

The problem of occupational exposure to cytostatics used in veterinary practice

Miśkiewicz A., Cywińska A., Winnicka A., Division of Animal Pathophysiology, Department of Pathology and Veterinary Diagnostics, Faculty of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences – SGGW

The purpose of this paper was to present the health risk for veterinarians and their employees resulting from handling antineoplastic drugs. Since companion animals cancer chemotherapy has been gaining popularity, the occupational exposure to antineoplastic agents, that is well known in human oncology, occurred also in veterinary practice. In human medicine, specific guidelines for safe work with hazardous drugs have been established. Their implication and implementation have led to reduction in occupational exposure to these agents. These guidelines have been transferred directly to veterinary medicine, that may not be completely adequate, because they are based primarily on human and experimental animals studies. The knowledge about occupational exposure to cytostatic drugs in veterinary medicine still remains scanty, as it arises from rare researches. Therefore, further investigation about pharmacokinetics of antineoplastic drugs in various species as well as environmental and biological monitoring of occupational exposure are still needed. Nevertheless, in both, human and veterinary oncology, the potential harmful effects associated with handling cytostatic drugs are widely known. They are highly toxic to the cells, mainly by affecting the cell proliferation. Many of them have also proved to be carcinogens, mutagens or teratogens. Veterinary care workers, who prepare or administer antineoplastic drugs or who work in areas where these drugs are used, may be exposed to these agents in the air or on multiple work surfaces, contaminated clothing, medical equipment and excretions of treated animals. This also applies to pet owners, who take care of their animals during treatment. Hence, each potentially exposed population, should get familiar with current knowledge and take special precautions when handling cytostatic drugs and nursing treated animals.

Keywords: cytostatic drugs, occupational exposure, antineoplastic agents, veterinary oncology, carcinogenicity.

Postępy w leczeniu, profilaktyce i diagnostyce chorób u psów i kotów sprawiły, że zwierzęta te częściej dożywają późnej starości. W konsekwencji pojawiają się u nich zaburzenia zdrowia charakterystyczne dla wieku podeszłego, do których można zaliczyć nowotwory stanowiące obecnie jedną z częstszych przyczyn śmierci psów i kotów (1, 2). Począwszy od lat siedemdziesiątych XX wieku dokonali się znaczny postęp w leczeniu chorób nowotworowych u tych zwierząt (2). Zarówno pies, jak i kot towarzyszą człowiekowi od tysięcy lat i często traktowani są jak członkowie

Problem zawodowego narażenia na cytostatyki stosowane w weterynarii

Alicja Miśkiewicz, Anna Cywińska, Anna Winnicka

z Zakładu Patofizjologii Zwierząt Katedry Patologii i Diagnostyki Weterynaryjnej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Warszawie

rodziny. Troska o ich zdrowie i chęć wydłużenia ich życia przyczyniły się do rozwoju opieki weterynaryjnej i konieczności wprowadzenia nowych metod leczenia, w tym chemioterapii. Mimo że wiąże się ona często z wysokimi kosztami, właściciele coraz chętniej decydują się na to rozwiązanie terapeutyczne. Wzrastają zatem zainteresowanie i kwalifikacje lekarzy weterynarii w zakresie onkologii weterynaryjnej, a liczba lecznic oferujących leczenie cytostatykami jest coraz większa. Długoletnie doświadczenie związane ze stosowaniem tych leków w medycynie i świadomość ich toksyczności wymusiły opracowanie zasad bezpiecznego obchodzenia się z nimi oraz z pacjentami, u których są one stosowane, w celu ochrony przed ich cytotoxycznością i karcynogennością. Analogicznie, wprowadzenie tych preparatów do leczenia zwierząt towarzyszących powinno nakładać na weterynarzy i właścicieli lecznic obowiązek właściwej ochrony otoczenia pacjenta przed szkodliwością leków cytostatycznych. Niestety w odróżnieniu od medycyny, w weterynarii brakuje odpowiednio opracowanych wytycznych bezpiecznej pracy z cytostatykami, które odnosiłyby się do danych na temat ich stosowania u zwierząt (farmakokinetyka, monitoring środowiskowy). Takie dane są wciąż nieliczne. Obecnie zasady pracy z cytostatykami przyjęte w weterynarii zostały przeniesione z medycyny i przestrzegane są w różnym stopniu, w zależności od miejsca, gdzie stosowane są te leki. Niekiedy nieświadomie pomijane są bardzo istotne punkty dotyczące bezpieczeństwa, co wynika z braku szkoleń i niskiej świadomości na temat szkodliwości cytostatyków dla pracowników weterynaryjnych i ich otoczenia.

Ekspozycja na cytostatyki

Do kontaktu z cytostatykami dochodzi podczas wielu rutynowych czynności, takich jak: przygotowywanie oraz podawanie leków, usuwanie opakowań z ich pozostałościami i zanieczyszczonej odzieży ochronnej, zmywanie narzędzi lub sprzątanie powierzchni oraz pomieszczeń, w których leki są przygotowywane. Do czynności, podczas których ryzyko ekspozycji na cytostatyki jest największe

zaliczane są: odpowietrzanie strzykawek z lekiem, sporządzanie roztworu do wstrzykiwań, mieszanie liofilizatu z rozpuszczalnikiem, odliczanie lub odsypywanie z opakowania niepowlekanych tabletek czy proszków, ich dzielenie – łamanie, miażdżenie i rozpuszczanie w wodzie, a także dotykanie zanieczyszczonych przez cytostatyki przedmiotów – strzykawek, igieł, fiolek i rękawiczek (3, 4). Przy braku odpowiednich zabezpieczeń i stosowania zasad bezpiecznego postępowania przy pracy z cytostatykami na ich działanie narażeni mogą być wszyscy pracownicy lecznic weterynaryjnych, włączając w to nie tylko lekarzy, ale też studentów, techników, a nawet osoby sprząające. Niektóre z cytostatyków mogą być podawane nie tylko przez onkologów, ale ze względu na dostępność tych leków w formie tabletek nawet przez właścicieli zwierząt, co znacznie rozszerza krąg ludzi narażonych na ich szkodliwe działanie (5). Może to dotyczyć na przykład leków wykazujących silne działanie immunosupresyjne (np. azatiopryna lub chlorambucil), które znajdują zastosowanie nie tylko w leczeniu chorób nowotworowych, ale również chorób o podłożu immunologicznym.

