

Pirolizidinski alkaloidi kao kontaminanti

Kireta, Lucija

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:793774>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

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



Lucija Kireta

**PIROLIZIDINSKI ALKALOIDI KAO
KONTAMINANTI**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, godina 2022.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na samostalnom kolegiju Toksikologija Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Irene Žuntar, spec. toksikologa.

Na kraju ovog putovanja koje označava tek početak jednog novog, želim prije svega zahvaliti svojoj obitelji koja mi je uvijek bila podrška i nikad nisu prestali vjerovati u mene, kao i prijateljima koji su me uvijek bili spremni nasmejati i oraspoložiti kad mi je bilo teško.

Želim zahvaliti i svojoj mentorici na svom trudu, vremenu i savjetima koje je uložila u izradu ovog diplomskog.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. OBRAZLOŽENJE TEME.....	7
3. MATERIJALI I METODE.....	8
4. RASPRAVA I REZULTATI.....	9
4.1. Pirolizidinski alkaloidi.....	9
4.1.1. Definicija alkaloida.....	9
4.1.2. Etiologija pirolizidinskih alkaloida.....	10
4.1.3. Patogeneza pirolizidinskih alkaloida.....	11
4.1.4. Kemijska svojstva pirolizidinskih alkaloida.....	11
4.1.5. Biosinteza pirolizidinskih alkaloida.....	15
4.1.6. Farmako(tokso)kinetika pirolizidinskih alkaloida.....	15
4.1.7. Toksičnost pirolizidinskih alkaloida povezana s farmako(tokso)dinamikom.....	17
4.1.8. Pregled zabilježenih slučajeva intoksikacije pirolizidinskim alkaloidima.....	20
4.2. Gavez-ljekovita biljka s toksičnim sastavnicama.....	26
4.2.1. Opis biljke gaveza.....	26
4.2.2. Sastavnice biljke gaveza i njihovo djelovanje.....	27
4.2.3. Uporaba gaveza.....	28
4.2.4. Ograničenja uporabe preparata gaveza.....	28
4.2.5. Mjere minimizacije rizika izloženosti pirolizidinskim alkaloidima iz pripravaka gaveza primijenjenih topikalnim putem.....	29
4.3. Ostali ljekoviti pripravci kontaminirani pirolizidinskim alkaloidima - Uredba Europske komisije.....	30
4.3.1. Ljekoviti pripravci bazirani na pčelinjim proizvodima.....	33
4.3.2. Čajevi i ostali biljni pripravci.....	35
4.3.3. Prehrambeni proizvodi.....	38

4.4. Poglavlje 2.8.26. Pirolizidinski alkaloidi kao kontaminanti u novom izdanju Europske farmakopeje (2022. godine).....	39
5. ZAKLJUČAK.....	40
6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA.....	41
7. LITERATURA.....	42
8. SAŽETAK/SUMMARY.....	50
9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA / BASIC DOCUMENTATION CARD	

1. UVOD

Mnoge biljne sirovine koje se koriste u prehrane svrhe i u svrhu izrade ljekovitih pripravaka čija je zadaća očuvanje i osiguranje zdravlja mogu sadržavati kemijske tvari koje su toksične te ako se konzumiraju u velikim količinama mogu uzrokovati zdravstvene probleme. Neke rizične komponente nemoguće je izbjeći jer su to prirodni toksini koji su sastavni dijelovi biljaka koji su same biljke razvile kao obrambene mehanizme za zaštitu od patogena i biljojeda dok je prisutnost nekih uzrokovana uvjetima okoliša (najčešće industrijske onečišćujuće tvari), uvjetima tijekom prerade i čuvanja sirovina te naknadnim dodavanjem određenih tvari poput aditiva te je tada riječ o toksikantima (www.hah.hr). Stoga je vrlo važno minimizirati rizik pojavnosti tih tvari odgovarajućim mjerama praćenja uvjeta u okolišu, kontrolom kakvoće ulaznih sirovina, nacionalnim ili međunarodnim propisima koji određuju maksimalna ograničenja. Važni kriteriji na temelju kojih se definiraju ograničenja uključuju: toksikološke dokaze - utvrđena razina toksičnosti i pouzdanost samih dokaza, dobru proizvođačku praksu - mjere koje se mogu poduzeti tijekom tehnološke prerade sirovina i analitičke mogućnosti - granica detekcije i kvantifikacije te sama osjetljivost metode (www.hah.hr).

Toksini biljnog podrijetla još se nazivaju i biljnim ili prirodnim pesticidima, a riječ je o velikom broju različitih kemijskih spojeva poput alkaloida, glukozinolata, cijanogenih glikozida, aminokiselina, peptida, terpenoida, fenola i sličnih čije je nakupljanje u biljnim organima potaknuto stresom, što uključuje izloženost biljke herbicidima, hladnoći i oštećenju tkiva (www.hah.hr). Samom prehranom unosi se do nekoliko tisuća tih spojeva koji su u stanju potaknuti tjelesne mehanizme zaštite i popravka te umjerena izloženost stoga može imati pozitivne učinke po zdravlje dok su štetni učinci najčešće rezultat dugotrajne i/ili pretjerane konzumacije određenih biljnih namirnica, neuobičajeno visokih razina ili snažne toksičnosti određenog toksina ili nasljedne preosjetljivosti. Mjere kojima se smanjuje rizik pojavnosti štetnih učinaka se prilagođavaju svakom pojedinom biljnom toksinu s obzirom na njegovu specifičnost, ali opće primjenjive mjere uključuju edukaciju i savjetovanje, zakonske propise, zabranu klasičnog križanja i genetičkog inženjeringa (www.hah.hr).

Najznačajniji predstavnici biljnih toksina s obzirom na toksičnost i stupanj konzumacije kratko će se spomenuti u nastavku teksta, a to su lektini, oksalati, fitati, tanini, inhibitori enzima, cijanogeni glikozidi, goitrogene tvari, pirimidini iz boba, vazoaktivni amini, aristolohične kiseline, ksantini,

fitoestrogeni, alergeni biljnog podrijetla, prehrambeni dodaci i pirolizidinski alkaloidi (www.hah.hr). Potonji su tema ovog diplomskog rada te će se obraditi u daljnjim poglavljima.

Lektini

Lektini su spojevi proteina i glikoproteina koji se odlikuju sposobnošću vezanja određenih ugljikohidrata (www.hah.hr). Ta sposobnost u ljudskom organizmu uzrokuje sljepljivanje eritrocita te se koristi za određivanje krvnih grupa. Najčešći lektini su: iz graha (engl. *Phaseolus vulgaris* agglutinin, PSA), ricin iz ricinusa, iz pšenice (engl. wheat germ agglutinin, WGA), iz graška (engl. *Pisum sativum* agglutinin, PSA) te iz visibabe (engl. *Galanthus nivalis* agglutinin, GNA). Glavni izvori lektina su mahunarke, bobičasto voće, krumpir, žitarice, rajčice i orašasti plodovi. Lektini su otporni na razgradnju u probavnom sustavu čime se povećava stupanj njihove apsorpcije te raste mogućnost pojave štetnih učinaka. U probavnom sustavu vežu se za stanice epitela crijeva prilikom čega dolazi do odumiranja tih stanica te pojave tegoba poput mučnine, povraćanja i proljeva. Termičkom obradom dolazi do denaturacije proteina i poništavanja toksičnih učinaka lektina (www.hah.hr).

Oksalati

Oksalati su spojevi oksalne kiseline koji se u biljkama pojavljuju u obliku topljivih natrijevih ili kalijevih soli ili netopljivih kalcijevih soli (www.hah.hr). Uglavnom se nalaze u špinatu, blitvi, kakau, rabarbari i zelenom čaju. Oksalati vežu kalcij te s njime stvaraju netopljivi kompleks čime se smanjuje raspoloživost kalcija u organizmu. Oksalati također mogu doprinijeti stvaranju bubrežnih kamenaca kod osoba s nasljednom sklonošću za njihovo stvaranje. Termičkom obradom može se znatno smanjiti količina topljivih oksalata, isto kao i uzimanjem suplemenata bogatih kalcijem, određenim probiotičkim kulturama i pripravcima klica žitarica koji sadrže enzime za razgradnju oksalata (www.hah.hr).

Fitati

Fitati su soli fitinske kiseline najčešće udružene s kationima kalcija, kalija ili magnezija (www.hah.hr). Glavni izvor fitata su sjemenke mahunarki i žitarica. Svojstvo fitata je da smanjuju apsorpciju minerala, uglavnom cinka i bakra te stupaju u interakciju s bjelančevinama i škrobom, uključujući inhibiciju probavnih enzima. Fitati su termostabilni i vodotopljivi (www.hah.hr).

Tanini

Tanini su heterogena skupina polifenola-polimernih flavonoida (www.hah.hr). Nalaze se u čaju, kavi, kakau, vinu, nezrelom voću, povrću i nekim žitaricama. Imaju sposobnost vezanja metalnih iona i bjelančevina u neprobavljive komplekse. Kod ljudi je utvrđeno da kronični, visoki unos doprinosi razvitku raku. Tehnološki postupci obrade mogu smanjiti rizik izloženosti taninima (www.hah.hr).

Inhibitori enzima

Tu spadaju inhibitori proteaza (inhibitori tripsina i kimotripsina), amilaza i lipaza koji su male bjelančevinaste molekule te inhibitori kolinesteraza koji su alkaloidni spojevi poput fizostigmina i *Solanum* alkaloida (www.hah.hr). Inhibitori probavnih enzima nalaze se pretežito u žitaricama, mahunarkama, mesu, jajima, mlijeku i krumpiru. Glavni izvor fizostigmina je jedna vrsta afričkog graha dok se *Solanum* glikoalkaloidi poput solanina i kakonina nalaze u krumpiru, rajčici i patlidžanu. Inhibitori probavnih enzima s enzimima stvaraju inaktivne, netopljive komplekse koji su u pokusnih životinja doveli do hipertrofije i hiperplazije gušterače te u konačnici i do raka gušterače. Procijenjeno je da je taj rizik u ljudi mali. Inhibitori kolinesteraza uzrokuju gastrointestinalne i neurološke poremećaje poput povraćanja, proljeva, bolova u abdomenu, mučnina, vrtoglavica i glavobolja. Uslijed visokih doza moguć je i smrtni ishod. Termička obrada uništava većinu inhibitora probavnih enzima dok su *Solanum* alkaloidi otporni na termičku obradu (www.hah.hr).

Cijanogeni glikozidi

To je skupina spojeva koja ima svojstvo oslobađanja cijanovodika (HCN), najčešće uslijed enzimske hidrolize, iako je moguća i kemijska (www.hah.hr). Najznačajniji predstavnici su amigdalini, prunasini, linamarini i durini. Izvori su lima grah, sijerak, gorki bademi, sjemenke voća poput marelica, breskvi, jabuka, sjemenke lana, korijen kasave i sjemenke cikasa palme. Simptomi akutne i kronične intoksikacije uključuju probavne i neurološke poremećaje (paraliza, sljepoća), metaboličku acidozu te moguće i smrt. Razgradnjom cijanida u organizmu nastaje tiocijanat koji izaziva gušavost, što je osobito opasno u kombinaciji s insuficijencijom joda. Termička obrada smanjuje rizik od trovanja, kao i ekstrakcija odgovarajućim otapalima (www.hah.hr).

Goitrogene tvari

U goitrogene tvari spadaju skupine tvari čije je glavno svojstvo da izazivaju gušavost, a to su glukozinolati, izoflavoni (genistein i daidzein) i cijanogeni glikozidi (www.hah.hr). Glukozinolati, kao i cijanogeni glikozidi, razgrađuju se do potencijalno štetnih tvari, i to tako da se prvo odvaja šećerni dio glukozinolata od cijele molekule djelovanjem enzima te se daljnjom razgradnjom stvaraju spojevi poput nitrila, izotiocijanata, tiocijanata i oksazolidina. Izvor glukozinolata je povrće iz porodice *Brassicaceae* (kupus, kelj, cvjetača, brokula, prokulica, raštika, potočarka) te hren, gorušica, uljana repica. Glavni izvor izoflavona je soja. Izotiocijanati, tiocijanati i nitrili mogu uzrokovati inhibiciju nakupljanja joda u štitnjači dok oksazolidini i izoflavoni mogu inhibirati sintezu hormona štitnjače što rezultira poremećajima funkcije štitnjače i gušavošću. Osobama s deficitom hormona štitnjače preporuča se ograničiti unos soje i povrća porodice *Brassicaceae*, a isto tako pomaže i termička obrada namirnica kojom se smanjuje razina glukozinolata, kao i fermentacija (www.hah.hr).

Pirimidini iz boba

Spojevi pirimidinske građe povezani s molekulama šećera su vicin i konvicin od kojih hidrolizom nastaju divicin i izouramil, nositelji potencijalnih štetnih svojstava boba, koji im je glavni izvor (www.hah.hr). Ovi spojevi imaju svojstvo da mogu uzrokovati favizam, odnosno hemolitičku anemiju kod osjetljivih pojedinaca (genetska predispozicija uvjetovana nedostatkom enzima koji je važan u zaštiti od oksidativnog stresa) jer potiču oksidativni stres. Rizik se smanjuje termičkom obradom, sušenjem, ekstrakcijom i mljevenjem zrna boba (www.hah.hr).

Vazoaktivni amini

Nastaju razgradnjom aminokiselina, a najčešći su tiramin, adrenalin, noradrenalin, feniletilamin, dopamin, dihidroksifenilalanin, serotonin (www.hah.hr). Izvori su im fermentirano voće i povrće, posebno banana, ananas, avokado, rajčica, bob. To su tvari koje mogu utjecati na krvni tlak te je poseban oprez potreban kod pacijenata koji koriste inhibitore monoaminooksidaze (www.hah.hr).

Aristolohične kiseline

Skupina policikličkih spojeva čiju osnovu čini nitrofenantren karboksilna kiselina, a glavni izvor im je biljka vučja stopa čije sjeme sadrži velike količine aristolohične kiseline i može dospjeti u brašno žitarica te neki čajevi i pripravci tradicionalne kineske medicine koji se izrađuju od biljaka vrste *Aristolochia* (www.hah.hr). Aristolohične kiseline djeluju toksično na bubrege i izazivaju karcinome urinarnog trakta. Rizik se danas smanjuje modernim tehnologijama žetve, preradom žita u brašno i izdvajanjem nečistoća i primjesa (www.hah.hr).

Ksantini

Najvažniji metilirani ksantini su kofein, teobromin i teofilin iz kave, zelenog čaja, kakaa, čokolade, energetskih pića i Coca-Cole (www.hah.hr). Konzumacija ksantina potiče pojačano oslobađanje dopamina, serotoninina i adrenalina što dovodi do povećanog kapaciteta mentalnog i fizičkog rada, boljeg raspoloženja i tahikardije. Akutna intoksikacija dovodi do simptoma poput razdražljivosti, nerveze, srčane aritmije. Kroničnim izlaganjem visokim dozama kod životinja utvrđena je veza između razvojno-toksičnih posljedica za plod. Umjerena konzumacija smanjuje rizik razvoja kardiovaskularnih bolesti, a manji je i rizik od razvoja raka (www.hah.hr).

Fitoestrogeni

Spojevi biljnog podrijetla koji pokazuju estrogeno djelovanje u organizmu, a dijele se na izoflavone soje i/ili njihove glikozide, kumestane i lignane (www.hah.hr). Najviše izoflavona sadrži soja i njeni proizvodi, kumestani su prisutni pretežito u nekim vrstama graha, a lignani u sjemenkama lana i žitarica. Reproductivna i razvojna toksičnost visokih doza dokazana je na životinjama, dok je umjerena konzumacija u ljudi povezana s pozitivnim učincima u smanjenju rizika od razvoja kardiovaskularnih bolesti i raka. Termička obrada i ekstrakcija smanjuje sadržaj izoflavona (www.hah.hr).

Alergeni biljnog podrijetla

Tvari koje izazivaju reakcije preosjetljivosti kod kojih imuni sustav preburno reagira na niske razine bezopasnih tvari (www.hah.hr). Biljni alergeni su peptidne, proteinske ili glikoproteinske molekule, a najčešći izvori su im kikiriki, soja, sezam, pšenica, citrusi, jagode, krumpir, kakao, orašasti plodovi. Klinička slika nakon izloženosti, ovisno o pojedincu, može varirati od otekline i svrbeža, promjena na koži, gastrointestinalnih simptoma pa do po život opasnog anafilaktičkog šoka. U svrhu smanjenja rizika provodi se kontrola proizvodnog procesa i samih sirovina, navođenje mogućih alergena na etiketi te je moguća fizikalna, kemijska i biokemijska modifikacija proteina čime se smanjuje alergenost (www.hah.hr).

Prehrambeni dodaci

Suplementi poput antioksidantnih vitamina i drugih tvari prirodnog porijekla (vitamin A, B, C, E, β -karoten, flavonoidi i drugi) nisu toksini u pravom smislu te riječi već to postaju pretjeranom konzumacijom preparata koji ih sadrže u visokim dozama te je važno edukacijom usmjeriti pacijente na adekvatan preporučeni dnevni unos koji je puno bolje ostvariti uravnoteženom i raznovrsnom prehranom bogatom voćem i povrćem kao prirodnim izvorima vitamina i minerala. Visoke doze remete normalno odvijanje staničnih procesa te kroničnim unosom čine više štete nego koristi (www.hah.hr).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Pirolizidinski alkaloidi poznati su biljni toksini koji su prisutni u mnogim biljkama, od kojih je za farmaceutsku struku među najznačajnijima biljka gaveza, ljekovita biljka s toksičnim sastojcima. S obzirom na ta svojstva, proučavane su mjere minimizacije rizika kako bi pacijenti od iste imali maksimalno koristi. No, ono što zabrinjava je upravo činjenica da u današnje doba, biljke koje prirodno ne sadrže pirolizidinske alkaloidne uslijed rasta na istom staništu kao i biljke koje ih sadrže, slučajnom kontaminacijom ili posljedičnim križanjem vrsta postaju biljke u kojima je moguće naći sadržaj pirolizidinskih alkaloida što postaje problem upravo zbog nepovoljnog i štetnog djelovanja koje pirolizidinski alkaloidi mogu imati na ljudski organizam. Od presudnog je značaja i činjenica da je rasprostranjenost pirolizidinskih alkaloida na taj način postala velika, do te mjere da se mogu naći u žitu, brašnu, mlijeku, mesu, medu, pripravcima propolisa i ostalim pčelinjim proizvodima, čajevima, začinima i ostalim biljnim pripravcima. Kako bi se minimizirao rizik izloženosti na taj način, Europska komisija donijela je izmjenu postojeće Uredbe („UREDBA KOMISIJE (EU) 2020/2040 od 11. prosinca 2020. o izmjeni Uredbe (EZ) br.1881/2006 o utvrđivanju najvećih dopuštenih količina pirolizidinskih alkaloida u određenoj hrani“) kojom se utvrđuju najveće dopuštene količine pirolizidinskih alkaloida u određenoj hrani (www.eur-lex.europa.eu; www.efsa.europa.eu) te je i to tema ovog diplomskog rada.

