

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Eva Cvitaš Jurković

**PREDNOST KORIŠTENJA NOVIH REAGENSA U
PATOHIŠTOLOŠKOJ DIJAGNOSTICI**

Specijalistički rad

Zagreb, 2015.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Eva Cvitaš Jurković

**PREDNOST KORIŠTENJA NOVIH REAGENSA U
PATOHIŠTOLOŠKOJ DIJAGNOSTICI**

Specijalistički rad

Zagreb, 2015.

PSS studij: Toksikologija - modul B

Mentor rada: Prof. dr. sc. Franjo Plavšić

Specijalistički rad obranjen je dana 15.06.2015. u Zagrebu na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu, pred povjerenstvom u sastavu:

1. Prof. dr. sc. Valerije Vrčec
2. Prof. dr. sc. Karmela Barišić
3. Dr. sc. Ivana Čepelak, professor emerita

Rad ima 59 listova.

Predgovor

Zahvaljujem svima koji su na bilo koji način doprinijeli ostvarenju ovog rada, a posebno zahvaljujem obitelji na podršci.

SAŽETAK RADA

Cilj istraživanja: Cilj ovog istraživanja temelji se na prikazu utjecaja najčešće korištenih kemikalija u patohistologiji (formalin, ksilen, etilni alkohol) na ljudsko zdravlje i okoliš. Cilj je predložiti zamjenu tih kemikalija kemikalijama boljeg toksikološkog profila te predložiti ponovnu uporabu kemikalija u svrhu smanjenja količine opasnog medicinskog otpada.

Materijal i metode: U ovom radu korišteni su podaci o toksikološkim svojstvima kemikalija iz Europske agencije za kemikalije te važećih regulativa o opasnim kemikalijama i opasnom medicinskom otpadu. Najčešće korišteni reagensi uspoređeni su s reagensima različitih kompanija u svijetu koje proizvode reagense za patohistološku dijagnostiku. Ispitana su postojanja kemikalija koje bi mogle služiti kao zamjena, uz uvjet da pokazuju jednaku ili bolju djelotvornost pri korištenju u dijagnostičke svrhe.

Zaključak: Formalin kao fiksativ mogao bi se zamijeniti glioksalom, a ksilen kao sredstvo za prosvjetljavanje alifatskim ugljikovodicima, kao što su alkani, C11-15-izo. Formalin, ksilen i etilni alkohol mogli bi se reciklirati postupkom destilacije uz pomoć uređaja za tu namjenu. Ambalaža u kojoj se nalaze ta tri najčešće korištena reagensa također se ne bi trebala odbaciti, već bi se mogla ponovno uporabiti. Mogu se koristiti veći spremnici za višekratnu uporabu pri čemu bi se smanjila količina otpada, odnosno ambalaže za jednokratnu uporabu.

SUMMARY

Objectives: The aim of this research is to demonstrate the influence of the most commonly used chemicals in pathohistology (formalin, xylene, ethyl alcohol) on human health and the environment. The aim is to suggest replacement of these chemicals with chemicals of better toxicological profile and to suggest re-use of chemicals to reduce the amount of hazardous medical waste.

Material and Methods: The data on the toxicological properties of chemicals from the European Chemicals Agency and applicable regulations on hazardous chemicals and hazardous medical waste have been used in this research. The most commonly used reagents were compared to various reagents from different companies worldwide that produce reagents for diagnostic histopathology. The existence of chemicals that could serve as a substitute were examined, under the condition that they show the same or better efficiency in the use for diagnostic purposes.

Conclusion: Formalin as a fixative may be replaced by glyoxal and xylene as a clearing agent may be replaced by aliphatic hydrocarbons, such as alkanes, C11-15-iso. Formalin, xylene and ethyl alcohol could be recycled through distillation with the help of equipment for this purpose. Packaging containing these three most commonly used reagents are also not to be rejected, but could be re-used. You can use reusable containers where the amount of waste and single-use packaging could be reduced.

Sadržaj

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA.....	7
1.1. Obrada tkiva	8
1.1.1. Fiksiranje	9
1.1.2. Uklapanje	11
1.1.3. Bojenje	12
1.2. Opasne kemikalije.....	13
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	15
3. MATERIJAL I METODE – SUSTAVNI PREGLED SAZNANJA O TEMI.....	16
3.1. Principi za uspostavljanje prihvatljive razine rizika	16
3.2. Kontrola rizika	17
3.2.1. Upravljanje rizikom i kontrola kvalitete	17
3.2.2. Upravljanje kvalitetom	18
3.2.3. Osiguranje kvalitete	18
3.2.4. Kontinuirano poboljšanje kvalitete	18
3.3. Zaštita okoliša	18
3.4. Otpad.....	20
3.4.1. Hijerarhija gospodarenja otpadom	21
3.4.2. Odgovornost proizvođača	21
3.4.3. Europski trendovi.....	22
3.4.4. Medicinski otpad.....	22
3.5. Siguran rad u laboratoriju	26
3.5.1. Identifikacija i procjena rizika	27
3.5.2. Plan za smanjenje rizika	27
3.6. Granične vrijednosti izloženosti.....	28
3.6.1. Vrste granica izloženosti prema trajanju izloženosti	29
3.6.2. Biološka granična vrijednost	30
3.7. Vrste opasnosti	30

3.8. Opasne kemikalije u patohistološkoj dijagnostici	31
3.8.1. Formalin	31
3.8.2. Ksilen	33
3.9. Novi reagensi u patohistološkoj dijagnostici	34
3.9.1. Glioksal umjesto formalina.....	35
3.9.2. Alifatski ugljikovodici umjesto ksilena.....	39
3.10. Etilni alkohol.....	42
3.11. Recikliranje	43
3.11.1. Recikliranje formalina	43
3.11.2. Recikliranje ksilena.....	44
3.11.3. Recikliranje etanola	45
3.12. Zaštita okoliša za bolje sutra	45
3.12.1. Smanjenje plastične ambalaže	46
3.13. Zbrinjavanje opasnog otpada	47
4. RASPRAVA.....	48
5. ZAKLJUČI	51
6. LITERATURA	52
7. POPIS SKRAĆENICA	56
8. ŽIVOTOPIS	58

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

U današnje vrijeme naglog napretka svih znanosti, a pogotovo medicine, određene grane medicine doživljavaju procvat. Neke od tih grana su i morfološke znanosti – histologija i patologija. Koristeći napredak tehnologije, ovim se strukama otvaraju nove mogućnosti da, zajedno s bazičnim strukama, poput kemije i biokemije te u suradnji s klinikom, bitno doprinesu novim spoznajama u dijagnostičkom postupku te praćenju pacijenata oboljelih od cijelog niza bolesti.

Kako bi se uz pomoć morfoloških znanosti uspješno mogao obaviti svaki zadatak, koriste se različite metode. Povijesno gledano, najstarija i ujedno najjednostavnija metoda makroskopskog promatranja je promatranje golim okom. Pronalazak mikroskopa otvorio je nove, neslućene mogućnosti koje i danas predstavljaju osnovu rada histologije (mikroskopske anatomije) te patohistologije. Od 1800. godine nadalje, provode se istraživanja strukture uzoraka tkiva. Tijekom 19. stoljeća i na početku 20. stoljeća postignut je velik napredak u povezivanju strukture s kemijskim i biokemijskim svojstvima tkiva. Vrijeme između dva svjetska rata jedno je od najplodnijih razdoblja mikroskopske tehnologije. U to vrijeme djeluju velikani histokemije, kao što su Lillie, Masson, Gomory koji uvode cijeli niz specijalnih metoda bojenja te brojne nove histokemijske metode. Tridesetih godina javlja se otkriće elektronskog mikroskopa, koji u današnje vrijeme predstavlja značajnu pomoć u rutinskom i istraživačkom radu. Druga polovica sedamdesetih te osamdesete godine obilježene su novom tehnikom, imunohistokemijom, procesom lokalizacije specifičnih antigena u tkivu, pomoću ciljno usmjerenih protutijela, koristeći osnovni princip u imunologiji da se određeno protutijelo veže i prepozna samo ciljani antigen. Imunohistokemija se razvila u snažnu dijagnostičku metodu koja pruža dodatne informacije prilikom rutinske morfološke analize tkiva. [1, 2, 3]

1.1. Obrada tkiva

Osnovni cilj i svrha svih patohistoloških tehnika je pripremiti i obojiti tkivo tako da se dobije što je moguće vjerniji prikaz pojedinih staničnih elemenata ili njihovih svojstava koja se zatim promatraju uz pomoć određenih instrumenata – mikroskopa. Da bi se taj cilj mogao doseći, potrebno je obaviti cijeli niz postupaka koji se mogu podijeliti u nekoliko koraka: preuzimanje materijala, fiksiranje tkiva, dehidriranje i uklapanje tkiva, rezanje, montiranje i bojanje tkivnih prereza, pokrivanje preparata te pohrana preparata. Ovi koraci zajednički su većini patohistoloških tehnika. Donekle se razlikuju ovisno o kojim točno tehnikama i metodama se radi.

Najuobičajeniji postupak za proučavanje tkiva jest pripravljanje patohistoloških rezova koji se nakon završenog postupka obrade tkiva mogu promatrati pod mikroskopom. Budući da su tkiva i organi obično debeli i neprozirni, izrađene su metode za dobivanje tankih, prozirnih rezova. U nekim slučajevima vrlo tanki slojevi tkiva ili prozirne opne živih životinja (npr. rep punoglavca) mogu se promatrati mikroskopom bez prethodnog rezanja tkiva. Tada se tkiva mogu promatrati u dužim razdobljima i u različitim fiziološkim ili eksperimentalnim uvjetima. Ako je potrebno načiniti trajni pripravak, mali isječki tih tankih tvorbi mogu se fiksirati, razvući na stakalcu, obojiti, uklopiti u smolu i promatrati mikroskopom. Međutim, tkiva se najčešće mogu proučavati tek nakon što se izrežu na tanke rezove. To se postiže upotrebom preciznih instrumenata za rezanje, nazvanih mikrotomi. Organi ili tkiva moraju se na poseban način prirediti za rezanje, što je prikazano u Tablici 1. [1, 2, 3]

Tablica 1. Priprema tkiva za rezanje na mikrotomu

Stadij	Svrha
1. Fiksiranje u jednostavnim ili složenim fiksativima	- sačuvati morfologiju i molekularni sastav tkiva
2. Dehidracija u uzlaznom nizu koncentracije etilnog alkohola (70 % - 99 %)	- zamijeniti vodu u tkivu organskim otapalom

3. Prosvjetljavanje u ksilenu	- impregnirati (prožeti) tkivo otapalom za parafin
4. Uklapanje u otopljeni parafin	- parafin prodire u sve međustanične prostore pa i u stanice, što rezultira otvrdnutim tkivom koje je spremno za rezanje

Idealni mikroskopski pripravak tkiva (patohistološki preparat) treba biti prikladnim kemikalijama sačuvan (konzerviran) tako da tkivo na stakalcu ima jednaku građu i molekularni sastav kakav je imalo u tijelu. To je u praksi rijetko izvedivo, tako da na gotovom patohistološkom preparatu uvijek ima artefakata nastalih u postupku pripravljanja.

1.1.1. Fiksiranje

Da se izbjegne razgrađivanje tkiva enzimima (autoliza) ili bakterijama i sačuva njegova fizička struktura, komade tkiva treba brzo i prikladno fiksirati, koliko je moguće ranije, nakon što se izvade iz tijela. Kod pokusnih životinja to je moguće učiniti i prije, dok su organi još u tijelu. Taj se postupak – **fiksiranje** – obično izvodi tako da se tkivo uroni u otopinu tvari koje stabiliziraju, odnosno križno povezuju bjelančevine u tkivu pa mu se tako, što je moguće bolje, sačuvaju morfološke i molekularne značajke. Fiksiranje se može izvršiti i perfuzijom, tj. ubrizgavanjem fiksacijske tekućine u krvožilni sustav organa. [3]

Fiksiranje je prvi i najvažniji postupak u trajnoj obradi tkiva. Ideja fiksiranja biološkog tkiva sa ciljem boljeg razumijevanja bioloških funkcija i strukture dovela je do razvoja raznih fiksativa tijekom prošlog stoljeća. Postoje razni mehanizmi djelovanja fiksativa, kao što su kovalentno povezivanje s reaktivnim skupinama, križno povezivanje, dehidracija, utjecaji kiselina, stvaranje soli, povećana temperatura i kombinacija svih tih procesa međusobno.

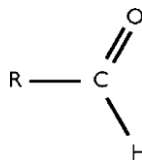
Glavni cilj fiksiranja u patohistologiji je očuvati jasna morfološka svojstva tkiva. Kako bi se mikroanatomija tkiva mogla vizualno predočiti, u obojenim dijelovima tkiva moraju se očuvati mikroskopske veze među stanicama i dijelovima stanice (npr. citoplazma i jezgra) kakve su bile i prije fiksiranja, a izvanstanični materijal može se malo razlikovati u organizaciji tkiva pri čemu kemijski sastav mora ostati jednak. [1, 2, 3]

Kemijske tvari kojima se obavlja fiksiranje nazivaju se **fiksativi**. Neki od njih (npr. živin klorid, pikrinska kiselina) izazivaju precipitaciju ili denaturaciju bjelančevina. Drugi (npr. formalin, glutaraldehid) dovode do križnog povezivanja bjelančevina. Najčešće korišteni fiksativi su 10 %-tna otopina formalina, 4 %-tna otopina formalina, a sve rjeđe Bouinova tekućina sastavljena od pikrinske kiseline, zasićenog formalina (37 %-tna otopina formaldehida u vodi), octene kiseline i vode. [1, 2, 3]

Fiksiranje tkiva može se postići fizikalnim i/ili kemijskim metodama. Fizikalne metode, kao što su zagrijavanje, fiksiranje mikrovalovima te sušenje zamrzavanjem nezavisni su postupci i nisu često korišteni u rutinskom radu u patohistologiji, osim u slučaju fiksiranja mikroorganizama prije Gram bojenja, kada se fiksiranje obavlja jednom metodom zagrijavanja.

