

Fallbericht aus der Pathologie: Tod eines Norwegers

M. Brüggemann¹, Ute Niemann¹, H. Wiedenfeld², F. Geburek³ und D.F. Jünemann⁴

- Veterinärinstitut Oldenburg (LAVES-Niedersachsen), Philosophenweg 38, 26121 Oldenburg
- Helmut Wiedenfeld, Pharmazeutisches Institut der Universität Bonn, An der Immenburg 4, 53121 Bonn
- Klinik für Pferde, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Bischofsholer Damm 15, 30173 Hannover
- Tierärztliche Praxis D.F. Jünemann, Mühlenstraße 3-5, 49844 Bawinkel

Vorbericht

Ein 15 Jahre alter Norweger-Wallach wurde tot auf der Weide aufgefunden (Abb.1 und 13); das Tier soll lt. Aussage der Besitzerin vorher klinisch unauffällig gewesen sein. Da vor 2 Wochen bereits ein weiteres Pferd auf derselben Weide perakut verendet war, bestand der Verdacht auf das Vorliegen einer Intoxikation bzw. der Verdacht auf ein „Fremdverschulden“. Das Pferd wurde daher an den Fachbereich Pathologie des Veterinärinstitutes Oldenburg übersandt. Die Abbildungen 1 und 13 zeigen die Auffindungssituation auf der Weide.

Pathomorphologische und weiterführende labor diagnostische Befunde

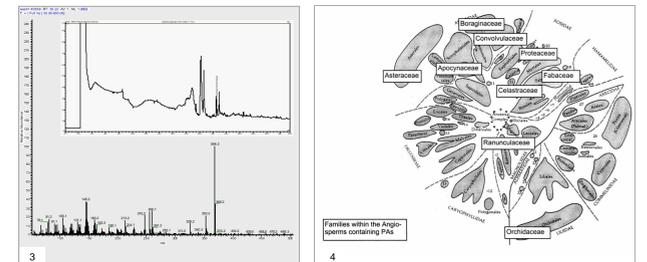
Bei der Sektion des gut genährten Tieres wurde als wesentlicher Hauptbefund eine derbe, ockerfarbene Leber (s. Abb.5) festgestellt, deren Schnittfläche das klassische Bild einer mikronodulären Zirrhose aufwies (Abb.6 und 7). Histologisch ist die mikronoduläre Zirrhose (Abb. 8-11) durch eine gering- bis mittelgradige interstitielle Kollagenfaservermehrung (Inset in Abb.7), zentrolobuläre Einzelzellnekrosen und Herdnekrosen mit granulöser Infiltration gekennzeichnet. Besonders eindrucksvoll und hinweisend auf das ursächliche Agens ist die ausgeprägte Megalozytose der Hepatozyten (Abb.8-11; unveränderte und teilweise atrophische Hepatozyten (-); extrem große Hepatozyten (+) = hepatozelluläre Megalozytose). Zusätzlich wurden ein geringgradiger Ikterus, eine geringgradige hämorrhagische Diathese, ein seröser Perikarderguß und eine uncharakteristische Peritonitis als Nebenbefunde festgestellt. Zur Abschätzung einer Leberfunktionsstörung wurde die postmortem gewonnene Augenkammerflüssigkeit der vorderen Augenkammer labor diagnostisch untersucht. Dabei ergaben sich folgende Werte (die Referenzwerte sind in Klammern dem jeweiligen Wert angefügt): GOT: 31U/l (20U/l); LDH: 58 IU/l (400 IU/l); γ -GT: 30 IU/l (20 IU/l); d.h. bis auf den erhöhten Wert der γ -GT läßt sich anhand der postmortalen Untersuchungen der Augenkammerflüssigkeit keine Leberfunktionsstörung ableiten.