Cilj ovog rada je napraviti pregled dosadašnjih istraživanja o pirolizidinskim alkaloidima s posebnim osvrtima na nove spoznaje koje su osobito važne i za samu ljekarničku djelatnost u čijem je središtu sam pacijent čija je sigurnost i očuvanje zdravlja na prvom mjestu. U prvom redu se to odnosi upravo na pripravke koji su dostupni u ljekarnama i koje sam ljekarnik preporučuje svojim pacijentima s obzirom na njihove potrebe. Te preporuke temelje se na očekivanjima da se radi o pripravcima koji zadovoljavaju zahtjeve zdravstvene ispravnosti koje je u svjetlu ovih novih spoznaja potrebno dodatno provjeriti propisanim analitičkim metodama.

3. MATERIJALI I METODE

Pri izradi ovog rada korištene su baze podataka znanstvenih radova (*Pub Med, Science Direct, Oxford Journals, Elsevier, Medline, CROSB*) kojima je pristupano putem računala te odgovarajuće mrežne stranice, a pretraživanje je vršeno uz pomoć ključnih riječi na engleskom jeziku poput *pyrrolizidine alkaloids, comfrey, contamination, toxic pyrrolizidine alkaloids, herbal medicinal products containing pyrrolizidine alkaloids, bee products, pollen and pollen products, honey, herbal tea, health risk, veno-occlusive disease, herbal preparations, pyrrolizidine alkaloid exposure, herbs containing pyrrolizidine alkaloids* i *genotoxicity of pyrrolizidine alkaloids*.

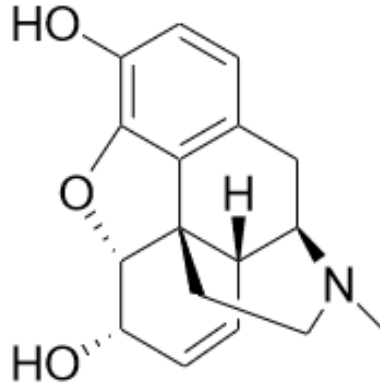
4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Pirolizidinski alkaloidi

4.1.1. Definicija alkaloida

Alkaloidi pripadaju grupi organskih spojeva koji u svojoj strukturi sadrže jedan ili više dušikovih atoma koji su najčešće udruženi u heterociklički prsten ili prstenove (www.intechopen.com; Verpoorte, 2005). Derivati su aminokiselina i najčešće nastaju kao sekundarni metaboliti sintezom u biljkama i nekim životinjama. Samo ime potječe im od njihovih svojstava, a to je da reagiraju s kiselinama tvoreći soli. Uzrok njihovoj alkalnosti leži upravo u prisutnosti dušikovog atoma. Obično su bezbojni, nehlapljivi, bez mirisa i u kristalnoj formi ili rjeđe tekući te uglavnom imaju gorak okus, pretežno su lipofilnog karaktera te su topljivi u nepolarnim organskim otapalima i alkoholu. Pokazuju snažan biološki učinak i u malim dozama, a djelovanje im je najčešće protuupalno, protutumorsko, analgetsko, stimulativno, hipnotičko, analgezijsko, antimikrobno, antifungalno, neurofarmakološko te još brojna druga (www.intechopen.com; Qiu i sur., 2014; Verpoorte, 2005).

Osobito su važni kao polazna sirovina u biosintezi novih spojeva upravo zbog jake biološke aktivnosti koja se ciljanom sintezom usmjerava k stvaranju novog spoja poboljšanog, usmjerenog i jačeg djelovanja (www.intechopen.com). Mogu se podijeliti s obzirom na strukturne karakteristike i to na indole, kinoline, izokinoline, pirolidine, piridine, pirolizidine, tropane, terpenoide i steroide. Druga podjela moguća je s obzirom na botaničko podrijetlo biljaka u kojima ih najčešće nalazimo, npr. *Papaver* alkaloidi (iz opija), *Cinchona* alkaloidi, *Rauwolfia* alkaloidi, *Catharanthus* alkaloidi, *Strychnos* alkaloidi, *Ergot* alkaloidi, *Solanum* alkaloidi i kaktus alkaloidi. U biljaka nalazimo ih u svim dijelovima biljke, listovima, korijenju, stabljici, cvijetu i plodu, ali u drugačijim oblicima i količinama te se razlikuju i po toksičnosti (www.intechopen.com; www.efsa.europa.eu).



Slika 1. Prikaz strukture morfina-alkaloida izoliranog iz opija.

4.1.2. Etiologija pirolizidinskih alkaloida

Pirolizidinski alkaloidi (engl. Pyrrolizidine alkaloids, PA) sačinjavaju grupu od preko 600 spojeva, a prisutni su u preko 6000 biljnih vrsta kao njihovi sekundarni metaboliti (www.hah.hr). To su pretežito biljne vrste porodica *Boraginaceae* (oštrolisti), *Compositae/Asteraceae* (glavočike), *Leguminosae/Fabaceae* (mahunarke), *Apocynaceae* (zimzelenke), *Ranunculaceae* (žabnjače) te *Scrophulariaceae* (zijevalice). Njihova proizvodnja u biljkama jedan je od obrambenih mehanizama koji su biljke razvile tijekom evolucije kako bi se obranile od biljojeda čime je ujedno i smanjena vjerojatnost akutne intoksikacije njima jer ih u pravilu životinje i izbjegavaju (www.hah.hr). Svojestvo izuzetno učinkovitog odbijanja insekata koji se hrane biljnim materijalom razlog je zašto mnoge biljne vrste razvijaju upravo ovaj mehanizam zaštite uslijed križanja s vrstama koje prirodno sadrže PA, a dijele isto stanište s vrstama koje ih prirodno ne sadrže (www.ema.europa.eu). Koncentracija PA koju biljke sadrže uvelike ovisi i o klimatskim uvjetima, tj. konkretno, povećava se u uvjetima suše (www.hah.hr). Utjecaj imaju i karakteristike tla te prisutnost ostalih biljnih vrsta na istom području (www.hah.hr). Najveća razina toksina prisutna je u sjemenju i cvjetovima dok se njihova količina smanjuje u zelenim dijelovima poput listova, stabljike i u korijenju (www.ema.europa.eu). Većina biljaka sadrži smjesu PA čiji se sadržaj kreće u rasponu od 0,001% do 5%, a osobito je zanimljivo i svojstvo da iste biljne vrste koje rastu na različitim staništima ili ovisno o sezoni mogu sadržavati različite PA (Flade i suradnici, 2019). Pirolizidinski alkaloidi najčešće kontaminiraju usjeve važne za prehranu ljudi i stoke, a do čega dolazi prilikom skupljanja biljnog materijala (www.hah.hr). Utvrđeno je raznim studijama da se u određenoj mjeri mogu prenijeti i u mlijeko životinja i jaja peradi te da ih pčele prenose u med i

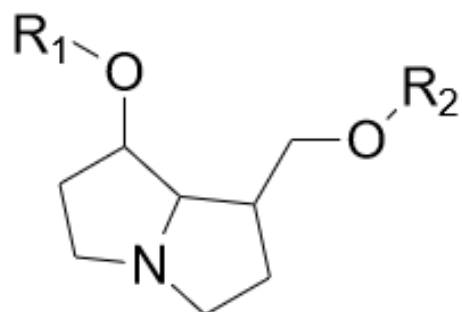
pelud posredstvom čega se mogu naći i u preparatima od peludi. Razlog tome je što životinje za ispašu, svoju prehranu koriste biljke koje sadrže PA. Sami toksini pokazuju otpornost spram fizičkih i termičkih procesa obrade te preživljavaju uvjete skladištenja pri čemu se često izmiješaju s ostalim krmnim biljem, a životinje, dakako, nisu u stanju razlikovati toksičnu hranu od netoksične (www.hah.hr).

4.1.3. Patogeneza pirolizidinskih alkaloida

Pirolizidinski alkaloidi metaboliziraju se u jetri do visoko reaktivnih pirola koji imaju citotoksični učinak na organizam, prvenstveno jezgru hepatocita (Yee i Roth, 2018). Stimuliraju proliferaciju jetrenih stanica čime se potiče razvoj venookluzivnih bolesti (engl. Venocclusive disease, VOD) jetre, hepatičke venske tromboze, ascitesa, žutice i povećava se rizik od razvoja tumora jetre. Toksičnim učinkom u najvećoj mjeri pogođena je jetra zbog toga što su specifične strukture toksina supstrati citokroma P450 (engl. Cytochrome P 450, CYP 450) čiji je najveći sadržaj upravo u jetri. Ostale mete djelovanja uključuju epitelna i vaskularna tkiva bubrega i pluća. Toksične pirolne vrste poprečno povezuju niti deoksiribonukleinske kiseline (engl. Deoxyribonucleic acid, DNA) i spajaju DNA s nukleoproteinima poput aktina. Upravo se za ove molekulske promjene smatra da su ključne za citotoksično, antimitotičko i megakariocitno djelovanje koje je karakteristika pirolizidinskih alkaloida. Njihovo toksično djelovanje nije samo genotoksično, hepatotoksično, pneumotoksično, karcinogeno, nego također i teratogeno (Yee i Roth, 2018; Ober i Kaltenecker, 2009).

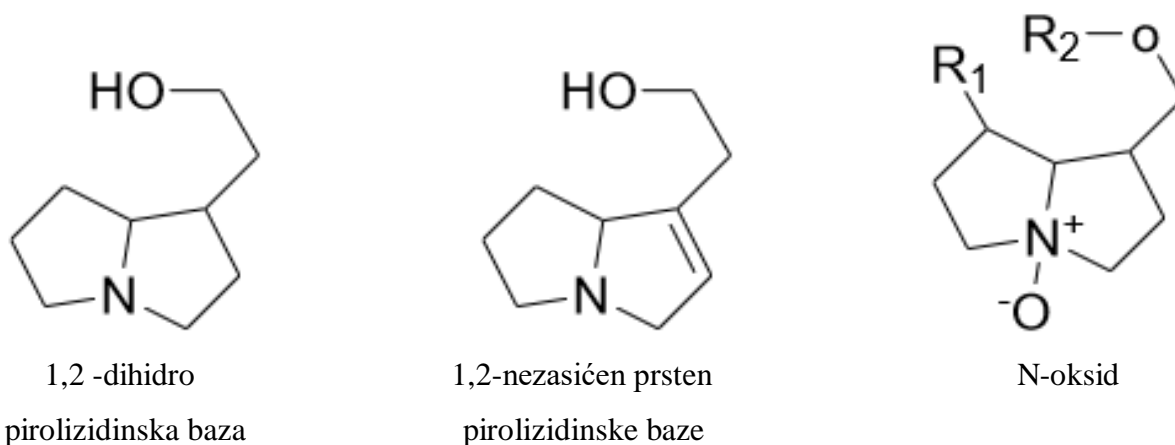
4.1.4. Kemijska svojstva pirolizidinskih alkaloida

Pirolizidinski alkaloidi su esteri (mono-, di- ili makrociklički diestri) 1-hidroksimetilpirolizidina, odnosno necinske baze (amino alkohol) i jedne ili više necinskih kiselina (mono- ili dikarboksilne razgranate alifatske kiseline koje sadrže 5 - 10 ugljikovih atoma) koji potječu od L-ornitina ili L-arginina (Moreira i sur., 2018; Chen i sur., 2010). Velika raznolikost struktura (više od 600 poznatih struktura) potječe upravo od različitih mogućih kombinacija necinskih baza i necinskih kiselina. Najčešće dolaze u formi tercijarnih baza ili N-oksida pirolizidinskih alkaloida (engl. pyrrolizidine alkaloids N-oxide, PANO), rijetko slobodni (www.hah.hr).



Slika 2. Opća strukturna formula pirolizidinskih alkaloida.

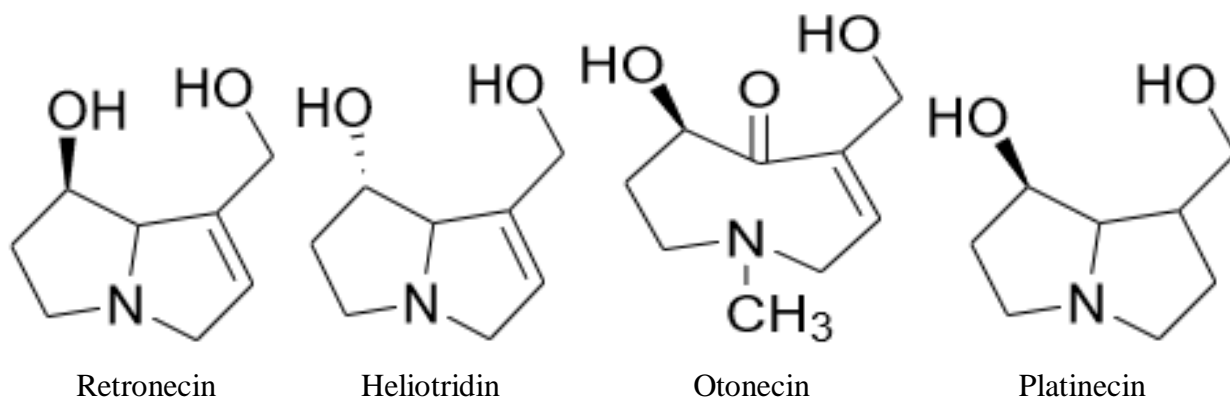
(R1 i R2 predstavljaju različite strukture necinskih kiselina kao mogućih supstinenata)



Slika 3. Prikaz različitih oblika pirolizidinskih baza koje utječu na samu toksičnost spoja.

Pirolizidinska jezgra strukturno je okarakterizirana prisustvom dva peteročlana prstena koja su spojena preko središnjeg dušikovog atoma, dvostukom vezom na 1,2-poziciji pirolizidinskog prstena koja je ključ toksičnosti ovih spojeva (Moreira i sur., 2018; Chen i sur., 2010). U njenom odsustvu ne dolazi do metaboličke aktivacije kojom se formira reaktivna pirolna vrsta kojoj se pripisuju hepatotoksični, kancerogeni i mutageni učinci. Još neke strukturne karakteristike uključuju esterifikaciju na položaju C-7 ukoliko je prisutna hidroksilna skupina i esterifikaciju hidroksimetilne skupine na C-1 položaju. Rjeđe dolazi do esterifikacije na položaju C-2 i C-6, a moguća je i češća esterifikacija i na položaju C-9. Može doći i do račvanja alkilnog lanca na barem jednoj od esterificiranih karboksilnih kiselina. Većina pirolizidinskih alkaloida derivirana je iz 4

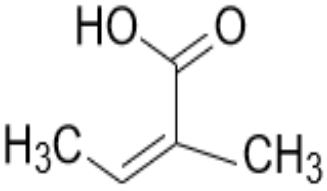
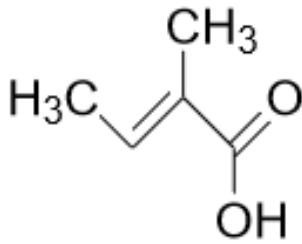
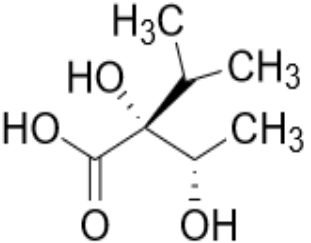
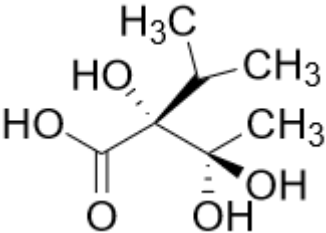
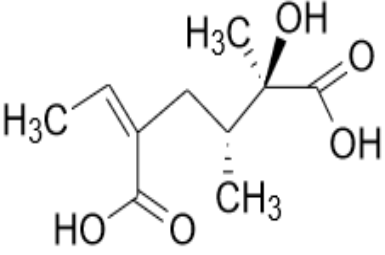
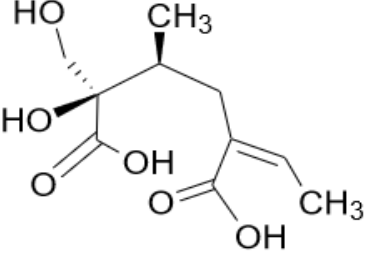
tipa necinskih baza, a to su otonecin, retronecin, heliotridin i platinecin. Retronecinski, otonecinski i heliotridinski tip pirolizidinskih alkaloida pripadaju nezasićenom tipu baza, dok je platinecinski tip zasićen. Po strukturalnim karakteristikama, najrazličitiji je otonecinski tip koji je oksidiran na C-8 položaju te je monociklički prsten, za razliku od ostalih koji su biciklički sustavi. Heliotridin i retronecin su diastereomeri s različitom orijentacijom na C-7 položaju (Moreira i sur., 2018; Chen i sur., 2010).



Slika 4. Prikaz različitih grupa pirolizidinskih alkaloida na temelju necinskih baza.

Necinske kiseline koje dolaze u sastavu pirolizidinskih alkaloida mogu biti jednostavne alifatske karboksilne kiseline poput anđelične i tiglične kiseline, monokarboksilne kiseline s hidroksiizopropilbutanskom strukturom na C-7 položaju poput trahelantske i viridiflorične kiseline ili dikarboksilne kiseline na C-8 ili C-10 položaju poput senecinske i isatinetične kiseline (Chen i sur., 2010).

Tablica 1. Prikaz kemijskih struktura necinskih kiselina koje dolaze u sastavu pirolizidinskih alkaloida.