Većina metoda fiksiranja korištena u obradi tkiva za patohistološku dijagnostiku oslanja se na kemijsko fiksiranje koje se postiže uz pomoć tekućih fiksativa. Kemijsko fiksiranje koristi organske i anorganske otopine kako bi se održala morfološka svojstva tkiva.

Neke kemikalije ili kombinacija kemikalija mogu djelovati kao dobri fiksativi i postići potrebnu svrhu fiksiranja. Neki fiksativi dodaju kovalentne reaktivne skupine što može izazvati križno povezivanje između proteina, unutar nukleinskih kiselina te između nukleinskih kiselina i proteina. Najbolji primjeri fiksativa koji potiču križno povezivanje su formaldehid, glutaraldehid, kloral hidrat, gliksal, metalne soli, kao što su živin klorid i cinkov klorid te



osmijev tetroksid. Aldehidne skupine () su kemijski reaktivne i odgovorne za mnoge histokemijske reakcije.

Drugi pristup fiksiranju je korištenje sredstava koja uklanjaju slobodnu vodu s tkiva i time dolazi do taloženja i koaguliranja proteina. Primjeri takvih fiksativa uključuju etanol, metanol i aceton.

Ostali fiksativi poput octene kiseline, trikloroctene kiseline, živinog klorida i cink acetata oslanjaju se na denaturiranje proteina i nukleinskih kiselina putem promjene pH vrijednosti ili stvaranja soli. [1, 2, 3]

1.1.2. Uklapanje

Da bi se mikrotomom moglo izrezati na tanke rezove, tkivo se nakon fiksiranja i ispiranja fiksativa mora prožeti sredstvom za uklapanje, koje će mu dati potrebnu čvrstoću. Najčešće korišteno sredstvo za uklapanje je parafin.

Postupku uklapanja ili impregniranja tkiva obično prethode dva pripremna postupka: **dehidriranje** i **prosvjetljavanje**. Iz fiksiranih i ispiranih komadića tkiva najprije se uklanja voda uzastopnim prenošenjem u sve koncentriranije mješavine etanola i vode (obično od 70 % do 99 % etanola). Nakon toga se etanol zamjenjuje otapalom za sredstvo za uklapanje. Za parafin je to ksilen. Kada se tkivo prožme otapalom, ono obično postane prozirno (zato se postupak naziva **prosvjetljavanje**) i tada se može staviti u otopljeni parafin u termostatu na temperaturi od 58 do 60 °C. Pod utjecajem topline otapalo ispari i svi se prostori u tkivu ispune parafinom.

Mali blokovi tkiva u sredstvu za uklapanje režu se pomoću mikrotoma čeličnom ili staklenom oštricom na rezove debele 1 – 10 µm. Rezovi se zatim prenese na predmetno staklo. Promatranje elektronskim mikroskopom zahtijeva mnogo tanje rezove (0,02 – 0,1 µm) te se tkivo uklapa u tvrdi epoksi plastiku. Dobiveni blokovi tako su tvrdi da se mogu rezati samo dijamantnim i staklenim oštricama.

Uranjanjem tkiva u otapalo poput ksilena otapaju se tkivni lipidi što onemogućuje njihovo proučavanje. Da bi se izbjegao gubitak lipida, koristi se mikrotom sa zamrzavanjem, u kojem se na niskim temperaturama tkivo smrzne i otvrdne dovoljno da se može rezati. Kriostat je uređaj koji uz mikrotom (nož za rezanje tankih rezova) sadrži rashladnu jedinicu koja dobiveni uzorak tkiva smrzava na -20 do -30 °C. Mikrotom i kriostat omogućuju brzo dobivanje rezova bez prije opisanog postupka uklapanja. Zato se rutinski upotrebljavaju u bolnicama za brzo pregledavanje patološki promijenjenih tkiva za vrijeme kirurških zahvata.

Sredstva za prosvjetljavanje su intermedijeri između otopina dehidracije i infiltracije te bi se trebala moći miješati s oba sredstva. Većina sredstava za prosvjetljavanje su ugljikovodici s indeksima loma sličnima indeksima loma proteina.

Većina sredstava za prosvjetljavanje su zapaljive tekućine. Prema točkama vrenja tih sredstava može se pretpostaviti koliko brzo može doći do zamjene sredstva za prosvjetljavanje s rastopljenim parafinom. Tekućine s nižom točkom vrenja uglavnom se lakše zamijene s parafinom. Viskoznost također utječe na brzinu prodiranja sredstva za prosvjetljavanje u tkivo. Dugotrajno izlaganje većini sredstava za prosvjetljavanje uzrokuje lomljivost tkiva. Vrijeme provedeno u sredstvu za prosvjetljavanje trebalo bi se pažljivo pratiti kako bi se osiguralo da gusti blokovi tkiva budu dovoljno prosvjetljeni, a manji, krhki blokovi tkiva ne budu oštećeni. [1, 2, 3]

1.1.3. Bojenje

S malo iznimaka, tkiva su bezbojna pa se neobojena teško mogu promatrati svjetlosnim mikroskopom. Zato su pronađene metode bojenja tkiva kojima se mogu istaknuti pojedini sastojci tkiva i uočiti razlike među njima. Bojenje se izvodi mješavinom boja koje manje ili više selektivno prikazuju sastojke tkiva. Većina patohistoloških boja sadrži kisele ili bazične sastojke koji pokazuju afinitet za stvaranje kemijskih veza. Sastojci tkiva koji se jače oboje bazičnim bojama nazivaju se bazofilni, a sastojci tkiva s afinitetom za kisele boje označuju se kao acidofilni sastojci.

Primjeri bazičnih boja su toluidinsko i metilensko modri. Hematoksilin se smatra bazičnom bojom, tj. boji bazofilne sastojke tkiva. Glavni sastojci tkiva koji reagiraju s bazičnim bojama su oni koji sadrže kiseline (nukleoproteini i glikozaminoglikani). Kiselim bojama (npr. *orange G*, eozin, kisel fuksin) uglavnom se prikazuju osnovni sastojci bjelančevina u citoplazmi.

Od svih boja najčešće se upotrebljava kombinacija hematoksilina i eozina. Hematoksilin boji staničnu jezgru i druge kisele sastojke (npr. organele s mnogo RNA) u plavu boju. Suprotno njemu, eozin boji citoplazmu crveno, a kolagen ružičasto. U različitim patohistološkim postupcima upotrebljavaju se i mnoge druge boje. Iako su korisne za isticanje različitih

sastojaka tkiva, one obično ne daju nikakav uvid u kemijski sastav tkiva. Osim bojenja tkiva bojama, često se primjenjuje i impregnacija metalima, kao što su srebro i zlato, osobito za proučavanje živčanog tkiva. [1, 2, 3]

1.2. Opasne kemikalije

Kada je riječ o opasnim kemikalijama, postoje razni pojmovi koji opisuju njihova svojstva i koji su kasnije u radu spomenuti. Potrebno je prvo definirati **opasne kemikalije**, a to su:

- a) tvari ili pripravci koji ispunjavaju kriterije za fizikalne opasnosti, opasnosti za zdravlje ili okoliš utvrđene Direktivom 67/548/EEZ i Direktivom 1999/45/EZ
- b) tvari i smjese koje ispunjavaju kriterije za fizikalne opasnosti, opasnosti za zdravlje ili okoliš utvrđene u 2. – 5. dijelu Priloga I. Uredbe (EZ) br. 1272/2008. [4]

CAS (*Chemical Abstract Service*) broj je karakterističan broj već otkrivenih tvari po međunarodnom popisu *Chemical Abstract Service*. [4]

Razred opasnosti je vrsta fizikalne opasnosti ili opasnosti za zdravlje ljudi ili okoliš. [5]

Kategorija opasnosti je skupina kriterija unutar pojedinih razreda opasnosti na temelju kojih se utvrđuje razina opasnosti. [5]

Piktogram opasnosti je grafički prikaz koji sadrži simbol i druge grafičke elemente, kao što je obrubljenje, uzorak podloge i boja, čija je svrha prenijeti određene informacije opasnosti u pitanju. [5]

Oznaka opasnosti je riječ kojom se označava relativna razina opasnosti kako bi se čitatelja upozorilo na potencijalnu opasnost. Razlikuju se dva stupnja opasnosti:

- a) „Opasnost“ je oznaka opasnosti za više kategorije opasnosti;
- b) „Upozorenje“ je oznaka opasnosti za niže kategorije opasnosti. [5]

Oznaka upozorenja je izraz koji se dodjeljuje razredu i kategoriji opasnosti kako bi se opisala vrsta opasnosti opasne tvari ili smjese te, prema potrebi, stupanj opasnosti. [5]
Označava se sa slovom „H“.

Oznaka obavijesti je izraz kojim se opisuje preporučena mjera ili mjere za smanjenje ili prevenciju štetnih posljedica izlaganja opasnoj tvari ili smjesi uslijed njihove uporabe ili zbrinjavanja. [5] Označava se sa slovom „P“.

Pri određivanju toksikoloških svojstava, razne skupine testnih organizama (npr. štakor, zec...) izlažu se progresivno sve većim koncentracijama toksikanta te se prati određena reakcija koja se lako može kvantificirati. Akutna toksičnost može biti izražena preko **LD50** (oralno, dermalno) ili **LC50** (inhalacijski) koncentracija. LD50 označava srednju letalnu dozu, odnosno dozu toksikanta (mg/kg) u testu, koja je letalna za 50 % organizama određene vrste unutar određenog vremenskog razdoblja. Pri određivanju ekotoksikoloških svojstava, skupine testnih organizama (npr. ribe, račići...) izlažu se toksikantu te je princip testa određivanje koncentracije ispitivane tvari koja uzrokuje smrtnost 50 % populacije. Vremena izlaganja ispitivanoj tvari mogu biti 24 h, 48 h, 72 h i 96 h, a rezultati se izražavaju kao 24 h – LC50, 48 h – LC50, 72 h – LC50 i 96h – LC50.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja temelji se na prikazu utjecaja najčešće korištenih kemikalija u patohistologiji (formalin, ksilen, etilni alkohol) na ljudsko zdravlje i okoliš. Cilj je predložiti zamjenu tih kemikalija kemikalijama boljeg toksikološkog profila te predložiti ponovnu uporabu kemikalija u svrhu smanjenja količine opasnog medicinskog otpada.

3. MATERIJAL I METODE – SUSTAVNI PREGLED SAZNANJA O TEMI

Svi aspekti radnog procesa uključuju jednu razinu rizika, a upravljanje rizicima uključuje procjenu rizika i određivanje prioriteta te adekvatno postupanje s prepoznatim rizicima. Najčešće nije moguće izbjeći ili ukloniti rizike, ali bitno je prepoznati i smanjiti njihov utjecaj.

3.1. Principi za uspostavljanje prihvatljive razine rizika

Uspostavljanje prihvatljive razine rizika može se razlikovati ovisno o sustavu u kojem se nalazi osoba koja se bavi upravljanjem rizikom. Postoje različiti principi [6] koji pomažu pri određivanju prihvatljive razine rizika, a neki od njih su:

1. **Politika.** Neke odluke donesene su od strane osoba koje su na višoj poziciji kada se radi o donošenju odluka od voditelja upravljanja rizikom, kao što su primjerice vlasnici tvrtke.
2. **Bez rizika.** Nekoć se smatralo da je neke rizične događaje moguće izbjeći i da time rizika neće biti. Iskustvom je kasnije zaključeno da je prihvatljivije razmišljati na način da se rizik može svesti na najmanju moguću mjeru koja će toliko malo utjecati na određeni događaj da će zapravo biti zanemariv. Takav zanemariv rizik je, u ovom slučaju, prihvatljiva razina rizika.
3. **Važnost dokaza.** Dokaz mora biti dovoljno jak i siguran da uopće potvrdi postojanje rizika. Potrebno je konstantno pratiti struku u području od interesa i ispitivati postojanje rizika na temelju dokaza koji je donesen. Ovaj princip može pomoći u određivanju razine rizika o kojem se radi.
4. **Načelo predostrožnosti.** Ovaj princip temelji se na vjerovanju da je bolje suzdržati se od neke akcije ukoliko posljedice te akcije nisu poznate. Uglavnom se temelji na saznanju da su zdravlje čovjeka i očuvanje okoliša nezamjenjivi. Njihova zaštita trebala bi biti primarna, a svi ostali problemi sekundarni.
5. **ALARA princip.** ALARA je akronim koji označava pristup smanjenju rizika onoliko koliko je to razumno moguće (*As Low As Reasonably Achievable*). Ako rizik nije

smanjen onoliko koliko je razumno moguće, ne smatra se prihvatljivim prema ALARA principu.

6. Odgovarajuća razina zaštite. Odgovarajuća razina zaštite ili ALOP (*Appropriate Level Of Protection*) definirana je kao rizik kojeg društvo može podnijeti. Značajan doprinos ovog principa je u postavljanju težišta s rizika na zaštitu.
7. Standardi sigurnosti i ravnoteže. Standardi sigurnosti koriste se za uspostavljanje podnošljive razine rizika. Primjerice, princip „bez rizika“ o kojem je prethodno bilo govora jedan je od mogućih standarda sigurnosti. TLR (*Tolerable Level of Risk*) ili prihvatljiva razina rizika zahtjeva subjektivnu odluku. Rizike neizvjesnog potencijalnog dobitka najbolje je pratiti uz pomoć standarda ravnoteže. Primjerice, ponekad je razumljivo da se veća razina rizika može prihvatiti u svrhu moguće potencijalne koristi ili dobiti.

