



Bundesministerium  
für Landwirtschaft, Ernährung  
und Heimat



---

Schlussbericht zum Thema

---

# Studien zum Transfer von Pyrrolizidinalkaloiden in Nutztieren

FKZ: 2818NA004, 2818NA005, 2818NA006, 2818NA007

Projektnehmer/Projektnehmerin:

Ludwig-Maximilians-Universität München,  
Max Rubner-Institut Bundesforschungsinstitut für Ernährung und  
Lebensmittel,  
Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR),  
Friedrich-Loeffler-Institut Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit

Gefördert durch das Bundesministerium für Landwirtschaft, Ernährung und Heimat auf Grund eines Beschlusses des deutschen Bundestages im Rahmen des Bundesprogramms Ökologischer Landbau.

Das Bundesprogramm Ökologischer Landbau (BÖL) hat sich zum Ziel gesetzt, die Rahmenbedingungen für die ökologische Landwirtschaft in Deutschland zu verbessern. Es wird vom Bundesministerium für Landwirtschaft, Ernährung und Heimat (BMLEH) finanziert und in der BÖL-Geschäftsstelle in der Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE) in die Praxis umgesetzt. Das Programm gliedert sich in zwei ineinandergreifende Aktionsfelder - das Forschungs- und das Informationsmanagement.

**Detaillierte Informationen und aktuelle Entwicklungen finden Sie unter:**

[www.bundesprogramm.de](http://www.bundesprogramm.de)  
[www.oekolandbau.de/forschung](http://www.oekolandbau.de/forschung)

**Wenn Sie weitere Fragen haben, wenden Sie sich bitte an:**

Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung  
Bundesprogramm Ökologischer Landbau  
Deichmanns Aue 29  
53179 Bonn  
Tel.: 0228-6845-3280  
E-Mail: [boel-forschung@ble.de](mailto:boel-forschung@ble.de)

<b>Titel des Vorhabens</b>	<b>Studien zum Transfer von Pyrrolizidinalkaloiden in Nutztieren</b> (Akronym: PA-SAFE-FEED)
<b>Arbeitspaket I:</b>  <b>Transferstudien mit Kühen, Schafen und Ziegen</b>	
<b>Förderkennzeichen</b>	<p>Gefördert durch</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p><b>BÖL</b> BUNDESPROGRAMM ÖKOLOGISCHER LANDBAU</p> </div> </div> <p>aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages</p> <p>2818NA004, 2818NA005, 2818NA006, 2818NA007</p>
<b>Laufzeit des Vorhabens</b>	2019/07-2024/03
<b>Ausführende Stellen</b>	<p><b>Ludwig-Maximilians-Universität München</b>  Lehrstuhl für Lebensmittelsicherheit und -analytik  Schönleutnerstr. 8, 85764 Oberschleißheim  (FKZ: 2818NA004)</p> <p><b>Max Rubner-Institut</b>  Bundesforschungsinstitut für Ernährung und  Lebensmittel</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Institut für Sicherheit und Qualität bei Milch und  Fisch, Hermann Weigmann-Str. 1, 24103 Kiel</li> <li>- Institut für Sicherheit und Qualität bei Fleisch,  E.-C.-Baumann-Str. 20, 95326 Kulmbach  (FKZ: 2818NA005)</li> </ul> <p><b>Friedrich-Loeffler-Institut</b>  Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit  Institut für Tierernährung,  Bundesallee 37, 38116 Braunschweig  (FKZ: 2818NA007)</p> <p><b>Bundesinstitut für Risikobewertung</b>  Abteilung Sicherheit in der Nahrungskette  Max-Dohrn-Str. 8-10, 10589 Berlin  (FKZ: 2818NA006)</p>

## Kurzzusammenfassung

### Studien zum Transfer von Pyrrolizidinalkaloiden in Nutztieren

(Akronym: PA-SAFE-FEED)

Arbeitspaket I:

#### Transferstudien mit Kühen, Schafen und Ziegen

Dr. Angelika Miriam Knispel Lisa Monika Klein	<b>Ludwig-Maximilians-Universität München</b> Lehrstuhl für Lebensmittelsicherheit und -analytik <a href="mailto:sekretariat@ls.vetmed.uni-muenchen.de">sekretariat@ls.vetmed.uni-muenchen.de</a>
Dr. Karin Knappstein Dr. Julika Lamp Dr. Wolfgang Jira Dr. Ilyya Fedotenko	<b>Max Rubner-Institut</b> Institut für Sicherheit und Qualität bei Milch und Fisch & Institut für Sicherheit und Qualität bei Fleisch <a href="mailto:karin.knappstein@mri.bund.de">karin.knappstein@mri.bund.de</a> <a href="mailto:julika.lamp@mri.bund.de">julika.lamp@mri.bund.de</a> <a href="mailto:wolfgang.jira@mri.bund.de">wolfgang.jira@mri.bund.de</a>
Prof. Dr. Sven Dänicke Dr. Janine Saltzmann Kirsten Knoop	<b>Friedrich-Loeffler-Institut</b> Institut für Tierernährung, Braunschweig <a href="mailto:Janine.Saltzmann@fli.de">Janine.Saltzmann@fli.de</a> <a href="mailto:Sven.Daenicke@fli.de">Sven.Daenicke@fli.de</a>
Dr. Anja These Julian Tänzer	<b>Bundesinstitut für Risikobewertung</b> Abteilung Sicherheit in der Nahrungskette <a href="mailto:anja.these@bfr.bund.de">anja.these@bfr.bund.de</a> <a href="mailto:julian.taenzer@bfr.bund.de">julian.taenzer@bfr.bund.de</a>

Im Rahmen des PA-SAFE-FEED-Projektes wurde eine 28-tägige Fütterungsstudie mit laktierenden Rindern, Schafen und Ziegen durchgeführt, bei der jeweils drei Dosisstufen eines Extraktes aus Jakobskreuzkraut (*Jacobaea vulgaris* Gaertn.) oral verabreicht wurden (einschließlich mindestens einer Kontrollgruppe). Die Tiere wurden hinsichtlich ihrer Leistungs- und Gesundheitsparameter untersucht, wobei leberassoziierte Parameter wie die Leberenzyme im Blut als toxikologische Endpunkte bei allen drei Tierarten identifiziert wurden. Darüber hinaus wurden die Gehalte an Pyrrolizidinalkaloiden (PA) und deren *N*-Oxiden (PANO) u.a. in Milch und Fleisch als Lebensmittel tierischen Ursprungs quantifiziert. Auf Grundlage dieser Daten wurden die Transferparameter sowohl für Gesamt-PA als auch für die einzelnen *Senecio*-PAs bestimmt. Es zeigte sich, dass ein geringer und selektiver Transfer in tierische Produkte stattfindet und dass die Höhe des Transfers maßgeblich von Jacolin, Jacobin, Jaconin und Senkirkin bestimmt wurde, da diese die höchste Transferrelevanz aufwiesen.

Ergänzend zur Fütterungsstudie wurden *in vitro* Untersuchungen zum Pansen- und Lebermetabolismus der *Senecio*-PAs durchgeführt, die insbesondere in Kombination mit Ergebnissen einer durchgeführten Kinetikstudie mit Reinsubstanzen (einmalige Gabe von Retrorsin bzw. dessen *N*-Oxid), eine Bilanzierung des Verbleibs der PAs und ihrer Metaboliten ermöglichen.

## Brief summary

### Studies on the transfer of pyrrolizidine alkaloids in livestock

(Acronym: PA-SAFE-FEED)

Work package I:

#### Transfer studies with cows, sheep and goats

Dr. Angelika Miriam Knispel Lisa Monika Klein	<b>Ludwig-Maximilians University Munich</b> Chair of Food Safety and Analytics <a href="mailto:sekretariat@ls.vetmed.uni-muenchen.de">sekretariat@ls.vetmed.uni-muenchen.de</a>
Dr. Karin Knappstein Dr. Julika Lamp Dr. Wolfgang Jira Dr. Illya Fedotenko	<b>Max Rubner-Institut</b> Department of Safety and Quality of Milk and Fish Products Department of Safety and Quality of Meat <a href="mailto:karin.knappstein@mri.bund.de">karin.knappstein@mri.bund.de</a> <a href="mailto:Julika.Lamp@mri.bund.de">Julika.Lamp@mri.bund.de</a> <a href="mailto:Wolfgang.Jira@mri.bund.de">Wolfgang.Jira@mri.bund.de</a>
Prof. Dr. Sven Dänicke Dr. Janine Saltzmann Kirsten Knoop	<b>Friedrich-Loeffler-Institut</b> Institute of Animal Nutrition <a href="mailto:Janine.Saltzmann@fli.de">Janine.Saltzmann@fli.de</a> <a href="mailto:Sven.Daenicke@fli.de">Sven.Daenicke@fli.de</a>
Dr. Anja These Julian Taenzer	<b>German Federal Institute for Risk Assessment</b> Department Safety in the Food Chain <a href="mailto:anja.these@bfr.bund.de">anja.these@bfr.bund.de</a> <a href="mailto:julian.taenzer@bfr.bund.de">julian.taenzer@bfr.bund.de</a>

As part of the PA-SAFE-FEED project, a 28-day feeding study was conducted with lactating cows, sheep, and goats, in which three dose levels each of an extract of common ragwort (*Jacobaea vulgaris* Gaertn.) were administered orally, including at least one control group. The animals were evaluated for performance and health parameters. Liver-associated parameters, including blood liver enzymes, were identified as toxicological endpoints in the three species. Additionally, the concentrations of pyrrolizidine alkaloids (PA) and their *N*-oxides (PANO) were quantified in milk and meat as products intended for human consumption. Based on these data, transfer parameters were established for both total-PA and individual *Senecio*-PAs. It was found that there is a low and selective transfer into animal products, with the content in milk and meat mainly consisting of jacoline, jaconine, jacobine and senkirkine.

In addition to the feeding study, *in vitro* studies on the ruminal and hepatic metabolism of *Senecio*-PAs were carried out. These studies, particularly in conjunction with results of a kinetic study performed with pure substances (single-dose administration of retrorsine or retrorsine-*N*-oxide, resp.), provide a better understanding of the fate of PAs and their metabolites.

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	iv
Tabellenverzeichnis .....	x
1. Einführung .....	1
1.1. Gegenstand des Vorhabens.....	2
1.2. Ziele und Aufgabenstellungen des Projektes: Bezug des Vorhabens zu einschlägigen Zielen des BÖL.....	2
1.3. Planung und Ablauf des Projektes.....	3
2. Wissenschaftlicher und technischer Stand an den angeknüpft wurde.....	3
3. Material und Methoden .....	8
3.1. Herstellung des PA/PANO Extraktes aus Jakobskreuzkraut zur Supplementierung .....	8
3.2. Charakterisierung des Extraktes.....	9
3.3. Dosis-Findungs-Studie .....	9
3.3.1. Tierversuch .....	9
3.3.2. Probenahme .....	10
3.3.3. Analytik.....	11
3.4. Transferstudien .....	12
3.4.1. Rinder .....	12
3.4.1.1. Tierversuch .....	12
3.4.1.2. Probenahme .....	14
3.4.1.3. Analytik .....	16
3.4.2. Schafe .....	17
3.4.2.1. Tierversuch .....	17
3.4.2.2. Probenahme .....	19
3.4.2.3. Analytik.....	19
3.4.3. Ziegen .....	20
3.4.3.1. Tierversuch .....	20
3.4.3.2. Probenahme .....	21
3.4.3.3. Analytik.....	22
3.5. Kinetikstudie.....	23
3.5.1. Rinder .....	23
3.5.1.1. Tierversuch .....	23
3.5.1.2. Probenahme .....	24
3.5.1.3. Analysen .....	24
3.5.2. Schafe und Ziegen .....	25
3.5.2.1. Tierversuch .....	25
3.5.2.2. Probenahme .....	26
3.6. Untersuchungen zum Metabolismus .....	27
3.6.1. Pansenmetabolismus .....	27
3.6.2. Hepatischer Metabolismus.....	27
4. Ergebnisse.....	28
4.1. Charakterisierung des Extraktes.....	28

4.2.	Dosis-Findungs-Studie .....	30
4.2.1.	Klinisches Monitoring .....	30
4.2.2.	Serologie .....	32
4.2.3.	Pathologie .....	35
4.2.4.	Zusammenfassung .....	35
4.3.	Transferstudien .....	36
4.3.1.	Tiergesundheitliche Aspekte .....	36
4.3.1.1.	Ergebnisse Rinder .....	36
4.3.1.2.	Ergebnisse Schafe .....	54
4.3.1.2.1.	Klinisches Monitoring .....	54
4.3.1.2.2.	Milchleistung .....	56
4.3.1.2.3.	Serologie .....	56
4.3.1.2.4.	Pathologie .....	61
4.3.1.2.5.	Rückstände - Blutplasma .....	63
4.3.1.3.	Ergebnisse Ziegen .....	65
4.3.1.3.1.	Klinisches Monitoring .....	65
4.3.1.3.2.	Milchleistung .....	66
4.3.1.3.3.	Serologie .....	67
4.3.1.3.4.	Pathologie .....	72
4.3.1.3.1.	Rückstände - Blutplasma .....	74
4.3.2.	Transfer in die Milch .....	76
4.3.2.1.	Ergebnisse Rinder .....	76
4.3.2.2.	Ergebnisse Schafe .....	80
4.3.2.3.	Ergebnisse Ziegen .....	83
4.3.3.	Transfer in das Muskelfleisch (und Lebergewebe) .....	85
4.3.3.1.	Ergebnisse Rinder .....	86
4.3.3.2.	Ergebnisse Schafe .....	86
4.3.3.3.	Ergebnisse Ziegen .....	87
4.4.	Kinetikstudie .....	88
4.4.1.	Ergebnisse Rinder .....	88
4.4.1.1.	Leistungsparameter .....	88
4.4.1.2.	Klinisch-chemische Parameter .....	89
4.4.1.3.	Bestimmung der PA/PA-Konzentration sowie der Pansenmetabolite .....	95
4.4.2.	Ergebnisse Schafe und Ziegen .....	101
4.4.2.1.	Schafe und Ziegen: Klinisch chemische Parameter .....	101
4.4.2.1.	Bestimmung der PA/PANO-Konzentration sowie der Pansenmetabolite .....	103
4.5.	Ergebnisse zum Metabolismus .....	107
4.5.1.	Pansenmetabolismus .....	107
4.5.2.	Hepatischer Metabolismus .....	111
4.6.	Berechnung der verabreichten PA-Dosis in PA-Gehalte im Futter sowie in eine Anzahl an individuellen Jakobskreuzkraut-Pflanzen .....	114
4.6.1.	Umrechnung der verabreichten PA Dosis in eine PA Konzentration im Futter .....	114

4.6.2.	Umrechnung der verabreichten PA/PANO-Dosis in eine Anzahl an individuellen Jakobskreuzkrautpflanzen.....	115
4.6.3.	Umrechnung der verabreichten PA/PANO Dosis in eine Anzahl an individuellen Frühlingskreuzkrautpflanzen.....	118
5.	Diskussion.....	119
5.1.	Charakterisierung des eingesetzten Extrakts .....	119
5.2.	Tiergesundheitliche Aspekte .....	121
5.3.	Transfer in die tierischen Produkte .....	132
5.3.1.	Transfer in die Milch.....	132
5.3.2.	Transfer in das Fleisch .....	139
6.	Nutzen und zur Verwertbarkeit der Ergebnisse .....	142
7.	Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich Ziele .....	143
8.	Zusammenfassung.....	144
9.	Anhang.....	145
9.1.	LC-MS/MS Analytik.....	145
9.1.1.	Referenzstandards und Chemikalien.....	146
9.1.2.	Analyse zur Bestimmung der PA Gehalte im applizierten Extrakt .....	147
9.1.3.	Analyse zur Bestimmung der PA -Gehalte im Futter und in der Melasse .....	147
9.1.4.	Analyse zur Bestimmung der PA -Gehalte in den Milchproben .....	148
9.1.5.	Analyse zur Bestimmung der PA-Gehalte in den Muskel- und Leberproben.....	149
9.1.6.	Analyse zur Bestimmung der PA -Konzentrationen in den Plasmaproben .....	150
9.1.7.	Analyse zur Bestimmung der PA -Konzentrationen im Pansensaft, Darminhalt und Galle 150	
9.1.8.	Analyse zur Bestimmung der PA und PANO-Konzentrationen im Urin.....	151
9.1.9.	Analyse zur Bestimmung der PA-Gehalte im Kot .....	152
9.2.	Kohlenhydratanalyse in PA-Extrakt und Melasse.....	152
9.3.	Bestimmung des Methanol-, Stickstoff- und Wassergehalts in PA-Extrakt und Melasse ...	152
9.4.	Weender-Analyse .....	153
9.5.	Bestimmung der Milchinhaltsstoffe .....	153
9.6.	Hämatologie .....	153
9.7.	Klinisch-chemische Analyse (Serologie) .....	154
9.8.	Durchflusszytometrische Untersuchungen des Blutes von Rindern .....	154
9.9.	Bestimmung von inflammatorischen Markern im Blut von Rindern .....	155
9.10.	Untersuchung des Pansenmetaboloms von Rindern .....	155
9.11.	Bestimmung von Purinen im Harn .....	156
9.12.	Bestimmung des Leberfettgehaltes bei Rindern .....	156
9.13.	Lebertranskriptom von Rindern .....	156
9.14.	Pansensaftanalysen bei Rindern .....	156
9.15.	Histopathologie der Organe und Morphometrie der Hepatozytenkerne.....	157
10.	Literaturverzeichnis.....	158

Abkürzungsverzeichnis

AAT	Abdominale Fettgewebe
ADF	Acid Detergend Fibre
AST	Aspartat-Aminotransferase
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BHB	Beta-Hydroxybutyrat
BTF	Biotransferfaktor
EB	Energiebilanz
ECM	Energiekorrigierte Milchleistung
FFS	Freie Fettsäuren
FIS	Indikator für Inzucht
FLI	Friedrich-Löffler-Institut
FM	Frischmasse
GGT	Gamma Glutamyltransferase
GLDH	Glutamatdehydrogenase
HCT	Hämatokrit
HGB	Hämoglobinkonzentration
JKK	Jacobaea vulgaris Gartn.
KG	Körpergewicht
LAVES	Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
LD	Linkage Disequilibrium
LMW	Kohlenhydrate mit niedrigem Molekulargewicht
MAF	Mindestallelfrequenz
MAT	Mesenteriale Fettgewebe
MCH	Mittleres korpuskulares Hämoglobin
MCHC	Mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration
MCV	Mittleres korpuskulares Volumen
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MPV	Mittleres Thrombozytenvolumen
MRI	Max-Rubner-Institut
NDF	Neutral Detergend Fibre

## PA-SAFE-FEED Abschlussbericht

NEFA	Freie Fettsäuren
NSP	Nicht-Stärke-Polysaccharide
OAT	Omentale Fettgewebe
PA	Pyrrrolizidinalkaloide: Freie Basen
PA/PANO	Pyrrrolizidinalkaloide generell oder als Summe von PA und PANO
PANO	N-Oxide der Pyrrrolizidinalkaloide
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Bluts
PCT	Thrombozytenkrit
PDW	Thrombozytenverteilungsbreite
PLT	Thrombozytenzahl
PMN	Polymorphkernige neutrophile Granulozyten
RAT	Retroperitoneale Fettgewebe
RBC	Erythrozytenzahl
RDW	Erythrozytenverteilungsbreite
SCC	Somatische Zellzahl
SD	Standardabweichung
SNV	Single nucleotid variant
TF	Transferfaktor
TM	Trockenmasse
TMR	Totale Mischration
TR	Transferrate
TS	Trokensubstanz
WBC	Weißes Blutbild

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturen, die typischerweise von Senecio-Arten gebildet werden. I .....	5
Abbildung 2: Probenahmeschema des Rinderhauptversuches .....	14
Abbildung 3: Probenahmeschema des Schafhauptversuches. ....	19
Abbildung 4: Probenahmeschema des Ziegenhauptversuches .....	22
Abbildung 5: Darstellung des Ablaufes einer Sammelperiode des Kinetikversuches bei Milchkühen .	24
Abbildung 6: Dosis-Findungs-Studie an Milchziegen und Milchschaafen–Milchleistung in kg pro Tag .	31
Abbildung 7: Aktivitäten des Enzyms AST im Serum der Versuchstiere. ....	32
Abbildung 8: Aktivitäten des Enzyms GGT im Serum der Versuchstiere. ....	33
Abbildung 9: Aktivitäten des Enzyms GLDH im Serum der Versuchstiere .....	33
Abbildung 10: Verlauf der Bilirubinkonzentration im Serum der Versuchstiere. ....	33
Abbildung 11: Verlauf der Konzentration freier Fettsäuren (FFS) im Serum der Versuchstiere.....	34
Abbildung 12: Zeitlicher Verlauf, der Trockenmasse-Aufnahme, des Körpergewichts, der Energiebilanz und der energiekorrigierten Milchleistung bei Milchkühen .....	37
Abbildung 13: Daten zum zeitlichen Verlauf der Konzentration der Zellen des weißen Blutbildes, zugehörig Lymphozyten und Granulozyten, sowie die Hämoglobinkonzentration, rotes Blutbild im Differentialblutbild der Versuchsgruppen.....	38
Abbildung 14 Vorläufige Daten zum zeitlichen Verlauf des durch TPA induzierten oxidativen Ausbruchs der polymorphkernigen Neutrophilen und der mononukleären Zellen des peripheren Blutes.....	39
Abbildung 15: Zeitlicher Verlauf der ALT, GGT, AST, GLDH im Blutserum von Milchkühen. ....	41
Abbildung 16: Daten zur PA/PANO-Zusammensetzung im Blut. ....	43
Abbildung 17 Zusammensetzung des abdominalen Fettgewebes mit retroperitonealem AT, omentalem AT und mesenterialem AT vor Beginn und am Ende des Versuchs.....	45
Abbildung 18: Hepatozytenkernfläche und Gesamtleberlipidkonzentration im Verlauf des Experiments, wobei Tag 0 den Wert vor Beginn der PA-Exposition angibt. ....	47
Abbildung 19: Leberhistopathologie-Scores für die verschiedenen PA-Expositionsgruppen.....	48
Abbildung 20: Vorläufige Mittelwerte der beobachteten Shannon Entropie.....	49
Abbildung 21: Hauptkoordinatenanalyse der Bray-Curtis Distanz zur Darstellung struktureller Unterschiede des Pansenmikrobioms unter Einfluss von PA und deren Abbauprodukten.....	51
Abbildung 22 Daten zum zeitlichen Verlauf der Konzentration von Essigsäure, Propionsäure, Ammoniak sowie der Laktat-Konzentration im Pansensaft .....	52
Abbildung 24: Transferversuch an Milchschaafen – Milchleistung in kg pro Tag.....	56
Abbildung 25 Konzentration des Enzyms AST im Serum der Versuchstiere .....	57
Abbildung 26: Konzentration des Enzyms GGT im Serum der Versuchstiere. ....	57

Abbildung 27: Konzentration des Enzyms GLDH im Serum der Versuchstiere .....	58
Abbildung 28: Konzentration des Bilirubins im Serum der Versuchstiere. ....	58
Abbildung 29: Zeitlicher Verlauf der ALT, GGT, AST, GLDH im Blutserum der Schafe .....	60
Abbildung 30: Darstellung der PA Konzentrationen im Plasma an Tag 1 der Applikation.....	64
Abbildung 31: Abgeleiteter Zeitpunkte der maximalen Plasmakonzentration der PA/PANO .....	65
Abbildung 32: Transferversuch an Milchziegen – Milchleistung in kg pro Tag.....	66
Abbildung 33: Konzentration des Enzyms AST im Serum der Kontroll- und Versuchstiere.....	67
Abbildung 34: Konzentration des Enzyms GGT im Serum der Kontroll- und Versuchstiere.....	68
Abbildung 35: Konzentration des Enzyms GLDH im Serum der Kontroll- und Versuchstiere.....	69
Abbildung 36: Konzentration des Bilirubins im Serum der Kontroll- und Versuchstiere.....	70
Abbildung 37: Zeitlicher Verlauf der ALT, GGT, AST, GLDH im Blutserum der Ziegen in Abhängigkeit von den Pyrrolizidinalkaloid (PA)/N-Oxid (NO)-Expositionsgruppen. ....	71
Abbildung 38: Darstellung der PA/PANO Konzentrationen im Plasma an Tag 1 der Applikation.....	74
Abbildung 39: Daten zur PA/PANO-Zusammensetzung im PA/PANO-Extrakt und in der Milch .....	77
Abbildung 40: Vergleich der PA/PANO Konzentrationen im Morgen- und Abendgemelk der drei Dosisgruppen über den gesamten Versuchsverlauf. ....	78
Abbildung 41: Vergleich der PA-Profile in der Kuhmilch.....	78
Abbildung 42: PA/PANO-Gehalte in % - Vergleich zwischen Extrakt und Milch bei Milchschafen.....	80
Abbildung 43: PA/PANO-Gehalte in Milch der Schafe als gewichtete Tagesmittelwerte.....	81
Abbildung 44: Unterschiede der PA/PANO-Summengehalte in Milch zwischen den Melkzeiten.....	82
Abbildung 45: PA/PANO-Gehalte in % - Vergleich zwischen Extrakt und Milch bei Milchziegen.....	83
Abbildung 46: PA/PANO-Gehalte in Milch der Ziegen .....	84
Abbildung 47: PA-Gehalte im Muskel der Rinder pro applizierter PA-Dosis.....	86
Abbildung 48: PA-Gehalte in drei untersuchten Muskelpartien der Schafe.....	87
Abbildung 49: PA-Gehalte in drei untersuchten Muskelpartien der Ziegen.....	87
Abbildung 50: Daten zum zeitlichen Verlauf der Futteraufnahme, sowie der Milchleistung.....	88
Abbildung 51: Daten zum zeitlichen Verlauf der Konzentration der klinisch chemischen Parameter: Glukose, Cholesterin, Albumin, und Harnstoff während des Versuches .....	90
Abbildung 52: Daten zum zeitlichen Verlauf von ALP, ALT, AST und GLDH. ....	91
Abbildung 53: Daten zum zeitlichen Verlauf der Konzentration des im Harn enthaltenen Allantoin und Kreatinin während des Versuches.....	92
Abbildung 54: Daten zum zeitlichen Verlauf der Konzentration der flüchtigen Fettsäuren im Pansensaft: Essigsäure, Propionsäure, Isobuttersäure, Buttersäure, Isovaleriansäure, Valeriansäure. ....	94

Abbildung 55: Daten zum zeitlichen Verlauf der Ammoniakkonzentration, sowie der Laktatkonzentration im Pansensaft.....	95
Abbildung 56: Vorläufige Daten zum zeitlichen Verlauf der Konzentration von Retrorsin (Re) und Retrorsin-N-Oxid (ReNO) im Plasma bei A: oraler Applikation von Retrorsin, B: oraler Applikation von Retrorsin-N-Oxid, C: intravenöser Applikation von Retrorsin und D: intravenöser Applikation von Retrorsin-N-Oxid. Dargestellt sind Mittelwerte der vier Versuchstiere.....	96
Abbildung 57: Daten zum zeitlichen Verlauf der Konzentration von Retrorsin (Re), Retrorsin-N-Oxid (ReNO) und der Pansenmetabolite Re+2H und Re+4H in der Pansenflüssigkeit bei A: oraler Applikation von Retrorsin, B: oraler Applikation von Retrorsin-N-Oxid, C: intravenöser Applikation von Retrorsin und D: intravenöser Applikation von Retrorsin-N-Oxid. ....	98
Abbildung 58: Daten zum zeitlichen Verlauf der Konzentration von Retrorsin (Re), Retrorsin-N-Oxid (ReNO) und der Pansenmetabolite Re+2H und Re+4H in der Darmflüssigkeit bei A: oraler Applikation von Retrorsin, B: oraler Applikation von Retrorsin-N-Oxid, C: intravenöser Applikation von Retrorsin und D: intravenöser Applikation von Retrorsin-N-Oxid. ....	99
Abbildung 59: Daten zum zeitlichen Verlauf der Konzentration von Retrorsin (Re) und Retrorsin-N-Oxid (ReNO) in der Milch bei A: oraler Applikation von Retrorsin, B: oraler Applikation von Retrorsin-N-Oxid, C: intravenöser Applikation von Retrorsin und D: intravenöser Applikation von Retrorsin- N-Oxid. Dargestellt sind Mittelwerte der vier Versuchstiere.....	101
Abbildung 60: Verlauf des Leberenzym AST bei den Ziegen und Schafen im Zeitraum von 24 Stunden vor bis 72 Stunden nach der Supplementierung.....	102
Abbildung 61: Verlauf des Leberenzym GGT bei den Ziegen und Schafen im Zeitraum von 24 Stunden vor bis 72 Stunden nach der Supplementierung.....	102
Abbildung 62: Verlauf des Leberenzym GLDH bei den Ziegen und Schafen im Zeitraum von 24 Stunden vor bis 72 Stunden nach der Supplementierung.....	103
Abbildung 63: Vorläufige Daten zum zeitlichen Verlauf der Konzentration von Retrorsin (Re) und Retrorsin-N-Oxid (ReNO) im Plasma der Schafe bei oraler Applikation von: Re und Re-N-Oxid.....	104
Abbildung 64: Vorläufige Daten zum zeitlichen Verlauf der Konzentration von Retrorsin (Re) und Retrorsin-N-Oxid (ReNO) und der Pansenmetabolite Re+2H und Re+4H in der Pansenflüssigkeit der Schafe bei oraler Applikation von: Retrorsin (links) und Retrorsin-N-Oxid (rechts).. ....	104
Abbildung 65: Vorläufige Daten zum zeitlichen Verlauf der Konzentration von Retrorsin (Re) und Retrorsin-N-Oxid (ReNO) in der Milch von Schafen bei oraler Applikation von: Retrorsin (links) und Retrorsin-N-Oxid (rechts). ....	105

Abbildung 66: Vorläufige Daten zum zeitlichen Verlauf der Konzentration von Retrorsin (Re) und Retrorsin-N-Oxid (ReNO) im Plasma der Ziegen bei oraler Applikation von: Retrorsin (links) und Retrorsin-N-Oxid (rechts)..	106
Abbildung 67: Vorläufige Daten zum zeitlichen Verlauf der Konzentration von Retrorsin (Re) und Retrorsin-N-Oxid (ReNO) und der Pansenmetabolite Re+2H und Re+4H in der Pansenflüssigkeit der Ziegen bei oraler Applikation von: Retrorsin (links) und Retrorsin-N-Oxid (rechts).	106
Abbildung 68: Vorläufige Daten zum zeitlichen Verlauf der Konzentration von Retrorsin (Re) und Retrorsin-N-Oxid (ReNO) in der Milch von Ziegen bei oraler Applikation von: Retrorsin (links) und Retrorsin-N-Oxid (rechts)..	107
Abbildung 69: Inkubation <i>Senecio</i> PANO-Standards mit Panseninokulum von fistulierten Kühen. ...	107
Abbildung 70: Überblick über die strukturellen Veränderungen der Pyrrolizidinalkaloide während des Pansenstoffwechsels am Beispiel von Erucifolin-N-Oxid (ErNO).	108
Abbildung 71: Halbwertszeiten [h] der <i>Senecio</i> PAs abgeleitet aus Inkubationsversuchen.....	109
Abbildung 72: Nachgewiesene PAs und ihre Pansenmetaboliten (rM) in Pansenflüssigkeit von Kühen (links), Ziegen (Mitte) und Schafen (rechts) innerhalb der drei Dosisgruppen.....	110
Abbildung 73: Prozentuale Darstellung des PA-Profiles (PA total= freie Base + korrespondierendes N-Oxid) im applizierten Extrakt im Vergleich zur Pansenflüssigkeit .....	111
Abbildung 74: Darstellung des prozentualen Abbaus der <i>Senecio</i> PAs mit Lebermikrosomen .....	112
Abbildung 75: Darstellung der identifizierten hepatischen Metaboliten von <i>Seneciphyllin</i> . .....	113
Abbildung 76: Darstellung des mittleren Gesamt-PA/PANO Gehalts in <i>Jakobskeutzkraut</i> pflanzen ..	116
Abbildung 77: Gesamt PA/PANO-Gehalt in <i>Jacobaea vulgaris</i> aus verfügbaren Literaturdaten.....	116
Abbildung 78: Schätzung der wahrscheinlichsten Anzahl an einzelnen PA Pflanzen, in Abhängigkeit vom Monat, die ein Rind verzehren müsste, um die applizierten PA-Dosen zu erreichen..	118
Abbildung 79: Schätzung der wahrscheinlichsten Anzahl an einzelnen PA Pflanzen pro Tierart .....	118
Abbildung 80: Vergleichende Darstellung des zeitlichen Verlaufs der GGT, GLDH im Blutserum der Kontroll- und Expositionsgruppen drei getesteten Spezies. ....	123
Abbildung 81: Vergleichende Darstellung der PA-Profile im Plasma und in der Milch der Tiere .....	134
Abbildung 82: Zeitlicher Verlauf der PA Konzentration in der Milch der Wiederkäuer nach einmaliger oraler PA- Exposition (Kinetikstudie). Rot: Rind, Grün: Ziege, Blau: Schaf.....	138
Abbildung 83: Mittlere PA-Gehalte [ng/g Frischgewicht] in a) Leber- und b) Muskelgewebe von Milchkühen, Ziegen und Schafen je Dosis- und Kontrollgruppe. ....	139
Abbildung 84: Ermittelte Gesamt-PA-Gehalte [ng/g] in Leber und Muskel bei Milchkühen, Ziegen und Schafen in Abhängigkeit von der Zeitdifferenz zwischen letzter Verabreichung und Tötung.....	140

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammenfassung der veröffentlichten Transferraten für Senecio PAs in die Kuhmilch.....	6
Tabelle 2: Dosis-Findungsversuch - Daten der Versuchstiere.....	10
Tabelle 3: Zusammensetzung des verabreichten Extraktes und die daraus resultierende totale PA/PANO Exposition der einzelnen Gruppen des Rinderhauptversuches.....	13
Tabelle 4: Transferversuch an Milchschaafen - Daten der Versuchstiere.....	18
Tabelle 5: Transferversuch an Milchziegen - Daten der Versuchstiere.....	21
Tabelle 6: Kinetikversuch an Milchziegen und Milchschaafen - Daten der Versuchstiere .....	25
Tabelle 7: Charakterisierung des JKK Ausgangsmaterials und der daraus gewonnen Extraktchargen.	29
Tabelle 8: Zusammenfassung der wesentlichen Befunde nach Supplementierung pro Dosisgruppe..	36
Tabelle 9: Hauptversuch an Milchschaafen - parasitäre Schädigung an Leber und Lunge.....	62
Tabelle 10: Sektionsbefunde Ziegen .....	73
Tabelle 11: Daten zur mittleren Transferrate [%] der einzelnen PA und PANO in die Kuhmilch.....	79
Tabelle 12: Transferraten [%] der einzelnen PAs in die Milch der Schafe .....	82
Tabelle 13: Transferraten [%] der einzelnen PAs in die Milch der Ziegen .....	85
Tabelle 14: Zusammenstellung der Dosisgruppen, der mittleren Körpergewichte pro Tierart und der daraus resultierenden absolut applizierten PA Menge.....	115
Tabelle 15: Untersuchung von <i>Senecio vernalis</i> Pflanzen auf das Frischmassegewicht inklusive Spannweite, die relative Trockenmasse (TM), sowie deren Gesamt-PA/PANO Gehalt.....	119
Tabelle 16: PA-Gehalte der in Kreuzkrautarten typischerweise enthaltenen PAs.....	121
Tabelle 17: Vergleich der histologischen, serologischen, pathologischen und klinischen Befunde bei Schafen und Ziegen .....	132
Tabelle 18: PA/PANO Zusammenstzung in Prozent der Milch der untersuchten Wiederkäuer.....	133
Tabelle 19: Ermittelte Transferraten [%] der PAs in Kuh-, Ziegen- und Schafsmilch .....	135
Tabelle 20: Darstellung der in der Literatur veröffentlichten Transferraten sowie der im vorliegenden Projekt erzielten Transferraten für die in den Senecio Arten vorkommenden PAs.....	136
Tabelle 21: Abschätzung der erwartbaren PA-Konzentration [ $\mu\text{g/L}$ ] in der Milch auf Basis der im PA-SAFE-FEED Projekt bestimmten Transferraten für Rinder. Die Abschätzung erfolgte unter der Annahme, dass die Kuh 1 kg der jeweiligen <i>Senecio</i> Art-mit den angegebenen PA-Gehalten frisst (Tabelle 16 ) und am Tag durchschnittlich 33 L Milch gibt.....	137
Tabelle 22: Ermittelte Transferparameter wie die Transferrate (TR), der Transferfaktor (TF) und der Biotransferfaktor (BTF) für Leber und Muskel von Kuh, Ziege und Schaf.....	141
Tabelle 23: Analytspektrum des PA-SAFE-FEED Projektes. ....	145
Tabelle 24: Identifizierte Pansenmetaboliten der Senecio PANO/PAs .....	151

## 1. Einführung

Grünland spielt eine wichtige Rolle bei der Sicherung der Futtermittellieferung für Weide- und Nutztiere. Im Hinblick auf den Erhalt der Artenvielfalt und der Biodiversität ist insbesondere artenreiches Grünland Wunsch und Ziel. Eine vielfältige Flora enthält aber auch immer Pflanzen, die potenziell giftig sind, wie z.B. Pflanzen, die Pyrrolizidinalkaloide (PA) und deren N-Oxide (PANO) bilden. PA/PANO-bildende Pflanzen gehören vornehmlich den Familien der Korbblütler (Asteraceae) und der Rauhbblatt- oder Borretschgewächse (Boraginaceae) an, wobei in Bezug auf Weideland insbesondere das Vorkommen der Greiskrautarten (*Senecio*) aus der Familie der Korbblütler von Relevanz ist. Der ökologische Wert der Kreuzkräuter wird u.a. darin gesehen, dass sie als Blühpflanzen Pollen und Nektar für blütensuchende Insekten liefern (Hicks et al. 2016), aber es wird auch ihre ökologische Bedeutung als „Erstbesiedler“ diskutiert. Während in Norddeutschland das Wachstum von Jakobskreuzkraut (*Jacobaea vulgaris* Gaertn., syn. *Senecio jacobaea* L.) ein typisches Problem darstellt, wird z.B. in Süddeutschland das Wachstum von Wasserkreuzkraut (*J. aquatica* Gaertn, syn. *S. aquaticus* L.) mit Sorge betrachtet. PA/PANO sind in Lebens- und Futtermitteln unerwünscht, da sie im Verdacht stehen, bei Menschen und Tieren eine genotoxisch-karzinogene Wirkung hervorzurufen. Als primäre Ursache wird hierbei die Bildung von reaktiven Pyrrol-Metaboliten während des Leberstoffwechsels angesehen, die schnell mit funktionellen Gruppen von Proteinen und DNA reagieren können. Kovalente Modifikationen an Biomolekülen können zur Schädigung der Zelle führen. In Folge dessen kann die Zelle absterben oder es können Fehler am genetischen Material entstehen, was in der Konsequenz zu Venenverschlüssen, Lebernekrosen, DNA-Mutationen und möglicher Tumorbildung führt. Somit können diese Pflanzen nicht nur die Tiergesundheit beeinträchtigen, sondern stellen auch ein Risiko für die Verbraucher dar, wenn PAs in Lebensmittel tierischen Ursprungs gelangen. In Bezug auf die Empfindlichkeit gegenüber der Toxizität der PAs ist bekannt, dass Monogastrier empfindlicher sind als Wiederkäuer, aber bei Wiederkäuern auch Abstufungen beobachtet werden und Schafe als vergleichsweise resistent beschrieben wurden. Es wurde diskutiert, dass Rinder auf Weiden mit ausreichender anderer Vegetation das Kreuzkraut effektiv meiden (Craig et al. 1930; Aboling 2023; Vockrodt 1973), während Schafe freiwillig große Mengen an Jakobskreuzkraut aufnehmen können (Ohlsen et al. 2022). Anders verhält es sich bei Heu oder Silage, das mit Kreuzkraut verunreinigt ist. Dieses wird auch nicht von den Tieren abgelehnt, die frisches Kreuzkraut meiden.

Vor diesem Hintergrund stellt das Vorkommen von Kreuzkräutern auf Grünland einen Konflikt dar, von dem insbesondere die extensive und/oder die ökologische Landwirtschaft betroffen ist, da es hier Beschränkungen bei der Unkrautbekämpfung und Düngung sowie Restriktionen bei der Mahd gibt.

Somit ist für die verantwortlichen Behörden in Deutschland und der Europäischen Union die Ableitung geeigneter Empfehlungen und Risikomanagementmaßnahmen herausfordernd und sollte auf Basis einer validen Datengrundlage erfolgen.

### 1.1. Gegenstand des Vorhabens

Vor dem in Abschnitt 1 genannten Hintergrund sollten Daten erhoben werden, aus denen ableitbar ist, welche PA/PANO-Gehalten in Futtermitteln aus Sicht des Verbraucherschutzes und der Gesundheit von Nutztieren möglicherweise als noch akzeptabel angesehen werden können. Derzeit ist davon auszugehen, dass hauptsächlich grasfressende Tiere gegenüber PAs exponiert sind, sodass im PA-SAFE-FEED Projekt Wiederkäuer untersucht wurden. Im Projekt wurden Fütterungsstudien mit laktierenden Rindern, Schafen und Ziegen durchgeführt, deren Ergebnisse eine Einschätzung ermöglichen, ab welchen PA/PANO-Gehalten in Futtermitteln adverse gesundheitliche Effekte beim Tier auftreten können. Weiterhin wurde der Transfer der PAs in die Milch sowie in die tierische Muskulatur bzw. Lebern bestimmt. Die Bestimmung der Transferparameter erfolgte sowohl für den Gesamt-PA-Gehalt (Summe der einzelnen PAs) als auch für die individuellen PAs. Dieses Vorgehen erlaubt teilweise Rückschlüsse, mit welchem PA-Transfer in die tierischen Nutzgewebe zu rechnen wäre, wenn das Futter mit anderen Kreuzkrautarten (wie z.B. Wasserkreuzkraut) kontaminiert wäre, als dem hier untersuchten Jakobskreuzkraut.

### 1.2. Ziele und Aufgabenstellungen des Projektes: Bezug des Vorhabens zu einschlägigen Zielen des BÖL

Die Projektdaten sollten den ökologischen Landbau in seinen Zielen, wie z.B. den Erhalt der Biodiversität, die biologische Produktion und Nutzung regionaler Futtermittel oder die Gewährleistung des Zugangs zu Weideland unterstützen. Das Wachstum von Kreuzkräutern ist eine Begleiterscheinung extensiv bewirtschafteten Grünlands und wird kontrovers diskutiert. Aufgabe des PA-SAFE-FEED Projektes war es, *in vivo* Daten aus Fütterungsstudien zu erbringen, aus denen in späteren Bewertungen ableitbar ist, in wieweit der Bewuchs von Kreuzkraut auf Grünland möglicherweise tolerabel ist. Diese Ableitung sollen a) in Bezug auf die Tiergesundheit und b) in Bezug auf Risiken für die menschliche Gesundheit beim potenziellen PA/PANO-Transfer in Lebensmittel tierischen Ursprungs möglich sein.

### 1.3. Planung und Ablauf des Projektes

Das PA-SAFE-FEED Projekt war ein Verbundprojekt der Ludwig-Maximilians-Universität München (Projektkoordination), des Max-Rubner-Instituts, des Friedrich-Loeffler-Instituts und des Bundesinstituts für Risikobewertung. Das Projekt gliederte sich in drei Arbeitspakete (AP), die parallel an den jeweiligen Forschungsstellen bearbeitet wurden.

- Arbeitspaket I: Transferstudien mit Kühen, Schafen und Ziegen
- Arbeitspaket II: Gewinnung und Untersuchung von Feldproben (Statusanalyse)
- Arbeitspaket III: PA-Verhalten bei der Herstellung von Milchprodukten

In diesem Bericht wird das Arbeitspaket I dargestellt, die Themenschwerpunkte werden wie folgt berichtet:

- Gewinnung und Charakterisierung des für die Applikation genutzten PA-Extraktes
- Dosis-Findungs-Studie
- Transferstudien (Tiergesundheit, Transfer)
- Kinetikstudien
- Untersuchungen zum Pansen- und hepatischen Metabolismus

Die Arbeitspakete II und III werden in einem gesonderten Bericht zusammengefasst.

## 2. Wissenschaftlicher und technischer Stand an den angeknüpft wurde

1,2-ungesättigte Pyrrolizidinalkaloide (im Bericht vereinfacht als PA/PANO abgekürzt) sind sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe, die von einer Vielzahl von Blühpflanzen gebildet werden, vornehmlich aus der Familie der Boraginaceae and Asteraceae. Es wird davon ausgegangen, dass PA/PANOs weltweit in mehr als 6000 verschiedenen Pflanzenspezies vorkommen und dabei eine hohe strukturelle Vielfalt aufweisen. Aufgrund der in Abschnitt 1 dargestellten Problematik wurden im Rahmen des PA-SAFE-FEED Projektes PAs/PANOs untersucht, die typischerweise von der Gattung der Greiskräuter (Senecio) gebildet werden. Wie in Abbildung 1 dargestellt, handelt es sich dabei um zyklische Diester (Makrozyklen) deren Necinbase zum Strukturtyp der Retronecine zählt. In geringeren Mengen werden auch PAs des Otonecin-Typs gebildet (siehe Senkirkin in Abbildung 1). In Pflanzen kommen PA/PANOs

als freie Base (PA) und deren korrespondierendes N-Oxid (PANO) vor (Abbildung 1 in rot angedeutet), wobei der größte Anteil als N-Oxid vorliegt.

**Der Transfer der PAs in die Milch von Kühen** wurde bereits in verschiedenen Studien beschrieben. Die Ergebnisse der relevantesten drei Studien können wie folgt beschrieben werden.

Während einer zweiwöchigen Fütterungsstudie mit laktierenden Kühen (n=4) wurden homogenisierte *Jacobaea vulgaris* Pflanzen per Pansen-Kanüle verabreicht (zwei Dosen pro Tag) (Dickinson et al. 1976). In den ersten 5-7 Tagen wurde eine Menge an Pflanzenmaterial verabreicht, die ca. 1 % des Gesamtkörpergewichts der Kühe bzw. 10 g *Senecio jacobaea*/kg KGW entsprach, anschließend wurde die Dosis schrittweise um 50-75% reduziert. Der PA-Gehalt der Pflanzen wurde mit 0,16% angegeben (entspricht einem PA-Gehalt von 1,6 g/kg), so dass die applizierte Anfangsmenge einer PA Dosis von ca. 16 mg/kg KGW/d entsprach. Auf Basis der Daten wurde geschätzt, dass etwa 0,1 % der PAs (total) in die Milch übergehen. Über das Pflanzenmaterial waren Jacobin, Seneciphyllin, Jacolin, Jaconin und Jacozin verabreicht worden, wobei in der Milch ausschließlich Jacolin nachweisbar war (Nachweis der PAs erfolgte als Summe aus jeweiligem PA und PANO).

Hoogenboom et al. (2011) führten eine dreiwöchige Transfer-Studie mit Milchkühen (n=3) durch. Dabei wurden steigende Mengen Pflanzenmaterial einer Mischung aus *Jacobaea vulgaris* und *Senecio inaequidens* verabreicht (Woche 1: tägliche Gabe von 2 x 25g, Woche 2: tägliche Gabe von 2 x 50g und Woche 3: tägliche Gabe von 2 x 100g). Der PA-Gehalt der Pflanzen wurde mit 0,23% bestimmt (entspricht einem PA-Gehalt von 2,3 g/kg), so dass bei einem angenommenen Gewicht von 650 kg folgende Dosen verabreicht wurden: 1. Woche: 0,18 mg PA/kg KGW, 2. Woche: 0,35 mg PA/kg KGW und 3. Woche: 0,71 mg PA/kg KGW.

Der PA-Transfer (in Bezug auf den Gesamt-PA-Gehalt) wurde mit 0,1% bestimmt und es wurde bestätigt, dass Jacolin die höchsten Transferrate aufweist. Eine Übersicht der Transferraten der einzelnen Studien sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

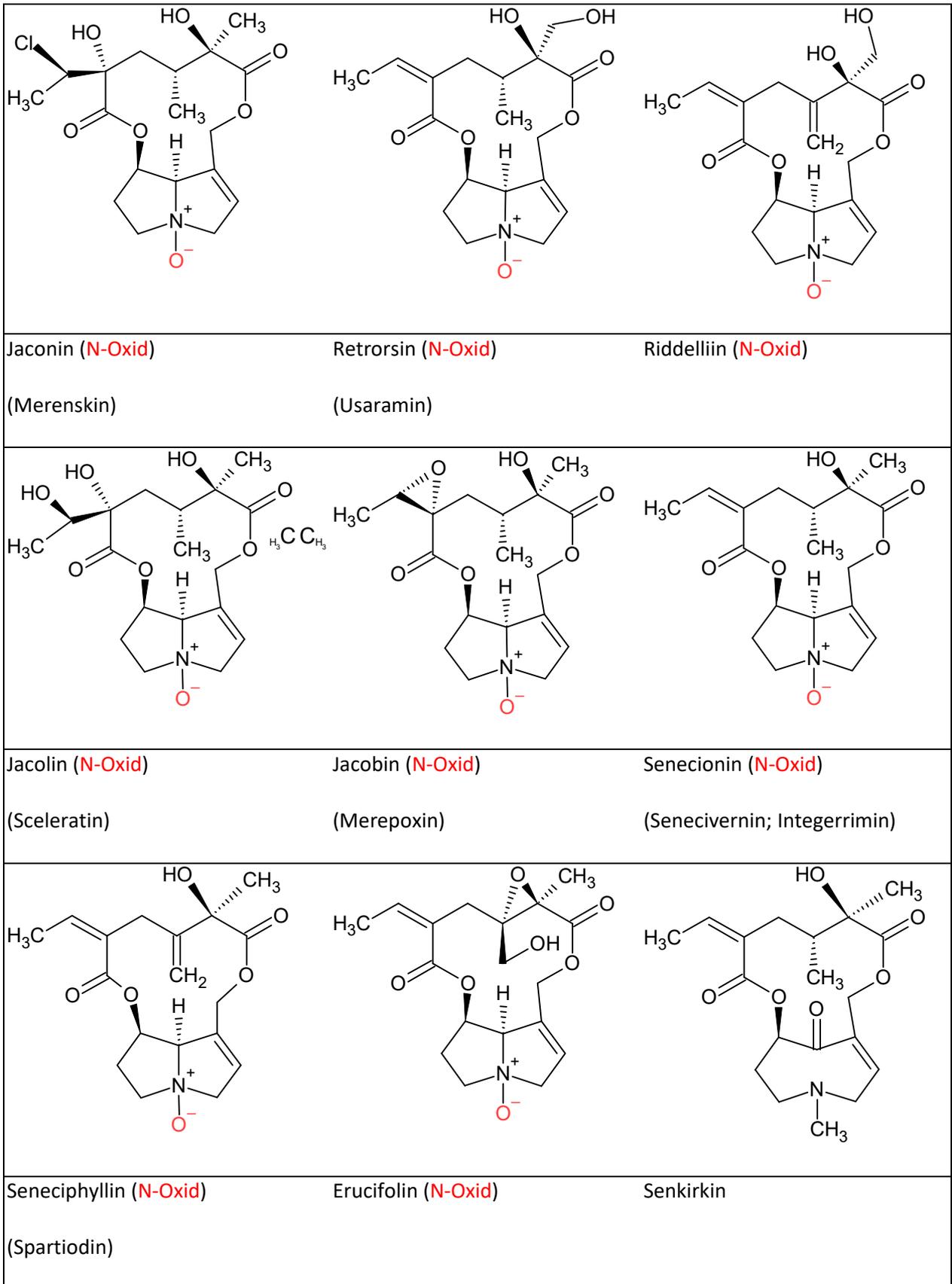


Abbildung 1: Strukturen, die typischerweise von Senecio-Arten gebildet werden. In der Natur vorkommende Isomere sind zur Information in Klammern eingefügt.

