



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
STOMATOLOŠKI FAKULTET

Marijana Rinčić Mlinarić

**NIKAL-TITANSKE ORTODONTSKE ŽICE
U INTERAKCIJI S ORALNIM
ANTISEPTICIMA: KEMIJSKI,
MEHANIČKI I BIOLOŠKI UČINAK**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2018.



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
STOMATOLOŠKI FAKULTET

Marijana Rinčić Mlinarić

**NIKAL-TITANSKE ORTODONTSKE ŽICE
U INTERAKCIJI S ORALNIM
ANTISEPTICIMA: KEMIJSKI,
MEHANIČKI I BIOLOŠKI UČINAK**

DOKTORSKI RAD

Mentor: Izv. prof. dr. sc. Stjepan Špalj

Zagreb, 2018.



UNIVERSITY OF ZAGREB
SCHOOL OF DENTAL MEDICINE

Marijana Rinčić Mlinarić

**NICKEL-TITANIUM ORTHODONTIC
ARCHWIRES IN INTERACTION WITH
ORAL ANTISEPTICS: CHEMICAL,
MECHANICAL AND BIOLOGICAL
EFFECT**

DOCTORAL THESIS
Associate Professor Stjepan Špalj, DDM

Zagreb, 2018.

Rad je ostvaren u: Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci, Katedri za ortodonciju, laboratorijima Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta i Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, Zavodima za javno zdravstvo u Rijeci i Zagrebu te laboratoriju INA – Rafinerija Urinj u Rijeci.

Naziv poslijediplomskog doktorskog studija: Dentalna medicina

Mentor rada: izv.prof.dr.sc. Stjepan Špalj, dr.med.dent., spec.ortodont, Katedra za ortodonciju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci

Lektor hrvatskog jezika: (Nikolina Stulić, prof. hrvatskog jezika i književnosti)

Lektor engleskog jezika: (Marija Bogdanić, prof. engleskog jezika)

Sastav Povjerenstva za obranu doktorskog rada:

1. Izv.prof.dr.sc. Sandra Anić Milošević
2. Prof.dr.sc. Marina Lapter Varga
3. Izv.prof.dr.sc. Martina Šlaj
4. Prof.dr.sc. Jasna Lovrić
5. Prof.dr.sc. Hrvoje Jurić
6. Prof.dr.sc. Asja Čelebić

Datum obrane rada: 28.11.2018.

Rad sadrži: 104 stranice

12 tablica

36 slika

CD

Rad je vlastito autorsko djelo, koje je u potpunosti samostalno napisano uz naznaku izvora drugih autora i dokumenata korištenih u radu. Osim ako nije drukčije navedeno, sve ilustracije (tablice, slike i dr.) u radu su izvorni doprinos autora poslijediplomskog doktorskog rada. Autor je odgovoran za pribavljanje dopuštenja za korištenje ilustracija koje nisu njegov izvorni doprinos, kao i za sve eventualne posljedice koje mogu nastati zbog nedopuštenog preuzimanja ilustracija odnosno propusta u navođenju njihovog podrijetla.

Zahvala

Pri izradi ovog doktorskog rada provedena su istraživanja u laboratorijima Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta i Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci, Zavodima za javno zdravstvo u Rijeci i Zagrebu te laboratoriju INA – Rafinerija Urinj u Rijeci.

Zahvaljujem dr.sc. Višnji Katić, prof.dr.sc. Branki Blagović, dipl.ing. Zlatku Ciganju, dipl.ing. Pauli Žurgi, dipl.ing. Jasenki Šabarić, prof.dr.sc. Draženki Komes, prof.dr.sc. Kseniji Durgo, dr.sc. Aniti Perajić, doc.dr.sc. Zoranu Zoriću, ing. Goranu Bosancu, doc.dr.sc. Svenu Karloviću, Lidiji Kanižaj i Damiru Žuljeviću.

Posebnu zahvalu upućujem svojem mentoru prof. dr. sc. Stjepanu Špalju, iznimnom čovjeku i stručnjaku koji me strpljivo i predano vodio tijekom izrade ovog rada.

Istraživanje je provedeno uz materijalnu i financijsku pomoć projekta Hrvatske zaklade za znanost „Imunosne i regenerativne implikacije korozije dentalnih materijala u djece i adolescenata“ (IP-2014-09-7500), voditelja projekta Stjepana Špalja.

Nikal - titanske ortodontske žice u interakciji s oralnim antisepticima: kemijski, mehanički i biološki učinak

SAŽETAK

Cilj istraživanja bio je ispitati utjecaj oralnih antiseptika na koroziju ortodontskih slitina nikal-titana (NiTi) različitih prevlaka te biološke učinke korozije. Neobložene NiTi žice (0,020 x 0,020") i NiTi žice prevučene titanijevim nitridom i rodijem testirane su u interakciji s umjetnom slinom vrijednosti pH 4,8 na temperaturi od 37°C i s oralnim antisepticima baziranim na hijaluronskoj kiselini (Gengigel), klorheksidinu (Curasept) i eteričnim uljima alkoholne baze (Listerine). Dinamika oslobađanja iona nikla i titana zabilježena su trećega, sedmoga, četrnaestoga, dvadeset i prvoga i dvadeset i omoga dana optičkom emisijskom spektroskopijom i masenom spektrometrijom induktivno spregnutom plazmom. Fleksibilnost i rezilijencija procjenjivani su testom savijanja u tri točke. Za analizu vrste korozije korištene su elektrokemijska impedancijska spektroskopija i ciklička polarizacija. Biološko djelovanje iona Ni i Ti istraženo je na humanim staničnim linijama jezika CAL 27, jetre HEP G2 i debelog crijeva Caco-2. Rezultati su pokazali da je korozija NiTi u vezi s vrstom oralnih antiseptika i prevlake. Brzina i stupanj korozije uglavnom se povećavaju uz dodatak antiseptika. Zbog izloženosti umjetnoj slini i antisepticima smanjuje se fleksibilnost i rezilijencija NiTi žica. Utjecaj medija značajniji je od utjecaja vrste prevlake slitine. Najveće oslobađanje iona Ni događa se unutar prva tri dana. Oslobađanje iona Ti uglavnom potvrđuje nalaze stope generalizirane korozije. Biološki efekt iona Ni i Ti nije velik. Ioni nikla i titana ne izazivaju samostalno značajni citotoksični efekt, već njihova kombinacija. Povećanjem koncentracije nikla i titana povećava se citotoksičnost i to više s titanom nego niklom. Može se zaključiti da promjene ortodontske naprave inducirane antisepticima ne bi imale veliki klinički značaj. Citotoksičnost značajno jako linearno korelira s indukcijom slobodnih radikala

Ključne riječi: korozija; nikal-titanska slitina; ortodontske žice; površinska svojstva

Nickel – titanium orthodontic archwires in interaction with oral antiseptics: chemical, mechanical and biological effect

SUMMARY

AIM: The aim was to explore the influence of the oral antiseptics on the corrosion of nickel-titanium (NiTi) orthodontic alloys with various coatings and subsequent biological effects.

MATERIALS AND METHODS: Uncoated, titanium nitride coated and rhodium coated NiTi archwires (0.020x0.020") were tested in interaction with artificial saliva pH 4.8 at the temperature of 37°C and oral antiseptics based on and hyaluronic acid (Gengigel), chlorhexidine (Curasept) and essential oils in alcohol base (Listerine). The dynamics of nickel and titanium ions release were recorded 3th, 7th, 14th, 21th and 28th day by inductively coupled plasma-optical emission spectroscopy and mass spectrometry. Flexibility and resilience of archwires were assessed by three-point bending test. Electrochemical impedance spectroscopy and cyclic polarization were used to analyse corrosion type. Biological effect of Ni and Ti ions was explored on cell lines of human tongue CAL 27, liver HEP G2 and colon Caco-2.

RESULTS: Corrosion of NiTi is related to type of antiseptic mouth rinse and coating formulations. The rate and degree of corrosion mainly increase with the addition of antiseptics. Exposure to an artificial saliva and antiseptics tend to reduce flexibility and resilience of NiTi archwires, but not to a great extent. The influence of the media is more significant than the influence of the type of the alloys coating. The largest release of Ni ions is in the first three days. The release of Ti ions mainly supports findings of general corrosion rate. Biological effect of released Ni and Ti ions is not high. Ni and Ti ions alone do not induce a major cytotoxic effect, but their combination does. Increase in concentration of Ni and Ti tend to increase cytotoxicity, titanium more than nickel. Correlation between cytotoxicity and induction of free radicals is significant, linear and strong.

CONCLUSION: Changes of orthodontic appliance induced by antiseptics would not have a clinically important impact.

Key words: corrosion; nickel-titanium alloy; orthodontic wires; surface properties; cytotoxicity

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
1.1.	Ortodontska biomehanika	2
1.2.	Neželjeni učinci ortodontske terapije	7
1.3.	Oralni antiseptici	9
1.4.	Korozija	11
1.5.	Biološke posljedice korozije	16
2.	SVRHA ISTRAŽIVANJA	19
3.	MATERIJALI I POSTUPCI	21
3.1.	Materijali	22
3.2.	Postupci	26
3.3.	Statistička obrada podataka	36
4.	REZULTATI	37
4.1.	Mehanički učinak	38
4.2.	Kemijski učinak	44
4.3.	Biološki učinak	59
5.	RASPRAVA	75
5.1.	Dinamika otpuštanja iona i mehanički učinak korozije	76
5.2.	Korozijski mehanizmi	80
5.3.	Biološki utjecaj otpuštenih iona nikla i titana	84
6.	ZAKLJUČCI	88
7.	LITERATURA	90
8.	ŽIVOTOPIS	103
9.	PRIVITAK	

Popis skraćenica

PDL – parodontni ligament

NiTi – nikal titanska legura

TiO_x - titanov oksid

E – modul elastičnosti

YS – točka popuštanja

RhNiTi – rodirana nitinolska žica

NNiTi – nitrirana nitinolska žica

1. UVOD

1.1. Ortodonska biomehanika

Ortodonskim tretmanom malokluzija i kraniofacijalnih nepravilnosti uspostavlja se skladan odnos zuba i čeljusti, poboljšava žvačna funkcija, fonacija i estetika lica. Učinkom na opće i oralno zdravlje, podizanjem samopouzdanja pojedinca pozitivno se utječe i na poboljšanje kvalitete života (1).

Mehanika je prirodna znanost čiji početci sežu u doba prije Krista. Ona je najstarija grana fizike koja opisuje utjecaj sile na tijelo. Biomehanika kao disciplina proučava fizičke i mehaničke zakone u biološkom sustavu (2).

Ortodonskom terapijom aplicira se sila na zube. Ta je sila generirana u različitim mobilnim ili fiksnim napravama. Kako bi došlo do pomaka zuba sila mora biti dugotrajna, ali ne i apsolutno kontinuirana. Pomak zuba u ortodonciji temelji se na odgovoru parodontnog ligamenta (PDL) i okolne kosti na apliciranu silu uslijed čega se pokreće niz složenih bioloških reakcija koje rezultiraju pomakom zuba kroz kost.

Optimalna razina sile za ortodontski pomak ona je koja omogućava staničnu stimulaciju bez potpunog prekida krvi u parodontnom ligamentu, a jednaka je kapilarnom tlaku od 20 do 26 cN/cm² površine korijena (1). Trajanje sile 4 - 8 sati minimum je koji je potreban za poticanje stanične proliferacije i posljedično pomak zuba (1). Razina prostaglandina E₂, snažnog stimulatora koštane resorpcije, najviša je u gingivnoj sulkusnoj tekućini 24 sata nakon aplikacije sile (3).

Za razliku od mobilnih naprava, fiksnim napravama postižu se kontinuirane sile. Slabe kontinuirane sile omogućuju fiziološki pomak zuba stimuliranjem proliferacije stanica koje dovode do frontalne resorpcije lamine dure koštane alveole. Sveobuhvatna terapija fiksnim ortodontskim napravama prosječno traje dvije godine i prolazi kroz tri faze: nivelacija zubnog luka, radna faza i finalizacija. Cilj je prve faze postizanje idealnog oblika zubnog luka horizontalnom i vertikalnom nivelacijom rotiranih i distopično položenih zuba, izravnavanje Speeove krivulje uz kontrolu anteroposteriornog položaja sjekutića, posteriorne širine i oblika zubnog luka. Ortodontski žičani lukovi glavni su izvor sile. Energija sadržana u njima oslobađa se prilikom deformacije luka (4). Nivelacijski žičani lukovi moraju posjedovati kombinaciju sile, elastičnosti i velikog raspona djelovanja. Sila kojom djeluju treba biti lagana i kontinuirana, jačine oko 50 cN kako bi se izbjegle neželjene nuspojave. Nikal-titanska legura (NiTi) predstavlja materijal izbora u inicijalnoj fazi ortodontske terapije. Njihova niska deaktivacijska sila rezultira fiziološkim odgovorom PDL-a i kosti.

Radna faza odvija se na krutim čeličnim žičanim lukovima. Tijekom te faze, za potrebe pomaka zuba, mogu se koristiti potisne ili vlačne opruge koje se izrađuju od NiTi slitine. U ovoj fazi korigiraju se odnosi kutnjaka i bukalnih segmenata, zatvaraju ekstrakcijski prostori kao i ostali prostori u lukovima. Postiže se anteroposteriorni sklad.

U završnoj fazi osim čeličnih lukova primjenjuju se i titan-molibdenski lukovi, a po potrebi i NiTi lukovi. Cilj je ove faze namještanje položaja pojedinih zubi, paraleliziranje korijenova, korekcija vertikalnih odnosa sjekutića i postizanje njihova ispravnog vestibulo-oralnog i mezio-distalnog nagiba.

Legura nikla i titana, poznata kao Nitinol, sadrži navedene kemijske elemente u podjednakom omjeru. Naziv Nitinol izveden je od njegova sastava i njegova mjesta otkrivanja: *Nickel Titanium-Naval Ordnance Laboratory*. William Buehler i Frederick Wang otkrili su njegova svojstva tijekom istraživanja u *Naval Ordnance Laboratory* 1959. godine (1).

Nitinol posjeduje dva srodna i jedinstvena svojstva: efekt pamćenja oblika i superelastičnost. Pamćenje oblika vidljivo je u pojavi da se nakon deformacije materijal vraća u svoj prvobitni nedeformirani oblik uslijed izlaganja određenoj povišenoj temperaturi. Superelastičnost se pojavljuje u uskom temperaturnom intervalu nešto iznad temperature transformacije, tj. deformacije. Temperatura nije potrebna za povratak u nedeformirani oblik (5).

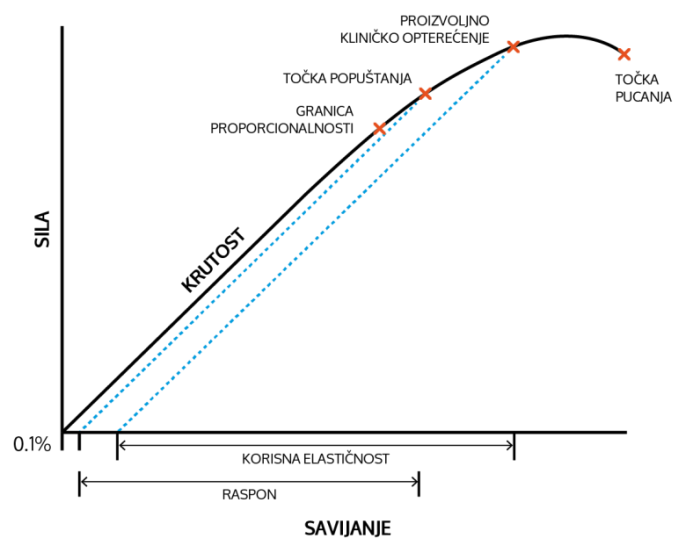
Kristalna rešetka NiTi slitine može postojati u dva oblika: martenzitnoj ili austenitnoj (6). Ta kristalografska osobitost određuje pamćenje oblika i superelastičnost. Martenzitna forma prisutna je na nižim temperaturama dok se prijelaz u austenitnu fazu odvija na višim temperaturama. NiTi žica u austenitnom obliku poprima formu idealnog luka. Kod slitine potpuno transformirane u austenit, proporcionalan je odnos naprezanja i deformacije kao npr. kod čelika. Svojstvo superelastičnosti vezano je za martenzitnu formu. Osim promjenom temperature martenzična transformacija događa se i pod utjecajem sile na žicu. Lokalizirano formiranje martenzita, potrebnog za postizanje superelastičnosti, dolazi na mjestima žičanog luka na kojem je on ligiran za bravicu. Udio martenzita povećava elastičnost slitine i takvo svojstvo slitine naziva se pseudoelastičnost (1,5,6).

NiTi lukovi jedni su od najčešće korištenih lukova u ortodontiji. Odlikuje ih nizak omjer naprezanje – deformacija, visoka elastičnost, fleksibilnost i rezilijencija (4,5).

Visoka elastičnost podrazumijeva mogućnost deformacije žice uslijed djelovanja sile, a nakon prestanka opterećenja vraćanje u prvobitni oblik. Fleksibilnost je odgovor na silu bez nastanka trajne deformacije. Rezilijencija predstavlja mjeru pohranjene energije u žici koja je savijena unutar svog elastičnog limita. To je svojstvo materijala da se vrati u prvobitni oblik

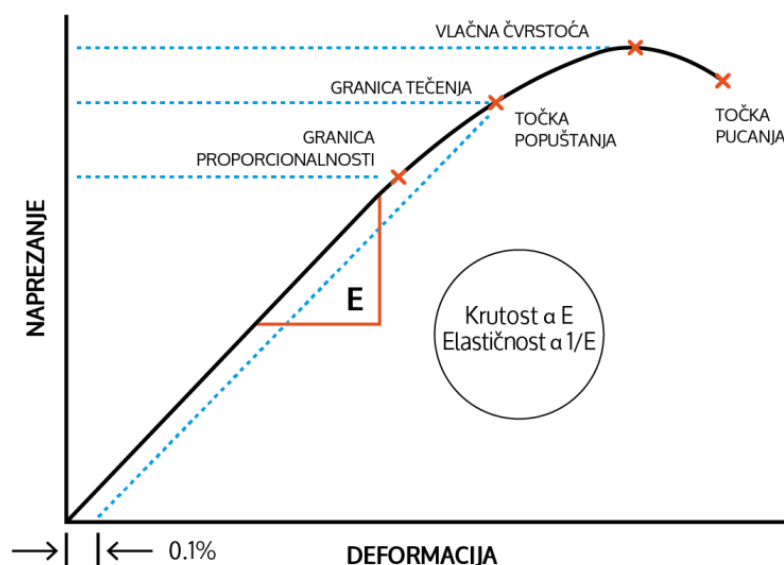
nakon prestanka djelovanja sile kojoj je izloženo, a koje ne prelazi granicu njegove rastezljivosti.

Kliničku korisnost lukova opisuju tri osnovna svojstva: čvrstoća, krutost (ili elastičnost) te raspon djelovanja. Svako od tih varijabli mogu se pojedinačno definirati preko dijagrama sila – otklon (slika 1) te naprezanje – deformacija (slika 2).



Slika 1. Dijagram sila – otklon (izradio Logobox d.o.o)

Dijagram sila – otklon opisuje krutost, odnosno elastičnost te područje djelovanja dok dijagram naprezanje – deformacija opisuje čvrstoću materijala.



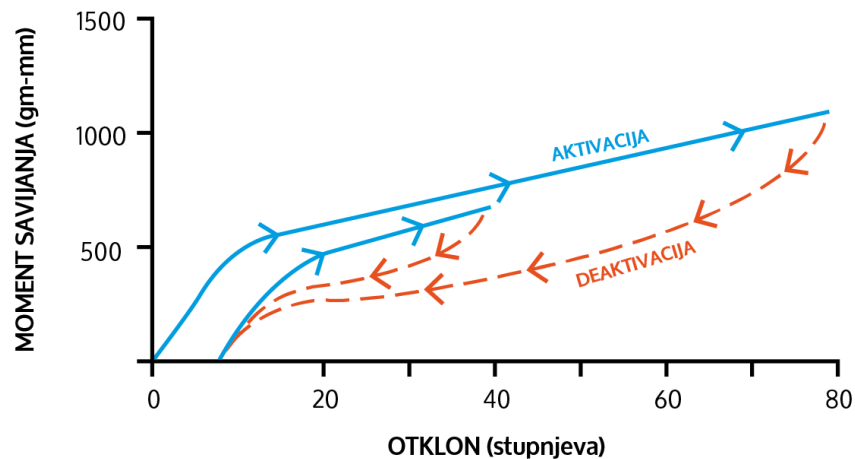
Slika 2. Dijagram naprezanje – deformacija (izradio Logobox d.o.o)

Modul elastičnosti, koji određuje elastično svojstvo materijala, ovisi o odnosu naprezanja i deformacije. Proporcionalan je krutosti, a obrnuto proporcionalan elastičnosti (7). Iz odnosa točke popuštanja (engl. *yield strength*, YS) i modula elastičnosti (E) moguće je izračunati omjer elastičnog vraćanja (engl. *springback ratio*) kao mjeru savitljivosti, odnosno fleksibilnost (YS/E) te modul rezilijencije kao mjeru popustljivosti, odnosno rezilijenciju ($YS^2/2E$). Fleksibilnost je iznos obnovljive elastične deformacije nakon deaktivacija. Ako je deformacija isključivo elastične prirode, raspon i korisna elastičnost istoznačni su i rezultat su omjera granice proporcionalnosti i modula elastičnosti. Kako kliničari često tijekom aktivacije uzrokuju i određeni iznos trajne deformacije za izračun fleksibilnosti uzima se omjer točke popuštanja i modula elastičnost (5).

Nivelacijsku fazu ortodontske terapije karakterizira progresivno povećanje promjera žičanih lukova tijekom terapije. U kliničkom radu važno je poznavanje mehaničkih karakteristika lukova kako bi se izbjegle neželjene nuspojave.

Važna je karakteristika superelastičnih materijala izgled njihove krivulje aktivacije i deaktivacije (slika 3). Zbog gubitka energije (histereza), deaktivacijska sila uvijek je niža od

sile potrebne za aktivaciju. U kliničkoj primjeni ta je sila važna jer ona dovodi do pomaka zuba. Žičani lukovi koji otpuštaju blage sile, neovisno o stupanju otklona, smatraju se najučinkovitijima u prvim fazama terapije. Svaka promjena mehaničkih svojstva materijala uzrokovana utjecajem okoline, može utjecati na jačinu otpuštene sile i posljedično na rezultate terapije.



Slika 3. Izgled krivulje aktivacije i deaktivacije superelastičnih materijala (izradio Logobox d.o.o)

U svrhu poboljšanja estetike, mehaničkih svojstava i korozijske otpornosti, na tržištu se pojavljuju modifikacije osnovne neobložene NiTi žice u obliku različitih obloga površine. Nitiranje površine jedan je od najvažnijih postupaka površinske termokemijske obrade. Temelji se na implantiranju, odnosno difuziji dušika u površinski sloj čime se postiže visoka tvrdoća, poboljšanje otpornosti na trošenje i zamor te bolja korozijska otpornost (8). NiTi žice s nitridnom prevlakom na svojoj površini imaju i sloj TiO_2 preko sloja TiN zbog prirodne sklonosti titana prema formiranju pasivnog sloja (9). Postupkom rodiranja na površinu žice nanosi se tanki sloj rodija i zlata (0,5mm) čime se postiže bolja estetika. Prethodna istraživanja utvrdila su kako različite prevlake ne utječu na promjenu radnih svojstava te generiraju podjednake sile tijekom primjene (10).

1.2. Neželjeni učinci ortodontske terapije

Dosadašnja klinička, radiološka i histološka ispitivanja pokazala su i nuspojave ortodontskih tretmana u vidu neželjenih učinaka na caklinu, korijen zuba i okolne strukture. To uključuje mobilnost i bol, resorpciju korijena, gingivne recesije, oštećenje cakline te gubitak visine alveolarne kosti (1).

Blaga mobilnost zuba tijekom ortodontske terapije normalna je pojava, nastala zbog remodelacije kosti i reorganizacije PDL-a. Povećana mobilnost znak je primjene prejakih sila koje uzrokuju opsežnu podminirajuću resorpciju. Prijevremeni kontakti koji vode u traumatsku okluziju također mogu pojačati mobilitet zuba. Nakon što se ukloni uzrok, zub se stabilizira bez trajnih posljedica. Jačina boli ovisi individualno i o pacijentu. Bol se obično javi tri do četiri sata nakon aplikacije sile i traje tri do četiri dana. Dokazano je postojanje slobodnih živčanih završetaka u području hijaline zone koji reagiraju na pritisak i izazivaju bol (6).

Resorpcija korijena dokumentirana je nakon završene ortodontske terapije. Ovisna je o vrsti naprave i tipu aplicirane sile, opsežnosti pomaka zuba, vremenu trajanja tretmana te starosti pacijenta (11). U odnosu na alveolarnu kost, resorpcija je korijena nepredvidiva. Remodelacija korijena konstantno se događa za vrijeme ortodontskog pomaka. Trajni gubitak strukture korijena nastaje kad se početno resorbirani cement ne reparira (1, 2). Dva su tipa resorpcije korijena - površinska i apikalna resorpcija. Cement korijena i stanice PDL prekrivaju površinu korijena. Oni sadrže snažne kolagenske inhibitore koji formiraju barijeru i tako sprječavaju resorpciju korijena. Za vrijeme procesa remodelacije hijaline zone, nekrotično hijalinizirano tkivo te zid alveolarne kosti uklanjaju se djelovanjem makrofaga i osteoklasta. Kao nuspojava stanične aktivnosti za vrijeme uklanjanja nekrotičnog PDL izlaganje je cementa korijena resorptivnim stanicama. Resorpcija korijena vidljiva je na mjestima koji graniče s hijalinom zonom (12, 13). Te male lakunarne resorpcije vidljive su jedino elektronskim mikroskopom i potpuno se repariraju u fazi obnavljanja. Ako se spoje lakune sa susjednih strana taj se dio apeksa odlomi i korijen je nepovratno skraćen. Jaka lokalizirana resorpcija podrazumijeva gubitak više od 1/3 korijena i uvijek je posljedica primjene jakih sila u ortodontskoj terapiji. Osim produženog trajanja terapije, na apikalnu resorpciju utječe i anatomska osobitost korijena i vrsta pomaka. Toj resorpciji najviše podliježu gornji sjekutići (2).

Prosječni gubitak alveolarne kosti tijekom ortodontske terapije iznosi 0.5 mm i gotovo nikad ne prelazi 1 mm. Najveće promjene nalaze se na mjestima ekstrakcije zuba. No, pomicanje zubi napravama baziranim na niklu i titanu ima veliki osteogeni potencijal i može regenerirati deficitne dijelove alveolarne kosti te pomicati rubove gingive (14, 15).

Nedostatak potpore alveolarne kosti i parodontnih tkiva najčešća je i najzahtjevnija dilema s kojom se susreće interdisciplinarni stomatološki tim u rehabilitaciji djelomično ozubljenih ljudi. Smanjenje elastičnosti i povećanje krutosti naprava zbog intraoralne korozije može producirati prevelike sile, poremetiti regeneraciju tkiva zbog čega mogu nastati nepopravljive štete na korijenu zuba i okolnoj alveolarnoj kosti.

Rizični čimbenici za razvoj upale gingive i demineralizacije cakline ostaci su hrane i dentobakterijski plak. Ortodontski pacijenti imaju značajan porast broja bakterija *Streptococcus mutans* i *Lactobacillus* u odnosu na pacijente koji nisu u terapiji. Također, povećana je tendencija gingivnom krvarenju, gubitku epitelnog pričvrstka i formiranju gingivnih džepova, posebno na molarima (16).

Bijele mrljaste lezije ozbiljna su nuspojava ortodontske terapije vidljiva kod gotovo 96% pacijenata liječenih fiksnim napravama (17 – 19). Povećan broj acidogenih bakterija utječe na snižavanje pH vrijednosti sline. To pokreće proces otapanja kalcija i fosfata iz caklinskih prizmi. Proces je reverzibilan ukoliko se pH vrati prema normalnim vrijednostima. Kod većih gubitaka minerala cakline oštećenja su vidljiva i trajna. Stoga je kod pacijenata s nedovoljnom oralnom higijenom i povećanom sklonošću za nastanak karijesa neophodna upotreba sredstava za oralnu higijenu na bazi fluorida, antimikrobnih sredstava ili probiotika.

1.3. Oralni antiseptici

Topikalna primjena oralnih antiseptika tijekom ortodontske terapije smanjuje mogućnost nastanka upale oralnih tkiva (gingivitis i mukozitis) i karijesa, no istovremeno može dovesti do pojačanog korodiranja ortodontskih žica i neželjenih bioloških efekata. Ostaci hrane i formirani plak rizični su čimbenici za nastanak karijesa i upale gingive. Komercijalno dostupni preparati različitog su kemijskog sastava i aktivnih tvari. Iako su nuspojave rijetke, reportirane su alergijske reakcije na njihove sastojke i pojave citotoksičnosti (20, 21).

Razumijevanje efekata interakcije materijala omogućava kombiniranje njihovih pozitivnih efekata radi postizanja maksimalnog benefita za pacijenta. Elementi fiksne ortodontske naprave pridonose zadržavanju hrane i formiranju plaka. Plak je produkt razmnožavanja mikroorganizama i njihova metabolizma. Čvrsto zalijepljen na površinu zuba može se ukloniti samo mehaničkim čišćenjem. Sastav plaka podložan je dinamičkim promjenama. Metabolizam bakterija snižava oksido-redukcijski potencijal plaka što dovodi do razmnožavanja anaerobnih bakterija roda *Bacteroides*, *Actinomyces israeli* i određenih aerobnih koka (22). Acidogene bakterije poput *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis* i bakterije roda *Lactobacilles* svojim metabolizmom stvaraju mliječnu kiselinu koja osim što snižava pH plaka utječe i na smanjenje pH same sline čime se umanjuje njena protektivna vrijednost (23).

Istraživanja su pokazala kako je u plaku starom 24 sata izmjerena pH vrijednost od 4,8 (24, 25). Ukoliko pH vrijednost ostane niska tijekom dužeg razdoblja, gube se minerali cakline i nastaju oštećenja klinički vidljiva kao bijele mrljaste lezije. Takva demineralizacijska oštećenja prva su faza u razvoju karijesne lezije. Uz poboljšanje oralne higijene, mogu se do određene mjere reparirati i ne zahtijevaju konzervativno liječenje ispunom.

Kemijska kontrola plaka uz mehaničko čišćenje danas su standard individualne profilakse. Oralni antiseptici uglavnom djeluju bakteriostatski, a u određenim koncentracijama i baktericidno. Djelotvornost im ovisi o koncentraciji, vremenu djelovanja, temperaturi i načinu primjene. Denaturiranjem staničnih proteina, interferiranjem s metaboličkim procesima mikroorganizama te mijenjanjem osmotske ravnoteže dovode do raspada same stanice (26). U skupinu oralnih antiseptika ubrajaju se fenoli, kvarterni amonijeve spojevi, metalne soli, povidon jodid, natrij hipoklorit te preparati na bazi klorheksidina, eteričnih ulja, hijaluronske kiseline ili preparati potpuno organskih sastojaka (26). Klorheksidin najučinkovitije je antimikrobno sredstvo u usnoj šupljini (27). Koristi se u prevenciji gingivitisa, sekundarnoj

prevenciji nakon kirurških zahvata, vođenih regeneracija tkiva, implantoloških zahvata i tijekom parodontološke terapije.

Preparati klorheksidina na tržištu se nalaze u obliku tekućina za ispiranje usta (0,05%-0,2%), gela (0,02% - 1%), spreja (0,1% - 0,2%), tableta/kapsula(5mg/tbl), čipova (2,5mg), lakova i žvakaćih guma (26). Klorheksidin je širokog antimikrobnog spektra, djeluje baktericidno denaturacijom proteina mikroorganizama. Djelovanje je najjače na gram pozitivne bakterije, a nešto slabije na gram negativne bakterije i gljivice (28). Učinak mu ovisi o koncentraciji. Pozitivno nabijene molekule klorheksidina pokazuju veliki afinitet prema membranama stanica streptokoka i laktobacila koje su negativno nabijene. Negativni naboj imaju i gingiva, sluznica usne šupljine i caklina. Na tim mjestima stvara se rezervoar aktivne tvari koja se oslobađa narednih 24 sati nakon primjene.

Nuspojava klorheksidina je žuto-smeđe obojenje zuba i stražnjih dijelova jezika. Novi klorheksidinski preparati sadrže sustav protiv obojenja zuba (engl. *Anti Discoloration System*, ADS). ADS sadržava dvije aktivne tvari, natrijev metabisulfit i askorbinsku kiselinu, dva sastojka koja bi trebala spriječiti diskoloraciju bez utjecaja na antiseptičko djelovanje.

Osim klorheksidina, kao oralni antiseptici često se koriste - Listerine, preparat na bazi eteričnih ulja te Gengigel koji sadrži hijaluronsku kiselinu u obliku natrij hijaluronata. Hijaluronska kiselina prirodna je tvar prisutna u ekstracelularnom matriksu vezivnog tkiva, sinovijalne tekućine i drugih tkiva. Ima fiziološku i strukturalnu funkciju koja podrazumijeva staničnu i vanstaničnu interakciju, interakciju s čimbenicima rasta te regulaciju osmotskog tlaka. Istraživanja na bolesnicima pokazala su kako egzogena primjena hijaluronske kiseline pokazuje antibakterijski, antiinflamatorni te antiedematozni učinak kod parodontnih bolesti (29). Listerin, jedan od komercijalno napopularnijih antiseptika, sadrži četiri prirodna sastojka otopljena u etanolu (eukaliptol, mentol, timol i metil salicilat). Njegova primjena datira još od kraja 19. stoljeća. Pokazao je dobra antimikrobna svojstva (30,31).

1.4. Korozijska

Fiziološke, termalne, mikrobiološke i biokemijske karakteristike usne šupljine, slina i hrana čine idealni okoliš za biodegradaciju dentalnih materijala i naprava. Usna šupljina može se smatrati galvanskim člankom u kojem je slina elektrolit, a dentalne legure elektrode. Odavno je poznat izrazito agresivan i korozijski učinak kloridnih iona prema metalima, a ionski sastav i koncentracija proteina u tjelesnim tekućinama dodatno kompliciraju razumijevanje biomedicinske korozijske (32). Zbog prisutnosti kloridnih iona, blago kiselog pH i otopljenog kisika, slina predstavlja pogodan medij za odvijanje korozijskih procesa. Za razliku od drugih izvanstaničnih tekućina sastav i svojstva sline značajno se mijenjaju ovisno o konzumaciji hrane i pića ili primjenom sredstava za održavanje oralne higijene.

Sredstva za održavanje oralne higijene u nastojanju da unaprijede oralno zdravlje također reagiraju s gradbenim tvarima dentalnih materijala, utječući na proces njihova trošenja, otpuštajući produkte u okolna tkiva, slinu i krv (33, 34). Brojni nusfekti mogu nastati, u rasponu od reakcija preosjetljivosti, proliferacije tkiva do citotoksičnosti i genotoksičnosti (33, 35, 36). Propisi za sigurnost medicinskih proizvoda reguliraju pitanja sigurnosti materijala obveznim provođenjem laboratorijskih testova i ekspertiza. No testiranje interakcija tih materijala s novoformuliranim materijalima za prevenciju oštećenja i regeneraciju orodentalnih tkiva nije obvezna prije puštanja u komercijalnu uporabu. Takva testiranja trebaju provesti neovisne znanstvene institucije, a ne proizvođači s direktnim komercijalnim interesom.

Korozijski proces je prelaska u termodinamički stabilnije stanje u obliku korozijskih produkata. Nekoliko je oblika korozijske koji se mogu javiti i kod ortodontskih legura: opća, pjegasta, jamičasta, točkasta ili igličasta te galvanska korozijska (37).

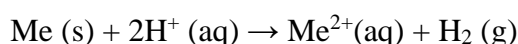
Galvanska korozijska nastaje u uvjetima kad su dva različita metala spojena i potopljena u elektrolit. Manje plemeniti metal oksidira i postaje anoda, dok je plemenitiji metal katoda i pokazuje veću otpornost prema korozijskoj. U ortodonciji se galvanska korozijska može javiti npr. kod lukova sa zalemljenim dodatnim elementima ili kod bravica građenih od dva različita metala.

Iako se u ortodonciji primjenjuju materijali velike korozijske otpornosti i kod njih može u određenim okolišnim uvjetima doći do intenzivne korozijske, najčešće u obliku lokaliziranog korozijskog oštećenja. Nastali korozijski produkti ili omogućuju daljnju korozijsku na tim mjestima ili usporavaju korozijsku stvarajući slabo topive korozijske produkte koji djeluju

zaštitno poput titanovih oksida (TiO_x). O stabilnosti formiranog pasivnog sloja ovisi daljnje korozijsko ponašanje metala. Sloj je stabilan do određenog anodnog potencijala pri kojem dolazi do oštećenja pasivnog sloja i pojave jamičaste korozije (38). Kako su pokazala ranija istraživanja, jamičasta se korozija na površini NiTi najčešće manifestira lokalizirano (39). Ovakav tip korozije prepoznatljiv je po brazdama ili jamicama na površini materijala kao rezultat otapanja određenog dijela površine. S obzirom da je NiTi kristalne strukture, granice kristalnih zrna mogu biti slaba mjesta koja popuštaju pod lokaliziranom korozijom (40).

Elektrokemijska korozija metala, koja se javlja u usnoj šupljini, simultani je redukcijско-oksidacijski proces u sustavu metal/elektrolit. Proces redukcije u vodenim medijima odnosi se na redukciju vodika ili otopljenog kisika. U jako kiselim otopinama utjecaj kisika na proces korozije metala nije velik, dok u neutralnim otopinama taj utjecaj prevladava.

