

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET

Andrej Pavlić

**UTJECAJ NIKLA KAO PRODUKTA  
KOROZIJE NIKAL-TITANIJSKE LEGURE  
DENTALNIH MATERIJALA NA  
KOMENZALNE BAKTERIJE LJUDSKOG  
ORGANIZMA**

DOKTORSKI RAD

Rijeka, 2019.



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET

Andrej Pavlić

**UTJECAJ NIKLA KAO PRODUKTA  
KOROZIJE NIKAL-TITANIJSKE LEGURE  
DENTALNIH MATERIJALA NA  
KOMENZALNE BAKTERIJE LJUDSKOG  
ORGANIZMA**

DOKTORSKI RAD

Mentor: Izv. prof. dr. sc. Stjepan Špalj  
Komentor: Izv. prof. dr. sc. Ivana Gobin

Rijeka, 2019.



UNIVERSITY OF RIJEKA  
FACULTY OF MEDICINE

Andrej Pavlić

**INFLUENCE OF NICKEL AS A PRODUCT  
OF CORROSION OF NICKEL-TITANIUM  
ALLOY OF DENTAL MATERIALS ON  
HUMAN COMMENSAL BACTERIA**

DOCTORAL THESIS

Mentor: Associate Professor Stjepan Špalj, PhD  
Co-mentor: Associate Professor Ivana Gobin, PhD

Rijeka, 2019



Mentor rada: Izv. prof. dr. sc. Stjepan Špalj, dr.med.dent.

Komentor rada: Izv. prof. dr. sc. Ivana Gobin, dipl. sanit. ing.

Doktorski rad obranjen je dana \_\_\_\_\_ na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci, pred povjerenstvom u sastavu:

1. Prof. dr. sc. Marina Šantić, dipl. sanit. ing.
2. Prof. dr. sc. Marina Lapter Varga, dr. med. dent.
3. Doc. dr. sc. Damir Klepac, mag. sanit. ing.
4. Izv. prof. dr. sc. Stjepan Špalj, dr.med.dent.
5. Izv. prof. dr. sc. Ivana Gobin, dipl. sanit. ing.

Rad ima \_\_\_\_\_ listova.

UDK: \_\_\_\_\_

## **PREDGOVOR**

Ovo istraživanje provedeno je u suradnji s Katedrom za ortodontiju, Zavodom za mikrobiologiju i parazitologiju, Katedrom za medicinsku kemiju, biokemiju i kliničku kemiju Medicinskog fakulteta u Rijeci te Hrvatskim zavodom za javno zdravstvo u Zagrebu. Financijska pomoć istraživanju osigurana je projektom Hrvatske zaklade za znanost „Imunosne i regenerativne implikacije korozije dentalnih materijala u djece i adolescenata – IMUNODENT (IP-2014-09-7500)“ voditelja Stjepana Špalja.

U provedbi rada puno su pomogli Gabrijela Begić, prof. dr. sc. Marin Tota, Hrvoje Jakovac te mentor prof. dr. sc. Stjepan Špalj i komentorica prof. dr. sc. Ivana Gobin.



## SAŽETAK

Cilj istraživanja: Ispitati utjecaj nikla na komenzalne bakterije ljudskog organizma. Fiksna ortodontska naprava *edgewise* tipa sadrži nikal, korodira te ga otpušta u ljudski organizam. Ispitivan je utjecaj nikla na rast bakterija, interakcija nikla i antibiotika na rast bakterija, sposobnost adaptacije istih bakterija na nikal te posljedična promjena njihovih svojstava.

Materijal i metode: Korištene su bakterije stanične kulture američkog tipa (engl. American Type Cell Culture, ATCC) i to *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* i *Escherichia coli*. Dilucijskom metodom uz pomoć resazurina određene su minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) nikla te antibiotika ciprofloksacina i ampicilina. Nasađivanjem na Mueller-Hinton agar određene su minimalne baktericidne koncentracije (MBK) za iste spojeve. Metodom šahovnice dobiveni su rezultati frakcijske inhibitorne koncentracije (FIK). Očitanjem mikrotitarskih ploča u spektrofotometrijskom uređaju dobivene su krivulje rasta. Bakterija *S. aureus* adaptirana je na različite koncentracije nikla te su određena fenotipska svojstva novih sojeva u vidu adhezije na različite podloge i osjetljivosti na niz antibiotika.

Rezultati: MIK nikla za sve bakterije je bio 1000 mg/L. MBK je bio u rasponu 1000 - 2000 mg/L. MIK za ampicilin je bio 1 – 2,5 mg/L (MBK 2 – 5) i 0,005 – 0,62 mg/L (MBK 0,005 – 1,25) za ciprofloksacin. Rezultati FIK-a za ciprofloksacin i nikal pokazali su antagonističko djelovanje spojeva u bakterija *E. coli* i *E. faecalis*, a aditivno u bakterije *S. aureus*. FIK za ampicilin i nikal pokazao je sinergističko djelovanje na *E. faecalis*, aditivno na *E. coli* te indiferentnu interakciju pri rastu *S. aureus*. Sojevi adaptirani na više koncentracije nikla (500 – 1000 mg/L) slabije su adherirali na površine od sojeva adaptiranih na više koncentracije i bili su osjetljiviji na antibiotike. Prema rezultatima MIK-a za adaptirane sojeve, sojevi adaptirani na 250 i 1000 mg/L Ni<sup>2+</sup> bili su rezistentiji na ciprofloksacin i gentamicin od drugih sojeva.

Zaključak: Čini se da bi koncentracije nikla otpuštene iz nikal-titanijskih ortodontskih žičanih lukova mogle dovesti do interakcije s antibioticima te, imajući u vidu sposobnost akumulacije nikla od strane bakterija, uzrokovati promjene svojstava bakterija.

**Ključne riječi:** nikal; bakterija; rezistencija; antibiotik

## SUMMARY

Objectives: To assess the influence of nickel on commensal bacteria of the human organism. An effect of nickel on the growth of bacteria, interaction of nickel and antibiotics on bacterial growth and the ability of bacterial adaptation to nickel and alteration of their properties was examined.

Material and methods: ATCC (American Type Cell Culture) bacterial strains were used; *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* and *Escherichia coli*. Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) were determined for nickel and for antibiotics ciprofloxacin and ampicillin by the dilution method with resazurin colouring. Minimum Bactericidal Concentrations (MBC) were determined by subculturing to Mueller-Hinton agar. The checkerboard method was used to obtain Fractional Inhibitory Concentrations. Microtiter plates were read on a spectrophotometric microplate reader to acquire bacterial growth curves. Furthermore, bacteria *S. aureus* was adapted to various concentrations of nickel and phenotype properties, such as ability of adhesion and biofilm formation, and antibiotic sensitivity of the new strains were tested.

Results: MIC for nickel for all tested bacteria was 1000 mg/L. MBC was in range 1000 - 2000 mg/L. MIC for ampicillin was 1 – 2,5 mg/L (MBC 2 – 5) i 0,005 – 0,62 mg/L (MBC 0,005 – 1,25) for ciprofloxacin. FIC results for ciprofloxacin and nickel demonstrated an antagonistic effect of the two agents when growth of *E. coli* and *E. faecalis* were assessed, and additive effect when *S. aureus* was assessed. FIC for ampicillin and nickel demonstrated a synergistic effect on the growth of *E. faecalis*, additive on *E. coli* but indifferent on the growth of *S. aureus*. Strains of *S. aureus* adapted to higher concentrations of nickel (500 - 1000 mg/L) showed decreased adhesion ability. According to the results of MIC of adapted bacteria, strains adapted to 250 and 1000 mg/L of Ni<sup>2+</sup> were more resistant to ciprofloxacin and gentamicin than the other strains.

Conclusion: Nickel released from orthodontic archwires could interact with antibiotics and possibly alter bacteria properties, having in mind their ability to concentrate it.

**Keywords:** nickel; bacteria; resistance; antibiotics

## SADRŽAJ

1.	UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA	1
1.1.	Nikal u usnoj šupljini	1
1.2.	Komenzalne bakterije ljudskog organizma	4
1.3.	Rast bakterija i čimbenici koji ga mijenjaju	8
1.4.	Učinak nikla na rast bakterija	10
1.5.	Utjecaj fluorida i probiotika na bakterijski rast	11
1.6.	Bakterije u biofilmu	12
2.	CILJ ISTRAŽIVANJA	14
3.	MATERIJALI I METODE	15
3.1.	Materijal	15
3.1.1.	Sojevi bakterija	15
3.1.2.	Spojevi	15
3.1.3.	Umjetna slina	16
3.1.4.	Ortodontski žičani lukovi	16
3.2.	Metode	17
3.2.1.	Određivanje koncentracije otpuštenih Ni <sup>2+</sup> iz ortodontskih žičanih lukova	17
3.2.2.	Uzgoj bakterija	17
3.2.3.	Priprema spojeva	18
3.2.4.	Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) i minimalne baktericidne koncentracije (MBK)	18
3.2.5.	Ispitivanje interakcije nikla i antibiotika	20
3.2.6.	Ispitivanje interakcije nikla i antibiotika metodom šahovnice na krivulje bakterijskog rasta	21
3.2.7.	Adaptacija bakterije <i>S. aureus</i> na nikal	22
3.2.8.	Ispitivanje utjecaja nikla i antibiotika na brzinu logaritamske faze bakterijskog rasta	23
3.2.9.	Funkcionalna svojstva bakterija <i>S. aureus</i> adaptiranih na različite koncentracije nikla	24
3.3.	Statistička analiza	27
4.	REZULTATI	28
4.1.	Otpuštanje Ni <sup>2+</sup> iz nikal-titanijskih žičanih lukova	28
4.2.	Određivanje minimalne inhibitorne i minimalne baktericidne koncentracije (MIK i MBK)	29
4.3.	Određivanje interakcije između nikla i antibiotika ampicilina i ciprofloksacina Frakcijskom inhibitornom koncentracijom (FIK)	29

4.4. Utjecaj različitih kombinacija koncentracija ciprofloksacina i nikla na rast bakterije <i>S. aureus</i>	33
4.5. Utjecaj različitih kombinacija koncentracija ciprofloksacina i nikla na rast bakterije <i>E. faecalis</i>	35
4.6. Utjecaj različitih kombinacija koncentracija ciprofloksacina i nikla na rast bakterije <i>E. coli</i>	37
4.7. Sinergistički i antagonistički učinak ciprofloksacina i nikla na rast bakterija <i>S. aureus</i> , <i>E. faecalis</i> i <i>E. coli</i>	39
4.8. Korelacije bakterijskog rasta s promjenom koncentracije antibiotika i metala	41
4.9. Utjecaj različitih kombinacija koncentracija ampicilina i nikla na rast bakterije <i>S. aureus</i>	42
4.10. Utjecaj različitih kombinacija koncentracija ampicilina i nikla na rast bakterije <i>E. faecalis</i>	44
4.11. Utjecaj različitih kombinacija koncentracija ampicilina i nikla na rast bakterije <i>E. coli</i>	46
4.12. Prikaz sinergističkog učinka ampicilina i nikla na rast bakterija <i>E. faecalis</i> i <i>E. coli</i>	48
4.13. Adaptacija bakterija <i>S. aureus</i> na nikal – morfološka obilježja	49
4.14. Utjecaj različitih kombinacija koncentracija ciprofloksacina i nikla na rast bakterije <i>S. aureus</i> adaptirane na 250 mg/L nikla	49
4.15. Usporedba krivulja rasta u različitim koncentracijama ciprofloksacina i nikla neadaptiranog i adaptiranih sojeva <i>S. aureus</i>	53
4.15.1. Adhezija adaptiranih sojeva bakterije <i>S. aureus</i> na polistiren	58
4.16. Adhezija adaptiranih sojeva bakterije <i>S. aureus</i> na NiTi i čelične ortodontske lukove	59
4.17. Sposobnost stvaranja biofilma adaptiranih sojeva bakterije <i>S. aureus</i> na polistiren	62
4.18. Sposobnost stvaranja biofilma adaptiranih sojeva bakterije <i>S. aureus</i> na NiTi i čelične ortodontske lukove	63
4.19. Antibiogram adaptiranih bakterija <i>S. aureus</i> na nikal	65
4.20. Ispitivanje antimikrobne osjetljivosti na nikal adaptiranog <i>S. aureus</i>	70
5. RASPRAVA	71
6. ZAKLJUČCI	79
7. LITERATURA	80
ILUSTRACIJE	96
Popis slika	96
Popis tablica	99
POPIS POKRATA	100
ŽIVOTOPIS	102



## 1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

### 1.1. Nikal u usnoj šupljini

Ortodontska terapija korigira položaj zubi i odnos između zubnih lukova te ima za cilj postizanje optimalne harmonije položaja zubi, funkcije žvačnog sustava i izgleda lica. Najčešće se provodi fiksnom napravom *edgewise* tipa u trajanju od prosječno 2 do 3 godine. Iako postoje razne naprave koje se koriste u ortodontskoj terapiji, terapiju *edgewise* napravom možemo proglašiti zlatnim standardom. Naprava se sastoji od metalnih elemenata; bravica, cjevčica, prstenova i žičanih lukova. Uz plemeniti čelik i legure željeza, najčešći gradivni elementi jesu nikal i titanij. Iako postoje i nemetalne verzije bravica, žičani lukovi su uvijek metalni, od kojih su jedni od najčešće korištenih lukovi od legura nikla i titanija zbog, u vidu pomaka zuba, optimalnih fizikalnih svojstava (Slika 1.) [168]. Broj pacijenata koji ulaze u ortodontsku terapiju je u porastu [152]. Uz djecu i adolescente, kao još uvijek najzastupljeniju populaciju među ortodontskim pacijentima, sve više odraslih odlučuje se za ortodontsku terapiju [162]. S obzirom na važnost koja se pridaje vanjskom izgledu u modernom društvu te podizanje psihosocijalnog zdravlja eliminacijom malokluzije [92] za očekivati je i daljnji porast broja ljudi s ortodontskim napravama u ustima.



Slika 1. Fiksna ortodontska naprava *edgewise* tipa.



Slika 2. Ortodontski žičani lukovi od nikal-titanijske legure.

Nikal, koji se u ionskom obliku otpušta iz ortodontskih žičanih lukova (Slika 2.) za vrijeme ortodontske terapije, svrstava se u teške metale. Nikal je srebrno-bijele boje, visoke čvrstoće, kovnosti i vodljivosti s raznolikom primjenom zbog svojstva dobre otpornosti na koroziju. Ima uporabu u proizvodnji nehrđajućeg čelika, baterija (nikal–kadmij), nakita, u elektronici, aeronautici i slično [175]. Čovjek u kontakt s niklom dolazi najčešće putem hrane i nakita. Namirnice bogate niklom su čokolada, zob i orašasti plodovi [37]. Nadalje, unosi se pripremanjem hrane, otpuštanjem iz posuđa od nehrđajućeg čelika, za koje se pokazalo da otpuštanje nikla značajno varira među raznim proizvođačima istoga, te se povećava dugotrajnim kuhanjem [48]. Tolerabilni dnevni unos je 1 mg [28], dok je prosječni procijenjeni dnevni unos hranom, vodom i dodacima prehrani oko 260 µg [116]. Bez obzira na smjernice za izradu i prodaju nakita, otpuštanje nikla iz istoga je još uvijek na zabrinjavajućem nivou [163]. Nikal je s biološkog aspekta zanimljiv kao najčešći kontaktni alergen u svijetu [155]. U osjetljivih osoba javlja se kasni tip alergijske reakcije te dolazi do upalnih promjena na koži i/ili sluznici [141].

Još jedan od potencijalnih unosa nikla u ljudski organizam jest prisustvo ortodontskih naprava u usnoj šupljini. S obzirom na trajanje ortodontske terapije, moguć je unos značajnih količina iona u organizam. Poznato je da uslijed procesa korozije navedeni elementi naprave otpuštaju metale u usnu šupljinu [169]. Okoliš usne šupljine je, zbog svojih ionskih, enzimskih i mikrobioloških svojstava, idealan milje za stimulaciju korozivnih procesa [69]. U nikal-titanijskim (NiTi) ortodontskim legurama, oba metala su zastupljena u otprilike jednakim omjerima. Ioni nikla ( $Ni^{2+}$ ) se otpuštaju iz NiTi legure u okolinu u većoj koncentraciji u odnosu na ione titanija ( $Ti^{4+}$ ), koji

stvaraju sloj titanijskih oksida ( $\text{TiO}_x$ ) na površini, uglavnom u obliku titanijevog dioksida ( $\text{TiO}_2$ ) [65]. I u terapiji nemetalnim bravicama očekujemo otpuštanje metala zbog korozije žičanih lukova i opruga [72]. Oblaganjem površine NiTi legure mogu se promijeniti korozivna svojstva materijala, tako primjerice rodijska obloga pojačava koroziju, a oblaganje nitridom je smanjuje [71]. Titanij se također otpušta iz žica za vrijeme ortodontske terapije, pokazujući slične koncentracije kao nikal [9]. Zabrinjavajući su pokazatelji da se metali otpušteni u usnoj šupljini zadržavaju u ljudskom organizmu za vrijeme terapije [68]. Povišene razine nikla su nađene u slini i gingivnoj sulkusnoj tekućini pacijenata u ortodontskoj terapiji fiksnim napravama [12], [32]. Prosječno se dnevno otpušta oko 40  $\mu\text{g}$  nikla iz fiksne ortodontske naprave [127], s time da je najveće otpuštanje iz ortodontskih naprava tijekom prvog tjedna [62], uz značajno usporavanje otpuštanja kroz vrijeme [130], [64]. Ioni nikla otpušteni iz fiksnih ortodontskih naprava mogli bi dovesti do toksičnih efekata [104]. Otpuštanje je zavisno od niza čimbenika - tehnologiji proizvodnje, galvanskim prevlakama i sastavu legura, ali validnost mjerenja ovisi o analitičkim tehnikama i granicama detekcije [105], [115]. Intraoralni uvjeti poput pH vrijednosti sline, prisustva fluorida te proizvoda za održavanje oralne higijene mogu pridonijeti povećanom otpuštanju iona nikla [95].

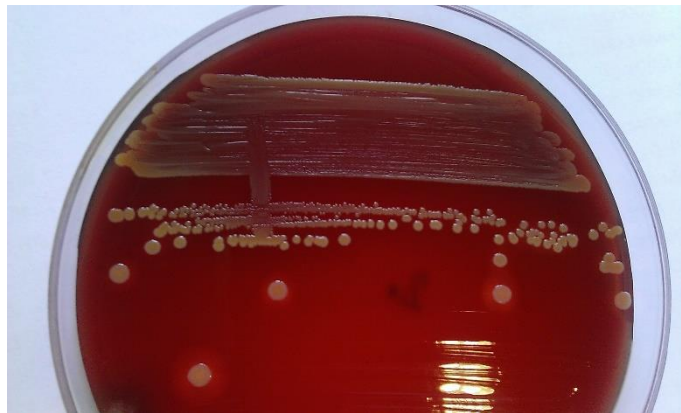


## 1.2. Komenzalne bakterije ljudskog organizma

Ljudski organizam sadrži barem deset puta više prokariotskih, bakterijskih stanica nego vlastitih eukariotskih. Uvriježeni nazivi za te bakterije su: komenzalne bakterije ljudskog organizma, ljudska bakterijska mikrobiota ili ljudska bakterijska flora. Pojam označava bakterijsku mikrobiotu koja je prisutna unutar i na koži čovjeka [44]. Uz bakterije, ljudski organizam je dom nizu virusa i gljiva koje zajedno s bakterijama čine kompletan mikrobiom ljudskog organizma koji ima veliku važnost za homeostazu i uredno funkcioniranje organizma [14], [106]. Komenzalne bakterije važne su za modeliranje metaboličkog fenotipa, funkcioniranje imunološkog sustava, apsorpciju hranjivih tvari te zaštitu od raznih patogena [167]. Istraživanja potvrđuju kako komenzalne bakterije probavnog sustava imaju utjecaj na razvoj niza bolesti. Niz čimbenika uvjetuje komenzalnost ljudske bakterijske flore, odnosno njihovu nepatogenost za domaćina. Jedan od njih je i lokacija na kojoj se nalaze, primjerice neke bakterije će biti komenzali u jednom organskom sustavu, a patogeni u drugom [146]. Tako će u pacijenata koji aspiriraju sadržaj probavnog sustava, komenzalne bakterije probavnog sustava postati ozbiljni patogeni u dišnom sustavu. Primjerice oralni komenzal, *Actinomyces* može stvoriti ozbiljne zdravstvene probleme nađe li se u drugom dijelu organizma [98]. Također, stanja poput infekcija, bolesti, rana, starenja i imunodeficijentnih stanja mogu potaknuti patogeni potencijal komenzala [13].

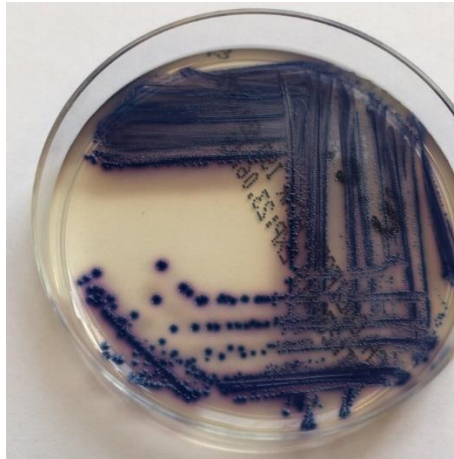
*Staphylococcus aureus* je Gram pozitivna bakterija i fakultativni anaerob (Slika 3.). Kao komenzal najčešće je u ljudi prisutan na koži, no u dijelu populacije nalazi ga se na sluznici nosa [110]. Smatra se da je 20% populacije stalni nosilac *S. aureus*, a čak 60% intermitentni [46]. Iako ljudska populacija čini veliki dio rezervoara *S. aureus*, radi se o vrlo adaptabilnoj bakteriji, sposobnoj preživjeti teške okolišne uvjete te se može naći u zraku, prašini, kanalizaciji i vodi [143]. S druge strane, to je bakterija odgovorna za invazivne, po život opasne infekcije, poput bakterijemije, infektivnog endokarditisa i osteomijelitisa. Mehanizmi infekcije su najčešće transfer bakterije na otvorenu ranu, hrana te bolničke infekcije. Uzročnik je mnogobrojnih kožnih infekcija, impetiga, celulitisa, folikulitisa, akni i atopičnog dermatitisa [170]. Izoliran je u slučajevima rekurentnog tonzilitisa i rinosinitisa [177]. Soj *S. aureus* odgovoran je za izuzetno tešku nekrotizirajuću upalu pluća [90]. Također, radi se o bakteriji čiji sojevi pokazuju izraženu rezistenciju prema mnogim poznatim antibioticima [31]. Antibiotici

koji se koriste u liječenju infekcija uzrokovanih *S. aureus* jesu penicilinaza-resistentni penicilini, cefalosporini, eritromicin, klindamicin i dr. [84].



Slika 3. Kolonije bakterije *Staphylococcus aureus* na podlozi.

*Escherichia coli* je Gram negativni fakultativni anaerob (Slika 4.). Svaki sisavac, a čak i neke hladnokrvne životinje kolonizirane su tom bakterijom [34]. Najčešće je prvi kolonizator novorođenčeta te ostaje u probavnom sustavu čovjeka cijeloga života [126]. Primarno kolonizira debelo crijevo, do kojega može doći peroralnim putem, te preživjeti uvjete niskog pH koji su prisutni u gornjem dijelu probavnog sustava [39]. Kao komenzal ima višestruku važnost za urednu homeostazu; proizvodi vitamin K i vitamin B12, natječe se s patogenim bakterijama za nutrijente u crijevima te na taj način prevenira razvoj bolesti [85], [164], [20]. Na primjer, kompeticijom za željezo djeluje protektivno protiv patogena *Salmonella typhimurium* [63]. Ipak, tanka je linija između korisnog komenzalizma i patogenog potencijala *E. coli* [87]. Istraživanja potvrđuju kako neki serotipovi mogu djelovati kao komenzali, no mogu i potencirati kronične upalne promjene na crijevima [22], [77]. Dokazano je da insercija samo jedne sekvencije deoksiribonukleinske kiseline (DNK) može promijeniti tihi komenzal *E. coli* u patogena [134]. Kao patogen, *E. coli* je uzročnik većine infekcija mokraćnog sustava [49]. Vodeći je uzročnik putničke dijareje te se patogeni sojevi većinom prenose hranom i vodom [144]. Također uzrokuje i neonatalni meningitis i bakterijemiju [25]. U liječenju infekcija uzrokovanih *E. coli* koriste se amoksicilin, amoksicilin s dodatkom klavulanske kiseline, cefaleksin, norfloksacin, ciprofloksacin, trimetoprim [102]. Studija iz 2018. pokazuje da komenzalne *E. coli* mogu biti rezervoar gena odgovornih za povećanu rezistenciju prema antibioticima te izvor pojačane rezistencije prema ciprofloksacinu [83].



Slika 4. Kolonije bakterije *Escherichia coli* na kromogenoj podlozi.

*Enterococcus faecalis* je Gram pozitivni fakultativni anaerob te komenzal probavnog sustava (Slika 5.) [40]. Njegova važnost kao komenzalne bakterije nije proučena kao ona *E. coli*, no poznata je u smislu kompeticije s egzogenim patogenima te stimulacije imunskog odgovora ljudskog organizma [79]. Ipak, kao i prethodno spomenute bakterije, u određenim uvjetima ima patogeni potencijal. Pri transferu u drugu anatomsku regiju, od komenzala može postati ozbiljan patogen [100]. Najčešće uzrokuje infekcije mokraćnog sustava u starijih muškaraca [58]. Enterokoki su drugi najznačajniji uzročnik bakterijemije stečene u bolničkom okruženju, ali i općenito jedan od najznačajnijih uzročnika svih bolničkih infekcija [40]. Dovode do 5 – 15 % svih slučajeva bakterijskog endokarditisa [112], a mogu uzrokovati i peritonitis, abdominalne i zdjelične apscese [43]. Zanimljivo je da je *E. faecalis* česti izolat u neuspješno endodontski liječenim periapikalnim procesima [147].

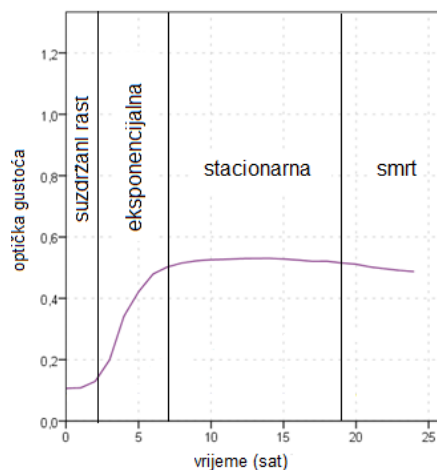


Slika 5. Kolonije bakterije *Enterococcus faecalis* na krvnom agaru.

Osim u slučajevima endokarditisa i pacijenata s alergijom, antibiotici izbora za liječenje infekcija uzrokovanih bakterijom *E. faecalis* su ampicilin i penicilin. Alternativno se mogu koristiti amoksisicilin/klavulanska kiselina, piperacilin-tazobaktam, vankomicin i teikoplanin [176]. *In vitro* upotreba ciprofloksacina pokazuje obećavajuće rezultate [3].

### 1.3. Rast bakterija i čimbenici koji ga mijenjaju

Bakterije se dijele nespolnim razmnožavanjem ili staničnim dijeljenjem, u kojem od jedne stanice nastaju dvije genetski istovjetne stanice kćeri. Rast bakterija može se podijeliti u nekoliko faza: fazu suzdržanog rasta ili lag fazu, eksponencijalnu ili log (logaritamsku) fazu, stacionarnu fazu i fazu smrti stanica (Slika 6.) [78].



Slika 6. Faze bakterijskog rasta prikazane na krivulji optička gustoća (engl. optical density, OD)/vrijeme.

U fazi suzdržanog rasta bakterije se pripremaju za rast. Nakon iznenadnog dolaska u okruženje u kojem će im rast biti moguć, njihov primarni interes je dobivanje na biomasi te iskorištavanje dostupnih nutrijenata prije suparnika. Često se suzdržani rast opisuje kao adaptacijski period pri promjeni iz niskog u visoke metaboličke zahtjeve. Ova faza manje je izučavana od eksponencijalne (logaritamske ili log) faze, u kojoj bakterije, izvan laboratorijskih uvjeta, provode malo vremena. Ipak, dokazano je da se bakterije u lag fazi s genetskog aspekta intenzivno pripremaju za nadolazeće povećanje biomase proizvodeći enzime za iskorištavanje ugljika [97].

Eksponencijalna faza je dio rasta karakteriziran udvostručavanjem broja stanica. Broj novih stanica koje se pojavljuju po jedinici vremena jest proporcionalan trenutnoj populaciji stanica. Dok je moguće, udvostručenje broja stanica se nastavlja konstantnom brzinom. Rast u ovoj fazi je dosta prediktabilan i može se opisati matematičkim jednadžbama. Kada se log faza prikaže kao rast broja stanica u prirodnom logaritmu na apscisi vremena, dobiva se ravna linija [182].

Većina mikroorganizama prisutnih u zraku, vodi, zemlji uglavnom se nalaze u stacionarnoj fazi [42]. Ulazak bakterija u stacionarnu fazu može biti uzrokovan nizom čimbenika; ograničenom količinom određenog nutrijenta, akumulacijom toksičnih nusprodukata, prisutnošću stresora poput promjena u pH, temperaturi, osmolarnosti itd. Kada stanica uđe u stacionarnu fazu, dolazi do smanjenja njene veličine i do povećanja omjera količine DNK i količine bjelančevina [122].

U fazi smrti dolazi do odumiranja bakterijskih stanica zbog manjka nutrijenata, promjene pH te nakupljanja produkata metabolizma koji ograničavaju rast [35].

Antimikrobni učinak agensa može se evaluirati minimalnom inhibitornom koncentracijom (MIK) i minimalnom baktericidnom koncentracijom (MBK). MIK je definiran kao najniža koncentracija antimikrobnog agensa koja zaustavlja vidljiv rast mikroorganizma tijekom 24 sata. MBK je najniža koncentracija agensa koji će ubiti mikroorganizme što dokazujemo presađivanjem na medij bez antimikrobnog agensa. MIK je čest laboratorijski postupak koji se koristi za potvrdu rezistencije, ali najčešće se koristi da se odredi *in vitro* aktivnost novih antimikrobnih spojeva. Određivanje MBK se provodi rjeđe, najčešće za izolate iz krvi pacijenata s endokarditisom [7]. Metode određivanja su standardizirane, u Europskoj Uniji prema Europskom odboru za ispitivanje antimikrobne osjetljivosti (engl. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST).

Najvažniji čimbenici koji utječu na rast bakterija su kisik, temperatura, pH i osmotski tlak. Ovisno o prisustvu kisika bakterije se dijele na striktne aerobe, striktne anaerobe, fakultativne anaerobe i mikro-aerofile. Striktni aerobi mogu rasti samo u prisustvu kisika, striktni anaerobi samo u uvjetima bez kisika. Fakultativni anaerobi mogu rasti i sa i bez kisika dok mikro-aerofili rastu u minimalnim količinama kisika. S obzirom na temperaturu okoline, bakterije mogu rasti u nižim temperaturama 4 - 10 °C, srednje visokim temperaturama 15 – 45 °C (mezofili) i visokim temperaturama 45 – 90 °C (termofili). Iako većina bakterija raste pri neutralnom pH od 7, postoje acidofilne i bazofilne bakterije koje rastu pri nižem ili višem pH. Osmotski tlak odnosi se na koncentraciju soli u okolini te različite bakterije mogu tolerirati različite koncentracije [113].

#### 1.4. Učinak nikla na rast bakterija

Učinak nikla na bakterijski rast je dvostruk i ovisan o koncentraciji. Pronađeni su mehanizmi kojima bakterije omogućavaju unos nikla te istraživanja potvrđuju niz bakterijskih enzima čiji je kofaktor nikel [111], [89]. S druge strane, opisani su i mehanizmi efluksa nikla i drugi sustavi detoksikacije vezani za nikel. Očito je da svi ti procesi dovode do homeostaze nikla u bakterija [89]. Istraživanje na bakteriji *S. aureus* pokazalo je da ona koristi nikel kao enzimatski kofaktor te njegovim unosom raste virulencija same bakterije [36]. Bakterije uglavnom akumuliraju metale iz svoje okoline, isto vrijedi i za nikel. Primjerice, kod bakterije *E. coli* koja je rasla na agaru s 1  $\mu\text{M}$  nikla nađeno je 30  $\mu\text{M}$  istog metala [135]. S druge strane, karakterističan odgovor bakterije na visoke koncentracije metala u okolini je sintetiziranje efluks pumpe te redukcija unutarstanične koncentracije metala [117]. Najčešće su efluks sustavi opisani u bakterija koje su bile u okolišu s izuzetno visokim koncentracijama nikla. Efluks pumpa za nikel prisutna je i u *E. coli* [137]. Nadalje, mehanizmi poput eliminacije nikla preko vakuola te proizvodnje nikal sulfida kako bi se smanjila koncentracija okolišnih niklovih iona mogu braniti bakteriju od štetnih koncentracija [96].

Nikal može djelovati toksično na bakterije i to na više načina; 1) način da nikel zamijeni esencijalni metal u metaloproteinu, 2) vezivanje nikla za katalitički ostatak nemetalnog enzima, 3) vezivanje nikla izvan katalitičkog mjesta enzima, 4) oksidativni stres koji zahvaća proteine, DNK ili lipide [96].

Razni oblici nikla pokazali su se kao učinkovit agens u kontroli rasta oralnih bakterija [74]. Zanimljivo je da se kao terapijsko svojstvo u eliminaciji nekih bakterija, poput *E. coli* može koristiti nikel [29], dok je s druge strane prehrana bez nikla pokazala bolji terapijski učinak na eradikaciju *Helicobacter pylori* [18]. Jedno istraživanje na izoliranim bakterijama iz okoliša pokazuje bakteriostatski učinak  $\text{Ni}^{2+}$  u koncentracijama 512 – 1024 mg/L na Gram pozitivne koke, Gram negativne štapičaste bakterije i nefermentirajuće Gram negativne štapičaste bakterije [136]. Izgleda da terapija fiksnim ortodontskim napravama ne mijenja sastav oralnog biofilma tijekom perioda od 6 mjeseci [67].

Oralna bakterijska flora adherira na ortodontske žičane lukove i to bolje na NiTi u usporedbi s čeličnim [76]. Fiksna ortodontska naprava ima antibakterijski potencijal, no on je slab [45].

## 1.5. Utjecaj fluorida i probiotika na bakterijski rast

Uz antibiotike i metale, utjecaj na bakterijski rast imaju fluoridi. Fluoridi imaju poznato antibakterijsko djelovanje kroz više biokemijskih procesa [56]. Upotreba natrijevog fluorida, koji se koristi kao antikariogeni agens, nije pokazala promjene u oralnih komenzala [153]. S obzirom na široku primjenu i sustavne primjene fluorida u nekim zemljama, raspravlja se o mogućem utjecaju na komenzale probavnog sustava [38]. Studija na miševima je potvrdila inhibiciju kariogenih bakterija, ali ne i utjecaj na komenzale probavnog sustava [173]. Poznato je da bakterije imaju razvijen mehanizam obrane od visokih koncentracija fluora u okolišu [10]. Neki ortodontski adhezivi sadrže te otpuštaju fluor u cilju prevencije pojave inicijalnih karijesnih lezija tijekom ortodontske terapije. Koncentracije otpuštene prvih 28 dana mogu iznositi nešto iznad 10 ppm fluora. Ortodontski adhezivi imaju niski potencijal rezervoara fluorida, a otpuštanje fluorida ne pokazuje biološki relevantnu genotoksičnost [158].