Labor diagnostische Untersuchungen auf Pyrrolizidinalkaloide

Aufgrund der pathomorphologischen Befunde wurde eine tiefgefrorenen asservierte Lebergewebeprobe des Pferdes mittels Gaschromatographie (GC) und Gaschromatographie-Massenspektroskopie (GC-MS) am Pharmazeutischen Institut der Universität Bonn auf toxische Pyrrolizidinalkaloide untersucht. Das Lebergewebe (62,1 g) wurde zunächst homogenisiert, dann erfolgte eine 3-mig Ultra-Turrax-Extraktion mit Methanol; nach dem Abzentrifugieren wurde die Probe unter Vakuum zur Trockne eingedampft. Der Rückstand in 200 ml 2,5%iger HCl aufgenommen und 3x mit Methylchlorid extrahiert und die organische Phase unter vermindertem Druck zur Trockne eingedampft (= Extrakt 1). Die wässrige Phase wurde mit Zn-Staub versetzt und 60 Minuten gerührt, anschließend filtriert; das gewonnene Filtrat mit Kochsalz gesättigt und mit NH₄OH (25%) alkalisiert; daraufhin wurde mit MeCl₂ erschöpfend extrahiert; die MeCl₂-Phase im Vakuum zur Trockne eingedampft (= Extrakt 2). Das Extrakt 2 wurde in 2 ml MeCl₂ gelöst, das Extrakt 1 in 5 ml MeCl₂ gelöst, hiervon wurden jeweils 2 ml entnommen. Diese Menge (2 ml) der Extrakte wurde einer Festphasenextraktion an Diol-Phasen unterworfen; gewaschen mit MeCl₂ und eluiert mit einem 1:1-Gemisch MeOH/CH₂Cl₂. Waschlösungen und Eluate wurden im Vakuum eingedampft. Die Rückstände wurden jeweils in 1 ml MeCl₂ gelöst und entsprechend verdünnt (F = 12,5) der Gaschromatographie (GC) bzw. der Gaschromatographie-Massenspektroskopie (GS-MS) unterworfen. Die grafische Darstellung der Untersuchungsergebnisse können Sie der Abb. 3 entnehmen.

Die Quantifizierung (bezogen auf Senecionin) ergab eine Aerea SE von: 12,2804, dies entspricht einer Menge von 32 µg. Die Aerea des Dehydropyrrolizidinalkaloid-Peaks ergab eine Aerea von 3,065, dies entspricht 7,987 µg Dehydropyrrolizidine. Bezogen auf den Verdünnungsfaktor wurden in 62,1 g Leber somit 31,25 µg Dehydropyrrolizidine nachgewiesen, dies entspricht einer Konzentration von 0,5 µg/g Lebergewebe (nativ).



Ätiologie

Aufgrund des pathomorphologischen Bildes der mikronodulären Leberzirrhose und der labor diagnostischen Ergebnisse handelt es sich bei dem hier vorgestellten Fall um eine Folgeerscheinung einer chronischen, toxischen Hepatose, hervorgerufen durch eine Pyrrolizidinalkaloid-Intoxikation.

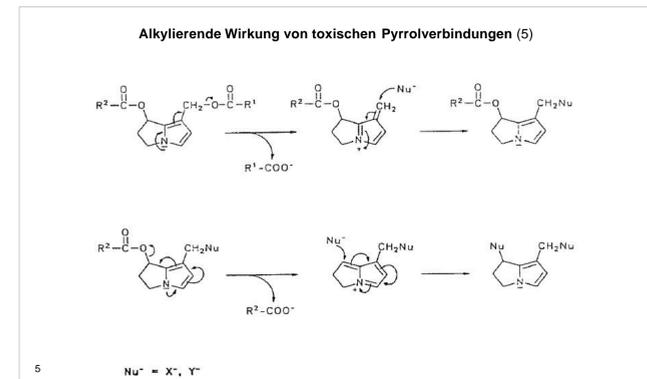
Der alleinige Nachweis einer mikronodulären Zirrhose ist jedoch noch nicht beweisend für das Vorliegen einer Pyrrolizidinalkaloid-Intoxikation. Die mikronoduläre Zirrhose ist Ausdruck einer toxischen Hepatose, die in der Regel auf der wiederholten Aufnahme von Phytotoxinen, Mykotoxinen oder Chemikalien beruht, die entweder zur Schädigung der Leberzellen oder des Gallengangsystems führen (1,4).

