

**SVEUČILIŠTE U SPLITU**

**MEDICINSKI FAKULTET**

**Ivana Jurković**

**PROCJENA CITOGENETSKIH OŠTEĆENJA U STANICAMA ORALNE SLUZNICE  
KOD DENTALNIH TEHNIČARA**

**Diplomski rad**

**Akadska godina:**

**2016. / 2017.**

**Mentor:**

**doc. dr. sc. Antonija Tadin, dr. med. dent.**

**Split, srpanj 2017.**

**SVEUČILIŠTE U SPLITU**

**MEDICINSKI FAKULTET**

**Ivana Jurković**

**PROCJENA CITOGENETSKIH OŠTEĆENJA U STANICAMA ORALNE SLUZNICE  
KOD DENTALNIH TEHNIČARA**

**Diplomski rad**

**Akadska godina:**

**2016. / 2017.**

**Mentor:**

**doc. dr. sc. Antonija Tadin, dr. med. dent.**

**Split, srpanj 2017.**

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Dentalni tehničari .....</b>	<b>2</b>
<b>1.2. Opasnosti posla dentalnih tehničara .....</b>	<b>2</b>
1.2.1. Rizici vezani uz izloženost metalima .....	4
1.2.2. Rizici vezani uz izloženost metakrilatima .....	6
1.2.3. Rizici vezani uz izloženost silikatima .....	7
1.2.4. Rizici vezane uz izlaganje voskovima.....	8
1.2.5. Rizici vezani uz izlaganje ljepilima na osnovi cijanoakrilata.....	8
1.2.6. Rizici vezani uz izlaganje hidrofluornoj kiselini .....	8
<b>1.3. Preventivne mjere za dentalne tehničare na radnom mjestu .....</b>	<b>9</b>
1.3.1. Procjena izloženosti i praćenje izloženih bolesnika .....	9
1.3.2. Smanjenje ili suzbijanje izloženosti na kolektivnoj razini .....	9
1.3.3. Primjena pojedinih sredstava zaštite.....	10
<b>1.4. Mikronukleus test .....</b>	<b>10</b>
<b>2. CILJ ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZE.....</b>	<b>13</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE .....</b>	<b>15</b>
<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>19</b>
<b>5. RASPRAVA .....</b>	<b>27</b>
<b>6. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>32</b>
<b>7. POPIS CITIRANE LITERATURE .....</b>	<b>34</b>
<b>8. SAŽETAK .....</b>	<b>38</b>
<b>9. SUMMARY .....</b>	<b>40</b>
<b>10. ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>42</b>

*Veliko hvala mojoj mentorici doc. dr. sc. Antoniji Tadin, koja je svojim savjetima olakšala pripremu i pisanje ovoga rada. Hvala vam na utrošenu vremenu, strpljenju i obazrivosti. Posebno vam želim zahvaliti sto ste mi tijekom kliničkih vježbi bili veliki uzor i inspiracija da uvijek težim izvrsnosti i novim znanjima.*

*Hvala doc. dr. sc. Lidiji Gavić na suradnji, pomoći i korisnim savjetima koji su mi olakšali statističku obradu podataka i interpretaciju rezultata.*

*Zahvaljujem se svim kolegama i kolegicama te prijateljima koji su sudjelovali u ovom radu.*

*Ipak, najveću zahvalnost dugujem svojoj obitelji, a posebno svojim roditeljima i Stjepanu. Bez njihove neizmjerne potpore i razumijevanja ne bih bila tu gdje jesam. Sve što sam u životu postigla, postigla sam zahvaljujući vama. Zato vam posvećujem ovaj diplomski rad.*

## **1. UVOD**

## 1.1. Dentalni tehničari

Oralno zdravlje opće populacije u novije vrijeme se poboljšalo zbog fluoridacije i ostalih preventivnih mjera koje se provode. Iako se sve manje izrađuju potpune proteze, a sve više fiksno-protetski radovi i mobilni ortodontski aparatići, posao dentalnog tehničara na njima nije nikako zanemariv (1).

Postupak izrade fiksnih i mobilnih protetskih nadomjestaka temelji se na načelima stomatološke doktrine i na način široko korišten u svijetu. Proces rada protetskih nadomjestaka rezultat je suradnje tima doktora dentalne medicine i dentalnog tehničara (2).

Rad dentalnih tehničara vrlo je specifičan i podrazumijeva izradu mobilnih i fiksnih nadomjestaka i mobilnih ortodontskih aparatića na sadrenim modelima dobivenim lijevanjem dentalnih otisaka pacijenata (2). Da bi se izradio jedan fiksno-protetski rad potrebno je na temelju otiska pacijentovih čeljusti napraviti studijske i radne modele iz sadre, nadoknaditi zube koji nedostaju voskom, izliti metalnu osnovu, napeći keramiku i završno obraditi i ispolirati rad. Sve je to dio posla dentalnog tehničara. Kao i u slučaju fiksno-protetskih nadomjestaka, izrada proteza, mobilno-protetski radova (totalnih i parcijalnih) se isto provodi u više faza (3).

U nekim laboratorijima tehničari se bave samo pojedinim dijelovima izrade protetskog ili ortodontskog nadomjeska, dok u drugim obavljaju sve faze izrade. Posao dentalnog tehničara izrazito je precizan i za njega je potrebno dosta vremena (3). Zahtjeva točnost i manualnu spretnost, dobar vid i sposobnost prepoznavanja minimalnih razlika u nijansama boje. Sve dentalne restauracije i nadomjesci rezultat su ispravno postavljenih uvjeta u artikulatoru i same kreativnosti dentalnog tehničara prilikom izrade istog (2).

## 1.2. Opasnosti posla dentalnih tehničara

Razvoj protetike doveo je do pojave brojnih novih materijala. Svi ti materijali moraju imati određenu biološku, fizikalnu, kemijsku i estetsku kompatibilnost i zadovoljavati zahtjeve pacijenata. Dentalni tehničari i doktori dentalne medicine su u stalnom kontaktu s restaurativnim i pomoćnim materijalima kao što su metali, sintetski polimeri na bazi smola, cementi, materijali za uzimanje otisaka i keramika. Ti materijali mogu izazvati lokalnu

(alergijski, kontaktni dermatitis) ili sistemsku (plućna, neurološka, gastrointestinalna oboljenja) reakciju (1, 4).

Biti dentalni tehničar znači raditi posao koji je kvalificiran kao opasan za zdravlje. Postoji opravdan rizik za pojavu profesionalnih oboljenja, ne samo zbog korištenja i isparavanja brojnih štetnih tvari tijekom rada, nego i zbog neodgovarajućih radnih uvjeta u laboratoriju i loše zaštite kože, očiju i sluznica. Tehničari su izloženi štetnom djelovanju različitih otapala, anorganskim kiselinama i isparavanjima tijekom laboratorijske izrade fiksnih i mobilnih nadomjestaka i prašini prilikom finiranja i poliranja metala, keramike i akrilata. U grupu potencijalno toksičnih materijala koji se koriste u laboratoriju spadaju metakrilati, silikati, butilen glikol, otopine heksana, etil acetat, nitroceluloza, glutaraldehid, benzoil peroksid, hidrokinon, bisfenol A, kaolin i različiti metalni oksidi. Izloženost prašini iz materijala kao što su silikati i neki metalni oksidi (kobalt, krom, molibden, berilij) predstavlja rizik za razvoj nekih plućnih bolesti poput pneumokonioze (1). Prvi i najčešći simptomi su kašalj sa sputumom te kronična zaduha koji su izraženiji s duljim radnim stažom u laboratoriju (5).

Laboratorijsko osoblje izloženo je povećanom riziku za nastanak iritacija kože, očiju i sluznica i alergijskog dermatitisa. Posebice se to odnosi na različite materijale koji imaju metakrilatne monomere, za koje se zna da su potencijalni alergeni. Nije rijedak nalaz ni kontaktnog dermatitisa. Njega se povezuje s akrilatima i metalnim legurama, koje u kombinaciji s vodom, gipsom, mehaničkom frikcijom i promjenama temperature dovode do pojave kožnih simptoma. Iako nije do kraja ispitan, postoji rizik i za nastanak karcinoma. Posebice jer su neki materijali koji se koriste, u prvom redu krom, nikal, berilij i silikati, izrazito kancerogeni (1).

### *Osnovni toksikološki principi*

U profesionalnom okruženju, inhalacija je najvažniji put ulaska kemijskih sredstava u tijelo, nakon čega slijedi dodir s kožom i kasnije apsorpcija kože. Iako je gastrointestinalni trakt potencijalno mjesto apsorpcije, gutanje značajnih količina kemikalija rijetkost je u profesionalnom okruženju. Toksikologija je proučavanje štetnih učinaka kemijskih i fizikalnih sredstava. Najosnovniji koncept u toksikologiji navodi da postoji veza između doze sredstva i odgovora koji se proizvodi u biološkom sustavu. Toksičnost je sposobnost tvari da uzrokuje ozljedu biološkog tkiva. Opći rizik od neke tvari je vjerojatnost da će uzrokovati ozljede u danom okruženju ili situaciji. Opasnost tvari ovisi o nekoliko čimbenika,

uključujući njegovu toksičnost, sposobnost apsorpcije, metabolizma i izlučivanja te koliko brzo djeluje. Izloženost kemikalijama u toksikološkim ispitivanjima na životinjama razvrstava se prema učestalosti i trajanju. Akutna izloženost je izloženost do 24 sata. Subakutna izloženost je ponovljena izloženost tijekom jednog mjeseca ili manje. Subkronična izloženost je ponovljena izloženost kroz 1 do 3 mjeseca. Kronična izloženost je ponovljena izloženost koja traje duže od 3 mjeseca, a često 24 mjeseca ili duže. U radnom okruženju, akutna izloženost čovjeka obično se odnosi na izloženost koja uzrokuje učinak unutar 24 sata, dok se pojam kronične izloženosti primjenjuje na višu izloženost tijekom vremena (6).

### 1.2.1. Rizici vezani uz izloženost metalima

Prilikom izrade krunica, mostova i mobilnih proteza tehničari su izloženi djelovanju metalnih legura i smjesa kao što su vitallium (Co - Cr legura), durallium (Al – Cu – Mg - Mn legura) i wironit (Co - Cr legura). U sastavu tih slitina nalaze se najčešće nikal, kobalt, krom, i berilij te kombinacije tih istih metala s molibdenom, silikatima, ugljikom i željezom. Svaki od metala je potencijalno toksičan i može izazvati alergijske reakcije na koži, ali i različite sistemske bolesti. Najugroženija su pluća i njihov parenhim zbog udisanja para i prašine koja se stvara prilikom obrade legura (7). Uslijed akumulacije prašine u plućima često dolazi do pneumokonioze. Rizik za nastanak je izravno povezan s količinom prašine, posebice kobaltne, te s lošom ventilacijom prostorije u kojoj se radi (5).