Tabelle 1: Zusammenfassung der veröffentlichten Transferraten für Senecio PAs in die Kuhmilch. Die Anordnung der PAs erfolgte nach deren Transferrelevanz.

PA	Transferrate % <sup>1</sup>	Transferrate % <sup>2</sup>	Transferrate % <sup>3</sup>
Jacolin	3,914	1,354	-
Senkirkin	1,000	0,116	-
Jaconin	0,150	0,010	-
Jacobin	0,015	0,033	-
Seneciophyllin	< 0,152*	< 0,074*	0,004
Riddelliin	< 0,083*	< 0,039*	< 0,030*
Retrorsin	< 0,025*	0,003	0,002
Senecionin	< 0,015*	0,003	0,001
Erucifolin	<0,004*	0,080	-

1) Berechnet aus Hoogenboom et al. (2011) bei Applikation einer Mischung aus *Jacobaea vulgaris* und *Senecio inaequidens*, 2) Berechnet aus Mulder et al. (2020) bei Applikation einer Mischung aus *Senecio jacobaea* und *Senecio inaequidens*, 3) Berechnet aus Mulder et al. (2020) bei Applikation von *Senecio vulgare*. Isomere PAs wurden nicht gesondert ausgewertet

\* PA/PANO wurden zwar über die Pflanze verabreicht, waren aber in der Milch nicht mehr nachweisbar. Auf Basis des in der Publikation angegebenen LOQs wurde der maximale Transfer zur Orientierung berechnet

- keine Bestimmung, da PA nicht in von der applizierten Pflanzenart gebildet wird

Obwohl die PA/PANO-Dosierungen in der Studie von Hoogenboom ungefähr 20-100-mal niedriger waren als in der Studie von Dickinson, wurden vergleichbare Ergebnisse erzielt. Während der Laufzeit der PA-SAFE-FEED Projektes wurde eine weitere Transferstudie veröffentlicht (Mulder et al. 2020). In dieser Studie wurden verschieden PA-bildende Pflanzen nacheinander getestet. Dabei bestand jeder Versuchszeitraum (Perioden) aus einem viertägigen Applikationszeitraum (Tag 1 bis 4) und einer dreitägigen Auswaschphase (Tag 5 bis 7), bevor die nächste Periode begann. Den Kühen (n=3) wurde einmal täglich direkt vor der morgendlichen Fütterung 200 g eines getrockneten PA/PANO-Pflanzenmaterials per Kanüle direkt in den Pansen verabreicht. Die Tiere erhielten in Periode 1 eine Mischung aus *Jacobaea vulgaris* und *Senecio inaequidens* und in Periode 2 *Senecio vulgaris*. In Periode 3 wurde *Echium vulgare* getestet - da dies eine Spezies der Familie der Boraginaceae ist, die andere PA/PANO Strukturen bildet, werden die Ergebnisse dieser Periode hier nicht betrachtet Die

Transferraten betragen für die Mischung aus *Jacobaea vulgaris* und *Senecio inaequidens* 0,05%, für *Senecio vulgaris* 0,01% in Bezug auf den Gesamt-PA/PANO-Gehalt. Die unterschiedlichen Transferraten ergeben sich aus der unterschiedlichen Zusammensetzung der *Senecio* Arten und den individuellen Transferraten der jeweiligen PAs (siehe Tabelle 1).

**Für Schafe wurde der Transfer in Milch** mittels <sup>14</sup>C-markiertem Seneciphyllin ermittelt, das in einer Dosis von 0,5 mg/kg KGW über 5 Tage verabreicht wurde (Panariti et al. 1997). Anhand der gemessenen Radioaktivität in Milch wurde ein Transfer in Milch von ca. 3,4 % an den Tagen 4 und 5 ermittelt.

**Für Ziegen** existieren zwei Studien, bei denen in Form von getrocknetem Jakobskreuzkraut sehr hohe PA/PANO-Dosen (16 mg/kg KGW bzw. 33,3 mg/kg KGW) über 125 bzw. 84 d verabreicht wurden (Dickinson et al. 1976; Deinzer et al. 1982). Von der Arbeitsgruppe Dickinson et al. wurden analog zur Studie an Kühen (Dickinson et al. 1976) im verabreichten Material nur ausgewählte PA detektiert, während in der Studie von Deinzer et al. (1982) die Rückstände in Milch nur als Jacobin gemessen wurden. In beiden Studien wurden sehr hohe PA-Gehalte in Milch (bis zu 810 µg/kg) gefunden. Eine Bestimmung der Transferraten ist auf Grund von fehlenden Angaben zur Milchleistung und Einschränkungen bei der Analytik nicht möglich.

Zum **Transfer der PAs in Fleisch und Leber** konnten im Vorfeld 2 Studien ausfindig gemacht werden.

In einer Studie von Mulder et al. (2016) wurden Legehennen (n=5 pro Gruppe) für 14 Tage Futtermittel gefüttert, welche zu 0,5% mit verschiedenen *Senecio*-Arten, wie z.B. *J. vulgaris*, *S. vulgaris*, und *S. inaequidens* kontaminiert waren (weitere PA/PANO Bildner wurden getestet, auf die hier nicht eingegangen wird, da diese andere PA/PANO Strukturen bilden). Die entsprechenden Gesamt-PA/PANO Gehalte im Futter waren 5,5, 11,1 und 53,1 mg/kg und entsprachen einer verabreichten PA/PANO Dosis von ca. 0,38 mg/kg KGW/Tag für die *J. vulgaris*, 0,74 mg/kg KG/Tag für die *S. vulgaris* und 3,5 mg/kg KG/Tag für die *S. inaequidens* Gruppe. Bei den Tieren der *J. vulgaris* Gruppe, die nach der letzten Behandlung 14 Tage mit unbelastetem Futter gefüttert und dann geschlachtet wurden, waren Brustmuskel und Leber frei von PA/PANO (letzter Behandlungstag: 6,5 ± 1,9 µg/kg; 14 Tage nach der Behandlung: 0,0 ± 0,0 µg/kg). Im Gegensatz dazu waren bei Tieren, die mit *Senecio inaequidens* gefüttert wurden, das hohe Mengen an PA vom Otonecin-Typ produziert, immer noch PA-Konzentrationen nachweisbar (letzter Behandlungstag: 67,1 ± 26,2 µg/kg; 14 Tage nach der Behandlung: 3,3 ± 1,1 µg/kg), jedoch wurde auch eine höhere Gesamtdosis verwendet (Mulder et al. 2016).

In einer Studie aus Nordaustralien wurde das Muskelfleisch von Kälbern untersucht, die mit Pflanzen von *Senecio bragalowensis* (früher als *S. lautus* klassifiziert) gefüttert wurden. Die gefütterte Menge entsprach einer PA/PANO-Dosis von 2,5 mg/kg KGW/Tag (Fletcher et al. 2011). Der Transfer von PAs in Leber und Muskel war gering und nur PAs vom Otonecin-Typ, wie Senkirkin waren in den Geweben nachweisbar.

Diese Ergebnisse zeigen, dass sich der selektive Transfer von PA/PANOs aus *Senecio*-Pflanzen in tierisches Gewebe hauptsächlich auf PAs wie Jacolin- bzw. PAs des Otonecin-Typs konzentriert. Darüber hinaus zeigen die Studien, dass es keine Bioakkumulation in Leber oder Muskel zu geben scheint.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Herstellung des Pyrrolizidinalkaloid- und -N-Oxid- (PA/PANO) Extraktes aus Jakobskreuzkraut zur Supplementierung

Im Rahmen des Projektes wurde entschieden, dass die Gewährleistung einer genauen PA/PANO Dosierung für alle Tierarten und über den gesamten Versuchszeitraum nur über eine Extraktgabe erreicht werden kann, da selbst bei sorgfältiger Homogenisierung von Jakobskreuzkrautpflanzen [JKK] mit einer hohen Streuung der PA/PANO-Gehalte in den Pflanzenpartikeln zu rechnen ist.

Zur Herstellung des JKK Extraktes wurden im Juli 2019, während der Hochblütezeit von *Jacobaea vulgaris*, auf zwei verschiedenen Naturschutzflächen in Schleswig-Holstein an sieben aufeinanderfolgenden Tagen etwa 7 Tonnen Frischmasse von Hand geerntet. Die Pflanzen wurden mittels eines Häckslers auf eine Länge von 14 mm gehäckselt. Die Tagesernte wurde in einem horizontalen Bandtrockner einer Biogas-Anlage für ca. 18 bis 24 Stunden bei 60 °C getrocknet und anschließend in Big Bags mit wasserabweisender Beschichtung abgesackt und bei Raumtemperatur gelagert. Während der Absackung wurden Mischproben aus jedem Sack entnommen und zur Bestimmung des jeweiligen PA/PANO-Gehaltes an die LMU München versendet.

Nach Bestimmung des PA/PANO-Gehaltes wurden die Tagesernten mit den höchsten PA/PANO-Gehalten ausgewählt. Insgesamt 7 Big Bags mit ca. 870 kg Trockenmasse wurden mittels Spedition zur Fa. Phytoplan in Heidelberg transportiert.

Zur Gewinnung der PA/PANO aus der JKK Ernte wurde durch die Fa. Phytoplan (Heidelberg, Deutschland) eine wiederholte methanolische Extraktion des getrockneten Materials durchgeführt. Durch zeitlich versetzte Extraktion entstanden drei Extraktchargen, die wie folgt verwendet wurden:

- Dosis-Findungsversuch an Schafen und Ziegen: Extrakt 1
- Hauptversuch an Schafen: je 50 % Extrakt 1 und Extrakt 2
- Hauptversuch an Milchkühen: Extrakt 2
- Hautversuch an Milchziegen: Extrakt 3

### 3.2. Charakterisierung des Extraktes

Die qualitative und quantitative Charakterisierung des Extraktes im Hinblick auf die Gehalte an Pyrrolizidinalkaloiden und -N-Oxiden ist im Anhang unter Kapitel 9.1.2 beschrieben.

### 3.3. Dosis-Findungs-Studie

#### 3.3.1. Tierversuch

Im Rahmen des Vorversuches an kleinen Wiederkäuern sollten mit je einem Tier pro Dosis diejenigen Dosierungen ermittelt werden, die über einen Zeitraum von 28 Tagen verabreicht werden können, ohne klinische Erscheinungen zu verursachen. Der Dosis-Findungsversuch wurde gemäß der Genehmigung durch das schleswig-holsteinische Ministerium für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt, Natur und Digitalisierung (Az. 244-31105/2019 (63-5/19)) vom 22.10.2019 bis zum 18.11.2019 an je vier Milchziegen und Milchschaafen in der ersten Laktation durchgeführt. Die Tiere wurden zwei Wochen vor Versuchsbeginn nach Tierarten getrennt auf der Versuchsstation Schädtkbek (MRI Kiel) aufgestellt, um eine entsprechende Eingewöhnung an die Haltung und Fütterung zu gewährleisten. Die Fütterung mit Rotkleesilage und Heu erfolgte ad libitum. Pro Tag erhielten die Schafe 500 g Quetschhafer, die Ziegen 500 g gequetschten Weizen, plus 10 g tierartspezifisches Mineralfutter. Das Melken erfolgte über eine Eimermelkanlage (Minimelker, Schlauerbauer Melktechnik GmbH, Liebenscheid, DE) um 7 Uhr und 17 Uhr. Die Milchmenge pro Tier und Melkzeit wurde mittels Waage erfasst.

Die Daten der Versuchstiere und die jeweilige PA/PANO-Dosis sind in Tabelle 2 aufgeführt. Die Tiere erhielten 28 Tage lang einmal täglich nach dem Morgenmelken die individuelle Dosis des PA/PANO-Extraktes oral per Maulspritze. Die beabsichtigten Dosierungen (1.5; 3; 6; 12 mg/kg KG) wurden auf Basis einer vorläufigen Analyse verabreicht und später auf Grund einer genauen Analyse korrigiert. Zur

Überwachung des Gesundheitszustandes wurden die Tiere im Versuchsverlauf täglich tierärztlich untersucht.

Tabelle 2: Dosis-Findungsversuch - Daten der Versuchstiere

Nr.	Tierart/Rasse	Gewicht (kg)	Laktations-tag <sup>1</sup>	Milchmenge <sup>2</sup> (kg/d)	PA/PANO Dosis (mg/kg KG/d)
1	Bunte Deutsche Edelziege	41,5	172	1,0	1,46
2	Bunte Deutsche Edelziege	42,0	269	1,1	2,91
3	Weißer Deutsche Edelziege	45,5	278	1,3	5,83
4	Weißer Deutsche Edelziege	48,0	177	1,3	11,65
5	Ostfriesisches Milchschaaf	64,0	104	0,6	1,46
6	Ostfriesisches Milchschaaf	68,0	103	0,8	2,91
7	Ostfriesisches Milchschaaf	74,0	103	0,6	5,83
8	Ostfriesisches Milchschaaf	77,0	110	0,4	11,65

<sup>1</sup> zu Versuchsbeginn, <sup>2</sup> Mittelwert über 7 Tage vor Versuchsbeginn

### 3.3.2. Probennahme

Alle Matrices (Milch, Blut, Kot, Pansensaft) wurden vor Versuchsbeginn beprobt, um den Ausgangsstatus festzustellen.

An den Tagen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 14, 21, 24 und 28 wurden Milchproben zweimal täglich aus dem gut durchmischten Gesamtgemelk pro Tier und Melkzeit gewonnen, in Portionen zu 100 ml aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Blutproben wurden aus der *Vena jugularis* mittels eines Vacuetten-Systems (Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland) entnommen. Nach der Supplementierung an Tag 1 wurden innerhalb der ersten 6 Stunden stündlich, danach in 2-Stunden-Abständen bis 12 Stunden nach der Supplementierung Proben entnommen. Weitere Probenahmen erfolgten an den Tagen 2, 3, 5, 7, 10, 14, 21 und 28 jeweils 2 Stunden nach der Supplementierung.

Für die Rückstandsanalysen wurde Plasma mittels Vacuetten mit Lithium-Heparin (Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland) und Zentrifugation (2500g, 10 Minuten) gewonnen und in 2 ml-Portionen bei -20 °C gelagert.

Für die serologische Analytik wurden Vacuetten mit Serum Separator Clot Activator (Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, Germany) verwendet. Serumproben wurden nach Zentrifugation (2500g, 10 Minuten) in 1,5 ml-Portionen bei -80 °C gelagert.

Vollblut wurde an Tag 7, 14, 21 und 28 für die hämatologische Untersuchung gewonnen und per Kurier zum Labor transportiert.

Kotproben wurden an Tag -5, 7,14,21, und 28, Pansensaft an Tag -5, 7, 14, 21 gewonnen und bei -20 °C konserviert.

Da der Harnabsatz sich nicht stimulieren ließ, wurden Harnproben als Spontanharn gewonnen, wann immer dies möglich war. Die Harnproben wurden zu 2 ml aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Muskel- und Organproben wurden nach Euthanasie in Vollnarkose an Tag 29 (Ziegen) bzw. Tag 30 (Schafe) im Rahmen einer Sektion im Landeslabor Schleswig-Holstein (Neumünster) gewonnen und für die Rückstandsanalytik bei -20 °C gelagert bzw. für histologische Untersuchungen in Formalin fixiert.

### 3.3.3. Analytik

Die beprobten Matrices wurden auf folgende Parameter untersucht:

<b>Matrix</b>	<b>Parameter</b>	<b>Durchführung der Analytik</b>
Extrakt für Supplementierung	PA/PANO	Kapitel 9.1.2
Milch	PA/PANO	Kapitel 9.1.4
	Milchinhaltsstoffe	Kapitel 9.5
Blut	PA/PANO	Kapitel 9.1.6
Pansensaft	PA/PANO & Pansenmetaboliten (inkl.	Kapitel 9.1.7
Urin	PA, PANO	Kapitel 9.1.8
Kot	PA, PANO	Kapitel 9.1.9
Muskelfleisch	PA, PANO	Kapitel 9.1.5
Leber	Pathologie und Histopathologie	Kapitel 9.15
	PA, PANO	Kapitel 9.1.5
Weitere Organproben	Pathologie und Histopathologie (Lunge, Niere, Pansenwand, Labmagen, Gehirn Pansenwand)	Kapitel 9.15

### 3.4. Transferstudien

#### 3.4.1. Rinder

##### 3.4.1.1. Tierversuch (Rinder)

Der Rinderversuch, beschrieben in Knoop et al. (2023) wurde in der Versuchsstation des Friedrich-Loeffler-Instituts (FLI) in Braunschweig, Deutschland, in Übereinstimmung mit dem deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt und vom Niedersächsischen Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (LAVES) genehmigt.

In dem 28- tägigen Versuch wurden 20 pluripare, nicht trächtige, laktierende ( $169,7 \pm 30$  Tage in Laktation; Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (SD)) Deutsche Holsteinkühe hinsichtlich ihrer Milchleistung ( $39,7 \pm 6,4$  kg/Tag) und ihres Körpergewichts (KG,  $649 \pm 51$  kg) gleichmäßig auf fünf Gruppen ( $n = 4$  pro Gruppe) verteilt. Während des Versuchszeitraumes waren die Kühe in Gruppenbuchten untergebracht, die mit Spaltenböden und Hochboxen ausgestattet waren. Alle Kühe erhielten die gleiche totale Mischration (TMR), die aus Maissilage, Grassilage und Kraftfutter bestand. Einschließlich des Kraftfutters, das mit dem Greenfeed-System, einem System zur automatischen Messung von Stoffwechselgasen, gefüttert wurde, bestand die Ration zu je 30 % aus Mais- und Grassilage und zu 40 % aus Kraftfutter auf Basis der Trockenmasse (TM). Die Versorgung der Kühe mit Energie und Nährstoffen erfolgte nach den Empfehlungen der Gesellschaft für Ernährungsphysiologie (Flachowsky et al. 2001). Futter und Wasser wurden von computergesteuerten Selbstfütterungsstationen *ad libitum* angeboten (Insentec, B.V., Mercknesse, Niederlande), wobei die individuelle Wasser- und Frischmasse (FM)-Aufnahme durch Ohr-Transponder aufgezeichnet wurde.

Aufgrund des hohen Zuckeranteils im PA/PANO-Extrakt wurden zwei Kontrollgruppen implementiert, wobei die erste Kontrollgruppe Wasser und die zweite Kontrollgruppe Melasse erhielt. Um einen ausgeglichenen Zuckergehalt in den PA/PANO exponierten Gruppen ( $n=3$ ) zu gewährleisten, wurde zusätzlich zum PA/PANO-Extrakt Melasse in den beiden geringer dosierten Dosisgruppen verabreicht (Tabelle 3). Insgesamt wurden PA/PANO Expositionen von  $0,47$  mg/kg KG/d in der am niedrigsten dosierten Gruppe, von  $0,95$  mg/kg KG/d in der mittleren dosierten Gruppe und von  $1,91$  mg/kg KG/d in der höchstdosierten Gruppe erreicht. Die tierindividuellen Extraktmischungen aus Melasse, Wasser und/oder PA/PANO-Extrakt wurden täglich nach dem Morgengemelk über eine Schlundsonde direkt in den Pansen verabreicht.

Tabelle 3: Zusammensetzung des verabreichten Extraktes und die daraus resultierende totale PA/PANO Exposition der einzelnen Gruppen des Rinderhauptversuches

<b>Gruppe</b>	<b>Exposition: (PA/PANO)/kg KG/Tag [mg]</b>	<b>Administration: Extrakt/kg KG/Tag [g]</b>	<b>Administration: Melasse/kg KG/Tag [g]</b>	<b>Enthaltener Zucker*/kg BW/day [g]</b>
CON <sub>Wasser</sub>	<0,01	0	0	0
CON <sub>Melasse</sub>	<0,01	0	0,45	0,17
PA/PANO-1	0,47	0,11	0,34	0,17
PA/PANO-2	0,95	0,23	0,23	0,16
PA/PANO-3	1,91	0,45	0	0,16

Alle Kühe wurden täglich hinsichtlich ihres Gesundheitsstatus untersucht, wobei einmal wöchentlich ein umfassendes Gesundheitsmonitoring durchgeführt wurde, wobei u.a. der Body Condition Score (BCS) nach Edmonson et al. 1989 ermittelt wurde und die rektale Körpertemperatur gemessen wurde. Des Weiteren wurden von den Tieren der Gruppe PA/PANO-3 und CON<sub>Melasse</sub> vor Versuchsbeginn und einen Tag vor der Schlachtung die Fettdepots nach Raschka et al. 2016 mittels Ultraschalls (Mindray M5 Vet, Shenzhen, China) bestimmt.

Am letzten Versuchstag wurden die PA-exponierten Tiere und die Tiere der Melassegruppe zwei Stunden nach letzter Dosisgabe mittels Bolzenschussgerät betäubt und mittels Durchtrennen der großen Halsgefäße durch Entbluten getötet.

### 3.4.1.2. Probenahme (Rinder)

Für die Futtermittelanalyse wurden Proben des Greenfeed-Kraftfutters und des TMR-Kraftfutters wöchentlich, die Mais- und Grassilage zweimal pro Woche und die TMR täglich entnommen und über die Dauer des Versuchs gepoolt.

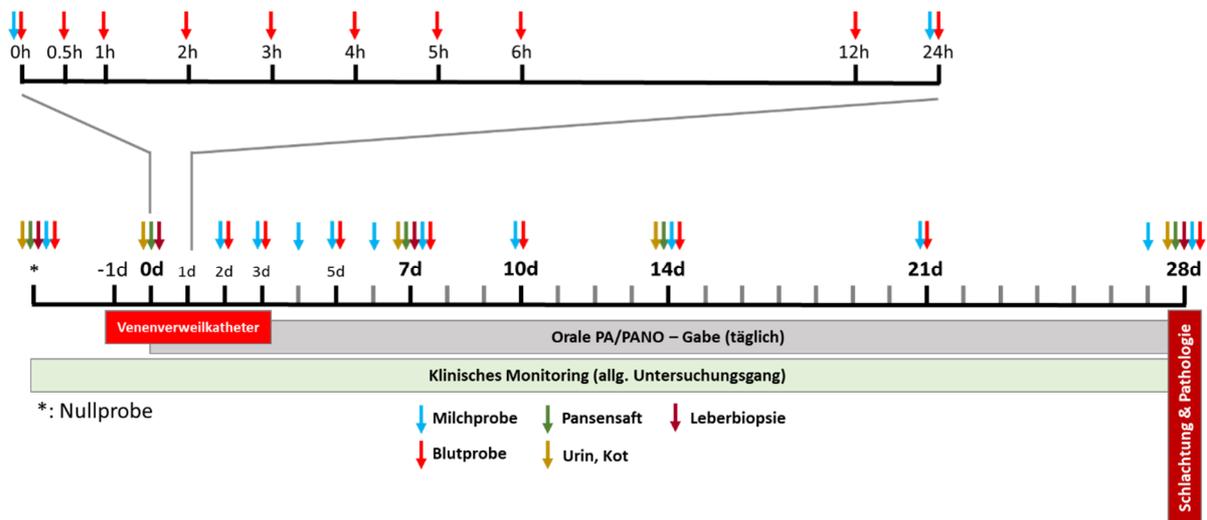


Abbildung 2: Probenahmeschema des Rinderhauptversuches

Die Kühe wurden zweimal täglich, morgens und abends, gemolken, wobei die Milchleistung automatisch erfasst (Lemmer Fullwood GmbH, Lohmar, Deutschland) wurde. Nach Verlassen des Melkstandes wurden die Tiere automatisch gewogen und das Körpergewicht elektronisch aufgezeichnet. Zweimal wöchentlich wurde die Morgen- und Abendmilch für die Analyse der Milchinhaltsstoffe beprobt.

Vor Versuchsbeginn wurden einzelne, von der Behandlung unbeeinflusste Nullproben von Milch, Pansensaft, Lebergewebe, Blut, Kot und Urin entnommen (Abbildung 2). Am Tag vor Versuchsbeginn (-1d) wurde ein Verweilkatheter in der *Vena jugularis externa* für eine stressfreie Blutentnahme gelegt (an Versuchstag 3 wieder entfernt). Der eigentliche Versuch begann mit einer Blutentnahme unmittelbar vor der ersten oralen Gabe der Versuchssubstanzen (Wasser, Melasse, PA/PANO-Extrakt). Während am ersten Versuchstag hochfrequent Blutproben gezogen wurden (Abbildung 2), erfolgten alle folgenden Probenahmen etwa 90 min nach oraler Gabe. Im Rahmen des Versuches fanden drei transkutane, minimal-invasive Leberbiopsien bei allen Kühen statt. Die Biopsie wurde unter sonographischer Kontrolle und Lokalanästhesie (Isocain®) mittels eines Biopsieentnahmegertes (Bard® Magnum® Biopsy System) mit dazugehörigen sterilen Biopsienadeln (Bard® Magnum® Biopsy Needle, 12G x 20cm) durchgeführt.

Bei der Schlachtung wurden die Organe entnommen, gewogen und grobmakroskopisch untersucht. Proben aller Schichten der Wand des ventralen Pansensacks (kaudal, medial, kranial), der Leber (*Lobus dexter hepatis*), der Lunge, der Niere und der Gallenblase wurden für histopathologische Untersuchungen vorbereitet. Des Weiteren wurden für weiterführende Analysen folgende Proben gewonnen: Muskel, Blättermagen, Labmagen, Jejunum, Ileum, Duodenum, Caecum, Colon.

Das Fettgewebe der Beckenhöhle, das Fettgewebe, das die Niere, den Pansen, die Därme und den Blättermagen umgibt, das Labmagenfettgewebe und das subkutane Fettgewebe wurden getrennt seziiert und gewogen. Das entfernte Fettgewebe wurde als abdominales Fettgewebe (AAT) zusammengefasst.

## 3.4.1.3. Analytik (Rinder)

Die in Abbildung 2 beprobten Matrices wurden auf folgende Parameter untersucht:

<b>Matrix</b>	<b>Parameter</b>	<b>Durchführung der Analytik</b>
Extrakt für Supplementierung	PA/PANO	Kapitel 9.1.2
	Kohlenhydrate	Kapitel 9.2
	Methanol-, Stickstoff- und Wassergehalt	Kapitel 9.3
Futter	Weender-Analyse zur Bestimmung von Trockensubstanz, Rohasche, Rohprotein, Rohfett- und Rohfasergehalt, saure & neutrale Detergenzien	Kapitel 9.4
	PA/PANO	Kapitel 9.1.3
Milch	PA/PANO	Kapitel 9.1.4
	Milchinhaltsstoffe	Kapitel 9.5
Blut	PA/PANO	Kapitel 9.1.6
	Hämatologie	Kapitel 9.6
	klinisch-chemische Analyse (Serologie)	Kapitel 9.7
	Durchflusszytometrische Untersuchungen	Kapitel 9.8
	inflammatorische Marker (Tryptophan, Kynurenin und Niacin)	Kapitel 9.9
	Comet-Assay Genomanalyse	
Pansensaft	PA/PANO & Pansenmetaboliten (inkl. Darminhalte)	Kapitel 9.1.7
	Pansenmetabolom	Kapitel 9.10
	pH-Wert, Ammoniumstickstoff, freie Fettsäuren,	Kapitel 9.14
Urin	PA, PANO	Kapitel 9.1.8
	Purine	Kapitel 9.11
Kot	PA, PANO	Kapitel 9.1.9
Muskelfleisch	PA, PANO	Kapitel 9.1.5
Leber	Pathologie und Histopathologie	Kapitel 9.15
	PA, PANO	Kapitel 9.1.5
	Leberfettgehalt	Kapitel 9.12
	Lebertranskriptom	Kapitel 9.13
Weitere Organproben	Pathologie und Histopathologie (Gallenblase, Pansenwand, Niere, Lunge)	Kapitel 9.15

### 3.4.2. Schafe

#### 3.4.2.1. Tierversuch

Gemäß der Genehmigung durch das schleswig-holsteinische Ministerium für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt, Natur und Digitalisierung vom 13.05.2020 (Az. 244-30394/2020 (63-5/19)) wurde der Versuch vom 09.06.2020 bis zum 14.07.2020 an 16 Ostfriesischen Milchschaften in der ersten Laktation auf der Versuchsstation Schädbeck (MRI Kiel) durchgeführt.

Basierend auf den Daten des vorhergehenden Dosis-Findungsversuches wurden drei verschiedene Dosierungsstufen festgelegt, die den Tieren der Versuchsgruppen 2, 3 und 4 über 28 Tage verabreicht wurden (Tabelle 4). Zur Verbesserung der Verträglichkeit und der Akzeptanz wurde die tägliche Dosis auf zwei Gaben aufgeteilt und den Tieren jeweils nach der Morgen- und Abendmelkzeit verabreicht.

Da der PA/PANO-Extrakt einen hohen Anteil leicht verdaulicher Kohlenhydrate enthielt (Zuckergehalt 36%), wurde über Zugabe von Melasse die geringere Zuckeraufnahme der niedrigeren Dosierungsstufen (Gruppe 2 und 3) ausgeglichen. Die Kontrollgruppe (Gruppe 1) erhielt Melasse entsprechend der Zuckermenge, die von der höchstdotierten Gruppe 4 mit dem PA/PANO-Extrakt aufgenommen wurde. Zur Gewöhnung des Pansenmikrobioms an diese Zuckeraufnahmemengen erhielten die Tiere vor Versuchsbeginn über 10 Tage eine täglich ansteigende Menge Melasse.

Die Daten der Versuchstiere und die jeweilige PA/PANO-Dosis sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Transferversuch an Milchschaafen - Daten der Versuchstiere

Tier-Nr.	Gewicht (kg) <sup>1</sup>	Laktations-tag <sup>1</sup>	Milchleistung <sup>2</sup> (kg/d)	PA/PANO Dosis (mg/kg/d)	Melasse (g/d)
Gruppe 1 - Kontrollgruppe					
11	61,5	56	0,8	0	68
12	65,0	56	0,9	0	72
13	59,5	62	1,0	0	66
43	65,5	57	1,2	0	72
Gruppe 2					
21	64,0	57	0,6	1,5	53
22	66,5	49	1,5	1,5	55
23	58,5	48	1,2	1,5	48
24	62,0	46	1,5	1,5	51
Gruppe 3					
31	67,0	58	1,4	3	37
32 <sup>3</sup>	57,5	60	0,7	3	32
33	60,0	53	1,3	3	33
34	54,0	31	1,1	3	30
Gruppe 4					
14 <sup>4</sup>	61,0	47	1,3	6	0
41	63,0	65	1,3	6	0
42	55,0	46	1,2	6	0
44 <sup>5</sup>	64,0	45	1,2	6	0

<sup>1</sup> zu Versuchsbeginn, <sup>2</sup> Mittelwert über 7 Tage vor Versuchsbeginn, <sup>3</sup> Abbruch PA-Gabe an Tag 17 nach der morgendlichen Eingabe, ( $\cong$  halbe Dosis Tag 17), <sup>4</sup> Abbruch PA-Gabe an Tag 10 nach der morgendlichen Eingabe, ( $\cong$  halbe Dosis Tag 10), <sup>5</sup> Abbruch PA-Gabe an Tag 22

Die Supplementierung erfolgte für Gruppe 3 und 4 für 28 Tage und wurde für Gruppe 2 aus organisatorischen Gründen auf 29 Tage verlängert. Die Supplementierung von Gruppe 2 und 3 begann einen Tag später als die der Gruppe 4. Hintergrund dieser Staffelung war, dass die Euthanasie und Sektion für die Versuchsgruppen an drei aufeinanderfolgenden Tagen erfolgen musste. Diese wurde für Gruppe 4 an Versuchstag 29, Gruppe 3 an Versuchstag 29, Gruppe 2 an Versuchstag 30 vorgenommen. Die Euthanasie und Sektion der Kontrollgruppe erfolgte abschließend an Versuchstag 36.

Unbeabsichtigt kam es durch einen Fehler beim Einwiegen des Extraktes zu einer Überdosierung in den Gruppen 3 (3 mg/kg) und 4 (6 mg/kg). Die Höhe der Überdosierung ließ sich nicht genau

bestimmen. Auf Grundlage der bestimmten Gehalte in Blutplasma- und Milchproben konnte die Überdosierung auf den Zeitraum Tag 3 bis 5 für die Gruppe 3 sowie Tag 4 bis 6 für die Gruppe 4 eingegrenzt werden. In Gruppe 3 schienen nur die Tiere 33 und 34 betroffen zu sein, während in Gruppe 4 für alle Tiere eine unterschiedlich starke Überdosierung angenommen werden kann.

### 3.4.2.2. Probenahme

Die Probenahmen wurden analog zum Vorversuch an den entsprechenden Versuchstagen mit zusätzlicher Milchprobenahme am Tag 17 durchgeführt. Die Entnahme der Blutproben erfolgte auf Grund der Ergebnisse der Vorversuche jeweils drei Stunden nach Supplementierung, um die Maximalwerte für möglichst viele PA/PANO zu erfassen.

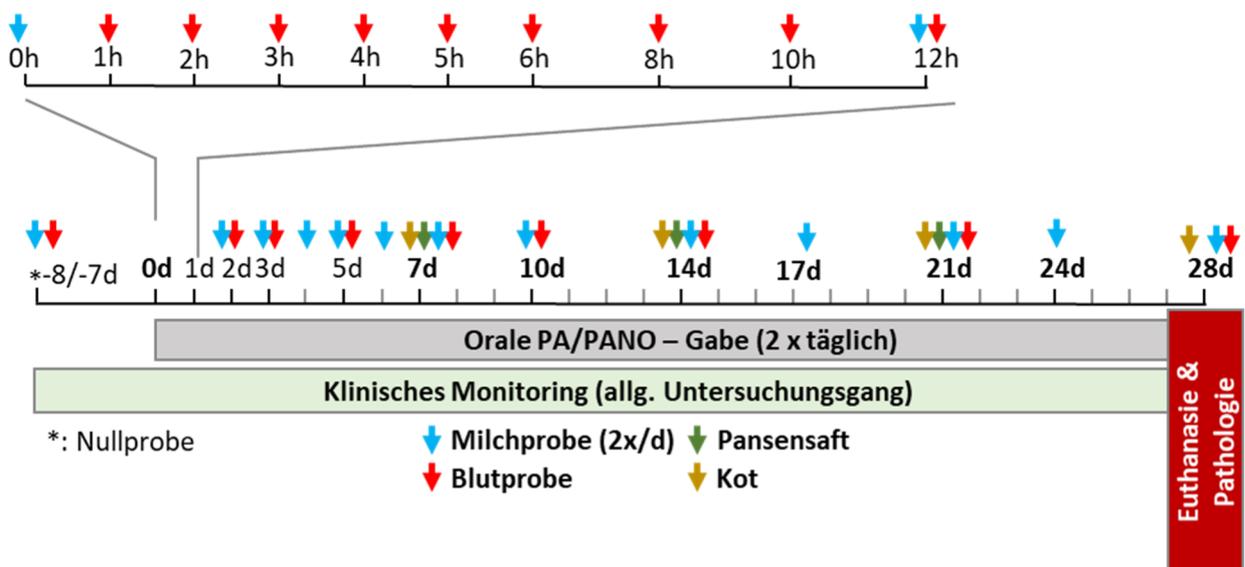


Abbildung 3: Probenahmeschema des Schafhauptversuches (zusätzlich erfolgte die Entnahme des Pansenproben post mortem während der Sektion).

### 3.4.2.3. Analytik

Die beprobten Matrices wurden auf folgende Parameter untersucht:

<b>Matrix</b>	<b>Parameter</b>	<b>Durchführung der Analytik</b>
Extrakt für Supplementierung	PA/PANO	Kapitel 9.1.2
	Methanol-, Stickstoff- und Wassergehalt	Kapitel 9.3
Milch	PA/PANO	Kapitel 9.1.4
	Milchinhaltsstoffe	Kapitel 9.5
Blut	PA/PANO	Kapitel 9.1.6
	Hämatologie	Kapitel 9.6
	klinisch-chemische Analyse (Serologie)	Kapitel 9.7
Pansensaft	PA/PANO & Pansenmetaboliten (inkl. Pansenmetabolom)	Kapitel 9.1.7
	Pansenmetabolom	Kapitel 9.10
Urin	PA, PANO	Kapitel 9.1.8
	Purine	Kapitel 9.11
Kot	PA, PANO	Kapitel 9.1.9
Muskelfleisch	PA, PANO	Kapitel 9.1.5
Leber	Pathologie und Histopathologie	Kapitel 9.15
	PA, PANO	Kapitel 9.1.5
Weitere Organproben	Pathologie und Histopathologie ((Lunge, Niere, Pansenwand)	Kapitel 9.15

### 3.4.3. Ziegen

#### 3.4.3.1. Tierversuch

Der Transferversuch an 16 Milchziegen wurde gemäß der Genehmigung durch das schleswig-holsteinische Ministerium für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt, Natur und Digitalisierung (Az. 244 - 30394/2020 (63-5/19)) vom 6.4.2021 bis 11.5.2021 analog zum vorhergehenden Transferversuch an Schafen ebenfalls auf der Versuchsstation Schädtebek (MRI Kiel) durchgeführt. Es handelte sich um erstlaktierende Weiße Deutsche Edelziegen, Bunte Deutsche Edelziegen sowie Gebrauchskreuzungen. Abweichend vom Hauptversuch mit den Milchschaafen war die PA/PANO-Dosierung bei den Milchziegen etwas geringer, da eine neue Charge des PA/PANO-Extraktes verwendet wurde, deren Einsatz auf Grund des knappen Zeitraums zwischen Extraktlieferung und Versuchsbeginn auf der Grundlage von orientierenden Laboranalysen erfolgte. Die Abweichung von der geplanten Dosierung wurde im Rahmen von nachträglichen umfassenden Extraktanalysen durch die Projektpartner LMU und BfR festgestellt. Die Daten der Versuchstiere und die jeweilige PA/PANO-Dosis sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5: Transferversuch an Milchziegen - Daten der Versuchstiere

Tier-Nr.	Gewicht (kg) <sup>1</sup>	Laktations-tag <sup>1</sup>	Milchleistung <sup>2</sup> (kg/d)	PA/PANO Dosis (mg/kg/d)	Melasse (g/d)
Gruppe 1 - Kontrollgruppe					
15	36,0	77	1,9	0	43
16	54,0	47	1,8	0	65
17	53,5	45	2,5	0	64
18	47,0	73	2,9	0	56
Gruppe 2					
25	64,0	74	3,0	1,32	39
26	66,5	78	2,6	1,32	37
27	58,5	77	2,0	1,32	35
28	62,0	41	2,2	1,32	43
Gruppe 3					
35	36,0	53	2,5	2,63	22
36	41,5	78	2,9	2,63	25
37	44,5	40	2,5	2,63	27
38	63,5	45	1,7	2,63	38
Gruppe 4					
45	54,5	73	3,3	5,26	0
46	38,0	73	2,5	5,26	0
47 <sup>3</sup>	45,0	42	2,8	5,26	0
48	53,0	54	2,3	5,26	0

<sup>1</sup> zu Versuchsbeginn, <sup>2</sup> Mittelwert über 7 Tage vor Versuchsbeginn, <sup>3</sup> Abbruch an Tag 23 (≙)

#### 3.4.3.2. Probennahme

Die Probennahme wurde analog zum Hauptversuch an den Milchschaften durchgeführt. Eine Übersicht zur Probennahme ist in Abbildung 4.

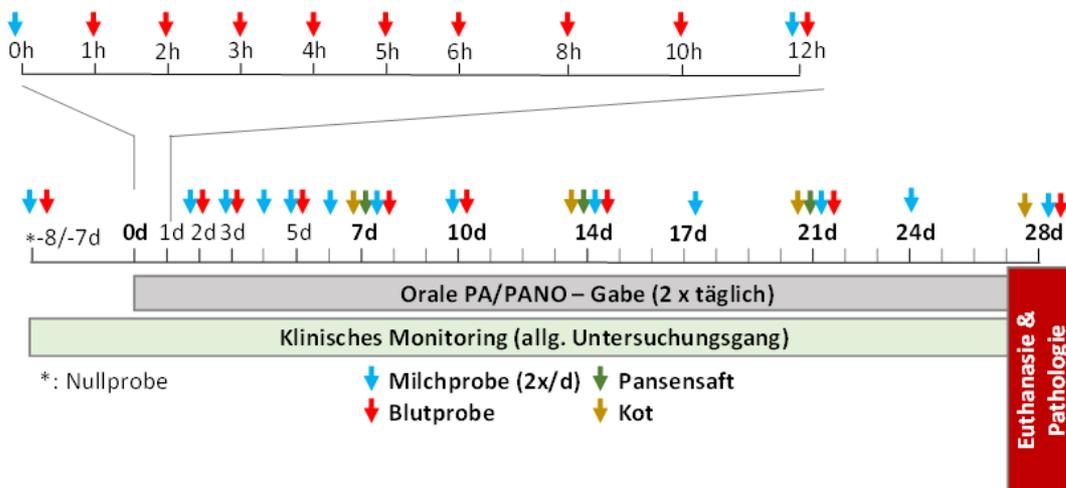


Abbildung 4: Probenahmeschema des Ziegenhauptversuches (zusätzlich erfolgte die Entnahme des Pansensafts post mortem während der Sektion)

### 3.4.3.3. Analytik

Die beprobten Matrices wurden auf folgende Parameter untersucht:

Matrix	Parameter	Durchführung der Analytik
Extrakt für Supplementierung	PA/PANO	Kapitel 9.1.2
	Methanol-, Stickstoff- und Wassergehalt	Kapitel 9.3
Milch	PA/PANO	Kapitel 9.1.4
	Milchinhaltsstoffe	Kapitel 9.5
Blut	PA/PANO	Kapitel 9.1.6
	Hämatologie	Kapitel 9.6
	klinisch-chemische Analyse (Serologie)	Kapitel 9.7
Pansensaft	PA/PANO & Pansenmetaboliten (inkl. Darminhalte)	Kapitel 9.1.7
Urin	PA, PANO	Kapitel 9.1.8
	Purine	Kapitel 9.11
Kot	PA, PANO	Kapitel 9.1.9
	Pathologie und Histopathologie	Kapitel 9.15
Leber	PA, PANO	Kapitel 9.1.5
	Pathologie und Histopathologie (Gallenblase, Pansenwand, Niere, Lunge)	Kapitel 9.15
Fleisch	PA, PANO	Kapitel 9.1.5

### 3.5. Kinetikstudie

#### 3.5.1. Rinder

##### 3.5.1.1. Tierversuch

Der im Folgenden beschriebene Kinetikversuch an Milchkühen wurde vom Niedersächsischen Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (LAVES) genehmigt und in der Versuchsstation des Friedrich-Loeffler-Instituts (FLI) in Braunschweig, Deutschland, in Übereinstimmung mit dem deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt.

Hierfür wurden 8 laktierende, z.T. pansen- und duodenalfistulierte Milchkühe der Rasse Deutsche Holstein verwendet, die über den Versuchszeitraum in Anbindehaltung gehalten wurden. Die Kühe erhielten während des Versuches eine Teilmischration *semi ad libitum*. Die Futtervorlage erfolgte zweimal täglich, wobei vor der morgendlichen Fütterung der Rest des Vortages zurückgewogen wurde, um die Futteraufnahme pro Tag zu erfassen. Der Versuch wurde in zwei Perioden durchgeführt, wobei die Kühe vorab nach KG und Milchleistung in 2 Gruppen (n=4) eingeteilt wurden.

Die Versorgung der Kühe mit Energie und Nährstoffen erfolgte nach den Empfehlungen der Gesellschaft für Ernährungsphysiologie (Flachowsky et al. 2001). Die Kühe erhielten über den gesamten Versuchszeitraum eine TMR aus Maissilage (39,1%), Grassilage (39,1%) und Kraftfutter (21,8%), auf Trockenmassebasis. Zusätzlich erhielten die Tiere täglich 4 kg Kraftfutter (Frischmasse), die anteilig zu den Melkzeiten bereitgestellt wurden.

Die Sammelperiode I begann mit der einmaligen Verabreichung von Retrorsin (Re: Dosis 1,8 mg/kg KM) bzw. des korrespondierenden N-Oxids (ReNO Dosis 2,2 mg/kg KM) in den Pansen und bei nichtfistulierten Kühen über eine Schlundsonde. In der Sammelperiode I waren zwei fistulierte Tiere in der Re-Gruppe und 3 fistulierte Tiere in der ReNO-Gruppe enthalten. In der Sammelperiode II erfolgte die Applikation von Re (Dosis 2,2 mg/ kg KM) bzw. ReNO iv (Dosis 1,5 mg/ kg KM). Hierzu wurden die tierindividuellen Lösungen zunächst sterilfiltriert und danach über den Katheter injiziert. In der Sammelperiode II war 1 fistuliertes Tier in der Re-Gruppe und 3 fistulierte Tiere in der ReNO-Gruppe enthalten.

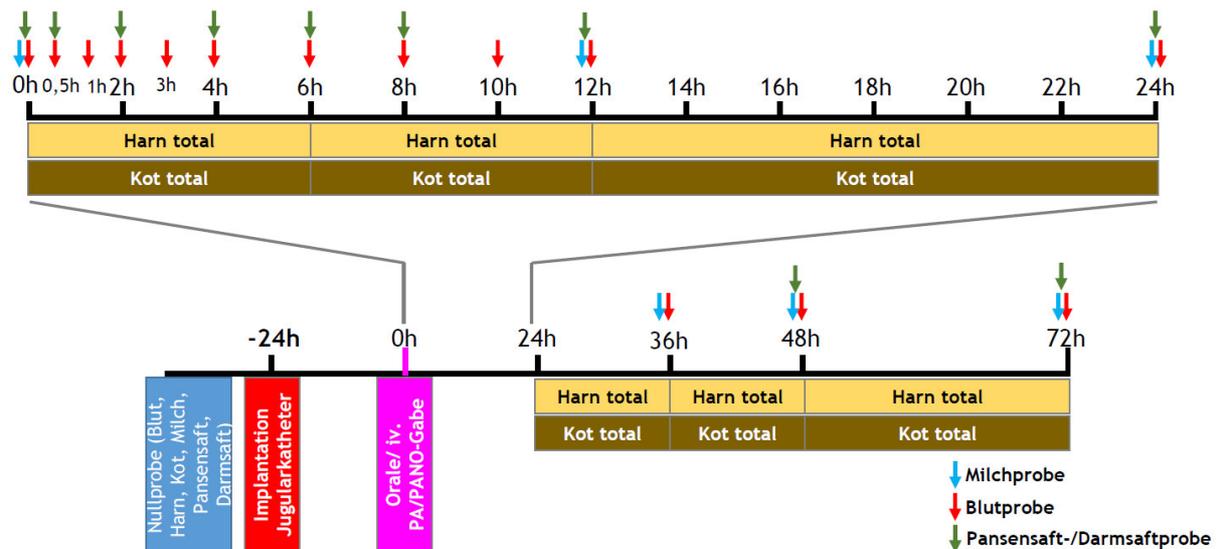


Abbildung 5: Detaillierte Darstellung des Ablaufes einer Sammelperiode des Kinetikversuches bei Milchkühen

### 3.5.1.2. Probenahme

Einzelfutterproben (Krafftutter, Mais – und Grassilage) sowie die TMR wurden über den Versuchszeitraum gepoolt, vermahlen und analytisch untersucht (Weender Analyse, ADF, NDF).

Am Tag vor Verabreichung der jeweiligen Testsubstanz wurden Urin, Kot, Pansen- und Darmsaftproben genommen (Nullprobe) und den Kühen zur stressfreien Blutentnahme ein Venenverweilkatheter gelegt, der nach Ende der jeweiligen Sammelperiode (nach 72h) entfernt wurde. Außerdem wurde an den Kühen ein Urinal zur totalen Urinsammlung befestigt. Die Blut-Nullprobe wurde direkt vor Verabreichung der Testsubstanzen genommen.

Während des Versuches wurden die Tiere zweimal gemolken (ab 5:00Uhr und ab 15:30Uhr), wobei von allen Tieren die Milchleistung erfasst und Milchproben gezogen wurden. Alle weiteren Probenahmen und deren zeitliche Abstände sind in (Abbildung 5) dargestellt.

