

*Małgorzata Kania-Dobrowolska¹, Justyna Baraniak¹, Radosław Kujawski²,
Marcin Ożarowski¹

Alkaloidy pirolizydynowe – źródła i zagrożenie dla zdrowia ludzi

Pyrrolizidine alkaloids – source and risk for human health

¹Instytut Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich, Poznań

Dyrektor Instytutu: dr hab. Małgorzata Zimmiewska, prof. IWNiRZ

²Katedra i Zakład Farmakologii, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Kierownik Katedry i Zakładu: prof. dr hab. n. farm. Przemysław Łukasz Mikołajczak

SUMMARY

The pyrrolizidine alkaloids are commonly found in many plants. They are present in well-known medicinal plants as: comfrey (*Symphytum officinale* L.), common butterbur (*Petasites hybridus* L.), coltsfoot (*Tussilago farfara* L.) or borage (*Borago officinalis* L.). Some of this plants are not used in phytotherapy or are used with big restrictions. We must pay attention that several human food products can be a source for pyrrolizidine alkaloids ingestion as a consequence of pollution of farmlands by plants originated from families: *Senecio*, *Echium*, *Heliotropium*, *Crotalaria*, *Boraginaceae* and *Eupatorium*. When harvesting, it may lead to contamination of food grains and feed for livestock. In consequence, pyrrolizidine alkaloids are detected in food products just like: baker's goods, cakes, milk, cheese, yoghurts or meat.

Keywords: pyrrolizidine alkaloids, toxicity, food chain, herbs

STRESZCZENIE

Alkaloidy pirolizydynowe występują dość powszechnie w wielu roślinach. Do popularnych roślin zielarskich zawierających te alkaloidy należą: żywokost lekarski (*Symphytum officinale* L.), lepieźnik różowy (*Petasites hybridus* L.), podbiał pospolity (*Tussilago farfara* L.) oraz ogórecznik lekarski (*Borago officinalis* L.). Niektórych z tych roślin obecnie nie stosuje się w doustnej fitoterapii lub stosuje się z dużymi ograniczeniami. Należy zwrócić uwagę, że alkaloidy pirolizydynowe mogą dostać się do produktów spożywanych przez ludzi na skutek zanieczyszczenia pól uprawnych roślinami z rodzin *Senecio*, *Echium*, *Heliotropium*, *Crotalaria*, *Boraginaceae* i *Eupatorium*. Przy zbiorze może dojść do zanieczyszczenia zbóż oraz paszy dla zwierząt gospodarskich. W wyniku tego wykrywa się alkaloidy pirolizydynowe w takich produktach, jak: pieczywo i wyroby ciastkarskie, mleko, sery, jogurty czy mięso.

Słowa kluczowe: alkaloidy pirolizydynowe, toksyczność, łańcuch żywności, zioła

Wstęp

Alkaloidy pirolizydynowe (AP) to wtórne metabolity roślinne wydzielane przez roślinę w celu ochrony przed roślinożercami. Rośliny zielarskie, które zawierają alkaloidy pirolizydynowe, takie jak: podbiał, lepieźnik i żywokost, są albo zabronione do użytku wewnętrznego, albo ich dawkowanie jest ograniczone w zależności od zawartości alkaloidów. Problem jednak rodzi się w momencie, gdy surowiec roślinny zostaje zakażony innymi roślinami zawierającymi alkaloidy pirolizydynowe. Taki problem może dotyczyć wielu upraw, gdzie obok roślin hodowlanych rosną rośliny z rodzin *Senecio*, *Echium*, *Heliotropium*, *Crotalaria*, *Boraginaceae* i *Eupatorium*. Alkaloidy pirolizydynowe

mogą przedostawać się do zbieranych zbóż, ziół, warzyw czy roślin przeznaczonych na kiszonkę. W ten sposób następuje zakażenie łańcucha żywnościowego alkaloidami, które mogą przedostawać się do takich produktów, jak: chleb, ciasta, miody, mieszanki sałat, herbaty ziołowe, suplementy diety na bazie ziół, mięso, jaja, mleko itp.

Występowanie AP w środowisku naturalnym

Alkaloidy pirolizydynowe są metabolitami, które są biosyntetyzowane przez roślinę w celu ochrony przed zwierzętami roślinożernymi. Alkaloidy te mogą

występować w każdej części rośliny, jednakże najwięcej jest ich w tkance epidermalnej. Szacuje się, że około 6000 gatunków roślin na świecie – co stanowi 3% wszystkich roślin kwitnących – może zawierać alkaloidy pirolizydynowe. AP występują głównie w rodzinach okrytonasiennych *Boraginaceae* (wszystkie rodzaje), *Asteraceae* (*Senecioneae* i *Eupatorieae*) i *Fabaceae* (rodzaj *Crotalaria*). Można je znaleźć w niektórych roślinach zielarskich, takich jak: żywokost lekarski (*Symphytum officinale* L.), lepieźnik różowy (*Petasites hybridus* L.), podbiał pospolity (*Tussilago farfara* L.) oraz ogórecznik lekarski (*Borago officinalis* L.).

Zawartość AP w materiale roślinnym zależy od wielu czynników (gatunku, części rośliny, zbioru, przechowywania, procedury ekstrakcji itp.). Zmienność zawartości alkaloidów w różnych częściach tej samej rośliny obrazują badania składu liści i kłączy lepieźnika różowego (*Petasites hybridus*). Autorzy zauważyli istnienie sporych różnic w zawartości AP, np. kłącze tej rośliny zawiera 4,8-89,9 $\mu\text{g/g}$ s.m., a liście 0,02-1,50 $\mu\text{g/g}$ s.m. (1). Ponadto, zawartość alkaloidów w różnych częściach roślin może ulec zmianie poprzez realokację jako odpowiedź na atak roślinożercy na roślinę (2). Interesujące wydają się badania podbiału zebranego z różnych części Polski, w których stwierdzono zmienność zawartości alkaloidów uzależnioną od miejsca wzrostu rośliny. Zaobserwowano, że liście podbiału zebrane z różnych stron kraju mogą zawierać alkaloidy pirolizydynowe w ilości od 0,02 do 0,34 $\mu\text{g/g}$ s.m. (3). Wyniki tych badań sugerują, że nie można jednoznacznie stwierdzić, czy rośliny potencjalnie zawierające AP będą toksyczne dla człowieka.