#### *Izloženost kromu*

Toksičnost kroma, posebice njegovog šesterovalentnog iona ( $Cr^{6+}$ ), može dovesti do različitih simptoma i stanja. Naime, on lako penetrira barijere u ljudskom tijelu, od pora na koži do sluznica. Na koži može izazvati eritematozni ili vezikulo – papulozni dermatitis sa simptomima svrbeža i edemom kože. Posebno se manifestira na predjelu podlaktice kao takozvane kromove narukvice. Uz ovaj blaži, postoji i teži oblik kožnog oboljenja, a očituje se kao bezbolne Tannerove mukokutane ulceracije na dlanovima i nazalnom septumu, kao posljedica kontaminacije rukama. Od sistemskih stanja najčešće dovodi do kroničnog rinitisa, faringitisa, laringitisa pa čak i astme. U novije vrijeme rađena su eksperimentalna istraživanja koja su pokazala da neki spojevi heksavalentnog kroma mogu biti karcinogeni. Što se tiče trovalentnog iona ( $Cr^{3+}$ ) on se lako apsorbira samo kroz probavni sustav, pa su i simptomi i stanja koja izaziva većinom vezana za gastrointestinalni sustav (3, 6).



### *Izloženost kobaltu*

Dugotrajna izloženost kobaltu može dovesti do respiratornih manifestacija kao što su faringitis, suhi kašalj, astma, alergijski ili deskvamativni fibrozni alveolitis. Uz sistemska stanja može izazvati i kontaktni dermatitis na mjestima koja su podložna frikciji (gležanj, lakatni pregib i područje vrata) (3, 6).

### *Izloženost niklu*

Nikal može izazvati nespecifične iritacije uha, nosa i grla koje mogu dovesti do hipertrofičnog rinitisa, sinusitisa i nazalne polipoze te posljedično gubitka osjeta njuha. Kožne alergijske reakcije manifestiraju se u obliku kontaktnog ekcema sa svrbežom. Prerada nikla povezana je s povećanim rizikom od raka nosa i pluća (3, 6).

### *Izloženost beriliju*

Kronična intoksikacija berilijem izaziva beriliozu. To je stanje slično sarkoidozi čiji su inicijalni simptomi gubitak kilograma, dispneja, suhi kašalj praćen cijanozom i batičastim promjenama prstiju. Ukoliko upalna promjena traje dovoljno dugo, na plućima se mogu razviti granulomi koji, ako se bolest ne prepozna na vrijeme, mogu napredovati i izazvati komplikaciju koja se zove „cor pulmonale“, insuficijencija desne strane srca.

Berilij se nalazi u nekim legurama nikla-kroma koje se koriste u proizvodnji metalnih proteza. Koristi se zbog velike otpornosti na deformaciju. Ona predstavlja između 0 i 1% legura koje se koriste za proteze. Rizik od izlaganja metalnim prašinama dolazi nakon lijevanja, tijekom struganja i poliranja (3, 6).

### *Izloženost aluminiju*

Izloženost aluminiju može uzrokovati suptilne neurološke učinke, a povećano udisanje aluminijevih prašina može uzrokovati plućne efekte. Kod ljudi simptomi dugotrajne pretjerane izloženosti finoj prašini aluminija mogu uključivati dispneju, kašalj i slabost. Zabilježeno je da su ovi radnici obično izloženi brojnim drugim toksičnim sastojcima koji bi mogli uzrokovati slične simptome. Tipično, može postojati radiografski dokaz fibroze i povremenog pneumotoraksa. Ove prašine nalaze se u pjeskarenjima od korunda (aluminijev oksid) i keramičkim prašcima sastavljenim od kristalnog aluminijevog silikata (3, 6).

### 1.2.2. Rizici vezani uz izloženost metakrilatima

Akrilne smole često se koriste u svakodnevnoj dentalnoj praksi. Najčešća uporaba materijala obuhvaća baze proteza i podlaganje proteza, privremene krune i ortodontske aparate. U ustima, svojstva i funkcionalna učinkovitost primijenjenih akrilnih smola ovise o unutarnjem faktoru, a odnosi se na metode i uvjete polimerizacije te na vanjske čimbenike koji su povezani s okolinom u kojoj se materijal nalazi. Rezidualni monomer, koji se oslobađa kao rezultat interakcije oba čimbenika, često je povezan s iritacijom, upalnim i alergijskim reakcijama usne sluznice. Metil metakrilat (MMA), monomer akrilatne smole, ima primjenu u dentalnoj i općoj medicini i industriji. Najpoznatija primjena mu je za bazu mobilnih proteza. U promet dolazi u obliku praha i tekućine, gelova i listova. Ipak, najčešće je korišten u obliku praha i tekućine. Prah akrilatne smole sastoji se od polimetil metakrilata (PMMA), dibenzoil peroksida i raznih pigmentata. PMMA služi kao strukturni skelet zajedno s pigmentima koji oponašaju boju orofacijalnih tkiva. Benzoil peroksid je inicijator reakcije polimerizacije. Tekućina sadrži monomer MMA u najvećem postotku, zajedno s glikol dimetakrilatom (GDMA), koji služi kao sredstvo koje povezuje MMA monomere unutar PMMA skeleta te hidrokinonom koji je inhibitor polimerizacije. Komponente se miješaju u odgovarajućem omjeru, a polimerizacija se postiže toplom polimerizacijom (postupno zagrijavanje smjese do 343 K), hladnom polimerizacijom (autopolimerizacija – polimerizacija pri sobnoj temperaturi ili pri 313 K do 323 K) i mikrovalnom polimerizacijom (polimerizacija aktivirana mikrovalovima u mikrovalnoj pećnici; učinkovita polimerizacija u kratkom vremenu). Kao jedan od najvećih nedostataka u izradi i uporabi protetskih nadomjestaka na osnovi metakrilata smatra se nereagirani, zaostatni monomer. On može izazvati iritaciju, upalu i alergijsku reakciju na oralnoj sluznici (2-4, 8).

U novije vrijeme javlja se sve veća zabrinutost zbog potencijalne toksičnosti MMA, kako za tehničara koji izrađuje, tako i za pacijenta koji nosi mobilni nadomjestak. Djeluje kao senzibilizator i iritans na oči te respiratorni trakt. Štetan je i za centralni i periferni živčani sustav. Simptomi koji se pojavljuju prilikom dugotrajne izloženosti su glavobolja, križobolja, mučnina, gubitak teka, smanjena pokretljivost crijeva, umor, poremećaj spavanja, neuropatija pa čak i gubitak pamćenja. Može izazvati i blagu degeneraciju digitalnih živčanih vlakana kad se dodiruje bez zaštitnih rukavica prije polimerizacije. Izloženost MMA se pokazala kao faktor rizika za nastanak astme, a prilikom miješanja i pripreme materijala, pare monomera koje su isparavale znale su kod studenata izazvati glavobolju, vrtoglavicu i sinusnu iritaciju.

Čak i nakon polimerizacije, prilikom obrade materijala, prašina koja bi se oslobađala bila je odgovorna za nastanak pneumokonioze kod dentalnih tehničara (3, 4, 8-13).

#### *Citotoksičnost i genotoksičnost metil metakrilatnih monomera*

Mehanizmi genotoksičnosti i citotoksičnosti MMA monomera još uvijek nisu jasni. Neke studije su pokazale da ti monomeri smanjuju razinu glutation radikala (GSH; eng. glutathione radical), koji štiti stanične strukture od oštećenja uzrokovanih reaktivnim kisikovim spojevima (ROS; eng. reactive oxygen species). Tako značajno doprinose toksičnosti, jer odgovarajući porast razine ROS može aktivirati apoptozu. Jedna studija pokazala je da monomeri izazivaju toksične genetske događaje i da je mitotička rekombinacija glavni mehanizam djelovanja (14).

#### *Načini smanjenja izloženosti metil metakrilatnim monomerima*

U zubotehničkim laboratorijima pare monomera ne smiju biti veće od 100 ppm, a sustavi za ventiliranje trebaju se koristiti prema pravilima zaštite na radu. Treba obvezno nositi zaštitnu radnu odjeću, laboratorijsku pregaču, zaštitne naočale, masku i zaštitne rukavice. Spremnici moraju biti dobro pokriveni, kako bi spriječili isparavanje. Potrebno je napraviti oznake za pokazivanje količine izloženosti monomeru u radnom području. Uvijek temeljito oprati radne površine odmah nakon izlaganja monomeru i na kraju radne smjene. Isprati ruke vodom odmah nakon dodira s njima bez kontakta očiju ili kože. Ukloniti kontaktne leće ako se to može izvesti sigurno i odmah isprati vodom najmanje 15 minuta, držeći kapke otvorenim. Premjestiti pogođene osobe na otkriveni zrak. Popustiti usku odjeću kao što su ovratnik, kravata ili remen kako biste olakšali disanje. U slučaju proljevanja, očistiti proliveno pomoću odgovarajućeg materijala za upijanje. Radije koristiti sustave za miješanje sastavnica, nego ručno miješati (15).

#### 1.2.3. Rizici vezani uz izloženost silikatima

U svakodnevnom radu dentalni tehničari susreću se s materijalima koji sadrže silikate. Najčešće se koriste u abrazivima za pjeskarenje i poliranje metalnih osnova fiksnih i mobilnih radova. Tijekom pjeskarenja oslobađaju se velike količine silikatne prašine. Različiti lakovi i materijali za impregnaciju i zaštitu sadrže slobodne kristalne silikate u obliku kvarca ili kristobalita s česticama izrazito male veličine, zbog čega je olakšana apsorpcija u pulmonalni trakt, ne samo tijekom pripreme i izrade materijala, nego i nakon

vađenja materijala iz kalupa. Najčešća bolest koju izazivaju prašine silikata je pneumokonioza, odnosno silikoza. Dolazi do promjena alveolarne strukture unutar plućnog parenhima zbog kronične upale i stvaranja granuloma. U određenog broja dentalnih tehničara pronađena je veza između izloženosti silikatima i pojavnosti određenih autoimunih bolesti, u prvom redu sistemske skleroderme. Uz nju, nije rijedak nalaz i ostalih bolesti poput: sistemnog eritematoznog lupusa, reumatoidnog artritisa i dermatomioze. Rizik od silikoze ograničen je ako se ti materijali koriste u vlažnim uvjetima, ali preventivne mjere su ipak neophodne kada se vrši brušenje i završna obrada (3).

#### 1.2.4. Rizici vezane uz izlaganje voskovima

Voskovi se sastoje od estera, masnih kiselina, alkohola, kolofonija i parafina koji pri zagrijavanju proizvode pare aldehida i ketona. Ketoni mogu ući u tijelo svim putovima, posebno inhalacijom. Aldehidi i ketoni su toksični na kožu, oči i sluznicu dišnog trakta. Oni mogu izazvati alergijske reakcije i / ili iritaciju. Nezasićeni aldehidi niske molekulske mase i halogenirani aldehidi uzrokuju nadraženu iritaciju. Alergijske reakcije kože na formaldehid i glutaraldehid dobro su dokumentirane. Moguće su i respiratorne alergije, ali mnogo rjeđe. Rosin, prirodna smola, složena je mješavina nezasićenih, nearomatskih cikličkih ugljikovodika. Njegov najtoksičniji sastojak je abietična kiselina koja se oslobađa nakon zagrijavanja i uzrokuje kontaktni ekcem (3).