Necinska kiselina	Kemijska struktura
Jednostavne kiseline	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>Andelična kiselina</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Tiglična kiselina</p> </div> </div>
Monokarboksilne kiseline	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>Trahelantska kiselina</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Viridiflorična kiselina</p> </div> </div>
Dikarboksilne kiseline	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>Senecinska kiselina</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Isatinetična kiselina</p> </div> </div>

N-oksidi pirolizidinskih alkaloida nabijene su molekule dobre topljivosti u vodi, ali i polarnim organskim otapalima poput metanola i acetonitrila (www.hah.hr). Tercijarne baze pirolizidinskih alkaloida topive su u organskim otapalima poput metanola, ali i u lipofilnijim otapalima poput diklormetana (www.hah.hr). Pri nižim pH vrijednostima dolazi do protonacije dušikovog atoma te se mijenja stupanj topljivosti tercijarnih baza PA u vodi. Stabilnost PA promjenjiva je i ovisi o uvjetima kojima su izloženi. Toplinska obrada može utjecati na samu količinu PA, PANO i

tercijarnih baza PA. Enzimi kataliziraju reakciju N-oksidacije PA, a redukcija PANO-va događa se spontano u prisutnosti bioloških ili kemijskih reducirajućih agensa. Bez obzira na spontanu redukciju, znatne količine i tercijarnih PA i PANO prisutne su u liofiliziranom biljnom materijalu nakon skladištenja u tamnim i suhim uvjetima. Za razliku od tih oblika PA, sami PA u potpunosti se razgrađuju u silaži ili u uvjetima u kojima nastaje kompost. Ostali oblici PA, poput estera posebice su osjetljivi na hidrolizu u vodenim otopinama pri pH vrijednostima iznad 9 te se stoga prilikom same ekstrakcije pri ispitivanjima koristi amonijak kako bi se digla pH vrijednost (www.hah.hr). Većina PA pokazuje stabilnost u blago kiselim uvjetima dok su neki osjetljivi na halogene kiseline (www.efsa.europa.eu).

4.1.5. Biosinteza pirolizidinskih alkaloida

U biosintezi pirolizidinskih alkaloida sudjeluje specifičan enzim, homospermidin sintaza (engl. Homospermidine synthase, HSS) koji prenosi amino butilni dio spermidina u niokotinamid adenin dinukleotid (engl. Nicotinamide adenine dinucleotide, NAD^+) ovisnoj reakciji na diamin putrescin što rezultira sintezom simetričnog triamina, homospermidina (Moreira i sur., 2018; Ober i Kaltenecker, 2009). Dalje se intermedijerni homospermidin ciklizira u odgovarajući iminijev ion koji se reducira i ciklizira u trahelantamidin i izoretronekanol koji se direktno ugrađuju u strukturu pirolizidinskih alkaloida kao necinske baze. Biosinteza se najčešće odvija u korijenu gdje se formira PANO oblik koji ima veliku topljivost u vodi i prenosi se dalje u druge dijelove biljke te pohranjuje u staničnoj vakuoli (Moreira i sur., 2018; Ober i Kaltenecker, 2009).

4.1.6. Farmako(tokso)kinetika pirolizidinskih alkaloida

Nakon oralne ingestije PA, dolazi do njihove apsorpcije iz gastrointestinalnog sustava te daljnje distribucije po organizmu (Luckert i suradnici, 2015). Većina njih, oko 80%, izlučuje se urinom, fecesom te majčinim mlijekom (Moreira i sur., 2018). Pojedini PA visokog stupnja lipoofilnosti u mogućnosti su proći placentu. Nakon oralne primjene, najveća koncentracija PA postiže se u plazmi nakon sat vremena, a sama apsorpcija oralnim putem je 20 - 50 puta veća od dermalne (Moreira i sur., 2018). Bioaktivacija PA većinom se odvija u jetri te je to stoga organ koji je najviše pogođen toksičnim učincima (Prakash i sur., 1999). U manjoj mjeri pogođeni su bubrezi i pluća jer se piroli koji se formiraju u jetri nakon metaboličke aktivacije transportiraju krvlju. Kao i mnogi drugi ksenobiotici kojima je za ispoljavanje toksičnog učinka potrebna biotransformacija, ista je

nužna i pirolizidinskim alkaloidima (Moreira i sur., 2018). Putevi metaboličke aktivacije mogu se podijeliti na tri glavna putem kojih dolazi ili do detoksikacije ili stvaranja rekativnih pirolnih vrsta (Chen i sur., 2010). To su: 1) hidroliza, čime dolazi do oslobađanja necinskih baza i necinskih kiselina; 2) N-oksidacija, čime dolazi do formiranja N-oksida pirolizodinskih alkaloida; 3) oksidacija, koja dovodi do formiranja pirolnih estera ili dehidropirolizidinskih alkaloida (eng. Dehydropyrrolizidine alkaloids, DHPA) (Moreira i sur., 2018; Prakash i sur., 1999). DHPA se smatraju najaktivnijim oblikom PA odgovornim za toksičnost jer reagiraju s nukleofilnim skupinama nukleinskih kiselina i proteina formirajući adukte (Chen i sur., 2010). Hidroliza predstavlja važan put detoksikacije čime se potiče klirens ovih tvari, isto kao i N-oksidacija kojom se stvaraju PANO koji su izrazito topljivi u vodi te se jako brzo izlučuju urinom. Međutim, to nije jedini put transformacije PANO (Chen i sur., 2010). Vrlo često, može doći i do ponovne pretvorbe PANO u PA te potom njihove oksidacije u DHPA (Moreira i sur., 2018). Ta reakcija katalizirana je pretežito citokrom P-450 monooksigenazama (Moreira i sur., 2018; Prakash i sur., 1999). Upravo o aktivnosti ovih enzima ovisi osjetljivost različitih vrsta na same pirolizidinske alkaloidne (Moreira i sur., 2018). Citokrom P450 3A (engl. Cytochrome P 450 3A, CYP 3A) i citokrom P450 2B (engl. Cytochrome P 450 2B, CYP 2B) izoforme su citokroma P450 uključene u metabolizam PA koje dovode do formiranja DHPA (Fu i sur., 2004). U proces hidrolize uključene su jetrene mikrosomalne karboksilesteraze (Chen i sur., 2010). Necinske kiseline koje se otpuštaju u procesu hidrolize nemaju toksikološki značaj (Moreira i sur., 2018). Između različitih tipova necinskih baza postoje i razlike metabolizma koje su posljedica strukturalnih razlika (Luckert i sur., 2015). Primjerice, retronecinski i heliotridinski tip podložni su procesu N-oksidacije dok otonecinski tip nije u mogućnosti formirati PANO upravo zbog metilacije dušika (Luckert i sur., 2015). Kao i u svakom sustavu, najvažnija je ravnoteža između puteva detoksikacije i aktivacije koja ima presudnu ulogu u osjetljivosti pojedinih vrsta na 1,2- nezasićene pirolizidinske alkaloidne (Yang i sur., 2016). Proces kojim se formiraju DHPA uključuje hidroksilaciju necinske baze na položaju C-3 i C-8 kod retronecinskog i heliotridinskog tipa, dok je kod otonecinskog nužna oksidativna N-demetilacija. Nakon stvaranja tih visokoreaktivnih metabolita, moguće je njihovo vezanje za glutation (eng. Glutathione, GSH) čime se stvara GSH konjugat, oblik pogodan za eliminaciju zbog čega se to smatra reakcijom detoksikacije. Pirolni esteri koji također mogu nastati metaboličkim reakcijama mogu se vezati za proteine i DNA te posljedično formirati adukte. Ovi

metaboliti također su podložni reakcijama hidrolize i transformacijama u dehidronecine koji su toksični produkti, ali ipak manje toksični od DHPA (Yang i sur., 2016).

4.1.7. Toksičnost pirolizidinskih alkaloida povezana s farmako(tokso)dinamikom

Kao što je već ranije spomenuto, glavni nositelj toksičnosti pirolizidinskih alkaloida prisutnost je 1,2 dvostruke veze koju nalazimo prvenstveno u retronecinskom, heliotidinskom i otonecinskom tipu, kao i prisutnost dvije hidroksilne grupe pridružene pirolnom prstenu (Yee i Roth, 2018). Za toksičnost važna je i prisutnost metilne skupine na C-1 atomu, dvije esterificirane grupe i grananje u bar jednoj od karboksilnih kiselina (www.efsa.europa.eu). Sve to rezultira time da su pirolizidinski alkaloidi najveće toksičnosti oni koji su po strukturi ciklički diesteri, a najmanje toksičnosti monoesteri (www.hah.hr). Umjerenu razinu toksičnosti posjeduju diesteri otvorenog tipa lanca (www.hah.hr). Povezanost između razine esterifikacije i toksičnosti neposredno je dokazana na primjeru makrocikličkih DHPA koji posjeduju izrazito veću toksičnost u odnosu na diestere otvorenog tipa lanca (Moreira i sur., 2018). Ostali faktori, osim strukturalnih karakteristika samih pirolizidinskih alkaloida koji utječu na osjetljivost spram toksičnih učinaka, uključuju dob i spol pri čemu je muški spol podložniji većoj toksičnosti, kao i djeca i sami fetusi (www.hah.hr). Različita osjetljivost primijećena je i među različitim vrstama te čak i u prisutnosti određenih bakterija i metala (Moreira i sur., 2018). Studije su pokazale da istovremena izloženost niskim dozama monokrotalina (vrsti pirolizidinskih alkaloida koja inače ne uzrokuje oštećenja u niskim dozama) u prisutnosti lipopolisaharida (engl. Lipopolysaccharide, LPS), strukturalne komponente Gram-negativnih bakterija, rezultira hepatotoksičnošću u obliku jetrenih lezija. Značajan je i utjecaj bakra koji u kombinaciji s retrorsinom uzrokuje značajno veća oštećenja nego sam retrorsin (Moreira i sur., 2018; Yee i sur., 2000; Aston i sur., 1998; Morris i sur., 1994). Upravo se bakru i njegovoj visokoj prirodnoj prisutnosti u jetri kod novorođenčadi pripisuje efekt povećane osjetljivosti ove skupine na PA (Edgar i sur., 2011). Sinergistički učinak PA i aflatoksina, kao i etanola primijećen je u promociji razvoja hepatotoksičnog učinka (Neumann i sur., 2017). Što se tiče vrsta, krave, konji, svinje, kokoši, patke, ribe, miševi, štakori, psi, pa i sami ljudi više su podložni PA intoksikaciji, dok su vrste poput ovaca, koza, zečeva, mongolskog skočimiša, hrčka i zamorca puno otpornije (Yee i Roth, 2018). Studijama je ispitivana akutna toksičnost za različite vrste te je utvrđeno da je za štakore $LD_{50} = 34$ mg/kg, miševe $LD_{50} = 65$ mg/kg, hrčke $LD_{50} = 81$ mg/kg, purice $LD_{50} = 85$ mg/kg, snježne prepelice $LD_{50} = 279$ mg/kg i zamorce $LD_{50} > 800$ mg/kg

(Yee i Roth, 2018; Prakash i sur., 1999). Tolike razlike među vrstama objašnjavaju se razlikama u hepatičkom metabolizmu, iako postoje razlike i u podložnosti vrsta spram specifičnog PA (www.hah.hr). Kao što je već više puta naglašeno, jetra je glavna meta toksičnog učinka zbog bogatog sadržaja enzima koji su ključni za biotransformaciju PA te se kao klinička manifestacija intoksikacije PA javlja venookluzivna bolest jetre koja se može smatrati specifičnim markerom tog događaja (Yee i Roth, 2018). Simptomi intoksikacije su povraćanje, povećanje jetre, krv u stolici i dijareja (www.hah.hr). Intoksikacija može biti akutna, subakutna i kronična, a međusobno se razlikuju i prema simptomima kroz koje se manifestiraju (Moreira i sur., 2018). Akutnu intoksikaciju karakteriziraju hemoragična nekroza, hepatomegalija i ascitesi. Kod subakutnog oblika dolazi do okluzije hepatičke vene što dovodi do primarnog sinusoidalnog oštećenja i disfunkcije parenhimalnih stanica (engl. Hepatic sinusoidal obstruction syndrome, HSOS) (Moreira i sur., 2018; Prakash i sur., 1999). Kronična intoksikacija dovodi do nekroze, fibroze, ciroze i proliferacije epitela žučnih kanala (www.hah.hr). Krajnja manifestacija intoksikacije otkazivanje je jetre i smrt. Sami znakovi koji ukazuju na toksičnost često nisu zamijećeni odmah, nego nakon par dana od izloženosti čime je znatno otežan sam proces utvrđivanja izvora toksičnosti. Klinički znakovi intoksikacije su intenzivnija bol u gornjem dijelu trbušne šupljine, brzo nakupljanje vode u peritonealnoj šupljini s oticanjem trbuha te katkad smanjena proizvodnja mokraće i oticanje nogu. Popratni simptomi koji se mogu javiti su mučnina i povraćanje te rjeđe žutica i visoka temperatura. Nakon nekoliko tjedana može doći do povećanja i stvrdnjavanja jetre te pleuralnog izljeva (www.hah.hr). Ostali pokazatelji mogu biti povišene serumske vrijednosti fibrinogena, bilirubina, γ -glutamilttransferaze i glutamat dehidrogenaze (Aydin i sur., 2013; Bosi i sur., 2013; Chen i sur., 2010; Helmy, 2006).

Intoksikaciju PA najbolje je spriječiti ukoliko je to moguće, no ako do nje ipak dođe, specifičan tretman ne postoji. U tom slučaju primjenjuju se mjere kojima se smanjuje unos natrija, primjenjuju se antagonisti aldosterona (spironolakton), smanjuje se portalni tlak primjenom nitrata, propranolola, losartana, izbjegavaju se inhibitori prostaglandina (diklofenak, ibuprofen), isto kao i sedativi (posebice benzodiazepini) te po potrebi uvodi se i nutritivna prehrabena potpora (nadoknada proteina i ugljikohidrata), a sve u svrhu prevencije daljnjih mogućih komplikacija koje se javljaju kao posljedica venookluzivne bolesti (Yee i Roth, 2018; Stickel i Seitz, 2000). Prehrana bogata proteinima pogoduje protektivnom učinku, isto kao i uvođenje cisteina i taurina u prehranu (Yee i Roth, 2018). Pozitivne protektivne učinke nakon uvođenja u

prehranu pokazuju i antioksidansi, cinkov klorid, beta karoten, etoksikin i butilirani hidroksianisol koji povećavaju aktivnost glutathione S-transferaze (engl. Glutathione S-transferase, GST) koja je važan enzim za kataliziranje GSH konjugata (Neumann i sur., 2017; Baybutt i Molteni, 1999). Za redukciju ascitesa koriste se infuzije albumina (Yee i Roth, 2018). Prilikom farmakoloških ispitivanja, pokazalo se da potencijal za kliničku uporabu u slučaju intoksikacije PA imaju pikroliv (glikozid koji ima protektivno djelovanje u slučaju monokrotalin induciranih oštećenja jetre- ispitivano na štakorima uz primjenu monokrotalina i potom pikroliva) i intravenska primjena N-acetilcisteina za dodatnu konjugaciju pirola (Yee i Roth, 2018). U ozbiljnijim slučajevima pribjegava se i invazivnim metodama poput uklanjanja ascitesa paracentezom, endoskopije krvarenja, ugradnje transjugularnog intrahepatičkog portosistematskog šanta (eng. Transjugular intrahepatic portosystemic shunt, TIPS) ili kirurškog „Denver“ šanta ili u konačnici, kao krajnja opcija-transplantacija jetre (Stickel i Seitz, 2000).

Druga glavna meta DHPA su pluća do kojih putuju plućnim arteriolama iz jetre (Moreira i sur., 2018; Prakash i sur., 1999). Šteta koja nastaje na plućima slična je onoj koja nastaje kao posljedica venookluzivne bolesti. Nakon što dosegnu ovaj ciljni organ, trombi u žilama i zadebljanja u njihovim stijenkama dovode do okluzije i upale. Svi ti činitelji u konačnici dovode do plućne hipertenzije koja posljedično može dovesti do kongestivnog srčanog zatajenja (Moreira i sur., 2018). U studiji Prakash i sur. (1999) provedenoj na štakorima, ispitivan je utjecaj izlaganja niskim dozama PA tijekom duljeg vremena kako bi se utvrdio stupanj razvoja plućnih lezija u tim uvjetima (Prakash i sur., 1999.). Kao krajnji rezultat došlo je do razvitka dva tipa plućnih lezija: intravaskularne akumulacije mononuklearnih stanica što je rezultiralo venskom okluzijom i ekstravaskularnih promjenama u kojima dolazi do zadebljanja alveolarne pregrade i proliferacije. Uz plućne lezije uvijek se pojavljuju i jetrene (Moreira i sur., 2018; Prakash i sur., 1999). Moguća je i pojava da se pirolne vrste trajnije vežu za određena tkiva te da s vremenom dolazi do indukcije staničnog popravka i njihovog metaboliziranja pri čemu se prekida njihova veza sa staničnim proteinima ili nuklearnim kiselinama što posljedično dovodi do toga da pirolne vrste ponovno povrate svoju elektrofilnost i mogućnost reagiranja sa staničnim komponentama (Stegelmeier i sur., 2016).

Moguć je i neurotoksični učinak PA koji se manifestira simptomima poput vrtoglavice, glavobolje i encefalitisa koji mogu napredovati čak i do deliričnog stadija i gubitka svijesti (Moreira i sur., 2018). Također, opisana je i pojava lezija u centralnom živčanom sustavu (Moreira i sur., 2018;

Huxtable i sur., 1996). Postoje zapisi i o teratogensti PA, premda su podaci ograničeni i rijetki. Zabilježen je slučaj razvoja venookluzivne bolesti u novorođenčeta čija je majka konzumirala biljni čaj pripremljen od biljne vrste *Tussilago farfara* L. (Moreira i sur., 2018; Roulet i sur., 1998). Genotoksični efekti poput mutacija, izmjena sestrinskih kromatida i kromosomalnih devijacija uočeni su u biljkama i staničnim kulturama nakon metaboličke aktivacije (Mei i sur., 2010). Karcinogenost PA dokazana je pokusima na štakorima i ostalim eksperimentalnim glodavcima (Fu, 2017), a s obzirom na razinu dokaza, za neke određene PA poput ridelina postoji opravdana sumnja da bi mogao biti i ljudski karcinogen (www.ema.europa.eu). Pretpostavljeni mehanizam uzrokovanja jetrenog hemangiosarkoma bazira se na interakciji aktivnog metabolita ridelina s endotelnom DNA pri čemu se stvara adukt i dolazi do oštećenja poput citomegalije, kariomegalije i apoptoze jetrenih stanica. Uslijed povećanja endotelnih stanica dolazi do opstrukcije krvnih žila i lokalne hipoksije čime se potencira proizvodnja vaskularnog endotelnog faktora rasta u hepatocitima što dovodi do povećane replikacije endotelnih stanica čime se povećava vjerojatnost DNA oštećenja koje može pobjeći mehanizmima popravka i u konačnici postati mutacija koja inducira razvoj hemangiosarkoma (www.ema.europa.eu).

