

ПРИСУСТВО ФЕНОЛА У УРИНУ КОД РАДНИКА СА ПРОФЕСИОНАЛНОМ ИЗЛОЖЕНОШЋУ – МОГУЋНОСТИ АНАЛИТИЧКЕ ПОТВРДЕ

Ема Раичевић¹, Нада Миловановић¹, Филип Михајловић², Снежана Ђорђевић^{3,4}

¹Завод за здравствену заштиту радника, Крагујевац

²Универзитет у Крагујевцу, Факултет медицинских наука, Крагујевац

³Национални центар за контролу тровања, Војномедицинска академија, Београд

⁴Универзитет одбране, Медицински факултет Војномедицинске академије, Београд

PRESENCE OF PHENOL IN URINE IN WORKERS WITH PROFESSIONAL EXPOSURE - POSSIBILITY OF ANALYTIC CONFIRMATION

Ема Раичевић¹, Нада Миловановић¹, Филип Михајловић², Снежана Ђорђевић^{3,4}

¹Institute for Occupational Health, Kragujevac, Serbia

²University of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, Kragujevac, Serbia

³National Poison Control Center, Military Medical Academy, Belgrade, Serbia

⁴University of Defense, Medical Faculty of the Military Medical Academy, Belgrade, Serbia

САЖЕТАК

Увод. Услед све веће употребе фенола у различитим индустријама, у региону Централне Србије повећана је потреба за обављањем токсиколошких анализа. Токсиколошким анализама амбијенталног и биолошког мониторинга превентивно се спречавају професионална обољења што је основни циљ свих завода за медицину рада. Циљ рада је приказати значај континуираног биолошког мониторинга радника изложених бензену, фенолу и фенолним смолама и брзог и лаког детектовања фенола у урину семиквантитативном методом.

Метод. Истраживање је дизајнирано као аналитичка, опсервациона, ретроспективна студија пресека. Засновано је на токсиколошкој анализи концентрације фенола у урину радника и обради документованих резултата из протокола евиденције редовних систематских прегледа Завода за здравствену заштиту радника Крагујевац, у периоду од јануара 2018. до децембра 2022. године.

Резултати. Статистичком анализом података из протокола пацијената обрађене су вредности фенола у урину код 61 пацијента, и то 58 пацијената мушког (95%) и три пацијента женског пола (5%). Добијени резултати указују на то да не постоји повезаност између пола, старости и времена експозиције с концентрацијом фенола у урину радника ($p > 0,05$).

Закључак. Биолошки мониторинг радника приликом експозиције фенолу и његовим дериватима важан је са аспекта професионалне токсикологије. Време експозиције, интериндивидуалне особине пацијента и старост неки су од података које треба узети у обзир приликом интерпретације резултата. Семиквантитативна метода за одређивање концентрације фенола у урину показала се као брза, лака и поуздана. Због све веће потребе за анализама фенола, за коначну потврду концентрације неопходно извршити неку од савременијих хроматографских метода.

Кључне речи: фенол, бензен, токсикологија, медицина рада, биолошки мониторинг

ABSTRACT

Objective. Due to the increasing use of phenol in various industries, there is an increased need for toxicological analyses in the region of Central Serbia. Toxicological measurements are implemented as a preventive measure to avoid occupational diseases, which is the primary goal of all occupational medicine institutions. The aims of this study were to demonstrate the significance of continuous biological monitoring of workers exposed to benzene, phenol, and phenolic resins, as well as the rapid and easy detection of phenol in urine by a semi-quantitative method.

Methods. The study was designed as an analytical, observational, retrospective cross-sectional study. It was based on a toxicological analysis of phenol concentration in workers' urine and the processing of documented results from the records of regular systematic check-ups at the Institute for Occupational Health Kragujevac between January 2018 and December 2022.

Results. The values of phenol in the urine of 61 patients were processed through statistical data analysis of patient records, of which 58 were male (95%), and three were female (5%). The obtained results show that there is no correlation between sex, age, and time of exposure with the concentration of phenol in the workers' urine ($p > 0.05$).

Conclusion. Biological monitoring of workers exposed to phenol and its derivatives is important from the perspective of professional toxicology. Exposure time, individual patient characteristics, and age are some of the factors that need to be taken into account when interpreting and issuing results. Semi-quantitative method for determining phenol concentration in urine has been shown to be fast, easy, and reliable. Due to the increasing need for phenol analysis, it is necessary to perform one of the more modern chromatographic methods for final confirmation of concentrations.