#### 1.2.5. Rizici vezani uz izlaganje ljepilima na osnovi cijanoakrilata

Ljepila korištena u proizvodnji proteza uključuju metil, etil i alkil cijanoakrilate. Te tvari odgovorne su za astmu i iritaciju konjunktive, respiratornog trakta (rinitis, bronhitis) i kože. Zabilježeno je nekoliko slučajeva alergijskog kontaktnog dermatitisa (3).

#### 1.2.6. Rizici vezani uz izlaganje hidrofluornoj kiselini

Hidrofluorna kiselina je hlapljiva tekućina koja se koristi za poliranje i kiseljenje legura kod popravka keramičkih proteza. Emitiraju se dimovi koji nadražuju oči i gornju stranu dišnih putova. Izravni kontakt uzrokuje vrlo teške opekline i nekrozu (3).

### 1.3. Preventivne mjere za dentalne tehničare na radnom mjestu

#### 1.3.1. Procjena izloženosti i praćenje izloženih bolesnika

Glavni modaliteti prevencije su klasifikacija i kvantifikacija izloženosti. To se može postići identifikacijom i mjerenjem razine supstrata u atmosferi na mjestu rada, s ciljem uspoređivanja tih vrijednosti s referentnim vrijednostima kao što je srednja vrijednost izloženosti. Ovaj pristup prikladan je za proučavanje tvari koje prodiru u pluća (plinovi, prašine), ali su male vrijednosti u slučaju dodira s kožom. Mogu se koristiti senzori pozadine ili pojedinačni senzori. Također je moguće mjeriti biološke pokazatelje izloženosti u krvi ili urinu, izdahnutom zraku, bronho-alveolarni ispirku ili egzoskeletu izloženih radnika. Biomarker može biti sama tvar ili jedan od njegovih metabolita. Ove metode skupe su i teške za provedbu (uzimanje krvi ili urina, očuvanje uzoraka, tehnika analize). U većini slučajeva, praćenje izloženih bolesnika temelji se na jednostavnom biološkom pregledu (broj krvnih stanica, jetreni enzimi, gGT). Neuobičajeni rezultati trebaju se smatrati signalima upozorenja što dovodi do uvođenja adekvatnije ventilacije u laboratoriju i pojedinačnih zaštitnih mjera (3).

#### 1.3.2. Smanjenje ili suzbijanje izloženosti na kolektivnoj razini

Da bi se postiglo smanjenje ili suzbijanje ili izloženost na kolektivnoj razini, nužno je suzbijanje opasnih emisija uporabom novih proizvoda (izbjegavati gdje god je to moguće sve proizvode i materijale koji sadrže slobodni kristalni silicijev dioksid, azbest i berilij te zabraniti uporabu hidrofluorne kiseline) ili novih tehnika (raditi pod tekućom vodom, pakiranje u prethodno doziranim vrećicama, izbjegavajući praškaste materijale, koristiti zapečaćene prethodno dozirane kapsule s miješanjem i automatskim ubrizgavanjem u zatvorene kalupe, spajanje legura s indukcijom visoke frekvencije). Koristiti usisne uređaje koji hvataju štetne tvari i prozračuju prostor. Uređaj koji prikuplja onečišćujuće tvari mora biti što je moguće bliže mjestu na kojem se emitiraju, a postavljeni na takav način da operator nije između uređaja i izvora onečišćenja. Osigurati dovoljan protok zraka, ravnomjerno rasporediti strujanje zraka u zoni prikupljanja te nadoknaditi protjerani zrak s odgovarajućim protjecanjem svježeg (3).

### 1.3.3. Primjena pojedinih sredstava zaštite

Kako bi smanjio rizik za nastanak bolesti i povećala učinkovitost, dentalnim tehničarima se moraju osigurati valjani uvjeti za rad. Laboratoriji bi trebali biti prostrani, čisti, dobro osvijetljeni i ventilirani. Trebale bi postojati zasebne prostorije za različite faze rada. Da bi se izbjegla oštećenja muskuloskeletalnog sustava trebali bi imati odgovarajuće i prilagodljive stolice. Osoblje bi trebalo imati najmanje dvije 10 – minutne pauze koje bi iskoristili za izvođenje vježbi za kralježnicu i ruke. Pušenje i konzumiranje alkoholnih napitaka bi trebalo biti zabranjeno na radnom mjestu. Izrazito je važno koristiti i odgovarajuću zaštitu. Tehničari moraju nositi radnu odoru, naočale ili vizire i maske. Nitrilne i gumene rukavice napravljene od sintetskih materijala preporučuju se zbog činjenice da rukavice od lateksa ne pružaju dobru zaštitu, budući da molekule metakrilata i ostalih potencijalno toksičnih tvari mogu prodrijeti kroz njih i izazvati iritacije i alergijske reakcije. Da bi se izbjegli štetni utjecaji buke koriste se zaštitne slušalice. Česta izmjena opsega posla koristi se za sprječavanje štetnih utjecaja vibrirajućih uređaja. Mogu se koristiti i specijalne antivibrirajuće rukavice. Dentalni tehničari trebali bi ići redovito na sistematske preglede, s posebnim naglaskom na pregled plućne funkcije, kože, sluznica dišnog sustava i uha. Za sprječavanje infektivnih bolesti svaki otisak i predmet koji je bio u ustima pacijenta potrebno je adekvatno dezinficirati. Kao važno ističe se odgovarajuća izobrazba osoblja o štetnosti određenih materijala i radnji te postupcima kojima bi se njihova štetnost svela na minimum (1-3, 12, 16).

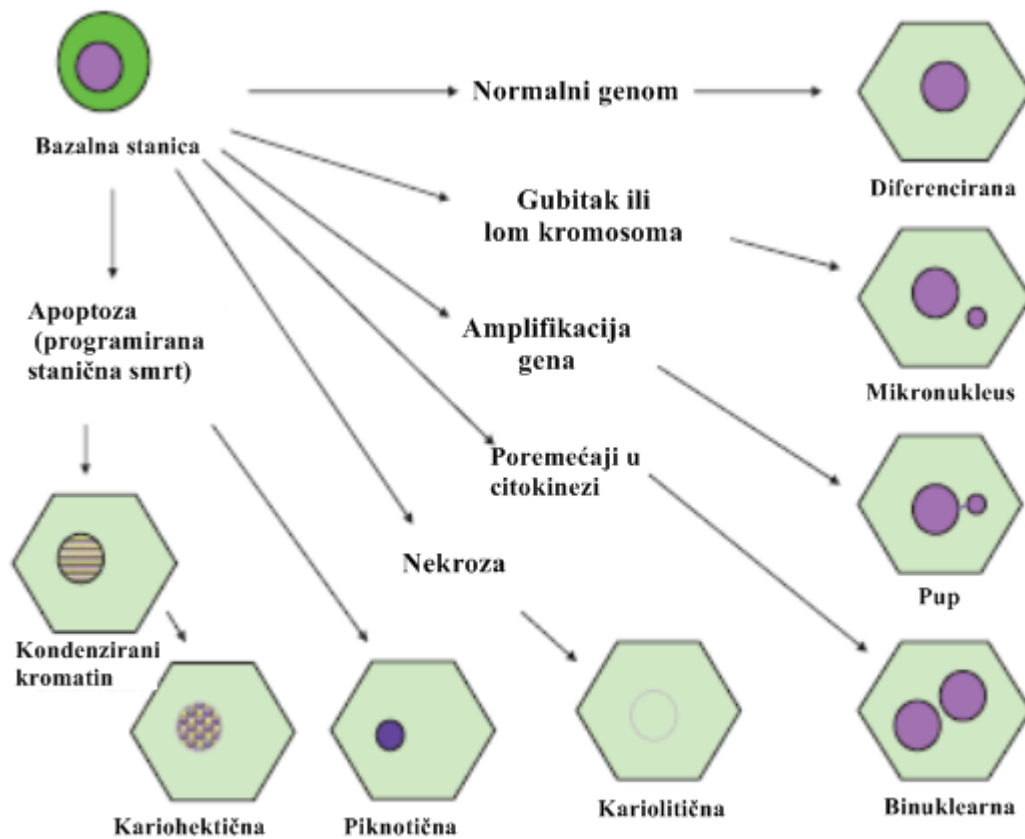
## 1.4. Mikronukleus test

Mikronukleus test je minimalno invazivna metoda za proučavanje oštećenja DNK, kromosomske nestabilnosti, stanične smrti te regenerativne sposobnosti ljudskih stanica. Ovim testom određuje se pojavnost stanica s mikronukleusom, ekstranuklearnim tjelešcem sastavljenim od cijelih kromosoma ili zaostatnih kromosomskih fragmenata koji se tijekom diobe nisu mogli inkorporirati u stanicu kćer. Naime, u anafazi mitoze acentrična kromatida i kromosomski fragmenti počinju zaostajati za centričnim elementima, koji se počinju kretati prema polovima vretena. Centrični elementi sazrijevaju do stanice kćeri, dok ostali elementi ostaju inkapsulirani i odvojeni u male jezgre tzv. mikronukleuse (17-19).

Regenerativni kapacitet tkiva i organa bitan je za homeostazu organizma. On ovisi o broju stanica koje su u diobi, njihovoj genomskoj stabilnosti te sklonosti staničnoj smrti. Jedan od načina ispitivanja regenerativnog kapaciteta je provođenje mikronukleus testa na oljuštenim bukalnim stanicama. Metoda je minimalno invazivna i korisna za istraživanje utjecaja određene prehrane, načina života i izlaganja genotoksičnom utjecaju nekih štetnih agensa. Bukalne stanice su prva barijera za inhalacijski i ingestijski put te su kao intaktne sposobne metabolizirati određene karcinogene. Budući da je više od 90 % tumora epitelnog porijekla, istraživanje na njima bi moglo otkriti genotoksične utjecaje prije nego izazovu sistemske posljedice (17, 18).

Oralni epitel sastoji se od četiri sloja – bazalnog sloja (*stratum germinativum*), trnastog sloja (*stratum spinosum*), zrnatog sloja (*stratum granulosum*) i keratiniziranog sloja na površini (*stratum corneum*). Vrijeme potrebno da stanica iz bazalnog sloja dospije u površinski sloj i oljušti se je 7 – 14 dana. Unutar bazalnog sloja mogu se pojaviti mikronukleus stanice kao indikator genetskih oštećenja tijekom diobe (17, 18).

Osim mikronukleus stanica mogu se pojaviti i stanice koje ukazuju na oštećenja DNK (stanice pupovi), citokinetske defekte (binuklearna stanica) i smrti stanica (kondenzirani kromatin, karioreksa, piknoza, karioliza) (Slika 1) (17, 18).



Slika 1. Dijagramski prikaz različitih tipova stanica dobivenih u bukalnom mikronukleus testu. Preuzeto i prilagođeno iz: Thomas P, Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, et al. Buccal micronucleus cytome assay. Natur Protoc. 2009;4(6):825-37.



## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZE**

Cilj ovog istraživanja bio je procijeniti pojavnost broja bukalnih epitelnih stanica s mikronukleusom, nuklearnim pupom, nuklearnim mostom, binuklearnih stanica, stanica s karioreksom, kondenziranim kromatinom, piknotičkom jezgrom i kariolizom kod dentalnih tehničara u usporedbi s doktorima dentalne medicine i njihovim asistentima kako bi se odredila potencijalna genotoksičnost materijala s kojima se susreću u svakodnevnom radu.

