

Citostatici - odgovoran i siguran rad - očuvano zdravlje i okoliš

Galić, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:206173>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-09**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Ivana Galić

**Citostatici – odgovoran i siguran rad – očuvano
zdravlje i okoliš**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2019.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Toksikologija Sveučilišta u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen stručnim vodstvom prof. dr. sc. Irene Žuntar.

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. sc. Ireni Žuntar na stručnom vodstvu, savjetima, uloženom vremenu i pomoći pri odabiru teme i same izrade ovog diplomskog rada.

Veliko hvala mojoj obitelji, bez vas ništa ne bi bilo moguće. Hvala na pruženoj prilici, svom strpljenju, podršci i ukazanom povjerenju.

Posebna zahvala svim posebnim ljudima u mom životu. Hvala što sam uvijek mogla računati na vas, bili ste mi oslonac, ispušni ventil i redovna doza smijeha i zabave te me poticali i gurali dalje kad je trebalo. Onima koje je fakultet donio u moj život, hvala i na tome što ste uvijek bili više od samo kolega, dali ste neopisivu vrijednost samom fakultetskom iskustvu i učinili mi zadnjih 5 godina nezaboravnima.

Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1. Farmaceutici u okolišu.....	3
1.2. Detekcija farmaceutika u okolišu.....	3
1.3. Citostatici	10
1.4. Podjela citostatika prema mehanizmu djelovanja	10
1.4.1. Alkilirajući spojevi.....	10
1.4.2. Antimetaboliti	11
1.4.3. Antitumorski antibiotici	12
1.4.4. Mitotički inhibitori.....	13
1.4.5. Inhibitori topoizomeraze	13
2. Obrazloženje teme.....	14
3. Materijali i metode	16
4. Rezultati i rasprava	18
4.1. Toksičnost citostatika i pravilno, sigurno rukovanje.....	19
4.2. Cytothreath.....	23
4.2.1. Ciljevi cytothreath projekta	24
4.2.2. Analitičke metode za citostatike	25
4.2.3. Učinak na vodene organizme	29
4.2.4. Učinak na biljne organizme.....	32
4.2.5. Procjena rizika za ljude	34
4.3. Uloga farmaceuta	34
5. Zaključci	37
6. Literatura.....	39
7. Sažetak	49
Summary	50
8. Temeljna dokumentacijska kartica/Basic documentation card	

1. Uvod

Terapija zloćudnih bolesti tijekom godina ima sve veći značaj jer je pojava navedenih bolesti sve učestalija. Prema strukturi uzroka smrti prema skupinama bolesti 2017. godine u Hrvatskoj, novotvorine zauzimaju čak drugo mjesto (www.hzjz.hr). Naime, produljenje životne dobi, veća izloženost onkogenim čimbenicima i promjene načina života s većom izloženosti stresu bitno doprinose povećanju broja oboljelih od malignih bolesti. Kao i za brojne druge bolesti, i za tumore postoji nekoliko načina liječenja koji najčešće uključuju kirurške zahvate, terapiju zračenjem i terapiju protutumorskim lijekovima. Ovim potonjima, vrlo aktivnim spojevima, zadaća je na različite načine zaustaviti rast ili diobu tumorskih stanica (Gerić i sur., 2017). U Republici Hrvatskoj anatomske terapijske kemijske (ATK) skupine Lijekovi za liječenje zloćudnih bolesti i imunomodulatori (L) se nalazi na prvom mjestu po financijskoj potrošnji u 2017. godini, a na 10. mjestu po ukupnoj potrošnji lijekova prema DDD/1000 stanovnika/dan po glavnim skupinama ATK klasifikacije (www.halmed.hr). Pojavnost svakog lijeka u okolišu izravno je povezana s intenzitetom njegove primjene, iz čega proizlazi da porastom primjene protutumorskih lijekova ili citostatika, raste i njihova prisutnost u okolišu. Koncentracije lijekova u okolišu su niske, ali to ne znači da rizik ne postoji, jer lijekovi su kemikalije dizajnirane da izazivaju biološke učinke upravo pri vrlo niskim dozama (Vrček, 2017). Zagađenje površinskih, podzemnih i pitkih voda lijekovima i njihovim razgradnim produktima predstavlja gorući ekološki problem. U otpadnim vodama, u rijekama, jezerima i morima, ali i u vodovodnim cijevima nalazi se čitavo skladište farmaceutskih proizvoda: antibiotici, kemoterapeutici, sedativi, analgetici, kontraceptivi, statini, veterinarski preparati i drugi (Richardson i Kimura, 2016). Pojam nova zagađivala podrazumijeva spojeve kojima se do sada nije pridavalo značenje kao zagađivalima i koji se sve više ispuštaju u okoliš u količinama koje bi mogle predstavljati potencijalnu opasnost za ekosustav te za koje ne postoji zadovoljavajuća zakonska regulativa o njihovom ispuštanju u okoliš. Jednu od najvažnijih skupina novih zagađivala predstavljaju farmaceutici i sredstva za osobnu higijenu. Navedena skupina obuhvaća velik broj kemijskih spojeva kao što su farmaceutici ili farmaceutski aktivne tvari koje se upotrebljavaju u humanoj i veterinarskoj medicini, sredstva za osobnu higijenu kao i sredstva koja se upotrebljavaju u kućanstvu u svrhu poboljšanja kvalitete svakodnevnog života (Periša i Babić, 2016). S obzirom da sami po sebi mnogi lijekovi iz navedenih skupina mogu imati mutageni, karcinogeni, teratogeni i/ili genotoksični učinak te iako se propisuju i koriste u nižim koncentracijama u odnosu na neke druge farmaceutike, zbog mehanizma djelovanja postavlja se napose pitanje njihovog učinka na okoliš i ljudsko zdravlje primjerice prilikom duljeg izlaganja njihovim ostacima, reziduama, iz dijelova okoliša (voda, tlo, zrak), ali i putem hrane (vode, namirnice životinjskog i biljnog podrijetla).

1.1. Farmaceutici u okolišu

U svakom kućanstvu postoji bar neki farmaceutski oblik što pokazuje podatak da svaki stanovnik Hrvatske za lijekove prosječno tijekom godine potroši 1.464 kuna (www.halmed.hr). Taj podatak je bitan kad uzmemo u obzir da farmaceutici u okolišu načešće završavaju na dva načina – odlaganjem i izlučivanjem. Razlozi za odlaganje takvog otpada mogu biti razni, od promjene u načinu doziranja, prekid korištenja zbog nuspojava ili pak zbog isteka roka trajanja. Zbog neznanja i neinformiranosti o zbrinjavanju farmaceutskog otpada, za lijekove korištene u kućanstvu, a i one koji potječu iz zdravstvenog sustava, odlaganje obično znači ispiranje niz odvod čime dospijevaju u okoliš putem vodenog medija (Jjemba, 2008). S druge strane, lijekovi koji u okoliš dospijevaju izlučevinama velikim dijelom podliježu i biotransformaciji pa se nalaze u različitim oblicima koji mogu biti više ili manje reaktivni od početne strukture lijeka. Prilikom procjene ponašanja i daljnje sudbine farmaceutika u okolišu važno je poznavanje njihovih fizikalno-kemijskih svojstava poput koeficijenta razdiobe oktanol/voda (Kov), koeficijenta razdiobe (Kd), konstante ionizacije (Kk) te koeficijenta sorpcije na organski ugljik (Koc). Navedena fizikalno-kemijska svojstva određuju sorpciju farmaceutika na tlo i sediment kao i njihovu sklonost abiotičkim ili biotičkim procesima razgradnje. Abiotički procesi razgradnje uključuju hidrolizu i fotolizu, dok biološka razgradnja podrazumijeva razgradnju farmaceutika bakterijama i gljivicama. Razgradni i transformacijski produkti mogu imati drugačija fizikalno-kemijska svojstva od početne molekule farmaceutika, a ima i slučajeva kada su produkti razgradnje toksičniji od početne molekule. Vrlo niske koncentracije farmaceutika i njihovih produkata razgradnje u kompleksnim uzorcima iz okoliša velik su problem prilikom njihove identifikacije i kvantitativnog određivanja (Periša i Babić, 2016).

1.2. Detekcija farmaceutika u okolišu

Za određivanje farmaceutika u okolišu uglavnom se primjenjuju plinska i tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) vezane sa spektrometrijom masa (MS) (Periša i Babić, 2016).

Plinska kromatografija (engl. *Gas chromatography*) podrazumijeva kromatografsku metodu gdje je mobilna faza plin i ona se uvijek provodi u koloni. Pod plinskom kromatografijom, GC, uobičajeno se podrazumijeva plinsko-tekućinska kromatografija (GLC) čiji temelj

funkcioniranja jeste razdjeljenje tvari između pokretne plinovite i nepokretne tekuće faze. Ona se provodi tako da se analizirani spojevi prevedeni u plinoviti oblik eluiraju pomoću plina kao pokretne faze uzduž kolone. Pokretna faza je sam plin nosač pa nema interakcija s analitom. Kod GC je longitudinalna difuzija izraženija nego u drugim kromatografijama. Razlog su daleko veći difuzijski koeficijenti u plinovima nego u tekućinama ($\sim 10^4$ puta) (Luterotti, 2014).

Kod GSC odjeljivanje se temelji na adsorpcijsko-desorpcijskom procesu između plinovite i čvrste faze. Tipične nepokretne faze čine anorganski adsorbensi kao npr. molekularna sita (Al-silikat), silika gel, diatomijske zemlje (silicijevi skeleti micelularnih algi koje sadrže 90% amorfne silicijeve kiseline) ali i porozni polimeri kao stiren-DVB kopolimerizati, aktivni ugljen ili teflon. Prednosti GSC pred razdjelnom GLC su široki radni temperaturni interval, stabilnost bazne linije, brzo uravnoteženje. Nedostaci su asimetrični pikovi koji nastaju zbog uskog linearnog područja adsorpcijske izoterme, duga vremena zadržavanja zbog velikih adsorpcijskih entalpija, heterogene površine i katalitičke aktivnosti mnogih adsorbenasa i ograničeni broj adsorpcijskih medija koje je teško standardizirati. GSC je važna za odjeljivanja plinova niskog vrelišta kao što su vodik, dušik, kisik, metan, CO₂, CO ili inertni plinovi, kao i lagani ugljikovodici, te u analizi plinova u zraku (Luterotti, 2014). Sustav za plinsku kromatografiju sastoji se od 6 glavnih komponenata, a čine ga: sustav za dopremu plinova, injektor, detektor, pećnica, kolona i sustav za obradu podataka. U većini slučajeva, injektor, detektor i pećnica su integralni dijelovi plinskog kromatografa, a kolona, plinski sustav i sustav za prikupljanje i obradu podataka djeluju zasebno (Rood, 2007). Primjena plinske kromatografije za analizu farmaceutika ograničena je zbog njihovih fizikalno-kemijskih svojstava poput polarnosti, nehlapljivosti i nestabilnosti pri povišenim temperaturama (Kostopoulou i Nikolaou, 2008).

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High performance liquid chromatography*, HPLC) je oblik kromatografije na stupcu koji se često koristi u analitičkoj kemiji (Malviya i sur., 2010; Bhardwaj i sur., 2015). Glavni cilj HPLC metode je separacija, identifikacija i kvantifikacija spojeva prisutnih u uzorcima koji su topljivi u tekućem mediju te separacija spojeva od nečistoća koje se mogu pojaviti kao posljedica reakcija razgradnje bioaktivnih komponenata (Bhardwaj i sur., 2015). Tekućinski kromatograf na kojem se može provesti opisana analiza sastoji se od sustava za unošenje uzorka, spremnika mobilne faze i sustava za obradu otapala (uklanjanje otopljenih plinova), crpki za visoke tlakove, kolone, detektora te spremnika za sakupljanje otpada. Otopina uzorka nanosi se na kolonu poroznog materijala, koja predstavlja stacionarnu fazu, ručnim ili automatskim injektorom tzv.

autosamplerom, dok se tekuća tj. mobilna faza crpi kroz kolonu pod povišenim tlakom. Vrijeme koje je potrebno mobilnoj fazi da prođe kroz kolonu označava se kao t_M . Kromatografska kolona zapravo je zatvorena cijev izrađena od nehrđajućeg čelika, koja je ispunjena nepokretnom odnosno stacionarnom fazom i u kojoj se usred različitih fizikalno-kemijskih interakcija odvija razdvajanje spojeva prisutnih u analiziranom uzorku. Mehanizam odjeljivanja ovisi o vrsti stacionarne faze, a može se temeljiti na: razdiobi, adsorpciji, ionskoj izmjeni, raspodjeli prema veličini čestica te stereokemijskim interakcijama. Vrijeme od injektiranja analita u tok mobilne faze do vremena kada pik analita izađe iz kolone i uđe u detektor naziva se vrijeme zadržavanja ili retencijsko vrijeme (R_t). Spojevi koji su eluirani iz kromatografske kolone detektiraju se primjenom specifičnih detektora kojima se utvrđuje promjena sastava eluenta mjerenjem nekog njegovog fizikalnog ili kemijskog svojstva. Postoji više vrsta detektora koji se mogu koristiti za detekciju eluiranih spojeva, a neki od njih su: spektrofotometrijski detektori koji rade na principu monokromatske ili polikromatske detekcije (detektor s nizom dioda); spektrofluorimetrijski (fluorescentni) detektori; detektori koji mjere indeks refrakcije (loma) svjetlosti (RI detektor), maseni spektrometar (MS) (Nigović i sur., 2007). HPLC koristi se za odjeljivanja i određivanja polarnih i nepolarnih spojeva u farmaceutskoj, biokemijskoj, forenzičkoj, kliničkoj i industrijskoj praksi. Npr. važna je primjena HPLC u ispitivanjima hrane, zraka, industrijskih procesnih i drugih otpadnih tekućina na prisustvo i sadržaj štetnih supstancija, npr. pesticida, polikloriranih bifenila ili policikličkih aromatskih ugljikovodika kao potencijalnih karcinogena i mutagena (Luterotti, 2014).

Tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti (engl. *ultra-performance liquid chromatography*, UPLC) novo je razdoblje tekućinske kromatografije. UPLC kolone punjene su znatno manjim česticama (1,7 – 1,8 μm) od HPLC kolona (3 – 10 μm) te UPLC za razliku od HPLC-a postiže tlakove do 1000 bara, dok je HPLC ograničen na 400 bara. Navedene promjene u tehnologiji instrumenta i kolona dovele su do značajnog povećanja razlučivosti, brzine i osjetljivosti tekućinske kromatografije (www.waters.com). Ultra-djelotvorna tekućinska kromatografija povezana s masenom spektrometrijom s hibridnom trostrukom četveropolnom-linearnom ionskom zamkom (engl. *Ultra-high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry with hybrid triple quadrupole-linear ion trap*, UPLC – QqLIT – MS / MS) spominje se u radu koji je za cilj imao istražiti pojavu lijekova u uzorcima sakupljenim iz izvora pitke vode te iz podzemnih, površinskih i otpadnih voda u Srbiji. Određivanje se provodilo istodobno za lijekove različitih terapijskih skupina, gdje je od

81 odabranog lijeka, 47 pokazalo široku rasprostranjenost u koncentracijskom rasponu od ng / L u uzorcima pitke vode, do više od 1 µg/L u uzorcima otpadnih voda (Petrović i sur.,2014).