Biorąc pod uwagę zagrożenie dla otoczenia związane ze stosowaniem chemioterapii u zwierząt, bardzo istotny jest też kontakt z samym pacjentem, ponieważ krew, mocz, kał, ślina i wymiociny leczonych zwierząt mogą zawierać pewne ilości cytostatyku lub jego metabolitu (2, 3, 6). Uważa się, że kontakt z takim materiałem jest niebezpieczny dla zdrowia co najmniej przez 48 godzin po podaniu leku, a w niektórych przypadkach nawet do siedmiu dni (3, 7). Zależy to od farmakokinetyki leku (absorpcja, dystrybucja, metabolizm, eliminacja oraz wydalanie) i gatunku zwierzęcia (2). Szczególną ostrożność należy zachować podczas podawania chemioterapeutyków przeznaczonych dla ludzi, których parametry farmakokinetyczne u psów i kotów nie zostały dotąd zbadane (2). W wielu pracach opisujących zasady bezpiecznej pracy z cytostatykami w weterynarii, z powodu braku danych farmakokinetycznych konkretnego leku dla psów i kotów, podane są wartości określone dla człowieka lub zwierząt laboratoryjnych. Należy je traktować jedynie orientacyjnie,

ponieważ u psów i kotów wartości te mogą być inne (2, 8).

Zależnie od farmakokinetyki stosowanego leku, jego pozostałości, także w postaci metabolitów, mogą być obecne w różnych materiałach biologicznych pochodzących od pacjenta i stanowić źródło zagrożenia. Knobloch i wsp. (9, 10) badali pozostałości cyklofosfamidu, winkrystyny, winblastyny i doksorubicyny w moczu i surowicy psów z chłoniakami lub guzami z komórek tucznych (mastocytoma), stosując metodę chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas. Celem badań była ocena zagrożenia dla lekarzy weterynarii, właścicieli i innych osób mających kontakt z leczonym zwierzęciem, a także potencjalnego zanieczyszczenia środowiska. Po dokonaniu pomiarów w próbkach moczu zbieranych po 1 do 2 godzinach po podaniu leku stwierdzono najwyższe wyniki, natomiast w próbkach moczu z kolejnych dni wartości te malały. Średnie stężenie cyklofosfamidu w moczu pobranym w pierwszych trzech dniach, po podaniu doustnym i doustnym leku, pozostawało poniżej granicy wykrywalności (0,25 µg/l). Tymczasem stężenie winkrystyny w analogicznym okresie osiągało wartość wykrywalną i dopiero w siódmym dniu było poniżej granicy wykrywalności (0,5 µg/l). Z kolei stężenie winblastyny w próbkach moczu pacjentów utrzymywało się na niskim, ale wykrywalnym poziomie do 7 dnia po podaniu leku, a doksorubicyny aż do 21 dnia. Badanie surowicy przeprowadzono po doustnym podaniu cyklofosfamidu, winkrystyny, winblastyny lub doksorubicyny oraz po doustnym podaniu cyklofosfamidu, stosowanego do leczenia guzów z komórek tucznych łącznie z winblastyną (*i.v.*). Jak należało przypuszczać, we krwi pobranej do 5 minut po podaniu leków stwierdzono obecność wszystkich użytych chemioterapeutyków, co jednoznacznie wskazuje na krew jako potencjalne źródło zagrożenia dla otoczenia. Natomiast we krwi pobranej w kolejnych dniach pozostałości leków wykryto tylko w pojedynczych próbkach surowic, np. w jednej próbce stężenie winblastyny po tygodniu od podania wynosiło 7 µg/l (granica wykrywalności 0,25 µg/l) oraz w 2 z 12 próbek surowic pobranych 1–2 dni po podaniu doustnym cyklofosfamidu, którego stężenie wynosiło 7 i 9 µg/l (granica wykrywalności 0,25 µg/l).

Niestety wciąż brakuje kompleksowych informacji na temat farmakokinetyki cytostatyków stosowanych u zwierząt, a zwłaszcza u kotów. Ponadto w piśmiennictwie weterynaryjnym niewiele jest danych na temat problemu zawodowego narażenia lekarzy weterynarii na cytostatyki. W związku z tym obecnie niemożliwe jest wiarygodne określenie rzeczywistego ryzyka narażenia

na te substancje podczas ich stosowania u psów i kotów. Bez wątplenia jest to zagrożenie, któremu w związku z szybkim rozwojem onkologii weterynaryjnej powinno być poświęcone więcej uwagi.

Drogi wnikania cytostatyków ze środowiska do organizmu

Jedną z dróg wnikania cytostatyków do organizmu jest wdychanie zanieczyszczonych nimi cząsteczek kurzu, kropli lub pary (2, 11). W zależności od rodzaju chemioterapeutyku jego zawartość w próbkach powietrza może być różna. Na podstawie danych z piśmiennictwa nie stwierdzono, np. obecności platyny w powietrzu z pomieszczenia, gdzie stosowano pochodne cisplatyny (12), a cyklofosamid wykryto tylko w niewielkiej liczbie próbek powietrza pobranych w szpitalu, w którym obowiązywały i były przestrzegane wytyczne pracy z cytostatykami (13). Dokonano również oceny parowania doksorubicyny, paklitakselu i dakarbazyny, a wyniki wykazały stosunkowo niską zdolność parowania i lotność, co zostało potwierdzone dodatkowymi badaniami ich zawartości w powietrzu (14). W innych doświadczeniach liczba próbek powietrza, w których wykryto badany cytostatyk była mała, a próbki zawierały leki cytostatyczne w niskim stężeniu. Nie należy jednak ignorować ryzyka narażenia drogą wziewną, przede wszystkim ze względu na to, że taka ekspozycja podczas pracy ma zwykle charakter przewlekły oraz dlatego że istnieją wątpliwości co do czułości stosowanych dotychczas metod pomiarowych w powietrzu (14, 15).