Am häufigsten werden jedoch chronische, toxische Hepatosen durch Pyrrolizidinalkaloide induziert, die weitverbreitet in Pflanzen ganz unterschiedlicher Gattungen bzw. Familien vorkommen (Compositae, Leguminosae, Boraginaceae und Asteraceae u.a., siehe Abb.4).

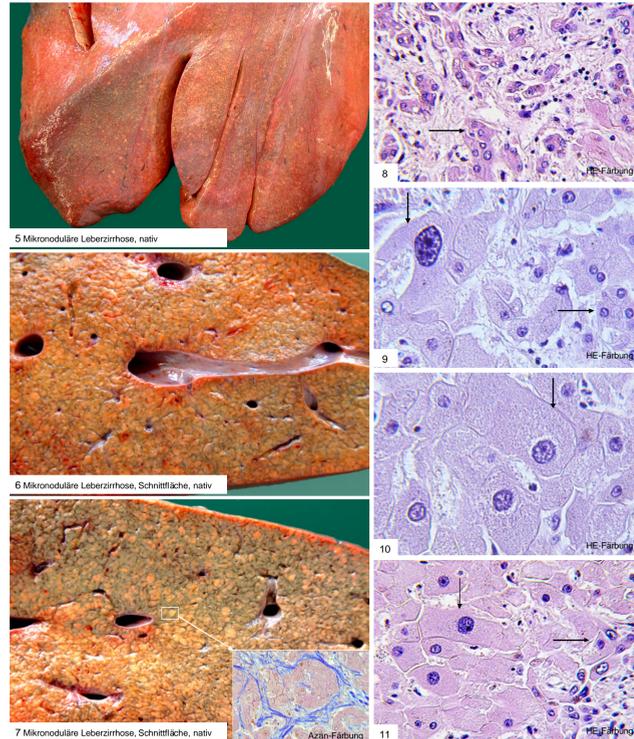
Einige differentialdiagnostisch wichtige und weitverbreitete pyrrolizidinalkaloidhaltige Pflanzen:

Jakobs-Kreuzkraut (<i>Senecio jacobaea</i>)	Gemeines Kreuzkraut (<i>Senecio vulgaris</i>)
Alpen-Kreuzkraut (<i>Senecio alpinus</i>)	Wasser-Kreuzkraut (<i>Senecio aquaticus</i>)
Raukenblättriges Kreuzkraut (<i>Senecio erucifolius</i>)	Sumpf-Greiskraut (<i>Senecio paludosus</i>)
Sonnenwende (<i>Heliotropium arborescens</i>)	Europäische Sonnenwende (<i>Heliotropium europaeum</i>)
Taumelholz (<i>Lolium temulentum</i>)	Gew. Hundszunge (<i>Cynoglossum officinale</i>)
Huflattich (<i>Tussilago farfara</i>)	Borretsch (<i>Borago officinalis</i>)
Gemeiner Natternkopf (<i>Echium vulgare</i>)	Gemeiner Beinwell (<i>Symphytum officinale</i>)

(Quelle: Giftpflanzen-Datenbank im Internet: <http://www.vetpharm.unizh.ch/index.htm>).



Literatur
1. Dahme, E. und Weiss, E.: Grundriss der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere. Enke Verlag, 1999, S. 214
2. Grahner und Dörzner: Ernährungsphysiologie und hepatoenzephalisches Syndrom bei Pferden nach Vergiftung mit Senecio alpinus. gekürzte Fassung aus: Pferdeheilkunde 6 (1990) 3 (Mai) 119-124 © <http://www.amstieraezter.de>
3. International programme of chemical safety environmental health criteria 80 - pyrrolizidine alkaloids - World Health Organization, Geneva 1988. ISBN 92 4 154209 2. (c) World Health Organization 1988
4. Jubb, K.V.F., Kennedy, P.C., Palmer, N.: Pathology of domestic animals. Academic Press, 1992, S. 392-395
5. Ober, O., Hartmann, T., Moll, S., Nuhayati, N., Anke, S., Reimann, A.: Evolution and localization of pyrrolizidine alkaloid biosynthesis. <http://www.biolgie.uni-erlangen.de/pharmol/AbstractShort.html>
6. Rasenack, R., Müller, C., Kierschmidt, M., Rasenack, J., Wiedenfeld, H.: Veno-occlusive disease in a fetus caused by pyrrolizidine alkaloids of food origin. *Fatal Diagn. Ther.* 2003; 16:223-225
7. Wiedenfeld, H., Röder, E.: Pyrrolizidinalkaloide - Struktur und Toxizität. *Deutsche Apotheker Zeitung* 1984; 124: (43), 2116-2122