Spektrometrija masa (MS) je analitička tehnika kod koje se nabijeni atomi ili molekule odvajaju s obzirom na njihov omjer mase i naboja (m/z). Spektrometar masa sastoji se od tri osnovna dijela: ionizatora, analizatora masa i detektora. Temelj svake masene spektrometrije je analizirati ione u plinovitoj fazi pod utjecajem električnog i/ili magnetskog polja. Spektrometrija masa se može koristiti za dobivanje podataka o strukturi molekule, a time posljedično i funkciju molekula šireg raspona masa. Između tekućinske kromatografije i spektrometra mase dolazi do otparavanja tekućine, ionizacije neutralnih molekula i uvođenje analita u analizator, drugim riječima dolazi do promjene faze, prevođenjem molekula iz krutog ili tekućeg stanja u plinovito. Procesi ionizacije i evaporacije se odvijaju u ionskim izvorima. Analiza iona se vrši masenim analizatorima koji kontroliraju kretanje određenih iona kroz analizator do detektora gdje se stvara signal. Maseni analizatori sastoje se od kvadropola koji pomoću oscilacija u električnim poljima određuje koji ioni će dospjeti do detektora. Naboj se generira dodavanjem ili gubitkom protona, kationa, aniona ili elektrona na molekuli, te dopušta upravljanje molekulama pomoću električnog polja. Na četiri šipke kvadropola primijenjen je napon radio frekvencije i istosmjerne struje koji filtriraju sve ione osim one određene m/z vrijednosti. Jedan par šipki ima konstantni napon i promjenjivu radiofrekvenciju, a drugi ima napon i radiofrekvenciju suprotne polarnosti. Promjenom vrijednosti napona u kvadropolu omogućuje se propuštanje samo određenih m/z vrijednosti iona do detektora. Kvadropol može analizirati ione na dva načina: kompletno (Scan) ili snimanje odabranih iona (engl. *selected ion monitoring*, SIM). Pomoću takve analize moguće je odrediti kvalitativni sastav analiziranog uzorka, primjerice molekulsku masu ili kemijski sastav, a uz odgovarajući standard i kvantitativni sastav (Stachniuk i Fornal, 2016).

Vezani sustav tekućinska kromatografija visokog učinka i spektrometrija mase (engl. *High pressure liquid chromatography – tandem mass spectrometry*, HPLC – MS/MS) predstavlja sustav koji omogućuje odjeljivanje komponenata smjese i njihovu detekciju na temelju omjera mase i naboja (m/z) nabijenih čestica. Kod tandemске MS/MS kombinira se masena spektrometrija u dva koraka sa analizatorom iste ili različite vrste, te fazom fragmentacije između. Spajanje HPLC i MS omogućuje analizu najrazličitijih spojeva, uključujući termički nestabilne analite i analite s visokom molekularnom težinom (Suder i Silberring, 2006).

Može se koristiti i sustav s običnom tekućinskom kromatografijom s tandemskom masenom spektrometrijom (engl. *Liquid chromatography – tandem mass spectrometry*, LC – MS/MS) kao što je slučaj u radu koji je za cilj imao istražiti pojavu, sezonske varijacije, prostornu distribuciju, i ekološki rizik 22 nova zagađivala (farmaceutika) u uzorcima japanskih rijeka, sedimenta i sustava za obradu otpadnih voda. Istraživanje je pokazalo da koncentracije pronađene u rijeci su više za 1.5 puta u sušnoj sezoni od onih u kišnoj, dok je za koncentracije prisutne u sedimentu situacija obrnuta. Također, za čak 3 farmaceutika se pokazalo da spadaju u dominantne zagađivače te da moraju biti pod posebnim nadzorom (He i sur., 2018).

U radu Klančara i suradnika iz 2017. opisan je razvoj postupka ekstrakcije sorpcijskog miješanja (engl. *Stir-bar sorptive extraction*, SBSE) i nova brza analitička LC-MS / MS metoda za određivanje ciljanih farmaceutskih spojeva. Razvijena metoda kritički je procijenjena u setu od 27 reprezentativnih lijekova iz širokog raspona terapijskih klasa, na temelju njihove pojave u otpadnim vodama i njihove prikladnosti za SBSE ($\log K_{O/W}$ između 2,7 i 5,5). Optimizirana metoda SBSE osigurala je povrat za više od 80% kod 12 analita, a za 6 analita između 45% i 65%, dok je za ostalih 6 analita prikupljeno ispod 25%. Metoda je osigurala široki linearni raspon (uglavnom 1,25–1250 ng L⁻¹, R² > 0,99) s vrlo niskim granicama kvantifikacije za sve analite (1,25–5,00 ng L⁻¹). Validirana metoda primijenjena je na uzorke otpadnih voda radi utvrđivanja prisutnosti ciljanih analita, a polovica ih je otkrivena u svim uzorcima, što je pokazalo značajno onečišćenje slovenskih otpadnih voda farmaceutskim zagađivalima. Tehnika miješanja predstavlja jednostavnu i učinkovitu alternativu klasičnim metodama ekstrakcije za praćenje onečišćenja vode, što je ključno za adekvatnu zaštitu okoliša od novih farmaceutskih onečišćenja. Stoga je metoda vrlo pogodna za primjenu u rutinskom nadzoru određenih farmaceutskih proizvoda u različitim uzorcima vode iz okoliša (Klančar i sur., 2017)

Analitička metoda koja se temelji na ekstrakciji na čvrstoj fazi (engl. *Solid phase extraction – SPE*) i LC-MS/MS korištena je za detekciju velikog broja (n=44) odabranih lijekova u površinskim vodama Slovenije. Validirana metoda pokazala je prikladnu točnost, preciznost i linearnost. Učinkovitost ekstrakcije za lijekove bila je uglavnom iznad 90%, a određena granica kvantifikacije (engl. *Limit of quantitation*, LOQ) je općenito ispod 5 ng/L pa čak i do 0,03 ng/L. Učinak matrice je uspješno minimiziran izotopnim internim standardima. Šest uzoraka rijeka i jezera iz slovenske regije su bili analizirani. 42 od 44 farmaceutika otkrivena su u najmanje dva uzorka vode, 66% je otkriveno u svim uzorcima, dok su tri analita bila su prisutna iznad LOQ u svim uzorcima. Opsežna usporedba s podacima iz literature pokazala je da su pronađene koncentracije lijekova osobito niže u ovom istraživanju i da brojni lijekovi nisu ranije

prijavljeni. Usporedba izmjerenih i predviđenih (izračunatih) okolišnih koncentracija lijekova u površinskim vodama pokazala je veliko odstupanje između dva pristupa, jasno ukazujući na potrebu sveobuhvatne analitičke metode za rutinsko praćenje ovih tek nastalih zagađivala. Zaključno, dokazano je ova metoda prikladno osjetljiva da pouzdano kvantificira većinu farmaceutskih onečišćenja iako su pronađena u znatno nižim koncentracijama u slovenskim površinskim vodama nego što je bilo predviđeno njihovim konzumiranjem i literaturom (Klančar i sur., 2018).

Posljednjih nekoliko godina HPLC-MS metode sve više zamjenjuju analitičke metode koje se koriste detektorom s nizom dioda i fluorescentnim detektorom. Fluorescentnim detektorom mogu se postići niske granice dokazivanja, ali u nekim slučajevima potrebno je provesti derivatizaciju kako bi se poboljšala fluorescencijska svojstva analita, dok je detektor s nizom dioda moguće upotrebljavati za određivanje spojeva koji apsorbiraju u području UV/VIS-a te kada se analiziraju jako opterećene otpadne vode u kojima su koncentracije farmaceutika relativno visoke. Iz navedenih razloga spektrometar masa se sve više upotrebljava za identifikaciju i kvantitativno određivanje farmaceutika u uzorcima iz okoliša. Uz niže granice dokazivanja i kvantifikacije, HPLC-MS metode omogućuju određivanje molekulske mase farmaceutika kao i utvrđivanje struktura nepoznatih spojeva (Periša i Babić 2016).

Bitno je napomenuti da polutanti rijetko utječu na samo jedan faktor ili parametar. Iz tog razloga, kriterij baziran isključivo na kemijskoj strukturi i reaktivnosti nije dovoljan da uspješno predvidimo utjecaj na okoliš. To je dovelo do razvoja biomarkera kao ekonomičnih, brzo i rano uočljivih indikatora zagađenja. Ispitivanja mogu provoditi in vitro i in vivo te njima određujemo prisutnost i/ili jakost tvari uspoređivanjem njezinog učinka na testnom organizmu u odnosu na standardni uzorak. Oslanjaju se na biološke sustave, odnosno na cijele organizme, stanične linije i same biološke procese. Iako je teško točno povezati uzročnika i uzrok, budući da je aktivna tvar farmaceutika uglavnom u prisutnosti drugih pomoćnih sredstava i kontaminanata. Olakotna okolnost je ta da u kontroliranim (laboratorijskim) uvjetima poznajemo supstancu i koncentraciju koju ispitujemo (Jjemba, 2008).

Imunološka ispitivanja dobivaju sve više na važnosti u ispitivanju utjecaja farmaceutika na okoliš. Ona uključuju upotrebu antitijela koja prepoznaju specifične interakcije s homolognim antigenom (analit). Temelje se na sposobnostima antitijela da specifično prepoznaju i formiraju stabilne komplekse sa antigenima. Imunološki temeljene tehnike su korisne zbog činjenice da je imunološki sustav vrlo složen i ima važno svojstvo sposobnosti razlikovanja svog od stranog materijala kojeg tvore antitijela, odnosno bjelanjčevine koje se specifično i nekovalentno vežu

s kemijskim molekulama. Stoga, različiti farmaceutici evociraju tijelo na stvaranje antitijela koja se mogu mjeriti. Antitijela su najvažnija komponenta u svim imunološkim analizama, značajno doprinoseći specifičnosti i osjetljivosti. Ovaj koncept se u medicini koristi već nekoliko desetljeća za proučavanje farmakokinetike i farmakodinamike različitih lijekova (Laurie i sur., 1989; McCann i sur., 2002).

U tim vrstama okruženja, imunološka ispitivanja mogu dati vrlo dobru povezanost s uobičajenim tehnikama zasnovanim na instrumentima. Imunološka ispitivanja također se sve više koriste u otkrivanju farmaceutika u okolišu. U većini primjera, antitijela se imobiliziraju na čvrstoj površini i pojačana je detekcija označavanjem fluorescencijom, radioizotopom, enzimima ili hemiluminescijom (engl. *enzyme-linked immunosorbent assays*, ELISA). Priprema uzoraka prije imunološkog ispitivanja obično je minimalna za uzorke iz vode, ali često su potrebni za čvrste matrice, poput tla i sediment te takvi pripravci mogu uključivati neki oblik ekstrakcije nakon kojeg slijedi daljnje razrjeđivanje prije imunoanalize. Razrjeđivanje posebno minimizira efekte smetnji iz matrice. Važno je napomenuti da je u analizi ELISA apsorbancija obrnuto povezana s koncentracijom ciljanog spoja (Huang i Sedlak, 2001).

Imunokemijski pristupi su jeftiniji, lako prilagodljivi, brzi, prenosivi i smanjuju potrebu za skupom analitičkom opremom. Oni se također mogu koristiti za istodobno testiranje velikog broja uzoraka tijekom kratkog vremenskog razdoblja. Jedan od glavnih čimbenika koji i dalje ograničavaju uporabu ove tehnike u otkrivanju šireg raspona farmaceutika u okolini je nedostatak odgovarajućih antitijela osjetljivih na većinu farmaceutika koji se pojavljuju u okolišu. Nadalje, točnost imunološkog ispitivanja mogu biti podložni unakrsnim reakcijama i drugim utjecajima iz matrice, dajući lažno pozitivne rezultate u nekim slučajevima (Huang i Sedlak, 2001). Stoga se preporučuje da se rezultati analize imunološkog ispitivanja validiraju GC ili LC metodama. U cjelini, programi dizajnirani za nadgledanje prisutnosti farmaceutika u okolišu se još uvijek suočava s nekoliko glavnih izazova. Na primjer, različiti spojevi imaju različita svojstva koja obično zahtijevaju upotrebu različitih metoda ili uvjete pripreme uzorka, predobrade ili uvjeta mjerenja. Osim toga, metaboliti i proizvodi transformacije mogu biti još uvijek biološki aktivni, ali nisu vidljivi pomoću istih metoda ili uvjeta liječenja kao matični spoj. Odluke o tome koja će se metoda koristiti, na primjer, instrumentalna u odnosu na imunološki test, mogu se voditi faktorima kao što su osjetljivost, varijabilnost, selektivnost i cijena (Jjemba, 2008).

1.3. Citostatici

Tumor je nenormalna nakupina tkiva koja raste brže nego normalno tkivo, a ima sljedeća obilježja: nesvrhovitost – beskorisnost i čak štetnost organizmu; samostalnost – neovisnost o fiziološkim nadzornim sustavima; parazitizam – iskorištavanje i iscrpljivanje organizma; neorganiziranost – nemogućnost stvaranja normalnog tkiva i organa; i agresivnost – invazija okolnih struktura (benigni tumori–ekspanzijom, maligni tumori–ekspanzijom ili metastaziranjem) (Damjanov i sur., 2017). Kemoterapija ima jednu od ključnih uloga u liječenju malignih bolesti, čime zaslužuje posebnu pozornost. To je liječenje raka kemijskim sredstvima (kemijskim spojevima) koja uništavaju zloćudne stanice (Roganović, 2004). Lijekovi u kemoterapiji tumora često se nazivaju citostatici, citotoksični lijekovi, antitumorski kemoterapeutici ili antineoplastici. Njihovo djelovanje je primarno sustavno, a upotrebljavaju se u prvome redu u uznapredovalim tumorskim bolestima u vidu kemoterapije. Liječenjem kemoterapijom u značajnom se broju neoplazmi postiže dobar napredak, produljenje preživljavanja pa i izlječenje. Neki su tumori rezistentni na kemoterapiju, a citostatici su često izrazito toksični te je to razlog za neprestano traženje novih lijekova citostatika, kao i za nove oblike liječenja malignih bolesti (www.halmed.hr).

1.4. Podjela citostatika prema mehanizmu djelovanja

Prema mehanizmu djelovanja i kemijskom sastavu, citostatici se dijele u skupine: alkilirajući spojevi, antimetaboliti, antitumorski antibiotici, mitotički inhibitori, inhibitori topoizomeraze te skupina ostalih citostatika (Vrdoljak i sur., 2013). U detaljnijem objašnjenju svake skupine, navedeni su lijekovi koji su od posebnog interesa zbog njihove prisutnosti i ponašanja u okolišu.