Inną drogą wnikania cytostatyków do organizmu może być ich absorpcja przez skórę, głównie ręk, w wyniku bezpośredniego kontaktu z lekami oraz przedmiotami i powierzchniami, które są nimi zanieczyszczone, a także wydaliniami zwierząt po chemioterapii (11, 16, 17). Czynnikiem ułatwiającym kontakt jest brak lub zła jakość rękawiczek ochronnych, nieprzestrzeganie zasady ich częstej wymiany i natychmiastowej zmiany po uszkodzeniu. Jak wynika z doświadczeń jednego ze szpitali onkologicznych, większe niebezpieczeństwo dla pracowników niesie kontakt cyklofosfamidu ze skórą niż wdychanie jego drobin rozpylonych w powietrzu (13). W lecznicach weterynaryjnych zanieczyszczeniu cytostatykami mogą ulec podłogi, stoły, okolice zlewu, a nawet toalety podczas opróżniania worków z moczem lub usuwania chusteczek czy ręczników papierowych zanieczyszczonych moczem, kałem lub śliną leczonych zwierząt (2, 3). Ponadto zanieczyszczenie skóry rąk sprzyja wnikaniu szkodliwych substancji drogą alimentarną, dlatego przy pracy z cytostatykami bardzo istotne jest

zachowanie higieny, przestrzeganie zakazu spożywania posiłków, picia napojów i palenia papierosów. Należy również pozbyć się odruchów wkładania osłon od igieł lub strzykawek do ust oraz innych nawyków mogących zwiększać ryzyko wnikania leków tą drogą. W toku pracy lekarza nie można wykluczyć przypadkowego zakucia igłą lub skałeczenia, prowadzącego do zanieczyszczenia rany cytostatykiem. Uważa się, że spośród wszystkich możliwych dróg ekspozycji największe znaczenie ma droga wziewna i absorpcja przez skórę. Wprowadzenie cytostatyku do organizmu drogą doustną lub przez skałeczenie zwykle wynika z przypadkowych, nieumyślnych zachowań i zdarza się stosunkowo rzadko (3, 11). Sformułowanie oraz przestrzeganie zasad i wytycznych pracy z cytostatykami w medycynie przyczyniło się do znacznego zmniejszenia ekspozycji na te preparaty, jednak nadal ich śladowe ilości są wykrywane w organizmie pracowników (3, 11).

Monitoring środowiskowy i biologiczny cytostatyków

O ile monitorowaniu ekspozycji na cytostatyki w zakładach farmaceutycznych i szpitalach poświęcono wiele publikacji, to prace opisujące ten problem w weterynarii są nieliczne. Poznanie wiedzy na ten temat pozwala na ustalenie podstawowych, odpowiednich dla weterynarii zasad pracy z cytostatykami, niezbędnych w dążeniu do minimalizowania zagrożenia zdrowia ludzi. Ocena ekspozycji na cytostatyki obejmuje monitoring środowiskowy oraz biologiczny (biomonitoring), w ramach którego dokonuje się badania biomarkerów ekspozycji (narażenia) oraz biomarkerów efektów (skutków) biologicznych (18, 19). Monitoring środowiskowy umożliwia identyfikację potencjalnych źródeł ekspozycji i pozwala na ocenę efektywności metod stosowanych do zachowania bezpieczeństwa i higieny pracy (18). Obejmuje on ocenę próbek pobranych ze skażonych powierzchni w laboratoriach, np. z okolic komory laminarnej, zanieczyszczonych rękawiczek ochronnych lub próbek powietrza (20, 21). Obecność zanieczyszczeń cytostatykami w środowisku nie stanowi dowodu ich przenikania do organizmu ludzi (2). Uznaje się je jednak za potencjalne źródło zagrożenia zdrowia i należy dążyć do ich eliminowania.

Rolą biomonitoringu jest ocena narażenia populacji na szkodliwą substancję oraz badanie jej wpływu na organizm ludzki, z uwzględnieniem potencjalnych konsekwencji zdrowotnych. Rozwój choroby nowotworowej jest wynikiem ogółu zmian biologicznych i biochemicznych zachodzących w ludzkim organizmie. W ramach

biomonitoringu dokonuje się pomiarów biomarkerów, które umożliwiają scharakteryzowanie tych zmian i poszczególnych zdarzeń zachodzących pomiędzy ekspozycją na chemioterapeutyki a rozwojem choroby. Do biomarkerów ekspozycji należą mierzalne, obecne w organizmie, egzogenne substancje (w tym również chemioterapeutyki), ich metabolity lub produkty interakcji między szkodliwym czynnikiem i docelowymi komórkami lub cząsteczkami (18, 22, 23). Stwierdzenie obecności tych biomarkerów w tkankach lub wydalinach/wydzielinach nie wskazuje jednak jednoznacznie na wystąpienie zaburzeń zdrowia (2). W ocenie konsekwencji zdrowotnych pomocne może być oznaczenie biomarkerów efektów biologicznych, do których zaliczane są np. aberracje chromosomowe, występowanie mikrojąder w komórkach, wymiany chromatyd siostrzanych lub mutacje (24, 25, 26). Umożliwiają one ocenę występowania zmian funkcjonalnych lub strukturalnych, które są spowodowane działaniem szkodliwych związków, w tym leków przeciwnowotworowych (23). Zmiany te mogą pozostawać w ścisłym związku z rozwojem procesu nowotworowego. Biomarkery efektów biologicznych są często nieswoiste i odzwierciedlają całkowity efekt działania szkodliwych substancji w środowisku, na jakie narażona jest dana populacja. Palenie papierosów, spożywanie alkoholu, złe nawyki żywieniowe, zaawansowany wiek badanego lub częste zakażenia wirusowe mogą istotnie wpływać na interpretację wyników (2, 18, 24).

Wykorzystanie biomarkerów pozwala na wykazanie potencjalnych zależności pomiędzy ekspozycją a skutkiem zdrowotnym, umożliwia wykrycie zmian o charakterze przedklinicznym i oszacowanie ryzyka rozwoju nowotworu, stwarzając możliwość wdrożenia bardziej skutecznych działań profilaktycznych (23). W ostatnich latach zwiększyła się ilość oraz swoistość dostępnych do oceny biomarkerów, co poprawiło wiarygodność przewidywania ryzyka nie tylko w zakresie populacji, ale również na poziomie osobniczym (23, 27).