Radne hipoteze:

- Učestalost mikronuklea i drugih jezgrinih anomalija je veća kod dentalnih tehničara nego kod doktora dentalne medicine i dentalnih asistenata,
- Učestalost mikronuklea i drugih jezgrinih anomalija je veća kod dentalnih tehničara koji se većinom u svome svakodnevnom radu bave s metalima i akrilatom nego onih koji rade s keramikom.

### **3. MATERIJALI I METODE**

Ova presječena studija bila je usmjerena na procjenu pojavnost mikronukleusa i ostalih jezgrinih anomalija (karioreksa, karioliza, piknoza, kondenzirani kromatin, most, pup, binuklearne stanice) na bukalnim epitelnim stanicama dentalnih tehničara u usporedbi s dvjema kontrolnim skupinama koju su činili doktori dentalne medicine i asistenti.

Istraživanje se provodilo na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Splitu u suradnji sa zubotehničkim laboratorijima i ordinacijama dentalne medicine u Splitu. Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta (Klasa: 003-08/17-03/001, Ur. Br. : 2181-198-03-04-17-0012)

### *Ispitanici*

Istraživanje je provedeno na 145 ispitanika. 45 dentalnih tehničara, 50 doktora dentalne medicine te 50 dentalnih asistenata. U istraživanje smo uključili dentalne tehničare, doktore dentalne medicine i dentalne asistente koji su dobrovoljno pristali sudjelovati u istraživanju, potpisali suglasnost za sudjelovanje, popunili upitnik o demografskim čimbenicima (dob, spol), osobnim čimbenicima (uporaba lijekova, izloženost zračenju, medicinska i dentalna anamneza), prehrambenim navikama te oralno – higijenskim navikama.

Kriteriji uključanja bili su punoljetni i zdravi ispitanici bez sistemskih oboljenja koji minimalno godinu dana rade u svojoj struci. Isključni kriteriji podrazumijevali su oboljele od zaraznih bolesti, kroničnih upalnih bolesti, korištenje antibiotika, kortikosteroida i protuupalnih lijekova kao i oštećenje sluznice usne šupljine - maligne i premaligne lezije usne šupljine. U istraživanje nisu bili uključeni ni ispitanici s mobilnim i fiksnim nadomjescima te ortodontskim aparatićem, te svi oni koji su zračeni u području glave i vrata u posljednjih šest mjeseci.

Svaki ispitanik je prije potpisivanja informiranog pristanka i suglasnosti u potpunosti bio upoznat sa svrhom rada.

### *Uzorkovanje stanica*

Svakom ispitaniku uzimao se uzorak stanica s područja bukalne sluznice citološkom četkicom (Cytobrush Plus, GmbH, Dietramszell-Linden, Njemačka). Nakon ispiranja usne šupljine vodom, mekom citološkom četkicom se uzimao bris s bukalne sluznice lijeve i desne

strane. Nakon toga stanice se razmazane preko predmetnog stakalca. Sve sudionike istraživanja zamolili smo da se jedan sat prije uzorkovanja suzdrže od pušenja, jela te konzumacije alkoholnih pića.

### *Mikronukleus test*

Uzorak epitelnih stanica nanio se na predmetno stakalce, potom fiksirao metanolom (80% v/v) i bojao otopinom 5% Giemsa-e. Nakon toga uzorak je ispran destiliranom vodom i osušen na zraku te analiziran svjetlosnim mikroskopom Olympus CX 40 (Olympus, Tokio, Japan) pod x400 povećanjem, s time da su svaki mikronukleus i ostale nuklearne anomalije dodatno provjereni pod povećanjem od 1000 puta. Za svakog ispitanika analizirao se broj od 1000 stanica u duplikatu. Kao mjere citotoksičnosti i genotoksičnosti, u stanicama su se utvrdili broj mikronukleusa te drugih morfoloških promjena jezgre. Gledale su se samo stanice koje su zadovoljavale slijedeće kriterije: (a) intaktna citoplazma i relativno ravan položaj stanice na stakalcu, (b) minimalno ili bez preklapanja sa susjednim stanicama, (c) malo ili bez debrisa i (d) jezgra normalna i intaktna, nuklearan obujam gladak i izražen. Također su se poštovali i kriteriji za raspoznavanje mikronukleusa koji uključuju: (a) zaobljen i gladak obujam koji ukazuje na membranu, (b) promjer manji od 1/3 promjera nukleusa, ali dovoljno velik za raspoznavanje boje i oblika, (c) intenzitet bojanja sličan nukleusu, (d) struktura slična nukleusu, (e) ista žarišna ravnina kao kod nukleusa i (f) odsutnost preklapanja s nukleusom (20). Odvojeno su prebrojane i stanice s dvije jezgre koje su evidentirane kao binuklearne stanice, kao i ostale nuklearne anomalije karioreksa (nuklearna dezintegracija), karioliza (disolucija jezgre), jezgrini pupovi (prekursori mikronukleusa), jezgrini mostovi (jezgra sužena na pola), kondenzirani kromatin i piknotička jezgra (21).

### *Statistička obrada podataka*

Za statističku obradu podataka korišten je programski paket Statistica 13 (Dell Software, Kalifornija, SAD). Za određivanje osnovnih statističkih parametara (srednje vrijednosti, standardne pogreške, standardne devijacije i relativne standardne devijacije, medijana te minimalne i maksimalne vrijednosti) korištena je metoda deskriptivne statistike. Uz pomoć analize varijance i *post hoc* Student t-testa, utvrđene su razlike u broju mikronukleusa i ostalih jezgrinih anomalija unutar grupe i između pojedinih grupa ispitanika.

Opći regresijski model iz lineranog/nelinearnog regresijskog modela i kanonska korelacijska analiza korištene su za procjenu utjecaja prediktorskih varijabli (dob, spol, zdravstveno stanje, korištenje lijekova, izloženost rendgenskom zračenju, prehrambene navike, dentalni status, osobne navike) na zavisne varijable (mikronukleus, binuklearne stanice, nukleoplazmatski mostovi, nuklearni pupovi, piknoza, kondenzirani kromatin, karioliza i karioreksa). Za opis populacije te računanje Parsonovih korelacijskih koeficijenata korištena je metoda osnovne statistike. Za utvrđivanje odnosa između pojedinih varijabli korišteni su napredni regresijski modeli, a rezultati su prikazani u formi Pareto dijagrama. U svim testovima korištena je razina značajnosti  $P < 0,05$ .

#### **4. REZULTATI**

U istraživanju je sudjelovalo 145 ispitanika, od kojih 50 dentalnih asistenata, 50 doktora dentalne medicine i 45 dentalnih tehničara. Među dentalnim tehničarima bilo je 86,68% žena i 13,33% muškaraca, doktorima dentalne medicine 72% žena i 28% muškaraca, a svi dentalni asistenti su bili ženskog spola. Srednja dob dentalnih tehničara bila je  $38,80 \pm 13,17$ , doktora dentalne medicine  $37,08 \pm 9,13$ , a dentalnih asistentica  $35,18 \pm 15,22$ .

#### *Usporedba dentalnih tehničara, dentalnih asistenata i doktora dentalne medicine*

Osnovni statistički parametri korišteni za dobivanje rezultata pomoću mikronukleus testa na stanicama bukalne sluznice kod tri grupe ispitanika prikazani su u Tablici 1, te Slikama 2 i 3.

Analiza varijance potvrdila je statistički značajnu razliku između testiranih grupa, koje su podijeljene s obzirom na njihovu profesiju i testirane na sljedeće parametre: broj mikronukleusa i binuklearnih stanica, stanica s nukleoplazmatskim mostovima i pupovima, piknozom, kondenziranim kromatinom, kariolizom i karioreksom.

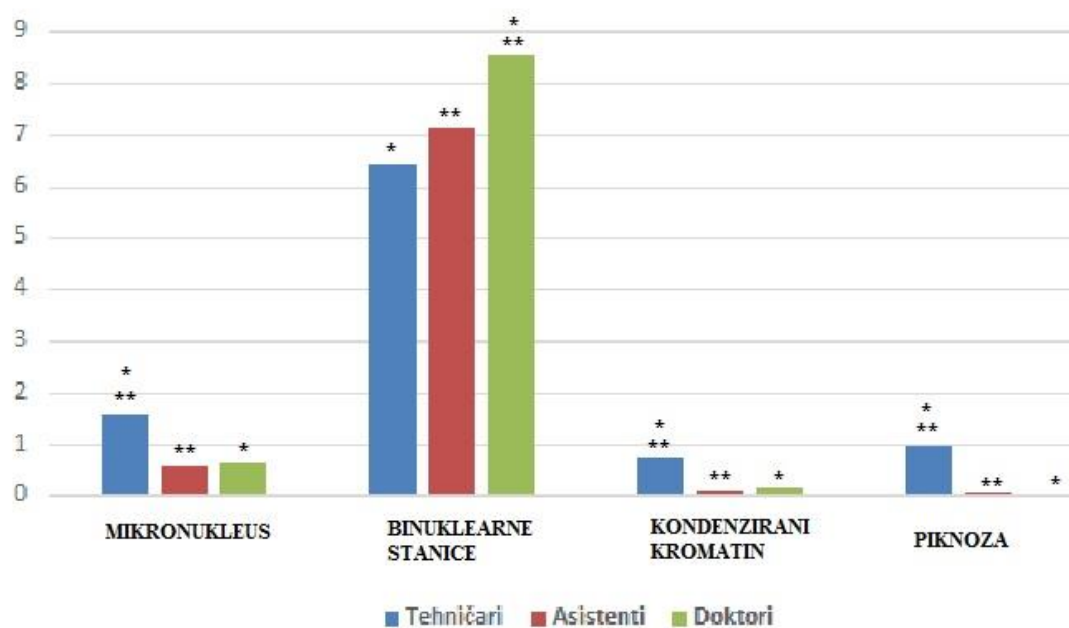
Student t-test potvrdio je statistički značajnu razliku između broja mikronukleusa kod dentalnih tehničara i doktora dentalne medicine ( $P = 0,008$ ), te između dentalnih tehničara i dentalnih asistenata ( $P = 0,004$ ). Također, kod dentalnih tehničara zapažena je značajna razlika u broju stanica s kondenziranim kromatinom u usporedbi s doktorima dentalne medicine i dentalnim asistentima ( $P = 0,000$ ). Ista, statistički značajna razlika zapažena je u broju stanica s piknozom kao i stanica s kariolizom, između dentalnih tehničara i druge dvije testirane grupe. Između dentalnih tehničara i doktora primijećena je statistički značajna razlika u broju stanica s pupom ( $P = 0,002$ ) i binuklearnih stanica ( $P = 0,003$ ). Student t-test potvrdio je i statistički značajnu razliku u broju stanica s mostovima i binuklearnih stanica kod dentalnih asistenata i doktora dentalne medicine ( $P = 0,000$  i  $P = 0,037$ , za svaki posebno). Pojavnost mostova razlikovala se između dentalnih tehničara i dentalnih asistenata ( $P = 0,000$ ).