3.2. Kontrola rizika

Svrha upravljanja rizicima je kontrola rizika. U nekim slučajevima moguće je izbjeći ili potpuno spriječiti prepoznati rizik. To je moguće primjerice potragom za alternativnim, zamjenskim kemikalijama koje bi se koristile u laboratoriju i koje bi doprinosile manjoj opasnosti za čovjeka i okoliš. Prije sedamdesetih godina prošlog stoljeća uobičajeno je bilo koristiti živin klorid kao sastavni dio fiksativa. [7] Premda su rezultati bili izvrsno fiksirana tkiva, korištenje takvih reagensa bilo je izrazito štetno za okoliš i za zaposlenike u laboratoriju. Živin klorid kao sastojak fiksativa više se ne koristi i uvedeni su zamjenski reagensi zadovoljavajuće kvalitete za provođenje uspješnog tretiranja uzorka.

Unatoč trudu da se rizik eliminira, najčešće nije moguće ukloniti ga potpuno. Može se naći način da ga se smanji što je više moguće. Jedan oblik rizika uvijek će ostati prisutan.

3.2.1. Upravljanje rizikom i kontrola kvalitete

Praćenje rizika je kontinuirani proces. Jednom otkriveni i smanjeni rizik ne smije se zanemariti. Cilj upravljanja rizikom je osigurati što sigurnije uvjete za okoliš od interesa.

Prema Powersu [8], zahtjevi kontrole kvalitete u laboratoriju trebali bi se zasnivati na principima upravljanja rizikom. Poziva se na ISO 14971 procese upravljanja rizicima koji su prepoznati u nekom laboratoriju.

3.2.2. Upravljanje kvalitetom

U uskoj poveznici s osiguranjem kvalitete i kontinuiranim poboljšanjem kvalitete, kontrola kvalitete čini sastavni dio potrebnog sustava kvalitete. Dobar sustav kontrole kvalitete daje informacije o aktivnostima unutar osiguranja kvalitete. Sustav provjerava je li radni proces učinkovit. Uključuje procese korištene u laboratoriju kako bi se greške prepoznale i uklonile. Kontrola kvalitete osigurava usklađenost kvalitete rada u laboratoriju s određenim zahtjevima. Pogreške i/ili odstupanja od očekivanih rezultata moraju biti dokumentirani i, prema tome, treba uključiti potrebne korektivne radnje.

3.2.3. Osiguranje kvalitete

Osiguranje kvalitete ne podrazumijeva fokus na konačan proizvod ili uslugu, već na proces koji je doveo do toga. Ovaj sustav praćenja ocjenjuje pogreške i probleme te pruža rješenje. Pregled podataka omogućuje prepoznavanje smanjene kvalitete u pojedinim područjima i pokretanje odgovarajućih korektivnih radnji.

3.2.4. Kontinuirano poboljšanje kvalitete

Kontinuirano poboljšanje kvalitete koristi se proaktivno kako bi se pristupila, prepoznala i ocijenila mogućnost poboljšanja kvalitete prije nego što problem nastane, što se postiže kroz ocjenjivanje svih procesa u radu.

3.3. Zaštita okoliša

Opasna kemikalija je posebnim propisom određena kemikalija, mješavina ili pripravak koji je u postrojenju prisutan kao sirovina, proizvod, nusproizvod, ostatak ili među proizvod,

uključujući i one tvari za koje se može pretpostaviti da mogu nastati u slučaju nesreće, a koje mogu imati štetne posljedice za zdravlje ljudi, materijalna dobra te prirodu i okoliš. [9]

Zaštita okoliša je skup odgovarajućih aktivnosti i mjera kojima je cilj sprječavanje opasnosti za okoliš, sprječavanje nastanka šteta i/ili onečišćivanja okoliša, smanjivanje i/ili otklanjanje šteta nanesenih okolišu te povrat okoliša u stanje prije nastanka štete. [9]

Ciljevi zaštite okoliša u ostvarivanju uvjeta za održivi razvitak jesu:

- zaštita života i zdravlja ljudi
- zaštita biljnog i životinjskog svijeta, georaznolikosti, bioraznolikosti i krajobrazne raznolikosti te očuvanje ekološke stabilnosti
- sprječavanje velikih nesreća koje uključuju opasne tvari
- sprječavanje i smanjenje onečišćenja okoliša
- uklanjanje posljedica onečišćenja okoliša
- napuštanje i nadomještanje uporabe opasnih i štetnih tvari.

Kada prijete opasnost od stvarne i nepopravljive štete za zdravlje ljudi i okoliš, ne smije se odgađati poduzimanje nužnih zaštitnih mjera, pa ni u slučaju kada ta opasnost nije u cijelosti znanstveno istražena. [9]

Velika nesreća je događaj, odnosno nekontrolirana pojava izazvana velikom emisijom, požarom ili eksplozijom i sl., koji je uzrokovan nekontroliranim razvitkom događanja tijekom djelovanja u postrojenju u kojem su prisutne opasne tvari te jedna ili više tih opasnih tvari i/ili njihovih spojeva nastalih uslijed događaja. Nekontrolirana je pojava koja dovodi u ozbiljnu trenutačnu ili odgođenu – naknadnu opasnost ljudsko zdravlje i život, materijalna dobra i/ili okoliš, unutar postrojenja i/ili izvan postrojenja. [9]

Kada je riječ o sprječavanju velikih nesreća koje uključuju opasne tvari misli se na postrojenja u kojima ili putem kojih se, obavljanjem djelatnosti operatera opasne tvari: proizvode, prerađuju, skladište, nastaju kao nusprodukt u proizvodnji proizvoda, koriste kao sirovine u proizvodnji, odnosno tehnološkom procesu, transportiraju unutar postrojenja i/ili odlažu u svrhu proizvodnog procesa, mogu nastati prilikom velike nesreće. Operater u čijem su postrojenju prisutne opasne tvari obvezan je poduzeti preventivne mjere nužne za

smanjenje rizika nastanka i sprječavanje nastanka velikih nesreća te mjere za ograničavanje utjecaja velikih nesreća na ljude, materijalna dobra i okoliš. [9]

3.4. Otpad

Otpad je svaka tvar ili predmet određen kategorijama otpada propisanim provedbenim propisom Zakona o otpadu, koje posjednik odbacuje, namjerava ili mora odbaciti. [10]

Recikliranje je ponovna uporaba otpada u proizvodnom procesu osim uporabe otpada u energetske svrhe. [10]

Gospodarenje otpadom je skup aktivnosti, odluka i mjera usmjerenih na:

1. sprječavanje nastanka otpada, smanjivanje količine otpada i/ili njegovoga štetnog utjecaja na okoliš,
2. obavljanje skupljanja, prijevoza, uporabe (svaki postupak čiji je glavni rezultat uporaba otpada u korisne svrhe), zbrinjavanja i drugih djelatnosti u svezi s otpadom, te nadzor nad obavljanjem tih djelatnosti,
3. skrb za odlagališta koja su zatvorena.

Ciljevi gospodarenja otpadom su:

1. izbjegavanje i smanjivanje nastajanja otpada i smanjivanje opasnih svojstava otpada, i to posebice:
 - razvojem čistih tehnologija koje koriste manje prirodnih izvora,
 - tehničkim razvojem i promoviranjem proizvoda koji ne pridonose ili, u najmanjoj mogućoj mjeri pridonose, povećanju štetnog utjecaja otpada i opasnosti od onečišćenja,
 - razvojem odgovarajućih metoda zbrinjavanja opasnih tvari sadržanih u otpadu namijenjenom uporabi,
2. uporaba otpada recikliranjem, ponovnom uporabom ili obnovom, odnosno drugim postupkom koji omogućava izdvajanje sekundarnih sirovina, ili uporabu otpada u energetske svrhe,
3. zbrinjavanjem otpada na propisan način,
4. sanacijom otpadom onečišćenog okoliša.

Gospodarenje otpadom je od interesa za Republiku Hrvatsku (RH). Država je odgovorna za gospodarenje opasnim otpadom i za spaljivanje otpada, a otpad čija se vrijedna svojstva mogu iskoristiti mora se oporabiti. [10]

Proizvođač i uvoznik proizvoda i proizvođač i uvoznik otpada moraju planirati proizvodnju proizvoda i ambalažu za proizvode tako da se proizvodnja unapređuje primjenom čistih tehnologija. Također, na način koji omogućuje učinkovitu uporabu materijala i energije, potiče ponovnu uporabu i reciklažu proizvoda (ako je to po svojstvu proizvoda moguće) i uzima u obzir najprimjereniji postupak uporabe, obrade i/ili odlaganja proizvoda kojem je istekao rok odnosno vijek trajanja, kako bi se nepovoljni utjecaj na okoliš sveo na najmanju moguću mjeru. Proizvođači su dužni kupcu i/ili korisniku proizvoda osigurati mogućnost povrata uporabljenih proizvoda, odnosno ambalaže koja se nakon odgovarajuće obrade može ponovno uporabiti. [10]

Strategijom se uređuje gospodarenje različitim vrstama otpada na teritoriju RH, od njegova nastanka do konačnog odlaganja. Osnovni cilj je ostvarivanje i održavanje cjelovitog sustava gospodarenja otpadom koji će biti ustrojen prema suvremenim europskim standardima i zahtjevima, sa svrhom da se maksimalno izbjegne, odnosno smanji nastajanje otpada, smanji, na najmanju moguću mjeru, nepovoljni utjecaj otpada na ljudsko zdravlje, okoliš i klimu, te da se cjelokupno gospodarenje otpadom uskladi s načelima održivog razvoja. [11]

3.4.1. Hijerarhija gospodarenja otpadom

Prioriteti su izbjegavanje i smanjivanje nastajanja otpada te smanjivanje njegovih opasnih svojstava. Ako se nastajanje otpada ne može izbjeći niti smanjiti, otpad se mora ponovno koristiti – reciklirati i/ili oporabiti. Otpad koji se više ne može racionalno iskoristiti trajno se odlaže na prihvatljiv način za okoliš.

3.4.2. Odgovornost proizvođača

Proizvođač proizvoda od kojega potječe otpad odgovoran je za odabir rješenja najprihvatljivijeg za okoliš, prema svojstvima proizvoda i tehnologiji proizvodnje, uključujući

vijek trajanja proizvoda i uporabu najbolje dostupne tehnologije. Proizvođač otpada podmiruje sve troškove preventivnih mjera i mjera zbrinjavanja otpada, troškove gospodarenja otpadom koji nisu pokriveni prihodom ostvarenim od prerade otpada, te je financijski odgovoran za provedbu preventivnih i sanacijskih mjera zbog štete za okoliš koju je prouzročio ili bi je mogao prouzročiti otpad.

3.4.3. Europski trendovi

Što se tiče europskih trendova u gospodarenju otpadom, a vezano uz opasni otpad unutar EU, bit će potrebno:

- identificirati opasne tvari, poticati njihovu zamjenu manje opasnim tvarima ili alternativnim dizajnom proizvoda, odnosno stvarati sustav u kojem je proizvođač dužan osigurati da se otpad skuplja, obrađuje i reciklira na način koji smanjuje, na najmanju moguću mjeru, rizike i učinke na okoliš (»zatvorena petlja«);
- integrirati ciljeve i prioritete izbjegavanja nastajanja otpada u Politiku integriranog proizvoda EU-a, sa ciljem identificiranja i provedbe mogućnosti smanjivanja sadržaja opasnih tvari u proizvodima, produživanja trajanja proizvoda, te da proizvodi postanu podobniji za recikliranje i ponovno korištenje, itd.;
- učiniti proizvođače odgovornima za njihove proizvode kad oni postanu otpad (gdje je to učinkovito);
- utjecati na potražnju potrošača u korist proizvoda i procesa kojima se pridonosi stvaranju manje količine otpada, npr. politikom »zelene« nabave, označavanjem eko-proizvoda, kampanjama informiranja i drugim. [11]

3.4.4. Medicinski otpad

Medicinski otpad je svaki otpad iz kataloga otpada sukladno Uredbi o kategorijama, vrstama i klasifikaciji otpada, s katalogom otpada i listom opasnog otpada. **Kemijski otpad** je opasan medicinski otpad koji sadržava toksične ili opasne kemikalije, uključujući citotoksike, citostatike i slično, a neopasan je kad ne sadržava ništa od navedenog.

Ugrožene osobe su sve osobe izložene opasnom medicinskom otpadu slučajnim kontaktom unutar zdravstvene zaštite ili bilo kojem drugom izvoru medicinskog otpada, kao i osobe koje gospodare ili su izložene nemarnom gospodarenju medicinskim otpadom. Prema svojstvima, medicinski otpad je:

- opasan proizvodni otpad ili
- neopasan proizvodni otpad.

Opasan medicinski otpad s obzirom na opasna svojstva definirana posebnim propisom, dijeli se na:

- infektivni,
- kemijski otpad koji sadrži opasne tvari,
- oštri predmeti,
- citotoksici i citostatici,
- amalgamski otpad iz stomatološke zaštite i
- ostali opasan otpad – svaki otpad za koji se pretpostavlja da ima neko od opasnih svojstava. [12]

Pri pružanju zdravstvene zaštite nastaju dvije grupe otpada:

- inertni medicinski otpad (otpad po sastavu i izgledu sličan komunalnom otpadu) i
- opasni medicinski otpad.

Inertni medicinski otpad čini oko 86% sastava medicinskog otpada, a uključuje uobičajeni otpad, papir i kartonsku ambalažu, staklo te ostatke hrane. Opasni medicinski otpad čini oko 14% ukupnih količina medicinskog otpada, a sastoji se od skupina otpada sa sljedećim udjelima:

– infektivni otpad	80 %
– oštri predmeti	8 %
– patološki otpad	5 %
– farmaceutski otpad	3 %
– kemijski otpad	2 %
– citostatici	2 %

Na temelju ankete koju je provelo Ministarstvo zdravstva i socijalne skrbi 2003. u okviru izrade stručnih podloga za cjelovito rješavanje problematike uspostave organiziranog i sustavnog zbrinjavanja otpada iz zdravstvene djelatnosti, ukupna je količina medicinskog otpada bila:

- inertni medicinski otpad 16,788 t/god
- opasni medicinski otpad 2,733 t/god
- Ukupno 19,521 t/god

Anketom je bilo obuhvaćeno 77 zdravstvenih ustanova u državnom vlasništvu i vlasništvu županija, 73 zdravstvene ustanove u privatnom vlasništvu, te zavodi za javno zdravstvo i domovi zdravlja.