Obecnie zidentyfikowano ponad 500 związków chemicznych należących do grupy alkaloidów pirolizydynowych. Są to pochodne pirolizydyny lub necyny, o charakterze estrów i diestrów. AP ulegają hydrolizie kwaśnej lub zasadowej, dając zasadowe aminoalkohole typu necyna (takie jak: retronecyna, heliotrydyna, platynecyna, otonecyna) oraz kwasy necynowe mono- i dikarboksyłowe. Mogą także tworzyć się N-tlenki (4, 5).

Toksykologia AP

Alkaloidy pirolizydynowe działają toksycznie i genotoksycznie, mogą powodować toksyczość ostrą, mutagenność, aberracje chromosomowe, tworzenie nieprawidłowych wiązań poprzecznych pomiędzy niemi DNA i wiązań DNA-białko oraz megalocytozę. Działanie AP w badaniach na zwierzętach doświadczalnych powodowało powstawanie guzów wątroby i zmian płucnych (6). Odnotowano także zatrucia u ludzi powodowane przez AP (7).

Liczne badania na zwierzętach wykazały, że reaktywne metabolity 1,2-nienasyconych alkaloidów pirolizydynowych, takich jak riddelliny i retroriny, powstają pod wpływem enzymu CYP 3A4. Dane sugerują, że ten sam mechanizm zachodzi po podaniu doustnym; następuje uszkodzenie makromolekuł, w tym DNA. Należy podkreślić, że nienasycone AP są nietoksyczne przed aktywacją metaboliczną i dlatego są klasyfikowane jako protoksyny.

Toksyczność alkaloidów zależy od ich metabolizowania w wątrobie. W wątrobie na skutek działania kompleksu enzymów cytochromu P450 najczęściej do alkaloidu przyłącza się grupa hydroksylowa (8). N-tlenki nie ulegają przekształceniu do hydroksypirolizydyn i są w takiej formie nietoksyczne dla człowieka. Spożyte jednak ulegają redukcji przez enzymy jelitowe lub mikrosomy wątroby i zaczynają wykazywać działanie toksyczne (9). AP występujące w rodzinie *Senecio*, takie jak: senecionina, senecifilina, senkirkinina czy retrorsyna, uszkodzają wątrobę, powodując sieciowanie DNA. CYP3A4 to główny enzym zaangażowany w bioaktywację i detoksykację senecioniny w ludzkiej wątrobie (10-12). Pirolowe związki pośrednie wykazują wysoką reaktywność, co powoduje działanie cytotoksyczne i genotoksyczne. Stwierdzono, że AP są genotoksyczne w teście punktowym Wing *Drosophila* (13).

Metabolity alkaloidów reagują z grupami SH zlokalizowanymi w glutationie czy cysteinie. Dlatego dieta bogata w glutation, taurynę, cysteinę i metioninę może obniżać toksyczność spożytych AP (14, 15). Na zmianę toksyczności alkaloidów może także wpływać wzmaganie lub hamowanie aktywności cytochromu P450 przez leki (16). Toksyczność AP zależy również od czasu ekspozycji, dawki oraz podatności organizmu. W tabeli 1 przedstawiono LD_{50} ważniejszych AP (17, 18).

Dawka AP w ilości 10 mg/kg m.c. na dzień powoduje ostrą toksyczność w ciągu 1-6 dni, natomiast dawki 0,1 mg/kg m.c. na dzień – przewlekłą toksyczność. U ludzi dawka toksyczna waha się w przedziale 0,1-10 mg/kg m.c. na dzień (19). Dodatkowo zakres toksyczności AP zależy od stanu odżywienia. Szczury karmione dietą niskobiałkową wykazywały wyższą śmiertelność niż osobniki karmione normalną dietą (20). Młode zwierzęta także wykazywały większą wrażliwość na toksyczne działania AP (21, 22). Nowo narodzone szczury wykazywały większą podatność na działanie toksyczne senecioniny i monokrotaliny, ponieważ mikrosomalna aktywność hydroksylowania wątroby u nich jest niska (23).

Stwierdzono, że zmiany w płucach objawiające się obrzękiem pęcherzyków płucnych następowały

Tab. 1. Wartości LD₅₀ ważniejszych alkaloidów pirolizydynowych

Alkaloid	LD ₅₀ (mg/kg m.c.)
Retrorsyna	34
Senecionina	50
Heliosupina	60
Lasiokarpina	72
Senecifillina	77
Jakobina	77 (mysz)
Riddellina	105 (mysz)
Simfitina	130
Heleurina	140
Jakonina	168 (samice szczura)
Monokrotalina	175
Echimidina	200
Spektabilina	220
Senkirkina	220
Heliotrina	300
Echinatina	350
Supinina	450
Europina	> 1000
Heliotridina	1200
Intermedina	1500
Likopsamina	1500

po pojedynczej dawce monokrotaliny 60 mg/kg m.c. podanej podskórnie szczurom i u psów otrzymujących tę dawkę dożylnie. Ponadto podskórne podawanie co 2 miesiące 4 dawek monokrotaliny w ilości 120 mg/kg m.c. szczurom spowodowało martwicze tętnicze zapalenie płuc (18). W innym badaniu po 4 godzinach od wstrzyknięcia do żyły ogonowej szczurów 3,5 mg/kg m.c. monokrotaliny pirolu (pochodnej dehidropirolizydyny monokrotaliny) obserwowano wczesne zmiany płucne (24).

W kolejnym badaniu szczurom podawano 5 dni w tygodniu przez 105 tygodni riddellinę w ilości 0,033 mg/kg m.c. dziennie i obserwowano wygląd hepatocytów. U myszy nastąpiło powstanie ogniska martwiczego w wątrobie przy dawce 0,1 mg/kg m.c./dzień, a przy dawce 0,3 mg/kg m.c./dzień w obrazie histopatologicznym hepatocytów nastąpiły zmiany wielkości średnicy jądra (25).