Toxikologie

Chemisch stellt die Substanzklasse der Pyrrolizidinalkaloide (PA) Esteralkaloide dar. Sie kommen als Monoester, als offene Diester oder als cyclische Diester vor. Dabei wird das Grundgerüst, ein cyclisches Fünfringsystem über Stickstoff verknüpft, Necin genannt und die veresternde Säure Nicotinsäure. Bis heute sind circa 200 verschiedene Pyrrolizidinalkaloide bekannt (7).

Da Pyrrolizidinalkaloide leicht zu N-Oxiden reagieren können, ist in den Pflanzen meist ein Gemisch von N-Oxiden und freien Alkaloiden vorhanden. Pyrrolizidinalkaloide in Pflanzen wirken als Repellentien gegen Vögel, Insekten und Reptilien. Männliche Bärenspinner und Schneckenfalter verwenden Pyrrolizidinalkaloide als Vorstufen zur Synthese von Pheromonen; Raupenstadien von Schmetterlingen nehmen Pyrrolizidinalkaloide beim Fressen pyrrolizidinalkaloidhaltiger Pflanzen auf, akkumulieren diese und setzen sie gegen Fraßfeinde ein.

Bei parenteraler Applikation zeigen die N-Oxide eine geringere Toxizität, weil diese eine größere Wasserlöslichkeit als die reduzierte Alkaloidform besitzen und aus diesem Grund schneller renal ausgeschieden werden. Bei oraler Anwendung weisen die N-Oxide die gleiche Toxizität wie die freien Alkaloide auf. Während die oral aufgenommenen Pyrrolizidinalkaloide als solche direkt im Darm aufgenommen werden, müssen die N-Oxide zunächst durch Reduktasen der Bakterienflora des Darms reduziert werden, bevor sie in dieser Form resorbiert werden können. Im Blut findet dann eine Spaltung eines Teils der PA in die entsprechenden Necine und Nicotinsäuren mittels der dort vorhandenen unspezifischen Esterasen statt. Diese Metaboliten werden vermutlich ohne toxische Wirkung ausgeschieden. Untersuchungen bei Schafen haben zudem gezeigt, dass eine partielle Detoxifikation der Pyrrolizidinalkaloide in den Vormägen der Wiederkäuer erfolgt.

