

OBSERVATION
UDC 613.63:615.076

NAŠA ISKUSTVA U PRIMJENI BIOLOŠKOG MONITORINGA IZLOŽENOSTI NEKIM ORGANSKIM OTAPALIMA

L.J. SKENDER

*Institut za medicinska istraživanja i
medicinu rada, Zagreb, Hrvatska*

Primljeno 27. siječnja 1994.

Prikazana su iskustva u primjeni biološkog monitoringa profesionalne izloženosti benzenu, toluenu, ksilenu, stirenu, trikloretilenu i tetrakloretilenu. Istaknuta je važnost pravilnog odabira pokazatelja, medija i vremena uzorkovanja. Uspoređena su vlastita istraživanja s postojećim biološkim graničnim vrijednostima te je naglašena potreba za njihovom realnom primjenom u svrhu zaštite zdravlja radnika.

Ključne riječi:

benzen, biološke granične vrijednosti, biološki markeri, ksilen, profesionalna izloženost, stiren, tetrakloretilen, toluen, trikloretilen

○ biološkom monitoringu pisano je mnogo (1-6) i jasno je definirana terminologija (7, 8). Potrebno je, međutim, istaknuti da se u novije vrijeme (9, 10) uvriježeni nazivi »biološki pokazatelji«, »biološki indikatori«, »biološki parametri« zamjenjuju nazivom biološki markeri. Naziv markeri potječe od istraživanja mehanizma karcinogenosti - od kovalentnog vezanja neke tvari na DNA, smatrajući DNA »markiranom« (11). Novi pristup temelji se na postavci da se pri izloženosti nekoj tvari može otkriti neprekidan slijed (kontinuum) bioloških događaja (9). Drugim riječima, za razumijevanje povezanosti izloženosti i opasnosti za zdravlje potrebno je definirati slijed događaja između izloženosti nekom agensu i zdravstvenog učinka (12). Takvom pristupu pridonijeli su stalna tehnološka unapređenja i razvoj bazičnih znanosti na staničnoj i molekularnoj razini koji omogućuju detekciju malih promjena u neprekidnu slijedu događaja. Naime, biološki markeri definirani su kao znakovi u slijedu događanja između izloženosti kao uzroka i bolesti kao posljedice (9) stanične, biokemijske ili molekularne promjene što ih je moguće mjeriti u biološkom mediju: tkivima, stanicama ili tjelesnim tekućinama (13), odnosno kao kvantitativno određivanje kemijske tvari, biokemijske, funk-

cionalne ili morfološke promjene u sustavu na koji je djelovala kemijska tvar i čija je posljedica patološka promjena i izražena toksičnost (14).

Biološki markeri klasificirani su kao biološki markeri izloženosti, biološki markeri učinka i biološki markeri osjetljivosti.

Ovaj je uvod potreban jer se ovi nazivi sve više upotrebljavaju u literaturi o biološkom monitoringu. Budući da su se godinama upotrebljavali nazivi »biološki pokazatelji doze (izloženosti)« i »biološki pokazatelji učinka (odgovora)«, čini se katkad da je novi naziv »biološki markeri« samo pitanje mode i da stari i novi nazivi imaju jednako značenje.

Definicija biološkog monitoringa *Schultea i suradnika* (15): biološki monitoring je komponenta u slijedu preventivnih djelatnosti korisnih u sigurnosti pri radu i očuvanju zdravlja, najbolje je povezana s definicijom bioloških markera.

Činjenica jest da je biološki monitoring primarno povezan s toksikokinetikom (1). Zbog sve veće mogućnosti otkrivanja ranih i reverzibilnih promjena u organizmu, koncept biološkog monitoringa sve se više proširuje i povezuje s toksikodinamikom (16).