Otapanje metala u otopini kiseline prikazuje slijedeća reakcija (37) :



Anodna reakcija ili oksidacija proces je otpuštanja elektrona. Redukcija (katodna reakcija) rezultat je primanja elektrona nastalih procesom oksidacije pri čemu nastaju hidroksilni ioni, voda ili vodik (41)



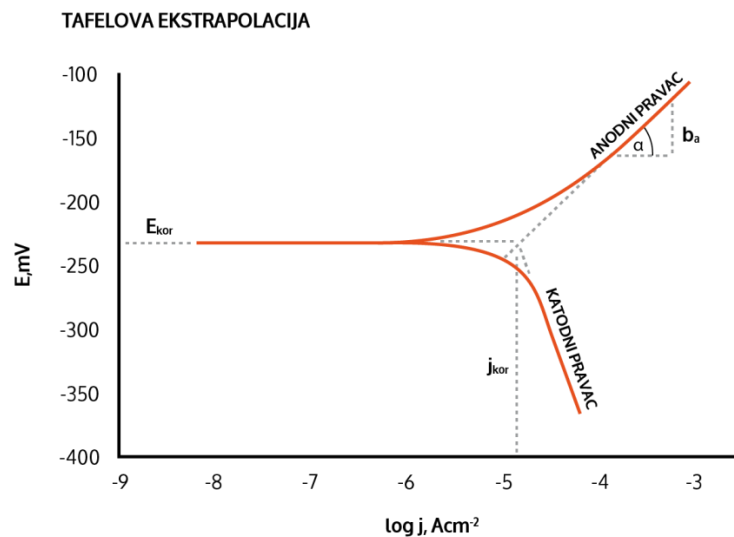
Katodna reakcija :



Ispitivanja korozije *in vitro* provode se elektrokemijskim tehnikama temeljenim na istosmjernoj (engl. *direct current techniques*, DC) ili izmjeničnoj struji (engl. *alternating current techniques*, AC) (37). Kod DC tehnika upotrebljavaju se polarizacijske metode mjerenja (potenciostatička i galvanostatička polarizacija). Iz snimljene polarizacijske krivulje

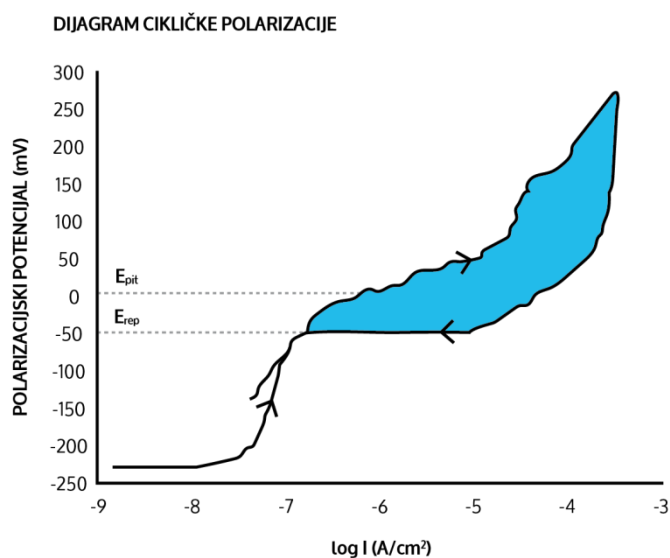
određuju se korozijski parametri i kvantificira korozijsko ponašanje materijala u određenom mediju.

Ciklička polarizacija kao mjerna metoda provodi se u troelektrodnom sustavu koji sadrži radnu elektrodu (ispitivani materijal), referentnu elektrodu poznatog potencijala (najčešće zasićena kalomel elektroda) i inertnu protuelektrodu pomoću koje se zatvara strujni krug, tj omogućuje protjecanje struje preko radne elektrode. Spajanjem na potenciostat kontrolira se potencijal radne elektrode i mjeri se rezultirajuća struja. Potencijal radne elektrode mijenja se od negativnijih (katodni dio krivulje) prema pozitivnijim potencijalima (anodni dio krivulje) sve do porasta jakosti struje koji uzrokuje pucanje pasivnog sloja (potencijal pucanja pasivnog sloja) uslijed čega dolazi do pojave lokaliziranih oštećenja površine i izraženog otpuštanja iona. Metodom Tafelovih pravaca izračunavaju su vrijednosti gustoće korozijske struje koja je mjera brzine opće korozije te sklonost jamičastoj koroziji (Slika 4). Tafelova je metoda grafička metoda određivanja korozijskih parametara. Dobiveni rezultati anodne i katodne polarizacije prikazuju se u polulogaritamskom obliku. Na osi je x logaritam gustoće struje, a na osi y potencijal. Ekstrapoliranjem linearnih dijelova anodnih i katodnih pravaca dobiva se njihovo sjecište koje određuje vrijednost korozijskog potencijala E_{kor} i gustoću korozijske struje j_{kor} . Nagib anodnog i katodnog pravca također se koriste u proračunu.



Slika 4. Tafelova ekstrapolacija (izradio Logobox d.o.o)

Cikličkoj su polarizaciji osnova Tafelovi dijagrami s tim da se potencijal pomiče i u suprotnom smjeru (42). Nakon što je dosegnut potencijal pucanja pasivnog filma (E_{pit}), polarizacija se nastavlja u suprotnom smjeru (Slika 5). Materijal koji pokazuje veće vrijednosti potencijala pucanja pasivnog filma te veće vrijednosti repasivacijskog potencijala, pokazuje veću otpornost pasivnog sloja (33). Histerezu na cikličkoj polarizacijskoj krivulji predstavlja razlika između potencijala pucanja pasivnog filma i potencijala repasivacije. Potencijal kod kojeg se petlja histereze zatvara naziva se repasivacijski potencijal (E_{rep}). Ukoliko su potencijali jednaki po vrijednosti vjerojatnost je nastanka jamičaste korozije mala. Negativne vrijednosti E_{rep} upućuju na mogućnost pojave jamica.



Slika 5. Dijagram cikličke polarizacije (izradio Logobox d.o.o)

Elektrokemijska impedancijska spektroskopija (EIS) temelji se na odzivu strujnog kruga na izmjenični napon ili struju. Impedancija je složeni otpor sastavljen od induktivnog i kapacitivnog otora koji ovise o frekvenciji. EIS tehnike koriste vrlo male pobudne amplitude, često u rasponu od 5 do 10 mV od vrha do vrha vala. Pobudni val takve amplitude uzrokuje minimalno narušavanje ispitivanog elektrokemijskog sustava, umanjujući pogreške uzrokovane mjernom tehnikom. EIS-om se dobiva podatak o polarizacijskom otporu kao

izravnoj mjeri otpornosti na koroziju te vrijednost korozijske struje. Također, moguće je dobiti i podatke o svojstvima, kapacitetu i stabilnosti zaštitnog sloja (33).

Kod DC tehnika otpor je definiran Ohmovim zakonom: (37)

$$E = I \times R$$

pri čemu je E potencijal, I jakost struje i R otpor. Kod AC tehnika frekvencija je različita od nule pa je analogna jednadžba:

$$E = I \times Z$$

u kojoj je Z Faradayeva impedancija ekvivalentna otporu kod DC. Dakle, kod mjerenja izmjeničnom strujom određuje se impedancija Z koja uz omski otpor (realna komponenta impedancije Z_{re}) sadži i kapacitivne i induktivne otpore (imaginarna komponenta impedancije Z_{im}).

Podaci dobiveni impedancijom mogu se prikazati:

- a) Nyquistovim prikazom koji predstavlja ovisnost Z_{re} u odnosu na Z_{im} za svaku pobudnu frekvenciju
- b) Bodeovim dijagramom koji pokazuje ovisnost logaritma apsolutne vrijednosti impedancije $|Z|$ i faznog kuta o logaritmu frekvencije f (37)

Osim opisanim elektrokemjskim metodama intenzitet korozije može se kvantificirati i mjerenjem otpuštenih iona nakon izlaganja korozivnom mediju. Masena spektrometrija i optička emisijska spektrometrija induktivno spregnutom plazmom (ICP-MS i ICP-OES) precizne su analitičke kemijske metode za određivanje koncentracije iona pojedinih elemenata u nekoj otopini. Danas su prisutne u svim znanstvenim istraživanjima gdje je potrebno odrediti kvalitativni elementarni kemijski sastav te kvantificirati koncentraciju pojedinih iona i na pikogramskoj razini pa tako i u okviru biokorozivskih ispitivanja dentalnih legura (5,43).

1.5. Biološke posljedice korozije

Usna šupljina je dinamičan medij izložen neprestanim promjenama sastava, temperature, pH vrijednosti i količine sline (44). Materijali primijenjeni u usnoj šupljini trebali bi u potpunosti biti sigurni i biokompatibilni tijekom dužeg vremenskog razdoblja. Niz čimbenika poput prehrambenih i higijenskih navika, općeg zdravstvenog stanja te primjena različitih protektivnih preparata mogu u određenim okolnostima narušiti stabilnost primijenjenih materijala.

Dobra mehanička svojstva, odlična biokompatibilnost i korozijska stabilnost, razlog su svakodnevne primjene žičanih lukova nikal-titanske (NiTi) legure u ortodontskoj terapiji. Korozijska otpornost temelji se na činjenici da se stvara zaštitni pasivni film na površini materijala koji se sastoji od oksida TiO_2 s malim udjelom NiO čime se stvara kemijska i fizička barijera od vanjskih utjecaja (45). Unatoč postojanju protektivnog sloja, metalni ioni mogu biti otpušteni u oralnu sredinu procesom korozije (5, 41, 46). Niske pH vrijednosti, kakve se nalaze u bakterijskom biofilmu zrelog dentalnog plaka koji oblaže žicu u slotovima bravica, ubrzavaju korozijske procese (24). To je potvrđeno i u prethodnim istraživanjima legura koje se primjenjuju u ortodontiji, što za posljedicu ima otapanje zaštitnog sloja (47-49). Posljedično, povećane koncentracije iona, prvenstveno nikla u slini te dugotrajna ekspozicijom mogu povećati rizik od senzibilizacije pacijenata (50).

Nikal je jedan od najjačih kontaktnih alergena. Alergija na nikal javlja se do 28.5% populacije i ne može se više smatrati niskim potencijalnim rizikom (49, 50). Jedan je od najčešće korištenih metala u predmetima za svakodnevnu uporabu. Preosjetljivost je učestalija kod žena, a pretpostavka je da je razlog tomu kronična izloženost niklu preko nakita i kozmetike.

Dokazano je da se razina nikla u gingivalnoj tekućini i slini značajno povećava nakon postavljanja fiksne ortodontske naprave (51). Također utvrđena je i povećana akumulacija nikla u uzorcima plaka u odnosu na netretirane pacijente (52).

Određene kliničke manifestacije kod ortodontskih pacijenata poput gingivne hiperplazije, osjećaj pečenja, promijenjenog okusa ili metalni okus, angularnog heilitis, eritema multiforme i parodontitisa mogu biti povezane s upalnim odgovorom induciranim korozijom ortodontske naprave i otpuštanja nikla (53, 36).

Prema Nielsenu (54) dnevni unos nikla prehranom i vodom iznosi oko 260 μg , dok je prag povezan s alergijskim reakcijama između 300 i 600 μg nikla na dan. U literaturi se nalazi i podatak o većem dnevnom unosu nikla kao granici koja može izazvati alergijsku reakciju, a iznosi 1,2 – 2,5 mg Ni/dan (55). Otpuštanje iona nikla proučavano je u različitim uvjetima.

Park and Sherarer utvrdili su *in vitro* dnevni iznos otpuštenog nikla kod pacijenata s potpunom fiksnom napravom koji je iznosio 40 µg / dan (56).

Imunološki je odgovor na nikal je tip IV preosjetljivosti, tj. stanično posredovana kasna preosjetljivost koja se manifestira kontaktnim alergijskim reakcijama (stomatitis ili gingivitis). Pri prvom unosu nikla u organizam nastaje prva faza senzibilizacije kod koje ne dolazi do imunološkog odgovora. Druga faza razvija se tijekom nekoliko dana pa sve do tri tjedna u obliku mukozitisa ili dermatitisa.

Zadnjih godina reportirane su i alergijske reakcije na titan iako se za njega prethodno smatralo da je biokompatibilan. Dokazane su kod pacijenata sa srčanim stimulatorima, endoprotezama kuka, stentovima i dentalnim implantatima (57 – 59). Pojava alergije na titan mogla bi biti odgovorna na sukcesivne neobjašnjene slučajeve neuspjeha i odbacivanja dentalnih implantata u nekih pacijenata jer je rizik od alergije na titan povećan u pacijenata koji su alergični i na ostale metale (60). Alergijska reakcija koja se javlja tip je I ili IV.

U dentalnoj medicini titan se najviše koristi u dentalnoj implantologiji za izradu oseointegrirajućih implantata, u protetici za izradu protetskih konstrukcija, a u ortodonciji za miniimplantate, kao privremene sidrišne jedinice te u kombinaciji s niklom za izradu nikal-titanskih lukova.

U fiziološkim uvjetima ljudskog organizma titanski materijali spontano formiraju oksidni pasivni sloj na površini koji je odgovoran za izvrsnu otpornost takvih materijala na koroziju. Zaštitni oksidni sloj kemijski je otporan u fiziološkoj sredini i spontano se obnavlja (repassivizacija). U određenim uvjetima poput: uvjetima velikog trošenja (deplecije) kisika i niske pH vrijednosti, u prisutnosti “agresivnih” halogenih aniona, fluora i klora, prevelike mehaničke sile na implantat ili bliskog kontakta implantata s drugim metalom, može doći do oštećenja zaštitnog pasivnog sloja i pojave korozije i upalnog procesa okolnog tkiva (33).

Abraham i sur. u svom istraživanju dokazali su povećanu prisutnost iona titana u slini i gingivnoj tekućini kod pacijenata s titanskim dentalnim implantatima (61). Wennerberg i sur. dokazali su koncentraciju titana 100 – 300 ppm u tkivu koje okružuje implantate kao i u regionalnim limfnim čvorovima i plućnom tkivu (62). Prvi slučaj odgođene reakcije preosjetljivosti na titan, s lokalnom granulomatoznom reakcijom, opisan je kod pacijenta sa srčanim stimulatorom (63).

Iako prosječna dnevna doza otpuštenih niklovih iona iz NiTi lukova obično ne prelazi limite propisane standardnim propisima, kod nekih tipova žičanih lukova dolazi do pretjeranog

otpuštanja niklovih iona tijekom prva tri dana, što može pogodovati senzibilizaciji (46). Ipak niže doze iona nikla koje se otpuste nakon trećeg dana izlaganja slini mogu uzrokovati citotoksične efekte ili gingivnu hiperplaziju (36). Prethodno je istraživanje pokazalo da ortodontske naprave induciraju oksidacijski stres kao tip genotoksičnog utjecaja u živim stanicama (64).

2. SVRHA ISTRAŽIVANJA

Cilj je ovog rada bio ispitati utjecaj oralnih antiseptika na svojstva NiTi slitine.

Primarni je cilj bio ispitati u kojoj mjeri mogu uzrokovati oštećenja u obliku pojave opće i lokalizirane korozije te koliki je utjecaj na radna svojstva ortodontskih žičanih lukova. Također je svrha bila odrediti intenzitet korozije mjerenjem otpuštanja iona Ni i Ti te utjecaj iona na staničnoj razini.

Sekundarni je cilj bio procijeniti u kojoj mjeri se oblaganjem površine može modificirati korozija uzrokovana antisepticima.

Pretpostavka je bila da antiseptici uzrokuju dodatnu koroziju NiTi slitina, povrh utjecaja sline, uglavnom u obliku lokalizirane korozije. Očekivan je značajan utjecaj na radna svojstva žičanih lukova.

Pogoršanje fleksibilnosti i rezilijencije očekuje se više u rasterećenju nego u opterećenju. Od aniseptika alkoholne baze očekuje se najveći učinak na brzinu korozije, a najmanji od antiseptika baziranog na hijaluronskoj kiselini.

Očekuje se da količina otpuštenih iona podupire nalaze elektrokorozijske. Otpušteni ioni vjerojatno izazivaju oksidacijski stres u stanicama. Intenzivniji biološki učinak vjerojatno je veći u nikla nego titana. Očekuje se poboljšanje korozijske stabilnosti nakon nitriranja površine, a smanjenje nakon rodiranja.

3. MATERIJALI I POSTUPCI

3.1. Materijal

3.1.1. Nikal-titanski lukovi

Ispitivano je ponašanje tri tipa nikal-titanskih ortodontskih žičanih lukova (sastava Ni=50,4%; Ti=49,6%) neobložene i obložene površine koji služe u ortodontskoj terapiji fiksnim napravama. Sve su žice dimenzija 0,508 × 0,508 mm (0,020 x 0,020") (Dentsply GAC Int, New York, SAD):

1. BioForce Sentalloy®, neobložene površine
2. Bioforce Sentalloy IonGuard®, površine obložene dušikom
3. Bioforce Sentalloy High Aesthetic®, površine prevučene rodijem



Slika 6. Uzorci žičanih lukova

3.1.2. Antiseptičke otopine

Kao korozivni mediji korištena je Tani-Zucchi umjetna slina te antiseptici Listerine (Johnson & Johnson, Maidenhead, Velika Britanija), Curasept ADS® 205 (Curadet AG, Kriens, Švicarska) i Gengigel (Rontis, Zug, Švicarska) čiji su sastavi prikazani u Tablici 1.

Za izračun koncentracije fluorovodične kiseline (HF) u antisepticima korišteni su podaci o pH i koncentraciji fluorida prema formuli: $[HF] = \frac{[F^-]}{10^{pH-pK_a}}$, gdje je $[F^-]$ koncentracija fluorida, a pK_a konstanta disocijacije fluorovodične kiseline 3,17 (65).



Slika 7. Oralni antiseptici primijenjeni u ispitivanju

3.1.3. Umjetna slina

U svim ispitivanjima korištena je Tani-Zucchi umjetna slina pH 4,8. Navedena vrijednost pH sline odgovara pH vrijednosti sline i plaka starog jedan i dva dana i služi kao simulacija pacijenata s lošom oralnom higijenom (24, 66).

Za regulaciju pH vrijednosti umjetne sline korištena je mliječna kiselina.

Tablica 1. Kemijski sastav ispitivanih antiseptika i umjetne sline

Medij	Sastav
umjetna slina	1,5 g/L KCl; 1,5 g/L NaHCO ₃ ; 0,5 g/l NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O; 0,5 g/L KSCN; 0,9 g/L mliječne kiseline, pH 4,8.
Listerine (Johnson & Johnson, Maidenhead, Velika Britanija)	etanol (96%), natrijev fluorid (0,02%; 200 ppm), sorbitol, benzoatna kiselina, eukaliptol, mentol, metilsilicilat, natrijev benzoate, timol, cinkov klorid, pročišćena voda, pH 4,4, HF=11,78 ppm
Curasept ADS® 205 (Curadet AG, Kriens, Švicarska)	klorheksidin 0,05%, natrijev fluorid (0,05%; 500 ppm), pročišćena voda, ksilitol, propilen glikol, Peg-40 hidrogenirano ricinusovo ulje, L-askorbinska kiselina, natrijev benzoat, natrijev, metabisulfid, natrijev citrat, pH 5,7, HF=1,48 ppm
Gengigel (Rontis, Zug, Švicarska)	hijaluronska kiselina (0,025%), natrijev fluorid (0,02%; 200 ppm), ksilitol, pomoćne tvari, pH 6,2, HF=0,19 ppm

3.1.4. Stanične kulture

U istraživanju su korištene kultura epitela humanog karcinoma skvamoznih stanica jezika - stanična linija CAL 27 (ATCC[®] CRL-2095[™]), hepatocelularnog karcinoma Hep G2 (ATCC[®] HB-8065[™]) i adenokarcinoma debelog crijeva Caco-2 (ATCC[®] HTB-37[™]). Sve stanične linije proizvodi su tvrtke ATCC (Manassas, SAD).

HepG2 stanična linija je adherentna, epitelna stanična linija dobivena iz jetre hepatocelularnog karcinoma 15-godišnjeg američkog bijelca. Primjenjuje se kao *in vitro* model hepatocita i služi u ispitivanjima toksičnosti spojeva. Jetra je ključni metabolički organ te se Hep G2 stanice koriste za proučavanje metabolizma brojnih tvari.

Caco-2 stanice su epitelne stanice kolorektalnog adenokarcinoma dobivene od 72-godišnjeg američkog bijelca. Spontano diferenciraju u kulturi i stvaraju monosloj stanica koje su morfološki i funkcionalno slične zreloom enterocitu. Vrijeme udvostručavanja iznosi 62 sata.

Cal 27 je stanična linija dobivena iz tumorske lezije jezika 56-godišnjeg američkog bijelca. To su epitelne stanice poligonalnog oblika s granuliranom citoplazmom i aneuploidnim brojem kromosoma. U staničnoj kulturi rastu priljepljene za podlogu i vrijeme udvostručavanja iznosi 35 sati.

Kultivacija staničnih linija i analiza biološkog učinka iona nikla i titana provedena je u Laboratoriju za biologiju i genetiku mikroorganizama Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

3.2. Postupci

3.2.1. Mehanička ispitivanja

Priprema uzoraka

Po svakom tipu žice uzeto je šest uzoraka. Za izračun veličine uzorka za analizu mehaničkih svojstava uzeti su podaci od prethodnih istraživanja (10). Uz pretpostavku da će između dva eksperimentalna uvjeta razlika u modulu elastičnosti biti 7 te standardnu devijaciju od 2,1 u jednom i 4,5 u drugom uvjetu uz snagu 80% i razinu značajnosti $\alpha=0,05$ dobije se minimalna veličina od po pet uzoraka po grupi. Kalkulacija je rađena u statističkom softveru MedCalc 14.8.1 (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgija).

Da bi se simulirala situacija u usnoj šupljini žice su bile uronjene u umjetnu slinu ukupno 28 dana. Uzorci žica dužine 10 cm, površine 2 cm², potopljani su u 10 mL umjetne sline pH 4,8 i inkubirani u vodenoj kupelji na 37°C. Uzorci su prije početnog eksponiranja umjetnoj slini te trećega, sedmoga, četrnaestoga, dvadeset i prvoga i dvadeset i osmoga dana vađeni i potapani na vrijeme od 5 minuta u antiseptička sredstva iza čega su ispirani s dH₂O te stavljeni u novu umjetnu slinu da bi se spriječilo zasićenje otopine otpuštenim ionima (48). Vrijeme od 5 minuta izračunato je kao kumulativna ekspozicija od prosječno 20 sekundi aplikacije oralnog antiseptika dvaput dnevno tijekom razdoblja od mjesec dana. Češća ekspozicija u prvih tjedan dana korištena je kako bi simulirala intenzivniju primjenu s ciljem redukcije broja bakterija nakon čega slijedi terapija održavanja sljedećih tri tjedna.

Apsolutnu kontrolu činili su lukovi koji nisu bili izloženi nikakvom mediju, negativnu kontrolu činili su lukovi potopljani isključivo u umjetnu slinu, bez tretiranja oralnim antisepticima, a u intervalima koji su prethodno navedeni.

Postupak testiranja

Testiranje mehaničkih svojstava lukova, u izvornom stanju i nakon ekspozicije eksperimentalnim medijima, baziralo se na Američkim nacionalnim standardima i Standardima Američke dentalne udruge za ortodontske žičane lukove (67,68).

Šest uzoraka svakog luka, dužine 2,5 cm (odrezani s ravnog kraja žičanog luka), korišteni su za test savijanja u tri točke na univerzalnom stroju za testiranje (Model 1125/5500, Instron, Norwood, SAD; slika 8). Potpornji uređaja Texture Analyser TA.HD.plus (Stable Micro Systems,

Godalming, Velika Britanija) namješteni su na 12 mm i opterećeni masom 5 kg, tvornički kalibrirano).

Tijekom mjerenja temperatura u termalnoj komori postavljena je na 37°C pomoću grijača i automatski regulirana termalnim sensorom. Svaki uzorak opterećen je silom od 5 kg do defleksije od 3,1 mm i potom rasterećen do nula defleksije uz brzinu glave od 0,0167 mm/s. Svakih 5 ms bilježena je sila u njutnima (N) i otklon u milimetrima (mm) u opterećenju i rasterećenju svakog uzorka pomoću softvera Texture Exponent (Stable Micro System, Godalming, Velika Britanija). Iz tih podataka generirane su krivulje sila-otklon iz kojih su očitane sile na udaljenosti 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5 i 3 mm za vrijeme opterećenja i rasterećenja. Iz krivulje histereze očitani su nagib tangente krivulje (m) te opterećenje u opaženoj točki popuštanja (P). Iz dobivenih vrijednosti izračunati su modul elastičnosti (E) te točka popuštanja (YS) u opterećenju i rasterećenju

Izračun parametara

Za izračunavanje modula elastičnosti i točke popuštanja korištena je inženjerska teorija grede (69,70):

$$E = L^3 m / 4bd^3 \text{ (GPa)}$$

pri čemu je:

L= udaljenost između potpornja uređaja (mm)

b= širina uzorka (mm)

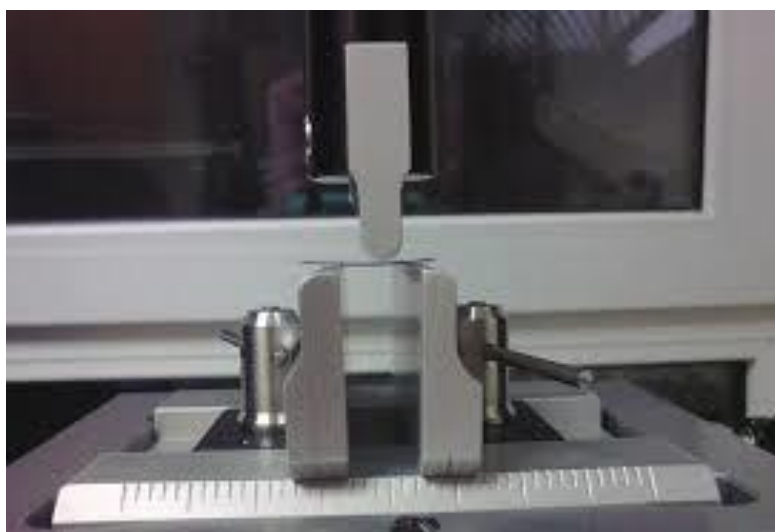
d= visina uzorka (mm)

m= nagib tangente krivulje dobivene mjerenjem i očitane iz dijagrama (N/mm²)

$$YS = 3PL / 2bd^2 \text{ (MPa)}$$

P= opterećenje u opaženoj točki popuštanja (N)

Iz vrijednosti E i YS izračunati su omjer elastičnog vraćanja kao mjera savitljivosti, odnosno fleksibilnost (YS / E) i modulus rezilijencije kao mjera popustljivosti, odnosno rezilijencije (YS² / 2E).



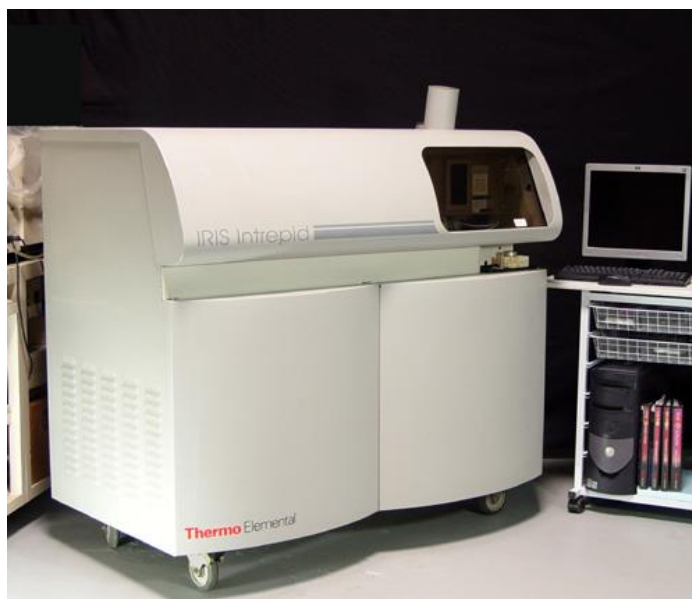
Slika 8. Univerzalni stroj Texture Analyser TA.HD.plus (Stable Micro Systems, Godalming, Velika Britanija) s termalnom komorom na ispitnom dijelu uređaja

3.2.2. Određivanje iona nikla i titana

Otopine umjetne sline s korozivnim produktima nakon eksponiranja žica antisepticima, dobivene u prethodno opisanom postupku, korištene su za spektroskopsku analizu koncentracija iona Ni i Ti. Uzorci su skupljeni trećeg, sedmog, četrnaestog, dvadeset prvog i dvadeset osmog dana. Stabilizacija iona prije mjerenja postignuta je dodatkom jedne kapljice ultra čiste nitratne kiseline (Kemika, Zagreb, Hrvatska).

Koncentracija otpuštenih iona određena je u skladu s parametrima opisanim u prethodnim istraživanjima optičkom emisijskom spektroskopijom induktivno spregnutom plazmom na uređaju Thermo Elemental IRIS Intrepid II XSP Duo (Thermo Electron Corporation, Austin, SAD) (46, Slika 9).

Valna dužina za očitavanje koncentracije Ni bila je 231,6 nm, a za Ti 334,9 nm uz graničnik detekcije ispod 2 i 5 $\mu\text{g/L}$, za nikal odnosno titan. Rezultati su izraženi kao količina iona u $\mu\text{g/cm}^2$ žice. Umjetna slina u svakom vremenskom intervalu korištena je kao negativna kontrola.



Slika 9. Uređaj Thermo Elemental IRIS Intrepid II XSP Duo za mjerenje koncentracije iona optičkom emisijskom spektroskopijom induktivno spregnutom plazmom

3.2.3. Elektrokemijska ispitivanja

Korozijska stabilnost NiTi žica određena je dvjema elektrokemijskim metodama: cikličkom polarizacijom i elektrokemijskom impedancijskom spektroskopijom (EIS). Određivanje pH antiseptika provedeno je na temperaturi od 37°C primjenom pH-metra MP 220 (Mettler Toledo Int., Greifensee, Switzerland).

Ciklička polarizacija

Za testiranje su korišteni su uzorci NiTi žičanih lukova dužine 50 mm. Uzorci su pripremljeni na način da je distalni ravni kraj žice izoliran u dužini od 30 mm i ukupne površine od 60,96 mm² pomoću izolacijskog laka duljine 10 mm, ostavljajući mezijalnih 10 mm luka slobodnog za spajanje na potenciostat. Ispitivanja su provedena u triplikatu u mješavini 75 mL umjetne sline i 75 mL antiseptika na temperaturi 37±1°C.

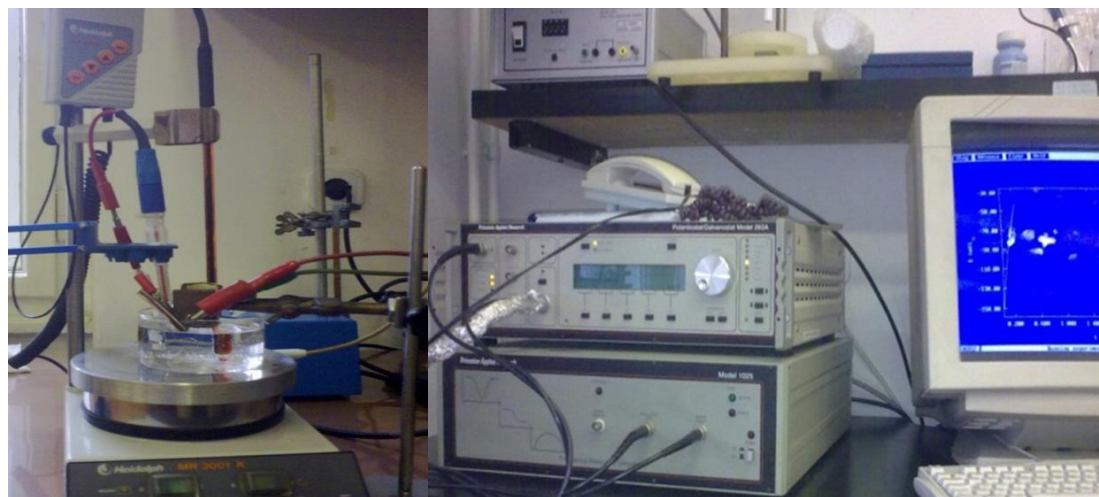
Mjerenja su provedena troelektrodnom ćelijom spojenom na potenciostat PAR 263A i analizator frekvencije PAR 1025 (Princeton Applied Research, Oak Ridge, SAD; Slika 10). Radna elektroda bila je ispitivana žica, referentna elektroda bila je zasićena kalomel elektroda, a protuelektroda platinska žica.

Prvo je tijekom dva sata praćena stabilizacija korozijskog potencijala. Iza toga je ciklička polarizacija provedena od početnog potencijala od -300 mV od potencijala otvorenog kruga do potencijala od 700 mV (u odnosu na referentnu zasićenu kalomel elektrodu), odnosno potencijal kod kojeg je gustoća struje dosegala do 100 μAcm⁻². Polarizacija je potom nastavljena u katodnom smjeru do potencijala otvorenog kruga ili potencijala repasivacije. Brzina promjene potencijala iznosila je 1 mVs⁻¹. Iz tih mjerenja, metodom Tafelovih pravaca, dobiveni su parametri: gustoća korozijske struje (j_{corr}), koja je direktno proporcionalna stopi korozije lukova, korozijski potencijal (E_{corr}), nagib anodnog i katodnog pravca, potencijal popuštanja pasivnog filma (E_{bd}) i repasivacijski potencijal (E_{rp}) iz kojih se može predvidjeti otpornost na lokaliziranu koroziju. Svi ti parametri omogućili su kvantificiranje intenziteta korozije NiTi slitine u slini (samostalno ili s dodanim antisepticima) te objašnjavanje mehanizama kojim različiti antiseptici mogu mijenjati svojstva zaštitnog oksidnog sloja koji je odgovoran za izvrsnu korozijsku stabilnost materijala.

Kontrolni uzorak bile su žice izložene djelovanju umjetne sline čime je uspoređeno ima li antiseptik dodatni utjecaj površ sline.

Elektrokemijska impedancijska spektroskopija

EIS je provedena na potencijalu otvorenog kruga uz amplitudu pobude od 10 mV te u rasponu frekvencija od 100kHz do 10 mHz na ukupno 36 točaka. Kod svih mjerenja korištena je ista aparatura kao i kod cikličke polarizacije. Ispitivanja su provedena nakon 2 sata izlaganja žice korozivnom mediju (sline ili slina+antiseptik) kako bi se uspostavila stabilna vrijednost potencijala otvorenog kruga.



Slika 10. Aparatura za elektrokemijska mjerenja korozije (potenciostat PAR263A i analizator frekvencija PAR FRD 1025, Princeton Applied Research, Oak Ridge, SAD)

3.2.4. Ispitivanje biološkog učinka otpuštenih iona Ni i Ti

Za ispitivanje biološkog učinka otpuštenih iona Ni i Ti korištena je neobložena NiTi žice BioForce Sentalloy® dimenzija $0,508 \times 0,508$ mm (0,020 x 0,020") (Dentsplay GAC Int, New York, SAD), dužine 10 cm i površine 2 cm². U komori za sterilni rad otpipetirano je 40 mL umjetne sline i preneseno u sterilnu posudu. Kako bi se simulirali uvjeti u usnoj šupljini za vrijeme nošenja fiksne ortodontske naprave, u slinu su potopljena po dva NiTi luka, prethodno autoklavirana na temperaturi 134°C 30 minuta (Lina class B, W&H, Austrija). Slina je pripravljena po prethodno navedenoj recepturi i pH podešen na 4,8. Za svaki vremenski interval pripremljeno je po šest uzoraka. Uzorci su inkubirani u vodenoj kupelji na temperaturi od 37°C na razdoblje od tri, sedam i četrnaest dana. Nakon završenog vremena potapanja, žičani lukovi su izvađeni sterilnom pincetom. Uzorci sline iz istog vremenskog intervala spojeni su u novu sterilnu posudu te je dobiven ukupan volumen uzorka od 240 mL za svaki period potapanja.

Od dobivenog volumena, u svrhu određivanja koncentracije otpuštenih iona Ni i Ti, otpipetirano je 20 mL uzorka u koji je dodano dvije kapi ultra čiste nitratne kiseline (Kemika, Zagreb, Hrvatska) radi stabilizacije iona. Koncentracija iona nikla i titana određena je pomoću masenog spektrometra induktivno spregnutom plazmom na uređaju 7800 ICP-MS (Agilent, Santa Clara, SAD). Granice detekcije za Ti i Ni su 0,1 µg/L. Mase na kojima su mjereni elementi su Ti 47 i Ni 60.

Uzorci volumena 220 mL koncentrirani su 50x na rotacijskom vakuum uparivaču (RV 10, IKA, Staufen, Njemačka). Dobiveni volumen svakog uzorka nakon koncentriranja iznosio je 4,4 mL i koristio se za pripremu ispitivanih koncentracija. Uzorci su propuhani inertnim plinom dušikom te su do daljnjih provođenja analiza čuvani na -60°C.

Istraživale su se koncentracije od 5,0x, 1,0x, 0,5x i 0,1x. Sva razrjeđenja pripremana su iz ishodišne otopine uzoraka sline koncentriranih 50x. Odgovarajuća radna koncentracija dobivena je razrjeđivanjem ishodišne otopine pomoću uzgojnog medija RPMI-1640 (Sigma-Aldrich- Chemie, Steinheim, Njemačka). Koncentracija 1,0x predstavljala je ukupnu koncentraciju iona nikla i titana koji su prisutni u umjetnoj slini nakon uranjanja lukova u umjetnu slinu pri temperaturi od 37°C i trajanju od tri, sedam i četrnaest dana. Svaka koncentracija rađena je u četiri replike, svaki eksperiment ponovljen je 2x.

Kako bi utvrdili postoji li toksičan učinak samog nikla ili samog titana na stanične kulture i u kojem rasponu koncentracija, iz soli NiCl₂ (Acros, New Jersey, SAD) i TiO₂ (Acros, New Jersey, SAD) pripremljene su koncentracije navedenih iona od 5,0x, 1,0x, 0,5x i 0,1x te su njima tretirane stanice u vremenskom periodu od 24, 48 i 72 sata. Za pripremu radne koncentracije kao otapalo koristio se PBS- fosfatni pufer, pH=7,2-7,4. Koncentracija 1,0x predstavljala je izmjerenu koncentraciju iona nikla, odnosno titana koji su prisutni u umjetnoj slini nakon uranjanja lukova u umjetnu slinu pri temperaturi od 37°C i trajanju od tri, sedam i četrnaest dana. Svaka koncentracija rađena je u dvije replike uz ponavljanje eksperimenta 2x. Negativna kontrola u svim eksperimentima bila je medij za uzgoj stanica i stanice.