Für die kanzerogene Wirkung werden Metaboliten der PA verantwortlich gemacht, d.h. Pyrrolizidinalkaloide sind selbst nicht toxisch, werden aber durch mischfunktionelle Monooxygenasen der Hepatozyten in toxische Pyrrolverbindungen umgewandelt. Im ersten Metabolisierungsschritt werden N-Oxide gebildet oder in a-Stellung zum Stickstoff eine Hydroxylgruppe eingeführt. Im zweiten Schritt erfolgt dann der Umbau zu einem Pyrrolderivat und im letzten Schritt die Abspaltung der Säuren sowie die Bildung toxischer Verbindungen mit alkylierenden Eigenschaften (3,7). Diese toxischen Pyrrolverbindungen alkylieren Aminosäuren, Nikotinamid, Guanin- und Adenin-Derivate der DNA und RNA irreversibel (siehe Abb.5). Diese Quervernetzung der DNA und RNA erklärt die Hepato-, Geno-, Embryotoxizität und Kanzerogenität der Pyrrolizidinalkaloide. Zudem verursachen PA akute zentrolobuläre hepatozelluläre Nekrosen. Die weitaus häufigere Form der Schädigung durch PA ist jedoch das Auftreten chronisch progressiver Leberveränderungen. Die chronische Aufnahme führt aufgrund der alkylierenden Eigenschaften der PA zur histologisch beobachteten Megalozytose (Abb. 9-11; Vergrößerung der Leberzellen, des Zellkerns und der Nukleoli) und mikronodulären Leberzirrhose, diese ist nicht absolut spezifisch für Pyrrolizidinalkaloide, diese wird u.a. auch bei Intoxikationen mit Aflatoxinen oder Nitrosaminen beobachtet (1,4). Zudem werden renale Tubulusepitheldegenerationen und -nekrosen in der Niere sowie vaskuläre Alterationen in der Lunge mit interstitieller Fibrose und Epithelmetaplasien beschrieben (4). Im vorliegenden Fall konnten keine extrahepatischen Veränderungen festgestellt werden, die in einem kausalen Zusammenhang mit der PA-Intoxikation stehen. Der LD₅₀-Wert wird in der Giftpflanzen-Datenbank der Universität Zürich für das Pferd mit 0,05-0,20 kg getrocknete *Senecio jacobaea*/kg KG angegeben. Dies entspricht der Aufnahme von 25 - 100 kg getrockneter Pflanze / 500 kg schweres Pferd über einen Zeitraum von Tagen bis Monaten.

Spezies	LD ₅₀ -Wert
Pferd, Rind, Ratte	5-20% des Körpergewichts = 0,05-0,20 kg getrocknete <i>Senecio jacobaea</i> /kg KG
Ziege	125-400 % des Körpergewichts = 1,25-4,0 kg getrocknete <i>Senecio jacobaea</i> /kg KG (= total 29,8-71,5kg) über 152-388 Tage.
Schaf	> 2 kg <i>Senecio jacobaea</i> /kg KG
Huhn	50 g <i>Senecio jacobaea</i> /kg KG
Maus	1,5 kg <i>Senecio jacobaea</i> /kg KG
Ratte	0,5 kg <i>Senecio jacobaea</i> /kg KG

(Quelle: Internet: <http://www.vetpharm.unizh.ch/index.htm>).

Experten schätzen die tatsächliche Anzahl der Vergiftungsfälle weitaus höher ein, da die eindeutige Beziehung zwischen Pflanzenaufnahme und den erst sehr viel später auftretenden Krankheitsbildern schwer zu erkennen ist (7).

Klinik

Die akute Pyrrolizidinalkaloid-Intoxikation beim Pferd ist selten und verläuft in wenigen Tagen tödlich. Aufgrund der meist geringen Tagesaufnahmen pyrrolizidinalkaloidhaltiger Pflanzen führt die kumulative Wirkung der Pyrrolizidinalkaloide meist zu einem chronischen Verlauf der Erkrankung, d.h. im Verlauf von 3 Tagen bis 6 Monaten nach der Pflanzenaufnahme werden erste Symptome beobachtet, mit längerer stationären Phasen, das Terminalstadium verläuft dann meist innerhalb weniger Tage, kann sich aber auch über mehrere Wochen hinziehen.

Das chronische Krankheitsbild beim Pferd ist u.a. durch Konditions- und Gewichtsverlust, Anorexie, Kolik, Obstipation oder blutige Diarrhoe, Tenesmus, Rektumprolaps, Hämoglobinurie, häufiges Gähnen, Dyspnoe, Photosensibilität und Ikterus gekennzeichnet. Bei Pferden dominieren häufig zentralnervöse Störungen infolge eines hepatoenzephalischen Syndroms (Leber-Hirn-Krankheit; syn. „Schweinsberger Krankheit“; „walking disease“), die Tiere zeigen unkoordiniertes Vorwärtsdrängen, zielloses Wandern, Unruhe, Taumeln, Ataxie, Lecksucht, Blindheit, Kopfpresen, Depression, Konvulsionen bis zum hepatischen Koma. Infolge der Leberfunktionseinschränkung wird u.a. eine Hyperammonämie beobachtet, die u.a. ursächlich für die zentralnervöse Symptomatik des Tieres ist. Am empfindlichsten reagiert das Schwein, gefolgt von Rind und Pferd, relativ gering empfindlich sind Schafe (partielle Detoxifikation in den Vormägen wahrscheinlich).