U dijelu upitnika koji se odnosio na probleme koji se javljaju prilikom postupanja s medicinskim otpadom zdravstvene ustanove istaknule su:

- razvrstavanje opasnog od komunalnog otpada,
- discipliniranost ljudi za odvajanje otpada,
- sortiranje i pakiranje otpada; vođenje očevidnika,
- prijevoz otpada,
- visoke financijske troškove za sanaciju svih vrsta otpada,
- skladištenje kemijskog, farmaceutskog otpada i otpada od citostatika, te zbrinjavanje ambalaže kemikalija i infektivnih otopina; zbrinjavanje aspiriranog sadržaja,
- problem spremanja ostatka pepela poslije izgaranja u vlastitoj spalionici,
- prestanak rada Pokretnog uređaja za termičku obradu otpada (PUTO-a) 1.8.2002. u Zagrebu po mišljenju nekoliko zdravstvenih ustanova uzrokovao je probleme vezane uz konačno zbrinjavanje kemijskog i farmaceutskog otpada budući da nema dovoljan broj firmi koje se bave konačnim zbrinjavanjem navedenog otpada,
- slabu informiranost o stručnim tvrtkama koje mogu zbrinjavati sve vrste otpada nastalog u medicinskim ustanovama. [11]

Tablica 2. Procjena ukupnih godišnjih količina medicinskoga opasnog otpada

Županija	Količina opasnog otpada (t/god)	Županija	Količina opasnog otpada (t/god)
Bjelovarsko-bilogorska	66,23	Požeško-slavonska	55,29
Brodsko-posavska	121,01	Primorsko-goranska	104,58
Dubrovačko-neretvanska	90,55	Sisačko-moslavačka	88,73
Grad Zagreb	1.038,43	Splitsko-dalmatinska	148,80
Istarska	125,53	Šibensko-kninska	63,02
Karlovačka	124,90	Varaždinska	112,70
Koprivničko-križevačka	74,50	Virovitičko-podravska	63,31
Krapinsko-zagorska	83,80	Vukovarsko-srijemska	54,15
Ličko-senjska	28,88	Zadarska	98,85
Međimurska	52,93	Zagrebačka	65,41
Osječko-baranjska	70,89	UKUPNO	2.732,53

U Tablici 2. prikazane su procjene ukupnih godišnjih količina medicinskoga opasnog otpada prema županijama RH. Što je županija razvijenija, to je količina medicinskoga opasnog otpada veća. Izvor podataka iz Tablice 2. je istraživanje Zbrinjavanje medicinskog otpada, Projekt optimalnog zbrinjavanja otpada iz zdravstvenih djelatnosti na području RH s prikazom najpovoljnijeg tehnološkog rješenja (ENERKON, APO, Klinički bolnički centar Zagreb u suradnji sa Svjetskom zdravstvenom organizacijom, Zagreb 2003.).

Anketom su utvrđene sljedeće količine uskladištenog opasnog medicinskog otpada u zdravstvenim ustanovama i to:

- farmaceutski otpad 3,900 kg
- infektivni otpad 2,500 kg
- citostatici s ambalažom 1,250 kg
- kemijski otpadi 1,400 kg

Tablica 3. Proizvodnja i načini zbrinjavanja opasnoga medicinskog otpada

Način zbrinjavanja	Opasni medicinski otpad (kg/tjedan)					
	Patološki	Infektivni	Oštri	Farmaceutski	Citostatici	Kemijski
Vlastita obrada	71,80	8.816,34	494,34	50,75	357,25	954,00
Ugovorna tvrtka	757,65	15.062,75	1.816,70	538,50	154,00	649,40

U Tablici 3. prikazani su načini zbrinjavanja opasnog medicinskog otpada, iz koje se može vidjeti da se opasan medicinski otpad većinom zbrinjava preko ugovorne tvrtke, a rjeđe vlastitom obradom. Izvor podataka je Ministarstvo zdravstva i socijalne skrbi.

Kemijski otpad se ne obrađuje na odgovarajući način i najveći dio ispušta se u kanalizaciju [11].

3.5. Siguran rad u laboratoriju

Većina udžbenika u području histopatologije sadržavala je malo informacija o zdravlju, sigurnosti i pitanju okoliša. Donedavno, mjesta u kojima se radilo s histopatološkim reagensima bila su bez ventilacije i prozora. U neka od tih mjesta naknadno su ugrađeni ventilatori koji ipak najčešće nisu pružili zadovoljavajuću kvalitetu zraka za osobe koje su

boravile u tom prostoru. Sigurnost radnika rijetko se smatrala bitnom temom, većinom zbog toga što nitko nije razumio važnost opasnosti reagensa (kemikalija) koji se koriste u patohistologiji. [7]

S vremenom, siguran rad u laboratoriju sve više se počeo primjenjivati. Mnogi laboratoriji dizajnirani su prema važećim propisima o sigurnosti na radnom mjestu. Iako se propisi razlikuju od države od države, cilj je postići univerzalne zahtjeve. U zdravstvenim i istraživačkim ustanovama vidljiva su poboljšanja uvjeta na radnom mjestu, ali zagađenje okoliša i dalje je prisutno.

3.5.1. Identifikacija i procjena rizika

Prvi korak u upravljanju rizicima je identificirati rizike iz radnog okoliša. Zatim, treba utvrditi ozbiljnost, odnosno jačinu određenog rizika. Treba uzeti u obzir i količinu o kojoj se radi; nije svejedno hoće li se npr. prolići 1000 litara formalina u laboratoriju u kojem se proizvodi patohistološki reagens ili 30 ml iz posude za uzorke koja se nalazi u uredu. Rizik se ne smije podcjenjivati, ali moraju se uzeti u obzir svi parametri koji doprinose opasnosti.

3.5.2. Plan za smanjenje rizika

Treba težiti pronalasku načina za smanjenje rizika. Svaki rizik treba se uzeti u obzir, a ne samo onaj koji je najopasniji. Kontrola praktičnog rada najbolji je način kako doći do odgovora na postavljena pitanja, što može uključivati uklanjanje, smanjivanje i ponovnu uporabu (recikliranje) korištenih kemikalija. Osobna zaštitna oprema trebala bi se koristiti kao posljednji izbor.

Plan za smanjenje rizika može uključivati mogućnost zamjene opasne kemikalije manje opasnom, a kvalitetom zadovoljavajućom kemikalijom. Antifriz, lak za nokte, sredstva za čišćenje, kozmetika, otopine za kontaktne leće, benzin samo su neki od svakodnevnih materijala koji su podlegli takvoj promjeni. U svim slučajevima, proizvodi su sigurniji, mnogi daju bolji rezultat, a neki su i financijski prihvatljiviji.

Ukoliko je otklanjanje opasnosti nemoguće, opasnost je moguće smanjiti. Ponovna uporaba, odnosno recikliranje, također može doprinijeti smanjenju rizika. Ako se količina pri upotrebi ne može smanjiti, treba razmisliti o mogućem smanjenju količine pri skladištenju i odlaganju. Plan za smanjenje rizika može uključiti i financijsko opravdanje. Razmatranje financija od velike je važnosti za svako poslovanje. Iako će mnoge promjene na početku imati najveću financijsku težinu, kasnije će se isplatiti.

3.6. Granične vrijednosti izloženosti

Većina kemikalija je opasna, ali pitanje je koliko su opasne. Drugim riječima, koja bi granična koncentracija kemikalije bila za siguran radni proces? Uzevši u obzir višegodišnje iskustvo u industriji, razne agencije odredile su granične vrijednosti izloženosti za kemikalije u širokoj upotrebi. Naziv granične vrijednosti izloženosti prihvaćen je u Republici Hrvatskoj, dok se u drugim državama koriste neki drugi nazivi, ali značenje je jednako. Na primjer, dopuštena granica izloženosti (PEL – *Permissible Exposure Limit*) od strane Agencije za sigurnost i zdravlje na radu (OSHA – *Occupational Safety and Health Administration*) temelji se na znanstveno potkrijepljenim preporukama od Nacionalnog instituta za sigurnost i zdravlje na radu (NIOSH – *National Institute of Occupational Safety and Health*). Drugi izvor graničnih vrijednosti izloženosti, odnosno praga graničnih vrijednosti (TLV – *Threshold Limit Value*) je Američka konferencija državnih industrijskih higijeničara (ACGIH – *American Conference of Governmental Industrial Hygienists*) i te vrijednosti češće se koriste u svijetu za radne standarde. [7]

Granica izloženosti je maksimalna dopuštena koncentracija kemikalije u zraku (para, dim ili prah) kojoj osoba smije biti izložena. Predstavlja koncentraciju pri kojoj je rad još siguran za većinu ljudi. Međutim, uvijek će postojati osobe koje su preosjetljive i negativno će reagirati i na niže koncentracije od granice izloženosti.

3.6.1. Vrste granica izloženosti prema trajanju izloženosti

Prosječna koncentracija izloženosti ovisna o vremenu (TWA ili TWAEV – *Time-Weighted Average ili Time-Weighted Average Exposure Value*) je prosječna koncentracija izloženosti osobe tijekom radne smjene u trajanju od 8 sati, kojoj radnik može biti izložen bez nepoželjnih nuspojava. U nekom trenutku unutar 8 sati može se dogoditi da koncentracija izloženosti osobe bude veća od određene TWA vrijednosti, no bitno je da je prosječna koncentracija izloženosti ispod određene TWA vrijednosti. Mogu postojati kratke izloženosti pri kojima koncentracija kemikalije može biti veća od određene koncentracije za siguran rad, kao što je to slučaj kod primjerice fenola i metanola koji jako brzo prolaze kroz kožu. [7]

Granica (ili vrijednost) kratkotrajne izloženosti (STEL ili STEV – *Short-Term Exposure Limit ili Short-Term Exposure Value*) je najveća dopuštena prosječna vrijednost ovisna o vremenu za razdoblje od 15 minuta tijekom radne smjene. Trebala bi se mjeriti tijekom najgorih/najopasnijih 15 minuta rada. STEL koncentracija uvijek je veća od TWA. [7]

Gornja granica izloženosti (CL ili CEV – *Ceiling Limit ili Ceiling Exposure Value*) je maksimalna dopuštena trenutna izloženost u bilo kojem trenutku tijekom radne smjene. STEL i CL vrijednosti dodijeljene su samo za par kemikalija, pri čemu CL vrijednost uglavnom pripada vrlo opasnim tvarima. [7]

Za kemikalije kojima nedostaje podatak o STEL ili CL vrijednosti, okvirna STEL vrijednost može se dobiti tako da se TWA vrijednost pomnoži s brojem 3, a okvirna CL vrijednost tako da se TWA vrijednost pomnoži s brojem 5 (predloženo od strane Ministarstva rada, Ontario, Kanada 1991. godine). Kada je prisutno više od jedne opasne tvari, koriste se kompleksne formule kako bi se odredila kombinirana granična vrijednost izloženosti. Formule koje su propisane razlikuju se od države do države. [7]

Također postoji i koncentracija izloženosti određenoj kemikaliji koja je trenutno opasna po život ili zdravlje (IDLH – *Immediately Dangerous to Life or Health*). Kemikalije s niskim IDLH trebale bi se smatrati vrlo opasnim u slučaju prolijevanja ili kada se radi o većim volumenima. Jedan udisaj pri toj ili iznad te koncentracije mogao bi imati ozbiljne, ako ne i smrtonosne posljedice. [7]

3.6.2. Biološka granična vrijednost

Preko konferencije industrijskih higijeničara ACGIH uspostavljene su biološke granične vrijednosti (BEI – *Biological Exposure Indices*) kao maksimalne vrijednosti analita određene kliničkim testovima preko izdaha, urina ili krvi za različite opasne kemikalije.

Ksilen je, primjerice, jedna od najčešće korištenih kemikalija u patohistologiji. Izomeri ksilena metaboliziraju se u metil-hipurnu kiselinu koja se može izmjeriti u urinu izloženog radnika. Uzorci se prikupljaju odmah po završetku radne smjene. Biološka granična vrijednost za ksilen iznosi 1,5 g metil-hipurne kiseline na 1 gram kreatinina.

3.7. Vrste opasnosti

Iako ne postoji univerzalan dogovor, sljedeći pojmovi imaju opće značenje i koriste se kada se govori o opasnosti u patohistologiji. Opasne kemikalije podijeljene su na dvije opće kategorije, zdravstveno i fizički opasne kemikalije. Fizički opasne kemikalije svakako mogu pokazivati i opasnost po zdravlje, ali primarno stvaraju probleme za skladištenje i rukovanje. Postoje kemikalije koje djeluju nadražujuće, zatim korozivne kemikalije, kemikalije koje izazivaju preosjetljivost, odnosno alergijske reakcije. Većina kemikalija može uzrokovati alergijsku reakciju kod preosjetljivih pojedinaca pa je ključan podatak o učestalosti reakcije kod izložene populacije. Kemikalije koje izazivaju preosjetljivost vrlo su opasne jer preosjetljivost može trajati cijeli život, a stanje se može samo pogoršavati naknadnim izlaganjem. Preosjetljivost se može razviti na radnom mjestu zbog visoke razine izloženosti, ali postoji vjerojatnost da se kemikalije mogu naći i izvan radnog mjesta pri nižim koncentracijama što također može utjecati na preosjetljivost. Formaldehid je primjer takve kemikalije. Njegove pare dio su raznih kućanskih i građevinskih materijala, kao što su zavjese, tapete, iverica.