Kultivacija staničnih linije u monosloju

Zamrznute stanične kulture CAL 27, Hep G2 i Caco-2 (ATCC, Manassas, SAD) otopljene su s 10% glicerola u vodenoj kupelji na 37°C. Centrifugiranjem se (100 g / 5 min) uklonio supernatant koji je sadržavao ostatke medija i krioprotektivnog sredstva. Na dobiveni talog dodan je 1,0 mL svježeg medija zagrijanog na 37°C. Stanice su se resuspendirale i ponovno

centrifugirale (1000 rpm / 5 min), a potom nasadile u Petrijevu zdjelicu promjera 5 cm (Corning, Amsterdam, Nizozemska) te se na taj način vršila propagacija stanica. Nakon 24 sata stanice su nasadene u T- boce volumena 75 mL (Corning, Amsterdam, Nizozemska) i uzgojene do subkonfluentnog stanja, kada su se mogle koristiti za eksperimentalni rad. Stanice su uzgojene u Dulbeco modificiranom Eaglovom mediju DMEM (Gibco, Carlsbad, Njemačka) obogaćenim s 10% fetalnog goveđeg seruma FBS (Gibco, Carlsbad, Njemačka), glukoze, piridoksina, otopine 1% penicilina/ streptomcina pri 37°C u vlažnoj atmosferi uz 5% CO₂. Prilikom presađivanja stanica korištena je 0,25%-tna otopina tripsina (Gibco, Carlsbad, Njemačka). Sve su stanice rasle u monosloju.

Priprema stanične suspenzije iz subkonfluentnog monosloja

Sa stanica u T-bocama pipetom se uklonio medij i stanice su isprane s 0,25% tripsinom kako bi se uklonile tvari iz medija koje bi mogle inhibirati tripsin. Na stanice se dodala minimalna količina otopine 0,25% tripsina, potrebna da pokrije dno T-boce. U trenutku odljepljivanja stanice su poprimile okrugli oblik i došlo je do njihova kretanja u smjeru kretanja otopine tripsina. Kako bi se zaustavio proteolitički učinak tripsina na stanice se dodao medij obogaćen serumom. Stanice su izbrojane pomoću Bürker-Trükove komorice pod svjetlosnim mikroskopom.

Određivanje citotoksičnog učinka ispitivanih otopina na staničnim linijama

Neutral red metoda

Neutral red je kolorimetrijski test koji se temelji na ugradnji boje Neutral red (3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazin hidrokolid) u lizosome živih stanica nakon inkubacije s istraživanim tvarima. Ta slaba kationska boja prolazi kroz staničnu membranu pasivnom difuzijom i veže se intracelularno na dijelove lizosomskog matriksa. Oštećene ili mrtve stanice ne zadržavaju boju nakon ispiranja i procesa fiksacije. Iz živih se stanica ekstrahira pomoću otopine etanola nakon čega se mjeri absorbancija (71). Unos Neutral red boje ovisi o kapacitetu stanice da proizvodnjom ATP-a održava gradijent pH. U mrtvim stanicama ili pri smanjenom pH gradijentu, ne dolazi do zadržavanja boje unutar lizosoma. Količina vezane boje proporcionalna je broju živih stanica (72).

Ishodna boja otopine Neutral red (Sigma- Aldrich- Chemie, Steinheim, Njemačka) pripremljena je otapanjem boje u etanolu (Kemika, Zagreb, Hrvatska) do konačne koncentracije od 5 mg/mL te inkubirana 24 sata na 37°C. Nakon inkubacije pripremljena je

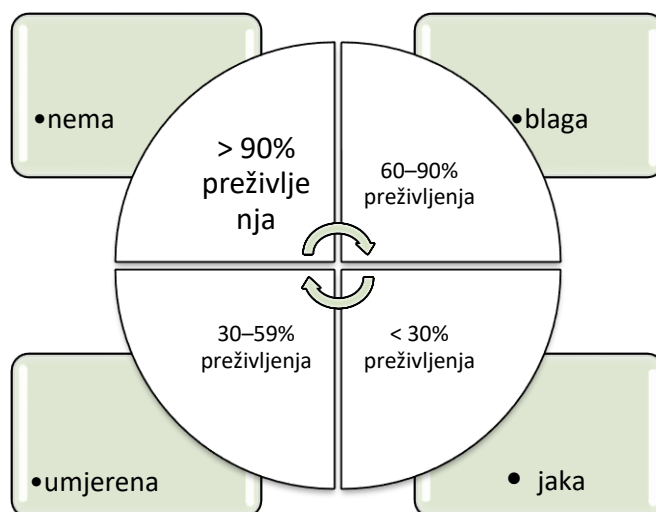
10% otopina razrjeđivanjem ishodne otopine u mediju za uzgoj stanica DMEM (Gibco, Carlsbad, Njemačka) te filtrirana kako bi se uklonili neotopljeni kristalici i osigurala sterilnost (71). Stanice su se nasadile na mikrotitarske ploče sa 96 jažica (Corning, New York, SAD) u koncentraciji od 10^5 st/mL. U svaku jažicu unijelo se 100 μ L stanične suspenzije. Stanice su inkubirane 24 sata pri temperaturi od 37°C. Nakon inkubacije iz jažica se uklonio medij, a stanice su tretirane sa 100 μ L sline koncentracija 5,0x, 1,0x, 0,5x i 0,1x tijekom 24, 48 i 72 sata te otopinama pripremljenih koncentracija iona nikla i titana od 5,0x, 1,0x, 0,5x i 0,1x u istim vremenskim intervalima.

Po završetku tretmana iz jažica su se uklonio medij, a stanice su dva puta isprane sa 100 μ L fosfatnog pufera PBS (Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim, Njemačka). Zatim su stanice tretirane sa 100 μ L 1%-tne svježe pripremljene otopine Neutral red-a te inkubirane 90 minuta na 37°C. Neutral red se uklonio i stanice su dva puta isprane sa 100 μ L PBS-a. Na stanice se zatim dodalo 100 μ L otopina za odbojavanje koja je sadržavala 50% etanola, 49% H₂O i 1% octene kisline (Kemika, Zagreb, Hrvatska)(72).

Intenzitet obojenja odredio se spektrofotometrijski pri 540 nm na uređaju 2000 Series Operators Spcetrophotometer (Cecil Instruments, Cambridge, Velika Britanija). Kao negativna kontrola služila je jažica u kojoj se nalazio medij za uzgoj i stanice.

$$\% \text{ preživljenja} = \frac{A_{540nm} \text{ istraživanog spoja}}{A_{540nm} \text{ kontrole}} \times 100$$

Za interpretaciju je korištena sljedeća klasifikacija prikazana na slici 11 (73):



Slika 11. Klasifikacija intenziteta citotoksično

Određivanje prooksidativnog učinka uzorka sline i iona metala na stanične linije

Slobodni radikali (engl. *reactive oxygen species*, ROS) nastali bazalnim metabolizmom određuju se 2',7'- diklorofluorescin-diacetat fluorimetrijskim testom. 2',7'- diklorofluorescin-diacetat (DCFH-DA) je neonski, nepolarni spoj koji ne fluorescira. Kemijska građa mu omogućuje laku difuziju kroz staničnu membranu gdje se u citosolu stanica djelovanjem intracelularnih enzima prevodi u 2',7'- diklorofluorescin (DCFH) koji isto tako nije fluorescentan. U prisutnosti ROS-a, DCFH oksidira u diklorofluorescein (DCF) koji je izrazito fluorescentan (74). Intenzitet fluorescencije je mjera slobodnih radikala u stanici. Fluorescencija se mjerila u fluorimetru pri valnim duljinama od 485±10 nm za ekscitaciju i 530±12,5 nm za emisiju. Metoda osjetljiva na fotooksidaciju, stoga se otopina DCFH-DA svježije pripravljala za eksperiment (74). Ishodišna otopina DCFH- DA (2 mM) dobivena je otapanjem 2 mg DCFH-DA (Sigma- Aldrich- Chemie, Steinheim, Njemačka), u 2 mL dimetil sulfoksida (DMSO) (Kemika, Zagreb, Hrvatska). Za tretiranje stanica iz ishodišne otopine pripravljena je otopina DCFH-DA, u 50 µL PBS-a (Gibco, Carlsbad, Njemačka), koja sadrži i goveđi serumski albumin (eng. *bovine serum albumin*, BSA) (1% ukupnog volumena) (Sigma- Aldrich- Chemie, Steinheim, Njemačka).

Stanice su nasadene na crne mikrotitarske ploče s 96 jažica u koncentraciji 10^5 st/mL⁻¹. U svaki se bunarić unijelo 100 µL stanične suspenzije. Sljedeći dan, nakon što su se stanice prihvale za podlogu i nakon što je počela dioba stanica, uklonio se medij sa stanica. Stanice su tretirane sa 100 µL istraživanih uzoraka sline koncentracija 5,0x, 1,0x, 0,5x i 0,1x tijekom 24, 48 i 72 sata (svaka koncentracija rađena je u četiri replike, svaki eksperiment ponovljen je 2x.) te otopinama soli pripremljenih koncentracijama iona nikla i titana od 5,0x, 1,0x, 0,5x i 1,0x u istim vremenskim intervalima. Svaka koncentracija rađena je u dvije replike uz ponavljanje eksperimenta 2x. Nakon 24, 48 i 72 sata inkubacije uklonili su se istraživani uzorci, a stanice su ispirane dva puta sa 100µL PBS-a i tretirane sa 100µL otopine DCFH-DA. Nakon inkubacije od 30 minuta na 37 °C, mjerio se intenzitet fluorescencije fluorimetrom pri valnoj duljini ekscitacije od 485 nm i valnoj duljini emisije 520 nm. Nakon mjerenja fluorescencije ponovno se provodio Neutral red test kako bi se utvrdio postotak preživljenja i kako bi se vrijednosti fluorescencije mogle normalizirati s obzirom na postotak preživjelih stanica u kojima su izmjerene reaktivne kisikove vrste. Rezultati su izraženi kao umnožak fluorescencije i kvocijenta preživljenja koji se računa u odnosu na negativnu kontrolu (75). Negativna kontrola u svim eksperimentima bila je medij za uzgoj stanica i stanice.

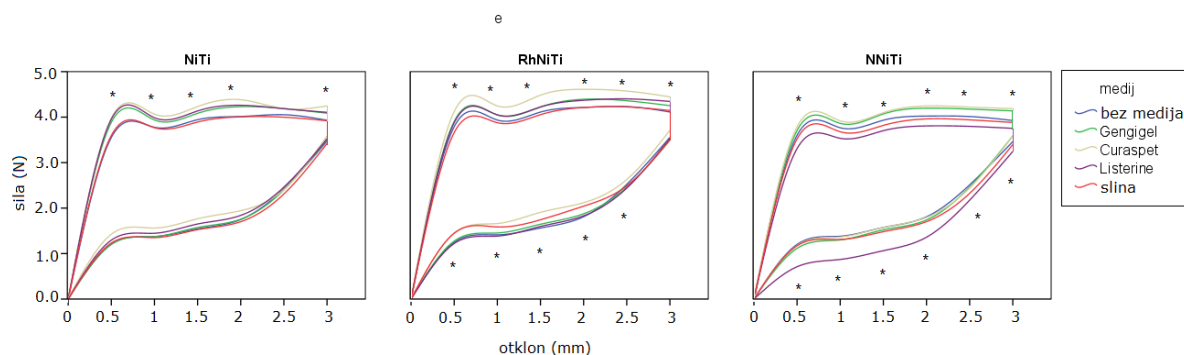
3.3. Statistička obrada podataka

Za usporedbu varijabli korozije, biološkog učinka, mehaničkih i fizičkih karakteristika između tipova materijala i eksperimentalnih stanja korištena je analiza varijance (ANOVA) sa Student-Newman-Keulsovim post-hoc testom. Analizirano je koji medij utječe najviše, a koji najmanje u usporedbi sa žicama koje nisu izložene (apsolutna kontrola) te onima izloženim umjetnoj slini (negativna kontrola). Snaga efekta, odnosno veličina razlike između grupa kvantificirana je pomoću parcijalnog η^2 . Za interpretaciju su korišteni sljedeći kriteriji: $\eta^2=0,02-0,13$ = mala snaga efekta, $0,13-0,26$ = umjerena i $>0,26$ velika snaga efekta. Načinjene su linearne korelacije i regresija da se provjeri je li koncentracija iona linearni prediktor citotoksičnosti te u kojoj mjeri. Sve analize načinjene su u komercijalnom softveru IBM SPSS 22 (IBM Corp, Armonk, SAD).

4. REZULTATI

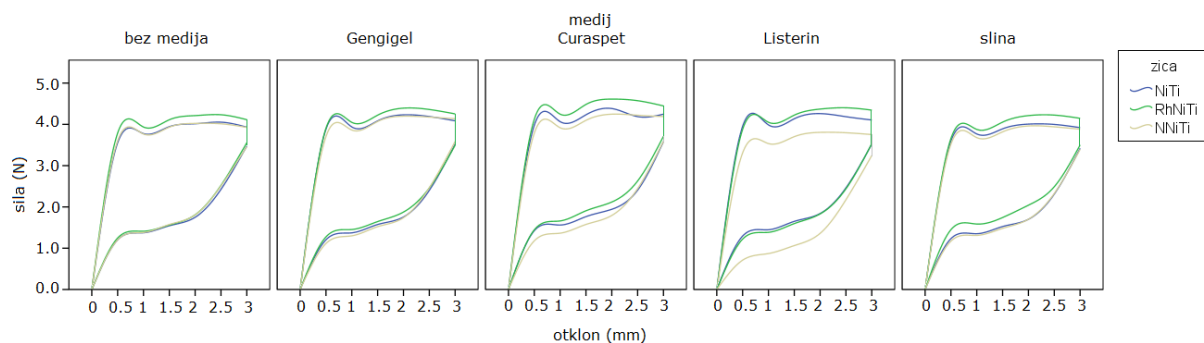
4.1. Mehanički učinak

Krivulje opterećenja i rasterećenja dobivene testom savijanja u tri točke prikazane su na slikama 12. i 13. Vidljivo je da u određenoj mjeri dolazi do mijenjanja sila u opterećenju i rasterećenju. Najvidljivije su promjene u rasterećenju kod nitrirane žice nakon ekspozicije antiseptiku Listerine kod kojeg se oslobađaju manje sile dok se nakon izlaganja Curaseptu oslobađaju nešto veće sile kod neobložene i rodirane žice.



Slika 12. Usporedba sila u opterećenju i rasterećenju između medija unutar istog tipa žice

Zvijezdicama su označene značajne razlike na udaljenosti od 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5 i 3 mm za vrijeme opterećenja i rasterećenja



Slika 13. Usporedba sila u opterećenju i rasterećenju između vrsta žica unutar istog medija

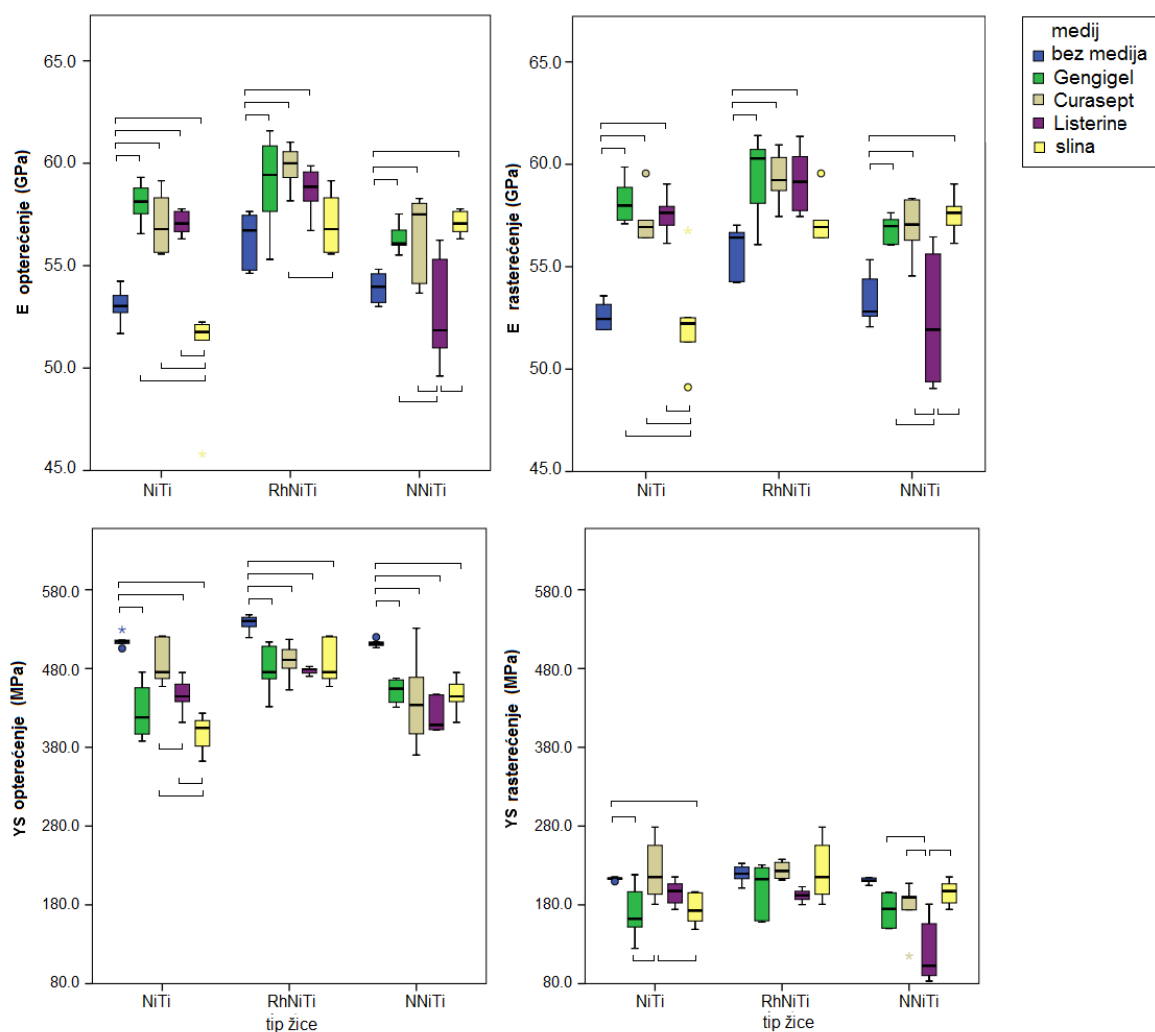
Provedene su dvofaktorske analize varijance s faktorima vrsta medija i vrsta žice. Analize na značajan efekt tipa žice, vrste medija te kombinacije žica x medij ($p < 0,05$) pokazale su značajniji utjecaj medija nego vrsta žice. Kombinacija vrste žice i medija upisuje 25–53% varijabiliteta mehaničkih svojstava. Jednofaktorske analize varijance načinjene su za svaku žicu zasebno kako bi se ispitalo koji medij najviše, a koji najmanje djeluje na žicu u odnosu

na nulto stanje i negativnu kontrolu (umjetna slina). Antiseptici su uglavnom povećavali E i snižavali YS u opterećenju i rasterećenju. Kod nitrirane žice Listerin je snizio oba parametra (E i YS), posebno u rasterećenju. Razlike u mehaničkim svojstvima žica prikazane su tablicama 2 i 3 te slikama 12-15.

Tablica 2. Usporedba Youngova modula elastičnosti (E) i točke popuštanja (YS) u opterećenju i rasterećenju

varijabla		NiTi prosjeck ±SD	RhNiTi prosjeck±SD	NNiTi prosjeck±SD
E opterećenje	bez medija	53,04±0,86 ^a	56,33±1,32 ^a	53,93±0,81 ^a
	slina	50,85±2,49 ^b	57,04±1,49 ^{ab}	57,08±0,56 ^b
	Gengigel	58,08±0,98 ^c	59,04±2,32 ^{bc}	56,32±0,71 ^b
	Curasept	57,04±1,49 ^c	59,84±1,01 ^c	56,52±2,08 ^b
	Listerine	57,08±0,56 ^c	58,67±1,14 ^{bc}	52,64±2,60 ^a
	p	<0,001	0,003	<0,001
	η ²	0,817	0,466	0,584
E rasterećenje	bez medija	52,58±0,67 ^a	55,84±1,25 ^a	53,34±1,26 ^a
	slina	52,36±2,49 ^a	57,25±1,18 ^{ab}	57,57±0,97 ^b
	Gengigel	58,18±1,05 ^b	59,48±2,01 ^b	56,84±0,64 ^b
	Curasept	57,25±1,18 ^b	59,32±1,23 ^b	56,93±1,43 ^b
	Listerine	57,57±0,97 ^b	59,20±1,55 ^b	52,40±3,28 ^a
	p	<0,001	0,001	<0,001
	η ²	0,796	0,532	0,630
YS opterećenje	bez medija	515,22±7,79 ^a	537,69±10,59 ^a	512,01±4,58 ^a
	slina	398,40±23,01 ^b	486,09±27,58 ^b	445,64±21,36 ^b
	Gengigel	425,28±36,26 ^{bc}	478,55±30,14 ^b	451,65±14,86 ^b
	Curasept	486,09±27,58 ^a	489,35±21,85 ^b	439,13±57,50 ^b
	Listerine	445,64±21,36 ^c	477,45±4,50 ^b	419,19±21,84 ^b
	p	<0,001	<0,001	<0,001
	η ²	0,771	0,569	0,566
YS rasterećenje	bez medija	213,10±1,97 ^a	219,08±11,25	210,70±3,52 ^a
	slina	174,27±19,15 ^b	223,19±37,27	195,71±15,48 ^a
	Gengigel	169,38±33,54 ^b	200,22±32,69	173,55±20,60 ^a
	Curasept	223,19±37,27 ^a	223,84±10,71	177,66±32,41 ^a
	Listerine	195,71±15,48 ^{ab}	191,96±7,93	119,36±40,20 ^b
	p	0,003	0,085	<0,001
	η ²	0,459	0,271	0,633

*ANOVA. Mediji unutar istog tipa žice koji dijele ista slova u eksponetu ne razlikuju se statistički značajno temeljem Student-Newman-Keuls post-hoc testa.



Slika 14. Usporedba Youngova modula elastičnosti (E) i točke popuštanja (YS) u opterećenju i rasterećenju

Omjer elastičnog vraćanja kao mjera fleksibilnosti i modulus rezilijencije kao mjera rezilijencije prikazani su u tablici 3 i na slici 15.

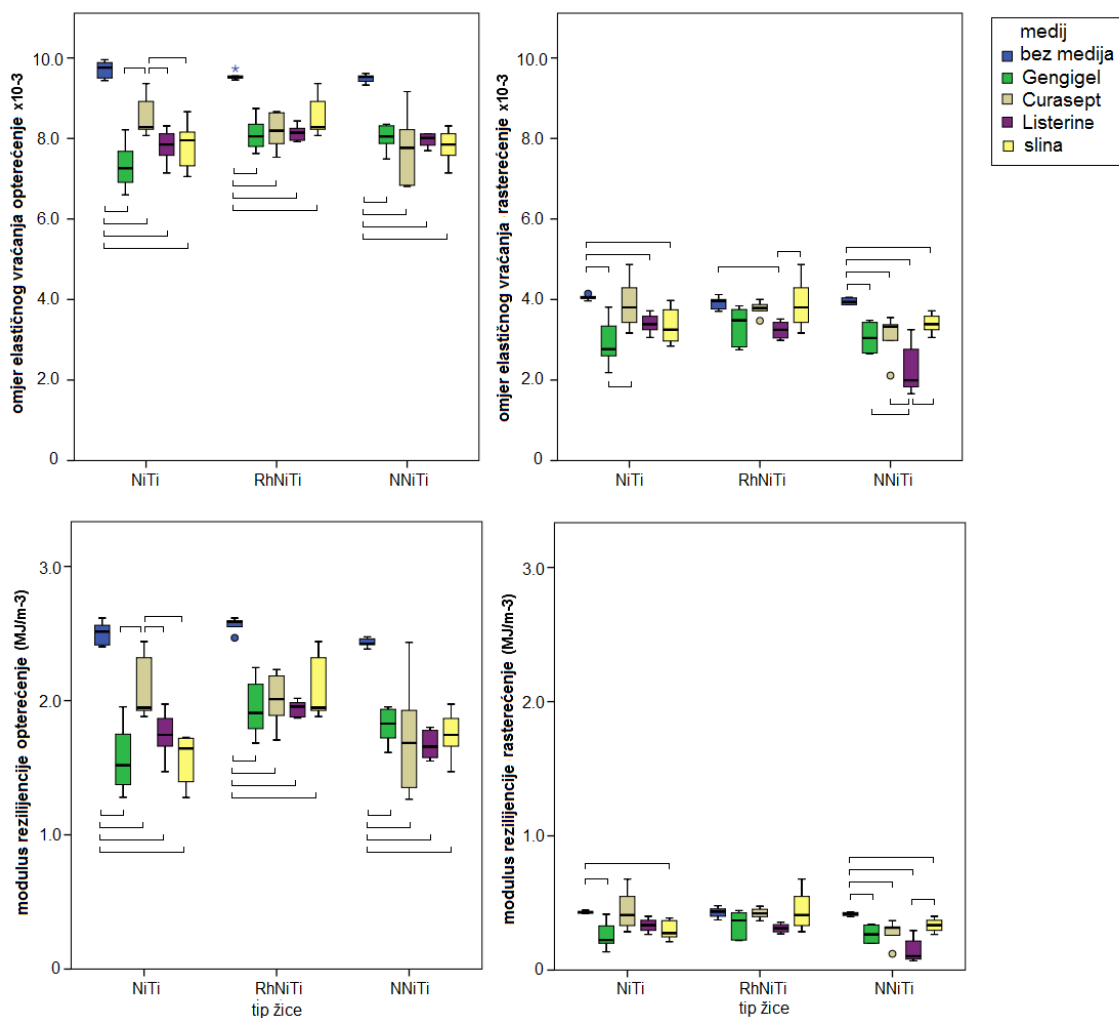
Izlaganje slini i antisepticima smanjuje elastična svojstva NiTi žičanih lukova što je više vidljivo u opterećenju nego u rasterećenju. Dvofaktorske analize varijance s faktorima vrsta žice i vrsta medija ukazuju na značajan efekt vrste žice, vrste medija te kombinacije žice i medija ($p < 0,05$), pri čemu je značajniji utjecaj medija nego vrsta žice. Kombinacija vrste žice i medija upisuje 25 – 53% varijabiliteta elastičnih svojstava.

Tablica 3. Usporedba fleksibilnosti i rezilijencije u opterećenju i rasterećenju

varijabla		NiTi	RhNiTi	NNiTi
		prosjeak±SD	prosjeak±SD	prosjeak±SD
fleksibilnost u opterećenju $\times 10^{-3}$	bez medija	9,72±0,21 ^a	9,55±0,10 ^a	9,50±0,10 ^a
	slina	7,85±0,58 ^b	8,53±0,50 ^b	7,81±0,41 ^b
	Gengigel	7,32±0,59 ^b	8,11±0,40 ^b	8,02±0,32 ^b
	Curasept	8,53±0,50 ^c	8,18±0,44 ^b	7,76±0,89 ^b
	Listerine	7,81±0,41 ^b	8,14±0,20 ^b	7,96±0,17 ^b
	p	<0,001	<0,001	<0,001
	η^2	0,781	0,730	0,698
	fleksibilnost u rasterećenju $\times 10^{-3}$	bez medija	4,05±0,06 ^a	3,92±0,16 ^a
slina		3,34±0,45 ^{bc}	3,89±0,61 ^a	3,40±0,24 ^b
Gengigel		2,91±0,58 ^c	3,36±0,46 ^{ab}	3,05±0,36 ^b
Curasept		3,89±0,61 ^{ab}	3,77±0,18 ^{ab}	3,11±0,52 ^b
Listerine		3,40±0,24 ^{bc}	3,25±0,21 ^b	2,25±0,63 ^c
p		0,001	0,008	<0,001
η^2		0,509	0,409	0,680
rezilijencija u opterećenju (MJ/m ⁻³)		bez medija	2,50±0,08 ^a	2,57±0,05 ^a
	slina	1,57±0,19 ^c	2,08±0,24 ^b	1,74±0,17 ^b
	Gengigel	1,57±0,26 ^c	1,94±0,21 ^b	1,81±0,13 ^b
	Curasept	2,08±0,24 ^b	2,01±0,19 ^b	1,72±0,43 ^b
	Listerine	1,74±0,17 ^c	1,94±0,06 ^b	1,67±0,10 ^b
	p	<0,001	<0,001	<0,001
	η^2	0,797	0,696	0,664
	rezilijencija u rasterećenju (MJ/m ⁻³)	bez medija	0,43±0,01 ^a	0,43±0,04
slina		0,29±0,07 ^b	0,44±0,15	0,33±0,05 ^b
Gengigel		0,25±0,10 ^b	0,34±0,10	0,27±0,06 ^b
Curasept		0,44±0,15 ^a	0,42±0,04	0,28±0,09 ^b
Listerine		0,33±0,05 ^{ab}	0,31±0,03	0,14±0,09 ^c
p		0,003	0,037	<0,001
η^2		0,463	0,325	0,681

*ANOVA. Mediji unutar istog tipa žice koji dijele ista slova u eksponetu ne razlikuju se statistički značajno temeljem Student-Newman-Keuls post-hoc testa.

Jednofaktorske analize varijance načnije za svaku žicu zasebno u odnosu na nulto stanje (apsolutna kontrola) i umjetnu slinu (negativna kontrola) ukazuju da vrsta medija opisuje znanti dio varijabiliteta elastičnosti (33 – 80%). Promjene su manje izražene kod rodirane žice, a podjednako kod neobložene i nitrirane. U rasterećenju najviše se mijenjaju svojstva nitrirane žice uz značajnu snagu efekta ($p < 0,001$; $\eta^2 = 0,68$). Curasept najmanje smanjuje svojstva svih žica, ponekad nešto manje i od same sline. Listerin smanjuje svojstva značajno više i od sline u unloadu kod rodirane i nitrirane ($p < 0,05$; $\eta^2 = 0,325-0,681$). Gengigel najviše smanjuje elastičnost neobložene, posebno u unload ($p \leq 0,003$; $\eta^2 = 0,463-0,979$), no smanjenje je podjednako djelovanju same sline. Kod rodirane Listerine i Gengigel podjednako smanjuju elastična svojstva.



Slika 15. Usporedba fleksibilnosti i rezilijencije u opterećenju i rasterećenju

4.2. Kemijski učinak

4.2.1. Otpuštanje iona

Otpuštanje nikla

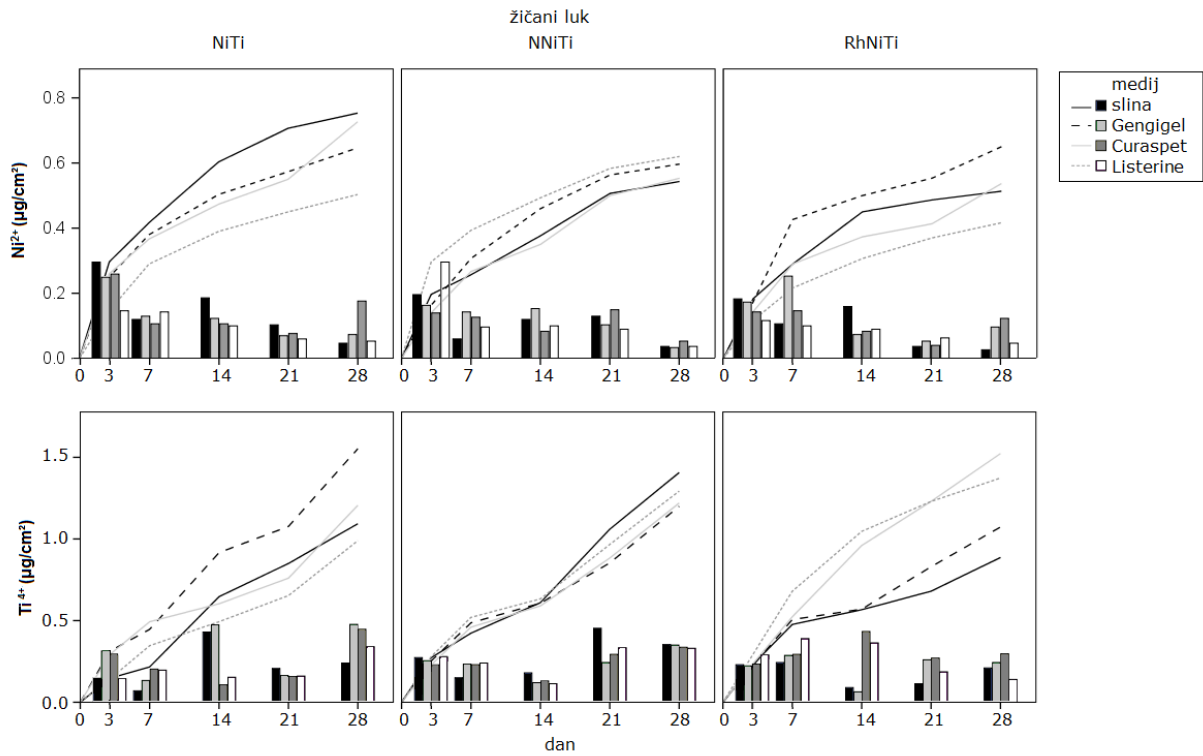
Trofaktorska ANOVA ukazuje da na kumulativno otpuštanje iona nikla značajni utjecaj ima vrijeme imerzije ($p < 0,001$, $\eta^2 = 0,681$), medij ($p = 0,007$, $\eta^2 = 0,096$), tip žice ($p < 0,001$, $\eta^2 = 0,140$) i interakcija medij x žica ($p < 0,001$, $\eta^2 = 0,228$), dok ostale interakcije nisu značajne. Provedene su ANOVA-e između medija unutar iste žice i istog vremena kako bi se detektiralo koji mediji djeluju agresivnije na pojedinu žicu u funkciji vremena.

Vidljivo je kod neobložene žice da u startu slina uzrokuje najviše, a Listerine najmanje otpuštanje iona nikla, no kumulativno nakon 28 dana Curasept inducira slično otpuštanje nikla kao i slina, a Listerin najmanje (Tablica 4, Slika 16).

Kod nitrirane žice Listerine u startu inducira najviše otpuštanje nikla, a Curasept najmanje, no razlike između medija najmanje su kod ove žice u usporedbi s ostalim žicama. Kumulativno nakon 28 dana Listerine i Gengigel induciraju podjednako visoku razinu otpuštanja nikla koja je viša od one Curaspeta i sline.

Kod rodirane žice u startu slina i Gengigel uzrokuju najveće otpuštanje nikla, a Listerin najmanje otpuštanje. Gengigel zadržava kumulativno najvišu razinu, a Listerine najmanju razinu otpuštanja nikla nakon 28 dana.

Prosječno otpuštanje nikla po očitavanju uglavnom se nije značajno razlikovalo između medija unutar istog tipa žice (Tablica 5).



Slika 16. Prosječno (stupci) i kumulativno (linija) otpuštanje iona nikla (Ni^{2+}) i titana (Ti^{4+}) po jedinici površine žice ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) po vrsti žičanog luka i medija

Tablica 4. Kumulativno otpuštanje nikla po jedinici površine žice ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) po vrsti žičanog luka i medija

dan	medij	NiTi		NNiTi		RhNiTi	
		prosjeak	SD	prosjeak	SD	prosjeak	SD
3	slina	0,30 ^a	0,06	0,20	0,01	0,18	0,01
	Gengigel	0,25 ^{ab}	0,03	0,16	0,02	0,17	0,04
	Curaspets	0,26 ^{ab}	0,01	0,14	0,10	0,14	0,03
	Listerine	0,15 ^b	0,08	0,30	0,21	0,12	0,03
7	slina	0,42	0,08	0,26	0,06	0,29	0,02
	Gengigel	0,38	0,03	0,31	0,03	0,43	0,19
	Curaspets	0,37	0,06	0,27	0,14	0,29	0,10
	Listerine	0,29	0,09	0,39	0,18	0,22	0,04
14	slina	0,60	0,18	0,38	0,03	0,45	0,14
	Gengigel	0,50	0,04	0,46	0,03	0,50	0,18
	Curaspets	0,47	0,07	0,35	0,12	0,37	0,10
	Listerine	0,39	0,06	0,49	0,22	0,31	0,04
21	slina	0,71 ^a	0,14	0,51	0,07	0,49	0,13
	Gengigel	0,57 ^{ab}	0,03	0,56	0,04	0,55	0,18
	Curaspets	0,55 ^{ab}	0,09	0,50	0,21	0,41	0,10
	Listerine	0,45 ^b	0,05	0,58	0,21	0,37	0,02
28	slina	0,75	0,14	0,54	0,07	0,51	0,14
	Gengigel	0,65	0,05	0,60	0,04	0,65	0,29
	Curaspets	0,73	0,19	0,55	0,20	0,54	0,14
	Listerine	0,50	0,06	0,62	0,22	0,42	0,02

*mediji koji dijele ista slova u eksponentu unutar iste žice i istog dana ne razlikuju se statistički značajno temeljem Student-Neuman-Keuls testa na razini $p < 0,05$.

Tablica 5. Otpuštanje nikla u vremenskom razdoblju (nekumulativno) po jedinici površine žice ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) po vrsti žičanog luka i medija

dan	medij	NiTi		NNiTi		RhNiTi	
		prosjeak	SD	prosjeak	SD	prosjeak	SD
3	slina	0,30 ^a	0,09	0,20	0,01	0,18	0,01
	Gengigel	0,25 ^{ab}	0,10	0,16	0,02	0,17	0,04
	Curaspets	0,26 ^{ab}	0,07	0,14	0,10	0,14	0,03
	Listerine	0,15 ^b	0,12	0,30	0,21	0,12	0,03
7	slina	0,12	0,03	0,06	0,06	0,11	0,02
	Gengigel	0,13	0,03	0,14	0,04	0,25	0,21
	Curaspets	0,11	0,05	0,13	0,05	0,15	0,08
	Listerine	0,14	0,02	0,10	0,03	0,10	0,03
14	slina	0,19	0,10	0,12	0,03	0,16	0,12
	Gengigel	0,12	0,01	0,15	0,02	0,07	0,02
	Curaspets	0,11	0,02	0,08	0,07	0,08	0,01
	Listerine	0,10	0,03	0,10	0,03	0,09	0,01
21	slina	0,10	0,04	0,13	0,05	0,04	0,01
	Gengigel	0,07	0,02	0,10	0,03	0,05	0,01
	Curaspets	0,08	0,02	0,15	0,10	0,04	0,00
	Listerine	0,06	0,01	0,09	0,01	0,06	0,04
28	slina	0,05	0,01	0,04	0,01	0,03	0,01
	Gengigel	0,07	0,03	0,03	0,01	0,10	0,12
	Curaspets	0,18	0,10	0,05	0,02	0,12	0,07
	Listerine	0,05	0,01	0,04	0,01	0,05	0,01

*mediji koji dijele ista slova u eksponentu unutar iste žice i istog dana ne razlikuju se statistički značajno temeljem Student-Neuman-Keuls testa na razini $p < 0,05$.