Diljem svijeta zabilježeni su još mnogi slučajevi zdravstvenih problema koji su povezani s konzumacijom PA, no stvarna incidencija puno je veća od zabilježene zbog poteškoća pri određivanju točne etiologije izloženosti PA i dijagnosticiranja PA intoksikacije (Yee i Roth, 2018). Dodatno, tu je i problem praćenja i analize prisutnosti PA u pripravcima koji karakteriziraju alternativnu medicinu, najčešće pripravci tradicionalne kineske medicine te različiti dodaci prehrani (Yee i Roth, 2018).

4.1.8. Pregled zabilježenih slučajeva intoksikacije pirolizidinskim alkaloidima

Glavni izvor izloženosti ljudi PA je putem hrane koja je njima slučajno kontaminirana ili direktnom ingestijom alternativnih lijekova ili dodataka prehrani koji ih sadrže (www.ema.europa.eu). Glavni izvor slučajne izloženosti je kroz žitarice, dok manji doprinos imaju i ulja korištena za kuhanje, med, mlijeko, polen, jaja i meso životinja (Yee i Roth, 2018; www.ema.europa.hr). Izloženost se češće javlja u manje razvijenim zemljama jer u njima često do intoksikacije dolazi putem žitarica kontaminiranih PA i to u većem broju ljudi, od stotinu do čak i tisuću. No, to ne znači da su razvijenije zemlje izuzetak i da se u njima to ne događa (Yee i Roth, 2018). Primjer su Njemačka, Švicarska, Izrael i SAD, ali tad do intoksikacije dolazi putem

konzumacije meda i čajeva, ponekad začina, pića na biljnoj bazi, salate, graška i mrkve (www.bfr.bund.de; Shimshoni i sur., 2015; Bodi i sur., 2014). U novije vrijeme čak je zabilježeno dosta slučajeva pronađenih PA u biljnim čajevima pripremljenih od vrsta koje ne sadrže PA poput vrsta *Matricaria Chamomilla* L. i *Mentha x piperita* L., a što je rezultat križne kontaminacije (www.efsa.europa.eu). Visoke količine PA pronađene su uglavnom u komercijalno dostupnom zelenom i crnom čaju (Moreira i sur., 2018). Kroz povijest zabilježeno je mnogo slučajeva gotovo pa epidemijske intoksikacije do koje je došlo jer su se biljke bogate PA preradile u brašno od kojeg se pekao kruh koji je na taj način manjim količinama PA kroz par mjeseci ili čak godina trovao stanovništvo Tadžikistana, Uzbekistana, Japana, Nigerije, Afganistana, Indije, Šri Lanke, Južne Afrike, Iraka, Kariba (Yee i Roth, 2018; Huxtable, 1989). Dosad zabilježeni slučaj najvećih razmjera intoksikacije PA dogodio se 1974. godine u Afganistanu (Yee i Roth, 2018). Tada je oko 7800 pojedinaca od opće populacije od 35 000 ljudi u 100 sela konzumiralo pšenično brašno koje je bilo kontaminirano sjemenkama vrste *Heliotropium* sp., s iznimno visokim sadržajem PA. Od tih 7800 ljudi na kojim su bili vidljive posljedice intoksikacije, 2000 je završilo smrtnim ishodom, prvenstveno zbog hepatičke venookluzivne bolesti (Yee i Roth, 2018; Stegelmeier i sur., 1999). Globalizacija tržišta pridonijela je tome da se toksini transportiraju diljem svijeta u kontaminiranim proizvodima, a također dolazi i do ekspanzije invazivnih vrsta iz porodice *Senecio* sp. zbog nedostatka prirodnih faktora koji ograničavaju tu ekspanziju (www.ema.europa.eu). Mnoge takve biljke od presudne su važnosti za ekosustav jer sprječavaju eroziju tla i osiguravaju bioraznolikost (www.aoel.org).

U razvijenijim zemljama se u današnje vrijeme koriste odgovarajući herbicidi i provode se analize žitarica, što nažalost, nije slučaj s manje razvijenijim zemljama gdje se onda još uvijek i događaju slični slučajevi poput ovog ranije navedenog (Yee i Roth, 2018). Zabilježeni su i slučajevi ingestije alternativnih pripravaka poput biljnih čajeva ili dodataka prehrani koji su sadržavali PA. Ti slučajevi su bili rezultat pogrešnog vjerovanja kako su svi biljni preparati, ujedno i sigurni. Kroz desetljeća zabilježeni su i mnogi slučajevi hepatičke venookluzivne bolesti u dojenčadi i male djece koji su posebice osjetljivi na toksične učinke PA. Do intoksikacije u njihovim slučajevima najčešće je dolazilo preko biljnih čajeva ili su majke koristile biljne preparate tijekom trudnoće. Posebice se izdvajaju slučajevi zabilježeni na Jamajci i u zapadnim dijelovima Indije gdje je osobito bila popularna primjena takozvanih „bush“ čajeva koji su se pripremali od vršnih lisnatih dijelova ili divljih grmova vrsta *Senecio* sp. i/ili *Crotalaria* sp. (Yee i Roth, 2018). Koristili su se

za liječenje prehlada, bolova kod izbijanja zubića u djece i kod želučanih tegoba (Yee i Roth, 2018). Tijekom 70-ih godina prošlog stoljeća, u Arizoni je također zabilježena intoksikacija PA čiji je uzrok bio tada komercijalno dostupni biljni čaj „*gordolobo yerba*“ (www.who.int; Yee i Roth, 2018). Par slučajeva intoksikacije PA zabilježeno je kroz konzumaciju vrste *Heliotropium* sp. koja je jedno vrijeme bila jako popularna za liječenje mnogih kožnih stanja, pogotovo u Indiji. Ipak, najpopularnija i najraširenija biljna vrsta koja sadrži PA je upravo gavez (*Symphytum officinale* L.). Od davnina poznat je kao „*univerzalni lijek za sve tegobe*“. Nekada su se čak prodavale kapsule koje su sadržavale kombinaciju gaveza i pepsina kao preparat za poticanje probave (www.who.int; Yee i Roth, 2018). Sadržaj PA u kapsulama je varirao, ali u pojedinima je utvrđen sadržaj PA i do 2,9 mg/g preparata (www.who.int; Yee i Roth, 2018; Huxtable, 1989). Listovi gaveza konzumirali su se i sirovi u obliku salate, pretežito u Europi, Sjevernoj Americi, Japanu i Australiji (www.who.int; Yee i Roth, 2018). Gavez se nalazi i u mnogim kozmetičkim proizvodima za osobnu njegu poput šampona i krema. Američka agencija za hranu i lijekove (eng. (United States) Food and Drug Administration, (US)FDA) službeno je objavila preporuku da se svi pripravci gaveza namijenjeni oralnoj uporabi povuku s tržišta, a osim SAD-a, tu preporuku su prihvatili i u Kanadi, Ujedinjenom Kraljevstvu, Australiji i Brazilu. U tradicionalnoj medicini mnogih zemalja također se koriste biljne vrste bogate PA, pogotovo u zemljama poput Tajvana i Indije (*Ayurveda* pripravci), Madagaskara i Maskarenskim otocima (Yee i Roth, 2018; Roeder i Wiedenfeld, 2013). U 49 različitih biljnih vrsta korištenih u tradicionalnoj kineskoj medicini utvrđena je prisutnost oko 90 različitih PA (Jiang i sur., 2006). Prilikom konzumacije čaja od gaveza, primijećeni znakovi koji ukazuju na intoksikaciju PA su bolovi u trbuhu, tamna mokraća, žute bjeloočnice te žuta koža (Yee i Roth, 2018). Pacijenti često mnoge pripravke uzimaju na svoju ruku te ih uzimaju na dnevnoj bazi kroz dulji vremenski period (Stickel i Seitz, 2000). Primjer toga je slučaj žene kod koje se razvila hepatska venookluzivna bolest uslijed toga da je pila svaki dan čaj od gaveza te uzimala 6 kapsula dnevno koje su sadržavale kombinaciju pepsina i gaveza kroz period od 6 mjeseci (www.who.int; Stickel i Seitz, 2000). Kasnije je utvrđeno za kapsule da su sadržavale 400 mg bijelog praha u kojem je sadržaj pirolizidinskih alkaloida iznosio 107 nmol/g i 757 nmol/g N-oksida pirolizidinskih alkaloida. Količina biljnog čaja koju je dnevno konzumirala iznosila je oko 480 g. Utvrđeni sadržaj pirolizidinskih alkaloida u čaju iznosio je 23,9 nmol/g. Kad se zbroji ukupni sadržaj, dnevni unos PA bio je 700-740 µg što iznosi oko 15 µg/kg tjelesne mase (www.who.int; Stickel i Seitz, 2000; Ridker i sur., 1985). Još jedan slučaj povezan s

konzumacijom čaja od gaveza je onaj žene u dobi od 47 godina koja je dnevno konzumirala 10 šalica čaja kroz godinu dana za liječenje alergija i umora. Izmjerena koncentracija PA po šalici čaja varirala je između 8,5 mg i 26 mg (www.who.int; Stickel i Seitz, 2000).

U Engleskoj je zabilježen slučaj dječaka u dobi od 13 godina koji je zaprimljen u bolnicu sa simptomima koji su ukazivali na venookluzivnu bolest (www.who.int; Weston i sur., 1987). Prije toga imao je utvrđenu dijagnozu Crohnove bolesti unazad 3 godine te je bio liječen prednizonom i sulfasalazinom koji su imali pozitivan efekt na liječenje simptoma te bolesti. Na zahtjev roditelja, ukinuta je ta terapija te je liječenje nastavljeno akupunkturoom i gavezovim korijenom što mu je prepisano od strane naturopata. Točne količine i učestalost konzumacije gavezovog korijena nisu bile poznate. U trenutku zaprimanja u bolnicu, pacijent je ponovno uzimao prednizolon i sulfasalazin. Na temelju svih ovih saznanja, zaključeno je da je jedini faktor koji je mogao uzrokovati venookluzivnu bolest ipak sam gavez (www.who.int; Weston i sur., 1987).

Daljni izvještaji prijavljuju i slučaj mladića s Novog Zelanda starosti 23 godine kod kojeg je detektirana venookluzivna bolest i portalna hipertenzija koje su u konačnici dovele i do njegove smrti uslijed zatajenja jetre (www.who.int; Yeong i sur., 1990). Prije nego što se razvila sama bolest, poznato je da je konzumirao velike količine zelenih dijelova gaveza, pretežito listove kao salatu kroz dulji vremenski period. Sam pacijent prijavio je da je kroz posljednja tri mjeseca patio od početnih simptoma koji su nalik gripi praćenih slabošću i noćnim znojenjem. Tri tjedna prije nego što je zaprimljen u bolnicu primijetio je periferni edem i abdominalnu napetost. Zadnje četiri godine živio je u komuni te mu je prehrana uglavnom bila vegetarijanska. Uz to, imao je naviku da bi krajem tjedna ili na kraju samog dana jeo velike količine određene hrane. U periodu od tjedan ili dva prije manifestacije simptoma, jeo je 4 do 5 porcija listova mladog gaveza pripremljenog na pari. Pretpostavlja se da je ulogu u razvitku bolesti mogla odigrati i višegodišnja deficijencija proteina u prehrani, no glavnim uzrokom smatra se upravo gavez (www.who.int; Yeong i sur., 1990).

U Austriji je zabilježen slučaj venookluzivne bolesti jetre u djeteta starosti 18 mjeseci koje je od svojeg trećeg mjeseca života konzumiralo biljni čaj (www.who.int; Sperl i suradnici, 1995). Čaj je naknadno analiziran i utvrđeno je da je sadržavao biljne vrste porodica *Mentha x piperita*, *Tussilago farfara* i *Adenostyles alliariae* (Gouan) A. Kern. Procijenjeno je da je ukupna doza koju je dijete konzumiralo bila 0,06 mg/kg smjese PA na dan kroz period od 15 mjeseci (www.who.int; Sperl i sur., 1995).

U Španjolskoj u bolnicu je primljen muškarac starosti 73 godine sa simptomima abdominalne boli, distenzije i hepatomegalije i nakon mjesec dana je umro od masivnog gastričkog krvarenja (www.who.int; Ortiz-Cansado i sur., 1995). Prije toga je 2 godine, redovito i na dnevnoj bazi, konzumirao 2 infuza biljnog čaja „*hierba cana*“ koji u sebi sadrži vrstu *Senecio vulgaris* L., (www.who.int; Ortiz-Cansado i suradnici, 1995).

U Brazilu je dječaku starosti 25 mjeseci dijagnosticiran ascites, hepatomegalija i respiratorno zatajenje uslijed 2 godine konzumacije čaja „*maria mole*“ koji u sebi sadrži vrstu *Senecio brasiliensis* (Spreng) Less (www.who.int; Magnabosco i sur., 1997).

Djevojčica starosti 3,5 mjeseca zaprimljena je u bolnicu u Južnoj Africi 2002. godine sa simptomima dijareje, povraćanja i ascitesa te je utvrđeno da je konzumirala tradicionalni biljni pripravak „*muti*“ (www.who.int; Zuckerman i sur., 2002). Nakon 3 mjeseca došlo je do razvoja peritonitisa i septikemije te smrti djeteta. Analizom je utvrđeno da je konzumirani pripravak sadržavao između 1,0 i 1,2 mg/kg PA (www.who.int; Zuckerman i sur., 2002).

U Njemačkoj u bolnicu je zaprimljena trudnica te podvgnuta hitnom carskom rezu uslijed dijagnoze fetalnog ascitesa (www.who.int; Rasenack i sur., 2003). Dijete je umrlo 12 sati nakon poroda te je utvrđeno da je uzrok bila hepaticka venookluzivna bolest. Naknadnim ispitivanjem utvrđeno je da je majka tijekom cijele trudnoće prilikom kuhanja koristila svakodnevno oko 2 grama biljne mješavine začina porijeklom iz Turske u kojoj je nađen znatni sadržaj PA. Procijenjeno je da je majka tijekom trudnoće ukupno unijela oko 4,73 mg PA koji su se transportirali do fetusa te je fetalna jetra bila glavno aktivno mjesto formacije reaktivnih pirolnih vrsta i ispoljavanja toksičnih učinaka (www.who.int; Rasenack i sur., 2003).

Blizanci starosti 1 mjesec, i to dva para njih, zaprimljeni su u bolnicu u Južnoj Africi uslijed konzumacije biljnih pripravaka u kojima je utvrđen visok sadržaj PA, pretežito retrorsina (www.who.int; Conradie i sur., 2005). Blizanci jedne obitelji su preživjeli, ali uz znatna oštećenja jetre dok su blizanci druge preminuli (www.who.int; Conradie i sur., 2005).

U Kini su zabilježeni slučajevi hepatotoksičnosti uslijed konzumacije biljne vrste *Gynura segetum* (Lour.) Merr., biljke koja se koristi u tradicionalnoj kineskoj medicini (www.who.int; Dai i sur., 2007; Dai i sur., 2006). Jedan pacijent oporavio se nakon transplantacije jetre, a prije pojave simptoma poput abdominalne distenzije, ascitesa i hepatomegalije, dnevno je konzumirao dozu od oko 3 g ove biljne vrste. Drugi pacijent također je konzumirao oko 3 g dnevno kroz 3 mjeseca te se potpuno oporavio. Treći pacijent konzumirao je oko 2 g dnevno (www.who.int; Dai i sur., 2007;

Dai i sur., 2006). Ista biljna vrsta bila je uzrokom razvoja hepatičke venookluzivne bolesti kod još jedne pacijentice koja je sama spravila tradicionalno biljno vino koristeći upravo vrstu *Gynura segetum* (www.who.int; Lin i sur., 2011).

U Švicarskoj u bolnicu je zaprimljena žena starosti 66 godina s dijagnozom progresivne dispneje (www.who.int; Györik i Stricker, 2009). Daljnjim pretragama utvrđeno je da žena pati od plućne hipertenzije uslijed plućne venookluzivne bolesti koju liječnici nisu mogli povezati s nekim objašnjivim uzrokom. Naknadno je utvrđeno da je žena konzumirala čaj za pripremu kojeg je korišteno više biljnih vrsta. Jedna od korištenih biljaka je bila i *Symphytum officinale*, a dnevno je pila oko litru ili litru i pol tog pripravka kroz više mjeseci (www.who.int; Györik i Stricker, 2009).

U SAD-u je zabilježen slučaj razvitka venookluzivne bolesti jetre uslijed dnevne konzumacije „*Shen Chu Cha*“ čaja čiji je sastojak biljka *Scutellaria baicalensis* Georgi za koju nije dokazano hepatotoksično djelovanje, već tijekom žetve te biljne vrste često dolazi do kontaminacije biljnom vrstom *Teucrium chamadrys* L. koja sadrži PA (www.who.int; Frist i sur. 2010).

Zabilježen je i slučaj ciroze uzrokovan čestom ingestijom biljne vrste *Crotalaria longirostrata* Hook. i Arn. koja sadrži PA (www.who.int; Ng i sur., 2014).

Žena starosti 63 godine zaprimljena je u bolnicu u Njemačkoj uslijed abdominalne boli i povraćanja koji su se javili 3 h nakon konzumacije listova koje je sama skupila (oko 100 g), i to pretežito vrsta *Petasites* sp. L. i *Tussilago* sp. (www.who.int; Schroff i sur., 2013). Kasnije je došlo i do razvitka hepatičke venookluzivne bolesti (www.who.int; Schroff i sur., 2013).

U Kini u bolnicu je primljen dječak starosti 10 mjeseci s abdominalnom distenzijom te je utvrđeno da pati od Budd-Chiari sindroma (tromboza jetrenih vena) uzrokovanog konzumacijom PA iz biljnih pića (www.who.int; Wu i sur., 2013). Naime, dječakova majka pripremala je pića od biljaka koje je uzgajala u svom vrtu. Pripremala ih je na način da je kuhala biljke, a točnih količina niti učestalosti konzumacije tih pripravaka, nije se mogla sjetiti. Biljni materijal koji je sakupila za pripremu pića, ali ga nije još iskoristila, podvrgnut je analizi te je utvrđeno da sadrži biljne vrste *Emilia sonchifolia* L. (PA sadržaj), *Elephantopus scaber* L., *Centella asiatica* L. i *Hedyotis diffusa* Willd. (www.who.int; Wu i sur., 2013).

U Švicarskoj u bolnicu je zaprimljena žena uslijed simptoma poput povraćanja, umora i žutice (www.who.int; Rollason i sur., 2016). Pacijentica je izjavila da je prije pojave simptoma, kroz 3-4 tjedna na dnevnoj bazi konzumirala jednu žlicu cvjetnog peluda koji je analiziran i u kojem je

nađen visoki sadržaj PA. Isto tako, utvrđeno je da je pacijentica brzi CYP3A metabolizator, što je dodatno pridonijelo povećanoj toksičnosti (www.who.int; Rollason i sur., 2016).