Nužno je spomenuti i uvođenje bioloških graničnih vrijednosti koje čine velik korak u zaštiti radnika (6). Biološke granične vrijednosti kao biološki ekvivalent maksimalno dopustivih koncentracija (MDK), za biološki su monitoring isto što su MDK za ambijentalni (17). Definirane su i u našoj zemlji Pravilnikom o maksimalno dopustivim koncentracijama štetnih tvari u atmosferi radnih prostorija i prostora i o biološkim graničnim vrijednostima (18). Temelje se na dva trenutno postojeća službena dokumenta, jedan Njemačkog istraživačkog društva (*Deutsche Forschungsgemeinschaft, DFG*) (19) i drugi Američkog vladinog vijeća industrijskih higijeničara (*American Conference of Governmental Hygienists, ACGIH*) (20). Oba se dopunjuju novim podacima ili se, uporedo s novijim saznanjima, stari podaci revidiraju. Među njima postoje razlike. Njemački dokument postavlja biološke dopustive vrijednosti (*Biologische Arbeitsstofftoleranzwerte, BAT*) kao maksimalno dopustive koncentracije određene tvari u biološkom materijalu kao rezultat izloženosti MDK. Američki dokument definira biološke pokazatelje izloženosti (*Biological Exposure Indices, BEI*) kao najvjerojatnije razine određene tvari u biološkom materijalu, tj. kao prosječnu koncentraciju određenu u biološkim uzorcima radnika sa sličnom razinom izloženosti. Rezultat te razlike su više vrijednosti BAT za polovicu postavljenih bioloških graničnih vrijednosti. Ukupan broj postavljenih bioloških graničnih vrijednosti je malen zbog nedostatnih podataka o toksikokinetici i toksikodinamici određene tvari te o odnosu između vanjske izloženosti, unutarnje doze i neželjenih učinaka. Najveći broj postojećih bioloških graničnih vrijednosti odnosi se na metale i organska otapala.

Unatrag deset godina u Kliničko-toksikološkom laboratoriju Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada, Zagreb, bavimo se biološkim monitoringom izloženosti organskim otapalima. Primjeni biološkog monitoringa prethodila je razrada osjetljivih, točnih i reproducibilnih metoda za određivanje odabranih parametara. Koristimo se plinskom kromatografijom koja je idealna tehnika za određivanje otapala kao predstavnika hlapljivih spojeva. Otapala u krvi određuju se u pravilu analizom para iznad uzorka (»head space«), a metaboliti u krvi i mokraći nakon ekstrakcije ili derivatizacije.

Moralo se odrediti i optimalno vrijeme uzimanja bioloških uzoraka, presudno u biološkom monitoringu izloženosti otapalima zbog relativno kratkog biološkog poluzivota, uzimajući u obzir opterećenje organizma a ne odraz nedavne izloženosti. Razradili smo biološki monitoring izloženosti benzenu, toluenu, ksilenu, stirenu, trikloretilenu i tetrakloretilenu (perkloretilenu). Toksičnost otapala i/ili učestalost primjene bili su odlučujući za takav izbor. Od početka smo se koristili postojećom BGV u interpretaciji rezultata. U primjeni biološkog monitoringa neminovno se postavlja pitanje kontrole kvalitete. Sudjelujemo u vanjskoj kontroli kvalitete koju je organizirao Institut za medicinu rada u Helsinkiju, Finska, i Njemačko društvo za medicinu rada i medicinu okoliša u Erlangenu. Dosada su svi rezultati bili unutar dopuštenih.

Biološki monitoring izloženosti benzenu

U radnika zaposlenih u industriji obuće analizom benzenu u krvi i fenola u mokraći prije i poslije posla otkrivena je profesionalna izloženost benzenu iz korištenih ljepljiva, lakova i otapala (21). Kao sastavnica tih sredstava deklariran je samo toluen i u tvornici se tvrdilo da ne postoji izloženost benzenu. Analizom upotrebljivanih sredstava dokazan je benzen u 8 od 10 uzoraka u koncentraciji od 1 do 9%. Pokazalo se da je razina fenola u mokraći prije i poslije posla dovoljno osjetljiv pokazatelj izloženosti benzenu u uvjetima profesionalne izloženosti. Određivanje fenola samo u jednom uzorku mokraće (svejedno je li to prije ili poslije posla) nije dovoljno. Naime, fenol je normalni razgradni produkt metabolizma te normalni sastojak mokraće. Neki gastrointestinalni poremećaji, neki antibiotici te neki lijekovi uzrokuju povećanu razinu fenola u mokraći, što se ne bi moglo razlikovati od posljedice izloženosti benzenu odnosno fenolu. Tek određivanje koncentracije fenola u mokraći prije i poslije posla koja se u normalnih osoba, bez medikacije i bez izloženosti benzenu odnosno fenolu, ne mijenja statistički značajno (21), odražava izloženost benzenu odnosno fenolu.