Probiotici su tradicionalno predstavljali bakterije probavnog sustava koje su se koristile za liječenje razne simptomatologije problema probavnog sustava [15]. Najčešće korišteni sojevi probiotika u svrhu poboljšanja oralnog zdravlja su *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* i *Streptococcus*. Istraživanja su potvrdila kako njihova primjena utječe na smanjenje bolesti poput karijesa, gingivitisa i parodontitisa [150], [16], [82], [47]. Čak i probiotici mliječnih proizvoda mogu poboljšati oralno zdravlje [114]. S druge strane, sve učestalija primjena probiotika može djelovati na pojačanu koroziju metala. Istraživanje koje je ispitivalo intenzitet korozije NiTi ortodontskih žica u slini i u slini s dodatkom oralnog probiotika pokazalo je da probiotik pojačava generaliziranu koroziju u rodiranih NiTi te lokaliziranu u neobloženih NiTi [159].

Sve učestalija pojava rezistentnih sojeva bakterija jedan je od najznačajnijih globalnih medicinskih problema [174]. Iako se ta pojava najčešće pripisuje učinku pretjerane i pogrešne upotrebe antibiotika, postoje dokazi kako do pojave rezistencije na antibiotike može doći i drugim mehanizmima. Unazad zadnjih 20 - 25 godina pokazalo se da određeni metali mogu stimulirati razvoj rezistentnih sojeva na antibiotike [178]. Do razvoja može doći na dva načina; jedan je da se u samoj bakterijskoj stanici nalaze geni odgovorni za rezistenciju i na antibiotike i na metale, a drugi da postoji jedan mehanizam odgovoran za rezistenciju i na metale i na antibiotike. Niz istraživanja pokazuje da u eko-sustavima poput stajaćih voda, otpadnih voda i tla



postoje izolati bakterija koji pokazuju otpornost i na antibiotike i na metale [136], [121], [21]. Nadalje, dokazano je postojanje komenzalnih životinjskih sojeva koji su rezistentni na antibiotike i metale [33]. Nikal također može biti jedan od metala koji može potencirati razvoj rezistencije. U zemlji kontaminiranoj niklom nađen je veći broj gena vezanih za rezistenciju na beta laktamske antibiotike. U većoj koncentraciji nikla nađeno je više gena vezanih za rezistenciju na antibiotike [61]. Uz razvoj prave rezistencije, smatra se da bi metali mogli djelovati na način da, kada se nađu u istom okolišu s antibioticima, keliraju s istima te na taj način smanjuju njihovo djelovanje na bakterije [180]. Recentna studija koja je ispitala djelovanje teških metala na bakterije ukazuje na nekoliko značajnih pojava; niske koncentracije metala, 64 puta manje od MK-a, dovele su do pojačavanja rezistencije na antibiotike u ispitivane bakterije iz roda *Enterobacteriaceae*. Također je primijećena pojačana rezistencija na dva različita antibiotika, inicirana raznim metalima, u više vrsta bakterija [23].

## 1.6. Bakterije u biofilmu

Bakterije su uglavnom prisutne u okolišu u dva oblika, planktonskom ili slobodnom te u biofilmu. Biofilm je sesilna bakterijska zajednica ugrađena u matriks polisaharida koja se razvija na površinama [124]. Bakterije imaju niz prednosti u biofilm formaciji; veću otpornost na antibiotike, dezinficijense i okolišne stresore [53]. Iz ljudske perspektive, biofilm predstavlja problem u nizu polja, prehrambenoj industriji, nautici, industriji papira, ali i dentalnoj medicini i bolničkim institucijama [172], [52].

Posebna važnost biofilma u usnoj šupljini u patološkim procesima dovela je do toga da su vrlo dobro izučene njegove karakteristike. Nastanak biofilma je dinamičan proces [80]. Prvi korak je adhezija planktonskog organizma na neku površinu koju slijedi agregacija istih ili drugih mikroorganizama te formiranje biofilma. Razvoj biofilma završava fazom disperzije mikroorganizama iz biofilma. Biofilm se sastoji od mnogih organizama povezanih matriksom izlučenih polimernih molekula. Matriks im daje zaštitu, omogućava adheziju, stabilizaciju i prehranu. Sadržaj mikroorganizama u biofilmu je oko 5% [54]. U usnoj šupljini nalazimo različite oblike biofilma. Površine na kojima se može stvarati su prirodni zubi, protetski nadomjesci i dentalni implantati. Biofilm stvoren na površini zuba naziva se dentalni plak ili dentalni biofilm. Dentalni plak sastoji se od niza mikroorganizama uronjenih u vanstanični matriks raznih

polimera. Ključan je etiološki čimbenik u nastanku zubnog karijesa i parodontnih bolesti [109], [99]. Mjesta gdje nastaje su često teško dostupna biocidima, te njegova eliminacija može biti izazov [30]. Oralni biofilm stvara se i na zubnim protezama gdje često uključuje oportunističkog patogena *Candida albicans* koja vrlo dobro adherira na akrilatni materijal proteze [148]. Čak 65% pacijenata s protezama imaju neki oblik stomatitisa, često uzrokovanog biofilmom gljivice *Candida albicans* [133]. Bakterije mogu adherirati i stvarati biofilm na dentalnim implantatima, dovodeći do razvoja mukozitisa, periimplantitisa te posljedičnog gubitka kosti oko implantata [142]. Biofilm se može stvarati i na elementima ortodontskih naprava. Razvijeni su i agensi za oblaganje bravica u cilju redukcije bakterijske adhezije [27]. Osim na bravicama, biofilm se može stvoriti i na ortodontskim žičanim lukovima [149].

Uzevši u obzir dugotrajnu prisutnost ortodontskih naprava i ortodontskih žičanih lukova usnoj šupljini, potvrđeno otpuštanje metala te njihov akumulativni potencijal, ali i istražene interakcije istih s ljudskom mikrobiotom, bilo bi potrebno ispitati učinak niklovih iona na bakterije u ljudskom organizmu koje su izložene istima.

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Temeljni cilj istraživanja bio je:

- Ispitati ponašanje komenzalnih bakterija ljudskog organizma *S. aureus*, *E. coli* i *E. faecalis* pri sub-inhibitornim koncentracijama nikla u *in vitro* modelu

Specifični ciljevi:

- Odrediti koncentracije u kojima ioni  $\text{Ni}^{2+}$  djeluju inhibitorno i baktericidno na bakterije *S. aureus*, *E. coli* i *E. faecalis*
- Odrediti koncentracije iona  $\text{Ni}^{2+}$  koje se otpuštaju iz ortodontskih žičanih lukova
- Odrediti krivulje rasta bakterija pri različitim pojedinačnim koncentracijama iona nikla
- Ispitati utjecaj različitih kombinacija nikla i odabranih antibiotika na rast navedenih bakterija i odrediti krivulje rasta
- Postepenim izlaganjem sve većim koncentracijama nikla izolirati i karakterizirati na nikal adaptirane bakterije *S. aureus* te ispitati njihovu osjetljivost na različite antibiotike
- Proučiti sposobnost adhezije adaptiranih sojeva modelne bakterije *S. aureus* i stvaranja biofilma na NiTi legurama, nehrđajućem čeliku i polistirenu.

Hipoteze ovog istraživanja su:

- Pretpostavljamo da će ioni nikla djelovati inhibitorno na ispitivane bakterije i da će interferirati s antibioticima.
- Vjerojatno će adaptirani sojevi bakterije *S. aureus* biti otporniji na baktericidne koncentracije u odnosu na neadaptirani soj te će pokazati drugačija fenotipska svojstva.
- Ne očekujemo da će doze koje se otpuštaju tijekom nošenja ortodontske naprave izazvati bakteriostatski efekt, no kumulativnim učinkom je moguće da izazovu veću rezistenciju bakterija na antibiotike.
- Očekujemo da će adaptirane bakterije pokazati bolju adheziju i stvaranje biofilma na NiTi leguri, nehrđajućem čeliku i polistirenu.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Materijal

##### 3.1.1. Sojevi bakterija

Ispitivane bakterije su standardizirani sojevi iz Američke zbirke staničnih kultura (engl. American Type Cell Culture, ATCC) i to *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922 i *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. Bakterije su se čuvale zamznute na -80 °C u 10%-tnom glicerolu te su potom odležane i uzgajane na Mueller-Hinton (MH) bujonu i agaru (Biolife Italiana, Milano, Italija). Bakterije su uzgajane na 37 °C tijekom 24 sata.

##### 3.1.2. Spojevi

Spoj korišten za ispitivanje učinka nikla bio je  $\text{NiCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$  (Sigma-Aldrich, St Louis, SAD). Ispitivani antibiotici bili su ampicilin ( $\geq 845 \mu\text{g}$  po mg, Sigma-Aldrich, St Louis, SAD) i ciprofloksacin (98%, Sigma-Aldrich, St Louis, SAD). Ispitivani antibiotici u antibiogramu u disk obliku (BioRad Laboratories Inc., Hercules, SAD) su bili:

- penicilin (1 internacionalna jedinica) -P
- klindamicin (2  $\mu\text{g}$ ) - CMN
- eritromicin (15  $\mu\text{g}$ ) - ERY
- gentamicin (10  $\mu\text{g}$ ) - GMN
- cefoksitin (30  $\mu\text{g}$ ) - FOX
- teikoplanin (30  $\mu\text{g}$ ) - TEC
- linezolid (10  $\mu\text{g}$ ) - LIN
- ciprofloksacin (5 $\mu\text{g}$ ) - CIP
- rifampicin (5  $\mu\text{g}$ ) - RIF
- trimetoprim + sulfametoksazol (1,25  $\mu\text{g}$  + 23,75  $\mu\text{g}$ ) - SXT
- moksifloksacin (5  $\mu\text{g}$ ) – MOX

### 3.1.3. Umjetna slina

Za ispitivanja sposobnosti adhezije i stvaranja biofilma adaptiranih sojeva bakterije *S. aureus* na nikal korištena je umjetna slina Tani-Zucchi, sastava: 1,5 g/L KCl; 1,5 g/L NaHCO<sub>3</sub>; 0,5 g/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>–H<sub>2</sub>O; 0,5 g/L KSCN; 0,9 g/L mliječne kiseline [131]. Mliječna kiselina je korištena kao pufer za postizanje pH koji je stavljen na definirane vrijednosti u rasponu od 4,8 - 6,6 ovisno o dijelu eksperimenta.

### 3.1.4. Ortodontski žičani lukovi

U ispitivanjima su korišteni sljedeći ortodontski žičani lukovi:

- četvrtasti nikal-titanijski žičani lukovi dimenzija 0,018 x 0,025 inča ili 0,46 x 0,63 mm i 0,020 x 0,020 inča ili 0,51 x 0,51 mm (Dentsply GAC, York, Pennsylvania, Sjedinjene Američke Države)
- četvrtasti čelični žičani lukovi dimenzija 0,018 x 0,025 inča ili 0,46 x 0,63 mm (American Orthodontics, Sheboygan, Wisconsin, Sjedinjene Američke Države)

## **3.2. Metode**

### **3.2.1. Određivanje koncentracije otpuštenih Ni<sup>2+</sup> iz ortodontskih žičanih lukova**

Sva ispitivanja su provedena paralelno na tri uzorka. Dinamika i mjerenje otpuštanja iona Ni<sup>2+</sup> je provedeno na uzorcima žičanih lukova dužine 10 cm i površine 2 cm<sup>2</sup>, uronjenih u 10 mL otopine umjetne sline pri pH vrijednostima od 4,8; 5,1 i 6,6 inkubiranih u vodenoj kupelji 28 dana na 37 °C. Mjerenje otpuštenih Ni<sup>2+</sup> mjereno je nakon 28 dana uronjenosti u umjetnu slinu različitih pH vrijednosti jer nije očekivano značajno odstupanje od linearnog otpuštanja tijekom vremena i u količinama koje bi bile na razini detekcije uređaja za mjerenje kroz kraća vremenska razdoblja [81]. Ispitivani raspon pH simulira stanja lošije i bolje oralne higijene, odnosno većeg i manjeg nakupljanja dentalnog biofilma te stupnja njegove maturacije.

Otpušteni ioni Ni<sup>2+</sup> mjereni su optičkom emisijskom spektroskopijom induktivno spregnutom plazmom (engl. inductively coupled plasma-optical emission spectroscopy - ICP-OES) na uređaju Thermo Elemental "IRIS Intrepid II" XSP Duo, (Thermo Electron Corporation, Austin, SAD), prema prethodno opisanim parametrima [73]. Količina otpuštenih iona Ni<sup>2+</sup> je izražena u µg/cm<sup>2</sup>.

### **3.2.2. Uzgoj bakterija**

Bakterijska suspenzija pripravljena je u MH bujonu (Biolife Italiana, Milano, Italija) te joj je određena optička gustoća pri 600 nm (engl. optical density, OD) pomoću spektrofotometrijskog uređaja koji mjeri apsorbanciju (Eppendorf BioPhotometer, Hamburg, Njemačka). Apsorbancija je sposobnost određene materije da apsorbira svjetlost određene valne duljine. Preciznije, kada je riječ o bakterijama, koristi se termin zamućenosti umjesto apsorbancije jer one uglavnom ne apsorbiraju svjetlost već joj mijenjaju smjer. Mjerač se sastoji od izvora svjetla, optičkog filtera ili monokromatora i detektora svjetlosti koja je prošla kroz uzorak. Apsorbanciju ili zamućenost uzorka računa se po sljedećoj formuli:  $A_\lambda = \log_{10} (I_0/I)$  gdje je  $A_\lambda$  apsorbancija određene valne duljine,  $I_0$  početni intenzitet svjetla te  $I$  intenzitet svjetla nakon prolaska kroz uzorak. Najčešće korištena valna duljina za mjerenja bakterijskih suspenzija je 600 nm jer ne oštećuje stanice ni njihovu DNK, što bi bio slučaj pri korištenju UV svjetla. Vrijednost

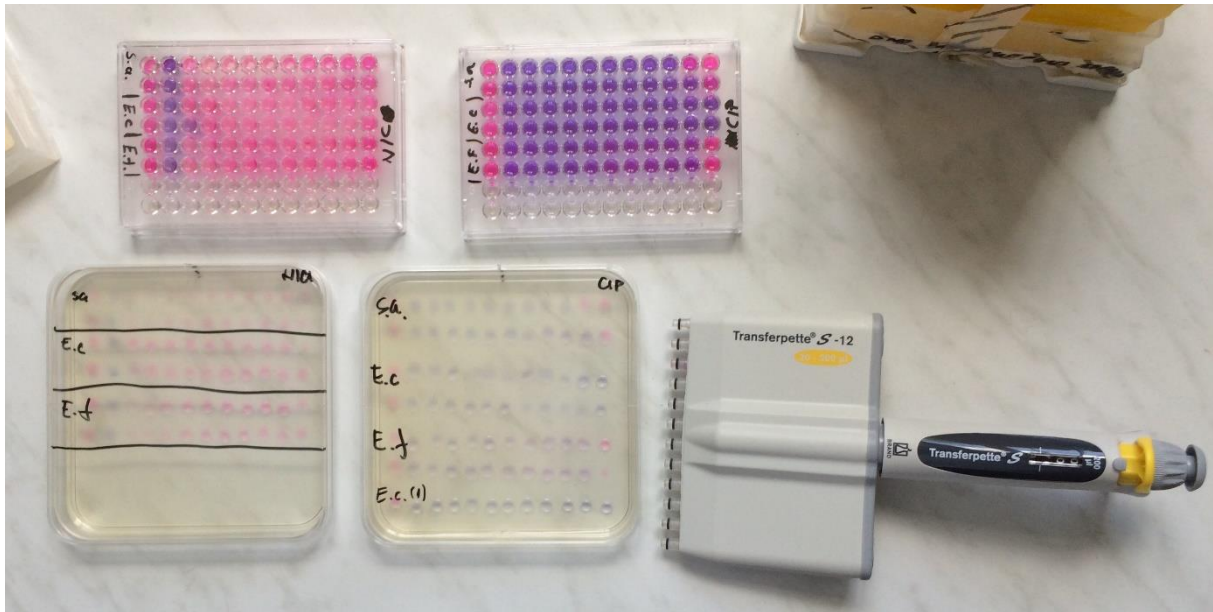
OD 1 pri 600 nm odgovara približnoj koncentraciji  $1 \times 10^9$  CFU/mL bakterija (engl. colony forming units, CFU). Kroz tri serije deseterostrukih razrijeđenja osnovne bakterijske suspenzije pripravljena je suspenzija od  $10^6$  bakterija. Broj bakterija u suspenziji je kasnije provjeren nasađivanjem deseterostrukih razrijeđenja na MH agar te inkubacijom kroz 24 sata na 37 °C.

### **3.2.3. Priprema spojeva**

Izvorna otopina  $\text{NiCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$  je pripravljena u dvostruko destiliranoj vodi s pH prilagođenim na 7 te je filtrirana kroz 0,45  $\mu\text{m}$  filter i pohranjena na 4 °C. Radna otopina je bila koncentracije 8000 mg/L. Izvorne otopine ampicilina i ciprofloksacina pripravljene su vaganjem praha na analitičkoj vagi (Nimbus, Adam Equipment, Milton Keynes, Ujedinjeno Kraljevstvo), dodavanjem praha sterilnoj fiziološkoj otopini (0.9% NaCl) te filtriranjem kroz 0,45  $\mu\text{m}$  filter. Radna koncentracija  $\text{NiCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$  otopine je pripravljena razrijeđenjima izvorne otopine. Za spomenutu otopinu, termini nikal i  $\text{Ni}^{2+}$  su korišteni kao sinonimi u daljnjem tekstu.

### **3.2.4. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) i minimalne baktericidne koncentracije (MBK)**

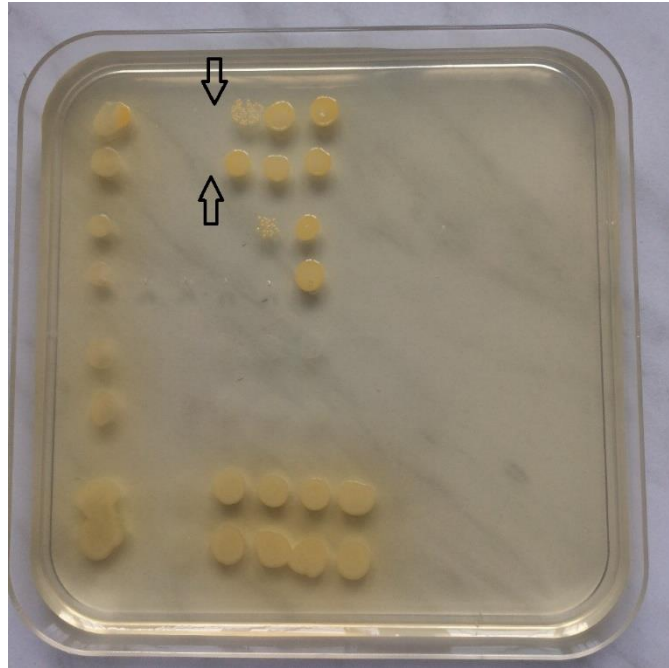
Za određivanje MIK-a korištena je dilucijska metoda uz pomoć 0,015% resazurina (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD). Resazurin je spoj plave boje koji u uvjetima povećanog staničnog metabolizma ireverzibilno mijenja boju u crvenu. Intenzitet boje proporcionalan je broju živih stanica [123]. U mikrotitarskim pločicama s 96 jažica (Vacutest Kima s.r.l., Arzergrande, Italija) načinjena su serijska dvostruka razrijeđenja testiranih spojeva u rasponu 2000 – 125 mg/L za nikal i 0,08 - 5 mg/ml za ampicilin i ciprofloksacin. U svaku jažicu je dodana bakterijska suspenzija ( $1 \times 10^6$  CFU/mL po jažici) i resazurin. Tri jažice su korištene kao kontrola sterilnosti i tri kao kontrole rasta. Nakon 24-satne inkubacije na 37 °C pločice su očitane vizualno. Najniža koncentracija koja nije pokazala promjenu boje (plava) je definirana kao MIK.



Slika 7. Mikrotitarske pločice po 24-satnoj inkubaciji u prisutnosti rezazurina te nasađivanje na MH agar u četvrtastim pločama (crvena boja označava porast bakterija, a plava izostanak rasta)

Nakon 24-satne inkubacije te određivanja MIK-a, bakterije su nasađene na MH agar u četvrtastim plastičnim pločama (Syntesys, Teolo, Italija) te ponovno inkubirane 24 sata (Slika 7.). Nakon inkubacije ploče su očitane. Najniža koncentracija u kojoj nije bilo porasta bakterija određena je kao MBK (Slika 8.).





Slika 8. Određivanje minimalne baktericidne koncentracije (MBK) – strelicama označen izostanak bakterija nakon presađivanja, ta koncentracija spoja određuje MBK.

### 3.2.5. Ispitivanje interakcije nikla i antibiotika

Kako bi se ispitala interakcija nikla i antibiotika na bakterijski rast korištena je metoda šahovnice (engl. checkerboard method). Najviše ispitivane otopine nikla i antibiotika bile su dvostruko veće od MIK-a. Pripremane su dvije sterilne mikrotitarske ploče. U ploču 1 dodano je 50  $\mu\text{L}$  MH bujona osim u 11. stupac u koji se dodaje 100  $\mu\text{L}$  radne otopine antibiotika te se potom 50  $\mu\text{L}$  antibiotika prenijelo u sve stupce osim u 1. i 2. stupac. U ploču 2 dodano je 100  $\mu\text{L}$  MH bujona u sve redove osim u G red u koji se dodaje 200  $\mu\text{L}$  radne otopine spoja metala. Potom je 100  $\mu\text{L}$  otopine metala preneseno u sve redove osim u A i B red. Nakon toga izvršen je transfer iz ploče 2 u ploču 1 prebacivanjem 50  $\mu\text{L}$  sadržaja u sve redove osim u B i A red. Zatim je u sve jažice ploče 1 dodano 100  $\mu\text{L}$  bakterijske suspenzije od  $1 \times 10^6$  CFU/mL. Ploča 2 je služila samo za pripremu, ploča 1 je analizirana. Pripremom na navedeni način dobiveno je 36 kombinacija različitih koncentracija antibiotika i metala. Koncentracija metala pada po redovima, od reda G prema redu C, dok koncentracija antibiotika pada po stupcima, od stupca 11 do stupca 3. Stupac 2 je korišten kao kontrola metala, a red B kao kontrola za antibiotik. U rubne redove (A i H) i stupce (1 i 12) dodano je 200  $\mu\text{L}$

destilirane vode kako bi se spriječilo isušivanje rubnih ispitivanih jažica. Ploče su potom stavljene na 24-satnu inkubaciju. Nakon inkubacije se vizualno očitava prisutnost ili odsutnost bakterijskog rasta uz pomoć resazurina.

Interakcija između različitih koncentracija antibiotika i nikla određena je Frakcijskom inhibitornom koncentracijom - FIK (engl. Fractionary Inhibitory Concentration, FIC). Evaluiran je sumarni FIK ( $\Sigma$ FIK) koji se dobiva niže opisanim izračunom:

$$FIK \text{ spoja } A = \frac{MIK \text{ spoja } A \text{ u kombinaciji}}{MIK \text{ spoja } A}$$

$$FIK \text{ spoja } B = \frac{MIK \text{ spoja } B \text{ u kombinaciji}}{MIK \text{ spoja } B}$$

$$\Sigma FIK = FIK \text{ spoja } A + FIK \text{ spoja } B$$

MIK spoja u kombinaciji označava minimalnu inhibitornu koncentraciju toga spoja kada je u kombinaciji sa drugim spojem. Primjerice, MIK antibiotika ciprofloksacina kada mu je dodan nikal.

Rezultati sumarnog FIK-a se interpretiraju na sljedeći način [161]:

- sinergična interakcija kada je  $\Sigma FIK < 0,5$
- aditivna interakcija kada je  $0.5 \leq \Sigma FIK \leq 1$
- indiferentna interakcija kada je  $1 < \Sigma FIK \leq 4$
- antagonistički učinak kada je  $\Sigma FIK > 4$

### **3.2.6. Ispitivanje interakcije nikla i antibiotika metodom šahovnice na krivulje bakterijskog rasta**

Na prethodno navedeni način pripremljene su nove mikrotitarske ploče te inkubirane u čitaču mikrotitarskih ploča (Microplate Reader ELX 808, Biotek, Vermont, SAD) kroz 24 sata. Mjerač svakih sat vremena očitava apsorbanciju ili optičku gustoću (engl. optical density, OD) bakterijske suspenzije pri 600 nm na temperaturi od 37 °C.

Mjerenja su načinjena u triplicatu. Krivulje rasta bakterija eksponiranih različitim koncentracijama antibiotika ciprofloksacina i ampicilina te metala nikla uspoređene su s kontrolnim krivuljama.

### 3.2.7. Adaptacija bakterije *S. aureus* na nikal

Za eksperiment adaptacije na nikal odabrana je modelna bakterija *S. aureus* ATCC 29213. Pripremljena je bakterijska suspenzija bakterije s određenom koncentracijom  $\text{NiCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ . Nakon inkubacije od 24 sata, ta ista bakterija je prebačena u suspenziju s dvostrukom većom koncentracijom  $\text{Ni}^{2+}$ . Istom dinamikom, svakih 24 sata, koncentracija se dvostruko uvećavala do završne koncentracije u kojoj nije bio moguć rast bakterija. Koncentracije nikla su bile:

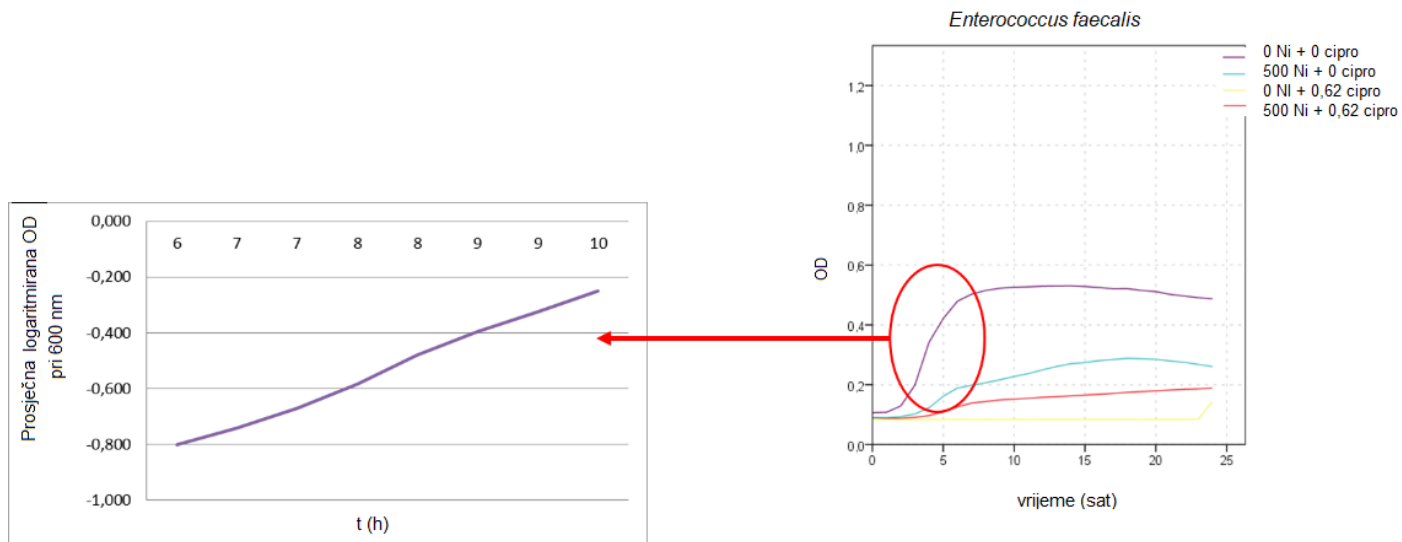
1. 62,5 mg/L
2. 125 mg/L
3. 250 mg/L
4. 500 mg/L
5. 1000 mg/L
6. 2000 mg/L

Nakon svake inkubacije bakterije su nasađivane na MH agar s istovjetnom koncentracijom  $\text{NiCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$  te je nakon inkubacije od 24 sata određen broj poraslih kolonija i bilježena njihova morfologija. Paralelno se radio kontrolni broj bakterija s onima koje nisu bile izložene serijskom razrijeđenju nikla. Nakon određivanja broja kolonija, određen broj je pohranjen u glicerol bujonu na  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ .

Naknadno su bakterije odleđene te su prošle ponovnu adaptaciju na način da je *S. aureus* adaptiran na 1. koncentraciju nikla (62,5 mg/L) 5x24h inkubiran u MH bujonu s navedenom koncentracijom nikla, *S. aureus* adaptiran na 2. koncentraciju je prošao 1x24h inkubaciju u 1. koncentraciji te 4x24h inkubacije u 2. koncentraciji. Tim slijedom su dobivene bakterije *S. aureus* adaptirane na 1.; 2.; 3.; 4.; 5. i 6. koncentraciju nikla. U daljnjem tekstu navedene su kao *S. aureus* ad1, *S. aureus* ad2, *S. aureus* ad3, *S. aureus* ad4, *S. aureus* ad5 i *S. aureus* ad6. Na navedenim bakterijama testirana je osjetljivost na antibiotike kao i njihova sposobnost adhezije i stvaranja biofilma.

### 3.2.8. Ispitivanje utjecaja nikla i antibiotika na brzinu logaritamske faze bakterijskog rasta

Logaritamska faza bakterijskog rasta je logaritmiranjem rezultata optičke gustoće prikazana je kao pravac (Slika 9)



Slika 9. Određivanje brzine logaritamske faze rasta (OD – optička gustoća).

Pravac je definiran regresijskom jednačbom kao  $y = ax + b$ , a elementi jednačbe prikazani su u Tablici 1.

Tablica 1. Elementi regresijske jednadžbe  $y = ax + b$

---

y	vrijednost na ordinati
x	vrijednost na apscisi
a	nagib pravca – mjera uzeta za brzinu logaritamske faze bakterijskog rasta
b	odsječak na osi y

---

### **3.2.9. Funkcionalna svojstva bakterija *S. aureus* adaptiranih na različite koncentracije nikla**

#### **3.2.9.1. Priprema adaptiranih sojeva**

Adaptirani sojevi inkubirani su 3x24h u MH bujonu uz promjenu bujona svakih 24h. Nakon toga, svaki je soj vraćen u bujon s koncentracijom nikla na koju je adaptiran. Na taj način se ispitivalo je li adaptacija reverzibilna, odnosno nestaje li kada se adaptirani soj bakterije vrati u uvjete bez Ni<sup>2+</sup>. Svi sojevi osim soja ad6 su pokazali rast te je taj soj isljučen iz daljnjih eksperimenata.

#### **3.2.9.2. Testiranje osjetljivosti adaptiranih bakterija *S. aureus* na antibiotike**

Ispitana je osjetljivost adaptiranih bakterija na antibiotike, prethodno navedene u materijalima, prema Europskom odboru za ispitivanje antimikrobne osjetljivosti (engl. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST) u triplikatu i dobiveni rezultati uspoređeni su s kontrolnim sojevima. U četvrtastoj ploči su na podlogu s MH agarom nasađene bakterije te su raspoređeni antibiotici u disk obliku. Bakterije su inkubirane na 24h te su potom očitani promjeri zone inhibicije bakterijskog rasta za svaki antibiotik. Očitavanja je vršio isti ispitivač. Testiranje je ponovljeno tri puta. Rezultati su prikazani prema vrijednostima prema EUCAST-u i prema statističkim valoriziranim promjenama promjera zona inhibicije.

### 3.2.9.3. Određivanje MIK-a odabranih antibiotika adaptiranih bakterija *S. aureus*

MIK adaptiranih sojeva određivan je za antibiotike ampicilin, gentamicin i ciprofloksacin kako bi se pokrile tri grupe antibiotika (beta-laktami, aminoglikozidi i fluorokinoloni) te provjerili rezultati antibiograma. Za određivanje MIK-a korištena je dilucijska metoda uz pomoć 0,015% resazurina (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD). U mikrotitarskim pločicama s 96 jažica (Vacutest Kima s.r.l., Arzergrande, Italija) načinjena su serijska dvostruka razrijeđenja testiranih spojeva u 0.08 - 5 mg/ml za ampicilin, gentamicin i ciprofloksacin. U svaku jažicu su dodani bakterijska suspenzija ( $1 \times 10^6$  CFU/mL po jažici) i resazurin. Tri jažice su korištene kao kontrola sterilnosti i tri kao kontrole rasta. Nakon 24-satne inkubacije na 37 °C pločice su očitane vizualno. Najniža koncentracija koja nije pokazala promjenu boje (plava) je definirana kao MIK. MBK je ispitan nasađivanjem na MH agar te 24-satnom inkubacijom nakon koje su očitani rezultati.

### 3.2.9.4. Ispitivanje interakcije nikla i antibiotika metodom šahovnice na adaptirane bakterije

*S. aureus* ad3 i *S.aureus* ad5 su izloženi različitim koncentracijama nikla i antibiotika prethodno opisanom metodom šahovnice. Najviše ispitivane otopine nikla i antibiotika bile su dvostruko veće od MIK-a.

### 3.2.9.5. Sposobnost adhezije adaptiranih bakterija na polistiren, nikal-titanijske i čelične žičane lukove u umjetnoj slini

Funkcionalna svojstva sojeva adaptiranih na nikal testirana su na sposobnost adhezije na polistirenu. Bakterijskoj suspenziji adaptiranih sojeva, *S.aureus* ad3, *S.aureus* ad5 i neadaptiranog soja *S. aureus* ( $1 \times 10^6$  CFU/mL) u umjetnoj slini su dodani, odvojeno, polistiren, nikal-titanijski i čelični žičani luk duljine 1 cm i inkubirani 24 sata. Zatim su adherirane bakterije na polistirenu isprane sterilnom destiliranom vodom da bi se uklonile planktonske stanice, adherirani sloj je razoren u ultrazvučnoj kupelji na 40 kHz (Bactosonic, Bandelin, Berlin, Njemačka) te su se subkultivirala

serijska razrijeđenja na MH agaru da bi se odredio broj adheriranih bakterijskih stanica (CFU/ml).

#### 3.2.9.6. Sposobnost stvaranja biofilma adaptiranih bakterija na polistirenu, nikal-titanijskim i čeličnim ortodontskim žičanim lukovima u umjetnoj slini

Funkcionalna svojstva sojeva adaptiranih na nikal testirana su na sposobnost stvaranja biofilma na polistirenu. Bakterijskoj suspenziji adaptiranih sojeva, *S.aureus* ad3, *S.aureus* ad5 i neadaptiranog soja *S. aureus* ATCC 29213 ( $1 \times 10^6$  CFU/mL) u umjetnoj slini su dodani, odvojeno, polistiren, nikal-titanijski i čelični žičani luk duljine 1 cm i inkubirani 5 dana (120 h). Medij se mijenjao svakih 24 sata. Nastali biofilm na materijalu nakon 5 dana inkubacije ispran je sterilnom destiliranom vodom da bi se uklonile planktonske stanice te je biofilm razoren u ultrazvučnoj kupelji (Bactosonic, Bandelin, Berlin, Njemačka). Serijska razrijeđenja subkultivirana su na MH agaru da bi se odredio broj bakterijskih stanica u biofilmu (CFU/ml).