4.2. Gavez - ljekovita biljka s toksičnim sastavnicama

Gavez je biljka koja je farmaceutski važna jer ima dokazana brojna ljekovita svojstva te se zbog toga i koristi u praksi, no važno je obratiti pozornost na to da isto tako prirodno sadrži sastavnice koje mogu djelovati toksično.

4.2.1. Opis biljke gaveza

Gavez (*Symphytum officinale* L., *Boraginaceae*) višegodišnji je grm koji nalazimo u središnjoj Europi i dijelovima Azije (Staiger, 2012). Najčešće raste na vlažnim tlima, ima debelu dlakavu stabljiku i visine je 20 - 100 cm (www.pharmaceutical-journal.com). Duboko se ukorijenjuje u tlu. Korijen je izvana tamno smeđe do crne boje, a iznutra bijele do svijetlo žute boje i sluzav. Listovi su mu duguljasti, dlakavi i često drugačijeg izgleda ovisno o položaju na stabljici. Donji listovi su široki u podnožju i prema krajevima se sve više sužavaju dok su gornji listovi naizmjenično poredani na stabljici i suženi samo na krajevima. Cvjetovi su tamnoljubičasti, plavi ili bjelkasti te raspoređeni u grozdove. Sama cvatnja odvija se od svibnja do kolovoza kad se i preporučuje brati svježu biljku. Korijen i listovi uglavnom se koriste zbog ljekovitih svojstava i skupljaju u proljeće i kasnu jesen, a koriste se svježi ili osušeni. Korijen se iskopa, opere, osuši te potom razreže na komadiće veličine oko 15 cm te se suši na toplom i prozračnom mjestu ili u sušionici u što kraćem vremenskom roku kako bi se spriječila fermentacija djelatnih tvari (www.pharmaceutical-journal.com). Tako osušeni listovi i korijen čuvaju se na suhom mjestu. Zapravo su i mnoge druge biljke koje imaju visok sadržaj PA prvotno namjerno uvedene na polja usjeva kako bi se spriječila erozija tla i obogatilo tlo dušikom, no zbog loše kontrole njihovog širenja, proširile su se po poljima u tolikoj mjeri da su postali kontaminanti sa štetnim utjecajem (Yee i Roth, 2018; Stegelmeier i sur., 1999).

4.2.2. Sastavnice biljke gaveza i njihovo djelovanje

Korijen gaveza dio je biljke koji sadrži najveću koncentraciju djelatnih tvari, a to je alantoin čiji sadržaj varira i iznosi 0,6 - 4,7 % (Staiger, 2012; Dennis i sur., 1987), obilan sadržaj sluzavih polisaharida sastavljenih od fruktoze i glukoze (do 29 %) (Staiger, 2012; Franz, 1969), fenolne kiseline poput ružmarinske (sadržaj do 0,2 %), klorogenske kiseline (sadržaj do 0,012 %), kafeinske kiseline (sadržaj do 0,004 %) i α -hidroksi kafeinske kiseline (Staiger, 2012; Grabias i Swiatek, 1998). Potom još glikopeptide i aminokiseline (asparagin) (Staiger, 2012; Hiermann i Writzel, 1998), triterpenske saponine u formi monodezmozidnih i bidezmozidnih glikozida baziranih na aglikonu hederageninu (npr. simfitoksid A), oleanolnu kiselinu (Staiger, 2012; Aftab i sur., 1996), litospermičnu kiselinu (Staiger, 2012), eterično ulje, smolu, trijeslovine, kolin te pirolizidinske alkaloidne, skoro u potpunosti u formi N-oksida od kojih su to uglavnom 7-acetilintermedin i 7-acetillikopsamin zajedno s manjim količinama intermedina, likopsamina i simfitina (Staiger, 2012; Brauchli i sur., 1982). Ovisno o korištenoj analitičkoj metodi, utvrđeni sadržaj PA u biljci gaveza varira od 0,013 % do 1,2 % (Staiger, 2012; Mütterlein i Arnold, 1993; Vollmer i sur., 1987; Stengl i sur., 1982.). Listovi gaveza sadrže manju koncentraciju pirolizidinskih alkaloida od korijena te kalij i vitamin C (Staiger, 2012; Schmidt, 2006). Zbog tog razloga češće se listovi i svi dijelovi biljke koji rastu iznad tla skupljaju za uporabu u medicinske svrhe (Staiger, 2012; Schmidt, 2006). Terapeutska svojstva gaveza temelje se na njegovom protuupalnom i analgetskom djelovanju (Staiger, 2012). Jedna od najvažnijih djelatnih sastavnica svakako je alantoin koji se odlikuje snažnom sposobnošću poticanja proliferacije stanica u kostima, vezivnom i potkožnom tkivu. Za aktivaciju i djelovanje alantoina potrebne su druge aktivne tvari iz gaveza poput auksina, biljnog hormona koji potiče alantoin na stvaranje novih stanica i tkiva. Točni molekularni mehanizmi na kojima se temelji djelovanje gaveza nisu još u potpunosti razjašnjeni, no smatra se da su za farmakodinamičke učinke odgovorni upravo alantoin i ružmarinska kiselina (Staiger, 2012). Ružmarinska kiselina posjeduje protuupalnu aktivnost i to na način da inhibira formiranje malondialdehida u ljudskim eritrocitima, sintezu prostaglandina i agregaciju eritrocita induciranu karagenanom i želatinom (Baranauskeite i sur., 2020; Gracza, 1987). Ova svojstva i učinci dokazani su pokusima na štakorima pri čemu je korišten etanolni ekstrakt gavezovog korijena (Staiger, 2012). Svojstvo gaveza da potpomaže cijeljenju rana također je dokazano pokusima na modelu fibroblasta u kolagenskom matriksu (Staiger, 2012).

4.2.3. Uporaba gaveza

Gavez se još od antičkih vremena oralno koristi za liječenje gastritisa, peptičkog ulkusa, jakih menstruacija, diareje, krvi u urinu, kašlja, bronhitisa, bolova u prsištu te za grgljanje kod bolesti desni i upaljenog grla (www.ema.europa.eu). Na temelju današnjih spoznaja, enteralna uporaba se ne preporučuje, upravo zbog sadržaja toksičnih pirolizidinskih alkaloida koji mogu imati štetne, toksične učinke (www.pharmaceutical-journal.com). Topička primjena ima dokazanu učinkovitost i sigurnost kroz mnoge randomizirane kontrolirane kliničke studije. Odobreno je korištenje kod boli, upale i natečenosti zglobova i mišića u stanjima poput osteoartritisa, akutne leđne mialgije, uganuća i kontuzija uzrokovanih sportskim ozljedama (www.pharmaceutical-journal.com). Koristio se i za pospješivanje zacijeljivanja rana te kod posjeklina prije spoznaja o toksičnosti što je osobito opasno u slučajevima ozlijeđene kože te je danas takva uporaba strogo zabranjena (Staiger, 2012). Osim toga, koristi se i kod modrica, gihta, varikoznih vena, psorijaze i sličnih stanja, međutim, za tu namjenu nema dovoljno dokaza o učinkovitosti (Staiger, 2012).

Od gaveza se najčešće pripremaju masti, gelovi i kreme, a moguća je i priprema tinktura, obloga, kupki i biljnih kapi (Staiger, 2012). Pripravci se ne smiju držati u metalnim posudama (www.krenizdravo.dnevnik.hr).

4.2.4. Ograničenja uporabe pripravaka gaveza

Moguće su interakcije ukoliko se istovremeno uzimaju preparati gaveza i hepatotoksični lijekovi (www.webmd.com). Stupanj interakcije spada pod kategoriju umjerenih interakcija, što znači da nije potpuna kontraindikacija, no nužan je veliki oprez ukoliko se ipak odluči da je primjena neophodna te prije svega savjetovanje s liječnikom. Hepatotoksični lijekovi sami po sebi djeluju toksično na jetru, na što ukazuje samo im ime, a pošto se i gavez može smatrati hepatotoksičnim, logično je zaključiti da se povećava rizik nepovoljnih utjecaja na samu jetru. Neki od lijekova koji mogu dovesti do oštećenja jetre su acetaminofen, amiodaron, karbamazepin, izoniazidi, metotreksat, metildopa, flukonazol, itrakonazol, eritromicin, fenitoin, lovastatin, pravastatin, simvastatin i mnogi drugi (www.webmd.com). Potreban je poseban oprez ukoliko se istovremeno s gavezom primijenjuju citokrom P 450 3A4 (eng. Cytochrome P 450 3A4, CYP 3A4) induktori, odnosno lijekovi koji mogu potaknuti bržu razgradnju tvari putem jetre u što u prvom redu, ipak spada i gavez. Ubrzanom razgradnjom gaveza, moguće je povećanje njegovog toksičnog učinka.

Lijekovi koji su ujedno i CYP 3A4 induktori su karbamazepin, fenobarbital, fenitoin, rifampicin, rifabutin i drugi (www.webmd.com).

Preporučena primjena gaveza za koju se smatra da bi trebala biti uglavnom sigurna za krajnjeg korisnika je topička, u malim količinama i kroz period koji nije duži od 10 dana (www.webmd.com). Naravno, apsorpcija toksičnih PA moguća je kroz kožu, no ipak u puno manjoj mjeri nego što je to slučaj s oralnom primjenom koja nije preporučljiva ni u kojem slučaju. Topička primjena isto može predstavljati značajan rizik ukoliko je koža oštećena jer tad ipak dolazi do značajnog povećanja apsorpcije ili ako se primjenjuju velike količine (www.webmd.com).

Ne preporučuje se primjena u trudnoći ili kod dojilja, oralno ni u kojem slučaju, kao što je već i naglašeno, posebice ne kod ove skupine bolesnika (www.webmd.com). Isto tako, čak ni topička primjena u trudnoći se ne preporučuje zbog moguće apsorpcije preko kože u značajnoj mjeri. Primjena kod djece također se ne preporučuje, osobito zbog posebnosti njihovog organizma prilikom čega može doći do puno većeg stupnja apsorpcije kroz kožu nego kod odraslih. Različit je i sadržaj enzima i stupanj razvoja jetre te je to još jedan razlog zašto na njih mogu PA djelovati toksičnije. Kao i uvijek, posebna skupina su i stariji ljudi kod kojih se mijenja cijeli organizam s godinama te je potreban veći oprez i prilagodba primjene (www.webmd.com). Ljudi koji pate od jetrenih bolesti također su skupina koja ne bi trebala primjenjivati preparate gaveza (www.webmd.com).

4.2.5. Mjere minimizacije rizika izloženosti pirolizidinskim alkaloidima iz pripravaka gaveza primijenjenih topikalnim putem

Na temelju spoznaja o toksičnosti PA, preporuča se izloženost PA svesti na minimum (www.ema.europa.eu). Iako je topikalna apsorpcija 20-50 puta manja nego oralna, i za topikalnu primjenu se kao maksimalna dnevna doza uzima ona koja ne prelazi 1,0 µg/dan PA u preparatima (www.ema.europa.eu). Općenito se kao maksimalni dnevni unos PA uzima vrijednost od ukupno 1,0 µg na dan, bilo da se radi o preparatima na bazi biljaka za koje se zna da prirodno sadrže PA ili ako je riječ o pripravcima koji mogu biti kontaminirani PA. Više riječi o tome će biti u narednom poglavlju koje će ukazati na dodatne izvore koji mogu doprinijeti izloženosti PA te njihovom ukupnom dnevnom unosu te se stoga uvodi i bolja kontrola kojom se utvrđuje i ograničava količina PA (www.ema.europa.eu). Isto tako važno je da proizvođači provode odgovarajuće kontrole kvalitete sirovina, deklariraju na odgovarajući način proizvode te da se nadležnim agencijama

prijavljuje pojava neželjenih nuspojava (Yee i Roth, 2018). Što se tiče pripravka gaveza za topikalnu primjenu, u današnje vrijeme se uzgajaju vrste gaveza koje su genetski modificirane na način da je sadržaj PA ili jako nizak ili nepostojeći (www.pharmaceutical-journal.com).

4.3. Ostali ljekoviti pripravci kontaminirani pirolizidinskim alkaloidima - Uredba Europske komisije

Na području Europske unije, čiji dio je i Republika Hrvatska, još 2006. donesena je Uredba kojom su utvrđene najveće dopuštene količine određenih kontaminanata u hrani, no ta Uredba od tada je doživjela mnoge nadopune i preinake temeljene na mišljenjima i istraživanjima stručnih agencija i odbora (www.efsa.europa.eu; www.eur-lex.europa.eu). Prva koja je od posebnog interesa za ovaj rad tiče se znanstvenog mišljenja o rizicima za javno zdravlje povezanim s prisutnošću pirolizidinskih alkaloida u hrani i hrani za životinje iz 2011. objavljenog od strane Znanstvenog odbora za kontaminante u prehrambenom lancu (www.efsa.europa.eu; www.eur-lex.europa.eu). Odbor je zaključio da 1,2-nezasićeni pirolizidinski alkaloidi na ljude mogu djelovati kao genotoksične karcinogene tvari i da postoji mogući zdravstveni rizik za djecu i malu djecu koja konzumiraju velike količine meda. Osim meda, zaključeno je da i postoje drugi mogući izvori izloženosti pirolizidinskim alkaloidima putem hrane, no rezultate nije bilo moguće kvantificirati zbog nedovoljno podataka. Bez obzira na to, krajnji zaključak ipak je bio da izloženost pirolizidinskim alkaloidima iz peludi, čaja, biljnih infuzija i biljnih dodataka prehrani potencijalno može predstavljati rizik za razvoj akutnih i kroničnih štetnih učinaka u potrošača (www.efsa.europa.eu; www.eur-lex.europa.eu). Uočena je potreba za ispitivanjem koncentracije pirolizidinskih alkaloida u prehrambenim proizvodima životinjskog podrijetla poput mlijeka, mliječnih proizvoda, jaja, mesa i mesnih proizvoda, te za prehrambene proizvode biljnog podrijetla, uključujući biljne čajeve i dodatke prehrani u različitim regijama Europe kako bi se procijenio rizik izloženosti tim putem (www.efsa.europa.eu; www.eur-lex.europa.eu). Na temelju provednih istraživanja i ispitivanja, 2016. godine zaključeno je da čajevi i biljne infuzije najviše pridonose izloženosti ljudi pirolizidinskim alkaloidima, ali isto tako i dodaci prehrani na bazi peludi. Izloženost pirolizidinskim alkaloidima putem konzumacije meda niža je u odnosu na prethodno nabrojene izvore, ali nipošto nije zanemariva, isto kao i izloženost putem biljnih dodataka prehrani (www.efsa.europa.eu; www.eur-lex.europa.eu). Godine 2017. utvrđena je nova referentna točka od 237 µg/kg tjelesne mase po danu kako bi se procijenio karcinogeni rizik

pirolizidinskih alkaloida te je zaključeno da postoji mogući rizik za zdravlje povezan s izloženosti pirolizidinskim alkaloidima, posebno za česte potrošače velikih količina čaja i biljnih infuzija, osobito ako je u pitanju mlađa populacija. Uz upozorenja o opasnosti, predložene su i mjere kojima se ista može smanjiti, svesti na minimum ili čak i spriječiti. Predložene mjere uključuju primjenu dobrih poljoprivrednih praksi i praksi berbe, utvrđivanje najvećih dopuštenih količina u početnim sirovinama, tijekom proizvodnog procesa, kao i u krajnjem proizvodu (www.efsa.europa.eu; www.eur-lex.europa.eu). S obzirom na sve te spoznaje, početnoj Uredbi iz 2006. godine koja je spomenuta na početku ovog poglavlja, dodan je Prilog 11. prosinca 2020. koji će biti u primjeni od 1. srpnja 2022. godine, kao i tako nadopunjena Uredba, a u kojem su definirane najveće dopuštene količine pirolizidinskih alkaloida u pojedinim proizvodima koji su prepoznati kao značajan izvor izloženosti pirolizidinskim alkaloidima. Potrebno je dodati da ono što je zakonito stavljeno na tržište prije 1. srpnja 2022. može ostati na tržištu do 31. prosinca 2023. Najveća dopuštena količina odnosi se na zbroj sljedećih 21 pirolizidinskih alkaloida: intermedin/likopsamin, intermedin-N-oksid/likopsamin-N-oksid, senecionin/senecivernin, senecionin-N-oksid/senecivernin-N-oksid, senecifilin, senecifilin-N-oksid, retrorsin, retrorsin-N-oksid, ehimidin, ehimidin-N-oksid, lasiokarpin, lasiokarpin-N-oksid, senkirkin, europin, europin-N-oksid, heliotrin, heliotrin-N-oksid. Kako su u biljkama najčešće prisutne smjese različitih pirolizidinskih alkaloida, često je prilikom primjene određenih metoda analize teško odvojiti i pojedinačno identificirati pojedine pirolizidinske alkaloidne te je određeno još dodatnih 14 pirolizidinskih alkaloida koji koeluiraju, tj. istodobno se izdvajaju iz smjese s kromatografske kolone kao i neki od prethodno nabrojanih, a to su: indicin, ehinatin, rinderin koji mogu koeluirati s likopsaminom/intermedinom, indicin-N-oksid, ehinatin-N-oksid, rinderin-N-oksid koji mogu koeluirati s likopsamin-N-oksidom/intermedin-N-oksidom, integerimin koji može koeluirati sa senecioninom/seneciverninom, integerimin-N-oksid koji može koeluirati sa senecionin-N-oksidom/senecivernin-N-oksidom, heliosupin koji može koeluirati s ehimidinom, heliosupin-N-oksid koji može koeluirati s ehimidin-N-oksidom, spartioidin koji može koeluirati sa senecifilinom, spartioidin-N-oksid koji može koeluirati sa senecifilin-N-oksidom, usaramin koji može koeluirati s retrorsinom, usaramin-N-oksid koji može koeluirati s retrorsin-N-oksidom. Pojedini pirolizidinski alkaloidi koji se mogu pojedinačno i odvojeno identificirati korištenom metodom analize, moraju se kvantificirati i uključiti u ukupni zbroj pirolizidinskih alkaloida čija je najveća dopuštena količina u pojedinim proizvodima definirana Prilogom (www.efsa.europa.eu;

www.eur-lex.europa.eu). Potrebno je još naglasiti da pojedine zemlje članice Europske unije imaju svoja vlastita restriktivnija nacionalna pravila o stavljanju na tržište biljaka koje sadrže pirolizidinske alkaloidne na što svaka država ima pravo, no pravila propisana ovom Uredbom se generalno odnose na sve zemlje članice kao minimum pravila koja se moraju poštivati (www.efsa.europa.eu; www.eur-lex.europa.eu).