Mechanizm działania cytostatyków

Działanie cytostatyków polega na zaburzeniu cyklu komórkowego, a zależnie od grupy leków może być swoiste lub nieswoiste dla określonej fazy cyklu komórkowego (1, 3, 28). Zważywszy, że komórki nowotworowe charakteryzują częste podziały, są one bardziej podatne na uszkodzenia DNA niż komórki prawidłowe. Cytostatyki zatrzymują wzrost i podział komórek nowotworowych lub prowadzą do ich apoptozy (1). Nie mają one

jednak działania wybiórczego i oddziałują również na szybko dzielące się zdrowe komórki organizmu, takie jak: komórki szpiku kostnego, mieszków włosowych lub komórki nabłonkowe przewodu pokarmowego (1, 3).

Niektóre leki przeciwnowotworowe mogą również pobudzać wytwarzanie reaktywnych form tlenu (29, 30, 31). Antracykliny, cyklofosfamid i cisplatyna sprzyjają produkcji nadtlenu wodoru, który uszkadza DNA, czego konsekwencją jest pojawienie się mutacji (32). Aktywne formy tlenu zaburzają też funkcje komórek poprzez bezpośredni wpływ na inne składniki komórkowe, lipidy i białka (24).

Cytostatyki charakteryzują się bardzo wąskim indeksem terapeutycznym. Niebezpieczeństwo związane z leczeniem lub kontaktem z nimi wiąże się z możliwością wystąpienia zaburzeń systemowych, a także z potencjalną genotoksycznością, nowotworzeniem, embriotoksycznością i zaburzeniami w rozrodzie (1, 2).

Zdrowotne skutki kontaktu z cytostatykami

Efekty szkodliwego wpływu leków przeciwnowotworowych na zdrowie zależą od dawki oraz od czasu ekspozycji. Na skutki działania wysokich dawek jednego lub kilku cytostatyków jednocześnie najbardziej narażeni są ludzie podczas chemioterapii. W konsekwencji często obserwowane są u nich zaburzenia zdrowia o charakterze ostrym, stanowiące skutki uboczne terapii przeciwnowotworowej. Do najczęściej występujących efektów ubocznych leczenia nowotworów należą: nudności, wymioty, alergie, podrażnienia skóry, oczu, błon śluzowych, wysypka, wypadanie włosów, ból w klatce piersiowej, kaszel, podwyższone ciśnienie krwi, bóle i zawroty głowy oraz gorączka (33, 34, 35). Te same objawy były również obserwowane u pielęgniarek onkologicznych, farmaceutów przygotowujących leki przeciwnowotworowe i innych osób mających kontakt z cytostatykami podczas pracy (36, 37). Występowanie u nich ostrych zaburzeń było częściej opisywane, gdy nie znano szkodliwości leków przeciwnowotworowych lub nie zachowywano specjalnych środków ostrożności przy obchodzeniu się z nimi. Wtedy ryzyko kontaktu z cytostatykami, np. w wyniku przypadkowego rozlania leku, oblania się nim lub stosowania nieodpowiednich komór laminarnych, było większe (3). Wprowadzenie określonych wytycznych, wzrost świadomości zagrożenia i poszerzenie wiedzy w tym zakresie przyczyniło się do niemal całkowitego wyeliminowania zjawiska występowania objawów o charakterze ostrym u osób mających kontakt z cytostatykami (11).

Genotoksyczność i rakotwórczość leków przeciwnowotworowych

Leki przeciwnowotworowe uszkadzają DNA komórkowe, działając w różny sposób. Uszkodzenia te mogą wywoływać mutacje lub hamować ważne procesy komórkowe, takie jak transkrypcja czy replikacja (1, 2). Wywołane efekty biologiczne mogą być różne w zależności od rodzaju chemioterapeutyku oraz indywidualnych uwarunkowań i wrażliwości genetycznej. Obecność niektórych zmian, może stanowić wczesny sygnał alarmujący o zagrożeniu związanym z ekspozycją na cytostatyki (2, 27). W wielu pracach opisane zostały mutagenne i genotoksyczne efekty działania chemioterapeutyków (38, 39). Ich ocena przeprowadzana była głównie w próbkach krwi i moczu pobranych od pielęgniarek lub farmaceutów zawodowo narażonych na kontakt z toksycznymi lekami. Wyniki były różne, co tłumaczy rozbieżności związane z zastosowaniem różnych metod badawczych o odmiennej czułości oraz rodzaju i wielkości ekspozycji, a także różnych zasad i wytycznych obchodzenia się z cytostatykami w ich miejscach pracy. Nie ulega jednak wątpliwości, że ekspozycja na cytostatyki wywołuje potencjalne ryzyko genotoksyczności i narażonych osób (2). Należy jednak podkreślić, że obecność uszkodzeń DNA nie jest jednoznaczna z rozwojem nowotworu. Komórka może bowiem, w ramach odpowiedzi na uszkodzenie DNA, podjąć działania zmierzające do naprawy tych uszkodzeń lub jeśli jest to niemożliwe, aktywować ścieżkę apoptozy. Kiedy jednak zawiodą mechanizmy naprawy DNA, uszkodzenie to może zostać włączone do genomu i zainicjować nowotworzenie.

Wyniki badań epidemiologicznych, wskazują na korelację pomiędzy chemioterapią a rozwojem wtórnych nowotworów u pacjentów onkologicznych (40, 41). Nielatwo jest jednak określić wpływ poszczególnych leków na rozwój wtórnych zmian nowotworowych, ze względu na powszechnie stosowaną terapię kombinowaną (27). Wykazano natomiast, że leczenie chlorambucilem może być bezpośrednio związane z wystąpieniem ostrej białaczki u ludzi, a cyklofosfamid znacznie zwiększa ryzyko pojawienia się guzów pęcherza moczowego (2, 42, 43). Czynniki warunkujące rakotwórczość leków przeciwnowotworowych to przede wszystkim: ich własny potencjał rakotwórczy, długość okresu stosowania leku oraz dawka całkowita podana podczas leczenia (44). Już w latach osiemdziesiątych XX wieku zauważono, że leki alkilujące, takie jak np.: melfalan, chlorambucil lub cyklofosfamid, dają największy odsetek rozwoju wtórnych nowotworów, wśród których najczęściej występują

białaczkę (44). Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem (International Agency for Research on Cancer – IARC) dokonała podziału chemicznych środków rakotwórczych na cztery grupy, definiując ich karcynogenne działanie dla człowieka. Wśród sklasyfikowanych czynników znalazły się również cytostatyki (11, 45). W tabeli 1 przedstawiono podział na grupy czynników karcynogennych wraz z przykładami cytostatyków stosowanych w weterynarii.