### 3.3. Statistička analiza

U statističkoj analizi korišteni su Shapiro-Wilkovljev test za provjeru normalnosti distribucije podataka, t-test za nezavisne uzorke, analiza varijance (ANOVA) sa Student-Neuman-Keuls post-hoc testom, Pearsonove korelacije i  $\chi^2$  test. Kruskal Wallis test je rađen za analizu podataka adhezije i stvaranja biofilma bakterija jer je Shapiro-Wilkovljev test pokazao da podaci ne slijede normalnu distribuciju, a Levenov test je pokazao nehomogenost varijanci. Uz Kruskal Wallis rađen je kao post-hoc Mann-Whitneyev test uz Bonferronijevu korekciju p vrijednosti za višestruke usporedbe. Snaga efekta, tj. veličina razlike između eksperimentalnih stanja su određeni s r, Cramerovim V,  $R^2$  i  $\eta^2$ . Sljedeći kriteriji su korišteni za interpretaciju r i V:  $r < 0,1$  = neznačajna snaga efekta;  $0,1 - 0,3$  = mala snaga efekta;  $0,3 - 0,5$  = srednja;  $0,5 - 0,7$  = velika i  $> 0,7$  vrlo velika snaga efekta [138], a za kvadrirane vrijednosti  $R^2$  i  $\eta^2$  kvadriranje prethodno navedenih raspona. Razlike u korelacijskim koeficijentima između bakterija su određene Fisherovim r-u-z transformacijama. Statistika je načinjena u programu IBM SPSS 21 (IBM Corp, Armonk, SAD).



## 4. REZULTATI

### 4.1. Otpuštanje Ni<sup>2+</sup> iz nikal-titanijskih žičanih lukova

Temeljem izmjerene količine otpuštenog nikla iz žičanih lukova površine (0,020 x 0,020 inča) pri rasponu pH 4,8 - 6,6 izračunato je kumulativno otpuštanje nikla za najčešće korištene veličine NiTi lukova; 0,014, 0,016 x 0,022 i 0,018 x 0,025 inča. Izračuni su iz vrijednosti količine po površini jedinice preračunati prema Arndtu i sur [8]. U izračunu je korištena duljina žičanog luka od 28 cm što odgovara zbroju dužina gornjeg i donjeg luka koji se protežu od lijevog do desnog drugog kutnjaka. Vrijednosti su prikazane u Tablici 2. Otpuštanje iona raste sa smanjenjem pH vrijednosti te je očekivano veće iz žičanih lukova veće površine.

Tablica 2. Kumulativna količina otpuštenih iona nikla u µg u prvih 28 dana iz tri veličine nikal-titanijskih žičanih u ovisnosti o pH umjetne sline

dimenzija žičanog luka (u inčima)	pH umjetne sline	AS (SD) (µg)
0,14	4,8	0,55 (0,10)
	5,1	0,49 (0,02)
	6,6	0,29 (0,06)
0,16x0,22	4,8	2,96 (0,54)
	5,1	2,63 (0,11)
	6,6	1,56 (0,32)
0,18x0,25	4,8	3,36 (0,61)
	5,1	2,99 (0,12)
	6,6	1,77 (0,37)

AS – aritmetička sredina, SD – standardna devijacija

#### 4.2. Određivanje minimalne inhibitorne i minimalne baktericidne koncentracije (MIK i MBK)

Minimalne inhibitorne i baktericidne vrijednosti prikazane su u Tablici 3. ATCC soj *S. aureus* pokazuje veću osjetljivost na ciprofloksacin u odnosu na ampicilin. Koncentracija nikla 400 do 3000 puta viša od koncentracije antibiotika potrebna je kako bi inhibirala bakterijski rast. MBK je u većini slučajeva dvostruko viši od MIK-a.

Tablica 3. Vrijednosti MIK i MBK

	MIK Cip	MBK Cip	MIK Amp	MBK Amp	MIK NiCl <sub>2</sub>	MBK NiCl <sub>2</sub>
	koncentracije u mg/L					
<i>S.aureus</i>	0,62	1,25	1	2	1000	1000
<i>E.coli</i>	0,005	0,005	2,5	5	1000	2000
<i>E.faecalis</i>	0,31	0,31	1	2	1000	1000

MIK – minimalna inhibitorna koncentracija, MBK – minimalna baktericidna koncentracija

#### 4.3. Određivanje interakcije između nikla i antibiotika ampicilina i ciprofloksacina Frakcijskom inhibitornom koncentracijom (FIK)

Kombinacije različitih koncentracija antibiotika i nikla dale su različite rezultate, ovisno o vrsti antibiotika i ovisno o vrsti bakterije. U dvije kombinacije koncentracija ciprofloksacina i nikla postoji aditivna interakcija u koncentraciji ciprofloksacina od 0,62 mg/L u kombinaciji sa 125 i 250 mg/L nikla na bakteriju *S. aureus*. Na rast iste bakterije kombinacije ampicilina i nikla nisu pokazale interakciju. Na rast *E. faecalis* kombinacija ciprofloksacina i nikla djeluju antagonistički u kombinaciji 0,62; 0,31 i 0,16 mg/L ciprofloksacina sa 500 mg/L nikla, dok neke kombinacije ampicilina i nikla djeluju aditivno i sinergistički, primjerice u koncentraciji ampicilina od 1 mg/L i nikla od 125-500 mg/L. U nekim kombinacijama ciprofloksacin i nikal djeluju antagonistički pri promatranju rasta bakterije *E. coli*, primjerice u koncentraciji ciprofloksacina od 0,01

mg/L i nikla od 500 mg/L. U kombinaciji koncentracija ampicilina od 2,5 mg/L i 500 mg/L nikla interakcija je aditivna kod iste bakterije (Tablica 4. i 5.).

Tablica 4. Vrijednosti FIK za ciprofloksacin i nikal

<i>S. aureus</i>	Koncentracija u kombinaciji (mg/L)	Ciprofloksacin Ni	<b>0,62</b> <b>125</b>	<b>0,62</b> <b>250</b>	<b>0,62</b> 500	<b>0,31</b> 125	<b>0,31</b> 250	<b>0,31</b> 500	<b>0,16</b> 125	<b>0,16</b> 250	<b>0,16</b> 500
		FIK <sub>CIP</sub>	<b>0,5</b>	<b>0,5</b>	1	0,5	0,5	1	0,5	0,5	1
		FIK <sub>Ni</sub>	<b>0,5</b>	<b>0,5</b>	0,5	1	1	1	1	1	1
		ΣFIK	<b>1</b>	<b>1</b>	1,5	1,5	1,5	2	1,5	1,5	2
		Interakcija	<b>Ad</b>	<b>Ad</b>	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind
<i>E. faecalis</i>	Koncentracija u kombinaciji (mg/L)	Ciprofloksacin Ni	0,62 125	0,62 250	<b>0,62</b> <b>500</b>	0,31 125	0,31 250	<b>0,31</b> <b>500</b>	0,16 125	0,16 250	<b>0,16</b> <b>500</b>
		FIK <sub>CIP</sub>	1	2	<b>4</b>	1	2	<b>4</b>	1	2	<b>4</b>
		FIK <sub>Ni</sub>	1	1	<b>1</b>	1	1	<b>1</b>	1	1	<b>1</b>
		ΣFIK	2	3	<b>5</b>	2	3	<b>5</b>	2	3	<b>5</b>
		Interakcija	Ind	Ind	<b>Ant</b>	Ind	Ind	<b>Ant</b>	Ind	Ind	<b>Ant</b>
<i>E. coli</i>	Koncentracija u kombinaciji (mg/L)	Ciprofloksacin Ni	0,01 125	0,01 250	0,01 500	0,005 125	0,005 250	0,005 500	0,00025 125	0,00025 250	0,00025 500
		FIK <sub>CIP</sub>	1	2	<b>4</b>	1	2	<b>4</b>	1	2	<b>4</b>
		FIK <sub>Ni</sub>	1	1	<b>1</b>	1	1	<b>1</b>	1	1	<b>1</b>
		ΣFIK	2	3	<b>5</b>	2	3	<b>5</b>	2	3	<b>5</b>
		Interakcija	Ind	Ind	<b>Ant</b>	Ind	Ind	<b>Ant</b>	Ind	Ind	<b>Ant</b>

FIK – frakcijska inhibitorna koncentracija, ΣFIK je jednak zbroju FIK-a za svaki spoj. Interakcija je ovisno o vrijednosti ΣFIK-a definirana kao indiferentna (Ind), aditivna (Ad), sinergistička (Sin) ili antagonistička (Ant); podebljano su označene interakcije koje nisu indiferentne

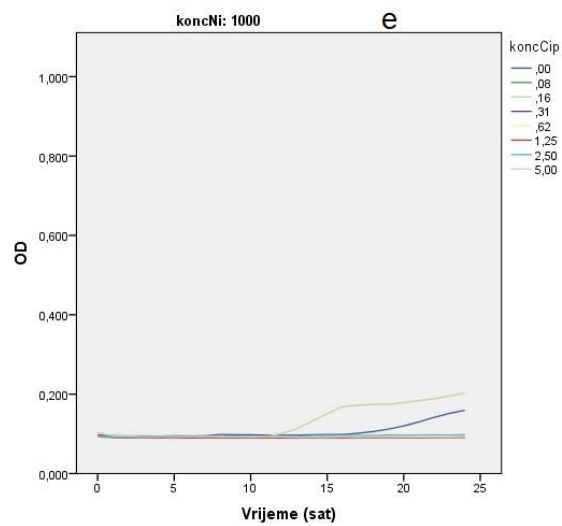
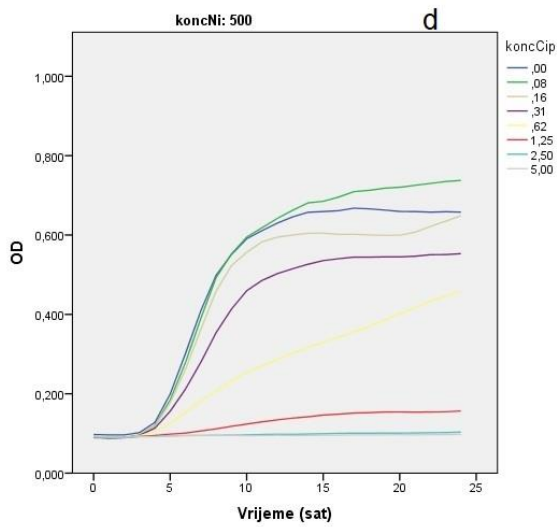
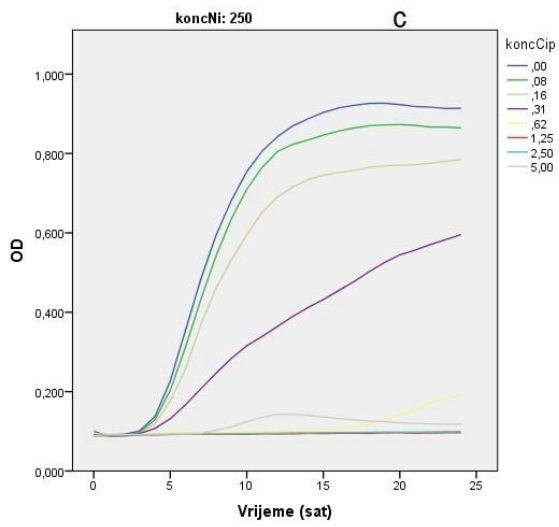
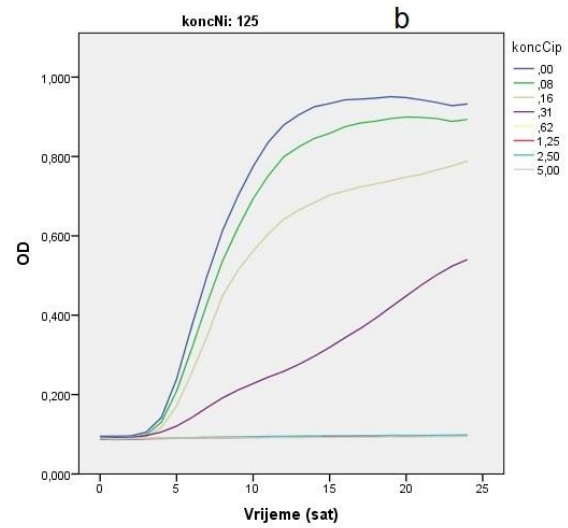
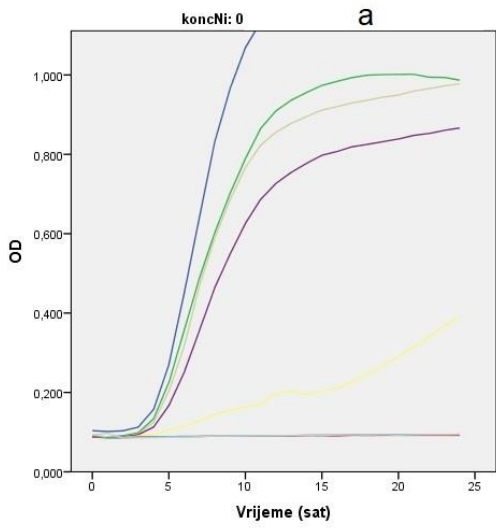
Tablica 5. Vrijednosti FIK za ampicilin i nikal

<b>S. aureus</b>	Koncentracija u kombinaciji (mg/L)	Ampicilin Ni	<b>1</b> 125	<b>1</b> 250	<b>1</b> 500	<b>0,5</b> 125	<b>0,5</b> 250	<b>0,5</b> 500	<b>0,25</b> 125	<b>0,25</b> 250	<b>0,25</b> 500
		FIK <sub>AMP</sub>	1	1	0,5	1	1	0,5	1	1	0,5
		FIK <sub>Ni</sub>	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		ΣFIK	2	2	1,5	2	2	1,5	2	2	1,5
		Interakcija	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind
<b>E. faecalis</b>	Koncentracija u kombinaciji (mg/L)	Ampicilin Ni	1 125	1 250	1 500	0,5 125	0,5 250	0,5 500	0,25 125	0,25 250	0,25 500
		FIK <sub>AMP</sub>	<b>0,25</b>	<b>0,25</b>	<b>0,1</b>	<b>0,25</b>	<b>0,25</b>	<b>0,1</b>	0,25	0,25	0,1
		FIK <sub>Ni</sub>	<b>0,25</b>	<b>0,25</b>	<b>0,25</b>	<b>0,25</b>	<b>0,25</b>	<b>0,25</b>	1	1	1
		ΣFIK	<b>0,5</b>	<b>0,5</b>	<b>0,35</b>	<b>0,5</b>	<b>0,5</b>	<b>0,35</b>	1,25	1,25	1,1
		Interakcija	<b>Ad</b>	<b>Ad</b>	<b>Sin</b>	<b>Ad</b>	<b>Ad</b>	<b>Sin</b>	Ind	Ind	Ind
<b>E. coli</b>	Koncentracija u kombinaciji (mg/L)	Ampicilin Ni	2,5 125	2,5 250	2,5 500	1,25 125	1,25 250	1,25 500	0,62 125	0,62 250	0,62 500
		FIK <sub>AMP</sub>	1	1	<b>0,5</b>	1	1	0,5	1	1	0,5
		FIK <sub>Ni</sub>	0,5	0,5	<b>0,5</b>	1	1	1	1	1	1
		ΣFIK	1,5	1,5	<b>1</b>	2	2	1,5	2	2	1,5
		Interakcija	Ind	Ind	<b>Ad</b>	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind	Ind

FIK – frakcijska inhibitorna koncentracija, ΣFIK je jednak zbroju FIK-a za svaki spoj. Interakcija je ovisno o vrijednosti ΣFIK-a definirana kao indiferentna (Ind), aditivna (Ad), sinergistička (Sin) ili antagonistička (Ant), podebljano su označene interakcije koje nisu indiferentne

#### **4.4. Utjecaj različitih kombinacija koncentracija ciprofloksacina i nikla na rast bakterije *S. aureus***

Za rast bakterije *S. aureus* vidljivo je kako prijelaz s koncentracije nikla od 250 na 500 mg/L donosi vidljivo slabiji rast bakterije. Zanimljivo je kako u koncentraciji ciprofloksacina od 0,62 mg/L koncentracije nikla od 125 i 250 mg/L dovode do izostanka rasta bakterije (Slika 10. b i c), dok u koncentraciji nikla od 500 mg/L ponovno imamo vidljiv, iako suprimiran rast, kao i bez prisutnosti nikla (Slika 10. d). Vidljivo je produženje lag faze pri povećanju koncentracije ciprofloksacina (Slika 10. a). Pri 1000 mg/L nikla rast bakterije je izrazito suprimiran, s produženom lag fazom, vidljiv je jedino u koncentracijama ciprofloksacina od 0 i 0,16 mg/L (Slika 10. e).



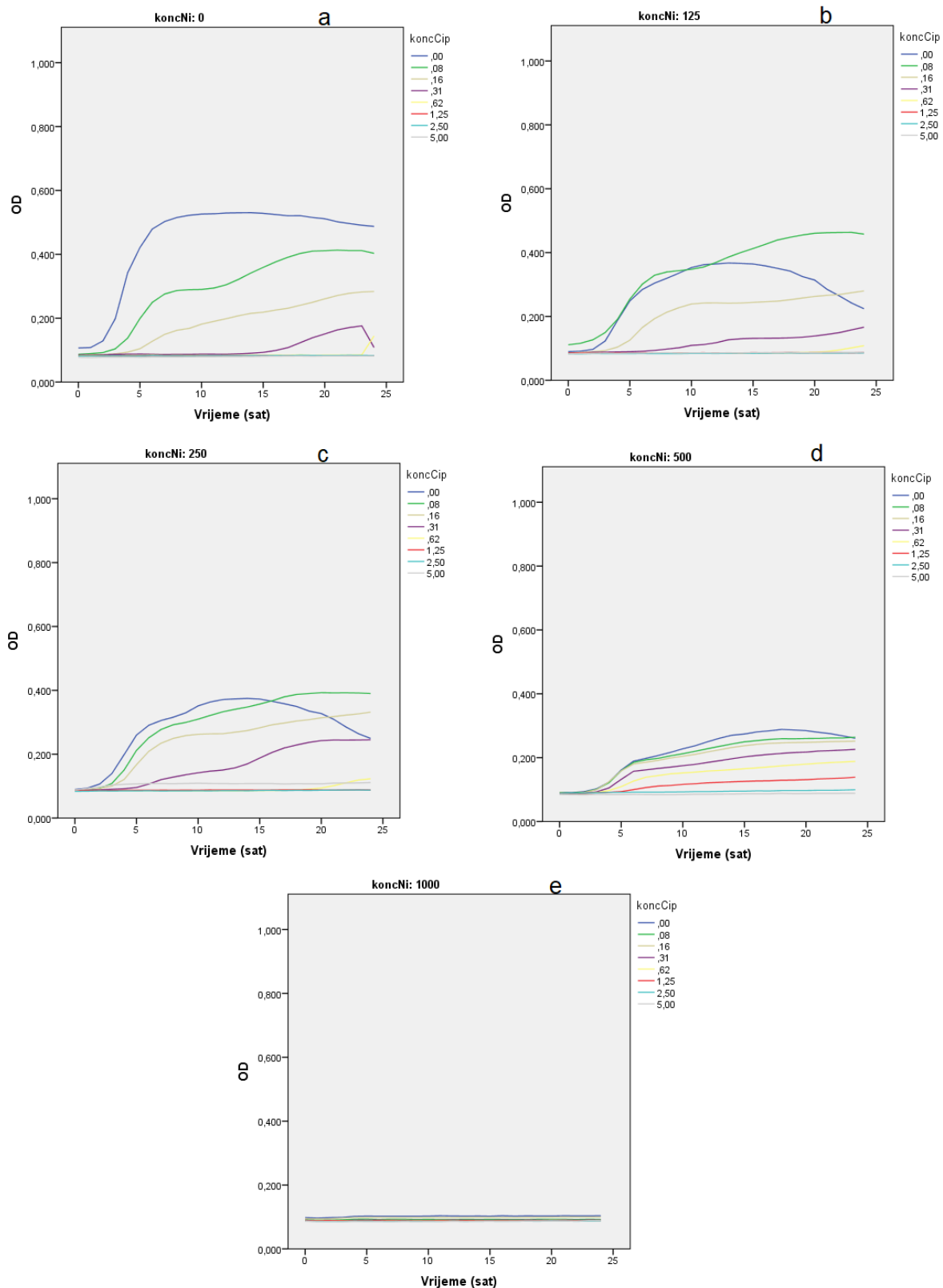
Slika 10. Krivulje rasta bakterije *S. aureus* u različitim koncentracijama ciprofloksacina i nikla u mg/L (a – e; rast bakterije u različitim koncentracijama ciprofloksacina i nikla koje su navedene uz pojedini graf, krivulja je prikaz srednjih vrijednosti optičke gustoće pri 600 nm kroz 24 sata mjerene u triplikatu).

Koncentracija ciprofloksacina značajno je smanjivala rast *S. aureus* s graničnom koncentracijom od 0,62 mg/L u usporedbi sa 0,31 mg/L ( $0,037 \pm 0,032$  vs.  $0,149 \pm 0,024$ ;  $p < 0,001$ ;  $\eta^2 = 0,938$ ). U koncentraciji nikla od 500 mg/L, 1,25 mg/L ciprofloksacina blokirao je rastu usporedbi sa 0,62 mg/L i niže ( $p < 0,001$ ;  $\eta^2 = 0,873$ ), dok je u koncentracijama nikla od 125 i 250 mg/L, 0,31 mg/L ciprofloksacina usporavalo rast u odnosu na niže koncentracije počevši od 0,16 mg/L ( $0,068 \pm 0,054$  vs.  $0,156 \pm 0,048$  i  $0,087 \pm 0,059$  vs.  $0,158 \pm 0,034$ ,  $p < 0,001$ ;  $\eta^2 = 0,890$  i  $0,913$ ). U koncentracijama nikla od 1000 and 2000 mg/L nije bilo bakterijskog rasta. Razmatrajući različite koncentracija nikla u istoj koncentraciji ciprofloksacina, koncentracija nikla značajno mijenja bakterijski rast u koncentracijama ciprofloksacina 0,08 – 0,62 mg/L ( $p \leq 0,008$ ;  $\eta^2 = 0,690 - 0,910$ ). Više koncentracije ciprofloksacina pokazuju potpunu inhibiciju bakterijskog rasta. Za koncentraciju od 0,62 mg/L ciprofloksacina, koncentracija nikla od 500 mg/L značajno smanjuje rast u usporedbi s nižim koncentracijama ( $0,087 \pm 0,057$  vs.  $0,037 \pm 0,032$ ,  $p < 0,001$ ).

#### **4.5. Utjecaj različitih kombinacija koncentracija ciprofloksacina i nikla na rast bakterije *E. faecalis***

Vidljivo je kako porast koncentracije ciprofloksacina smanjuje rast bakterije. Prijelaz s koncentracije nikla od 250 u koncentraciju od 500 mg/L vidljivo smanjuje rast (Slika 11. c i d). Interakcija ciprofloksacina i nikla vidljiva je u značajnijem rastu bakterije pri 250 i 500 mg/L nikla u koncentracijama ciprofloksacina od 0,31 i 0,62 mg/L ciprofloksacina u usporedbi s rastom u 0 mg/L nikla (Slika 11. a, c i d). Pri koncentraciji 0 mg/L nikla vidljivo je produljenje lag faze za oko 13 sati bakterije u prisustvu 0,31 mg/l ciprofloksacina (Slika 11. a). Pri 1000 mg/L nikla nema vidljivog bakterijskog rasta (Slika 11. e).





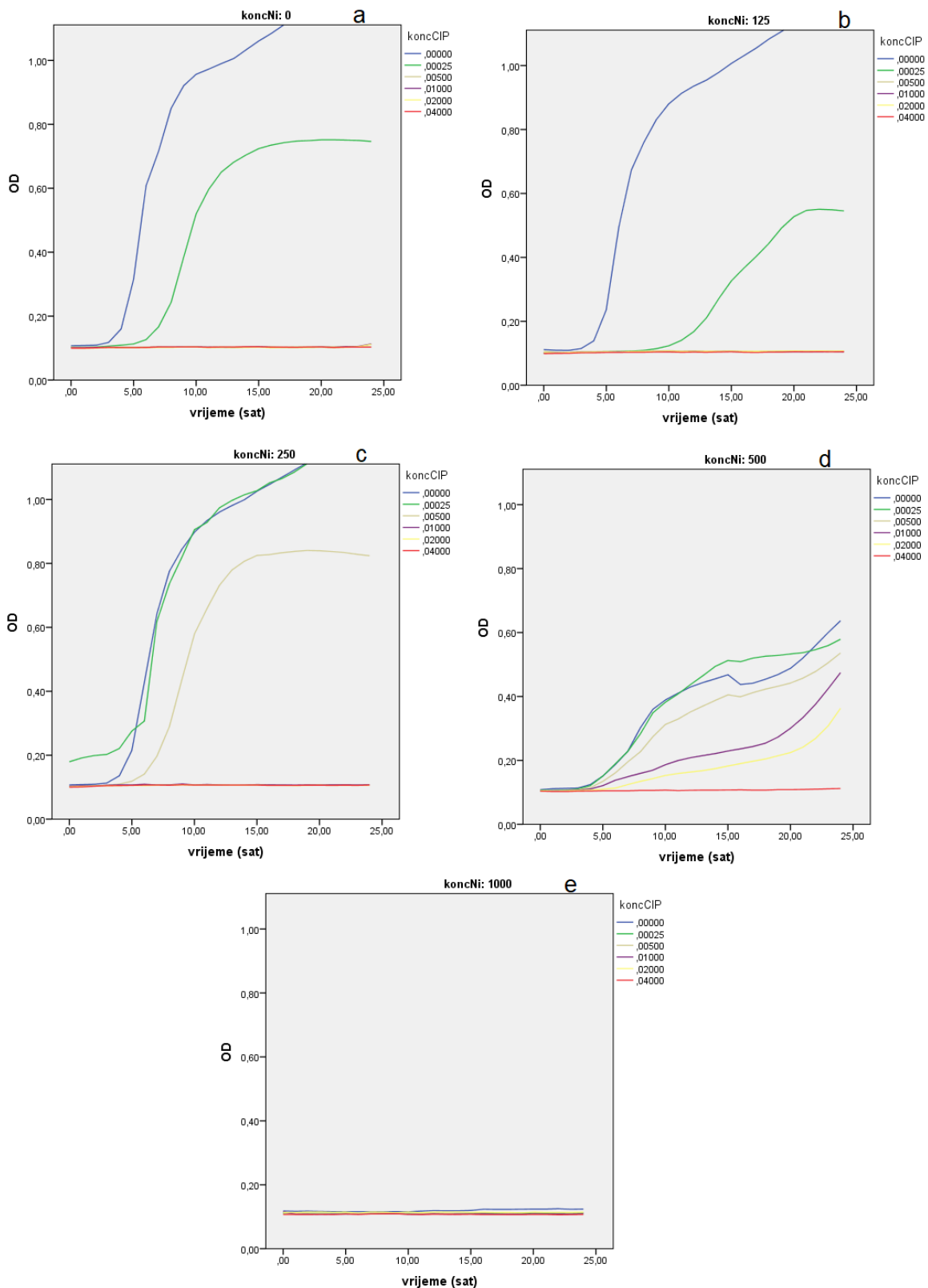
Slika 11. Krivulje rasta bakterije *E. faecalis* u različitim koncentracijama ciprofloksacina i nikla u mg/L (a – e; rast bakterije u različitim koncentracijama ciprofloksacina i nikla koje su navedene uz pojedini graf, krivulja je prikaz srednjih vrijednosti optičke gustoće pri 600 nm kroz 24 sata mjerene u triplikatu).

Koncentracija ciprofloksacina je značajno usporavala rast bakterije *E. faecalis* s i graničnom koncentracijom od 0,31 mg/L ( $0,043 \pm 0,075$ ;  $p < 0,001$ ;  $\eta^2 = 0,729$ ). Efekt te koncentracije nije se razlikovao od onoga koncentracija 0,6 and 0,08, ali jest u odnosu na rast bakterije bez ciprofloksacina ( $0,177 \pm 0,005$ ). U koncentraciji nikla od 250 mg/L, koncentracija ciprofloksacina je značajno usporavala rast sa velikom snagom efekta ( $p < 0,05$ ;  $\eta^2 = 0,703$ ) s time da je koncentracija od 0,62 mg/L blokirala rast.

U koncentraciji nikla od 125 and 500 mg/L nije bilo koncentracija ciprofloksacina koje su značajno usporavale rast u odnosu na druge koncentracije. Nije bilo bakterijskog rasta u koncentracijama nikla  $\geq 1000$  mg/L. Gledajući različite koncentracije nikla, u istoj koncentraciji ciprofloksacina, koncentracija nikla nije imala veliki utjecaj na logaritamsku fazu, ni u jednoj koncentraciji ciprofoksacina.

#### **4.6. Utjecaj različitih kombinacija koncentracija ciprofloksacina i nikla na rast bakterije *E. coli***

Za rast bakterije *E. coli* vidljiv je značajan antagonistički efekt koncentracije nikla od 500 mg/L na ciprofloksacin (Slika 12. d). *E. coli* pokazuje rast u minimalnim inhibitornim i višim koncentracijama ciprofloksacina od 0,005; 0,01 i 0,02 mg/L u 500 mg/L nikla (Slika 12. d). U koncentraciji nikla od 250 mg/L rast se odvija u 0,005 mg/L ciprofloksacina (Slika 12. c). Pri koncentracijama od 0, 125 i 250 mg/L nikla dolazi do produljenja lag faze (Slika 12. a, b i c). U koncentraciji nikla od 1000 mg/L nema vidljivog bakterijskog rasta (Slika 12. d).

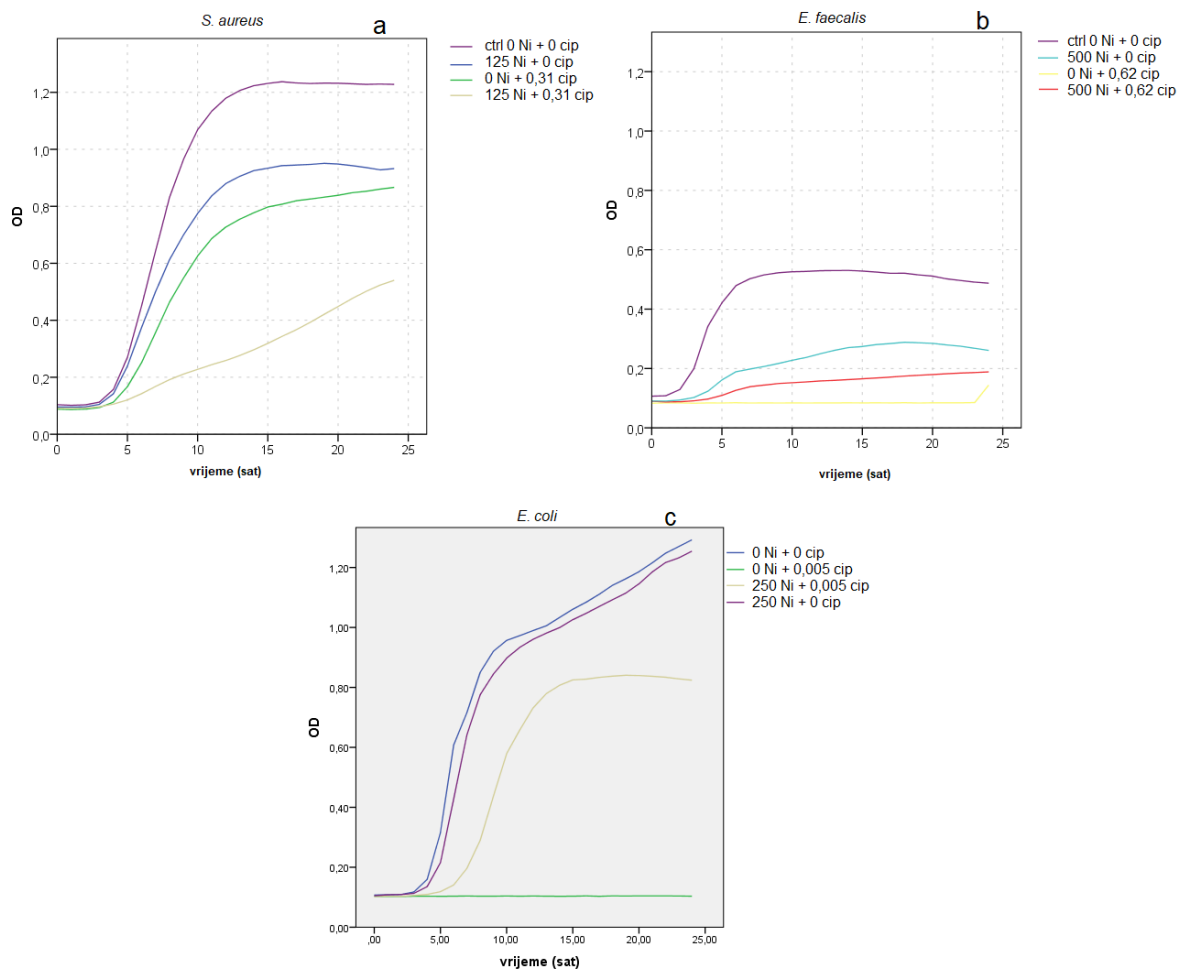


Slika 12. Krivulje rasta bakterije *E. coli* u različitim koncentracijama ciprofloksacina i nikla u mg/L (a – e; rast bakterije u različitim koncentracijama ciprofloksacina i nikla koje su navedene uz pojedini graf, krivulja je prikaz srednjih vrijednosti optičke gustoće pri 600 nm kroz 24 sata mjerene u triplikatu).

Koncentracija ciprofloksacina značajno je smanjivala rast *E. coli* s graničnom koncentracijom od 0,005 mg/L ( $p < 0,001$ ;  $\eta^2 = 0,998$ ). U koncentraciji nikla od 125 mg/L i 250 mg/L ponovno je koncentracija od 0,005 mg/L bila granična koja je usporavala rast. U koncentraciji nikla od 500 mg/L je tek koncentracija od 0,04 mg/L ciprofloksacina značajno usporavala rast u odnosu na niže koncentracije ( $p < 0,001$ ;  $\eta^2 = 0,680$ ). U koncentracijama nikla od 1000 i 2000 mg/L nije bilo bakterijskog rasta.

#### **4.7. Sinergistički i antagonistički učinak ciprofloksacina i nikla na rast bakterija *S. aureus*, *E. faecalis* i *E. coli***

Na prikazu krivulja s kontrolom koja je bez prisustva ciprofloksacina i nikla, za *S. aureus* je vidljivo kako koncentracija od 125 mg/L nikla djeluje sinergistički s koncentracijom ciprofloksacina od 0,31 mg/L (Slika 13. a). Za *E. faecalis* koncentracija nikla od 500 mg/L djeluje antagonistički na ciprofloksacin dok u rastu *E. coli* koncentracija nikla od 250 mg/L nikla djeluje antagonistički na prethodno potvrđeni MIK ciprofloksacina od 0,005 mg/L (Slika 13. b). Iako postoji rast *E. coli* u 0,005 mg/L ciprofloksacina i 250 mg/L nikla, vidljivo je produženo trajanje lag faze (Slika 13. c).



Slika 13. Krivulje rasta *S. aureus*, *E. faecalis* i *E. coli* u različitim kombinacijama ciprofloksacina i nikla u mg/L – demonstracija aditivnog i antagonističkog učinka ciprofloksacina i nikla (a – c; rast bakterija u različitim koncentracijama ciprofloksacina i nikla koje su navedene uz pojedini graf, krivulja je prikaz srednjih vrijednosti optičke gustoće pri 600 nm kroz 24 sata mjerene u triplicatu).