Za biljne infuzije rooibosa, anisa (*Pimpinella anisum* L.), matičnjaka, kamilice, majčine dušice, paprene metvice, biljke *Aloysia citodora* Paláu (odnosi se na sušene proizvode pri čemu se biljna infuzija u obliku sušenog proizvoda sastoji od listova, cvjetova, korijenja, bilja i svih ostalih dijelova biljke, bilo u vrećicama ili u rasutom stanju, a služi za pripravak tekućeg proizvoda) i mješavine koje se sastoje isključivo od tog sušenog bilja, najveća dopuštena količina pirolizidinskih alkaloida je 400 µg/kg (www.efsa.europa.eu; www.eur-lex.europa.eu). Uzimajući u obzir da se pri pripremi jedne šalice iskoristi oko 2 g biljnog materijala, sadržaj PA po šalici iznosi 0,8 µg. Biljne infuzije u sušenom obliku za dojenčad i malu djecu smiju sadržavati najviše 75 µg/kg pirolizidinskih alkaloida, a one u tekućem obliku za dojenčad i malu djecu najviše 1,0 µg/kg. Ostale biljne infuzije izuzev ovih prethodno nabrojanih do 200 µg/kg (www.efsa.europa.eu; www.eur-lex.europa.eu).

Čaj (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze), kao i aromatizirani čaj (*Camellia sinensis*) kao sušeni proizvod za primjenu u dojenčadi i male djece, smije najviše sadržavati do 75 µg/kg (www.efsa.europa.eu; www.eur-lex.europa.eu). Pojam čaja u sušenom obliku odnosi se na sušene listove, stabljiku i cvjetove, bilo u rasutom stanju ili u vrećicama koji se koriste za pripremu tekućeg oblika, kao i na instant biljne čajeve dok se pojam aromatiziranog čaja odnosi na čaj s aromama i određenim sastojcima hrane s osobinama aroma. Čaj i aromatizirani čaj za dojenčad i malu djecu u obliku tekućeg proizvoda smije sadržavati najviše 1,0 µg/kg pirolizidinskih alkaloida, a svi ostali sušeni proizvodi čaja i aromatiziranog čaja 150 µg/kg (www.efsa.europa.eu; www.eur-lex.europa.eu).

Dodaci prehrani na bazi peludi, pelud i proizvodi od peludi smiju sadržavati najviše 500 µg/kg pirolizidinskih alkaloida, a ostali dodaci prehrani koji sadrže biljne sastojke, uključujući ekstrakte 400 µg/kg (www.efsa.europa.eu; www.eur-lex.europa.eu).

Listovi borača, bilo smrznuti ili svježi, stavljeni na tržište za krajnjeg potrošača smiju sadržavati do 750 µg/kg pirolizidinskih alkaloida (www.efsa.europa.eu; www.eur-lex.europa.eu).

Sušeni borač, mažuran, ljupčac i origano, kao i mješavine koje se sastoje isključivo od tog sušenog bilja smiju sadržavati najviše 1000 µg/kg pirolizidinskih alkaloida dok ostalo sušeno bilje smije sadržavati do 400 µg/kg (www.efsa.europa.eu; www.eur-lex.europa.eu).

Sjemenke kumina koje se koriste kao začim u sjemenu također su prepoznate kao izvor izloženosti pirolizidinskim alkaloidima čiji sadržaj ne smije prelaziti granicu od 400 µg/kg (www.efsa.europa.eu; www.eur-lex.europa.eu).

4.3.1. Ljekoviti pripravci bazirani na pčelinjim proizvodima

Još od davnina poznata je uporaba raznih pčelinjih proizvoda za olakšavanje i liječenje brojnih tegoba. Med, pčelinji vosak, propolis, matična mliječ i pčelinji otrov najčešće su korišteni proizvodi čija je namjena poboljšanje zdravlja, njega kože i usne šupljine, pogotvo nakon dentalnih operacija te za olakšanje tegoba uzrokovanih opeklinama, ranama i ostalim kožnim stanjima (Brugnerotto i sur., 2021; Coppock, 2021). Osim toga, posjeduju i antimikrobnu aktivnost te se koriste u liječenju kandidijaza, infekcija uzrokovanih herpesom, infekcija čiji je uzrok *Helicobacter pylori* te gljivičnih infekcija kože i genitalija. Istražuje se i mogućnost njihove primjene u oftalmologiji kao zamjena za profilaktičku antibiotsku terapiju, u liječenju keratokonjunktivitisa te uporaba u proizvodnji umjetnih suza. Kao dodaci prehrani, pčelinji proizvodi koriste se kao pomoć u svrhu poboljšanja plodnosti te se istražuje njihova potencijalna uporaba u produženju života spermija prilikom umjetne oplodnje kao i prilikom smrzavanja embrija. Prepoznat je i njihov potencijal u liječenju simptoma predmenstrualnog sindroma, menstrualnih tegoba, smanjenju boli prilikom poroda i smanjenju simptoma genitourinarnog sindroma kod postmenopausalnih žena. Koriste se i nakon antineoplastičnih tretmana i za smanjenje iscrpljenosti kod pacijenata koji imaju tumor. Primjena pčelinjeg otrova u liječenju autoimunih bolesti i olakšavanju simptoma predmet je istraživanja, posebice primjena u liječenju osteoartritisa (Brugnerotto i sur., 2021; Coppock, 2021). Sam polen, med i ostali pčelinji proizvodi bogati su vitaminima, mineralima, flavonoidima i polifenolima te sukladno tome imaju antioksidativno, antimikrobno i protuupalno djelovanje (Kast i sur., 2019; Saraiva i sur., 2018). Iz svega navedenog, vidljivo je koliko je široka i rasprostranjena primjena raznih pčelinjih proizvoda u liječenju raznih tegoba, ali još uvijek najveću zastupljenost ima primjena meda u prehrane svrhe (Kempf i sur., 2010). Upravo zato što se radi o proizvodu koji se nalazi u gotovo svakom

kućanstvu i koji se konzumira svakodnevno, potrebno je obratiti pozornost na to da je to jedan od mogućih čestih izvora izloženosti pirolizidinskim alkaloidima (Kempf i sur., 2010).

Najčešći način kako dolazi do kontaminacije meda pirolizidinskim alkaloidima je putem pčela koje skupljaju nektar i polen na cvjetovima te tijekom tog skupljanja dolaze u dodir s biljkama koje sadrže pirolizidinske alkaloidne koji se naposljetku prenose i u sami med (Brugnerotto i sur., 2021). To je i jedan od glavnih razloga zašto su biljke koje prirodno nisu sadržavale PA postale biljke u kojima se može naći njihov sadržaj, zahvaljujući prirodnoj oprašivačkoj ulozi pčela. Međutim, neke biljke koje prirodno sadrže PA koriste se prilikom proizvodnje meda, a najčešće se radi o biljkama iz porodica *Echium*, *Senecio*, *Eupatorium*, *Heliotropium*, *Borago*, *Myosotis*, *Chromolaena*, *Petasites*, *Ageratum*, *Cynoglossum*, *Crotalaria*, *Tussilago* i *Symphytum*. Kontaminacija PA nije ograničena samo na med, uz njega posebno zabrinjava i sam polen kao i proizvodi na bazi polena u kojima je utvrđen najveći sadržaj PA dok se za druge pčelinje proizvode također pretpostavlja da su podložni kontaminaciji. Zasad je istraživanjima utvrđen nizak sadržaj PA u tim proizvodima koji ne zabrinjava, ali ta istraživanja nisu dostatna za takav krajnji zaključak, već je potrebno provesti opsežnija i detaljnija istraživanja (Brugnerotto i sur., 2021).

Prilikom provođenja istraživanja kojima se željela utvrditi stopa kontaminacije meda, utvrđeno je da rezultati jako variraju, od toga da u pojedinim uzorcima uopće nije bilo pirolizidinskog sadržaja dok su drugi imali znatan sadržaj (www.ages.at). U uzorcima dostupnim na austrijskom tržištu utvrđena je prisutnost PA u 62 % analiziranih uzoraka pri čemu je ukupno analizirano njih 159 od 2016. godine (www.ages.at). U uzorcima dostupnim na australskom tržištu utvrđen je sadržaj PA u uzorcima meda do 2,0 µg/g meda (Coppock, 2021). U uzorcima s francuskog tržišta utvrđen je sadržaj PA od maksimalno 182 ng/g meda, a onima s belgijskog do 60 ng/g meda. Najveća utvrđena količina PA u polenu iznosila je 1672 ng/g polena (Coppock, 2021). U uzorcima meda sa španjolskog tržišta utvrđen je sadržaj PA između 0,019 µg/g i 0,120 µg/g i ako se to preračuna na prosječnu dnevnu konzumaciju meda od 1 ili 2 žlice što je između 10 i 20 g, vrlo je lako za prosječnog konzumenta prekoračiti dnevni limit od maksimalno 1,0 µg/g PA (Moreira i sur., 2018).

S obzirom na ove spoznaje do kojih se došlo dosadašnjim istraživanjima, neizbježno se nameće potreba za pomnim praćenjem sadržaja PA u medu i polenu, pogotovo jer ti preparati mogu predstavljati posebnu opasnost za trudnice i djecu (Brugnerotto i sur., 2021). Ono što mogu učiniti sami proizvođači meda je da osiguraju pčelama dovoljno alternativnih izvora hrane kako bi one

što manje posjećivale biljke koje sadrže pirolizidinske alkaloide. Isto tako, može se upozoriti proizvođače da bolje prouče biljne vrste koje obitavaju na određenom staništu gdje odluče postaviti košnice te da primjenom odgovarajućih mjera uklone biljne vrste za koje postoji opravdana sumnja da mogu sadržavati pirolizidinske alkaloide (Brugnerotto i sur., 2021). Isto tako, zadaća je i samog farmaceuta upozoriti pacijente da med i polen mogu sadržavati PA te da je stoga pri njihovoj primjeni potreban oprez i umjerenost pri konzumaciji. Kao stručnjak, farmaceut bi također trebao biti obaviješten o provedenim kontrolama proizvoda i njihovoj sigurnosti za uporabu. To se poglavito odnosi na polen koji se konzumira u obliku dodataka prehrani.

Ostale mjere koje je moguće poduzeti kako bi se smanjila izloženost PA putem ovih pripravaka je česta promjena proizvođača ili marke meda jer su ispitivani uzori dosta varirali sadržajem PA, a na ovaj način se izbjegava mogućnost dugotrajne izloženosti visokim koncentracijama PA (www.ages.at). Isto tako, konzumacija meda ne preporuča se tijekom prve godine života, prvenstveno zbog toga što može, između ostalog med biti kontaminiran i bakterijskim sporama s kojima se dječji probavni sustav još nije spreman izboriti te može doći do razvoja botulizma (www.ages.at).

4.3.2. Čajevi i ostali biljni pripravci

Čaj je jedno od najpopularnijih pića za konzumaciju koje ima tradiciju dugu skoro 4 tisuće godina (Kan i Mukhtar, 2013). Čajem se tradicionalno naziva piće koje se sprema od listova i drugih dijelova biljke *Camellia sinensis*, a s obzirom na stupanj fermentacije dijeli se na bijeli čaj (nema fermentacije), zeleni čaj (minimalna fermentacija), oolong (djelomično fermentiran) i crni čaj (cjelokupna fermentacija). Ostali napitci koji se pripremaju na način da se biljni materijal (biljni i voćni čaj) prelijeva kipućom vodom također se nazivaju čajevima, premda je točniji izraz za njih infuzi (Kan i Mukhtar, 2013; www.plantagea.hr).

„Pravi“ čajevi koji se spremaju od biljke *Camellia sinensis* sadrže tanine, katehine, flavonoide, teanin, kofein, ugljikohidrate, masti, proteine, teofilin, teobromin (Kan i Mukhtar, 2013). S obzirom na ove djelatne sastavnice, prepoznat je njihov potencijal koji se koristi i u medicinske svrhe. Mnoga istraživanja sugeriraju da zeleni čaj ima učinak u prevenciji tumora, a isto tako da to svojstvo ima i crni čaj jer su sastavom gotovo identični. Osim toga, polifenoli prisutni u čaju povezuju se s korisnim učincima u prevenciji metaboličkih bolesti poput dijabetesa i

kardiovaskularnih bolesti, posebno ateroskleroze i koronarne srčane bolesti. Ostali učinci povezuju se s antioksidativnim učincima u prevenciji starenja (Kan i Mukhtar, 2013).

Pošto su čajevi i biljni infuzi proizvodi koji se sastoje isključivo od biljnog materijala koji može dijeliti stanište s biljkama koje proizvode PA, za očekivati je da može doći do njihove kontaminacije, kao i prenošenja svojstava štetnih učinaka PA (www.bfr.bund.de). S obzirom na tu mogućnost, prepoznata je potreba za provođenjem istraživanja kako bi se utvrdilo kolika je točno razina kontaminacije (www.ages.at). Posebno zabrinjava istraživanje koje je provela Europska agencija za sigurnost hrane (engl. European Food Safety Authority, EFSA) 2015. godine i u kojem je utvrđeno da je preko 90% uzoraka čajeva u sebi sadržavalo pirolizidinske alkaloide. Za čajne infuze utvrđeno je da su sadržavali oko 6 µg/L PA dok je najveća utvrđena koncentracija nađena u Rooibos čaju, tj. infuzu i iznosila je do 64 µg/L. Testirani uzorci dosta su varirali sadržajem, u nekima nije uopće bilo PA, dok su drugi sadržavali vrlo visoke koncentracije i to pogotovo ista vrsta čaja, ali različitog proizvođača. Od 2016. godine na 187 uzoraka čajeva namijenjenih austrijskom tržištu utvrđena je prisutnost PA u 54% njih. U 15 uzoraka od tih 187 sadržaj PA bio je toliki da je prelazio maksimalne dopuštene količine PA utvrđene novim Prilogom Uredbi razrađenom u prethodnom tekstu (www.ages.at). U Njemačkoj Savezni institut za procjenu rizika (njem. Bundesinstitut für Risikobewertung, BfR) u sklopu istraživačkog projekta proveo je istraživanja na 221 uzorku komercijalno dostupnih čajeva i drugih biljnih pripravka u svrhu istraživanja prisutnosti PA (www.ema.europa.eu). Utvrđeni PA sadržaj varirao je od 0 do 3430 µg/kg mjerenih u suhom biljnom materijalu, poglavito u biljnim čajevima komorača, kamilice, mente, koprive, matičnjaka (www.ema.europa.eu). Istraživanje o sadržaju PA u čajevima provedno je i u Republici Hrvatskoj (www.hah.hr). Provela ga je Hrvatska agencija za hranu (HAH) 2015. godine na prikupljenim uzorcima čaja dostupnim u slobodnoj prodaji u velikim trgovačkim lancima, a odabir vrste i količine temeljio se na podacima o prehranbenim navikama odrasle populacije Republike Hrvatske. Za analizu prikupljeni su uzorci čaja od šipka, kamilice, mente, šumskog voća, marelice, brusnice, zelenog čaja i crnog čaja. Uzorci su odvagani i poslani na analizu u Savezni institut za procjenu rizika u Njemačkoj. U nekim uzorcima utvrđene su ekstremno visoke vrijednosti, dok su u nekima zabilježene male vrijednosti. Krajnji zaključak bio je da je potrebno provesti detaljnije istraživanje na većem broju uzorka, da uzorak nije dovoljno reprezentativan da bi se donijeli neki sigurni zaključci. Ali, ono što se može tvrditi s potpunom sigurnošću je to da su redoviti konzumenti čajeva izloženi povećanom riziku štetnih posljedica po

zdravlje, pogotovo ako konzumiraju proizvode s visokim udjelom PA kroz duži vremenski period (www.hah.hr).

Biljni dodaci prehrani preparati su za koje se smatra da imaju ljekovita svojstva, a najčešće se pripremaju od samog biljnog materijala, ulja biljaka, korijenja, sjemenki, plodova ili cvjetova (www.clevelandclinic.org). Dostupni oblici uključuju tekuće ekstrakte, tablete i kapsule, ulja, masti, soli za kupanje, pa čak i same čajeve (www.clevelandclinic.org). Istraživanja koja su provedena na biljnim dodacima prehrani mogu se podijeliti u dvije grupe, a to je istraživanja na biljnim dodacima prehrani koji se sastoje od biljaka za koje se zna da prirodno proizvode PA (*Borago officinalis* L., *Eupatorium perfoliatum* L., *Eupatorium odoratum* L., *Lithospermum officinale* L., *Pulmonaria officinalis* L., *Symphytum officinale*, *Petasitis* sp., *Petasites hybridus* (L.) PH Gaertn., B. Mey i Scherb, *Tussilago farfara*) i na biljne dodatke prehrani koji se baziraju na biljkama za koje se zna da prirodno ne proizvode PA, ali je njihov sadržaj nađen u uzorcima (*Hypericum perforatum* L., *Passiflora incarnata* L., *Matricaria chamomilla*, *Alchemilla vulgaris* L., *Glycyrrhiza glabra* L., *Melissa officinalis* L., *Mentha piperita*, *Salvia officinalis* L., *Taraxacum officinale* L., *Thymus vulgaris* L., *Valleriana officinalis* L.) uslijed kontaminacije (Moreira i sur., 2018). Kao što se i može očekivati, najveći sadržaj nađen je u pripravcima koji u sebi sadrže biljke koje prirodno sadrže PA, ali više razloga za brigu pobudila je neočekivana spoznaja da je sve veći stupanj kontaminacije ostalih biljnih vrsta pirolizidinskim alkaloidima uslijed unakrsne kontaminacije (Moreira i sur., 2018). Uslijed konzumacije biljnih dodataka prehrani, postoji opravdana briga zbog značajno većeg unosa PA nego uslijed konzumacije hrane koja ih može sadržavati te samim time to sa sobom nosi značajno veće rizike po zdravlje, u prvom redu povećana je opasnost akutnog otrovanja (www.ages.at). Mnogi fitofarmaceutici, od kojih najpoznatiji Iberogast[®], sastoje se od biljaka koje prirodno sadrže PA. U ovom konkretnom slučaju, to je zelen rosopasa, a sadrži i ostale vrste za koje je već uočena velika vjerojatnost kontaminacije PA, a to su korijen sladića i anđelike, list paprene metvice, matičnjaka i cvijet kamilice (www.aeel.org). Preporuke koje se mogu primjenjivati u svrhu smanjenja vjerojatnosti izloženosti PA putem čajeva i ostalih biljnih pripravaka uključuju njihovu razumnu konzumaciju. Djeci se treba za žeđ nuditi što više voda ili sokovi kao alternativa biljnim infuzima, a čajevi, pogotovo crni i zeleni nisu ni primjereni za uporabu kod djece zbog sadržaja kofeina. Trudnice i dojilje također ne bi trebale zadovoljavati svoje potrebe za unosom tekućina putem čajeva i biljnih infuza, uključujući i čajeve koji su namijenjeni dojiljama bez savjetovanja s liječnikom. Kao i s medom, s čajevima bi isto

trebalo redovito mijenjati proizvođača ili marku proizvoda kako bi se izbjegla mogućnost dugotrajne izloženosti visokim koncentracijama PA (www.ages.at). Ostale mjere koje mogu poduzeti sami proizvođači kultura je korisnih biljaka, edukacija o biljkama koje sadrže PA te njihovo uklanjanje s određenog staništa kako ne bi došlo do moguće kontaminacije prilikom skupljanja biljnog materijala za proizvodnju čaja, infuza ili biljnih dodataka prehrani, poštovanje dobre proizvođačke prakse, korištenje selektivnih herbicida, ručno skupljanje biljnog materijala ili njihovo sortiranje, kontrola kvalitete sirovina, pravilno označavanje proizvoda za koje se zna sa sigurnošću da mogu sadržavati PA ili se pretpostavlja da je moguća kontaminacija i sukladno tome, odgovarajuća kontrola tog sadržaja (www.aeel.org).