### 3.5.1.3. Analysen

Die Analysen von Proben des Kinetikversuches wurden analog zu denen des Hauptversuches durchführt und sind im Abschnitt 3.4.1.3 beschrieben. Im Kinetikversuch wurden folgende Analysen durchgeföhrt:

- PA/PANO in Blut, Milch, Pansen- und Darmsaft

- Klinisch-chemische Analyse des Blutserums
- Hämatologie im Blut
- Durchflusszytometrische Bestimmungen
- Comet-Assay
- Bestimmung von Purinen im Harn
- Bestimmung von flüchtigen Fettsäuren im Pansensaft
- Bestimmung vom Ammoniumstickstoff im Pansensaft
- Bestimmung von Laktat im Pansensaft

### 3.5.2. Schafe und Ziegen

#### 3.5.2.1. Tierversuch

Am MRI Kiel wurden gemäß der Genehmigung durch das schleswig-holsteinische Ministerium für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt, Natur und Digitalisierung vom 09.02.2022 (Az. 244-83566/2021 (3-1/22)) die Kinetikversuche an Milchziegen vom 08.03.2022 bis zum 11.03.2022 sowie an Milchschaafen vom 09.05.2022 bis zum 12.05.2022 durchgeführt. Die Tiere wurden 14 Tage vor Versuchsbeginn in der Versuchsstation Schädtkbek aufgestellt. Haltung und Fütterung erfolgten wie im Dosis-Findungsversuch beschrieben. Je drei Tiere einer Spezies wurden in einer Gruppe gehalten.

Basierend auf den Daten aus den bisherigen Versuchen erhielten jeweils 6 Ziegen und Schafe eine einmalige Dosis von 6 mg/kg Körpergewicht oral per Schlundsonde. Dabei wurde je drei Tieren einer Spezies die freie Base Retrorsin und drei Tieren das korrespondierende N-Oxid Retrorsin-NO verabreicht. Die Daten der Versuchstiere sind in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Kinetikversuch an Milchziegen und Milchschaafen - Daten der Versuchstiere

Tierart	Tier-Nr.	Gewicht (kg)	Milchleistung <sup>2</sup> (kg/d)	PA/PANO Dosis einmalig 6 mg/kg
Ziege	51	34,5	1,5	Retrorsin
Ziege	52	48,5	2,8	Retrorsin
Ziege	53	54,0	2,3	Retrorsin

Ziege	54	37,0	1,9	Retrorsin-NO
Ziege	55	46,5	2,0	Retrorsin-NO
Ziege	56	50,5	2,6	Retrorsin-NO
Schaf	61	59,5	0,6	Retrorsin
Schaf	62	64,5	0,5	Retrorsin
Schaf	63	56,5	0,8	Retrorsin
Schaf	64	60,0	0,7	Retrorsin-NO
Schaf	65	63,0	0,9	Retrorsin-NO
Schaf	66	55,0	0,4	Retrorsin-NO

<sup>1</sup> zu Versuchsbeginn, <sup>2</sup> Mittelwert über 7 Tage vor Versuchsbeginn

Zur Überwachung des Gesundheitszustandes wurden die Tiere im Versuchsverlauf bis 3 Wochen nach dem Ende der Probenahme täglich tierärztlich untersucht.

#### 3.5.2.2. Probenahme

Probenahme und Aufbereitung erfolgten wie im Dosis-Findungsversuch beschrieben (Kapitel 3.3). Alle Matrices wurden einen Tag (Ziegen) bzw. vier (Schafe) Tage vor Versuchsbeginn beprobt.

Im Versuchsverlauf wurden Milchproben zweimal täglich an Tag 1, 2, 3 und 4 aus dem Gesamtmelk pro Tier und Melkzeit gewonnen.

Blutproben für die Rückstandsanalytik wurden nach der Supplementierung an Tag 1 innerhalb der ersten 6 Stunden stündlich, danach in 2-Stunden-Abständen bis 12 Stunden nach der Supplementierung entnommen. Weitere Probenahmen erfolgten 24, 36, 48 und 72 Stunden nach der Supplementierung. Die Probenahme für Serologie und Hämatologie erfolgte 6, 12, 24, 48 und 72 h nach Supplementierung.

Pansensaft wurde 1,5 h und 24 h nach Supplementierung entnommen. Kotproben wurden 24, 48 und 72 h nach Supplementierung entnommen. Harnproben wurden als Spontanharn gewonnen.

### 3.6. Untersuchungen zum Metabolismus

#### 3.6.1. Pansenmetabolismus

Die Untersuchungen zur Transformation von PA und PANO im Pansen wurde mittels Batch-Inkubationen von PA- bzw. PANO-Einzelsubstanzen und -Gemischen (inklusive dem Extrakt den Hauptversuchen) mit Pansenchymus von fistulierten Kühen und Schafen durchgeführt (Taenzer et al. 2022). Dafür wurde der Panseninhalt (Flüssigkeit und Feststoffe) drei Stunden nach der morgendlichen Fütterung von drei pluriparen, fistulierten, laktierenden und nicht laktierenden Holstein-Kühen (zwischen 3 und 6 Jahren alt) gesammelt. Gleiche Mengen aus der flüssigen und festen Phase des Panseninhalts aller drei Kühe wurden zusammengeführt und desoxygeniert (Entfernung molekularen Sauerstoffs), um anaerobe Bedingungen zu erhalten. Die Lösungen wurden mit gasförmigem Stickstoff gespült und bei 39°C gehalten. Die Inkubationen wurden nach: 0,5; 1; 2; 6 und 20 Stunden gestoppt. Alle Lösungen wurden massenspektrometrisch untersucht und die entstandenen Pansenmetaboliten der *Senecio* PA wurden identifiziert. Alle Inkubationen wurden mehrfach wiederholt (n=12), sodass über die Verringerung der Analyt-Konzentrationen über die Zeit die Halbwertszeiten der jeweiligen *Senecio* PA (Senecionin, Retrorsin, Seneciphyllin, Jacolin, Jaconin, Jacobin, Erucifolin und Riddelliin und deren PANOs sowie für Senkirkin) bestimmt werden konnten.

#### 3.6.2. Hepatischer Metabolismus

Die Untersuchungen zum hepatischen Metabolismus der *Senecio* PA (Senecionin, Retrorsin, Seneciphyllin, Jacolin, Jaconin, Jacobin, Erucifolin, Riddelliin und Senkirkin sowie deren Pansenmetabolite) wurden mittels Inkubationen der Einzelsubstanzen mit Lebermikrosomen der Spezies Rind und Schaf durchgeführt. Da die korrespondierenden PANOs im Pansen vollständig zur freien PA-Base reduziert werden und so de facto die Leber nicht erreichen, wurden nur die PAs (freie Basen) inkubiert. Zum Vergleich der Ergebnisse wurden die PAs zusätzlich mit Human- und Rattenmikrosomen umgesetzt, da hierzu in der Literatur eine breitere Datenbasis vorliegt. Zur Simulation des Phase-I-Metabolismus wurde eine Inkubationsmischung bestehend aus 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7,5), 33 mM Kaliumchlorid, 8mM Magnesiumchlorid, 1mM Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid Phosphat, 5 mM Glucose-6-phosphat und 0,5 U/mL Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase verwendet. Die Lebermikrosomen wurden auf eine Protein-Endkonzentration von 1 mg/ml verdünnt. Der Phase-II-Stoffwechsel wurde für zwei Co-Faktoren getestet: die Konjugation mit Glutathion und die Glukuronidierung (Glutathion und UDP-Glucuronsäure waren in einer Endkonzentration von 5 mM

zugesetzt). Die Mischungen wurden bei 37 °C mit den PAs (15 µM) inkubiert und die Reaktionen wurden durch Zugabe von eiskaltem Methanol mit 1% Ammoniumformiat zu verschiedenen Zeitpunkten gestoppt (Zeit=0 min, 5 min 10 min, 30 min, 60 min, 120 min) (Geburek et al. 2020a; Geburek et al. 2020b). Pro PA und Spezies wurden die Experimente mindestens dreifach wiederholt. Die Abbauraten der PAs (sowie deren Pansenmetabolite) und die Bildung von Lebermetaboliten wurden mittels LC-MS bestimmt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Charakterisierung des Extraktes

Die Extraktion von entsprechenden Mengen von Jakobskreuzkraut kostete mehr Zeit als erwartet. Entgegen den ursprünglichen Planungen zur Herstellung eines einheitlichen Extraktes, der in allen Versuchen verwendet werden sollte, erfolgte die Extraktion in drei Chargen. Die drei Extraktchargen wurden hinsichtlich ihres PA/PANO-Gehaltes und ihres PA/PANO-Profiles untersucht. Die Analyseergebnisse des getrockneten Pflanzenmaterials sowie der drei Chargen sind in Tabelle 7 dargestellt. Im Extrakt für den Schafversuch ist bereits berücksichtigt, dass Extrakt der Dosis-Findungsstudie und des Rinderversuchs jeweils zu 50 % eingesetzt wurden. Während der Extrakt der Dosis-Findungsstudie eine recht ähnliche Zusammensetzung wie das Ausgangsmaterial aufwies, war bei den Extrakten von Rind und Ziege ein geringerer PANO Anteil auffällig.

Tabelle 7: Charakterisierung des JKK Ausgangsmaterials und der daraus gewonnenen Extraktchargen

<b>Analyt</b>	<b>getrockenes JKK-Pflanzen- material</b>	<b>Extrakt 1 Dosis- Findung</b>	<b>Extrakt 2 Rind</b>	<b>Extrakt 3 Ziege</b>	<b>Extrakt 1 und 2 (1:1) Schaf</b>
<b>PA-Gesamt [mg/kg]</b>	<b>2480</b>	<b>6685</b>	<b>4184</b>	<b>3769</b>	<b>5435</b>
<b>PA-Anteil [%]</b>	<b>12,0</b>	<b>19,8</b>	<b>65,6</b>	<b>68,7</b>	<b>37,4</b>
<b>PANO-Anteil [%]</b>	<b>88,0</b>	<b>80,2</b>	<b>34,4</b>	<b>31,3</b>	<b>62,6</b>
Erucifolin [%]	1,0	2,6	6,4	7,4	4,1
Erucifolin NO [%]	15,8	16,3	4,9	4,1	11,9
<b>Erucifolin-total [%]</b>	<b>16,8</b>	<b>18,9</b>	<b>11,3</b>	<b>11,5</b>	<b>16</b>
Jacobin [%]	7,1	7,1	5,7	6,5	6,6
Jacobin NO [%]	31,9	19,5	2,9	1,3	13,1
<b>Jacobin-total [%]</b>	<b>39</b>	<b>26,6</b>	<b>8,6</b>	<b>7,8</b>	<b>19,7</b>
Jacolin [%]	0,6	1,0	3,3	4,5	1,9
Jacolin NO [%]	1,2	2,1	0,9	1,0	1,6
<b>Jacolin-total [%]</b>	<b>1,8</b>	<b>3,1</b>	<b>4,2</b>	<b>5,5</b>	<b>3,5</b>
Jaconin [%]	1,3	3,9	33,9	30,2	15,4
Jaconin NO [%]	6,0	9,6	7,5	9,3	8,8
<b>Jaconin-total [%]</b>	<b>7,3</b>	<b>13,5</b>	<b>41,4</b>	<b>39,5</b>	<b>24,2</b>
Retrorsin [%]	0,0	0,7	1,8	2,0	1,1
Retrorsin NO [%]	4,9	3,2	2,3	2,1	2,9
<b>Retrorsin-total [%]</b>	<b>4,9</b>	<b>3,9</b>	<b>4,1</b>	<b>4,1</b>	<b>4</b>
Riddelliin [%]	0,0	0,3	1,3	1,3	0,7
Riddelliin NO [%]	4,2	1,9	1,5	1,3	1,7
<b>Riddelliin-total [%]</b>	<b>4,2</b>	<b>2,2</b>	<b>2,8</b>	<b>2,6</b>	<b>2,4</b>
Senecionin [%]	0,6	1,6	5,6	6,9	3,2
Senecionin NO [%]	5,8	13,2	6,9	6,0	10,8
<b>Senecionin-total [%]</b>	<b>6,4</b>	<b>14,8</b>	<b>12,5</b>	<b>12,9</b>	<b>14</b>
Seneciphyllin [%]	1,5	2,4	7,4	9,8	4,3
Seneciphyllin NO [%]	18,2	14,4	7,5	6,3	11,7
<b>Seneciphyllin-total [%]</b>	<b>19,7</b>	<b>16,8</b>	<b>14,9</b>	<b>16,1</b>	<b>16</b>
<b>Senkirkin [%]</b>	<b>0,0</b>	<b>0,1</b>	<b>0,2</b>	<b>0,1</b>	<b>0,2</b>

Der im PA-SAFE-FEED Projekt eingesetzte Extrakt aus Jakobskreuzkraut fällt im Vergleich zu anderen in der Literatur veröffentlichten Materialien durch einen sehr hohen Jaconin-Anteil (PA/PANO) auf. Während in der Literatur dieses Alkaloid durchschnittlich 1% ausmacht, stellt Jaconin bei den Extrakten von Rind und Ziege sogar die Hauptkomponente dar (Kapitel 5.1).

Die Aufkonzentrierung der PAs in den Extrakten war geringer als gewünscht, so dass im Vorversuch insbesondere zur Erzielung der höchsten Dosierungen von 12 mg PA/PANO pro kg Körpergewicht große Mengen an Extrakt pro Tier verabreicht werden mussten.

## 4.2. Dosis-Findungs-Studie

### 4.2.1. Klinisches Monitoring

Im Dosis-Findungsversuch wurde der PA/PANO-Extrakt täglich als einmaliger Bolus nach dem Morgenmelken per Maulspritze verabreicht. Die Akzeptanz der Supplementierung hing dabei deutlich mit der durch die jeweilige Dosierungshöhe bedingten Menge des Extraktes zusammen. Die Tiere der beiden niedrigsten Dosierungsstufen nahmen die tägliche Supplementierung meist problemlos auf. Dagegen wurden höhere Dosierungsstufen von beiden Spezies deutlich schlechter akzeptiert. Ziege 4 (höchste Dosisstufe) zeigte deutliche Abwehrbewegungen und verschluckte sich bereits an Tag 1 an dem Extrakt.

Die Tiere der Dosierungsstufen 1 und 2 zeigten im Versuchsverlauf keine klinischen Auffälligkeiten. Dagegen traten bei beiden Tieren der dritten Dosierungsstufe (5,83 mg/kg) Befunde auf, die mit der Supplementierung in Zusammenhang gebracht werden können. So zeigte Ziege 3 zwischen Tag 9 und Tag 18 nach der morgendlichen Eingabe ein reduziertes Allgemeinbefunden (Absonderung von der Gruppe, Apathie, keine Futteraufnahme), das sich aber im Zeitraum von bis zu einer Stunde nach der Extraktgabe wieder normalisierte. Bei Schaf 7 trat eine Reduktion der Pansenmotorik auf, die sich am 25. Versuchstag bis zum vollständigen Pansenstillstand verschlechterte. Daher wurde die Supplementierung bei diesem Tier an Tag 26 abgebrochen. Unter tierärztlicher Behandlung verbesserte sich die Pansenmotorik, normalisierte sich aber bis zum Versuchsende nicht vollständig.

Bei den Tieren der höchsten Dosierungsstufe (11,65 mg/kg) traten bereits ab Tag 2 der Supplementierung deutliche Symptome auf. Ziege 4 zeigte Absonderung von der Gruppe, Apathie, Drängen gegen die Wand, vermehrtes Liegen sowie Einstellung der Futteraufnahme und des Wiederkauens. Bei diesem Tier wurde die Supplementierung von Tag 3 bis Tag 6 unterbrochen. Nach Abbruch der PA/PANO-Gabe traten keine Symptome mehr auf. Da sich im Rahmen einer serologischen Untersuchung kein deutlicher Hinweis auf eine Leberbeeinträchtigung ergab, wurde die Supplementierung an Tag 7 mit reduzierter Dosis (7,77 mg/kg) wieder aufgenommen. Auch bei dieser Dosis entwickelte Ziege 4 erneut Symptome (reduziertes Allgemeinbefinden, Einstellen der Futteraufnahme, Verminderung der Pansenmotorik und des Wiederkauens), die sich wie bei Ziege 3 im Laufe einer Stunde nach Eingabe des Extraktes normalisierten. An Tag 14 zeigte sich jedoch selbst nach 8 Stunden keine Pansenaktivität. Zusätzlich wies das Tier eine erhöhte Herz- und Atemfrequenz, einen Ikterus sowie eine erhöhte Körpertemperatur auf. Wegen Verdacht auf Aspirationspneumonie wurde das Tier am Abend von Tag 14 euthanasiert und am nächsten Tag zur Sektion und Probenahme in die Pathologie des Landeslabors Schleswig-Holstein gebracht.

Schaf 8 zeigte zunächst einen Rückgang der Kraftfutteraufnahme sowie eine reduzierte Milchleistung. Ab dem 4. Versuchstag trat Durchfall auf, der sich an Tag 5 stark verschlechterte. Daher wurde die Supplementierung an Tag 6 abgebrochen. Die klinischen Symptome normalisierten sich anschließend innerhalb von 5 Tagen.

Schaf 8 zeigte zunächst einen Rückgang der Kraftfutteraufnahme sowie eine reduzierte Milchleistung. Ab dem 4. Versuchstag trat zusätzlich Durchfall auf, der sich an Tag 5 stark verschlechterte. Daher wurde die Supplementierung an Tag 6 abgebrochen. Die klinischen Symptome normalisierten sich anschließend innerhalb von 5 Tagen.

### Milchmenge

Die Entwicklung der Milchleistung über den Versuchszeitraum ist in Abbildung 6 für die beiden Tierarten dargestellt.

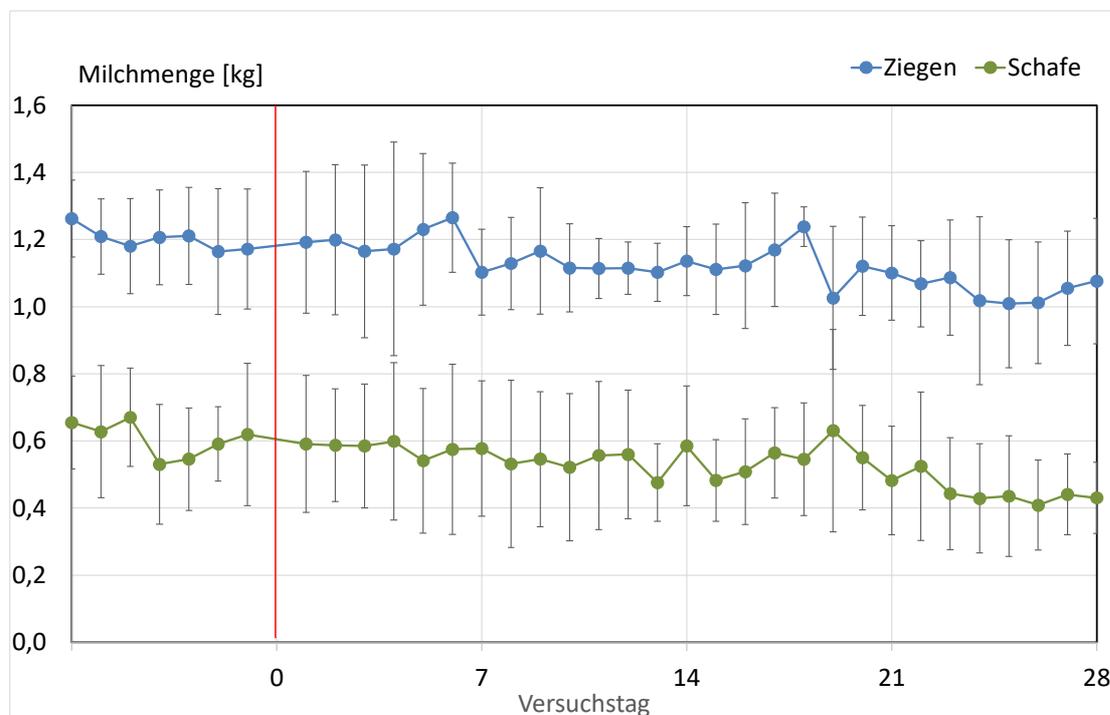


Abbildung 6: Dosis-Findungs-Studie an Milchziegen und Milchschaafen – Milchleistung in kg pro Tag ( $\bar{X} \pm SD$ ), n = 4 pro Tierart (Ziegen n=3 ab Tag 15)

Die durchschnittlichen Milchleistungen beider Tierarten unterschieden sich deutlich. Die Tagesleistung bei den Ziegen lag in der Regel mehr als doppelt so hoch wie bei den Schafen, obwohl die Ziegen deutlich kleiner und leichter waren. Zudem befanden sich die Ziegen bereits im 7. bis 10. Laktationsmonat; also im letzten Drittel der Laktation. Die Schafe waren alle im 4. Laktationsmonat, da sie erst in der Jahresmitte gelammt hatten. Die Schafmilch weist aber auch einen deutlich höheren

Fettgehalt auf. Die hohen Standardabweichungen zeigen bei beiden Tierarten große tierindividuelle Unterschiede an. Während unter den Ziegen die leichteren Tiere eine etwas geringere Milchleistung aufwiesen, gab es bei den Schafen keinen Zusammenhang zwischen Körpergewicht und Milchleistung. Bei der Betrachtung der Konzentrationen von PA/PANO-Rückständen in Milch ebenso wie bei der Berechnung von Transferraten sind diese Aspekte zu berücksichtigen.

#### 4.2.2. Serologie

Die Auswertung der Messwerte von Leberenzymen wurde durch die je nach Literaturquelle stark divergierenden Referenzwertangaben erschwert. So lagen je nach Quelle einige Ausgangswerte bereits leicht oberhalb des Referenzbereichs, während im Versuchsverlauf deutlich ansteigende Gehalte noch innerhalb der Normalwerte lagen. Um einen Anstieg der Leberenzymwerte unter der PA/PANO-Supplementierung darzustellen, wurde daher tierindividuell der Wert der Kontrollprobe mit dem des letzten Versuchstages verglichen. Bei Schaf 8 wurde zusätzlich der Verlauf der Enzymwerte zwischen Kontrollprobe und Versuchsabbruch abgeglichen. Bei einem Anstieg des Ausgangswertes um einen Faktor von  $\geq 2,0$  wurde die Erhöhung als „deutlicher Anstieg“ gewertet.

Die Verläufe der wichtigsten Leberenzymwerte Aspartat-Aminotransferase (AST), Gamma-Glutamyltransferase (GGT), Glutamatdehydrogenase (GLDH) sowie der Verlauf der Bilirubin- und der Fettsäurekonzentration werden in den folgenden Abbildungen dargestellt.

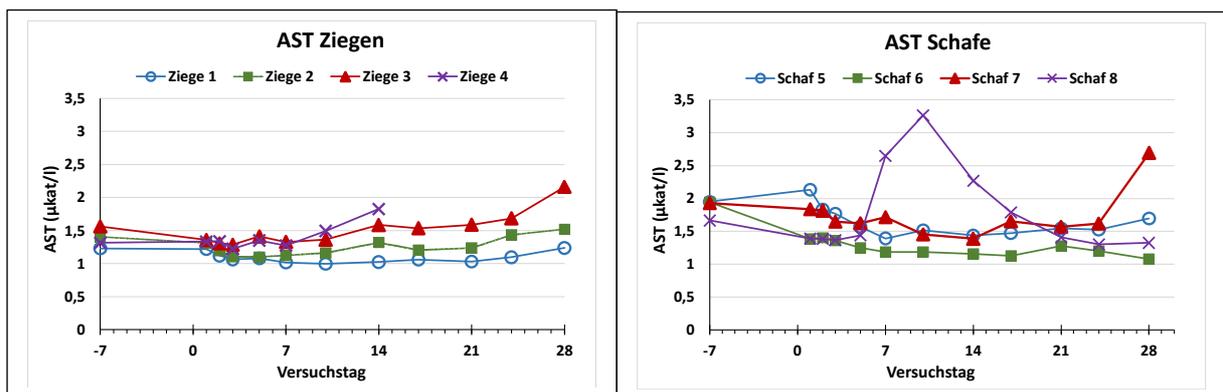


Abbildung 7: Aktivitäten des Enzyms Aspartat-Aminotransferase (AST) im Serum der Versuchstiere. Abbruch des Versuchs bei Ziege 4 an Tag 14, Abbruch der Supplementierung bei Schaf 8 an Tag 5, bei Schaf 7 an Tag 26

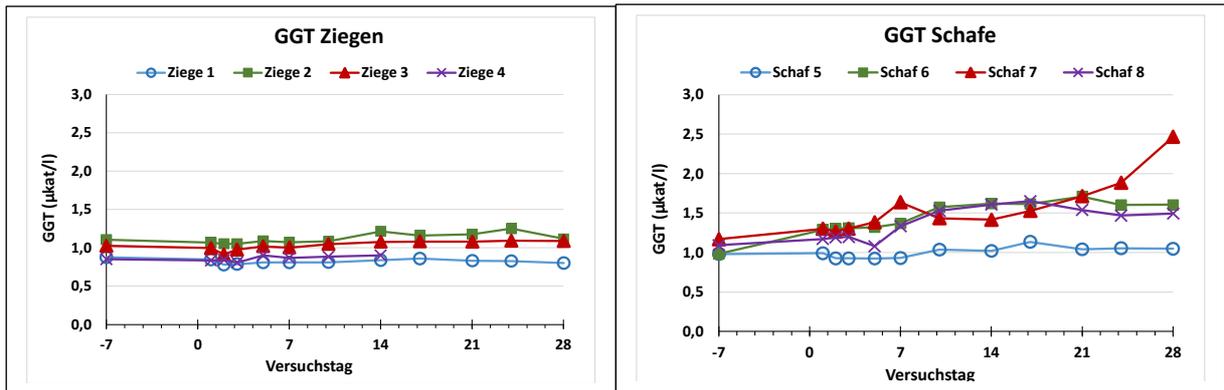


Abbildung 8: Aktivitäten des Enzyms Gamma-Glutamyltransferase (GGT) im Serum der Versuchstiere. Abbruch des Versuchs bei Ziege 4 an Tag 14, Abbruch der Supplementierung bei Schaf 8 an Tag 5, bei Schaf 7 an Tag 26

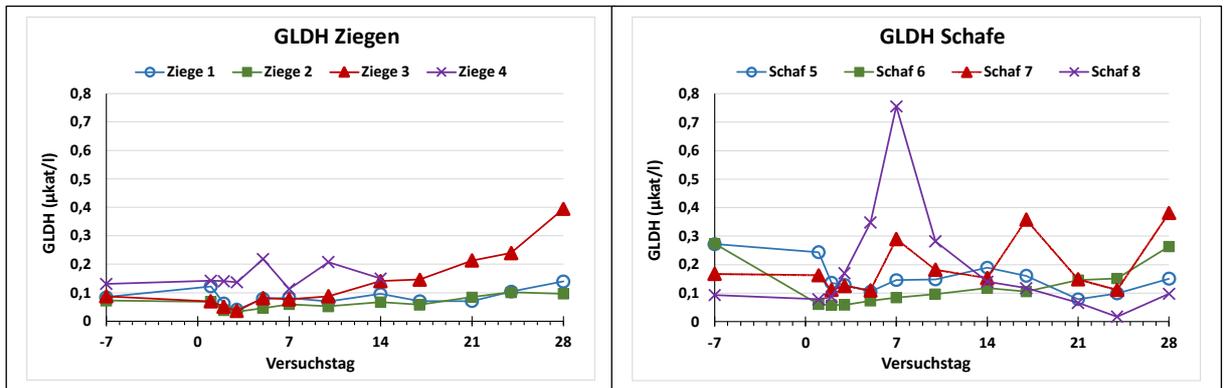


Abbildung 9: Aktivitäten des Enzyms Glutamatdehydrogenase (GLDH) im Serum der Versuchstiere. Abbruch des Versuchs bei Ziege 4 an Tag 14, Abbruch der Supplementierung bei Schaf 8 an Tag 5, bei Schaf 7 an Tag 26

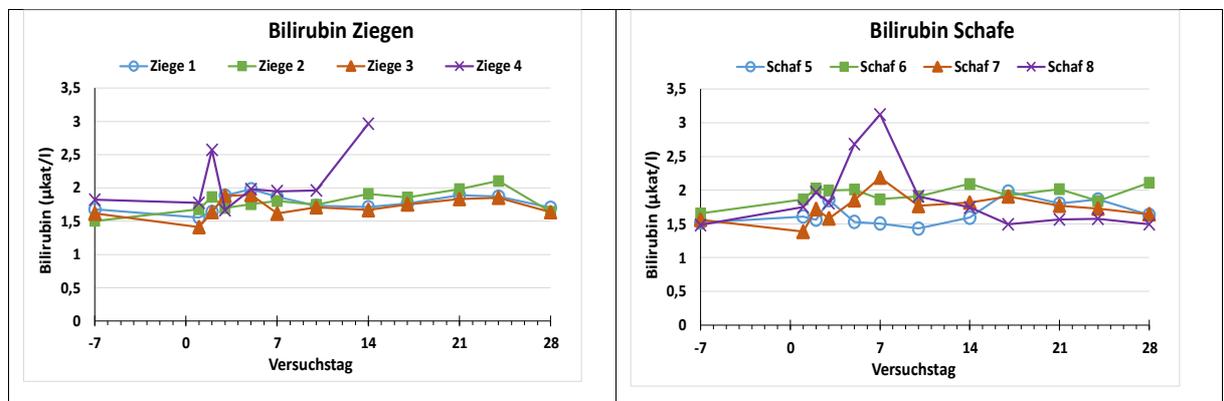


Abbildung 10: Verlauf der Bilirubinkonzentration im Serum der Versuchstiere. Abbruch des Versuchs bei Ziege 4 an Tag 14, Abbruch der Supplementierung bei Schaf 8 an Tag 5, bei Schaf 7 an Tag 26

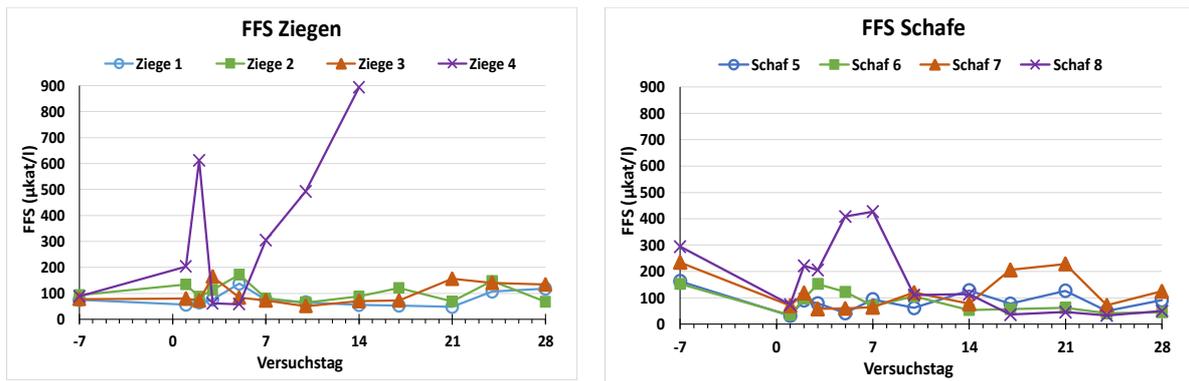


Abbildung 11: Verlauf der Konzentration freier Fettsäuren (FFS) im Serum der Versuchstiere. Abbruch des Versuchs bei Ziege 4 an Tag 14, Abbruch der Supplementierung bei Schaf 8 an Tag 5, bei Schaf 7 an Tag 26

In den beiden niedrigeren Dosisgruppen 1 und 2 blieben die Leberwerte sowie die Bilirubin- und Fettsäurekonzentration über den gesamten Versuchsverlauf auf niedrigem Niveau, während in den höheren Dosisgruppen 3 und 4 Veränderungen auftraten.

Ziege 3 und Schaf 7 (Dosierung 5,83 mg/kg) zeigten keine deutlichen Veränderungen der Bilirubin- und Fettsäurekonzentration, aber bei mehreren als einem Enzymen tendenziell Anstiege zum Ende des Versuchs. Diese waren für GLDH bei beiden Tieren deutlich: Ziege 3 – 4,5-fach, Schaf 7 – 2,3-fach. Bei Schaf 7 war zusätzlich GGT am Versuchsende um das 2,1-fache erhöht.

Bei Ziege 4 (Dosierung 11,65 und 7,77mg/kg) konnten trotz des Auftretens der klinischen Symptome bis zum Versuchsabbruch keine deutliche Erhöhung der Leberenzyme festgestellt werden. Bei der Bilirubinkonzentration konnte an Tag 3 und Tag 14 jeweils ein leichter Anstieg verzeichnet werden, der nach Unterbrechung der Supplementierung an Tag 3 bereits bis Tag 5 wieder zurückging. Nach Wiederaufnahme der Supplementierung mit verringerter Dosis stieg die Konzentration erneut an. Da das Tier an Tag 14 euthanasiert wurde, kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob der Anstieg im weiteren Versuchsverlauf deutlich ( $\hat{=}$  über 2-fach) gewesen wäre. Parallel zu den ansteigenden Bilirubinwerten kam es zu einem deutlichen Anstieg der freien Fettsäuren (FFS), die an Tag 7 um das 7-fache und an Tag 14 um das 10-fache erhöht waren.

Schaf 8 (Dosierung 11,65 mg/kg) zeigte deutliche Anstiege bei den Leberwerten AST, GLDH und Bilirubin. Dabei traten die höchsten Werte der GLDH (8-fach) und der Bilirubinkonzentration (2-fach) am 7. Versuchstag – also nach Versuchsabbruch - auf, während die höchste AST-Konzentration (2-fach) erst am 10. Versuchstag gemessen wurde. Im Gegensatz dazu stiegen die freien Fettsäuren um den 7.

Versuchstag nur leicht an (1,5- fach). Nach dem Abbruch der Supplementierung fielen alle Werte wieder auf das Ausgangsniveau zurück.

#### 4.2.3. Pathologie

##### – Sektion - makroskopische Befunde

Die Leber von allen Tieren war bei der Sektion überwiegend unauffällig. Bei Ziege 3 (Dosis 6 mg/kg) wurde eine geringgradige Brüchigkeit festgestellt. Die Leber von Schaf 8 (Dosis 12 mg/kg) zeigte eine Stauung mit erweiterten Gefäßen sowie eine Verdickung der Gallenblasenwand.

Bei keinem der Tiere konnten in Lunge und Niere makroskopische Hinweise auf toxinbedingte Veränderungen festgestellt werden.

Bei der vorzeitig euthanasierten Ziege 4 wurde eine eitrige Spitzenlappenpneumonie mit Veränderungen an ca. 20 % der Lunge festgestellt. Die Lokalisation im Spitzenlappen ist typisch für eine Aspirationspneumonie und passend zu dem Verschlucken bei der Eingabe des Extraktes am ersten Tag der Supplementierung.

Bei allen Tieren wurden im Dünndarm makroskopisch Hinweise auf eine gering-/mittel- bzw. hochgradige katarrhalische Enteritis gefunden. Ein Zusammenhang zwischen Stärke der Veränderungen und PA/PANO-Dosisstufe war nicht erkennbar. Es ist aber nicht auszuschließen, dass diese Veränderungen auf die hohe Zuckerkonzentration im Extrakt und dadurch bedingte Verdauungsstörungen zurückzuführen sind.

##### – Sektion - histopathologische Befunde

Besonders von Interesse sind die Befunde der Leber als Hauptzielorgan der PA/PANO-Toxizität.

Bei allen Tieren traten unabhängig von der Dosierung histologische Befunde wie Megakaryosen, mehrkernige Hepatozyten, Hepatozytenschwellungen- und Nekrosen, Vakuolisierung von Zellen sowie Entzündungsreaktionen auf. Da derartige Befunde typischerweise im Rahmen von toxischen Leberzellschädigungen entstehen, scheinen sie mit der PA/PANO-Supplementierung zusammenzuhängen.

#### 4.2.4. Zusammenfassung

Tabelle 8 fasst die wesentlichen Befunde nach PA/PANO-Supplementierung pro Dosisgruppe zusammen. Die Tiere der Dosierungsstufen 1 und 2 zeigten im Versuchsverlauf keine klinischen Auffälligkeiten, während jeweils beide Tiere der dritten und vierten Dosierungsstufe klinische Befunde

zeigten, die bei drei Tieren (Ziege 4, sowie Schaf 7 und Schaf 8) zum Abbruch der Supplementierung führten. Erhöhungen der Leberenzymwerte konnten bei drei der klinisch auffälligen Tiere (Ziege 3, Schaf 7 und Schaf 8) beobachtet werden. Das Ausbleiben einer deutlichen Erhöhung der Leberenzymwerte bei Ziege 4 könnte durch die kurze Supplementierungsdauer bedingt sein.

Bei allen Tieren konnten histologische Hinweise auf toxische Leberzellschäden festgestellt werden, die mit der PA- Supplementierung im Zusammenhang stehen können. Eine Einstufung in Schweregrade war durch die Heterogenität der Befunde nicht möglich.

Tabelle 8: Zusammenfassung der wesentlichen Befunde nach PA/PANO-Supplementierung pro Dosisgruppe

Gruppe/Dosis	Tier	Klinik	Serologie	Patho-Histologie der Leber - Hinweis auf toxische Leberzellschäden
Gruppe 1 1,46 mg/kg	Ziege 1	-	-	+
	Schaf 5	-	-	+
Gruppe 2 2,91 mg/kg	Ziege 2	-	-	+
	Schaf 6	-	-	+
Gruppe 3 5,83 mg/kg	Ziege 3	+	GLDH +	+
	Schaf 7	+	GGT +, GLDH +	+
Gruppe 4 11,65 mg/kg	Ziege 4*	+	FFS +	+
	Schaf 8	+	AST +, GLDH +, Bilirubin +	+

**Klinik:** - = keine klinischen Befunde im Verlauf der Supplementierung, + klinische Befunde im Verlauf der Supplementierung; **Serologie:** - = kein Anstieg der Leberenzyme über den 2-fachen Ausgangswert, + = Erhöhung >2 bis 10-fach; \*Ziege 4 ab Tag 7 Supplementierung mit reduzierter Dosis (7,77 mg/kg), Versuchsabbruch an Tag 14; **Patho-Histologie Leber:** + = Hinweis auf toxische Leberzellschäden;

### 4.3. Transferstudien

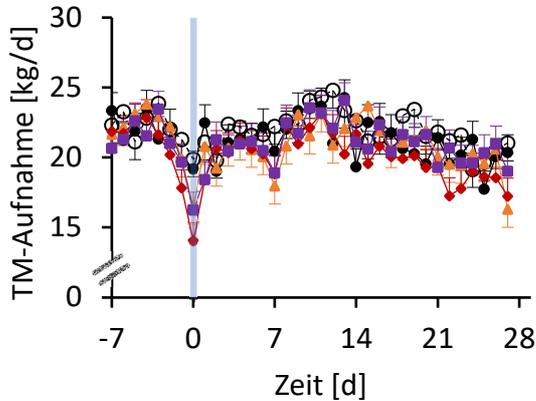
#### 4.3.1. Tiergesundheitliche Aspekte

##### 4.3.1.1. Ergebnisse Rinder

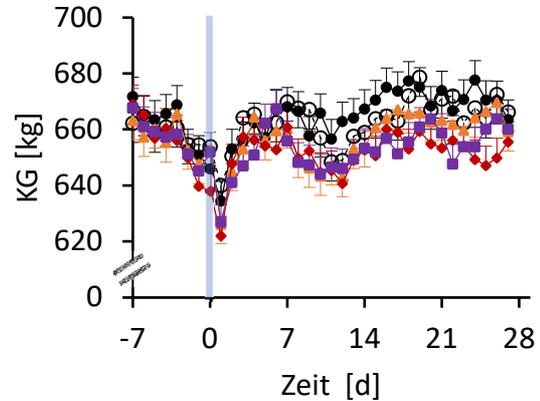
Alle Milchkühe zeigten während des gesamten Versuches keine klinischen Auffälligkeiten. Erhobene Leistungsparameter (Darstellung ausgewählter Parameter in Abbildung 12) zeigten keine signifikanten Gruppeneffekte. Hierbei konnte lediglich ein Zeiteffekt registriert werden, der durch den Abfall der

TM-Aufnahme am Versuchsbeginn und des daraus resultierenden geringeren KG und der Milchleistung am Folgetag zustande kam.

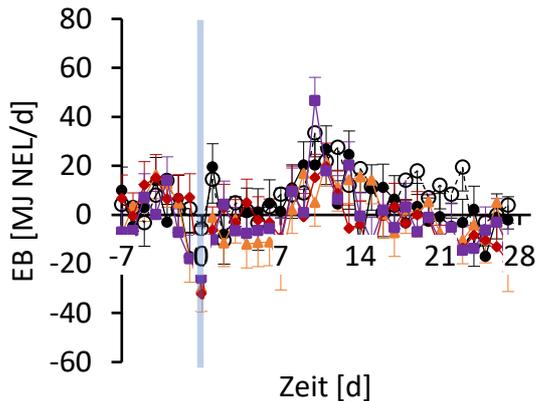
[A]



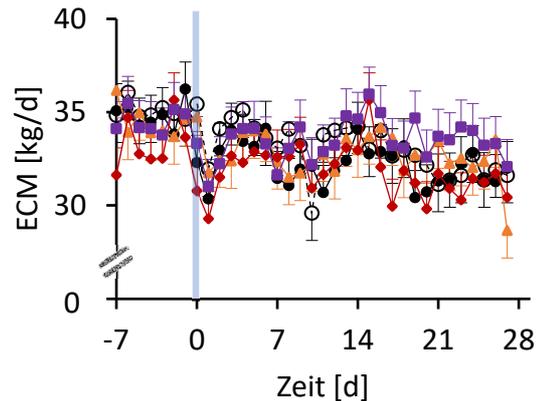
[B]



[C]



[D]



--○-- CON<sub>Wasser</sub>    ● CON<sub>Molasses</sub>    ▲ PA1    ◆ PA2    ■ PA3

Abbildung 12: Zeitlicher Verlauf, von einer Woche vor Beginn bis zum Ende des Versuchs, der Trockenmasse (TM)-Aufnahme [A], des Körpergewichts (KG) [B], der Energiebilanz (EB) [C] und der energiekorrigierten Milchleistung (ECM) [D] bei Milchkühen in Abhängigkeit von den Pyrrolizidinalkaloid (PA)/N-Oxid (NO)-Expositionsgruppen: CON<sub>Wasser</sub> ○ (<0,01 mg (PA/PANO)/kg KG/d), CON<sub>Molasse</sub> ● (<0,01 mg (PA/PANO)/kg KG/d), PA/PANO-1 ▲ (0,47 mg (PA/PANO)/kg KG/d), PA/PANO-2 ◆ (0,95 mg (PA/PANO)/kg KG/d), PA/PANO-3 ■ (1,91 mg (PA/PANO)/kg KG/d). Die Symbole stellen die LS-Means (n=4) mit Standardfehler dar. Der hellblaue Balken zeigt Tag 0, den Beginn der Studie.

**p-Werte:** **TM-Aufnahme:** Gruppe: p=0,414, Tag: p<0,001, Gruppe x Tag: p=0,824; **KG:** Gruppe: p=0,945, Tag: p<0,001, Gruppe x Tag: p=0,960; **EB:** Gruppe: p=0,782, Tag: p<0,001, Gruppe x Tag: p=0,948; **ECM:** Gruppe: p=0,079, Tag: p<0,001, Gruppe x Tag: p=0,922  
CON = Kontrolle; d = Tag; DM = Trockenmasse

Auch die erhobenen Milchinhaltsstoffe (Milchfett-, Protein-, Harnstoff- und Laktosegehalt, somatische Zellzahl (SCC)) blieben von den Behandlungen unbeeinflusst. Der Fett-, Harnstoff- und Laktosegehalt sowie das Fett-Eiweiß-Verhältnis zeigten eine signifikante zeitabhängige ( $p_{\text{Day}} < 0,001$ ) Veränderung während des Versuchs (nicht dargestellt).

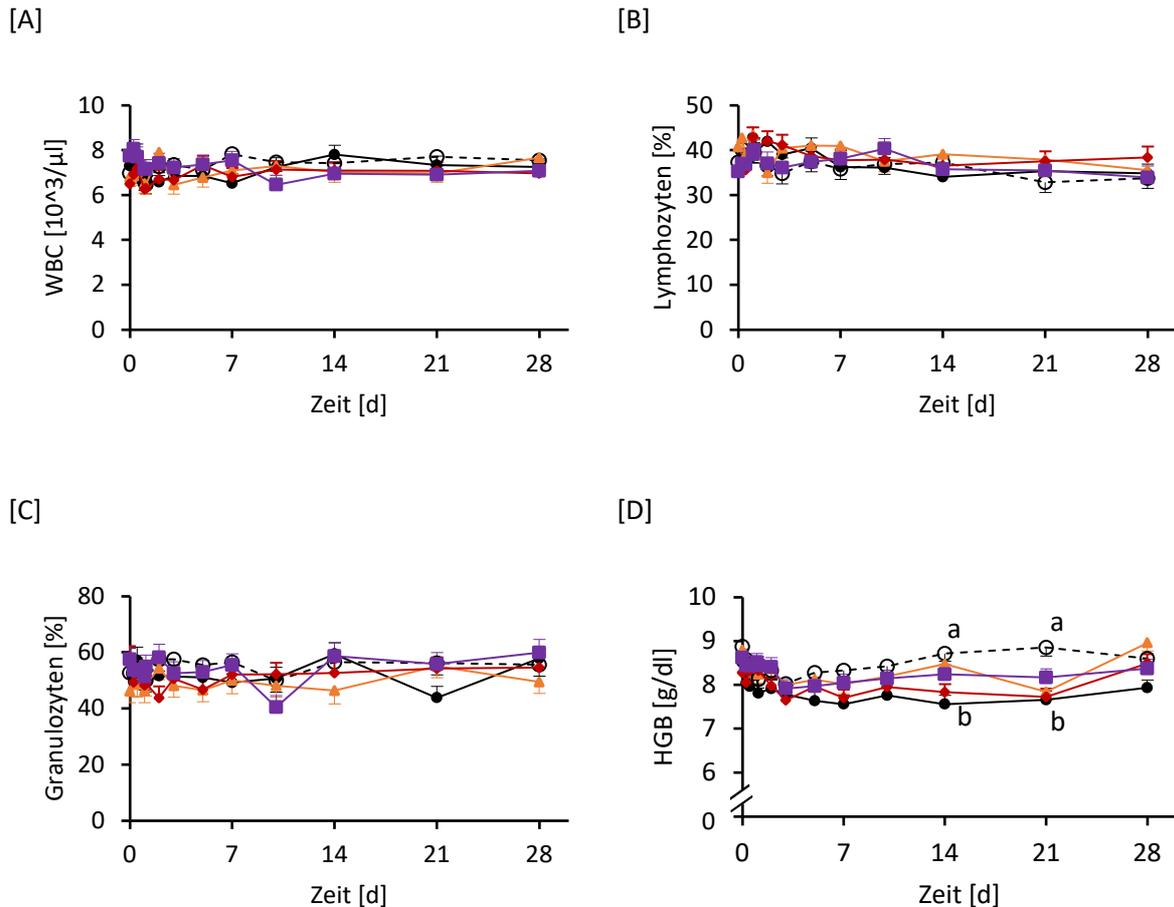


Abbildung 13: Vorläufige Daten zum zeitlichen Verlauf der Konzentration der Zellen des weißen Blutbildes (WBC) [A], zugehörig Lymphozyten [B] und Granulozyten [C], sowie die Hämoglobinkonzentration (HGB, rotes Blutbild) [D] im Differentialblutbild der Versuchsgruppen: CON<sub>Wasser</sub> ○ (<0,01 mg (PA/PANO)/kg KG/d), CON<sub>Molasse</sub> ● (<0,01 mg (PA/PANO)/kg KG/d), PA/PANO-1 ▲ (0,47 mg (PA/PANO)/kg KG/d), PA/PANO-2 ◆ (0,95 mg (PA/PANO)/kg KG/d), PA/PANO-3 ■ (1,91 mg (PA/PANO)/kg KG/d). Dargestellt sind die LS means mit Standardfehler als Fehlerindikatoren. Buchstabenindizes (a,b) zeigen Signifikante Unterschiede an.  
**p-Werte:** **WBC:** Gruppe:  $p=0,670$ , Zeit:  $p<0,001$ , Gruppe x Zeit:  $p=0,209$ ; **Lymphozyten:** Gruppe:  $p=0,578$ , Zeit:  $p<0,001$ , Gruppe x Zeit:  $p=0,720$ ; **Granulozyten:** Gruppe:  $p=0,079$ , Zeit:  $p=0,185$ , Gruppe x Zeit:  $p=0,862$ ; **HGB:** Gruppe:  $p=0,015$ , Zeit:  $p<0,001$ , Gruppe x Zeit:  $p=0,100$  ;  
 CON = Kontrolle; d = Tag; KG = Körpergewicht; PA = Pyrrolizidinalkaloide; PANO = Pyrrolizidinalkaloid N-Oxide

Bei der Betrachtung des Differentialblutbildes fällt auf, dass sowohl beim roten Blutbild, bei den Thrombozyten (nicht dargestellt), als auch beim weißen Blutbild signifikante Zeiteffekte zu erkennen sind. Jedoch weisen die einzelnen Parameter eine relativ hohe individuelle Streuung innerhalb der Gruppen auf. Einige assoziierte Parameter des roten Blutbildes (Hämoglobinkonzentration (Abbildung 13, [D]), mittleres korpuskulares Hämoglobin, mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration, Erythrozytenverteilungsbreite) variieren nicht nur über die Zeit, sondern zeigen auch signifikante Gruppeneffekte. Aufgrund der weiten Streuung der Werte der Kontrollgruppen ist dieser Effekt jedoch nicht auf die PA/PANO Exposition zurückzuführen. Insgesamt entsprechen alle Werte dem Bereich klinisch gesunder Tiere.