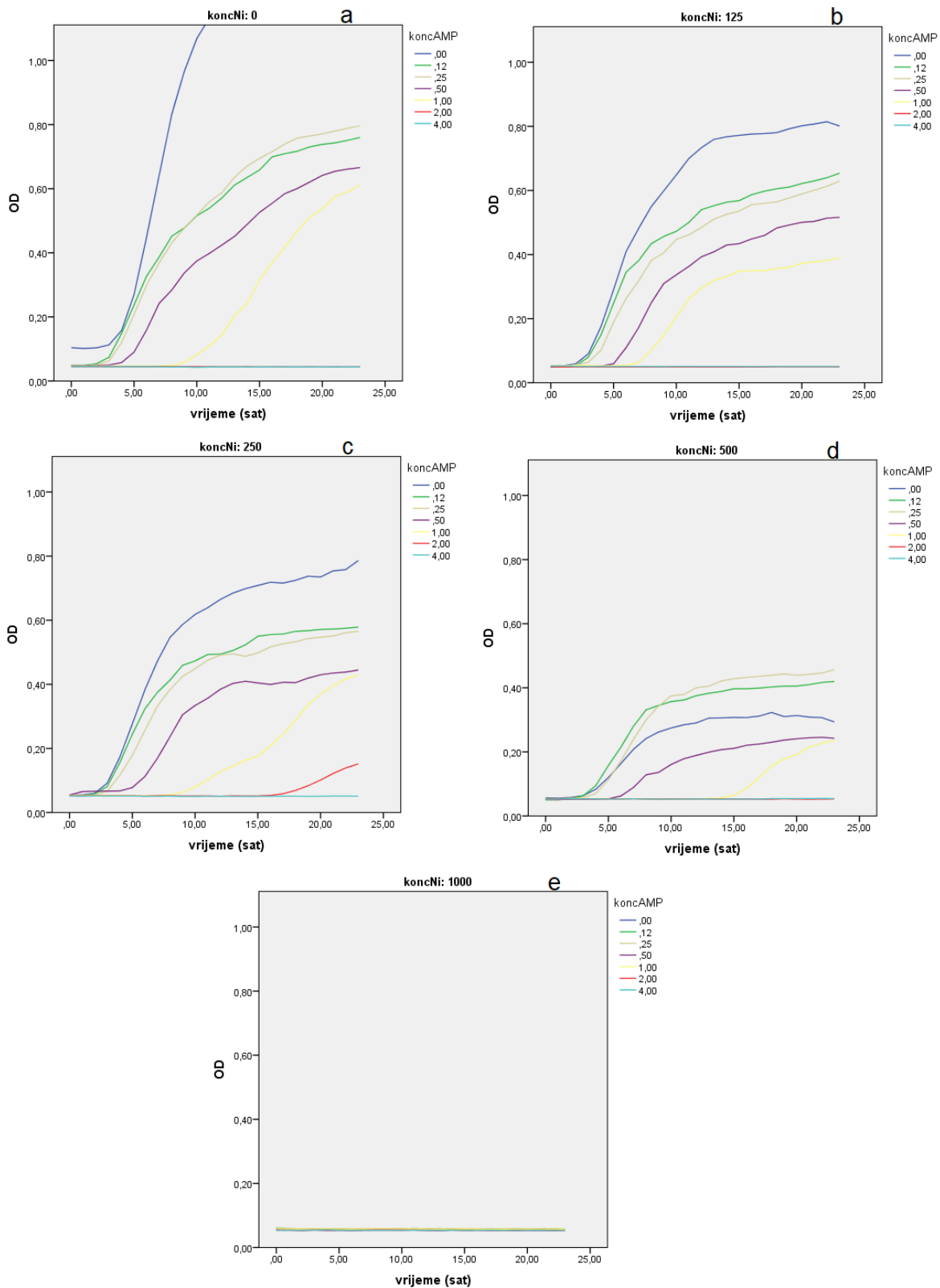
#### **4.8. Korelacije bakterijskog rasta s promjenom koncentracije antibiotika i metala**

Rast bakterija *S. aureus* i *E. faecalis* korelirao je više s koncentracijom ciprofloksacina ( $r=-0,469$  and  $0,373$ ;  $p<0,001$ ) nego nikla ( $r=-0,438$  and  $-0,340$ ;  $p<0,001$ ), te su korelacije bile linearne, umjerene i negativne. Što je viša koncentracija metala i antibiotika, to je jače usporavanje bakterijskog rasta. Razlike u korelacijskim koeficijentima nisu bile značajne.

Rast bakterije *E. coli* korelirao je značajno s koncentracijom ciprofloksacina ( $r=-0,492$ ;  $p<0,001$ ) no ne i s koncentracijom nikla ( $r=-0,192$ ;  $p=0,092$ ).

#### **4.9. Utjecaj različitih kombinacija koncentracija ampicilina i nikla na rast bakterije *S. aureus***

Za rast *S. aureus* vidljivo je da povećanje koncentracije nikla smanjuje rast bakterije u istoj koncentraciji ampicilina. Pri koncentraciji nikla 500 mg/L najbolje je vidljivo sinergističko djelovanje nikla s ciprofloksacinom, na primjeru rasta bakterije s koncentracijom od 1 mg/L ampicilina, vidljiv je smanjeni rast i produženje faze suzdržanog rasta u odnosu na rast bez prisutnosti nikla (Slika 14. d). Povećanje koncentracije ampicilina u istoj koncentraciji nikla produljuje vrijeme lag faze (Slika 14. a - d). Pri koncentraciji nikla od 0 mg/l, četverostruko povećanje koncentracije ampicilina dovodi do produljenja lag faze za oko sedam sati (Slika 14. a). Pri koncentraciji nikla od 1000 mg/L nema vidljivog bakterijskog rasta (Slika 14. e).



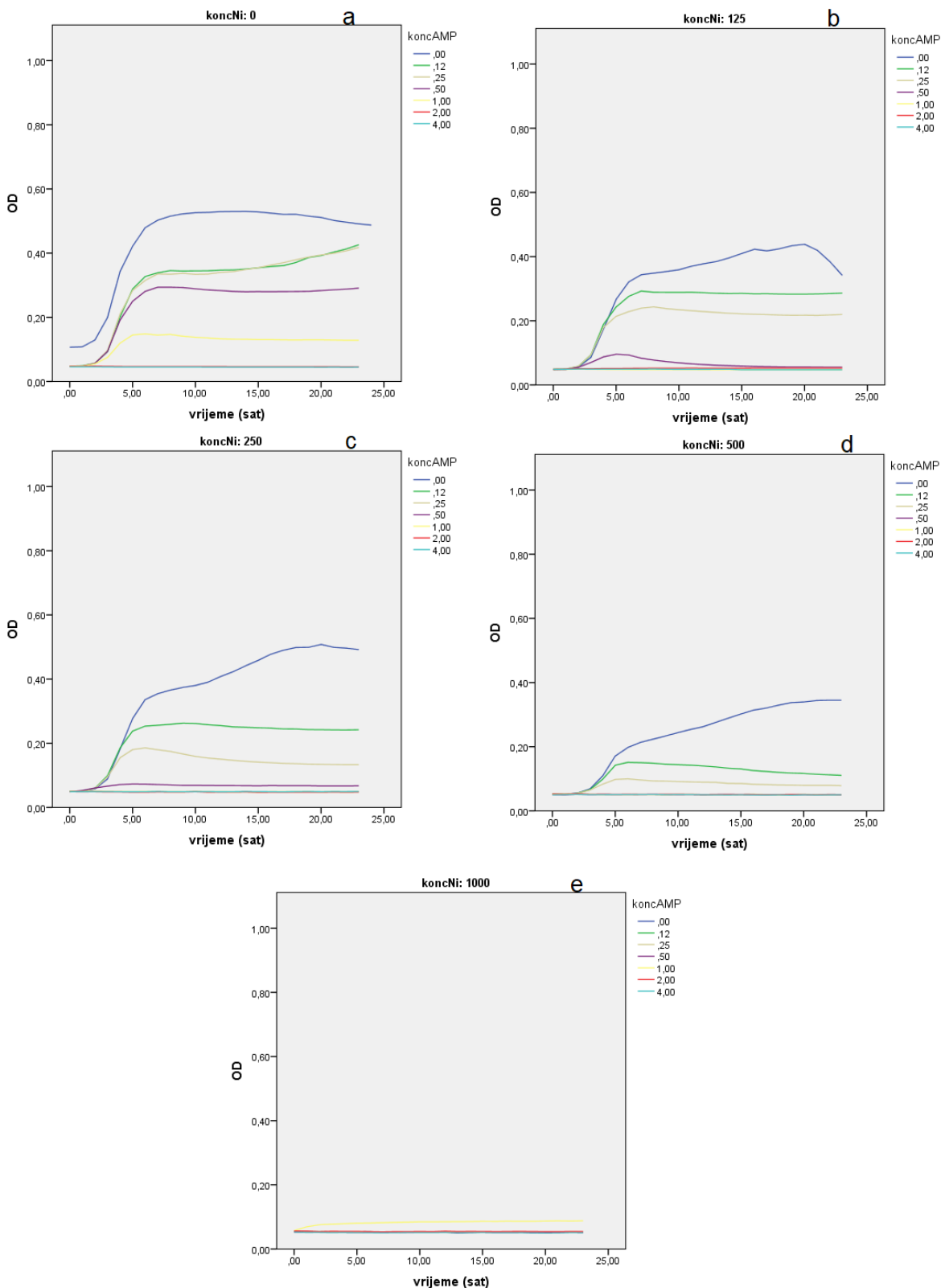
Slika 14. Krivulje rasta bakterije *S. aureus* u različitim koncentracijama ampicilina i nikla u mg/L (a – e; rast bakterije u različitim koncentracijama ampicilina i nikla koje su navedene uz pojedini graf, krivulja je prikaz srednjih vrijednosti optičke gustoće pri 600 nm kroz 24 sata mjerene u triplikatu).



Koncentracija ampicilina značajno je smanjivala rast *S. aureus* s velikom snagom efekta i graničnom koncentracijom od 2 mg/L u usporedbi sa 1 mg/L ( $0 \pm 0$  vs.  $0,132 \pm 0,029$ ;  $p < 0,001$ ;  $\eta^2 = 0,898$ ). U koncentraciji nikla od 125 mg/L, 1 mg/L ampicilina značajno je usporavao rast u odnosu na 0,5 mg/L i niže, ( $0,102 \pm 0,088$  vs.  $0,200 \pm 0,019$ ,  $p < 0,001$ ;  $\eta^2 = 0,871$ ). U koncentraciji od 250 mg/L nikla, koncentracija od 2 mg/L je bila graničnik ( $0,0417 \pm 0,072$  vs.  $0,161 \pm 0,012$ ,  $p < 0,001$ ,  $\eta^2 = 0,874$ ). U 500 mg/L nikla nije bilo granične koncentracije ampicilina koja usporava logaritamsku fazu rasta.

#### **4.10. Utjecaj različitih kombinacija koncentracija ampicilina i nikla na rast bakterije *E. faecalis***

Analizirajući krivulje rasta bakterije *E. faecalis* vidljivo je da veća koncentracija nikla u istoj koncentraciji antibiotika dovodi do smanjenog rasta bakterije. Gledajući rast bakterije u subinhibitornoj dozi ampicilina od 0,5 mg/L, vidljivo izrazito suprimiran rast u koncentracijama nikla od 125, 250 i 500 mg/L nikla (Slika 15. b, c i d). Slično je vidljivo i za koncentraciju četiri puta manju od MIK-a; 0,12 mg/L. Generalno, vidljiv je sinergistički učinak nikla i ampicilina (Slika 15.). Pri koncentraciji od 1000 mg/L nikla nema vidljivog bakterijskog rasta (Slika 15. e).

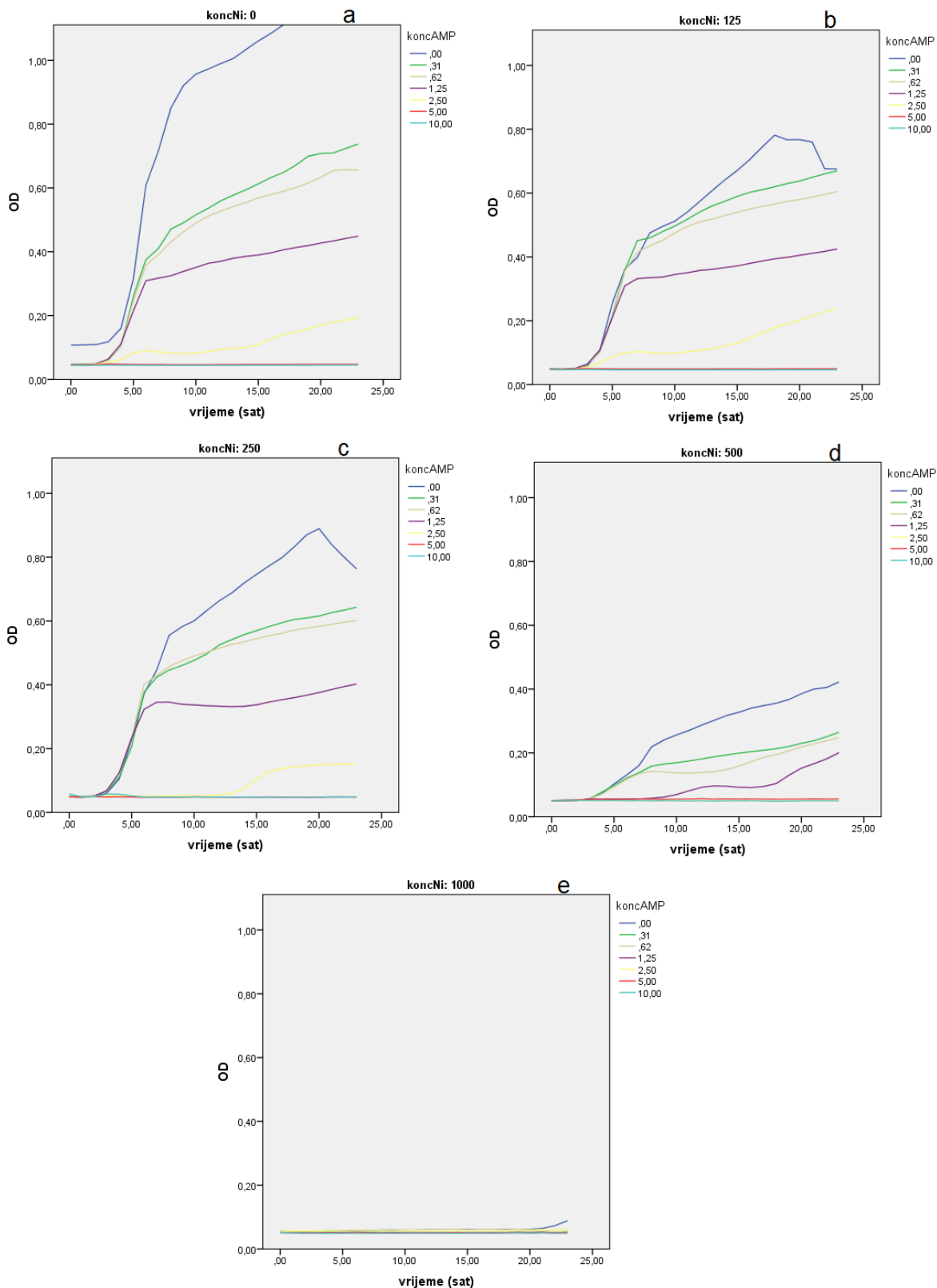


Slika 15. Krivulje rasta bakterije *E. faecalis* u različitim koncentracijama ampicilina i nikla u mg/L (a – e; rast bakterije u različitim koncentracijama ampicilina i nikla koje su navedene uz pojedini graf, krivulja je prikaz srednjih vrijednosti optičke gustoće pri 600 nm kroz 24 sata mjerene u triplikatu).

Koncentracija ampicilina značajno je smanjivala rast *E. faecalis* s graničnom koncentracijom od 1 mg/L u usporedbi sa 0,5 mg/L ( $0,052 \pm 0,090$  vs.  $0,182 \pm 0,020$ ;  $p < 0,001$ ;  $\eta^2 = 0,886$ ). U koncentraciji nikla od 125 mg/L, koncentracija ampicilina od 0,5 mg/L značajno je usporavala rast u odnosu na niže koncentracije ( $0,0 \pm 0,0$  vs.  $0,177 \pm 0,71$ ,  $p < 0,001$ ,  $\eta^2 = 0,908$ ). Pri 250 mg/L ponovno je 0,5 mg/L ampicilina značajno usporavalo rast, dok je pri 500 mg/L nikla 0,25 mg/L ampicilina značajno usporavalo rast u odnosu na niže koncentracije ( $p < 0,001$ ,  $\eta^2 = 0,980$ ).

#### **4.11. Utjecaj različitih kombinacija koncentracija ampicilina i nikla na rast bakterije *E. coli***

Prema krivuljama rasta bakterije *E. coli* vidljiv je efekt supresije rasta s povećanjem koncentracije nikla, odnosno pojačavanje antibakterijskog efekta ampicilina. Do vidljivog sinergističkog učinka nikla i ampicilina dolazi pri koncentraciji nikla od 500 mg/L (Slika 16. d). Pri koncentraciji od 1000 mg/L nikla nema vidljivog bakterijskog rasta (Slika 16. e).

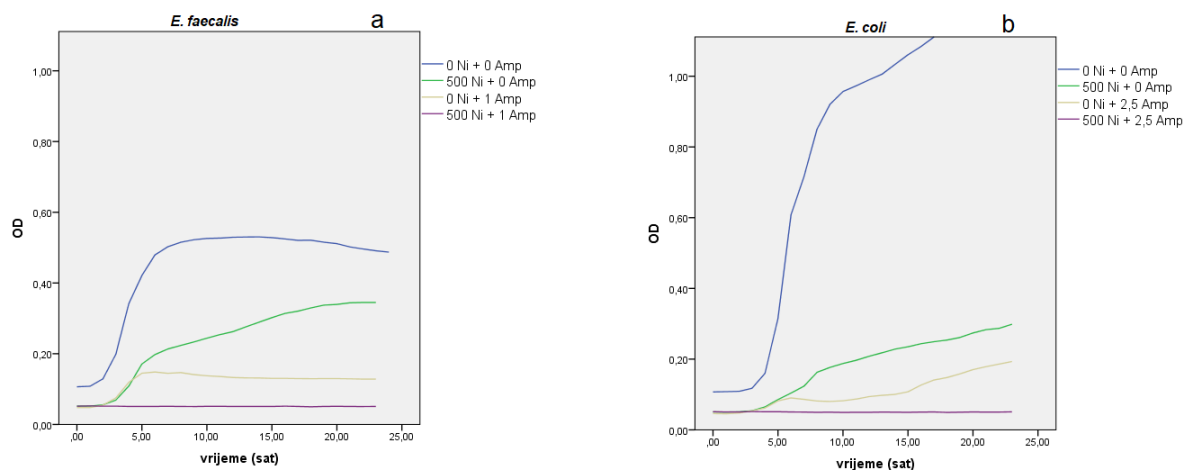


Slika 16. Krivulje rasta bakterije *E. coli* u različitim koncentracijama ciprofloksacina i nikla u mg/L (a – e; rast bakterije u različitim koncentracijama ciprofloksacina i nikla koje su navedene uz pojedini graf, krivulja je prikaz srednjih vrijednosti optičke gustoće pri 600 nm kroz 24 sata mjerene u triplikatu).

Koncentracija ampicilina značajno je smanjivala rast *E. coli* s velikom snagom efekta i graničnom koncentracijom od 2,5 mg/L u usporedbi sa 1,25 mg/L ( $0,075 \pm 0,048$  vs.  $0,230 \pm 0,030$ ;  $p < 0,001$ ;  $\eta^2 = 0,959$ ). U koncentraciji nikla od 125 i 250 mg/L ponovno je granična koncentracija koja je značajno usporavala rast bila 2,5 mg/L u odnosu na niže ( $p < 0,001$ ,  $\eta^2 = 0,970$  i  $\eta^2 = 0,986$ ). U 500 mg/L nikla nije bilo granične koncentracije ampicilina koja usporava logaritamsku fazu rasta.

#### 4.12. Prikaz sinergističkog učinka ampicilina i nikla na rast bakterija *E. faecalis* i *E. coli*

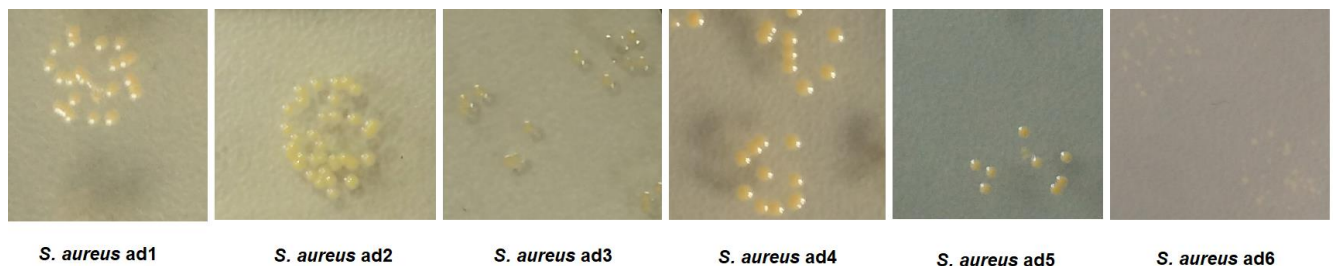
U odabranim krivuljama vidljivo je kako *E. faecalis* pokazuje rast u 500 mg/L nikla bez ampicilina i u 1 mg/L ampicilina bez nikla dok u kombinaciji 500 mg/L nikla i 1 mg/L ampicilina nema bakterijskog rasta (Slika 17. a). Kod rasta bakterije *E. coli* koncentracija nikla od 500 mg/L i ampicilina od 2,5 mg/L djeluju sinergistički (slika 17 b).



Slika 17. Krivulje rasta *E. faecalis* i *E. coli* u različitim kombinacijama ampicilina i nikla u mg/L – demonstracija sinergističkog ampicilina i nikla i nikla (a – b; rast bakterija u različitim koncentracijama ampicilina i nikla koje su navedene uz pojedini graf, krivulja je prikaz srednjih vrijednosti optičke gustoće pri 600 nm kroz 24 sata mjerene u triplikatu).

#### 4.13. Adaptacija bakterija *S. aureus* na nikal – morfološka obilježja

Adaptirane bakterije *S. aureus* su nakon inkubacije u trajanju od 3x24h na 37 °C u MH bujonu prebačene u koncentraciju nikla na koju su prethodno adaptirane. Bakterije *S. aureus*. ad1, ad2, ad3, ad4 i ad5 su pokazale rast u koncentraciji nikla te potvrdile adaptiranost za koju se pokazalo kako nije reverzibilna. Bakterija *S. aureus* ad6 je pokazala reverzibilnu adaptiranost, odnosno nije rasla kada je prebačena u koncentraciju nikla na koju je prethodno adaptirana. Inkubacija bakterije *S. aureus* ad5 bila je 48 sati, a bakterije *S. aureus* ad6 72 sata. Bakterije *S. aureus* ad5 i *S. aureus* ad6 pokazale su sitnije kolonije s manje pigmenta (Slika 18.).

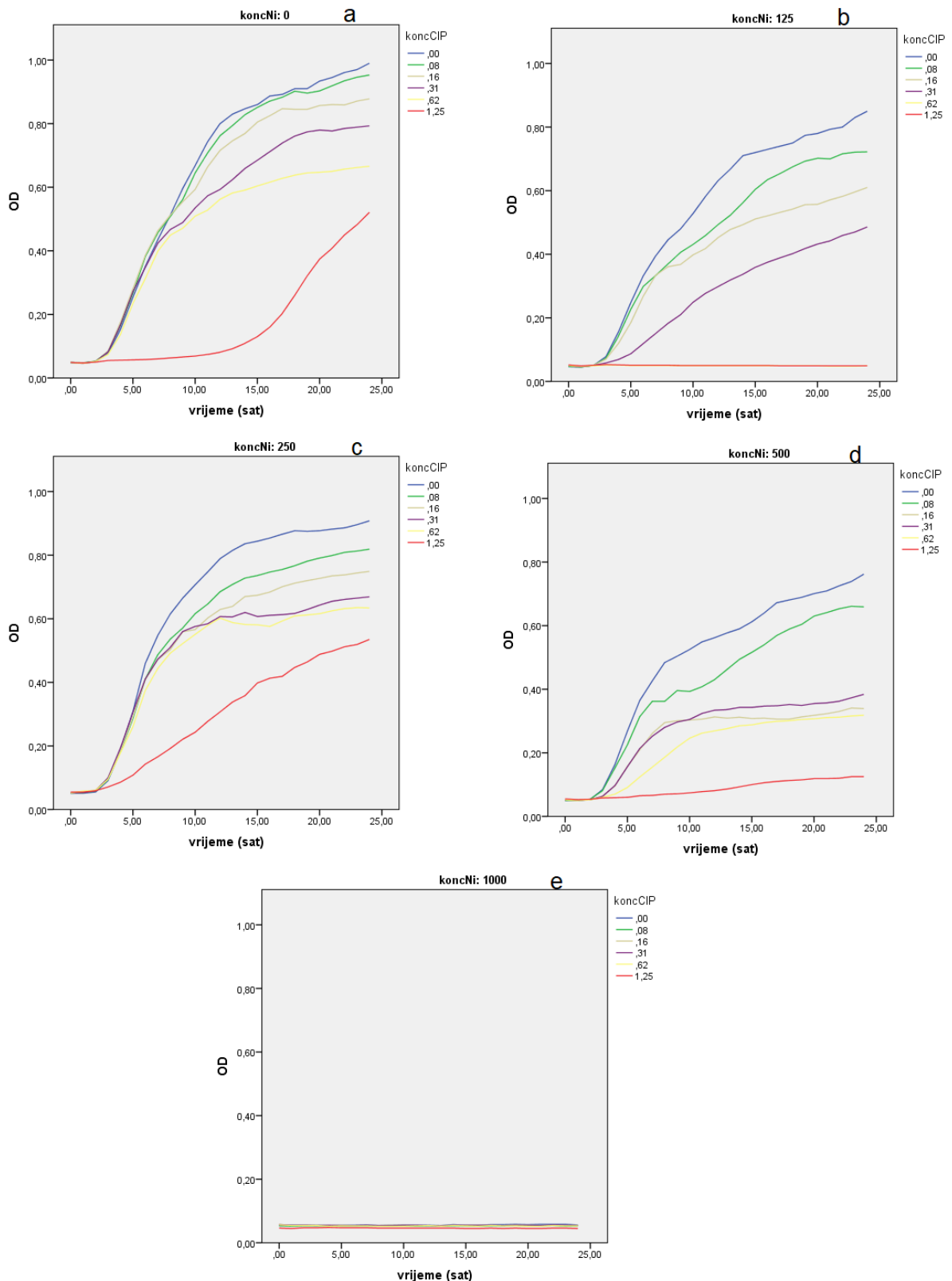


Slika 18. Fotografije kolonija sojeva bakterije *S. aureus* adaptiranih na nikal.

#### 4.14. Utjecaj različitih kombinacija koncentracija ciprofloksacina i nikla na rast bakterije *S. aureus* adaptirane na 250 mg/L nikla

Adaptirane bakterije odabrane su za sljedeće eksperimente na način da se uključe bakterije adaptirane na sub-inhibitorne koncentracije i na inhibitorne koncentracije nikla, koje su prethodno određene na ATCC soju *S. aureus* 29213.

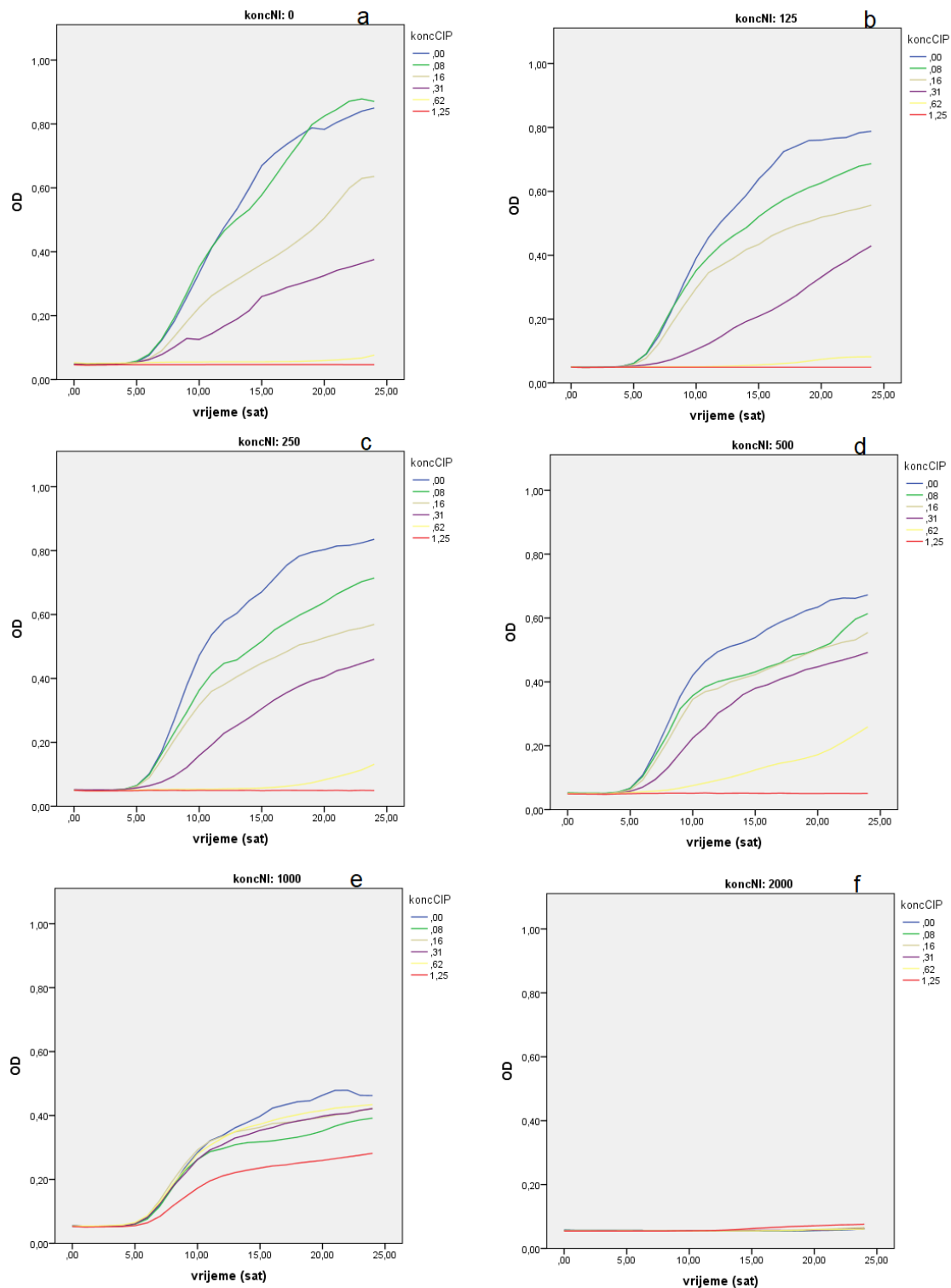
Vidljiva je redukcija bakterijskog rasta s povećanjem koncentracije nikla i koncentracije antibiotika (Slika 19.). Pri koncentraciji nikla od 0 mg/L, u koncentraciji ciprofloksacina od 1,25 mg/L lag faza je produžena za više od 10 sati u odnosu na dvostruko manju koncentraciju ciprofloksacina (Slika 19. a). Nema vidljivog rasta pri 1000 mg/L nikla (Slika 19. e).



Slika 19. Krivulje rasta bakterije *S. aureus* ad3 u različitim koncentracijama ciprofloksacina i nikla u mg/L (a – e; rast bakterije u različitim koncentracijama ciprofloksacina i nikla koje su navedene uz pojedini graf, krivulja je prikaz srednjih vrijednosti optičke gustoće pri 600 nm kroz 24 sata mjerene u triplikatu).

Značajna redukcija bakterijskog rasta vidljiva je pri 1000 mg/L nikla (Slika 20. e). Povećanje koncentracije ciprofloksacina također reducira bakterijski rast. Vidljiv je rast bakterije u 0,62 mg/L ciprofloksacina u koncentracijama nikla od 500 i 1000 mg/L (Slika 20. d i e), dok je u koncentracijama od 0, 125 i 250 mg/L rast zanemariv (Slika 20. a, b i c). Rast u koncentraciji od 0,31 mg/mL ciprofloksacina pokazuje produljenje laga faze u odnosu na rast u nižim koncentracijama ciprofloksacina (Slika 20. a, b, c i d).

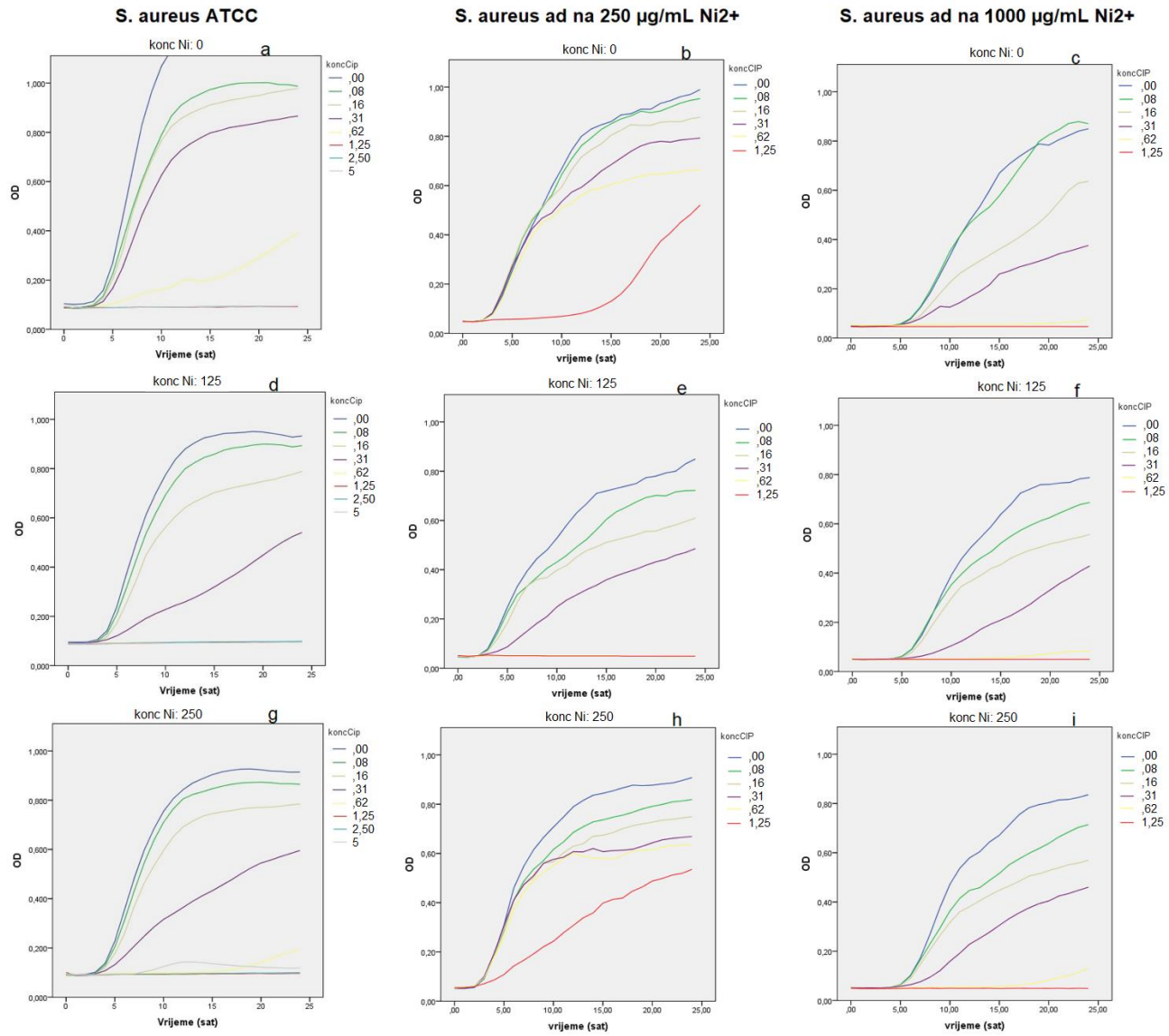


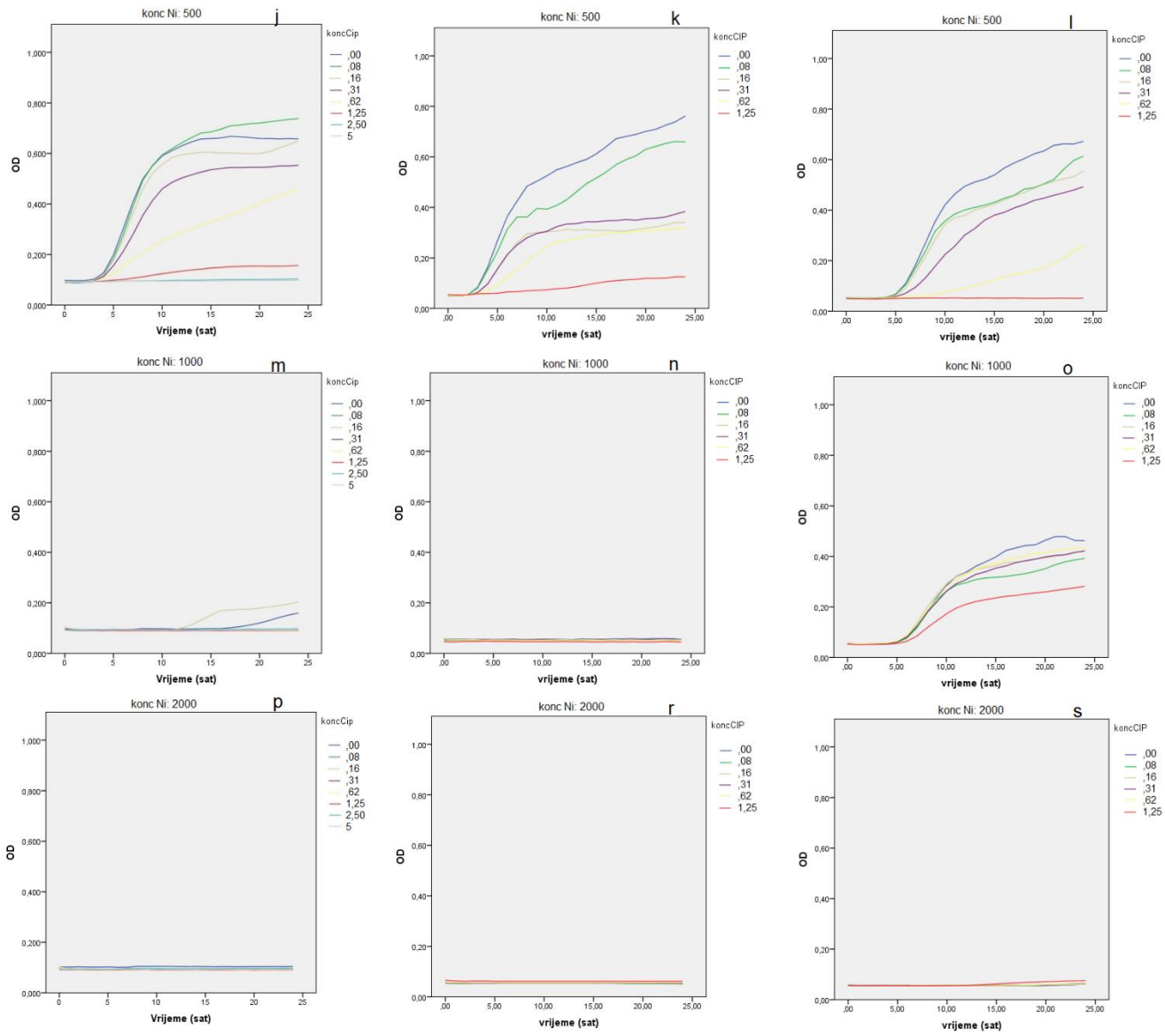


Slika 20. Krivulje rasta bakterije *S. aureus* ad5 u različitim koncentracijama ciprofloksacina i nikla u mg/L (a – e; rast bakterije u različitim koncentracijama ciprofloksacina i nikla koje su navedene uz pojedini graf, krivulja je prikaz srednjih vrijednosti optičke gustoće pri 600 nm kroz 24 sata mjerene u triplicatu).