Rozwój wtórnych nowotworów obserwowany jest przede wszystkim u ludzi, którzy podczas leczenia narażeni są na działanie wysokich dawek leków przeciwnowotworowych. Zawodowy kontakt z chemioterapeutykami, zarówno w medycynie, jak i w weterynarii, ma najczęściej charakter przewlekły i jest ograniczony do dużo mniejszych dawek niż w przypadku leczenia. Ocena związku pomiędzy długotrwałą lub krótkotrwałą ekspozycją na niskie dawki leków przeciwnowotworowych a występowaniem nowotworów u pracowników sprawia duże trudności. Wyniki przeprowadzonych badań epidemiologicznych nie dają często wystarczających dowodów na istnienie takiej zależności. Wiadomo jednak, że ryzyko rozwoju nowotworów u osób pracujących z lekami przeciwnowotworowymi istnieje, o czym świadczy ich rakotwórczy potencjał i częste występowanie wtórnych nowotworów u osób leczonych cytostatykami (46).

Zaburzenia w rozrodzie

Płodność kobiet i mężczyzn

Leki przeciwnowotworowe wywierają szkodliwy wpływ na płodność kobiet i mężczyzn oraz na przebieg ciąży. Mogą one uszkadzać i zaburzać funkcjonowanie męskich gonad na każdym etapie życia mężczyzny, powodując trwałą bądź długoterminową bezpłodność (2). Niektóre

z chemioterapeutyków uszkadzają wraz z komórkami spermatogonii, czyli macierzyste komórki płciowe, wykazujące wysoki stopień aktywności mitotycznej i stąd są dużo bardziej podatne na uszkodzenia DNA (47, 48, 49). Leki przeciwnowotworowe mogą również zaburzać funkcjonowanie gonad żeńskich. W okresie rozwoju płodowego, narodzin i dojrzewania najbardziej podatne na działanie chemioterapeutyków są oocyty, których wzrost i rozwój, w następstwie narażenia, może zostać zaburzony (50). W dorosłym życiu kobiety leki te mogą uszkadzać dojrzewające pęcherzyki i prowadzić do zwłóknienia jajników oraz znacznie uszczuplić rezerwę jajnikową, którą stanowią wszystkie komórki jajowe (51). Następnym tego mogą być poważne zaburzenia hormonalne. Zwiększona ekspozycja na cytostatyki podczas pracy może więc doprowadzić u kobiet do wystąpienia takich objawów, jak ciągła, zbyt częsta lub sporadycznie występująca miesiączka, jej zupełny brak lub bezpłodność.

Ciąża

Ekspozycja zarodka lub płodu na cytostatyki niesie za sobą konsekwencje wystąpienia bezpośrednich lub pośrednich efektów genotoksycznych. Wynikiem tego mogą być: mutacje somatyczne, nowotwory, anomalie rozwojowe (potworności), funkcjonalne deficyty niektórych układów, narządów, np. układu nerwowego, lub zamieralność zarodków (52, 53). Efekty te różnią się w zależności od okresu ciąży. Kiedy narażenie na leki przeciwnowotworowe ma miejsce przed implantacją zarodka, najczęściej dochodzi do jego obumarcia, zaś ekspozycja na nie podczas implantacji lub organogenezy z dużą częstością predysponuje do pojawienia się wad rozwojowych i deformacji (52, 54). Najczęstszym następstwem narażenia na szkodliwe czynniki podczas życia płodowego jest z kolei zaburzenie w funkcjonowaniu niektórych narządów lub rozwój nowotworu. Skutki

szkodliwego działania określonych leków na zarodek i płód w wysokim stopniu zależą również od ich przechodzenia przez łożysko (55). Piśmiennictwo w tym zakresie jest jednak skąpe i dotyczy przede wszystkim zwierząt laboratoryjnych. Wraz ze stopniem zaawansowania ciąży rozwijają się możliwości naprawcze uszkodzeń DNA, dlatego częstość występowania toksycznych efektów będzie większa przy narażeniu zarodka w pierwszym trymestrze ciąży. Wtedy ekspresja cząsteczek zaangażowanych w mechanizmy naprawy genomu jest słabsza, a spontaniczne poronienia, wcześniactwo, wzrost częstości urodzeń martwych noworodków lub śmiertelności wśród urodzonych już dzieci są notowane częściej. Dane te oparte są jednak głównie na publikacjach opisujących przypadki kobiet będących w ciąży i jednocześnie leczonych na nowotwór (52, 56). Znając jednak skutki toksycznego działania leków przeciwnowotworowych na zarodek i płód, zaleca się, aby na okres ciąży nie narażać się podczas pracy na kontakt z tymi lekami.

Wytyczne pracy z cytostatykami

Odkąd pojawiły się doniesienia na temat toksyczności leków przeciwnowotworowych wśród osób zawodowo narażonych na kontakt z nimi, wiele instytucji, organizacji, związków zawodowych oraz szpitali wydało ostrzegawcze biuletyny, monografie i artykuły z wytycznymi na temat bezpiecznej pracy z cytostatykami. Przyczyniło się to do znacznego zmniejszenia ekspozycji zawodowej na te leki. Rozwój weterynaryjnej onkologii klinicznej i coraz częstsze wdrażanie chemioterapii do leczenia zwierząt towarzyszących przyczyniło się do wydania analogicznych prac, odnoszących się do zawodowego narażenia na cytostatyki w weterynarii. Europejskie Kolegium Medycyny Wewnętrznej Zwierząt Towarzyszących (European Veterinary College of Internal Medicine – Companion

Tabela 1. Klasyfikacja czynników rakotwórczych według Międzynarodowej Agencji Badań nad Rakiem z uwzględnieniem cytostatyków (45)