1.4.1. Alkilirajući spojevi

Alkilirajući spojevi su oni koji imaju sposobnost stvaranja kovalentnih veza s DNA. Terminalni atom ugljika aktivnih alkilirajućih dijelova tih spojeva veže se na elektronima bogate regije različitih molekula. Citotoksični učinak alkilirajućih spojeva uglavnom se pripisuje njihovoj interakciji s DNA koja rezultira inhibicijom ili netočnom replikacijom DNA, što u konačnici uzrokuje mutaciju ili staničnu smrt. Važno je istaknuti i reakciju alkilirajućih spojeva sa

sulfhidrilnim fosfatnim skupinama na aminokiselinama, što rezultira višestrukim oštećenjima stanica. Alkilirajući spojevi pokazuju aktivnost kroz cijeli stanični ciklus, najviše u fazi G2 na prelasku iz faze G1 u S-fazu. Lijekovi od interesa iz te skupine su ciklofosfamid, cisplatin i karboplatin. (Vrdoljak i sur., 2013)

CIKLOFOSFAMID je najčešće primjenjivan alkilirajući spoj, a jedna od njegovih prednosti jest visoka bioraspoloživost nakon oralne primjene. Može se primijeniti oralno i intravenski s jednakom kliničkom učinkovitošću. Inaktivan je u svojem osnovnom obliku a aktivira se u citotoksični oblik putem mikrosomskih jetrenih enzima. Sustav citokroma P450 pretvara ciklofosfamid u 4-hidroksiciklofosfamid koji je u ravnoteži s aldofosfamidom. Navedeni aktivni metaboliti ulaze u tumorsko, ali i zdravo tkivo, gdje neenzimskim cijepanjem aldofosfamida nastaju citotoksični oblici, fosforamid iperit i akrolein (Katzung i sur., 2011). Rabi se u liječenju raka dojke, jajnika, limfoma, leukemije, mikrocelularnog raka pluća. Najvažnije neželjene posljedice jesu mijelosupresija, alopecija, rjeđe hemoragijski cistitis (Vrdoljak i sur.,2013).

CISPLATIN je,za razliku od većine, anorganski metalni kompleks otkriven na temelju slučajnog opažanja da neutralni kompleks platine koči dijeljenje i uzrokuje nitasti rast E. Coli. Nakon toga sintetizirano je nekoliko anologa platine. Iako točan mehanizam njihova djelovanja nije poznat, pretpostavlja se da citotoksični učinak ostvaruju na isti način kao i alkilirajući lijekovi. Kao takvi, ubijaju tumorske stanice u svim stadijima staničnog ciklusa i stvaraju ukrižane veze unutar i između lanaca DNA (Katzung i sur., 2011).

1.4.2. Antimetaboliti

Antimetaboliti tvore skupinu citotoksičnih lijekova koji svoj učinak ostvaruju poradi strukturne ili fiziološke sličnosti s intermedijalnim produktima staničnih procesa koji su uključeni u sintezu nukleinskih kiselina. Stoga su oni lažni supstrat za biokemijske reakcije. Tada dolazi do inhibicije enzima uključenih u sintezu nukleinskih kiselina ili do netočnog kodiranja nakon što inkorporiraju u nukleinske kiseline. Oba mehanizma rezultiraju inhibicijom sinteze DNA i staničnom smrću. Antimetaboliti citotoksični učinak ostvaruju u S fazi staničnog ciklusa (Vrdoljak i sur., 2013).

METOTREKSAT je analog folne kiseline koji se visokim afinitetom veže na aktivno katalitičko mjesto na dihidrofolatreduktazi (DHFR) te ometa sintezu tetrahidrofolata (THF) koji je glavni nosač ugljika za enzimske procese uključene u sintezu timidilata, purinskih nukleotida i aminokiselina serina i metionina. Inhibicija tih, različitih metaboličkih procesa ometa sintezu

DNA i RNA i ključnih staničnih proteina. Rabi se u liječenju raka dojke, mokraćnog mjehura, raka probavnih organa, leukemija, osteogenoga sarkoma. Najizraženije neželjeno djelovanje je izazivanje mijelosupresije i mukozitisa a pri velikim dozama i nefrotoksičnost (Vrdoljak i sur., 2013.)

5-FLUOROURACIL je najčešće primjenjivan fluoropirimidin koji je zapravo predlijek pa tek nakon unutarstanične konverzije u aktivne metabolite ostvaruje svoj citotoksični učinak. 5-fluorodeoksiuridin-monofosfat (5-FdUMP) inhibira enzim timidilat-sintetazu (TS). Inhibicijom TSa onemogućuje se nastanak deoksitimidin-trifosfata, jednog od četiriju potrebnih sastavnica DNA. 5-fluorouracil (5FU) citotoksično djelovanje ostvaruje i preko fluorouridin-trifosfata (FUTP) koji se ugrađuje u RNA i onemogućuje njenu funkciju. Dodatkom leukovorina 5-fluorouracilu povećavaju se trajanje i intezitet inhibicije TS-a, a time i citotoksični učinak. 5-FU i njegovi metaboliti uglavnom se uzlučuju preko žuči. To je jedan od najšire primjenjivanih citostatika, a rabi se u liječenju raka dojke, kolorektuma, želudca, jednjaka, gušterače, anusa, raka glave i vrata, bazocelularnog raka kože. Najizraženija je gastrointestinalna toksičnost (mukozitis, ali i oštećenja cijele sluznice probavnog trakta, proljevi) i mijelosupresija. Kontinuiranom infuzijom, u usporedbi intravenskim bolusom, postižu se bolji rezultati u liječenju kolorektalnog raka, a mijenja se i toksični profil s blažom mijelosupresijom, ali i izraženijom gastrointestinalnom toksičnošću (Vrdoljak i sur., 2013).

1.4.3. Antitumorski antibiotici

Probir mikrobnih proizvoda doveo je do otkrića brojnih tvari s inhibicijskim učinkom na stanični rast, a pokazale su se klinički korisnima u liječenju karcinoma. Antitumorski antibiotici vezuju DNA interkalacijom specifičnih baza i sprječavaju sintezu RNA, DNA ili oboje; cijepaju DNA lanac i ometaju staničnu diobu. Svi antibiotici koji se koriste u liječenju karcinoma proizvod su različitih sojeva mikroorganizma *Streptomyces*. U tu skupinu spadaju lijekovi epirubicin, daunorubicin, mitoksantron i doksorubicin (Katzung i sur., 2011).

DOKSORUBICIN je jedan od najvažnijih lijekova u liječenju tumora, a najveću aktivnost pokazuje protiv karcinoma dojke, endometrija, jajnika, testisa, štitnjače, želudca, mokraćnog mjehura, jetre i pluća; sarkoma mekih tkiva; nekih karcinoma dječje dobi poput neuroblastoma, Ewingova sarkoma, osteosarkoma i rabdomiosarkoma. Aktivan je i protiv hematoloških malignoma, akutne limfoblastične leukemije, multiplog mijeloma, Hodgkinova i Non-Hodgkinova limfoma. Obično se rabi u kombinaciji s drugim lijekovima (ciklofosfamidom, cisplatinom i 5-FU) i pri tome je klinička učinkovitost bolja (Katzung i sur., 2011).

1.4.4. Mitotički inhibitori

U skupini mitotičkih inhibitora izdvajaju se vinka-alkaloidi, vinkristin, vinblastin i vinorelbin. Citotoksični učinak ostvaruju vezanjem s tubulinom, proteinom koji je osnovna komponenta staničnih mikrotubula koji tvore diobeno vreteno. Kao posljedica vezanja s tubulinom dolazi do otapanja mikrotubula i diobenog vretena te smrti stanice u metafazi (Katzung i sur., 2011).

1.4.5. Inhibitori topoizomeraze

Inhibitori topoizomeraze uzrokuju lomove u DNA koje inače popravlja taj isti enzim u izoformi II. Njihov učinak se ostvaruje u kasnoj S i G2 fazi. Primjer je etopozid, semisintetički podofilotoksin koji inhibicijom enzima topoizomeraze II uzrokuje lomove lanaca DNA. Citotoksični učinak ostvaruje u kasnoj S i G2-fazi. Nešto manje od 50% etopozida izlučuje se mokraćom, vrlo mali dio preko žuči, a ostalo se metabolizira u jetri. Primjenjuje se u liječenju tumora testisa, raka pluća, raka želudca, limfoma. Najvažnija je nuspojava mijelosupresija, a često uzrokuje alopeciju (Katzung i sur., 2011).

2. Obrazloženje teme

S obzirom da je preveliko propisivanje antibiotika dovelo do razvoja rezistencije te se susrećemo s velikim problemom u samoj terapiji, a i povećanim koncentracijama istih lijekova u okolišu, postalo je očito da je veliki problem i neinformiranost i neznanje o pravilnom zbrinjavanju farmaceutskog otpada. Samim time, javlja se pitanje kakav utjecaj imaju lijekovi koji su potentniji od antibiotika, točnije onih koji su dizajnirani na način da ubijaju stanice nastale u organizmu čovjeka, na okoliš, a posljedično i na ljude. Postoje smjernice sigurne istraživačke i industrijske sinteze citostatika, kao i za siguran rad s njima, ali manje se govori o obavezama za takav citostatski otpad iako postoje propisi. Nadalje, puno je manje i istraživanja ostatnih citostatika u okolišu. Farmaceuti kao važan dio zdravstvenog tima imaju ključnu ulogu u educiranju šire javnosti o pozitivnim i negativnim učincima farmaceutskih proizvoda, kako i tijekom terapije, tako i nakon njezinog završetka. U ovom radu također su sažeta današnja istraživanja koja se bave otkrivanjem učinaka citostatika na različite okolišne sustave, kakve probleme nam to donosi, te što farmaceuti kao zdravstveni djelatnici mogu učiniti po tom pitanju kako bi osigurali najbolji mogući ishod za pacijenta i ekosustav.

3. Materijali i metode

Pri izradi ovog diplomskog rada korištena je literatura prikupljena iz znanstvenih radova, knjiga, udžbenika, internetskih poveznica i pravnih propisa. Znanstveni i stručni radovi pronađeni su preko ključnih pojmova kao što su cytostatic, antineoplastic agent, environment, ecotoxicology, pharmacoecology u bazama podataka PubMed-a, Science Directa, Scopus, Hrčak. Također, korišteni su podaci objavljeni na stranicama Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo, Hrvatske agencije za lijekove i medicinske proizvode, Europske Unije te mrežnih stranica projekta Cytothreath.

4. Rezultati i rasprava

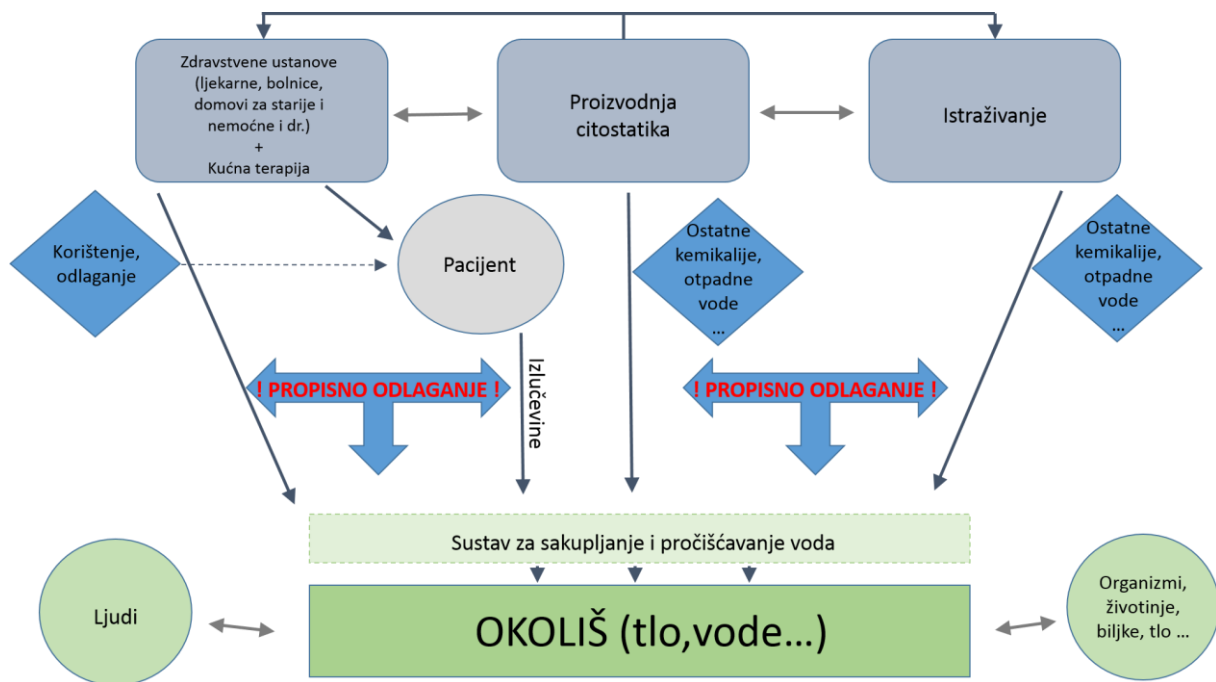
4.1. Toksičnost citostatika i pravilno, sigurno rukovanje

Svi antineoplastični spojevi imaju različite neželjene učinke i potencijalno su imunosupresivni, a samim time opasni i ljudima i životinjama (Mosby, 2009). Antineoplastici općenito mogu biti teratogeni, mutageni i kancerogeni. Oni koji izravno komuniciraju s DNA (npr. alkilirajuća sredstva) od najveće su važnosti u pogledu rizika kojeg nose budući da direktno inhibiraju replikaciju DNA ili ju mijenjaju. Rezultat je apoptoza ili mutageneza. Neželjene nuspojave lijekova koji djeluju na DNA su učinak na plodnost, leukemija, rak mjehura i drugi. Štetni učinci mogu rezultirati oštećenjem nekanceroznih tkiva ili organa s visokim udjelom stanica koje dijele brzo kao što su npr. folikuli kose, jajne stanice i stanice gastrointestinalnog trakta. Terapeutski, ovo rezultira ograničenjem količine i učestalosti primjene lijeka (Segen, 2002). Često se antineoplastični lijekovi primjenjuju kao smjese. Neki antineoplastični spojevi kao što su ciklofosamid (CP) su prolijekovi, tj. aktivna molekula će se u tijelu stvoriti metabolizmom (Allwood i sur., 2002). Svi antineoplastici imaju visoku farmakološku sposobnost te su često fetotoksični, genotoksični (mutageni) i teratogeni (Allwood i sur., 2002). Potražnja za kemoterapijskim liječenjem u razvijenim zemljama i dalje raste oko 10% godišnje (DoH, 2004; Health Canada, 2004; Varadhachary i Hoff, 2005; Besse i sur. 2012). Općenito, očekuje se da će se incidencija oboljenja od raka povećati širom svijeta (Stewart i Wild 2014). Obično se 80% ovih lijekova daje intravenski, a 20% se daje oralno (Allwood i sur., 2002). Postoji preko 100 antineoplastičnih lijekova koji se rutinski koriste u kemoterapiji u razvijenim zemljama (www.bccancer.bc.ca). Međutim, novi spojevi ulaze na tržište i promjena medicinskog znanja može promijeniti režim liječenja, stoga se korištenje nekih spojeva smanjuje dok drugih raste. U Hrvatskoj potrošnja lijekova u ovoj skupini (L01) tijekom promatranog razdoblja od 2013. do 2017. godine stalno raste te se njihova potrošnja povećala s 484 milijuna kuna u 2013. godini na 753 milijuna kuna u 2017. godini, što je povećanje od 57% (www.halmed.hr). Povećanje potrošnje sugerira i na povećanje otpada tih supstanci, te posljedično povećanu potrebu za analizom učinka istih na vodene, biljne i u konačnici ljudske organizme. Citostatici čine veći dio tzv. genotoksičnog otpada (1% sveukupnog medicinskog otpada i 2% opasnog medicinskog otpada) (Marinković i sur., 2006).