#### **4.15. Usporedba krivulja rasta u različitim koncentracijama ciprofloksacina i nikla neadaptiranog i adaptiranih sojeva *S. aureus***

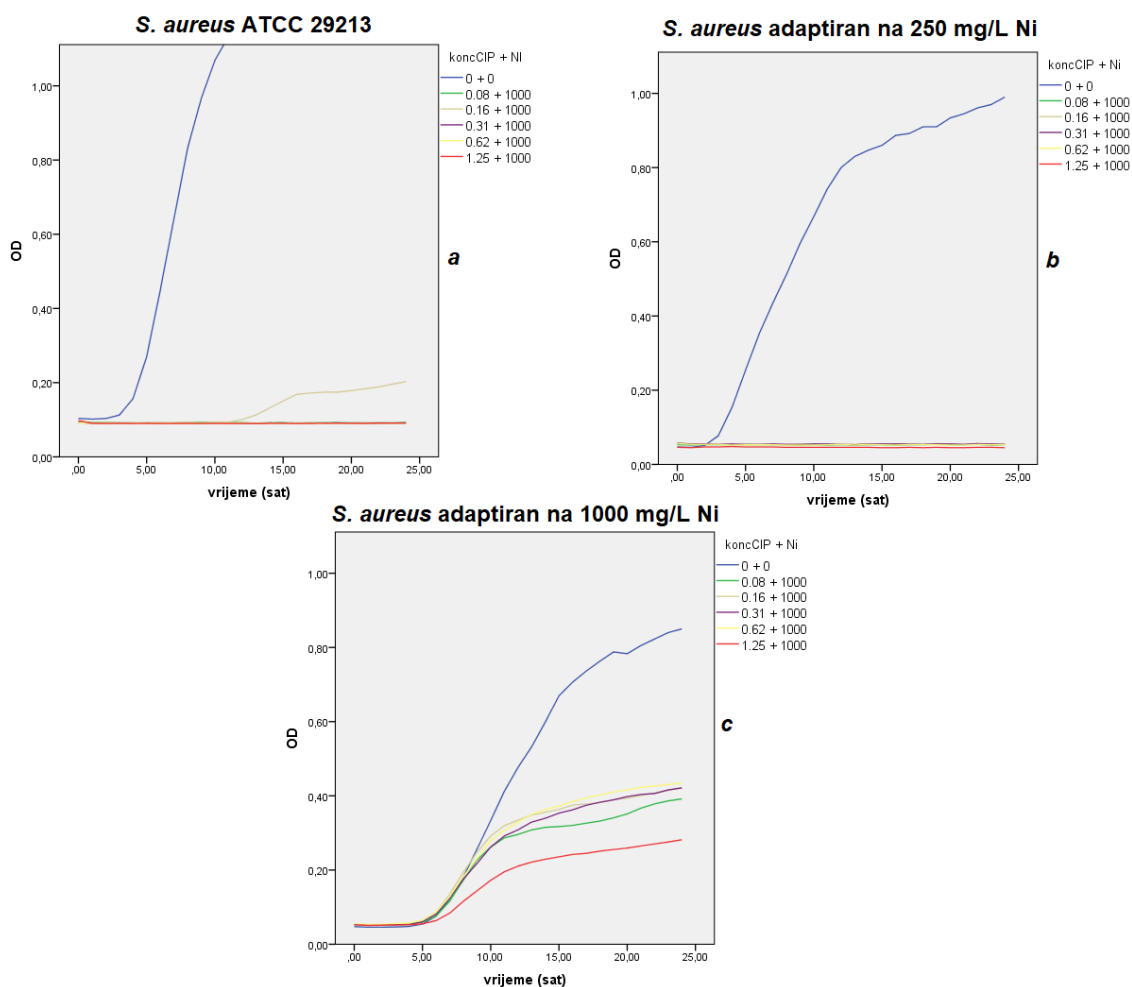
Uspoređujući krivulje rasta *S. aureus* ATCC 29213 (u daljnjem tekstu *S. aureus* ATCC) i soja adaptiranog na 250 mg/L nikla (*S. aureus* ad3) vidljiv je bolji rast adaptiranog soja u višim koncentracijama ciprofloksacina. Pri koncentracijama nikla od 0 i 250 mg/L bakterije *S. aureus* ad3 vidljivo bolje rastu u koncentracijama ciprofloksacina od 0,62 i 1,25 mg/L nego li bakterije *S. aureus* ATCC (Slika 21. a, b, g i h). Rast bakterije *S. aureus* ad3 u 1,25 mg/L ciprofloksacina pokazuje produljenje lag faze za više od 10 sati (graf b, slika 21). Bakterije *S. aureus* ad5 pokazuju produljenje laga faze za 2-3 sata u odnosu na bakterije *S. aureus* ad3 i *S. aureus* ATCC (Slika 21. c, f, l, i, o). *S. aureus* ad5 pokazuje rast u koncentraciji od 1000 mg/L nikla, za razliku od *S. aureus* ad3 i *S. aureus* ATCC (Slika 21. m, n, o). U koncentracijama od 2000 mg/L nikla nema značajnog bakterijskog rasta (Slika 21. p, r, s).





Slika 21. Krivulje rasta bakterije *S. aureus* ATCC, *S. aureus* ad3 i *S. aureus* ad5 u različitim koncentracijama ciprofloksacina i nikla u mg/L (a – s; rast bakterije u različitim koncentracijama ciprofloksacina i nikla koje su navedene uz pojedini graf, krivulja je prikaz srednjih vrijednosti optičke gustoće pri 600 nm kroz 24 sata mjerene u triplikatu).

*S. aureus* ad5 pokazuje rast u 1000 mg/mL nikla za razliku od sojeva *S. aureus* ad3 i *S. aureus* ATCC (Slika 22. a - c). Također, soj *S. aureus* ad5 koji se adaptirao na baktericidnu koncentraciju nikla za ATCC soj i ostale adaptirane sojeve, pokazaje i rast u prethodno dokazanim bakterostatskim i baktericidnim koncentracijama antibiotika ciprofloksacina. U MIK koncentraciji ciprofloksacina za ATCC soj od 0,62 mg/L vidljiv je rast bakterije (Slika 22. c). Rast se opaža i u MBK koncentraciji za ATCC soj od 1,25 mg/L ciprofloksacina (Slika 22. c).



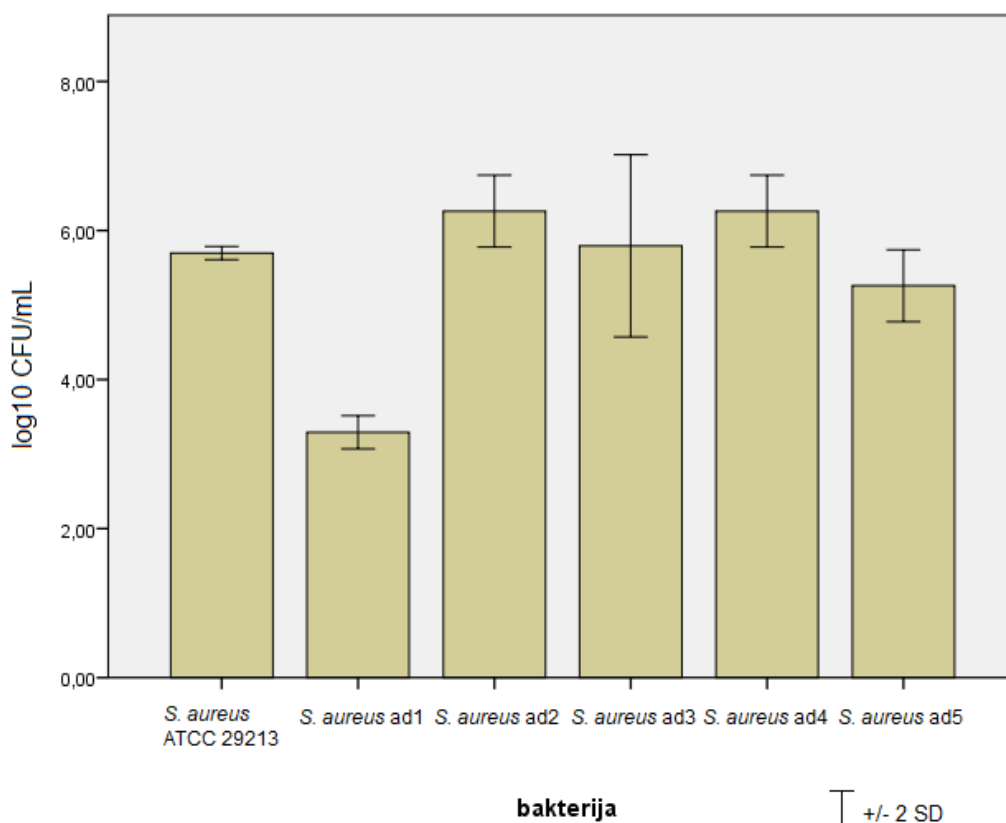
Slika 22. Krivulje rasta bakterije *S. aureus* ATCC, *S. aureus* ad3 i *S. aureus* ad5 u različitim koncentracijama ciprofloksacina i nikla u mg/L (a – c; rast bakterije u različitim koncentracijama ciprofloksacina i nikla koje su navedene uz pojedini graf, krivulja je prikaz srednjih vrijednosti optičke gustoće pri 600 nm kroz 24 sata mjerene u triplikatu).

U koncentraciji nikla od 0 mg/L, u različitim koncentracijama ciprofloksacina *S. aureus* ad3 i *S. aureus* ATCC imali su statistički značajno višu brzinu rasta od ad5 soja ( $0,117 \pm 0,185$  i  $0,126 \pm 0,085$  vs.  $0,060 \pm 0,056$ ,  $p < 0,001$ ). U koncentraciji nikla od 125 i 500 mg/L nije bilo statistički značajnih razlika u brzini logaritamske faze među sojevima. U koncentraciji od 250 mg/L nikla ponovno je *S. aureus* ad3 imao značajno višu brzinu rasta ( $0,133 \pm 0,019$  vs.  $0,094 \pm 0,079$  i  $0,074 \pm 0,048$ ,  $p < 0,001$ ). U koncentraciji od 1000 mg/L nikla, najvišu brzinu je imao soj *S. aureus* ad5 ( $0,083 \pm 0,033$ ), značajno višu od soja ATCC ( $0 \pm 0$ ), koji je imao značajno višu brzinu ad3 soja ( $0 \pm 0$ ;  $p < 0,001$ ). U koncentraciji od 2000 mg/L nije bilo bakterijskog rasta.

Uspoređujući brzinu logaritamskog rasta u istoj koncentraciji ciprofloksacina, u koncentracijama od 0, 0,08, 0,16 i 0,31 mg/L ciprofloksacina nije bilo statistički značajnih razlika u brzini logaritamskog rasta. U koncentraciji od 0,62 mg/L ciprofloksacina, *S. aureus* ad3 imao je statistički značajno višu brzinu rasta od ATCC soja i *S. aureus* ad5 ( $0,069 \pm 0,071$  vs.  $0,021 \pm 0,040$  i  $0,032 \pm 0,038$ ,  $p < 0,001$ ). U koncentraciji od 1,25 mg/L ciprofloksacina također je brzina logaritamskog rasta bila značajno više kod soja *S. aureus* ad3 u usporedbi sa ATCC i *S. aureus* ad5 sojem ( $0,038 \pm 0,048$  vs.  $0 \pm 0$  i  $0,007 \pm 0,021$ ).

#### **4.15.1. Adhezija adaptiranih sojeva bakterije *S. aureus* na polistiren**

Adhezija je u ovom radu mjerena kao broj bakterija u adheriranom sloju u CFU/mL nakon inkubacije od 24 h. Razlika u broju CFU/mL adheriranih bakterija na polistiren između sojeva bila je statistički značajna ( $p < 0,05$ ). Najniže vrijednosti CFU/mL pokazao je *S. aureus* ad1, a najviše *S. aureus* ad4, no nisu detektirane statistički značajne razlike između bakterija kod višestrukih usporedbi (Slika 23.).



Slika 23. Adhezija kontrolnog i adaptiranih sojeva *S. aureus* na polistiren izražena u log<sub>10</sub> CFU/mL mjerena nakon 24 h (početna koncentracija bakterija 10<sup>6</sup> CFU/mL). Pokus je ponovljen 2 puta u triplicatu i prikazana je srednja vrijednost ±SD.

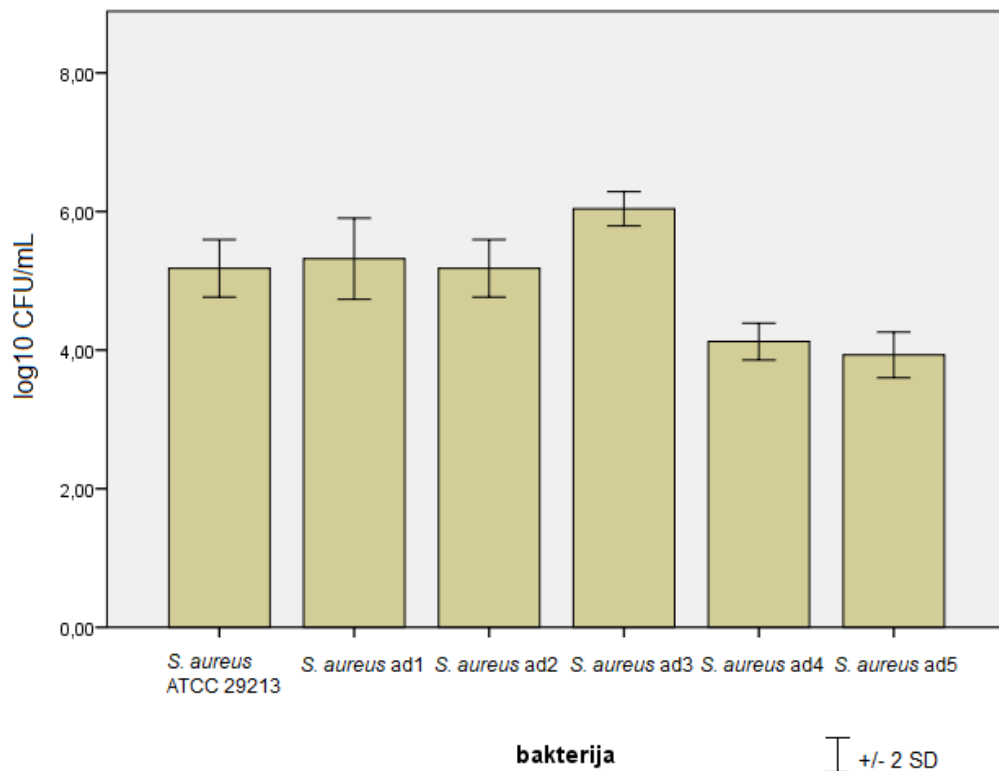
#### 4.16. Adhezija adaptiranih sojeva bakterije *S. aureus* na NiTi i čelične ortodontske lukove

Razlika u adheziji očitana u CFU/mL svih bakterija između NiTi i nehrđajućeg čelika nije bila statistički značajna. Ipak, analizirajući bakterije pojedinačno, *S. aureus* ATCC je adherirao značajno bolje na nehrđajući čelik ( $p < 0,05$ ). *S. aureus* ad3 i *S. aureus* ad1 su bili jedini sojevi koji su adherirali bolje na NiTi nego na SS ( $p < 0,005$ ).

Uspoređivajući CFU/mL bakterija adheriranih na NiTi postojale su statistički značajne razlike (Slika 24.). *S. aureus* ad3 je značajno bolje adherirao od *S. aureus* ad4 i *S. aureus* ad5 ( $p < 0,001$ ). ATCC soj nije pokazao značajno različitu sposobnost adhezije u usporedbi sa ostalim bakterijama. Pearsonove korelacije u NiTi grupi nisu

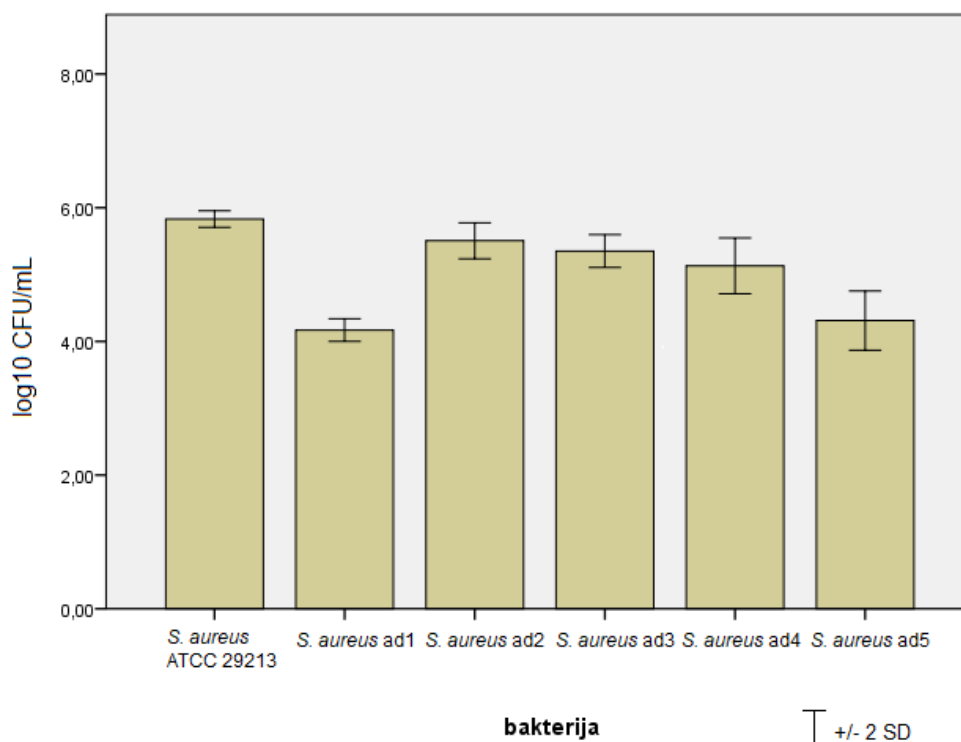


pokazale značajnu linearnu povezanost između koncentracije nikla na koju je bakterija adaptirana i adhezije.



Slika 24. Adhezija sojeva *S. aureus* na nikal-titanijske žičane lukove izražena u log<sub>10</sub> CFU/mL mjerena nakon 24 h (početna koncentracija bakterija 10<sup>6</sup> CFU/mL). Pokus je ponovljen 2 puta u triplikatu i prikazana je srednja vrijednost ±SD.

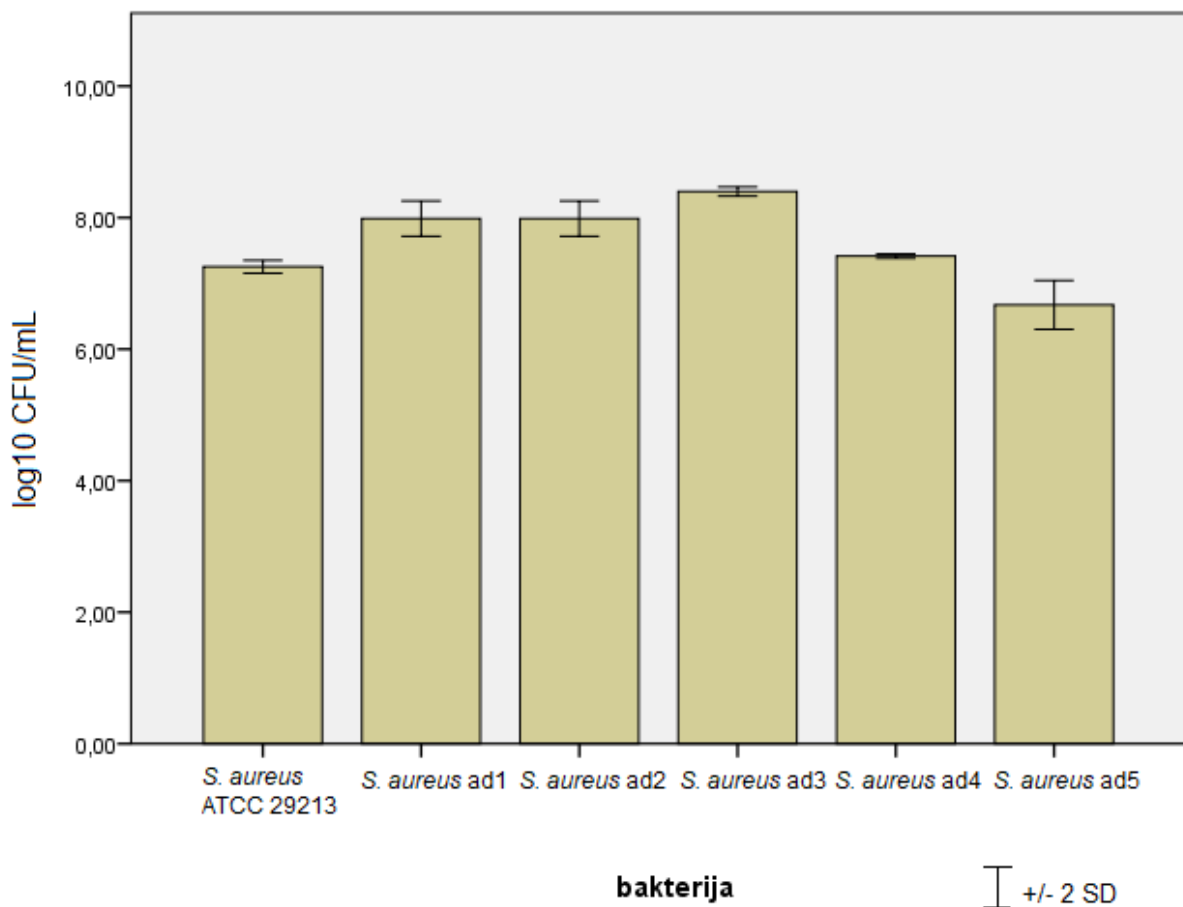
Postojale su statistički značajne razlike u CFU/mL između sojeva bakterija u adheziji na nehrđajući čelik ( $p < 0,001$ ) (Slika 25.). *S. aureus* ATCC je imao značajno viši CFU/mL od *S. aureus* ad1 i *S. aureus* ad5 ( $p < 0,001$ ). Također je *S. aureus* ad2 adherirao značajno bolje od *S. aureus* ad1 ( $p < 0,001$ ). Postojala je umjerena linearna negativna korelacija između koncentracije nikla na koju je soj adaptiran i adhezije ( $r = -0,535$ ,  $p < 0,05$ ). S porastom koncentracije nikla smanjivala se adhezija.



Slika 25. Adhezija sojeva *S. aureus* na čelične žičane lukove izražena u log<sub>10</sub> CFU/mL mjerena nakon 24 h (početna koncentracija bakterija 10<sup>6</sup> CFU/mL). Pokus je ponovljen 2 puta u triplicatu i prikazana je srednja vrijednost ±SD.

#### 4.17. Sposobnost stvaranja biofilma adaptiranih sojeva bakterije *S. aureus* na polistiren

Između sojeva je postojala značajna razlika u CFU/mL ( $p < 0,001$ ). Bakterija *S. aureus* ad3 stvorila je značajno više biofilma mjenog u CFU/mL od soja *S. aureus* ad5 ( $p < 0,001$ ). Nije bilo statistički značajne razlike između ATCC soja i nekih od adaptiranih sojeva (Slika 26.).

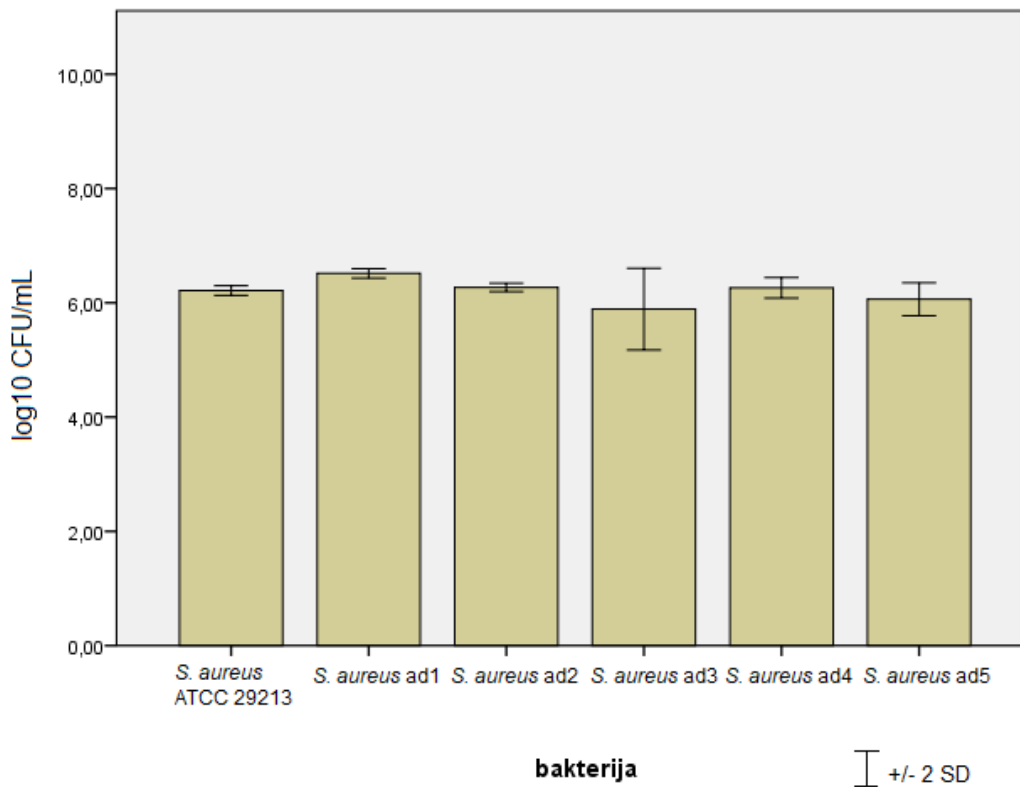


Slika 26. Biofilm stvoren od strane sojeva *S. aureus* na polistiren izražen u log<sub>10</sub> CFU/mL mjerena nakon 120 h (početna koncentracija bakterija 10<sup>6</sup> CFU/mL). Pokus je ponovljen 2 puta u triplikatu i prikazana je srednja vrijednost ±SD.

#### 4.18. Sposobnost stvaranja biofilma adaptiranih sojeva bakterije *S. aureus* na NiTi i čelične ortodontske lukove

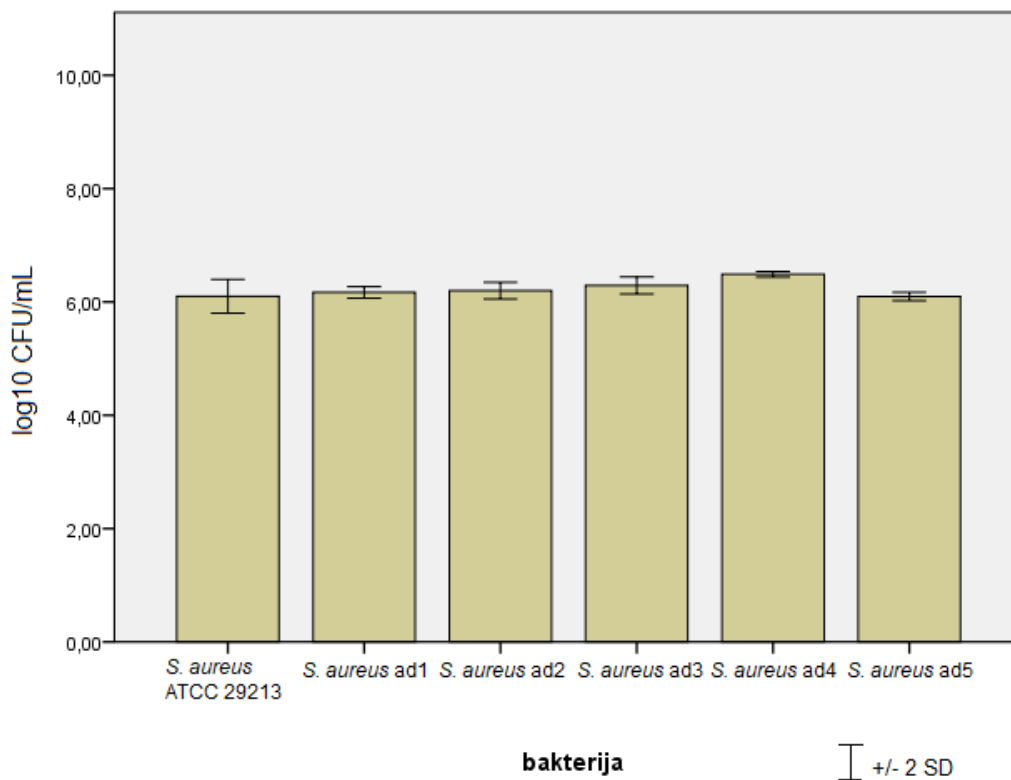
Za ATCC soj nije bilo razlike u količini stvorenog biofilma na nikal-titanijskim i čeličnim žičanim lukovima. Razlike su pokazali sojevi *S. aureus* ad1 koji je stvorio više biofilma na nikal-titaniju ( $p < 0,001$ ), *S. aureus* ad4 i *S. aureus* ad4 koji su pokazali više biofilma na čeličnim žicama ( $p < 0,001$ ).

Razlika u stvaranju biofilma mjenenog u CFU/mL na nikal-titanijske žičane lukove bila je statistički značajna ( $p < 0,001$ ). Nije detektirana značajna razlika između ATCC soja i ostalih sojeva. Bakterija *S. aureus* ad1 stvorila je veću količinu biofilma od soja *S. aureus* ad3 i *S. aureus* ad5 ( $p < 0,001$ ) (Slika 27.).



Slika 27. Biofilm stvoren od strane sojeva *S. aureus* na NiTi žičane lukove izražen u log<sub>10</sub> CFU/mL mjerena nakon 120 h (početna koncentracija bakterija 10<sup>6</sup> CFU/mL). Pokus je ponovljen 2 puta u triplikatu i prikazana je srednja vrijednost ±SD.

Postojale su statistički značajne razlike između bakterija u količini stvorenog biofilma mjenjenog u CFU/mL na čelične žičane lukove ( $p < 0,001$ ). Ponovno nije bilo značajne razlike između ATCC soja i adaptiranih sojeva. *S. aureus* ad4 imao je značajno veći CFU/mL od soja *S. aureus* ad1 i *S. aureus* ad5 ( $p < 0,001$ ) (Slika 28.).



Slika 28. Biofilm stvoren od strane sojeva *S. aureus* na čelične žičane lukove izražen u log<sub>10</sub> CFU/mL mjerena nakon 120 h (početna koncentracija bakterija 10<sup>6</sup> CFU/mL). Pokus je ponovljen 2 puta u triplikatu i prikazana je srednja vrijednost ±SD.