Key words: phenol; benzene; toxicology; occupational medicine; biological monitoring.

УВОД

Фенол (карболна киселина) на собној температури јавља се у облику белих или провидних кристала (1). Примена фенола налази своје место у индустрији, медицини и козметици. У индустрији феноли се користе за производњу фенолних смола које се примењују у грађевини, производњи аутомобила и дрвених прерађевина. Осим тога, фенол се користи за производњу бисфенола А, који служи као полазно једињење у синтези пластике, циклохексанола, капролактама и анилина који се користе индустрији најлона и боја (2).

Главни пут интоксикације фенола је преко дисајних путева, ређе преко коже и слузокоже. Без обзира на начин уноса у организам, фенол се лако апсорбује. На месту контакта с ткивима делује корозивно, изазивајући неспецифично оштећење чији интензитет зависи искључиво од количине која је доспела до ткива (3). Фенол на оку изазива конјуктивитис и оштећење површних слојева рожњаче са замућењем (4). У респираторном тракту фенол изазива иритацију, трахеобронхитис и, код најтежих тровања, едем плућа (5). За разлику од општих ефеката експозиције фенолу који имитирају акутно тровање, посебни токсични ефекти фенола и његових деривата (крезол, хидрохинон) настају после поновљене експозиције мањим дозама. У малим дозама, слично салицилатима, фенол стимулише респираторни центар, што изазива респираторну алкалозу. Касније доводи до ацидозе која настаје због декомпензованог губитка алкалија преко бубрега у време алкалозе, делимично због киселог карактера фенолног радикала, а делимично због поремећеног метаболизма угљених хидрата. Може се јавити метхемоглобинемија, нарочито после примене хидрохинона. Фенол и његови деривати, у случају дуге експозиције, инхибирају синтезу РНК и других протеина у митохондријама јетре и коштане сржи, после чега долази до поремаћаја у функцији митохондрија. Америчка агенција за заштиту животне средине (United States Environmental Protection Agency – EPA) (6) и Међународна организација за проучавање карцинома (International Agency for Research on Cancer) (7) сврстали су фенол (трихлорофенол и 2,4-диметилфеонол) (8) у групу карциногених једињења за људе. Излучује се из организма делимично непромењен, а делимично преко урина у облику фенол-оксида, који је у случају професионалног тровања тамне боје (9, 10).

Будући да је експозиција фенолима присутна у бројним производним процесима, то захтева континуирани амбијентални мониторинг радног простора, као и биолошки мониторинг, мониторинг експозиције фенолима и његовим једињењима. Такође, код експозиције бензену као главни биомаркер

експозиције користи се и одређује управо фенол као његов главни метаболит. Законска регулатива у нашој земљи усклађена је са законима Европске уније који прописују максимално дозвољене концентрације опасних материја у радном простору којима радници могу бити изложени дужи период (осам сати дневно, пет радних дана, дужи период), а да притом нема нежељених ефеката на здравље. Те вредности се изражавају као граничне вредности за професионалну изложеност (occupational exposure limits – OEL) (11, 12).

Осим амбијенталног мониторинга, постоји и биомониторинг, односно потреба мерења биомаркера експозиције различитим супстанцама ради процене људске изложености природним и синтетским једињењима у животној и радној средини. Као биомаркер експозиције фенолу и једињењима која метаболишу до фенола користи се мерење концентрације фенола у биолошком материјалу (13, 14). Биолошки материјал избора је урин који треба узимати од радника изложених овим једињењима пре и на крају радне смене или једнократни узорак урина на крају радне смене последњег радног дана у недељи. Граничне вредности биомаркера изложености дате су као индекс биолошке изложености (Biological exposure indices – BEI). Индекси биолошке изложености јесу вредности које се користе као смернице за процену резултата биолошког праћења (15, 16).

Када се одреди већа концентрација од дозвољене може се спречити рад у таквим условима док се она не доведе у планиране оквири (0,5–8 mg/L урина) (9). Осим тога, редовним систематским прегледима у телесним течностима људи који раде под таквим условима одређује се концентрација растварача или њихових деривата, што представља директан одраз експозиције (9, 10). На основу претраге литературе до сада није довољно описан и познат утицај експозиције фенолу у зависности од пола, старости и дужине експозиције запослених.