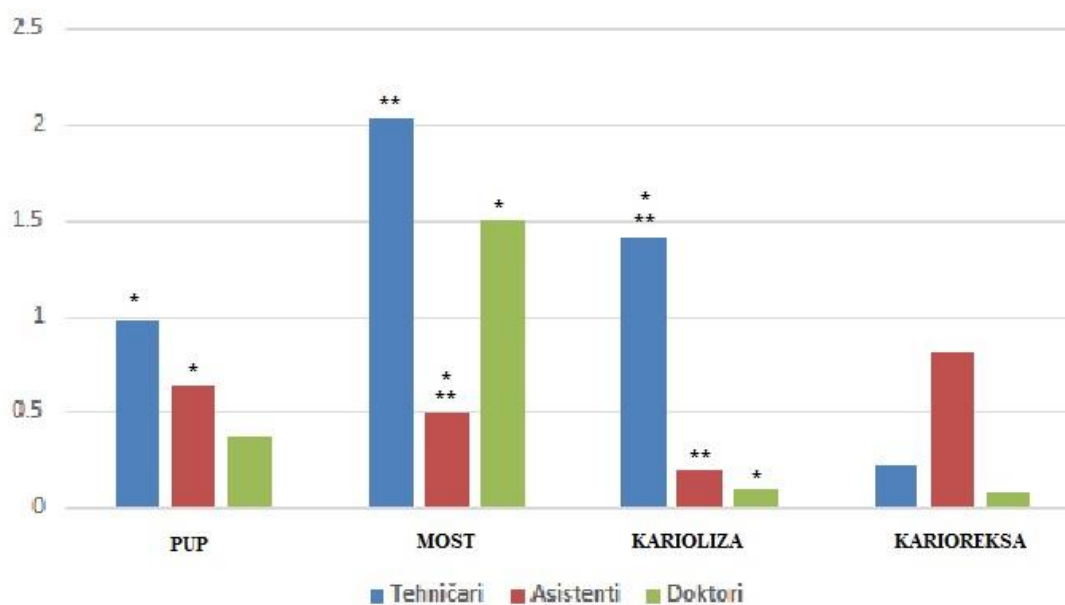
**Tablica 1.** Osnovni statistički parametri za ispitivane varijable mikronukleus testa kod dentalnih asistenata, dentalnih tehničara i doktora dentalne medicine prikazani kao srednja vrijednost i standardna devijacija.

	Dentalni asistenti	Dentalni tehničari	Doktori dentalne medicine
<b>Mikronukleus</b>	0,58 ± 0,81 <sup>a</sup>	1,58 ± 2,07 <sup>a,b</sup>	0,68 ± 0,74 <sup>b</sup>
<b>Binuklearne stanice</b>	7,12 ± 3,37 <sup>d</sup>	6,44 ± 3,27 <sup>c</sup>	8,56 ± 3,42 <sup>c,d</sup>
<b>Kondenzirani kromatin</b>	0,14 ± 0,35 <sup>l</sup>	0,76 ± 0,98 <sup>e,l</sup>	0,16 ± 0,37 <sup>e</sup>
<b>Piknoza</b>	0,08 ± 0,27 <sup>j</sup>	0,96 ± 1,24 <sup>f,j</sup>	0,04 ± 0,20 <sup>f</sup>
<b>Pup</b>	0,64 ± 0,90	0,98 ± 1,10 <sup>g</sup>	0,38 ± 0,64 <sup>g</sup>
<b>Most</b>	0,50 ± 0,86 <sup>h</sup>	2,04 ± 1,97	1,50 ± 1,04 <sup>h</sup>
<b>Karioliza</b>	0,20 ± 0,49 <sup>k</sup>	1,42 ± 1,25 <sup>i,k</sup>	0,10 ± 0,30 <sup>i</sup>
<b>Karioreksa</b>	0,81 ± 0,60	0,22 ± 0,42	0,08 ± 0,40

\*Unutar istog reda, isto slovo označuje statistički značajnu razliku među testiranim grupama ( $P < 0,05$ ).



**Slika 2.** Srednje vrijednosti i standardne devijacije parametara mikronukleus testa (mikronukleus, binuklearna stanica, kondenzirani kromatin) kod ispitivanih skupina. \*\*, \*\* P < 0,05.



**Slika 3.** Srednje vrijednosti i standardne devijacije parametara mikronukleus testa (pup, most, karioliza, karioreksa) kod ispitivanih skupina. \*\*, \*\* P < 0,05.

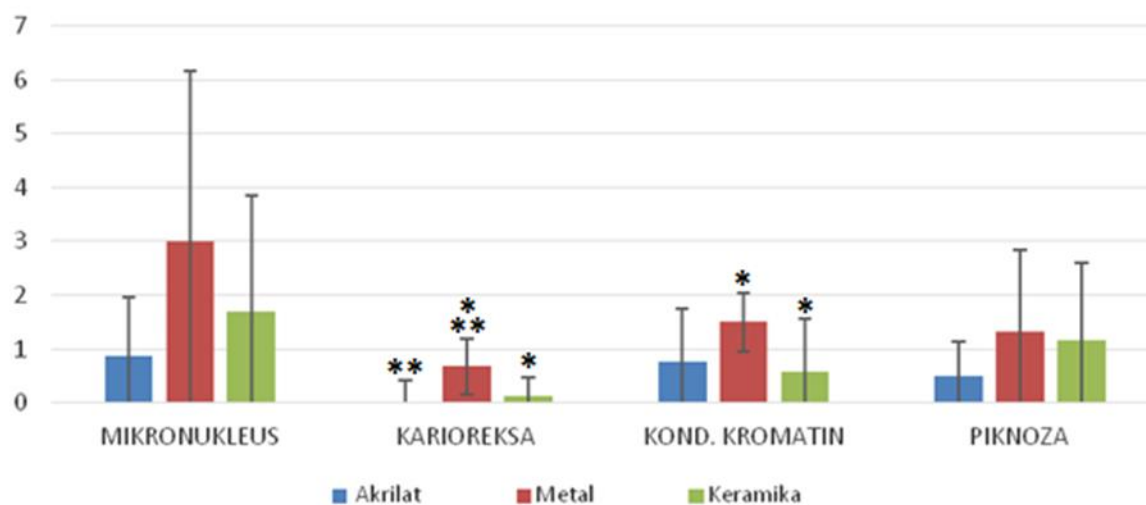
*Usporedba dentalnih tehničara s obzirom na vrstu posla koju obavljaju u laboratoriju*

Student t-testom smo usporedili zubne tehničare unutar kolektiva prema vrsti posla koju obavljaju u laboratorijima (Tablica 2, Slika 4 i 5). Među ispitivanih 45 dentalnih tehničara njih 16 radi većinom s akrilatom, 6 s metalima, a 23 s keramikom. Tehničari koji se bave primarno metalom imaju značajno više stanica s karioreksom u odnosu na one koji se bave akrilatom ( $P = 0,032$ ), te onih koji rade s keramikom ( $P = 0,005$ ). Nadalje, tehničari koji se uglavnom bave metalima imaju i značajno više stanica s kondenziranim kromatinom u odnosu na one koji se bave s keramikom ( $P = 0,036$ ).

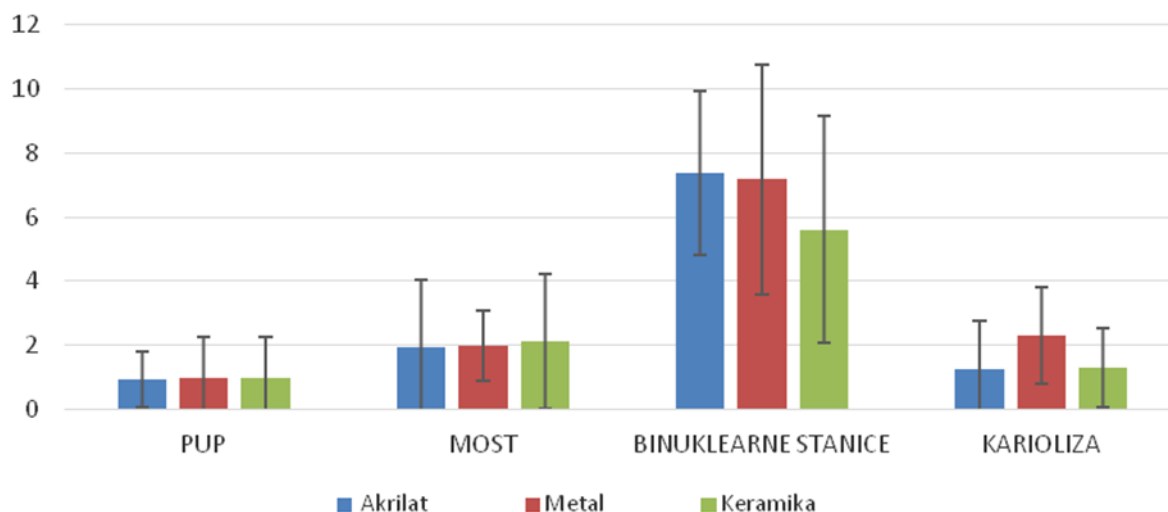
**Tablica 2.** Osnovni statistički parametri za ispitivane varijable mikronukleus testa unutar grupe dentalnih asistenata ovisno o poslu koji obavljaju u dentalnom laboratoriju prikazani kao srednja vrijednost (standardna devijacija).

	<b>Akrilat</b>	<b>Metal</b>	<b>Keramika</b>
<b>Mikronukleus</b>	0,88 (1,088)	3,00 (3,162)	1,70 (2,141)
<b>Karioreksa</b>	0,019 (0,403) <sup>a</sup>	0,67 (0,548) <sup>a, b</sup>	0,13 (0,344) <sup>b</sup>
<b>Kondenzirani kromatin</b>	0,75 (1,00)	1,50 (0,548) <sup>c</sup>	0,57 (0,992) <sup>c</sup>
<b>Piknoza</b>	0,50 (0,632)	1,33 (1,506)	1,17 (1,435)
<b>Pup</b>	0,94 (0,854)	1,00 (1,265)	1,00 (1,243)
<b>Most</b>	1,94 (2,112)	2,00 (1,095)	2,13 (2,096)
<b>Binuklearna stanica</b>	7,36 (2,553)	7,17 (3,601)	5,61 (3,539)
<b>Karioliza</b>	1,25 (1,506)	2,33 (1,506)	1,30 (1,222)

\*Unutar istog reda, isto slovo označuje statistički značajnu razliku među testiranim grupama ( $P < 0,05$ ).



**Slika 4.** Srednje vrijednosti i standardne devijacije parametara mikronukleus testa (mikronukleus, karioreksa, kondenzirani kromatin, piknoza) dentalnih tehničara s obzirom na posao koji primarno obavljaju u laboratoriju.