#### 4.19. Antibiogram adaptiranih bakterija *S. aureus* na nikal

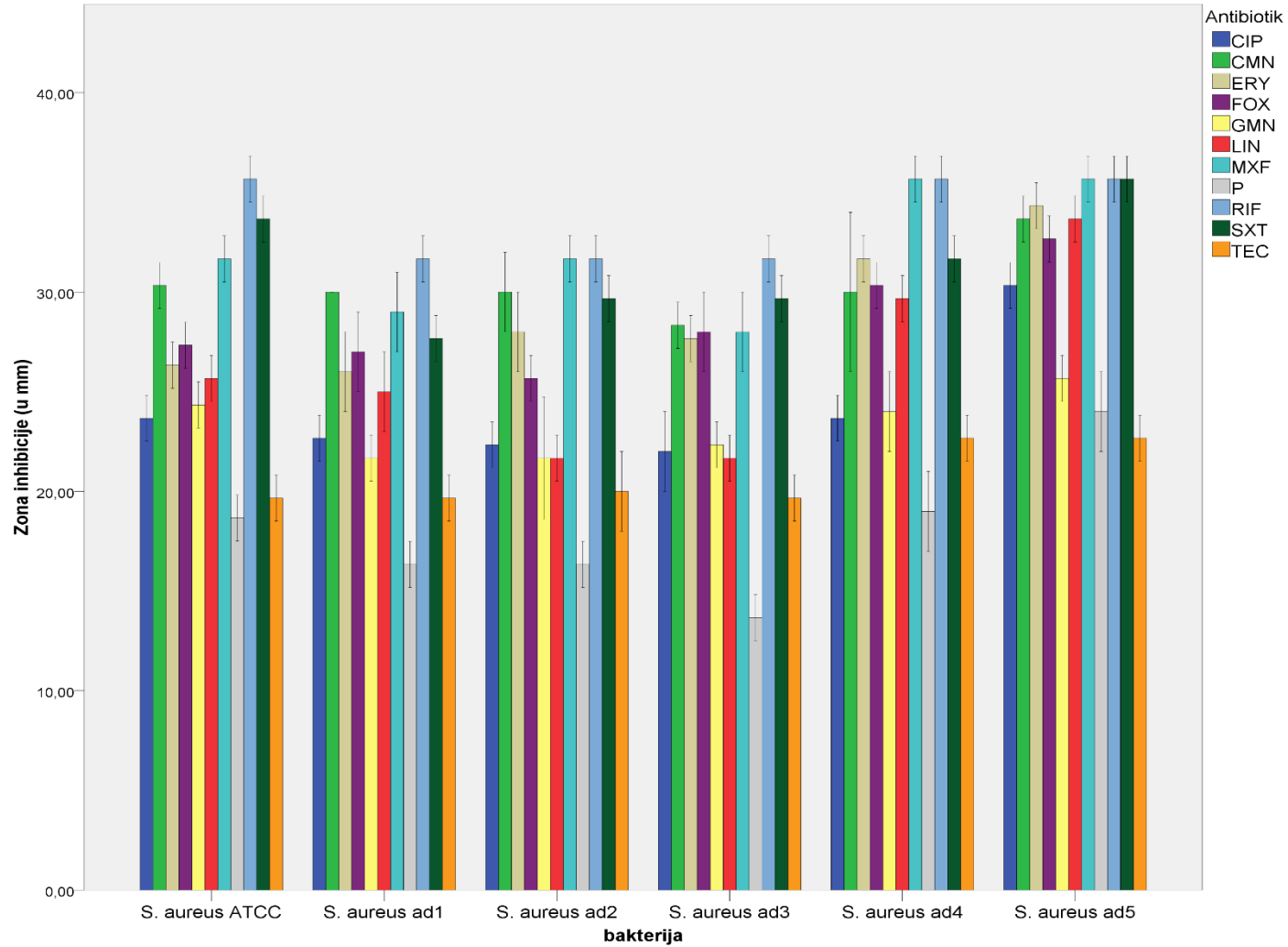
Rezultati antibiograma pokazali su osjetljivost svih sojeva, ATCC, ad1, ad2, ad3, ad4, ad5 na antibiotike prema vrijednostima zone inhibicije prema EUCAST-u (Tablica 6.).

Tablica 6. – Rezultati antibiograma kontrolnog i adaptiranih sojeva

	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>S. aureus</i> ad1	<i>S. aureus</i> ad2	<i>S. aureus</i> ad3	<i>S. aureus</i> ad4	<i>S. aureus</i> ad5
	AS (interpretacija)					
CIP	23,7 (O)	22,7 (O)	22,3 (O)	22 (O)	35,7 (O)	30,3 (O)
CMN	30,3 (O)	30 (O)	30 (O)	28 (O)	30 (O)	34 (O)
ERY	26,3 (O)	26 (O)	30 (O)	28,3 (O)	30 (O)	33,7 (O)
FOX	27,5 (O)	27 (O)	25,7 (O)	28 (O)	30,3 (O)	32,7 (O)
GMN	24,3 (O)	21,3 (O)	21,7 (O)	22,3 (O)	24 (O)	25,7 (O)
LIN	25,7 (O)	25 (O)	21,7 (O)	21,7 (O)	29,7 (O)	33,7 (O)
MXF	31,7 (O)	29 (O)	31,7 (O)	28 (O)	35,7 (O)	35,7 (O)
P	18,7 (O)	16,3 (O)	16,3 (O)	13,7 (O)	19 (O)	25 (O)
RIF	35,7 (O)	31,7 (O)	31,7 (O)	31,7 (O)	35,7 (O)	35,7 (O)
SXT	33,7 (O)	27,7 (O)	29,7 (O)	29,7 (O)	31,7 (O)	35,7 (O)

AS – aritmetička sredina očitavanja promjera zone inhibicije; interpretacija: O – osjetljiv na antibiotik, R – rezistentan na antibiotik; antibiotici: P –penicilin, CMN – klindamicin, ERY – eritromicin, GMN – gentamicin, FOX – cefoksitin, TEC – teikoplanin, LIN – linezolid, CIP – ciprofloksacin, RIF – rifampicin, SXT - trimetoprim + sulfametoksazol, MOX - moksifloksacin

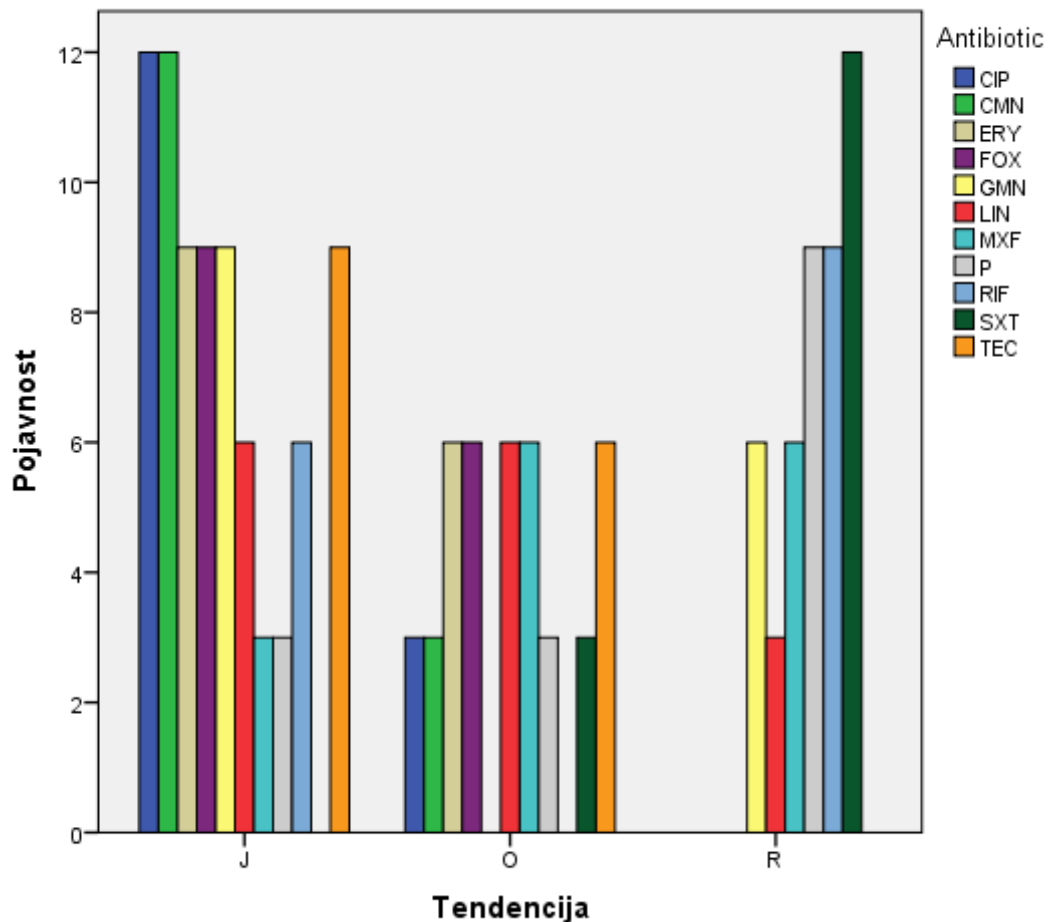
Ipak, pokazane su tendencije prema većoj ili manjoj osjetljivosti na antibiotike. *S. aureus* ad5 pokazao je značajno veću osjetljivost na niz antibiotika (CIP, CMN, ERY, FOX, LIN, MXF, P, SXT, TEC) u usporedbi sa ATCC sojem ( $p < 0,05$ ). *S. aureus* ad4 bio je značajno osjetljiviji na niz antibiotika (ERY, FOX, LIN, MXF, TEC) ( $p < 0,05$ ) u odnosu na ATCC, dok je za SXT bio značajno rezistentniji u odnosu na ATCC soj ( $p < 0,05$ ). *S. aureus* ad1 bio je značajno rezistentniji na neke antibiotike (GMN, P, RIF, SXT, MXF) u odnosu na ATCC soj. *S. aureus* ad2 je također pokazao manju osjetljivost na neke antibiotike (GMN, P, RIF, SXT) kao i *S. aureus* ad3 (LIN, MXF, P, RIF, SXT) u odnosu na ATCC soj ( $p < 0,05$ ) (Slika 29.).



Slika 29. Antibiogram sojeva *S. aureus* ATCC i sojeva adaptiranih na nikal.



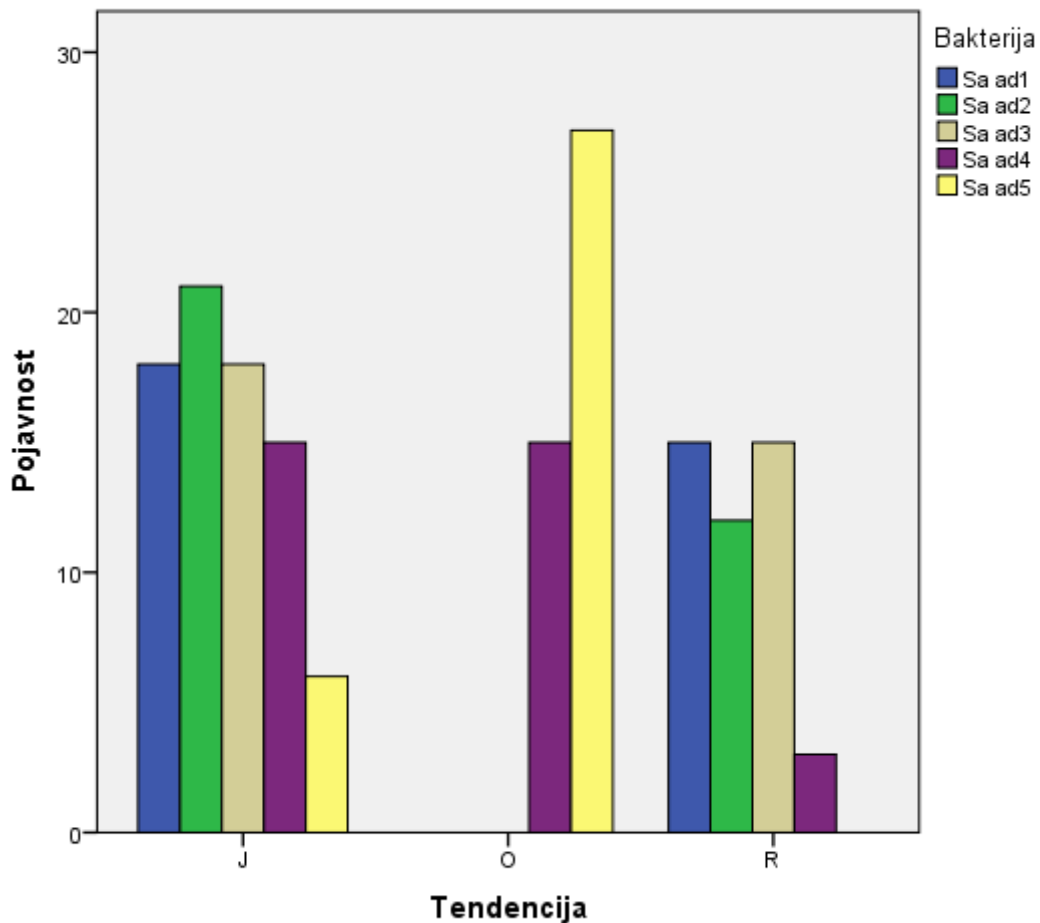
Kada se statistički povećana osjetljivost, povećana rezistentnost i jednaka osjetljivost prikažu kao kategoričke varijable (O, R i J) vidljivi su sljedeći obrasci; neki antibiotici pokazuju veću tendenciju za pojavu povećane osjetljivosti, a neki za pojavu povećane rezistencije u adaptiranih bakterija (Slika 30.).



Slika 30. Tendencija promjene osjetljivosti na antibiotike prema vrsti antibiotika (pojavnost – broj sojeva koji su bili statistički osjetljiviji, rezistentiji ili jednake osjetljivosti u odnosu na ATCC soj; tendencija – statistički značajna promjena promjera pri očitavanju antibiogramu, u izostanku statističke značajnosti – jednaka osjetljivost).

Razlike među antibioticima s obzirom na pojavnost jednake osjetljivosti, pojačane osjetljivosti ili pojačane rezistencije su bile značajne ( $p < 0,05$ ). Postoji umjerena povezanost vrste antibiotika i pojave promjenjene osjetljivosti (Cramerov  $V = 0,508$ ).

Vidljivo je da je pojava pojačane osjetljivosti češća za eritromicin, cefoksitin, linezolid i teikoplanin, dok je pojačana rezistencija češća za penicilin, rifampicin i trimetoprim-sulfametoksazol. Nije zabilježena pojavnost tendencije povećane osjetljivosti za rifampicin. Povećane rezistencije nije bilo za ciprofloksacin, klindamicin, eritromicin, cefoksitin i teikoplanin.



Slika 31. Tendencija promjene osjetljivosti na antibiotike prema vrsti soja (pojavnost – broj sojeva koji su bili statistički osjetljiviji, rezistentiji ili jednake osjetljivosti u odnosu na ATCC soj; tendencija – statistički značajna promjena promjera pri očitavanju antibiogramu, u izostanku statističke značajnosti – jednaka osjetljivost).

S obzirom na pojavnost promjene osjetljivosti u usporedbi sa ATCC sojem prema soju adaptirane bakterije postoji statistička značajnost razlike među bakterijama ( $p < 0,05$ ). Umjerena je povezanost soja bakterije i pojavnosti veće, manje ili jednake

osjetljivosti (Cramerov  $V = 0,556$ ) te je nešto veća povezanost nego ona vrste antibiotika i promjene osjetljivosti (Slika 31.).

#### 4.20. Ispitivanje antimikrobne osjetljivosti na nikal adaptiranog *S. aureus*

MIK adaptiranih bakterija pokazuje povećanje u odnosu na MIK ATCC soja. Za ciprofloksacin *S. aureus* ad3, ad5 pokazuju dvostruko veći MIK od *S. aureus* ATCC. *S. aureus* ad2 pokazuje dvostruko veći MBK u odnosu na ATCC soj (Tablica 7.). Za ampicilin bakterije *S. aureus* ad2, ad3, ad4, ad5 pokazuju porast MIK-a u odnosu na ATCC soj. Do povećanja MBK u odnosu na ATCC soj dolazi kod *S. aureus* ad5 (Tablica 7). Sojevi *S. aureus* ad3 i *S. aureus* ad5 pokazuju najveći porast MIK-a i MBK za gentamicin u odnosu na ATCC soj (Tablica 7).

Tablica 7. Minimalne inhibitorne i minimalne baktericidne koncentracije sojeva *S. aureus* adaptiranih na nikal za antibiotike ciprofloksacin, ampicilin i gentamicin

Bakterija	MIK	MBK	MIK	MBK	MIK	MBK
	CIP	CIP	AMP	AMP	GMN	GMN
koncentracije u mg/L						
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	0,62	1,25	1	2	0,5	1
<i>S. aureus</i> ad1	0,62	1,25	0,62	0,62	0,31	0,31
<i>S. aureus</i> ad2	0,62	2,5	1,25	1,25	0,62	0,62
<i>S. aureus</i> ad3	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25
<i>S. aureus</i> ad4	0,62	0,62	1,25	1,25	0,62	1,25
<i>S. aureus</i> ad5	1,25	1,25	1,25	2,5	1,25	5

## 5. RASPRAVA

Prosječno otpuštanje nikla pri niskim pH, kod pacijenata s lošom higijenom je u rasponu 0,55 – 3,36 µg, ovisno o dimenziji žičanog luka (0,014 - 0,018 x 0,025 inča). Dok je kod viših pH vrijednosti, sličnom onome kod pacijenata s dobrom higijenom u rasponu 0,29 – 1,77 µg. S obzirom na prosječni dnevni unos nikla hranom od 300-500 µg [160], dobivene vrijednosti mogle bi biti značajan dodatni unos nikla. Vidljiva je još jedna dobrobit održavanja oralne higijene, u vidu više nego dvostruke redukcije elucije niklovih iona iz žičanih lukova. Ipak, još niz elemenata može utjecati na pH usne šupljine. Suprotno poželjnom učinku, neki agensi za održavanje oralne higijene koji sadrže fluorida mogu pojačati koroziju nikla [71].

MIK za ciprofloksacin za bakteriju *S. aureus* bio je nešto viši od vrijednosti prema EUCAST-u, koje su u rasponu 0,125 - 0,5 mg/L. MIK ciprofloksacina za *E. faecalis* i *E. coli* bio je u rasponu EUCAST-a; 0,25 – 2 mg/L, odnosno 0,004 - 0,016 mg/L. MIK za ampicilin je za bakterije *E. faecalis* i *E. coli* bio u rasponima prema EUCAST-u; 0,5 - 2 i 2 - 8 mg/L [150]. MIK ampicilina za *S. aureus* ATCC 29213 nije objavljen u podacima EUCAST-a te ga nije bilo moguće usporediti.

Minimalne inhibitorne koncentracije nikla za *S. aureus* izoliran iz okoliša su u rasponu 100 - 1500 mg/L [1]. Za izolirane enterokoke iz okoliša reportiran je MIK nikla od 1024 mg/L [26]. Izolati *E. coli* iz otpadnih voda pokazali su MIK nikla u rasponu 200-2000 mg/L [2]. Iako ne postoje MIK-ovi u literaturi za ATCC sojeve testirane kroz ovo istraživanje, okolišne bakterije pokazuju slične minimalne inhibitorne koncentracije nikla onima dobivenim u ovom eksperimentu.

Kombinacija ciprofloksacina i nikla u određenim kombinacijama djelovala je sinergistički, pojačavajući učinak oba spoja na inhibiciju rasta bakterije *S. aureus*. Suprotno tome, na rast bakterije *E. faecalis* i *E. coli* ta dva spoja djelovala su antagonistički, na način da je koncentracija nikla od 500 mg/L suprimirala djelovanje ciprofloksacina.

Kombinacija ampicilina i nikla pokazala je drugačije djelovanje. Aditivan učinak je primijećen na rast bakterije *E. faecalis* u nizu kombinacija koncentracija te na *E. coli*, u jednoj kombinaciji koncentracija. Na rast bakterije *S. aureus* spojevi nisu pokazali interakciju.

Korištenje metala kao antibakterijskih agenasa seže tisućama godina u povijest te su ih antibiotici zamijenili tek u 20. stoljeću [59]. Značajna razlika je što antibiotici djeluju na neki specifični cilj; replikaciju, transkripciju, enzime, dok metali djeluju na niz staničnih procesa [5], [88]. Ipak, problem korištenja metala je njihovo toksično djelovanje i na eukariotske stanice [41]. Poznato je i sinergističko djelovanje metala i antibiotika. Istraživanje Montelongo-Peralte i sur. iz 2019. pokazuje sinergističko djelovanje srebrovog nitrata i izoniazida u terapiji protiv rezistentnih sojeva *Mycobacterium tuberculosis* [108]. Studija iz 2016. pokazala je sinergistički učinak nanočestica cinkovog oksida te antibiotika ampicilina i ciprofloksacina na inhibiciju rasta niza bakterija među kojima su bili i patogeni sojevi *S. aureus* i *E. coli*. Möhler i sur. su utvrdili sinergistički učinak beta laktamskih antibiotika i iona bakra, srebra i cinka, od kojih je srebro imalo najviši sinergistički učinak [107]. Ne pokazuju samo kombinacije antibiotika i metala sinergiju, jedno istraživanje je pokazalo 1000 puta jači inhibicijski efekt na bakterijski rast u sinergiji metala i organskih kiselina [179]. Također, ispitivanja sinergističkog efekta više metala, poput kombinacija zlato/platina, zlato/paladij i platina/paladij pokazalo je pojačanje antimikrobnog učinka na bakterije *Enterococcus faecium*, *Klebsiella pneumoniae* i *Acinetobacter baumannii* [165].

S druge strane, poznata je i antagonistička reakcija metala i antibiotika. Zhou i sur. su 2015. na primjeru okolišnog *Pseudomonas fluorescens* pokazali da u rastu u prisutnosti teških metala, Pb, Cu, Zn, Cr i Hg, dolazi do slabijeg djelovanja antibiotika na istu bakteriju [181]. Još jedna studija pokazuje antagonistički učinak metalnih kationa i antibiotika tetraciklina, uslijed formiranja kompleksa između istih te posljedične smanjenje bioraspoloživosti tetraciklina [157].

U rastu *S. aureus* vidljiv je određeni sinergistički učinak. U najnižoj koncentraciji nikla (125 mg/L) vidljiv je slabiji rast te potpuni izostanak rasta bakterije u 0,62 mg/L ciprofloksacina koji je vidljiv kada nema prisutnog nikla. Neki kelati kinolona i metala pokazuju jednak ili čak bolji učinak od izoliranog djelovanja kinolona. Primjerice, neki kelati bolje penetriraju u stanicu te kao takvi imaju jače antimikrobno djelovanje [66], [128].

Krivulje rasta bakterija *E. coli* i *E. faecalis* pokazuju zanimljiv trend razvoja rezistencije na antibiotik nakon kratkotrajnog (24h) izlaganja metalu. U subinhibitornim koncentracijama nikla od 500 mg/L, pokazuju rast u koncentracijama ciprofloksacina četverostruko višim od MIK-a. Za *E. coli* zabilježen je i dobar rast bakterije u MIK ciprofloksacina u prisustvu 250 mg/L nikla. Takva pojava zabilježena je u literaturi [23], [181]. Interakcija metala i antibiotika prvo je opisana kao redukcija antimikrobne aktivnosti u prisustvu iona metala [86], [4]. Različita je bila koncentracija metala koja je dovela do razvoja rezistencije, u literaturi se navode koncentracije 1/64 i 1/16 MIK-a metala dok je u ovoj studiji koncentracija metala od 1/2 MIK-a dovela do razvoja rezistencije. Dva su moguća mehanizma koja bi mogla dovesti do opažene pojave. Jedan je kelacija metala i ciprofloksacina koja može dovesti do smanjene penetracije antibiotika u bakterijsku stanicu ili do stvaranja inaktivnih kelata [94]. Drugi je ekspresija sustava za antimikrobnu rezistenciju potaknuta metalima u bakterija. Jedna studija opisuje pojačanu ekspresiju nekoliko gena vezanih za antimikrobnu preosjetljivost u bakterije iz roda *Enterobacteriaceae* nakon 24-ero satnog izlaganja arsenu [23]. U bakterije *Salmonella enterica* bakar i cink su doveli do pojačanja transkripcije gena za efluks pumpu te posljedično do povećane rezistencije na antibiotike [118]. Na primjeru *E. coli*, bakar je inicirao operon marRAB za višestruku antibiotsku rezistenciju [57].

Još 1985. je objavljeno da ciprofloksacin u prisustvu metala pokazuje smanjenu bioraspoloživost [60]. Nadalje, pokazalo se kako kompleksi koje stvaraju metali i kinoloni mogu smanjiti crijevnu apsorpciju antibiotika [132]. Smanjenje bioraspoloživosti ciprofloksacina u zdravih ljudi zapaženo je pri istodobnoj preskripciji soli željeza [70]. Postoji visoka korelacija između smanjenja bioraspoloživosti kinolonskog antibiotika i iona  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  i  $\text{Fe}^{2+}$  [166].

Iako prema rezultatima FIK-a nema interakcije ampicilina i nikla pri rastu *S. aureus*, vidljiv je mogući antagonistički učinak s obzirom da u koncentraciji od 250 mg/L nikla postoji nešto rasta, s izrazito produženom lag fazom u dvostrukoj MIK koncentraciji ampicilina. Smanjeni učinak ampicilina na rast *S. aureus* je zabilježen u soja rezistentnog na živu [24].

Za *E. faecalis* i *E. coli* vidljivo je da 500 mg/L nikla pojačava djelovanje ampicilina četverostruko smanjujući MIK. Beard i sur. upozorili su 1992. na rast soja *E. coli* osjetljivog na ampicilin nakon izlaganja ampicilina ionima bakra [11], no sličan učinak metala nije zabilježen u rezultatima ove studije. Poznata je učinkovitost ampicilinu dodanim nanočesticama srebra, kombinacija kojih pokazuje izrazito manje MIK-ove u odnosu na ampicilin [75].

Ciprofloksacin i nikal djelovali su blago sinergistički na rast *S. aureus*, dok su za *E. faecalis* i *E. coli* pokazali suprotnu interakciju. Nikal je suprimirao djelovanje ciprofloksacina, a pojačao djelovanje ampicilina. Različito djelovanje ampicilina i metala na rast bakterija u odnosu na djelovanje ciprofloksacina i metala ukazuje na važnost vrste antibiotika koji je u prisustvu metala. Vjerojatno je da je za kratkoročno izlaganje važniji oblik kelacije i njegova penetrantnost nego odgovor same bakterije.

Granična koncentracija koja je značajno usporavala brzinu logaritamskog rasta *S. aureus* u odnosu na nižu bila je 0,62 mg/L ciprofloksacina, što je u skladu sa rezultatima MIK-a. U višim koncentracijama nikla, granična koncentracija se smanjivala na 0,31 mg/L što prati već opisano sinergističko djelovanje ciprofloksacina i nikla.

Koncentracija ciprofloksacina koja je značajno usporavala rast *E. faecalis* jednaka je koncentraciji MIK-a. U koncentraciji nikla od 500 mg/L nije pronađena statistički granična koncentracija, no rezultati FIK-a i krivulje rasta upućuju na povećanje MIK-a za ciprofloksacin u toj koncentraciji nikla.

Za *E. coli* granična koncentracija koja je usporavala logaritamski rast također je jednaka MIK-u. Četverostruko povećanje granične koncentracije ciprofloksacina koja usporava logaritamski rast u 500 mg/L nikla u skladu je s rezultatima antagonističkog djelovanja, potvrđenih FIK-om i krivuljama rasta.

Rast *S. aureus* i *E. faecalis* slično je povezan s promjenom koncentracije ciprofloksacina i nikla, dok je rast *E. coli* više vezan uz promjenu koncentracije ciprofloksacina.

Granična koncentracija ampicilina koja je značajno usporavala logaritamsku fazu rasta *S. aureus* bila je dvostruko veća od MIK-a. U koncentraciji nikla od 125 mg/L granična koncentracija usporavanja se smanjila, što ide u prilog opisanom aditivnom djelovanju prema krivuljama rasta.

Granična koncentracija ampicilina koja je značajno usporavala rast *E. faecalis* bila je jednaka MIK-u. U višim koncentracijama nikla, granična koncentracija se smanjivala, dvostruko u 125 i 250 mg/L nikla te četverostuko u 500 mg/L nikla, potvrđujući sinergističko djelovanje nikla i ampicilina.

Za brzinu logaritamskog rasta bakterije *E. coli*, granična koncentracija ampicilina koja je usporavala rast bila je jednaka MIK-u. U višim koncentracijama nikla nije dolazilo do promjene granične koncentracije ampicilina, iako FIK i krivulje potvrđuju sinergistički efekt dvaju ispitivanih agenasa.



Soj *S. aureus* adaptiran na 250 mg/L nikla pokazao je razvoj povećane rezistencije na ciprofloksacin, no ne i na nikal u odnosu na ATCC soj. Promatrajući krivulje rasta, jasno je kako *S. aureus* ad3 raste u dvostruko većoj koncentraciji od MIK-a ciprofloksacina za ATCC soj. Soj *S. aureus* adaptiran na 2000 mg/L raste u koncentraciji nikla koja je inhibitorna za ATCC soj. No, ne pokazuje različit odgovor na iste koncentracije antibiotika u odnosu na ATCC. Također, kod *S. aureus* ad5 uočava se produženje suzdržane faze rasta.

ATCC soj *S. aureus* adherirao je bolje na čelik nego na nikal-titanij. Slično je primjećeno u prethodnoj studiji [103]. Bakterije adaptirane na nikal pokazale su različitu sposobnost adhezije na NiTi i nehrđajući čelik. Na čelik su adaptirane bakterije adherirale slabije nego ATCC soj. Generalno svi sojevi su pokazali adhezijski potencijal, no oni adaptirani na 125 i 250 mg/L nikla pokazali su najviši adhezijski potencijal. *S. aureus* ad5 je pokazao nešto slabiji adhezijski potencijal od drugih sojeva. Potencijal stvaranja biofilma bio je ujednačeniji od adhezijskog. Razlike između sojeva bili su manje nego li u adhezije. Adaptirani sojevi, izuzev soja ad5 su stvarali nešto više biofilma od ATCC, neadaptiranog soja no razlike nisu bile značajne. Čini se da iako su razlike u adhezijskom potencijalu nešto različite, svi adaptirani sojevi podjednako stvaraju biofilm kroz 5 dana i to nešto bolje od neadaptiranog soja. Istraživanja su pokazala da bakterije akumuliraju nikal [125]. Imajući na umu da dnevno otpuštanje nikla samo iz NiTi slitine ortodontskih lukova može doseći 40 µg na dan [127], promjena potencijala adhezije uslijed adaptacije na nikal mogla bi biti klinički problem. Prisutnost *S. aureus* u usnoj šupljini je podcijenjena te bi modifikacija od strane nikla i pojačana adhezija na ortodontske žičane lukove mogla biti problematična [145]. Također, postoji rizik od diseminacije *S. aureus* u druge organe iz usne šupljine [101]. Jedno od rješenja mogle bi biti obloženi nikal-titanijski žičani lukovi na koje bakterije čini se slabije adheriraju [55].

Iako prema EUCAST-u niti jedan od adaptiranih sojeva nije svrstan u rezistentne niti na jedan ispitivani antibiotik, prema statističkoj značajnosti svi sojevi su pokazali pomak prema većoj osjetljivosti ili prema većoj rezistenciji. Dok su bakterije adaptirane na više koncentracije nikla, 500 i 1000 mg/L bile osjetljivije na antibiotike nego ATCC soj, kod bakterija adaptiranih na manje koncentracije primijećeno je suprotno. Već adaptacije na relativno niske koncentracije, od 62,5 mg/L, imale su tendenciju više rezistencije na neke antibiotike. Rezultati prethodnih studija su pokazali isto, pri niskim koncentracijama metala, moguć je razvoj rezistencije na antibiotike [23].

Također je poznato da u prisustvu nikla, okolišne bakterije postaju rezistentne na antibiotike [17], [140].

Penicilin, rifampicin i trimetoprim – sulfametoksazol bili su antibiotici na koje su adaptirani sojevi pokazali najviše tendencije rezistenciji. Sojevi *S. aureus* rezistentni na penicilin javili su se vrlo brzo nakon početka njegove upotrebe [91]. Do kasnih 1960-ih, više od 80% okolišnih i bolničkih izolata *S. aureus* su bili rezistentni na penicilin [19]. Ipak, studija iz 2017. pokazuje kako je čak 57 % izolata iz bakterijemije bilo osjetljivo na penicilin te smatra da bi se po potvrđenom antibiogramu isti mogao češće koristiti u terapiji [50]. Rezistencija na trimetoprim-sulfametoksazol je rijetka, on je čak jedan od antibiotika od izbora kod slabog odgovora meticilin rezistentnog *Staphylococcus aureus* (MRSA) na vankomicin [129]. Iako su rezistentni sojevi rijetki u Europi, studije potvrđuju rezistentne sojeve *S. aureus* na području sub-saharske Afrike i Azije [119], [120]. Rifampicin se primarno klinički koristi u terapiji tuberkuloze. Predlagana je njegova upotreba kao dodatnog agensa beta-laktamima ili glikopeptidima u terapiji *S. aureus* uzrokovane bakterijemije [139], no recentna studija opovrgava korist od takve upotrebe rifampicina [154].

Istraživanje na okolišnim bakterijama koje su pokazale rezistenciju na nikal, potvrđuje i visoku rezistenciju na penicilinske antibiotike [156]. Postoje i drugačiji rezultati, gdje su bakterije rezistentne na nikal bile osjetljive i na penicilin i na rifampicin [171]. Iako je većina bakterija rezistentnih na nikal izolirana iz okoliša, 2017. objavljeno je da postoje komenzalne bakterije ljudskog organizma koje su rezistentne na nikal [93]. Potrebne su daljnje studije, koje bi utvrdile prevalenciju takvih bakterija, primjerice uspoređujući osobe koje su izložene niklu na način da imaju ortodontske naprave ili dentalne legure s niklom u usnoj šupljini s osobama bez navedenih izvora kontaminacije niklom.

Bakterije adaptirane na nikal pokazale su različitu sposobnost adhezije i nivo osjetljivosti na antibiotike. Prema rezultatima antibiograma uviđene su razlike, s tendencijom da bakterije adaptirane na više koncentracije nikla budu osjetljivije na antibiotike. Preciznija metoda, određivanje MIK-a adaptiranih bakterija pokazala je povećanu rezistenciju sojeva *S. aureus* ad3 i *S. aureus* ad5 na ciprofloksacin i ampicilin. Bakterija *S. aureus* ad3 je također generalno bolje adherirala na podloge. Iako je *S. aureus* ad5 prema MIK-u pokazao pojačanu rezistenciju, on je slabije adherirao od drugih sojeva. Prema rezultatima MIK-a se čini da sposobnost antimikrobne rezistencije i sposobnost adhezije nisu povezani.

Razlike u stvaranju biofilma među bakterijama bile su manje od onih u sposobnosti adhezije. Izgleda da nakon početnih razlika u sposobnosti prijanjanja na površinu (24h) kroz dulje razdoblje svi sojevi uspiju stvoriti biofilm formaciju.

Rezultati ove studije mogu se povezati s kliničkom situacijom na nekoliko načina. Prvo je potrebno naglasiti ograničenja rezultata, naime adaptacija bakterija na nikal bila je kratkoročna, maksimalno 5 dana. Također, studija je provedena u *in-vitro* kontroliranim uvjetima, dok u usnoj šupljini i ljudskom organizmu postoji niz modificirajućih čimbenika koji mogu stvoriti niz kemijskih i drugih reakcija s otpuštenim metalom. Nadalje vrlo je teško ocijeniti koja količina nikla može dospjeti do samih bakterija, iz spomenutih razloga, a i iz razloga da je ljudski organizam jako dinamičan sustav gdje niz fizioloških tekućina uvelike mijenja odnose u usporedbi sa statičkim sustavom jažice u mikrotitarskoj ploči.

Ipak, imajući u vidu kumulativno mjesečno otpuštanje nikla iz nikal-titanijskih žica u sustavu ortodontske *edgewise* naprave u rasponu od 0,29 – 3,36  $\mu\text{g}$ , ovisno o pH i veličini žičanog luka, moguće je dosezanje koncentracija koje su ispitivane u ovoj studiji. Treba imati na umu da terapija ortodontskom napravom traje u prosjeku 2 – 2,5 godine, te često nikal-titanijski lukovi u ustima budu 1,5 – 2 godine. Vrlo bitna stavka je i sposobnost bakterija da koncentriraju metale, jedno već spomenuto istraživanje je pokazalo 30 puta višu koncentraciju nikla u bakterija nego li što je bila u njihovoj okolini [135].