Zauważono, że zespół niedrożności zatokowej wątroby (HVOD) jest powiązany ze stosowaniem preparatów roślinnych zawierających AP (26). VOD prowadzi do marskości i w końcu do śmierci organizmu. Istnieje wiele zgłoszonych przypadków zatruc spowodowanych przez AP, które doprowadziły do śmierci: Afganistan (27), Anglia (28), Egipt (29), Hong Kong (30), Indie (31), Izrael (32), Jamajka (33), Szkocja (34), Stany Zjednoczone (35) i Peru (36).

Istnieje kilka raportów opisujących stadium przypadku powstania HVOD. W jednym z opisanych zdarzeń u noworodka stwierdzono powstanie zespołu niedrożności zatokowej wątroby na skutek spożycia mleka matki, która piła w czasie karmienia herbatę ziołową zawierającą AP (37). Inny przypadek dotyczył 4 osób dorosłych spożywających herbatę ziołową z AP (30, 38) oraz 18-miesięcznego chłopca, któremu podawano także herbatę ziołową zawierającą alkaloidy (39). Stwierdzono także uszkodzenie wątroby u wcześniaka, którego matka w czasie ciąży piła herbatę zawierającą żywokost oraz kilka zatruc alkaloidami w Wielkiej Brytanii na skutek spożycia herbaty z żywokostu (40).

Odnotowano również zatrucia AP wywołane zanieczyszczeniem zbóż przez nasiona ogórecznika (w Afganistanie) i przez gatunki z rodzaju *Crotalaria* w Indiach Środkowych (41).

Dawki AP rzędu 1 mg/kg m.c. powodują u ludzi działanie hepatotoksyczne ujawniające się chorobą zarostową żył (41). Zatrucia te zostały opisane w takich krajach, jak: Pakistan, Indie i Afganistan (choroba Charmaka), których powodem była mąka pszenna zanieczyszczona AP. Istnieje również udokumentowany przypadek choroby zarostowej żył wątroby ze Stanów Zjednoczonych (lata 70. ubiegłego wieku) związany z przyjmowaniem herbat ziołowych z AP, a także bieżące raporty z Chin dotyczące stosowania tradycyjnych chińskich leków. Przypadki z USA i Chin są związane z przyjmowaniem ziołowych produktów przygotowywanych z roślin wytwarzających AP. Surowce botaniczne na ogół są zanieczyszczone bardzo niskimi poziomami AP, ale dzięki nowo opracowanym metodom analitycznym (LC-MS/MS) można obecnie wykrywać i oznaczać ilościowo nawet śladowe ilości tych związków (41).

Zanieczyszczenia AP produktów spożywczych i leczniczych

Wiele gatunków roślin leczniczych, które zawierają AP, takich jak: podbiał, żywokost i lepieńnik, stosowanych jest zgodnie z zaleceniami farmakopealnymi. Problem jednak stanowią AP znajdujące się w roślinach rosnących na pastwiskach (starzec, heliotrop,

krotalaria). Mogą one zostać zebrane z innymi roślinami, dostać się do paszy dla zwierząt i pośrednio przedostać się do produktów spożywczych, takich jak: mięso, mleko i masło. Konsument nie jest świadomy ich obecności w pożywieniu, dlatego powinno się uwzględnić ich monitorowanie w produktach żywnościowych.

Należy podkreślić, że do zanieczyszczenia żywności AP może dojść również poprzez zbiór, obok roślin uprawnych, roślin należących do rodzin: *Senecio*, *Crotalaria*, *Boraginaceae* i in. Dla przykładu AP były wykrywane w opakowaniach mieszanek sałat i najczęściej pochodziły z przypadkowo zebranych części *Senecio vulgaris* (42). Istnieją dane literaturowe wskazujące na obecność AP w serze kozim, pochodzących z roślin z rodziny *Crotalaria* oraz w mące pszennej pochodzącej z nasion *Heliotropium* (41). Przeprowadzono także badania pyłku kwiatowego wchodzącego w skład suplementów diety. Przebadano około 55 próbek pyłku, z czego około 31% zawierało AP w zakresie od 1080 do 16 350 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (średnio 5179 $\mu\text{g}/\text{kg}$) (43). W innym doświadczeniu sprawdzono 119 próbek pyłku kwiatowego przy zastosowaniu metod LC-MS/MS. Około 60% próbek zawierało AP w ilości od 11 do 37 855 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (średnio 1846 $\mu\text{g}/\text{kg}$) (44). W obu badaniach pyłek kwiatowy z roślin z rodzaju *Echium* występował w większości próbek, następnie wykrywano pyłek kwiatowy z roślin z rodzaju *Eupatorium* i sporadycznie z rodzaju *Senecio*.

Opublikowano ponadto badania dotyczące zawartości AP w próbkach miodu. W 2006 roku przeanalizowano pod kątem obecności AP około 171 próbek miodu z rynku holenderskiego – miody handlowe (importowane miody mieszane), a także miody uzyskane od lokalnych producentów. Próbki analizowano przy użyciu chromatografii LC-MS/MS pod kątem obecności AP identyfikowanych w roślinach z rodzaju *Senecio*. Zawartość AP wahała się między 0,5 a 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$. W 43 próbkach miodu (28%) wykryto AP w ilościach wahaających się od 1 do 365 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Średnia zawartość tych związków w próbkach wynosiła 6,9 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Z alkaloidów najczęściej identyfikowano senecioninę (34 próbki). W badaniu tym nie oznaczano likopsaminy i echimidiny (45).

Kempf i wsp. (46) przeanalizowali 216 próbek miodów, głównie z rynku niemieckiego, pod kątem obecności alkaloidów pirolizydynowych. Wśród nich 19 próbek (8,7%) zawierało AP w zakresie od 19 do 120 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (średnio 56 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

W innym doświadczeniu przebadano łącznie 3917 próbek, głównie miodu luzem, w tym około 696 próbek detalicznych miodów (rynek niemiecki). W około 94% próbek detalicznych miodów stwierdzono obecność AP w stężeniu od 1 do 267 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Średnie

stężenie AP w miodach handlowych wynosiło 26 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Natomiast w 2839 próbkach miodu luzem (w obrocie hurtowym, przed mieszaniem, porcjowaniem, napełnianiem i pakowaniem), w 68% próbek zidentyfikowano AP w stężeniach od 1 do 1087 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Należy dodać, że po zmieszaniu miodu luzem średnie stężenie AP miodu w sprzedaży detalicznej było około 2,5 raza niższe.