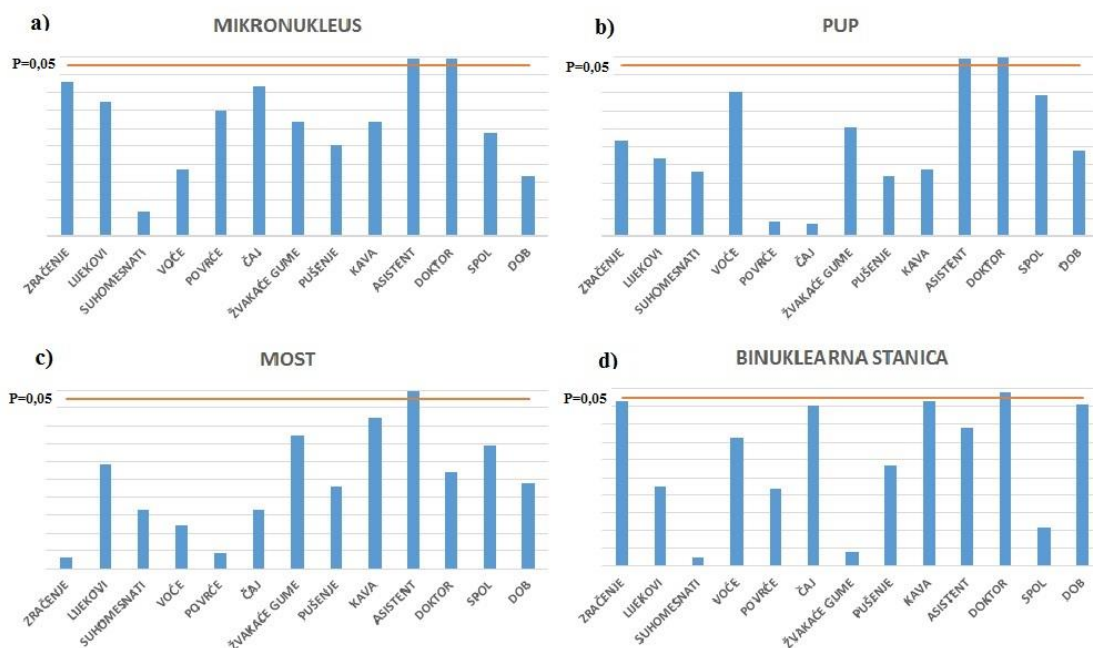


**Slika 5.** Srednje vrijednosti i standardne devijacije parametara mikronukleus testa (pup, most, binuklearne stanice, karioliza) dentalnih tehničara s obzirom na posao koji primarno obavljaju u laboratoriju.

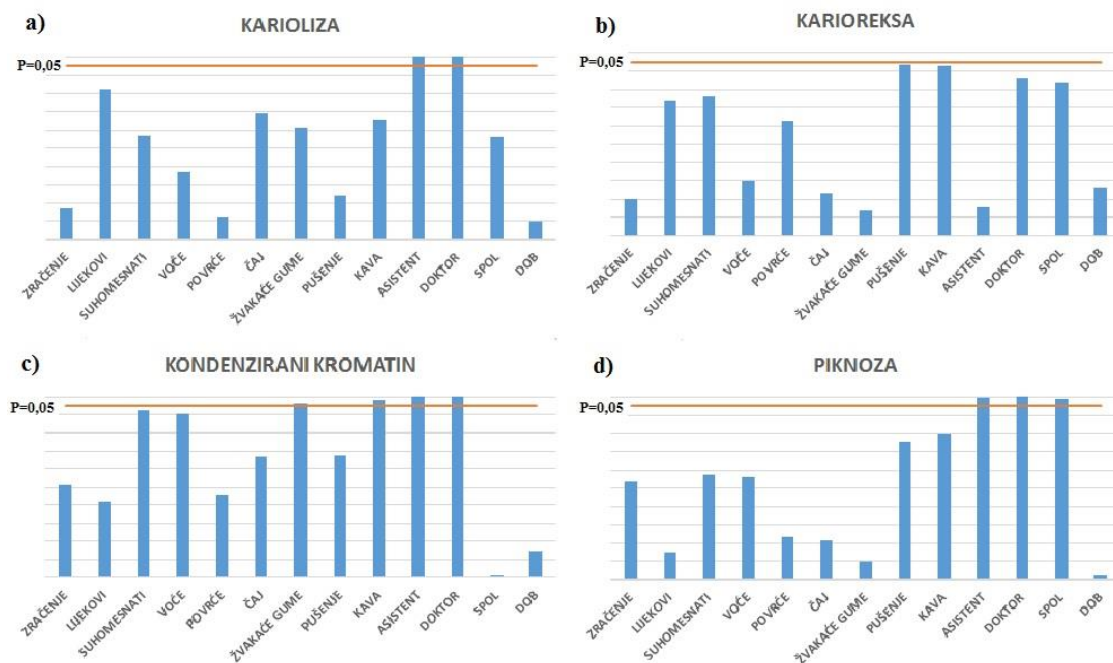
*Višestruka regresijska analiza*

Ovisnost parametara mikronukleus testa u ukupnoj ispitnoj skupini o svim prediktorskim varijablama utvrđena je generalnim regresijskim modelom i prikazana u obliku Pareto dijagrama (Slika 6 i 7).

Na incidenciju broja stanica s mikronukleusom od svih ispitivanih prediktorskih varijabla jedino utjecaj ima vrsta profesije kojom se ispitanici bave. Tako je utvrđeno kako doktori dentalne medicine i dentalni asistenti imaju manji broj mikronukleusa u odnosu na dentalne tehničare ( $\beta = -1,027$  i  $\beta = -1,030$ ,  $P = 0,009$  i  $P = 0,007$ ; redom) (Slika 6a). Dentalni asistenti imaju značajno manji broj nuklearnih mostova u odnosu na dentalne tehničare ( $\beta = -1,310$ ,  $P = 0,001$ ) (Slika 6b). Također profesija ima utjecaj i na pojavnost nuklearnih pupova, tako dentalni asistenti i doktori dentalne medicine imaju manju pojavnost istih u odnosu na dentalne tehničare ( $\beta = -0,710$  i  $\beta = -0,789$ ;  $P = 0,012$  i  $P = 0,006$ ) (Slika 6c). Na pojavu binuklearnih stanica je potvrđen statistički značajan učinak varijable profesija. Doktori dentalne medicine imaju veću pojavnost u odnosu na dentalne tehničare ( $\beta = 2,154$ ;  $P = 0,023$ ) (Slika 6d). Karioliza je isto u ovisnosti s profesijom, pa tako dentalni asistenti i doktori dentalne medicine imaju manju pojavnost u odnosu na dentalne tehničare ( $\beta = -1,447$  i  $\beta = -1,624$ ;  $P = 0,000$  i  $P = 0,000$ ) (Slika 7a). Nije uočen značajan utjecaj nijedne od ispitivanih varijabli na pojavnost kariorekse (Slika 7b), a na pojavnost stanica s kondenziranim kromatinom imali su utjecaj učestalosti konzumacije žvakaćih guma ( $\beta = 0,261$ ;  $P = 0,035$ ) učestalosti uživanja u kavi ( $\beta = 0,521$ ;  $P = 0,014$ ), te profesija. Dentalni asistenti i doktori dentalne medicine imaju manje stanica s kondenziranim kromatinom ( $\beta = -0,764$  i  $\beta = -0,829$ ;  $P = 0,000$  i  $P = 0,000$ ) (Slika 7c). Na pojavnost stanica s piknotičnom jezgrom utjecaj je imala profesija, pa je tako uočen manji broj stanica s piknotičnom jezgrom kod dentalnih asistenata i doktora dentalne medicine ( $\beta = -0,770$  i  $\beta = -1,098$ ,  $P = 0,001$  i  $P = 0,000$ ) u odnosu na dentalne tehničare. Spol je isto imao značajan utjecaj na pojavnost stanica s piknozom ( $\beta = 0,857$ ;  $P = 0,009$ ) (Slika 7d).



**Slika 6.** Pareto dijagram ovisnosti pojavnosti stanica s mikronukleusom, nuklearnim mostom, nuklearnim pupom i binuklearnih stanica o prediktorskim varijablama.



**Slika 7.** Pareto dijagram ovisnosti pojavnosti stanica s kariolizom, karioreksom, kondenziranim kromatinom i piknotičkom jezgrom o prediktorskim varijablama.

## **5. RASPRAVA**

Dentalni tehničari redovno su izloženi prašini i organskim otapalima prilikom izrade krunica, mostova, djelomičnih i potpunih proteza te ortodontskih naprava. U svom radu koriste brojne metalne legure i polimere temeljene na metil metakrilatu koje mogu biti opasne za njihovo zdravlje. Zbog svega navedenog opravdana je zabrinutost vezana uz profesionalnu izloženost tim materijalima, budući da njihova razgradnja izaziva neželjene učinke na stanicama oralne sluznice. Cilj ovog presječenog istraživanja bio je procijeniti moguće dugoročne genotoksične i citotoksične učinke zbog profesionalne izloženosti materijalima, na stanicama bukalne sluznice kod dentalnih tehničara, s obzirom na obim i vrstu posla kojeg obavljaju u laboratoriju. Istraživanje je provedeno pomoću mikronukleus testa na oljuštenim stanicama bukalne sluznice kod dentalnih tehničara i kontrolnih skupina, koje su činili doktori dentalne medicine i asistenti. Hipoteze istraživanja su potvrđene, učestalost jezgrinih oštećenja u bukalnim stanicama je bila veća kod dentalnih tehničara nego kod doktora dentalne medicine i dentalnih asistenata. Isto tako je učestalost jezgrinih anomalija u bukalnim stanicama bila veća kod dentalnih tehničara koji češće rade s metalima nego kod onih koji rade s akrilatom i keramikom.

Stanice bukalne sluznice predstavljaju prvu barijeru na inhalacijskom i ingestivskom putu te su sposobne metabolizirati potencijalne karcinogene i ostale reaktivne produkte. Također, čine prvo mjesto za pojavu i prijevremenih genotoksičnih oštećenja izazvanih kancerogenim agensima, stoga se na njima i rade testovi za procjenu genotoksičnosti (22). Mikronukleus test, korišten u ovoj studiji, minimalno invazivan je pristup za procjenu genomskih oštećenja, stanične smrti i citostaze u ljudskim stanicama aerodigestivnog trakta (18). Genotoksični učinak na bukalnu sluznicu može se procijeniti oštećenjem DNK, kroz pojavu kromosomskih aberacija, zamjenu sestrinskih kromatida i stvaranjem mikronukleusa. Učestalost stanica s mikronukleusom predstavlja takozvani „dozimetar” za procjenu vjerojatnosti pojave karcinoma na proučavanim stanicama (23). Mikronukleus test na oljuštenim bukalnim stanicama predstavlja *in vivo* metodu koja pokazuje učinak toksičnih agensa izravno na ispitivano tkivo.

Statistički značajan povećan broj stanica s mikronukleusom ( $1,58 \pm 2,07$  i  $0,68 \pm 0,74$ ,  $P = 0,000$ ; redom), pupom ( $0,98 \pm 1,10$  i  $0,38 \pm 0,64$ ,  $P = 0,002$ ), kariolizom ( $1,42 \pm 1,25$  i  $0,10 \pm 0,30$ ,  $P = 0,000$ ), piknozom ( $0,96 \pm 1,24$  i  $0,04 \pm 0,20$ ,  $P = 0,000$ ) i kondenziranim kromatinom ( $0,76 \pm 0,98$  i  $0,16 \pm 0,37$ ,  $P = 0,000$ ) pronađen je kod dentalnih tehničara u usporedbi s doktorima dentalne medicine. Jedino je broj binuklearnih stanica statistički



značajno viši kod doktora ( $6,44 \pm 3,27$  i  $8,56 \pm 3,42$ ,  $P = 0,003$ ). Nije pronađena značajna razlika u broju stanica s nukleoplazmatskim mostom i karioreksom.