Otpuštanje titana

Trofaktorska ANOVA ukazuje da na otpuštanje iona titana značajan utjecaj ima vrijeme imerzije ($p < 0,001$, $\eta^2 = 0,223$) no ne i medij, tip žice i interakcija vrijeme x medij, no značajne su interakcije žica x vrijeme ($p < 0,001$; $\eta^2 = 0,457$), žica x medij ($p < 0,001$; $\eta^2 = 0,247$) te žica x vrijeme x medij ($p < 0,001$; $\eta^2 = 0,485$). Provedene su ANOVA-e između medija unutar iste žice i istog vremena kako bi se detektiralo koji mediji djeluju agresivnije na pojedinu žicu u funkciji vremena.

Dinamika otpuštanja iona u svakom očitavanju ne ukazuje na jasne obrasce (Tablice 6 i 7, slika 16). Kod neobložene žice najveće otpuštanje uzrokuje Gengigel, a najmanje Listerine. Ponašanje je nitrirane žice najhomogenije, odnosno slično u svim medijima. Najmanje je otpuštanje titana u Gengigelu i Curaseptu, a nešto više izaziva Listerine.

Kod rodirane žice Curasept i Listerine uzrokuju veće otpuštanje titana, a Gengigel i slina manje. U startu na rodiranu žicu više djeluje Listerine (treći i sedmi dan), da bi nakon toga više djelovao Curasept.

Promatrajući rezultate kumulativnog otpuštanja titana, vidljivo je da Gengigel uzrokuje najviše otpuštanja iona titana kod neobložene žice što je kumulativno značajno od sedmog dana nadalje. Listerine uzrokuje najmanje otpuštanje titana u startu i kumulativno.

Kod nitrirane žice svi mediji djeluju podjednako. U startu slina i Listerine uzorkuju najviše otpuštanje, a Gengigel najmanje, što je jednako i kumulativno.

Kod rodirane žice Listerine uzrokuje najveće otpuštanje titana, što je značajno od sedmog dana nadalje, a slijedi ga Curasept što je značajno od četrnaestog dana nadalje. Najmanje otpuštanje inducira slina.

Iz tablice 7 (nekumulativno) vidljivo je da kod neobložene žice Curaspert uzorkuje veće otpuštanje iona sedmog i dvadeset osmog dana, Listerine sedmog dana, a Gengigel četrnaestog i dvadeset osmog dana.

Prosječno otpuštanje titana po očitavanju nije se značajno razlikovalo kod nitrirane žice. Kod rodirane žice Curaspert i Listerine uzrokuju veće otpuštanje iona titana što je značajno četrnaesti i dvadeset i prvog dana za Curaspert te četrnaestog dana za Listerine.

Tablica 6. Kumulativno otpuštanje titana po jedinici površine žice ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) po vrsti žičanog luka i medija

dan	medij	NiTi		NNiTi		RhNiTi	
		prosjeak	SD	prosjeak	SD	prosjeak	SD
3	Slina	0,15	0,09	0,27	0,14	0,23	0,05
	Gengigel	0,31	0,10	0,25	0,05	0,22	0,02
	Curaspets	0,29	0,07	0,23	0,10	0,23	0,04
	Listerine	0,15	0,12	0,28	0,03	0,29	0,07
7	Slina	0,22 ^a	0,08	0,42	0,25	0,47 ^a	0,02
	Gengigel	0,45 ^b	0,08	0,49	0,02	0,51 ^a	0,06
	Curaspets	0,50 ^b	0,07	0,46	0,10	0,53 ^a	0,04
	Listerine	0,34 ^{ab}	0,11	0,52	0,03	0,68 ^b	0,12
14	Slina	0,65 ^a	0,06	0,61	0,21	0,57 ^a	0,05
	Gengigel	0,92 ^b	0,13	0,61	0,05	0,57 ^a	0,06
	Curaspets	0,60 ^a	0,05	0,59	0,10	0,96 ^b	0,10
	Listerine	0,49 ^a	0,10	0,63	0,01	1,05 ^b	0,11
21	Slina	0,85 ^a	0,02	1,06	0,15	0,68 ^a	0,08
	Gengigel	1,08 ^c	0,11	0,85	0,13	0,83 ^a	0,10
	Curaspets	0,76 ^{ab}	0,04	0,88	0,35	1,23 ^b	0,05
	Listerine	0,65 ^b	0,12	0,97	0,07	1,23 ^b	0,14
28	Slina	1,09 ^a	0,04	1,41	0,15	0,89 ^a	0,11
	Gengigel	1,56 ^b	0,10	1,20	0,16	1,07 ^a	0,04
	Curaspets	1,21 ^a	0,12	1,22	0,37	1,53 ^b	0,03
	Listerine	0,99 ^a	0,15	1,30	0,14	1,37 ^b	0,16

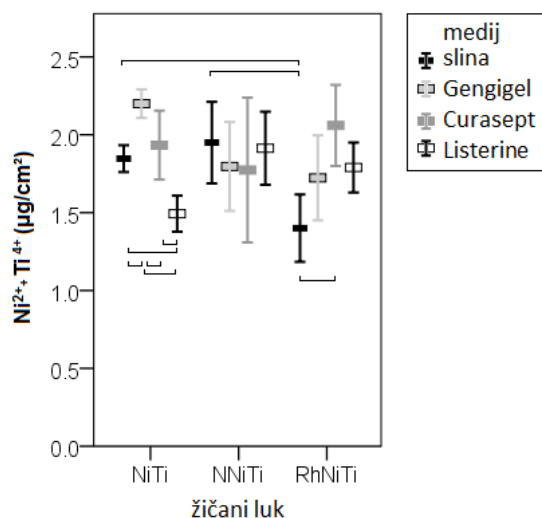
*mediji koji dijele ista slova u eksponentu unutar iste žice i istog dana ne razlikuju se statistički značajno temeljem Student-Neuman-Keuls testa na razini $p < 0,05$.

Tablica 7. Otpuštanje titana u vremenskom razdoblju (nekumulativno) po jedinici površine žice ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) po vrsti žičanog luka i medija

dan	Medij	NiTi		NNiTi		RhNiTi	
		prosjeak	SD	prosjeak	SD	prosjeak	SD
3	Slina	0,15	0,09	0,27	0,15	0,23	0,05
	Gengigel	0,31	0,10	0,25	0,05	0,22	0,02
	Curaspets	0,29	0,07	0,23	0,10	0,23	0,04
	Listerine	0,14	0,12	0,28	0,03	0,29	0,07
7	Slina	0,07 ^a	0,01	0,15	0,13	0,24	0,05
	Gengigel	0,13 ^b	0,02	0,23	0,04	0,29	0,04
	Curaspets	0,20 ^c	0,01	0,23	0,03	0,29	0,03
	Listerine	0,20 ^c	0,03	0,24	0,01	0,39	0,19
14	Slina	0,43 ^a	0,05	0,18	0,04	0,09 ^a	0,04
	Gengigel	0,47 ^a	0,07	0,12	0,04	0,06 ^a	0,02
	Curaspets	0,11 ^b	0,02	0,13	0,04	0,43 ^b	0,14
	Listerine	0,15 ^b	0,02	0,11	0,01	0,36 ^b	0,09
21	Slina	0,21	0,03	0,45	0,09	0,11 ^a	0,04
	Gengigel	0,16	0,03	0,24	0,15	0,26 ^b	0,05
	Curaspets	0,16	0,02	0,29	0,26	0,27 ^b	0,05
	Listerine	0,16	0,03	0,33	0,06	0,19 ^{ab}	0,04
28	Slina	0,24 ^a	0,06	0,35	0,07	0,21	0,07
	Gengigel	0,48 ^b	0,03	0,35	0,07	0,24	0,07
	Curaspets	0,45 ^b	0,10	0,34	0,05	0,30	0,05
	Listerine	0,34 ^{ab}	0,09	0,33	0,08	0,14	0,13

*mediji koji dijele ista slova u eksponentu unutar iste žice i istog dana ne razlikuju se statistički značajno temeljem Student-Neuman-Keuls testa na razini $p < 0,05$.

Kumulativno otpuštanje nikla i titana zajedno do 28. dana



Slika 17. Usporedba kumulativnog otpuštanje nikla i titana zajedno do 28. dana između medija i tipova žica

Tablica 8. Kumulativno otpuštanje nikla i titana zajedno do 28. dana

	NiTi	NNiTi	RhNiTi	p	η ²
medij	prosjeck± SD	prosjeck± SD	prosjeck± SD		
slina	1,85±0,09 ^b	1,95±0,26	1,40±0,22 ^a	0,034	0,676
Gengigel	2,20±0,09 ^c	1,80±0,29	1,72±0,27 ^{ab}	0,094	0,545
Curaspet	1,93±0,22 ^b	1,77±0,47	2,06±0,26 ^b	0,600	0,157
Listerine	1,49±0,12 ^a	1,91±0,23	1,79±0,16 ^{ab}	0,065	0,598
p	0,002	0,885	0,049		
η ²	0,830	0,074	0,606		

*mediji koji dijele ista slova u eksponentu unutar iste žice i istog dana ne razlikuju se statistički značajno temeljem Student-Neuman-Keuls testa na razini p<0,05

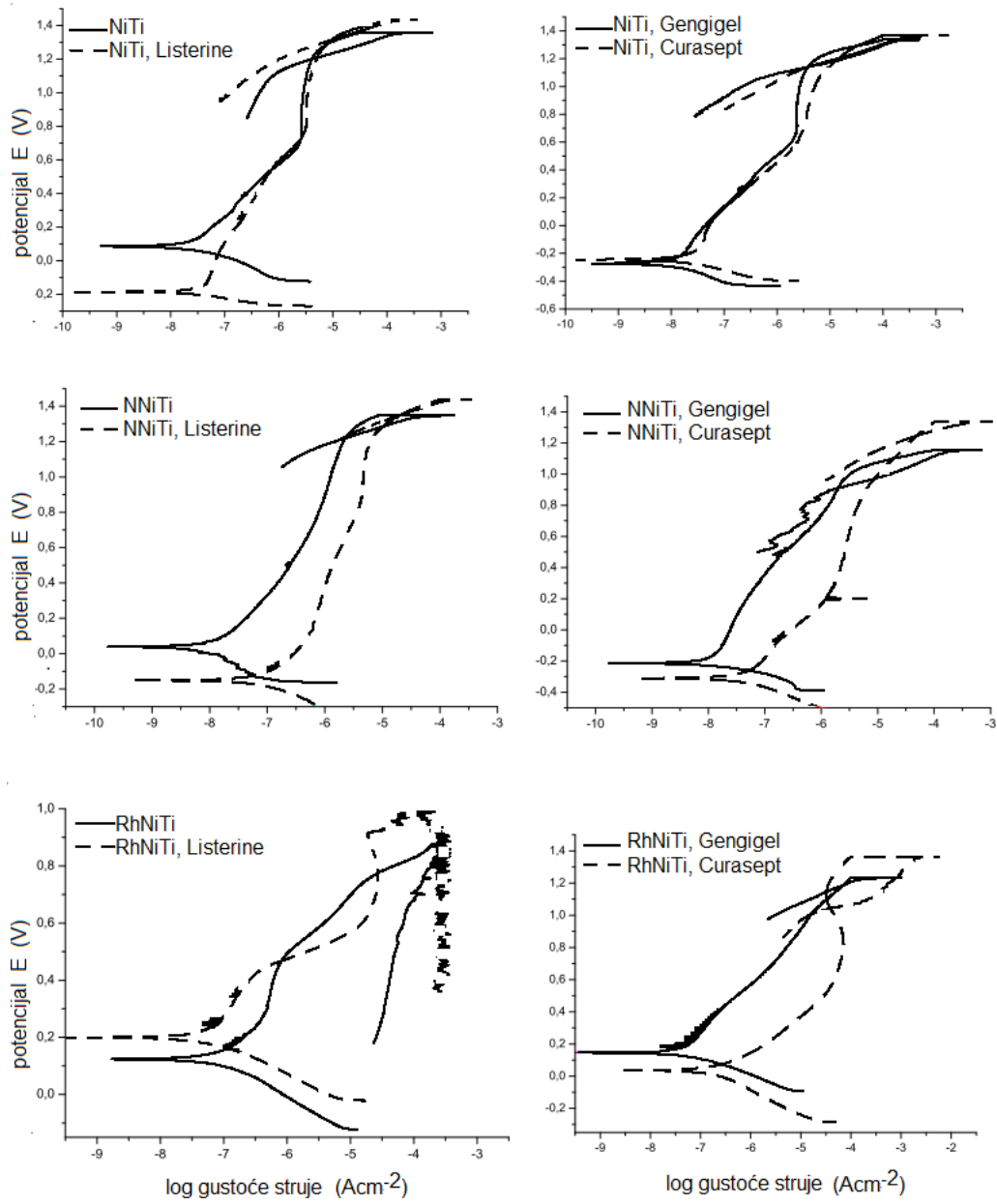
Dvofaktorska ANOVA ukazuje da je značajan efekt kombinacije medija i žice na kumulativno otpuštanje iona nikla i titana u 28-dnevnom razdoblju (p=0,015; η²=0,455; slika 17, tablica 8).

Napravljene su jednofaktorske ANOVA-e kako bi se provjerila razlika u medijima unutar svake žice.

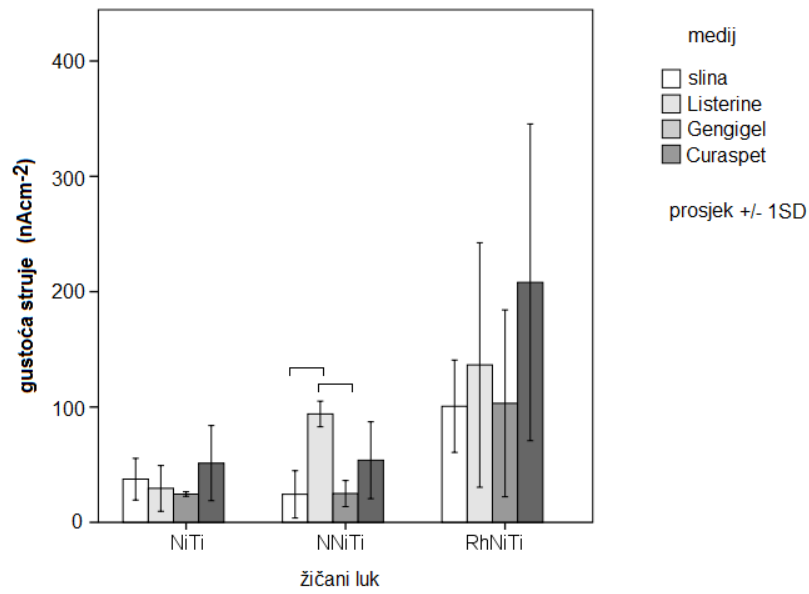
Analiza djelovanja medija na isti tip žice ukazuje da kod neobložene žice Listerine značajno najmanje inducira otpuštanje iona, a Gengigel najviše ($p=0,002$). Kod nitrirane žice mediji podjednako djeluju, iako Curasept inducira nešto manje otpuštanje iona, a slina i Listerine nešto više. Kod rodirane žice Curaspel značajno više inducira otpuštanje iona nego slina.

Usporedba istog medija na različite tipove žica ukazuje da u umjetnoj slini rodirana žica otpušta značajno manje iona od nitrirane i neobložene žice među kojima nema razlike. No nakon izlaganja antisepticima razlike između žica nisu značajne niti za jedan anstispetik, iako gengigel najviše djeluje na neobloženu žicu, Curasept na rodiranu žicu, a Listerine na nitriranu žicu. Na rodiranu najmanje djeluje Gengigel, nitrificiranu Curaspel, a neobloženu Listerine.

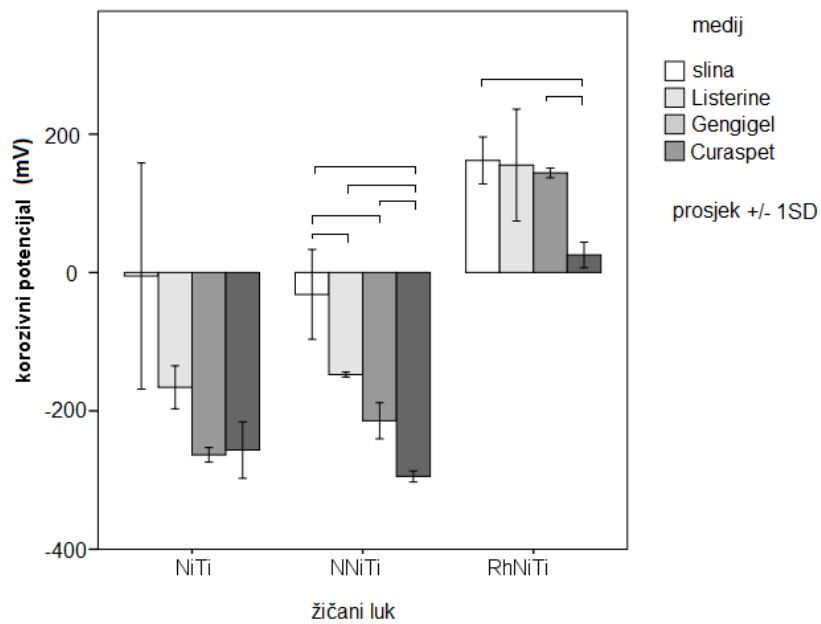
4.2.2. Elektrokemija



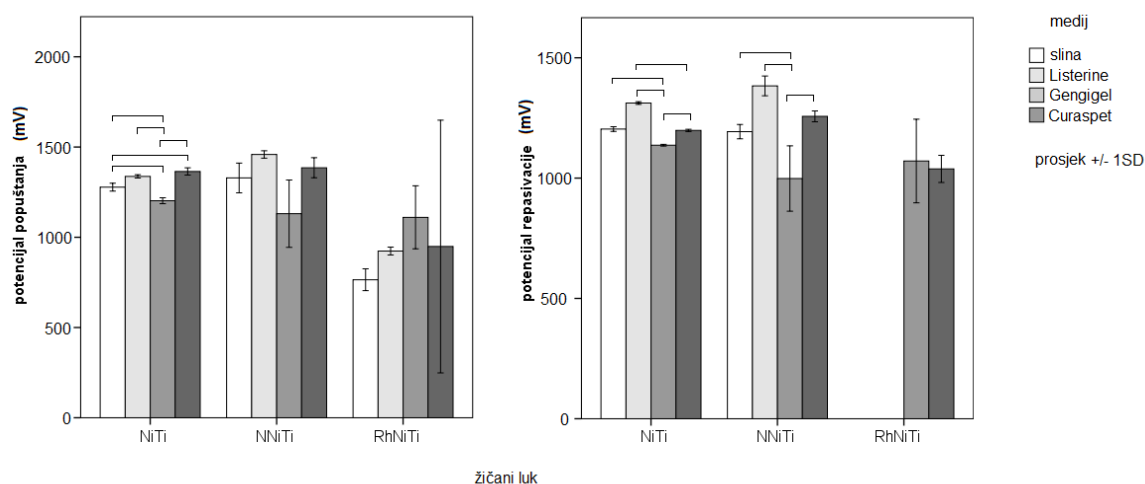
Slika 18. Polarizacijske krivulje NiTi žica neobložene i obložene površine prikazani metodom Tafelove ekstrapolacije



Slika 19. Usporedba opće korozije uslijed djelovanja medija unutar istog tipa žice



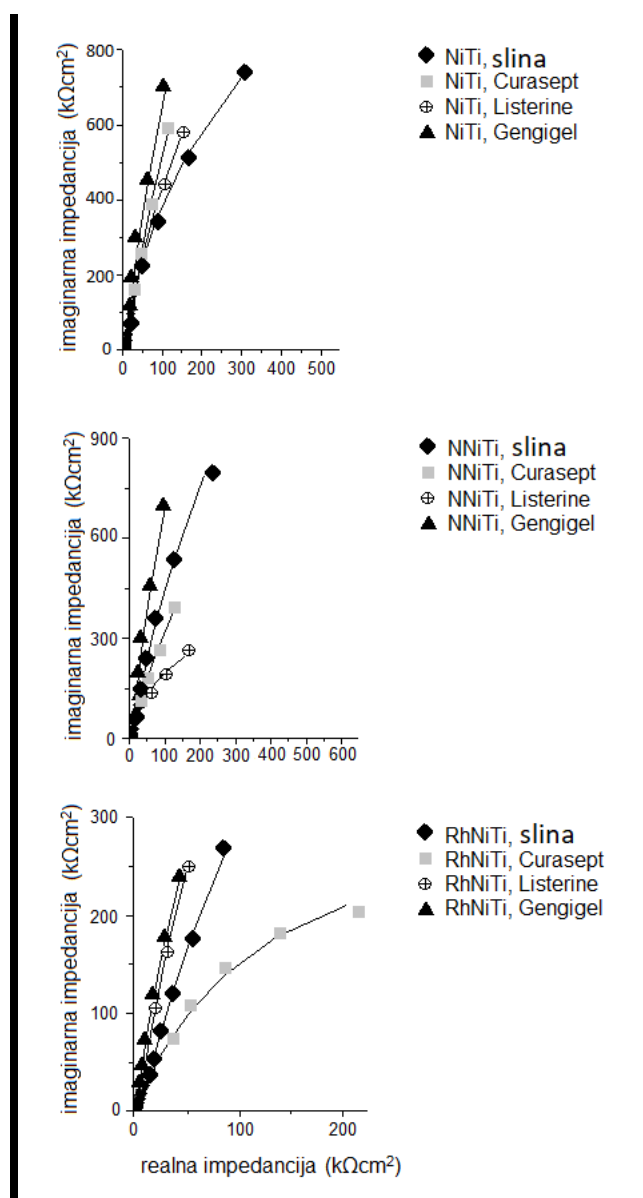
Slika 20. Usporedba sklonosti jamičastoj koroziji između medija u paramteru korozivni potencijal



Slika 21. Usporedba sklonosti jamičastoj koroziji između medija u parametrima potencijal popuštanja/pucanja pasivnog sloja i potencijal repasivacije

Mediji su kod neobložene žice značajno utjecali na potencijal pucanja pasivnog sloja i potencijal repasivacije uz veliku snagu efekta (93-99%; $p < 0,05$) te granično na korozivni potencijal (Slike 18-21). Potencijali repasivacije i popuštanja značajno su najmanji kod Gengigela. Najveći potencijal repasivacije inducira Listerine, a popuštanja Listerine i Curaspet. Kod nitrirane žice mediji su značajno utjecali na gustoću struje, korozivni potencijal i potencijal repasivacije uz veliku snagu efekta (69 – 92%; $p < 0,05$) te granično na potencijal popuštanja. Listerine producira najveću gustoću struje kod nitrirane žice, a slina i Gengigel najmanju. Najveću negativnu vrijednost korozivnog potencijala izaziva Curasept, a najmanju slina. Potencijal repasivacije kod Gengigela značajno je manji od svih ostalih medija, uključujući i slinu.

Mediji su kod rodirane žice značajno utjecali na korozivni potencijal i nagib katodnog pravca uz veliku snagu efekta (70 – 77%; $p < 0,05$). Slina i Listerine kod rodirane žice produciraju značajno najveći korozivni potencijal, a Curasept najmanji.



Slika 22. Rezultati dobiveni elektrokemijskom impedancijskom spektroskopijom

Rezultati dobiveni elektrokemijskom impedancijskom spektroskopijom pokazuju da najveću korozivsku otpornost pokazuju svi tipovi lukova nakon izlaganja Gengigelu (slika 22). To je slično nalazima cikličkog polarizacijskog testa. Najmanja otpornost na koroziju neobložene žice vidljiva je nakon izlaganja Listerinu i slini. Nitirana žica pokazuje najmanju otpornost nakon izlaganja Listerinu, a rodirana Curaseptu. Dobiveni rezultati se se nadopunjuju s rezultatima polarizacijskih mjerenja.

Tablica 9. Impedancijski parametri dobiveni prilagodbom eksperimentalnih podataka na odabrane ekvivalentne električne modele

Žica	Medij	Otpor površinskog sloja, R_1 ($M\Omega$ cm^2)	Konstantno fazni element, CPE ($\mu S s^n cm^{-2}$)	Koeficijent, n
NiTi	Slina	2,45	18	0,95
	Curasept	6,26	24	0,94
	Listerine	4,56	22	0,93
	Gengigel	6,91	21	0,95
NNiTi	Slina	6,94	17	0,91
	Curasept	4,57	15	0,90
	Listerine	0,87	34	0,88
	Gengigel	7,45	7,3	0,89
RhNiTi	Slina	3,02	45	0,90
	Curasept	0,82	22	0,80
	Listerine	4,06	49	0,91
	Gengigel	3,00	48	0,93

Za daljnje vrednovanje svojstava površinskog sloja, dobiveni EIS spektri modelirani su primjenom električnih ekvivalentnih krugova. Za većinu mjerenja moguće je koristiti jednostavan model R_{el} ($CPE R_1$) gdje R_{el} predstavlja otpornost elektrolita, R_1 otpor površinskog sloja, a CPE je konstantni element faza koji opisuje kapacitivno ponašanje neidealnih sustava u kojima je n koeficijent povezan s neravnomjernom raspodjelom struje uzrokovan hrapavošću i površinskim oštećenjima. Vrijednosti n od gotovo jedan upućuju na skoro idealno kapacitivno ponašanje. Za uzorke prevučene rodijem potrebno je koristiti električni model R_{el} ($CPE_1 R_1$) ($CPE_2 R_2$) gdje prvi CPE-R par predstavlja elektrokemijsku reakciju koja se javlja na plemenitoj prevlaci, a drugi elektrokemijsko ponašanje NiTi supstrata u porama prevlake. Za neobloženi NiTi u Curaseptu i nitriranu NiTi u Gengigelu također je bilo potrebno koristiti električni ekvivalent s dva CPE-R para. Onaj na višim frekvencijama obično se pripisuje poroznom sloju gornjeg oksida, dok se onaj na nižim frekvencijama pripisuje unutarnjem sloju barijere. Otpornost unutarnjeg sloja barijere znatno je veća od one vanjskog sloja i zbog toga su parametri u vezi s unutarnjim slojem barijere prikazani u tablici 9. Navedeni podaci predstavljaju srednju vrijednost dobivenu u najmanje tri mjerenja u istim uvjetima.

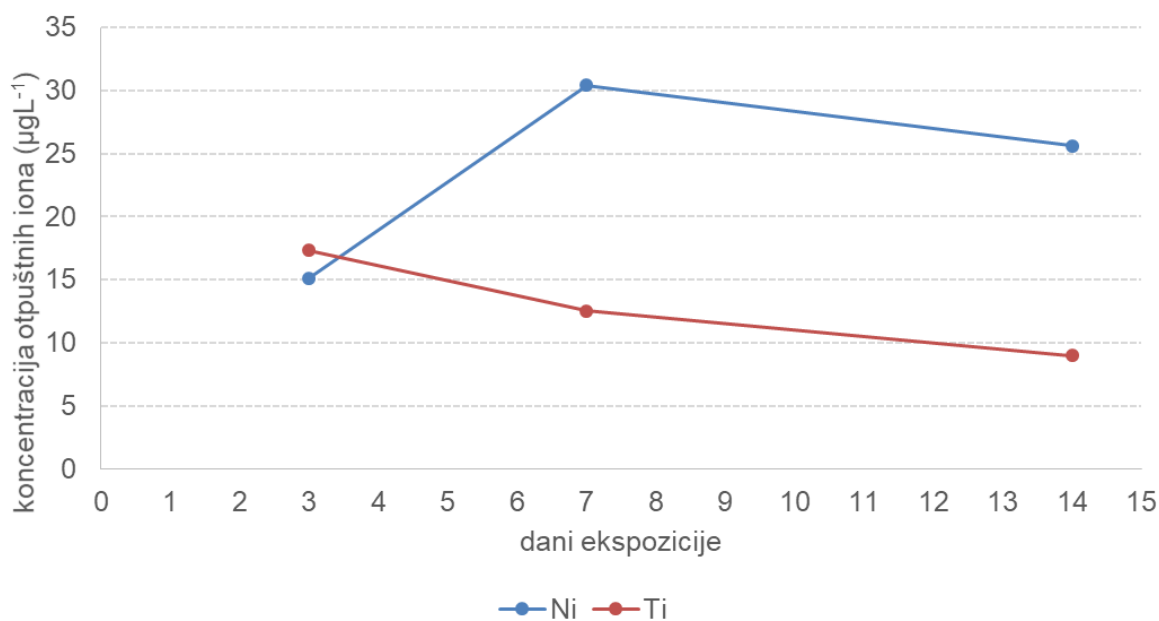
EIS podaci predstavljeni u tablici 9. pokazuju da kod neobloženih NiTi žica antiseptici povećavaju otpornost oksidnog sloja. Takvo ponašanje može biti pripisano bržem otapanju slitine u antisepticima s oslobađanjem Ti^{4+} , no lako se konvergira u TiO_2 , čime se stvara više zaštitnog sloja oksida nego u umjetnoj slini. Kod nitriranih NiTi Curasept i Listerine uzrokuju smanjenje svojstava zaštitnog površinskog sloja. Kod žice prevučene rodijem smanjenje svojstava oksidnog zaštitnog sloja najizraženije je s Curaseptom.

4.3. Biološki učinak

Dinamika otpuštanje iona nikla i titana kroz 14 dana, korištena za ispitivanje biološkog učinka, prikazana je u tablici 10 i slici 23.

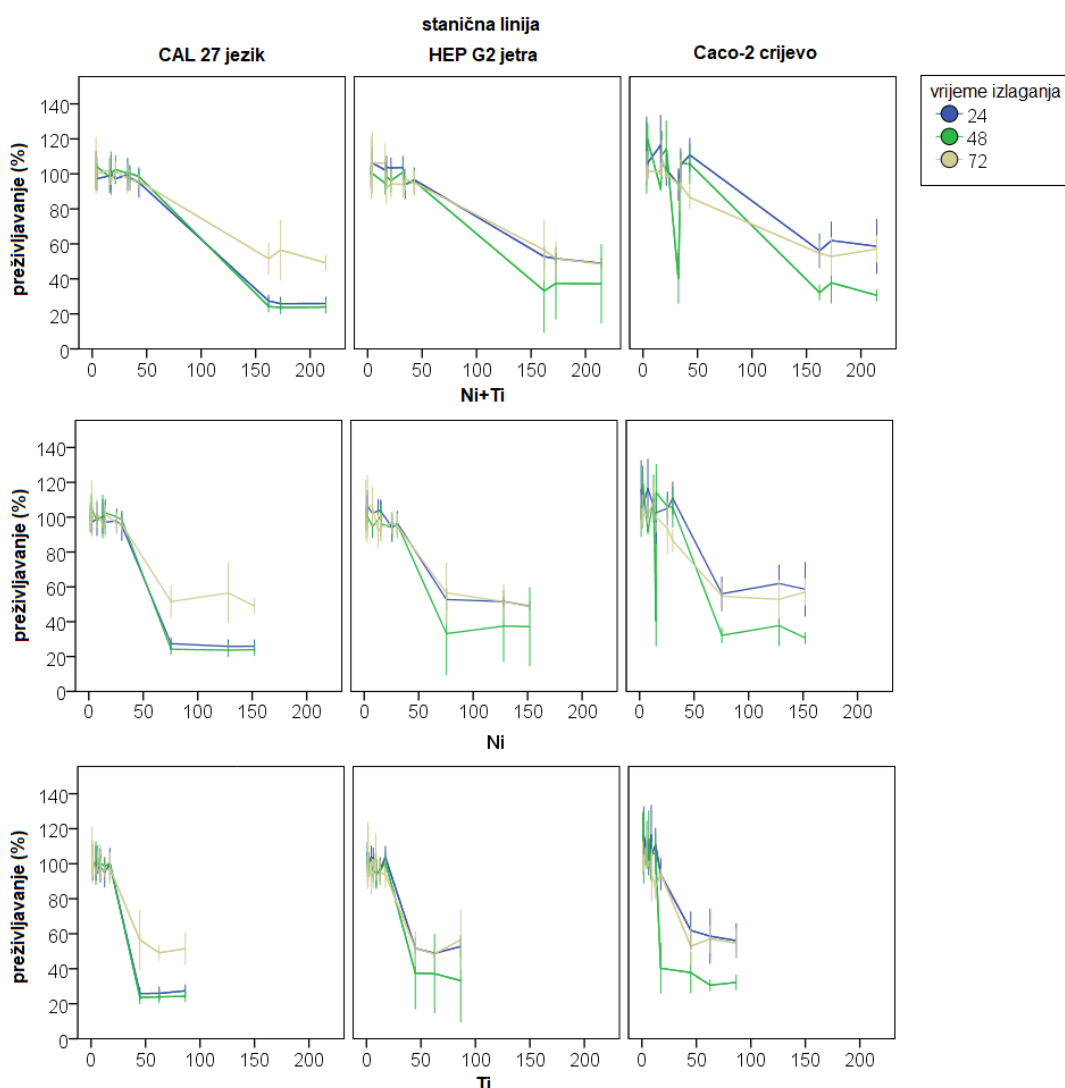
Tablica 10. Koncentracije iona Ni i Ti u uzorcima za ispitivanje biološkog učinka

	Ni (μgL^{-1})	Ti (μgL^{-1})
Slijepa proba (slina)	<1	<1
3. dan	15,1	17,3
7. dan	30,4	12,5
14. dan	25,6	9,0



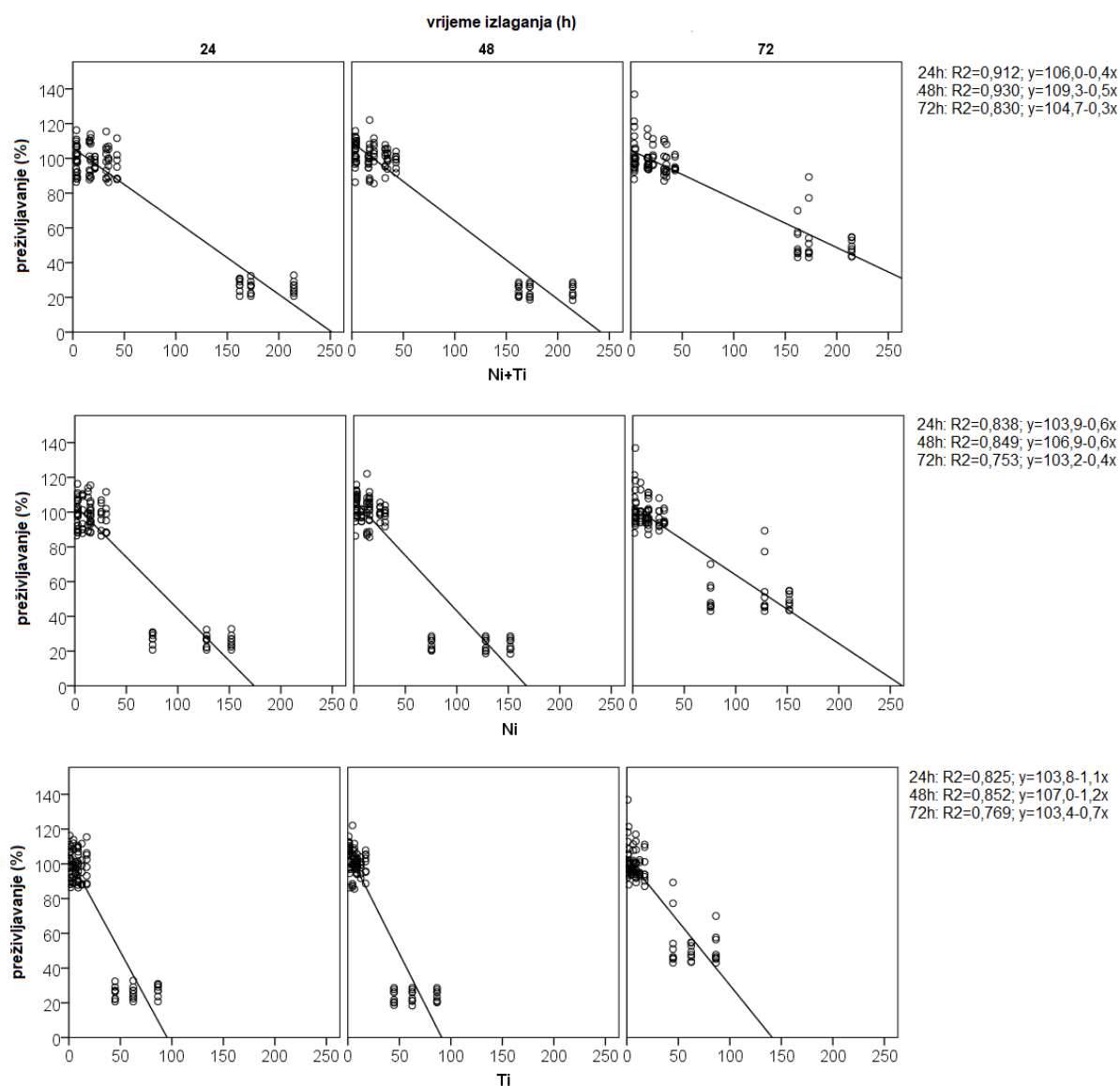
Slika 23. Ovisnost otpuštanja iona Ni i Ti o vremenu ekspozicije dva neobložena NiTi luka dužine 10 cm dimenzija $0,508 \times 0,508$ mm ($0,020 \times 0,020$ ") slini

Značajni pad preživljavanja uz veliku snagu efekta bilježe sve kulture stanica kada je koncentracija oba metala zajedno barem 162 $\mu\text{g/L}$, a čine ju kombinacija od 75,5 $\mu\text{g/L}$ nikla i 86,5 $\mu\text{g/L}$ titana ili 128 $\mu\text{g/L}$ nikla i 44,9 $\mu\text{g/L}$ titana ($p < 0,001$; $\eta^2 = 0,853-0,971$; Slika 24). Ako se gleda zasebno svaki ion onda preživljavanje značajno pada nakon izloženosti koncentraciji od 75,5 $\mu\text{g/L}$ nikla i 44,9 $\mu\text{g/L}$ titana. Radi se o umjerenoj do jakoj citotoksičnosti. Vrijednost od 30,4 $\mu\text{g/L}$ nikla te 17,3 $\mu\text{g/L}$ titana u slini, koliko je najviše zabilježeno tijekom 14 dana ekspozicije, odnosno koncentracija oba metala zajedno od barem 42,3 $\mu\text{g/L}$ ne izaziva citotoksični učinak. Niske koncentracije nikla i titana mogu čak i stimulirati razvoj stanica.