W badaniach Dübecke i wsp. (44) sprawdzono korelację pomiędzy obecnością AP a geograficznym pochodzeniem badanych próbek miodu. Stwierdzono, że miód z Ameryki Południowej i Środkowej był w największym stopniu zanieczyszczony AP, następnie znajdowały się miody z krajów Europy Południowej, a najniższą zawartość AP miały miody z krajów Europy Środkowo-Wschodniej. Podobnie jak w przypadku pyłku kwiatowego, najwięcej alkaloidów pochodziło z roślin z rodzaju *Echium*, a następnie z rodzaju *Eupatorium* i niekiedy z rodzaju *Senecio*.

Sprawdzono także, jak wygląda zanieczyszczenie AP w łańcuchu przepływu towarów, badając produkty typu miód pitny (n = 19), cukierki (n = 10), miód z kopru (n = 9), napoje bezalkoholowe (n = 5), batony energetyczne (n = 7), galaretki (n = 3), żywność dla niemowląt (n = 3), suplementy diety (n = 3) i sosy owocowe (n = 1) zawierające w swoim składzie miód. AP znaleziono w miodzie pitnym, słodyczach i miodach z kopru, ich stężenie wahało się od 10 do 484 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (47).

W Holandii przeprowadzono badanie na obecność AP w paszy dla zwierząt (48). W ramach krajowego planu monitorowania pasz w latach 2006-2008 zebrano 147 próbek kiszonki z trawy, siana, suszonej trawy oraz lucerny i poddano je analizie przy użyciu techniki LC-MS/MS. Metoda obejmowała 40 makrocyklicznych AP na poziomie detekcji 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ dla poszczególnych alkaloidów. W 31 ze 147 próbek wykryto AP w ilości od 10 do 5401 $\mu\text{g}/\text{kg}$, o średniej zawartości 121 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Odnotowano duże różnice w zawartości AP między różnymi kategoriami pasz. W kiszonce z trawy AP były rzadko obecne; tylko w 3 z 56 próbek znaleziono ich nieznaczne ilości (maksymalna zawartość 28 $\mu\text{g}/\text{kg}$). 37 próbek siana (głównie uzyskanych z rezerwatów przyrody) nie zawierało AP, z wyjątkiem 1 próbki zawierającej 549 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Spośród 23 próbek z suszonej trawy tylko w 4 stwierdzono AP, a najwyższe stężenie wynosiło 288 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Wysoka częstość występowania AP charakteryzowała produkty z lucerny. Z 31 analizowanych próbek 23 (około 74%) zawierały co najmniej ślady jednego lub więcej AP. W 16 próbkach znaleziono stosunkowo niskie ilości (od 10 do 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$), podczas gdy w 4 próbkach była to ilość od 100 do 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$. W 3 próbkach (10%) wykryto odpowiednio wysokie ilości AP, odpowiadające 3524, 3765 i 5401 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Średnie

stężenie AP znalezione w próbkach produktów z luncermy wynosiło 455 $\mu\text{g}/\text{kg}$, w porównaniu do 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ lub mniej w przypadku pozostałych kategorii. W omawianym badaniu wykrywano głównie AP pochodzące z roślin *Senecio vulgaris* i *S. inaequidens* (48).

Obecność AP w paszy dla zwierząt może wiązać się z przenikaniem ich do produktów pochodzenia zwierzęcego, takich jak: mleko, jaja, mięso. Hoogenboom i wsp. (49) badali możliwość przechodzenia AP z paszy do mleka krowiego. Przez 3 tygodnie krowy otrzymywały karmę, w której stopniowo zwiększano dodatek *Jacobaea vulgaris* (syn. *Senecio jacobaea*) od 50 do 200 g na dzień, podawany w równej ilości rano i wieczorem przez zgłębnik do żwacza. Próbkę mleka pobierano 2 razy dziennie. W mleku stwierdzono występowanie AP zależne od dawki. W największych ilościach w mleku występowała jakolina, chociaż nie jest ona alkaloidem występującym w znacznych ilościach w *J. vulgaris*. Zaskakujący był fakt występowania w mleku śladowych ilości N-tlenków alkaloidów, pomimo tego, że stanowiły one ponad 80% AP w *J. vulgaris*. Stwierdzono ponadto, że tylko około 0,1% alkaloidów przechodzi do mleka krowiego z paszy zawierającej *J. vulgaris*. Wyniki te były zgodne z badaniami opisanymi przez Dickinson i wsp. (50).

Fletcher i wsp. (51) wykazali, że w niewielkim stopniu następuje przenikanie AP do tkanki mięśniowej zwierząt gospodarskich. Cielęta karmiono paszą zawierającą około 15% roślin z rodzajów *Crotalaria* i *Heliotropium*. Obecność AP oznaczano za pomocą LC-MS i GC-MS we krwi, mięśniach i wątrobie. U cieląt otrzymujących paszę z dodatkiem krotalarii (dawka około 5,5 mg/kg m.c./dzień) najwyższą zawartość AP stwierdzono w tkance mięśniowej i wątrobowej (odpowiednio 250 i 2500 $\mu\text{g}/\text{kg}$). U cieląt karmionych paszą z *Senecio* (2,5 mg AP/kg m.c./dzień) maksymalne stężenie AP w tkance wątrobowej utrzymywało się na poziomie 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ podczas badania, przy czym obniżyło się do 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ po zakończeniu doświadczenia. Natomiast w tkankach cieląt otrzymujących *Heliotropium* (15 mg AP/kg m.c./dzień) po zakończeniu badań nie wykryto AP na poziomie wykrywalności ($> 1 \mu\text{g}/\text{kg}$ m.c.). Na tej podstawie autorzy twierdzą, że poziom AP w tkankach zwierząt nie odzwierciedla faktycznego składu tych alkaloidów w materiale roślinnym, co wskazuje na możliwość ich metabolizowania w organizmie zwierząt gospodarskich poprzez hydrolizę lub utlenianie.