Zur weiteren Differenzierung der Leukozyten wurden verschiedene Untergruppen mittels Durchflusszytometrie klassifiziert. Während die Expressionsdichte der B-Zellen (CD 21 MFI), T-Helferzellen (CD 4 MFI), zytotoxische T-Zellen (CD 8 MFI) und Monozyten (CD 14 MFI) von der Behandlung unbeeinflusst blieb, konnten bei diesen Parametern zeitliche Effekte ( $p < 0,001$ ) durch eine Abnahme insbesondere in der ersten Versuchswoche registriert werden.

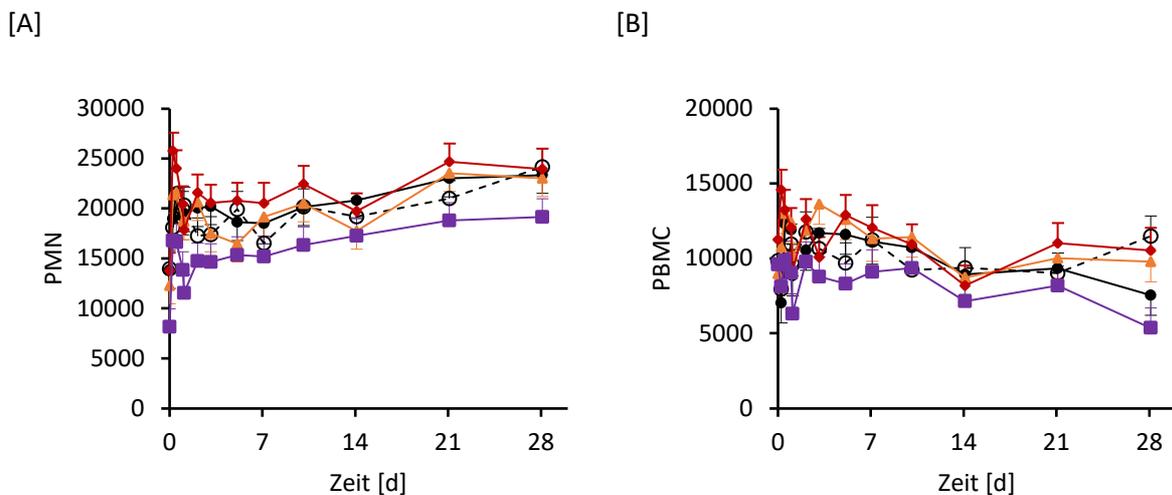


Abbildung 14 Vorläufige Daten zum zeitlichen Verlauf des durch TPA induzierten oxidativen Ausbruchs der polymorphkernigen Neutrophilen (PMN) [A] und der mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) [B] der Versuchsgruppen: CON<sub>Wasser</sub> ○ (<0,01 mg (PA/PANO)/kg KG/d), CON<sub>Molasse</sub> ● (<0,01 mg (PA/PANO)/kg KG/d), PA/PANO-1 ▲ (0,47 mg (PA/PANO)/kg KG/d), PA/PANO-2 ◆ (0,95 mg (PA/PANO)/kg KG/d), PA/PANO-3 ■ (1,91 mg (PA/PANO)/kg KG/d). Dabei wurde die Kapazität jeder Zelle zur intrazellulären Oxidation als mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) ausgedrückt. Dargestellt sind die LS means mit Standardfehler als Fehlerindikatoren.

**p-Werte:** TPA PMN MFI: Gruppe:  $p=0,013$ , Zeit:  $p < 0,001$ , Gruppe x Zeit:  $p=0,932$ ; TPA PBMC MFI: Gruppe:  $p=0,024$ , Zeit:  $p < 0,001$ , Gruppe x Zeit:  $p=0,361$

CON = Kontrolle; d = Tag; KG = Körpergewicht; PA = Pyrrolizidinalkaloide; PANO = Pyrrolizidinalkaloid N-Oxide

Der TPA induzierte oxidative Ausbruch (Abbildung 14) der PMN und PBMC wurde durch einen Abfall der Kapazität bei der am höchsten exponierten Gruppe charakterisiert. Im weiteren Versuchsverlauf blieb die Kapazität dieser Gruppe unterhalb der anderen Gruppen, was zu einem signifikanten Zeit- und Gruppeneffekt dieser Parameter führte. Auch bei der phagozytotischen Kapazität der PBMC und PMN und der Apoptose von frühapoptotischen, spätapoptotischen und nekrotischen PMN wurde kein Behandlungseffekt registriert. Jedoch gab es durch ungerichtete Veränderungen signifikante Effekte auf den zeitlichen Verlauf.

Während des gesamten Versuchsverlaufs wurden diverse klinisch-chemisch Parameter analysiert um mögliche Veränderungen auf den Energie-, Leber -oder Fettstoffwechsel wahrnehmen zu können. Während die meisten Parameter (z.B. Glukose, NEFA, BHB, totales Protein, Albumin, Bilirubin, Urea, Kreatinin, Aspartat Aminotransferase) keine Effekte durch die PA/PANO Gabe aufzeigten, konnten bei dem im Blut analysierten Leberenzymen signifikante Veränderungen beobachtet werden (Abbildung 15). Die mittlere Konzentration der Alanin-Aminotransferase (ALT) (Abbildung 15, [A]) nahm von Beginn des Versuchs bis zum 14. Tag nahezu konstant ab und stieg danach in Abhängigkeit von der Behandlung in der letzten Woche des Versuchs an. Dies führte zu einem signifikantem Effekt über die Zeit. Die Aktivität der Gamma-Glutamyltransferase (GGT, Abbildung 15, [B]) nahm in allen Gruppen bis zum 7. Tag auf einem vergleichbaren Niveau leicht ab und blieb in den Gruppen CON<sub>Wasser</sub>, CON<sub>Melasse</sub> und PA/PANO-1 bis zum Ende der Studie nahezu konstant. Im Gegensatz dazu stieg die GGT-Aktivität in den Gruppen PA/PANO-2 und PA/PANO-3 bis zum Tag 28 an, was in den signifikanten Interaktionen zwischen Zeit und Behandlung zum Ausdruck kommt. Die Aktivitäten von AST und GLDH spiegelte den Verlauf von GGT wider. Beide Leberenzyme nahmen bis zum Tag 7 des Versuchs leicht ab, bevor sie in der höchstdosierten Gruppe anzusteigen begannen (Abbildung 15, [C], [D]).

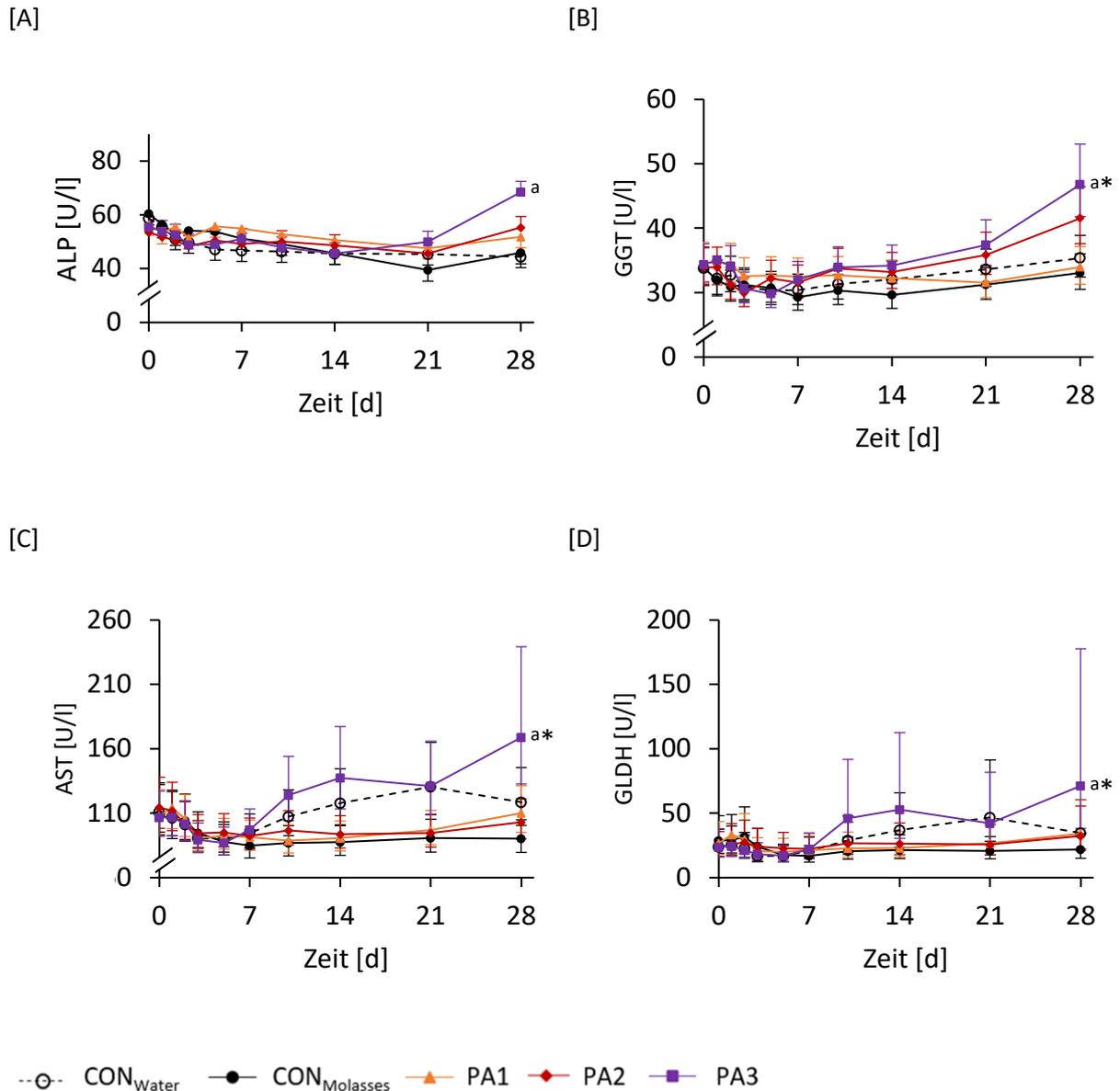


Abbildung 15: Zeitlicher Verlauf der Alanin-Aminotransferase (ALT) [A], Gamma-Glutamyltransferase (GGT) [B], Aspartat-Aminotransferase (AST) [C], Glutamat-Dehydrogenase (GLDH) [D] im Blutserum von Milchkühen in Abhängigkeit von den Pyrrolizidinalkaloid (PA)/N-Oxid (NO)-Expositionsgruppen: CON<sub>Wasser</sub> ○ (<0,01 mg (PA/PANO)/kg KG/d), CON<sub>Molasses</sub> ● (<0,01 mg (PA/PANO)/kg KG/d), PA/PANO-1 ▲ (0,47 mg (PA/PANO)/kg KG/d), PA/PANO-2 ◆ (0,95 mg (PA/PANO)/kg KG/d), PA/PANO-3 ■ (1,91 mg (PA/PANO)/kg KG/d). Die Symbole stellen LS-Means (n=4) mit Fehlerindikatoren oder als 95% Konfidenzintervalle für Box-Cox- und rücktransformierte Daten dar.

**p-Werte:** ALT: Gruppe: p=0,431, Tag: p<0,001, Gruppe x Tag: p=0,970; GGT: Gruppe: p=0,072, Tag: p<0,001, Gruppe x Tag: p=0,011; AST: Gruppe: p=0,415, Tag: p<0,001, Gruppe x Tag: p<0,001; GLDH: Gruppe: p=0,857, Tag: p<0,001, Gruppe x Tag: p=0,033

a: Signifikante Unterschiede zwischen Gruppe PA3 und CON<sub>Molasses</sub> an Tag 28

\*: Signifikante Unterschiede zwischen Tag 0 und 28 in der Gruppe PA/PANO-3

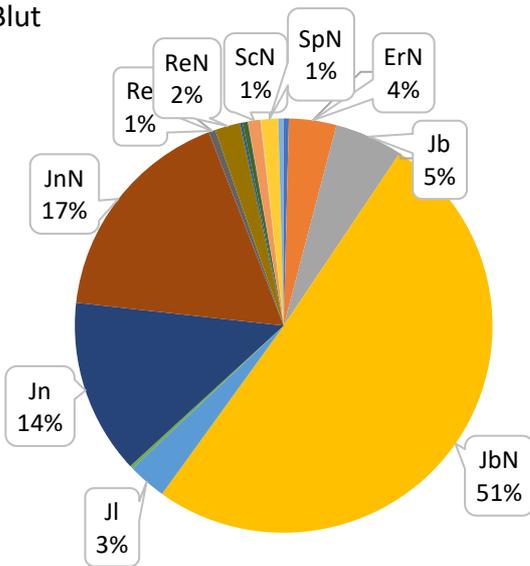
BW = Körpergewicht; CON = Kontrolle; d = Tag; Mean = Mittelwert

Die Analyse der inflammatorischen Parameter im Blut ergab für Kynurenin und Niacin keine signifikanten Effekte. Die zeitlichen Verläufe von Kynurenin und Niacin als auch Tryptophan blieben über den gesamten Versuch über alle Gruppen relativ konstant. Hingegen konnte bei Tryptophan ein signifikanter Gruppeneffekt beobachtet werden, der durch den geringen Gehalt an Tryptophan in der CON<sub>Melasse</sub> Gruppe resultierte und somit keine Auswirkung der PA/PANO Gabe darstellte.

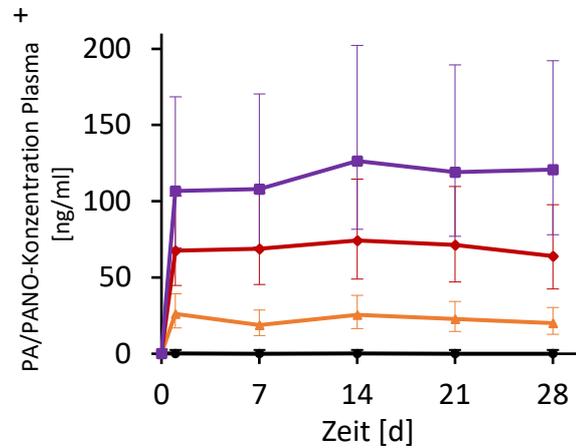
Auch die im Harn analysierten Purinderivate (Allantoin und Harnsäure) und das Kreatinin, welche als Marker für Nierenerkrankungen oder Stoffwechselstörungen herangezogen werden können, zeigten keine signifikanten Gruppeneffekte.

[A]

Blut



[B]



--- CON<sub>Wasser</sub>    ● CON<sub>Melasse</sub>    ▲ PA/PANO-1    ◆ PA/PANO-2    ■ PA/PANO-3

Erucifolin	■ Er	Erucifolin-NO	■ ErN	Jacobin	■ Jb	Jacobin-NO	■ JbN
Jacolin	■ JI	Jacolin-NO	■ JIN	Jaconin	■ Jn	Jaconin-NO	■ JnN
Retrorsin	■ Re	Retrorsin-NO	■ ReN	Riddellin	■ Rd	Riddelliin-NO	■ RdN
Senecionin	■ Sc	Senecionin-NO	■ ScN	Seneciphyllin	■ Sp	Seneciphyllin-NO	■ SpN
Senkirkin	■ Sk						

Abbildung 16: Vorläufige Daten zur PA/PANO-Zusammensetzung im Blut [A] als Mittelwert der verschiedenen Dosierungsgruppen über den gesamten Versuchsverlauf 1,5h nach PA-Gabe dargestellt in Prozent. PA/PANO <1% sind nicht gekennzeichnet und der zeitliche Verlauf der Pyrrolizidinalkaloid/N-Oxid (PA/PANO)-Exposition pro kg Körpergewicht (KG) [A] und PA/PANO-Konzentration im Plasma [B] bei Milchkühen in Abhängigkeit von den PA/PANO-Expositionsgruppen: CON<sub>Melasse</sub> ● (<0,01 mg (PA/PANO)/kg KG/d), PA1 ▲ (0,47 mg (PA/PANO)/kg KG/d), PA2 ◆ (0,95 mg (PA/PANO)/kg KG/d), PA3 ■ (1,91 mg (PA/PANO)/kg KG/d). Die Symbole stellen die LS-Mittelwerte (n=4) und die Fehlerindikatoren als Standardfehler bzw. als 95%ige Konfidenzintervalle für Box-Cox- und rücktransformierte Daten dar.

**p-Werte: PA-Konzentration im Plasma:** Gruppe: p<0,001, Tag: p<0,001, Gruppe x Tag: p<0,001;

CON = Kontrolle; d = Tag;

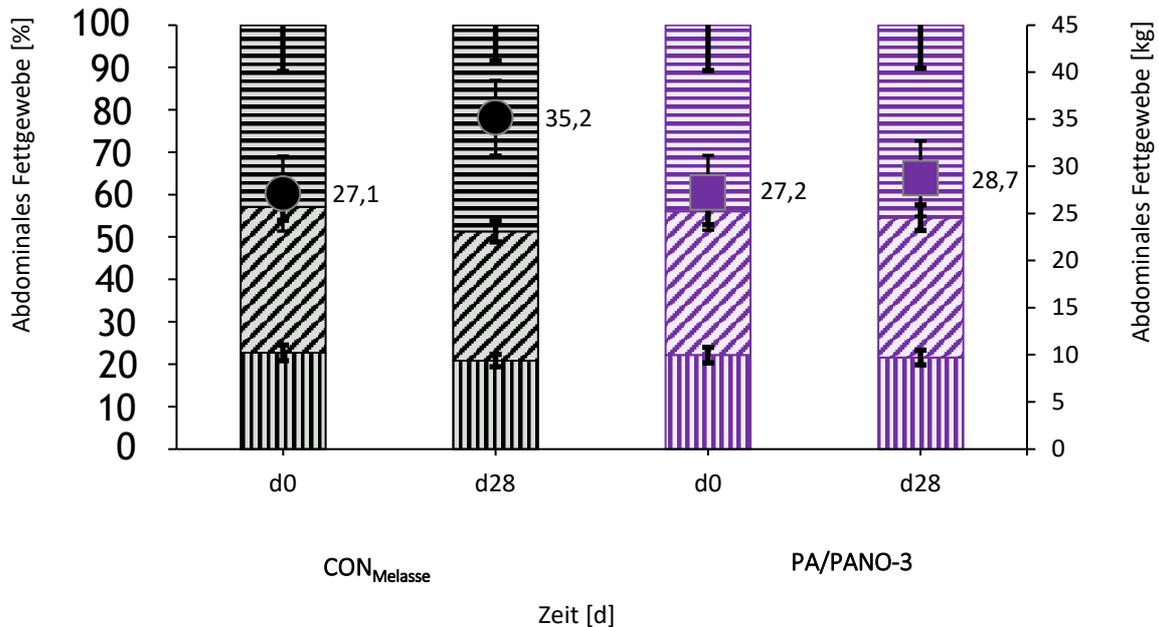
+ box cox- und rücktransformierte Daten

NO = N-Oxid; PA = Pyrrolizidinalkaloide

Die Analyse der PA/PANO im Blut (Abbildung 16, [A]) zeigte, dass hauptsächlich PANO (gemittelter Wert: 76 %) detektiert wurden, wobei vor allen JbN (über 50% am Gesamtanteil) und JnN (17%) auftraten. Bei den freien Basen wurde hauptsächlich Jn (14%) analysiert, was in einem ähnlichen Anteil wie das korrespondierende NO vorlag, gefolgt von Jb (5%) und JI (3%). Weitere detektierte PA/PANO waren u.a. ErN, ReNO, Re, ScN und SpN, die anteilig unter 5% lagen. Die hier dargestellte gemittelte Verteilung variierte zwischen den PA/PANO exponierten Gruppen und innerhalb des Versuches geringfügig.

Die Konzentration der PA/PANO im Blutplasma (Abbildung 16, [B]) lag vor der ersten Behandlung an Tag 0 bei einer geringen Gesamtkonzentration von maximal 0,83 ng/ml. Die mittlere PA/PANO-Konzentration im Plasma der Gruppe CON<sub>Melasse</sub> ( $\leq 0,01$  ng/ml) blieb während der gesamten Studie konstant auf einem sehr geringen Niveau. Entsprechend der PA/PANO-Konzentration im PA/PANO-Extrakt konnten dosisabhängig steigende PA/PANO-Konzentrationen im Blutplasma festgestellt werden (Abbildung 16, [B]). Die Gruppe PA/PANO-1 wies während des Versuchs eine mittlere PA/PANO-Konzentration im Plasma von  $22,6 \pm 3,2$  ng/ml auf, während die mittlere Konzentration der Gruppe PA/PANO-2 ( $69,2 \pm 3,9$  ng/ml) etwa dreimal so hoch war. Eine Kuh der Gruppe PA/PANO-2 wies mit einer maximalen Konzentration von 292 ng/ml die höchste Konzentration während des gesamten Versuchs auf. Dies erhöhte den Mittelwert der PA/PANO-Konzentration im Plasma für die gesamte Gruppe PA/PANO-2. Abgesehen von diesem Aspekt schwankte die mittlere PA/PANO-Konzentration im Plasma bei den drei anderen Einzeltieren der Gruppe PA/PANO-2 zwischen 30,6 und 67 ng/ml. In der Gruppe PA3 wurde eine mittlere Konzentration von  $116,2 \pm 8,5$  ng/ml gemessen. Zwischen den einzelnen Tieren gab es große individuelle Unterschiede (69,8 - 166,2 ng/ml), aber die PA/PANO-Konzentration im Blutplasma jedes einzelnen Tieres änderte sich während des Versuchs nur geringfügig. Die PA/PANO-Konzentration im Plasma wurde in der Gruppe CON<sub>Wasser</sub> nicht gemessen.

Entwicklung der Fettdepots über den Versuchszeitraum



CON<sub>Melasse</sub> ■ RAT ■ OAT ■ MAT ● AAT  
 PA/PANO-3 ■ RAT ■ OAT ■ MAT ■ AAT

Abbildung 17 Zusammensetzung des abdominalen Fettgewebes (AAT) mit retroperitonealem AT (RAT), omentalem AT (OAT) und mesenterialem AT (MAT) vor Beginn und am Ende des Versuchs (d28) (linke Ordinate) und das daraus resultierende AAT in absoluten Massen (rechte Ordinate) der Behandlungsgruppen, gemessen mit der Ultraschallmessmethode:

CON<sub>Melasse</sub> ● (<0,01 mg (PA/PANO)/kg KG/d) und PA/PANO-3 ■ (1,91 mg (PA/PANO)/kg KG/d).

Die Werte sind als LS-Means (n=4) mit Standardfehler dargestellt.

**p-Werte:** AAT: group=0.440; day=0.254; Group x day=0.428; RAT: group=0.348; day=0.210; Group x day=0.330; OAT: group=0.558; day: 0,366; Group x day=0,518; MAT: Gruppe=0,580; Tag=0,286; Gruppe x Tag=0,472  
 BW = Körpergewicht; CON = Kontrolle; d = Tag; Mean = Mittelwert

Die Fettdepots der Gruppe CON<sub>Melasse</sub> und Gruppe PA/PANO-3 zeigten die gleiche Verteilung der verschiedenen vorhergesagten Fettgewebe (AT) (Abbildung 17) mit steigenden Anteilen von mesenterialem AT (MAT), omentalem AT (OAT) und retroperitonealem AT (RAT) vor Beginn des Versuchs. Im Laufe des Versuchs gab es leichte Veränderungen in der prozentualen Verteilung dieser

AT, die jedoch keine signifikanten Unterschiede ergaben. Die Ergebnisse der per Ultraschall ermittelten Relativgewichte (g/kg KG) der AAT-Massen wurden mit den nach der Schlachtung gemessenen Relativgewichten verglichen. Es wurde eine signifikante positive Korrelation festgestellt ( $r^2=0,763$ ,  $p=0,006$ ), wobei der Ultraschallwert im Durchschnitt 39% höher war.

#### Evaluierung der Organe

Insgesamt wurden von den Organen Leber, Herz, Lunge und Trachea, Labmagen, Blättermagen, Dickdarm, Dünndarm, Euter, Nieren, Pankreas, Thymus, Milz, Gallenblase (gefüllt und entleert), Harnblase, Uterus und Ovarien die relativen Gewichte in Bezug auf die Körpermasse gebildet und zwischen den Gruppen verglichen. Dabei ergaben sich keine signifikanten Veränderungen der Organgewichte innerhalb der Gruppen. Nur bei dem relativen Gewicht der gefüllten Gallenblase stieg das Gewicht von der Gruppe CON<sub>Melasse</sub> bis hin zur Gruppe PA3 tendenziell ( $p<0,1$ ) an.

Da die Leber das Hauptzielorgan der PA/PANO darstellt, wurden hier noch weitere Untersuchungen durchgeführt. Während die Lipidkonzentration der Leber von der Behandlung unbeeinflusst blieb (Abbildung 18, [B]), stieg die Fläche der Hepatozytenkerne (Abbildung 18, [A]) bei allen Gruppen während des Versuchs an. Dies resultierte in einer signifikant größeren Fläche der Hepatozytenkerne der Gruppen PA/PANO-2 und PA/PANO-3 am Tag 28 im Vergleich zur Beprobung vor dem Versuch (Tag 0).

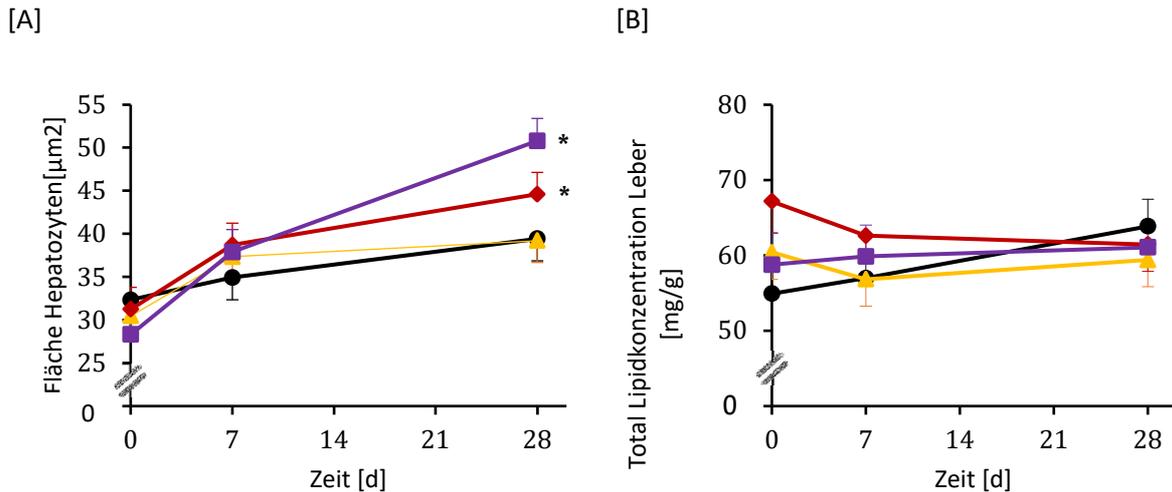


Abbildung 18: Hepatozytenkernfläche [A] und Gesamtleberlipidkonzentration [B] im Verlauf des Experiments, wobei Tag 0 den Wert vor Beginn der PA-Exposition angibt.

CON<sub>Melasse</sub> ● (<0,01 mg (PA/PANO)/kg KG/d), PA/PANO-1 ▲ (0,47 mg (PA/PANO)/kg KG/d), PA/PANO-2 ◆ (0,95 mg (PAPANO)/kg KG/d), PA/PANO-3 ■ (1,91 mg (PA/PANO)/kg KG/d). Die Symbole stellen LS-Means (n=4) und Fehlerindikatoren dar. Die LS-Means für die gesamten Leberfette wurden ohne Kovariable berechnet.

**p-Werte:** Fläche der Leberkerne: Gruppe: p=0,285; Tag: p<0,001; Gruppe x Tag: p=0,089;

Gesamtleberlipidkonzentration: Gruppe: p=0,466; Tag: p=0,600; Gruppe x Tag: p=0,513

KG = Körpergewicht, CON = Kontrolle; d = Tag; Mean = Mittelwert; NO = N-Oxid; PA = Pyrrolizidinalkaloide

\* Signifikante Unterschiede zwischen Tag 0 und Tag 28 berechnet mit einem Tukey angepassten t-Test

Weiterführend wurde eine signifikante Zunahme der Hepatozyten mit vergrößerten Zellkernen in den Gruppen PA/PANO-2 und 3 im Versuchsverlauf durch Bilder der HE-gefärbten Leberschnitte beobachtet. Auch das Eindringen von Leukozyten in das Gewebe und von pyknotischen Zellen waren in diesen Gruppen sichtbar. Zur histopathologischen Beurteilung des Lebergewebes wurde ein totaler Leberscore implementiert, der sich aus der Zunahme von Hepatozyten mit vergrößerten, vesikulären Zellkernen (Hepatozytenkernvergrößerungs-Score) sowie der lymphozytären Infiltration (Immunologischen Aktivitäts-Score) nach der Schlachtung, zusammensetzt. Dabei wurde eine Einteilung von geringgradig über mittelgradig bis hochgradig, jeweils mit einem Score von 1 bis 3, vorgenommen. Die Gruppen CON<sub>Melasse</sub> sowie PA/PANO-1 wiesen keine lymphozytären Infiltrationen auf, im Gegensatz zu den Gruppen PA/PANO-2 und PA/PANO-3 (

Abbildung 19). Die Gruppen CON<sub>Melasse</sub>, PA/PANO-1 und PA/PANO-2 erreichten einen geringgradig erhöhten Wert der vergrößerten, vesikulären Zellkerne, wobei Gruppe PA/PANO-3 eine mittelgradige Erhöhung des Wertes aufwies. Dies resultierte in einem signifikant höheren Leberscore der Gruppe PA/PANO-3 im Vergleich zur Gruppe PA/PANO-1 (

Abbildung 19).

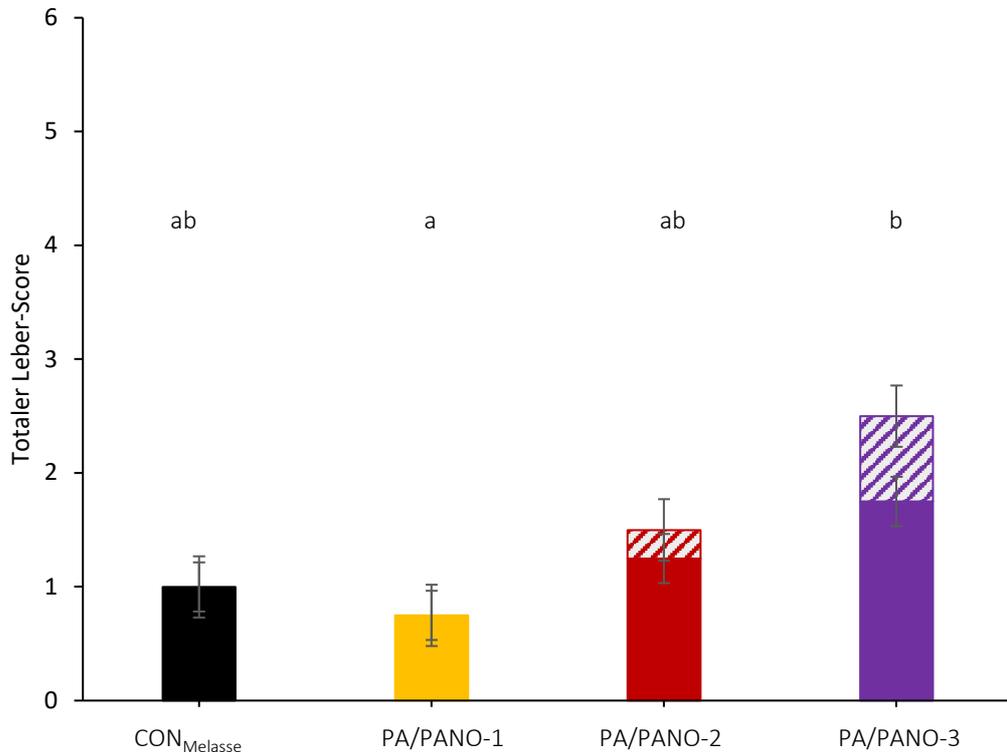


Abbildung 19: Leberhistopathologie-Scores für die verschiedenen PA-Expositionsgruppen an Tag 28.

CON<sub>Melasse</sub> (<0,01 mg (PA/PANO)/kg KG/d), PA/PANO-1 (0,47 mg (PA/PANO)/kg KG/d), PA/PANO-2 (0,95 mg (PA/PANO)/kg KG/d), PA/PANO-3 (1,91 mg (PA/PANO)/kg KG/d)

Gefüllte Balken (n=4) stellen die vergrößerten Hepatozytenkerne dar, die zum Hepatozytenkernvergrößerungs-Score führen, während gestreifte Balken (n=4) dem immunologischen Aktivitäts-Score der Leber entsprechen, klassifiziert nach fokaler Infiltration von Makrophagen mit vielkernigen Riesenzellen (granulomatöse Entzündung) und eosinophilen Granulozyten, multifokaler lymphohistiozytärer Portalinfiltration mit eosinophilen Granulozyten oder fokaler lymphohistiozytärer Infiltration. Beide Bereiche wurden zum totalen Leber-Score zusammengefasst, jeweils mit Standardfehler.

p-Werte: \_Totaler Leber-Score: p = 0,029; Hepatozytenkernvergrößerungs-Score: p = 0,037; Immunologischer Aktivitäts-Score: p = 0,217

Signifikante Unterschiede zwischen den Werten des totalen Leber-Scores und des Hepatozytenkernvergrößerungs-Scores wurden mit Hilfe eines Tukey-angepassten t-Tests berechnet und als unterschiedliche Buchstaben dargestellt (a,b).

KG = Körpergewicht, CON = Kontrolle; d = Tag; Mean = Mittelwert; NO = N-Oxid; PA = Pyrrolizidinalkaloide

Zusätzlich zur Leber wurde auch weitere Organe histopathologisch untersucht. Hierbei wurde bei allen Tieren mit Ausnahme einer Kuh aus der CON<sub>Melasse</sub>-Gruppe eine geringgradige lymphoplasmatische Infiltration der Lamina propria der Gallenblase beobachtet. Die Lunge blieb bei Kühen der Gruppe CON<sub>Melasse</sub> unauffällig, während Kühe der Gruppen PA/PANO-1, PA/PANO-2 und PA/PANO-3 eine

Infiltration mit neutrophilen und/oder eosinophilen Granulozyten aufwiesen. Darüber hinaus wies eine Kuh der Gruppe PA/PANO-2 eine Hyperplasie des bronchusassoziierten lymphatischen Gewebes (BALT) auf. In der Milz wurden keine Läsionen festgestellt. In den Nieren zeigten alle Gruppen geringgradige multifokale lymphoplasmatische Infiltrate im Interstitium. Eine Kuh der Gruppe PA/PANO-2 wies einzelne detritusgefüllte Tubuli auf, während eine Kuh der Gruppe PA/PANO-3 eine moderate fokale Atrophie des Parenchyms entwickelte. Nur das mediale und kraniale Epithel des ventralen Pansensacks wies in der Gruppe CON<sub>Melasse</sub> isolierte Pusteln auf, während in der Gruppe PA/PANO-1 eine geringe und mäßige Inzidenz mit isolierten Pusteln im Epithel sowie fokale lymphohistiozytäre Infiltrate mit eosinophilen Granulozyten in der Lamina propria zu beobachten waren.

Erfassung von möglichen Effekten von PA/PANO auf das Pansenmikrobiom sowie die ruminalen PA/PANO Umsetzungen

Erste Aussagen über die Zusammensetzung des Pansenmikrobioms können durch die sogenannte  $\alpha$ - und  $\beta$ -Diversität beschrieben werden. Für die  $\alpha$ -Diversität wurde der Shannon-Index herangezogen, der ein Maß der biologischen Vielfalt darstellt und aus dem Verhältnis des Anteils einer Art an der Summe aller Individuen im Pansensaft abgeleitet wird. Im zeitlichen Verlauf (Abbildung 20) ist zu

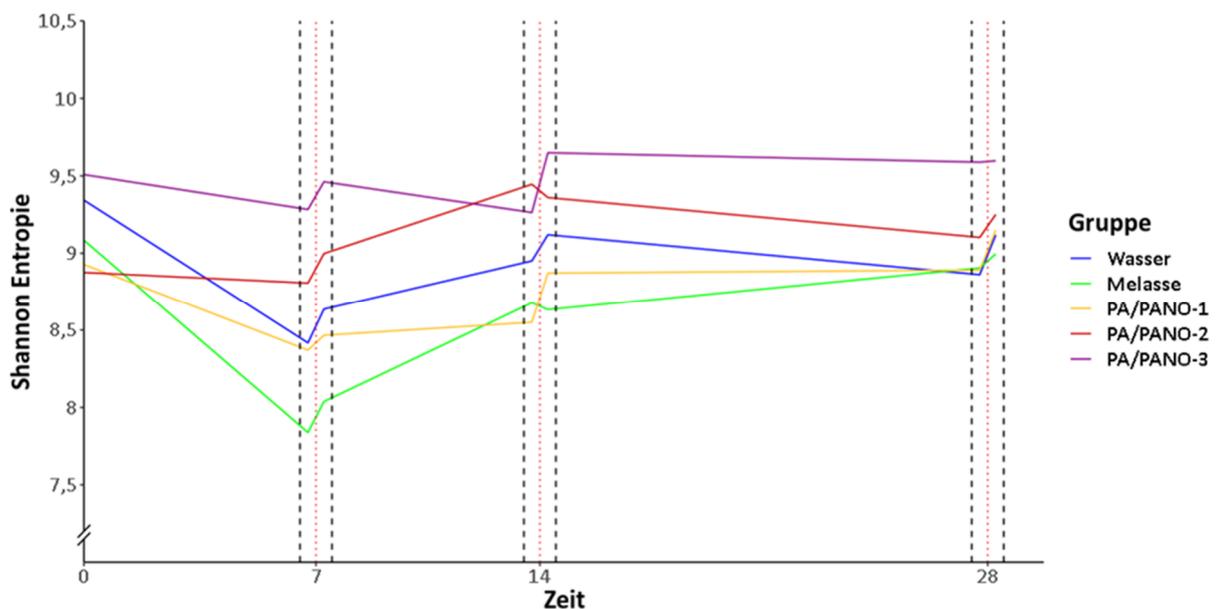


Abbildung 20: Vorläufige Mittelwerte der beobachteten Shannon Entropie dargestellt als zeitlicher Verlauf in Abhängigkeit der Gruppen mit simulierten Zeitpunkten innerhalb der Probenahmetage (senkrechte schwarze Linien umreißen den Tag, senkrechte rote Linien markieren die PA-Gaben)

**p-Werte:** Gruppe:  $p=0,013$ ; Versuchstag:  $p<0,001$ ; Zeitpunkt:  $p=0,063$ ; Gruppe x Versuchstag:  $p=0,253$ ; Gruppe x Zeitpunkt:  $p=0,967$ ; Versuchstag x Zeitpunkt:  $p=0,989$ ; Gruppe x Versuchstag x Zeitpunkt:  $p=0,990$

erkennen, dass die Gruppen grundsätzlich auf unterschiedlichen Niveaus in den Versuch starten und diese Ausgangslage einen offensichtlichen Einfluss auf die Ergebnisse des Versuches haben. Hierbei kristallisieren sich signifikante Unterschiede ( $p=0,013$ ) zwischen der Gruppe PA/PANO-3 und der Melassegruppe heraus. Während die Shannon-Entropie in der am höchsten dosierten Gruppe (PA/PANO-3) nahezu konstant bleibt, ist ein eindeutiger Abfall der Melasse-Gruppe, Gruppe PA/PANO-1 und Wassergruppe am Tag 7 zu verzeichnen, was zu einem signifikanten Effekt des Versuchstages ( $p<0,001$ ) führt. Des Weiteren ist zu erkennen, dass die Shannon-Entropie zwischen den einzelnen Probenahmezeitpunkten tendenziell ( $p=0,063$ ) ansteigt.

Die  $\beta$ -Diversität beschreibt als Distanz den Unterschied in der Artenvielfalt der Pansenmikrobiota zwischen verschiedenen Proben. In Abbildung 21 ist der zeitliche Verlauf der Distanzen zwischen den Behandlungsgruppen nach dem Bray-Curtis Index dargestellt, welcher neben der Anwesenheit auch die Häufigkeit einzelner Mikroorganismen berücksichtigt. Im Vergleich zur  $\alpha$ -Diversität, sieht man auch bei der  $\beta$ -Diversität Gruppencluster und zeitliche Verläufe, die zu signifikanten Effekten der Einzelfaktoren Gruppe ( $p=0,001$ ) und Versuchstag ( $p=0,036$ ) und zu tendenziellen Veränderungen beim Zeitpunkt ( $p=0,077$ ) führen. Ähnlich wie bei der  $\alpha$ -Diversität ist zu sehen, dass die Distanzen zwischen den Gruppen an den Versuchstagen insbesondere die Distanzen zwischen den Proben zum Zeitpunkt der Nullprobe widerspiegeln.

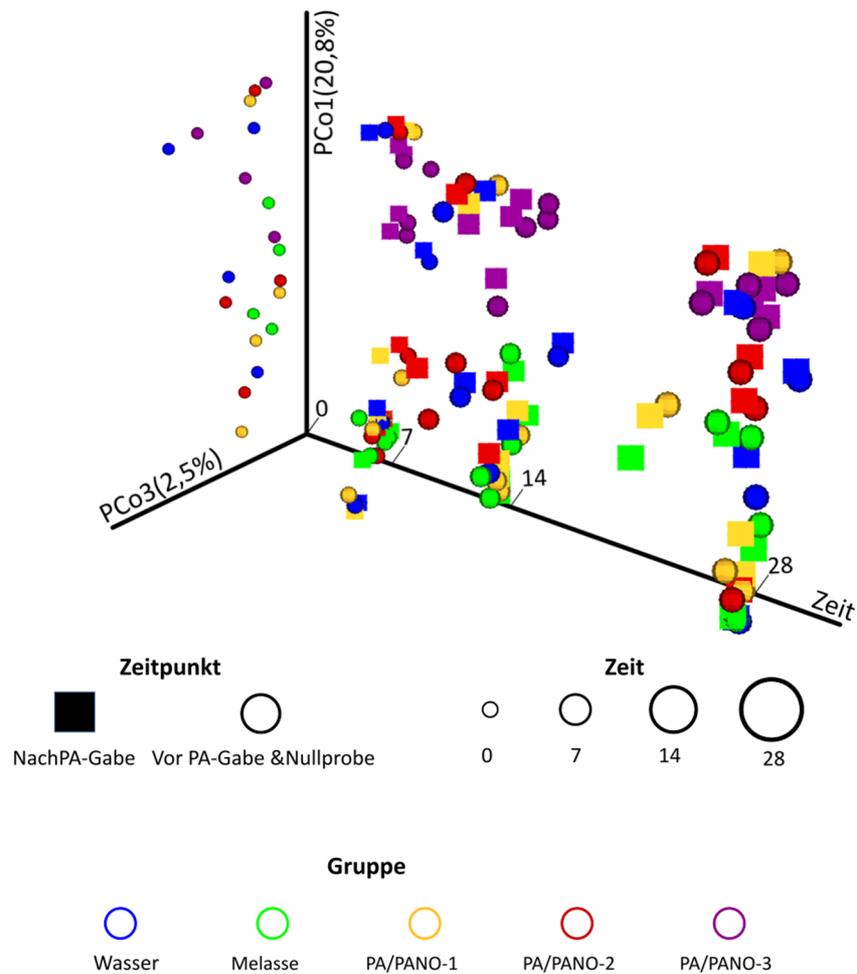
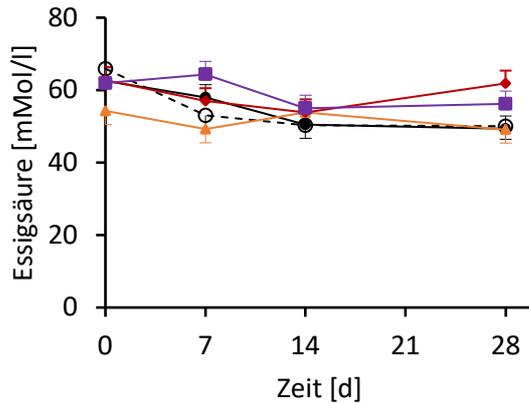


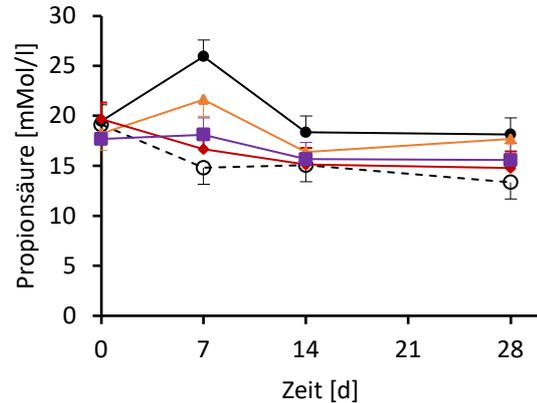
Abbildung 21: Hauptkoordinatenanalyse der Bray-Curtis Distanz zur Darstellung struktureller Unterschiede des Pansenmikrobioms unter Einfluss von Pyrolizidinalkaloiden und deren Abbauprodukten (vorläufige Daten).  
**p-Werte:** Gruppe:  $p=0,001$ ; Versuchstag:  $p=0,036$ ; Zeitpunkt:  $p=0,077$ ; Gruppe x Versuchstag:  $p=0,162$ ; Gruppe x Zeitpunkt:  $p=0,659$ ; Versuchstag x Zeitpunkt:  $p=1,000$ ; Gruppe x Versuchstag x Zeitpunkt:  $p=1,000$

Des Weiteren kann der Pansensaft über verschiedene weitere Parameter charakterisiert werden. Hierbei spielen vor allen die freien Fettsäuren, Ammoniumstickstoff oder Laktat eine Rolle, die von den unterschiedlichen Pansenmikrobiota gebildet werden können.

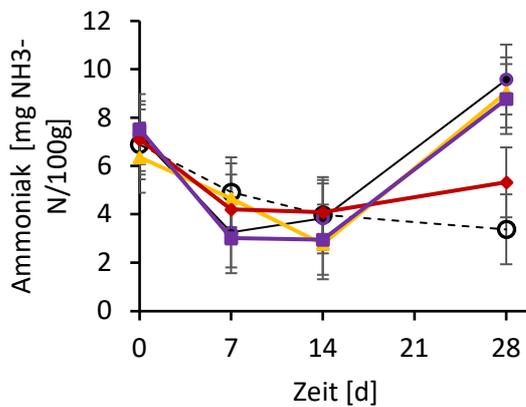
[A]



[B]



[C]



[D]

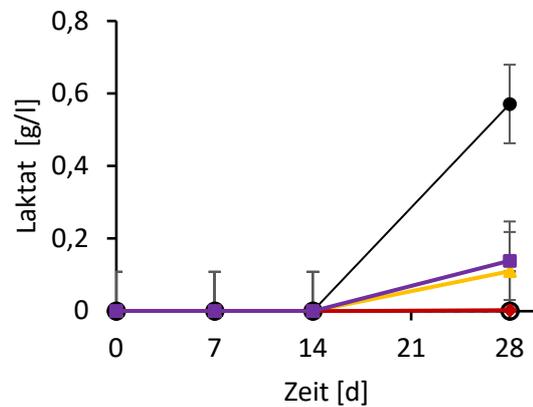


Abbildung 22 Vorläufige Daten zum zeitlichen Verlauf der Konzentration von Essigsäure [A], Propionsäure [B], Ammoniak [C] sowie der Laktat-Konzentration [C] im Pansen saft der Versuchsgruppen: CON<sub>Wasser</sub> ○ (<0,01 mg (PA/PANO)/kg KG/d), CON<sub>Melasse</sub> ● (<0,01 mg (PA/PANO)/kg KG/d), PA/PANO-1 ▲ (0,47 mg (PA/PANO)/kg KG/d), PA/PANO-2 ◆ (0,95 mg (PA/PANO)/kg KG/d), PA/PANO-3 ■ (1,91 mg (PA/PANO)/kg KG/d). Dargestellt sind die Least square means mit Standardfehler als Fehlerindikatoren.

**p-Werte:** **Essigsäure:** Gruppe: p=0,167, Zeit: p=0,002, Gruppe x Zeit: p=0,158; **Propionsäure:** Gruppe: p<0,001, Zeit: p=0,001, Gruppe x Zeit: p=0,217; **Ammoniak:** Gruppe: p=0,819, Zeit: p<0,001, Gruppe x Zeit: p=0,263

**Laktat:** Gruppe: p=0,326, Zeit: p=0,043, Gruppe x Zeit: p=0,313

CON = Kontrolle; d = Tag; KG = Körpergewicht; PA = Pyrrolizidinalkaloide; PANO = Pyrrolizidinalkaloid N-Oxide

Die Konzentration der Fettsäuren Essigsäure (Abbildung 22, [A]), iso-Buttersäure, Buttersäure, iso-Valeriansäure und Valeriansäure im Pansensaft zeigen Schwankungen über den zeitlichen Verlauf des Versuches. Die Konzentrationen zwischen den Gruppen blieben jedoch unbeeinflusst.

Die Konzentration der Propionsäure (Abbildung 22, [B]) variiert über die Zeit und zeigt auch einen signifikanten Gruppeneffekt, der aber nicht die PA/PANO Exposition widerspiegelt, da die Werte der PA/PANO Gruppen zwischen denen der Kontrollgruppen liegen.

Die mittlere Konzentration an Ammoniak (Abbildung 22, [C]) nimmt von Versuchsbeginn bis zu Tag 14 ab und steigt anschließend bis zum Versuchsende an. Dadurch kommt es zu signifikanten Zeiteffekten, jedoch gibt es keine signifikanten Effekte zwischen den Gruppen.