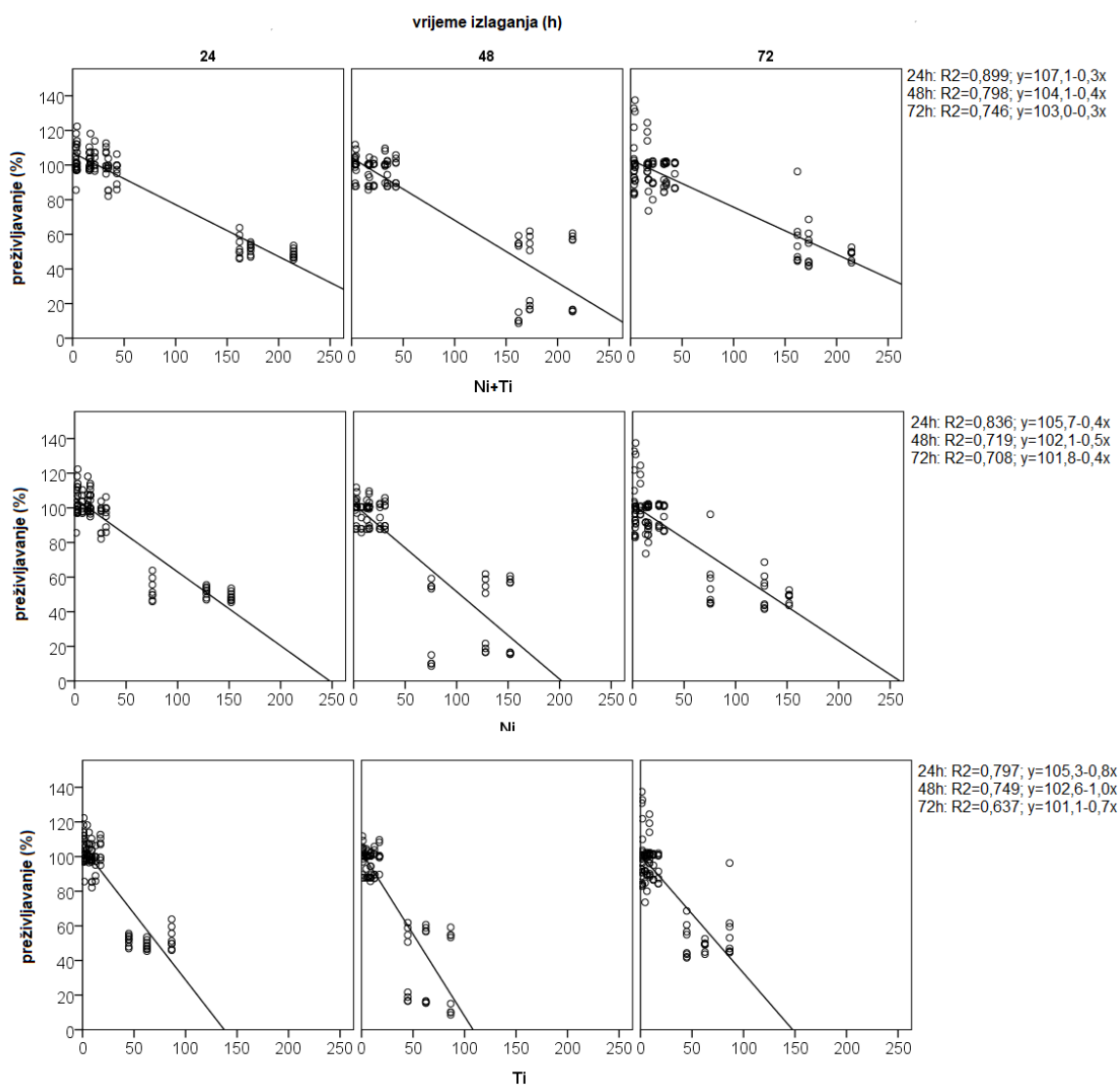


Slika 24. Usporedba citotoksičnosti u kulturama stanica izloženima slini s otpuštenim ionima nikla i titana tijekom vremena izlaganja

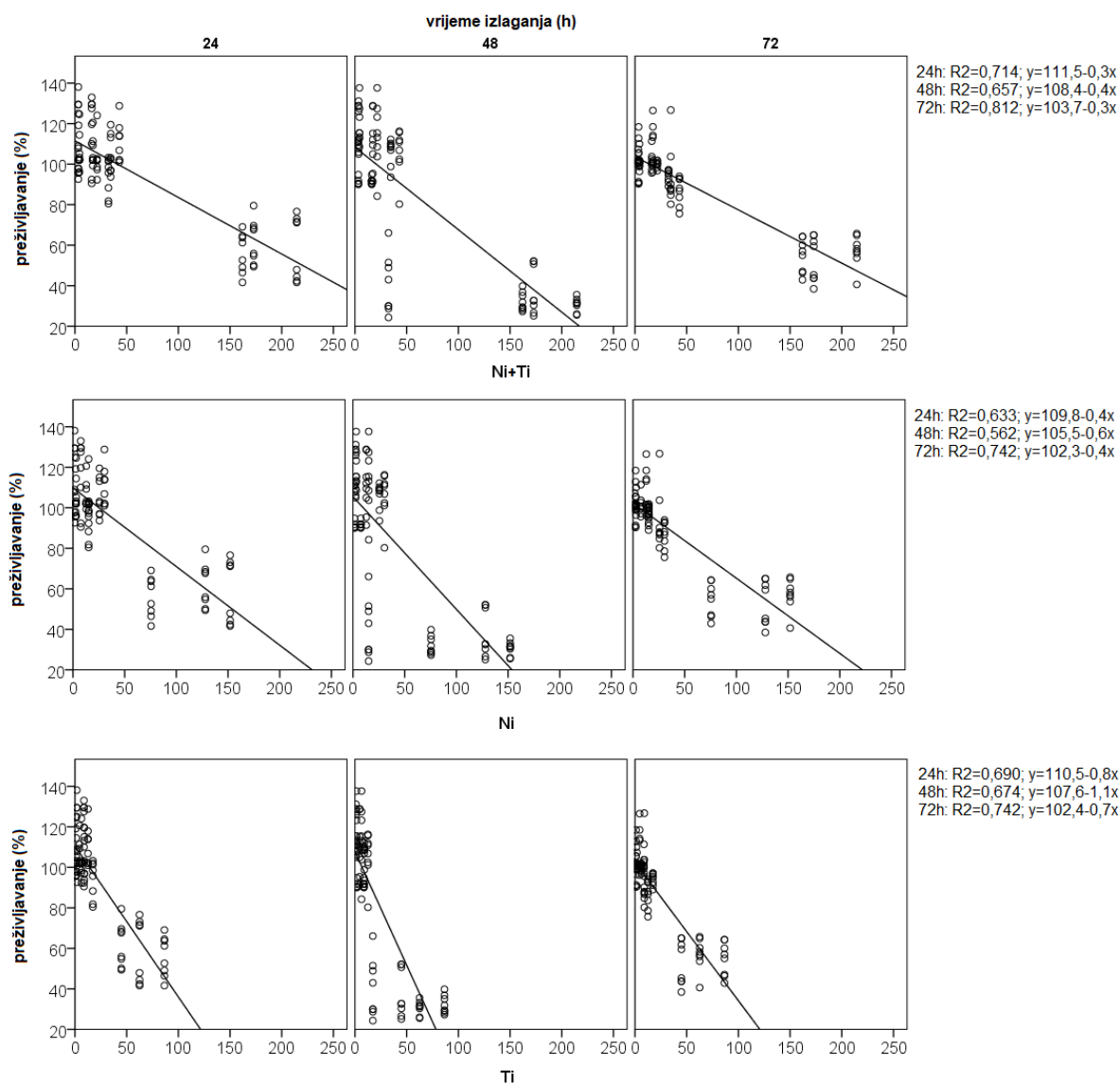
Vidljiv je linearni trend smanjenja preživljavanja na svim kulturama stanica s povećanjem koncentracije nikla i titana (Slike 25 –27). Korelacija je podjednake snage u sva tri vremenska intervala, a povećanje koncentracije titana nešto više smanjuje preživljavanje nego povećanje koncentracije nikla. Iz regresijskih jednadžbi vidljivo je da povećanje koncentracije titana za 1 $\mu\text{g/L}$ smanjuje preživljavanje za 0,7-1,2 skalarnih boda, dok kod nikla za 0,4-0,6 boda (Slike 25 – 27).



Slika 25. Linearna regresija za predikciju citotoksičnosti na kulturi stanica jezika temeljem otpuštenih iona nikla i titana iz NiTi lukova u slinu. Udio preživljavanja određen je u odnosu na negativnu kontrolu



Slika 26. Linearna regresija za predikciju citotoksičnosti na kulturi stanica jetre temeljem otpuštenih iona nikla i titana iz NiTi lukova u slinu

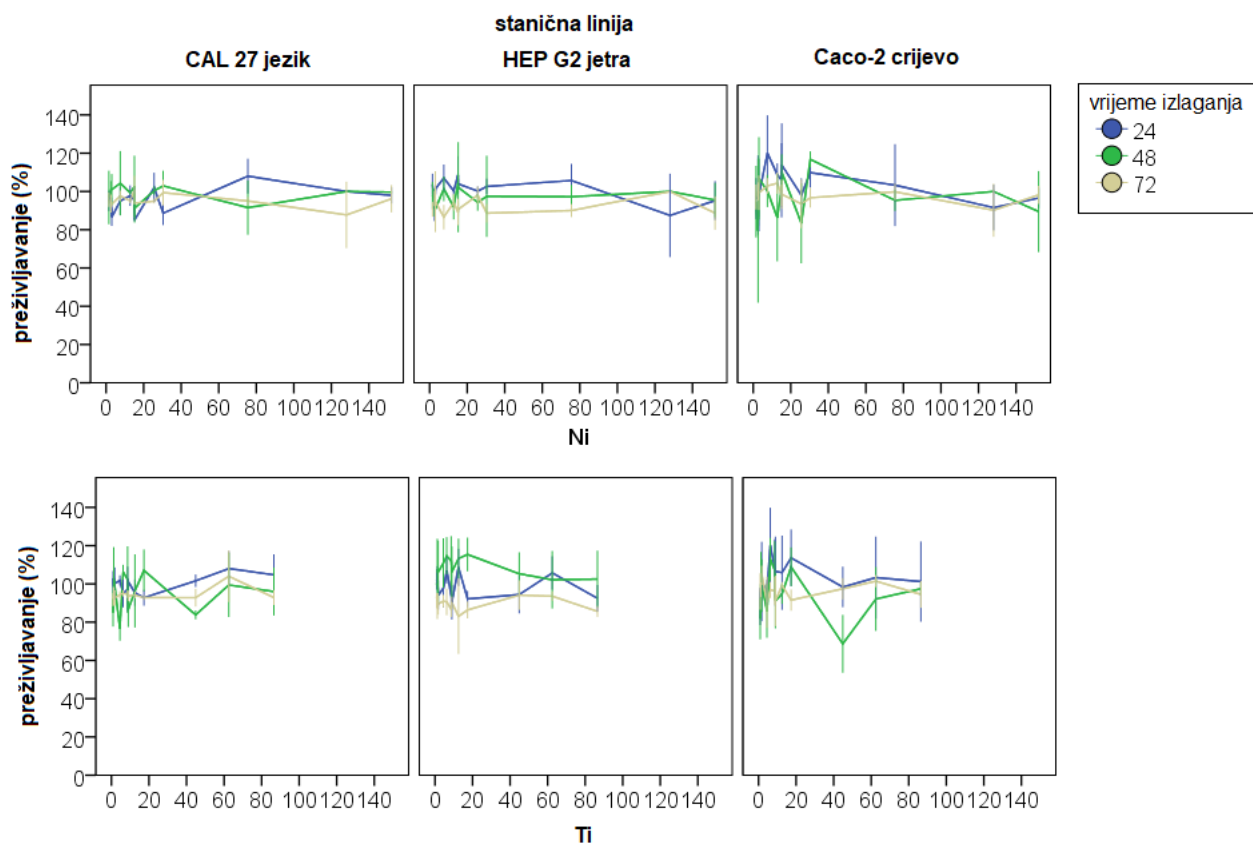


Slika 27. Linearna regresija za predikciju citotoksičnosti na kulturi stanica crijeva temeljem otpuštenih iona nikla i titana iz NiTi lukova u slinu

Nikal i titan podjednako su značajni prediktori citotoksičnosti. Dodatak titana povećava snagu modela povrh nikla, no ne u velikom iznosu ($\Delta R < 0,1$; $p < 0,001$). Velik je dio varijabiliteta zajednički za oba metala, dok samostalno svaki metal objašnjava oko 10% varijabiliteta. U tablici su prikazani rezultati regresijskih jednadžbi. Kada se gledaju sve regresijske jednadžbe opet je vidljivo je da povećanje koncentracije titana nešto više smanjuje preživljavanje nego povećanje koncentracije nikla. Iz regresijskih jednadžbi vidljivo je da povećanje koncentracije titana za 1 $\mu\text{g/L}$ smanjuje preživljavanje za 0,3 – 0,9 skalarnih boda, dok kod nikla za 0,2 – 0,4 boda (Tablica 11).

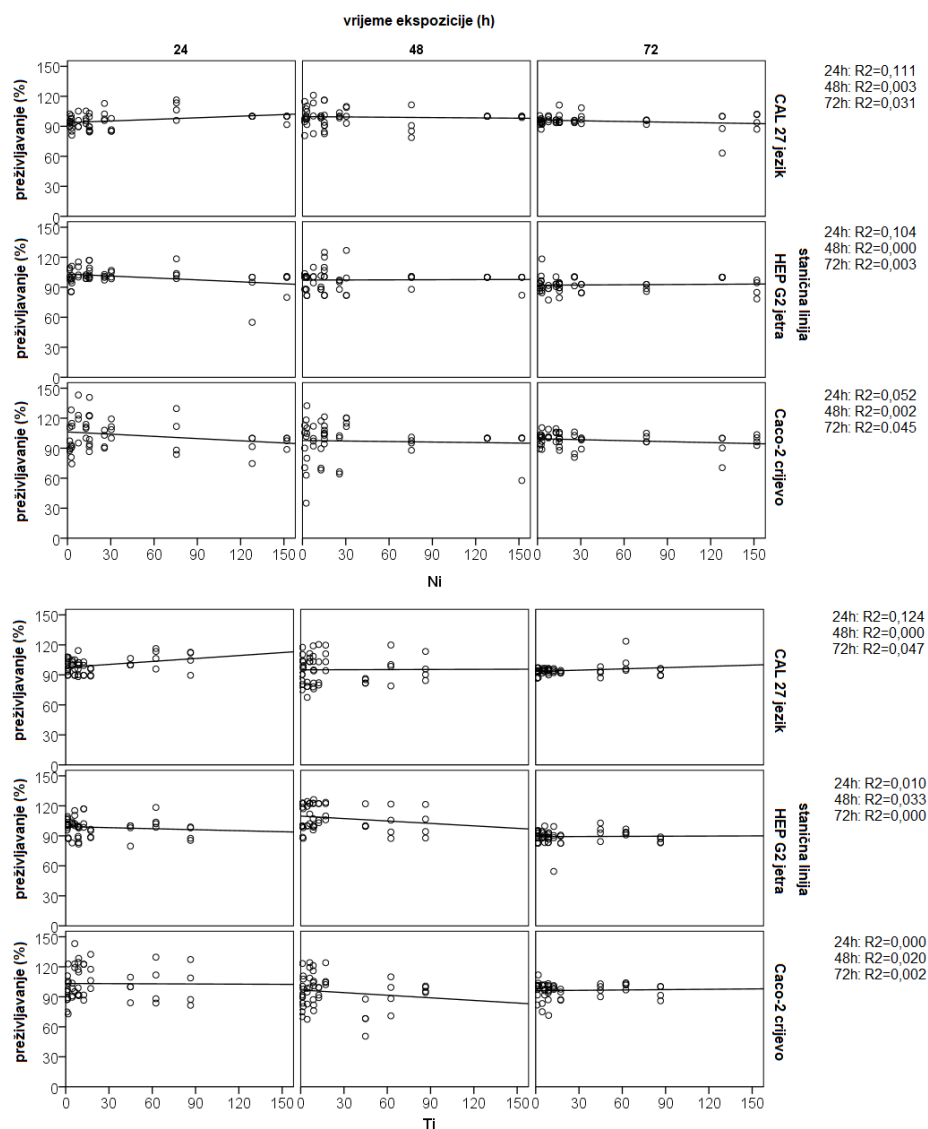
Tablica 11. Rezultati linearne regresije za predikciju preživljavanja temeljem otpuštenog nikla i titana

kultura stanica	vrijeme ekspozicije	regresijska jednadžba	R2	p
jezik	24	$y=106,3-0,3 \times Ni - 0,6 \times Ti$	0,918	<0,001
	48	$y=109,6-0,4 \times Ni - 0,7 \times Ti$	0,939	<0,001
	72	$y=104,9-0,2 \times Ni - 0,4 \times Ti$	0,840	<0,001
jetra	24	$y=107,2-0,3 \times Ni - 0,4 \times Ti$	0,902	<0,001
	48	$y=104,4-0,3 \times Ni - 0,6 \times Ti$	0,811	<0,001
	72	$y=108,0-0,3 \times Ni - 0,3 \times Ti$	0,746	<0,001
crijevo	24	$y=111,8-0,2 \times Ni - 0,5 \times Ti$	0,733	<0,001
	48	$y=108,9-0,2 \times Ni - 0,9 \times Ti$	0,694	<0,001
	72	$y=103,9-0,2 \times Ni - 0,4 \times Ti$	0,819	<0,001



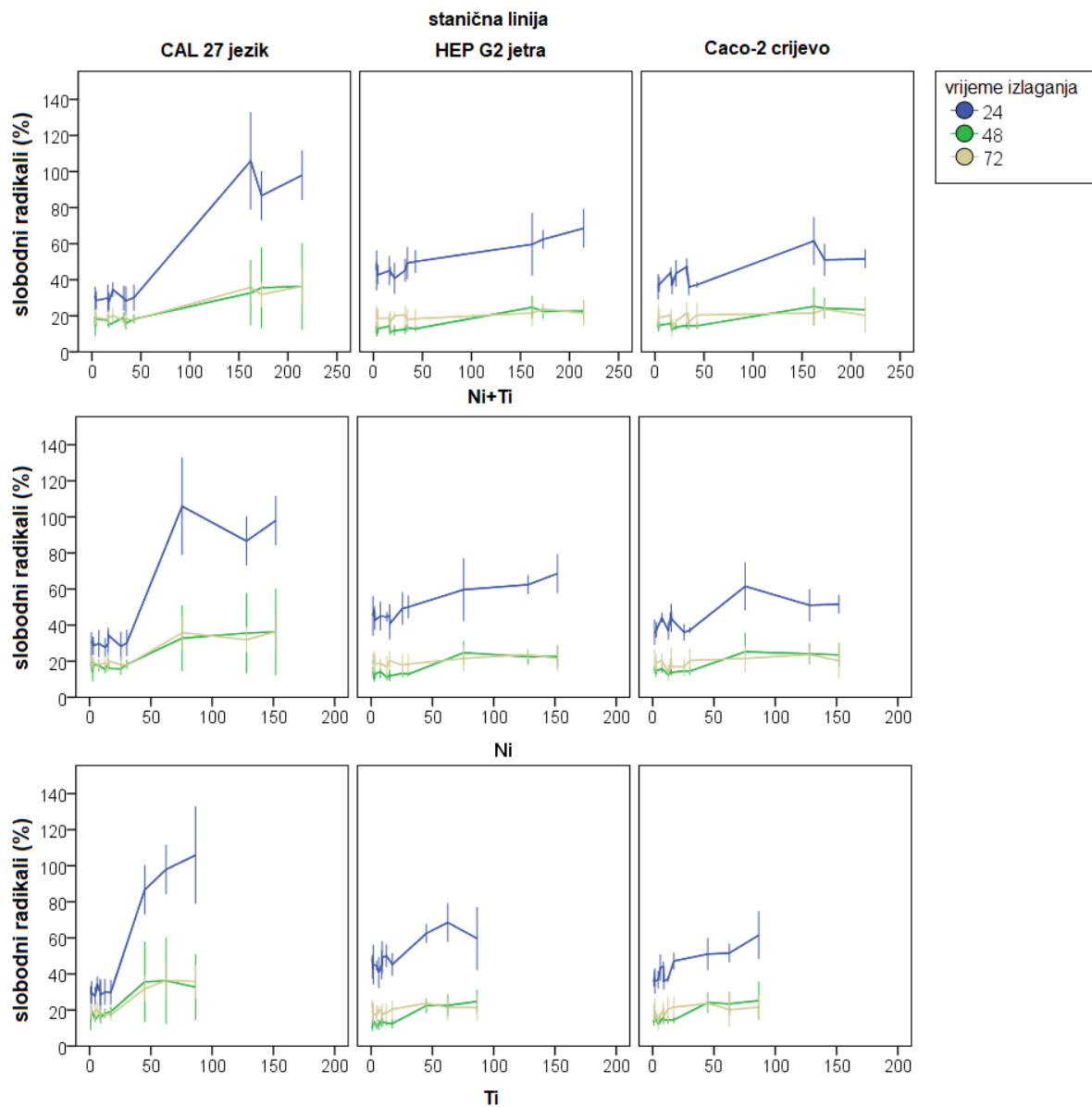
Slika 28. Usporedba citotoksičnosti, procijenjene kao udio preživljavanja u odnosu na negativnu kontrolu, u kulturama stanica izloženima ionima nikla (NiCl₂) i titana (TiO₂) tijekom vremena izlaganja stanica

Izlaganje odvojeno niklu i odvojeno titanu dobivenima iz soli NiCl_2 i TiO_2 ne izaziva značajniji citotoksični efekt niti u jednoj kulturi stanica niti u jednom vremenu izlaganja (Slika 28). Uglavnom nema citotoksičnog efekta ili se javlja blaža citotoksičnost. Kada se gleda samo odnos citotoksičnosti u stanicama nakon ekspozicije samom niklu ili samom titanu korelacije su bile slabe ili beznačajne (Slika 29). Koncentracija nikla jedino je korelirala s citotoksičnosti nakon 24 sata ekspozicije u stanicama jezika i jetre, a titana samo nakon 24 sata u stanicama jezika. Nikal i titan dobiveni iz soli NiCl_2 i TiO_2 slabi su prediktori citotoksičnosti.



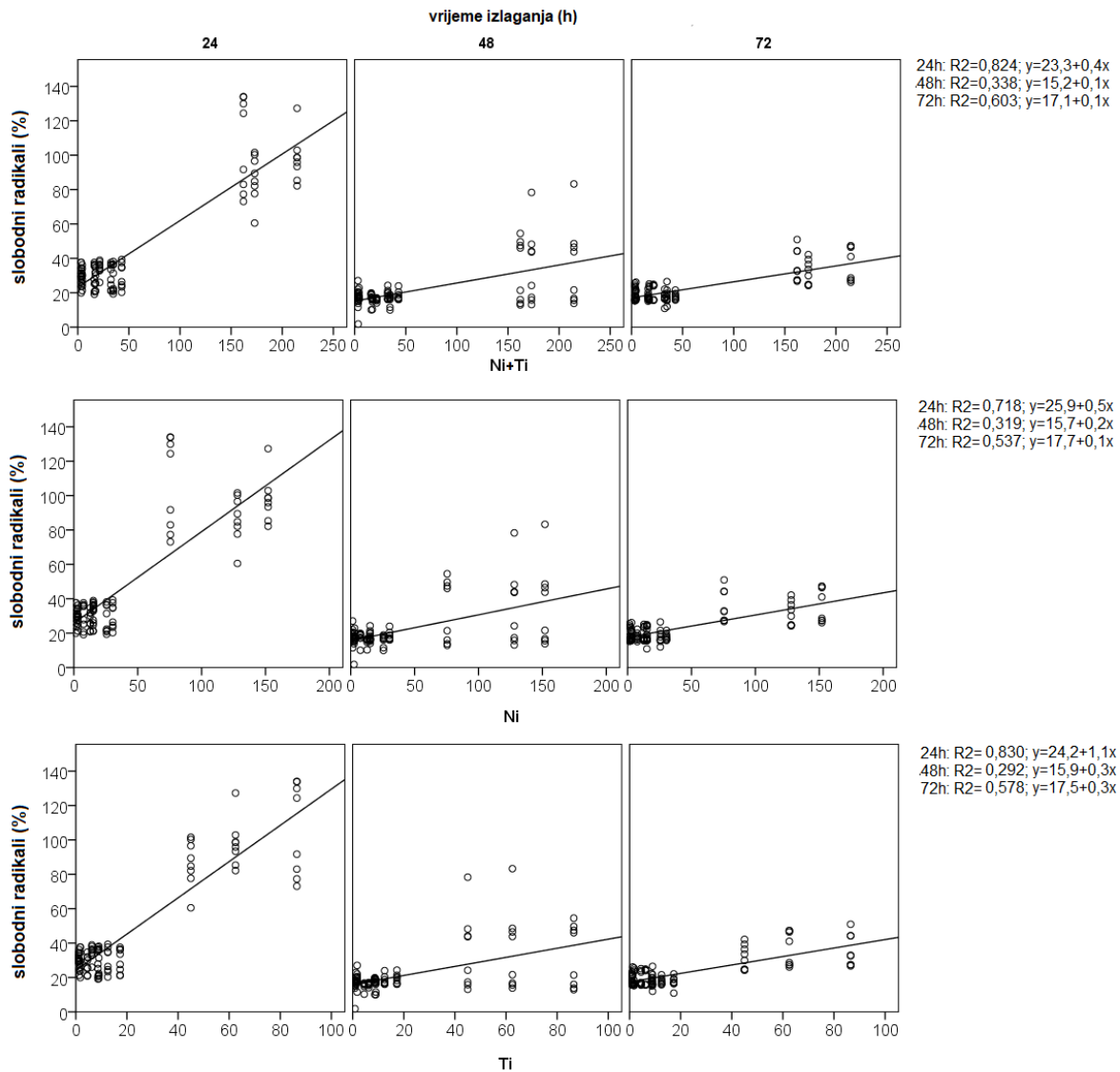
Slika 29. Linearna regresija za predikciju citotoksičnosti nikla (NiCl_2) i titana (TiO_2) na kulturama stanica u ovisnosti o vremenu ekspozicije

Značajni rast prisutnosti slobodnih radikala uz veliku snagu efekta bilježe stanice jezika kada je koncentracija oba metala zajedno barem 162 $\mu\text{g/L}$, a čine ju kombinacija od 75,5 $\mu\text{g/L}$ nikla i 86,5 $\mu\text{g/L}$ titana ili 128 $\mu\text{g/L}$ nikla i 44,9 $\mu\text{g/L}$ titana ($p < 0,001$; $\eta^2 = 0,362-0,891$; Slika 30). Udio radikala je određen kao umnožak fluorescencije i kvocijenta preživljavanja u odnosu na negativnu kontrolu. Nalaz je sličan i kod stanica jetre i crijeva no samo u vremenima izlaganja 24 i 48 sati ($p < 0,001$; $\eta^2 = 0,513-0,678$), ali ne i nakon izlaganja 78 sati. Ako se gleda zasebno svaki ion onda udio slobodnih radikala značajno raste nakon izloženosti koncentraciji od 75,5 $\mu\text{g/L}$ nikla i 44,9 $\mu\text{g/L}$ titana. Kod crijeva ioni titana već pri 17,30 $\mu\text{g/L}$ uzrokuju znatni porast radikala nakon 24 sata. Kao i prethodno, kod stanica jetre i crijeva nema značajnih razlika nakon izlaganja 72 sati. Kraće izlaganje izaziva stvaranje veće količine radikala (24 sata – 30-100%) nego duže izlaganje (48 i 72 sata – 10 do 40%). Vrijednost od 30,4 $\mu\text{g/L}$ nikla te 17,3 $\mu\text{g/L}$ titana u slini, koliko je najviše zabilježeno tijekom 14 dana ekspozicije, odnosno koncentracija oba metala zajedno od barem 42,3 $\mu\text{g/L}$ inducira uglavnom <50% radikala, i u kraćem i u dužem periodu ekspozicije.

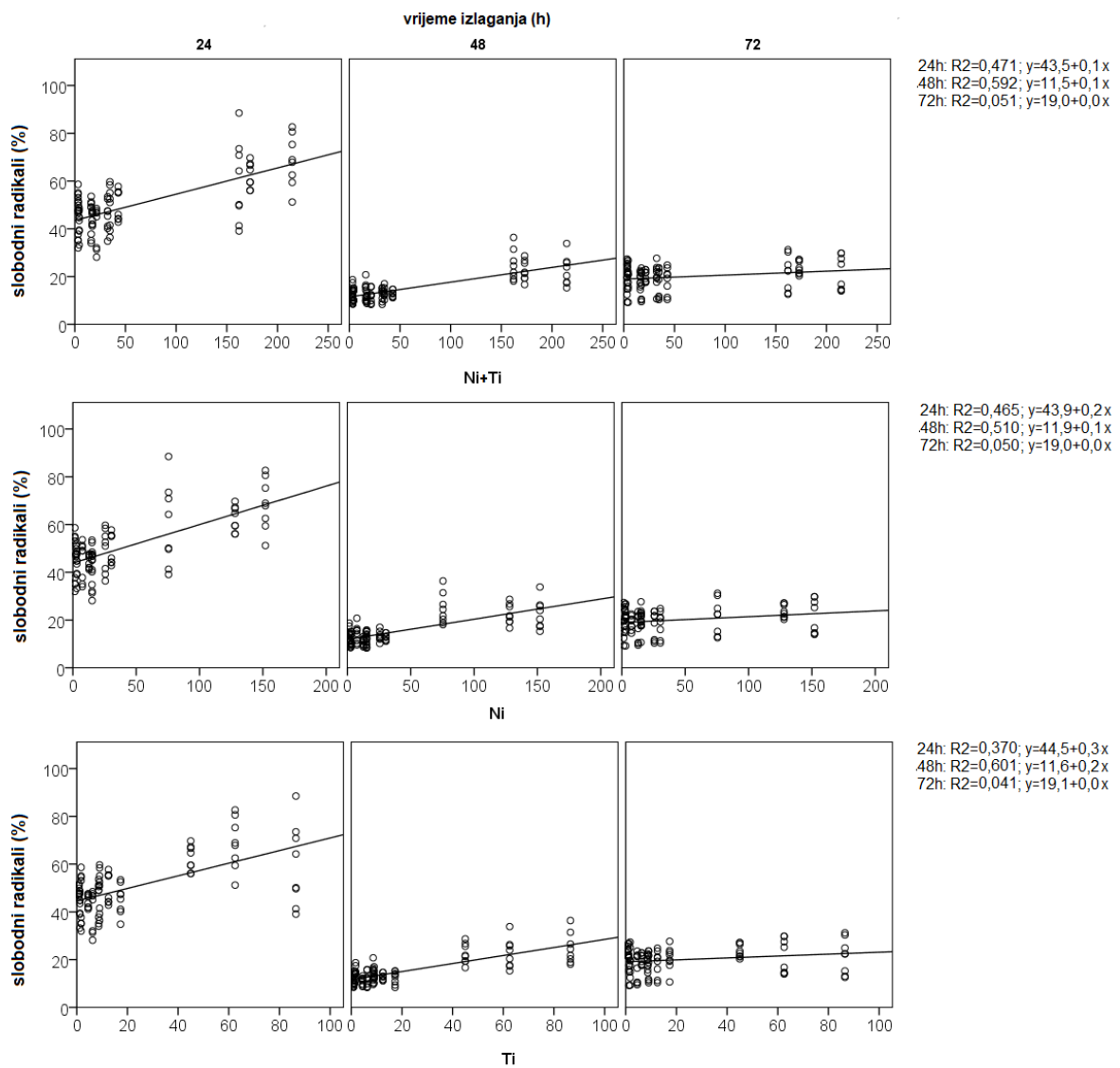


Slika 30. Usporedba prisutnosti slobodnih radikala u kulturama stanica izloženima slini s otpuštenim ionima nikla i titana tijekom vremena izlaganja

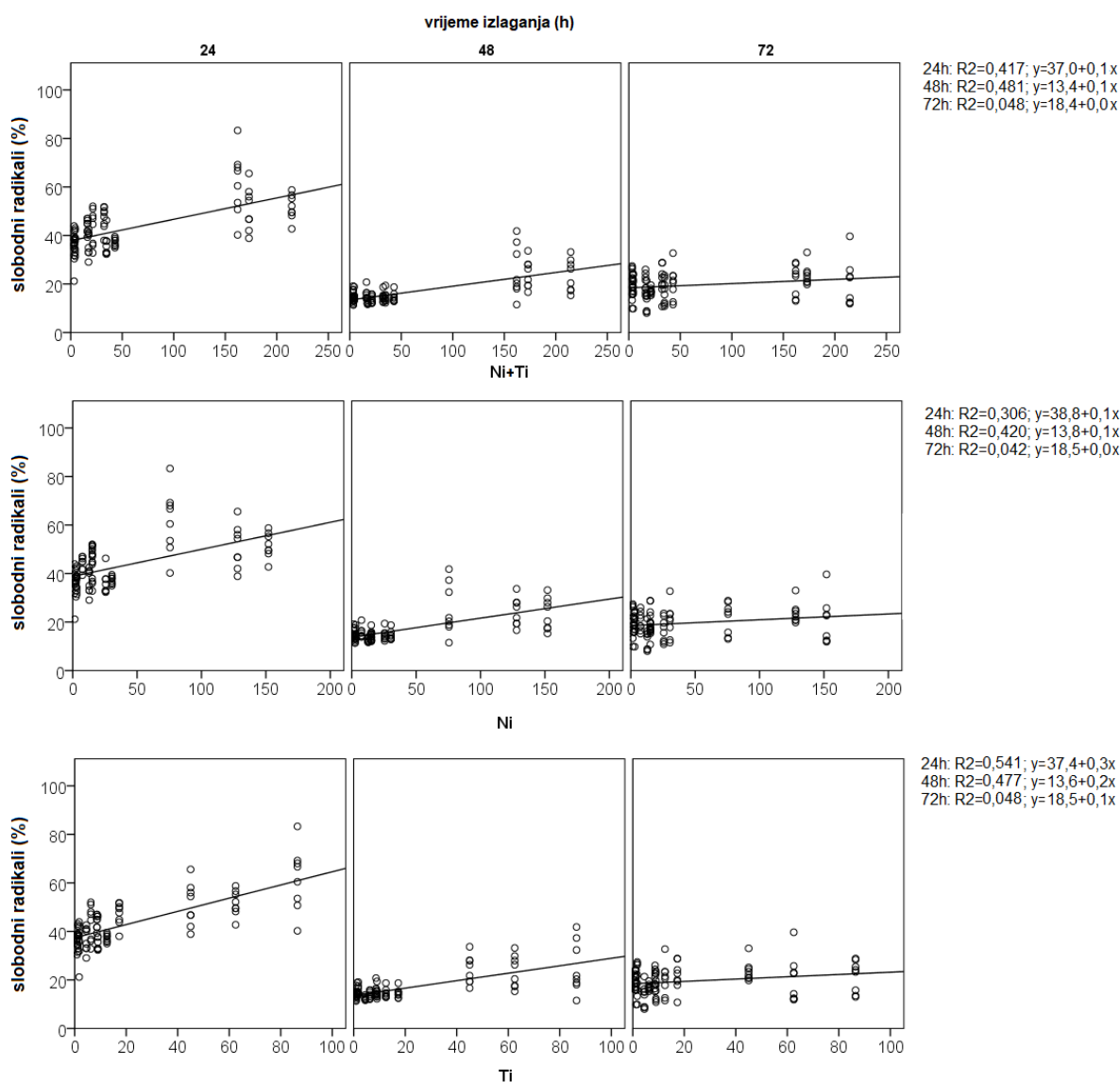
Vidljiv je linearni trend povećavanja prisutnosti radikala na svim kulturama stanica s povećanjem koncentracije nikla i titana (Slike 31-33). Korelacije su jače kod jezika, a podjednake u crijeva i jetre. a povećanje koncentracije titana nešto više povećava prisutnost radikala nego povećanje koncentracije nikla. Iz regresijskih jednadžbi vidljivo je da povećanje koncentracije titana za $1 \mu\text{g/L}$ povećava prisutnost radikala za 0,1-1,1 skalarnih boda, dok kod nikla za 0,1-0,5 boda (Slike 31-33).



Slika 31. Linearna regresija za predikciju prisutnosti radikala na kulturi stanica jezika temeljem otpuštenih iona nikla i titana iz NiTi lukova u slinu. Udio radikala je određen kao umnožak fluorescencije i kvocijenta preživljavanja u odnosu na negativnu kontrolu.