Opisano także przypadek zanieczyszczenia pszenicy dla kur niosek nasionami *Heliotropium europaeum* (52). Pszenica zawierała łącznie 26 mg/kg AP, głównie heliotrynę, europeinę i lazjokarpinę. Średnia zawartość AP w jajach zebranych w okresie skażenia wynosiła 156,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (średnia z dwóch pomiarów). Jednakże zauważono, że znaczna część AP

znaleziona w jajach nie pochodziła z *H. europaeum*, ale najprawdopodobniej z obecności *Echium plantagineum* w poprzedniej partii paszy. To spowodowało, że interpretacja wyników była niemożliwa (52).

W badaniu przeprowadzonym przez Eröksüz i wsp. (53) kurom nioskom podawano przez kilka tygodni paszę zawierającą *Senecio vernalis* w ilości do 4%, co odpowiadało 56 mg AP/kg paszy. Niestety w jajach nie udało się oznaczyć AP powyżej poziomu wykrywalności za pomocą metody GC/MS (53).

W innym badaniu (54) przepiórkom podawano paszę zawierającą AP. W grupie HD przepiórkom podawano nadziemne części *Heliotropium dolosum* w ilości 390 mg/kg. W grupie HC ptakom podawano *Heliotropium circinatum* w ilości 450 mg/kg. Ostatnia grupa przepiórek SV otrzymywała paszę z dodatkiem *Senecio* w ilości 420 mg/kg. Ptaki karmiono wyższymi paszami przez 6 tygodni. We wszystkich przypadkach zaobserwowano przejście alkaloidów pirolizydynowych do jaj. Stwierdzono, że zawartość AP w jajach w grupie HD wynosiła 8,66 $\mu\text{g}/\text{kg}$, w grupie HC 20,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i w grupie SV kształtowała się na poziomie 3,21 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Zauważono, że nie wszystkie AP obecne w paszach przedostawały się do jaj. O ile europina była w jajach wykrywana we wszystkich przypadkach, to obecności lazjokarpiny w jajach nie udało się oznaczyć. Na podstawie przeprowadzonych badań współczynnik przechodzenia AP z paszy do jaj obliczono na poziomie: 0,35% dla grupy HD, 1,08% dla grup HC i 0,22% dla grup SV (54).

Analiza piśmiennictwa wskazuje, że większość zatruc u ludzi było spowodowanych albo stosowaniem surowców leczniczych zawierających AP, albo produktów spożywczych, w których obecne były rośliny zawierające AP. Brak jest natomiast doniesień o zatruciach spowodowanych spożywaniem jaj, mięsa lub mleka zawierającego AP.

Obserwowano zatrucia w Indiach spowodowane stosowaniem herbat zawierających rośliny z gatunków *Crotalaria*, *Heliotropium*, *Symphytum* oraz *Senecio*. Odnotowano także duże ogniska zatruc, w tym zgony po spożyciu zbóż zanieczyszczonych nasionami z gatunku *Heliotropium* w Indiach, Rosji i Afganistanie (18). W Afganistanie zanieczyszczenie pszenicy nasionami chwastów *Heliotropium popovi* spowodowało rozwój choroby zarostowej żył wątroby u znacznej populacji ludzi (55, 56). W przypadku zatruc w Indiach stwierdzono, że proso było skażone nasionami z gatunków *Crotalaria*, zawierającymi głównie alkaloid pirolizydynowy – monokrotalinę. Całkowitą zawartość alkaloidów oszacowano na poziomie 5,3 g/kg nasion w przeliczeniu na monokrotalinę. Poziom zanieczyszczenia prosa AP mieścił się w granicach od 0 do 19 g/kg.

Zakładając średnie dzienne spożycie prosa na poziomie 400 g w odniesieniu do dorosłego człowieka i maksymalny poziom zanieczyszczenia prosa wynoszący do 20 g/kg, autorzy obliczyli, że ilość spożytych AP wynosiła przeciętnie 40 mg/dzień (18, 57).

W Afganistanie wielu pacjentów ze zdiagnozowanym zespołem niedrożności zatokowej wątroby HVOD spożywało chleb z pszenicy zanieczyszczonej nasionami *Heliotropium popovii*. Według analizy przeprowadzonej w dwóch niezależnych laboratoriach nasiona zawierały AP. Stwierdzono zanieczyszczenie pszenicy nasionami zawierającymi AP na poziomach 7,2 oraz 13,2-14,9 g/kg. Zidentyfikowano głównie heliotrynę i inne związki o charakterze zbliżonym do lazjokarpiny. Próbkę pszenicy otrzymane z kilku miejscowości, w których odnotowano przypadki HVOD, zawierały średnio 0,03% nasion *Heliotropium popovii*. Autorzy oszacowali, że osoby dorosłe mogły spożywać do 700 g mąki dziennie, o zawartości około 2 mg toksycznych alkaloidów (58).

Kolejny przykład dotyczy uszkodzenia wątroby u 6-miesięcznej dziewczynki z USA, której podawano herbatę zanieczyszczoną *Senecio longilobus* (59-61). W innym raporcie z USA opisano przypadek zatrucia alkaloidami u 49-letniej kobiety, u której zaobserwowano HVOD. Pacjentka spożywała suplement zawierający żywakost przez 4 miesiące przed przyjęciem do szpitala. Piła ona także przez 6 miesięcy herbatę ziołową. Zanalizowano te produkty pod kątem obecności AP i wykryto w nich monokrotalinę i jej pochodne. Obliczono, że podczas 6 miesięcy przed hospitalizacją pacjentka spożyła łącznie co najmniej 85 mg AP. Zauważono przy tym, że całkowite zużycie AP było stosunkowo niskie i że zaistniała możliwość wykorzystywania przez pacjentkę tych preparatów dłużej niż zadeklarowała to ona w wywiadzie klinicznym (62).

HVOD został zdiagnozowany także u 18-miesięcznego chłopca, któremu od 3. miesiąca życia regularnie podawano herbatę ziołową. U dziecka nastąpiło uszkodzenie wątroby. Trafiło ono do szpitala z wodobrzuszem i martwicą mięszu wątroby. U dziecka zastosowano leczenie zachowawcze, po którym całkowicie wyzdrowiało w ciągu 2 miesięcy. Herbata zawierała miętę. A to, co matka uważała za podbiał (*Tussilago farfara*), w rzeczywistości okazało się rośliną o nazwie *Adenostyles alliariae*. Zwierała ona alkaloidy pirolizydynowe, głównie zidentyfikowano senecyfilinę i jej tlenki. Obliczono, że dziecko spożyło łącznie około 30 mg AP w ciągu zaledwie 15 miesięcy życia (63).