Otpušteni nikal mogao bi stvarati kliničke probleme vezane uz bakterije na dva načina. Jedan, na koji upućuju rezultati ove studije prikazani krivuljama rasta, jest taj da on dođe u interakciju s antibioticima koji mogu biti propisani pacijentima za vrijeme ortodontske terapije. Kada bi došlo do antagonističkog učinka, mogli bi oslabiti efekt antimikrobne terapije, no u nekim slučajevima ga i pojačati. Interakcija nikla i cefalosporina je proučavana, te je u skladu s rezultatima ovog istraživanja, odgovor na interakciju bio i pojačanje antimikrobnog djelovanja i slabljenje istoga, ovisno o vrsti cefalosporina. Također, različit odgovor dobiven je za različite bakterije [6]. Drugi način, na koji upućuju rezultati s adaptiranim sojevima *S. aureus* na nikal bi bio direktno djelovanje nikla na bakterije i modifikacija njihovih svojstava, primjerice adhezije koja može biti znak virulencije [51] i povećanja rezistencije na antibiotike, koja se može javiti u bakterija izloženima teškim metalima [23]. Dakako, u tom smislu nužne su daljnje studije s dugotrajnijom ekspozicijom bakterija niklu.

## 6. ZAKLJUČCI

- MIK nikla za sve bakterije je bio 1000 mg/L. MBK je bio u rasponu 1000 - 2000 mg/L. MIK za ampicilin je bio 1 – 2,5 mg/L (MBK 2 – 5) i 0,005 – 0,62 mg/L (MBK 0,005 – 1,25) za ciprofloksacin.
- Rezultati FIK-a za ciprofloksacin i nikal pokazali su antagonističko djelovanje spojeva u bakterija *E. coli* i *E. faecalis*, a aditivno u bakterije *S. aureus*. FIK za ampicilin i nikal pokazao je sinergističko djelovanje na *E. faecalis*, aditivno na *E. coli* te indiferentnu interakciju pri rastu *S. aureus*.
- Prema MIK-u adaptiranih bakterija pokazana je povećana rezistencija sojeva *S. aureus* ad3 i *S. aureus* ad5 na ciprofloksacin i ampicilin. Bakterija *S. aureus* ad3 je također generalno bolje adherirala na podloge. Iako je *S. aureus* ad5 prema MIK-u pokazao pojačanu rezistenciju, on je slabije adherirao od drugih sojeva. Razlike u stvaranju biofilma među bakterijama bile su manje od onih u sposobnosti adhezije.
- S obzirom na izmjerene količine otpuštenog  $\text{Ni}^{2+}$  iz ortodontskih žičanih lukova, potrebna je dugotrajna ortodontska terapija *edgewise* napravom te sposobnost bakterija da koncentriraju  $\text{Ni}^{2+}$  iz okoline kako bi došlo do moguće interakcije s antibiotiskom terapijom pacijenata i modifikacijom svojstava komenzalnih bakterija.
- Sljedeće studije mogle bi uzimanjem kliničkih uzoraka od pacijenata u terapiji ortodontskim napravama *edgewise* tipa pokušati utvrditi koncentraciju metala u komenzalnih bakterija te potencijalne promjene njihovih svojstava; adaptaciju na metale i odgovor na antibiotike.

## 7. LITERATURA

- [1] Abimbola O, Adekanmbi, Olutayo I, Falodun. Heavy metals and antibiotics susceptibility profiles of *Staphylococcus aureus* isolated from several points receiving daily input from the bodija abattoir in Ibadan, Oyo State, Nigeria. *Adv Microbiol* 2015;5:871-880.
- [2] Alam M, Imran M. Multiple antibiotic resistances in metal tolerant *E. coli* from hospital waste water. *Bioinformation* 2014;10:267-272.
- [3] Albuquerque MT, Valera MC, Moreira CS, Bresciani E, de Melo RM, Bottino MC. Effects of ciprofloxacin-containing scaffolds on *Enterococcus faecalis* biofilms. *J Endod* 2015;41:710-714.
- [4] Alkaysi HN, Abdel-Hay MH, Sheikh Salem M, Gharaibeh AM, Na'was TE. Chemical and biological investigations of metal ion interaction with norfloxacin. *Int J Pharmaceut* 1992;87:73–77.
- [5] Aminov RI. A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. *Front Microbiol* 2010;1:134.
- [6] Anacona JR, Lopez M. Mixed-ligand nickel(ii) complexes containing sulfathiazole and cephalosporin antibiotics: synthesis, characterization, and antibacterial activity. *Int J Inorg Chem* 2012;2012:1-8.
- [7] Andrews JM. Determination of minimum inhibitory concentrations. *J Antimicrob Chemother.* 2001;48 Suppl 1:5-16. Erratum in: *J Antimicrob Chemother* 2002;49:104.
- [8] Arndt M, Bruck A, Scully T, Jager A, Bourauel C. Nickel ion release from orthodontic NiTi wires under simulation of realistic in-situ conditions. *J Mat Sci* 2005;40:3659–3667.
- [9] Azizi A, Jamilian A, Nucci F, Kamali Z, Hosseinikhoo N, Perillo L. Release of metal ions from round and rectangular NiTi wires. *Prog Orthod* 2016;17:10.
- [10] Baker JL, Sudarsan N, Weinberg Z, Roth A, Stockbridge RB, Breaker RR. Widespread genetic switches and toxicity resistance proteins for fluoride. *Science* 2012;335:233-235.
- [11] Beard SJ, Ciccognani DT, Hughes MN, Poole RK. Metal ion-catalysed hydrolysis of ampicillin in microbiological growth media. *FEMS Microbiol Lett* 1992;15:207-211.

- [12] Bhasin V, Pustake SJ, Joshi V, Tiwari A, Bhasin M, Punia RS. Assessment of changes in nickel and chromium levels in the gingival crevicular fluid during fixed orthodontic treatment. *Contemp Dent Pract* 2017;18:675-678.
- [13] Brown SP, Cornforth DM, Mideo N. Evolution of virulence in opportunistic pathogens: generalism, plasticity, and control. *Trends Microbiol* 2012;20:336-342.
- [14] Bryce K. *Fungi: Ecological Importance and Impact on Humans*. Chichester: John Wiley & Sons Ltd; 2011.
- [15] Burton JP, Drummond BK, Chilcott CN, Tagg JR, Thomson WM, Hale JD, Wescombe PA. Influence of the probiotic *Streptococcus salivarius* strain M18 on indices of dental health in children: a randomized double-blind, placebo-controlled trial. *J Med Microbiol* 2013;62:875-884.
- [16] Cagetti MG, Mastroberardino S, Milia E, Cocco F, Lingstrom P, Campus G . The use of probiotic strains in caries prevention: a systematic review *Nutrients* 2013;5:2530-2550.
- [17] Calomiris JJ, Armstrong JL, Seidler RJ. Association of metal tolerance with multiple antibiotic resistance of bacteria isolated from drinking water. *Appl Environ Microbiol* 1984;47:1238-1242.
- [18] Campanale M, Nucera E, Ojetti V, Cesario V, Di Rienzo TA, D'Angelo G, Pecere S, Barbaro F, Gigante G, De Pasquale T, Rizzi A, Cammarota G, Schiavino D, Franceschi F, Gasbarrini A. Nickel free-diet enhances the *Helicobacter pylori* eradication rate: a pilot study. *Dig Dis Sci* 2014;59:1851-5.
- [19] Chambers HF. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? *Emerg Infect Dis* 2001;7:178–182.
- [20] Chang DE, Smalley DJ, Tucker DL, Leatham MP, Norris WE, Stevenson SJ, Anderson AB, Grissom JE, Laux DC, Cohen PS, Conway T. Carbon nutrition of *Escherichia coli* in the mouse intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:7427-7432.
- [21] Charles W Knapp, Anna C Callan, Beatrice Aitken, Rylan Shearn, Annette Koenders, Andrea Hinwood. Relationship between antibiotic resistance genes and metals in residential soil samples from Western Australia. *Environ Sci Pollut Res Int* 2017;24: 2484–2494.
- [22] Chassaing B, Koren O, Carvalho FA, Ley RE, Gewirtz AT. AIEC pathobiont instigates chronic colitis in susceptible hosts by altering microbiota composition. *Gut* 2013;63:1069–1080.

- [23] Chen S, Li X, Sun G, Zhang Y, Su J, Ye J. Heavy metal induced antibiotic resistance in bacterium *Isjc7*. *Int J Mol Sci* 2015;16:23390-233404.
- [24] Chudobova D, Dostalova S, Blazkova I, Michalek P, Ruttkay-Nedecky B, Sklenar M, Nejdil L, Kudr J, Gumulec J, Tmejova K, Konecna M, Vaculovicova M, Hynek D, Masarik M, Kynicky J, Kizek R, Adam V. Effect of ampicillin, streptomycin, penicillin and tetracycline on metal resistant and non-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int J Environ Res Public Health* 2014;11:3233-3255.
- [25] Clements A, Young JC, Constantinou N, Frankel G. Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Microbes* 2012;3:71-87.
- [26] da Silva VL, Caçador NC, da Silva Cdos S, Fontes CO, Garcia GD, Nicoli JR, Diniz CG. Occurrence of multidrug-resistant and toxic-metal tolerant enterococci in fresh feces from urban pigeons in Brazil. *Microbes Environ* 2012;27:179-185.
- [27] Demling A, Elter C, Heidenblut T, Bach FW, Hahn A, Schwestka-Polly R, Stiesch M, Heuer W. Reduction of biofilm on orthodontic brackets with the use of a polytetrafluoroethylene coating. *Eur J Orthod* 2010;32:414-418.
- [28] Dietary reference intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Copper. National Academy Press 2001: 521–529.
- [29] Dogra V, Kaur G, Kaur A, Kumar R, Kumar S. In vitro assessment of antimicrobial and genotoxic effect of metallosurfactant based nickel hydroxide nanoparticles against *Escherichia coli* and its genomic DNA. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2018;170:99-108.
- [30] Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002;15:167–193.
- [31] Dumitrescu O, Dauwalder O, Boisset S, Reverdy MÉ, Tristan A, Vandenesch F. *Staphylococcus aureus* resistance to antibiotics: key points in 2010. *Med Sci (Paris)* 2010;26:943-949.
- [32] Dwivedi A, Tikku T, Khanna R, Maurya RP, Verma G, Murthy RC. Release of nickel and chromium ions in the saliva of patients with fixed orthodontic appliance: An in-vivo study. *Natl J Maxillofac Surg* 2015;6:62-66.
- [33] Fard RM, Heuzenroeder MW, Barton MD. Antimicrobial and heavy metal resistance in commensal enterococci isolated from pigs. *Vet Microbiol* 2011;148:276-282.

- [34] Finegold SM, Sutter VL, Mathisen GE. Normal indigenous intestinal microflora. In: Hentges DJ, editor. Human intestinal microflora in health and disease. New York, N.Y.: Academic Press, Inc.; 1983:3–31.
- [35] Finkel SE. Long-term survival during stationary phase: evolution and the GASP phenotype. *Nat Rev Microbiol* 2006;4:113-120.
- [36] Finney LA, O'Halloran TV. Transition metal speciation in the cell: insights from the chemistry of metal ion receptors. *Science* 2003;300:931-936.
- [37] Flyvholm MA, Nielsen GD, Andersen A. Nickel content of food and estimation of dietary intake. *Z Lebensm Unters Forsch* 1984;179:427-31.
- [38] Follin-Arbelet B, Moum B. Fluoride: a risk factor for inflammatory bowel disease? *Scand J Gastroenterol* 2016;51:1019-1024.
- [39] Foster JW. *Escherichia coli* acid resistance: tales of an amateur acidophile. *Nat Rev Microbiol* 2004;2:898–907.
- [40] Foulque Moreno, MR, Sarantinopoulos, P, Tsakalidou, E, De Vuyst L. The role and application of enterococci in food and health. *Int J Food Microbiol* 2006;1061–24.
- [41] Garza-Cervantes JA, Chávez-Reyes A, Castillo EC, García-Rivas G, Antonio Ortega-Rivera O, Salinas E, Ortiz-Martínez M, Gómez-Flores SL, Peña-Martínez JA, Pepi-Molina A, Treviño-González MT, Zarate X, Elena Cantú-Cárdenas M, Enrique Escarcega-Gonzalez C, Morones-Ramírez JR. Synergistic antimicrobial effects of silver/transition-metal combinatorial treatments. *Sci Rep* 2017;7:903.
- [42] Gefen O, Fridman O, Ronin I, Balaban NQ. Direct observation of single stationary-phase bacteria reveals a surprisingly long period of constant protein production activity. *Proc Natl Acad Sci* 2014;111:556–561.
- [43] Graninger W, Ragette R. Nosocomial bacteremia due to *Enterococcus faecalis* without endocarditis. *Clin Infect Dis* 1992;15:49-57.
- [44] Grice EA, Segre JA. The human microbiome: our second genome. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2012;13:151–170.
- [45] Grimsdottir MR, Hensten-Pettersen A. Cytotoxic and antibacterial effects of orthodontic appliances. *Scand J Dent Res* 1993;101:229-231.
- [46] Grumann D, Nubel U, Broker, BM. *Staphylococcus aureus* toxins--their functions and genetics. *Infect Genet Evol* 2014;21:583–592.
- [47] Gruner D, Paris S, Schwendicke F. Probiotics for managing caries and periodontitis: systematic review and meta-analysis. *J Dent* 2016;48:16-25.



- [48] Guarneri F, Costa C, Cannavò SP, Catania S, Bua GD, Fenga C, Dugo G. Release of nickel and chromium in common foods during cooking in 18/10 (grade 316) stainless steel pots. *Contact Dermatitis* 2017;76:40-48.
- [49] Guglietta A. Recurrent urinary tract infections in women: risk factors, etiology, pathogenesis and prophylaxis. *Future Microbiol* 2017;12:239-246.
- [50] Hagstrand Aldman M, Skovby A, Pålman L. Penicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*: susceptibility testing, resistance rates and outcome of infection. *Infect Dis (Lond)* 2017;49:454-460.
- [51] Haiko J, Westerlund-Wikström B. The role of the bacterial flagellum in adhesion and virulence. *Biology (Basel)* 2013;2:1242–1267.
- [52] Halabi M, Wiesholzer-Pittl M, Schöberl J, Mittermayer H. Non-touch fittings in hospitals: a possible source of *Pseudomonas aeruginosa* and *Legionella* spp. *J Hosp Infect* 2001;49:117-121.
- [53] Hall CW, Mah TF. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 2017;41:276-301.
- [54] Hall-Stoodley L, Stoodley P. Developmental regulation of microbial biofilms. *Curr Opin Biotechnol* 2002;13:228–233.
- [55] Hamid Raji S, Shojaei H, Ghorani PS, Rafiei E. Bacterial colonization on coated and uncoated orthodontic wires: A prospective clinical trial. *Dent Res J (Isfahan)* 2014;11:680–683.
- [56] Hamilton IR. Biochemical effects of fluoride on oral bacteria. *J Dent Res* 1990;69:660-667.
- [57] Hao ZY, Lou HB, Zhu RF, Zhu JH, Zhang DM, Zhao BXS, Zeng SZ, Chen X, Chan J, He C, Chen PR. The multiple antibiotic resistance regulator MarR is a copper sensor in *Escherichia coli*. *Nat Chem Biol* 2014;10:21–48.
- [58] Hidron AI, Edwards JR, Patel J, Horan TC, Sievert DM, Pollock DA, Fridkin SK. NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2008;29:996–1011.
- [59] Hobman JL, Crossman LC. Bacterial antimicrobial metal ion resistance. *J Med Microbiol* 2015;64:471–497.

- [60] Höffken G, Borner K, Glatzel PD, Koeppe P, Lode H. Reduced enteral absorption of ciprofloxacin in the presence of antacids (letter). *Eur J Clin Microbiol* 1985;4:345.
- [61] Hu HW, Wang JT, Li J, Shi XZ, Ma YB, Chen D, He JZ. Long-term nickel contamination increases the occurrence of antibiotic resistance genes in agricultural soils. *Environ Sci Technol* 2017;51:790-800.
- [62] Huang HH, Chiu YH, Lee TH, Wu SC, Yang HW, Su KH, Hsu CC. Ion release from NiTi orthodontic wires in artificial saliva with various acidities. *Biomaterials* 2003;24:3585-3592.
- [63] Hudault S, Guignot J, Servin A. *Escherichia coli* strains colonising the gastrointestinal tract protect germfree mice against *Salmonella typhimurium* infection. *Gut* 2001;49:47–55.
- [64] Hwang CJ, Shin JS, Cha JY. Metal release from simulated fixed orthodontic appliances. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2001;120:383-391.
- [65] Iijima M, Endo K, Ohno H, Yonekura Y, Mizoguchi I. Corrosion behavior and surface structure of orthodontic Ni-Ti alloy wires. *Dent Mater J* 2001;20:103-113.
- [66] Imran M, Iqbal J, Iqbal S, Ijaz N. In vitro antibacterial studies of ciprofloxacin- imines and their complexes with Cu(II),Ni(II),Co(II), and Zn(II). *Turk J Biol* 2007;31:67–72.
- [67] Ize-Iyamu IN, Ogbogu P. Nickel chromium brackets and its effect on the oral microflora. *Afr J Med Med Sci* 2011;40:367-371.
- [68] Jamshidi S, Rahmati Kamel M, Mirzaie M, Sarrafan A, Khafri S, Parsian H. Evaluation of scalp hair nickel and chromium level changes in patients with fixed orthodontic appliance: a one-year follow-up study. *Acta Odontol Scand* 2018;76:1-5.
- [69] Kao CT, Ding SJ, He H, Chou MY, Huang TH. Cytotoxicity of orthodontic wire corroded in fluoride solution in vitro. *Angle Orthod* 2007;77:349-354.
- [70] Kara M, Hassinoff BB, Mckay DN, Campbell NRC. Clinical and chemical interactions between iron preparations and ciprofloxacin. *Brit J Clin Pharmacol* 1991;31:257–261.
- [71] 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;36:149-156.

- [72] Katić V, Curković 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;84:1041-1048.
- [73] Katić V, Čurković L, Ujević Bošnjak M, Špalj S. Determination of corrosion rate of orthodontic wires based on nickel-titanium alloy in artificial saliva. *Materialwiss Werkst* 2014;45:99-105.
- [74] Khan ST, Ahamed M, Alhadlaq HA, Musarrat J, Al-Khedhairi A. Comparative effectiveness of NiCl<sub>2</sub>, Ni- and NiO-NPs in controlling oral bacterial growth and biofilm formation on oral surfaces. *Arch Oral Biol* 2013;58:1804-1811.
- [75] Khatoon N, Alam H, Khan A, Raza K, Sardar M. Ampicillin silver nanoformulations against multidrug resistant bacteria. *Sci Rep* 2019;9:6848.
- [76] Kim IH, Park HS, Kim YK, Kim KH, Kwon TY. Comparative short-term in vitro analysis of mutans streptococci adhesion on esthetic, nickel-titanium, and stainless-steel arch wires. *Angle Orthod* 2014;84:680-686.
- [77] Kittana H, Gomes-Neto JC, Heck K, Geis AL, Segura Muñoz RR, Cody LA, Schmaltz RJ, Bindels LB, Sinha R, Hostetter JM, Benson AK, Ramer-Tait AE. Commensal *Escherichia coli* strains can promote intestinal inflammation via differential interleukin-6 production. *Front Immunol* 2018;9:2318.
- [78] Kolter R, Siegele DA, Tormo A. The stationary phase of the bacterial life cycle. *Annu Rev Microbiol* 1993;47:855-874.
- [79] Kommineni Sushma, Bretl Daniel J, Lam Vy, Chakraborty Rajrupa, Hayward Michael, Simpson Pippa, Cao Yumei, Bousounis Pavlos, Kristich Christopher J, Salzman Nita H. Bacteriocin production augments niche competition by enterococci in the mammalian gastrointestinal tract. *Nature* 2015;526:719–722.
- [80] Kostakioti M, Hadjifrangiskou M, Hultgren SJ. Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2013;3:a010306.
- [81] Kuhta M, Pavlin D, Slaj M, Varga S, Lapter-Varga M, Slaj M. Type of archwire and level of acidity: effects on the release of metal ions from orthodontic appliances. *Angle Orthod* 2009;79:102-110.
- [82] Laleman I, Dettailleux V, Slot D, Slomka V, Quirynen M, Teughels W. Probiotics reduce mutans streptococci counts in humans: a systematic review and meta-analysis. *Clin Oral Invest* 2014;18:1539-1552.

- [83] Lambrecht E, Van Meervenne E, Boon N, Van de Wiele T, Wattiau P, Herman L, Heyndrickx M, Van Coillie E. Characterization of cefotaxime- and ciprofloxacin-resistant commensal *Escherichia coli* originating from Belgian farm animals indicates high antibiotic resistance transfer rates. *Microb Drug Resist* 2018;24:707-717.
- [84] Laub K, Tóthpál A, Kardos S, Dobay O. Epidemiology and antibiotic sensitivity of *Staphylococcus aureus* nasal carriage in children in Hungary. *Acta Microbiol Immunol Hung* 2017;64:51-62.
- [85] Lawrence JG, Roth JR. Evolution of coenzyme B12 synthesis among enteric bacteria: evidence for loss and acquisition of a multigene complex. *Genetics* 1996;143:11–24.
- [86] Lecomte S, Baron MH, Chenon MT, Compry C, Moreau NJ. Effect of magnesium complexation by fluoroquinolones on their antibacterial properties. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:2810–2816.
- [87] Leimbach A, Hacker J, Dobrindt U. *E. coli* as an all-rounder: the thin line between commensalism and pathogenicity. *Curr Top Microbiol Immunol* 2013;358:3-32.
- [88] Lemire J, Harrison JJ, Turner RJ. Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. *Nat Rev Microbiol* 2013;11: 371–384.
- [89] Li Y, Zamble DB. Nickel homeostasis and nickel regulation: an overview. *Chem Rev* 2009;109:4617-4643.
- [90] Löffler B, Niemann S, Ehrhardt C, Horn D, Lanckohr C, Lina G, Ludwig S, Peters G. Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* necrotizing pneumonia: the role of PVL and an influenza coinfection. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2013;11:1041-1051.
- [91] Lowy FD. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest* 2003;111:1265–1273.
- [92] Lukez A, Pavlic A, Trinajstic Zrinski M, Spalj S. The unique contribution of elements of smile aesthetics to psychosocial well-being *J Oral Rehabil*. 2015;42:275-281.
- [93] Lusi EA, Patrissi T, Guarascio P. Nickel-resistant bacteria isolated in human microbiome. *New Microbes New Infect* 2017;19:67-70.
- [94] Ma H, Chiu F, Li R. Mechanistic investigation of the reduction in antimicrobial activity of ciprofloxacin by metal cations. *Pharm Res* 1997;14:366–370.

- [95] Mabileau G, Bourdon S, Joly-Guilou ML, Filmon R, Baslé MF, Chappard D. Influence of fluoride, hydrogen peroxide and lactic acid on the corrosion resistance of commercially pure titanium. *Acta Biomater* 2006;2:121-129.
- [96] Macomber L, Hausinger RP. Mechanisms of nickel toxicity in microorganisms. *Metallomics* 2011;3:1153-1162.
- [97] Madar D, Dekel E, Bren A, Tzimmer A, Porat Z, Alon U. Lag phase bacteria strongly and selectively express bottleneck genes. *BMC Syst Biol* 2013;11:136.
- [98] Manalac JM, Shankaranayanan D, Paul-Olivier J, Guidry L, Sells NR. What can erode through lungs, bone and skin? *J La State Med Soc* 2017;169:55.
- [99] Marsh PD. Dental plaque as a microbial biofilm. *Caries Res* 2004;38:204–211.
- [100] Mason KL, Stepien TA, Blum JE, Holt JF, Labbe NH, Rush JS, Raffa KF, Handelsman J. From commensal to pathogen: translocation of *Enterococcus faecalis* from the midgut to the hemocoel of *Manduca sexta*. *MBio* 2011;2:e00065-11.
- [101] McCormack MG, Smith AJ, Akram AN, Jackson M, Robertson D, Edwards G. *Staphylococcus aureus* and the oral cavity: an overlooked source of carriage and infection? *Am J Infect Control* 2015;43:35-37.
- [102] Meumann EM, Mitchell BG, McGregor A, McBryde E, Cooley L. Urinary *Escherichia coli* antimicrobial susceptibility profiles and their relationship with community antibiotic use in Tasmania, Australia. *Int J Antimicrob Agents* 2015;46:389-393.
- [103] Mhaske AR, Shetty PC, Bhat NS, Ramachandra CS, Laxmikanth SM, Nagarhalli K et al. Antiadherent and antibacterial properties of stainless steel and NiTi orthodontic wires coated with silver against *Lactobacillus acidophilus*--an in vitro study. *Prog Orthod* 2015;16:40.
- [104] Mikulewicz M, Chojnacka K, Woźniak B, Downarowicz P. Release of metal ions from orthodontic appliances: an in vitro study. *Biol Trace Elem Res* 2012;146:272-280.
- [105] Mikulewicz M, Chojnacka K. Trace metal release from orthodontic appliances by in vitro studies: a systematic literature review. *Biol Trace Elem Res* 2010;139:241–256.
- [106] Miller G, Fischer DK. Beneficial effects of human viruses. *Yale J Biol Med* 1981;54:57–63.

- [107] Möhler JS, Kolmar T, Synnatschke K, Hergert M, Wilson LA, Ramu S, Elliott AG, Blaskovich MA, Sidjabat HE, Paterson DL, Schenk G, Cooper MA, Ziora ZM. Enhancement of antibiotic-activity through complexation with metal ions - Combined ITC, NMR, enzymatic and biological studies. *J Inorg Biochem* 2017;167:134-141.
- [108] Montelongo-Peralta LZ, León-Buitimea A, Palma-Nicolás JP, Gonzalez-Christen J, Morones-Ramírez JR. Antibacterial Activity of combinatorial treatments composed of transition-metal/antibiotics against *Mycobacterium tuberculosis*. *Sci Rep* 2019;9:5471.
- [109] Morse DJ, Wilson MJ, Wei X, Lewis MAO, Bradshaw DJ, Murdoch C, Williams DW. Denture-associated biofilm infection in three-dimensional oral mucosal tissue models. *J Med Microbiol* 2018;67:364–375.
- [110] Mulcahy ME, McLoughlin RM. Host–bacterial crosstalk determines *Staphylococcus aureus* nasal colonization. *Trends Microbiol* 2016;24:872–886.
- [111] Mulrooney SB, Hausinger RP. Nickel uptake and utilization by microorganisms. *FEMS Microbiol Rev* 2003;27:239–261.
- [112] Murdoch DR, Corey GR, Hoen B, Miró JM, Fowler VG Jr, Bayer AS, Karchmer AW, Olaison L, Pappas PA, Moreillon P, Chambers ST, Chu VH, Falcó V, Holland DJ, Jones P, Klein JL, Raymond NJ, Read KM, Tripodi MF, Utili R, Wang A, Woods CW, Cabell CH. Clinical presentation, etiology, and outcome of infective endocarditis in the 21st century: the International Collaboration on Endocarditis-Prospective cohort study. *JAMA Internal Medicine* 2009;169:463–473.
- [113] Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Medical microbiology*. Philadelphia: Elsevier/Saunders; 2013.
- [114] Nadelman P, Magno MB, Masterson D, da Cruz AG, Maia LC. Are dairy products containing probiotics beneficial for oral health? A systematic review and meta-analysis. *Clin Oral Investig* 2018;22:2763-2785.
- [115] Nakagawa M, Matsuya S, Shiraishi T, Ohta M. Effect of fluoride concentration and pH on corrosion behavior of titanium for dental use. *J Dent Res* 1999;78:1568-1572.
- [116] Nielsen GD, Søderberg U, Jørgensen PJ, Templeton DM, Rasmussen SN, Andersen KE, Grandjean P. Absorption and retention of nickel from drinking water in relation to food intake and nickel sensitivity. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999;154:67-75.

- [117] Nies DH. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev* 2003;27:313-339.
- [118] Nishino K, Nikaido E, Yamaguchi A. Regulation of multidrug efflux systems involved in multidrug and metal resistance of *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *J. Bacteriol* 2007;189:9066–9075.
- [119] Nurjadi D, Olalekan AO, Layer F, Shittu AO, Alabi A, Ghebremedhin B, Schaumburg F, Hofmann-Eifler J, Van Genderen PJ, Caumes E, Fleck R, Mockenhaupt FP, Herrmann M, Kern WV, Abdulla S, Grobusch MP, Kreamsner PG, Wolz C, Zanger P. Emergence of trimethoprim resistance gene *dfpG* in *Staphylococcus aureus* causing human infection and colonization in sub-Saharan Africa and its import to Europe. *J Antimicrob Chemoth* 2014;69:2361–2368.
- [120] Nurjadi D, Schafer J, Friedrich-Janicke B, Mueller A, Neumayr A, Calvo-Cano A, Goorhuis A, Molhoek N, Lagler H, Kantele A, Van Genderen PJ, Gascon J, Grobusch MP, Caumes E, Hatz C, Fleck R, Mockenhaupt FP, Zanger P. Predominance of *dfpG* as determinant of trimethoprim resistance in imported *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect* 2015;21:1095–1099.
- [121] Nyamboya RA, Okemo PO, Ombori O. Heavy metal and antibiotic resistance of fecal pathogens from wastewaters of abattoirs in Nairobi. *J Appl Biosci* 2013;64:4858–4866.
- [122] Nystrom T. Stationary-phase physiology. *Annu Rev Microbiol* 2004;58 161–181.
- [123] O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem* 2000;267:5421-5426.
- [124] O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* 2000;54:49-79.
- [125] Pal A, Paul A. Nickel uptake and intracellular localization in *Cupriavidus pauculus* KPS 201, native to ultramafic ecosystem. *Adv Bioscie Biotechnol* 2010;1:276-280.
- [126] Palmer C, Bik EM, Digiulio DB, Relman DA, Brown PO. Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol* 2007;5:e177.
- [127] Park HY, Shearer TR. In vitro release of nickel and chromium from simulated orthodontic appliances. *Am J Orthod* 1983;84:156-159.

- [128] Patel NH, Parekh HM, Patel MN. Synthesis, physicochemical characteristics, and biocidal activity of some transition metal mixed-ligand complexes with bidentate (NO and NN) Schiff bases. *Pharm Chem J* 2007; 41:78–82.
- [129] Paul M, Bishara J, Yahav D, Goldberg E, Neuberger A, Ghanem-Zoubi N, Dickstein Y, Nseir W, Dan M, Leibovici L. Trimethoprim-sulfamethoxazole versus vancomycin for severe infections caused by methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: randomised controlled trial. *BMJ* 2015;350:2219.
- [130] Petoumenou E, Arndt M, Keilig L, Reimann S, Hoederath H, Eliades T, Jäger A, Bouraueil C. Nickel concentration in the saliva of patients with nickel-titanium orthodontic appliances. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2009;135:59-65.
- [131] Pfeiffer P, Schwicherath H. Nickel release of dental alloys as a function of the pH value of the corrosive solution. *Dtsch Zahnärztl Z* 1991;46:753-756.
- [132] Polk RE, Healey DP, Sahai J, Drwal L, Racht E. Effect of ferrous sulphate and multivitamins with zinc on absorption of ciprofloxacin in normal volunteers. *Antimicrob. Agents Chemother* 1989;33:1841–1844.
- [133] Preshaw PM, Walls AWG, Jakubovics NS, Moynihan PJ, Jepson NJA, Loewy Z. Association of removable partial denture use with oral and systemic health. *J Dent* 2011;39:711–719.
- [134] Proença JT, Barral DC, Gordo I. Commensal-to-pathogen transition: One-single transposon insertion results in two pathoadaptive traits in *Escherichia coli* - macrophage interaction. *Sci Rep* 2017;7:4504.
- [135] Remy L, Carrière M, Derré-Bobillot A, Martini C, Sanguinetti M, Borezée-Durant E. The *Staphylococcus aureus* Opp1 ABC transporter imports nickel and cobalt in zinc-depleted conditions and contributes to virulence. *Mol Microbiol* 2013;87:730-743.
- [136] Resende JA, Silva VL, Fontes CO, Souza-Filho JA, Rocha de Oliveira TL, Coelho CM, César DE, Diniz CG. Multidrug-resistance and toxic metal tolerance of medically important bacteria isolated from an aquaculture system. *Microbes Environ* 2012;27:449-455.
- [137] Rodrigue A, Effantin G, Mandrand-Berthelot MA. Identification of *rcnA* (*yohM*), a nickel and cobalt resistance gene in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2005;187:2912-2916.
- [138] Rosenthal JA. Qualitative descriptors of strength of association and effect size. *J Soc Serv Res* 1996;21:37-59.



- [139] Russell CD, Lawson McLean A, Saunders C, Laurenson IF. Adjunctive rifampicin may improve outcomes in *Staphylococcus aureus* bacteraemia: a systematic review. *J Med Microbiol* 2014;63:841–848
- [140] Sabry SA, Ghozlan HA, Abou-Zeid DM. Metal tolerance and antibiotic resistance patterns of a bacterial population isolated from sea water. *J Appl Microbiol* 1997;82:245-252.
- [141] Saito M, Arakaki R, Yamada A, Tsunematsu T, Kudo Y, Ishimaru N. Molecular Mechanisms of Nickel Allergy. *Int J Mol Sci* 2016;17:E202.
- [142] Schaumann S, Staufenbiel I, Scherer R, Schilhabel M, Winkel A, Stumpp SN, Eberhard J, Stiesch M. Pyrosequencing of supra- and subgingival biofilms from inflamed peri-implant and periodontal sites. *BMC Oral Health* 2014;14:157-159.
- [143] Seo KS, Bohach GA. Food microbiology fundamentals and frontiers. Doyle MP, Beuchat LR, editors. Washington: ASM Press; 2007. p. 493–518.
- [144] Shah N, DuPont HL, Ramsey DJ. Global etiology of travelers' diarrhea: systematic review from 1973 to the present. *Am J Trop Med Hyg* 2009;80:609–614.
- [145] Smith AJ, Robertson D, Tang MK, Jackson MS, MacKenzie D, Bagg J. *Staphylococcus aureus* in the oral cavity: a three-year retrospective analysis of clinical laboratory data. *Br Dent J* 2003;195:701-703.
- [146] Stanley D, Mason LJ, Mackin KE, Srikhanta YN, Lyras D, Prakash MD, Nurgali K, Venegas A, Hill MD, Moore RJ, Wong CH. Translocation and dissemination of commensal bacteria in post-stroke infection. *Nat Med* 2016;22:1277-1284.
- [147] Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod* 2006;32:93-98.
- [148] Susewind S, Lang R, Hahnel S. Biofilm formation and candida albicans morphology on the surface of denture base materials. *Mycoses* 2015;58:719–727.
- [149] Taha M, El-Fallal A, Degla H. In vitro and in vivo biofilm adhesion to esthetic coated arch wires and its correlation with surface roughness. *Angle Orthod* 2016;86:285-289.
- [150] Teughels W, Loozen G, Quirynen M. Do probiotics offer opportunities to manipulate the periodontal oral microbiota? *J Clin Periodontol* 2011;38:159-177.
- [151] The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Routine and extended internal quality control for MIC determination and disk diffusion as

recommended by EUCAST. Version 9.0, 2019. <http://www.eucast.org> [21. lipanj 2019.]