Svjesni da određivanje apsorbirane doze ne odražava zdravstveni rizik benzenu, utvrđenog karcinogena, pomoću aberacije kromosoma i izmjene kromatida sestara istražili smo mogući genotoksični učinak benzenu u radnika profesionalno izloženih benzenu u industriji obuće u dva navrata, 1987. godine (22) i pet godina kasnije (23). Modernim izričajem rekli bismo da smo osim bioloških markera izloženosti analizirali i biološke markere učinka. Kolikogod je teško interpretirati citogenetska istraživanja, jer je mnogo faktora koji mogu interferirati, dobiveni rezultati jasno upozoravaju na mogući genotoksični učinak benzenu i pri relativno niskim koncentracijama (<15 mg/L) (22). Do istog zaključka došli smo i u novijem, ponovljenom istraživanju (23). U skupini jače izloženoj benzenu, potvrđeno i ambijentalnim i biološkim monitoringom, nađena je značajno veća učestalost izmjena kromatida sestara.

Potrebno je istaknuti da smo na temelju vlastitih iskustava i saznanjem iz literature (24) promijenili vrijeme uzimanja krvi za analizu benzenu. Dok smo na početku uzimali krv neposredno poslije posla, u novijim mjerenjima krv smo uzimali prije posla. Naime, benzen u krvi poslije posla odražava samo nedavnu

izloženost, dok je benzen u krvi prije posla (tj. 16 sati nakon prestanka izloženosti) pokazatelj opterećenja organizma benzenom.

Za biološki monitoring izloženosti benzenu preporučujemo određivanje benzena u krvi prije posla (ili u izdahnutom zraku jer je benzen u ta dva medija u ravnoteži) i fenola u jednkrotnim uzorcima mokraće prije i poslije posla. Idealno je uz biološki monitoring izloženosti pratiti učinke benzena na zdravlje izloženih radnika. Iskustvo nas uči da je osim bioloških uzoraka uvijek poželjna analiza upotrebljivanih otapala, boja, ljepila i dr.

Biološki monitoring izloženosti toluenu i ksilenu

U radnika zaposlenih u industriji boja provedeno je komparativno istraživanje izloženosti toluenu i ksilenu (25). Uzorci krvi i mokraće uzeti su u ponedjeljak prije posla (procjena opterećenja organizma) i u srijedu prije i poslije posla (odraz stvarne izloženosti). Toluenu u krvi pokazao se najboljim pokazateljem izloženosti toluenu. Njegov metabolit, hipurna kiselina, normalno prisutna u mokraći u različitim koncentracijama ovisno o hrani, nije pouzdan pokazatelj izloženosti umjerenim koncentracijama toluena kakve su bile u ovom istraživanju. Vrijednost drugog metabolita toluena, o-krezola, tek treba potvrditi istraživanjima s većim brojem radnika. Za procjenu izloženosti ksilenu pouzdani su pokazatelji i ksilen u krvi i njegov specifični metabolit metilhipurna kiselina.

Dobiveni rezultati uspoređeni su s postojećim biološkim graničnim vrijednostima. Naše je iskustvo da su one za toluen i ksilen u krvi realne, dok su za metabolite u mokraći previsoke.

Pri niskoj izloženosti toluenu, dokazanoj biološkim monitoringom, i pored općih neuroloških nalaza u granicama normale, evidentirano je oštećenje središnjeg živčanog sustava mjereno vidnim, kognitivnim i evociranim potencijalima moždanog debla te prevalencijom stečenog gubitka vida za boje.

Biološki monitoring izloženosti stirenu

Razrađena je osjetljiva, specifična i točna metoda za određivanje bademove i fenilglioksilne kiseline, metabolita stirena, u mokraći.

U radnika profesionalno izloženih stirenu u industriji ojačane laminirane plastike određeni su stiren u krvi i mokraći te bademova i fenilglioksilna kiselina u mokraći. Svi su ispitivani parametri specifični i dobro odražavaju izloženost stirenu. Od učinaka na zdravlje istraženi su hematološki i hepatološki pokazatelji.