Karcinogene kemikalije doprinose visokoj razini opasnosti. Dok mnoge kemikalije potiču stvaranje tumora kod eksperimentalnih životinja izloženih visokim koncentracijama, službeno su prepoznate i karcinogene kemikalije koje predstavljaju veliki rizik za ljude. Kriterij za obilježavanje karcinogene kemikalije razlikuje se među agencijama, ali bilo koja karcinogena

kemikalija koja se koristi u patohistologiji prepoznata je kao karcinogena, primjerice formaldehid, kloroform, kromna kiselina, dioksan i slično.

Kemikalije koje djeluju specifično na neki organ vrlo su opasne jer njihov učinak nije vidljiv odmah i uglavnom je nepovratan. U patohistologiji postoji mnogo takvih primjera: ksilen i toluen su neurotoksini, a benzen utječe na sastav krvi. Kemikalije koje djeluju na reproduktivni sustav posebno su rasprostranjene, primjerice ksilen, kloroform, metanol, toluen.

3.8. Opasne kemikalije u patohistološkoj dijagnostici

Za izvođenje patohistoloških tehnika za obradu tkiva potrebno je proizvesti, a zatim i koristiti različite *in vitro* dijagnostičke (IVD) medicinske proizvode za svaki korak postupka obrade tkiva. Trenutno najčešće korišteni IVD medicinski proizvodi sastoje se od opasnih kemikalija, kako za proizvođača, tako i za korisnika. Najveći udio tih proizvoda čine formalin, ksilen i etilni alkohol.

3.8.1. Formalin

Formalin (otopina formaldehida) koristi se za fiksiranje tkiva. Formaldehid je kao fiksativ prvi put korišten krajem 1800. godine kada ga je Ferdinand Blum upotrijebio u mikrobiologiji i patohistologiji. Pravilno fiksirano tkivo je neoštećeno pa se nakon obrade može izraditi kvalitetan patohistološki preparat. Standardni fiksativ je puferirani neutralni 10 % formalin. Fiksiranje nastaje mijenjanjem konformacije proteina – nastaju metilenski mostovi između karbonilne skupine formaldehida i amino skupina bočnih lanaca aminokiselina u proteinu.

Formaldehid je plin koji potpunim otapanjem u vodi stvara otopinu koja sadrži 37-40 % formaldehida. Ta vodena otopina naziva se formalin. Uobičajeni 10 %-tni formalin korišten prilikom fiksiranja tkiva sadrži približno 4 % volumnog udjela formaldehida. Formaldehid je poznat i pod sljedećim nazivima: metanal, metilen oksid, oksimetilen, metilaldehid i oksometan. Reakcije formaldehida i makromolekula su brojne i složene. 40-tih godina prošlog stoljeća, Fraenkel-Conrat i njegovi kolege, koristeći osnovna znanja kemije, opisali

su većinu reakcija formaldehida s aminokiselinama i proteinima. U vodenoj otopini, formaldehid postaje hidratiziran te se stvara glikol (hidratizirani formaldehid) koji se naziva metilen glikol. [13] Metilen hidrat (ili metilen glikol) reagira s bočnim lancima aminokiselina u proteinu kako bi se stvorile reaktivne hidroksimetil bočne skupine. S relativno kratkim vremenom fiksiranja (sati do dani) s 10 %-tnim neutralno puferiranim formalinom, stvaranje hidroksimetil bočnih skupina vjerojatno je primarna i karakteristična reakcija. Križno povezivanje je rijetko pri ovom kratkom vremenu fiksiranja.

Formaldehid također reagira s jezgrinim proteinima i nukleinskim kiselinama. [14, 15] Prodire između nukleinskih kiselina i proteina i stabilizira vezu među njima i također modificira nukleotide na način da reagira sa slobodnim amino skupinama nukleotida. U slobodnoj DNA, reakcije križnog povezivanja vjerojatno počinju kod adenin-timin (AT) regije, a križno povezivanje se pojačava s povišenom temperaturom. [16, 17, 18, 19] Bočni aminokiselinski lanci peptida ili proteina koji su najreaktivniji s metilen hidratom i stoga pokazuju najveći afinitet za formaldehid uključuju lizin, cistein, histidin, arginin, tirozin te reaktivne hidroksilne skupine serina i treonina. [20]

Kada se formaldehid otopi u nepuferiranoj vodenoj otopini, stvori se kisela otopina (pH 5,0-5,5). Kiseli formalin s proteinima reagira puno sporije nego neutralno puferirani formalin jer amino skupine postaju nabijene ($-\text{NH}_3^+$). Formaldehid primarno konzervira veze između peptida i proteina te općenito strukturu staničnih organela. Može međusobno djelovati s nukleinskim kiselinama, ali ima mali utjecaj na ugljikohidrate te lipide konzervira ako otopina sadrži kalcij. [21]

Formaldehid se lako apsorbira udisanjem i gutanjem, ali slabo preko kože. Brzo se metabolizira u format pa zapravo male količine udahnutog ili progutanog formaldehida kolaju cijelim tijelom. Izlučuje se preko urina kao mravlja kiselina ili preko izdaha kao ugljikov dioksid.

10 % otopina formalina štetna je ako se proguta. Kod gutanja se mogu javiti žarenje i moguća oštećenja sluznica probavnog trakta, abdominalna bol, mučnina, povraćanje (moguće i krvavog sadržaja), vrtoglavica, glavobolja, poremećaji vida kao i trajna sljepoća

uslijed oštećenja očnog živca, nesvjestica. Također je štetna u dodiru s kožom te djeluje nadražujuće. Može izazvati alergijsku reakciju na koži. Mogu se javiti crvenilo uz žarenje i bol, odmašćivanje, pucanje kože, osip, oticanje, opekotine, pojava mjehura i kasniji upalni procesi. Uzrokuje i jako nadraživanje oka. Može doći do žarenja sluznice, suzenja, crvenila i boli. Moguće je krvarenje, kasnije upale i trajna oštećenja vida. 10 % otopina formalina štetna je ako se udiše. Mogu se javiti iritacija mukozne membrane nosa/grla (osjećaj peckanja, nagon za kihanjem, curenje iz nosa). Ako se radi o visokim koncentracijama može doći i do teškoća pri disanju, napadaja kašlja, stezanja u prsima, glavobolje, pneumonije (upale pluća), pojave plućnog edema. Formaldehid ima karcinogena svojstva te može uzrokovati rak.

Formaldehid je zapaljiv plin. Stvara eksplozivnu smjesu sa zrakom. Lako je topljiv u vodi i vrlo lako isparava. Otopine formaldehida imaju plamište od 32 do 61 °C, zavisno o koncentraciji plina u otopini. Povišena temperatura (zagrijavanje) utječe na povećanje tlaka i povećava rizik od eksplozije. U slučaju požara, može doći do razvijanja opasnih produkata gorenja, npr. ugljičnog monoksida.

3.8.2. Ksilen

Parafin potreban za uklapanje preparata netopljiv je u vodi i alkoholu. Zato se u procesu mora koristiti ksilen koji se miješa s parafinom i alkoholom što omogućava prodor parafina u tkivo i istiskivanje alkohola iz tkiva. Ksilen se koristi za prosvjetljavanje patohistoloških uzoraka i deparafiniranje patohistoloških preparata.

Ksilen je štetan ako se udiše. Udisanje para može izazvati iritaciju sluznice nosa i grla praćeno grloboljom, kašljem, otežanim disanjem pa i gušenjem. Udisanje para visokih koncentracija može prouzročiti glavobolju, slabost i iscrpljenost, teškoće s disanjem, stezanje u prsima, smetnje u koordinaciji, poremećaje u radu CNS-a. Štetan je u dodiru s kožom i nadražuje ju. Izaziva iritaciju kože, crvenilo, oticanje, a produljeni ili ponovljeni kontakt uzrokuje odmašćivanje, suhoću. Pare ksilena iritiraju oči. U slučaju prskanja može doći do iritacije i pojave crvenila, suzenja, boli, oticanja, zamućenja vida, osjetljivosti na svjetlo.

Nakon gutanja može doći do pojave mučnine, povraćanja, dijareje. Moguća je pojava glavobolje, slabosti i iscrpljenosti, smetnje u koordinaciji, depresije CNS-a. Aspiracija u pluća može prouzročiti pneumotitis i edem pluća. U težim slučajevima može doći do smrti.

Ksilen je zapaljiva tekućina. Pare mogu stvoriti eksplozivnu smjesu sa zrakom kada je ksilen zagrijan iznad temperature paljenja, što može biti moguće već pri povišenoj sobnoj temperaturi. Ksilen je vrlo slabo topljiv u vodi i lakši je od nje. Također je hlapljiv. Plamište ksilena je 25 °C. Povišena temperatura (zagrijavanje) utječe na povećanje tlaka i povećava rizik od eksplozije. U slučaju požara, može doći do razvijanja opasnih produkata gorenja, npr. ugljičnog monoksida.

3.9. Novi reagensi u patohistološkoj dijagnostici

Najčešće korišteni IVD medicinski reagensi koji se koriste u dijagnostici polako se pokušavaju zamijeniti zamjenskim, manje štetnim ili potpuno bezopasnim sredstvima za ljudsko zdravlje. Sve više poznatih svjetskih firmi (Merck, Sigma, Diapath...) koje se bave proizvodnjom takvih reagensa širi svoju ponudu takozvanim „zelenim“ proizvodima.

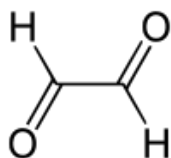
Govoreći o fiksativima bez formaldehida, mnoge firme u svom prodajnom programu nude takve reagense. Tako primjerice, tvrtka Trend Scientific, Inc predlaže **Histo-Fix** kao zamjenu formaldehidu. Histo-Fix predstavlja vodenu otopinu poliola i uree bez udjela formaldehida. Tvrtka National Diagnostics predstavlja **Mirsky's Fixative** bez formaldehida i glutaraldehida, a tvrtke Anatech Ltd., Thermo Electron i BBC Biochemical predstavljaju **Prefer**, **Shandon Glyo-Fixx** te **Uni-Fix** fiksative bez formalina, a na bazi glioksala. Sigma-Aldrich također nudi fiksativ na bazi glioksala pod nazivom **Glyoxal Solution, ~40% in water**, a Merck proizvodi **Neo-Fix**, fiksativ na bazi etilnog alkohola.

Što se tiče zamjenskih reagensa za ksilen, u svijetu se već koriste Merck-ov **Neo-Clear** (alifatski umjesto aromatskih ugljikovodika), Sigma-Aldrich proizvodi **Xylene Substitute** također na bazi alifatskih ugljikovodika, kao i Thermo Scientific (proizvod **Shandon Xylene Substitute**), Sakura (proizvod **Tissue-Tek Tissue-Clear Xylene Substitute**). Anatech Ltd.

nudi **Pro-Par Clearant** na bazi alifatskih umjesto aromatskog ugljikovodika, američka firma Scientific Safety Solvents proizvodi **Hemo-De** kao zamjenu za ksilen na bazi limonena.

3.9.1. Gliksal umjesto formalina

Gliksal je nestabilan u čistom obliku. Najčešće je dostupan u 30 – 40 %-tnoj vodenoj otopini. Kemijska formula gliksala je $C_2H_2O_2$ i najmanji je dialdehid, strukturne formule



. U mnogočemu je sličan formaldehidu, ali posjeduje i vlastite specifičnosti.

Gliksal nema utvrđenu dopuštenu graničnu vrijednost izloženosti. Djeluje nadražujuće za kožu i oči. Pri rukovanju gliksalom treba koristiti nitrilne rukavice i zaštitne naočale. Također, gliksal je biorazgradiv te ga je lakše zbrinuti od formalina. Ne pokazuje svojstva ekotoksičnosti.

Gliksal nije zapaljiva tvar. Pri povišenoj temperaturi (zagrijavanju) može doći do povišenja tlaka i prsnuća. Također, postoji mogućnost spontane polimerizacije.

Gliksal je u svijetu vodeća zamjena fiksativima na bazi formaldehida. Ta zasluga temelji se na manjoj štetnosti za zdravlje čovjeka koji je u kontaktu s gliksalom. Također, reakcija fiksiranja brže se odvija s gliksalom nego s formalinom. Rutinska bojenja hematoksilinom i eozinom tkiva fiksiranih gliksalom prikazuju bolju jasnoću i detalje od tkiva fiksiranih formaldehidom. [22]

Fiksativi na bazi gliksala daju brži učinak od formalina. Manji uzorci dobiveni biopsijom mogu biti spremni za daljnju obradu tkiva nakon samo jednog sata. Tkiva fiksirana gliksalom posjeduju jasno vidljive detalje, a daljnji proces bojenja uobičajenim tehnikama rada daje zadovoljavajuće rezultate. [23] Također, fiksativi na bazi gliksala koji ne stvaraju pare kada se zagriju na višu temperaturu (50 °C i više) sve češće se koriste kada se radi o takvoj vrsti fiksiranja. [24]

Svjetske tvrtke poput tvrtki Anatech, Thermo Scientific, BBC Biochemical, Sigma-Aldrich u svom proizvodnom programu nude zamjenski, manje štetan fiksativ na bazi gliksala.

Vodena otopina glioksala s masenim udjelom glioksala od 40 % maksimalna je moguća koncentracija glioksala u vodi. Ovisno o koncentraciji i vremenu izlaganja, 40 %-tna vodena otopina glioksala može nadražiti kožu te izazvati alergijsku reakciju na koži. Nakon jednokratnog dodira s kožom praktički je netoksična. Može prouzročiti jako nadraživanje oka. Štetna je ako se udiše i može izazvati nadražaj dišnih puteva (osjećaj žarenja, nagon za kihanjem, curenje nosa). Postoji sumnja na moguća genetska oštećenja. Pri jednokratnom gutanju, otrovnost je niska.