Mogućnost kontaminacije citostaticima je raznovrsna: u istraživačkim djelatnostima (fakulteti, instituti i dr.), u proizvodnji i pripravi lijekova (farmaceutske industrije, ljekarne), skladištenju i transportu, na mjestima upotrebe (zdravstvene i ostale ustanove za zbrinjavanje oboljelih) i

zbrinjavanja citostatskog otpada, uključujući i sam okoliš tj. prirodu u slučaju zagađivanja nezbrinutim citostatskim otpadom (Antonijević, 2012; Marinković i sur., 2015).

Na slici je prikaz pretpostavljene sheme osnovnih izvora i sudbine citostatika u okolišu.



Slika 1. Pretpostavljena shema osnovnih izvora i sudbine citostatika u okolišu (Autori: Irena Žuntar, Ivana Galić)

Sistematskim pregledom literature vezane za upravljanje opasnim lijekovima u koje spadaju i citostatski lijekovi, nisu pronađeni standardizirani sustavi koji bi osigurali upravljanje kvalitetom, sljedivost procesa i minimiziranje rizika povezanih s tim lijekovima. U pregledanim smjernicama nijednog računalnog sustava nije spomenuto osiguravanje pravilnog upravljanja cijelim procesom za tu vrstu lijekova (Martinez i sur.,2018).

Kopjar i Pavlica navode da su 2005.godine rukovanje, priprava i aplikacija citotoksičnih lijekova u hrvatskim medicinskim ustanovama bili u domeni rada medicinskih sestara (Kopjar i Pavlica, 2005). Pored osoblja koje svakodnevno priprema i aplicira antineoplastične lijekove, malim dozama ovih agenasa profesionalno su izložene i osobe koje sudjeluju u njezi bolesnika koji primaju kemoterapiju ili pak dolaze u kontakt s tjelesnim tekućinama bolesnika, te osoblje koje zbrinjava citotoksični otpad. S obzirom na dokazana mutagena, karcinogena i teratogena

svojstva, profesionalna izloženost antineoplastičnim lijekovima povezana je s brojnim zdravstvenim rizicima (Kopjar i Pavlica, 2005). Pokazano je da je premala, čak zanemariva uključenost ljekarnika u poslove povezane s pripravom citotoksičnih lijekova te s farmakološkim liječenjem onkoloških bolesnika, kao i s razradom medicinskih postupaka i protokola liječenja, što je nužan preduvjet za bolje upravljanje rizicima. Zatečeno stanje ukazuje na nepotrebnu prisutnost rizika u gotovo svim fazama rukovanja citotoksičnim lijekovima. S obzirom na to da za citotoksične lijekove ne postoji stupanj izloženosti, koji bi se mogao smatrati sigurnim, potrebno je smanjiti rizik primjenom načela "smanjivanja na najmanju moguću mjeru", a za uspješno upravljanje rizicima rukovanja citotoksičnim lijekovima u medicinskim ustanovama nužno je zakonski regulirati te provoditi redoviti nadzor radnoga okoliša i osoblja (Pavlica, 2007). Unatoč podacima iz radova objavljenih 2005. i 2007. godine (Kopjar i Pavlica, 2005; Pavlica, 2007) u današnje doba primjećuju se značajni pomaci. Tako se može pronaći informacija da od 2019. godine u Kliničko bolničkom centru Osijek i Kliničko bolničkom centru Zagreb uspostavljeni su suvremeni laboratoriji za centralnu pripremu citostatika koji koriste sustav gravimetrijske kontrole, a cijeli proces izrade se odvija u posebnim izolatorima. Gravimetrijska izrada podrazumijeva korištenje računalne vage za točno izračunavanje doza lijeka prema težini i visini pacijenata za kojeg se pripravak priprema i tako, gotovo u potpunosti isključuje pogreške. Proces pripreme citostatske terapije u izolatorima znači veću sigurnost za djelatnike zbog manje izloženosti citostatskom materijalu. Za pripremu lijeka su zaduženi farmaceutski tehničari, a farmaceuti kontroliraju i verificiraju doze propisane od strane liječnika (www.glas-slavonije.hr, www.kbc-zagreb.hr).

Europsko društvo onkološke farmacije (engl. *European Society of Oncology Pharmacy*, ESOP), čija je Hrvatska članica, izdaje dokument Standard kvalitete ljekarničkih usluga u onkologiji (engl. *Quality Standard for the Oncology Pharmacy Service*, Quapos) u kojem su navedeni propisi i dane upute za upravljanje kvalitetom u ljekarnama koje pripremaju citostatske agense te za upravljanje rizikom (Quapos 5, 2014; Quapos 6, 2018). Upravljanje kvalitetom predstavlja temelj za konačnu kontrolu procesa u pripremi citostatika. U pravilniku je navedeno osoblje koje rukuje s citostaticima u okviru ljekarne te osoblje uključeno u proizvodni proces. Definirano je da samo farmaceutsko osoblje može sudjelovati u pripremi citostatskih otopina spremnih za uporabu. Prije početka obavljanja ovih zadataka, osoblje mora steći odgovarajuće obrazovanje i proći obuku vezanu uz aseptične radne procedure i rukovanje s opasnim tvarima te zaposlenici moraju biti upoznati sa sustavom upravljanja kvalitetom u odjelu i aktivno sudjelovati u njegovu daljnjem razvoju. Prije samog početka proizvodnje citostatika, potrebno

je procijeniti i dokumentirati rizike rukovanja citostaticima (zakon o sigurnosti na radu, odredbe o rukovanju opasnim tvarima) te se na temelju toga daju daljnje upute zaposlenicima, ovisno o kategoriji posla koju obavljaju. Obuka se mora ponavljati svake godine, sve nezgode moraju biti dokumentirane unutar posebnog protokola i zaposlenici su dužni dokumentirati svoju izloženost citostaticima, kao što su dužni pohađati redovite sistematske preglede. Definirani su i zahtjevi za sobe i opremu koja se koristi u procesu proizvodnje kako bi se kontaminacija svela na minimum. Postavljeni su i zahtjevi za proizvođače lijekova, tj. farmaceutske tvrtke koje su obavezne poduzeti posebne organizacijske mjere u odnosu na distribuciju i skladištenje. Što se samih citostatskih lijekova tiče, određena su i pravila vezana za njihovu potražnju, stabilnost i doziranje. Kako spadaju u skupinu lijekova uske terapijske širine, prilagodbe doza su obavezne i zbog njihovog organotoksičnog potencijala, kao i zbog potencijalno smanjene funkcije nekog organa što utječe na njihovu bioraspoloživost. Ljekarna kao središnja jedinica za citostatičnu terapiju primjenjuje sustav upravljanja kvalitetom usluga onkološkog ljekarništva i preuzima odgovornost za bolesnike i osoblje u svim područjima citotoksične terapije. U ljekarni se bilježe i obrađuju svi medicinski i toksikološki podaci važni za citotoksično sredstvo te, u okvirima mogućnosti, provode i popratne mjere te mjere koje to podupiru. Dostupne informacije mogu se epidemiološki procjenjivati, dokumentirati s kliničkog, farmakoeconomskog i ekološkog stajališta, uklopiti u savjetodavne postupke te primijeniti u izobrazbi osoblja (Quapos 5, 2014; Quapos 6, 2018).

Prema Pravilniku o gospodarenju medicinskim otpadom iz 2015. godine definirani su citotoksični i citostatski, farmaceutski, kemijski i medicinski otpad (N.N., br 50/2015). 2019. godine donesen je Pravilnik o izmjenama i dopunama Pravilnika o gospodarenju medicinskim otpadom (N.N., br 56/2019).

Citotoksični i citostatski otpad je opasni medicinski otpad koji nastaje zbog primjene, proizvodnje i pripravljanja farmaceutskih tvari s citotoksičnim i citostatskim efektom, uključivo primarnu ambalažu i sav pribor korišten za pripremu i primjenu takvih tvari.

Farmaceutski otpad su svi lijekovi i tvari, uključujući i njihovu primarnu ambalažu, koji su postali neupotrebljivi zbog isteka roka valjanosti, prolijevanja, rasipanja, pripremljeni pa neupotrebljeni ili se ne mogu koristiti zbog drugih razloga.

Kemijski otpad je opasni medicinski otpad koji sadržava toksične ili opasne kemikalije kao što su laboratorijski reagensi, razvijači filma, dezinficijensi koji nisu upotrebljivi ili kojima je istekao rok valjanosti, otapala, otpad s visokim sadržajem teških metala i slično.

Medicinski otpad je otpad nastao prilikom pružanja njege, zaštite i očuvanja zdravlja ljudi i/ili životinja; otpad nastao u istraživačkim djelatnostima kao i otpad nastao prilikom pružanja različitih usluga kod kojih se dolazi u kontakt s krvlju i/ili izlučevinama ljudi i/ili životinja. Prema svojstvima, medicinski otpad može biti:

- A. opasni medicinski otpad – s obzirom na opasna svojstva i način gospodarenja dijeli se na:
 - 1. Zarazni,
 - 2. Oštri predmeti,
 - 3. Farmaceutski otpad,
 - 4. Kemijski otpad,
 - 5. Citotoksični i citostatski otpad,
 - 6. Amalgamski otpad iz stomatološke zaštite i
 - 7. Ostali opasni otpad – svaki otpad koji posjeduje jedno ili više opasnih svojstava iz Priloga Uredbe (EU) br. 1357/2014 i Priloga Uredbe (EU) br. 2017/997 i koji nije obuhvaćen točkama od 1. do 6. ovoga stavka.

- B. neopasni medicinski otpad. – onaj otpad koji nema opasna svojstva u skladu s odredbama Zakona.

Pravilnikom su utvrđeni načini i postupci gospodarenja otpadom koji nastaje prilikom pružanja njege, zaštite i očuvanja zdravlja ljudi i/ili životinja, istraživačkih djelatnosti i pružanja različitih usluga kod kojih se dolazi u kontakt s krvlju i/ili izlučevinama ljudi i/ili životinja. Gospodarenje medicinskim otpadom u smislu ovoga Pravilnika podrazumijeva djelatnosti sakupljanja i prijevoza te postupke obrade medicinskog otpada, uključujući nadzor nad tim djelatnostima i postupcima te nadzor i mjere koje se provode na lokacijama nakon obrade medicinskog otpada kao i radnje koje poduzimaju trgovac otpadom ili posrednik (N.N.,br 50/15, N.N.,br 56/19).

4.2. Cytothreath

CytoThreat je projekt pokrenut 1. siječnja 2011.godine, financiran od strane Europske Unije koji govori o potrebi procjene rizika lijekova koji se oslobađaju u okoliš, usredotočujući se na citostatske lijekove, jer su oni vrlo opasni spojevi zbog svojih genotoksičnih svojstava koja

moгу izazvati neočekivane dugoročne učinke (www.cytothreath.eu). Njihovo oslobađanje u okoliš može dovesti do sistemskih ekoloških učinaka i povećane učestalosti raka, smanjene plodnosti i malformacija u potomstvu kod ljudi. Pojava, distribucija i sudbina odabranih široko korištenih citostatika u različitim vodenim matricama, njihova akutna i kronična toksičnost i utjecaj na stabilnost genetskog materijala u različitim vodenim organizmima različitih trofičkih razina pružaju skupove podataka neophodne za znanstveno utemeljenu procjenu rizika. Poseban naglasak stavlja se na kombinirane učinke smjesa koje su štetne za okoliš. Primjenjuje se kombinacija vrhunske analitičke kemije, *in vivo* i *in vitro* sustava, te 'OMIKA' tehnologija – tehnologije koje mjere neke karakteristike velike obitelji staničnih molekula, poput gena, proteina ili malih metabolita, imenovane su dodavanjem sufiksa „-omika“, kao u „genomika“. Omika se odnosi na kolektivne tehnologije koje se koriste za istraživanje uloge, odnosi i radnje različitih vrsta molekula koje čine stanice organizma. *In vivo* studije s modelima zebrića imaju za cilj identificirati veze između genskih profila, uvjeta izloženosti i štetnih učinaka na kralježnjaka kako bi se identificirali molekularni biomarkeri za štetne učinke specifičnih skupina citostatika koji će se koristiti kao dijagnostički markeri i za predviđanje sinergističkih učinaka kombinirane izloženosti. Usporedna *in vitro* genotoksičnost i transkriptomске studije sa zebrićima i stanicama dobivenim od čovjeka pružit će dodatne informacije za ekstrapolaciju toksikoloških podataka na ljude. Usporedba s opasnim učincima drugih skupina lijekova pružit će znanje o veličini problema. CytoThreat će generirati nova znanja o ekološkim i zdravstvenim rizicima citostatika i pružiti objektivne argumente za preporuke i propise (www.cytothreath.eu).

4.2.1. Ciljevi cytothreath projekta

1. Razviti nove analitičke metode za procjenu pojave i sudbine citostatskih lijekova, njihovih metabolita i proizvoda transformacije u sustavima za pročišćavanje vode i okolišu.
2. Istražiti potencijalne odgođene i nepovratne učinke citostatičkih lijekova na koncentracije u okolišu vodenih eksperimentalnih modela i usporediti podatke s onima dobivenim na pokusnim modelima na ljudima.
3. Istražiti kombinirane učinke mješavina citostatskih lijekova, njihovih izlučenih metabolita i produkata transformacije nastalih u okolišu i/ili obradi otpadnih voda.
4. Na osnovu dobivenih rezultata razviti smjernice o tome kako poboljšati procjenu opasnosti od životne sredine i citostatika izloženih u okoliš (www.cytothreath.eu).

4.2.2. Analitičke metode za citostatike

U Cytotreath projektu opisane su analitičke metode za citostatike kao i njihove prednosti i mane pregledom radova različitih autora (www.cytothreath.eu). Tri analitičke metode razvijene su za određivanje citostatskih spojeva u vodenim uzorcima. Jedna od njih temelji se na on-line ekstrakciji čvrste faze s tekućinskom kromatografijom i tandemskom masenom spektrometrijom (on-line SPE LC-MS/MS), a razvio ih je španjolski institut CSIC (*Spanish Council for Scientific Research*) za analizu do 17 citostatika i transformacijskih produkata u vodenim uzorcima. Druga se temelji na masenoj spektrometriji s induktivno spregnutom plazmom (ICP-MS) za analizu kemoterapeutika na bazi platine također u vodenim uzorcima), a razvio ju je slovenski JSI (*Jožef Stefan Institute*). Treća je razvijena u istom institutu te se bavi analizom ciklofosfamida (CF) i ifosfamid (IF) u otpadnim i površinskim vodama pomoću ekstrakcije čvrste faze i plinske kromatografske s masnom spektrometrijom (GC-MS). Uspješnosti svih triju metoda ocjenjuju se procjenom njihovog oporavka, ponovljivosti, linearnosti i osjetljivosti sa zadovoljavajućim rezultatima. Metode su također primijenjene na nekoliko različitih vodenih matrica (www.cytothreath.eu).