Grupa cytostatyków	Charakterystyka grupy	Nazwa cytostatyku
1 Czynniki rakotwórcze dla ludzi	Istnieją wystarczające dowody na to, że dany czynnik jest rakotwórczy dla człowieka lub gdy nie ma na to wystarczających dowodów badania potwierdzają jego rakotwórczość dla zwierząt doświadczalnych, a mechanizmy jego rakotwórczego działania są takie same u ludzi	Cyklofosamid, Chlorambucil, Semustyna, Melfatan, Azatiopryna
2a Czynniki prawdopodobnie rakotwórcze dla ludzi	Czynniki, które z dużym prawdopodobieństwem są rakotwórcze dla człowieka. Dowody na ich rakotwórczość u ludzi są ograniczone lub nie ma na ten temat odpowiednich danych, ale wiadomo, że są karcynogenne dla zwierząt doświadczalnych	Cisplatyna, Prokarbazyna
2b Czynniki przypuszczalnie rakotwórcze dla ludzi	Czynniki, które z mniejszym prawdopodobieństwem niż w grupie 2a są rakotwórcze dla człowieka. Dane na temat ich rakotwórczości dla ludzi są ograniczone i istnieje mniej dowodów niż w grupie 2a na ich działanie karcynogenne u zwierząt doświadczalnych	Dakarbazyna, Mitoksantron
3 Czynniki niesklasyfikowane jako rakotwórcze dla ludzi	Dowody na rakotwórcze działanie tych czynników dla ludzi są niedostateczne, a u zwierząt doświadczalnych ograniczone. Klasyfikuje się tu również czynniki z udowodnionym działaniem karcynogennym u zwierząt, pod warunkiem że mechanizmy działania rakotwórczego u zwierząt doświadczalnych nie działają u ludzi	Metotreksat, Winblastyna, Winkrystyna, Hydroksykarbamid, Ifosfamid

Animals) opracowało 30-stronicowy dokument, w którym uwzględniono zasady bezpiecznego obchodzenia się z cytostatykami, opisano sytuacje, w których może dojść ekspozycji, oraz podano informacje, jakie powinni otrzymać właściciele zwierzęcia leczonego onkologicznie (57). Jednak opracowanie to, jak również i inne podejmujące ten sam temat, opierają się w dużym stopniu na wiedzy przeniesionej bezpośrednio z onkologii ludzkiej oraz na danych dotyczących zwierząt laboratoryjnych. Przyczyną tego, jest skąpe piśmiennictwo na temat zawodowego narażenia lekarzy weterynarii na leki przeciwnowotworowe oraz farmakokinetyki tych leków u zwierząt towarzyszących. Aby informacje zawarte w opracowaniach na temat bezpiecznej pracy z cytostatykami w weterynarii były wiarygodne, konieczne jest rozszerzenie badań w tym zakresie.

Europejska Agencja Leków (European Medicines Agency – EMA), opierając się na dyrektywie unijnej: 2001/82/EC z uwzględnieniem poprawek w dyrektywach 2004/28/EC i 2009/9/EC, wydała wytyczne na temat oceny bezpieczeństwa użytkowania weterynaryjnych produktów leczniczych, w tym oceny bezpieczeństwa osób podających leki zwierzętom, a zatem zarówno lekarzy, jak personelu pomocniczego oraz właścicieli zwierząt. Według obowiązującego prawa, w procedurze dopuszczenia do obrotu (stosowania) każdego leku istnieje wymóg dołączania dokumentacji zawierającej informacje o bezpieczeństwie stosowania produktu, zawierające opis potencjalnego ryzyka dla zdrowia, w tym możliwości i prawdopodobieństwa ekspozycji, możliwych działań na organizm człowieka oraz środków bezpieczeństwa podczas kontaktu z lekiem. Jak dotąd jednak żaden lek przeciwnowotworowy nie został w Polsce dopuszczony do stosowania u zwierząt. Nie oznacza to oczywiście braku możliwości stosowania cytostatyków w weterynarii. Zgodnie z obowiązującym prawem, w przypadku braku odpowiednich leków dopuszczonych do stosowania u zwierząt lekarz weterynarii zaleca podawanie leków przeznaczonych dla ludzi. Tym trudniejsze jest jednak opracowanie ogólnych zasad postępowania w trakcie leczenia onkologicznego zwierząt. W przyszłości producenci weterynaryjnych leków przeciwnowotworowych będą jednak zobligowani do umieszczenia w drukach informacyjnych leku informacji na temat bezpieczeństwa osób podających produkt zwierzętom (58).

Podsumowanie

Wprowadzenie zaleceń bezpiecznego obchodzenia się z lekami przeciwnowotworowymi w medycynie przyczyniło się

do znacznego zmniejszenia zawodowej ekspozycji pracowników medycznych na cytostatyki. Jednak wykorzystanie tych preparatów w leczeniu chorób nowotworowych zwierząt oraz przeniesienie do praktyki weterynaryjnej stosowanych w medycynie zasad postępowania – lub, co gorsza, bez jakichkolwiek zasad – sprawiło, że stały się one zagrożeniem dla personelu weterynaryjnego, a także opiekunów zwierząt. Niezbędne są zarówno informacje dotyczące biomonitoringu, jak i bardziej szczegółowe dane epidemiologiczne. Ponadto ich parametry farmakokinetyczne różnią się między gatunkami, stąd ustalanie zasad i wytycznych obchodzenia się z chemioterapeutykami powinno być rozpatrywane oddzielnie. Chemioterapia psów i kotów ma wprawdzie dużo mniejszą skalę niż ludzi, a leki przeciwnowotworowe podawane są zwierzętom w mniejszych dawkach. Zważywszy, że całkowita eliminacja ekspozycji jest niemożliwa, a trudności w ustaleniu zależności pomiędzy ekspozycją lekarzy weterynarii na niskie dawki cytostatyków a skutkami dla zdrowia uniemożliwiają realną ocenę zagrożenia, bardzo istotne jest zachowanie bezwzględnej ostrożności w kontakcie z toksycznymi lekami przeciwnowotworowymi (2). Niezbędne jest szkolenie personelu i wprowadzanie do leczniczych zasad bezpiecznej pracy z cytostatykami, co pozwoli na zmniejszenie zanieczyszczenia środowiska pracy, ochronę zdrowia pracowników i opiekunów zwierząt oraz podwyższyć standard pracy, zwiększając zaufanie między członkami zespołu.