Циљ овог истраживања били су примена методе за одређивање фенола, испитивање утицаја пола, старости и времена експозиције на дејство фенола и процена утицаја на здравље запослених у индустријским постројењима у Крагујевцу и околини.

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

Врста истраживања и студијска популација

Истраживање је дизајнирано као аналитичка, опсервациона, ретроспективна студија пресека, засновано на токсиколошкој анализи резултата из протокола евиденције редовних систематских прегледа 333Р Крагујевац у периоду од јануара 2018. до децембра 2022. године. Истраживање је обухватало

анализу узорака урина радника запослених у индустријским постројењима у којима постоји могућност експозиције бензену, фенолу и његовим дериватима. Анализирани су укупно 61 узорак урина.

Узимање узорка

За анализу су коришћени први јутарњи урини радника, сакупљени у стерилну полиетиленску бочицу са пластичним затварачем. Сваки узорак је обележен адекватном налепницом са датумом, именом и презименом пацијента и бар кодом. Сви узорци су чувани у фрижидеру на температури 2–8°C до анализе, а анализа је обављана у року од 24 сата од прикупљања узорака. Узорци су анализирани у биохемијско-токсиколошкој лабораторији Завода за здравствену заштиту радника Крагујевац.

Материјал и реагенси

Сви употребљени реагенси имају аналитички степен чистоће (р. а.):

- порцеланска бела плоча са удубљењима;
- водено купатило;
- дејонизована вода;
- етил етар, натријум-карбонат, натријум-тетраборат;
- 2,6 дихлорхинон-4 хлоримид, 40% перхлорна киселина;
- 96% етанол;
- Gibbsov реагенс;
- алкални боратни пуфер.

Принцип методе

Фенол у алкалној средини реагује са Gibbsov-им реагентом и даје плаво обојени индофенол, чији је интензитет пропорционалан количини конјугованог и слободног фенола. Према интензитету боје се процењује концентрација фенола. Метода даје прецизне резултате, који су валидни за рутинску токсиколошку праксу.

Поступак одређивања фенола у урину семиквантитативном методом

Семиквантитативна метода за одређивање присуства фенола у урину заснива се на реакцији између перхлорне киселине и фенола у урину. Реакција се изводи у кључалом воденом купатилу да би се извршила хидролиза конјугованих фенолних производа. У даљем поступку, раствору додајемо етил етар и посматрамо старни слој у којем су растворени феноли. Додатком реагенса према следећем распореду: алкални боратни пуфер, издвојени етарски екстракт и Gibbs-ов реагенс издвојиће се плава боја

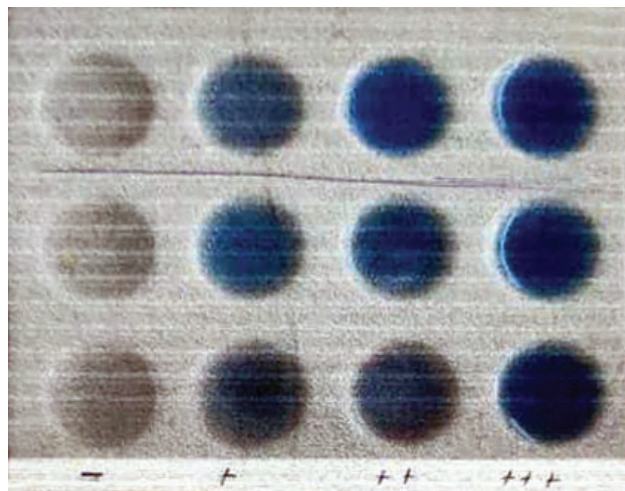
(слика 1), чији је интензитет пропорционалан концентрацији слободних и конјугованих фенола у урину. Концентрација фенола у mg/m^3 [14] у зависности од интензитета боје одређује се у складу с вредностима из табеле 1.

Статистичка обрада података

Подаци су обрађени методама дескриптивне статистике. За опис параметара од значаја, у зависности од њихове природе, коришћени су: фреквенца, проценти, средња вредност, медијана и стандардна девијација. За испитивање нормалности расподеле употребљени су тестови Kolmogorov–Smirnov и Shapiro Wilk. Зависна повезаност између старости, времена експозиције и концентрације фенола у урину радника испитана је Pearson-овом корелацијом, док је корелација између пола и концентрације утврђена Mann–Whitney U тестом. За статистичку обраду добијених резултата коришћен је Statistical Package for Social Sciences – SPSS for Windows, Version 22 (SPSS Inc. Chicago, IL). Резултати су приказани табеларно.