Citostatici koji su polarni spojevi i nerijetko velike molekulske mase, što ograničava upotrebu plinske kromatografske tehnike za njihovo određivanje jer je potreban korak derivatizacije kako bi se poboljšala isparljivost i toplinska stabilnost spojeva prije njihove injekcije u kromatografski sustav. Dakle, GC-MS su odredili samo IF i CP (Kiffmeyer i sur., 1998.; Buerge i sur., 2006.; Tauxe-Wuersch i sur., 2006.; www.cytothreath.eu). Tekućinska kromatografija (LC) zajedno s detektorom ultraljubičastog zračenja (UV) najčešće se primjenjuju (Kiffmeyer i sur., 1998; Lenz i sur., 2007; Chen i sur., 2012.; www.cytothreath.eu). Međutim, analiza tvari koji se u tragovima nalaze u okolišu zahtijeva veću osjetljivost, specifičnost i točnost, za koje je moguće koristiti samo MS. Također, opisana je primjena napredne analitičke tehnike online SPE LC-MS/MS (engl. *On-line solid phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry*) za određivanje citostatika (Buerge i sur., 2006; Tauxe-Wuersch i sur., 2006; Martin i sur., 2011; Tuerk i sur., 2011; Garcia-Ac i sur., 2011; Kovalova i sur., 2009; www.cytothreath.eu). Međutim, mnogi od njih usredotočili su se na analizu nekih klasa citostatika i strukturne informacije o ionima produkata odabranih za višestruku reakciju praćenja (engl. *Multiple reaction monitoring, MRM*), tako da se njihovo utvrđivanje često previđa. Drugi aspekt od važnosti je njihova moguća transformacija u druge produkte. Mogu se degradirati i dovesti do toga da nastaju spojevi toksičniji i postojaniji od originalnih. O tome

se malo zna, ali neki su proizvodi biorazgradnje već identificirani; na primjer, proces biorazgradnje za metotreksat se kombinira s stvaranjem toksičnog i postojanog produkta razgradnje 7-hidroksimetotreksat (Kiffmeyer i sur., 1998; www.cytothreath.eu), temozolomid razgrađuje se na 3-metil (triazin-1-il) imidazol-4-karboksamid (MTIC) u DNK pri $\text{pH} > 7$ (Denny i sur., 1994; www.cytothreath.eu), paklitaksel na hidroksipaklitaksela, tamoksifena do hidroksitamoksifena i endoksifena. U ovom kontekstu, cilj 2 radnog projekta (WP2 – work programme 2) u okviru Cytothreath kampanje bio je istražiti mogućnosti tekućinske kromatografije s tandemskom elektrosprej ionizacijom i masenom spektrometrijom (LC-ESI-MS/MS) u citostatskom polju optimizacijom analitičke metode za multianalitičko određivanje 17 spojeva (uključujući nekoliko metabolita) koji pripadaju različitim klasama i pružiti informacije o njihovom obrascu fragmentacije, aspektu koji se često previđa u literaturi (Negreira i sur., 2013; www.cytothreath.eu).

Tablica 1: Citostatici korišteni u analizi metodom On-line SPE LC-MS/MS*

SPOJ	MOLEKULARNA MASA	SKUPINA
Ciklofosamid	261.09	Analozi dušikovog iperita
Ifosamid	261.09	Analozi dušikovog iperita
Temozolomid	194.2	Ostali alkilirajući agensi
Metotreksat	454.45	Analozi folne kiseline
*Hidroksimetotreksat	470.44	Analozi folne kiseline
Gemcitabin	299.66	Analozi pirimidina
Kapecitabin	359.15	Analozi pirimidina
Etopozid	588.57	Derivati podofilotoksina
Paklitaksel	853.91	Taksani
*6(α)-hidroksipaklitaksel	869.91	Taksani
Doksorubicin	543.52	Antraciklini i slične tvari
Imatinib	493.60	Inhibitori protein kinaza
Erlotinib	393.44	Inhibitori protein kinaza
Irinotekan	586.68	Ostali antineoplastični agensi
Tamoksifen	371.51	Antiestrogeni
*Endoksifen (4-hidroksi-N-desmetil-tamoksifen)	373.49	Antiestrogeni
* (Z) -4-hidroksitamoksifen	387.51	Antiestrogeni
*aktivni metaboliti		

*prevedeno s engleskog jezika i prilagođeno prema slici koja se nalazi na stranici www.cytothreath.eu

Ova metoda se može smatrati zadovoljavajućom u pogledu performansi, tj. u smislu osjetljivosti, selektivnosti, pouzdanosti itd., s dodatkom prednosti što je u potpunosti automatizirana. Bez obzira na to, metoda ostavlja prostora za neko poboljšanje. Također, trebale bi se optimizirati druge različite analitičke metode za određivanje etopozida i drugih citostatika (5-FU, vinblastin, vinkristin, vinorelbin, karboplatin, oksaliplatin) i transformacijskih produkata, čija analiza nije moguća sa sadašnjim (Negreira i sur., 2013; www.cytothreath.eu).

Eksperimentalno je dokazano da je radni raspon za određivanje ukupne koncentracije platine po ICP-MS linearan od granice kvantifikacije (LOQ) do 100 $\mu\text{g/L}$. Kako koncentracije platine analizirane u stvarnim okolišnim uzorcima nisu očekivane da prelaze nisku razinu ng/L,

linearnost radnog raspona bila je potvrđena između LOQ i 10 µg/L. Korelacijski koeficijent prelazi 0,999 što odgovara validacijskim kriterijima metode (www.cytothreath.eu).

Granica detekcije (LOD) za određivanje ukupne platine po ICP-MS izračunato je kao $LOD = xbl + 3sbl$; (xbl -prosjeck vrijednosti signala za deset određivanja slijepih proba, sbl - njihovo odgovarajuće standardno odstupanje). LOD prema tome iznosi 0,2 ng Pt / L (www.cytothreath.eu).

Granica kvantifikacije (LOQ) po ICP-MS izračunato je kao $LOQ = xbl + 10sbl$ te je otkriveno da LOQ iznosi 1,2 ng Pt / L (www.cytothreath.eu).

Validirana analitička metoda korištena je kako bi se odredio sadržaj platine u vodi koja potječe iz onkološke bolnice u usporedbi s prirodnim vodama i onima koje utječu/istječu iz sustava za upravljanje otpadnim vodama (www.cytothreath.eu). Rezultati su pokazali da su najveće koncentracije bile određene u bolničkim uzorcima, gdje se kemoterapeutici na bazi platine koriste za kemoterapiju raka. Iako koncentracija platine opada za redoslijed silaska nizom iz onkološke bolnice na otpadne vode, količine Pt u otpadnim i prirodnim vodama su i dalje prilično visoke vjerojatno zbog drugih mogućih izvora Pt (npr. ispiranje iz automobilskih katalitičkih pretvarača). U budućnosti se planira provođenje određivanja određenih vrsta platine, što će isključiti kemoterapeutike na njenoj bazi od onih koji potječu iz drugih izvora (www.cytothreath.eu).

Tablica 2: Ukupne koncentracije Platine u vodenim uzorcima*

Uzorak	ng Pt L ⁻¹	Unutarnji standard 10 ng Pt L ⁻¹	Određena koncentracija ng Pt L ⁻¹
Onkološka bolnica 1	373	10	393
Onkološka bolnica 2	279	10	293
Utok u sustav za upravljanje otpadnim vodama	2	10	33
Istok iz sustava za upravljanje otpadnim vodama	31	10	45
Rijeka Ljubljana	22	10	30

*prevedeno s engleskog jezika i prilagođeno prema tablici sa stranice www.cytothreath.eu

Za procjenu zagađenja slovenskog vodenog okoliša citostaticima ciklofosfamid (CF) i ifosfamid (IF), razvijena je analitička metoda za analizu otpadnih i površinskih voda plinskom kromatografijom s masenom spektrometrijom (GC-MS). Uzorci su prikupljeni i analizirani s Instituta za onkologiju Ljubljana, Postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda u Ljubljani i iz rijeke Ljubljanice nizvodno od ispuštanja otpadnih voda. Rezultati su otkrili koncentracije u otpadnim vodama s Instituta za onkologiju 12,1 µg/L i 10,5 µg/L za CF i IF. Na drugim lokacijama koncentracije CF i IF bile su ispod njihovih granica otkrivanja. U buduću će metoda biti dodatno optimizirana kako bi se mogle otkriti i niže koncentracije. Uz to, studija će biti proširena i na uključivanje otpadnih i površinskih voda s drugih lokacija u Sloveniji kao i glavnih metabolita ciklofosfamida i ifosfamida (www.cytothreath.eu).

4.2.3. Učinak na vodene organizme

U Cytotreath projektu opisani su i učinci na vodene organizme (www.cytothreath.eu). Citostatski lijekovi prvi su puta otkriveni u vodenom okolišu 1970-ih (Hignite, Aznaroff 1977; www.cytothreath.eu). Od tada su maligni tumori u ljudi postali više i sve se češće stoga upotreba lijekova protiv raka povećava (Yin i sur. 2010; Besse i sur. 2012; www.cytothreath.eu). Zbog sve veće upotrebe, ostaci antineoplastičnih lijekova postali su zagađivala u vodenom okruženju. Većina ih se izravno ili neizravno miješa s genom stanice, koji ih svrstava u skupinu posebno opasnih spojeva (Gajski i sur., 2016; www.cytothreath.eu). Provedeno je nekoliko istraživanja zadnjih godina proučavajući učinak određenih lijekova iz skupine citostatika na staničnoj razini određenih vrsta ili čak na cijelim organizmima. Primjerice, talijanska studija "Akutna i kronična toksičnost 6 protutumorskih lijekova na kolnjake i rakove", (Parella i sur., 2014a; www.cytothreath.eu) je za cilj imala istražiti akutnu i kroničnu toksičnost šest citostatika (5-fluorouracil, kapecitabin, cisplatin, doksorubicin, etopozid i imatinib), koji pripadaju u pet različitih razreda Anatomske terapijske klasifikacije (ATK), kod primarnih potrošača vodenog lanca (*Daphnia magna*, *Ceriodaphnia dubia*, *Brachionus calyciflorus* i *Thamnocephalus platyurus*). Akutni ekotoksikološki učinci pojavili su se u koncentracijama reda mg/L, viši od onih predviđenih u okolišu, a akutno najtoksičniji lijekovi među ispitivanima bili su cisplatin i doksorubicin za većinu vodenih organizama. Za kroničnu toksičnost cisplatin i 5-fluorouracil su pokazali najveći toksični potencijal u svim ispitnim organizmima, izazivajući 50% inhibiciju reprodukcije u rakovima u koncentraciji reda µg/L, dok su kolnjaci bili manje osjetljivi na ove lijekove. Na osnovi kroničnih učinaka, niske

učinkovite koncentracije sugeriraju potencijalni okolišni rizik citostatika. Stoga bi ova studija mogla biti važno polazište za utvrđivanje stvarnog utjecaja ovih supstancija na okoliš (Parella i sur. 2014a; www.cytothreath.eu).

Nadalje, u studiji "Genotoksični potencijal odabranih citostatika na ljudske stanice i stanice zebrića" provedenoj 2016.godine od Gorana Gajskog i suradnika, *in vitro* je proučavan utjecaj 5-fluorouracila, etopozida, i cisplatina na jetrene stanice zebrića (ZFL), te na ljudske hepatične stanice (HepG2) i periferne krvne limfocite (HPBL) (Gajski i sur., 2016; www.cytothreath.eu). ZFL stanična linija odabrana je kao model za stanice dobivene iz riba za koje se smatra da su relevantnije za identifikaciju toksikoloških opasnosti za vodene organizme. Za odabrane citostatike promatran je bio učinak različitih koncentracija lijekova (0, 0.1, 0.2, 0.39, 0.78, 1.56, 3.13, 6.25, 12.5, 25 i 50 µg/mL za HPBL ; 0, 0.29, 0.59, 1.17, 2.34, 4.69, 9.38, 18.75, 37.5, 75 i 150 µg/mL Za ZFL i HepG2) kroz različite vremenske periode inubacije (4,24,48 i 72h). Pokazalo se da su sva tri testirana citostatika genotoksični spojevi; međutim, mehanizmi njihove genotoksičnosti su različiti. U stanicama ZFL-a 5-FU je inducirao oštećenje DNA vremenom i dozom, ali ne i nastajanje mikronukleusa, koji su uobičajeni indikator genotoksičnih događaja ili kromosomske nestabilnosti. Etopozid se također pokazao najtoksičniji za ZFL stanice, gdje je LOEC (engl. lowest observed effect concentration) za indukciju prekida lanca DNA bio je 0,001 i 0,01 µg/ml za stvaranje mikronukleusa. Cisplatin je inducirao formiranje mikronukleusa u sve tri stanične linije; međutim, indukcija njihovog nastajanja bila je u jednakim koncentracijama niža od one koju je izazvao etopozid. Na oštećenje DNA cisplatinom najosjetljivijima su se ponovno pokazale ZFL stanice. U konačnici, rezultati ukazuju da, u primijenjenim uvjetima izloženosti, stanice ZFL su podložnije genotoksičnom učinku tri lijeka nego stanice koje potječu od čovjeka. Razlike u odgovoru se mogu pripisati razlikama u staničnom rastu, kinetici i sposobnosti popravljivanja DNA između riba i sisavca. Linija ribljih stanica raste na nižim temperaturama od stanica sisavaca i imaju dulje vrijeme udvostručenja, a studije su pokazale da riblje stanice imaju nižu stopu i kapacitet popravljivanja DNA od sisavaca (Kienzler i sur. 2013; www.cytothreath.eu). Iako su koncentracije koje izazivaju genotoksične učinke bile mnogo veće od koncentracije očekivane u okolišu, rezultati impliciraju da se u vodenom okolišu nakon kroničnog izlaganja ostacima citostatskih lijekova, genotoksični učinci i njihove posljedice u ribama ne mogu isključiti. Ova pretpostavka može biti potkrijepljena opažanjima iz ljudskih epidemioloških studija o pacijentima na terapiji cistostaticima i profesionalnom izloženošću. Ta su istraživanja pokazala kromosomsko oštećenje limfocita (Burgaz i sur. 2002; Chrysostomou i sur. 1984; Kopjar i sur.

2009; www.cytothreath.eu) kao i u stanicama raslojenog bukalnog epitela (Cavallo i sur. 2005; www.cytothreath.eu).

Rad objavljen od strane Kovacs i suradnika (2016) izvještava o nalazima akutne toksičnosti u studiji koja uključuje četiri citostatska lijeka: 5-fluorouracil (5-FU), cisplatin (CDDP), etopozid (ET) i imatinib mesilat (IM) u embrijima zebrića (*Danio rerio*) i u odraslih riba, te subkroničnu toksičnost 5-FU i IM u ranoj životnoj fazi (Kovacs i sur., 2016). Za ispitivane lijekove karakteristična je slaba akutna i subkronična toksičnost, što ukazuje na nisku osjetljivost na riba prema tim lijekovima. Međutim, ranije objavljena studija (Kovacs i sur., 2015) izvještava o tome kako je kronična izloženost dviju generacija zebrića 5-fluorouracilu u okolišno relevantnim koncentracijama (10 ng/L) uzrokovala histopatološke promjene u jetri i bubrezima, narušavanje njihova integriteta DNA i izazvala ogromne promjene cijelog transkripta. Može se zaključiti da se preporučeni standardni testovi akutne i subakutne toksičnosti smjernice EMA (EMA, 2006; www.cytothreath.eu) nisu odgovarajuće za predviđanje potencijalnih zakašnjelih štetnih učinaka lijekova protiv raka. Za predviđanje štetnog učinka reaktivnih antikancerogenih lijekova na DNA kralješnjaka, preporučuju se studije toksičnosti za kroničnu izloženost s detekcijom genotoksičnog potencijala (Kovacs i sur., 2016; www.cytothreath.eu). Kundi i suradnici istraživali su genotoksičnost binarne mješavine 5-FU, CDDP, ET i IM u vrstama *Daphnia magna* i *Ceriodaphnia dubia* pomoću komet testa, odnosno elektroforeze pojedinačnih stanica (SCGE) (Kundi i sur., 2016; www.cytothreath.eu). To je relativno jednostavna, osjetljiva i kvantitativna metoda izučavanja DNA oštećenja (uključujući oksidacijska oštećenja) i popravka na razini pojedinačne stanice tj. određivanja genotoksičnosti (Tice i sur. 2000; www.cytothreath.eu). Rezultati dobiveni za *D. magna* pokazali su neovisno djelovanje koje je proizvelo aditivne učinke za smjese. Izuzetak je IM + 5-FU koji imaju antagonističku interakciju. U *C. dubia*, većine smjesa su imale antagonističke interakcije, osim IM + 5-FU i IM + CDDP koje su pokazale neovisnost. To potvrđuje nalaze prethodne studije o reproduktivnoj toksičnosti *D. magna* i *C. dubia* koja pokazuje da je većina tih binarnih mješavina djelovala neovisno (Parrella i sur., 2014a; www.cytothreath.eu). Kada se uspoređuju efektivne koncentracije binarnih mješavina prema jednostrukim spojevima (Parrella i sur., 2014b; www.cytothreath.eu), kombinacije lijekova protiv raka mogu biti briga za okoliš jer se njihovi učinci pojavljuju pri vrlo niskim koncentracije koje su u rasponu postojećih koncentracija u vodenim sustavima (Kundi i sur., 2015; www.cytothreath.eu).