- [152] The number of adults seeking orthodontic treatment in the UK continues to rise. *Br Dent J* 2018;224:847.
- [153] Thurnheer T, Belibasakis GN. Effect of sodium fluoride on oral biofilm microbiota and enamel demineralization. *Arch Oral Biol* 2018;89:77-83.
- [154] Thwaites GE, Scarborough M, Szubert A, Saramago Goncalves P, Soares M, Bostock J, Nsutebu E, Tilley R, Cunningham R, Greig J, Wyllie SA, Wilson P, Auckland C, Cairns J, Ward D, Lal P, Guleri A, Jenkins N, Sutton J, Wiselka M, Armando GR, Graham C, Chadwick PR, Barlow G, Gordon NC, Young B, Meisner S, McWhinney P, Price DA, Harvey D, Nayar D, Jeyaratnam D, Planche T, Minton J, Hudson F, Hopkins S, Williams J, Török ME, Llewelyn MJ, Edgeworth JD, Walker AS. Adjunctive rifampicin to reduce early mortality from *Staphylococcus aureus* bacteraemia: the ARREST RCT. *Health Technol Assess* 2018;22:1-148.
- [155] Thyssen JP, Linneberg A, Menné T, Johansen JD. The epidemiology of contact allergy in the general population—prevalence and main findings. *Contact Dermatitis* 2007;57:287–299.
- [156] Tomova I, Stoilova-Disheva M, Lazarkevich I, E Vasileva-Tonkova E. Antimicrobial activity and resistance to heavy metals and antibiotics of heterotrophic bacteria isolated from sediment and soil samples collected from two Antarctic islands. *Front Life Sci* 2015;8:348-357.
- [157] Tong F, Zhao YP, Gu XY, Gu C, Lee CCC. Joint toxicity of tetracycline with copper(II) and cadmium(II) to *Vibrio fischeri*: Effect of complexation reaction. *Ecotoxicology* 2015;24:346–355.
- [158] Trinajstić Zrinski M, Miljanic S, Peros K, Turco G, Contardo L, Špalj S. Fluoride release and recharge potential of remineralizing orthodontic adhesive systems. *Fluoride* 2019;52:397-403.
- [159] Trolić IM, Turco G, Contardo L, Serdarević NL, Otmačić H, Ćurković, Špalj S. Corrosion of nickel-titanium orthodontic archwires in saliva and oral probiotic Supplements. *Acta Stomatol Croat* 2017;51:316-325.
- [160] Trombelli L, Virgili A, Corazza M, Lucci R. Systemic contact dermatitis from an orthodontic appliance. *Contact Dermatitis* 1992;27:259-260.

- [161] Tserennadmid R, Takó M, Galgóczy L, Papp T, Pesti M, Vágvölgyi C, Almássy K, Krisch J. Anti yeast activities of some essential oils in growth medium, fruit juices and milk. *Int J Food Microbiol* 2011;144: 480–486.
- [162] Turpin DL. Need and demand for orthodontic services: the final report. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2010;137:151-152.
- [163] Uter W, Wolter J. Nickel and cobalt release from earrings and piercing jewellery - analytical results of a German survey in 2014. *Contact Dermatitis* 2018;78:321-328.
- [164] Vahjen W, Cuisiniere T, Zentek J. Protective effects of indigenous *Escherichia coli* against a pathogenic *E. coli* challenge strain in pigs. *Benef Microbes* 2017;8:779-783.
- [165] Vaidya MY, McBain AJ, Butler JA, Banks CE, Whitehead KA. Antimicrobial efficacy and synergy of metal ions against *Enterococcus faecium*, *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* in planktonic and biofilm phenotypes. *Sci Rep* 2017;7:5911.
- [166] Wallis SC, Charles BG, Gahan LR, Filippich LJ, Bredhauer MG, Duckworth PA. Interaction of norfloxacin with divalent and trivalent pharmaceutical cations, In vitro complexation and in vivo pharmacokinetic studies in the dog. *J Pharm Sci* 1996;85:803–809.
- [167] Wang B, Yao M, Lv L, Ling Z, Li L. The human microbiota in health and disease. *Engineering* 2007;3;71-82.
- [168] Wang Y, Liu C, Jian F, McIntyre GT, Millett DT, Hickman J, Lai W. Initial arch wires used in orthodontic treatment with fixed appliances. *Cochrane Database Syst Rev* 2018;7:CD007859.
- [169] Wendl B, Wiltsche H, Lankmayr E, Winsauer H, Walter A, Muchitsch A, Jakse N, Wendl M, Wendl T. Metal release profiles of orthodontic bands, brackets, and wires: an in vitro study. *J Orofac Orthop* 2017;78:494-503.
- [170] Williams MR, Nakatsuji T, Gallo RL. *Staphylococcus aureus*: master manipulator of the skin. *Cell Host Microbe* 2017;22:579-581.
- [171] Wright MS, Loeffler Peltier G, Stepanauskas R, McArthur JV. Bacterial tolerances to metals and antibiotics in metal-contaminated and reference streams. *FEMS Microbiol Ecol* 2006;58:293-302.
- [172] Wróblewska M, Strużycka I, Mierzwińska-Nastalska E. Significance of biofilms in dentistry. *Przegl Epidemiol* 2015;69:739-744.

- [173] Yasuda K, Hsu T, Gallini CA, McIver LJ, Schwager E, Shi A, DuLong CR, Schwager RN, Abu-Ali GS, Franzosa EA, Garrett WS, Huttenhower C, Morgan XC. Fluoride depletes acidogenic taxa in oral but not gut microbial communities in mice. *mSystems* 2017;2:e00047-17.
- [174] Zaman SB, Hussain MA, Nye R, Mehta V, Mamun KT, Hossain N. A review on antibiotic resistance: alarm bells are ringing. *Cureus* 2017;9:1403.
- [175] Zdrojewicz Z, Popowicz E, Winiarski J. Nickel - role in human organism and toxic effects. *Pol Merkur Lekarski* 2016;41:115-118.
- [176] Zervos MJ, Schaberg DR. Reversal of the in vitro susceptibility of enterococci to trimethoprim-sulfamethoxazole by folinic acid. *Antimicrob Agents Chemother* 1985;28:446–448.
- [177] Zhang G, Zhao Y, Paramasivan S, Richter K, Morales S, Wormald PJ, Vreugde S. Bacteriophage effectively kills multidrug resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates from chronic rhinosinusitis patients. *Int Forum Allergy Rhinol* 2018;8:406-414.
- [178] Zhang Y, Gu AZ, Cen T, Li X, He M, Li D, Chen J. Sub-inhibitory concentrations of heavy metals facilitate the horizontal transfer of plasmid-mediated antibiotic resistance genes in water environment. *Environ Pollut* 2018;237:74-82.
- [179] Zhitnitsky D, Rose J, Lewinson O. The highly synergistic, broad spectrum, antibacterial activity of organic acids and transition metals. *Sci Rep* 2017;7:44554.
- [180] Zhou Y, Xu YB, Xu JX, Zhang XH, Xu SH, Du QP. Combined toxic effects of heavy metals and antibiotics on a *Pseudomonas fluorescens* strain ZY2 isolated from swine wastewater. *Int J Mol Sci* 2015;16:2839–2850.
- [181] Zhou Y, Xu YB, Xu JX, Zhang XH, Xu SH, Du QP. Combined toxic effects of heavy metals and antibiotics on a *Pseudomonas fluorescens* strain ZY2 isolated from swine wastewater. *Int J Mol Sci* 2015;16:2839-2850.
- [182] Zwietering MH, Rombouts FM, van 't Riet K. Comparison of definitions of the lag phase and the exponential phase in bacterial growth. *J Appl Bacteriol* 1992;72:139-145.

## ILUSTRACIJE

### Popis slika

Slika 1. Fiksna ortodontska naprava *edgewise* tipa.

Slika 2. Ortodontski žičani lukovi od nikal-titanijske legure.

Slika 3. Kolonije bakterije *Staphylococcus aureus* na podlozi.

Slika 4. Kolonije bakterije *Escherichia coli* na kromogenoj podlozi.

Slika 5. Kolonije bakterije *Enterococcus faecalis* na krvnom agaru.

Slika 6. Faze bakterijskog rasta prikazane na krivulji OD/vrijeme.

Slika 7. Mikrotitarske pločice po 24-satnoj inkubaciji u prisutnosti resazurina te nasadivanje na MH agar u četvrtastim pločama (crvena boja označava porast bakterija, a plava izostanak rasta)

Slika 8. Određivanje minimalne baktericidne koncentracije (MBK) – strelicama označen izostanak bakterija nakon presađivanja, ta koncentracija spoja određuje MBK

Slika 9. Određivanje brzine logaritamske faze rasta (OD – optička gustoća).

Slika 10. Krivulje rasta bakterije *S. aureus* u različitim koncentracijama ciprofloksacina i nikla u mg/L (a – e; rast bakterije u različitim koncentracijama ciprofloksacina i nikla koje su navedene uz pojedini graf, krivulja je prikaz srednjih vrijednosti optičke gustoće pri 600 nm kroz 24 sata mjerene u triplikatu).

Slika 11. Krivulje rasta bakterije *E. faecalis* u različitim koncentracijama ciprofloksacina i nikla u mg/L (a – e; rast bakterije u različitim koncentracijama ciprofloksacina i nikla koje su navedene uz pojedini graf, krivulja je prikaz srednjih vrijednosti optičke gustoće pri 600 nm kroz 24 sata mjerene u triplikatu).

Slika 12. Krivulje rasta bakterije *E. coli* u različitim koncentracijama ciprofloksacina i nikla u mg/L (a – e; rast bakterije u različitim koncentracijama ciprofloksacina i nikla koje su navedene uz pojedini graf, krivulja je prikaz srednjih vrijednosti optičke gustoće pri 600 nm kroz 24 sata mjerene u triplikatu).

Slika 13. Krivulje rasta *S. aureus*, *E. faecalis* i *E. coli* u različitim kombinacijama ciprofloksacina i nikla u mg/L – demonstracija aditivnog i antagonističkog učinka ciprofloksacina i nikla (a – c; rast bakterija u različitim koncentracijama ciprofloksacina i nikla koje su navedene uz pojedini graf, krivulja je prikaz srednjih vrijednosti optičke gustoće pri 600 nm kroz 24 sata mjerene u triplikatu).

Slika 14. Krivulje rasta bakterije *S. aureus* u različitim koncentracijama ampicilina i nikla u mg/L (a – e; rast bakterije u različitim koncentracijama ampicilina i nikla koje su

navedene uz pojedini graf, krivulja je prikaz srednjih vrijednosti optičke gustoće pri 600 nm kroz 24 sata mjerene u triplikatu).

Slika 15. Krivulje rasta bakterije *E. faecalis* u različitim koncentracijama ampicilina i nikla u mg/L (a – e; rast bakterije u različitim koncentracijama ampicilina i nikla koje su navedene uz pojedini graf, krivulja je prikaz srednjih vrijednosti optičke gustoće pri 600 nm kroz 24 sata mjerene u triplikatu).

Slika 16. Krivulje rasta bakterije *E. coli* u različitim koncentracijama ciprofloksacina i nikla u mg/L (a – e; rast bakterije u različitim koncentracijama ciprofloksacina i nikla koje su navedene uz pojedini graf, krivulja je prikaz srednjih vrijednosti optičke gustoće pri 600 nm kroz 24 sata mjerene u triplikatu).

Slika 17. Krivulje rasta *E. faecalis* i *E. coli* u različitim kombinacijama ampicilina i nikla u mg/L – demonstracija sinergističkog ampicilina i nikla i nikla (a – b; rast bakterija u različitim koncentracijama ampicilina i nikla koje su navedene uz pojedini graf, krivulja je prikaz srednjih vrijednosti optičke gustoće pri 600 nm kroz 24 sata mjerene u triplikatu).

Slika 18. Fotografije kolonija sojeva bakterije *S. aureus* adaptiranih na nikal.

Slika 19. Krivulje rasta bakterije *S. aureus* ad3 u različitim koncentracijama ciprofloksacina i nikla u mg/L (a – e; rast bakterije u različitim koncentracijama ciprofloksacina i nikla koje su navedene uz pojedini graf, krivulja je prikaz srednjih vrijednosti optičke gustoće pri 600 nm kroz 24 sata mjerene u triplikatu).

Slika 20. Krivulje rasta bakterije *S. aureus* ad5 u različitim koncentracijama ciprofloksacina i nikla u mg/L (a – e; rast bakterije u različitim koncentracijama ciprofloksacina i nikla koje su navedene uz pojedini graf, krivulja je prikaz srednjih vrijednosti optičke gustoće pri 600 nm kroz 24 sata mjerene u triplikatu).

Slika 21. Krivulje rasta bakterije *S. aureus* ATCC, *S. aureus* ad3 i *S. aureus* ad5 u različitim koncentracijama ciprofloksacina i nikla u mg/L (a – s; rast bakterije u različitim koncentracijama ciprofloksacina i nikla koje su navedene uz pojedini graf, krivulja je prikaz srednjih vrijednosti optičke gustoće pri 600 nm kroz 24 sata mjerene u triplikatu).

Slika 22. Krivulje rasta bakterije *S. aureus* ATCC, *S. aureus* ad3 i *S. aureus* ad5 u različitim koncentracijama ciprofloksacina i nikla u mg/L (a – c; rast bakterije u različitim koncentracijama ciprofloksacina i nikla koje su navedene uz pojedini graf, krivulja je prikaz srednjih vrijednosti optičke gustoće pri 600 nm kroz 24 sata mjerene u triplikatu).

Slika 23. Adhezija kontrolnog i adaptiranih sojeva *S. aureus* na polistiren izražena u log<sub>10</sub> CFU/mL mjerena nakon 24 h (početna koncentracija bakterija 10<sup>6</sup> CFU/mL). Pokus je ponovljen 2 puta u triplikatu i prikazana je srednja vrijednost ±SD.

Slika 24. Adhezija sojeva *S. aureus* na nikal-titanijske žičane lukove izražena u log<sub>10</sub> CFU/mL mjerena nakon 24 h (početna koncentracija bakterija 10<sup>6</sup> CFU/mL). Pokus je ponovljen 2 puta u triplikatu i prikazana je srednja vrijednost ±SD.

Slika 25. Adhezija sojeva *S. aureus* na čelične žičane lukove izražena u log<sub>10</sub> CFU/mL mjerena nakon 24 h (početna koncentracija bakterija 10<sup>6</sup> CFU/mL). Pokus je ponovljen 2 puta u triplikatu i prikazana je srednja vrijednost ±SD.

Slika 26. Biofilm stvoren od strane sojeva *S. aureus* na polistiren izražen u log<sub>10</sub> CFU/mL mjerena nakon 120 h (početna koncentracija bakterija 10<sup>6</sup> CFU/mL). Pokus je ponovljen 2 puta u triplikatu i prikazana je srednja vrijednost ±SD.

Slika 27. Biofilm stvoren od strane sojeva *S. aureus* na NiTi žičane lukove izražen u log<sub>10</sub> CFU/mL mjerena nakon 120 h (početna koncentracija bakterija 10<sup>6</sup> CFU/mL). Pokus je ponovljen 2 puta u triplikatu i prikazana je srednja vrijednost ±SD.

Slika 28. Biofilm stvoren od strane sojeva *S. aureus* na čelične žičane lukove izražen u log<sub>10</sub> CFU/mL mjerena nakon 120 h (početna koncentracija bakterija 10<sup>6</sup> CFU/mL). Pokus je ponovljen 2 puta u triplikatu i prikazana je srednja vrijednost ±SD.

Slika 29. Antibiogram sojeva *S. aureus* ATCC i sojeva adaptiranih na nikal.

Slika 30. Tendencija promjene osjetljivosti na antibiotike prema vrsti antibiotika (pojavnost – broj sojeva koji su bili statistički osjetljiviji, rezistentiji ili jednake osjetljivosti u odnosu na ATCC soj; tendencija – statistički značajna promjena promjera pri očitavanju antibiogramu, u izostanku statističke značajnosti – jednaka osjetljivost).

Slika 31. Tendencija promjene osjetljivosti na antibiotike prema vrsti soja (pojavnost – broj sojeva koji su bili statistički osjetljiviji, rezistentiji ili jednake osjetljivosti u odnosu na ATCC soj; tendencija – statistički značajna promjena promjera pri očitavanju antibiogramu, u izostanku statističke značajnosti – jednaka osjetljivost).

## Popis tablica

Tablica 1. Elementi regresijske jednadžbe  $y = ax + b$

Tablica 2. Kumulativna količina otpuštenih iona nikla u  $\mu\text{g}$  u prvih 28 dana iz tri veličine nikal-titanijskih žičanih u ovisnosti o pH umjetne sline

Tablica 3. Vrijednosti MIK i MBK

Tablica 4. Vrijednosti FIK za ciprofloksacin i nikal

Tablica 5. Vrijednosti FIK za ampicilin i nikal

Tablica 6. – Rezultati antibiograma kontrolnog i adaptiranih sojeva

Tablica 7. Minimalne inhibitorne i minimalne baktericidne koncentracije sojeva *S. aureus* adaptiranih na nikal za antibiotike ciprofloksacin, ampicilin i gentamicin



## POPIS POKRATA

ad1	adaptiran na 1. koncentraciju nikla
ad2	adaptiran na 2. koncentraciju nikla
ad3	adaptiran na 3. koncentraciju nikla
ad4	adaptiran na 4. koncentraciju nikla
ad5	adaptiran na 5. koncentraciju nikla
ATCC	stanična kultura američkog tipa
CFU	kolonija-formirajuće jedinice
CIP	ciprofloksacin
CMN	klindamicin
DNK	deoksiribonukleinska kiselina
ERY	eritromicin
EUCAST	europska komisija za testiranje osjetljivosti na antimikrobne agense
FIK	frakcijska inhibitorna koncentracija
FOX	cefoksitin
GMN	gentamicin
ICP - OES	atomska emisijska spektrometrija induktivno spregnutom plazmom
LIN	linezolid
MBK	minimalna baktericidna koncentracija
MH	Mueller-Hinton
MIK	minimalna inhibitorna koncentracija
MOX	moksifloksacin
MRSA	meticilin-rezistentni <i>Staphylococcus aureus</i>
NiTi	nikal-titanijski
OD	optička gustoća
P	penicilin
RIF	rifampicin
SS	nehrđajući čelik
SXT	sulfametoksazol – trimetoprim
TEC	teikoplanin



## ŽIVOTOPIS

### OSOBNJE OBAVIJESTI

Ime	Andrej Pavlič
Adresa	Josipa Kulfaneka 9, HR-51000 Rijeka
Telefon	+385 51 345 638
Faks	+385 51 345 630
E-pošta	pavlic.andrej@yahoo.com
Matični broj iz Upisnika znanstvenika	340722
OIB	70975773254
Nacionalnost	hrvatska
Državljanstvo	hrvatsko
Datum rođenja	4. veljače 1988.
Obiteljski status	neoženjen

### RADNO ISKUSTVO

- Datum (od – do) Od 2013. do danas
- Naziv i sjedište tvrtke  
zaposlenja Katedra za ortodonciju i Katedra za dječju  
stomatologiju Medicinskog fakulteta  
Sveučilišta u Rijeci, Krešimirova 40, Rijeka
- Vrsta posla ili područje suradnik u nastavi
- Zanimanje i položaj koji  
obnaša asistent
- Osnovne aktivnosti i  
odgovornosti sudjelovanje u nastavi na predmetima  
Antropometrija i kefalometrija, Dentalna  
fotografija, Dentalno javno zdravstvo, Uvod u  
dentalnu medicinu, Pretklinička ortodoncija,  
Klinička ortodoncija, Interdisciplinarna  
ortodoncija, Morfologija zubi s dentalnom  
antropologijom, Stanična biologija s genetikom

znanstveni rad u području ortodontije.

- Datum (od – do) Od 2018. do danas
- Naziv i sjedište tvrtke zaposlenja Poliklinika za ortodontiju i medicinu rada dr. Pavlić
- Vrsta posla ili područje poliklinika
- Zanimanje i položaj koji obnaša doktor dentalne medicine
- Osnovne aktivnosti i odgovornosti sekundarni djelatnik

#### ŠKOLOVANJE I IZOBRAZBA

- Datum (od – do) Od 2006. do 2012.
  - Naziv i vrsta obrazovne ustanove Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci
  - Osnovni predmet /zanimanje Integrirani preddiplomski i diplomski sveučilišni studij Dentalna medicina
  - Naslov postignut obrazovanjem doktor dentalne medicine
  - Stupanj nacionalne kvalifikacije (ako postoji) VSS
- 
- Datum (od – do) Od 2002. do 2006.
  - Naziv i vrsta obrazovne ustanove Prva sušačka hrvatska gimnazija u Rijeci
  - Osnovni predmet /zanimanje opći smjer
  - Naslov postignut obrazovanjem

- Stupanj nacionalne kvalifikacije (ako postoji)

SŠS

#### OSOBNJE VJEŠTINE I SPOSOBNOSTI

*Stečene radom/životom, karijerom, a koje nisu potkrijepljene potvrdama i diplomama.*

#### MATERINJI JEZIK

hrvatski

#### DRUGI JEZICI

engleski

- sposobnost čitanja C2 iskusni korisnik
- sposobnost pisanja C2 iskusni korisnik
- sposobnost usmenog izražavanja C2 iskusni korisnik

talijanski

- sposobnost čitanja C1 iskusni korisnik
- sposobnost pisanja B2 samostalni korisnik
- sposobnost usmenog izražavanja B2 samostalni korisnik

#### SOCIJALNE VJEŠTINE I SPOSOBNOSTI

*Življenje i rad s drugim ljudima u višekulturnim okolinama gdje je značajna komunikacija,*

- u sklopu Erasmus stipendije za mobilnost nastavnog osoblja u akademskoj godini 2015./2016. boravio mjesec dana na Odjelu za ortodonciju Sveučilišta u Oslu, veljača 2016.

*gdje je timski rad osnova (npr. u kulturnim ili sportskim aktivnostima).*

- 2 tjedna u Ljubljani na Katedri za ortodontiju Medicinskog fakulteta i Stomatološkoj klinici, veljača 2017.

- tjedan dan na Odjelima za ortodontiju u Napulju, Sveučilište Federico II i Sveučilište Vanvitelli, siječanj 2019.

Sudjelovanje u znanstvenim projektima

- od 2013. do 2017. istraživač na projektu „Prediktivni čimbenici uspjeha ortodontske terapije u djece i adolescenata“ (13.06.2.1.53), glavnog istraživača Stjepana Špalja, financijer Sveučilište u Rijeci

- od 2016. istraživač na projektu „Imunosne i regenerativne implikacije korozije dentalnih materijala u djece i adolescenata“ (IP-7500), glavnog istraživača Stjepana Špalja, financijer Hrvatska zaklada za znanost

- od 2018. istraživač na projektu „Odrednice učinkovitosti terapije narušenih funkcija i izgleda orofacijalnog područja (uniri-biomed-18-22), voditelj prof. dr. sc. Stjepan Špalj

Članstvo u strukovnim udruženjima:

- Hrvatska komora dentalne medicine (od 2013.)
- Europsko ortodontsko društvo (od 2013.)
- Američka asocijacija ortodonata (od 2017.)
- Talijansko ortodontsko društvo (od 2018.)

ORGANIZACIJSKE  
VJEŠTINE I  
SPOSOBNOSTI

*Npr. koordinacija i  
upravljanje osobljem,*

-sudionik organizacije tečajeva trajnog usavršavanja i Međunarodne ljetne škole ortodontije Sveučilišta u Rijeci

*projektima, financijama;  
na poslu, u dragovoljnom  
radu (npr. u kulturi i  
športu) i kod kuće, itd.*

TEHNIČKE VJEŠTINE I  
SPOSOBNOSTI

*S računalima, posebnim  
vrstama opreme,  
strojeva, itd.*

Rad na računalu, korisnička programska podrška  
(MS Office, AudaxCeph, Moodle), programska  
podrška za statistiku (StatSoft, SPSS)  
rukovanje sustavom ortodontskih miniimplantata  
Forestadent

UMJETNIČKE  
VJEŠTINE I  
SPOSOBNOSTI

*Glazba, pisanje, dizajn,  
itd.*

Ples

DRUGE VJEŠTINE I  
SPOSOBNOSTI

*Sposobnosti koje nisu  
gore navedene.*

Nagrade i priznanja:  
- nagrada za najboljeg mladog znanstvenika  
Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci 2016.  
godine u kategoriji kliničkih medicinskih znanosti,  
dentalne medicine i javnog zdravstva

VOZAČKA DOZVOLA

B kategorija

DODATNE OBAVIJESTI

Autor/koautor 12 znanstvenih radova u časopisima  
indeksiranim u bazi CC

## POPIS RADOVA

Izvorni znanstveni i pregledni radovi u časopisima indeksiranim u bazi CC (12)

Izvorni znanstveni i pregledni radovi u časopisima indeksiranim u bazi SCIE (2)

Radovi prihvaćeni za objavljivanje u časopisima indeksiranim u bazi CC (2)

Radovi prihvaćeni za objavljivanje u časopisima indeksiranim u bazi SCIE (2)

Sažeci u zbornicima i časopisima (13)

Druga sudjelovanja na skupovima (9)

### Izvorni znanstveni i pregledni radovi u časopisima indeksiranim u bazi CC

1. Kovacevic Pavicic D, Pavlic A, Kinkela Devcic M, Lajnert V, Spalj S. Tooth color as a predictor of oral health-related quality of life in young adults. *J Prosthodont* 2019;28:e886-e892.
2. Pavicic DK, Kolceg M, Lajnert V, Pavlic A, Brumini M, Spalj S. Changes in quality of life induced by tooth whitening are moderated by perfectionism: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Int J Prosthodont* 2018;31:394–396.
3. Lajnert V, Kovacevic Pavicic D, Pavlic A, Pokrajac-Bulian A, Spalj S. Smile Aesthetics Satisfaction Scale: development and validation of a new brief five-item measure of satisfaction with smile aesthetics in adults and the elderly. *Int Dent J* 2018;68:162-170.
4. Saltovic E, Lajnert V, Saltovic S, Kovacevic Pavicic D, Pavlic A, Spalj S. Development and validation of a new condition-specific instrument for evaluation of smile esthetics-related quality of life. *J Esthet Restor Dent* 2018;30:160-167.
5. Manevska I, Pavlic A, Katic V, Trinajstic Zrinski M, Drevensek M, Spalj S. Satisfaction with facial profile aesthetics: are norms overrated? *Int J Oral Maxillofac Surg* 2018;47:72-78.
6. Pavlic A, Trinajstic Zrinski M, Katic V, Spalj S. Neoclassical canons of facial beauty: Do we see the deviations? *J Craniomaxillofac Surg* 2017;45:741-747.
7. Jovic T, Pavlic A, Varga S, Kovacevic Pavicic D, Slaj M, Spalj S. Perception of facial profiles: influence of female sex hormones and personality traits. *Orthod Craniofac Res* 2016;19:209-215.



8. Sop I, Mady Maricic B, Pavlic A, Legovic M, Spalj S. Biological predictors of mandibular asymmetries in children with mixed dentition. *Cranio* 2016;34:303-308.
9. Spalj S, Novsak A, Bilobrk P, Katic V, Zrinski MT, Pavlic A. Mediation and moderation effect of the big five personality traits on the relationship between self-perceived malocclusion and psychosocial impact of dental esthetics. *Angle Orthod* 2016;86:413-420.
10. Gavric A, Mirceta D, Jakobovic M, Pavlic A, Zrinski MT, Spalj S. Craniodentofacial characteristics, dental esthetics-related quality of life, and self-esteem. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2015;147:711-718.
11. Sasso A, Legovic M, Mady Maricic B, Pavlic A, Spalj S. Secular trend of earlier onset and decelerated development of third molars: evidence from Croatia. *Forensic Sci Int* 2015;249:202-206.
12. Lukez A, Pavlic A, Trinajstic Zrinski M, Spalj S. The unique contribution of elements of smile aesthetics to psychosocial well-being. *J Oral Rehabil* 2015;42:275-281.

Radovi prihvaćeni za objavljivanje u časopisima indeksiranim u bazi CC (2)

1. Pavlic A, Perissinotto F, Turco G, Contardo L, Spalj S. Do chlorhexidine and probiotics solutions provoke corrosion of orthodontic mini-implants? An in-vitro study. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2019.
2. Zigante M, Pavlic A, Vandevska Radunovic V, Mathewson A, Kotarac Knezevic A, Spalj S. Changes of mandibular dental arch shape during adolescence and its influence on late mandibular incisor crowding. *Homo* doi: 10.1127/homo/2019/1070.

Izvorni znanstveni i pregledni radovi u časopisima indeksiranim u bazi SCIE (2)

1. Rincic Mlinaric M, Karlovic S, Ciganj Z, Acev DP, Pavlic A, Spalj S. Oral antiseptics and nickel-titanium alloys: mechanical and chemical effects of interaction. *Odontology* 2019;107:150-157.
2. Spalj S, Mroz Tranesen K, Birkeland K, Katic V, Pavlic A, Vandevska-Radunovic V. Comparison of activator-headgear and Twin Block treatment approaches in class II division 1 malocclusion. *Biomed Res Int* 2017;2017:4861924.

### Izvorni znanstveni i pregledni radovi u časopisima indeksiranim u bazi SCOPUS (1)

1. Pavlić A, Roksandić Vrančić Z, Trinajstić Zrinski M, Katić V, Špalj S. Psihosocijalni utjecaj dentalne estetike u adolescenata u Hrvatskoj: validacija i pouzdanost psihometrijskog instrumenta. Med Flumin 2016;52:224-231

### Radovi prihvaćeni za objavljivanje u časopisima indeksiranim u bazi SCIE (2)

1. Brumini M, Slaj M, Katic V, Pavlic A, Trinajstic Zrinski M, Spalj S. Parental influence is the most important predictor of child's orthodontic treatment demand in a preadolescent age. Odontology doi: 10.1007/s10266-019-00447-1.
2. Kovacevic Pavicic D, Kolceg M, Lajnert V, Pavlic A, Spalj S. Changes in quality of life induced by tooth whitening are not influenced by global self-esteem: a randomized double-blind placebo-controlled trial. Odontology 2019. doi: 10.1007/s10266-019-00442-6.

### Sažeci u zbornicima i časopisima

1. Žigante M, Pavlić A, Gobin I, Špalj S. Nickel released during orthodontic treatment induces different effects on antimicrobial susceptibility of various commensal bacteria. Book of Abstracts 2019. 4th Congress of the Macedonian Orthodontic Society. Makedonija, 2019. str. 105
2. Perković V, Pavlić A, Trinajstić Zrinski M, Katić V; Špalj S. High orthognatic functional treatment need is less powerfull predictor of patients' decision to accept orthognatic surgery than high orthodontic treatment need. Book of Abstracts 95 EOS Congress Nica, Franuska, 2019. str. 152-153.
3. Brumini M, Pavlić A; Trinajstić Zrinski M, Ivanković Buljan Z, Špalj S. Parental influence is the most important predictor of child's orthodontic treatment demand in preadolescent age. Abstract book. 95th European Orthodontic Congress. Nica, Franuska, 2019. str. 80-81
4. Žigante M, Peternel S, Rinčić Mlinarić M; Pavlić A, Pop Acev D, Špalj S. Prevalence of titanium and nickel allergies in patients undergoing orthodontic treatment. Conference Proceedings 4th International Congress of Croatian

- Society of Orthodontics. / Lauc, Tomislav (ur.). Zagreb: Hrvatsko društvo ortodonata, 2018. str. 50-50
5. Pavlič A, Katić V. Nickel ions released from orthodontic appliances could diminish the susceptibility of *Staphylococcus aureus* to antibiotic ciprofloxacin. 49th Congress SIDO (Societa Italiana di Ortodonzia) Firenca, Italija, 2018.
  6. Kinkela Devčić M, Kovačević Pavičić D; Pavlič A, Lajnert V, Špalj S. Perfekcionizam usmjerava promjene u kvaliteti života izazvane izbjeljivanjem zubi : randomizirani, dvostruko slijepi, placebo kontrolirani pokus. 4. Međunarodni simpozij Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Zagreb, Hrvatska, 2018. str. 165-165.
  7. Katić V, Rinčić Mlinarić M, Trinajstić Zrinski M, Pavlič A, Špalj S. Working properties of nickel-titanium archwires after corrosion in oral antiseptics and saliva. Book of Abstracts 94th EOS Congress Edinburg, Velika Britanija, 2018. str. 164-164.
  8. Pavlič A, Morelato L, Vandevska Radunovic V, Špalj S. Maturation of wisdom teeth: influence of skeletal growth pattern and gender. Annual Session of American Association of Orthodontists San Diego, Sjedinjene Američke Države, 2017.
  9. Saint-Georges V, Peternel S, Kaštelan M, Pavlič A, Špalj S. High prevalence of hypersensitivity to nickel : should orthodontists worry? 117th Annual Session of American Association of Orthodontists : abstracts. San Diego, 2017.
  10. Katić V, Blagović B, Ciganj Z, Pavlič A, Špalj S. Correlation between ion release, wire type and acidity values of artificial saliva of nickel- titanium wires with different coatings. Eur J Orthod / David Rice (ur.). Stockholm, Švedska: Oxford University Press, 2016. str. e121-e121
  11. Pavlič A, Bilobrk P, Novšak A, Katić V, Špalj S. Mediation and moderation effect of the big five personality traits on the relationship between self-perceived malocclusion and psychosocial impact of dental aesthetics. Eur J Orthod / David Rice (ur.). Venecija, Italija: Oxford University Press, 2015. str. e165-e166.
  12. Pavlič A, Katić V, Trinajstić Zrinski M, Špalj S. Neoclassical canons in today's faces of adolescents and young adults and potential psychosocial repercussions of deviations from canons. Eur J Orthod. David Rice (ur.). Venecija, Italija: Oxford University Press, 2015. str. e165-e165.

13. Pavlić A, Mlacović-Zrinski M, Katić V, Špalj S. Do personality traits mediate the relationship between craniofacial features and self-esteem?. Eur J Orthod Book of Abstracts Varšava, Poljska, 2014.
14. Katić V, Mlacović-Zrinski M, Pavlić A, Špalj S. Orthognathic quality of life, craniofacial characteristics and personality traits. Eur J Orthod Book of Abstracts Varšava, Poljska, 2014.

#### Druga sudjelovanja na skupovima

1. Špalj S, Šlaj M, Pavlić A, Trinajstić Zrinski M, Katić V, Roksandić Vrančić Z. Validity and reliability of the Croatian version of the Child Perception Questionnaire 11-14. 1. Međunarodni kongres Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Zagreb, Hrvatska, 2015.
2. Roksandić Vrančić Z, Katalinić A, Pavlić A, Katić V, Špalj S. Psychosocial impact of dental aesthetics in Croatian adolescents: validation and reliability of psychometric instrument. 1. Međunarodni kongres Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Zagreb, Hrvatska, 2015.
3. Špalj S, Pavlić A, Trinajstić Zrinski M, Katić V. Multidisciplinarni pristup terapiji osoba s orofacijalnim rascjepima: iskustva tima u Rijeci. 2. međunarodni kongres Hrvatskog ortodontskog društva Zagreb, Hrvatska, 2016.
4. Kolčeg M, Kovačević Pavičić D, Pavlić A, Lajnert V, Špalj S. Utjecaj izbjeljivanja zuba na percepciju dentofacijalne estetike - randomizirani kontrolirani pokus. Book of Abstracts of the Congress Minimally Invasive Approach in Dental Medicine. Acta Stomatol Croat 2016;50:93. Zagreb, Hrvatska, 2016. str. 93-93
5. Pavlić A, Belušić-Gobić M, Trinajstić Zrinski M; Katić V, Špalj S. Kombinirana ortodontska i ortognatsko-kirurška terapija ; prikaz slučaja. 2. međunarodni kongres Hrvatskog ortodontskog društva. Zagreb, Hrvatska, 2016.
6. Pavlić A, Trinajstić Zrinski M, Katić V, Špalj S. Association of malocclusion with body image, self-esteem and quality of life. 2. međunarodni kongres Hrvatskog ortodontskog društva. Zagreb, Hrvatska, 2016.
7. Kos M, Kovačević Pavičić D, Lajnert V, Pavlić A; Špalj S. Stabilnost boje nakon izbjeljivanja i percepcija pacijenta. Vjesnik HKDM Zagreb, Hrvatska, 2017. str. 1-2

8. Štimac D, Vandevksa-Radunović V, Pavlić A. Facial growth and mandibular incisor crowding during adolescence. 2. Međunarodni kongres studenata dentalne medicine u Rijeci – RiCon. Rijeka, Hrvatska, 2017.