U nastavku je prikazana Tablica 4. prema kojoj se mogu usporediti opasna svojstva glioksala prema formaldehidu i iz koje se može vidjeti da je glikosal manje opasna kemikalija od formaldehida. Formaldehid je otrovan ako se proguta. U dodiru s kožom je otrovan i uzrokuje teške opekline, dok ju glikosal „samo“ nadražuje te može izazvati alergijsku reakciju na koži. Formaldehid uzrokuje teške ozljede oka, a glikosal njegovo jako nadraživanje. Pri udisaju, formaldehid je otrovan, dok je gliksal štetan. Također, formaldehid je karcinogena kemikalija.





Tablica 4. Usporedba opasnosti glioksala i formaldehida

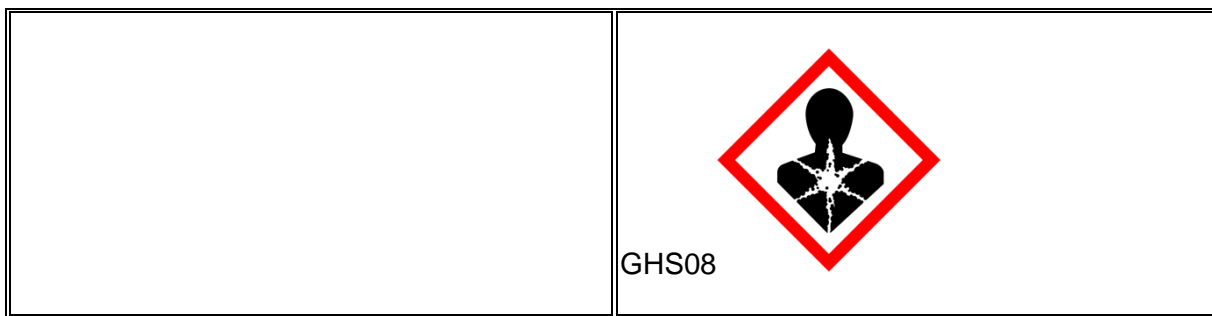
Oznake upozorenja	Gliksal CAS 107-22-2	Formaldehid CAS 50-00-0
H301 Otrovnost ako se proguta		+
H311 Otrovnost u dodiru s kožom		+
H314 Uzrokuje teške opekline kože i ozljede oka		+
H315 Nadražuje kožu	+	
H317 Može izazvati alergijsku reakciju na koži	+	+

H319 Uzrokuje jako nadraživanje oka	+	
H331 Otrovno ako se udiše		+
H332 Štetno ako se udiše	+	
H341 Sumnja na moguća genetska oštećenja	+	+
H350 Može uzrokovati rak		+

Oznaka opasnosti za glioksal je „Upozorenje“, dok je oznaka opasnosti za formaldehid „Opasnost“, a u Tablici 5. prikazani su odgovarajući piktogrami opasnosti.

Tablica 5. Usporedba piktograma opasnosti za formaldehid i glioksal

Glioksal CAS 107-22-2	Formaldehid CAS 50-00-0
 GHS07	 GHS06
 GHS08	 GHS05



Prema piktogramima opasnosti prikazanima u Tablici 5., vidljiva je veća opasnost formaldehida prema glioksalu.

Iako 10 %-tna otopina formalina, koja kao takva dolazi krajnjem korisniku, pokazuje manju štetnost pri upotrebi, treba uzeti u obzir i djelatnike koji rade s 37 %-tnom otopinom formaldehida (koncentriranom otopinom) koja pokazuje opasnosti navedene u Tablici 4. To su djelatnici u proizvodnji, a i neki krajnji korisnici.

TWA vrijednost za formaldehid iznosi 0,75 ppm, STEL vrijednost iznosi 2 ppm, CL vrijednost iznosi 0,3 ppm za vrijeme od 15 min prema konferenciji industrijskih higijeničara ACGIH, dok prema institutu NIOSH ta koncentracija iznosi 0,1 ppm. IDLH vrijednost za formaldehid iznosi 20 ppm. Formaldehid doprinosi najvećoj opasnosti za djelatnike u laboratoriju, što zbog opasnih svojstava koje posjeduje, što zbog količine koja je zastupljena u radu. Formaldehid je otrovan u slučaju gutanja i pri udisanju, a ciljani organski sustav na koji djeluje je respiratorni sustav. Formaldehid je klasificiran kao karcinogena kemikalija. Korozivan je za većinu metala. Svim radnicima koji su izloženi djelovanju formaldehida razina izloženosti trebala bi biti praćena periodično. Rukavice od lateksa gotovo su bezvrijedne kao zaštitna oprema. Nitrilne rukavice su pokazale bolja zaštitna svojstva, ali nisu učinkovite pri dugotrajnom izlaganju. Korišteni formaldehid je moguće reciklirati postupkom destilacije, a u nekim državama dopušteno je ispuštanje u odvod ograničene količine. [24]

Osnovne toksikološke i ekotoksikološke značajke glioksala i formaldehida prikazane su u Tablici 6. [25]

Tablica 6. Usporedba toksikoloških i ekotoksikoloških značajki glioksala i formaldehida

Toksikološke i ekotoksikološke značajke	Glioksal CAS 107-22-2	Formaldehid CAS 50-00-0
LD50 oralno štakor	200 mg/kg	100 mg/kg
LD50 dermalno zec	12700 mg/kg	292 mg/kg
LC50 ribe (96 sati)	215 mg/l	52,5 mg/l

Iz Tablice 6. može se vidjeti da grupe testnih organizama slabije reagiraju na glioksal, odnosno koncentracije koje uzrokuju smrtnost 50 % populacije veće su nego kod formaldehida kao ispitivanog toksikanta.

3.9.2. Alifatski ugljikovodici umjesto ksilena

Zamjena za ksilen najčešće je alifatski ugljikovodik. Alifatski ugljikovodici postoje u obliku dugačkih i kratkih lanaca, a razlikuju se prema broju ugljikovih atoma u lancu. [24] Nemaju benzenski prsten, za razliku od aromatskih ugljikovodika (ksilena).

TWA vrijednost za ksilen iznosi 100 ppm, STEL vrijednost iznosi 150 ppm, IDLH vrijednost za ksilen iznosi 900 ppm, a biološka granična vrijednost iznosi 1,5 g metil-hipurne kiseline na 1 gram kreatinina na kraju radne smjene. Djeluje nadražujuće za kožu i oči. Ponavljajuće izlaganje može prouzročiti neurotoksične učinke (oslabljeno pamćenje, loša koordinacija, promjene raspoloženja pa i trajno oštećenje živaca).

Alifatski ugljikovodici koji se koriste za prosvjetljavanje prilikom obrade tkiva imaju prosječnu TWA vrijednost od 196 ppm (ksilen ima TWA 100 ppm). Toksičnost im je izrazito mala. Ne pokazuju nadražujuća svojstva i ne izazivaju preosjetljivost na normalnu ljudsku kožu. Gorivi su (40 °C) ili zapaljivi (plamište je 24 °C). Kao zaštitna oprema dovoljne su neoprenske ili nitrilne rukavice. Alifatski ugljikovodici nemaju miris, za razliku od ksilena koji ima specifičan neugodan miris za čovjeka. Često se nazivaju naftnim destilatima i pokazuju manju



toksičnost od većine otapala. Što se tiče zbrinjavanja iskorištenih alifatskih ugljikovodika kao reagensa za prosvjetljavanje uzorka tkiva, mogu se reciklirati uz pomoć frakcijske destilacije ili paliti kao dodatak za gorivo. [24] U nastavku je prikazana Tablica 7. prema kojoj se mogu vidjeti opasna svojstva ksilena. Alkani, C11-15-izo (alifatski ugljikovodici) nisu razvrstani kao opasne kemikalije te se u ovom slučaju predlaže zamjena opasne s neopasnom kemikalijom (dok se u slučaju formaldehid/glioksal predložila zamjena opasne s manje opasnom kemikalijom).

Tablica 7. Usporedba oznaka upozorenja ksilena i alifatskih ugljikovodika

Oznake upozorenja	Ksilen CAS 1330-20-7	Alkani, C11-15-izo CAS 90622-58-5
H226 Zapaljiva tekućina i para	+	Nije razvrstano kao opasna kemikalija prema Uredbi (EZ) br. 1272/2008.
H312 Štetno u dodiru s kožom	+	
H315 Nadražuje kožu	+	
H332 Štetno ako se udiše	+	

Nadalje, u Tablici 8. prikazani su piktogrami opasnosti za ksilen. Oznaka opasnosti za ksilen je „Upozorenje“.

Tablica 8. Usporedba piktoograma opasnosti ksilena i alifatskih ugljikovodika

Ksilen CAS 1330-20-7	Alkani, C11-15-izo CAS 90622-58-5
 GHS07	Nije razvrstano kao opasna kemikalija prema Uredbi (EZ) br. 1272/2008.
 GHS02	

Toksikološke i ekotoksikološke značajke ksilena, odnosno LD50 i LC50 prikazane su u Tablici 9. [25] Ako bi se usporedila LC50 koncentracija ksilena s LC50 koncentracijama glioksala i formaldehida (glioksal – 215 mg/l, formaldehid – 52,5 mg/l), može se uočiti da ksilen pokazuje najveću toksičnost od te tri kemikalije.

Tablica 9. Usporedba toksikoloških i ekotoksikoloških značajki ksilena i alifatskih ugljikovodika

Toksikološke i ekotoksikološke značajke	Ksilen CAS 1330-20-7	Alkani, C11-15-izo CAS 90622-58-5
LD50 oralno štakor	4300 mg/kg	Nema podataka
LD50 dermalno zec	> 1700 mg/kg	
LC50 ribe (96 sati)	15,7 mg/l	

3.10. Etilni alkohol


Etanol ili etilni alkohol se u obradi tkiva u patohistologiji koristi za dehidraciju, odnosno za zamjenu vode iz tkiva organskim otapalom.

Etilni alkohol je lako zapaljiv. Pri udisanju, može doći do iritacije gornjeg dišnog sustava (osjećaja žarenja, iritacije). Moguća je pojava simptoma koji djeluju na središnji živčani sustav, poput glavobolje, vrtoglavice pa sve do gubitka svijesti pri izloženosti većim koncentracijama. Nakon dodira s kožom, etilni alkohol uzrokuje odmašćivanje i suhoću kože. Zbog prskanja tekućine u oči, može doći do osjećaja nelagodnosti, žarenja, crvenila konjunktiva te lezije površine rožnice. Nakon gutanja, može također doći do jakog osjećaja žarenja, poremećaja u središnjem živčanom sustavu, poput glavobolje, vrtoglavice, intoksikacije pa sve do gubitka svijesti pri izloženosti većim koncentracijama. Ako su u etilnom alkoholu prisutni denaturanti, moguća je pojava probavnih smetnji i povraćanja.

TWA vrijednost za etanol iznosi 1000 ppm, što je daleko više od TWA vrijednosti za formaldehid i ksilen (formaldehid – 0,75 ppm, ksilen – 100 ppm). Toksična svojstva nisu poznata pri korištenju etilnog alkohola u patohistološkom laboratoriju. Reciklirati je moguće pomoću postupka destilacije. [24]

U Tablici 10. prikazana su opasna svojstva etilnog alkohola. Oznaka opasnosti za etilni alkohol je „Opasnost“.

Tablica 40. Opasna svojstva etilnog alkohola, CAS 64-17-5

Oznaka upozorenja	Piktogram opasnosti
H225 Lako zapaljiva tekućina i para	 GHS02

3.11. Recikliranje

Jedan od korisnih načina za kontrolu opasnih kemikalija je postupak recikliranja, kojim se mogu smanjiti količine kemikalija pri proizvodnji, kupovini, skladištenju i zbrinjavanju. Mnoge kemikalije koje se koriste u patohistologiji, kao što su etilni alkohol, formalin i ksilen mogu se reciklirati do zadovoljavajuće kvalitete uz pomoć odgovarajuće opreme. Zbog velikog volumnog udjela tih kemikalija u obradi tkiva, nije zanemariva ni činjenica da bi se recikliranjem dugoročno i uštedjelo.

Oprema za destilaciju već se koristi u mnogim laboratorijima u svijetu za recikliranje alkohola, ksilena i formalina. Koristeći frakcijsku destilaciju, komponenta s najvišom točkom vrenja bit će pročišćena. Prednosti takvog načina rada su:

- smanjeni troškovi
- brzina postupka
- učinkovitost postupka
- otklanjanje potrebe zbrinjavanja kemikalija preko poduzeća za odlaganje otpada
- otklanjanje potrebe za slanjem kemikalija opasnih za okoliš na odlagališta za zbrinjavanje.

3.11.1. Recikliranje formalina

Formalin je smjesa hlapljivog formaldehida i nehlapljivih soli u vodenoj otopini ili otopini vode i etanola (mala količina metanola za stabiliziranje otopine može se zanemariti). Otopina formaldehida na kraju obrade tkiva također sadrži otopljene i krute komponente od uzoraka tkiva. Procesom jednostavne destilacije, voda i formaldehid se odvoje od ostalih sastojaka. Kako su se destilacijom uklonili nepoželjni sastojci, uklonili su se i oni korisni, a to su soli koje otopini osiguravaju potreban pH. Međutim, dobivena otopina formaldehida može se ispitati jednostavnim testom i po potrebi podesiti na odgovarajuću kvalitetu, odnosno u otopinu se mogu dodati potrebne soli za puferiranje.

Otapala bi se trebala frakcijski destilirati jer su neka onečišćenja u otpadu hlapljiva. Jednostavnom destilacijom neće se odvojiti sva onečišćenja pa bi konačna otopina mogla sadržavati neprihvatljivu količinu vode.