4.3.3. Prehrambeni proizvodi

Ova grupa proizvoda također je značajna jer u znatnoj mjeri doprinosi izloženosti PA, a tu prvenstveno spadaju začini, lisnato povrće i salata (www.ages.at). Neke biljke koje prirodno sadrže PA koriste se od davnina u tradicionalnoj kuhinji određenih kultura, od čega je najpoznatija boražina koja se koristi za pripremu frankfurtskog zelenog umaka (www.aeel.org). Prilikom istraživanja sadržaja PA, zabrinjavajuće visoka razina pronađena je u suhim oblicima začina poput mažurana, origana i ljupčaca za koje se smatra da su najvjerojatnije kontaminirani prilikom žetve gdje dolazi do slučajnog sabiranja i biljnih vrsta koje sadrže PA (www.ages.at). Začini su zapravo tvari koje se konzumiraju u malim količinama, no njihova opasnost leži u tome što bez obzira na to što se radi o malim količinama, i ta mala količina doprinosi ukupnom dnevnom unosu PA. Godine 2019. testirano je 37 uzoraka začina namijenjenih austrijskom tržištu prilikom čega je PA sadržaj detektiran u 58% uzoraka, od čega je njih 6 sadržajem PA premašilo maksimalni limit propisan Prilogom Uredbi Europske komisije (www.ages.at).

Mjere minimizacije rizika od izloženosti putem prehrambenih proizvoda u prvom redu podrazumijevaju raznoliki izbor namirnica kako bi se spriječila jednostrana izloženost potencijalno štetnim supstancama (www.ages.at). Pri pripremi salata, preporučuje se ukloniti sve biljne dijelove koje nije moguće identificirati kao poznate jestive biljke te ljudi ne bi trebali na svoju ruku u divljini skupljati razne biljke za prehrambene svrhe. Isto tako, preporučuje se koristiti svježe bilje koje je jasno moguće identificirati umjesto sušenog (www.ages.at).

4.4. Poglavlje 2.8.26. Pirolizidinski alkaloidi kao kontaminanti u novom izdanju Europske farmakopeje (2022. godine)

U novom izdanju Europske farmakopeje čija provedba kreće s 1.1.2022. objavljeno je novo poglavlje koje se tiče pirolizidinskih alkaloida kao kontaminanata jer je prepoznata njihova sve veća zastupljenost u biljnim preparatima kao i hrani (www.edqm.eu). Akutna toksičnost, genotoksičnost i karcinogeni potencijal PA poznati su već jako dugo vremena, a sad je prepoznata potreba za njihovom boljom kontrolom kroz postavljanje odgovarajućih limita. Opće poglavlje predstavljeno u farmakopeji opisuje 28 PA koji su prepoznati kao najčešći kontaminanti i moraju biti kvantificirani s validiranom testnom metodom. To su: ehimidin, ehimidin-N-oksid, erucifolin, erucifolin-N-oksid, europin, europin-N-oksid, heliotrin, heliotrin-N-oksid, intermedin, intermedin-N-oksid, jakobin, jakobin-N-oksid, lasiokarpin, lasiokarpin-N-oksid, likopsamin, likopsamin-N-oksid, monokrotalin, monokrotalin-N-oksid, retrorsin, retrorsin-N-oksid, senecionin, senecionin-N-oksid, senecifilin, senecifilin-N-oksid, senecivernin, senecivernin-N-oksid, senkirkin i trihodesmin (www.edqm.eu). Analitička metoda mora biti jako osjetljiva da bi se osigurala razina kvantifikacije potrebna za kontrolu sadržaja PA, a prema farmakopeji to je bilo koja procedura koja uključuje kromatografiju udruženu s tandenskom masenom spektrometrijom ili masenom spektrometrijom visoke rezolucije. Kao eksperimentalna metoda opisana je tekućinska kromatografija udružena s masenom spektrometrijom koja je dokazana kao primjerena za određivanje ciljnih PA u velikom broju uzoraka (www.edqm.eu). Kao maksimalni dnevni limit PA koji se smije unijeti u organizam odrasle osobe određena je vrijednost od 1,0 µg (www.gmp-compliance.org). Osim Europske farmakopeje, Američka farmakopeja trenutno radi na razvoju novog poglavlja o pirolizidinskim alkaloidima i analizi pirolizidinskih alkaloida koji mogu biti kontaminanti (www.gmp-compliance.org).

5. ZAKLJUČAK

Pirolizidinski alkaloidi su grupa široko rasprostranjeni spojeva te mogu imati štetne učinke po zdravlje ljudi i životinja, a problem postaje još veći time da osim biljaka koje ih prirodno sadrže, sve više ih pronalazimo i kao kontaminante u biljnom materijalu, kao i gotovim proizvodima. Spoznata je opasnost PA po zdravlje ljudi, a isto tako i njihova sve veća raširenost u različitim proizvodima te je stoga potrebno pomno praćenje poznatih izvora, ali i proširivanje praćenja na ostale moguće izvore. Potreba za dodatnim Prilogom Uredbi Europske komisije prepoznata je upravo na temelju spoznaja da su izvori izloženosti PA postali značajni putem proizvoda koji imaju svakodnevnu prehrambenu uporabu te stoga nije dovoljna primjena samo općeg limita za PA koji iznosi 1,0 µg dnevno već za pojedine grupe potrebno je dodatno ograničenje čija provedba kreće od 1. srpnja 2022. na temelju nadopunjene Uredbe. Istovremenom primjenom više proizvoda koji mogu biti kontaminirani PA, vrlo lako može se preći dnevno ograničenje što predstavlja opasnost u vidu toksičnosti i potencijalnog kancerogenog učinka.

U svjetlu svih tih novih spoznaja, neizbježno se nameće potreba za daljnjim istraživanjem pirolizidinskih alkaloida i njihovim kemijskim, farmakološkim i toksikološkim svojstvima kako bi se temeljem toga mogle donijeti i regulative za zaštitu zdravlja.

Između ostalih, zadaća farmaceuta je i osvještavanje pacijenata o mogućim opasnostima, a sve u svrhu podizanja opće svijesti i osiguravanja zdravlja dok je uloga regulatornih agencija osiguravanje odgovarajućih standarda provjere kvalitete i donošenje regulativa kojima se to omogućava. Najveća zabluda koja je uvijek prisutna u pacijenata je ta da je sve na biljnoj bazi sigurno za korištenje i to u neograničenim količinama. To dakako, nipošto nije točno te pri svakom razgovoru s pacijentom treba ispitati koje sve preparate i lijekove koristi kako bi se za njega pronašla najbolja i najsigurnija opcija za rješenje njegovih problema koja će ujedno biti i učinkovita. Farmaceut ima zadaću upozoriti pacijente na osnovno načelo na kojem počiva i sama farmaceutska djelatnost, a to je da svaka tvar može biti i lijek i otrov, da je samo pitanje doze te stoga svaki preparat treba koristiti razumno i po uputama kako bi se smanjila vjerojatnost neželjenih nuspojava koje se događaju i kad ih ne očekujemo. Stoga je od iznimne važnosti da u ovim slučajevima kad ih možemo predvidjeti ili očekivati, to i osvijestiti i prenijeti to znanje dalje.

6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA

BfR	njem. Bundesinstitut für Risikobewertung; Savezni institut za procjenu rizika u Njemačkoj
CYP 450	engl. Cytochrome P 450; citokrom P 450
CYP 2B	engl. Cytochrome P 450 2B; citokrom P 450 2B
CYP 3A	engl. Cytochrome P 450 3A; citokrom P 450 3A
CYP 3A4	engl. Cytochrome P 450 3A4; citokrom P 450 3A4
DHPA	engl. Dehydropyrrolizidine alkaloids; dehidropirolizidinski alkaloidi
DNA	engl. Deoxyribonucleic acid; deoksiribonukleinska kiselina
EFSA	engl. European Food Safety Authority; Europska agencija za sigurnost hrane
(US)FDA	engl. (United States) Food and Drug Administration; Američka agencija za hranu i lijekove
GNA	engl. <i>Galanthus nivalis</i> agglutinin; aglutinin iz visibabe
GSH	engl. Glutathione; glutation
GST	engl. Glutathione S-transferase, glutation S-transferaza
HAH	Hrvatska agencija za hranu
HCN	Cijanovodik
HSOS	engl. Hepatic sinusoidal obstruction syndrome; hepatički sinusoidalni opstruktivski sindrom
HSS	engl. Homospermidine synthase; homospermidin sintaza
LPS	engl. Lipopolysaccharide; lipopolisaharid
NAD ⁺	engl. Nicotinamide adenine dinucleotide; nikotinamid adenin dinukleotid
PA	engl. Pyrrolizidine alkaloids; pirolizidinski alkaloidi
PANO	engl. Pyrrolizidine alkaloids N-oxide; N-oksid pirolizidinskih alkaloida
PSA	engl. <i>Phaseolus vulgaris</i> agglutinin; aglutinin iz običnog graha
TIPS	engl. Transjugular intrahepatic portosystemic shunt; transjugularni intrahepatički portosistematski šant
VOD	engl. Venous-occlusive disease; venookluzivna bolest
WGA	engl. Wheat germ agglutinin; aglutinin iz pšenične klice

7. LITERATURA

Aftab K, Shaheen F, Mohammad FV, Noorwala M, Ahmad VU. Phyto-pharmacology of saponins from *Symphytum officinale* L. *Adv Exp Med Biol*, 1996, 404, 429–442.

Aston NS, Morris PA, Tanner MS, Variend S. An animal model for copper-associated cirrhosis in infancy. *J Pathol*, 1998, 186, 215–221.

Aydın AA, Letzel T. Simultaneous investigation of sesquiterpenes, pyrrolizidine alkaloids and N-oxides in butterbur (*Petasites hybridus*) with an offline 2D-combination of HPLC-UV and LC-MMI-TOF-MS. *J Pharm Biomed Anal*, 2013, 85, 74–82.

Baranauskaite J, Sadauskiene I, Liekis A, Kasauskas A, Lazauskas R, Zlabiene U, Masteikova R, Kopustinskiene D, Bernatoniene J. Natural Compounds Rosmarinic Acid and Carvacrol Counteract Aluminium-Induced Oxidative Stress. *Molecules*, 2020, 25, 1807.

Baybutt RC, Molteni A. Dietary b-carotene protects lung and liver parenchyma of rats treated with monocrotaline. *Toxicology*, 1999, 137, 69–80.

Bodi D, Ronczka S, Gottschalk C, Behr N, Skibba A, Wagner M, Lahrssen-Wiederholt M, Preiss-Weigert A, These A. Determination of pyrrolizidine alkaloids in tea, herbal drugs and honey. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 2014, 31, 1886–1895.

Bosi CF, Rosa DW, Grougnet R, Lemonakis N, Halabalaki M, Skaltsounis AL, Biavatti MW. Pyrrolizidine alkaloids in medicinal tea of *Ageratum conyzoides*. *Rev Bras Farmacogn*, 2013, 23, 425–432.

Brauchli J, Lüthy J, Zweifel U, Schlatter CH. Pyrrolizidine alkaloids from *Symphytum officinale* L. and their percutaneous absorption in rats. *Experientia*, 1982, 38, 1085–1087.

Brugnerotto P, Tischer Seraglio SK, Schulz M, Valdemiro Gonzaga L, Fett R, Oliveira Costa AC. Pyrrolizidine alkaloids and beehive products: A review. *Food Chem*, 2021, 342, 1-41.

Chen Z, Huo JR. Hepatic veno-occlusive disease associated with toxicity of pyrrolizidine alkaloids in herbal preparations. *Neth J Med*, 2010, 68, 252–260.

Chen T, Mei N, Fu PP. Genotoxicity of pyrrolizidine alkaloids. *J Appl Toxicol*, 2010, 30, 183–196.

Conradie J, Stewart MJ, Steenkamp V. GC/MS identification of toxic pyrrolizidine alkaloids in traditional remedies given to two sets of twins. *Ann Clin Biochem*, 2005, 42, 141–144.

Comfrey: ancient and modern uses, 2007., <https://pharmaceutical-journal.com>, pristupljeno 12.12.2021.

Comfrey - Uses, Side Effects, and More, 2012., <https://www.webmd.com>, pristupljeno 13.12.2021.

Coppock WR. Chapter 47 - Bee products as nutraceuticals to nutraceuticals for bees. U: Nutraceuticals: Efficacy, Safety and Toxicity, Second Edition. Gupta CR , Lall R, Srivastava A, urednici, 2021, London, Academic Press, str. 813-833

Dai HF, Gao Y, Yang M, Yu CH, Gu ZY, Chen WX. Hepatic veno-occlusive disease induced by *Gynura segetum*: report of two cases. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2006, 5, 406–408.

Dai N, Yu YC, Ren TH, Wu JG, Jiang Y, Shen LG, Zhang J. *Gynura* root induces hepatic veno-occlusive disease: a case report and review of the literature. *World J Gastroenterol*, 2007, 13, 1628–1631.

Dennis R, Dezelak C, Grime J. Studies on *Symphytum* species – HPLC determination of allantoin. *Acta Pharm Hung*, 1987, 57, 267–274.

Dietary exposure assessment to pyrrolizidine alkaloids in the European population, 2016., <https://www.efsa.europa.eu>, pristupljeno 9.12.2021.

Edgar JA, Colegate SM, Boppré M, Molyneux RJ. Pyrrolizidine alkaloids in food: a spectrum of potential health consequences. *Food Addit Contam Part A*, 2011, 28, 308-324.

European Pharmacopoeia Commission adopts new general chapter Contaminant pyrrolizidine alkaloids (2.8.26), 2021., <https://www.edqm.eu>, pristupljeno 18.12.2021.

Flade J, Beschow H, Wensch-Dorendorf M, Plescher A, Wätjen W. Occurrence of Nine Pyrrolizidine Alkaloids in *Senecio vulgaris* L. Depending on Developmental Stage and Season. *Plants*, 2019, 54, 1-13.

Franz G. Untersuchungen über die Schleimpolysaccharide von *Tussilago farfara* L., *Symphytum officinalis* L., *Borago officinalis* L. und *Viola tricolor* L. *Planta Med*, 1969, 17, 217–222.

Frist M, Pandolfi F, Uradomo L, Borum M. Death from herbal tea: Hepatic veno-occlusive disease and fulminant hepatic failure secondary to Chinese herbal tea ingestion. *Am J Gastroenterol*, 2010, 105, 294.

Frequently asked questions on pyrrolizidine alkaloids in foods, 2020., <https://www.bfr.bund.de>, pristupljeno 12.12.2021.

Fu PP, Xia Q, Lin G, Chou MW. Pyrrolizidine alkaloids—Genotoxicity, metabolism enzymes, metabolic activation, and mechanisms. *Drug Metab Rev*, 2004, 36, 1–55.

Gavez korijen – za regeneraciju kože i ublažavanje bolova, oprez i nuspojave, 2020., <https://krenizdravo.dnevnik.hr>, pristupljeno 13.12.2021.

Grabias B, Swiatek L. Phenolic acids in *Symphytum officinale* L. *Pharm Pharmacol Lett*, 1998, 8, 81–83.

Gracza L. Prüfung der membranabdichtenden Wirkung eines Phytopharmakons und dessen Wirkstoffe. *Z Phytothe*, 1987, 8, 78–81.

Györik S, Stricker H. Severe pulmonary hypertension possibly due to pyrrolizidine alkaloids in polyphytotherapy. *Swiss Med Wkly*, 2009, 139, 210–211.

Helmy A. Review article: Updates in the pathogenesis and therapy of hepatic sinusoidal obstruction syndrome. *Aliment Pharmacol Ther*, 2006, 23, 11–25.

Herbal Supplements, 2019., <https://my.clevelandclinic.org>, pristupljeno 18.12.2021.

Hiermann A, Writzel M. Antiphlogistic glycopeptide from the roots of *Symphytum officinale*. *Pharm Pharmacol Lett*, 1998, 8, 154–157.

Huxtable RJ. Human Health Implications of Pyrrolizidine Alkaloids and Herbs Containing Them. U: Toxicants of Plant Origin, Volume I, Alkaloids. Cheeke PR, urednik, Boca Raton, FL, USA, CRC Press, 1989, str. 41–86.

Huxtable R, Yan C, Wild S, Maxwell S, Cooper R. Physicochemical and metabolic basis for the differing neurotoxicity of the pyrrolizidine alkaloids, trichodesmine and monocrotaline. *Neurochem. Res*, 1996, 21, 141–146

Introductory Chapter: Alkaloids - Their Importance in Nature and for Human Life, 2019., www.intechopen.com, pristupljeno 08.12.2021.

Jiang Y, Fu PP, Lin G. Hepatotoxicity of naturally occurring pyrrolizidine alkaloids. *Asian J Pharm Pharmacol*, 2006, 6, 187–192.

Kast C, Kilchenmann V, Reinhard H, Bieri K, Zoller O. Pyrrolizidine Alkaloids: The Botanical Origin of Pollen Collected during the Flowering Period of *Echium vulgare* and the Stability of Pyrrolizidine Alkaloids in Bee Bread. *Molecules*, 2019, 24, 14–22.

Kempf M, Heil S, Haßlauer I, Schmidt L, von der Ohe K, Theuring C, Reinhard A, Schreier P, Beuerle T. Pyrrolizidine alkaloids in pollen and pollen products. *Mol Nutr Food Res*, 2010, 54, 292–300.