Die mittlere Laktat-Konzentration (Abbildung 22, [D]) blieb in allen Gruppen unterhalb der Nachweisgrenze und wurde nur am letzten Versuchstag detektiert, was zu einem signifikanten Effekt über die Zeit führte. Die höchste Konzentration wurde in der Melassegruppe beobachtet, wobei der statistische Faktor Gruppe keine Signifikanzen aufwies.

Bei der vorläufigen Auswertung der Sequenzierdaten des Genoms konnte eine Heterozygotie der 16 Versuchskühe von  $0,6429 \pm 0,0076$  und FIS bei  $-0,0408 \pm 0,0221$  beobachtet werden. Die FIS-Werte als Indikatoren für Inzucht zeigen, dass die beobachtete Heterozygotie im Vergleich zur erwarteten Heterozygotie höher ist und somit kein Defizit an beobachteter Heterozygotie vorliegt. Die Versuchsgruppen sind hinsichtlich ihrer beobachteten Heterozygotie und der FIS-Werte sehr homogen und nicht signifikant unterschiedlich. Für die phänotypischen Merkmale Lebendmasse, Trockensubstanzaufnahme und Milchleistung wurden die Heritabilitäten anhand der SNV-Daten geschätzt. Dafür wurde das Kopplungsungleichgewicht (LD, linkage disequilibrium) zwischen den SNVs berechnet und nur SNVs verwendet, die ein  $LD < 0,75$  hatten verwendet. Zugleich wurde eine Mindestallelfrequenz für das Minor-Allel (MAF) von  $> 0,05$  als Bedingung gesetzt. Die wöchentlichen Mittelwerte, die auf Vorversuchsniveau korrigiert wurden, wurden für die genetischen Auswertungen herangezogen. Über ein Hierarchical Bayes Mixture Model (BayesR, Moser et al. 2015) wurden die Heritabilitäten geschätzt und die SNVs wurden nach der Höhe ihrer erklärten Varianz klassifiziert. Der größte Teil der SNVs erklärte nur einen sehr geringen Anteil der genetischen Varianz. Die Effektgrößen wurden in 4 Mixture Verteilungen aufgeteilt. Die Effektgrößen betragen  $0\% \times Vg$  ( $Vg =$  additiv-genetische Varianz, Mixture Component 1),  $0,01\% \times Vg$  (Mixture Component 2),  $0,1\% \times Vg$  (Mixture Component 3) und  $1\% \times Vg$  (Mixture Component 4). Die Analysen wurden nach Versuchsgruppen und nach der jeweiligen Versuchswoche (Dauer der Gabe von PA/PANO) durchgeführt. Die Heritabilitäten steigen von Woche 1 zu Woche 4 im Mittel über die Milchleistungsparameter von  $0,4712$  in Woche 1,

auf 0,5255 in Woche 2, auf 0,5695 in Woche 3 und auf 0,5782 in Woche 4 an. Dies bedeutet, dass eine längerdauernde Exposition für PA/PANO zu größeren genetischen Unterschieden in der Milchleistung führt. Das bedeutet die Kühe reagieren genetisch bedingt zunehmend unterschiedlich mit längerer Exposition. Weiterführend wurden für 20 klinisch-chemische Parameter die Heritabilitäten bestimmt. Über den gesamten Versuchsverlauf liegen die Heritabilitäten in einem mittleren Bereich von 0,5052 bis 0,5736. In der ersten Woche der Exposition sind die mittleren Heritabilitäten am höchsten.

Genotyp-Expositionseffekte wurden für 32 Parameter in linearen Interaktions-Modellen mit dem additiv-genetischen Effekt des Tieres und der Exposition in den Versuchsgruppen im Vergleich zu den gleichzeitigen Kontrollgruppen überprüft. Dafür wurde der Effekt Versuchsgruppe x Expositionswoche getestet und die p-Werte auf die multiple Testsituation (Tukey-Kramer-Korrektur) angepasst. Es war nur in Einzelfällen eine Genotyp-Exposition-Interaktion nachzuweisen. Eine Dosis- oder Expositionsdauer-abhängige Reaktion der Tiere war nicht zu ermitteln. Die Varianz zwischen Tieren innerhalb Versuchsgruppen war für keinen der untersuchten Parameter signifikant. Bei einer Genotyp-Expositions-Interaktion wäre eine signifikante Varianz zwischen Tieren innerhalb Expositionsgruppe zu erwarten.

#### 4.3.1.2. Ergebnisse Schafe

##### 4.3.1.2.1. Klinisches Monitoring

Basierend auf den Erfahrungen aus dem Vorversuch wurde die tägliche PA/PANO-Extraktdosis in den nachfolgenden Hauptversuchen auf zwei Einzeldosen aufgeteilt, um den Tieren die Aufnahme zu erleichtern. Zusätzlich wurden die Tiere vor Versuchsbeginn durch die Fütterung einer täglich ansteigenden Melassemenge schrittweise an eine Zuckeraufnahme gewöhnt, um eine Anpassung der Pansenflora an die Versuchsbedingungen zu ermöglichen. Durch diese Maßnahmen sollten mögliche nachteilige Effekte der konzentrierten Kohlenhydratgaben auf die Pansenflora vermindert werden. Weiterhin wurden durch zwei Gaben pro Tag Praxisbedingungen mit einer über den Tag verteilten Futteraufnahme besser simuliert und künstliche Effekte auf die Tiergesundheit verringert.

Durch den bitteren Geschmack des PA/PANO-Extraktes war die Akzeptanz der Supplementierung bei allen Tieren stark durch den Melasseanteil beeinflusst. So nahmen die Kontrollgruppe (Melasse) und die Dosisgruppe 2 (PA/PANO Extrakt+ höchster Melasseanteil) die täglich supplementierte Menge gut an. Die Tiere der Gruppe 3 (PA/PANO Extrakt+ zweithöchster Melasseanteil) akzeptierten den Extrakt

meist gut, die Tiere der Gruppe 4 (reiner PA/PANO Extrakt ohne Melasse) jedoch durchweg mäßig bis schlecht. Bei drei Tieren wurde die Supplementierung vorzeitig abgebrochen:

Tier Nr. 32 (Gruppe 3) zeigte an Tag 17 der Supplementierung ein gestörtes Allgemeinbefinden mit Fieber, reduzierter Futteraufnahme und vermehrtem Liegen, daher wurde die PA/PANO-Gabe abgebrochen und das Schaf medizinisch behandelt. Das Tier erhielt an Tag 17 eine halbe Tagesdosis.

Tier Nr. 14 (Gruppe 4) verschluckte sich bereits an Tag 1 bei der abendlichen PA/PANO-Eingabe und hustete so stark, dass nicht die volle Dosis aufgenommen werden konnte. Daher hat das Tier am ersten Versuchstag nur etwa 2/3 der geplanten Tagesdosis erhalten. An Tag 10 zeigte das Schaf Fieber und gestörtes Allgemeinbefinden, daher wurde auch hier die PA/PANO-Gabe nach der morgendlichen Gabe abgebrochen und das Schaf medizinisch behandelt. Somit hat es an Tag 10 nur eine halbe Tagesdosis aufgenommen.

Tier Nr. 44 (Gruppe 4) reagierte ab Tag 12 nach der jeweiligen PA/PANO -Gabe mit einer Reduktion der Futteraufnahme und Absonderung von der Gruppe, das Verhalten normalisierte sich jedoch immer innerhalb von ca. 30 min. Am Tag 21 normalisierten sich diese Befunde erst nach einer Stunde. Am Tag 22 war das Schaf apathisch, die Pansenmotorik deutlich reduziert und es stellte das Wiederkauen ein. Daher wurde die PA/PANO -Gabe abgebrochen und das Schaf medizinisch behandelt.

Diese Tiere wurden weiter beprobt, um Erkenntnisse zum Abklingen von serologischen Veränderungen und Rückständen zu erhalten. Alle weiteren Tiere zeigten bei der klinischen Untersuchung keine Auffälligkeiten.

## 4.3.1.2.2. Milchleistung

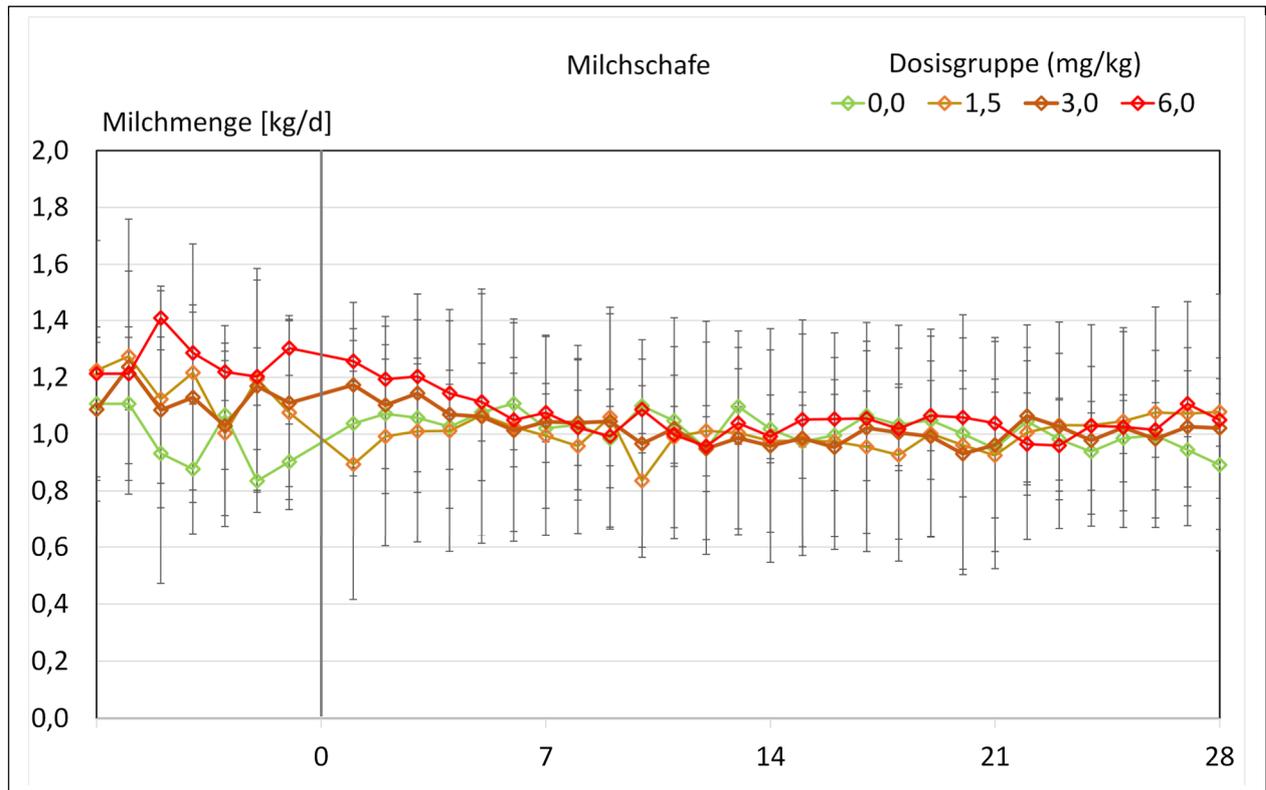


Abbildung 24: Transferversuch an Milchschaafen – Milchleistung in kg pro Tag ( $\bar{X} \pm \text{SD}$ ),  $n = 4$  Schafe pro Dosisgruppe

Während des Transferversuchs befanden sich die Schafe im 2. bis 3. Laktationsmonat und wiesen eine insgesamt deutlich höhere Leistung auf als die Schafe im Vorversuch, obwohl sie aus demselben Betrieb stammten. Obwohl die Leistungen zwischen den Gruppen vor Versuchsbeginn recht große Schwankungen aufwiesen, glichen sich die mittleren Leistungen der Dosisgruppen im Versuchsverlauf immer weiter aneinander an. Ein tendenzieller Leistungsabfall innerhalb der ersten 7 Tage ist bei den beiden höheren Dosisgruppen erkennbar. Wie bereits beim Vorversuch traten auch hier große tierindividuelle Unterschiede in der Milchleistung auf.

## 4.3.1.2.3. Serologie

Die serologischen Daten wurden analog zu dem Vorversuch ausgewertet. Das Verhältnis der Messwerte im Versuchsverlauf zum Ausgangswert wurde verwendet, um einen Anstieg der Leberwerte unter der PA/PANO-Supplementierung darzustellen. Bei einem Anstieg des Wertes um einen Faktor von  $\geq 2,0$  wurde die Erhöhung als „deutlicher Anstieg“ gewertet.

Der Verlauf der Enzymaktivitäten von AST, GGT und GLDH sowie der Verlauf der Konzentrationen des Bilirubins bei den Dosisgruppen 3 und 4 wird in den nachfolgenden Abbildungen dargestellt. Alle Serumwerte sind Indikatoren für mögliche Leberschäden. Für die Interpretation sind die vermutlichen Überdosierungen in den Gruppen 3 und 4 zu berücksichtigen.

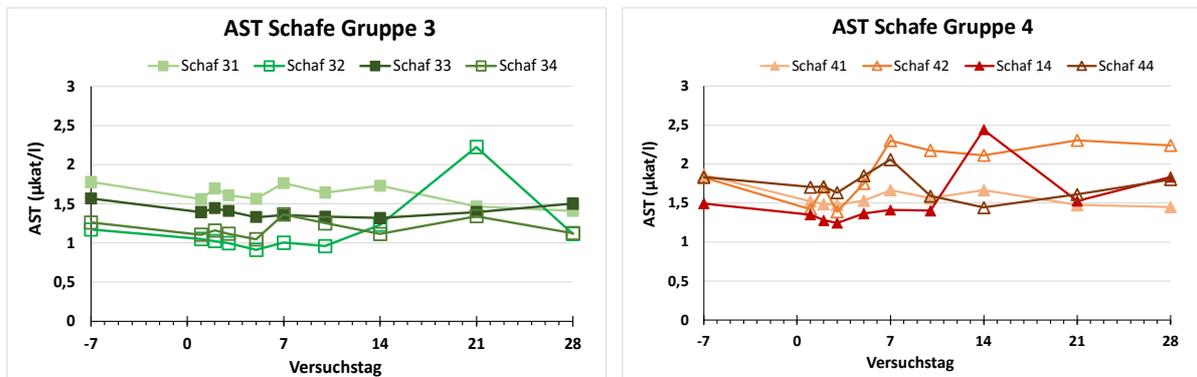


Abbildung 25 Konzentration des Enzyms Aspartat-Aminotransferase (AST) im Serum der Versuchstiere der Gruppen 3 (Dosis 3 mg/kg) und 4 (Dosis 6 mg/kg), vorzeitiger Abbruch der Supplementierung bei Schaf 32 (Tag 17), Schaf 14 (Tag 10) und Schaf 44 (Tag 22).

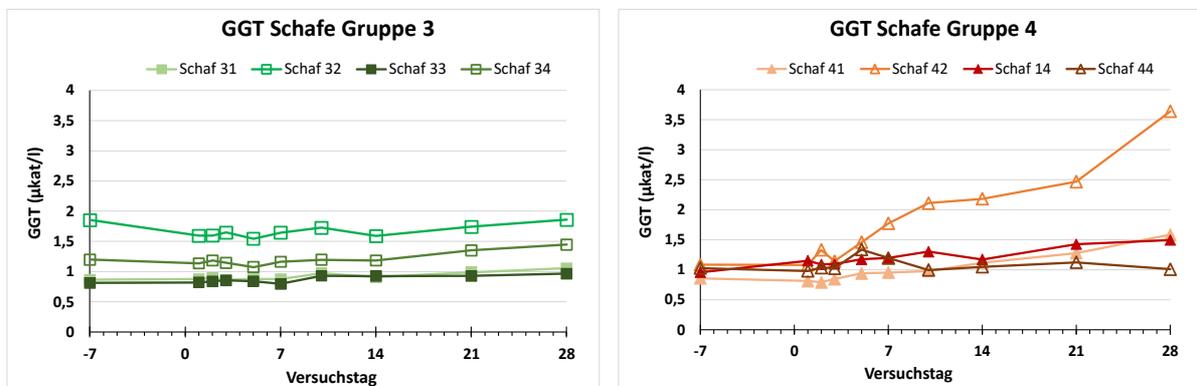


Abbildung 26: Konzentration des Enzyms Gamma-Glutamyltransferase (GGT) im Serum der Versuchstiere der Gruppen 3 (Dosis 3 mg/kg) und 4 (Dosis 6 mg/kg), vorzeitiger Abbruch der Supplementierung bei Schaf 32 (Tag 17), Schaf 14 (Tag 10) und Schaf 44 (Tag 22).

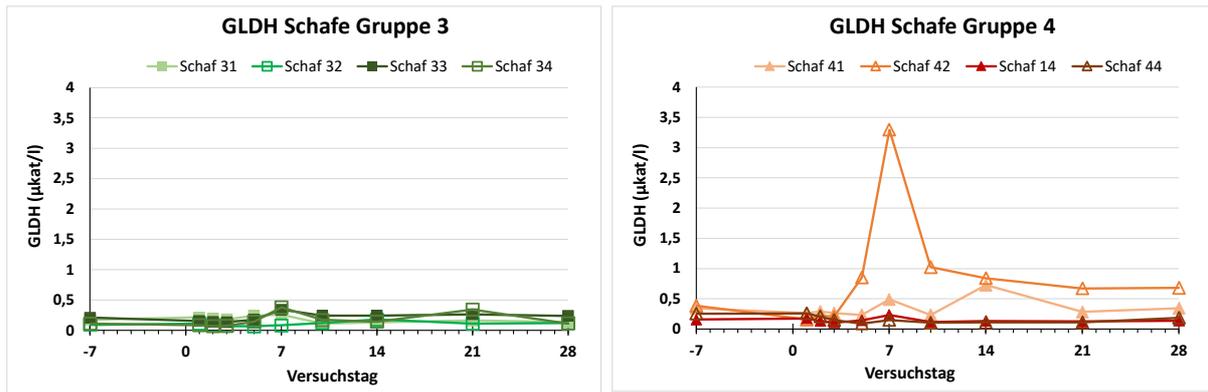


Abbildung 27: Konzentration des Enzyms Glutamatdehydrogenase (GLDH) im Serum der Versuchstiere der Gruppen 3 (Dosis 3 mg/kg) und 4 (Dosis 6 mg/kg), vorzeitiger Abbruch der Supplementierung bei Schaf 32 (Tag 17), Schaf 14 (Tag 10) und Schaf 44 (Tag 22)

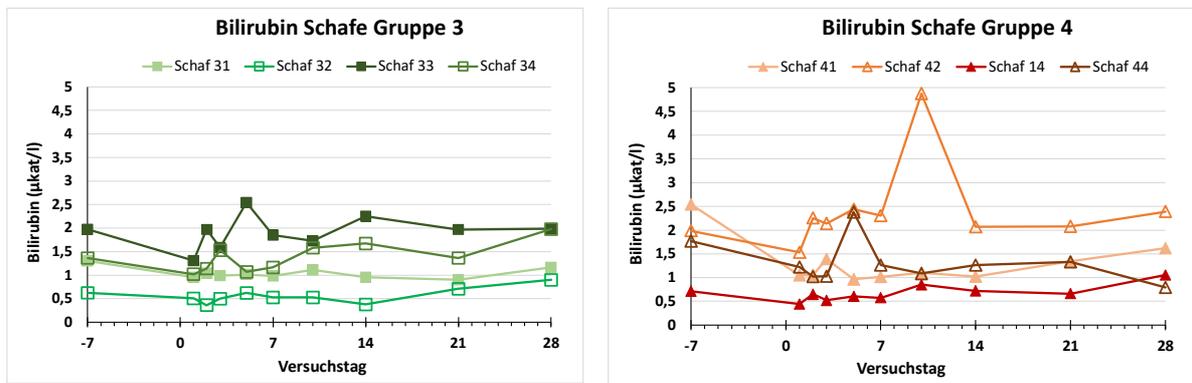


Abbildung 28: Konzentration des Bilirubins im Serum der Versuchstiere der Gruppen 3 (Dosis 3 mg/kg) und 4 (Dosis 6 mg/kg), vorzeitiger Abbruch der Supplementierung bei Schaf 32 (Tag 17), Schaf 14 (Tag 10) und Schaf 44 (Tag 22).

In der Kontrollgruppe und den Gruppen 2 (1,5 mg/kg) und 3 (3 mg/kg) traten keine erhöhten Leberwerte auf.

Insgesamt wurden im Versuchsverlauf nur bei dem Schaf 42 der Gruppe 4 (6 mg/kg) deutliche Erhöhungen der Leberenzyme GGT und GLDH sowie der Bilirubinkonzentration festgestellt. Dabei stieg die Aktivität der GGT zwischen Tag 0 und Tag 28 kontinuierlich bis auf das 3,4-fache an, der Verlauf der GLDH zeigte an Tag 7 einen Anstieg um das 8,7-fache und fiel danach wieder fast bis auf das Ausgangsniveau zurück. Die Bilirubinkonzentration stieg am 10. Versuchstag das 2,5-fache und fiel danach wieder auf das Niveau des Ausgangswertes. AST wies ab Tag 7 das höchste Niveau von allen

Tieren der Gruppe 4 auf. Trotz dieser erhöhten Werte war Schaf 42 während der gesamten Supplementierung klinisch unauffällig.

Bei den klinisch auffälligen Tieren (32, 14 und 44) konnten zwischen der ersten und letzten Probenahme keine deutlichen Veränderungen der Leberenzymaktivitäten festgestellt werden. Allerdings zeigte AST bei Schaf 14 an Tag 14 sowie bei Schaf 32 an Tag 21 jeweils einen leichten Anstieg, der nach Abbruch der Supplementierung wieder zurückging. Es bleibt unklar, ob die Werte bei fortgesetzter PA-Gabe noch weiter angestiegen wären.

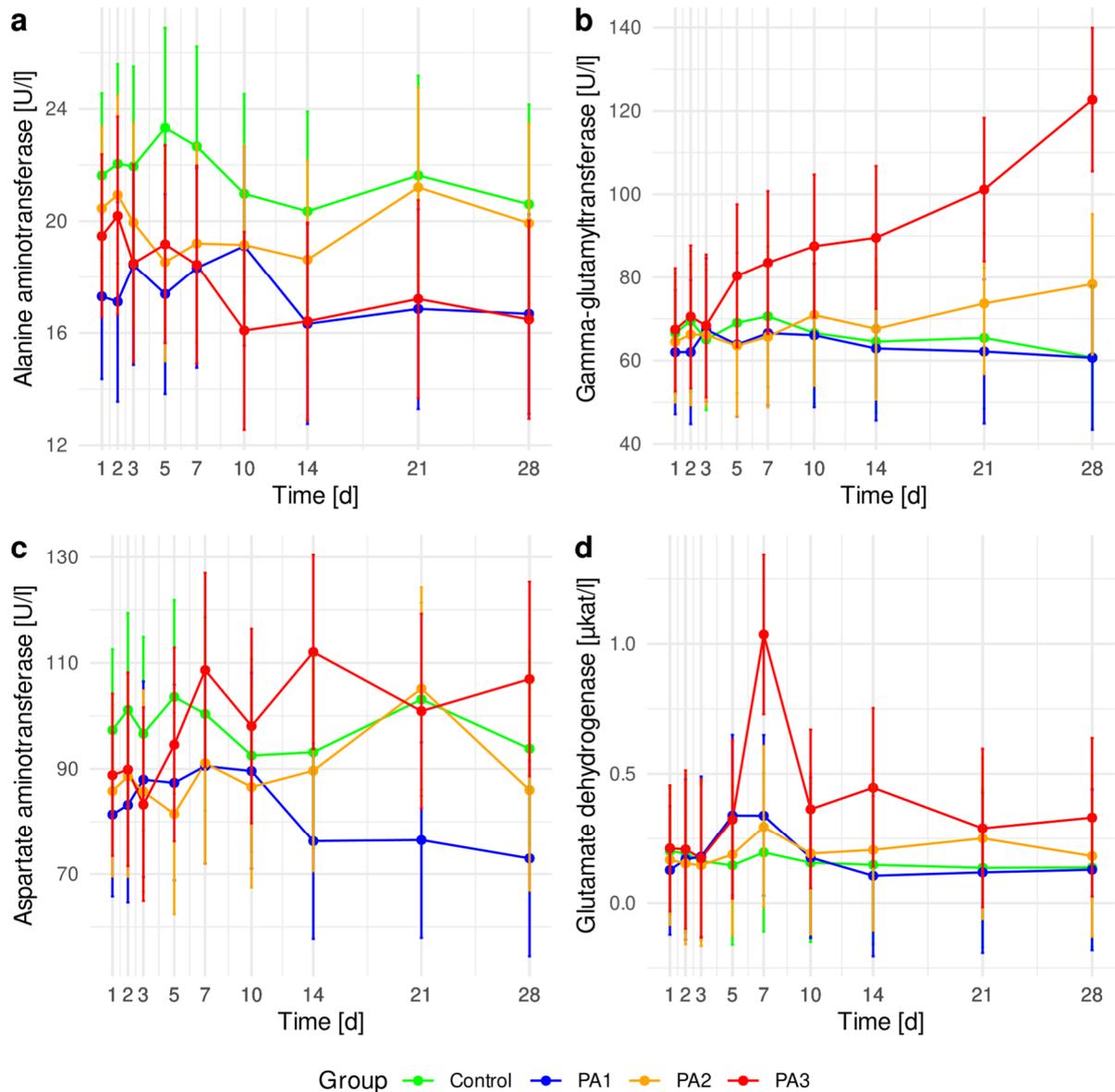


Abbildung 29: Zeitlicher Verlauf der Alanin-Aminotransferase (ALT) [a], Gamma-Glutamyltransferase (GGT) [b], Aspartat-Aminotransferase (AST) [c], Glutamat-Dehydrogenase (GLDH) [d] im Blutserum der Schafe in Abhängigkeit von den Pyrrolizidinalkaloid (PA)/N-Oxid (NO)-Expositionsgruppen: Kontrollgruppe, PA/PANO-1 (1,5 mg (PA/PANO)/kg KG/d), PA/PANO-2 (3,0 mg (PA/PANO)/kg KG/d), PA/PANO-3 (6,0 mg (PA/PANO)/kg KG/d). Die Symbole stellen LS-Means (n=4) mit Fehlerindikatoren oder als 95% Konfidenzintervalle für Box-Cox- und rücktransformierte Daten dar.

p-Werte: ALT: Gruppe:  $p = 0.686$ , Tag:  $p < 0.272$ , Gruppe x Tag:  $p = 0.906$ ; GGT: Gruppe:  $p = 0.457$ , Tag:  $p = 0.001$ , Gruppe x Tag:  $p < 0.001$ , \*b = signifikante Unterschiede zwischen Kontrolle - PA3 an Tag 21  $p = 0.032$  und PA1 - PA3 an Tag 21  $p = 0,024$ , \*b2 = signifikante Unterschiede zwischen Kontrolle - PA3 an Tag 28  $p < 0,001$  und PA1 - PA3 an Tag 28  $p < 0,001$  und PA2 - PA3 an Tag 28  $p = 0,009$ ; AST: Gruppe:  $p = 0,086$ , Tag:  $p < 0,325$ , Gruppe x Tag:  $p < 0,16$ , \*c = signifikanter Unterschied zwischen Kontrolle - PA3 an Tag 14  $p = 0,047$ ; GLDH: Gruppe:  $p = 0,31$ , Tag:  $p = 0.015$ , Gruppe x Tag:  $p = 0,322$ , \*d = signifikante Unterschiede zwischen Kontrolle - PA3 an Tag 7  $p = 0,006$  und zwischen PA1 - PA3 an Tag 7  $p = 0,021$  und zwischen PA2 - PA3 an Tag 7  $p = 0,015$ .

In Abbildung 29 sind die Verläufe der wichtigsten Enzyme jeweils für alle 4 Gruppen parallel als Least Square Means dargestellt. Signifikante Unterschiede zwischen den Dosisgruppen wurden nur für GGT festgestellt: an Tag 21 zwischen höchster Dosisgruppe und Kontrollgruppe bzw. niedrigster Dosisgruppe, an Tag 28 zwischen höchster Dosisgruppe und allen anderen Gruppen. Zudem gab es für das Enzym GLDH an Tag 7 signifikante Unterschiede zwischen höchster Dosisgruppe und allen anderen Dosisgruppen. Diese sind vermutlich auf die unbeabsichtigte Überdosierung an Tag 4 bis 6 in der Gruppe PA3 zurückzuführen, von der alle Tiere dieser Gruppe in unterschiedlichem Ausmaß betroffen waren. Der damit einhergehende Enzymanstieg war nach Korrektur der Dosis reversibel, so dass im weiteren Verlauf keine signifikanten Unterschiede zwischen den Dosisgruppen beobachtet wurden.

#### 4.3.1.2.4. Pathologie

##### **Sektion - makroskopische Befunde**

Durch die Supplementierung bedingte Veränderungen waren vorrangig an der Leber als Zielorgan für PA/PANO zu erwarten.

Makroskopisch wurde nur bei Schaf 42 im rechten Leberlappen fokal aufgehelltes, brüchiges Parenchym festgestellt. Insgesamt waren von dieser Veränderung etwa 10% der Leber betroffen. Anhand dieses Befundes wurde der Verdacht auf fokale hepatische Lipidose geäußert. Bei den anderen Schafen traten keine derartigen Leberveränderungen auf.

Bei 9 von insgesamt 16 Tieren aus allen Gruppen einschließlich der Kontrollgruppe konnten durch Endoparasiten induzierte Nebenbefunde an Lunge und/oder Leber festgestellt werden: an der Leber bei den Schafen 13, 22, 34 und 42; an der Lunge bei den Schafen 43, 23, 24, 33, 41 und 42. Von diesen Tieren war nur Schaf 42 auch serologisch auffällig. Die Befunde werden in Tabelle 9 zusammengefasst. Zudem zeigte sich bei Schaf 34 eine geringgradige abszedierende Pneumonie. Außer den genannten konnten makroskopisch keine weiteren pathologischen Auffälligkeiten diagnostiziert werden.

Tabelle 9: Hauptversuch an Milchschaafen - parasitäre Schädigung an Leber und Lunge

Schafe	Tier	Parasitäre Schädigung der Leber	Parasitäre Schädigung der Lunge
Gruppe 1	11	-	-
	12	-	-
	13	+	-
Kontrolle	43	-	+
Gruppe 2	21	-	-
	22	+	-
	23	-	+
1,5 mg/kg	24	-	+
Gruppe 3	31	-	-
	32	-	-
	33	-	+
3,0 mg/kg	34	+	-
Gruppe 4	14	-	-
	41	-	+
	42	+	+
6,0 mg/kg	44	-	-

Auch bei den vorzeitig aus dem Versuch genommenen Tieren 14, 32 und 44 konnten keine pathologisch- anatomischen Veränderungen festgestellt werden, die mit ihren klinischen Befunden im Zusammenhang standen. Es ist allerdings möglich, dass eventuelle Befunde durch den zeitlichen Abstand zwischen Abbruch der Supplementierung und Euthanasie sowie durch die erfolgreiche Behandlung makroskopisch nicht mehr darstellbar waren.

#### **Sektion - histopathologische Befunde**

Unabhängig von der PA/PANO-Dosis waren in der Leber von fast allen Tieren gering- bis mittelgradige multifokale portale lymphohistiozytäre Infiltrationen, teilweise mit einzelnen eosinophilen Granulozyten und Proliferation von stromalen Zellen und Gallengängen nachweisbar. Die beobachteten Veränderungen treten infolge verschiedener chronischer Prozesse in der Leber auf und sind überwiegend unspezifische Reaktionen (Reparationsvorgänge) des Lebergewebes. Da diese

Befunde sowohl in der Kontrollgruppe als auch in allen Versuchsgruppen auftraten, lassen sie sich nicht eindeutig der PA-Supplementierung zuordnen.

Bei einem Kontrolltier, zwei Tieren der Dosisgruppe 3 und allen Tieren der Dosisgruppe 4 ließen sich histologisch entzündliche Veränderungen der Lunge feststellen. Bei Schaf 14 ist wahrscheinlich, dass es im Zuge der teilweise starken Abwehr bei der PA Supplementierung (nachfolgend Verschlucken, Husten) Panseninhalt aspiriert hat.

Grundsätzlich ließen sich histologisch in Lunge, Niere und Pansen keine Veränderungen nachweisen, die für eine PA-Supplementierung spezifisch sind.

#### 4.3.1.2.5. Rückstände- Blutplasma

Die Bestimmung der PA/PANOs im Plasma der Schafe erfolgte am 1.Tag der Applikation hochfrequent mit einem Probenahmeintervall von 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10 und 12 h nach Gabe des Extraktes sowie jeweils drei Stunden nach Supplementierung an den Versuchstagen 2, 3, 5, 7, 10, 14, 21 und 28. Weder in den Plasma-Kontrollproben der Tiere vor Versuchsbeginn waren PA/PANOs nachweisbar noch in den Proben der Tiere der Kontrollgruppe.

Der zeitliche Verlauf der jeweiligen PA Konzentrationen im Plasma während des ersten Versuchstags ist in Abbildung 30 dargestellt. Hieraus ist ersichtlich, dass 1) einige der applizierten PAs, wie z.B. Senecionin oder Seneciphyllin (und deren N-Oxide) am frühesten Probenahmezeitpunkt eine Stunde nach Gabe nicht oder nicht mehr nachweisbar waren und das PA-Profil des Plasmas eine hohe Vergleichbarkeit zum Pansen aufweist (Abb. 70) Die PA-Verbindungen, die im Plasma nachweisbar waren, wurden sowohl in ihrer tertiären Basen- als auch N-Oxid Form detektiert, wobei aber das Verhältnis von freier Basen- zur N-Oxidform sich zwischen den PAs unterscheidet (Abbildung 30). Beipielsweise wurden Jaconin und dessen N-Oxid in ähnlichen Konzentrationen bestimmt, während Jacolin eine vergleichsweise hohe Konzentration aufwies und dessen N-Oxid nur in Spuren bestimmt wurde (Abbildung 30).

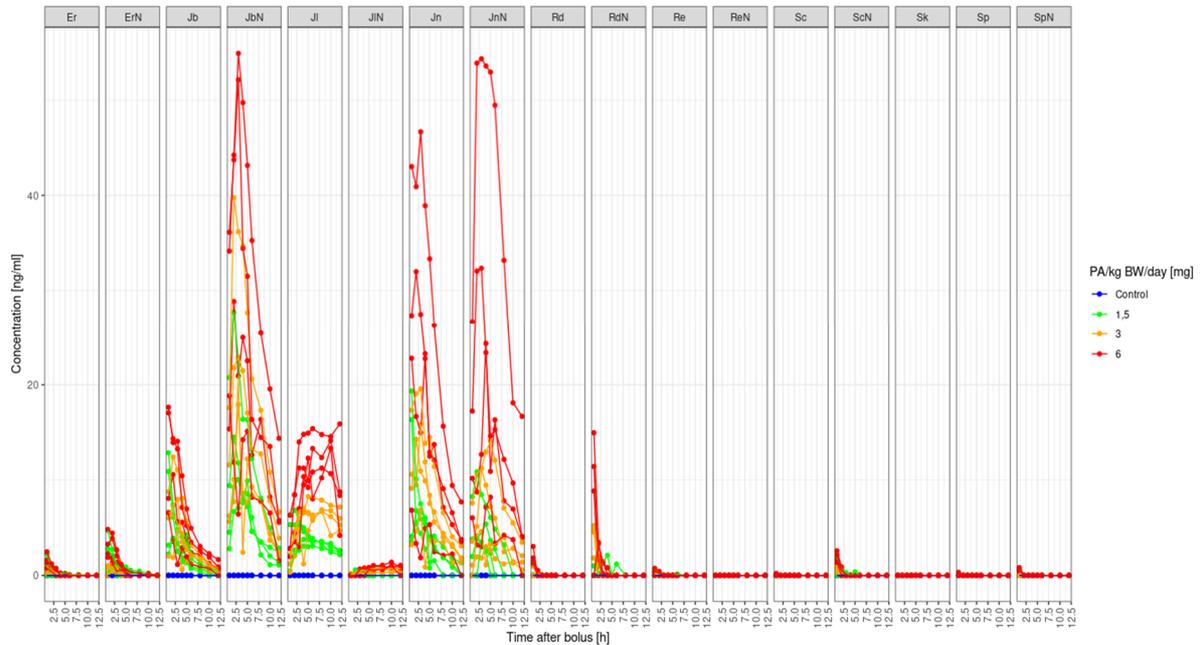


Abbildung 30: Darstellung der PA Konzentrationen im Plasma an Tag 1 der Applikation. Dargestellt sind die Tiere der Kontrollgruppe (blau) sowie der Dosisgruppen (mg PA/kg BW/d): 1,5 mg/kg in grün, 3,0 in orange und 6,0 mg/kg in rot. Abk: Erucifolin (Er), Erucifolin N-Oxid (ErN), Jacobin (Jb), Jacobin N-Oxid (JbN), Jacolin (Jl), Jacolin N-Oxid (JlN), Jaconin (Jn), Jaconin N-Oxid (JnN), Riddelliin (Rd), Riddelliin N-Oxid (RdN), Retrorsin (Re), Retrorsin N-Oxid (ReN), Senecionin (Sc), Senecionin N-Oxid (ScN), Senkirkin (Sk), Seneciophyllin (Sp), Seneciophyllin N-Oxid (SpN). Die Zusammensetzung des applizierten Extraktes ist in Tabelle 7 dargestellt.

Da die über den Extrakt applizierten N-Oxide im Pansen schnell zur korrespondierenden freien Base reduziert wurden und im Pansen nicht mehr nachweisbar waren, ist anzunehmen, dass die im Plasma detektierten N-Oxide durch den hepatischen Metabolismus aus ihrer freien Base gebildet wurden. Diese Annahme wird dadurch gestützt, dass die N-Oxidierung eines der wichtigsten metabolischen Transformationen der zyklischen PAs darstellt (Abbildung 75) sowie durch den zeitlichen Versatz der maximalen Plasmakonzentration zwischen der freien Basen- und dessen N-Oxid-Form (Abbildung 30). Wie aus Abbildung 31 ersichtlich, ist der Zeitpunkt der maximalen Plasmakonzentration  $t_{max}$  des N-Oxids immer später als das der freien Base, z.B. wurde  $t_{max}$  von Jacobin mit  $\leq 1$  h und von Jacobin-N-Oxid mit 3,1 h abgeschätzt.

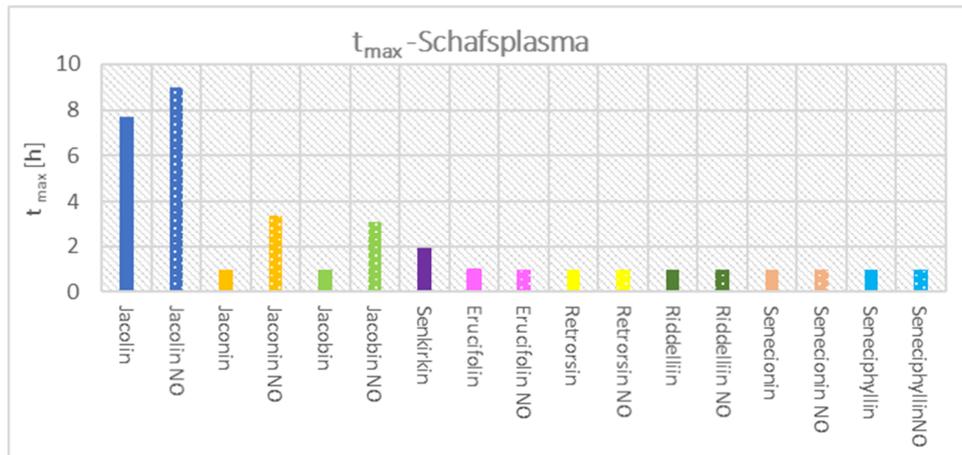


Abbildung 31: Abgeleitete Zeitpunkte der maximalen Plasmakonzentration der PA/PANO. Zur Information sind die in vitro abgeschätzten Halbwertszeiten [h] der Verbindungen im Pansen zugefügt. In grau dargestellt sind die PAs, deren maximale Konzentration schon beim frühesten Probenahmezeitpunkt (1h) erreicht war, hier ist  $t_{\max} \leq 1h$ .

Abk: Erucifolin (Er), Erucifolin N-Oxid (ErN), Jacobin (Jb), Jacobin N-Oxid (JbN), Jacolin (Jl), Jacolin N-Oxid (JlN), Jaconin (Jn), Jaconin N-Oxid (JnN), Riddelliin (Rd), Riddelliin N-Oxid (RdN), Retrorsin (Re), Retrorsin N-Oxid (ReN), Senecionin (Sc), Senecionin N-Oxid (ScN), Senkirkin (Sk), Seneciphyllin (Sp), Seneciphyllin N-Oxid (SpN).

#### 4.3.1.3. Ergebnisse Ziegen

##### 4.3.1.3.1. Klinisches Monitoring

Auch bei den Ziegen war die Akzeptanz der Supplementierung durch das Verhältnis von Melasse und bitterem PA/PANO-Extrakt beeinflusst. Alle Tiere der Kontrollgruppe (Melasse) und der niedrigsten Dosisgruppe (1,32 mg/kg PA/PANO-Extrakt plus höchster Melasseanteil) nahmen die täglich supplementierten Mengen gut an. Bei den Tieren der mittleren Dosisgruppe (2,63 mg/kg PA/PANO-Extrakt plus zweithöchster Melasseanteil) war eine kurze Gewöhnungsphase notwendig, danach wurde das Extrakt-Melassegemisch problemlos aufgenommen. Bei den Tieren der höchsten Dosisgruppe (5,26 mg/kg PA/PANO-Extrakt ohne Melasse) war die Akzeptanz zunächst mäßig, besserte sich aber im Laufe des Versuches bei allen Tieren außer bei Ziege 47.

Die Tiere der Kontrollgruppe sowie der Gruppe 2 (1,32 mg/kg) zeigten im Versuchsverlauf keine klinischen Auffälligkeiten.

Die Ziegen 37 und 38 der Gruppe 3 (2,63 mg/kg) fielen zwischen Tag 3 und Tag 9 nach der morgendlichen Extrakteingabe wiederholt durch kurzzeitige Reduktion des Allgemeinbefindens auf (Verminderung von Futteraufnahme und Wiederkautätigkeit). Nach 2 Stunden waren die Tiere klinisch wieder unauffällig. Ab Tag 9 kamen diese Symptome nicht mehr vor.

Ziege 47 der Gruppe 4 (5,26 mg/kg) zeigte ab Tag 5 nach der Extraktgabe regelmäßig reduziertes Allgemeinbefinden mit verminderter Futtermittelaufnahme und eingeschränkter Wiederkautätigkeit. Diese Symptome normalisierten sich innerhalb von ein bis zwei Stunden. Ab Tag 18 trat zusätzlich eine deutliche Reduktion der Pansenmotorik auf. Da die Symptome (Störung des Allgemeinbefindens, der Futtermittelaufnahme und der Pansenmotorik) reproduzierbar immer direkt nach der Extrakteingabe auftraten, wurde die Supplementierung an Tag 21 abends beendet. An diesem Tag erhielt die Ziege somit nur die halbe Dosis. Bereits ab dem nächsten Tag war das Tier wieder klinisch unauffällig. Das Tier wurde weiter beprobt, um Erkenntnisse zum Abklingen von serologischen Veränderungen und Rückständen zu erhalten.

Alle weiteren Ziegen zeigten bei der klinischen Untersuchung keine Auffälligkeiten.

4.3.1.3.2. Milchleistung

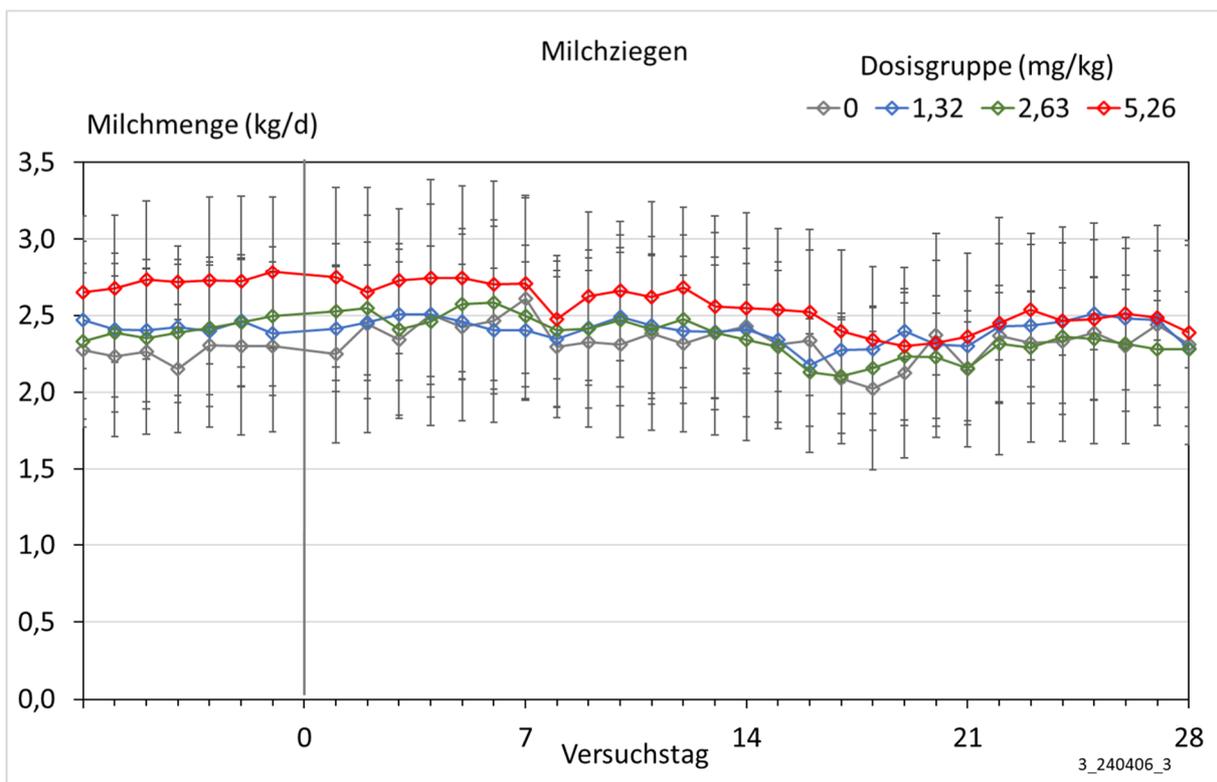


Abbildung 32: Transferversuch an Milchziegen – Milchleistung in kg pro Tag ( $\bar{X} \pm SD$ ), n = 4 Ziegen pro Dosisgruppe.

Die Ziegen befanden sich zu Versuchsbeginn im ersten Laktationsdrittel und wiesen erwartungsgemäß eine deutlich höhere Milchleistung auf als im Vorversuch. Obwohl alle Tiere aus einem Betrieb stammten, traten auch hier wieder recht große tierindividuelle Unterschiede zwischen den Einzeltieren auf, was vermutlich auch auf die genetische Heterogenität der Kreuzungstiere zurückzuführen war.

#### 4.3.1.3.3. Serologie

Analog zu den Vorversuchen wurde das Verhältnis der Messwerte im Versuchsverlauf zum Ausgangswert verwendet, um einen Anstieg der Leberwerte unter der PA/PANO-Supplementierung darzustellen. Bei einem Anstieg des Wertes um einen Faktor von  $\geq 2,0$  wurde die Erhöhung als „deutlicher Anstieg“ gewertet.

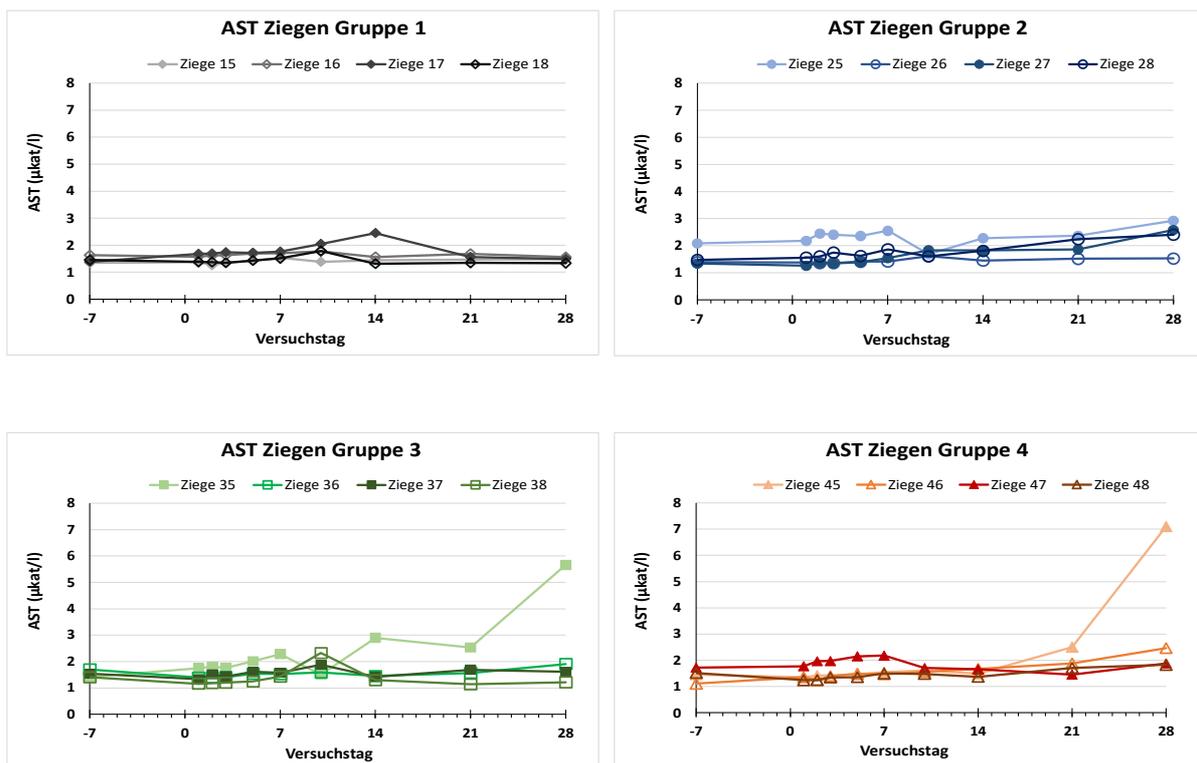


Abbildung 33: Konzentration des Enzyms Aspartat-Aminotransferase (AST) im Serum der Kontroll- und Versuchstiere vorzeitiger Abbruch der Supplementierung bei Ziege 47 (Tag 21).