Najčešći problem dobre opreme za destilaciju je neugodan miris amina koji se osjeća u recikliranom proizvodu. Taj miris dolazi od deaminacije proteina u otpadu tijekom destilacije. Oslobođeni amini lako isparavaju, zajedno s ostalim hlapljivim komponentama. Ako se unutrašnjost opreme održava besprijekorno čistom, ovaj problem će se vjerojatno uspjeti izbjeći. Formalin koji je izrazito „obogaćen“ proteinima iz krvi (npr. kod fiksiranja uzorka posteljice) trebao bi se pomiješati s „manje krvavim“ otpadnim formalinom. Otpadne otopine u kojima su ostaci tkiva ili koaguliranih proteina trebale bi se filtrirati prije obrade destilacijom. U Americi su provedeni pokusi na velikoj količini otpadnog formalina iz različitih bolnica. Iz dobivenih rezultata dalo se zaključiti da je reciklirani proizvod relativno konstantne koncentracije te je dobiven u visokom prinosu. Daljnja istraživanja omogućila su razvitak postupka za recikliranje formalina za ponovnu uporabu koji počinje postavljanjem do 19 litara filtriranog ili nefiltriranog formalina u odgovarajuću posudu opreme za destilaciju Pureform 2000[®]. Posuda se automatski puni s 9,5 litara otpada, a hladilo se pokreće kada se plamenik upali. Destilacija se provodi do temperature od 108 °C. Kada je ta temperatura postignuta, grijanje prestaje i preostala tekućina u posudi za destilaciju hladi se do temperature od 52 °C i zatim odbaci kao otpad. Posuda se potom dopuni sa sljedećom serijom iskorištenog formalina od 9,5 litara. Laboratoriji koji su koristili ovakav način obrade iskorištenog formalina, uspjeli su dobiti 80 % recikliranog formalina s konstantnim udjelom formaldehida u otopini. Destilat je zatim puferiran. Treba naglasiti da se praćenjem kvalitete zraka prilikom ovog skoro potpuno automatskog postupka dalo zaključiti da nije bilo otpuštanja formaldehida izvan sustava. [26]

3.11.2. Recikliranje ksilena

Otpadni ksilen sadrži vodu, alkohol, biološke materijale i parafin koji se moraju ukloniti prije ponovne uporabe ksilena. Udio tih nečistoća uvelike se razlikuje od laboratorija do laboratorija.

Provedena je anketa o otpadnom ksilenu s više od 200 laboratorija u američkim bolnicama koje su koristile uređaje za destilaciju i koji su sudjelovali u programu kontrole kvalitete

dobivenih uzoraka plinskom kromatografijom, u kojem je šest uzoraka analizirano 3 puta godišnje. Najbolji rezultat dobiven je uređajem za destilaciju uz pomoć kojeg je dobiveno 94 % recikliranog ksilena koji je kvalitetom u potpunosti odgovarao nerekicliranom. [26]

Gibbs [26] je proveo procjenu rizika za okoliš vezano za recikliranje etanola i ksilena u velikim količinama. Koristeći standardne metode Agencije za zaštitu okoliša (EPA- *Environmental Protection Agency*) za skupljanje i analizu uzoraka, zaključio je da su koncentracije otpuštenih otapala tijekom postupka recikliranja značajno ispod granice opasnosti za zdravlje čovjeka te da je opasnost od požara smanjena.

3.11.3. Recikliranje etanola

Otpadni etilni alkohol sadrži vodu, biološke materijale, proteine, boje. Navedene nečistoće moraju se ukloniti kako bi se etanol mogao ponovno uporabiti. Kada se takva smjesa destilira, dobije se približno 95:5 azeotropna smjesa etanola i vode. Također je provedeno ispitivanje u istim laboratorijima kao i u slučaju recikliranog ksilena te je plinskom kromatografijom rađena analiza početnog otpada i dobivenog azeotropa. Dobiveni podaci prikazuju visoki udio recikliranog proizvoda (93 %) i visoku čistoću recikliranog otapala. Tako dobivena azeotropna smjesa omjera 95:5 (etanol:voda) prikladna je za ponovnu uporabu u postupcima patohistološke obrade tkiva, kao i drugim postupcima koji zahtijevaju etilni alkohol visoke čistoće. Ukoliko se koristi denaturirani alkohol koji je onečišćen metanolom i izopropanolom, recikliranjem se također dobije visoko kvalitetan proizvod koji sadrži smjesu etanola/metanola/izopropanola u omjeru od približno 90:5:5 te mali udio vode. Plinskom kromatografijom također je analiziran dobiven proizvod i potvrđena je njegova zadovoljavajuća kvaliteta. [26]

3.12. Zaštita okoliša za bolje sutra

Kako bi se primjenom zamjenskih IVD dijagnostičkih sredstava u proizvodnji i upotrebi zaštitilo ljudsko zdravlje, tako bi se odlaganjem najčešće korištenih IVD dijagnostičkih sredstava mogao zaštititi i okoliš. Naime, mogle bi se pokrenuti potrebne mjere za prevenciju

zagađenja, smanjivanje, uporabu te recikliranje otpada, kao što se od 2012. godine tome posvetio laboratorij patologije u Seattle – CellNetix. Od 2012. godine CellNetix je svoj rad posvetio sprečavanju zagađenja, smanjenju, ponovnoj uporabi i recikliranju otpada.

Kao rezultat plana prevencije zagađenja i tehničke pomoći Odjela za ekologiju, CellNetix procjenjuje da je uštedio 180.000 \$ godišnje. U tome su uspjeli na način da su provodili politiku recikliranja na licu mjesta (a ne odvožnje otpada), pronalaska korisnog načina iskorištavanja otpadnog materijala i mijenjanja nekih kupovnih navika. Voditelj sigurnosti laboratorija CellNetix rekao je da se globalno mora shvatiti da rješenja koja se mogu pronaći mogu biti i od socijalnog i etičkog interesa, a pritom se može i uštedjeti. [27]

Recikliranjem, odnosno ponovnom uporabom, CellNetix je uspio nadoknaditi 407 galona (oko 1800 litara) ksilena i 522 galona (oko 2000 litara) etanola u prvih 7 mjeseci 2012. godine. Od siječnja do srpnja 2012. godine recikliranjem otapala tvrtka je uštedjela više od 4600 \$.

Djelatnici laboratorija patologije CellNetix su tijekom 2011. godine fiksirali više od 219.500 uzoraka tkiva koristeći formalin kao fiksativ. Većina formalina je nakon upotrebe bila toliko onečišćena da ju je teško bilo ponovno uporabiti. Ipak, CellNetix je od otpadnog formalina recikliranjem uspio dobiti dovoljno pročišćen formalin u količini od 539 galona (oko 2000 litara). Od siječnja 2012. do srpnja 2012. godine reciklirani formalin je tvrtki uštedio više od 2500 \$. [27]

CellNetix je uspio smanjiti količine iskorištene otpadne ambalaže, količine korištenog goriva, a time je i uštedio. Patohistološki laboratoriji koriste velike količine formalina pri čemu se ne može reciklirati jednaka količina. Uobičajena praksa u industriji je neutralizacija iskorištenog formalina prije ispuštanja u otpad. [27]

3.12.1. Smanjenje plastične ambalaže

2011. godine CellNetix je uočio veliki problem kada se radi o plastičnoj otpadnoj ambalaži. Uvođenjem kupovine formalina, alkohola i ksilena u kontejnerima za višekratnu upotrebu

smanjila se potrebna količina plastične ambalaže, a time i plastični otpad (za jednokratnu upotrebu). To je ujedno bila i ušteda goriva jer je smanjen broj pošiljki. [27]

Sve prethodno navedene promjene dovele su do smanjenja zagađenja i količine otpada, a ujedno i smanjenja troškova.

3.13. Zbrinjavanje opasnog otpada

Pravilnim programom prevencije onečišćenja moglo bi se doći do manje količine otpada koju bi trebalo zbrinuti. Sva tri proizvoda koja se koriste u najvećim količinama (formalin, ksilen i alkohol) mogla bi se reciklirati. Formalin bi se mogao zamijeniti s učinkovitim fiksativima na bazi glioksala, koji bi se mogli ispuštati u odvod zbog svoje biorazgradivosti i niske toksičnosti za vodene organizme.

Različite vrste otpada ne bi se trebale miješati, trebalo bi ih držati odvojenima. Također, bitna su svojstva otpada, poput zapaljivosti, topljivosti u vodi, otrovnosti. Svaki od ovih faktora utječe na odabir pravilnog odlaganja. Najbolji način odlaganja je ispustiti otpad kroz sanitarni odvod, nakon čega bi se trebao tretirati na odgovarajući način prije ispuštanja u okoliš.

Formaldehid je lako biorazgradiv. Gotovo svi organizmi imaju enzim formaldehid dehidrogenazu koja razgrađuje tu kemikaliju, samo treba paziti da ulazi u sustav dovoljno polagano kako voda bila konstantno razrijeđena ispod koncentracije toksičnosti. Velika količina otrovne kemikalije ne smije se odjednom ispustiti u vodovod. Isto tako, ne smije se ni ispustiti s velikom količinom vode, već polaganim ispuštanjem razrjeđivati vodom, tako da granica toksičnosti bude u dozvoljenim vrijednostima. U suprotnom, biorazgradljivost se može smanjiti ako se s kemikalijom rukuje na pogrešan način. [7]

4. RASPRAVA

Kako je gospodarenje otpadom definirano kao skup aktivnosti usmjerenih na sprječavanje i smanjivanje količine otpada, prijedlozi za smanjenje količine otpada koji su izneseni u ovom radu, prepoznati su kao učinkovito gospodarenje otpadom. U radu je spomenuta i velika nesreća koja je definirana preko Zakona o zaštiti okoliša RH, što se ne može dogoditi kod krajnjih korisnika patohistoloških reagensa, ali moguće je da se dogodi kod proizvođača takvih otopina u trenutku proizvodnje, a i pri skladištenju.

Otpad čija se vrijedna svojstva mogu iskoristiti mora se oporabiti, a dužnost proizvođača proizvoda, a time i proizvođača otpada, je da se kupcu i/ili korisniku proizvoda osigura mogućnost povrata uporabljenih proizvoda, odnosno ambalaže koja se nakon odgovarajuće obrade može ponovno uporabiti, kako kaže Zakon o otpadu. Proizvođač proizvoda od kojega potječe otpad odgovoran je za odabir rješenja najprihvatljivijeg za okoliš, prema svojstvima proizvoda i tehnologiji proizvodnje. Upravo dijelu te tematike posvećen je ovaj rad, a stavke iz Zakona navedene su kako bi se ustanovilo koje je predloženo postupanje s otpadom na razini države. Smatra se da bi od proizvođača trebala krenuti inicijativa sa svrhom edukacije krajnjih potrošača. Ako je po svojstvu proizvoda moguće, trebao bi se naći način kojim je moguće proizvod, pa i njegovu ambalažu, ponovno uporabiti i reciklirati. Također, u Zakonu je navedeno da su proizvođači dužni kupcu i/ili korisniku proizvoda osigurati mogućnost povrata uporabljenih proizvoda, odnosno ambalaže koja se nakon odgovarajuće obrade može ponovno uporabiti.

Neodgovarajuće gospodarenje otpadom jedan je od najvećih problema zaštite okoliša u Hrvatskoj. Iz podataka o nastalom opasnom medicinskom otpadu, odnosno kemijskom otpadu i uzevši u obzir podatke da:

a) je jedino postrojenje za termičku obradu opasnog otpada PUTO-Zagreb zatvoreno od 2002. godine te

b) da samo dvije bolnice (KBC Dubrava i KBC Vinkovci) u Republici Hrvatskoj imaju vlastitu, internu spalionicu opasnog medicinskog otpada koja zadovoljava ekološke standarde propisane prema direktivi Europske komisije,

može se zaključiti da infrastruktura koja bi trebala zbrinuti sav opasan otpad nije dostatna. To govori i o lošem gospodarenju otpadom. Neučinkovito postupanje s otpadom negativno se odražava na čitav okoliš, na vodu, zrak, more, tlo, klimu te na ljudsko zdravlje i drugi živi svijet. Potencijalno najveće štetno djelovanje može izazvati otpad, odnosno opasne kemikalije koje su u skladištu proizvođača u velikim količinama i u koncentriranim udjelima. Svakako bi trebalo razmisliti i o traženju financijske potpore iz EU fondova sa ciljem boljeg očuvanja zdravlja čovjeka i okoliša.

Ovaj rad bavi se potragom za manje opasnim kemikalijama koje bi zamijenile one koje se u najvećoj količini koriste u patohistologiji. Nekada je uobičajeno bilo koristiti živin klorid kao sastavni dio fiksativa. Premda su takvi fiksativi dali izvrsno fiksirana tkiva, korištenje tadašnjih reagensa bilo je izrazito štetno za okoliš i za zaposlenike koji su bili u doticaju s njima. Živin klorid je otrovan ako se proguta, uzrokuje teške opekline kože i ozljede oka, uzrokuje oštećenje organa te je vrlo otrovan za vodeni okoliš s dugotrajnim učincima. Živin klorid više se ne koristi u sredstvima za fiksiranje tkiva. Uvedeni su zamjenski reagensi zadovoljavajuće kvalitete za provođenje uspješnog tretiranja uzorka.

Ako bi se krajnji korisnici ovakvih proizvoda educirali o kvaliteti i manjoj štetnosti ili neštetnosti proizvoda koje koriste u svakodnevnom radu, potražnja bi bila veća. Posljedično, kada bi potražnja za manje štetnim proizvodima bila veća, zaposlenici u proizvodnim tvrtkama bili bi u sve manjem doticaju s opasnim kemikalijama. Određene kemikalije mogle bi se ponovno uporabiti, čime bi se smanjila količina kemijskog otpada. Osobna zaštita trebala bi biti krajnji izbor. Trebao bi se pokušati naći najbolji mogući način za kontrolu rada, kao što je uklanjanje, smanjivanje i recikliranje korištenih kemikalija. Mnoge države diljem svijeta već koriste nove reagense umjesto formaldehida i ksilena.