Beim Menschen wurde das pyrrolizidinalkaloid-assoziierte Krankheitsbild (Vomitus, Erbrechen, Kolik, Diarrhoe, Aszites, Hepatomegalie, Ikterus) als sinusoidales Obstruktionsyndrom (früher veno-occlusive disease) zuerst bei Jamaikanern nach dem Genuß von pyrrolizidinalkaloidhaltigen „bush-tea“ beschrieben.

Die häufigste Ursache des sinusoidalen Obstruktionsyndroms ist heute jedoch eine intensive Chemotherapie in Kombination mit anderen Medikamenten im Rahmen von allogenen Knochenmarkstransplantationen. Hier treten Gefäßverschlüsse in Höhe der hepatischen Sinusoide auf, die sich bis in die Zentralvenen und die Lebervenen fortsetzen können (3,7).



Abb. 12: Artikel aus dem Deutschen Tierärzteblatt Oktober 2006
Jakobskreuzkraut - Giftpflanze auf dem Vormarsch -

Absicherung der Diagnose

Die Diagnose des Pathogen im Rahmen von Intoxikationen ist primär häufig eine Verdachtsdiagnose, d.h. ein morphologisches Korrelat liegt vor, hier eine mikronoduläre Zirrhose mit ausgeprägter hepatozellulärer Megalozytose, und das ätiologische Agens wird durch relativ aufwändige toxikologische Untersuchungen nachgewiesen.

In diesem Fall konnte durch die Weidebegehung mit fotografischer Dokumentation das Agens rasch identifiziert werden. Der rote Kreis markiert in der Abbildung 13 das toxische Jakobskreuzkraut, dessen Inhaltsstoffe auch durch die toxikologische Untersuchung nachgewiesen wurden.



Bekämpfung von Jakobskreuzkraut ?

(aus: Jakobs-Kreuzkraut, eine Giftpflanze auf dem Vormarsch von Andreas Lüscher und Willy Kessler, AGFF/FAL Reckenholz; Franz Sutter, LBL Lindau/Oktober 2002, © LBL und FAL/AGFF, 8315 Lindau/8046 Zürich)

Das Abblühen und Versamen von Jakobskreuzkraut muss unbedingt verhindert werden, auch ausserhalb der landwirtschaftlichen Flächen! Die vorhandenen Blütenstände auf Weiden und an Wegrändern schneiden und vernichten. Zur Vorbeugung gehören eine angepasste Weidepflege, das Fördern eines dichten Bestandes und das Vermeiden von Trittschäden. Direkte Bekämpfung erfolgt durch Ausreissen oder Ausstechen der Pflanzen. Eine Frühjahrswende mit Schafen kann das Kreuzkraut zurückdrängen. Eine Bekämpfung mit einem gräsererschonendem Herbizid ist nur als Einzelplantanenanwendung erlaubt. Die Behandlung ist am erfolgreichsten im Frühjahr. Wegen der Toxizität und dem Vermehrungspotential ist Kreuzkraut zu einem Hauptproblem der Viehhaltung in Grossbritannien, Neuseeland und einzelner Regionen Amerikas geworden. Das Landwirtschaftsministerium hat in England und der Schweiz Jakobs-Kreuzkraut zur „gefährlichen Pflanze“ erklärt. Somit ist jeder Landesbesitzer verpflichtet, Kreuzkraut zu bekämpfen um damit eine Ausbreitung auf landwirtschaftlich genutzten Flächen zu verhindern.

Durch intensivere Landnutzung sowie durch Rationalisierungs- und Ökologisierungsmassnahmen im Strassen- und Bahnunterhaltsdienst haben spätblühende Arten wie das Jakobskreuzkraut (Abb. 14) vermehrt die Möglichkeit ungehindert zu versamen und sich in landwirtschaftlich genutzten Flächen auszubreiten. Dies vorwiegend in Weiden.