Slika 32. Linearna regresija za predikciju slobodnih radikala na kulturi stanica jetre temeljem otpuštenih iona nikla i titana iz NiTi lukova u slinu



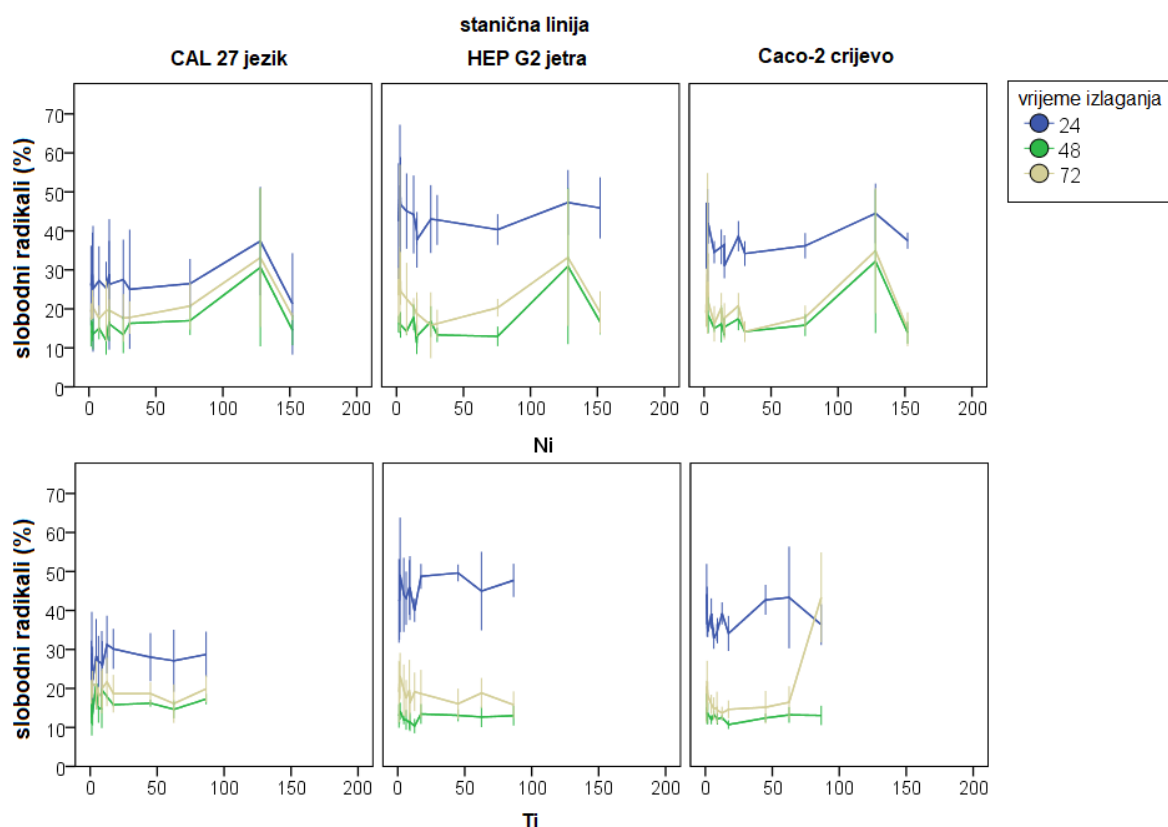
Slika 33. Linearna regresija za predikciju radikala na kulturi stanica crijeva temeljem otpuštenih iona nikla i titana iz NiTi lukova u slinu

Nikal i titan su podjednako značajni prediktori stvaranja radikala. Dodatak titana uglavnom povećava snagu modela povrh nikla no ne u velikom iznosu ($\Delta R < 0,1$). Veliki dio varijabiliteta je zajednički za oba metala, dok samostalno svaki metal objašnjava $< 10\%$ varijabiliteta. U tablici su prikazani rezultati regresijskih jednadžbi. Kada se gledaju sve regresijske jednadžbe opet je vidljivo je da povećanje koncentracije titana nešto više povećava stvaranje radikala nego povećanje koncentracije nikla. Iz regresijskih jednadžbi vidljivo je da povećanje koncentracije titana za $1 \mu\text{g/L}$ povećava stvaranje radikala za $0,1-0,8$ skalarnih boda, dok kod nikla za $0,1-0,2$ boda (Tablica 12).

Tablica 12. Rezultati linearne regresije za predikciju stvaranja radikala temeljem otpuštenog nikla i titana

kultura stanica	vrijeme ekspozicije	regresijska jednadžba	R2	p
jezik	24	$y=22,8+0,2 \times \text{Ni} + 0,8 \times \text{Ti}$	0,862	<0,001
	48	$y=15,2+0,1 \times \text{Ni} + 0,1 \times \text{Ti}^*$	0,339	<0,001
	72	$y=17,0+0,1 \times \text{Ni} + 0,2 \times \text{Ti}$	0,617	<0,001
jetra	24	$y=43,8+0,1 \times \text{Ni} + 0,1 \times \text{Ti}^*$	0,462	<0,001
	48	$y=11,4+0,0 \times \text{Ni} + 0,1 \times \text{Ti}$	0,622	<0,001
	72	$y=19,0+0,0 \times \text{Ni} + 0,0 \times \text{Ti}^{***}$	0,051	0,087
crijevo	24	$y=37,6+0,0 \times \text{Ni} + 0,3 \times \text{Ti}^{**}$	0,547	<0,001
	48	$y=13,3+0,0 \times \text{Ni} + 0,1 \times \text{Ti}$	0,499	<0,001
	72	$y=18,4+0,0 \times \text{Ni} + 0,0 \times \text{Ti}^{***}$	0,050	0,092

* titan nije značajni prediktor; ** nikal nije značajni prediktor; *** ni nikal ni titan nisu značajni prediktori.

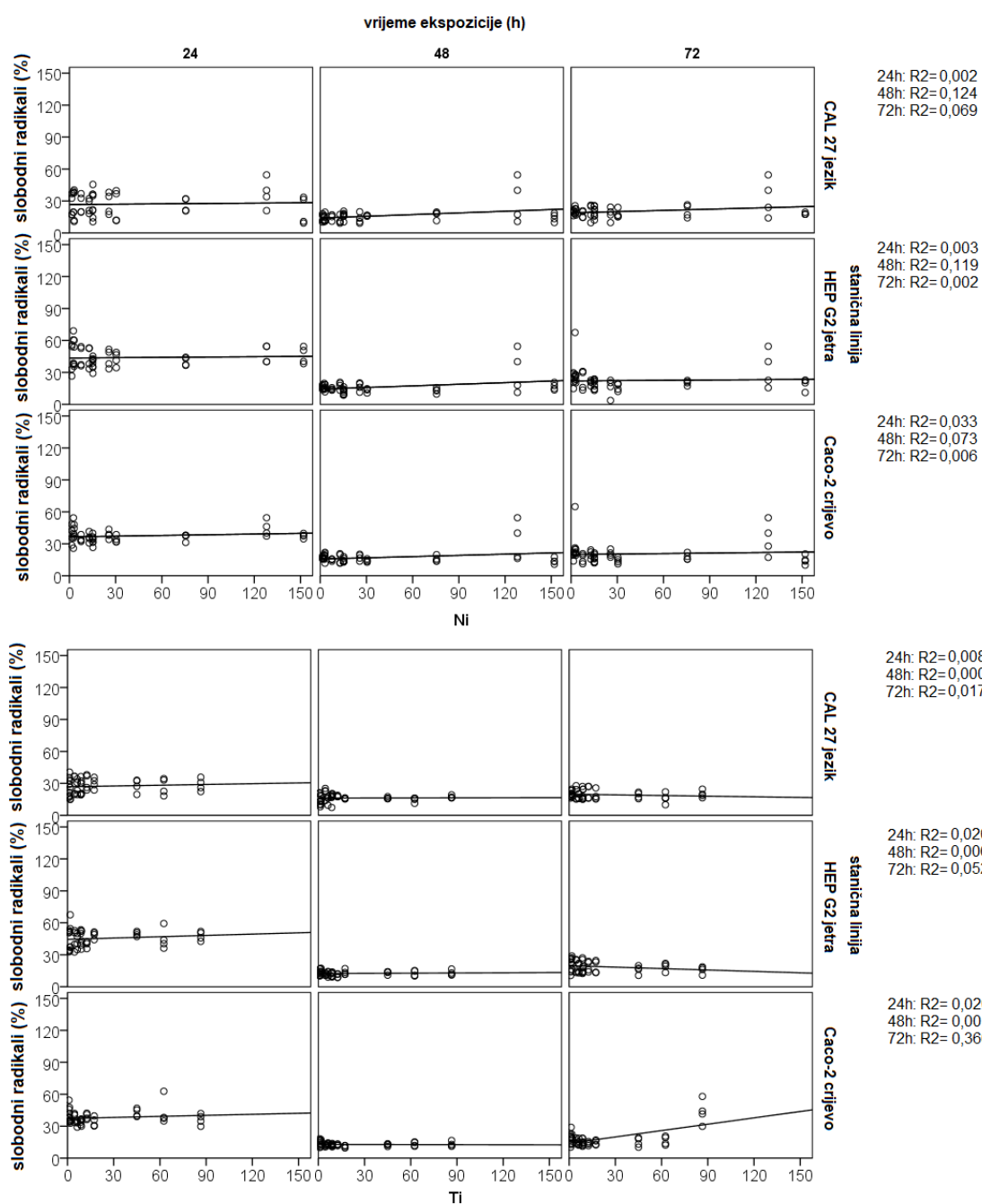


Slika 34. Usporedba prisutnosti slobodnih radikala u kulturama stanica izloženima ionima nikla (NiCl_2) i titana (TiO_2) tijekom vremena izlaganja stanica

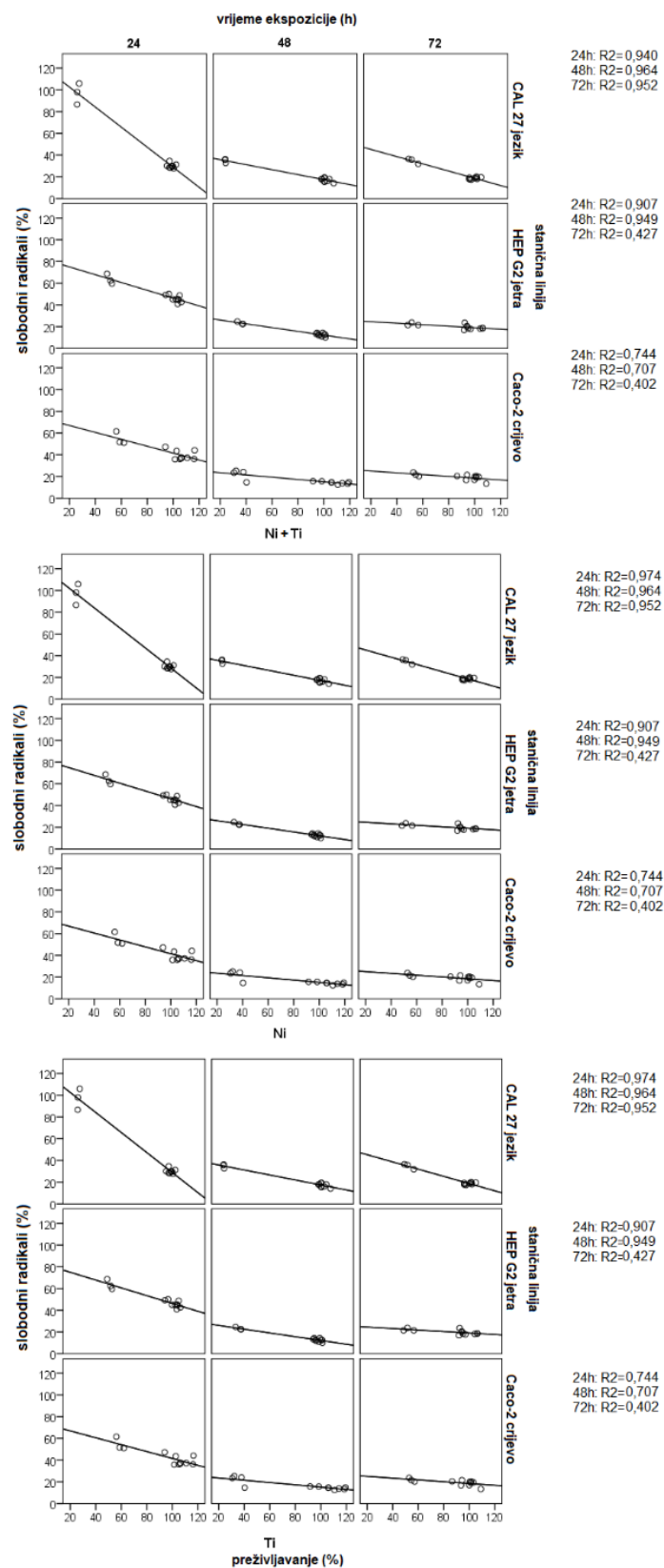
Izlaganje odvojeno niklu i odvojeno titanu dobivenima iz soli NiCl_2 i TiO_2 inducira stvaranje radikala u prosječnom iznosu 10-50% skalarnih poena. Kraće izlaganje (24 sata) inducira više radikala (Slika 34). U dužem periodu (48 i 72 sata) podjednaka je prisutnost radikala u sve tri kulture stanica, no u kraćem periodu (24 sata) manje radikala stvara se u kulturi stanica jezika (20-30%) u odnosu na stanice jetre i crijeva (30-50%).

Kada se gleda odnos radikala u stanicama nakon ekspozicije samom niklu ili samom titanu dobivenom iz soli NiCl_2 i TiO_2 korelacije su bile uglavnom slabe ili beznačajne (Slika 35). Koncentracija nikla je jedino korelirala s količinom radikala nakon 48 sata ekspozicije u svim kulturama stanica te nakon 72 sata u stanicama jezika, a korelacija je bila pozitivna. S porastom koncentracija iona rasla je količina radikala. Koncentracija titana je umjereno pozitivno korelirala s radikalima samo nakon 72 sata u stanicama crijeva ($r=0,6$). Nikal i titan dobiveni iz soli NiCl_2 i TiO_2 nisu jaki prediktori otpuštanja radikala.

Pearsonove korelacije ukazuju na jaku negativnu linearnu korelaciju između preživljavanja stanica i indukcije slobodnih radikala na sve tri stanične linije (Slika 36). Odnosno, s povećanjem koncentracije radikala povećava se citotoksičnost. Korelacija je uglavnom jaka, uglavnom jača kod stanica jezika, a slabija kod crijeva. Korelacija je podjednaka i kod nikla i kod titana. Nešto je slabija nakon duže ekspozicije (72 sata), tada je umjerena do jaka. U kraćem vremenu ekspozicije je jači pad preživljavanja s povećavanjem radikala nego u dužem periodu ekspozicije.



Slika 35. Linearna regresija za predikciju radikala induciranih niklom (NiCl_2) i titanom (TiO_2) na kulturama stanica u ovisnosti o vremenu ekspozicije



Slika 36. Korelacija preživljavanja stanica i prisutnosti radikala u ovisnosti o vremenu ekspozicije

5. RASPRAVA

5.1. Dinamika otpuštanja iona i mehanički učinak korozije

Dosadašnja istraživanja uglavnom su fokusirana na proučavanju promjene mehaničkih svojstava te korozivnog utjecaja sline, pH i fluorida na NiTi legure. No nedovoljno je istražen utjecaj oralnih antiseptika na svojstva NiTi lukova. Rezultati ovog istraživanja pokazali su kako je otpuštanje iona uslijed korozije i promjena mehaničkih svojstava ovisna o vrsti obloge kao i vrsti primijenjenog antiseptika.

Dinamika otpuštanja nikla i titana nakon izlaganja neobložene NiTi žice slini ukazuje na određeni obrazac. Najveće oslobađanje nikla vidljivo je prva tri dana, nakon čega pokazuje tendenciju opadanja. To potvrđuje da se nakon formiranja zaštitnog sloja titan oksida korozija žice smanjuje. Otpuštanje iona titana može se smanjivati, ali i povećavati tijekom izlaganja medijima što ukazuje da kontakt sa svježom slinom niskog pH može uzrokovati otapanje zaštitnog sloja. Stoga se zasebno gledalo otpuštanje iona titana po jedinici površine žice kao moguća mjera korozije zbog razaranja zaštitnog sloja titan oksida.

Nakon otapanja tog zaštitnog sloja, ponovno se javlja korozija i otpuštanje novih iona nikla, ali u manjem iznosu. Slično je izvještavano i u ranijim istraživanjima (76, 77). Općenito, iznos otpuštenog nikla iz NiTi žica nije dovoljan za izazivanje alergijske reakcije (34, 47, 78), ali nije zanemariv budući da se uz druge moguće izvore (tetovaže, nakit, metalna dugmad, patent zatvarači ili kozmetika) može akumulirati količina koja će dovesti do reakcije kod pacijenata s preosjetljivošću na nikal. Nikal je široko poznat kao kontaktni alergen. Podaci iz 2013./2014. pokazuju prevalenciju od 18,1% kontaktnih alergija na nikal u europskoj populaciji (79).

Dokazano je da nikal akumuliran u gingivi može uzrokovati gingivalnu hiperplaziju (36). Iako se dugo vremena smatrao biokompatibilnim metalom, istraživanja jasno pokazuju kako dolazi do otpuštanja iona titana iz dentalnih i medicinskih implantata s indicijama da ioni titana mogu penetrirati kroz oralnu mukozu (57, 58, 80).

Poznavanje dinamike otpuštanja iona i utjecaj pojedinih antiseptika na njihovo otpuštanje omogućit će terapeutu prevenciju neželjenih alergijskih reakcija. Stoga se istraživanje treba proširiti na proučavanje oslobađanja iona titana u interakciji s antisepticima tijekom duljeg vremenskog razdoblja.

Ova ponavljajuća korozija različitog intenziteta, uvjetovana dinamikom otpuštanja iona, u određenoj mjeri mijenja radna svojstva ortodontskih NiTi žičanih lukova. Ona se

manifestiraju u promjeni fleksibilnosti, rezilijencije te iznosa sile u opterećenju i rasterećenju što ukazuje da već sama slina reducira elastična svojstva neobložene NiTi žičane luka. Prethodno je izvještavano kako sama slina može značajno promijeniti svojstva žice u opterećenju i rasterećenju, iako to ovisi o proizvođaču žice (81).

Izloženost antiseptičkoj otopini dodatno oštećuje zaštitni sloj titan oksida, a najveće promjene se uočavaju u interakciji s Gengigelom, antiseptikom na bazi hijaluronske kiseline. Svako novo izlaganje antiseptiku dodatno oštećuje zaštitni sloj. Međutim, to neće značajno promijeniti dinamiku i količinu otpuštenih iona nikla jer se u kratkom vremenu stvara novi sloj zaštitnog TiO_2 . Iako je hipoteza bila da će oralni antiseptici utjecati na daljnje pogoršanje elastičnih svojstava neobložene žice, to nije dokazano ovim istraživanjem. Oralni antiseptici imaju sličan ili čak manji utjecaj na ta svojstva. Gengigel ima najveći učinak što je u skladu s rezultatima dinamike otpuštanja iona. Promjene su više vidljive tijekom opterećenja nego rasterećenja.

Za ortodontski pomak zuba važna je sila koja se oslobađa za vrijeme rasterećenja i tom silom žica djeluje kod vraćanja u prvobitan oblik. Ona ima utjecaj na parodontni ligament i biomehaniku pomaka zuba (1). Stoga, tijekom terapije neobloženim NiTi lukovima svi testirani antiseptici mogu se koristiti bez rizika od mijenjanja radnih svojstava lukova. Hipotezu o većem smanjenju elastičnih svojstava u rasterećenju kod interakcije s antiseptikom na bazi alkohola i eteričnih ulja te najmanjem smanjenju kod interakcije s onim na bazi hijaluronske kiseline, nismo potvrdili kod neobložene žice.

Curasept baziran na klorheksidinu imao je najmanji utjecaj na mehanička svojstva i umjeren utjecaj na dinamiku otpuštanja iona te bi bio najprikladnija opcija za primjenu uz neobloženu NiTi žicu. Prethodno je izvještavano kako preparati na bazi klorheksidina nemaju značajan utjecaj na mehanička svojstva žica kao ni na površinsku hrapavost i trenje (82).

Kao što je pretpostavljeno prevlake na NiTi žicama utječu na koroziju, međutim taj je utjecaj manji od utjecaja oralnih antiseptika. Kod rodiranih NiTi žica otapanje TiO_2 sloja veće je u interakciji s antisepticima nego u samoj slini. To je vidljivo kod primjene otopine Listerine i Curasepta, antiseptika na bazi alkohola i klorheksidina iako to ne mijenja značajno dinamiku i iznos otpuštanja iona nikla. Listerine smanjuje elastična svojstva žice više od same sline. Uzrok povećane brzine korozije kod rodirane žice vjerojatno je posljedica lokalizirane korozije na mjestu na kojem je prevlaka porozna (83). Nitrifikacija žice ne smanjuje značajno utjecaj antiseptika na dinamiku otpuštanja iona titana, iako je prethodno izveštavano o titan nitridnom zaštitnom sloju koji djeluje kao zaštita od korozije (84). Količina otpuštenih iona nikla nešto je veća nakon što se primjeni Listerine što rezultira pogoršanjem elastičnih

svojtava te oslobađanjem slabijih sila u rasterećenju. To podrazumijeva da nitrirani lukovi nakon interakcije s otopinom Listerine ne mogu povratiti svoj originalni oblik. Dakle, kod nitriranih NiTi žica potvrđena je hipoteza o smanjenju elastičnih svojstava u rasterećenju kod primjene antiseptika na bazi alkohola i eteričnih ulja. Ranije je izvještavano o povećanom otpuštanju metalnih iona u slinu nakon izlaganja oralnim antisepticima koje je veće kod onih baziranih na alkoholu ili fluoridima nego na klorheksidinu, dok je najmanje u vodenoj otopini biljnih ekstrakata (85 – 88). No, prethodno je i izvještavano da eterična ulja mogu smanjiti otpornost na koroziju NiTi legura (88). Otpuštanje iona također može biti povezano s mikrostrukturom same žice (89).

Razlika u otpornosti na koroziju između različitih tipova oralnih antiseptika mogla bi biti i posljedica njihove pH vrijednosti. Listerine s pH 4,4 smanjuje otpornost na koroziju više od Curasepta koji je pH 5,7. Po nekima je najvažniji čimbenik reduciranja sila u rasterećenju žice pH vrijednost, a ne samo profilaktičko sredstvo (90, 91). Kiseliji medij općenito više utječe na smanjenje radne sile ortodontske naprave (70).

Slično kao i kod neobložene žice, Curasept bi se mogao preporučiti kao oralni antiseptik uz rodirane i nitrirane žice zbog slabog utjecaja na mehanička svojstva i umjerenog utjecaja na dinamiku otpuštanja iona.

Osim smanjene pH vrijednosti, otpornost na koroziju također je uvjetovana sastavom proteina sline i visokim koncentracijama fluoridnih iona (92,93). Sve testirane otopine sadrže fluoride, Listerine i Gengigel u manjoj koncentraciji od Curasepta. Prema nekim istraživanjima primjena topikalnih fluorida za vrijeme ortodontske terapije može utjecati na mehanička svojstva NiTi žica (46, 73, 94, 95) dok druga poriču takav utjecaj (96, 97). Glavni je razlog degradacije radnih svojstava žičanih lukova apsorpcija vodika (98). Krutost žice tada je značajno smanjena (99). Ponekad se elastičnost može promijeniti od fleksibilnog u fragilno, a čvrstoća smanjiti tako da postanu sklone pucanju (100).

Izgleda da je fluorovodična kiselina, koja je produkt interakcije fluorida i pH, bolji prediktor otpuštanja iona iz NiTi legura nego sama koncentracija fluorida ili pH profilaktičkog sredstva (65).

Budući da Curasept najmanje mijenja mehanička svojstva ortodontskih žica, možemo ga smatrati najviše pouzdanim antiseptikom za primjenu kod pacijenata koji su u terapiji fiksnim ortodontskim napravama koje sadrže NiTi legure. Najmanju otpornost na koroziju i najveći utjecaj na smanjenje mehaničkih svojstava pokazao se kod primjene otopine Listerine. Posebno je važan ovaj podatak kod primjene nitriranih lukova.

Ako bi se željelo minimalizirati smanjenje poželjnih mehaničkih svojstava NiTi žica, potrebno je izabrati odgovarajuće antiseptičko sredstvo za svaku vrstu NiTi žice. Ipak, promjene izazvane antisepticima male su i ne bi imale veliki klinički značaj.

5.2. Korozijski mehanizmi

Elektrokemijska testiranja ukazuju da se korozijska ortodontske NiTi legure javlja već u samoj slini. U prisutnosti antiseptika dolazi do mijenjanja korozijske otpornosti NiTi legure. Javlja se uglavnom ubrzanje opće te pojava lokalizirane korozijske, a ovisna je o vrsti obloge. Ciklička polarizacija omogućava dobivanje informacija o korozijskom ponašanju materijala i korozijskom mehanizmu, prvenstveno analizu tendencije prema lokaliziranoj, jamičastoj korozijskoj. Nakon pucanja pasivnog oksidnog filma iz oblika povratne polarizacijske krivulje može se zaključiti o vjerojatnosti za pojavu jamičaste korozijske. Materijali koji pokazuju nižu vrijednost pucanja pasivnog oksidnog sloja i repasivacijskog potencijala skloniji su nastanku jamičaste korozijske jer lakše nastaju lokalizirana oštećenja na leguri. Također oni koji imaju veću razliku između pucanja pasivnog sloja i korozijskog potencijala manje su skloni lokaliziranoj korozijskoj. Odnos između potencijala pucanja i repasivacije mora se uzeti u obzir jer na potencijalu repasivacije dolazi do obnavljanja oštećenog pasivnog filma. Stoga, što je manja razlika lakše se popravlja oštećenje i manja je vjerojatnost da će se pojaviti lokalizirana korozijska u stvarnim uvjetima.

Kod neobložene žice ne postoji značajna razlika u izgledu polarizacijske krivulje u umjetnoj slini i onih u antiseptičkim otopinama. U antiseptičkim otopinama vidljiv je pomak korozijskog potencijala prema negativnim vrijednostima. Antiseptik baziran na klorheksidinu (Curasept) i eteričnim uljima u alkoholnoj bazi (Listerine) producira nešto veću gustoću korozijske struje kod neobložene žice nego antiseptik baziran na hijaluronskoj kiselini (Gengigel). Tendencija prema jamičastoj korozijskoj ni u jednom mediju nije dokazana. Iako je kod Gengigela smanjen potencijal popuštanja, prati ga manja korozijska i mogućnost repasivacije što upućuje da ovaj antiseptik ne povećava mogućnost nastanka lokalizirane korozijske.

Nitriranje površine usporava korozijsku u slini, odnosno čini žicu otpornijom prema općoj korozijskoj. No ne čini ju otpornijom prema lokaliziranoj korozijskoj jer je sklonost slična kao i kod neobložene žice što je izvještavano ranije (101). Nitriranje je jedan od najvažnijih postupaka površinske termokemijske obrade. Temelji se na implantiranju, odnosno difuziji dušika u površinski sloj čime se postiže visoka tvrdoća, poboljšanje otpornosti na trošenje i zamor te bolja korozijska otpornost (102). NiTi žice s nitridnom prevlakom na svojoj površini imaju i sloj TiO_2 preko sloja TiN zbog prirodne sklonosti titana prema formiranju pasivnog sloja (103). Kod rodiranih žica, slično kao i nitriranih, Listerine i Curasept povećavaju gustoću

korozijske struje, osobito Curasept. Listerine i slina induciraju veću tendenciju prema lokaliziranoj koroziji zbog manje razlike između korozijskog potencijala i potencijala pucanja te neobnavljanja oštećenog oksidnog sloja. S druge strane kod Curasepta i Gengigela moguća je repasivacija oštećenih mjesta. Prema tome, ovo potvrđuje da rodiranje površine u odnosu na neobloženu žicu ili nitriranje površine povećava tendenciju prema općoj i lokaliziranoj koroziji. Rodiranjem se nanosi tanki sloj rodija i zlata na površinu žice što rezultira boljom estetikom žice, no time se očito ne poboljšava korozijska otpornost. Razlog povećane brzine korozije nastanak je galvanske ćelije između plemenite obloge i NiTi podloge zbog poroznosti obloge (83). Pri tome obloga postaje katoda, a bazni materijali anoda. Stoga se korozijski procesi događaju lokalno, na mjestima na kojima je obloga porozna (84).

Vrijednosti brzine korozije za neobloženu NiTi žicu nalaze se između vrijednosti dviju spomenutih žica. Neobložena i nitrirana žica ne pokazuju sklonost prema lokaliziranoj koroziji stoga bi bile bolja opcija za ortodontsku terapiju kod osoba sklonih općenito alergijama, a nemaju potvrđenu alergiju na nikal.

Evidentno je da obloga modificira utjecaj antiseptika na NiTi leguru. Gengigel je općenito najmanje agresivan za sve vrste NiTi žica. To se može povezati s činjenicom da je Gengigel medij s najvećom pH vrijednosti i najmanjom koncentracijom fluorovodične kiseline. Njegov je pH veći i od umjetne sline i čini se da to umanjuje korozivan učinak fluorida.

Kod nitriranih uzoraka Listerine i Curasept povećavaju brzinu opće korozije u odnosu na isti uzorak u slini. Međutim, Listerine poboljšava otpornost prema lokaliziranoj koroziji. Pojava lokalizirane korozije nešto je vjerojatnija kod Gengigela u usporedbi s drugim medijima, ali pokazuje najnižu stopu opće korozije. Moguće je da neke od organskih komponenti Gengigela adheriraju na površinu žice i time inhibiraju opću koroziju. S druge strane omogućuju lakše pucanje pasivnog filma na nezaštićenim mjestima.

Listerine i Curasept dovode do povećanja opće korozije kod rodirane žice, posebno Curasept. Prisutnost pukotina u oblozi žice omogućuje pojavu lokalizirane korozije u slini i otopini Listerine. Ispitivanja su pokazala da kod Curasepta i Gengigela postoji mogućnost obnavljanja oštećenog oksidnog sloja. S obzirom na prisutnost oštećenja u samoj rodiranoj prevlaci, može se pretpostaviti da dolazi do punjenja pora Curaseptom i Gengigelom. Objašnjenje bi moglo biti da se pore ispune korozijskim produktima ili da organske komponente antiseptičkog sredstva adheriraju na površinu metala i time usporavaju njegovu koroziju. Dvostruko veći iznos korozije kod Curasepta čini ovaj antiseptik manje prikladnim izborom uz rodiranu žicu, a Gengigel optimalnim izborom. Na temelju provedenih analiza

korozije, jasno je da je Gengigel optimalna opcija za korištenje kod neobloženih i obloženih NiTi žica dok bi Listerine i Curasept trebali izbjegavati. Listerine je kemijski najagresivniji jer mu je pH najveći i koncentracija njegove fluorovodične kiseline naveća je među testiranim antisepticima, 8x veća od Curasepta, a 62x veća nego kod Gengigela. Listerine u svom sastavu ima etanol koji bi dodatno mogao povećati njegovu korozivnost.

Prethodno je već objavljeno kako Listerine inducira najmanji otpor i najveću brzinu korozije NiTi slitina, veću od antiseptika na bazi klorheksidina (9). Dosadašnje studije također su pokazale kako fluoridni ioni, oslobođeni iz antiseptika ili drugih preparata za remineralizaciju cakline mogu dodatno, u uvjetima snižene pH vrijednosti, pomaknuti korozijski potencijal prema negativnim vrijednostima te dovesti do otapanja zaštitnog titan oksidnog sloja (39, 45, 66).

Kao što je već prethodno navedeno, izgleda da korozija bolje korelira s koncentracijom fluorovodične kiseline nego s pH ili fluoridima pojedinačno (66). Profilaktička sredstva na bazi fluorida osim što smanjuju korozijsku otpornost, povećavaju površinsku hrapavost i trenje kod ortodontskih lukova (33).

Curasept je umjeren medij jer je manje kiselog od preparata Listerine i nešto kiselij od Gengigela, a većeg je sadržaja fluorida. Gengigel je kemijski najblagotvorniji jer je hijaluronska kiselina blaga organska kiselina, pH je najbliži neutralnom, ima nizak sadržaj fluorida i najnižu koncentraciju fluorovodične kiseline. Zbog protuupalnog i bakteriostatskog efekta te antioksidacijskih svojstava, primjenjuje se kao pomoćno sredstvo u terapiji gingivitisa. Učinak mu je sličan klorheksidinu (104). Do sada u radovima nije izvještavano o utjecaju hijaluronske kiseline na korozijsku stabilnost ortodontskih legura, no dokazano je da povećava otpornost na koroziji CoCrMo legura koje se koriste u ortopediji (105).

Najmanji stupanj korozije daleko je najmanji kod antiseptika koji se temelje na vodenim otopinama biljnih ekstrakata, koji su također manje kiseli (106). Ovo je u skladu sa studijom koja izvješćuje veću količinu otpuštenih iona iz ortodontskih bravica nakon izlaganja antiseptičkim otopinama na osnovi klorheksidina u usporedbi s drugim antisepticima baziranim na biljnim ekstraktima i cetilpiridinijevim kloridima (107).

Oslobađanje iona titana u osnovi je povezano nalazima opće brzine korozije nego s pojavom lokalizirane korozije. Korozija neobložene slitine NiTi u slini generira Ni^{2+} i Ti^{4+} , no ioni titana pretvaraju se u TiO_2 pa je općenito određeno više nikla. Transformacija sloja nitrida u oksid kod slitine obložene nitridom u slini može dovesti do većeg oslobađanja Ti^{4+} u usporedbi s neobloženom slitinom izloženoj slini. Veće oslobađanje Ti^{4+} u slitini obloženoj

rodijem u slini, u usporedbi s neobloženom u istom mediju, vjerojatno je posljedica povećane brzine korozije uzrokovane nastankom galvanskog članka između plemenitog sloja i neplemenite baze. Antiseptici otapaju zaštitni sloj, pri čemu se oslobađaju novi Ti^{4+} u većoj količini nego u slini. Veće oslobađanje Ti^{4+} pri svim antisepticima u usporedbi sa slinom vjerojatno je uzrokovano ionima fluorida iz antiseptika koji su ostali u otvorima ili porama na površini metala, što uzrokuje veće oslobađanje Ti^{4+} . Treba naglasiti da su mjerenja otpuštanja iona izvedena na način da su, nakon kratke izloženosti antiseptiku, žice položene u umjetnu slinu u kojoj je ispitivano otpuštanje iona simulacijom stvarnih uvjeta primjene. Stoga elektrokemijska mjerenja ispituju korozijsko ponašanje žica u antisepticima, dok mjerenja ionskog otpuštanja otkrivaju rezultira li izloženost antisepticima oštećenjem površinskog sloja koji bi mogao dovesti do većeg otpuštanja iona. Tako se ovim eksperimentalnim metodama dobivaju različite informacije.

5.3. Biološki utjecaj otpuštenih iona nikla i titana

Ioni metala otpušteni oralnom korozijom dentalnih legura ulaze u biološki sustav usne šupljine i interferiraju s okolnim tkivom. Ovo istraživanje ukazuje da ioni nikla i titana iz ortodontskih naprava otpušteni tijekom mjesec dana nemaju veliki biološki utjecaj. Svaki tip iona samostalno ne inducira veliki citotoksični efekt, no njihova kombinacija može u većim koncentracijama izazvati umjerenu do jaku citotoksičnost.

Među raznim testovima za utvrđivanje biokompatibilnosti materijala, citotoksičnost se preferira kao prvi test probira i biološkog vrednovanja medicinskih naprava zbog svoje jednostavnosti, brzine i osjetljivosti. Takvi testovi koriste tkivne stanice *in vitro* za proučavanje staničnog rasta, reprodukcije i morfoloških utjecaja medicinskih naprava (108). Prema Međunarodnoj organizaciji za standardizaciju procjena preživljavanja, odnosno vijabilnosti stanica jedan je od prvih testova za inicijalno vrednovanje biokompatibilnosti. Rezultati dobiveni *in vitro* analizom mogu biti indikativni za efekte zabilježene *in vivo*, iako prisustvo citotoksičnog efekta *in vitro* ne znači da je materijal toksičan za *in vivo* primjenu. Razlog su tome uvjeti laboratorijskih testiranja koji su znatno različiti od kompleksne oralne okoline (5). Ipak, odsustvo citotoksičnog efekta jamstvo je dobrog kliničkog odgovora (109).

Primjenom različitih koncentracija ispitivanih otopina željelo se odrediti koji je graničnik pojave citotoksičnosti i indukcije slobodnih radikala. Kako bi se simulirao cijeli probavni put s kojim otpušteni ioni mogu interferirati, izabrane su linije stanica koje su obuhvatile tri dijela probavnog sustava: usnu šupljinu, jetru i crijevo. Prema našem istraživanju izloženost samo niklu do 152 µg/L još ne izaziva značajnu citotoksičnost kao ni izloženost titanu do 86,5 µg/L, već se kod niskih koncentracija bilježi čak stimulacija rasta stanica. Slični efekt stimulacije rasta pri niskim koncentracijama izvještavan je i ranije, no potrebne su stotinu puta više koncentracije kako bi izazvale morfološke promjene na stanicama te smanjenje staničnog rasta na kulturi mišjih fibroblasta (15 000 – 30 000 µg/L) (110). No, naše istraživanje ukazuje da do umjerene do jake citotoksičnosti te značajnije indukcije slobodnih radikala dolazi kad je prisutna kombinacija metala kod kojih je koncentracija nikla i titana zajedno barem 162 µg/L, minimalno 75,5 µg/L nikla i 44,9 µg/L titana. No, potrebna je kombinacija koju čini 75,5 µg/L nikla i 86,5 µg/L titana ili 128 µg/L nikla i 44,9 µg/L titana. Nalaz je jednak na sva tri ispitivana dijela probavnog sustava: usna šupljina i crijevo u kojem se metali mogu resorbitati te jetra u kojoj se nakupljaju i u kojoj se provodi detoksikacija. Prethodno je potvrđeno da metali mogu imati singergistički efekt, ne samo citotoksični već i genotoksični i mutageni (111). Prethodna istraživanja potvrđuju blaži do umjereni citotoksični

učinak ortodontskih naprava na kulturama stanica košnog i vezivnog tkiva (35, 112 – 115). Iako su metodološki različita, citotoksičnost je kod većine dokazana i kvalificirana se kao blaga do umjerena. Taj podatak nije zanemariv, ako se uzme u obzir da su neka rađena na ortodontskim lukovima, a neka na simulaciji fiksne naprave koju pored lukova čine i bravice i tubice koje također otpuštaju korozijske produkte u usnu šupljinu. Njihov kumulativni učinak može utjecati na jače oštećenje stanica.