РЕЗУЛТАТИ

Статистичком анализом података из протокола пацијената обрађене су вредности фенола у урину код 61 пацијента, и то 58 пацијената мушког (95%) и три пацијента женског пола (5%) (табела 2). С обзиром на то да укупан узорак има више од 50 пацијената, на основу вредности Kolmogorov–Smirnov теста, показано је да подаци не прате нормалну расподелу ($0,00 < 0,05$). Просечна старост испитаника била је $51 \pm 1,7$ година. Измерене вредности концентрације фенола у урину биле су у опсегу референтних вредности (табела 2). На основу вредности параметара Pearson-ове корелације, не постоји повезаност између



Слика 1. Интензитет боје пропорционалан концентрацији фенола у урину.

Табела 1. Процењивање концентрације фенола у урину на основу интензитета боје.

Ознака	Боја	C (mg/m ³)	C (mg/L)
-	ружичаста	0,181	17
±	сива	0,276	26
+	слабо плавичаста	0,701	66
++	плавичаста	0,999	94
+++	плава	1,466	138
++++	јакно плава	3,400	320

коришћени референтни опсег за професионално изложену популацију C < 1,000 mg/m³ фенола у једнократном узорку урина (14, 15)

Табела 2. Број спроведених скрининга на присуство фенола у урину у Застава 333P у зависности од пола и концентрације у последњих пет година

Година	Измерена концентрација фенола у урину радника			
	мушки	Mean/SD	женски	Mean/SD
2018.	18 (29,4%)	0,08 ± 0,003	1 (1,6%)	0,07 ± 0,002
2019.	10 (16,4%)	0,17 ± 0,001	0 (0%)	-
2020.	10 (16,4%)	0,01 ± 0,005	0 (0%)	-
2021.	9 (14,8%)	0,14 ± 0,001	0 (0%)	-
2022.	11 (18,0%)	0,11 ± 0,004	2 (3,4%)	0,10 ± 0,003
Укупно	58 (95%)		3 (5%)	

C[mg/m³] (14, 15)

Табела 3. Повезаност пола, времена експозиције и старости с концентрацијом фенола у урину

Варијабла	Pearson correlation	Mann–Whitney U test	p
Пол	-	0.2446	0,14
Време експозиције	0,056	-	0,07
Старост	0,031	-	0,09

старости и времена експозиције са измереним вредностима фенола у урину ($p > 0,05$). На основу параметара Mann–Whitney U теста, показано је да не постоји повезаност између пола и концентрације фенола у урину ($p > 0,05$) (табела 3).

ДИСКУСИЈА

Клинички значај одређивања концентрације фенола огледа се у препознавању и превенцији професионалних обољења и биомониторингу за време елементарних непогода, што је показано у студији аутора Омерагића и сарадника (17) и другим студијама спроведеним у земљама у окружењу (18). Професионална експозиција једињењима фенола радника запослених у различитим врстама индустрије, производњи пластике (19, 20), хемијској (21) и нуклеарној индустрији (22), привукла је пажњу аутора студија из Европе и света. У зависности од лабораторијске опреме у токсиколошким лабораторијама, за одређивање концентрације фенола у урину радника приликом професионалне

експозиције могу се користити различите квантитативне (гасна хроматографија са масеном детекцијом – GC/MS) (23) и семиквантитативне методе (*Gibbs*-ова метода).

Измерене вредности фенола у урину радника у овом истраживању биле су у границама референтних вредности за професионалну експозицију фенолним једињењима (14, 15). Добијени резултати говоре да је адекватна опрема у радној средини један од начина да се смањи експозиција штетним једињењима и да измерене вредности штетних материја по здравље људи буду у опсегу референтних вредности (24). С друге стране, поштовање процедуре приликом доношења узорка у токсиколошку лабораторију један је од процеса који се мора поштовати да би резултат био тачан и правовремен (25). Веома често се догађа да време експозиције буде разлог за погрешну интерпретацију резултата, те је зато важно да се узорак урина за одређивање концентрације фенола донесе послењег радног дана у недељи, на крају смене, када је експозиција фенолним једињењима највећа (26, 27). Досадашња искуства показала су да