U ovom radu predlaže se ponovna uporaba, odnosno recikliranje formalina, ksilena i etilnog alkohola. To ne znači smanjenje količine pri upotrebi, već smanjenje količine pri skladištenju i

odlaganju gdje se zapravo i nalazi najveća koncentracija takvih kemikalija. Time bi rizik od nastanka jednog nepovoljnog događaja bio smanjen. Uostalom, u Zakonu o otpadu navedena je činjenica da „Ako se nastajanje otpada ne može izbjeći niti smanjiti, otpad se mora ponovno koristiti – reciklirati i/ili oporabiti.“.

Dva su pravca kojima se može krenuti. Jedan pravac je početi koristiti nove reagense, manje opasne za ljudsko zdravlje i okoliš, a drugi pravac je postojeće reagense početi reciklirati. Ambalažu bi, u svakom slučaju, trebalo smanjiti jer korištenjem ona postaje opasni otpad. Može se ponovno uporabiti, a proizvod je moguće pakirati u veće volumene. Kako bi se primjenom novih reagensa u patohistološkoj dijagnostici u proizvodnji i upotrebi zaštitilo ljudsko zdravlje, tako bi se i recikliranjem zaštitio i okoliš.

5. ZAKLJUČI

Prema iznesenim činjenicama temeljenim na najnovijim objavljenim tekstovima, može se zaključiti:

- 1) Formalin kao najčešće korišten fiksativ trebao bi se zamijeniti otopinom za fiksiranje na bazi glioksala. Glioksal zbog svojih manje opasnih svojstava, a jednako zadovoljavajućih rezultata fiksiranog tkiva, pruža manju opasnost za čovjeka i okoliš.
- 2) Ksilen za prosvjetljavanje uzorka tkiva mogao bi se zamijeniti jednako učinkovitim alifatskim ugljikovodicima kao što su to alkani, C11-15-izo, koji nisu svrstani u opasne kemikalije prema Uredbi (EZ) br. 1272/2008.
- 3) Formalin, ksilen i etilni alkohol mogli bi se reciklirati postupkom destilacije uz pomoć uređaja za tu namjenu. Izvršena je analiza kvalitete dobivenih recikliranih proizvoda, pri čemu se uspjelo dobiti 80 % recikliranog formalina s konstantnim udjelom formaldehida u otopini, 94 % recikliranog ksilena i 93 % recikliranog etilnog alkohola, koji su kvalitetom odgovarali nerecikliranom otpadu. Time bi se smanjila količina opasnih kemikalija pri skladištenju i odlaganju te u proizvodnim pogonima gdje zaposlenici dolaze u dodir s koncentriranim formalinom, ksilenom i etilnim alkoholom.
- 4) Ambalaža u kojoj se nalaze formalin, etanol ili ksilen, također se ne bi trebala odbaciti, već bi se mogla ponovno uporabiti. Mogu se koristiti veći spremnici za višekratnu uporabu pri čemu bi se smanjila količina otpada, odnosno ambalaže za jednokratnu uporabu. Radnici u proizvodnji dolazili bi u kraći kontakt s opasnom kemikalijom jer ju ne bi trebali pretakati u manju ambalažu. Po završetku proizvodnje koja se može odvijati u samim spremnicima za višekratnu uporabu, tako pripremljen spremnik mogao bi se dostaviti krajnjem korisniku. Nakon što bi sva količina kemikalija iz spremnika bila iskorištena, spremnik bi se mogao ponovno uporabiti u proizvodnom procesu.

6. LITERATURA

1. Carson FL. Histotechnology: a self-instructional text. 2nd ed. Chicago: ASCP Press; 1977.
2. Luna LG. Histopathologic methods and color atlas of special stains and tissue artifacts. Downers Grove: Johnson Printers; 1992.
3. Sheehan DC, Hrapchak B. Theory and practice of histotechnology. 2nd ed. St Louis: CV Mosby; 1980.
4. Zakon o kemikalijama (NN 173/03, 187/04, 79/05, 150/05, 53/08, 49/11, 18/13)
5. Pravilnik o razvrstavanju, označavanju, obilježavanju i pakiranju opasnih kemikalija (NN 23/08, 64/09, 113/10, 64/11, 137/11, 63/12, 71/12)
6. Yoe C. Principles of risk analysis: Decision making under uncertainty. CRC Press; 2011.
7. Bancroft JD. Theory and Practice of Histological Techniques. Elsevier Health Sciences; 2008.
8. Powers Donald M. Laboratory quality control requirements should be based on risk management principles. Labmedicine 2005;36:633-8.
9. Zakon o zaštiti okoliša (NN 82/94, 128/99, 110/07, 80/13)
10. Zakon o otpadu (NN 151/03, 178/04, 153/05, 111/06, 60/08, 87/09)
11. Strategija gospodarenja otpadom Republike Hrvatske (NN 130/05)
12. Pravilnik o gospodarenju medicinskim otpadom (NN 72/07)
13. Singer SJ. The properties of proteins in nonaqueous solvents. Adv Protein Chem 1962;17:1-68.
14. Kok LP, Boon ME. Microwaves for the art of microscopy. Leyden: Coulomb Press; 2003.
15. Leong AS-Y. Microwave technology for light microscopy and ultrastructural studies. Bangkok: Milestone; 2005.
16. McGhee JD, von Hippel PH. Formaldehyde as a probe of DNA structure: Reaction with exocyclic amino groups of DNA bases. Biochemistry; 1975;14:1281-96.

17. McGhee JD, von Hippel PH. Formaldehyde as a probe of DNA structure: Reaction with endocyclic imino groups of DNA bases. *Biochemistry*; 1975;14:1297-303.
18. McGhee JD, von Hippel PH. Formaldehyde as a probe of DNA structure: Equilibrium denaturation of DNA and synthetic polynucleotides. *Biochemistry*; 1977;16:3267-76.
19. McGhee JD, von Hippel PH. Formaldehyde as a probe of DNA structure: Mechanism of the initial reaction of formaldehyde with DNA. *Biochemistry*; 1977;16:3276-93.
20. Means GE, Feeney RE. Reductive alkylation of proteins. *Anal Biochem*; 1995;224:1-16.
21. Bayliss High OB, Lake B. Lipids. U: Bancroft JD, Stevens A, ur. Theory and practice of histological techniques. Edinburgh: Churchill-Livingstone; 1996;213-42.
22. Cotham WE, Metz TO, Ferguson PL. Glyoxal fixation: how it works and why it only occasionally needs antigen retrieval. *Biotech Histochem* 2007;82:161-6.
23. Shi SR, Taylor CR. Antigen Retrieval Immunohistochemistry Based Research and Diagnostics. John Wiley & Sons; 2011, str. 201-14.
24. Reinhardt PA, Leigh Leonard K, Ashbrook PC. Pollution Prevention and Waste Minimization in Laboratories. CRC Press; 1996, str. 341-75.
25. IFA, Institut für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung: Database on hazardous substances. Available at: <http://www.dguv.de/ifa/Gefahrstoffdatenbanken/GESTIS-Stoffdatenbank/index-2.jsp>. Accessed October 6, 2013.
26. Gibbs LM. Environmental risk factors in solvent recycling. *Am Clin Prod Rev* 1983.
27. Department of Ecology, State of Washington: Pollution Prevention. Available at: <http://www.ecy.wa.gov/ecyhome.html>. Accessed September 29, 2014.
28. Bradamante Ž, Kostović-Knežević Lj, Švajger A. Osnove histologije. Školska knjiga; 1999.
29. Diapath, Total anatomic pathology lab solution: Products. Available at: <http://www.diapath.com/prodotti.aspx>. Accessed December 27, 2014.
30. ECHA, European Chemicals Agency: C&L Inventory database. Available at: <http://echa.europa.eu/>. Accessed January 6, 2015.

31. Fraenkel-Conrat H, Brandon BA, Olcott HS. The reaction of formaldehyde with proteins: Participation of indole groups; Gramacidin. *J Biol Chem* 1947;168:99-118.
32. Fraenkel-Conrat H, Cooper M, Olcott HS. The reaction of formaldehyde with proteins. *J Am Chem Soc* 1945;67:950-4.
33. Fraenkel-Conrat H, Mecham DK. The reaction of formaldehyde with proteins: Demonstration of intermolecular cross-linking by means of osmotic pressure measurements. *J Biol Chem* 1949;177:477-86.
34. Fraenkel-Conrat H, Olcott HS. The reaction of formaldehyde with proteins: Cross-linking of amino groups with phenol, imidazole or indole groups. *J Biol Chem* 1948;174:827-43.
35. Fraenkel-Conrat H, Olcott HS. The reaction of formaldehyde with proteins: Cross linking between amino and primary amide or guanidyl groups. *J Am Chem Soc* 1948;70:2673-84.
36. Manuele FA. *On the practice of safety*. 4th ed. John Wiley & Sons; 2013.
37. Merck Millipore: Merck Chemicals. Available at: <http://www.merckmillipore.com/hr/chemicals>. Accessed January 2, 2015.
38. Plan gospodarenja otpadom u Republici Hrvatskoj za razdoblje 2007.-2015. godine (NN 85/07, 126/10, 31/11)
39. Plavšić F, Wolf-Čoporda A, Lovrić Z, Čepelak D, Siguran rad s kemikalijama. O-tisak, Zagreb; 2006.
40. Popis stručnih institucija koje imaju ovlasti za izdavanje izvješća o ispitivanju fizikalnih i kemijskih svojstava otpada (NN 51/96, 93/96)
41. Popov V, Brebbia CA. *Environmental Toxicology III*. WIT Press; 2010.
42. Pravilnik o ambalaži i ambalažnom otpadu (NN 97/05, 115/05, 81/08, 31/09, 156/09, 38/10, 10/11, 81/11, 126/11, 38/13, 86/13)
43. Pravilnik o gospodarenju otpadom (NN 23/07, 111/07, 23/14, 51/14)
44. Pravilnik o načinima i uvjetima odlaganja otpada, kategorijama i uvjetima rada za odlagališta otpada (NN 117/07, 111/11, 17/13, 62/13)
45. Pravilnik o načinu i uvjetima termičke obrade otpada (NN 45/07)

46. Pravilnik o uvjetima za postupanje s otpadom (NN 123/97, 112/01)
47. Pravilnik o vrstama otpada (NN 27/96)
48. Sigma-Aldrich: Products. Available at: <http://www.sigmaaldrich.com/technical-service-home/product-catalog.html>. Accessed December 27, 2014.
49. Solvent recycling: Histology Recycling. Available at: <http://www.solvent--recycling.com>. Accessed January 3, 2015.
50. Švob M. Histološke i histokemijske tehnike. „Svjetlost“, Izdavačko poduzeće Sarajevo; 1974.
51. University of Minnesota: Formalin Recovery in Healthcare Labs. Available at: <http://www1.umn.edu/twincities/index.html>. Accessed January 3, 2015.
52. Uredba o kategorijama, vrstama i klasifikaciji otpada s katalogom otpada i listom opasnog otpada (NN 50/05, 39/09)
53. Uredba o uvjetima za postupanje s opasnim otpadom (NN 32/98)
54. Vacca LL. Laboratory Manual of Histochemistry. New York: Raven Press; 1985.
55. Washington University in St. Louis, School of Medicine. Available at: <http://pathology.wustl.edu/research/cores/amp/index.php?page=Formalin%20Fixation>. Accessed October 6, 2013.
56. Zakon o održivom gospodarenju otpadom (NN 94/13)

7. POPIS SKRAĆENICA

ACGIH.....	Američka konferencija državnih industrijskih higijeničara (<i>American Conference of Governmental Industrial Hygienists</i>)
ALARA.....	Pristup smanjenju rizika onoliko koliko je to razumno moguće (<i>As Low As Reasonably Achievable</i>)
ALOP.....	Odgovarajuća razina zaštite (<i>Appropriate Level Of Protection</i>)
BEI.....	Biološke granične vrijednosti (<i>Biological Exposure Indices</i>)
CAS.....	Karakterističan broj otkrivenih tvari po međunarodnom popisu <i>Chemical Abstract Service</i>
CL ili CEV.....	Gornja granica izloženosti (<i>Ceiling Limit</i> ili <i>Ceiling Exposure Value</i>)
EPA.....	Agencija za zaštitu okoliša (<i>Environmental Protection Agency</i>)
GHS.....	Globalni harmonizirani sustav označavanja kemikalija (<i>Globally Harmonized System</i>)
IDLH.....	Koncentracija izloženosti kemikaliji koja je trenutno opasna po život ili zdravlje (<i>Immediately Dangerous to Life or Health</i>)
ISO 14971.....	Primjena upravljanja rizikom za medicinske proizvode (<i>International Organization for Standardization</i>)
IVD.....	<i>In vitro</i> dijagnostički (<i>in vitro diagnostic</i>)
LC50.....	Koncentracija toksikanta u testu koja je letalna za 50 % organizama (inhalacijski)
LD50.....	Doza toksikanta u testu koja je letalna za 50 % organizama (oralno, dermalno)
OSHA.....	Agencija za sigurnost i zdravlje na radu (<i>Occupational Safety and Health Administration</i>)
PEL.....	Dopuštena granica izloženosti (<i>Permissible Exposure Limit</i>)
PUTO.....	Pokretni uređaj za termičku obradu otpada
STEL ili STEV.....	Granica (ili vrijednost) kratkotrajne izloženosti (<i>Short-Term Exposure</i>)

Limit ili Short-Term Exposure Value)

TLR..... Prihvatljiva razina rizika (*Tolerable Level of Risk*)

TLV..... Prag graničnih vrijednosti (*Threshold Limit Value*)

TWA ili TWAEV... Prosječna koncentracija izloženosti ovisna o vremenu (*Time-Weighted Average ili Time-Weighted Average Exposure Value*)