Metody oznaczania AP

Alkaloidy pirolizydynowe są związkami zawierającymi azot. Stwierdzono kilkaset strukturalnie różnych

AP w niskich stężeniach w kilku tysiącach różnych gatunków roślin. Wiele z tych roślin to pospolite chwasty. Ostatnie badania wykazują, że rośliny zawierające AP zanieczyszczają surowce używane do produkcji żywności i ziołowych produktów leczniczych. Zanieczyszczenia AP są na niskim poziomie, dlatego do ich oznaczania wymagane są czułe metody analityczne, takie jak LC-MS/MS.

Analiza śladowych ilości AP zazwyczaj wymaga etapu oczyszczania, aby zwiększyć stężenie AP i usunąć związki przeszkadzające w analizie. W celu wyizolowania alkaloidów z badanych prób zaleca się stosowanie półpolarnych rozpuszczalników lub warunków kwasowych. Niekiedy na początku analizy traktuje się próbę rozpuszczalnikami niepolarnymi (jak pentan lub eter naftowy) w celu usunięcia niepolarnych związków, takich jak tłuszcze, woski i terpeny. Ekstrakty z AP można dalej oczyszczać za pomocą procedur SPE. Należy jednak pamiętać, że zastosowane warunki ekstrakcji mogą wpływać na stabilność alkaloidów i wydajność procesu ekstrakcji (46). Nadal można stosować metodę kolorymetryczną i rozdział za pomocą TLC. Jednakże nie są to metody na tyle czułe, aby określać śladowe ilości AP. Jeśli chodzi o metody immunologiczne, to również nie są one na tyle selektywne, aby były polecane do określania zawartości AP. Obecnie zaleca się stosowanie metod opartych na analizie MS (spektrometria mas). Istnieje wiele wariantów metod LC-MS/MS. We wszystkich przypadkach przed oznaczeniem badane próbki należy oczyścić i przeprowadzić ich wstępną koncentrację.

Podsumowanie

Zanieczyszczenie żywności lub leków roślinami zawierającymi AP jest problemem wymagającym rozwiązań prawnych. W marcu 2016 roku wprowadzono ograniczenie przyjmowania AP wraz z ziołowymi produktami leczniczymi w wysokości 1 $\mu\text{g}/\text{dobę}$.

Komitet ds. Ziołowych Produktów Leczniczych (HMPC) zalecił następnie ograniczenie przyjmowania AP obecnych w ziołowych produktach leczniczych do 0,35 $\mu\text{g}/\text{dobę}$ (maksymalnie przez 14 dni), w przeliczeniu na osobę o masie ciała 50 kg. Poziom ten został określony przez EFSA z wykorzystaniem tzw. zasady marginesu narażenia (MOE) zgodnie z aktualnymi wytycznymi dotyczącymi oceny ryzyka genotoksycznych czynników rakotwórczych w żywności. Oczywiście dawka ta u ludzi nie jest dawką określoną eksperymentalnie, ale wartością oszacowaną przy użyciu obecnego paradygmatu do oceny ryzyka genotoksycznych czynników rakotwórczych.

Biorąc więc pod uwagę te dane, wydaje się rozsądne zaakceptowanie dawki 1,0 μg AP/dzień w czasie

3-letniego okresu przejściowego. Uważa się, że ten limit w okresie przejściowym nie będzie stanowił negatywnego wpływu na zdrowie publiczne. Można zauważyć, że dawka 1,0 µg/dzień znajduje się poniżej progu zagrożenia toksykologicznego dla produktów leczniczych (1,5 µg/dzień), jak to zostało określone w innych wytycznych.

W tym czasie producenci ziołowych produktów leczniczych musieli podjąć działania zmierzające do zmniejszenia zanieczyszczeń AP w roślinach, wprowadzając bardziej rygorystyczne środki niż te wynikające z Dobrej Praktyki Rolniczej i Zbioru (GACP). Zastosowano skoordynowane metody uprawy, zbioru oraz oznaczania AP.

Z kolei EFSA przedstawiła zalecenia dotyczące AP. Stwierdzono, że aktualnie nie ma wystarczających danych dotyczących toksykologii związanej ze spożyciem żywności zawierającej AP. Brak jest szczególnie informacji o najczęściej spotykanych toksycznych alkaloidach w żywności oraz dotyczących toksykokinetyki, aktywacji metabolicznej i potencjalnej rakotwórczości poszczególnych AP. W związku z tym EFSA podjęła decyzję o rozpoczęciu gromadzenia danych analitycznych dotyczących występowania AP w żywności i paszach, a także w ziołowych suplementach diety. Ponadto zapowiedziano opracowanie bardziej czułych i selektywnych metod analitycznych do oznaczania AP w żywności i paszach (64).