Ako se podaci o otpuštanju iona po jedinici površine uslijed izlaganja slini te oralnim antisepticima tijekom mjesec dana, dobiveni u ovom istraživanju, preračunaju u koncentraciju iona za dva luka što je simulacija kliničkog uvjeta, dolazi se do raspona 1,2 – 39,6 $\mu\text{g/L}$ za nikal te 0,4 – 66,9 $\mu\text{g/L}$ za titan. Znači ni nakon mjesec dana i izaganja antisepticima ne bi se postigla značajna citotoksičnost, već blaža do umjerena. Ipak metalni ioni mogu se nakupljati u tkivu uz leguru nikla te prelaziti i koncentraciju višestruko veću ($0,6 - 47 \times 10^6 \mu\text{g/L}$) od najveće zabilježene tijekom 24 dana u našem istraživanju (116).

Oba metala kad su zajedno prisutna značajni su prediktori citotoksičnosti. Povećanje njihove koncentracije linearno povećava citotoksičnost, no stopa je veća kod titana nego kod nikla. Ovo istraživanje ukazuje da povećanje koncentracije titana za 1 $\mu\text{g/L}$ smanjuje preživljavanje za 0,3 – 0,9 skalarnih boda, dok kod nikla za 0,2 – 0,4 boda.

Korelacije ukazuju da je citotoksični učinak u velikom dijelu rezultat indukcije slobodnih radikala, a u manjem dijelu je to posljedica nekog drugog mehanizma koji inhibira diobu stanica ili uzrokuje njihovo odumiranje. Izgleda da je veće stvaranje radikala nakon kraćeg perioda ekspozicije, dok nakon 48 sati dolazi do smanjivanja količine radikala vjerojatno uslijed do reparatornih mehanizama stanice. Tome u prilog ide i nalaz da je u dužem periodu korelacija radikala i citotoksičnosti slabija nego u kraćem periodu. Izgleda da titan nešto više nego nikal inducira oksidacijski stres. Zanimljivo je da je korelacija radikala i citotoksičnosti jača kod stanica jezika, a slabija kod crijeva. Također veći efekt je zajedničkog djelovanja nikla i titana iz sline na jezik nego na stanice ostatka probavnog trakta.

Potvrđeno je da metalni ioni mogu inducirati promjene od permeabilnosti membrane do oksidacijskog stresa te nepoželjno djelovati na genetski materijal (117). Oštećenje DNA i nakupljanje metala u stanicama oralne sluznice utvrđeno je kod pacijenta u ortodontskoj terapiji čija je sluznica bila u kontaktu s čeličnim lukovima i lukovima bez nikla u vremenu od 30 dana (118). Poznato je da neki od teških metala koji se koriste u proizvodnji ortodontskih lukova imaju citotoksični potencijal. Tako željezo, kroma, kobalt i bakar prolaze kroz redoks ciklus i izravno formiraju slobodne radikale, dok ih kadmij, nikal, živa i olovo stvaraju neizravno (119).

Unutar stanice slobodni radikali nastaju tijekom uobičajenih staničnih procesa ili mogu biti inducirani egzogenim fizikalnim ili kemijskim agensima (120). Slobodni su radikali toksični međuproizvodi koji nastaju nepotpunom redukcijom kisika, zbog čega se nazivaju i kisikovi slobodni radikali. Hidroksilni radikali najreaktivnija su poznata vrsta reaktivnog oblika kisika (121). Oksidacijsko-redukcijski procesi kontrolirani su antioksidansima i reparatornim sustavima koji ih drži u ravnoteži (120). Višestruko nezasićene masne kiseline koje nalazimo u membrani stanica česta su meta slobodnih radikala koji dovode do lipidne peroksidacije, a ona za posljedicu ima narušavanje cjelovitosti stanične membrane. Oštećenje lipida određuje se mjerenjem količine malondialdehida. Gvanin u DNA ciljno je mjesto napada malondialdehida što može dovesti do genotoksičnosti (122).

Suprotno očekivanjima, iznos citotoksičnosti u stanicama nakon pojedinačne ekspozicije samom niklu ili samom titanu dobivenim iz soli NiCl_2 i TiO_2 i u najvećim koncentracijama u ovom istraživanju nije koreliralo s citotoksičnosti, a ako se pojavila citotoksičnost bila je blaga. Moguće je da direktno izlaganje korozivskih produkata koji sadržavaju sve otpuštene ione pokazuju snažniju interferencu sa staničnim metabolizmom i posljedično oštećenje stanice, nego pojedinačno eksponiranjem jednom metalu i bolja su simulacija realnih uvjeta. Naravno, ne smijemo isključiti i mogući pogrešni izbor soli koje nisu bila dobra aproksimacija realnog stanja pa su i rezultati drugačiji od očekivanih. Nikal klorid najčešće se koristi za ispitivanje citotoksičnosti nikla na kulturama stanica, no titan se uglavnom ispituje u obliku nanočestica (111, 123 – 127).

Nikal je svepristupan, a osim vodom (uglavnom $<10\mu\text{L}$ u vodovodnoj vodi), u tijelo ga unosimo kozmetikom, nakitom, tetovažama, ali i hranom do 0.2 mg/dnevno (kava, čaj, špinat, kupus, krumpir) (128).

U prethodnim radovima dokazana su citotoksična svojstva nikla (129 – 131). Nikal se smatra glavnim razlogom citotoksičnosti NiTi lukova koji inducira inhibiciju proliferacije te smanjuje preživljavanje stanica humanog osteosarkoma i keratinocita ovisno o dozi i vremenu ekspozicije (132). Veću citotoksičnost od nikla na stanicama humanih gingivnih fibroblasta imaju srebro, bakar i kobalt, a manju željezo (124).

Izgleda da ioni nikla interferiraju sa staničnim metabolizmom i funkcijom, a citotoksičnost im je povezana s indukcijom povećane proizvodnje unutarstanične laktat-dehidrogenaze, povećanim formiranjem radikala, utjecajem na redoks ravnotežu, padom potencijala membrane mitohondrija, trošenjem antioksidansa glutaciona, oštećenjem membrane lizosoma, staničnom proteolizom i aktivacijom kaspaze-3, enzima koji ima važnu ulogu u smrti stanice (123, 133, 134). Nikal može igrati i ulogu u urođenom imunološkom odgovoru na metalne

biomaterijale (125). Osim citotoksičnog on ima i genotoksični i kancerogeni potencijal što uključuje oksidacijski stres, pucanje DNA veza, mutacije, kromosomske oštećenje, transformaciju stanica i poremećaj popravka DNA (129).

Titan se smatra relativno inertnim te vrlo otpornim na koroziju zbog formiranja zaštitnog TiO₂ spoja na površini legure (135). TiO₂ je također sveprisutan, koristi se kao aditiv u bojama, kozmetici, kremama za sunčanje, hrani, pastama za zube, a sve više u obliku nanočestica. Upravo slaba topivost titan dioksida stvara probleme u in vitro ispitivanjima citotoksičnosti stoga se u istraživanjima češće koristi u obliku nanočestica (čestica veličine 1 – 100 nm) koje ipak nisu prikladna aproksimacija realnog stanja u ortodonciji. Nanočestice ulaze u stanice i u njima se deponiraju jer ih stanice zbog veličine čestica teško mogu izbaciti (136). Nanočestice TiO₂ su vrlo potentan pokretač programirane smrti stanica, a signal daju generiranjem radikala kisika, inducirajući promjenu permeabilnosti mitohondrijske membrane i aktiviranjem enzima kaspaze-3 (127, 137). Mogu ući i u jezgru stanice te uzrokovati lomove DNA te utjeci na ekspresiju gena (138).

Ioni titana formiraju agregacije sa serumskim proteinima koji aktiviraju i uzrokuju otpuštanje citokina interleukin 1 β iz humanih makrofaga, vrlo moćnog medijatora upale i sinteze radikala (139). Koncentracije 13 000 μ g/L titana potrebne su kako bi izazvale značajnu citotoksičnost gingivnih epitelnih stanica, a to je gotovo tisuću puta više od graničnika koncentracije titana dobivenih u ovom istraživanju (140). No, prema našem istraživanju titan bi morao biti u kombinaciji s niklom da njihov sinergistički učinak pri tom graničniku izazove citotoksičnost. Prethodno je reportirano da ioni titana imaju sinergistički efekt s mikroorganizmima, povećavaju osjetljivost gingivnih epitelnih stanica na mikroorganizme, posebice parodontopatogene, čime su zajednički uključeni u nastanak citotoksičnosti i upalne reakcije na kontaktu gingive i titanske legure (140 , 141). Zbog toga se sve više preispituje biokompatibilnost titana, na kojem tragu je i ovo istraživanje.

6. ZAKLJUČCI

- Postojanje korozije NiTi legura vidljivo je već u prisutnosti same sline
- Nitiranje površine NiTi legure povećava otpornost prema općoj koroziji, a rodiranje smanjuje otpornost općoj i lokaliziranoj koroziji
- Brzina i stupanj korozije dodatkom antiseptika uglavnom se povećava
- Na promjenu mehaničkih i radnih svojstava ortodontskih NiTi žičanih lukova veći utjecaj ima vrsta primijenjenog antiseptika nego tip obloge žice
- Kod neobložene i rodirane žice nema značajnih promjena sila koje pomiču zube, no one se znatno smanje kod nitrirane žice u kombinaciji s antiseptikom alkoholne baze (Listerine)
- Curasept baziran na klorheksidinu pokazao se kao najprikladnija opcija za NiTi lukove
- Listerine je najmanje prihvatljiva opcija za rodirane i nitrirane NiTi žice, dok je Gengigel baziran na hijaluronskoj kiselini, najmanje prihvatljiv za neobložene NiTi žičane lukove
- Ioni nikla i titana samostalno ne induciraju veliki citotoksični efekt, no njihova kombinacija izaziva umjerenu do jaku citotoksičnost
- Citotoksičnost značajno raste nakon izloženosti koncentraciji od 75,5 µg/L nikla i 44,9 µg/L titana
- Povećanje koncentracije nikla i titana ima tendenciju povećanja citotoksičnosti i to povećanje koncentracije titana nešto više nego nikla
- Ioni otpušteni tijekom 28 dana ne bi izazvali značajni citotoksični učinak
- Citotoksični učinak u velikom dijelu je rezultat indukcije slobodnih radikala
- Promjene ortodontske naprave izazvane antisepticima ne bi imale veliki klinički značaj

7. LITERATURA

1. Proffit WR, Fields HW, Sarver DM. Ortodoncija. Jastrebarsko: Naklada Slap; 2010, str. 3–23.
2. Nanda R. Biomechanics and esthetic strategies in clinical orthodontics. New York: Elsevier Saunders; 2005, str. 1–15.
3. Alhadlaq AM. Biomarkers of orthodontic tooth movement in gingival crevicular fluid: a systematic review. *J Contemp Dent Pract.* 2015;16:578–87.
4. Demirović D. Osnovi fiksne tehnike u ortodonciji. Sarajevo: Arka Press, Stomatološki fakultet Sarajevo; 2005, str. 127–35.
5. Eliades T, Brantley WA. Orthodontic applications of biomaterials. New York: Elsevier; 2017, str. 3–34.
6. Graber TM, Vanarsdall RL, Vig KWL. Orthodontics: current principles and techniques. New York: Elsevier; 2005, str. 361–69.
7. Jerolimov V i sur. Osnove stomatoloških materijala. Zagreb: Stomatološki fakultet Zagreb; 2005, str. 57–9.
8. Al Jabbari YS, Fehrman J, Barnes AC, Zapf AM, Zinelis S, Berzins DW. Titanium nitride and nitrogen ion implanted coated dental materials. *Coatings.* 2012;2:160–78.
9. Lijima M, Yuasa T, Endo K, Muguruma T, Ohno H, Mizoguchi I. Corrosion behavior of ion implanted nickel-titanium orthodontic wire in fluoride mouth rinse solutions. *Dent Mater J.* 2010;29:53–8.
10. Katić V, Mandić V, Ježek D, Baršić G, Špalj S. Influence of various fluoride agents on working properties and surface characteristics of uncoated, rhodium coated and nitrified nickel-titanium orthodontic wires. *Acta Odontol Scand.* 2015;73:241–9.
11. Jiang RP, Mc Donald JP, Fu MK. Root resorption before and after orthodontic treatment : a clinical study of contributory factors. *Eur J Orthod.* 2010;32:693–97.
12. Hammarstrom L, Lindskog S. General morphological aspects of resorption of teeth and alveolar bone. *Int Endod J.* 1985;18:93–108.
13. Jones S, Boyde A. The resorption of dentine and cementum in vivo and in vitro. U: Davidovich Z (ed). *The biological mechanisms of tooth eruption and root resorption.* Birmingham: EBSCO Media; 1988.
14. Vardimon AD, Nemcovsky CE, Dre E. Orthodontic tooth movement enhances bone healing of surgical bony defects in rats. *J Periodontol.* 2001;72:858–64.
15. Ogorescu A. Biology of the alveolar bone: orthodontic tissue regeneration (OTR). *Advances in biology, bioengineering and environment.* Athens: WSEAS Press; 2010:240–4.

16. Davies T, Shaw WC, Worthington HW, Addy M, Dummer P, Kingdon A. The effect of orthodontic treatment on plaque and gingivitis. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1991;155:93–7.
17. Boersma JG, Van der Veen MH, Lagerweij MD, Bokhout B, Prahl-Andersen B. Caries prevalence measured with QLF after treatment with fixed orthodontic appliances: influencing factors. *Caries Res.* 2005;39:41–7.
18. Heymann GC, Grauer D. A contemporary review of white spot lesions in orthodontics. *J Esthet Restor Dent.* 2013;25:85-95.
19. Glažar I i sur. Priručnik oralne higijene. Rijeka: Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci; 2017.
20. Schmidt J, Zyba V, Jung K, Rinke S, Haak R, Mausberg RF, Ziebolz D. Cytotoxic effects of octenidine mouth rinse on human fibroblast and epithelial cells-in vitro study. *Drug Chem Toxicol.* 2017;39:322–30.
21. Muller HD, Eick S, Moritz A, Lussi A, Gruber R. Cytotoxicity and antimicrobial activity of oral rinses in vitro. *Biomed Res Int.* 2017;40:19–23.
22. Lindhe J, Karring T, Lang NP. Klinička parodontologija i dentalna implantologija. Zagreb: Nakladni Zavod Globus; 2004.
23. Law V, Seow WK, Townsend G. Factors influencing oral colonization of mutans streptococci in young children. *Aust Dent J.* 2007;52:93–100.
24. Igrashi K, Lee IK, Schachtele CF. Effect of dental plaque age and bacterial composition on the pH of artificial fissures in human volunteers. *Caries Res.* 1990;24:52–8.
25. Arneberg P, Giertsen E, Emberland H, Ogaard B. Intra-oral variations in total plaque fluoride related to plaque pH. A study in orthodontic patients. *Caries Res.* 1997;31:451–6.
26. Vrbanić I, Žužul I, Vražić D. Klorheksidinski preparati i njihova primjena danas. *Sonda.* 2009;83–5.
27. Jones CG. Chlorhexidine: is it still the gold standard? *Periodontology 2000.* 1997; 15:55–62.
28. Cappelli DP, Mobley CC. Prevention in clinical oral health care. New York: Elsevier; 2008,213–29
29. Dahyia P, Kamal R. Hyaluronic acid: a boon in periodontal therapy. *Am J Med Sci.* 2013;5:309–15.
30. Vlachoianis C, Al-Ahmad A, Hellwig E, Chrubasik S. Listerine® products: an update on the efficacy and safety. *Phytother Res.* 2016;30:367–73.

31. Vlachojannis C, Chrubasik-Hausmann S, Hellwig E, Al-Ahmad A. A preliminary investigation on the antimicrobial activity of Listerine®, its components, and of mixtures thereof. *Phytother Res.* 2015;29:1590–4.
32. Kate H, Friedrich S, David D, Jonathan RS, Anthony JI. Corrosion of orthodontic appliance-should we care? *Am J orthod Dentofacial Orthop.* 2007;133:584–91.
33. Eliades T, Athanasiou AE. In vivo aging of of orthodontic alloys: implications for corrosion potential, nickel release and biocompatibility. *Angle Orthod.* 2002;72:222–37.
34. Setcos JC, Babaei-Mahani A, Di Silvio L, Mjor IA, Wilson NHF. The safety of nickel containing dental alloys. *Dent Mater.* 2006;22:1163–8.
35. Spalj S, Mlacovic Zrinski M, Tudor Spalj V, Ivankovic Buljan Z. In-vitro assessment of oxidative stress generated by orthodontic archwires. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2012;141:583–9.
36. Gursoy UK, Sokucu O, Uitto VJ, Aydin A, Demirer S, Toker H, Erdem O, Sayal A. The role of nickel accumulation and epithelial cell proliferation in orthodontic treatment-induced gingival overgrowth. *Eur J Orthod.* 2007;29:555–8.
37. Stupnišek Lisac E. Korozija i zaštita konstrukcijskih materijala. Zagreb: Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije; 2007.
38. Kim H, Johnson JW. Corrosion of stainless steel, nickel-titanium, coated nickel-titanium and titanium orthodontic wires. *Angle Orthod.* 1999;69:39–44.
39. Hu T, Xin YC, Wu SL, Chu PK, Chen T, Hung TF, Chu PK. Corrosion behavior on orthopedic NiTi alloy with nanocrystalline/amorphous surface. *Mater Chem Phys.* 2011;126:102–7.
40. Mirjalili M, Momeni M, Ebrahimi N, Moayed MH. Comparative study on corrosion behaviour of Nitinol and stainless steel orthodontic wires in simulated saliva solution in presence of fluoride ions. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2013;33:2084–93.
41. Castro MS, Ponces MJ, Lopes JD, Vasconcelos M, Pollmann MCF. Orthodontic wires and its corrosion – the specific case of stainless steel and beta titanium. *J Dent Sci.* 2015;10:1–7.
42. Hršak D. Zaštita nehrđajućeg čelika anodnom polarizacijom (diplomski rad). Zagreb: Fakultet strojarstva i brodogradnje; 2015.
43. Stanec Z. Istraživanje biokorozijskih karakteristika titanij-magnezij kompozitnog materijala (disertacija). Zagreb: Stomatološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu; 2018.
44. Mehulić K i sur. Dentalni materijali. Zagreb: Medicinska naklada; 2017.

45. Huang HH. Surface characterizations and corrosion resistance of nickel-titanium orthodontic archwires in artificial saliva of various degrees of acidity. *J Biomed Mater Res A*. 2005;74:629–39.
46. Katic V, Curkovic L, Ujevic Bosnjak M, Spalj S. Determination of corrosion rate of orthodontic wires based on nickel-titanium alloy in artificial saliva. *Materialwiss Werkst*. 2014;45:99–105.
47. 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; 24:3585–92.
48. 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;79:102–10.
49. Bass JK, Fine H, Cisneros GJ. Nickel hypersensitivity in the orthodontic patient. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 1993;103:280-5.
50. Hostynek JJ, Reagan KE, Maibach HI. Nickel allergic hypersensitivity: prevalence and incidence by country, gender, age and occupation. In: Hostynek JJ, Maibach HI (ed). *Nickel and the skin. Absorption, immunology, epidemiology, and metallurgy*. Boca Raton: CRC Press; 2002, p. 39–82.
51. Nayak RS, Khanna B, Pasha A, Vinay K, Narayan A, Chaitra K. Evaluation of nickel and chromium ion release during fixed orthodontic treatment using inductively coupled plasma-mass spectrometer: An in vivo study. *J Int Oral Health*. 2015;7:14–20.
52. Fors R, Persson M. Nickel in dental plaque and saliva in patients with and without orthodontic appliance. *Eur J Orthod*. 2006;28:292–7.
53. Genelhu MCLS, Marigo M, Alves Oliveira LF, Malaquias LCC, Gomez RC. Characterization of nickel-induced allergic contact stomatitis associated with fixed orthodontic appliances. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2005;128:378–81.
54. Nielsen GD, Soderberg U, Jorgensen PJ, Twmpleton DM, Rasmussen SN, Andresen 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.
55. Kaaber K, Mennè T, Tjell JC, Veien N. Antabuse treatment of nickel dermatitis. Chelation: a new principle in the treatment of nickel dermatitis. *Contact Dermatitis*. 1979;5:221–8.
56. Park HY, Shearer TR. In vitro release of nickel and chromium from simulated orthodontic appliances. *Am J Orthod*. 1983;84:156–9.

57. Siddiqi A, Payne AG, De Silva RK, Duncan WJ. Titanium allergy: could it affect dental implant integration? *Clin Oral Implants Res.* 2011;22:673–80.
58. Müller K, Valentine-Thon E. Hypersensitivity to titanium: Clinical and laboratory evidence. *Neuro Endocrinol Lett.* 2006;27(Suppl 1):31–5.
59. Schalock PC, Menné T, Johansen JD, Taylor JS, Maibach HI, Lidén C, Bruze M, Thyssen JP. Hypersensitivity reactions to metallic implants-diagnostic algorithm and suggested patch test series for clinical use. *Contact Dermatitis.* 2012;66:4–19.
60. Evrard L, Waroquier D, Parent D. Allergies to dental metals. Titanium: a new allergen. *Rev Med Brux.* 2010;31:44–9.
61. Abraham J, Grenon M, Sanchez H, Perez C, Valentinuzzi M. Titanium based implants, metal release study in the oral environment. Activity report. 2006; pp.1–2.
62. Wennerberger A, Ide-Ektessabi A, Hatkamata S, Sawase T, Johansson C, Albrektsson T, Martinelli A, Sodervall U, Odellius H. Titanium release from implants prepared with different surface roughness. *Clin Oral Impl Res.* 2004;15:505–12.
63. Peeters MS, Schroeter AL, Van Hale HM, Broadbent JC. Pacemaker contact sensitivity. *Contact Dermatitis.* 1984;11:218–28.
64. Buljan ZI, Ribaric SP, Abram M, Ivankovic A, Spalj S. In vitro oxidative stress induced by conventional and self-ligating brackets. *Angle Orthod.* 2012;82:340–5.
65. 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;36:149–15.
66. Arneberg P, Giertsen E, Emberland H, Ogaard B. Intra-oral variations in total plaque fluoride related to plaque pH. A study in orthodontic patients. *Caries Res.* 1997;31:451–6.
67. American Society for Testing and Materials. D790-10. Standard test methods for flexural properties of unreinforced and reinforced plastics and electrical insulating materials. West Conshohocken: American Society for Testing and Materials; 2010.
68. American National Standard/American Dental Association. Specification No.32. Orthodontic wires. Chicago: American Dental Association, Council on Scientific Affairs; 2000.
69. American Society for Testing and Materials. D790-02. Standard test methods for flexural properties of unreinforced and reinforced plastics and electrical insulating materials. West Conshohocken: American society for testing and materials; 2000.

70. Walker MP, White RJ, Kula KS. Effect of fluoride prophylactic agents on the mechanical properties of nickel-titanium-based orthodontic wires. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2005;127:662–9.
71. Babich H, Borenfreund E. Cytotoxicity of T-2 toxin and its metabolites determined with the Neutral red cell viability assay. *Appl Environ Microb.* 1991;57:2101–3
72. Repetto G, del Peso A, Zurita J. Neutral red uptake assay for estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat Protoc.* 2008;3:1125–31.
73. Ahrari F, Tavakkol Afshari J, Poosti M, Brook A. Cytotoxicity of orthodontic bonding adhesive resins on human oral fibroblasts. *Eur J Orthod.* 2010;32:688–92.
74. Wang H, Joseph JA. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radical Bio Med.* 1999;27:612-6.
75. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein- dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-254
76. Arndt M, Brück A, Scully T, Jäger A, Bourauel C. Nickel ion release from orthodontic NiTi wires under simulation of realistic in-situ conditions. *J Mater Sci.* 2005;40:3659–67.
77. Petoumeno E, Kislyuk M, Hoederath H, Keilig L, Bourauel C, Jäger A. Corrosion susceptibility and nickel release of nickel titanium wires during clinical application. *J Orofac Orthop.* 2008;69:411–23.
78. Sevcikova J, Pavkova Goldbergova M. Biocompatibility of NiTi alloys in the cell behaviour. *Biometals.* 2017;30:163–9.
79. Uter W, Amario-Hita JC, Balato A, Ballmer-Weber B, Bauer A, Belloni Fortina A, Bircher A, Chowdhury MMU, Cooper SM, Dugonik A, Gallo R, Giménez-Arnau A, Johansen JD, John SM, Kieć-Świerczyńska M, Kmecl T, Kręcisz B, Larese Filon F, Mahler V, Pesonen M, Rustemeyer T, Sadowska-Przytocka A, Sánchez-Perez J, Schliemann S, Schuttelaar ML, Simon D, Spiewak R, Valiukeviciene S, Weisshaar E, White IR, Wilkinson SM. European Surveillance System on Contact Allergies (ESSCA): results with the European baseline series, 2013/14. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2017;31:1516–25.
80. Fage SW, Muris J, Jakobsen SS, Thyssen JP. Titanium: a review on exposure, release, penetration, allergy, epidemiology, and clinical reactivity. *Contact Dermatitis.* 2016;74:323–45.
81. Hosseinzadeh Nik T, Ghadirian H, Ahmadabadi MN, Shahhoseini T, Haj-Fathalian M. Effect of saliva on load-deflection characteristics of superelastic nickel-titanium orthodontic wires. *J Dent (Tehran).* 2012;9:171–9.

82. Hosseinzadeh Nik T, Hooshmand T, Farazdaghi H, Mehrabi A, Razavi ES. Effect of chlorhexidine-containing prophylactic agent on the surface characterization and frictional resistance between orthodontic brackets and archwires: an in vitro study. *Prog Orthod.* 2013;14:48.
83. Zohdi H, Emami M, Shahverdi HR. Galvanic corrosion behavior of dental alloys. In: Valdez Salas B, Schorr M (ed). *Environmental and industrial corrosion: practical and theoretical aspects.* Rijeka: InTech; 2012, p. 157–68.
84. Katic V, Otmacic Curkovic H, Semenski D, Barsic G, Marusic K, Spalj S. Influence of surface layer on mechanical and corrosion properties of nickel-titanium orthodontic wires. *Angle Orthod.* 2014;84:1041–8.
85. Jamilian A, Moghaddas O, Toopchi S, Perillo L. Comparison of nickel and chromium ions released from stainless steel and NiTi wires after immersion in Oral B®, Orthokin® and artificial saliva. *J Contemp Dent Pract.* 2014;15:403–6.
86. Erdogan AT, Nalbantgil D, Ulkur F, Sahin F. Metal ion release from silver soldering and laser welding caused by different types of mouthwash. *Angle Orthod.* 2015;85:665 – 72.
87. Danaei SM, Safavi A, Roeinpeikar SM, Oshagh M, Iranpour S, Omidkhoda M. Ion release from orthodontic brackets in 3 mouthwashes: an in-vitro study. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2011;139:730–4.
88. Nalbantgil D, Ulkur F, Kardas G, Culha M. Evaluation of corrosion resistance and surface characteristics of orthodontic wires immersed in different mouthwashes. *Biomed Mater Eng.* 2016;27:539–49.
89. Briceño J, Romeu A, Espinar E, Llamas JM, Gil FJ. Influence of the microstructure on electrochemical corrosion and nickel release in NiTi orthodontic archwires. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2013;33:4989–93.
90. Kaneko K, Yokoyama K, Moriyama K, Asaoka K, Sakai J. Degradation in performance of orthodontic wires caused by hydrogen absorption during short-term immersion in 2.0% acidulated phosphate fluoride solution. *Angle Orthod.* 2004;74:487–95.
91. Rerhrhaye W, Bahije L, El Mabrouk K, Zaoui F, Marzouk N. Degradation of the mechanical properties of orthodontic NiTi alloys in the oral environment: an in vitro study. *Int Orthod.* 2014;12:271–80.
92. Noguti J, de Oliveira F, Peres RC, Renno AC, Ribeiro DA. The role of fluoride on the process of titanium corrosion in oral cavity. *Biometals.* 2012;25:859–62.
93. Chao Z, Yaomu X, Chufeng L, Conghua L. The effect of mucin, fibrinogen and IgG on the corrosion behaviour of Ni-Ti alloy and stainless steel. *Biometals.* 2017;30:367–77.

94. Ahrari F, Ramazanzadeh BA, Sabzevari B, Ahrari A. The effect of fluoride exposure on the load-deflection properties of superelastic nickel-titanium-based orthodontic archwires. *Aust Orthod J.* 2012;28:72–9.
95. Ramalingam A, Kailasam V, Padmanabhan S, Chitharanjan A. The effect of topical fluoride agents on the physical and mechanical properties of NiTi and copper NiTi archwires. An in vivo study. *Aust Orthod J.* 2008;24:26–31.
96. Lin J, Han S, Zhu J, Wang X, Chen Y, Vollrath O, Wang H, Mehl C. Influence of fluoride-containing acidic artificial saliva on the mechanical properties of Nickel-Titanium orthodontics wires. *Indian J Dent Res.* 2012;23:591–5.
97. Srivastava K, Chandra PK, Kamat N. Effect of fluoride mouth rinses on various orthodontic archwire alloys tested by modified bending test: an in vitro study. *Indian J Dent Res.* 2012;23:433–4.
98. Yokoyama K, Kaneko K, Moriyama K, Asaoka K, Sakai J, Nagumo M. Delayed fracture of Ni-Ti superelastic alloys in acidic and neutral fluoride solutions. *J Biomed Mater Res A.* 2004;69:105–13.
99. Walker MP, Ries D, Kula K, Ellis M, Fricke B. Mechanical properties and surface characterization of beta titanium and stainless steel orthodontic wire following topical fluoride treatment. *Angle Orthod.* 2007;77:342–8.
100. Harris EF, Newman SM, Nicholson JA. Nitinol arch wire in a simulated oral environment: changes in mechanical properties. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1988;93:508–13.
101. Kim H, Johnson JW. Corrosion of stainless steel, nickel-titanium, coated nickel-titanium and titanium orthodontic wires. *Angle Orthod.* 1999;69:39–44.
102. Al Jabbari YS, Fehrman J, Barnes AC, Zapf AM, Zinelis S, Berzins DW. Titanium nitride and nitrogen ion implanted coated dental materials. *Coatings.* 2012;2:160–178.
103. Lijima M, Yuasa T, Endo K, Muguruma T, Ohno H, Mizoguchi I. Corrosion behavior of ion implanted nickel-titanium orthodontic wire in fluoride mouth rinse solutions. *Dent Mater J.* 2010;29:53–8.
104. Rodrigues SV, Acharya AB, Bhadbhade S, Thakur SL. Hyaluronan-containing mouthwash as an adjunctive plaque-control agent. *Oral Health Prev Dent.* 2010;8:389-94.
105. Milosev I, Hmeljak J, Cor A. Hyaluronic acid stimulates the formation of calcium phosphate on CoCrMo alloy in simulated physiological solution. *J Mater Sci Mater Med.* 2013;24:555–71.

106. Brar AS, Singla A, Mahajan V, Jaj HS, Seth V, Negi P. Reliability of organic mouthwashes over inorganic mouthwashes in the assessment of corrosion resistance of NiTi arch wires. *J Ind Orthod.* 2015;49:129–33.
107. Danaei SM, Safavi A, Roeinpeikar SM, Oshagh N, Iranpour S, Omidkhoda M. Ion release from orthodontic bracket in 3 mouthwashes: an *in vitro* study. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2011;139:730–4.
108. Li W, Zhou J, Xu Y. Study of the *in vitro* cytotoxicity testing of medical devices. *Biomed Rep.* 2015;3:617–20.
109. Pizzoferrato A, Ciapetti G, Stea S, Cenni E, Arciola CR, Granchi D, Savarino L. Cell culture methods for testing biocompatibility. *Clin Mater.* 1994;15:175 – 90.
110. Bearden LJ, Cooke FW. Growth inhibition of cultured fibroblasts by cobalt and nickel. *Biomed Mater Res.* 1980;14:289–309.
111. Terpilowska S, Siwicki AK. Interactions between chromium(III) and iron(III), molybdenum(III) or nickel(II): Cytotoxicity, genotoxicity and mutagenicity studies. *Chemosphere.* 2018;201:780–9.
112. Mikulewicz M, Chojnacka K, Kochanowska I, Dziewicka A, Janeczek M, Cieplik J, Chrószcz A. Cytotoxicity of nickel ions for human osteoblasts in the context of orthodontic treatment in humans and animals. *Turk J Vet Anim Sci.* 2013;37:164–9.
113. Gonçalves TS, Menezes LM, Trindade C, Machado Mda S, Thomas P, Fenech M, Henriques JA. Cytotoxicity and genotoxicity of orthodontic bands with or without silver soldered joints. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2014;762:1–8.
114. Chia-Tze K, Shinn-Jyh D, Hong H, Ming Young C, Tsui-Hsien H. Cytotoxicity of orthodontic wire corroded in fluoride solution *in vitro*. *Angle Orthod* 2007;77:349–354.
115. Rongo R, Valletta R, Bucci R, Rivieccio V, Galeotti A, Michelotti A, D'Antò V. *In vitro* biocompatibility of nickel-titanium esthetic orthodontic archwires. *Angle Orthod.* 2016;86:789–95.
116. Wataha JC, O'Dell NL, Singh BB, Ghazi M, Whitford GM, Lockwood PE. Relating nickel-induced tissue inflammation to nickel release *in vivo*. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2001;58:537–44.
117. Martin-Camean A, Jos A, Camean AM, Solano E, Iglesias-Linares A. Genotoxic and cytotoxic effects and gene expression changes induced by fixed orthodontic appliances in oral mucosa cells of patients: a systematic review. *Toxicol Mech Methods.* 2015;25:440–47.

118. Fernández-Miñano E, Ortiz C, Vicente A, Calvo JL, Ortiz AJ. Metallic ion content and damage to the DNA in oral mucosa cells of children with fixed orthodontic appliances. *Biomaterials* 2011;24:935–41.
119. Jomova K, Valko M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*. 2011;283:65–87.
120. Halliwell B, Gutteridge JM. *Free radicals in biology and medicine*. 4th ed. London: Oxford University Press, 2007.
121. Halliwell B, Guteridge JMC. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J*. 1984;219:1–14.
122. Štefan L, Tepšić T, Zavidic T, Urukalo M, Tota D, Domitrović R. Lipidna peroksidacija – uzroci i posljedice. *Medicina*. 2007;43:84–93.
123. Zarei MH, Hosseini Shirazi SF, Aghvami M, Salimi A, Pourahmad J. Analysis of cytotoxic effects of nickel on human blood lymphocytes. *Toxicol Mech Methods*. 2018;28:79–86.
124. Contreras RG, Sakagami H, Nakajima H, Shimada J. Type of cell death induced by various metal cations in cultured human gingival fibroblasts. *In Vivo*. 2010;24:513–7.
125. D'Antò V, Eckhardt A, Hiller KA, Spagnuolo G, Valletta R, Ambrosio L, Schmalz G, Schweikl H. The influence of Ni(II) on surface antigen expression in murine macrophages. *Biomaterials*. 2009;30:1492–501.
126. Gandamalla D, Lingabathula H, Yellu N. Nano titanium exposure induces dose- and size-dependent cytotoxicity on human epithelial lung and colon cells. *Drug Chem Toxicol*. 2018. doi: 10.1080/01480545.2018.1452930.
127. Xue C, Luo W, Yang XL. A mechanism for nano-titanium dioxide-induced cytotoxicity in HaCaT cells under UVA irradiation. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2015;79:1384–90.
128. Stannard L, Doak SH, Doherty A, Jenkins GJ. Is nickel chloride really a non-genotoxic carcinogen? *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2017;121 Suppl 3:10–5.
129. Hamano H. Fundamental studies on biological effects of dental metals-nickel dissolution, toxicity and distribution in cultured cells. *J Stomatol Soc*. 1992;59:456–78.
130. Lü X, Bao X, Huang Y, Qu Y, Lu H, Lu Z. Mechanisms of cytotoxicity of nickel ions based on gene expression profiles. *Biomaterials*. 2009;30:141–8.
131. Taira M, Toguchi MS, Hamada Y, Takahashi J, Ito R, Toyosawa S, Ijyuin N, Okazaki M. Studies on cytotoxic effect of nickel ions on three cultured fibroblasts. *J Mater Sci Mater Med*. 2001;12:373–6.

132. D'Antò V, Valletta R, Amato M, Schweikl H, Simeone M, Paduano S, Rengo S, Spagnuolo G. Effect of nickel chloride on cell proliferation. *Open Dent J.* 2012; 6:177–81.
133. Trombetta D, Mondello MR, Cimino F, Cristani M, Pergolizzi S, Saija A. Toxic effect of nickel in an in vitro model of human oral epithelium. *Toxicol Lett.* 2005;159:219–25.
134. Bumgardner JD, Doeller J, Lucas LC. Effect of nickel-based dental casting alloys on fibroblast metabolism and ultrastructural organization. *J Biomed Mater Res.* 1995;29:611–7.
135. Brunette DM. Titanium in medicine: material science, surface science, engineering, biological responses and medical applications. Berlin: Springer; 2001.
136. Oberdrster G, Ferin J, Lehnert BE. Correlation between particle size, in vivo particle persistence, and lung injury *Environ. Health Perspect.* 1994;102:173–9.
137. Sha B, Gao W, Cui X, Wang L, Xu F. The potential health challenges of TiO₂ nanomaterials. *J Appl Toxicol.* 2015;35:1086–101
138. Hong J, Zhang YQ. Murine liver damage caused by exposure to nano-titanium dioxide. *Nanotechnology.* 2016;27:112001.
139. Pettersson M, Kelk P, Belibasakis GN, Bylund D, Molin Thoren M, Johansson A. Titanium ions form particles that activate and execute interleukin-1 beta release from lipopolysaccharide-primed macrophages. *J Periodontal Res.* 2017;52:21–32.
140. Makihiro S, Mine Y, Nikawa H, Shuto T, Iwata S, Hosokawa R, Kamoi K, Okazaki S, Yamaguchi Y. Titanium ion induces necrosis and sensitivity to lipopolysaccharide in gingival epithelial-like cells. *Toxicol In Vitro.* 2010;24:1905–10.
141. Irshad M, Scheres N, Crielaard W, Loos BG, Wismeijer D, Laine ML. Influence of titanium on in vitro fibroblast-*Porphyromonas gingivalis* interaction in peri-implantitis. *J Clin Periodontol.* 2013;40:841–9.