упркос томе што се пацијентима укаже на правилно узорковање и доношење узорка на анализу, они често донесу урин последњег радног дана у недељи ујутру, када је експозиција штетним материјама најмања, те се самим тим добијају нерелевантни резултати. У овом истраживању 95% пацијената било је мушког пола, као у многим студијама спроведеним у свету када је у питању рад у индустрији (28). Истраживања новијег датума указују на то да хронична експозиција једињењима фенола код пацијената мушког пола, старије животне доби, може утицати на експресију одређених генских парова који учествују у патогенези карцинома простате (29–30). С тим у вези, код ових радника у систематске периодичне прегледе треба уврстити и преглед простате и праћење тумор маркера у крви који су специфични за обољења простате, пре свега слободног простатичног специфичног антигена (fPSA) и укупног простатичног специфичног антигена (PSA), као и њиховог односа.

Предност коришћене семиквантитативне методе јесу брзина и једноставност извођења. У концентрационом подручју 150–300 mg/L могуће је добро оценити разлике у интензитету боје, док се у концентрацијама < 1,594 mg/m³ те разлике нешто теже уочавају (13). Будући да је за референтни опсег препоручена вредност < 1,000 mg/m³, то у овом конкретном испитивању није правило проблем јер се сви резултати испод ове вредности сматрају нормалним. Недостатак методе је интерференција индофенолних једињења која се екстрахују заједно са фенолом и дају позитивну интерференцију. Ова једињења настају због присуства бактерија у урину који дуже стоји на собној температури. Да би се ова интерференција елиминисала, неопходно је у урин, уколико се не узима одмах у рад, додати 40% перхлорну киселину у односу 0,4 mL киселине на 1 mL урина (13). Осим тога, недостатак овог истраживања огледа се у броју испитаника, нарочито испитаница женског пола. С обзиром на то да су узорци прикупљани током систематских прегледа, који се често спроводе о трошку надлежне индустрије, препорука за будућа истраживања су мултицентрична истраживања која би дала реалније податке са већим бројем испитаника.

У закључку, биолошки мониторинг радника при експозицији фенолу и његовим дериватима, важан је са аспекта професионалне токсикологије. Радом обрађени подаци, показали су да су измерене вредности у урину радника, у складу са референтним вредностима датог правилника. Време експозиције, интериндивидуалне особине пацијента и старост неки су од података које треба узети у обзир приликом интерпретације и издавања резултата. Семиквантитативна метода за одређивање

концентрације фенола у урину показала се као брза, лака и поуздана. Због све веће потребе за анализама фенола, за коначну потврду концентрације неопходно је извршити неку од савременијих хроматографских метода.

СКРАЋЕНИЦЕ

- BEI – Biological exposure indices
EPA – United States Environmental Protection Agency
OEL – occupational exposure limits
PSA – простата специфичан антиген
ЗЗЗР – Завод за здравствену заштиту радника

ЛИТЕРАТУРА

- Janković MS. Toksikologija. Kragujevac: Fakultet medicinskih nauka, 2014.
- Vidovix TB, Januário EFD, Bergamasco R, Vieira AMS. Bisfenol A adsorption using a low-cost adsorbent prepared from residues of babassu coconut peels. *Environ Technol* 2021; 42: 2372–84.
- Zhou PK, Huang RX. Targeting of the respiratory chain by toxicants: beyond the toxicities to mitochondrial morphology. *Toxicol Res (Camb)* 2018; 7(6): 1008–11.
- Vashisht S, Singh S. Evaluation of phenol red thread test versus schirmer test in dry eyes: a comparative study. *Int J Appl Basic Med Res* 2011; 1: 40–2.
- Jokanović M. Toksikologija. Niš: Medicinski fakultet, 2010. .
- United States Environmental Protection Agency. Integrated Risk Information System. IRIS Assessments. Phenol. Washington DC: United States Environmental Protection Agency, 2002. (https://iris.epa.gov/ChemicalLanding/&substance_nmbr=88).
- International Agency for Research on Cancer. Some Industrial Chemicals IARC. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Volume 115. Lyon, IARC, 2018..
- True BL, Dreisbach RH. Trovanja priručnik – prevencija, dijagnoza i lečenje. Trinaesto izdanje. Beograd: Data Status, 2005.
- Gilbert S.G. A small dose of toxicology: The Health Effects of common Chemicals. Seattle: CRC Press, 2004.
- Bruckner JV, Anand SS, Warren DA. Toxic effects of solvents and vapors. In: Klaassen CD, ed. Casarett and Doll's Toxicology. The basic science of poisons. 7th ed. New York: McGraw-Hill, 2008: 981–1052.