Eleršek i suradnici su testirali učinak mješavine 5-FU + IM + ET na inhibiciju rasta zelene alge *Pseudokirchneriella subcapitata* i cijanobakterije *Synechococcus leopoliensis* (Eleršek i sur.,

2016; www.cytothreath.eu). Pri niskoučinkovitim koncentracijama, učinak je bio u *P. subcapitata* jasno sinergističan, dok je u *S. leopoliensis* bio je blizak aditivnom, te je *P. subcapitata* bio osjetljiviji od *S. leopoliensis*. Osim toga, prethodno ispitivanje binarnih mješavina antikancerogenih lijekova otkrilo je da su alge bile osjetljivije od cijanobakterija, kao i to da ove mješavine mogu imati sinergijske ili antagonističke efekte ovisne o spojevima i vrsti koja se. Ovi podaci pružaju potvrdu da podaci o toksičnosti za jedan spoj nisu dovoljni za predviđanje toksičnosti lijekova protiv raka za vodeni okoliš. analizira (Brezovšek i sur., 2014; www.cytothreath.eu).

4.2.4. Učinak na biljne organizme

U Cytotreath projektu opisani su i učinci na biljne organizme (www.cytothreath.eu). Citostatski lijekovi uzrokuju oštećenje genetskog materijala što može utjecati i na plodnost viših organizama, mada još uvijek nema dovoljno istraživanja na tu temu. Akutna toksična i genotoksična svojstva ovih lijekova na više biljke su predmet studije Mišika i suradnika gdje su proučavani najčešće korištene lijekove (5-fluorouracil, etopozid, cisplatin, karboplatin, vinkristin sulfat i ciklofosfamid monohidrat) u ispitivanju nastajanja mikronukleusa u mejotičkim tetradnim peludnim stanicama *Tradescantia* i sa stanicama iz korijena *Allium cepa* (Mišik i sur., 2014; www.cytothreath.eu). Mikronukleusi nastaju kao posljedica kromosoma prijelomi i aneuploidija. Pratili smo i akutna toksična svojstva lijekova, tj. inhibiciju podjele stanica (mitotički indeksi i retardacija rasta korijena) u potonjoj vrsti. Svi spojevi uzorkovali su genotoksične učinke u obje indikatorske biljke. Redoslijed genotoksičnih potencijala izražen kao NOEL (engl. no observed effect concentration) u mM bio je cisplatin (0,1) > etopozid (0,5) > ciklofosfamid monohidrat (1,0) > cisplatin (10) > 5-FU (30) > vinkristin sulfat (100) u *Tradescantia*. Sličan je red bio viđen u mikronukleusima *Allium*-a, ali etopozid je bio manje aktivan (5,0 mM). Četiri spoja uzrokovala su promjene mitotičkog indeksa u sadašnjim uvjetima; cisplatin (0,5), etopozid (10,0), 5-FU (10,0) i vinkristin sulfat (100). Inhibicija rasta korijena smanjivala se redom cisplatin (0,5) > etopozid (1,0) > vinkristin sulfat (1,0) > 5-FU (5,0) > karboplatin (33,0) > ciklofosfamid monohidrat (>1000). Usporedba NOEL-a s predviđenim koncentracijama u okolišu (eng. Predicted Environmental Concentration, PEC) pokazuje da potonje su vrijednosti najmanje za 5 redova veličine niže i pokazuju da je malo vjerojatno da će njihovo otpuštanje u okolišu izazvati štetne učinke u višim biljkama. Međutim,

primjetno je da spojevi platine i 5-FU u bolničkim otpadnim vodama mogu doseći razine koje mogu izazvati oštećenje genetskog materijala (Mišik i sur., 2014; www.cytothreath.eu).

Kasnije provedena studija ' Analiza kombiniranog djelovanja citostatskih lijekova na stvaranje mikronukleusa u *Tradescantia*' (Mišik i sur., 2016a; www.cytothreath.eu), za cilj je imala utvrditi izazivaju li smjese lijekova koji su među najkorištenijima u terapiji (5-FU, cisplatin, etopozid i imatinib mesilat) sinergističke ili antagonističke učinke koji mogu imati utjecaja na njihovu sigurnost u okolišu. Stoga su učinci binarnih mješavina ovih antikancerogenih lijekova na indukciju stvaranja mikronukleusa procijenjene u tetradama *Tradescantia*. Sinergistički/antagonistički efekti određeni su usporedbom s pojedinačnim ekspozicijama koje bi bile jednako učinkovite u referentnom modelu neovisnog djelovanja. Ova je usporedba izvedena u dvije različite veličine učinka. Pronađeni su jasni dokazi za sinergizme u kombiniranim eksperimentima s imatinibom i antagonizmom u eksperimentu s visokim dozama s etopozidom i 5-FU. Ti nalazi su pokazali da imatinib povećava genotoksične učinke drugih antikancerogenih lijekova. Maksimalni dokazani učinci bili su u rasponu između 19 i 38% većeg učinka u odnosu na one predviđene neovisnim djelovanjem. Ti učinci mogu utjecati na ukupne genotoksične aktivnosti nepročišćenih bolničkih otpadnih voda, ali ne i na okoliš općenito, jer su predviđene koncentracije ispitivanih lijekova u okolišu nekoliko narednih stupnjeva niže od razina koja je potrebna da izazove indukciju mikronukleusa u više biljke (Mišik i sur., 2016a; www.cytothreath.eu).

Za proučavanje utjecaja široko korištenih antikancerogenih lijekova (cisplatin, etopozid i 5-fluorouracil) na reprodukciji viših biljaka, provedeni su i eksperimenti s "pobačajem peluda" kod vrsta koji pripadaju većim biljnim porodicama, *Tradescantia paludosa* (*Commelinaceae*), *Arabidopsis thaliana* (*Brassicaceae*), *Chelidonium majus* (*Papaveraceae*) i *Alisma plantago-aquatica* (*Alismataceae*). Svi spojevi povećavali su frekvencije abortivnih zrna. Najniže učinkovite doze bile su općenito u uskom rasponu (tj. 1 i 10 mg / kg suhog tla). Učinci pojedinih lijekova bili su slični u *T. paludosa*, *A. plantago-aquatica* i *Ch. majus*, dok je *A. thaliana* bila dosljedno manje osjetljiva. Najviša stopa pobačaja postignuta je u većini pokusa sa cisplatinom, a zatim 5-FU i etopozidom. Usporedbe doza koje su uzrokovale efekte u sadašnjim eksperimentima na različite vrste s predviđenim koncentracijama u okolini i s razinama citostatika koji su bili otkrivene u bolničkim otpadnim vodama, pokazuju da su realne koncentracije lijekova u okolini 4-6 redova veličine niže. Stoga je malo vjerojatno da su ti lijekovi utječu na plodnost viših biljaka u vodenim i kopnenim ekosustavima. (Mišik i sur., 2016b; www.cytothreath.eu)

4.2.5. Procjena rizika za ljude

U Cytotreath projektu opisana je i procjena rizika na ljude (www.cytothreath.eu). Ispitivanja utjecaja citostatika na okoliš u različitim uvjetima i metodama rezultirala su izračunavanjem predviđenih koncentracija bez učinka (engl. Predicted No-Effect Concentration, PNEC) i količnika rizika (engl. Risk Quotient, RQ) uspoređujući PNEC s predviđenim koncentracijama u okolišu (PEC vrijednosti) i izmjerenim koncentracijama (engl. Maximum Environmental Concentration, MEC) u otpadnim vodama. Najosjetljivije vrste u pokusima koji se tiču akutnih toksičnih i dugoročnih učinaka bile su općenito rakovi (*Daphnia magna*, *Ceriodaphnia dubia*) nakon kroničnog liječenja, a najizraženiji efekti detektirani su s imatinibom, zatim cisplatinom i 5FU. Usporedbe vrijednosti PNEC-a i PEC-a pokazuju da je malo vjerojatno da otpuštanje tih lijekova u vodene sredine dovodi do štetnih učinaka (vrijednosti RQ <1). Međutim, kada su provedene procjene s MEC-om u visoko kontaminiranim komunalnim otpadnim vodama i bolničkim otpadnim vodama, dobivene su vrijednosti RQ-a koje su indikativne za umjerene štetne učinke imatiniba. Izračuni s podacima iz pokusa genotoksičnosti i PEC vrijednosti indikativni su za povećane vrijednosti RQ za sve spojeve, osim etopozida. Najosjetljivije vrste bile su ribe (*Danio rerio*) koje su bile vrlo osjetljive na 5FU i dafnidi koji su bili osjetljivi na cisplatin i imatinib. Kad su za proračun korišteni podaci o okolišu (iz otpadnih voda), za cisplatin i imatinib se dobivaju visoke vrijednosti RQ (> 100). Ovi ukupni zaključci nisu bitno izmijenjeni kada su uzeti u obzir učinci drugih često korištenih citostatskih lijekova i kombinirani učinci mješavina antikancerogenih lijekova. Rezultati ovih procjena naglašavaju važnost učinkovitog uklanjanja tih kemikalija poboljšanim strategijama za obradu otpadnih voda i potrebu daljnjih istraživanja štetnih dugoročnih učinaka citostatika u vodenoj bioti kao posljedica oštećenja genetskog materijala kod visoko osjetljivih vrsta (Mišik i sur., 2019)

4.3. Uloga farmaceuta

U posljednjih 20 godina bilo je mnogo istraživanja o prisutnosti lijekova u okolišu, utjecaju farmaceutskog otpada i zbrinjavanju lijekova u zajednici. Međutim, vrlo je malo istraživanja stavova i ponašanja farmaceuta u pogledu zbrinjavanja farmaceutskog otpada. U znanstvenim radovima se naglašava važnost istraživanja i zbrinjavanja neiskorištenih lijekova (Daughton i Ruhoy, 2008; Koshy, 2013; Tong i sur., 2011.) i za istraživanje stavova farmaceuta u pogledu zbrinjavanja neželjenih lijekova i njihovo znanje o najprikladnijim metodama za to (Koshy,

2013). Ljekarnici mogu igrati vrlo važnu ulogu u poticanju ekološkog odgovornog postupanja s farmaceutskim otpadom, čak bi ta uloga mogla biti od veće važnosti u kontekstu bolničkih ljekarni u usporedbi s kontekstom ljekarne u zajednici. Jedan od razloga za to je taj da bolnički ljekarnici imaju širu sferu utjecaja na upotrebu i odlaganje lijekova ne samo da pacijentima distribuiraju lijekove, već i opskrbljuju lijekovima ostale odjele u bolnici. Odjel bolničke ljekarne opskrbljuje vanjske klinike, kao što su primjerice onkološke klinike, s lijekovima koji se koriste u njihovoj kliničkoj praksi, kao i izravno opskrbljivanje pacijenata lijekovima na recept. Ova dvojna uloga (opskrba i izdavanje) znači da bolnički ljekarnici imaju široku sferu utjecaja na uporabu lijekova u bolničkim uvjetima. Ova sfera utjecaja artikulirana je u "Izjavama o konsenzusu" dogovorenim na konferenciji (FIP 2008; FIP, 2014). Opće izjave zahtijevaju da bolnički ljekarnici budu uključeni u sve korake u opskrbi lijekovima unutar bolnice i da bi glavni ljekarnik/direktor ljekarne trebao biti viši stručnjak odgovoran za koordinaciju razumnih, sigurnih, djelotvornih, primjerenih i isplativa uporaba lijekova u bolnici. Bolnički ljekarnici trebali bi biti odgovorni za logistiku svih lijekova unutar bolničkih okruženja i trebali bi služiti kao izvor za sve informacije o lijekovima, pružajući edukaciju drugim zdravstvenim radnicima o najboljim praksama za uporabu lijekova. Sfere utjecaja izražene u ovim izjavama kao teme uključuju nabavu, propisivanje lijekova (bolnički ljekarnici trebali bi imati ključnu ulogu u edukaciji liječnika o pristupu i dokazima za optimalnu i odgovarajuću uporabu lijekova) te pakiranje, označavanje i skladištenje lijekova u cijelosti bolnica (FIP 2008; FIP, 2014). Dakle, može se vidjeti da se sfera utjecaja bolničkih ljekarnika proteže izvan granica bolničke ljekarne (Singleton i sur., 2014).

Kroz svoj angažman u kliničkim istraživanjima u onkologiji, farmaceut daje važan doprinos osiguravanju kvalitete ispitivanog lijeka i tako prikupljenih podataka u kliničkom ispitivanju. Farmaceut je odgovoran za pravilan prijem, skladištenje, rekonstituciju (ili proizvodnju), izdavanje i ispravno odlaganje i zbrinjavanje ispitivanog lijeka, a u konačnici i dokumentiranje na temelju važećih zakonskih propisa. Farmaceutsko - onkološke usluge čine važan doprinos istraživačkim aktivnostima. Rezultati istraživanja i razvoja poboljšavaju učinkovitost, prikladnosti i kvalitetu ponuđenih postupaka i usluga. U svakom istraživačkom okruženju, uključujući farmaceutske znanosti, kvalificirani ljekarnici trebali bi biti uključeni u izradu i provođenje istraživanja. Ljekarnički tim je uslužno orijentiran pružajući farmaceutske konzultacije i njegu u praksi. Kao dio farmakološko - onkološke službe, ljekarnik obavlja i stručne konzultacije s nazočnim liječnicima i osobljem odgovornim za njegu bolesnika. Ove aktivnosti čine sastavnicu farmaceutske skrbi orijentirane prema pacijentima koji boluju od raka.

Provedba konzultacija i usluga skrbi zahtijeva strukturirani pristup zaposlenika u odjelu citostatika u suradnji s farmaceutima koji rade u ambulanti ili na odjelu (Quapos 5,2014; QuapoS 6, 2018).