Piśmiennictwo

- Ożarowski M, Przystanowicz J, Adamczak A. Phytochemical, pharmacological and clinical studies of *Petasites hybridus* (L.) P. Gaertn., B. Mey. & Scherb. A review. *Herba Pol* 2013; 59(4):110-30.
- Dreger M, Stanisławska M, Krajewska-Patan A i wsp. Pyrrolizidine alkaloids – chemistry, biosynthesis, pathway, toxicity, safety and perspectives of medicinal usage. *Herba Pol* 2009; 55(4):127-47.
- Adamczak A, Opala B, Gryszczyńska A i wsp. Content of pyrrolizidine alkaloids in the leaves of coltsfoot (*Tussilago farfara* L.) in Poland. *Acta Soc Bot Pol* 2013; 82(4):289-93.
- Roeder E. Analysis of pyrrolizidine alkaloids. *Curr Org Chem* 1999; 3:557-76.
- Wiedenfeld H, Edgar J. Toxicity of pyrrolizidine alkaloids to human and ruminants. *Phytochem Rev* 2011; 10:137-51.
- Schoental R, Head MA, Peacock PR. Senecio alkaloids: Primary liver tumours in rats as a result of treatment with (1) a mixture of alkaloids from *S. jacobaea* Lin.; (2) retrorsine; (3) isatidine. *Br J Cancer* 1954; 8:458-65. (red AR Mattock). *Chemistry and toxicology of pyrrolizidine alkaloids*. Academic Press, London 1986.
- Fu PP, Xia Q, Lin G i wsp. Pyrrolizidine alkaloids-genotoxicity, metabolism enzymes, metabolic activation, and mechanisms. *Drug Metab Rev* 2004; 36:1-55.
- Wiedenfeld H, Roeder E, Bourauel T i wsp. Pyrrolizidine Alkaloids. Structure and Toxicity. Bonn University Press, Göttingen 2008.
- Prakash AS, Pereira TN, Reilly PE i wsp. Pyrrolizidine alkaloids in human diet. *Mutat Res* 1999; 443:53-67.
- Miranda CL, Reed RL, Guengerich FP i wsp. Role of cytochrome P450 IIIA4 in the metabolism of the pyrrolizidine alkaloid senecionine in human liver. *Carcinogen* 1991; 12:515-9.
- Yan CC, Cooper RA, Huxtable RJ. The comparative metabolism of the four pyrrolizidine alkaloids, seneciphylline, retrorsine, monocrotaline and trichodesmine in the isolated perfused rat liver. *Toxicol Appl Pharmacol* 1995; 133:277-84.
- Yan CC, Huxtable RJ. Relationship between glutathione concentration and metabolism of the pyrrolizidine alkaloid, monocrotaline, in the isolated, perfused liver. *Toxicol Appl Pharmacol* 1995; 130:132-9.
- Frei H, Luthy J, Brauchli J i wsp. Structure/activity relationships of the genotoxic potencies of sixteen pyrrolizidine alkaloids assayed for the induction of somatic mutation and recombination in wing cells of *Drosophila melanogaster*. *Chem-Biol Interact* 1992; 1:1-22.
- Yan Yan CC, Huxtable RJ. Effects of taurine and guanidinoethane sulfonate on toxicity of the pyrrolizidine alkaloid monocrotaline. *Biochem Pharmacol* 1996; 51:321-9.
- Yan CC, Huxtable RJ. Effect of taurine on biliary metabolites of glutathione in liver perfused with the pyrrolizidine alkaloid, monocrotaline. *Adv Exp Med Biol* 1998; 442:85-9.
- Eisenstein D, Azari J, Huxtable RJ. Attenuation of the toxicity of a pyrrolizidine alkaloid (monocrotaline) by metabolic inhibition. *Proc West Pharmacol Soc* 1979; 22:193-8.
- Wainwright J, Schonland MM. Toxic hepatitis in black patients in Natal. *South Afr Med J* 1977; 51:571-3.
- WHO-IPCS (World Health Organisation-International Programme on Chemical Safety). Pyrrolizidine alkaloids. *Environmental Health Criteria* 80. WHO, Geneva, 1988; 1-345.
- Culvenor CCJ. Estimated intakes of pyrrolizidine alkaloids by humans. *J Toxicol Environ Health* 1983; 11(4-6):625-35.
- Schoental R, Magee P. Chronic liver changes in rats after a single dose of lasiocarpine, a pyrrolizidine (*Senecio*) alkaloid. *J Pathol Bacteriol* 1957; 74:305-19.
- Schoental R. Liver lesions in young rats suckled by mothers treated with the pyrrolizidine alkaloids lasiocarpine and retrorsine. *J Pathol Bacteriol* 1959; 77:485-95.
- Fowler ME. Pyrrolizidine alkaloid poisoning in calves. *J Am Vet Med Assoc* 1968; 152:1131-7.
- McLean EK. The toxic actions of pyrrolizidine (*Senecio*) alkaloids. *Pharm Rev* 1970; 22:430-63; <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc080.htm>.
- Schultze AE, Wagner JG, White SM i wsp. Early indications of monocrotaline pyrrole-induced lung injury in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1991; 109:41-50.
- Toxicology and carcinogenesis studies of riddelline. *NTP Techn Report* 2003; 508.
- Ridker PM, Ohkuma S, McDermott WV i wsp. Hepatic veno-occlusive disease associated with consumption of pyrrolizidine alkaloid-containing dietary supplements. *Gastroenter* 1985; 88:1050-4.
- Tandon HD, Tandon BN, Mattocks AR. An epidemic of veno-occlusive disease of the liver in Afghanistan: Pathologic features. *Am J Gastroenterol* 1978; 70:607-13.
- Weston CF, Cooper BT, Davies J i wsp. Veno-occlusive disease of the liver secondary to the ingestion of comfrey. *Br Med J* 1987; 295:183.