11. Domínguez-Fernández M, Xu Y, Young Tie Yang P, et al. Quantitative assessment of dietary (poly)phenol intake: A high-throughput targeted metabolomics method for blood and urine samples. *J Agric Food Chem* 2021; 13; 69(1): 537–54.
12. Mihajlović V, Grba N, Sudić J, et al. Assessment of occupational exposure to BTEX in a petrochemical plant via urinary biomarkers. *Sustainability* 2021; 13(13): 7178.
13. Prpić-Majić D. Toksikološko kemijske analize. Beograd–Zagreb; Medicinska knjiga, 1985.
14. Pravilnik o preventivnim merama za bezbedan i zdrav rad pri izlaganju hemijskim materijama. Službeni glasnik RS, br. 106. od 17. decembra 2009, 117 od 27. decembra 2017, 107 od 12. novembra 2021. Beograd: Službeni glasnik, 2021.
15. Protić A, Otašević B, Golubović J, et al. Priprema biološkog materijala i validacija bioanalitičkih HPLC metoda za ispitivanje lekova i njihovih metabolita. *Arh Farm* 2012. 62: 579-86.
16. Benzene; CASRN 71-43-2. Integrated Risk Information System (IRIS). Chemical Assessment Summary. Washington, D.C.: U.S. Environmental Protection Agency, National Center for Environmental Assessment, 2003. (https://iris.epa.gov/static/pdfs/0276_summary.pdf).
17. Omeragić S. Klinički značaj određivanja fenola. *ZKMLDFBIH* 2020; 1: 1–9.
18. Horozić E, Begić A, Ademović Z, Lazarević SB. Ponovljivost odabranih metoda za određivanje fenola u urinu tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti. *Kem Ind* 2018; 67: 107–11.
19. Rebai I, Fernandes JO, Azzouz M, et al. Urinary bisphenol levels in plastic industry workers. *Environ Res* 2021; 202: 111666.
20. Schirmer E, Schuster S, Machnik P. Bisphenols exert detrimental effects on neuronal signaling in mature vertebrate brains. *Commun Biol* 2021; 4: 465.
21. Bousoumah R, Leso V, Iavicoli I, et al. Biomonitoring of occupational exposure to bisphenol A, bisphenol S and bisphenol F: A systematic review. *Sci Total Environ* 2021; 783: 146905..
22. Wu S, Wang F, Lu S, et al. Urinary bisphenol A and incidence of metabolic syndrome among Chinese men: a prospective cohort study from 2013 to 2017. *Occup Environ Med* 2019; 76: 758–64.
23. Farajzadeh MA, Khiavi EB, Feriduni B. Determination of phenolic compounds in industrial wastewaters by gas chromatography after extraction and preconcentration by microextraction procedure. *Global NEST Journal* 2020; 22): 109–18.
24. Stefanović V, Urošević S. Uticaj štetnosti u procesu rada na bezbednost i zdravlje zaposlenih žena sa osvrtom na tekstilnu industriju. *Tekstilna industrija* 2019; 67: 4–13.
25. Smernice dobre laboratorijske prakse. Službeni glasnik RS, br. 28/2008. Beograd: Službeni glasnik, 2008.
26. Environmental Health Criteria 161. Phenol. Geneva: World Health Organization, 1994. (<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/39825/9241571616-eng.pdf?sequence=1>).
27. Alwadi D, Felty Q, Roy D, Yoo C, Deoraj A. Environmental phenol and paraben exposure risks and their potential influence on the gene expression involved in the prognosis of prostate cancer. *Int J Mol Sci* 2022; 23: 3679.
28. Fan S, Liang Z, Gao Z, et al. Identification of the key genes and pathways in prostate cancer. *Oncol Lett* 2018; 16: 6663–9.
29. Lu W, Ding Z. Identification of key genes in prostate cancer gene expression profile by bioinformatics. *Andrologia* 2018; 51: e13169.
30. Artacho-Cordón F, Fernández MF, Frederiksen H, et al. Environmental phenols and parabens in adipose tissue from hospitalized adults in southern Spain. *Environ Int* 2018; 119: 203–11.