Bei den Tieren der Kontrollgruppe kamen keine Veränderungen vor, während bei insgesamt 5 Einzeltieren aus den Dosisgruppen 2, 3 und 4 Erhöhungen von Leberenzymwerten auftraten. Dabei zeigten die Werte zwischen erster und letzter Probenahme teilweise sehr starke Anstiege, deren Höhe nicht mit der Höhe der Dosierung, sondern anscheinend mit tierindividuellen Faktoren zusammenhing.

Der Verlauf der Enzymaktivitäten von AST (Aspartat-Aminotransferase), GGT (Gamma-Glutamyltransferase) und GLDH (Glutamatdehydrogenase) sowie der Konzentration des Bilirubins wird in den nachfolgenden Abbildungen dargestellt. Alle Serumwerte sind Indikatoren für mögliche Leberschäden.

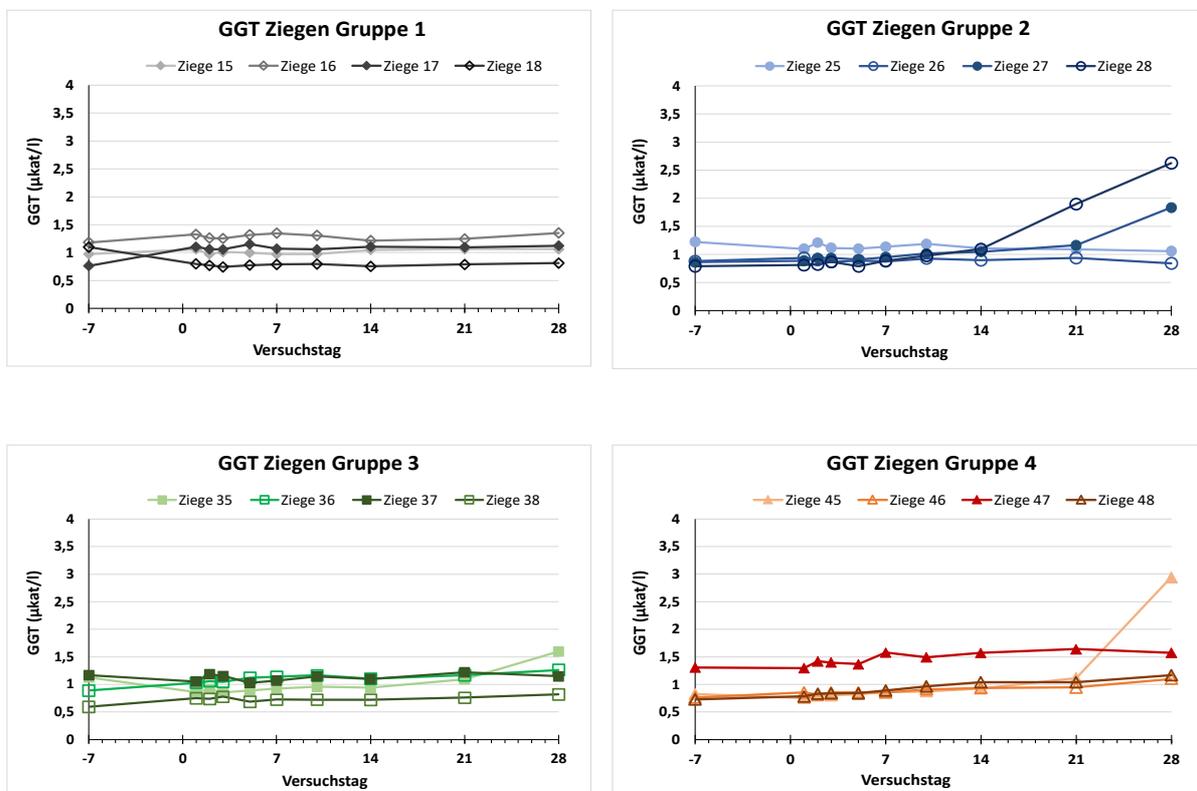


Abbildung 34: Konzentration des Enzyms Gamma-Glutamyltransferase (GGT) im Serum der Kontroll- und Versuchstiere, vorzeitiger Abbruch der Supplementierung bei Ziege 47 (Tag 21).

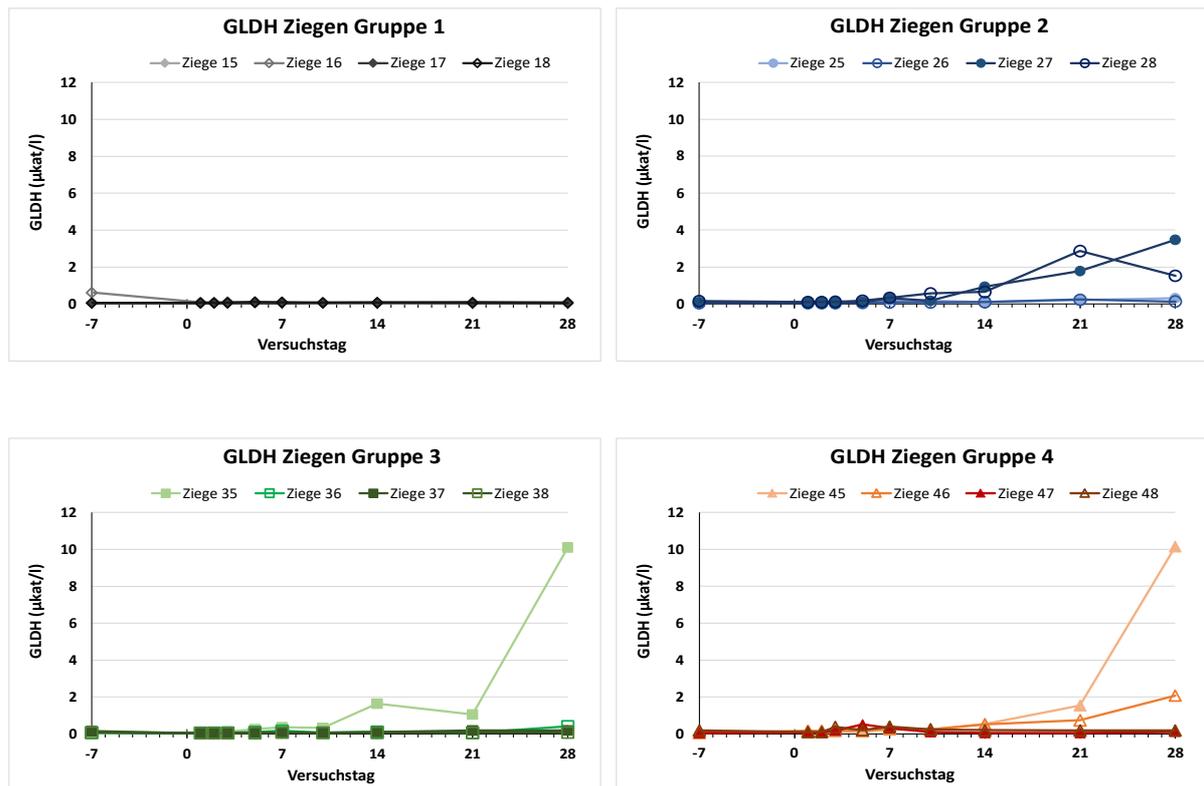


Abbildung 35: Konzentration des Enzyms Glutamatdehydrogenase (GLDH) im Serum der Kontroll- und Versuchstiere, vorzeitiger Abbruch der Supplementierung bei Ziege 47 (Tag 21).

Die Tiere 35 und 45 zeigten zum Versuchsende sehr deutliche Anstiege der Enzymaktivitäten von AST und GLDH. Beispielsweise erhöhte sich bei Ziege 35 (Gruppe 3) der Wert der GLDH um das 310-fache und bei Ziege 45 (Gruppe 4) um das 112-fache. Andere Tiere derselben Dosierungsstufen zeigten dagegen keinen Anstieg der Leberenzymwerte im Verlauf der Supplementierung. Das Auftreten von erhöhten Leberenzymwerten war wie bei den Schafen unabhängig von klinischen Auffälligkeiten. So konnte bei Ziege 47, deren Supplementierung auf Grund von klinischen Symptomen abgebrochen werden musste, zu keiner Zeit ein Anstieg der Leberenzyme festgestellt werden, während bei den Tieren mit erhöhten Leberenzymen (Ziege 27, 28, 35, 45 und 46) keine klinischen Befunde auftraten. Auf Grund der kurzen Versuchsdauer bleibt allerdings unklar, ob diese Tiere bei fortgesetzter Supplementierung klinische Symptome entwickelt hätten.

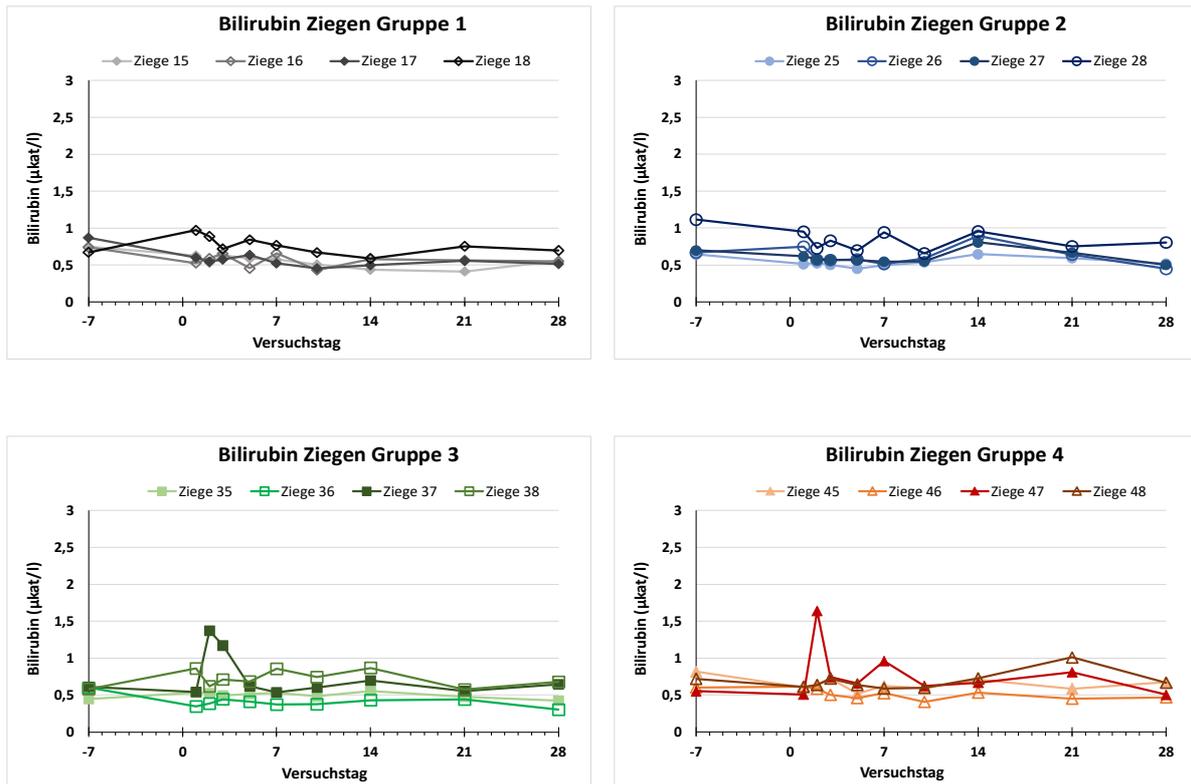


Abbildung 36: Konzentration des Bilirubins im Serum der Kontroll- und Versuchstiere, vorzeitiger Abbruch der Supplementierung bei Ziege 47 (Tag 21).

Die Bilirubinkonzentration war am 2. Versuchstag bei Ziege 37 (2,5-fach) und Ziege 47 (3-fach) deutlich erhöht, fiel danach wieder in den Bereich der Ausgangskonzentration zurück. Diese Erhöhung trat parallel zu einem zeitgleichen Anstieg und Abfall des Serumgehaltes an freien Fettsäuren auf (nicht dargestellt).

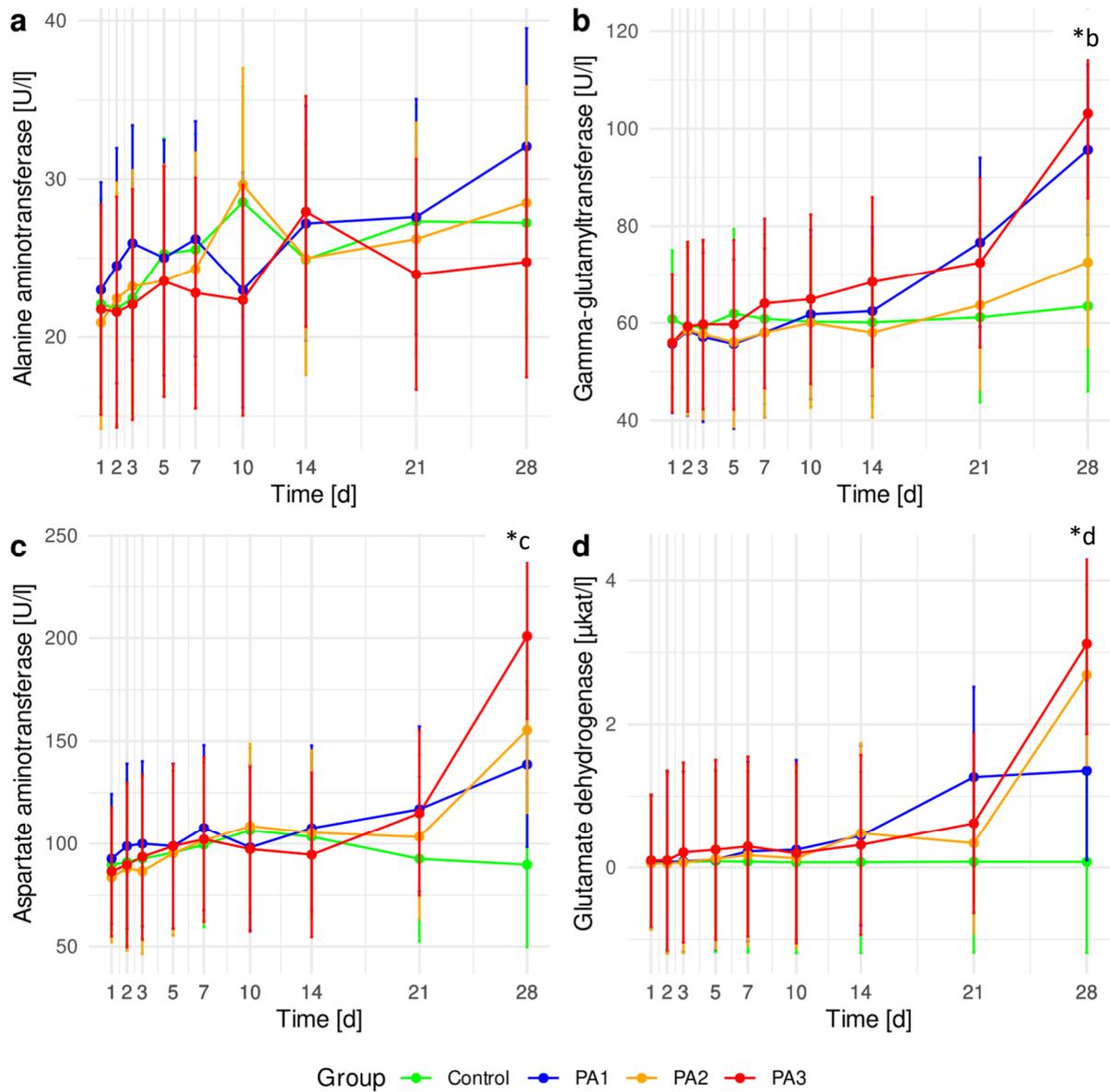


Abbildung 37: Zeitlicher Verlauf der Alanin-Aminotransferase (ALT) [a], Gamma-Glutamyltransferase (GGT) [b], Aspartat-Aminotransferase (AST) [c], Glutamat-Dehydrogenase (GLDH) [d] im Blutserum der Ziegen in Abhängigkeit von den Pyrrolizidinalkaloid (PA)/N-Oxid (NO)-Expositionsgruppen: Kontrollgruppe, PA/PANO-1 (1,32 mg (PA/PANO)/kg KG/d), PA/PANO-2 (2,63 mg (PA/PANO)/kg KG/d), PA/PANO-3 (5,26 mg (PA/PANO)/kg KG/d). Die Symbole stellen LS-Means (n=4) mit Fehlerindikatoren oder als 95% Konfidenzintervalle für Box-Cox- und rücktransformierte Daten dar.

p-Werte: ALT: Gruppe:  $p = 0.788$ , Tag:  $p < 0.001$ , Gruppe x Tag:  $p = 0.573$ ; GGT: Gruppe:  $p = 0.88$ , Tag:  $p < 0.001$ , Gruppe x Tag:  $p = 0.368$ , \*b = signifikanter Unterschied zwischen Kontrolle - PA3 an Tag 28  $p = 0.021$ ; AST: Gruppe:  $p = 0,77$ , Tag:  $p < 0,001$ , Gruppe x Tag:  $p < 0,41$ , \*c = signifikanter Unterschied zwischen Kontrolle - PA3 an Tag 28  $p = 0,005$ ; GLDH: Gruppe:  $p = 0,558$ , Tag:  $p < 0,001$ , Gruppe x Tag:  $p = 0,766$ , \*d = signifikante Unterschiede zwischen Kontrolle - PA2 an Tag 28  $p = 0,036$  und zwischen Kontrolle - PA3 an Tag 28  $p = 0,014$ .

In Abbildung 37 sind die Verläufe der wichtigsten Enzyme jeweils für alle 4 Gruppen parallel als Least Square Means dargestellt. Für drei Enzyme (GGT, AST und GLDH) traten an Tag 28 signifikante Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und der höchstdotierten Gruppe auf. Zudem war für GLDH an Tag 28 auch der Unterschied zwischen Kontrolle und mittlerer Dosisgruppe signifikant.

#### 4.3.1.3.4. Pathologie

##### **Sektion - makroskopische Befunde**

Drei Tiere (15, 18, 47) wiesen durch Endoparasiten induzierte Nebenbefunde am Labmagen auf. Zudem zeigten sich am Labmagen von insgesamt 8 Tieren (16, 17, 18, 25, 37, 45, 46, 48) fokale Schleimhautschädigungen verschiedener Ausprägung. Diese Befunde traten sowohl in der Kontroll- als auch in allen Versuchsgruppen auf. Auf der Pansenschleimhaut von einem Tier der Gruppe 2 (Ziege 25) wurde ebenfalls eine fokale Schädigung festgestellt. Weiterhin trat eine Vergrößerung der Milz (Splenomegalie) bei Tieren aus den beiden höchstdotierten Gruppen auf (Gruppe 3: Ziege 35, Gruppe 4: Ziegen 45, 46, 47). Da sich dieser Befund nur in den beiden höchst dotierten Gruppen darstellte, ist ein Zusammenhang zur PA-Supplementierung nicht auszuschließen. Außer den genannten konnten keine weiteren makroskopisch feststellbaren Auffälligkeiten diagnostiziert werden.

Tabelle 10: Sektionsbefunde Ziegen

Ziegen	Tier	Parasitäre Schädigung Labmagen	Schleimhautschäden Labmagen	Schleimhautschäden Pansen	Splenomegalie
Gruppe 1	15	+	-	-	-
	16	-	+	-	-
	17	-	+	-	-
	Kontrolle	18	+	+	-
Gruppe 2	25	-	+	+	-
	26	-	-	-	-
	27	-	-	-	-
	1,32	28	-	-	-
Gruppe 3	35	-	-	-	+
	36	-	-	-	-
	37	-	+	-	-
	2,63	38	-	-	-
Gruppe 4	45	-	+	-	+
	46	-	+	-	+
	47	+	-	-	+
	5,26	48	-	+	-

Bei der vorzeitig aus dem Versuch genommenen Ziege 47 konnten keine pathologisch-anatomischen Veränderungen festgestellt werden, die mit den klinischen Befunden im Zusammenhang standen. Es ist allerdings möglich, dass eventuelle Befunde durch den zeitlichen Abstand zwischen Abbruch der Supplementierung und Euthanasie sowie durch die erfolgreiche Behandlung makroskopisch nicht mehr darstellbar waren.

#### **Sektion - histopathologische Befunde**

An der Leber von jeweils 2 Tieren aus den Versuchsgruppen 2 (27, 28), 3 (35, 36) und 4 (45, 46) konnten vereinzelt abgerundete Zellen mit pyknotischen Zellkernen (Einzelzellnekrosen) nachgewiesen werden. Derartige Veränderungen werden im Zusammenhang mit Intoxikationen beobachtet. Da diese Befunde ausschließlich bei den Versuchsgruppen und nicht in der Kontrollgruppe auftraten, könnte ein Zusammenhang zur PA Supplementierung bestehen.

Zusätzlich konnten an der Leber von 9 der insgesamt 16 Tiere gering- bis mittelgradige multifokale portale lymphohistiozytäre Infiltrationen dargestellt werden. Die beobachteten Veränderungen sind überwiegend unspezifische Reaktionen (Reparationsvorgänge) des Lebergewebes und treten infolge verschiedener chronischer Prozesse in der Leber auf. Da dieser Befund sowohl in der Kontrollgruppe (3 Tiere) als auch in allen Versuchsgruppen (Gruppe 2: 3 Tiere, Gruppe 3 und 4: jeweils 1 Tier) auftrat, lässt sich kein Zusammenhang zu der PA Supplementierung herstellen.

#### 4.3.1.3.1. Rückstände- Blutplasma

Die Bestimmung der PA/PANOs im Plasma der Ziegen erfolgte am 1.Tag der Applikation hochfrequent mit einem Probenahmeintervall von 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10 und 12 h nach Gabe des Extraktes sowie jeweils drei Stunden nach Supplementierung an den Versuchstagen 2, 3, 5, 7, 10, 14, 21 und 28.

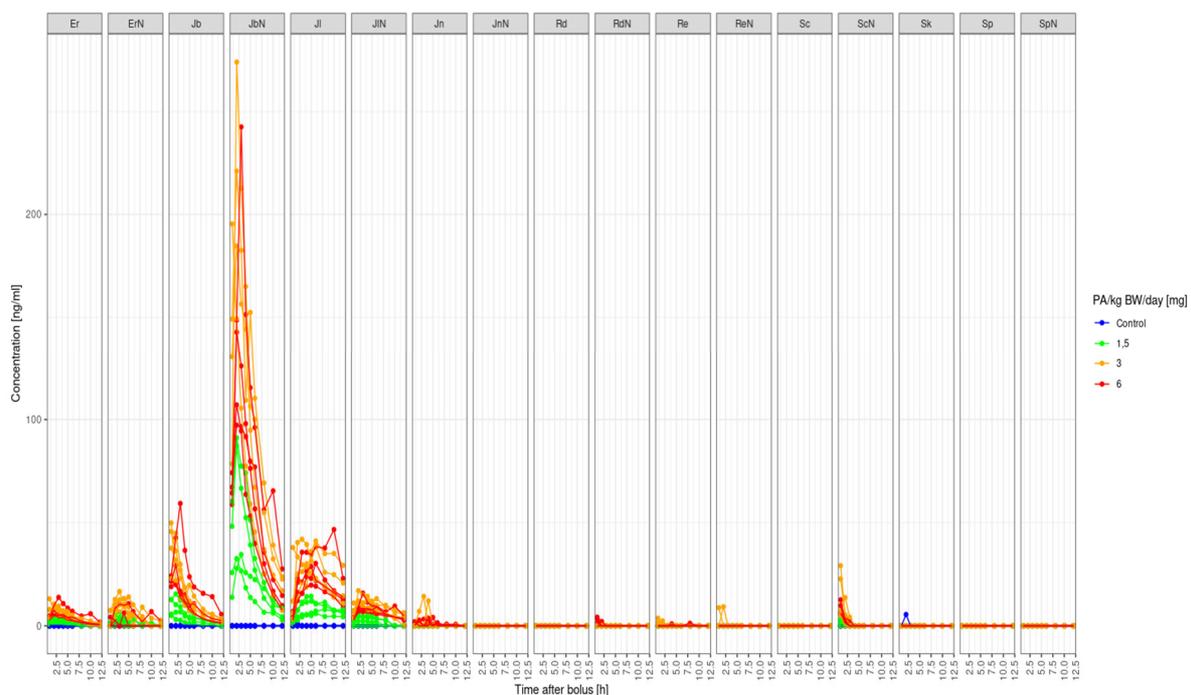


Abbildung 38: Darstellung der PA/PANO Konzentrationen im Plasma an Tag 1 der Applikation. Dargestellt sind die Tiere der Kontrollgruppe (blau) sowie der Dosisgruppen (mg PA/kg BW/d): 1,32 mg/kg in grün, 2,63 in orange und 5,26 mg/kg in rot. Abk: Erucifolin (Er), Erucifolin N-Oxid (ErN), Jacobin (Jb), Jacobin N-Oxid (JbN), Jacolin (Jl), Jacolin N-Oxid (JIN), Jaconin (Jn), Jaconin N-Oxid (JnN), Riddelliin (Rd), Riddelliin N-Oxid (RdN), Retrorsin (Re), Retrorsin N-Oxid (ReN), Senecionin (Sc), Senecionin N-Oxid (ScN), Senkirkin (Sk), Seneciphyllin (Sp), Seneciphyllin N-Oxid (SpN). Die Zusammensetzung des applizierten Extraktes ist in Tabelle 7 dargestellt.

Weder in den Plasma-Kontrollproben der Tiere vor Versuchsbeginn waren PA/PANOs nachweisbar noch in den Proben der Tiere der Kontrollgruppe. Der zeitliche Verlauf der jeweiligen PA/PANO Konzentrationen im Plasma während des ersten Versuchstags ist in Abbildung 38 dargestellt. Anders als bei den Schafen wurden im Plasma nur sehr geringe Gehalte von Jaconin und kein Jaconin-N-Oxid nachgewiesen, obwohl die Gehalte im Extrakt etwa doppelt so hoch waren wie im Schaf-Versuch.

### 4.3.2. Transfer in die Milch

#### 4.3.2.1. Ergebnisse Rinder

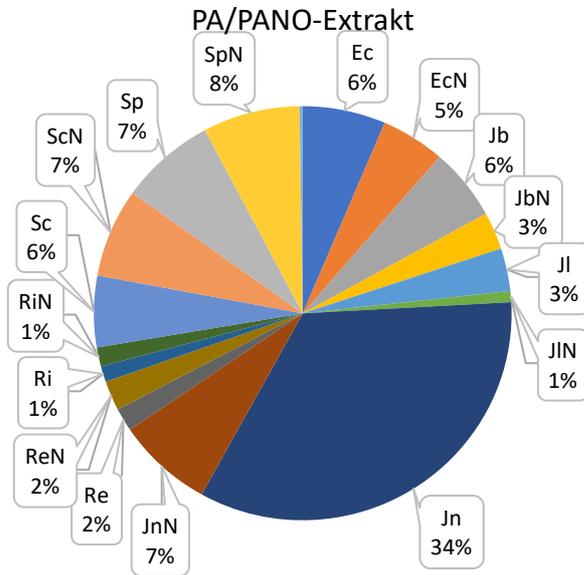
Die Untersuchung der Milch auf ihre PA/PANO-Zusammensetzung ergab für Jacolin (Jl) mit 74 % den höchsten Anteil, gefolgt von Jaconin (Jn) und Jacobin (Jb) mit 11 bzw. 7 % (Abbildung 39 [B]). Erst danach folgten die korrespondierenden N-Oxide im Bereich von 1-3 %, sowie Retrorsin-NO (ReNO) und Senkirkin (Sk).

Eine Übersicht über PA/PANO-Gesamt sowie die einzelnen Dosisgruppen inklusive der Spannweiten über den Versuchsverlauf ist in Tabelle 11 bzw. eine Berechnung der Transferrate (TR) für die einzelnen Kongenere als Summe aus PA-PANO ist in Tabelle 19 gegeben. Die TR war über den Versuchsverlauf für die drei Dosisgruppen vergleichbar, so dass eine mittlere Transferrate über alle Dosisgruppen berechnet wurde, die für PA-Gesamt durchschnittlich 0,06% betrug. Die PA/PANO-Konzentration in der Milch spiegelte sich auch in den TR wider, so dass das hauptsächlich vorkommende Jacolin mit 1,4% die mit Abstand höchste TR aufwies. Die zweithöchste TR wurde für Senkirkin bestimmt, welches in der Milch sogar einen höheren Anteil als im JKK-Extrakt aufwies. Die meisten PA/PANO wurden nur in sehr geringen Mengen in die Milch übertragen, was durch TR von durchschnittlich unter 0,003% untermauert wurde (Tabelle 11 bzw. Tabelle 19).

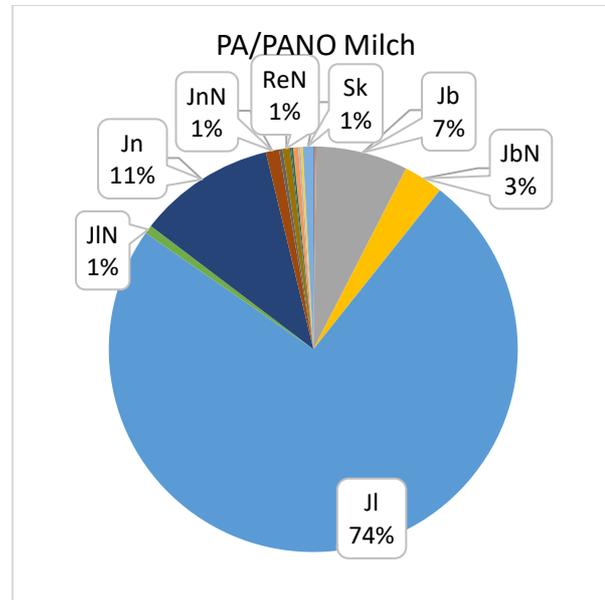
Ein Vergleich der PA/PANO-Konzentrationen im Morgen- und Abendgemelk zeigt deutliche Unterschiede (Abbildung 40). Die PA/PANO-Applikation bei den Rindern erfolgte einmal am Tag, so dass der zeitliche Abstand zwischen der PA/PANO-Gabe und den Melkzeiten 9 h (Abendgemelk) bzw. 23 h (Morgengemelk) betrug. Die deutlich geringeren PA/PANO-Konzentrationen im Morgengemelk im Vergleich zum Abendgemelk deuten darauf hin, dass nach einer PA/PANO-Exposition der Kühe die PAs relativ schnell wieder ausgeschieden werden und nach ca. 24-48 h nicht mehr in der Milch nachweisbar sind. Diese vergleichsweise schnelle Ausscheidung wurde für Retrorsin und Retrorsin-N-Oxid im Rahmen des ebenfalls im Projekt durchgeführten Kinetikversuchs für beide Formen bestätigt (Abbildung 59 A und B).

Ergänzend ist in Abbildung 41 das PA-Profil der Milch im Abend- (9h nach Gabe) sowie im Morgengemelk (23h nach Gabe) dargestellt. Daraus geht hervor, dass sich in Abhängigkeit vom zeitlichen Abstand zwischen Verabreichung und Probenahme (Melkzeit) nicht nur die Gesamtkonzentration an PA in der Milch ändert, sondern auch deren Zusammensetzung. Je später der Zeitpunkt der Probenahme, desto höher ist der Anteil an PA in der Milch, die im Pansen- und Leberstoffwechsel nur langsam abgebaut werden (Abbildung 71 und Abbildung 74).

[A]



[B]



Erucifolin	Ec	Erucifolin-NO	EcN	Jacobin	Jb	Jacobin-NO	JbN
Jacolin	Jl	Jacolin-NO	JlN	Jaconin	Jn	Jaconin-NO	JnN
Retrorsin	Re	Retrorsin-NO	ReN	Riddellin	Ri	Riddelliin-NO	RiN
Senecionin	Sc	Senecionin-NO	ScN	Seneciphyllin	Sp	Seneciphyllin-NO	SpN
Senkirkin	Sk						

Abbildung 39: Vorläufige Daten zur PA/PANO-Zusammensetzung im PA/PANO-Extrakt [A] und in der Milch [B], dargestellt als Mittelwerte der verschiedenen Dosierungsgruppen in Prozent. PA/PANO <1% sind nicht dargestellt; PA = Pyrrolizidinalkaloid; PANO = N-Oxid

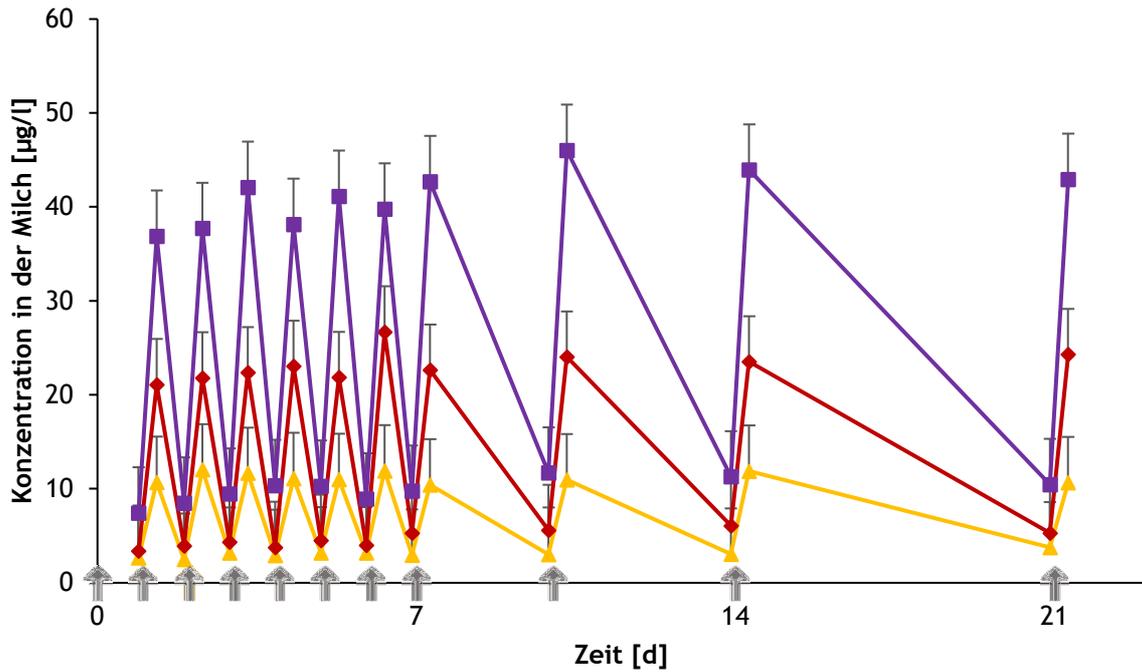


Abbildung 40: Vergleich der PA/PANO Konzentrationen im Morgen- und Abendgemelk der drei Dosisgruppen (gelb: 0,47; rot: 0,95 und lila 1,91 mg/kg KG/d) über den gesamten Versuchsverlauf. Die Pfeile zeigen die Probenahmezeitpunkte des Morgenmelks an (Morgengemelk: 23 Stunden nach PA-Gabe, Abendgemelk: 9 Stunden nach PA-Gabe)

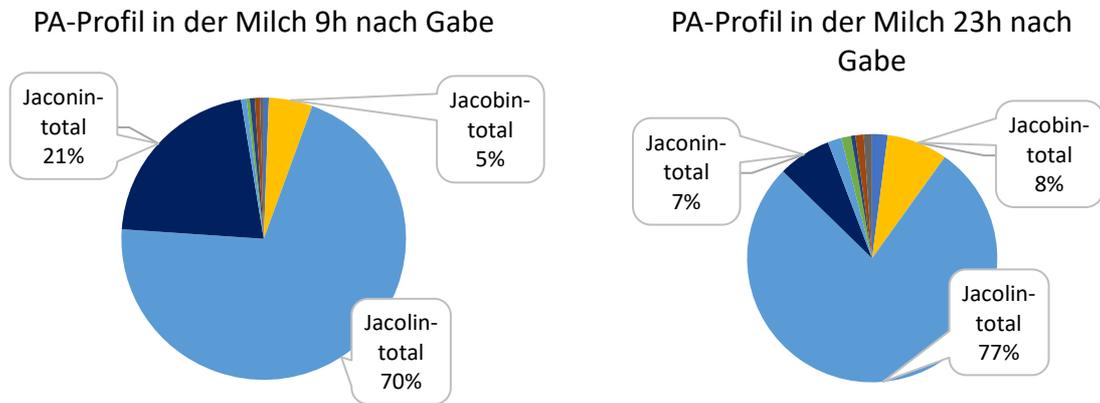


Abbildung 41: Vergleich der PA-Profile in der Kuhmilch berechnet als Mittelwert der drei Dosisgruppen. Links das Abendgemelk (9h nach Gabe) und rechts das Morgengemelk (23h nach Gabe) dargestellt ist.

PA-SAFE-FEED Abschlussbericht

Tabelle 11: Vorläufige Daten zur mittleren Transferrate [%] der einzelnen PA und PANO in der Milch der verschiedenen Dosierungsgruppen mit entsprechenden p-Werten, die durch Bildung von Rängen und anschließende Analyse mit einem gemischten linearen Modell ermittelt wurden. Als Spannweite sind die minimalen (min) und maximalen (max) Transferraten innerhalb der Gruppen angegeben.

		PA/PANO-1			PA/PANO-2			PA/PANO-3			p-Wert		
		0.47 mg (PA/PANO)/kg KG/Tag			0.95 mg (PA/PANO)/kg KG/Tag			1.91 mg (PA/PANO)/kg KG/Tag			Gruppe	Tag	Gruppe x Tag
		MW	Min	Max	MW	Min	Max	MW	Min	Max			
Erucifolin	Er	<LOD	<LOD	0,005	0,001	<LOD	0,003	0,002	0,001	0,003	<0,001	0,773	0,952
Erucifolin-NO	ErN	0,003	<LOD	0,045	0,001	<LOD	0,003	0,002	<LOD	0,004	<0,001	0,769	0,961
Jacobin	Jb	0,073	0,022	0,177	0,082	0,028	0,161	0,083	0,028	0,148	0,119	<0,001	0,967
Jacobin-NO	JbN	0,071	0,027	0,209	0,066	0,048	0,092	0,070	0,034	0,505	0,055	0,474	0,994
Jacolin	Jl	1,393	0,642	1,987	1,296	0,679	1,955	1,561	0,780	2,772	0,015	0,135	0,999
Jacolin-NO	JlN	0,034	0,006	0,112	0,049	0,007	0,094	0,054	0,012	0,285	0,011	0,781	0,146
Jaconin	Jn	0,020	0,007	0,054	0,022	0,011	0,039	0,021	0,009	0,043	0,249	<0,001	0,963
Jaconin-NO	JnN	<LOD	<LOD	<LOD	0,008	<LOD	0,014	0,011	<LOD	0,030	<0,001	0,889	0,851
Retrorsin	Re	0,002	<LOD	0,012	0,011	<LOD	0,030	0,022	0,005	0,049	<0,001	0,792	0,950
Retrorsin-NO	ReN	0,002	<LOD	0,046	0,001	<LOD	0,003	0,034	<LOD	1,321	<0,001	0,951	0,891
Riddelliin	Rd	<LOD	<LOD	0,007	0,002	<LOD	0,008	0,005	0,001	0,011	<0,001	0,275	0,781
Riddelliin-NO	RdN	0,001	<LOD	0,038	0,004	<LOD	0,012	0,006	<LOD	0,013	<0,001	0,936	0,997
Senecionin	Sc	<LOD	<LOD	0,005	<LOD	<LOD	0,001	<LOD	<LOD	0,001	<0,001	0,956	0,663
Senecionin-NO	ScN	0,002	<LOD	0,039	0,002	<LOD	0,005	0,005	0,001	0,035	<0,001	0,562	0,958
Seneciphyllin	Sp	<LOD	<LOD	0,004	0,001	<LOD	0,002	0,002	0,001	0,004	<0,001	0,236	0,924
Seneciphyllin-NO	SpN	0,002	<LOD	0,045	0,001	<LOD	0,003	0,002	<LOD	0,007	<0,001	0,119	0,121
Senkirkin	Sk	0,321	0,034	1,157	0,455	0,091	0,882	0,135	0,017	0,313	<0,001	0,871	0,999
PA-Gesamt		0,061	0,030	0,092	0,060	0,032	0,093	0,070	0,042	0,124	0,025	0,001	0,983

KG = Körpergewicht; MW = Mittelwert; LOD = Limit der Detection (<0.001); NO = N-Oxide; PA = Pyrrolizidinalkaloid

4.3.2.2. Ergebnisse Schafe



Abbildung 42: PA/PANO-Gehalte in % - Vergleich zwischen Extrakt und Milch bei Milchschaafen, Darstellung als Mittelwert über alle Dosisgruppen in Prozent; Blautöne – freie Basen, Grüntöne – N-Oxide.

In den Milchproben, die vor Versuchsbeginn von allen Schafen entnommenen wurden, konnten keine PA/PANO nachgewiesen werden. Während des Versuchs wurden in den Proben der Kontrollgruppe vereinzelt geringe Konzentrationen von PA/PANO nachgewiesen, die vermutlich auf Verschleppungen durch das Melkgeschirr zurückzuführen sind (nicht dargestellt) und daher nicht in der Auswertung berücksichtigt wurden.

Die prozentuale Zusammensetzung der PA/PANO-Gehalte im Extrakt und in der Milch der Schafe ist in Abbildung 42 dargestellt. Die Summen-PA/PANO-Gehalte in der Milch wurden als gewichtete Konzentrationen aus den Milchmengen in Morgen- und Abendmelkzeit und den entsprechenden PA/PANO-Konzentrationen je Versuchstier und Probenahmetag und errechnet (Abbildung 43). Die Summengehalte wurden anschließend über alle Tiere einer Gruppe gemittelt. Bei Tieren, die vorzeitig aus der Supplementierung genommenen wurden, wurden für die nachfolgenden Probenahmen aus der Mittelwertberechnung pro Gruppe ausgeschlossen.

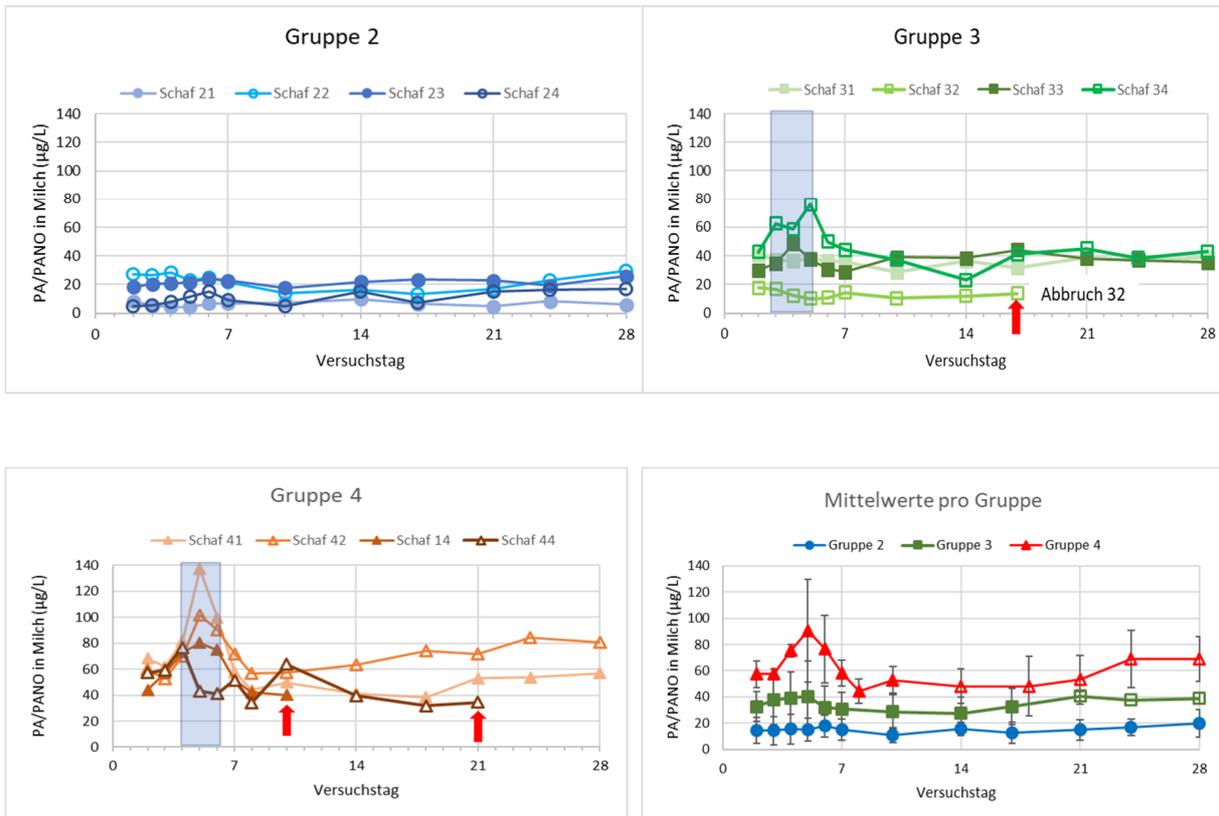


Abbildung 43: PA/PANO-Gehalte in Milch der Schafe als gewichtete Tagesmittelwerte pro Tier bzw. als Mittelwerte pro Dosisgruppe (Gruppe 2 – 1,5 mg/kg, Gruppe 3 – 3,0 mg/kg, Gruppe 4 – 6,0 mg/kg). – graublau hinterlegte Felder in Gruppe 3 und 4 – Zeitraum der vermutlichen Überdosierung; rote Pfeile – Abbruch der Supplementierung bei Einzeltieren; ungefüllte Symbole in der Abbildung Mittelwerte pro Gruppe - unvollständige Gruppen durch vorzeitig aus der Supplementierung genommene Tiere

Die Transferraten für Gesamt-PA sowie für die einzelnen PA (berechnet als Summe aus freier Base und N-Oxid) in die Schafmilch ist in Tabelle 12 dargestellt. Da keine Abhängigkeit der Transferrate von der applizierten PA/PANO-Dosis beobachtet wurde, wurde die mittlere Transferrate aus den drei Dosisgruppen berechnet. Für Substanzen, deren Konzentrationen als PA oder PANO bei Einzeltieren unterhalb des LOD lagen, wurde die LOD als maximale Konzentration angenommen.

Tabelle 12: Transferraten [%] der einzelnen PAs (total: Summe aus PA und PANO) in die Milch der Schafe (Mittelwert der drei Dosis-gruppen)

PA	Schafe
Gesamt-PA	0,032
Jl-total	0,702
Jn-total	0,017
Jb-total	0,015
Re-total	0,005
Rd-total	0,001
Er-total	0,001
Sp-total	0,0003
Sc-total	0,0004
Sk	<0,004*

\*Sk wurde zwar appliziert, war in der Milch aber in keinem Fall nachweisbar, bei fehlendem Nachweis von PA/PANO bei Einzeltieren Verwendung des LOD der Methode zur Schätzung der maximalen Transferrate.

Während der Verlauf in Gruppe 2 zwischen den Einzeltieren sehr ähnlich war, zeigten sich bei den Gruppen 3 und 4 stärkere tierindividuelle Schwankungen. Lässt man den Zeitraum der vermutlichen Überdosierung außer Betracht, so scheint auffällig, dass die Tiere, die auf Grund von Symptomen vorzeitig aus dem Versuch genommen wurden, jeweils vor Versuchsabbruch die geringsten PA/PANO-Konzentrationen in Milch aufwiesen. Eine Abstufung der Konzentrationen in Abhängigkeit von der Dosierung ist erkennbar.

Geringfügig höhere Konzentrationen in der Milch wurden in der Abendmelkzeit beobachtet, was auf die Intervalle zwischen Extraktgabe und Melkzeiten zurückzuführen ist. Beispielhaft ist dies für Tier 31

in Abbildung 44 dargestellt. Der zeitliche Abstand zur letzten Supplementierung betrug bei der Abendmelkzeit 9 h und bei der Morgenmelkzeit 13 h.

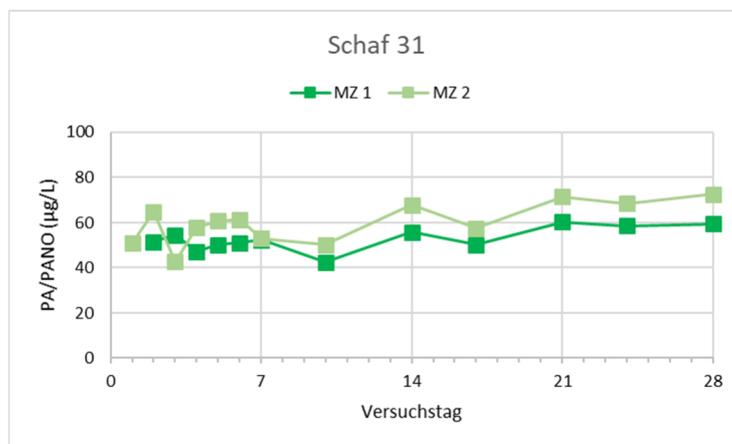


Abbildung 44: Unterschiede der PA/PANO-Summengehalte in Milch zwischen den Melkzeiten bei Schaf 31, Dosisgruppe 3 mg PA/kg KGW; MZ1 = Morgenmelkzeit, 13h nach Supplementierung; Melkzeit 2 = Abendmelkzeit, 9h nach Supplementierung

### 4.3.2.3. Ergebnisse Ziegen

Abbildung 45 zeigt die prozentuale Verteilung der PA/PANOs in der Milch der Ziegen als Mittelwert über alle Dosisgruppen im Vergleich zum Extrakt. Der Anteil von Jacolin in der Ziegenmilch ist mit 84,5% noch höher als bei den Milchkühen und Schafen. Jacolin, Jacobin und Jaconin sowie Jacolin-NO und Jacobin-NO machen zusammen 99% des PA/PANO-Gehaltes aus. Im Gegensatz zu den beiden anderen Tierarten war in der Milch der Ziegen kein Jaconin-NO nachweisbar. Wie bei den Schafen betrug der Anteil der N-Oxide in Milch in Summe nur 3,4%, obwohl der N-Oxid-Anteil im Extrakt mit 31,3% nur halb so hoch lag wie bei den Schafen.