Svojom profesionalnom predanošću kvalitetnoj uporabi lijekova i aktivnim sudjelovanjem u načinu upravljanja lijekovima, farmaceuti već igraju važnu ulogu u održivijoj upotrebi lijekova. Unatoč tome, oni imaju potencijal igrati još veću ulogu u ekološkom odgovornom odlaganju farmaceutskog otpada i edukaciji drugih zdravstvenih djelatnika i šire javnosti o ovoj temi. Na nacionalnoj razini, provedba i aktivna promocija ljekarničkih inicijativa u zajednici, poput australskog RUM projekta, koji potiču javnost da vrate neželjene lijekove u ljekarne radi ispravnog odlaganja, umanjit će negativan utjecaj lijekova na okoliš. Također, zdravstvene organizacije trebaju pokazati vodeću ulogu ohrabrujući ljekarnike i drugo medicinsko osoblje kako u bolnicama, tako i u ljekarnama u zajednici, da odvoje nekontaminirani ambalažni otpad od kontaminiranog otpada. Spaljivat će se manje otpada čime će se smanjiti ugljični otisak i troškovi gospodarenja otpadom u bolnici, a ako farmaceuti mogu reciklirati ili razrezati ambalažni otpad za kompostiranje, manje otpada na odlagalištu (Singleton i sur., 2014).

S druge strane, uloga farmaceuta u očuvanju okoliša može doći do izražaja i u procesu proizvodnje lijekova što se krije pod nazivom zelena farmacija, a temelji se na dizajnu lijekova koji imaju isti terapijski, ali povoljniji ekotoksikološki profil. S regulacijskim zabranama lijekova, taj će pristup postati sve važniji. To pokazuje da moratoriji ili zabrane, zbog zaštite ljudi i prirode, nisu nužno usmjereni protiv razvoja, već, naprotiv, mogu poticati inovativnost i otvarati prostore za nova istraživanja (Vrček, 2017).

5. Zaključci

Procjena rizika prisutnosti citostatika u okolišu je od sve većeg značaja iz više razloga. Naime, incidencija oboljenja od raka se povećava s godinama, a u modernim društvima se očituje i kontinuirano povećanje udjela osoba starije životne dobi što diktira veću uporabu navedenih lijekova. Nadalje, produljenjem životnog vijeka oboljelih, dolazi i do produženja terapije, isto kao što se znaju povećavati režimi doziranja pa se sve veće koncentracije lijeka i metabolita pojavljuju u okolišu. Ne smije se zanemariti i činjenica da u novije vrijeme dolazi i do preraspodjele korištenja lijekova za indikacije koje nisu primarno bile zamišljene, pa se tako primjerice citostatik metotreksat može naći u terapiji reumatskih oboljenja. Sve to ide u prilog povećanju svjesnosti o praćenju rizika tih snažno djelujućih lijekova i nakon njihove primjene pacijentima koji ih koriste kao terapiju. Istraživanja su pokazala da su niske koncentracije citostatika prisutne u okolišu te da je to uvjetovalo otkrivanje novih analitičkih metoda ili optimiranje starih kako bi bile što osjetljivije. Ipak, mjesta za napredak još ima budući da nije još nađena univerzalna metoda primjerena za otkrivanje svih skupina citostatika. Otkriveni su i biološki modeli kao što su jetrene stanice zebrića koje mogu biti koristan pokazatelj utjecaja stvarnih okolišnih koncentracija citostatika na žive organizme. Pokazalo se da utjecaj nije zanemariv niti na vodene niti na biljne organizme, a i to da kronična izloženost predstavlja još veći problem nego ona akutna. Predložene su i kritične koncentracije pri kojima se može opaziti učinak te one pri kojima se javlja neki rizični učinak. Dosadašnji objavljeni radovi su na dobrom tragu, ali je potrebno povećati interes prema ekološkoj svijesti, pogotovo kad uzmemo u obzir porast zagađivala, kao što su lijekovi, o kojima još uvijek danas nemamo dovoljno saznanja. Velika odgovornost pada na farmaceute; prvenstveno ljekarnike koji imaju najbolju poziciju za educirati pacijente i širu javnost o smanjenju farmaceutskog i medicinskog otpada, a samim time i njihovu prisutnost u okolišu. Također, može se djelovati i preventivno na smanjenje štetnih kemikalija i ograničavanje rada na educirane i odgovorne pojedince u procesu proizvodnje, u procesu odgovorne i propisne uporabe i odlaganja, te u kontekstu važećih propisa i trenda zelene farmacije.

6. Literatura

Allwood M, Stanley A, Wright P. The cytotoxics handbook, Oxford, Radcliffe Medical Press, 2002.

Antonijević B. Antineoplastici–procena rizika. *Arh Farm*, 2012, 62, 101-110.

BC Cancer Agency Cancer Drug Manual, 2017, www.bccancer.bc.ca, pristupljeno 20.8.2019.

Bernabeu-Martínez MA, Ramos Merino M, Santos Gago JM, Álvarez Sabucedo LM, Wanden-Berghe C, Sanz-Valero J. Guidelines for safe handling of hazardous drugs: A systematic review. *PLoS One*, 2018, 13, e0197172.

Besse JP, Latour JF, Garric J. Anticancer drugs in surface waters. What can we say about the occurrence and environmental significance of cytotoxic, cytostatic and endocrine therapy drugs? *Environ Int*, 2012 39,73–86.

Bhardwaj, S.K., Dwivedi, K., Agarwal, D.D. A Review: HPLC Method Development and Validation. *Int J. Anal Bioanal Chem*, 2015, 5, 76-81.

Brezovšek P, Eleršek T, Filipič M. Toxicities of four anti-neoplastic drugs and their binary mixtures tested on the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata* and the cyanobacterium *Synechococcus leopoliensis*. *Water Res*, 2014, 52, 168–177.

Buerge IJ, Buser HR, Poiger T, Müller MD. Occurrence and Fate of the Cytostatic Drugs Cyclophosphamide and Ifosfamide in Wastewater and Surface Waters. *Environ Sci Technol*, 2006, 40, 7242-7250.

Burgaz S, Karahalil B, Canhi Z, Terzioglu F, Ançel G, Anzion RB, Bos RP, Hüttner E. Assessment of genotoxic damage in nurses occupationally exposed to antineoplastics by the analysis of chromosomal aberrations. *Hum Exp Toxicol*, 2002, 21, 129–135.

Cavallo D, Ursini CL, Perniconi B, Francesco AD, Giglio M, Rubino FM, Marinaccio A, Iavicoli S. Evaluation of genotoxic effects induced by exposure to antineoplastic drugs in

lymphocytes and exfoliated buccal cells of oncology nurses and pharmacy employees. *Mutat Res*, 2005, 587, 45–51.

Chen W, Shen Y, Rong H, Lei L, Guo S. Development and application of a validated gradient elution HPLC method for simultaneous determination of 5-fluorouracil and paclitaxel in dissolution samples of 5-fluorouracil/paclitaxel-co-eluting stents. *J Pharm Biomed Anal*, 2012, 59, 179-83.

Chrysostomou A, Seshadri R, Morley AA. Mutation frequency in nurses and pharmacists working with cytotoxic drugs. *Aust N Z J Med*, 1984, 14, 831–834.

Daughton CG, Ruhoy IS. The afterlife of drugs and the role of pharmEcovigilance. *Drug Safety*, 2008, 31, 1069-1082.

Denny BJ, Wheelhouse RT, Stevens MFG, Tsang LLH, Slack JA. NMR and Molecular Modeling Investigation of the Mechanism of Activation of the Antitumor Drug Temozolomide and Its Interaction with DNA. *Biochemistry*, 1994, 33, 9045-9051.

DoH (Department of Health) (2004) Variations in usage of cancer drugs approved by NICE. Report of the review undertaken by the National Cancer Director, 2004, London: Department of Health.

EMA (European Medicines Agency), Guideline on the environmental risk assessment of medicinal products for human use, 2006, London.

Eleršek T, Milavec S, Korošec M, Brezovšek P, Negreira N, Zonja B, Alda ML, Barceló D, Heath E, Ščančar J, Filipič M. Toxicity of the mixture of selected antineoplastic drugs against aquatic primary producers and their behaviour under the applied exposure conditions. *Environ Sci Pollut Res*, 2016, 23, 14780–14790.

FIP (2008) Consensus Statements, International Pharmaceutical Federation, 2008, Den Haag, www.fip.org, pristupljeno 05.09.2019.

FIP (2014), Consensus Statements, International Pharmaceutical Federation, 2014, Den Haag, www.fip.org, pristupljeno 05.09.2019.

Gajski G, Gerić M, Žegura B, Novak M., Nunić J, Bajrektarević D, GarajVrhovac V, Filipič M. Genotoxic potential of selected cytostatic drugs in zebrafish liver cell line, human hepatoma HepG2 cells and human lymphocytes. *Environ Sci Pollut Res*, 2016, 23, 14739.

Garcia-Ac A, Segura PA, Viglino L, Gagnon C, Sauve S. Comparison of APPI, APCI and ESI for the LC-MS/MS analysis of bezafibrate, cyclophosphamide, enalapril, methotrexate and orlistat in municipal wastewater. *Journal of mass spectrometry:JMS*, 2011, 46, 383-90.

Gerić M, Gajski G, Garaj-Vrhovac V. Lijekovi u okolišu: drugo lice protutumorskih lijekova, *Priroda*, 2017, 34-35.

He S, Dong D, Zhang X, Sun C, Wang C, Hua X, Zhang L, Guo Z. Occurrence and ecological risk assessment of 22 emerging contaminants in the Jilin Songhua River (Northeast China). *Environ Sci Pollut Res Int*, 2018, 25, 24003-24012.

Health Canada (2004) Progress report on cancer control in Canada, Health Canada, 2004, Ottawa.

Hignite C, Aznaroff DL. Drugs and drugs metabolites as environmental contaminants: chlorophenoxyisobutirate and salicylic acid in sewage effluent. *Life Sci*, 1977, 20, 337-41.

Huang CH, Sedlak DL. Analysis of estrogenic hormones in municipal wastewater effluent and surface water using enzyme-linked immunosorbent assay and gas chromatography/tandem mass spectrometry. *Environ Toxicol Chem*, 2001, 20, 133-9.

Izvešće o potrošnji lijekova u Republici Hrvatskoj u 2017. godini, 2018., <https://www.halmed.hr>, pristupljeno 07.08.2019.

Izvešće o umrlim osobama u Hrvatskoj u 2017. godini, 2018., <https://www.hzjz.hr>, pristupljeno 07.08.2019.

Jjemba P.K., Pharma-ecology: The Occurrence and Fate of Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment, John Wiley & Sons, Inc., 2008, str. 81-112.

Jukić S, Jukić D, Nola M. Neoplazme (novotvorine). U: Damjanov I, Jukić S. (ur.) Opća patologija. Medicinska naklada, Zagreb, 2002, 129-161.

Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ. Temeljna i klinička farmakologija. Jedanaesto izdanje. Medicinska naklada Zagreb, 2011, 935-962.

Kbc Osijek – laboratorij za citostatike, <http://www.glas-slavonije.hr>, pristupljeno 16.09.2019.

Kbc Zagreb – laboratorij za citostatike, <https://www.kbc-zagreb.hr>, pristupljeno 16.09.2019.

Kienzler A, Bony S, Devaux A. DNA repair activity in fish and interest in ecotoxicology: a review. *Aquat Toxicol*, 2013, 134–135, 47–56.

Kiffmeyer T, Götze HJ, Jursch M, Lüders U. Trace enrichment, chromatographic separation and biodegradation of cytostatic compounds in surface water. *Fresenius J Anal Chem*, 1998, 361, 185-191.

Klančar A, Zakotnik M, Roškar R, Trontelj J. Multi-residue analysis of selected pharmaceuticals in wastewater samples by stir-bar sorptive extraction followed by liquid desorption and liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal Methods*, 2017, 9, 5310.

Klančar A, Trontelj J, Roškar R. Development of a Multi-Residue Method for Monitoring 44 Pharmaceuticals in Slovene Surface Water by SPE-LC-MS/MS. *Water Air Soil Poll*, 2018, 229, 192.

Kopjar N, Pavlica V. Rukovanje pripravcima citotoksičnih lijekova u medicinskim ustanovama u Republici Hrvatskoj – genotoksični učinci i rizici profesionalne izloženosti, Knjiga sažetaka / Zorc, Branka (ur.). Zagreb: Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2005.

Kopjar N, Garaj-Vrhovac V, Kasuba V, Rozgaj R, Ramić S, Pavlica V, Zeljezić D. Assessment of genotoxic risks in Croatian health care workers occupationally exposed to cytotoxic drugs: a multibiomarker approach, *Int J Hyg Environ Health*, 2009, 212,414–431.

Koshy, S. Disposal of unwanted medications: throw, bury, burn or just ignore?, *Int J Pharm Pract*, 2013, 21, 131-134.

Kostopoulou M, Nikolaou A.D. Analytical problems and the need for sample preparation in the determination of pharmaceuticals and their metabolites in aqueous environmental matrices, *TrAC Trend Anal Chem*, 2008, 27, 1023-1035.

Kovacs R, Csenki Z, Bakos K, Urbanyi B, Horvath A, Garaj-Vrhovac V, Gajski G, Geric M, Negreira N, de Alda ML, Barcelo D, Heath E, Kosjek T, Zegura B, Novak M, Zajc I, Baebler S, Rotter A, Ramsak Z, Filipic M. Assessment of toxicity and genotoxicity of low doses of 5-fluorouracil in zebrafish (*Danio rerio*) two-generation study, *Water Res*, 2015, 77, 201–212.

Kovacs R, Bakos K, Urbnyi B, Kovesi J, Gazsi G, Csepeli A, Appl ĀJ, Bencsik D, Csenki Z, Horvath A. Acute and sub-chronic toxicity of four cytostatic drugs in zebrafish, *Environ Sci Pollut Res*, 2016, 23, 14718–14729.

Kovalova L, McArdell CS, Hollender J. Challenge of high polarity and low concentrations in analysis of cytostatics and metabolites in wastewater by hydrophilic interaction chromatography/tandem mass spectrometry, *J Chromatogr A*, 2009, 1216, 1100-1108.

Kundi M, Parrella A, Lavorgna M, Criscuolo E, Russo C, Isidori M. Prediction and assessment of ecogenotoxicity of antineoplastic drugs in binary mixtures, *Environ Sci Pollut Res*, 2016, 23, 14771–14779.

Laurie, D., Manson, A. J., Rowell, F., and Seviour, J. A Rapid Qualitative ELISA Test for the Specific Detection of Morphine in Serum or Urine, *Clin Chim Acta*, 1989, 183, 183-196.

Lenz K, Koellensperger G, Hann S, Weissenbacher N, Mahnik SN, Fuerhacker M. Fate of cancerostatic platinum compounds in biological wastewater treatment of hospital effluents, *Chemosphere*, 2007, 69, 1765-74.

Luterotti S. Uvod u kemijsku analizu. Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu 2014; str. 204,207,213, 215-218.

Malviya R, Bansal V, Pal OP, Sharma PK. High performance liquid chromatography: A short review, *Journal of Global Pharma Technology*, 2010, 2, 22-26.

Marinković N, Vitale K, Janev Holcer N, Džakula A. Zbrinjavanje medicinskog otpada – zakonodavstvo i njegova provedba, *Arh Hig Rada Toksikol*, 2006, 57, 339-345

Martin J, Camacho-Munoz D, Santos JL, Aparicio I, Alonso E. Simultaneous determination of a selected group of cytostatic drugs in water using high-performance liquid chromatography-triplequadrupole mass spectrometry, *J sep sci*, 2011, 34, 3166-77.