Piśmiennictwo

1. Withrow S. J., Mail D. M.: *Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*. Saunders Elsevier, 4th ed., 2007.
2. Janssens T.: Antineoplastic drugs in veterinary oncology: excretion in dogs, contamination of the environment and exposure assessment of people at risk. ISBN/EAN: 978-94-6108-343-2, Utrecht, 2012.
3. Alert Document Preventing Occupational Exposure to Antineoplastic and other Hazardous Drugs in Health Care Settings. US Department of Health and Human Service, Public Occupational Safety and Health DHHS, 2004, NIOSH Publication No. 2004-165.
4. Pruss A., Giroult E., Rushbrook P.: Safe management of wastes from health-care activities. WHO, 1999
5. Viviano K.R.: Update on immunosuppressive therapies for dogs and cats. *Vet. Clin. North. Am. Small. Anim. Pract.* 2013, **43**, 1149–1170.
6. Hamscher G., Mohring S.A., Knobloch A., Eberle N., Nau H., Nolte I., Simon D.: Determination of drug residues in urine of dogs receiving anti-cancer chemotherapy by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry: is there an environmental or occupational risk? *J. Anal. Toxicol.* 2010, **34**, 142–148.
7. Cass Y., Musgrave C.F.: Guidelines for the safe handling of excreta contaminated by cytotoxic agents. *Am. J. Hosp. Pharm.* 1992, **49**, 1957–1958.
8. Document of the European College of Veterinary Internal Medicine of Companion Animals: *Preventing occupational and environmental exposure to cytotoxic drugs in veterinary medicine*. 2nd version, 2010
9. Knobloch A., Mohring S.A., Eberle N., Nolte I., Hamscher G., Simon D.: Cytotoxic drug residues in urine of dogs receiving anticancer chemotherapy. *J. Vet. Intern. Med.* 2010, **24**, 384–390.

10. Knobloch A., Mohring S.A., Eberle N., Nolte I., Hamscher G., Simon D.: Drug residues in serum of dogs receiving anticancer chemotherapy. *J. Vet. Intern. Med.* 2010, **24**, 379–383.
11. Dąbrowski T., Dąbrowska E. A.: Cytostatic drugs and their carcinogenicity – occupational risk problem for healthcare workers. *Współcz. Onkol.* 2007, **11**, 101–105.
12. Nygren O., Lundgren C.: Determination of platinum in workroom air and in blood and urine from nursing staff attending patients receiving cisplatin chemotherapy. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* 1997, **70**, 209–214.
13. McDevitt J.J., Lees P.S., McDiarmid M.A.: Exposure of hospital pharmacists and nurses to antineoplastic agents. *J. Occup. Med.* 1993, **35**, 57–60.
14. Dolezalová L., Odráská P., Gorná L., Prudilová M., Vejputsková R., Bláha L.: Evaporation of selected cytotoxic drugs and permeation of protective gloves—research into the occupational risks of health care personnel handling hazardous cytotoxic drugs (CYTO project). *Klin. Onkol.* 2009, **22**, 218–218.
15. Larson R.R., Khazaeli M.B., Dillon H.K.: Development of an HPLC method for simultaneous analysis of five antineoplastic agents. *Appl. Occup. Environ. Hyg.* 2003, **18**, 109–119. 22.
16. Hon C.Y., Astrakianakis G., Danyluk Q., Chu W.: Pilot Evaluation of Dermal Contamination by Antineoplastic Drugs among Hospital Pharmacy Personnel. *Can. J. Hosp. Pharm.* 2011, **64**, 327–332.
17. Fransman W., Vermeulen R., Kromhout H.: Dermal exposure to cyclophosphamide in hospitals during preparation, nursing and cleaning activities. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* 2005, **78**, 403–12.
18. Smolders R., Schramm K.W., Stenius U., Grellier J., Kahn A., Trnovec T., Sram R., Schoeters G.: A review on the practical application of human biomonitoring in integrated environmental health impact assessment. *J. Toxicol. Environ. Health. B. Crit. Rev.* 2009, **12**, 107–123.
19. Sorsa M., Anderson D.: Monitoring of occupational exposure to cytostatic anticancer agents. *Mutat. Res.* 1996, **355**, 253–261.
20. Sessink P.J., Van de Kerkhof M.C., Anzoin R.B., Noordhoek J., Bos R.P.: Environmental contamination and assessment of exposure to antineoplastic agents by determination of cyclophosphamide in urine of exposed pharmacy technicians: is skin absorption an important exposure route? *Arch. Environ. Health.* 1994, **49**, 165–169.
21. Hedmer M., Tinnerberg H., Axmon A., Jönsson B.A.: Environmental and biological monitoring of antineoplastic drugs in four workplaces in a Swedish hospital. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* 2008, **81**, 899–911.
22. Au W.W.: Usefulness of biomarkers in population studies: from exposure to susceptibility and to prediction of cancer. *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 2007, **210**, 239–246.
23. Mielżyńska D.: Narażenie na substancje o działaniu nowotworowym – biomarkery narażenia. Instytut Medycyny Pracy i Zdrowia Środowiskowego, Sosnowiec. Materiały szkoleniowe dostępne na stronie www: <http://www.ietu.katowice.pl/wpr/>
24. Rombaldi F., Cassini C., Salvador M., Saffi J., Erdtmann B.: Occupational risk assessment of genotoxicity and oxidative stress in workers handling anti-neoplastic drugs during a working week. *Mutagenesis.* 2009, **24**, 143–148.
25. Fucic A., Jazbec A., Mijic A., Seso-Simic, D. Tomek R.: Cytogenetic consequences after occupational exposure to antineoplastic drugs. *Mutat. Res.* 1998, **416**, 59–66.
26. Deng H., Lou J., Zhang M., Wu W., Jin L., Shijie C., Zheng W., Wang B., He J.: Detecting the cytogenetic effects in workers occupationally exposed to vincristine with four genetic tests. *Mutat. Res.* 2006, **559**, 152–159.
27. Kopjar N., Garaj-Vrhovac V., Kasuba V., Rozgaj R., Ramić S., Pavlica V., Zelječić D.: Assessment of genotoxic risks in Croatian health care workers occupationally exposed to cytotoxic drugs: a multi-biomarker approach. *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 2009, **212**, 414–431.
28. Abel E. A.: Immunosuppressant and cytotoxic drugs: unapproved uses or indications. *Clin. Dermatol.* 2000, **18**, 95–101.
29. Wagner B.A., Eviq C.B., Reszka K.J., Buettner G.R., Burns C.P.: Doxorubicin increases intracellular hydrogen peroxide in PC3 prostate cancer cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 2005, **440**, 181–190.
30. Murata M., Suzuki T., Midorikawa K., Oikawa S., Kawachi S.: Oxidative DNA damage induced by a hydroperoxide derivative of cyclophosphamide. *Free. Radic. Biol. Med.* 2004, **37**, 793–802.
31. Kawai Y., Nakao T., Kunimura N., Kohda Y., Gemba M.: Relationship of intracellular calcium and oxygen radicals to Cisplatin-related renal cell injury. *J. Pharmacol. Sci.* 2006, **100**, 65–72.