Kod usporedbe dentalnih tehničara i asistenata, uočeno je statistički značajno povećanje broja mikronukleusa ( $1,58 \pm 2,07$  i  $0,58 \pm 0,81$ ,  $P = 0,040$ ; redom), kariolize ( $1,42 \pm 1,25$  i  $0,20 \pm 0,49$ ,  $P = 0,000$ ), piknoze ( $0,96 \pm 1,24$  i  $0,08 \pm 0,27$ ,  $P = 0,000$ ) i kondenziranog kromatina ( $0,76 \pm 0,98$  i  $0,14 \pm 0,35$ ,  $P = 0,000$ ) kod tehničara. Nije bilo statistički značajne razlike u broju stanica s nukleoplazmatskim mostom, karioreksom i binuklearnim stanicama.

Dobiveni rezultati potvrđuju nalaz istraživanja kojeg su proveli Shamsavari i sur. (24) i Burgaz i sur. (7). Shamsavari i sur. (24) primijetili su da je na bukalnoj mukozi broj stanica s mikronukleusom 2,6 puta veći nego kod kontrolnih ispitanika ( $P < 0,001$ ). Slično su dobili i Burgaz i sur. (7) U njihovom istraživanju povećana je pojavnost mikronukleusa i u perifernim limfocitima i u oljuštenim stanicama nazalne sluznice. Srednja vrijednost ( $\pm$  standardna devijacija) testa mikronukleusa s blokiranjem citokinezu perifernim limfocitima kod dentalnih tehničara iznosila je statistički značajnih  $4,00 (\pm 2,98)$  i  $1,40 (\pm 1,30)$  kod kontrolnih subjekata, ( $P < 0,005$ ). Srednja vrijednost ( $\pm$  standardna devijacija) pojavnosti broja mikronukleusa u stanicama nazalne sluznice bila je  $3,50 (\pm 1,80)$  kod dentalnih tehničara i  $1,19 (\pm 0,53)$  kod kontrole, fakultetskog osoblja ( $P < 0,005$ ). Rezultati dobiveni ovim istraživanjem nisu u skladu s rezultatima dobivenim istraživanjem Ahazara i sur. (25). U njihovoj studiji, koja je provedena na 13 dentalnih tehničara i 13 doktora dentalne medicine, pojavnost stanica s mikronukleusom nije bila od statističke značajnosti ( $P = 0,27$ ). Ponuđeno objašnjenje bilo je da su se tehničari držali propisanih zaštitnih mjera, dok u našem istraživanju ni jedan ispitanik dentalni tehničar redovito ne koristi zaštitne mjere u obliku maski i rukavica. Također, u studiji Ahazara i sur. (25) nije sudjelovao dovoljan broj ispitanika po ciljnim skupinama, pa i to može biti razlog dobivenih rezultata. Da bi se izbjegli genotoksični učinci, potrebno je dentalnim tehničarima omogućiti adekvatne radne uvjete i izobrazbu čime bi se mogućnost profesionalnih oboljenja svela na najmanju moguću razinu. Ishikawa i sur. (26) istraživali su učinke profesionalne izloženosti i provođenja mjera zaštite na radu na pojavnost kromosomskih oštećenja kod dentalnih tehničara. Značajni parametri mikronukleus testa na perifernim limfocitima bili su pranje ruku ( $P < 0,01$ ,  $\beta = - 0,304$ ), radno vrijeme ( $P < 0,01$ ,  $\beta = 0,509$ ) i radno mjesto ( $P < 0,05$ ,  $\beta = 0,235$ ).

Ovisno o vrsti posla koji dentalni tehničari obavljaju u laboratoriju, prema rezultatima našeg istraživanja najveća učestalost genotoksičnih oštećenja vidljiva je kod dentalnih tehničara koji rade s metalima. Tako tehničari koji se bave primarno metalom bilo koje vrste

imaju značajno više stanica s karioreksom ( $0,67 \pm 0,584$ ) u odnosu na one koji se bave akrilatom ( $0,19 \pm 0,403$ ;  $P = 0,032$ ), te onih koji rade s keramikom ( $0,13 \pm 0,344$ ;  $P = 0,005$ ), te više stanica s kondenziranim kromatinom u odnosu na one koji se bave s keramikom ( $1,50 \pm 0,548$ ,  $0,57 \pm 0,992$ ;  $P = 0,036$ ).

Dentalni tehničari u doticaju su s legurama kroma, nikla i kobalta tijekom lijevanja, dorade i poliranja zubnih proteza te također maloj količini molibdena, silicijevog berilija, bora i ugljika (27). Nekoliko rezultata različitih istraživanja pokazalo je da krom (VI), u kombinaciji s metalnim kromom i kromom (III), može imati niz genotoksičnih i srodnih učinaka *in vitro* (28, 29). Profesionalna izloženost kromu povećava kancerogeni rizik u respiratornom traktu, a slične učinke izaziva i nikal i kobalt (7, 30). U literaturi su objavljeni pozitivni i negativni rezultati o sposobnosti kroma, kobalta i nikla da induciraju pojačanu pojavnost stanica s mikronukleusom (7, 31). U istraživanju Burgaz i suradnika (7) uočena je tri puta veća učestalost mikronukleusa u perifernim limfocitima i nazalnim stanicama u odnosu na kontrolnu skupinu. Vasudevan i sur. (32) ispitivali su pomoću mikronukleus testa genotoksičan utjecaj povezan s profesionalnom izloženošću radnika koji rade s kromom. Zaključili su da kronična profesionalna izloženost dovodi do povećanog oštećenja DNK, što proizlazi iz povećanja broja stanica s mikronukleusom. Koncentracija kobalta, nikla i kroma u razini krvi dentalnih tehničara veća je od preporučene razine i iznosi  $27 \mu\text{g} / \text{L}$ ,  $37 \mu\text{g} / \text{L}$  i  $117 \mu\text{g} / \text{L}$ , što se povezuje uz neadekvatne mjere zaštite na radu (33).

Usna šupljina je složeni mikrokoliš obzirom na specifične biološke varijacije kod svakog pacijenta. Brojni biološki, ekološki i demografski čimbenici mogu utjecati na analizu toksičnosti genotoksina (34). Medicinski postupci (zračenje, lijekovi), nedostatak mikronutrijenata (prehrana), navike vezane uz stil života (alkohol, pušenje, vježbanje, profesija) i neki nemođificirajući čimbenici (spol, dob) mogu utjecati na oštećenje DNK molekule, a time na oblik genotoksičnosti. U našem istraživanju radno mjesto utjecalo je više od ostalih ispitivanih varijabli na pojavnost jezgrinih oštećenja, kako onih genotoksične prirode (mikronukleus, most i pup), tako i citotoksičnih oštećenja (karioliza, kondenzirani kromatin, piknoza, binuklearne stanice). Među ispitivanim profesijama, dentalni tehničari su imali najviše oštećenja u odnosu na doktore dentalne medicine i dentalne asistente. Tako je utvrđeno kako doktori dentalne medicine i dentalni asistenti imaju manji broj mikronukleusa u odnosu na dentalne tehničare ( $\beta = - 1,207$  i  $\beta = - 1,030$ ,  $P = 0,009$  i  $P = 0,007$ ; redom), pupova ( $\beta = - 0,789$  i  $\beta = - 0,710$ ;  $P = 0,012$  i  $P = 0,006$ ), kariolize ( $\beta = - 1,624$  i  $\beta = - 1,447$ ;  $P = 0,000$  i  $P = 0,000$ ), kondenzirani kromatin ( $\beta = - 0,764$  i  $\beta = - 0,829$ ;  $P = 0,000$  i  $P = 0,000$ ) i piknotičnih jezgara ( $\beta = - 1,098$  i  $\beta = - 0,770$ ,  $P = 0,000$  i  $P = 0,000$ ).

Rezultati ovog istraživanja pokazali su povećan broj citogenetskih oštećenja u stanicama bukalne sluznice dentalnih tehničara u odnosu na kontrolne skupne doktora dentalne medicine i dentalnih asistenata. Povećan broj oštećenja može se dovesti u korelaciju sa svakodnevnom izloženošću djelovanja metalnih kovina koje dentalni tehničari koriste pri izradi mobilnoprortetskih i fiksoprortetskih nadomjestaka, ali i zbog nepoštivanja mjera zaštite na radu. Činjenica da većina dentalnih tehničara koji su sudjelovali u ovom istraživanju ne koristi zaštitne rukavice i maske tijekom rada u laboratoriju, može se povezati sa slabom edukacijom i brigom za zdravlje. Stoga je neophodna edukacija na sustavnoj razini o zaštiti na radu, kako bi se moguće štetne posljedice po zdravlje dentalnih tehničara svele na minimum.

## **6. ZAKLJUČCI**

Iz navedenih rezultata dolazimo do sljedećih zaključaka:

- Analizom je potvrđena statistički značajna razlika u ispitivanim parametrima genotoksičnosti i citotoksičnosti između testiranih grupa podijeljenih prema profesiji kojom se bave.
- Između dentalnih tehničara i doktora dentalne medicine postoji statistički značajna razlika u broju mikronukleusa, binuklearnih stanica, piknotičnih stanica, stanica s kondenziranim kromatinom, kariolizom i pupom.
- Između dentalnih tehničara i dentalnih asistenata postoji statistički značajna razlika u broju stanica s mikronukleusom, kondenziranim kromatinom, kariolizom i piknozom.
- Između doktora dentalne medicine i dentalnih asistenata postoji statistički značajna razlika u broju stanica s binukleusom i mostom.
- Uočeno je statistički značajno povećanje u broju stanica s jezgrinim anomalijama kod dentalnih tehničara koji se primarno bave metalom u odnosu na dentalne tehničare koji se bave akrilatom ili keramikom .
- Većina testiranih parametara mikronukleus testa potvrdila je postavljene hipoteze. Razlog takvim rezultatima može se pronaći u tome da većina tehničara ne radi u adekvatnim prostorijama za rad i da niti jedan od ispitanih tehničara ne koristi zaštitne rukavice i maske u svakodnevnom radu. Zbog povećanog rizika od citogenetskih oštećenja dentalni tehničari bi se općenito morali u većoj mjeri pobrinuti da nose adekvatnu zaštitu tijekom radnog vremena.