Biološki monitoring izloženosti trikloretilenu i tetrakloretilenu

Ovaj monitoring provodi se gotovo uvijek istodobno. Razlog je što trikloretilen (TRI) upotrebljavan u radu može sadržavati primjese tetrakloretilena (perkloretil-

lena, PER) i obrnuto. Dok se razina metabolita TRI (trikloretnanol/TCE i trikloroetena kiselina/TCA) ne mijenja pri izloženosti TRI kontaminiranog s PER, obrnuta situacija potpuno je različita zbog različite toksikokinetike TRI i PER. TRI se pretežno, oko 80%, metabolizira u TCE i TCA, a PER se najvećim dijelom nepromijenjen izlučuje izdahnutim zrakom; samo oko 3% izlučuje se u obliku TCA. Osim biološkog monitoringa uvijek predlažemo i analizu upotrebljivanih otapala (26).

Naša su iskustva u biološkom monitoringu izloženosti TRI i PER vezana za radnike u kemijskim čistionicama i procesu odmašćivanja metala (26-28). U biološkom monitoringu TRI svaki parametar (TRI, TCE, TCA) ima svoje vlastito značenje. Zbog dugog biološkog poluzivota ($t_{1/2}$ =70-100 sati) TCA u krvi i mokraći pokazatelj je razine izloženosti u nekoliko prethodnih dana, a TCE ($t_{1/2}$ =10-15 sati) posljednjeg dana. Zato se za procjenu izloženosti TRI preporučuje određivanje svih pokazatelja apsorpcije TRI u krvi i mokraći. Međutim, propisana BGV za TCE u krvi, na kraju radnog dana ili tjedna, od 4 mg/L uz važeći higijenski standard od 50 mg/L TRI jest podatak koji može služiti u zdravstvenoj kontroli radnika izloženih TRI, jer je upravo TCE metabolit TRI koji dovodi do zdravstvenih smetnji (organski psihosindrom).

U mnogim se radovima govori o hepatotoksičnosti TRI kao o činjenici, iako bez ikakvih dokaza. U kritičnijim radovima prevladava mišljenje da su za eventualno nađene učinke odgovorni mogući prisutni kontaminanti TRI. Naime, u vrlo malo radova naveden je stupanj čistoće upotrijebljenog TRI. Istraživanjem mogućeg učinka TRI na jetreni sustav citokrom P-450 monooksigenaza, određivanjem aktivnosti antipirina u slini radnika profesionalno izloženih TRI, nađeno je da su samo onečišćenja u upotrijebljenom TRI, a ne sam TRI, odgovorna za indukciju jetrenih monooksigenaza (26).

U radnika profesionalno izloženih PER (27, 28) dokazano je da je PER u krvi najpouzdaniji pokazatelj izloženosti PER. Postojeća biološka granična vrijednost za PER u krvi, 16 sati nakon prestanka izloženosti, od 1 mg/L pri MDK od 50 ppm je realna. TCA, od industrije najčešće traženi parametar za procjenu izloženosti PER, nije dobar pokazatelj i u Pravilniku (18) nije više naveden.

Iako je nađena povišena aktivnost nekih jetrenih enzima pri izloženosti PER (27), za definitivni zaključak o hepatotoksičnosti PER potrebna su daljnja istraživanja.

U svrhu proučavanja toksikokinetike PER i ispitivanja čimbenika koji na nju djeluju primijenjen je fiziološki temeljen simulacijski model uz provjeru profesionalne izloženosti PER.

U novije vrijeme (29-30) procjenjuje se izloženost TRI i PER urbane populacije pomoću biološkog monitoringa. Na temelju nalaza bioloških uzoraka i vode za piće zaključeno je da se TRI i PER nalaze u okolišu u istom omjeru. Vrlo širok raspon koncentracija svih parametara odražava različitu kontaminaciju okoliša s TRI i PER. Čak postoje naznake (30) o mogućem utjecaju TRI i PER iz vode za piće na koncentraciju TCA u plazmi i mokraći, dakle na opterećenje organizma. Takav nalaz upućuje na zaključak o mogućoj ulozi TCA kao biološkog markera izloženosti opće populacije nekim kloriranim ugljikovodicima čiji je TCA metabolit.