8. ŽIVOTOPIS

Marijana Rinčić Mlinarić rođena je 23.09.1974. godine u Zadru. Osnovnu školu završila je u Pakošanima, a srednju školu u COUO „Juraj Baraković” u Zadru. Školske godine 1993./94. upisala je Stomatološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Dipolmirala je 1998. godine s prosjekom ocjena 4,45. Za stručni rad „Parcijalna amputacija pulpe u terapiji kompliciranih fraktura mladih trajnih zuba” nagrađena je 1998. godine Rektorovom nagradom.

Državni je stipendist u razdoblju od 1996. do 1998. godine.

Magistarski rad naslova „Primjena čiste keramike trikalcijsva fosfata u liječenju velikih koštanih defekata čeljusti” obranila je na Stomatološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu 2007. godine pod mentorstvom prof.dr.sc. Gorana Kneževića.

Specijalizaciju iz ortodontije obavila je na Klinici za stomatologiju KBC Zagreb pod mentorstvom prof.dr.sc. Mladena Šlaja u razdoblju od 2006. do 2010. godine. Specijalistički ispit iz ortodontije položila je 2010. godine.

Aktivni je istraživač na dva projekta: „Prediktivni čimbenici uspjeha ortodontske terapije u djece i adolescenata” potpora Sveučilišta u Rijeci (13.06.2.1.53; trajanje 2013. – 2018.), voditelj prof.dr.sc. Stjepan Špalj i „Imunosne i regenerativne implikacije korozije dentalnih materijala u djece i adolescenata”, Hrvatska zaklada za znanost (IP-7500; trajanje 2015. –2019.), voditelj prof.dr.sc. Stjepan Špalj.

Od 2010. godine radi u vlastitoj ortodontskoj ordinaciji u Zadru. Udana je i majka je dvoje djece. Redovni je član Hrvatske stomatološke komore, Hrvatskog liječničkog zbora i Hrvatskog ortodontskog društva.

Matični broj znanstvenika (CROSBİ): 340812.

Popis djela:

Izvorni znanstveni radovi:

- **Rincic Mlinaric M**, Karlovic S, Ciganj Z, Pop Acev D, Pavlic A, Spalj S. Oral antiseptics and nickel-titanium alloys: mechanical and chemical effect of interaction. *Odontology*. 2018. doi: 10.1007/s10266-018-0387-9 (in press) (SCIE; IF 1.458; Q2)
- **Rincic Mlinaric M**, Kanizaj L, Zuljevic D, Katic V, Spalj S, Otmacic Curkovic H. Effect of oral antiseptics on the corrosion stability of nickel-titanium orthodontic alloys. *Mater Corros*. 2018;69:510 – 8. (CC; IF 1.260; Q2)

- Spalj S, Katic V, **Rincic Mlinaric M**, Musa Trolić I, Zurga P, Bulog A. Corrosion of orthodontic biomaterials-effect of pH, fluoride and acid concentration from remineralization agents on elastic properties of orthodontic nickel-titanium archwires. *Stomatol Vjesn.* 2018;7:6 – 12.

Stručni radovi

- Knežević G, **Rinčić Mlinarić M**, Knežević D. Radiološka procjena cijeljenja koštanih defekata punjenih trikalcijevim fosfatom (Bioresorbom) nakon cistektomije u donjoj čeljusti. *Acta Stomatol Croat.* 2007;41:66 – 73.
- Kotarac Knežević A, **Rinčić Mlinarić M**, Knežević G. Trikalcijev fosfat u liječenju velikih čeljusnih cista. *Hrvatski stomatološki vjesnik.* 2008;15:37 – 9.

Kongresna priopćenja

- Katic V, **Rincic Mlinaric M**, Trinajstic Zrinski M, Pavlic A, Spalj S. Working properties of nickel-titanium archwires after corrosion in oral antiseptics and saliva. 94th European Orthodontic Society Congress. Edinburgh, Velika Britanija, 17. – 21.6.2018.
- **Rincic Mlinaric M**, Otmacic Curkovic H, Spalj S. Nitriding the surface of nickel-titanium orthodontic wires improves corrosion stability. 47th Congress of the Italian Orthodontic Society, Firenca, Italija, 13. – 15.10.2016.
- **Rinčić Mlinarić M**, Karlović S, Otmačić Ćurković H, Katić V, Špalj S. Effect of oral antiseptics on the corrosion and mechanical properties of nickel-titanium orthodontic wires. 91st Congress of the European Orthodontic Society, Venecija, Italija, 13 –18.6.2015.
- Otmačić Ćurković H, Kanižaj L, Žuljevic D, **Rinčić Mlinarić M**, Katić V, Špalj S. An electrochemical study on effect of oral antiseptics on the corrosion stability of NiTi orthodontic wires. Eurocorr 2015, Graz, Austrija, 6 – 10.9.2015.
- **Rinčić Mlinarić M**, Ciganj Z, Špalj S. Poor oral hygiene, oral antiseptics and orthodontics: corrosive implications of nickel-titanium archwires. 12th National Congress Italian Academy of Orthodontics. Rim, Italija, 30.4 – 1.5.2015.

9. PRIVITAK

Tablica 1. Citotoksičnost u ovisnosti o staničnoj liniji, vremenu izlaganja stanica i koncentraciji iona nikla i titana otpuštenih iz NiTi lukova u slinu

stanice	vrijeme izlaganja	Ni+Ti			Ni			Ti		
		konc	AS	SD	konc	AS	SD	konc	AS	SD
jezik	24	3,2	99,1	7,9	1,5	99,1	7,9	0,9	102,2	10,0
	48		100,4	7,6		100,4	7,6		107,5	5,8
	72		101,7	9,8		101,7	9,8		105,0	16,2
jetra	24		99,7	7,2		99,7	7,2		104,9	7,5
	48		99,1	4,9		99,1	4,9		101,2	6,1
	72		104,3	17,1		104,3	17,1		92,4	6,9
crijevo	24		116,1	16,6		116,1	16,6		101,4	7,8
	48		98,4	9,7		98,4	9,7		118,4	11,3
	72		100,3	4,6		100,3	4,6		103,2	9,7
jezik	24	3,5	102,2	10,0	2,6	102,2	10,0	1,3	97,1	6,7
	48		107,5	5,8		107,5	5,8		104,1	6,0
	72		105,0	16,2		105,0	16,2		100,2	3,6
jetra	24		104,9	7,5		104,9	7,5		106,2	9,2
	48		101,2	6,1		101,2	6,1		100,2	6,2
	72		92,4	6,9		92,4	6,9		106,3	17,7
crijevo	24		101,4	7,8		101,4	7,8		106,2	9,0
	48		118,4	11,3		118,4	11,3		119,2	9,6
	72		103,2	9,7		103,2	9,7		101,2	4,0
jezik	24	4,3	97,1	6,7	3,0	97,1	6,7	1,7	99,1	7,9
	48		104,1	6,0		104,1	6,0		100,4	7,6
	72		100,2	3,6		100,2	3,6		101,7	9,8
jetra	24		106,2	9,2		106,2	9,2		99,7	7,2
	48		100,2	6,2		100,2	6,2		99,1	4,9
	72		106,3	17,7		106,3	17,7		104,3	17,1
crijevo	24		106,2	9,0		106,2	9,0		116,1	16,6
	48		119,2	9,6		119,2	9,6		98,4	9,7
	72		101,2	4,0		101,2	4,0		100,3	4,6

AS- aritmetička sredina; SD- standardna devijacija. Masnim tekstom naznačene su vrijednosti blage, umjerene i jake citotoksičnosti.

Tablica 2. Citotoksičnost u ovisnosti o staničnoj liniji, vremenu izlaganja i koncentraciji iona nikla i titana otpuštenih iz NiTi lukova u slinu

stanice	vrijeme izlaganja	Ni+Ti			Ni			Ti		
		konc	AS	SD	konc	AS	SD	konc	AS	SD
jezik	24	16,2	99,0	9,8	7,6	99,0	9,8	4,5	100,4	10,0
	48		98,1	2,8		98,1	2,8		100,4	12,4
	72		102,0	8,4		102,0	8,4		96,0	2,1
jetra	24		102,1	4,9		102,1	4,9		103,8	6,6
	48		94,7	6,6		94,7	6,6		98,4	5,4
	72		106,2	11,2		106,2	11,2		91,9	9,4
crijevo	24		116,5	17,1		116,5	17,1		106,2	7,1
	48		91,6	1,5		91,6	1,5		110,7	13,7
	72		101,4	4,8		101,4	4,8		109,0	10,6
jezik	24	17,3	100,4	10,0	12,8	100,4	10,0	6,3	97,1	3,0
	48		100,4	12,4		100,4	12,4		102,5	8,1
	72		96,0	2,1		96,0	2,1		101,4	5,6
jetra	24		103,8	6,6		103,8	6,6		103,4	5,9
	48		98,4	5,4		98,4	5,4		96,2	6,9
	72		91,9	9,4		91,9	9,4		94,2	8,2
crijevo	24		106,2	7,1		106,2	7,1		102,6	9,3
	48		110,7	13,7		110,7	13,7		114,2	16,3
	72		109,0	10,6		109,0	10,6		99,9	1,7
jezik	24	21,5	97,1	3,0	15,1	99,7	9,5	8,7	99,0	9,8
	48		102,5	8,1		100,3	6,5		98,1	2,8
	72		101,4	5,6		97,4	8,9		102,0	8,4
jetra	24		103,4	5,9		103,7	6,5		102,1	4,9
	48		96,2	6,9		101,0	6,1		94,7	6,6
	72		94,2	8,2		94,0	7,9		106,2	11,2
crijevo	24		102,6	9,3		93,9	9,2		116,5	17,1
	48		114,2	16,3		40,3	14,5		91,6	1,5
	72		99,9	1,7		94,2	3,0		101,4	4,8

AS- aritmetička sredina; SD- standardna devijacija. Masnim tekstom naznačene su vrijednosti blage, umjerene i jake citotoksičnosti.

Tablica 3. Citotoksičnost u ovisnosti o staničnoj liniji, vremenu izlaganja i koncentraciji iona nikla i titana otpuštenih iz NiTi lukova u slinu

stanice	vrijeme izlaganja	Ni+Ti			Ni			Ti		
		konc	AS	SD	konc	AS	SD	konc	AS	SD
jezik	24	32,4	99,7	9,5	15,2	97,1	3,0	9,0	97,8	7,2
	48		100,3	6,5		102,5	8,1		100,2	3,6
	72		97,4	8,9		101,4	5,6		96,6	6,2
jetra	24		103,7	6,5		103,4	5,9		94,1	8,4
	48		101,0	6,1		96,2	6,9		94,0	6,7
	72		94,0	7,9		94,2	8,2		96,9	6,4
crijevo	24		93,9	9,2		102,6	9,3		105,1	9,6
	48		40,3	14,5		114,2	16,3		106,0	6,4
	72		94,2	3,0		99,9	1,7		93,5	15,0
jezik	24	34,6	97,8	7,2	25,6	97,8	7,2	12,5	95,1	8,7
	48		100,2	3,6		100,2	3,6		98,5	3,9
	72		96,6	6,2		96,6	6,2		95,9	3,6
jetra	24		94,1	8,4		94,1	8,4		96,6	6,6
	48		94,0	6,7		94,0	6,7		95,8	7,9
	72		96,9	6,4		96,9	6,4		95,0	7,2
crijevo	24		105,1	9,6		105,1	9,6		110,8	9,7
	48		106,0	6,4		106,0	6,4		105,7	11,7
	72		93,5	15,0		93,5	15,0		86,5	6,8
jezik	24	42,9	95,1	8,7	30,4	95,1	8,7	17,3	99,7	9,5
	48		98,5	3,9		98,5	3,9		100,3	6,5
	72		95,9	3,6		95,9	3,6		97,4	8,9
jetra	24		96,6	6,6		96,6	6,6		103,7	6,5
	48		95,8	7,9		95,8	7,9		101,0	6,1
	72		95,0	7,2		95,0	7,2		94,0	7,9
crijevo	24		110,8	9,7		110,8	9,7		93,9	9,2
	48		105,7	11,7		105,7	11,7		40,3	14,5
	72		86,5	6,8		86,5	6,8		94,2	3,0

AS- aritmetička sredina; SD- standardna devijacija. Masnim tekstom naznačene su vrijednosti blage, umjerene i jake citotoksičnosti.

Tablica 4. Citotoksičnost u ovisnosti o staničnoj liniji, vremenu izlaganja i koncentraciji iona nikla i titana otpuštenih iz NiTi lukova u slinu

stanice	vrijeme izlaganja	Ni+Ti			Ni			Ti		
		konc	AS	SD	konc	AS	SD	konc	AS	SD
jezik	24	162,0	27,4	3,6	75,5	27,4	3,6	44,9	25,8	3,9
	48		24,2	3,3		24,2	3,3		23,6	3,9
	72		51,5	9,2		51,5	9,2		56,5	17,2
jetra	24		52,7	6,4		52,7	6,4		51,6	3,0
	48		33,2	23,9		33,2	23,9		37,5	20,6
	72		56,5	17,4		56,5	17,4		51,5	10,1
crijevo	24		56,1	9,9		56,1	9,9		61,9	10,9
	48		32,2	4,6		32,2	4,6		37,8	11,8
	72		54,6	8,3		54,6	8,3		52,8	11,0
jezik	24	172,9	25,8	3,9	128,0	25,8	3,9	62,5	25,9	3,9
	48		23,6	3,9		23,6	3,9		23,9	3,7
	72		56,5	17,2		56,5	17,2		49,1	4,6
jetra	24		51,6	3,0		51,6	3,0		48,9	2,8
	48		37,5	20,6		37,5	20,6		37,1	22,7
	72		51,5	10,1		51,5	10,1		48,5	2,9
crijevo	24		61,9	10,9		61,9	10,9		58,6	15,7
	48		37,8	11,8		37,8	11,8		30,6	3,4
	72		52,8	11,0		52,8	11,0		57,1	7,8
jezik	24	214,5	25,9	3,9	152,0	25,9	3,9	86,5	27,4	3,6
	48		23,9	3,7		23,9	3,7		24,2	3,3
	72		49,1	4,6		49,1	4,6		51,5	9,2
jetra	24		48,9	2,8		48,9	2,8		52,7	6,4
	48		37,1	22,7		37,1	22,7		33,2	23,9
	72		48,5	2,9		48,5	2,9		56,5	17,4
crijevo	24		58,6	15,7		58,6	15,7		56,1	9,9
	48		30,6	3,4		30,6	3,4		32,2	4,6
	72		57,1	7,8		57,1	7,8		54,6	8,3

AS- aritmetička sredina; SD- standardna devijacija. Masnim tekstom naznačene su vrijednosti blage, umjerene i jake citotoksičnosti.

Tablica 5. Citotoksičnost u ovisnosti o staničnoj liniji, vremenu ekspozicije stanica i koncentraciji iona nikla (NiCl_2) i titana (TiO_2)

stanice	Ni konc	vrijeme					
		izlaganja (h)	AS	SD	Ti konc	AS	SD
jezik	1,5	24	95,1	5,4	0,9	102,9	3,9
		48	96,9	14,0		84,9	7,2
		72	95,7	3,8		91,9	3,5
jetra		24	103,8	5,5		101,4	4,3
		48	98,0	6,9		99,7	0,2
		72	90,6	3,8		93,3	2,1
crijevo		24	96,2	10,7		88,2	9,7
		48	94,7	18,7		81,8	10,8
		72	97,1	6,5		96,0	9,5
jezik	2,6	24	97,6	2,6	1,3	95,1	5,4
		48	100,9	4,5		103,1	16,1
		72	93,7	4,7		93,6	4,8
jetra		24	91,6	7,0		103,8	5,5
		48	94,3	7,3		107,5	16,1
		72	96,3	4,0		87,4	5,7
crijevo		24	98,1	20,7		96,2	10,7
		48	79,5	37,6		99,2	17,4
		72	100,0	4,7		96,9	3,8
jezik	3,0	24	86,7	4,7	1,7	100,2	8,4
		48	101,0	8,1		99,1	2,9
		72	93,4	1,4		92,6	4,0
jetra		24	101,3	7,1		94,1	7,6
		48	90,9	10,6		106,3	16,2
		72	94,7	15,9		89,6	5,6
crijevo		24	98,1	19,0		101,2	20,8
		48	106,8	21,5		99,1	13,8
		72	99,3	9,0		104,5	5,0

AS- aritmetička sredina; SD- standardna devijacija. Masnim tekstom naznačene su vrijednosti blage citotoksičnosti.

Tablica 6. Citotoksičnost u ovisnosti o staničnoj liniji, vremenu ekspozicije i koncentraciji iona nikla (NiCl₂) i titana (TiO₂)

stanice	Ni konc	vrijeme			Ti konc	AS	SD
		izlaganja (h)	AS	SD			
jezik	7,6	24	95,1	7,4	4,5	101,8	2,7
		48	104,3	16,8		76,8	6,5
		72	97,7	2,8		94,3	1,9
jetra		24	107,1	7,0		97,8	9,9
		48	101,3	6,4		110,9	12,9
		72	86,6	6,4		91,0	3,3
crijevo		24	120,1	19,7		95,6	6,6
		48	100,2	8,4		85,8	13,9
		72	102,9	4,0		90,4	13,4
jezik	12,8	24	97,8	5,4	6,3	95,1	7,4
		48	99,4	1,1		106,2	3,8
		72	95,1	1,4		95,1	1,6
jetra		24	100,3	1,9		107,1	7,0
		48	91,9	6,5		114,7	9,8
		72	94,3	4,3		90,6	6,9
crijevo		24	108,7	6,0		120,1	19,7
		48	86,3	22,8		112,9	11,2
		72	104,3	5,6		96,9	4,2
jezik	15,1	24	95,4	6,9	8,7	97,1	11,9
		48	102,7	16,0		102,3	17,4
		72	100,7	7,5		94,6	2,0
jetra		24	108,6	9,7		94,0	6,3
		48	104,4	4,7		112,0	12,9
		72	89,2	6,9	86,7	4,0	
crijevo		24	105,9	19,4		108,2	15,2
		48	101,6	5,0		107,1	15,1
		72	97,9	5,6		96,4	7,3

AS- aritmetička sredina; SD- standardna devijacija. Masnim tekstom naznačene su vrijednosti blage citotoksičnosti.

Tablica 7. Citotoksičnost u ovisnosti o staničnoj liniji, vremenu ekspozicije i koncentraciji iona nikla (NiCl₂) i titana (TiO₂)

stanice	Ni konc	vrijeme			Ti konc	AS	SD
		izlaganja (h)	AS	SD			
jezik	15,2	24	85,2	0,8	9,0	101,1	1,4
		48	91,3	7,6		86,7	9,3
		72	93,9	0,2		93,7	2,7
jetra		24	103,9	4,7		90,3	9,0
		48	102,2	23,5		106,2	13,4
		72	90,7	3,4		90,2	3,2
crijevo		24	113,8	21,8		106,5	18,2
		48	110,1	9,3		91,1	14,4
		72	98,5	7,6		91,1	13,2
jezik	25,6	24	102,1	7,7	12,5	95,4	6,9
		48	100,5	2,2		96,4	19,1
		72	95,0	1,2		94,2	1,7
jetra		24	100,2	2,4		108,6	9,7
		48	94,3	4,4		113,3	10,4
		72	98,1	4,5		83,1	19,7
crijevo		24	98,1	8,8		105,9	19,4
		48	83,4	20,9		94,9	5,3
		72	93,5	12,8		99,3	1,7
jezik	30,4	24	88,6	6,2	17,3	92,7	4,2
		48	102,9	8,0		107,1	10,9
		72	99,4	6,7		92,8	1,2
jetra		24	102,6	4,1		92,1	4,3
		48	97,5	21,2		115,4	8,8
		72	88,6	4,9		86,4	4,4
crijevo		24	109,8	7,9		113,6	14,8
		48	116,8	4,2		108,9	10,1
		72	96,7	5,1		91,5	5,5

AS- aritmetička sredina; SD- standardna devijacija. Masnim tekstom naznačene su vrijednosti blage citotoksičnosti.

Tablica 8. Citotoksičnost u ovisnosti o staničnoj liniji, vremenu ekspozicije i koncentraciji iona nikla (NiCl₂) i titana (TiO₂)

stanice	Ni konc	vrijeme			Ti konc	AS	SD
		izlaganja (h)	AS	SD			
jezik	75,5	24	108,0	9,1	44,9	101,6	3,3
		48	91,5	14,1		83,8	2,4
		72	95,0	2,1		92,8	4,6
jetra		24	105,7	8,7		94,4	9,9
		48	97,2	6,2		105,3	11,2
		72	90,0	3,4		94,1	7,7
crijevo		24	103,3	21,4		98,4	10,6
		48	95,4	5,6		68,7	15,2
		72	99,8	4,3		97,5	5,6
jezik	128,0	24	100,0	0,0	62,5	108,0	9,1
		48	100,0	0,0		99,4	16,7
		72	87,7	17,4		104,0	13,5
jetra		24	87,5	21,8		105,7	8,7
		48	100,0	0,0		102,2	15,1
		72	100,0	0,0		93,6	2,5
crijevo		24	91,5	12,0		103,3	21,4
		48	100,0	0,0		92,1	16,7
		72	90,2	13,9		101,4	3,1
jezik	152,0	24	98,0	4,2	86,5	104,7	10,7
		48	99,7	0,6		96,0	12,6
		72	96,2	7,2		92,9	3,9
jetra		24	95,2	10,2		92,5	6,9
		48	95,5	9,0		102,5	14,8
		72	88,7	8,7		85,6	2,9
crijevo		24	96,5	5,3		101,2	21,0
		48	89,5	21,2		97,5	3,1
		72	98,2	4,7		94,5	7,0

AS- aritmetička sredina; SD- standardna devijacija. Masnim tekstom naznačene su vrijednosti blage citotoksičnosti.

Tablica 9. Prisutnost radikala u ovisnosti o staničnoj liniji, vremenu izlaganja stanica i koncentraciji iona nikla i titana otpuštenih iz NiTi lukova u slinu

stanice	vrijeme izlaganja	Ni+Ti konc	Ni			Ti				
			AS	SD	konc	AS	SD	konc		
jezik	24	3,2	29,6	6,5	1,5	29,6	6,5	0,9	31,2	1,7
	48		19,4	4,4		19,4	4,4		14,1	5,2
	72		19,3	4,3		19,3	4,3		19,6	2,5
jetra	24	3,2	45,1	11,1	1,5	45,1	11,1	0,9	48,7	1,9
	48		14,3	2,7		14,3	2,7		10,1	1,7
	72		18,2	6,1		18,2	6,1		23,6	2,0
crijevo	24	3,2	36,1	7,1	1,5	36,1	7,1	0,9	35,8	2,6
	48		15,6	1,9		15,6	1,9		13,3	2,1
	72		20,0	6,6		20,0	6,6		19,5	3,1
jezik	24	3,5	31,2	1,7	2,6	31,2	1,7	1,3	28,6	5,1
	48		14,1	5,2		14,1	5,2		18,1	2,3
	72		19,6	2,5		19,6	2,5		18,9	3,6
jetra	24	3,5	48,7	1,9	2,6	48,7	1,9	1,3	42,6	5,1
	48		10,1	1,7		10,1	1,7		12,8	2,4

				23,		23,		18,	
	72			6	2,0	6	2,0	5	5,3
crijev				35,		35,		37,	
o	24			8	2,6	8	2,6	4	4,2
				13,		13,		14,	
	48			3	2,1	3	2,1	8	1,8
				19,		19,		19,	
	72			5	3,1	5	3,1	0	4,8
				28,		28,		29,	
jezik	24	4,3		6	5,1	6	5,1	1,7	6
			3	6	5,1	6	5,1	6	6,5
				18,		18,		19,	
	48			1	2,3	1	2,3	4	4,4
				18,		18,		19,	
	72			9	3,6	9	3,6	3	4,3
				42,		42,		45,	11,
jetra	24			6	5,1	6	5,1	1	1
				12,		12,		14,	
	48			8	2,4	8	2,4	3	2,7
				18,		18,		18,	
	72			5	5,3	5	5,3	2	6,1
crijev				37,		37,		36,	
o	24			4	4,2	4	4,2	1	7,1
				14,		14,		15,	
	48			8	1,8	8	1,8	6	1,9
				19,		19,		20,	
	72			0	4,8	0	4,8	0	6,6

AS- aritmetička sredina; SD- standardna devijacija.

Tablica 10. Prisutnost radikala u ovisnosti o staničnoj liniji, vremenu izlaganja i koncentraciji iona nikla i titana otpuštenih iz NiTi lukova u slinu

stanice	vrijeme izlaganja	Ni+Ti konc	Ni			Ti				
			AS	SD	konc	AS	SD	konc	AS	SD
jezik	24	16,2	29,8	7,6	7,6	29,8	7,6	4,5	27,7	5,2
	48		17,7	3,2		17,7	3,2		15,3	2,1
	72		18,0	2,3		18,0	2,3		19,2	4,1
jetra	24		45,0	8,0		45,0	8,0		44,6	2,7
	48		14,3	3,7		14,3	3,7		11,0	1,6
	72		18,7	2,9		18,7	2,9		16,9	6,0
crijevo	24		44,1	2,8		44,1	2,8		36,8	4,9
	48		15,7	2,3		15,7	2,3		12,4	0,8
	72		20,4	3,9		20,4	3,9		13,4	4,6
jezik	24	17,3	27,7	5,2	12,8	27,7	5,2	6,3	34,5	4,0
	48		15,3	2,1		15,3	2,1		16,1	1,0
	72		19,2	4,1		19,2	4,1		20,1	4,6
jetra	24		44,6	2,7		44,6	2,7		40,8	8,6
	48		11,0	1,6		11,0	1,6		11,9	2,9
	72		16,9	6,0		16,9	6,0		20,2	2,3
crijevo	24		36,8	4,9		36,8	4,9		43,5	7,4
	48		12,4	0,8		12,4	0,8		13,8	1,5
	72		13,4	4,6		13,4	4,6		17,0	1,3
jezik	24	21,5	34,5	4,0	15,1	29,8	6,9	8,7	29,8	7,6
	48		16,1	1,0		19,1	2,8		17,7	3,2
	72		20,1	4,6		17,3	3,2		18,0	2,3
jetra	24		40,8	8,6		45,3	6,3		45,0	8,0
	48		11,9	2,9		12,5	2,6		14,3	3,7
	72		20,2	2,3		20,5	5,0		18,7	2,9
crijevo	24		43,5	7,4		47,2	4,7		44,1	2,8
	48		13,8	1,5		14,6	2,0		15,7	2,3
	72		17,0	1,3		21,5	5,9		20,4	3,9

AS- aritmetička sredina; SD- standardna devijacija.

Tablica 11. Prisutnost radikala u ovisnosti o staničnoj liniji, vremenu izlaganja i koncentraciji iona nikla i titana otpuštenih iz NiTi lukova u slinu

stanice	vrijeme izlaganja	Ni+Ti konc	Ni			Ti				
			AS	SD	konc	AS	SD	konc	AS	SD
jezik	24	32,4	29,8	6,9	15,2	34,5	4,0	9	28,3	8,1
	48		19,1	2,8		16,1	1,0		15,8	3,2
	72		17,3	3,2		20,1	4,6		18,1	4,4
jetra	24		45,3	6,3		40,8	8,6		49,2	9,0
	48		12,5	2,6		11,9	2,9		13,3	2,1
	72		20,5	5,0		20,2	2,3		17,8	5,8
crijevo	24		47,2	4,7		43,5	7,4		36,0	4,7
	48		14,6	2,0		13,8	1,5		14,6	2,2
	72		21,5	5,9		17,0	1,3		16,8	5,0
jezik	24	34,6	28,3	8,1	25,6	28,3	8,1	12,5	30,1	7,3
	48		15,8	3,2		15,8	3,2		18,2	2,8
	72		18,1	4,4		18,1	4,4		17,8	2,0
jetra	24		49,2	9,0		49,2	9,0		50,1	6,3
	48		13,3	2,1		13,3	2,1		12,8	1,4
	72		17,8	5,8		17,8	5,8		18,4	5,4
crijevo	24		36,0	4,7		36,0	4,7		37,2	1,6
	48		14,6	2,2		14,6	2,2		14,5	2,0
	72		16,8	5,0		16,8	5,0		20,4	6,7
jezik	24	42,9	30,1	7,3	30,4	30,1	7,3	17,3	29,8	6,9
	48		18,2	2,8		18,2	2,8		19,1	2,8
	72		17,8	2,0		17,8	2,0		17,3	3,2
jetra	24		50,1	6,3		50,1	6,3		45,3	6,3
	48		12,8	1,4		12,8	1,4		12,5	2,6
	72		18,4	5,4		18,4	5,4		20,5	5,0
crijevo	24		37,2	1,6		37,2	1,6		47,2	4,7
	48		14,5	2,0		14,5	2,0		14,6	2,0
	72		20,4	6,7		20,4	6,7		21,5	5,9

AS- aritmetička sredina; SD- standardna devijacija.

Tablica 12. Prisutnost radikala u ovisnosti o staničnoj liniji, vremenu izlaganja i koncentraciji iona nikla i titana otpuštenih iz NiTi lukova u slinu

stanice	vrijeme izlaganja	Ni+Ti			Ni			Ti		
		konc	AS	SD	konc	AS	SD	konc	AS	SD
jezik	24	162	105,9	27,0	75,5	105,9	27,0	44,9	86,6	13,6
	48		32,7	18,2		32,7	18,2		35,6	22,3
	72		35,8	9,4		35,8	9,4		31,9	7,1
jetra	24		59,7	17,4		59,7	17,4		62,4	5,3
	48		24,7	6,4		24,7	6,4		22,4	4,2
	72		21,5	7,3		21,5	7,3		23,7	2,8
crijevo	24		61,5	13,3		61,5	13,3		51,0	9,0
	48		25,2	10,6		25,2	10,6		24,1	5,8
	72		21,5	6,5		21,5	6,5		23,7	4,2
jezik	24	172,9	86,6	13,6	128	86,6	13,6	62,5	98,0	13,7
	48		35,6	22,3		35,6	22,3		36,2	24,1
	72		31,9	7,1		31,9	7,1		36,4	9,9
jetra	24		62,4	5,3		62,4	5,3		68,6	10,8
	48		22,4	4,2		22,4	4,2		22,6	6,1
	72		23,7	2,8		23,7	2,8		21,5	7,2
crijevo	24		51,0	9,0		51,0	9,0		51,6	5,2
	48		24,1	5,8		24,1	5,8		23,5	6,7
	72		23,7	4,2		23,7	4,2		20,2	9,6
jezik	24	214,5	98,0	13,7	152	98,0	13,7	86,5	105,9	27,0
	48		36,2	24,1		36,2	24,1		32,7	18,2
	72		36,4	9,9		36,4	9,9		35,8	9,4
jetra	24		68,6	10,8		68,6	10,8		59,7	17,4
	48		22,6	6,1		22,6	6,1		24,7	6,4
	72		21,5	7,2		21,5	7,2		21,5	7,3
crijevo	24		51,6	5,2		51,6	5,2		61,5	13,3
	48		23,5	6,7		23,5	6,7		25,2	10,6
	72		20,2	9,6		20,2	9,6		21,5	6,5

AS- aritmetička sredina; SD- standardna devijacija.

Tablica 13. Prisutnost radikala u ovisnosti o staničnoj liniji, vremenu ekspozicije stanica i koncentraciji iona nikla (NiCl_2) i titana (TiO_2)

stanice	Ni konc	vrijeme izlaganja (h)	Ni		Ti konc	Ti	
			AS	SD		AS	SD
jezik	1,5	24	26,0	10,3	0,9	24,1	8,1
		48	14,1	3,7		16,4	5,4
		72	19,3	2,2		19,1	3,1
jetra		24	42,5	14,8		42,5	10,8
		48	16,1	2,1		12,9	3,0
		72	23,5	7,0		19,2	7,9
crijevo		24	38,8	8,5		44,1	7,8
		48	16,9	1,2		15,1	3,5
		72	18,9	3,5		16,5	5,4
jezik	2,6	24	28,8	10,8	1,3	29,0	10,7
		48	14,2	2,5		12,6	4,7
		72	21,1	3,7		19,5	1,3
jetra		24	51,5	15,7		42,7	10,2
		48	16,2	2,4		13,6	2,6
		72	35,6	21,3		21,5	5,2
crijevo		24	38,8	11,9		39,7	6,4
		48	17,6	2,0		13,6	2,7
		72	34,2	20,6		20,5	6,6
jezik	3	24	25,1	16,1	1,7	22,2	8,6
		48	13,6	4,0		13,8	3,3
		72	20,4	2,7		21,0	3,5
jetra		24	46,7	12,1		49,2	14,7
		48	15,9	3,3		14,2	2,2
		72	24,5	3,4		23,2	5,9
crijevo		24	42,0	5,3		34,6	1,5
		48	18,4	4,6		13,6	2,7
		72	21,9	2,4		18,2	3,6

AS- aritmetička sredina; SD- standardna devijacija.

Tablica 14. Prisutnost radikala u ovisnosti o staničnoj liniji, vremenu ekspozicije i koncentraciji iona nikla (NiCl₂) i titana (TiO₂)

stanice	Ni konc	vrijeme izlaganja (h)	AS	SD	Ti konc	AS	SD	
jezik	7,6	24	27,2	8,8	4,5	28,3	9,5	
		48	15,0	2,8		21,2	5,1	
		72	17,5	3,3		20,8	6,2	
	jetra		24	45,1	9,7		44,0	9,5
			48	14,3	1,0		11,9	1,1
			72	22,6	9,2		19,5	6,6
	crijevo		24	34,5	2,9		39,2	3,9
			48	15,0	0,9		11,9	1,2
			72	16,2	4,6		15,9	2,5
jezik	12,8	24	25,3	6,7	6,3	26,9	6,6	
		48	11,9	3,7		14,8	3,6	
		72	19,5	7,7		18,0	2,4	
	jetra		24	44,2	10,0		43,1	6,8
			48	17,8	3,3		11,9	2,5
			72	20,5	2,3		17,5	4,7
	crijevo		24	35,9	4,5		32,8	2,7
			48	16,1	4,8		13,3	1,1
			72	20,3	3,8		14,8	2,9
jezik	15,1	24	28,8	8,6	8,7	26,4	8,3	
		48	16,6	0,9		14,9	5,1	
		72	19,8	6,7		19,0	5,5	
	jetra		24	39,8	3,4		45,9	7,0
			48	11,3	2,9		11,3	1,8
			72	18,6	5,6		19,5	7,8
	crijevo		24	36,5	2,4		34,4	2,2
			48	13,4	0,6		12,3	0,6
			72	14,7	2,6		15,1	4,1

AS- aritmetička sredina; SD- standardna devijacija.

Tablica 15. Prisutnost radikala u ovisnosti o staničnoj liniji, vremenu ekspozicije i koncentraciji iona nikla (NiCl₂) i titana (TiO₂)

stanice	Ni konc	vrijeme izlaganja (h)	AS		SD		Ti konc	AS		SD							
			AS	SD	AS	SD		AS	SD								
jezik	15,2	24	26,3	16,7	9	25,7	6,4	jetra	24	37,7	7,2	45,7	8,2				
		48	16,1	4,4		19,5	1,0										
		72	19,6	2,9		20,1	5,1										
	crijevo	15,2	24	31,0		3,2	34,8	3,2	jezik	25,6	24	27,5	10,2	12,5	31,3	7,4	
			48	15,4		2,2	12,2	1,5									
			72	17,6		3,9	14,4	0,8									
	jezik	25,6	24	27,5		10,2	12,5	31,3	7,4	jetra	25,6	24	27,5	10,2	12,5	31,3	7,4
			48	13,4		4,8		17,9	0,5								
			72	17,7		6,1		21,7	6,2								
crijevo		25,6	24	38,7	3,9	39,2		2,8	jezik	30,4	24	25,0	15,3	17,3	30,1	5,1	
			48	17,4	2,9	12,5		0,7									
			72	20,8	3,3	13,7		1,6									
jezik		30,4	24	25,0	15,3	17,3		30,1	5,1	jetra	30,4	24	42,8	6,4	48,7	3,2	
			48	16,3	0,4			15,8	0,4								
			72	17,8	4,2			18,7	4,8								
	crijevo	30,4	24	34,2	3,2		34,1	4,5	jezik	30,4	24	25,0	15,3	17,3	30,1	5,1	
			48	14,2	1,3		10,7	1,1									
			72	14,2	2,7		14,6	2,3									

AS- aritmetička sredina; SD- standardna devijacija.

Tablica 16. Prisutnost radikala u ovisnosti o staničnoj liniji, vremenu ekspozicije i koncentraciji iona nikla (NiCl₂) i titana (TiO₂)

stanice	Ni konc	vrijeme izlaganja (h)			Ti konc			
			AS	SD		AS	SD	
jezik	75,5	24	26,5	6,3	44,9	28,0	6,2	
		48	17,0	3,7		16,2	0,9	
		72	20,7	6,0		18,7	2,9	
	jetra	75,5	24	40,3	3,9	44,9	49,6	2,2
			48	13,0	2,5		13,1	1,5
			72	20,3	2,3		16,1	3,9
	crijevo	75,5	24	36,2	3,3	44,9	42,7	3,8
			48	15,8	2,8		12,4	1,1
			72	17,9	3,0		15,2	4,2
jezik	128	24	37,4	13,9	62,5	27,1	8,0	
		48	30,7	20,3		14,6	2,3	
		72	33,2	17,8		16,1	4,9	
	jetra	128	24	47,3	8,3	62,5	45,0	10,1
			48	30,9	20,0		12,7	2,6
			72	33,2	17,6		18,8	3,9
	crijevo	128	24	44,5	7,7	62,5	43,3	13,0
			48	32,2	18,4		13,2	2,0
			72	34,9	16,0		16,5	4,1
jezik	152	24	21,3	13,0	86,5	28,7	5,9	
		48	14,5	3,8		17,3	1,3	
		72	18,1	1,0		19,9	3,5	
	jetra	152	24	45,9	7,8	86,5	47,7	4,3
			48	16,7	3,2		13,0	2,5
			72	19,1	5,4		15,8	3,4
	crijevo	152	24	37,5	2,1	86,5	36,4	5,2
			48	13,9	2,8		13,1	2,5
			72	14,8	4,3		43,4	11,6

AS- aritmetička sredina; SD- standardna devijacija.