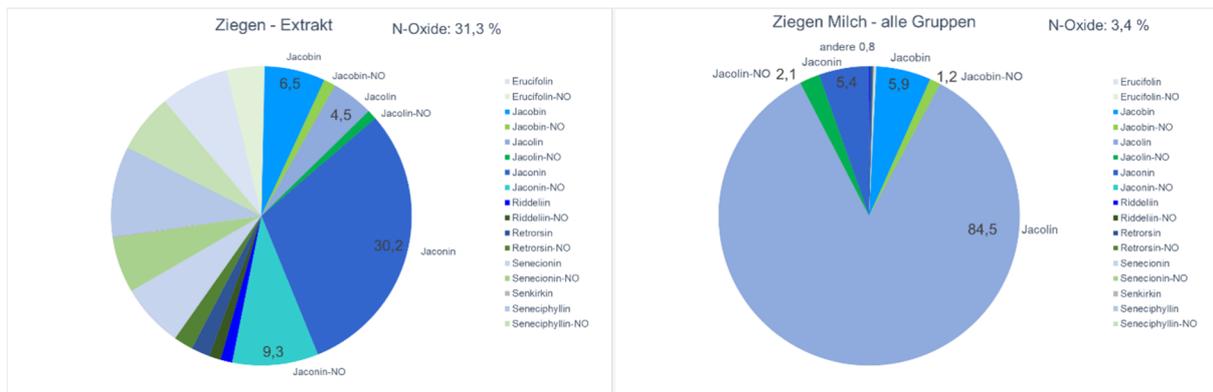


Abbildung 45: PA/PANO-Gehalte in % - Vergleich zwischen Extrakt und Milch bei Milchziegen, Darstellung als Mittelwert über alle Dosisgruppen in Prozent; Blautöne – freie Basen, Grüntöne – N-Oxide.

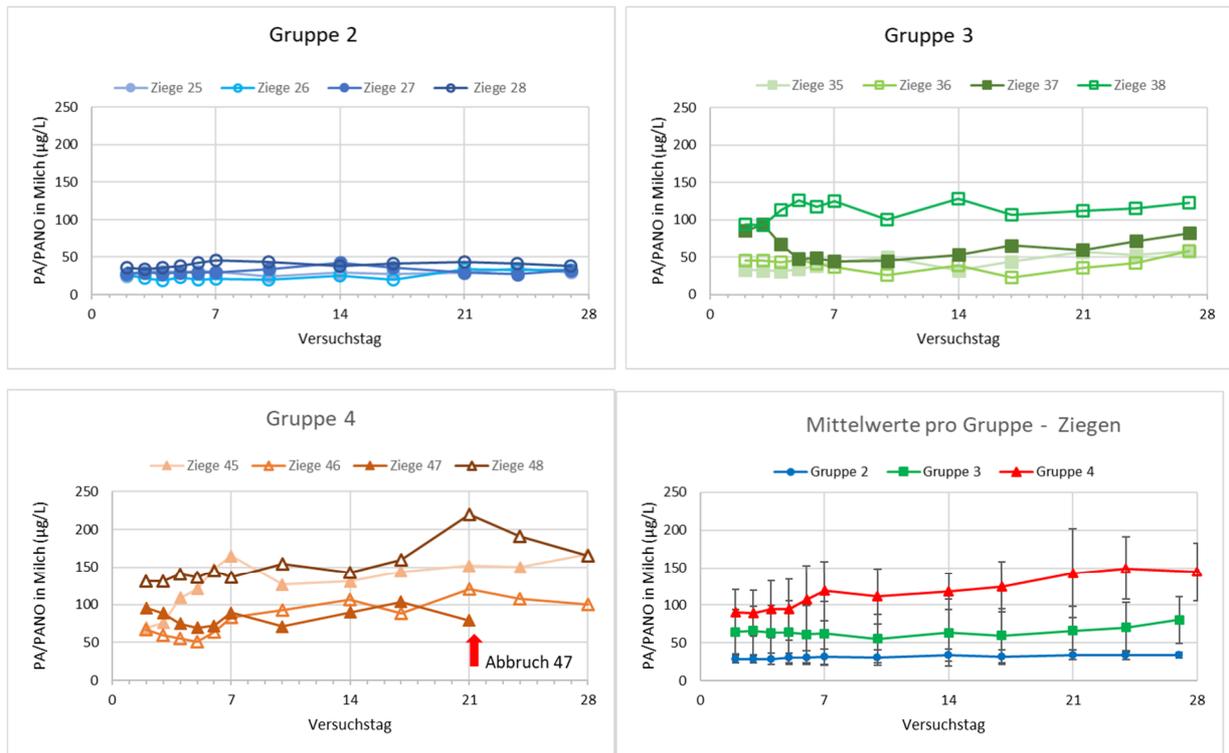


Abbildung 46: PA/PANO-Gehalte in Milch der Ziegen als gewichtete Tagesmittelwerte pro Tier bzw. als Mittelwerte pro Dosisgruppe (Gruppe 2 – 1,32 mg/kg, Gruppe 3 – 2,63 mg/kg, Gruppe 4 – 5,26 mg/kg).– ungefüllte Symbole in der Abbildung „Mittelwerte pro Gruppe“ markieren unvollständige Gruppe durch vorzeitig aus der Supplementierung genommenes Tier; roter Pfeil = Abbruch der Supplementierung bei Ziege 47

Tabelle 13: Transferraten [%] der einzelnen PAs (total: Summe aus PA und PANO) in die Milch der Ziegen (Mittelwert der drei Dosis-gruppen)

PA	
Gesamt-PA	0,125
Jl-total	1,886
Jn-total	0,016
Jb-total	0,107
Re-total	0,025
Rd-total	0,007
Er-total	0,002
Sc-total	0,002
Sp-total	0,001
Sk	<0,015*

\*Sk wurde zwar appliziert, war in der Milch aber in keinem Fall nachweisbar, bei fehlendem Nachweis von PA/PANO bei Einzeltieren Verwendung des LOD der Methode zur Schätzung der maximalen Transferrate.

Die bereits bei den Schafen beobachteten tierindividuellen Unterschieden zwischen den PA/PANO-Gehalten in Milch der Einzeltiere einer Dosisgruppe sind auch bei den Ziegen, insbesondere der Dosisgruppen 3 und 4 zu erkennen (Abbildung 46). Besonders hebt sich die Ziege 38 von den anderen Tieren der Gruppe ab. Zu beachten ist, dass dieses Tier das schwerste Tier der Gruppe war, jedoch die geringste Milchleistung aufwies.

Die Transferraten für Gesamt-PA sowie für die einzelnen PA (berechnet als Summe aus freier Base und N-Oxid) in die Ziegenmilch ist in Tabelle 13 dargestellt. Da keine Abhängigkeit der Transferrate von der applizierten PA-Dosis beobachtet wurde, wurde die mittlere Transferrate aus den drei Dosisgruppen berechnet.

#### 4.3.3. Transfer in das Muskelfleisch (und Lebergewebe)

Am Ende der Fütterungsstudie wurden alle Versuchstiere getötet, wobei bei den Milchkühen ein Muskeltyp (Filet) und bei den Schafen und Ziegen drei Muskeltypen (Rücken, Schulter und Bein) beprobt wurden. Zur Einordnung der Ergebnisse ist anzumerken, dass die Rinder zwei Stunden nach der letzten Dosisgabe geschlachtet wurden, während die Ziegen und Schafe 14 Stunden nach der letzten Dosisgabe euthanasiert wurden. Somit unterscheiden sich die Zeiträume zwischen Tötung und letzter Dosierung als auch die Tötungsmethoden, die im Gewebe der euthanasierten Tiere zu höheren Blutgehalten führten.

#### 4.3.3.1. Ergebnisse Rinder

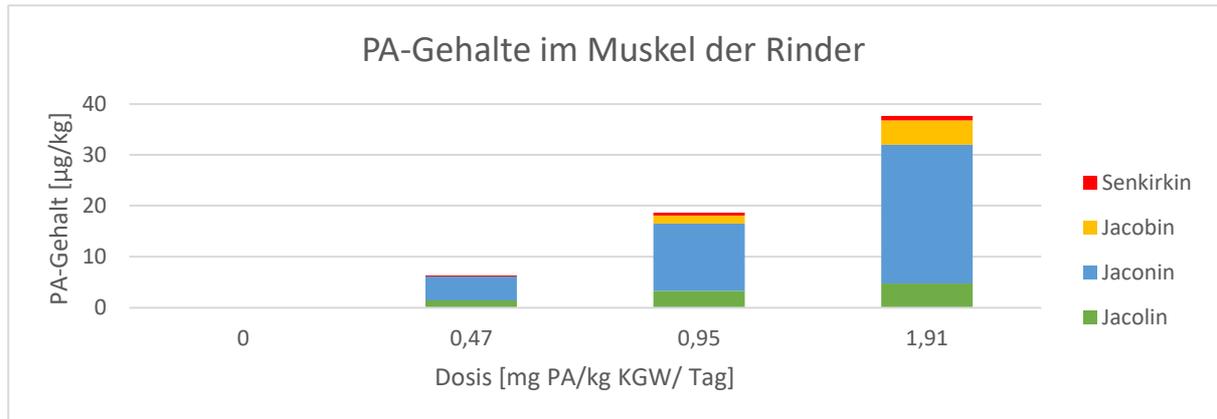


Abbildung 47: PA-Gehalte im Muskel der Rinder pro applizierter PA-Dosis dargestellt als Mittelwert der vier Tiere. Alle anderen PAs befanden sich unterhalb der Nachweisgrenze. Die Zusammensetzung des applizierten Extraktes ist in Tabelle 7 dargestellt.

In Abbildung 47 sind die Mittelwerte der PA-Gehalte im Muskelfleisch (Filet) der vier Versuchstiere pro Dosisgruppe sowie der Kontrolle dargestellt. Aus den neun per Extrakt applizierten PAs (inklusive N-Oxide) waren nur Jacobin, Jacolin und Jaconin im Muskelfleisch nachweisbar. Das PA-Profil in der Leber war mit dem des Muskelfleischs vergleichbar, aber die Gehalte in den Lebern der Tiere waren um ca. einen Faktor fünf höher als im Muskelfleisch. Ausnahme waren die Lebern der höchsten Dosisgruppe. Hier wurden zusätzlich noch geringe Gehalte an Erucifolin, Seneciphyllin und Retrorsin nachgewiesen.

#### 4.3.3.2. Ergebnisse Schafe

In Abbildung 48 sind die Mittelwerte der PA-Gehalte in drei untersuchten Muskelpartien der Schafe (Keule, Rücken, Schulter) der Versuchstiere pro Dosisgruppe (n=4) sowie der Kontrolle dargestellt (n=4). Von den über den Extrakt applizierten PA/PANOs waren nur Jacobin, Jacolin und Jaconin im Muskelfleisch nachweisbar. Zwischen den Muskelpartien wurden in Bezug auf den PA-Gehalt und das PA-Profil keine Unterschiede festgestellt. Die mittleren Konzentrationen in den drei Dosisgruppen entsprachen den Abstufungen der Dosierungen.

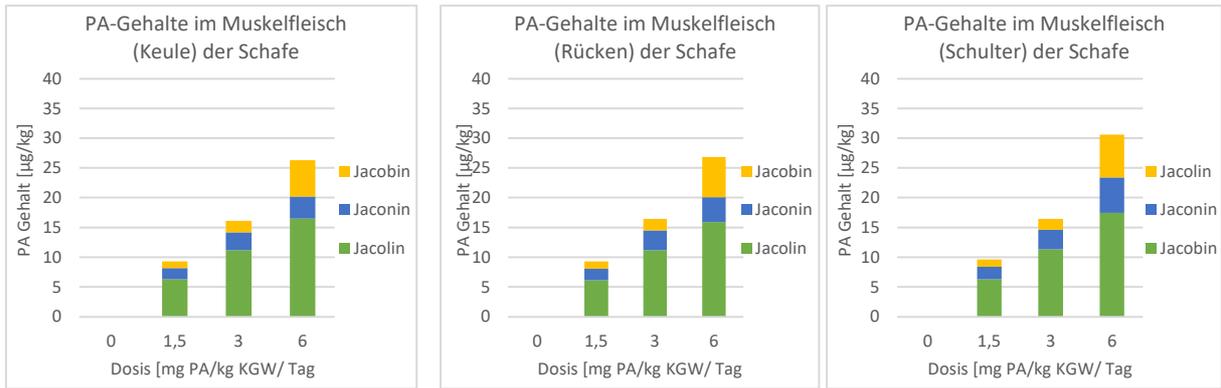


Abbildung 48: PA-Gehalte in drei untersuchten Muskelpartien der Schafe. Pro applizierter PA-Dosis ist der Mittelwert der vier Tiere dargestellt. Alle anderen PAs befanden sich unterhalb der Nachweisgrenze. Die Zusammensetzung des applizierten Extraktes ist in Tabelle 7 dargestellt.

#### 4.3.3.3. Ergebnisse Ziegen

In Abbildung 49 sind die Mittelwerte der PA-Gehalte in drei untersuchten Muskelpartien der Ziegen (Keule, Rücken, Schulter) der Versuchstiere pro Dosisgruppe (n=4) sowie der Kontrolle dargestellt (n=4). Von den über den Extrakt applizierten PA/PANOs waren nur Jacobin, Jacolin und Jaconin im Muskelfleisch nachweisbar. Zwischen den Muskelpartien wurden in Bezug auf den PA-Gehalt und das PA-Profil keine Unterschiede festgestellt. Die Ergebnisse für Schaf und Ziege wiesen eine hohe Vergleichbarkeit auf, jedoch wurden bei den Ziegen trotz geringfügig geringerer Dosierungen bezogen auf das jeweilige Körpergewicht sogar höhere Konzentrationen in der Muskulatur und in den Lebern gefunden als beim Schaf.

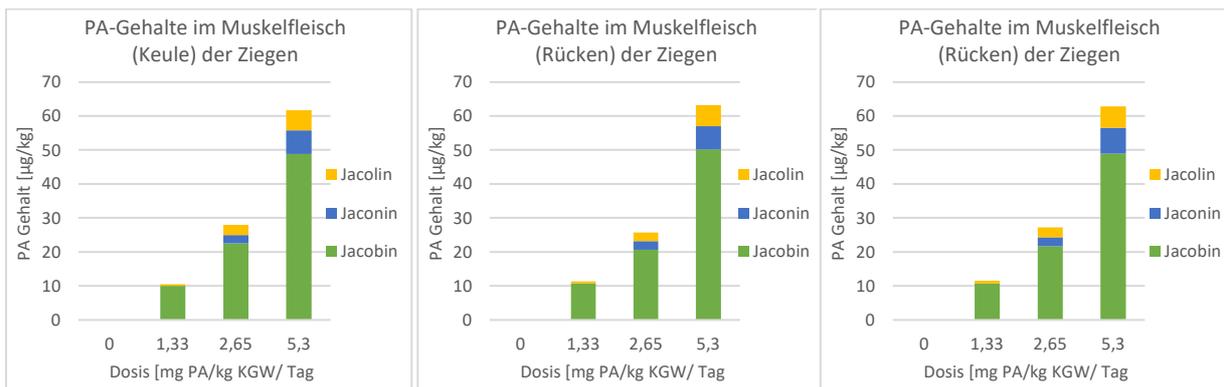


Abbildung 49: PA-Gehalte in drei untersuchten Muskelpartien der Ziegen. Pro applizierter PA-Dosis ist der Mittelwert der vier Tiere dargestellt. Alle anderen PAs befanden sich unterhalb der Nachweisgrenze. Die Zusammensetzung des applizierten Extraktes ist in Tabelle 7 dargestellt.

## 4.4. Kinetikstudie

### 4.4.1. Ergebnisse Rinder

#### 4.4.1.1. Leistungsparameter

Während die Leistungsparameter im Hauptversuch unauffällig blieben, zeigte sich im Kinetikversuch bei der Futteraufnahme (Abbildung 50, [A]) eine signifikante Interaktion zwischen Gruppe und Zeit. Während die Futteraufnahme der Kühe der oralen ReNO-Gruppe über den gesamten Versuch unbeeinflusst blieb, stieg die Futteraufnahme der ReNO-iv Tiere innerhalb der ersten 24h leicht an. Bei den Tieren beider Re-Gruppen verringerte sich die Futteraufnahme innerhalb der ersten 24 h des Versuches, was zu einer Signifikanz zu den ReNO-iv Tieren nach 24 h führte. Des Weiteren zeigten die Re-iv Tiere zu diesem Zeitpunkt eine signifikant ( $p=0,049$ ) niedrigere Futteraufnahme als zu Versuchsbeginn. Nach 48 Stunden kehrten alle Tiere auf das Ausgangsniveau zurück.

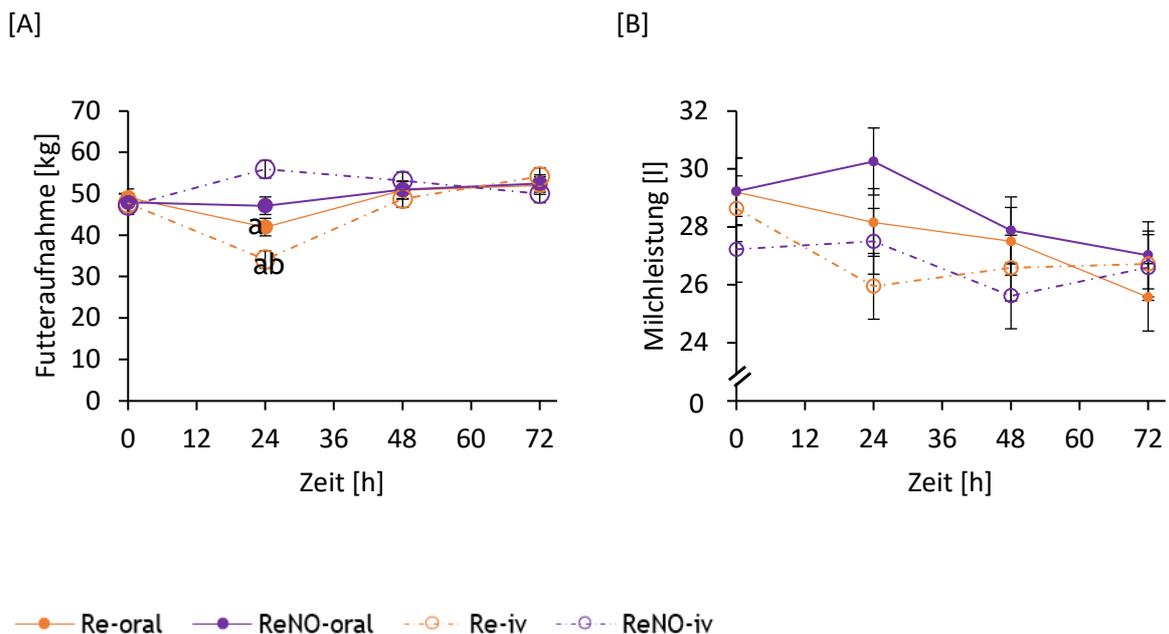


Abbildung 50: Vorläufige Daten zum zeitlichen Verlauf der Futteraufnahme (Frischmasse) [A], sowie der Milchleistung [B] während des Versuches, abhängig von den Versuchsgruppen Retrorsin (Re) oral ●, Retrorsin-N-Oxid (ReNO)-oral ●, Re-intravenös (iv) ○ und ReNO-iv ○. Die oral verabreichte Dosis weist jeweils eine Konzentration von 1,8 mg (PA/PANO)/kg KG auf, während die iv Dosis 0,9 mg (PA/PANO)/kg KG beträgt. Werte werden als Least square means ( $n=4$ )  $\pm$  Standardfehler angegeben.

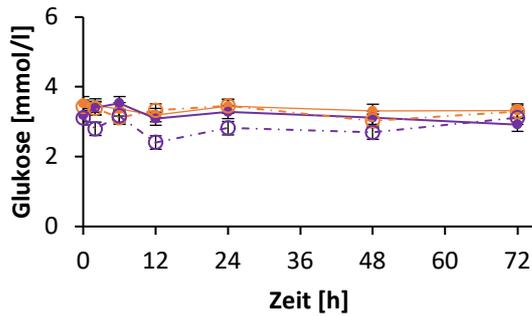
**p-Werte: Futteraufnahme:** Gruppe:  $p=0,023$ ; Zeit:  $p<0,001$ ; Gruppe x Zeit:  $p<0,001$ ; **Milchleistung:** Gruppe:  $p=0,533$ ; Zeit:  $p=0,001$ ; Gruppe x Zeit:  $p=0,139$ ; a: Signifikanter Unterschied zwischen Gruppe Re-oral/Re-iv zur Gruppe ReNO-iv nach 24 h; b: Signifikanter Unterschied zwischen den Werten zu Beginn des Versuches und nach 24 h der Gruppe Re-iv.

Im Gegensatz zur Futteraufnahme war die mittlere Milchleistung (Abbildung 50, [B]) nicht von der jeweiligen Behandlung der Tiere beeinflusst. Jedoch sank sie über den Versuchszeitraum in allen Gruppen ab, was zu einem signifikanten Zeiteffekt ( $p=0,001$ ) führte.

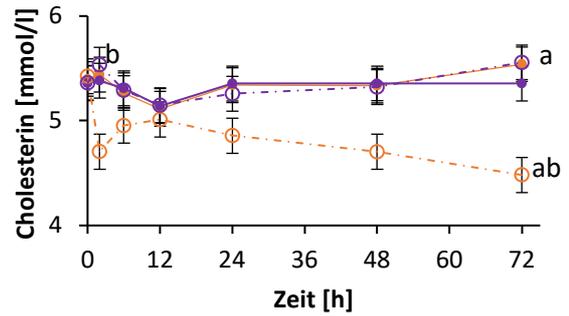
#### 4.4.1.2. Klinisch-chemische Parameter

Zur Beurteilung des Gesundheitsstatus der Tiere wurden vor allem klinisch-chemische Parameter und Elektrolyte im Blutserum herangezogen. Der Glukosespiegel (Abbildung 51, [A]) sank innerhalb der ersten 12 h des Versuches ab. Dieser Abfall zeigte sich vor allen bei Tieren der ReNO-iv Gruppe, welche über den gesamten Versuchsverlauf niedrigere Glukosewerte als die Tiere der anderen Gruppen aufwiesen. Dies führte zu einem tendenziellen Effekt der Interaktion zwischen Gruppe und Zeit ( $p=0,082$ ) und einem signifikanten Effekt über die Zeit ( $p=0,006$ ). Der Verlauf der Konzentration von Cholesterin (Abbildung 51, [B]) der Gruppe Re-iv unterschied sich vom Verlauf der anderen drei Gruppen, wobei der Gehalt an Cholesterin am Versuchsende signifikant ( $p=0,044$ ) niedriger war. Die Gruppen Re-oral, ReNO-oral und ReNO-iv blieben über den gesamten Versuchsverlauf relativ konstant. Die Albuminkonzentration (Abbildung 51, [B]) stieg in allen Gruppen, außer Re-iv, zu Versuchsbeginn an und sank danach bis ZP 12 h ab. Insgesamt stieg die mittlere Albuminkonzentration dieser Gruppen danach bis zum Versuchsende hin an. Hingegen verringerte sich die Albuminkonzentration in der Re-iv Gruppe zu Versuchsbeginn, stieg anschließend an und nahm zum Versuchsende hin stetig ab, was zu einer signifikanten Interaktion zwischen Gruppe und Zeit ( $p=0,002$ ) führte. Die mittlere Harnstoffkonzentration (Abbildung 51, [D]) sank zu Versuchsbeginn bei allen Tieren ab, gefolgt von einem Anstieg, der bei den Re-iv Tieren am stärksten verlief, was zu einer signifikanten Interaktion zwischen den Gruppen und der Zeit führte. Weitere klinisch-chemisch-Parameter wie das  $\beta$ -Hydroxybutyrat, Gesamtproteine oder freie Fettsäuren (NEFA) zeigten ausschließlich tendenzielle Zeiteffekte. Bei Phosphor und Calcium (Daten nicht gezeigt) konnte ein signifikanter Zeiteffekte beobachtet werden, der durch einen Anstieg (Calcium) bzw. Abfall (Phosphor) innerhalb der ersten 24h verursacht wurde. Desweiteren war der Calciumspiegel der Re-iv Tiere tendenziell ( $p=0,051$ ) bis 48h nach Versuchsbeginn niedriger als bei den Tieren der anderen Gruppen.

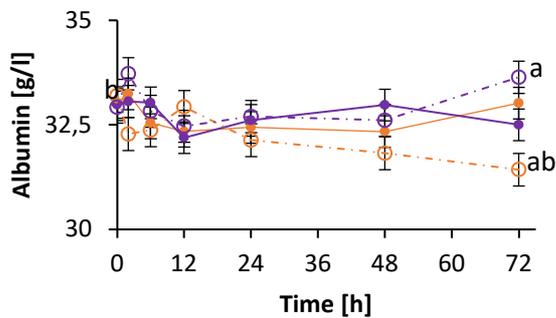
[A]



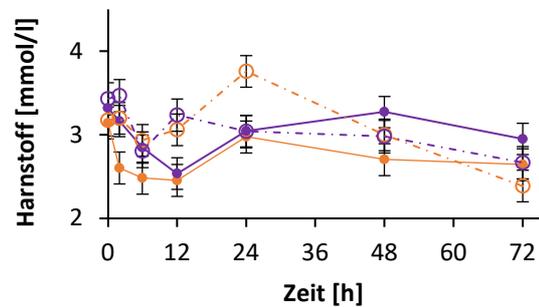
[B]



[C]



[D]



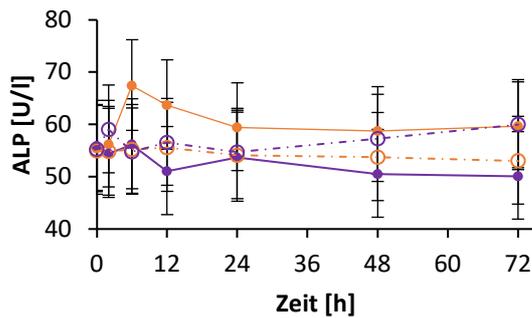
—●— Re-oral    —●— ReNO-oral    - -○- - Re-iv    - -○- - ReNO-iv

Abbildung 51: Vorläufige Daten zum zeitlichen Verlauf der Konzentration der klinisch chemischen Parameter: Glukose [A], Cholesterin [B], Albumin [C], und Harnstoff [D] während des Versuches, abhängig von den Versuchsgruppen Retrorsin (Re) oral ●, Retrorsin-N-Oxid (ReNO)-oral ●, Re-intravenös (iv) ○ und ReNO-iv ○. Die oral verabreichte Dosis weist jeweils eine Konzentration von 1,8 mg (PA/PANO)/kg KG auf, während die iv Dosis 0,9 mg (PA/PANO)/kg KG beträgt. Werte werden als LSmeans (n=4) ± Standardfehler angegeben. **p-Werte:** **Glukose:** Gruppe: p=0,053; Zeit: p=0,006; Gruppe x Zeit: p=0,082; **Cholesterin:** Gruppe: p=0,037; Zeit: p=0,117; Gruppe x Zeit: p<0,001; **Albumin:** Gruppe: p=0,499; Zeit: p=0,003; Gruppe x Zeit: p=0,002; **Harnstoff:** Gruppe: p=0,066; Zeit: p<0,001; Gruppe x Zeit: p=0,013; a: Signifikanter Unterschied zwischen Gruppe Re-iv und ReNO-iv zum ZP 72 h; b: Signifikanter Unterschied zwischen den Werten zu Beginn des Versuches und nach 72 h der Gruppe Re-iv. KG = Körpergewicht; PA = Pyrrolizidinalkaloide; PANO = Pyrrolizidinalkaloid-N-Oxide

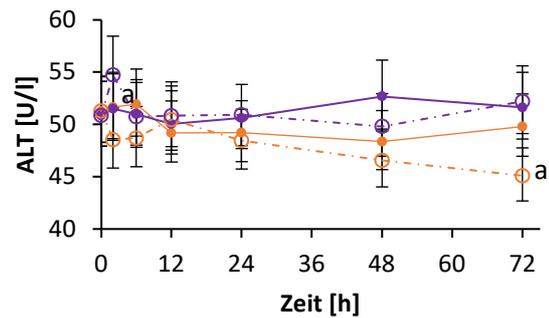
Die Konzentration der Alkalischen Phosphatase (ALP, Abbildung 52, [A]) stieg bei den Tieren der oralen Re-Gruppe innerhalb der ersten 6 Stunden des Versuches an und sank anschließend langsam auf die Ausgangskonzentration ab. ALP war jedoch weder von der Zeit noch von der Verabreichung von Re bzw. ReNO beeinflusst. Während die Alaninaminotransferasekonzentration (ALT, Abbildung 52, [B]) zu Beginn des Versuches in der ReNO-iv Gruppe anstieg, sank die ALT Konzentration der Re-iv Gruppe ab. Im Weiteren Versuchsverlauf fluktuierte die Konzentration um den Startwert, wobei die Tiere der Re-

Gruppen geringere Werte aufwiesen als die Tiere, die ReNO erhielten, was insgesamt zu einer signifikanten Interaktion zwischen den Gruppen und der Zeit ( $p=0,038$ ) führte. Bilirubin,  $\gamma$ -Glutamyltransferase (GGT), Aspartataminotransferase (AST, Abbildung 52, [C]) und Glutamatdehydrogenase (GLDH, Abbildung 52, [D]) blieben sowohl von der Behandlung als auch der Zeit unbeeinflusst. Jedoch zeigte sich bei den analysierten Leberenzymen GGT, AST und GLDH ein Anstieg innerhalb der ersten 6h bei den Tieren, die Re oral verabreicht bekommen haben.

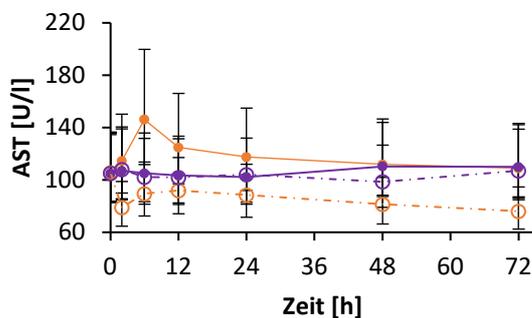
[A]



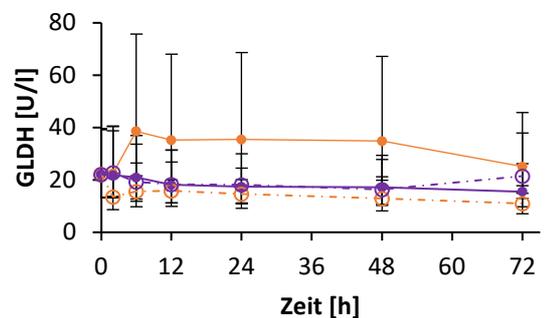
[B]



[C]



[D]



—●— Re-oral    —●— ReNO-oral    - -○- - Re-iv    - -○- - ReNO-iv

Abbildung 52 Vorläufige Daten zum zeitlichen Verlauf der Konzentration der klinisch chemischen Parameter: Alkalische Phosphatase (ALP) [A], Alaninaminotransferase (ALT) [B], Aspartataminotransferase (AST) [C] und Glutamatdehydrogenase (GLDH) [D] während des Versuches, abhängig von den Versuchsgruppen Retrorsin (Re) oral ●, Retrorsin-N-Oxid (ReNO)-oral ●, Re-intravenös (iv) ○ und ReNO-iv ○. Die oral verabreichte Dosis weist jeweils eine Konzentration von 1,8 mg (PA/PANO)/kg KG auf, während die iv Dosis 0,9 mg (PA/PANO)/kg KG beträgt. Dargestellt sind Box-cox transformierte Werte ( $n=4$ ), welche als rücktransformierte LSmeans  $\pm$  95% Konfidenzintervall angegeben sind.

**p-Werte:** ALP: Gruppe:  $p=0,515$ ; Zeit:  $p=0,478$ ; Gruppe x Zeit:  $p=0,120$ ; ALT: Gruppe:  $p=0,288$ ; Zeit:  $p=0,038$ ; Gruppe x Zeit:  $p=0,011$ ; AST: Gruppe:  $p=0,137$ ; Zeit:  $p=0,775$ ; Gruppe x Zeit:  $p=0,464$ ; GLDH: Gruppe:  $p=0,158$ ; Zeit:  $p=0,459$ ; Gruppe x Zeit:  $p=0,436a$ : Signifikanter Unterschied zwischen den Werten zu Beginn des Versuches und nach 72 h der Gruppe Re-iv. KG = Körpergewicht; PA = Pyrrolizidinalkaloide; PANO = Pyrrolizidinalkaloid-N-Oxide

Weiterführend wurden auch Marker für die Tiergesundheit im Harn analysiert. Hierbei zeigte sich ein signifikanter Gruppeneffekt bei Allantoin (Abbildung 53, [A]) und Kreatinin (Abbildung 53, [B]), wobei die Verläufe dieser beiden Stoffe sehr ähnlich waren. Während sich die Gruppen zu Beginn des Versuches kaum unterschieden, zeigte sich nach 36 h in der Gruppe ReNO-oral ein Peak.

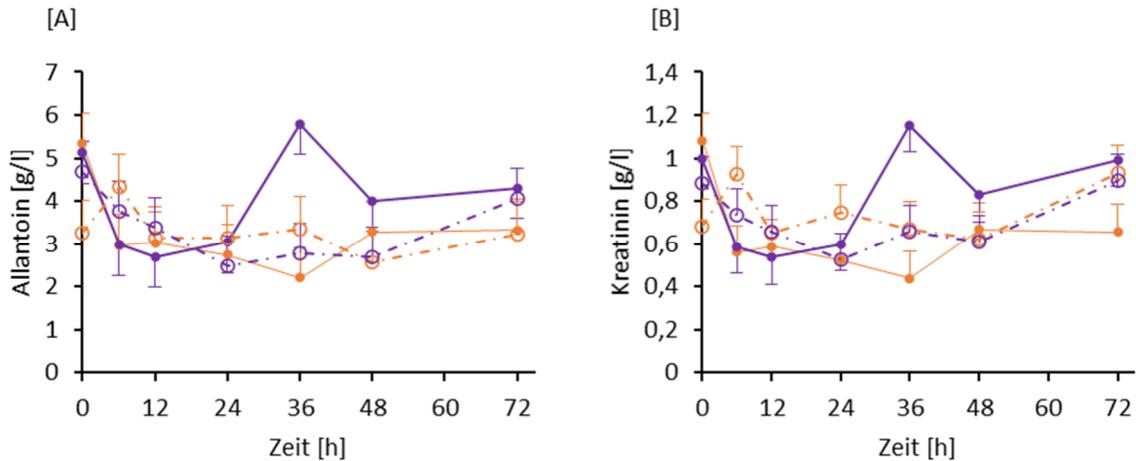


Abbildung 53: Vorläufige Daten zum zeitlichen Verlauf der Konzentration des im Harn enthaltenen Allantoin [A] und Kreatinin [B] während des Versuches, abhängig von den Versuchsgruppen Retrorsin (Re) oral ●, Retrorsin-N-Oxid (ReNO)-oral ●, Re-intravenös (iv) ○ und ReNO-iv ○. Die oral verabreichte Dosis weist jeweils eine Konzentration von 1,8 mg (PA/PANO)/kg KG auf, während die iv Dosis 0,9 mg (PA/PANO)/kg KG beträgt. Werte werden als least square means (n=4) ± Standardfehler angegeben

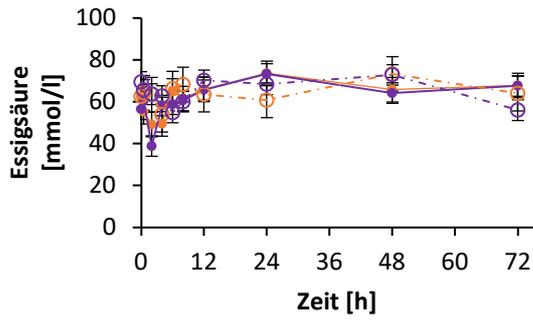
**p-Werte:** Allantoin: Gruppe: p=0,684; Zeit: p=0,001; Gruppe x Zeit: p=0,020; Kreatinin: Gruppe: p=0,545; Zeit: p<0,001; Gruppe x Zeit: p=0,001;

KG = Körpermasse; PA = Pyrrolizidinalkaloide; PANO = Pyrrolizidinalkaloid-N-Oxide

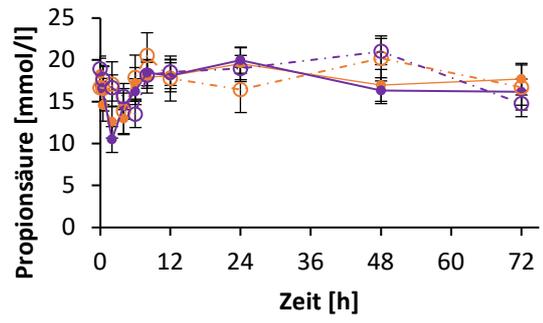
Wie im Hauptversuch wurden zur näheren Charakterisierung des Pansensaftes verschiedene Analyten bestimmt. Die Verläufe der flüchtigen Fettsäuren (FFS) Essigsäure, Propionsäure, Buttersäure und Valeriansäure (Abbildung 54, [A], [B], [D], [F]) im Pansensaft waren vergleichbar. Hierbei kam es innerhalb der ersten 8 h des Versuches bei allen Gruppen zu einer Konzentrationsverringering und anschließender Rückkehr auf die Ausgangskonzentration. Dies führte zu einem signifikanten Zeiteffekt über die gesamte Versuchsdauer.

Die Konzentration von Isobuttersäure (Abbildung 54, [C]) stieg bei den iv-Gruppen zu Beginn des Versuches bis zum ZP 8 h an. Hingegen verringerte sich die Konzentration in den oralen Gruppen in diesen Zeitraum. Danach blieb die Konzentration der iv-Gruppen relativ konstant, sank nach 48 h jedoch leicht ab. Bei den oralen Gruppen gab es einen Peak nach 24 h. Insgesamt konnte bei den oralen Gruppen eine geringere Konzentration als bei den iv-Gruppen beobachtet werden.

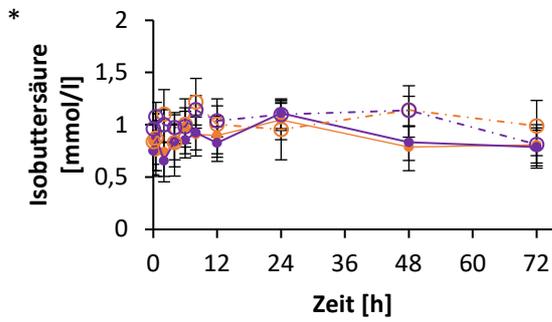
[A]



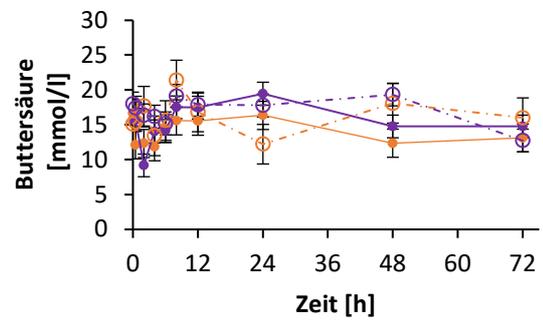
[B]



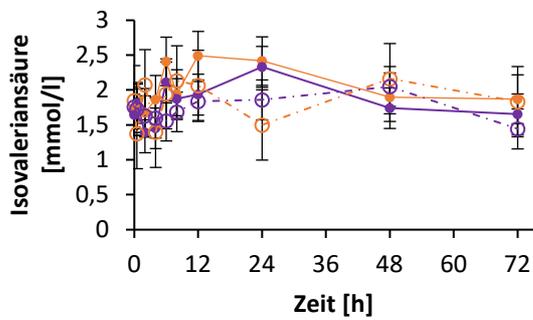
[C]



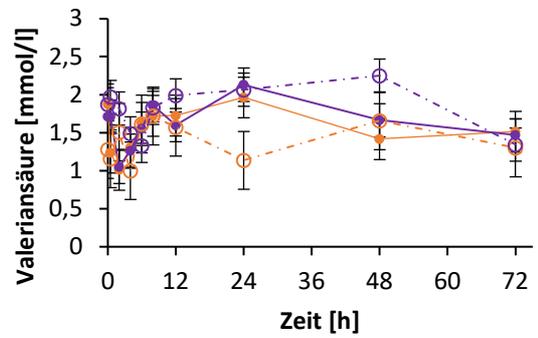
[D]



[E]



[F]



—●— Re-oral    —●— ReNO-oral    - -○- - Re-iv    - -○- - ReNO-iv

Abbildung 54 Vorläufige Daten zum zeitlichen Verlauf der Konzentration der flüchtigen Fettsäuren (FFS) im Pansensaft: Essigsäure [A], Propionsäure [B], Isobuttersäure\* [C], Buttersäure [D], Isovaleriansäure [E], Valeriansäure [F], während des Versuches, abhängig von den Versuchsgruppen Retrorsin (Re) oral ● (n=2), Retrorsin-N-Oxid (ReNO)-oral ● (n=3), Re-intravenös (iv) ○ (n=1) und ReNO-iv ○ (n=3). Die oral verabreichte Dosis weist jeweils eine Konzentration von 1,8 mg (PA/PANO)/kg KG auf, während die iv Dosis 0,9 mg (PA/PANO)/kg KG beträgt. Werte werden als LSmeans ± Standardfehler angegeben. Box-cox transformierte Werte sind mit einem \* markiert, diese werden als rücktransformierte LSmeans ± 95% Konfidenzintervall angegeben.

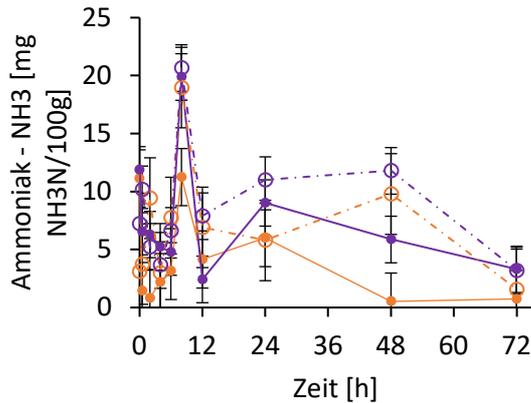
**p-Werte:** Essigsäure: Gruppe: p=0,508; Zeit: p=0,014; Gruppe x Zeit: p=0,265; Propionsäure: Gruppe: p=0,475; Zeit: p=0,005; Gruppe x Zeit: p=0,640; Isobuttersäure: Gruppe: p=0,034; Zeit: p=0,013; Gruppe x Zeit: p=0,497; Buttersäure: Gruppe: p=0,168; Zeit: p=0,036; Gruppe x Zeit: p=0,390; Isovaleriansäure: Gruppe: p=0,758; Zeit: p=0,236; Gruppe x Zeit: p=0,390; Valeriansäure: Gruppe: p=0,248; Zeit: p=0,038; Gruppe x Zeit: p=0,557

KG = Körpergewicht; PA = Pyrrolizidinalkaloide; PANO = Pyrrolizidinalkaloid-N-Oxide

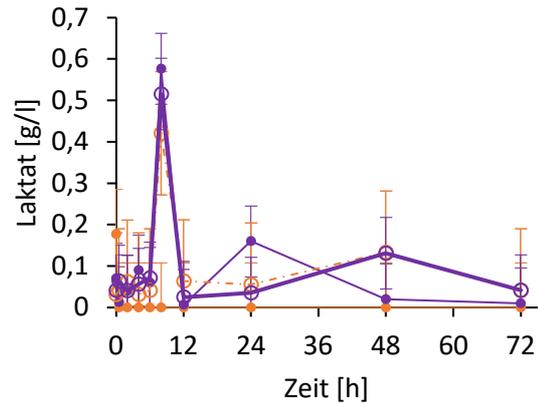
Dies führte zu signifikanten Gruppen- (p=0,034) und Zeiteffekten (p=0,013). Der Verlauf der Konzentration von Isovaleriansäure (Abbildung 54, [E]) blieb sowohl von der Behandlung als auch von der Zeit unbeeinflusst. Die mittlere Ammoniakkonzentration (NH<sub>3</sub>) im Pansensaft (Abbildung 55, [A]) sank innerhalb der ersten 4 h des Versuches ab. Danach stieg die Konzentration bis zum ZP 8 h stark an, fiel aber anschließend direkt wieder ab, wobei der Anstieg der oralen Re-Gruppe wesentlich geringer ausfiel als bei den anderen drei Gruppen. Auch im weiteren Versuchsverlauf liegen die Werte der Re-oral Gruppe unterhalb der anderen Gruppen, wobei die Werte sich am Versuchsende durch einen Abfall der anderen Gruppe wieder annähern. Der beschriebene Verlauf der Ammoniakkonzentration führte sowohl zu einem signifikanten Effekt zwischen den Gruppen (p=0,041) als auch über die Zeit (p<0,001).

Die Laktatkonzentration im Pansensaft (Abbildung 55, [B]) stieg in allen Versuchsgruppen außer Gruppe Re-oral zum ZP 8 h stark an, fiel danach aber wieder zurück auf den Ausgangswert. Dadurch ergaben sich signifikante Zeiteffekte, jedoch keine Gruppeneffekte.

[A]



[B]



—●— Re-oral    —●— ReNO-oral    -○- Re-iv    -○- ReNO-iv

Abbildung 55. Vorläufige Daten zum zeitlichen Verlauf der Ammoniakkonzentration [A], sowie der Laktatkonzentration [B] im Pansen saft während des Versuches, abhängig von den Versuchsgruppen Retrorsin (Re) oral ● (n=2), Retrorsin-N-Oxid (ReNO)-oral ● (n=3), Re-intravenös (iv) ○ (n=1) und ReNO-iv ○ (n=3). Die oral verabreichte Dosis weist jeweils eine Konzentration von 1,8 mg (PA/PANO)/kg KG auf, während die iv Dosis 0,9 mg (PA/PANO)/kg KG beträgt. Werte werden als Least square means ± Standardfehler angegeben.

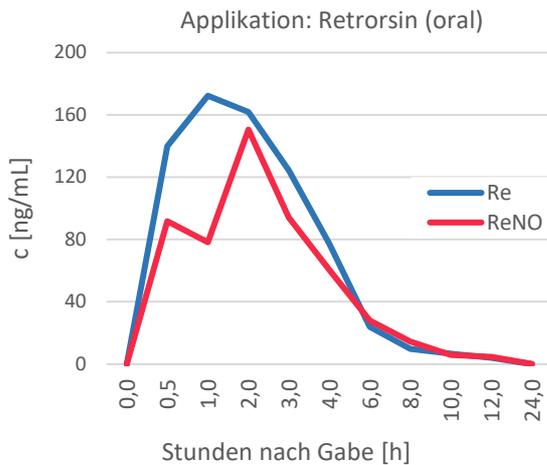
**p-Werte: Ammoniak:** Gruppe:  $p=0,041$ ; Zeit:  $p<0,001$ ; Gruppe x Zeit:  $p=0,255$ ; **Laktat:** Gruppe:  $p=0,545$ ; Zeit:  $p<0,001$ ; Gruppe x Zeit:  $p=0,999$ ;

KG = Körpergewicht; PA = Pyrrolizidinalkaloide; PANO = Pyrrolizidinalkaloid-N-Oxide

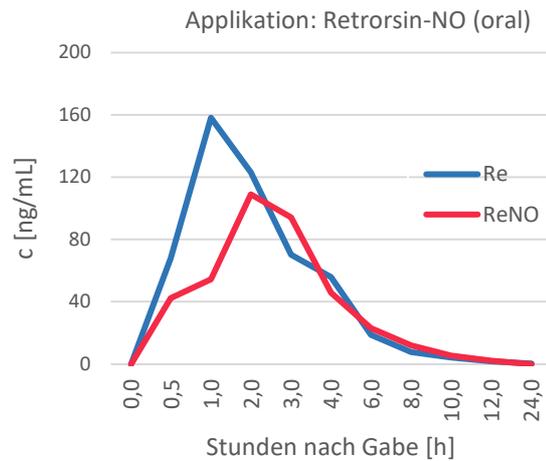
#### 4.4.1.3. Bestimmung der PA/PA-Konzentration sowie der Pansenmetabolite

Bei den Rindern wurden Retrorsin (Re) und Retrorsin-N-Oxid (ReNO) sowohl oral als auch intravenös verabreicht (Abbildung 5). Die Re- und ReNO-Konzentrationen im Plasma pro Applikationsweg über die Zeit sind in Abbildung 56 dargestellt.