Khan N, Mukhtar H. Tea and Health: Studies in Humans. *Curr Pharm Des*, 2013, 19, 6141–6147.

Lin G, Wang JY, Li N, Li M, Gao H, Ji Y, Zhang F, Wang H, Zhou Y, Ye Y, Xu HX, Zheng J. Hepatic sinusoidal obstruction syndrome associated with consumption of *Gynura segetum*. *J Hepatol*, 2011, 54, 66–73.

Luckert C, Hessel S, Lenze D, Lampen A. Disturbance of gene expression in primary human hepatocytes by hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids: A whole genome transcriptome analysis. *Toxicol In Vitro*, 2015, 29, 1669–1682.

Magnabosco EM, Rivera ML, Prolla IR, de Verney YM, de Mello ES. Hepatic veno-occlusive disease: report of a case. *J Pediatr (Rio J)*, 1997, 73, 115–118.

Mei N, Guo L, Fu PP, Fuscoe JC, Luan Y, Chen T. Metabolism, genotoxicity, and carcinogenicity of comfrey. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*, 2010, 13, 509–526.

Mütterlein R, Arnold CG. Untersuchungen zum Pyrrolizidinalkaloidgehalt und Pyrrolizidinalkaloidmuster in *Symphytum officinale* L. Versuche zur Gewinnung pyrrolizidinalkaloidarmer Pflanzen bzw. Pflanzenteile. *Pharm Ztg Wiss*, 1993, 138, 119–125.

Moreira R, Pereira D, Valentão P, Andrade P. Pyrrolizidine Alkaloids: Chemistry, Pharmacology, Toxicology and Food Safety. *Int J Mol Sci*, 2018, 1668, 1–22.

Morris P, O'Neill D, Tanner S. Synergistic liver toxicity of copper and retrorsine in the rat. *J Hepatol*, 1994, 21, 735–742.

Neumann MG, Cohen LB, Steenkamp V. Pyrrolizidine alkaloids enhance alcohol-induced hepatocytotoxicity in vitro in normal human hepatocytes. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017, 21, 53–68.

Ng V, Tran TT, Sundaram V. An unexpected cause of an infiltrative liver mass. *Gastroenterology*, 2014, 147, 12–13.

Ober D, Kaltenecker E. Pyrrolizidine alkaloid biosynthesis, evolution of a pathway in plant secondary metabolism. *Phytochemistry*, 2009, 70, 1687–1695.

Ortiz-Cansado A, Crespo Valadés E, Morales Blanco P, Sáenz de Santamaría J, González Campillejo JM, Ruiz Téllez T. Veno-occlusive liver disease due to intake of *Senecio vulgaris* tea. *Gastroenterol Hepatol*, 1995, 18, 413-416 .

Prakash AS, Pereira TN, Reilly PE, Seawright AA. Pyrrolizidine alkaloids in human diet. *Mutat Res*, 1999, 443, 53–67.

Ph. Eur. Draft Chapter for PA Contaminants in Herbal Drugs, 2020., <https://www.gmp-compliance.org>, pristupljeno 18.12.2021.

Ph. Eur. Adopts New General Chapter on Contaminant Pyrrolizidine Alkaloids, 2021., <https://www.gmp-compliance.org>, pristupljeno 18.12.2021.

Public statement on the use of herbal medicinal products containing toxic unsaturated pyrrolizidine alkaloids including recommendations regarding contamination of herbal medicinal products with PA, 2020., <https://www.ema.europa.eu>, pristupljeno 15.12.2021.

Pyrrolizidine alkaloids, 2021., <https://www.ages.at> pristupljeno 13.12.2021.

Pyrrolizidine alkaloids (PA) – residues, 2020., <https://www.aodel.org>, pristupljeno 11.12.2021.

Qiu S, Sun H, Zhang AH, Xu HY, Yan GL, Han Y, Wang XJ. Natural alkaloids: basic aspects, biological roles, and future perspectives. *Chin J Nat Med*, 2014, 12, 401–406.

Rasenack R, Muller C, Kleinschmidt M, Rasenack J, Wiedenfeld H. Veno-occlusive disease in a fetus caused by pyrrolizidine alkaloids of food origin. *Fetal Diagn Ther*, 2003, 18, 223–225.

Risks for human health related to the presence of pyrrolizidine alkaloids in honey, tea, herbal infusions and food supplements, 2017., <https://www.efsa.europa.eu>, pristupljeno 10.12.2021.

Roulet M, Laurini R, Rivier L, Calame A. Hepatic veno-occlusive disease in newborn infant of a woman drinking herbal tea. *J. Pediatr*, 1988, 11, 433–436.

Roeder E, Wiedenfeld H. Plants containing pyrrolizidine alkaloids used in the traditional Indian medicine –including ayurveda. *Pharmazie*, 2013, 68, 636–639.

Rollason V, Spahr L, Escher M. Severe liver injury due to a homemade flower pollen preparation in a patient with high CYP3A enzyme activity: a case report. *Eur J Clin Pharmacol*, 2016, 72, 507–508.

Ridker PM, Ohkuma S, McDermott WV, Trey C, Huxtable RJ. Hepatic veno-occlusive disease associated with the consumption of pyrrolizidine-containing dietary supplements. *Gastroenterology*, 1985, 88, 1050–1054.

Safety evaluation of certain food additives and contaminants: supplement 2: pyrrolizidine alkaloids, prepared by the eightieth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), 2020., <https://www.who.int>, pristupljeno 11.12.2021.

Saraiva LCF, Cunha FVM, Léllis DROD, Nunes LCC. Composition, biological activity and toxicity of bee pollen: State of the art. *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat*, 2018, 17, 426–440.

Schmidt M. Beinwellsalbe bei stumpfen Traumen und Muskelschmerzen. *Erfahrungsheilkunde*, 2006, 55, 326–329.

Schroff F, Felgenhauer N, Pfab R, Stenzel J, Eyer F. Acute liver failure after accidental intake of pyrrolizidine-containing plants. *Clin Toxicol*, 2013, 51, 264.

Scientific Opinion on Pyrrolizidine alkaloids in food and feed, 2011., <https://www.efsa.europa.eu/en>, pristupljeno 9.12.2021.

Shimshoni JA, Duebecke A, Mulder PPI, Cuneah O, Barel S. Pyrrolizidine and tropane alkaloids in teas and herbal teas perppermint, rooibos and chamomile in the Israeli market. *Food Addit Contam Part A*, 2015, 32, 2058–2067.

Sperl W, Stuppner H, Gassner I, Judmaier W, Dietze O, Vogel W. Reversible hepatic veno-occlusive disease in an infant after consumption of pyrrolizidine-containing herbal tea. *Eur J Pediatr*, 1995, 154, 112–116.

Staiger, C. Comfrey: A Clinical Overview. *Phytotherapy Research*, 2012, 26, 1441–1448.

Stegelmeier BL, Edgar JA, Colegate SM, Gardner DR, Schoch TK, Coulombe RA, Molyneux RJ. Pyrrolizidine alkaloid plants, metabolism and toxicity. *J Nat Toxins*, 1999, 8, 95 –116.

Stegelmeier BL, Colegate SM, Brown AW. Dehydropyrrolizidine Alkaloid Toxicity, Cytotoxicity, and Carcinogenicity. *Toxins*, 2016, 8, 356.

Stengl P, Wiedenfeld H, Roeder E. Pyrrolizidine alkaloids: testing for toxic constituents of comfrey. *Dtsch Apoth Ztg*, 1982, 122, 851–855.

Stickel F, Seitz H. The efficacy and safety of comfrey. *Public Health Nutr*, 2000, 3, 501-508.

Symphyti radix, 2015., <https://www.ema.europa.eu>, pristupljeno 13.12.2021.

Šarkanj B, Kipčić D, Vasić-Rački Đ, Delaš F, Galić K, Katalenić M, Dimitrov N, Klavec T. Kemijske i fizikalne opasnosti u hrani, Osijek, Hrvatska agencija za hranu, 2010, str. 11-22. Dostupno na: <https://www.hah.hr> (u obliku PDF e-knjige), pristupljeno 7.12.2021.

Updated risk assessment on levels of 1,2-unsaturated pyrrolizidine alkaloids (PAs) in foods, 2020., <https://www.bfr.bund.de>, pristupljeno 13.12.2021.

UREDBE -UREDBA KOMISIJE (EU) 2020/2040 od 11. prosinca 2020. o izmjeni Uredbe (EZ) br. 1881/2006 o utvrđivanju najvećih dopuštenih količina pirolizidinskih alkaloida u određenoj hrani, 2020., <https://eur-lex.europa.eu>, pristupljeno 14.12.2021.

Vollmer J, Steiner N, Larsen G, Muirhead K, Molyneux R. Pyrrolizidine alkaloids: testing for toxic constituents of comfrey. *J Chem Educ*, 1987, 64, 1027–1030.

Verpoorte R. Alkaloids. U: Encyclopedia of Analytical Science. Worsfold P, Townshend A, Poole C, urednici, Leiden, Elsevier, 2005, str. 56-61.

Vodeni ekstrakti, <https://www.plantagea.hr>, pristupljeno 17.12.2021.

Weston CF, Cooper BT, Davies JD, Levine DF. Veno-occlusive disease of the liver secondary to ingestion of comfrey. *Br Med J*, 1987, 295, 183.

Wu JS, Poon WT, Ma CK, Chen ML, Pang KS, Mak TLW, Chan HB. Budd-Chiari syndrome secondary to toxic pyrrolizidine alkaloid exposure. *Hong Kong Med J*, 2013, 19, 553–555.

Yang M, Ruan J, Fu PP, Lin G. Cytotoxicity of pyrrolizidine alkaloid in human hepatic parenchymal and sinusoidal endothelial cells: Firm evidence for the reactive metabolites mediated pyrrolizidine alkaloid-induced hepatotoxicity. *Chem-Biol Interact*, 2016, 243, 119–126.

Yee SB, Kinser S, Hill DA, Barton CC, Hotchkiss JA, Harkema JR, Ganey PE, Roth RA. Synergistic hepatotoxicity from coexposure to bacterial endotoxin and the pyrrolizidine alkaloid monocrotaline. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2000, 166, 173–185.

Yee SB, Roth RA. 2.21-Pyrrolizidine Alkaloid-Induced Hepatotoxicity. U: *Comprehensive Toxicology*, Third Edition. McQueen CA, urednica, Oxford, UK, Elsevier, 2018, str. 522-537.

Yeong ML, Swinburn B, Kennedy M, Nicholson G. Hepatic veno-occlusive disease associated with comfrey ingestion. *J Gastroenterol Hepatol*, 1990, 5, 211-214.

Zuckerman M, Steenkamp V, Stewart MJ. Hepatic veno-occlusive disease as a result of a traditional remedy: confirmation of toxic pyrrolizidine alkaloids as the cause, using an in vitro technique. *J Clin Pathol*, 2002, 55, 676–679.

Znanstveno mišljenje o pirolizidin alkaloidima u čajevima na tržištu RH, 2016., <https://www.hah.hr>, pristupljeno 8.12.2021.

8. SAŽETAK

Pirolizidinski alkaloidi su tvari koje prirodno nalazimo u nekim biljnim vrstama (pretežito vrste porodica *Boraginaceae*, *Compositae/Asteraceae*, *Leguminosae/Fabaceae*, *Apocynaceae*, *Ranunculaceae*, *Scrophulariaceae*), a produkt su njihovog sekundarnog metabolizma i primarno im služe kao obrana od biljojeda. Njihova akutna toksičnost, genotoksičnost i potencijalni karcinogeni učinak na ljude poznati su već jako dugo vremena, a najčešće je toksičnim učinkom u najvećoj mjeri pogođena jetra. Nove spoznaje sve više ukazuju na to da biljke koje prirodno ne sadrže pirolizidinske alkaloidne uslijed rasta na istom staništu kao i biljke koje ih sadrže, slučajne kontaminacije ili posljedičnog križanja vrsta, postaju biljke u kojima je moguće naći određeni sadržaj pirolizidinskih alkaloida. Time se povećava sveukupna moguća izloženost pirolizidinskim alkaloidima i to iz više različitih izvora te raste mogućnost ispoljavanja štetnih učinaka po zdravlje, osobito kod redovitih potrošača. Kako bi se ograničila izloženost pirolizidinskim alkaloidima, Komisija Europske unije je donijela odluku da se dozvoljeni sadržaj pirolizidinskih alkaloida dodatno ograniči u proizvodima poput čajeva, biljnih infuzija, biljnih dodatka prehrani, pripravaka na bazi peludi i začina te provedba te odluke kreće od 1. srpnja 2022. Iako o pirolizidinskim alkaloidima već puno toga znamo, svakodnevno dolazimo do novih spoznaja. Važno je naglasiti da je znanje moć koja nam omogućava da u svjetlu novih spoznaja poduzmemo mjere koje su u našoj moći kako bi se osigurala sigurnost i zdravlje opće populacije u čemu značajnu ulogu ima i sam farmaceut.

SUMMARY

Pyrrolizidine alkaloids are compounds that naturally occur in some herbal species (mostly species of plant families *Boraginaceae*, *Compositae/Asteraceae*, *Leguminosae/Fabaceae*, *Apocynaceae*, *Ranunculaceae*, *Scrophulariaceae*) and they are products of secondary metabolism that plants have developed as defense mechanism against insect herbivores. The acute toxicity, genotoxicity and carcinogenic potential for humans caused by pyrrolizidine alkaloids have been known for a very long time and usually liver is the most affected by its toxic effects. Recently, it has been shown that a lot of plants that naturally do not contain pyrrolizidine alkaloids are starting to show otherwise. Certain content of pyrrolizidine alkaloids has been found in plants due to the same habitat, contamination or crossbreeding of species. By this appearance, rate of possible exposure to pyrrolizidine alkaloids significantly increases and it is spread to more various sources what presents potential health hazard, especially in regular consumers. In order to restrict pyrrolizidine alkaloid exposure, The European Commission has brought the decision to additionally limit content of pyrrolizidine alkaloids that is allowed in products like tea, herbal infusions, herbal supplements, pollen based products and spices which will be implemented on 1. July 2022. Even though we know a lot about pyrrolizidine alkaloids, regularly we come to the new insights. It is important to emphasize the fact that knowledge is power which allows us to implement measures due to the new insights to ensure safety and preserve health of population in which significant role has the pharmacist.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija

Diplomski rad

Samostalni kolegij Toksikologija
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

PIROLIZIDINSKI ALKALOIDI KAO KONTAMINANTI

Lucija Kireta

SAŽETAK

Pirolizidinski alkaloidi su tvari koje prirodno nalazimo u nekim biljnim vrstama (pretežito vrste porodica *Boraginaceae*, *Compositae/Asteraceae*, *Leguminosae/Fabaceae*, *Apocynaceae*, *Ranunculaceae*, *Scrophulariaceae*), a produkt su njihovog sekundarnog metabolizma i primarno im služe kao obrana od biljojeda. Njihova akutna toksičnost, genotoksičnost i potencijalni karcinogeni učinak na ljude poznati su već jako dugo vremena, a najčešće je toksičnim učinkom u najvećoj mjeri pogođena jetra. Nove spoznaje sve više ukazuju na to da biljke koje prirodno ne sadrže pirolizidinske alkaloidne uslijed rasta na istom staništu kao i biljke koje ih sadrže, slučajne kontaminacije ili posljedičnog križanja vrsta, postaju biljke u kojima je moguće naći određeni sadržaj pirolizidinskih alkaloida. Time se povećava sveukupna moguća izloženost pirolizidinskim alkaloidima i to iz više različitih izvora te raste mogućnost ispoljavanja štetnih učinaka po zdravlje, osobito kod redovitih potrošača. Kako bi se ograničila izloženost pirolizidinskim alkaloidima, Komisija Europske unije je donijela odluku da se dozvoljeni sadržaj pirolizidinskih alkaloida dodatno ograniči u proizvodima poput čajeva, biljnih infuzija, biljnih dodatka prehrani, pripravaka na bazi peludi i začinicima te provedba te odluke kreće od 1. srpnja 2022. Iako o pirolizidinskim alkaloidima već puno toga znamo, svakodnevno dolazimo do novih spoznaja. Važno je naglasiti da je znanje moć koja nam omogućava da u svjetlu novih spoznaja poduzmemo mjere koje su u našoj moći kako bi se osigurala sigurnost i zdravlje opće populacije u čemu značajnu ulogu ima i sam farmaceut.

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

Rad sadrži: 51 stranicu, 4 grafička prikaza, 1 tablicu i 92 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: pirolizidinski alkaloidi, kontaminanti, med, polen, čaj, biljne infuzije, dodaci prehrani, gavez, toksičnost

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

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

Dr. sc. Valerije Vrčec, *redoviti profesor u trajnom zvanju Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

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

Rad prihvaćen: veljača 2022.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

PYRROLIZIDINE ALKALOIDS AS CONTAMINANTS

Lucija Kireta

SUMMARY

Pyrrolizidine alkaloids are compounds that naturally occur in some herbal species (mostly species of plant families *Boraginaceae*, *Compositae/Asteraceae*, *Leguminosae/Fabaceae*, *Apocynaceae*, *Ranunculaceae*, *Scrophulariaceae*) and they are products of secondary metabolism that plants have developed as defense mechanism against insect herbivores. The acute toxicity, genotoxicity and carcinogenic potential for humans caused by pyrrolizidine alkaloids have been known for a very long time and usually liver is the most affected by its toxic effects. Recently, it has been shown that a lot of plants that naturally do not contain pyrrolizidine alkaloids are starting to show otherwise. Certain content of pyrrolizidine alkaloids has been found in plants due to the same habitat, contamination or crossbreeding of species. By this appearance, rate of possible exposure to pyrrolizidine alkaloids significantly increases and it is spread to more various sources what presents potential health hazard, especially in regular consumers. In order to restrict pyrrolizidine alkaloid exposure, The European Commission has brought the decision to additionally limit content of pyrrolizidine alkaloids that is allowed in products like tea, herbal infusions, herbal supplements, pollen based products and spices which will be implemented on 1. July 2022. Even though we know a lot about pyrrolizidine alkaloids, regularly we come to the new insights. It is important to emphasize the fact that knowledge is power which allows us to implement measures due to the new insights to ensure safety and preserve health of population in which significant role has the pharmacist.

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

Thesis includes: 51 pages, 4 figures, 1 table and 92 references. Original is in Croatian language.

Keywords: pyrrolizidine alkaloids, contaminants, honey, pollen, tea, herbal infusions, dietary supplements, comfrey, toxicity

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

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

Valerije Vrčec, Ph.D. *Full Professor in tenure*, 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: February 2022.