Na kraju ovog prikaza o primjeni biološkog monitoringa izloženosti odabranim organskim otapalima, treba reći da su unatoč prednosti biološkog monitoringa, biološki i ambijentalni monitoring komplementarni.

Postojanje bioloških graničnih vrijednosti koje zapravo obvezuje poslodavca na redovnu kontrolu radnika jer štite radnike od neželjenih zdravstvenih posljedica, trebalo bi naći i realnu primjenu. Iako je ograničen broj tvari za koje one postoje, te se tvari koriste odnosno proizvode u velikim količinama te je njima izložen veliki broj radnika. Biološki monitoring i biološke granične vrijednosti trebali bi biti kriterij u ocjeni radne sposobnosti odnosno privremene nesposobnosti za rad jer su mjerljivi i objektivni pokazatelji.

U razvijenim zemljama malo se provodi biološki monitoring. Razlog je u strogom pridržavanju higijensko-tehničkih mjera i održavanju koncentracija tvari s kojima se radi daleko ispod maksimalno dopustivih koncentracija. U našoj zemlji morat ćemo još dugo čekati na takvu razinu zaštite.

Zahvala
na pripremi rukopisa.

Zahvaljujem dr. sc. Danici Prpić-Majić i dr. sc. Višnji Karačić na čitanju rukopisa i korisnim sugestijama te gđi Veri Ferenčak

LITERATURA

1. Zielhuis RL. Biological monitoring. Scand J Work Environ Health 1978;4:1-18.
2. Tellšman S. Opći aspekti biološkog monitoringa i relativna vrijednost bioloških indikatora za profesionalnu i ekološku ekspoziciju anorganskom olovu. Arh hig rada toksikol 1979;30:49-72.
3. Lauwerys RR. Industrial chemical exposure: Guidelines for biological monitoring. Davis, CA: Biomedical Publications, 1983.
4. Aitio A, Riihimaki V, Vainio H, ur. Biological Monitoring and Surveillance of Workers Exposed to Chemicals. Washington, New York, London: Hemisphere Publishing Corporation, 1984.
5. Hernberg S, Aitio A. Validation of biological monitoring: an introduction. U: Foa V, Emmet EA, Maroni M, Colombi A, ur. Occupational and Environmental Chemical Hazards. Chichester: Ellis Horwood, 1987;41-9.
6. Prpić-Majić D. Biološki monitoring i biološke granične vrijednosti za profesionalnu izloženost kemijskim štetnostima. U: Medicina rada u obnovi domovine. Zagreb: Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Sekcija za medicinu rada Hrvatskoga liječničkog zbora, 1992;99-109.
7. Berlin A, Yodaiken RE, Henman BA, ur. Assessment of Toxic Agents at the Workplace: Roles of Ambient and Biological Monitoring. The Hague: Nijhoff Publ, 1984.
8. Zielhuis RL, Henderson PT. Definitions of monitoring activities and their relevance for the practice of occupational health. Int Arch Occup Environ Health 1986;57:249-57.
9. National Research Council. Biological markers in environmental health research. Environ Health Perspect 1987;74:3-9.
10. Schulte PA. A conceptual framework for the validation and use of biologic markers. Environ Res 1989;48:129-44.