McCann SJ, White LO, Keevil B. Assay of teicoplanin in serum: comparison of high-performance liquid chromatography and fluorescence polarization immunoassay, *J Antimicrob Chemother*, 2002, 50, 107-10.

Mišik M, Pichler C, Rainer B, Filipic M, Nersesyan A, Knasmueller S. Acute toxic and genotoxic activities of widely used cytostatic drugs in higher plants: possible impact on the environment, *Environ Res*, 2014, 135, 196–203.

Mišik M, Filipič M, Nersesyan A, Mišiková K, Knasmueller S, Kundi M. Analyses of combined effects of cytostatic drugs on micronucleus formation in the *Tradescantia*, *Environ Sci Pollut Res*, 2016a, 23, 14762–14770.

Mišik M, Filipič M, Nersesyan A, Mišiková K, Knasmueller S, Kundi M. Impact of common cytostatic drugs on pollen fertility in higher plants, *Environ Sci Pollut Res*, 2016b, 23, 14730–14738.

Mišík M, Filipic M, Nersesyan A, Kundi M, Isidori M, Knasmueller S. Environmental risk assessment of widely used anticancer drugs (5-fluorouracil, cisplatin, etoposide, imatinib mesylate), *Water Res*, 2019, 164, 114953.

Mosby (2009) Mosby's medical dictionary, 8th ed. Elsevier. <http://medical-dictionary.thefreedictionary.com>, pristupljeno 20.8.2019.

Negreira N, Lopez de Alda M, Barcelo D. On-line solid phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of 17 cytostatics and metabolites in waste, surface and ground water samples, *J Chromatogr A*, 2013, 128.

Nigović B., Jurišić Grubišić R., Vuković J. Praktikum iz analitike lijekova II.dio. Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko- biokemijski fakultet 2007, str. 30-33.0, 64-74.

Parrella A, Lavorgna M, Criscuolo E, Russo C, Fiumano V, Isidori M. Acute and chronic toxicity of six anticancer drugs on rotifers and crustaceans, *Chemosphere*, 2014a, 115, 59–66.

Parrella A, Kundi M, Lavorgna M, Criscuolo E, Russo C, Isidori M. Toxicity of exposure to binary mixtures of four antineoplastic drugs in *Daphnia magna* and *Ceriodaphnia dubia*., *Aquat Toxicol*, 2014b, 157, 41–46.

Pavlica V, Procjena rizika u profesionalnoj izloženosti citotoksičnim lijekovima doktorska disertacija, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb, 2007.

Periša M, Babić S. Farmaceutici u okolišu. *Kem Ind*, 2016, 65, 471–482.

Petrović M, Škrbić B, Živančev J, Ferrando-Climent L, Barcelo D. Determination of 81 pharmaceutical drugs by high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry with hybrid triple quadrupole-linear ion trap in different types of water in Serbia. *Sci Total Environ*, 2014, 468-469, 415-28.

Project Deliverables D2.1. Analytical methods developed and validated, 2012, www.cytothreath.eu, pristupljeno 20.08.2019.

Pravilnik o gospodarenju medicinskim otpadom, 2015, Zagreb, Narodne novine, broj 50 (NN/50/2015).

Pravilnik o izmjenama i dopunama Pravilnika o gospodarenju medicinskim otpadom, 2019, Zagreb, Narodne novine, broj 56 (NN/56/2019).

Quapos 5, Quality Standard for the Oncology Pharmacy Service, 2014, www.esop.li, pristupljeno 09.09.2019.

Quapos 6, Quality Standard for the Oncology Pharmacy Service, 2018, www.esop.li, pristupljeno 09.09.2019.

Richardson SD, Kimura SY. Water Analysis: Emerging Contaminants and Current Issues. *Anal Chem*, 2016, 88, 546-82.

Roganović J. Kemoterapija: moderni lijekovi pobjeđuju rak. *Narodni zdravstveni list* 2004, 46, 532-533.

Rood D. The Troubleshooting and Maintenance Guide for Gas Chromatographers. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co; 2007, 4. izd., str. 3-6.

Sažetak projekta Cytothreath, www.cytothreath.eu, pristupljeno 20.08.2019.

Segen JC. The concise dictionary of modern medicine. McGrawHill, New York, 2002.

Singleton J, M. Nissen L, Barter N, McIntosh M. The global public health issue of pharmaceutical waste: what role for pharmacists? *Journal of Global Responsibility*, 2014, 5, 126-137.

Stewart BW, Wild CP. World cancer report, 2014, IARC Non Serial publication. WHO Press.

Stachniuk, A. i Fornal E. Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in the Analysis of Pesticide Residues in Food. *Food Anal. Methods*, 2016, 9, 1654–1665.

Suder P, Silberring J. Spektrometrija mas, Wydawnictwo UJ, Kraków, 2006, 51-65.

Tauxe-Wuersch A, De Alencastro LF, Grandjean D, Tarradellas J. Trace determination of tamoxifen and 5-fluorouracil in hospital and urban wastewaters. *Int J Env An C*, 2006, 86, 473-485.

Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen*, 2000, 35, 206–221.

Tong AYC, Peake BM, Braund R. Disposal practices for unused medications around the world. *Environ Int*, 2011, 37, 292-298.

Tuerk J, Kiffmeyer TK, Hadtstein C, Heinemann A, Hahn M, Stuetzer H, Kuss HM, Eickmann U. Development and validation of an LC–MS/MS procedure for environmental monitoring of eight cytostatic drugs in pharmacies. *Int J Env An C*, 2011, 91, 1178-1190.

Varadhachary GR, Hoff PM. Front-line therapy for advanced colorectal cancer: emphasis on chemotherapy. *Semin Oncol*, 2005, 35, 40–42.

Vrček V. Farmakoekologija – okolišna sudbina lijekova. *Kem. Ind.*, 2017, 66, 135–14.

Vrdoljak E, Šamija M, Kusić Z, Petković M, Gugić D, Krajina Z. Klinička onkologija. Medicinska naklada: Zagreb; 2013.

Waters Corporation, <http://www.waters.com>, pristupljeno 10.9.2019.

Yin J, Shao B, Zhang J, Li KJ. A preliminary study on the occurrence of cytostatic drugs in hospital effluents in Beijing, China. *Bull Environ Contam Toxicol*, 2010, 84, 39–45.

7. Sažetak

Citostatici ili antineoplastični lijekovi predstavljaju skupinu jako aktivnih sredstava koji se koriste u kemoterapiji, odnosno u liječenju malignih bolesti. S obzirom da se incidencija obolijevanja od istih povećava iz godine u godinu, posebice u razvijenim zemljama, povećava se i uporaba tih lijekova. Hrvatska spada u zemlje srednje pojavnosti, ali velike smrtnosti od raka te bilježi velike trendove u povećanju konzumacije navedenih lijekova. Iako su citostatici lijekovi koji se koriste u manjim dozama nego ostale skupine lijekova, ne smije se zanemariti činjenica da je njihovo djelovanje osmišljeno na principu sprječavanja ili proliferacije tumorskih stanica, no još uvijek su to slabo selektivne komponente koje su sposobne izazvati mutagena, genotoksična i slična oštećenja. Istraživanja su pokazala da se s razvojem novih i optimiranjem postojećih analitičkih metoda, kao i otkrivanjem raznih bioloških markera, utvrđuje sve više prisutnih citostatika u raznim okolišnim sustavima. Nađene koncentracije variraju ovisno o tipu i mjestu voda ili tla koji se uzorkuju, ali dovoljne su da postave pitanje o sigurnosti za cijeli ekosustav, a u konačnici i čovjeka. Problem pojavnosti tih lijekova u okolišu potječe i od procesa proizvodnje i istraživanja lijekova, kao i zdravstvenih ustanova. Nadalje, pacijent koji je u središtu brige zdravstvenih djelatnika, i sam je nositelj odgovornosti za okoliš, budući da i on pridonosi otpadu koji u njemu završava, bilo putem izlučevina ili pak nepravilnim zbrinjavanjem takvog otpada. Farmaceuti su bitna stavka u procesu poboljšanja trenutne situacije u tome što svojim obrazovanjem i djelatnošću mogu sudjelovati u mijenjanju svijesti, edukaciji opće populacije i načinu odnošenja prema tom problemu u svakom od navedenih izvora nepoželjnog otpada. Svekoliki angažman farmaceuta primjerice u osiguravanju kvalitete ispitivanih lijekova, ali i odgovornom skladištenju i distribuciji, okretanju prema zelenoj farmaciji, poštivanju i donošenju odgovarajućih propisa za korištenje i zbrinjavanje lijekova, konzultiranju s pacijentom te educiranju javnosti uvelike se može povećati kako bi se u konačnici postigao cilj, a to je očuvanje zdravlja i okoliša.

Summary

Cytostatics or antineoplastic drugs are a group of highly active agents used in chemotherapy or in the treatment of malignancies. As the incidence of these diseases increases year by year, especially in developed countries, the use of these drugs is increasing. Croatia is one of the countries with a medium incidence, but high mortality from cancer and has been showing great trends in increasing consumption of these drugs. Although cytostatics are drugs used at lower doses than other groups of drugs, their action is designed to prevent proliferation of tumor cells, but they are still poorly selective components capable of causing mutagenicity, genotoxicity, and the like damage. Research has shown that with the development of new and optimization of existing analytical methods, as well as the discovery of various biological markers, more and more cytostatics are found in various environmental systems. The concentrations found vary depending on the type and location of the water or soil being sampled, but are sufficient to raise the issue of safety for the entire ecosystem, and ultimately for humans. The problem of the occurrence of these drugs in the environment also originates from the process of production and research of drugs, as well as healthcare institutions. Furthermore, the patient who is at the center of the care of health professionals is himself the holder of environmental responsibility, since he also contributes to the waste that ends up in it, either through excretion or through the improper disposal of such waste. Pharmacists are an essential element in the process of improving the current situation in that, through their education and activity, they can participate in changing awareness, educating the general population and how to deal with this problem in each of these sources of unwanted waste. The pharmacist's overall engagement in ensuring the quality of the medicines tested, but also in the responsible storage and distribution, turning to green pharmacy, adhering to and adopting appropriate regulations for the use and disposal of medicines, consulting with the patient, and educating the public can greatly be increased to ultimately achieve the goal, which is to preserve health and the environment.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Samostalni kolegij (Toksikologija)
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

CITOSTATICI – ODGOVORAN I SIGURAN RAD – OČUVANO ZDRAVLJE I OKOLIŠ

Ivana Galić

SAŽETAK

Citostatici ili antineoplastični lijekovi predstavljaju skupinu jako aktivnih sredstava koji se koriste u kemoterapiji, odnosno u liječenju malignih bolesti. S obzirom da se incidencija obolijevanja od istih povećava iz godine u godinu, posebice u razvijenim zemljama, povećava se i uporaba tih lijekova. Hrvatska spada u zemlje srednje pojavnosti, ali velike smrtnosti od raka te bilježi velike trendove u povećanju konzumacije navedenih lijekova. Iako su citostatici lijekovi koji se koriste u manjim dozama nego ostale skupine lijekova, ne smije se zanemariti činjenica da je njihovo djelovanje osmišljeno na principu sprječavanja proliferacije tumorskih stanica, no još uvijek su to slabo selektivne komponente koje su sposobne izazvati mutagena, genotoksična i slična oštećenja. Istraživanja su pokazala da se s razvojem novih i optimiranjem postojećih analitičkih metoda, kao i otkrivanjem raznih bioloških markera, utvrđuje sve više prisutnih citostatika u raznim okolišnim sustavima. Nađene koncentracije variraju ovisno o tipu i mjestu voda ili tla koji se uzorkuju, ali dovoljne su da postave pitanje o sigurnosti za cijeli ekosustav, a u konačnici i čovjeka. Problem pojavnosti tih lijekova u okolišu potječe i od procesa proizvodnje i istraživanja lijekova, kao i zdravstvenih ustanova. Nadalje, pacijent koji je u središtu brige zdravstvenih djelatnika, i sam je nositelj odgovornosti za okoliš, budući da i on pridonosi otpadu koji u njemu završava, bilo putem izlučevina ili pak nepravilnim zbrinjavanjem takvog otpada. Farmaceuti su bitna stavka u procesu poboljšanja trenutne situacije u tome što svojim obrazovanjem i djelatnošću mogu sudjelovati u mijenjanju svijesti, edukaciji opće populacije i načinu odnošenja prema tom problemu u svakom od navedenih izvora nepoželjnog otpada. Svekoliki angažman farmaceuta primjerice u osiguravanju kvalitete ispitivanih lijekova, ali i odgovornom skladištenju i distribuciji, okretanju prema zelenoj farmaciji, poštivanju i donošenju odgovarajućih propisa za korištenje i zbrinjavanje lijekova, konzultiranju s pacijentom te educiranju javnosti uvelike se može povećati kako bi se u konačnici postigao cilj, a to je očuvanje zdravlja i okoliša.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 50 stranica, 1 grafički prikaz, 2 tablice i 87 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Citostatici, okoliš, toksičnost, otpad

Mentor: **Dr. sc. Irena Žuntar**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Irena Žuntar**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Milena Jadrijević-Mladar Takač, Izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Davor Šakić, Docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: rujan 2019.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Independent course (Toxicology)
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

CYTOSTATICS – RESPONSIBLE AND SAFE WORK – PRESERVED HEALTH AND THE ENVIRONMENT

Ivana Galić

SUMMARY

Cytostatics or antineoplastic drugs are a group of highly active agents used in chemotherapy or in the treatment of malignancies. As the incidence of these diseases increases year by year, especially in developed countries, the use of these drugs is increasing. Croatia is one of the countries with a medium incidence, but high mortality from cancer and has been showing great trends in increasing consumption of these drugs. Although cytostatics are drugs used at lower doses than other groups of drugs, their action is designed to prevent proliferation of tumor cells, but they are still poorly selective components capable of causing mutagenicity, genotoxicity, and the like damage. Research has shown that with the development of new and optimization of existing analytical methods, as well as the discovery of various biological markers, more and more cytostatics are found in various environmental systems. The concentrations found vary depending on the type and location of the water or soil being sampled, but are sufficient to raise the issue of safety for the entire ecosystem, and ultimately for humans. The problem of the occurrence of these drugs in the environment also originates from the process of production and research of drugs, as well as healthcare institutions. Furthermore, the patient who is at the center of the care of health professionals is himself the holder of environmental responsibility, since he also contributes to the waste that ends up in it, either through excretion or through the improper disposal of such waste. Pharmacists are an essential element in the process of improving the current situation in that, through their education and activity, they can participate in changing awareness, educating the general population and how to deal with this problem in each of these sources of unwanted waste. The pharmacist's overall engagement in ensuring the quality of the medicines tested, but also in the responsible storage and distribution, turning to green pharmacy, adhering to and adopting appropriate regulations for the use and disposal of medicines, consulting with the patient, and educating the public can greatly be increased to ultimately achieve the goal, which is to preserve health and the environment.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 50 pages, 1 figure, 2 tables and 87 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Cytostatics, environment, toxicity, waste

Mentor: **Irena Žuntar, Ph.D.** / *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Irena Žuntar, Ph.D.** / *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Milena Jadrijević-Mladar Takač, Ph.D. / *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Davor Šakić, Ph.D. / *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2019.