32. Minotti G., Menna P., Salvatorelli E., Cairo C., Gianni L.: Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol. Rev.* 2004, **56**, 185–229.
33. McDiarmid M., Egan T.: Acute occupational exposure to antineoplastic agents. *J. Occup. Med.* 1988, **30**, 984–987.
34. Walusiak J., Wittczak T., Ruta U., Palczynski C.: Occupational asthma due to mitoxantrone. *Allergy*. 2002, **57**, 461.
35. Kusnetz E., Condon M.: Acute effects from occupational exposure to antineoplastic drugs in a para-professional health care worker. *Am. J. Ind. Med.* 2003, **44**, 107–9.
36. Valanis B.G., Vollmer W.M., Labuhn K.T., Glass A.G.: Acute symptoms associated with antineoplastic drug handling among nurses. *Cancer. Nurs.* 1993, **16**, 288–95.
37. Constantinidis TC, Vagka E, Dallidou P, Basta P, Drakopoulos V, Kakolyris S, Chatzaki E.: Occupational health and safety of personnel handling chemotherapeutic agents in Greek hospitals. *Eur. J. Cancer. Care.* 2011, **20**, 123–131.
38. Hagmar L., Bonassi S., Strömberg U., Brøgger A., Knudsen L.E., Norppa H., Reuterwall C.: Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer: a report from the European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health (ESCH). *Cancer Res.* 1998, **58**, 4117–4121.
39. Bonassi S., Znaor A., Ceppi M., Lando C., Chang W.P., Holland N., Kirsch-Volders M., Zeiger E., Ban S., Barale R., Bigatti M.P., Bolognesi C., Cebulka-Wasilewska A., Fabianova E., Fucic A., Hagmar L., Joksic G., Martelli A., Migliore L., Mirkova E., Scarfi M.R., Zijno A., Norppa H., Fenech M.: An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis*. 2007, **28**, 625–631.
40. Allan JM, Travis LB.: Mechanisms of therapy-related carcinogenesis. *Nat. Rev. Cancer*. 2005, **5**, 943–955.
41. Travis LB.: The epidemiology of second primary cancers. *Cancer. Epidemiol. Biomarkers. Prev.* 2006, **15**, 2020–2026.
42. Berk P.D., Goldberg J.D., Silverstein M.N., Weinfeld A., Donovan P.B., Ellis J.T., Landaw S.A., Laszlo J., Najean Y., Pisciotto A.V., Wasserman L.R.: Increased incidence of acute leukemia in polycythemia vera associated with chlorambucil therapy. *N. Engl. J. Med.* 1981, **304**, 441–447.
43. Kaldor J.M., Day N.E., Kittelmann B., Pettersson F., Langmark F., Pedersen D., Prior P., Neal F., Karjalainen S., Bell J., et al.: Bladder tumours following chemotherapy and radiotherapy for ovarian cancer: a case-control study. *Int. J. Cancer*. 1995, **63**, 1–6.
44. Rieche K.: Carcinogenicity of antineoplastic agents in man. *Cancer Treat Rev.* 1984, **11**, 39–67.
45. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Preamble/CurrentPreamble.pdf>
46. Moretti M., Bonfiglioli R., Feretti D., Pavanello S., Musi F., Grollino M.G., Villarini M., Barbieri A., Ceretti E., Carrieri M., Buschini A., Appolloni M., Dominicci L., Sabatini L., Gelatti U., Bartolucci G.B., Poli P., Stronati L., Mastrangelo G., Monarca S.: A study protocol for the evaluation of occupational mutagenic/carcinogenic risks in subjects exposed to antineoplastic drugs: a multicentric project. *BMC Public. Health*. 2011, **30**, 11:195.
47. Jahnukainen K., Ehmcke J., Hou M., Schlatt S.: Testicular function and fertility preservation in male cancer patients. *Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 2011, **25**, 287–302.
48. Ozturk S., Demir N.: DNA repair mechanisms in mammalian germ cells. *Histol. Histopathol.* 2011, **26**, 505–517.
49. Varghese A.C., Ly K.D., Corbin C., Mendiola J., Agarwal A.: Oocyte developmental competence and embryo development: impact of lifestyle and environmental risk factors. *Reprod. Biomed. Online*. 2010.
50. Hulvat M.C., Jeruss J.S.: Fertility preservation options for young women with breast cancer. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 2011, **23**, 174–182.
51. Oktay K., Sönmez M.: Chemotherapy and amenorrhea: risks and treatment options. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 2008, **20**, 408–415.
52. Paskulin G.A., Gazzola Zen P.R., de Camargo Pinto L.L., Rosa R., Graziadio C.: Combined chemotherapy and teratogenicity. *Birth. Defects. Res. A. Clin. Mol. Teratol.* 2005, **73**, 634–637.
53. Pachkowsky B.F., Guyton K.Z., Sonawane B.: DNA repair during in utero development: a review of the current state of knowledge, research needs, and potential application in risk assessment. *Mutat. Res.* 2011, **728**, 35–46.
54. Selevan S.G., Kimmel C.A., Mendola P.: Identifying critical windows of exposure for children's health. *Environ Health Perspect.* 2000, **108**, 451–455.
55. Cardonick E., Iacobucci A.: Use of chemotherapy during human pregnancy. *Lancet. Oncol.* 2004, **5**, 283–291.
56. Del Campo M., Kosaki K., Bennett E.C., Jones K.L.: Developmental delay in fetal aminopterin/methotrexate syndrome. *Teratology*. 1999, **60**, 10–12.
57. Document of the European College of Veterinary Internal Medicine of Companion Animals: *Preventing occupational and environmental exposure to cytotoxic drugs in veterinary medicine*. 2nd version, 2010
58. EMA/CVMP/543/03-Rev.1 Committee for medicinal products for veterinary use (CVMP): *Guideline on user safety for pharmaceutical veterinary medicinal products*. 2010