29. Safouh M, Shehata AH, Elwi A. Hepatic vein occlusion disease in Egyptian children. *Arch Pathol* 1965; 79:505-11.
30. Kumana CR, Lin M, Ng HJ i wsp. Herbal tea induced hepatic veno-occlusive disease: quantification of toxic alkaloid exposure in adults. *Gut* 1985; 26:101-4.
31. Tandon BN, Tandon HD, Tandon RK i wsp. An epidemic of veno-occlusive disease of liver in central India. *Lancet* 1976; 2:271-2.
32. McLean E. *Senecio* and other plants as liver poisons. *Israel J Med Sci* 1974; 10:436-40.
33. Hill KR. The vomiting sickness of Jamaica: a review. *West Indian Med J* 1952; 1:243-64.
34. Bateman J, Chapman D, Simpson D. Possible toxicity of herbal remedies. *Scott Med J* 1998; 43:7-15.
35. Huxtable RJ. Herbal teas and toxins: Novel aspects of pyrrolizidine poisoning in the United States. *Perspectiv Biol Med* 1980; 24:1-14.
36. Ortiz Cansado A, Crespo Valadés E, Morales Blanco P i wsp. Veno-occlusive liver disease due to intake of *Senecio vulgaris* tea. *Gastroenterol Hepatol* 1995; 18:413-6.
37. Roulet M, Laurini R, Rivier L i wsp. Hepatic veno-occlusive disease in newborn infant of a woman drinking herbal tea. *J Pediatr* 1988; 112:433-6.
38. Kumana, CR, Ng M, Lin HJ i wsp. Hepatic veno-occlusive disease due to toxic alkaloid in herbal tea – letter to the editor. *Lancet* 1983; 10(12):1360-1.
39. Sperl W, Stuppner H, Gassner I i wsp. Reversible hepatic veno-occlusive disease in an infant after consumption of pyrrolizidine-containing herbal tea. *Eur J Pediatr* 1995; 154:112-6.
40. Culvenor CC, Edgar JA, Smith LW i wsp. *Heliotropium lasiocarpum* Fisch and Mey identified as cause of veno-occlusive disease due to a herbal tea. *Lancet* 1986; 26:978.
41. Scientific Opinion on Pyrrolizidine alkaloids in food and feed EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (Contam). *EFSA J* 2011; 9(11):2406.
42. BfR – Bundesinstitut für Risikobewertung, Federal Institute for risk Assessment, 2007. Salad mix contaminated with groundsel containing pyrrolizidine alkaloids, BfR Opinion No 028/2007, Berlin 2007.
43. Kempf M, Heil S, Hasslauer I i wsp. Pyrrolizidine alkaloids in pollen and pollen products. *Molecul Nutrit Food Chem* 2010; 54:292-300.
44. Dübecke A, Beckh G, Lüllmann C. Pyrrolizidine alkaloids in honey and pollen. *Food Additiv Contamin* 2011; 28:348-58.
45. VWA (Voedsel en Waren Autoriteit) Voedsel en Waren Autoriteit, Bureau Risicobeoordeling. Advies Pyrrolizidine alkaloiden in honing. 2007; http://vwa.nl/txmpub/files/?p_file_id=22703.
46. Kempf M, Beuerle T, Bühringer M i wsp. Pyrrolizidine alkaloids in honey: risk analysis by gas chromatography-mass spectrometry. *Molecul Nutrit Food Res* 2008; 52:1193-200.
47. Kempf M, Wittig M, Schonfeld K i wsp. Pyrrolizidine alkaloids in food: downstream contamination in the food chain caused by honey and pollen. *Food Additiv Contamin. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*, 2011; 28:325-31.
48. Mulder PPJ, Beumer B, Oosterink E i wsp. Dutch survey pyrrolizidine alkaloids in animal forage. RIKILT report 2009; <http://edepot.wur.nl/135952>.
49. Hoogenboom LAP, Mulder PPJ, Zeilmaker MJ i wsp. Carry-over of pyrrolizidine alkaloids from feed to milk in dairy cows. *Food Addit Contamin Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment* 2011; 28:359-72.
50. Dickinson JO, Cooke MP, King RR i wsp. Milk transfer of pyrrolizidine alkaloids in cattle. *J Am Vet Med Assoc* 1976; 169:192-6.
51. Fletcher MT, McKenzie RA, Reichmann KG i wsp. Risks from plants containing pyrrolizidine alkaloids for livestock and meat quality in Northern Australia. [W:] Riet-Correa F, Pfister J, Schild AL, Wierenga T. (red.). *Poisoning by plants, mycotoxins and related toxins*. CABI, Wallingford 2011; 208-14.
52. Edgar JA, Smith LW. Transfer of pyrrolizidine alkaloids into eggs: Food safety implications. *Natural and Selected Synthetic Toxins*. ACS Symposium Series 2000; 745:118-28.
53. Eröksüz H, Eröksüz Y, Öser H i wsp. Toxicity of *Senecio vernalis* to laying hens and evaluation of residues in eggs. *Vet Human Toxicol* 2003; 45:76-80.
54. Eröksüz Y, Çeribaşı AO, Çevik A i wsp. Toxicity of *Heliotropium dolosum*, *Heliotropium circinatum* and *Senecio vernalis* in parental quail and their progeny, with residue evaluation of eggs. *Turkish J Vet Animal Sci* 2008; 32:475-82.
55. WHO (World Health Organisation). Drought causes re-emergence of liver disease. *Lancet* 2001; 358:1070.
56. Kakar F, Akbarian Z, Leslie T i wsp. An outbreak of hepatic veno-occlusive disease in Western Afghanistan associated with exposure to wheat flour contaminated with pyrrolizidine alkaloids. *J Toxicol* 2010; 2010:313280.
57. Krishnamachari KAVR, Bhat RV, Krishnamurthy D i wsp. Aetiopathogenesis of endemic ascites in Sarguja district of Madhya Pradesh. *Indian J Med Res* 1977; 65:672-8.
58. Mohabbat O, Srivastava RN, Younos MS i wsp. An outbreak of hepatic veno-occlusive disease in north-western Afghanistan. *Lancet* 1976; 308:269-71.
59. Stillman AE, Huxtable RJ, Consroe P i wsp. Hepatic veno-occlusive disease due to pyrrolizidine poisoning in Arizona. *Gastroenterol* 1977; 73:349-52.
60. Huxtable RJ. Herbal teas and toxins: novel aspects of pyrrolizidine poisoning in the United States. *Perspect Biol Med* 1980; 24:1-14.
61. Fox DW, Hart MC, Bergeson PS i wsp. Pyrrolizidine (*Senecio*) intoxication mimicking Reye syndrome. *J Pediatr* 1978; 93:980-2.
62. Ridker PM, Ohkuma S, Mc Dermott WV i wsp. Hepatic veno-occlusive disease associated with consumption of pyrrolizidine alkaloid containing dietary supplements. *Gastroenterol* 1985; 88:1050-4.
63. Sperl W, Stuppner H, Gassner I i wsp.: Reversible hepatic veno-occlusive disease in an infant after consumption of pyrrolizidine-containing herbal tea. *Eur J Pediatr* 1995; 154:112-6.
64. Risks for human health related to the presence of pyrrolizidine alkaloids in honey, tea, herbal infusions and food supplements. *EFSA J* 2017; 15(7):4908.

Konflikt interesów

Conflict of interest

Brak konfliktu interesów

None

otrzymano/received: 16.08.2018

zaakceptowano/accepted: 10.09.2018

Adres/address:

*dr inż. Małgorzata Kania-Dobrowolska

Zakład Farmakologii i Fitochemii

Instytut Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich

ul. Kolejowa 2, 62-064 Plewiska

tel.: +48 (61) 665-95-50

e-mail: malgorzata.kania@iwnirz.pl