11. *Perera FP, Weinstein IB.* Molecular epidemiology and carcinogen-DNA adduct detection. New approaches to studies of human cancer causation. *J Chronic Dis* 1982;35:581-600.
12. *Fowle JR, Sexton K.* EPA priorities for biologic markers research in environmental health. *Environ Health Perspect* 1992;98:235-41.
13. *Hulka BS, Wilcosky T.* Biological markers in epidemiologic research. *Arch Environ Health* 1988;43:83-9.
14. *Mercier MJ, Robinson AE.* Use of biologic markers for toxic end-points in assessment of risks from exposure to chemicals. *Int Arch Occup Environ Health* 1993;65:S7-10.
15. *Schulte P, Halperin W, Herrick M, Connaly B.* The current focus of biological monitoring. U: Foa V, Emmet EA, Maroni M, Colombi A, ur. *Occupational and Environmental Chemical Hazards*. Chichester: Ellis Horwood, 1987;50-60.
16. *Lauwerys RR.* Objectives of biological monitoring in occupational health practice. (I: Aitio A, Riihimaki V, Vainio H, ur. *Biological Monitoring and Surveillance of Workers Exposed to Chemicals*. Washington, New York, London: Hemisphere Publishing Corporation, 1984;3-6.
17. *Lowry LK.* Biological exposure index as a complement to the TLV. *J Occup Med* 1986;28:578-82.
18. Pravilnik o maksimalno dopustivim koncentracijama štetnih tvari u atmosferi radnih prostorija i prostora i o biološkim graničnim vrijednostima. *Narodne novine* 1993;92:2088-111.
19. *Deutsche Forschungs-gemeinschaft, DFG.* Maximale Arbeitsplatzkonzentrationen und Biologische Arbeitsstofftoleranzwerte. Weinheim: VCH, 1991.
20. *American Conference of Governmental Hygienists, ACGIH.* Threshold Limit Values for chemical substances and physical agents and Biological Exposure Indices. Cincinnati: ACGIH, 1991-1992.
21. *Karačić V, Skender Lj, Prpić-Majić D.* Occupational exposure to benzene in the shoe industry. *Am J Ind Med* 1987;12:531-6.
22. *Karačić V, Horvat D, Skender Lj, Prpić-Majić D.* Chromosome studies in workers occupationally exposed to benzene. *Biol Monitoring* 1991;1:45-52.
23. *Karačić V, Skender Lj, Bosner-Cucančić B, Bogadt-Šare A.* Possible genotoxicity in low level benzene toxicity. *Am J Ind Med* 1994 (u tisku).
24. *Travis CC, Quillen JL, Arms AD.* Pharmacokinetics of benzene. *Toxicol Appl Pharmacol* 1990;102:400-20.
25. *Skender Lj, Karačić V, Bosner B.* A selection of biological indicators in occupational exposure to toluene and xylene. *Arh hig rada toksikol* 1993;44:27-33.
26. *Skender Lj, Karačić V, Prpić-Majić D.* Metabolic activity of antipyrine in workers occupationally exposed to trichloroethylene. *Int Arch Occup Environ Health* 1988;61:189-95.
27. *Skender Lj, Karačić V, Prpić-Majić D, Kežić S.* Occupational exposure indicators to tetrachloroethylene in a dry-cleaning shop. U: Foa V, Emmet EA, Maroni M, Colombi A, ur. *Occupational and Environmental Chemical Hazards*. Chichester: Ellis Horwood, 1987;192-6.
28. *Skender Lj, Karačić V, Prpić-Majić D.* A comparative study of human levels of trichloroethylene and tetrachloroethylene after occupational exposure. *Arch Environ Health* 1991;46:174-8.
29. *Skender Lj, Karačić V, Bosner B, Prpić-Majić D.* Assessment of exposure to trichloroethylene and tetrachloroethylene in the population of Zagreb, Croatia. *Int Arch Occup Environ Health* 1993;65:S163-5.
30. *Skender Lj, Karačić V, Bosner B, Prpić-Majić D.* Assessment of urban population exposure to trichloroethylene and tetrachloroethylene by means of biological monitoring. *Arch Environ Health* 1994 (u tisku).

*Summary***OUR EXPERIENCE IN BIOLOGICAL MONITORING OF EXPOSURE TO SOME ORGANIC SOLVENTS**

The paper describes our experience in the application of biological monitoring of occupational exposure to benzene, toluene, xylene, styrene, trichloroethylene and tetrachloroethylene. The importance of adequate selection of indicator, matrix and sampling time is pointed out. Own results are compared with the existing biological exposure indices. The need for actual and strict application of biological exposure indices is emphasized from the point of view of workers' health protection.

Key terms:

benzene, biological exposure indices, biological markers, xylene, occupational exposure, styrene, tetrachloroethylene, toluene, trichloroethylene

Requests for reprints:

Dr Lj. Skender
Institute for Medical Research
and Occupational Health
2 Ksaverska St., POB 291
41001 Zagreb, Croatia