## **7. POPIS CITIRANE LITERATURE**

1. Torbica N, Krstev S. World at work: Dental laboratory technicians. *Occup Environ Med.* 2006;63(2):145-8.
2. Petrovic D, Krunic N, Kostic M. Risk factors and preventive measures for occupational diseases in dental technicians. *Vojnosanit Pregl.* 2013;70(10):959-63.
3. Choe L GB, Bourgeois D, Descotes J. Occupational Toxic Risks in Dental Laboratory Technicians. *J Environ Med.* 1999(1):307-314.
4. Golbabaei F, Mamdouh M, Jelyani KN, Shahtaheri SJ. Exposure to methyl methacrylate and its subjective symptoms among dental technicians, Tehran, Iran. *Int J Occup Saf Ergon.* 2005;11(3):283-9.
5. Bozkurt N, Yurdasal B, Bozkurt AI, Yilmaz O, Tekin M. Respiratory Systems of Dental Technicians Negatively Affected during 5 Years of Follow-Up. *Balkan Med J.* 2016;33(4):426-33.
6. Hathaway GJ PN. *Chemical hazards of the workplace*, 5 th ed. New Jersey: Wiley - Interscience; 2004.
7. Burgaz S, Demircigil GC, Yilmazer M, Ertas N, Kemaloglu Y, Burgaz Y. Assessment of cytogenetic damage in lymphocytes and in exfoliated nasal cells of dental laboratory technicians exposed to chromium, cobalt, and nickel. *Mutat Res.* 2002;521(1-2):47-56.
8. Bereznowski Z. In vivo assessment of methyl methacrylate metabolism and toxicity. *Int J Biochem Cell Biol.* 1995;27(12):1311-6.
9. Borzelleca JF, Larson PS, Hennigar GR, Jr., Huf EG, Crawford EM, Smith RB, Jr. Studies on the Chronic Oral Toxicity of Monomeric Ethyl Acrylate and Methyl Methacrylate. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1964;6:29-36.
10. Braun D, Wagner W, Zenner HP, Schmahl FW. Disabling disturbance of olfaction in a dental technician following exposure to methyl methacrylate. *Int Arch Occup Environ Health.* 2002;75 Suppl:S73-4.
11. Leggat PA, Kedjarune U. Toxicity of methyl methacrylate in dentistry. *Int Dent J.* 2003;53(3):126-31.
12. Nayebzadeh A, Dufresne A. Evaluation of exposure to methyl methacrylate among dental laboratory technicians. *Am Ind Hyg Assoc J.* 1999;60(5):625-8.
13. Padmaja S. Biohazards associated with materials used in prosthodontics. *Niger J Clin Pract.* 2013;16(2):139-44.
14. Araujo AM, Alves GR, Avanco GT, Parizi JL, Nai GA. Assessment of methyl methacrylate genotoxicity by the micronucleus test. *Braz Oral Res.* 2013;27(1):31-6.

15. Gosavi SS, Gosavi SY, Alla RK. Local and systemic effects of unpolymerised monomers. *Dent Res J (Isfahan)*. 2010;7(2):82-7.
16. Sivakumar I, Arunachalam KS, Solomon E. Occupational health hazards in a prosthodontic practice: review of risk factors and management strategies. *J Adv Prosthodont*. 2012;4(4):259-65.
17. Thomas P, Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, et al. Buccal micronucleus cytome assay. *Nat Protoc*. 2009;4(6):825-37.
18. Thomas P, Fenech M. Buccal micronucleus cytome assay. *Methods Mol Biol*. 2011;682:235-48.
19. Bolognesi C, Knasmueller S, Nersesyanyan A, Thomas P, Fenech M. The HUMNxl scoring criteria for different cell types and nuclear anomalies in the buccal micronucleus cytome assay - an update and expanded photogallery. *Mutat Res*. 2013;753(2):100-13.
20. Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, Knasmueller S, et al. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. *Mutat Res*. 2008;659(1-2):93-108.
21. Tolbert PE, Shy CM, Allen JW. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutat Res*. 1992;271(1):69-77.
22. Kashyap B, Reddy PS. Micronuclei assay of exfoliated oral buccal cells: means to assess the nuclear abnormalities in different diseases. *J Cancer Res Ther*. 2012;8(2):184-91.
23. Vipul Ja PL, Bhanu A, Deepak S. Buccal cell micronuclei assay: a non-invasive genotoxic marker. *IJCMR*. 2017;4(1):100-4.
24. Shahsavari F GS, Farhadi S, Mazinani P, Delavari S. Occupational exposure in dental laboratory technicians may induce nuclear abnormalities in buccal mucosa cells: a preliminary study. *J Res Dentomaxillofac Sci*. 2016;1(2):23-7.
25. Azhar DA, Syed S, Luqman M, Ali AA. Evaluation of methyl methacrylate monomer cytotoxicity in dental lab technicians using buccal micronucleus cytome assay. *Dent Mater J*. 2013;32(3):519-21.
26. Ishikawa S, Ishikawa H, Shindo T, Yoshida T, Shimoyama Y, Satomi T, et al. Effects of occupational environmental controls and work management on chromosomal damage in dental technicians in Japan. *Int J Hyg Environ Health*. 2013;216(1):100-7.
27. Leghissa P, Ferrari MT, Piazzolla S, Caironi M, Parigi PC, Lebbolo E. Cobalt exposure evaluation in dental prostheses production. *Sci Total Environ*. 1994;150(1-3):253-7.



28. De Flora S, Bagnasco M, Serra D, Zancchi P. Genotoxicity of chromium compounds. A review. *Mutat Res.* 1990;238(2):99-172.
29. Fang Z, Zhao M, Zhen H, Chen L, Shi P, Huang Z. Genotoxicity of tri- and hexavalent chromium compounds in vivo and their modes of action on DNA damage in vitro. *PLoS One.* 2014;9(8):e103194.
30. Hayes RB. The carcinogenicity of metals in humans. *Cancer Causes Control.* 1997;8(3):371-85.
31. Hariyani N BT, Setyowati D. Effects of Occupational Environmental Controls on the Level of Co, Ni and Cr among Dental Technicians. *IJESD.* 2015;6(9):644-6.
32. Vasudevan SG SS, Prathyumnann S, Joseph S, Keyan KS. Enhanced micronuclei in exfoliative buccal cells of tannery workers exposed to chromium III in south India. In: *International conference on Bioscience. Biochemistry and Bioinformatics IPCBEE.* Singapore: IACSIT Press; 2011.
33. Hayashi M. The micronucleus test-most widely used in vivo genotoxicity test. *Genes Environ.* 2016;38:18.
34. Moller P. Genotoxicity of environmental agents assessed by the alkaline comet assay. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2005;96 Suppl 1:1-42.

## **8. SAŽETAK**

**Naziv diplomskog rada:** Procjena citogenetskih oštećenja u stanicama oralne sluznice kod dentalnih tehničara

**Cilj istraživanja:** Dentalni tehničari redovito su izloženi metalnoj prašini i monomerima akrilnih smola koji mogu ozbiljno ugroziti njihovo zdravlje. Cilj ove presječne studije bio je procijeniti i usporediti pojavnost mikronukleusa i drugih jezgrinih anomalija na stanicama bukalne sluznice dentalnih tehničara.

**Materijali i metode:** Studija je provedena na 45 dentalnih tehničara, te 50 doktora dentalne medicine i 50 dentalnih asistenata kao kontrolnih skupina. Sve grupe su podudarne prema dobi. Oštećenje DNA analizirano je mikronukleus testom.

**Rezultati:** Rezultati su pokazali da doktori dentalne medicine i dentalni asistenti imaju znatno nižu učestalost broja stanica s mikronukleusom u usporedbi sa dentalnim tehničarima ( $0,68 \pm 0,74$ ,  $0,58 \pm 0,81$  i  $1,58 \pm 2,07$ ,  $P = 0,008$  i  $0,004$ ), kariolize ( $0,10 \pm 0,30$ ,  $0,20 \pm 0,49$  i  $1,42 \pm 1,25$ ,  $P = 0,000$  i  $P = 0,000$ ), kondenziranog kromatina ( $0,16 \pm 0,37$ ,  $0,14 \pm 0,35$  i  $0,76 \pm 0,98$ ,  $P = 0,000$  i  $P = 0,000$ ) i piknoze ( $0,04 \pm 0,20$ ,  $0,08 \pm 0,27$  i  $0,96 \pm 1,24$ ,  $P = 0,000$  i  $P = 0,000$ ).

**Zaključak:** Rezultati ovog istraživanja pokazali su povećan broj citogenetskih oštećenja u stanicama bukalne sluznice dentalnih tehničara u odnosu na kontrolne skupine, što se može povezati s neadekvatnim zaštitnim mjerama na radu i izloženosti štetnim tvarima iz materijala kojima se koriste u svakodnevnom radu.

**Ključne riječi:** bukalne epitelne stanice, dentalni tehničar, doktor dentalne medicine, DNK oštećenje, mikronukleus test

## **9. SUMMARY**

**Diploma thesis title:** Assessment of cytogenetic damage in exfoliated oral cells of dental laboratory technicians

**Objectives:** Dental technicians are regularly exposed to metal dust and monomers from acrylic resins that can seriously jeopardize their health. The aim of this cross sectional study was to assess the incidence of micronuclei and other nuclear abnormalities in buccal mucosal cells of dental technicians.

**Materials and methods:** Study was conducted on 45 dental technicians, 50 doctors of dental medicine and 50 dental assistants who were used as the control group. All groups were match according to age. DNA damage was analysed by micronucleus assay.

**Results:** The results showed that the incidence of number of cells with micronuclei is significantly lower in doctors of dental medicine compared to dental technicians ( $0.68 \pm 0.74$ ,  $0.58 \pm 0.81$  and  $1.58 \pm 2.07$ ;  $P = 0.008$  and  $0.004$ , respectively). The same pattern of incidence was demonstrated for karyolytic cells ( $0.10 \pm 0.30$ ,  $0.20 \pm 0.49$  and  $1.42 \pm 1.25$ ;  $P = 0.000$  and  $P = 0.000$ , respectively), condensed chromatin ( $0.16 \pm 0.37$ ,  $0.14 \pm 0.35$  and  $0.76 \pm 0.98$ ;  $P = 0.000$  and  $P = 0.000$ , respectively) and pyknotic cells ( $0.04 \pm 0.20$ ,  $0.08 \pm 0.27$  and  $0.96 \pm 1.24$ ;  $P = 0.000$  and  $P = 0.000$ , respectively).

**Conclusion:** The results of this study have shown an increased number of cytogenetic defects in dental technician buccal mucosa compared to control groups that can be associated with inadequate protective measures at work and exposure to harmful ingredients from the materials that are used in everyday work.

**Key words:** buccal epithelial cells, dental technician, doctor of dental medicine, DNA damage, micronucleus assay

## **10. ŽIVOTOPIS**

**OSOBNİ PODACI**

**IME I PREZIME:** Ivana Jurković

**DRŽAVLJANSTVO:** Republike Hrvatske

**DATUM I MJESTO ROĐENJA:** 11. lipnja 1992. u Metkoviću, Republika Hrvatska

**ADRESA:** Mobine 14, 20350 Metković

**ELEKTRONIČKA POŠTA:** ivana.jurkovic11@hotmail.com

**IZOBRAZBA**

- 1999. – 2007. Osnovna škola don Mihovila Pavlinovića u Metkoviću
- 2007. – 2011. Gimnazija Metković, program prirodoslovno-matematički
- 2011. – 2017. Medicinski fakultet u Splitu, integrirani studij Dentalna medicina

**MATERINSKI JEZIK**

- hrvatski jezik

**OSTALI JEZICI**

- engleski jezik – tečno
- njemački jezik – osnovno

**AKTIVNOSTI**

- demonstrator na Katedri za restaurativnu dentalnu medicinu i endodonciju

**NAGRADE**

- dobitnica Dekanove nagrade za akademsku godinu 2014./2015.