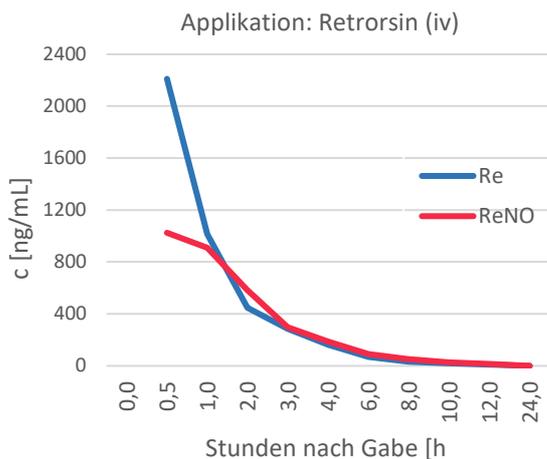
[A]



[B]



[C]



[D]

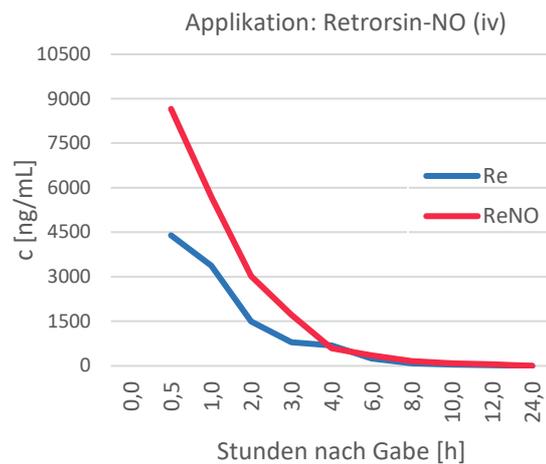


Abbildung 56: Vorläufige Daten zum zeitlichen Verlauf der Konzentration von Retrorsin (Re) und Retrorsin-N-Oxid (ReNO) im Plasma bei A: oraler Applikation von Retrorsin, B: oraler Applikation von Retrorsin-N-Oxid, C: intravenöser Applikation von Retrorsin und D: intravenöser Applikation von Retrorsin-N-Oxid. Dargestellt sind Mittelwerte der vier Versuchstiere.

Bei oraler Gabe der freien Base (Re) sind im Plasma vergleichbare Konzentrationen von Re und seinem N-Oxid detektierbar, da letzteres als Hauptmetabolit von Re in der Leber gebildet wird (Abbildung 56 A). Sowohl Re als auch ReNO sind bereits 30 Minuten (frühester Probenahmezeit) nach oraler Verabreichung im Plasma messbar. Diese Ergebnisse stimmen mit Literaturdaten für Mäuse und Ratten überein, die zeigen, dass *Senecio*-PAs nach oraler Exposition schnell resorbiert werden und in den systemischen Kreislauf gelangen können (Maus, Ratte; Brauchli et al. 1982; Wang et al. 2011;

Williams et al. 2002). Nach 12-24 Stunden waren Re und ReNO im Plasma nicht mehr nachweisbar (Abbildung 56 A). Die in Abbildung 57 abgebildeten Pansenmetaboliten waren im Plasma nur in Spuren nachweisbar. Bei oraler Applikation von ReN, werden im Plasma Re- und ReNO-Konzentrationen bzw. Konzentrationsverläufe gemessen, die mit denen bei Verabreichung der freien Base vergleichbar sind (Abbildung 56 A vs B). Dies ist dadurch zu erklären, dass das N-Oxid im Pansen schnell und quantitativ in die korrespondierende freie Base reduziert wird (Abbildung 57 B und 4.5.1).

Die Re- und ReNO-Konzentrationen sowie die Konzentrationen der gesättigten Pansenmetaboliten des Re (Re+2H und Re+4H) im Pansensaft pro Applikationsweg über die Zeit sind in Abbildung 57 dargestellt. Wie aus Abbildung 57 A und B ersichtlich, wird das applizierte N-Oxid im Pansen schnell und quantitativ in die korrespondierende freie Base reduziert. Diese Ergebnisse für Re vs ReN deuten darauf hin, dass es für Rinder keinen Unterschied macht, ob sie gegenüber der freien PA-Base oder dem jeweiligen N-Oxid exponiert sind. Der Hauptmetabolit, der im Pansen gebildet wird, ist die vollständig gesättigte Form von Re (Re+4H).

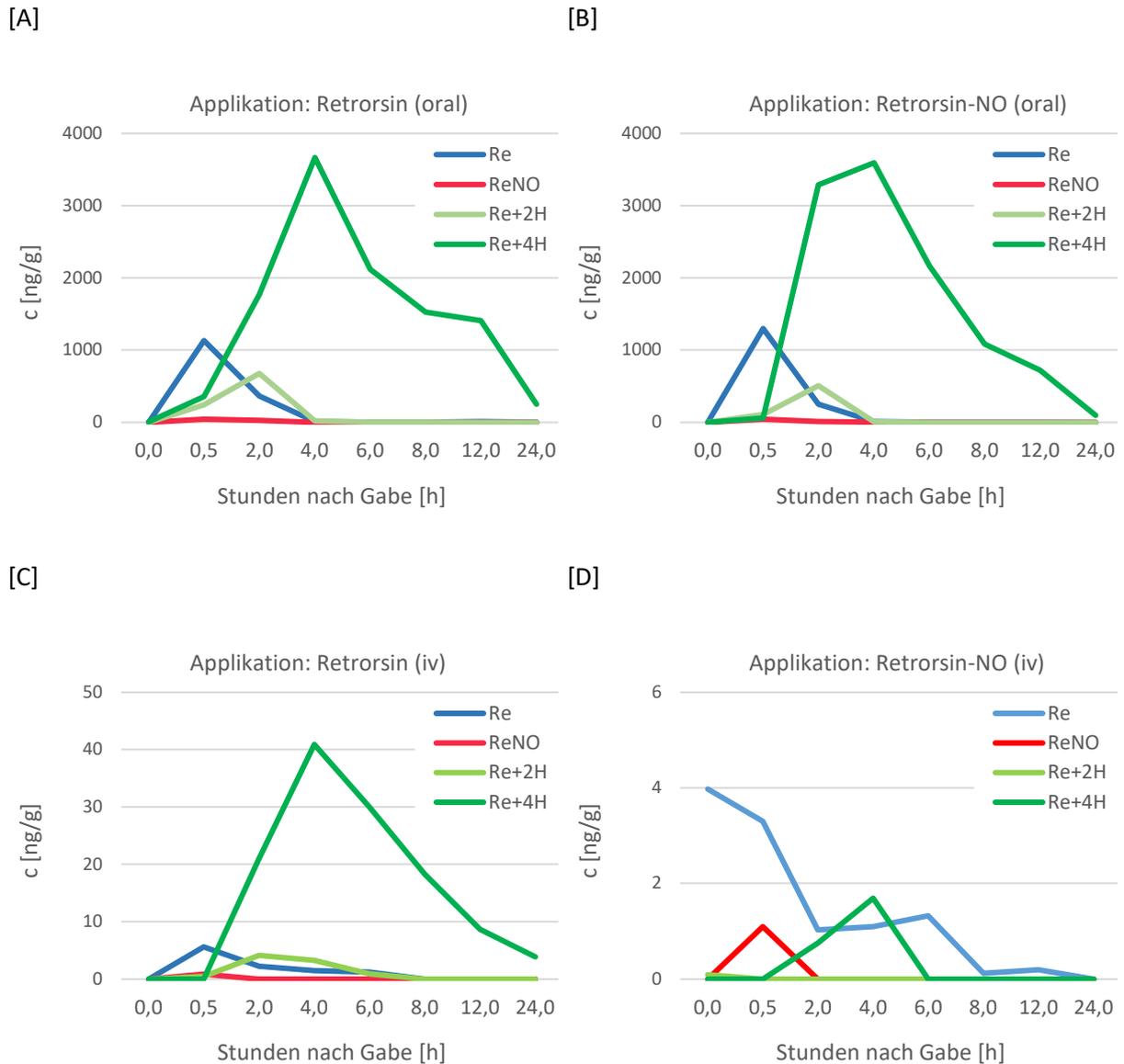


Abbildung 57: Vorläufige Daten zum zeitlichen Verlauf der Konzentration von Retrorsin (Re), Retrorsin-N-Oxid (ReNO) und der Pansenmetabolite Re+2H und Re+4H in der Pansenflüssigkeit bei A: oraler Applikation von Retrorsin, B: oraler Applikation von Retrorsin-N-Oxid, C: intravenöser Applikation von Retrorsin und D: intravenöser Applikation von Retrorsin-N-Oxid. Dargestellt sind Mittelwerte der Versuchstiere, wobei A: n=2, B: n=3, C: n=1, D: n=3 (abhängig von der Anzahl der Pansen-fistulierten Tiere in der Gruppe).

Die Re- und ReNO-Konzentrationen sowie die Konzentration der gesättigten Pansenmetaboliten des Retrorsins (Re+2H und Re+4H) im Darmsaft pro Applikationsweg über die Zeit sind in Abbildung 58 dargestellt. Nach oraler Gabe weisen die Pansenmetabolite, die höchste Konzentration auf, wobei sie bis zu 24h nach Applikation nachweisbar waren. Re konnte bei beiden Applikationsarten nur innerhalb der ersten 4 Stunden nachgewiesen werden, was durch den schnellen Metabolismus von Re bzw. ReNO im Pansen zu erklären ist.

Bei iv-Applikation wird hauptsächlich Re im Darm nachgewiesen, wobei die Konzentration bei Gabe von Re um ein Vielfaches höher ist. Die im Vergleich zur oralen Applikation im Verhältnis deutlich geringeren Konzentrationen an Pansenmetaboliten im Darmchymus deuten darauf hin, dass das höher konzentrierte Re vermutlich nicht ruminalen Ursprungs ist. Vielmehr lassen die PA-Verhältnisse eine biliäre Exkretion vermuten.

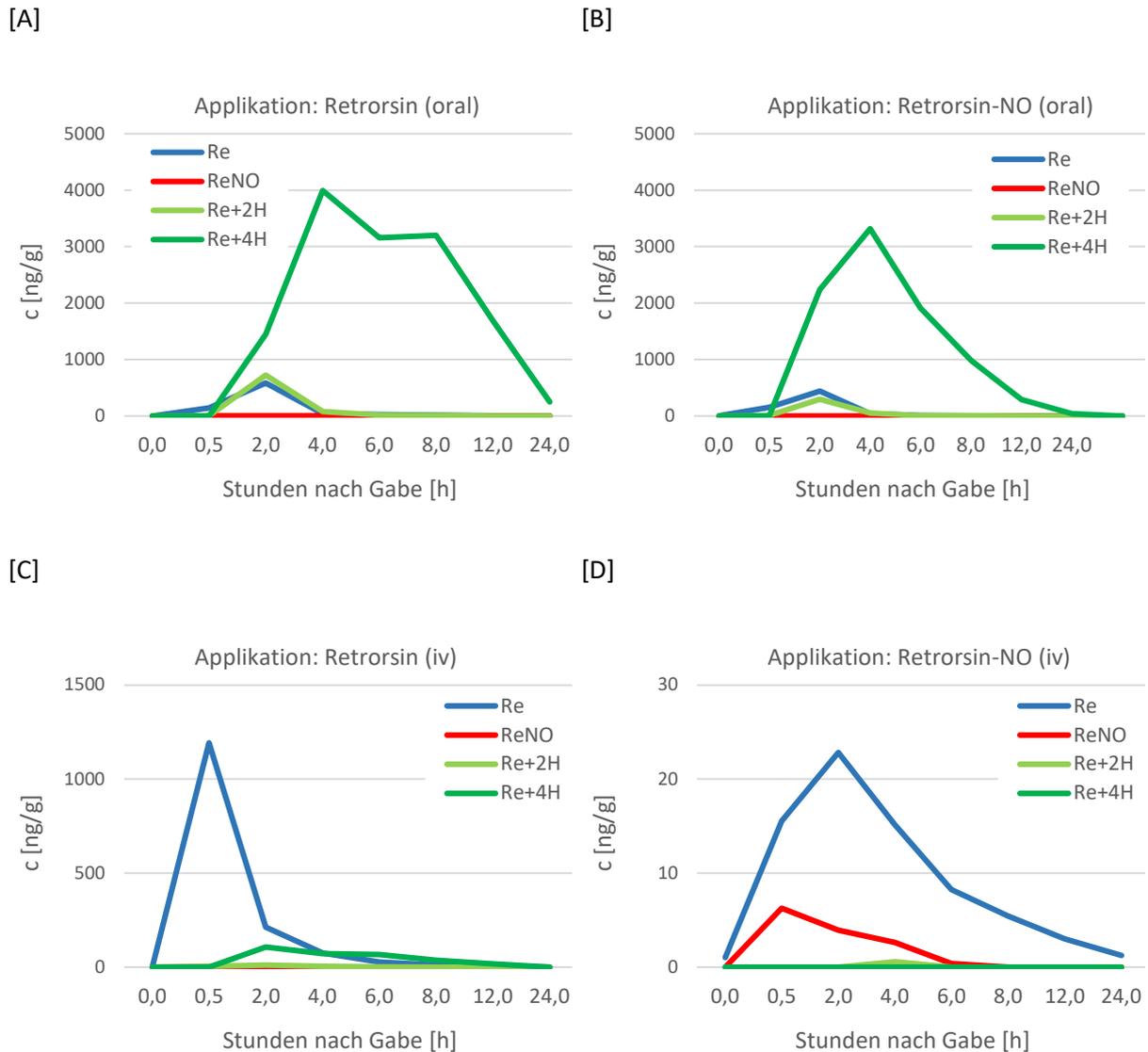
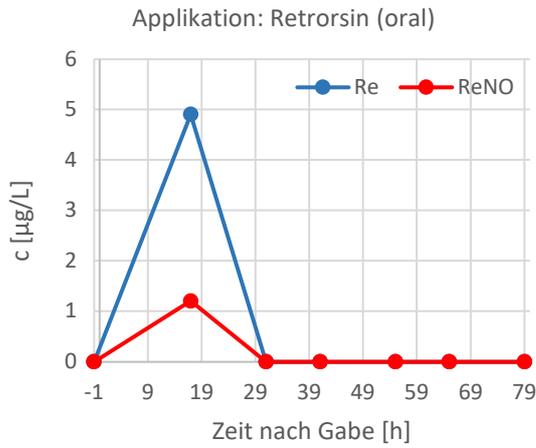


Abbildung 58: Vorläufige Daten zum zeitlichen Verlauf der Konzentration von Retrorsin (Re), Retrorsin-N-Oxid (ReNO) und der Pansenmetabolite Re+2H und Re+4H in der Darmflüssigkeit bei A: oraler Applikation von Retrorsin, B: oraler Applikation von Retrorsin-N-Oxid, C: intravenöser Applikation von Retrorsin und D: intravenöser Applikation von Retrorsin-N-Oxid. Dargestellt sind Mittelwerte der Versuchstiere, wobei A: n=2, B: n=2, C: n=1, D: n=2 (abhängig von der Anzahl der Darm-fistulierten Tiere in der Gruppe).

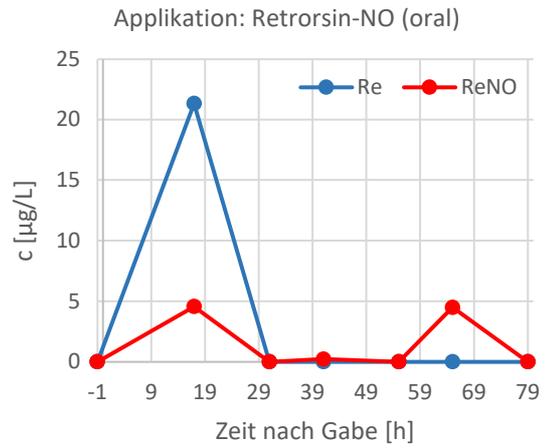
Nach i.v. Applikation von Re wäre allerdings eine höhere Konzentration von ReNO zu erwarten, da die freie Base in der Leber größtenteils zum ReNO oxidiert wird. Möglicherweise können die noch nicht

abgeschlossenen Auswertungen zur Kinetik der Substanzen in weiteren Matrices, wie Kot und Urin  
Aufschluss zur Ursache der im Darmchymus gefundenen Metabolitenprofile geben. Die  
Konzentrationen von Re und ReNO in der Milch pro Applikationsweg über die Zeit sind in Abbildung 59  
dargestellt. Die gesättigten Pansenmetaboliten von Retrorsin waren in der Milch nicht nachweisbar.  
Wie aus der Graphik ersichtlich, konnten Retrosin und dessen N-Oxid nur in den  
Probenahmezeitpunkten 16 h nach Gabe bzw. in Spuren 31 h nach Verabreichung nachgewiesen  
werden (Probenahmezeitpunkte beschränkt auf Melkzeiten). Die Daten des Kinetikversuchs bestätigen  
somit die des Hauptversuchs und zeigen, dass der Transfer in die Milch vergleichsweise gering ist und  
dass Re und ReNO schnell metabolisiert bzw. ausgeschieden werden, so dass sie ca. 24-48 h nach der  
Exposition nicht mehr in der Milch nachweisbar sind (siehe 4.3.2.1). Wie auch bei den zuvor  
betrachteten Matrices sind die Re- und ReNO-Konzentration bzw. der Konzentrationsverlauf bei oraler  
Applikation vergleichbar, unabhängig davon, ob die freie Base oder deren N-Oxid appliziert wird, da  
im Pansen eine quantitative Reduktion des N-Oxids zur freien Base erfolgt. Obwohl bei oraler  
Applikation vergleichbare Re- und ReNO-Konzentrationen im Plasma bestimmt wurden, ist die Re-  
Konzentration in der Milch etwa um den Faktor 4 höher, was darauf hindeutet, dass Re die Blut-Euter-  
Schranke besser passieren kann als sein N-Oxid (Abbildung 56 A, B und Abbildung 59 A, B).

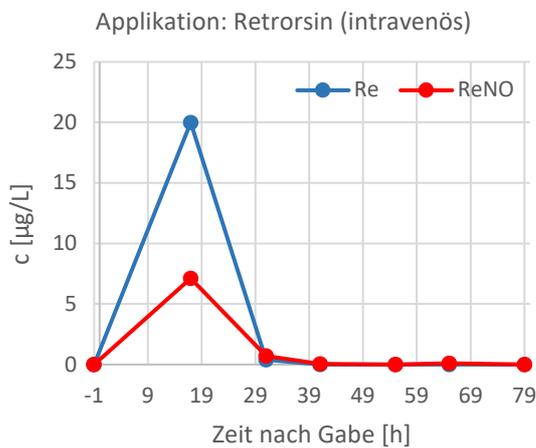
[A]



[B]



[C]



[D]

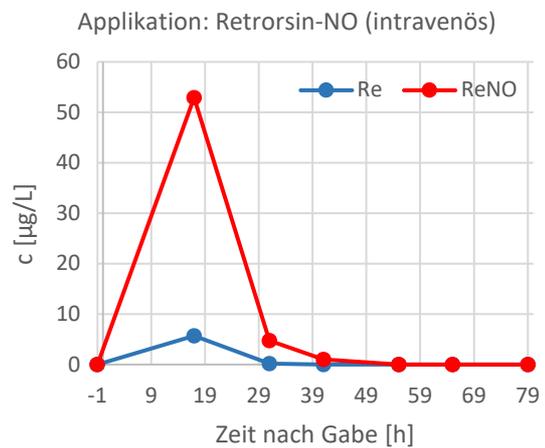


Abbildung 59: Vorläufige Daten zum zeitlichen Verlauf der Konzentration von Retrorsin (Re) und Retrorsin-N-Oxid (ReNO) in der Milch bei A: oraler Applikation von Retrorsin, B: oraler Applikation von Retrorsin-N-Oxid, C: intravenöser Applikation von Retrorsin und D: intravenöser Applikation von Retrorsin- N-Oxid. Dargestellt sind Mittelwerte der vier Versuchstiere.

#### 4.4.2. Ergebnisse Schafe und Ziegen

##### 4.4.2.1. Schafe und Ziegen: Klinisch chemische Parameter

###### Klinisches Monitoring

Alle Tiere zeigten während des Versuches und bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes drei Wochen nach Abschluss der Probenahme keine klinischen Auffälligkeiten.

## Hämatologie

Es konnten keine spezifischen Abweichungen der untersuchten Parameter festgestellt werden.

## Serologie

Die Serumwerte der Indikatoren für mögliche Leberschäden AST, GGT und GLDH werden in den folgenden Abbildungen dargestellt. Die blau abgebildeten Tiere erhielten Retrorsin, die rot abgebildeten Retrorsin-NO.

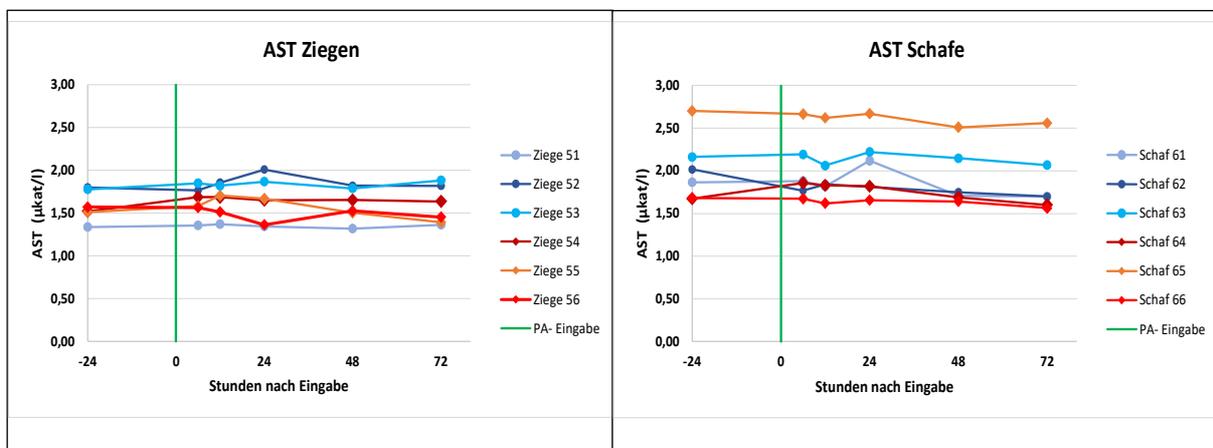


Abbildung 60: Verlauf des Leberenzym AST bei den Ziegen und Schafen im Zeitraum von 24 Stunden vor bis 72 Stunden nach der Supplementierung. Die blau dargestellten Tiere erhielten Retrorsin, die rot dargestellten Retrorsin-NO.

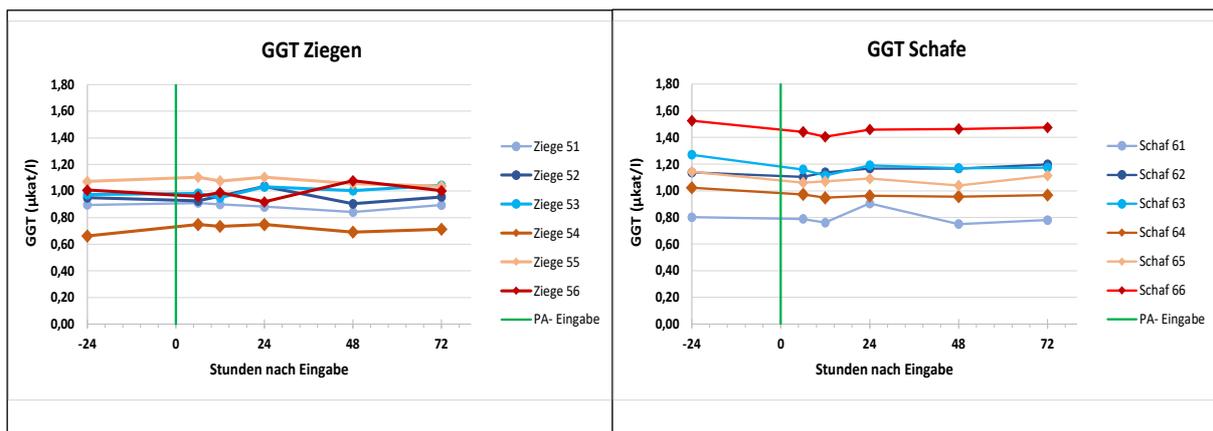


Abbildung 61: Verlauf des Leberenzym GGT bei den Ziegen und Schafen im Zeitraum von 24 Stunden vor bis 72 Stunden nach der Supplementierung. Die blau dargestellten Tiere erhielten Retrorsin, die rot dargestellten Retrorsin-NO.

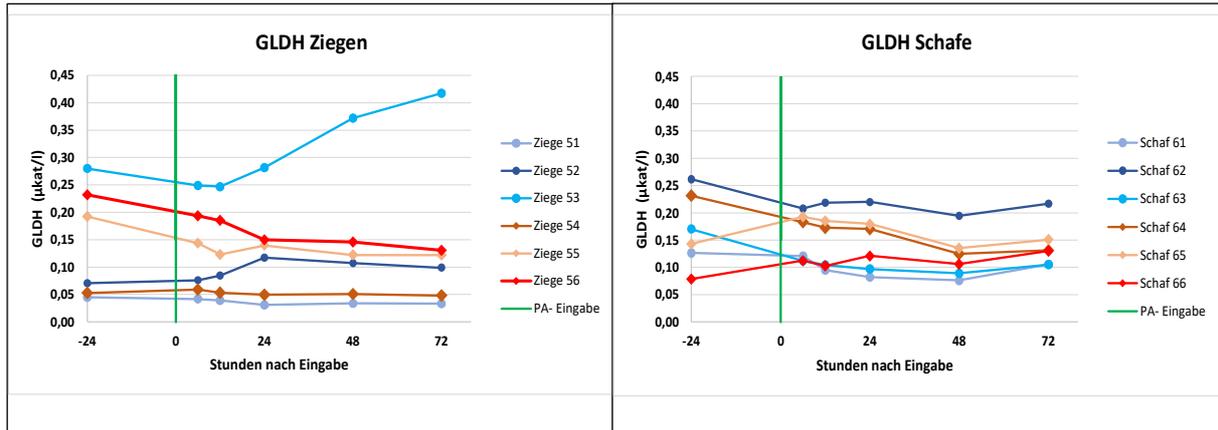


Abbildung 62: Verlauf des Leberenzym GLDH bei den Ziegen und Schafen im Zeitraum von 24 Stunden vor bis 72 Stunden nach der Supplementierung. Die blau dargestellten Tiere erhielten Retrorsin, die rot dargestellten Retrorsin-NO

Während der ersten 72 Stunden nach der Supplementierung traten weder bei den Ziegen noch bei den Schafen deutliche Veränderungen (Erhöhung des Ausgangswertes um mehr als 2-fach) auf. Der Anstieg der GLDH bei Ziege 53 war mit einem Faktor von 1,5-fach im Vergleich zu den im vorhergehenden Transferversuch mit gleicher Dosis supplementierten Ziegen sehr gering. Da die Beprobung nach 72 Stunden beendet wurde, kann der weitere Verlauf nicht beurteilt werden.

#### 4.4.2.1. Bestimmung der PA/PANO-Konzentration sowie der Pansenmetabolite

##### Schafe

Im Rahmen des Kinetikversuchs wurde den Schafen Retrorsin (Re) und Retrorsin-N-Oxid (ReNO) oral verabreicht. Die Re- und ReNO-Konzentrationen im Plasma sind über die Zeit in Abbildung 63 dargestellt.

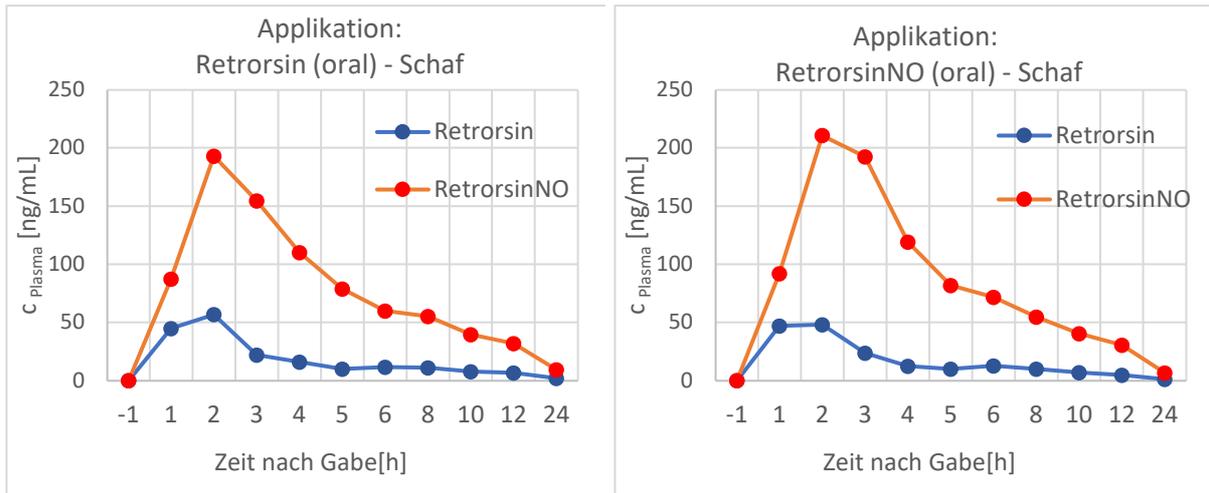


Abbildung 63: Vorläufige Daten zum zeitlichen Verlauf der Konzentration von Retrorsin (Re) und Retrorsin-N-Oxid (ReNO) im Plasma der Schafe bei oraler Applikation von: Retrorsin (links) und Retrorsin-N-Oxid (rechts). Dargestellt sind Mittelwerte der drei Versuchstiere.

Unabhängig von der Verabreichung der Reinsubstanz als freie Base oder -Oxid wurde im Plasma überwiegend Retrorsin-NO nachgewiesen, obwohl im Pansen das N-Oxid sehr schnell zur freien Base reduziert und vermutlich auch als solches resorbiert wird, siehe unten. Das besser wasserlösliche N-Oxid wird in der Leber gebildet und über die Niere ausgeschieden. Höchste Konzentrationen traten bei beiden Versuchsgruppen 2 bis 3 Stunden nach der Applikation auf, danach nahmen die Gehalte im Plasma schnell ab.

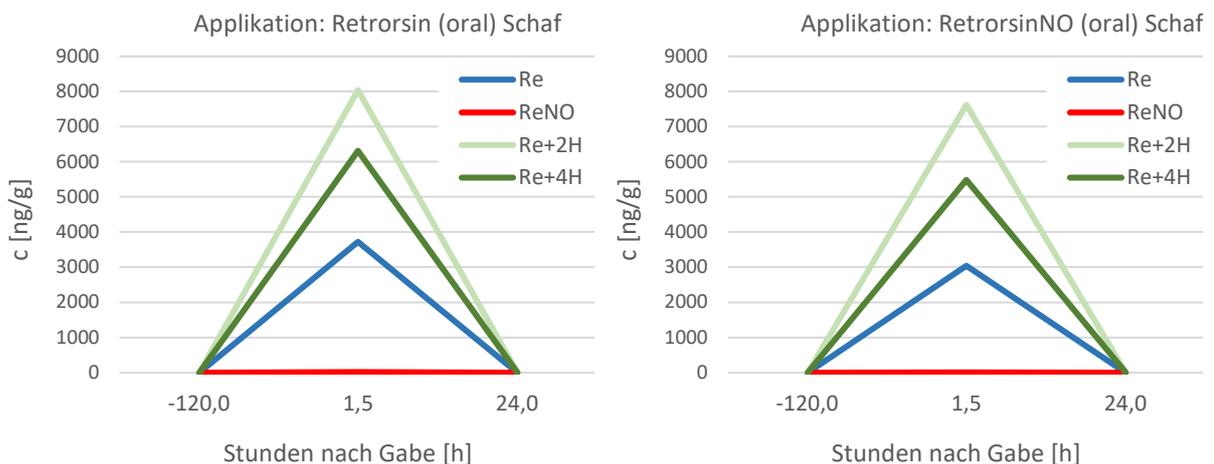


Abbildung 64: Vorläufige Daten zum zeitlichen Verlauf der Konzentration von Retrorsin (Re) und Retrorsin-N-Oxid (ReNO) und der Pansenmetabolite Re+2H und Re+4H in der Pansenflüssigkeit der Schafe bei oraler Applikation von: Retrorsin (links) und Retrorsin-N-Oxid (rechts). Dargestellt sind Mittelwerte der drei Versuchstiere.

Anhand der Ergebnisse wird deutlich, dass Retrorsin-NO nach oraler Verabreichung im Pansen sehr schnell zur freien Base reduziert wird, so dass bereits 1,5 h nach der Applikation im Pansensaft kein N-Oxid mehr nachweisbar war. Zudem fanden sich bereits zu diesem Zeitpunkt die Metaboliten Re+2H und Re+4H in hohen Konzentrationen, was den umgehend einsetzenden Metabolismus zeigt.

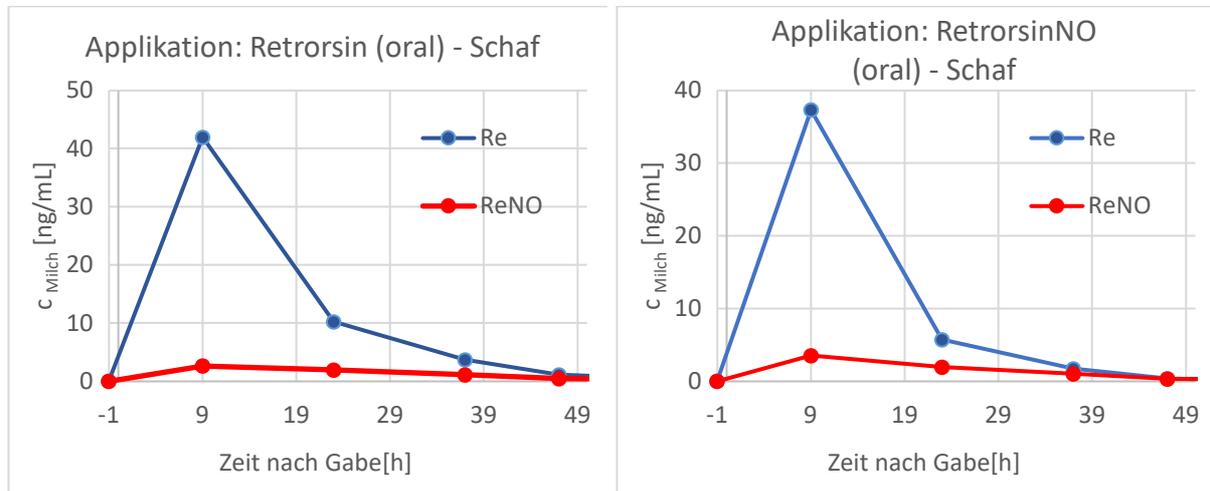


Abbildung 65: Vorläufige Daten zum zeitlichen Verlauf der Konzentration von Retrorsin (Re) und Retrorsin-N-Oxid (ReNO) in der Milch von Schafen bei oraler Applikation von: Retrorsin (links) und Retrorsin-N-Oxid (rechts). Dargestellt sind Mittelwerte der drei Versuchstiere.

Wie aus den Transferversuchen erwartet wurde in der Milch der Versuchstiere ganz überwiegend die freie Base nachgewiesen. Ein schneller Anstieg der Konzentration in der ersten Melkzeit nach der Supplementierung wurde gefolgt von einem schnellen Abfall, was auch den Konzentrationsverlauf im Plasma widerspiegelt.

Unabhängig von der Gabe als Re oder ReNo sind die Konzentrationsverläufe in Plasma, Pansensaft und Milch bei beiden Gruppen sehr ähnlich, so dass es unerheblich zu sein scheint, in welcher Form die orale Aufnahme erfolgt.

## Ziegen

Im Rahmen des Kinetikversuchs wurde den Ziegen Retrorsin (Re) und Retrorsin-N-Oxid (ReNO) oral verabreicht. Die Re- und ReNO-Konzentrationen im Plasma sind über die Zeit in Abbildung 66 dargestellt.

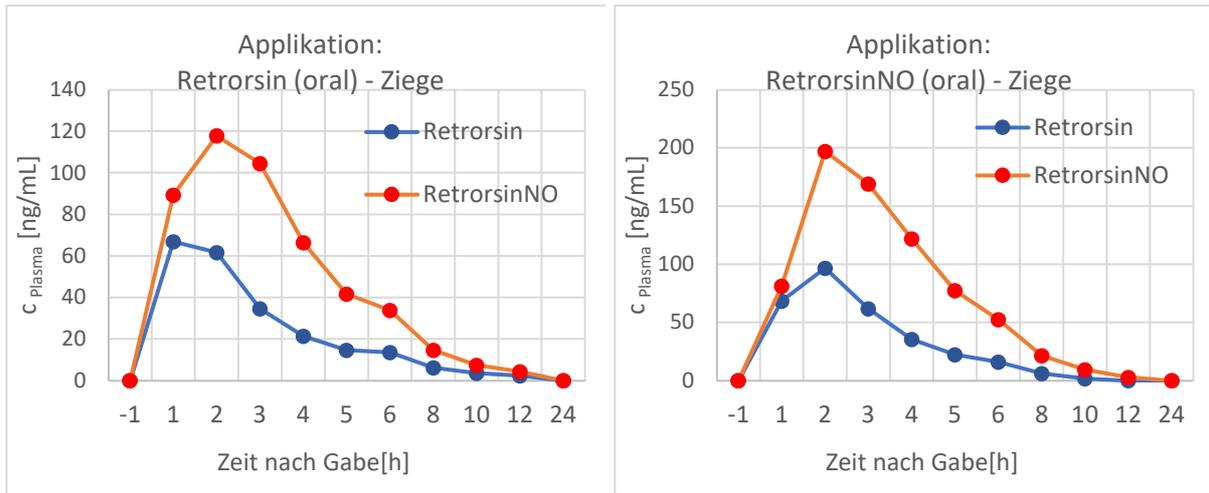


Abbildung 66: Vorläufige Daten zum zeitlichen Verlauf der Konzentration von Retrorsin (Re) und Retrorsin-N-Oxid (ReNO) im Plasma der Ziegen bei oraler Applikation von: Retrorsin (links) und Retrorsin-N-Oxid (rechts). Dargestellt sind Mittelwerte der drei Versuchstiere.

Der Verlauf von Re und ReNO in Plasma, Pansensaft und Milch war ähnlich wie bei den Schafen, wenn auch Retrorsin-NO im Plasma bei beiden Versuchsgruppen nicht ganz so deutlich überwog wie bei den Schafen. Unterschiede zwischen den maximal erreichten Konzentrationen im Plasma 2 Stunden nach der Applikation sind auch auf tierindividuelle Unterschiede zurückzuführen.

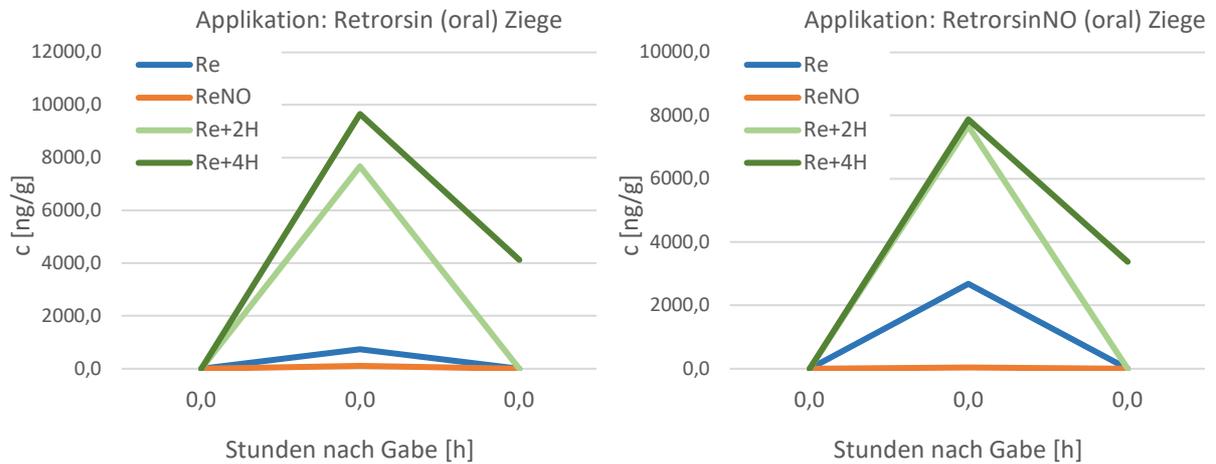


Abbildung 67: Vorläufige Daten zum zeitlichen Verlauf der Konzentration von Retrorsin (Re) und Retrorsin-N-Oxid (ReNO) und der Pansenmetabolite Re+2H und Re+4H in der Pansenflüssigkeit der Ziegen bei oraler Applikation von: Retrorsin (links) und Retrorsin-N-Oxid (rechts). Dargestellt sind Mittelwerte der drei Versuchstiere

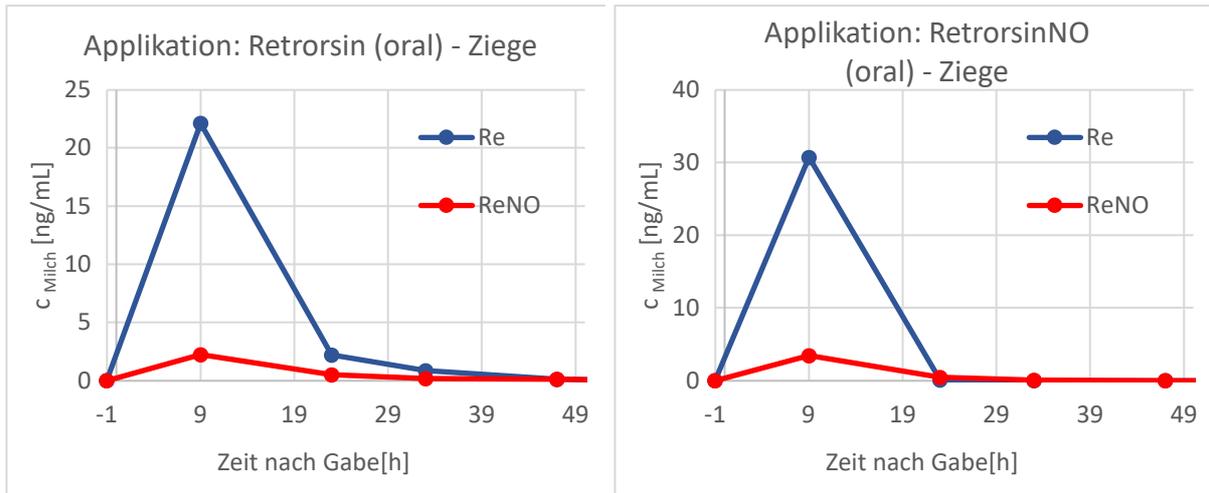


Abbildung 68: Vorläufige Daten zum zeitlichen Verlauf der Konzentration von Retrorsin (Re) und Retrorsin-N-Oxid (ReNO) in der Milch von Ziegen bei oraler Applikation von: Retrorsin (links) und Retrorsin-N-Oxid (rechts). Dargestellt sind Mittelwerte der drei Versuchstiere.

#### 4.5. Ergebnisse zum Metabolismus

##### 4.5.1. Pansenmetabolismus

Das Verhalten von PA/PANOs der Gattung *Senecio* im Pansen wurde mittels Batch-Inkubationen mit Pansenchymus von fistulierten Kühen simuliert und massenspektrometrisch untersucht. Inkubationen mit Pansenchymus von Schafen wurden in geringerem Umfang durchgeführt. Der größte Anteil der PAs kommt in den Pflanzen als N-Oxid vor, so dass auch der größte Anteil der PA-Fracht den Pansen als N-Oxid Form erreicht.

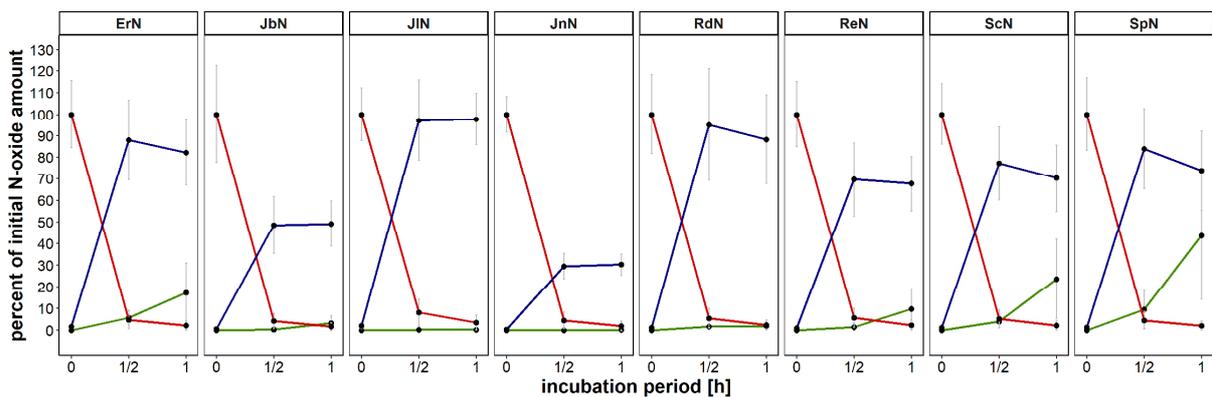


Abbildung 69: Inkubation der *Senecio* PANO-Standards (Strukturen in Abbildung 1) mit Panseninokulum von fistulierten Kühen (n = 6). Der Konzentrationsverlauf während der ersten Stunde der Inkubation zeigt, dass die PANO-Konzentration abnimmt (rote Linien), während gleichzeitig die Konzentration des korrespondierenden PA ansteigt (dunkelblaue Linien). Der anschließende Abbau der PAs wird durch die Bildung von weiteren Metaboliten ist als grüne Linie dargestellt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der Messungen.

Die Daten der Inkubationsversuche zeigen (Abbildung 69), dass für alle getesteten PANOs die Konzentration schnell abnahm und nach 30-minütiger Inkubation (1. Probenahmezeitpunkt) im Durchschnitt nur noch 5 % der PANO Ausgangskonzentration messbar waren (nach einer Stunde nur noch Spuren nachweisbar). Fast in gleichem Maße wie die Konzentration des N-Oxids (PANO) abnahm, stieg die Konzentration der korrespondierenden tertiären Base (PA) an und im Durchschnitt konnten nach einer Stunde  $85 \pm 10\%$  des ursprünglichen PANOs als das korrespondierende PA quantifiziert werden. Auf Basis dieser *in vitro* Daten wird davon ausgegangen, dass im ersten Schritt die N-Oxid Form im Pansen sehr schnell und quantitativ in die korrespondierende freie Base umgewandelt wird. Mit zunehmender Inkubationszeit wurden die PAs (freien Basen) weiter metabolisiert. Die gebildeten Metaboliten wurden massenspektrometrisch identifiziert (Summenformel) und auf Basis der massenspektrometrischen Fragmentierung wurden Strukturvorschläge gemacht. In Abbildung 70 sind die strukturellen Veränderungen der PANOs beispielhaft für Erucifolin dargestellt.

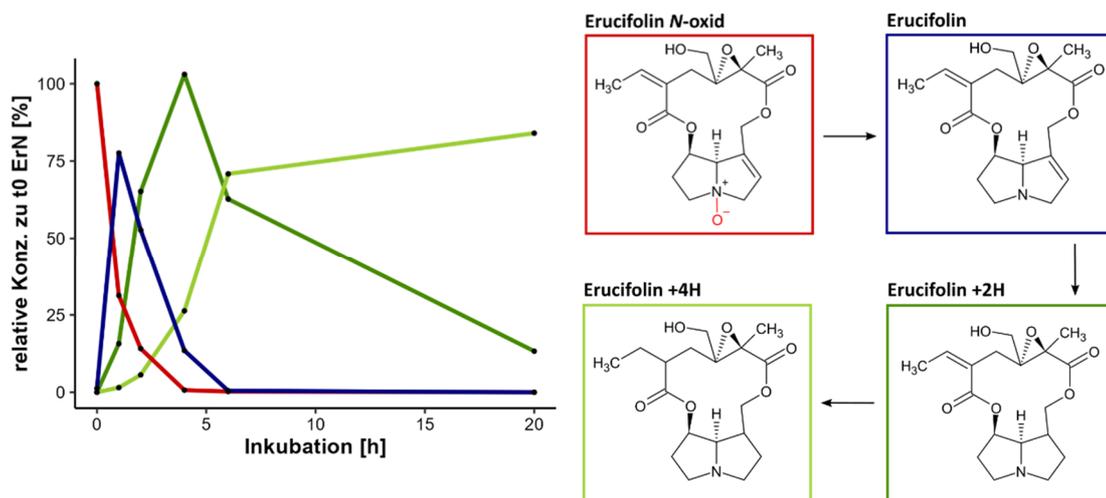


Abbildung 70: Überblick über die strukturellen Veränderungen der Pyrrolizidinalkaloide während des Pansenstoffwechsels am Beispiel von Erucifolin-N-Oxid (ErNO). N-Oxide der Senecio-Pflanzen werden in das korrespondierende PA umgewandelt, gefolgt von der Reduktion der in der Necinbase und der Necinsäure vorhandenen Doppelbindungen.

Im nächsten Schritt wird die Doppelbindung in der 1,2 Position der Necinbase von den Pansenmikroben hydriert, d.h. es entstehen Pansenmetabolite, die ein gesättigtes Ringsystems besitzen. Darauf folgend werden die Doppelbindungen der Necinsäure hydriert, so dass vollständig gesättigte Metaboliten entstehen (Abbildung 70). Diese Reaktionen konnte als ein gemeinsames Prinzip des Pansenmetabolismus für alle Senecio-PAs festgestellt werden.

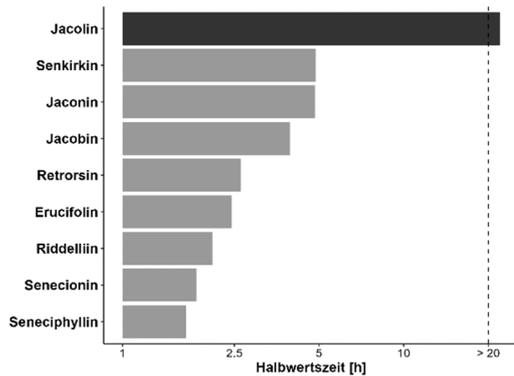


Abbildung 71: Halbwertszeiten [h] der Senecio PAs abgeleitet aus Inkubationsversuchen mit den Einzelsubstanzen. Dargestellt sind die resultierenden Mittelwerte aus drei biologischen Replikaten (Kuh), wobei jedes Replikat als technisches Duplikat durchgeführt wurde (insgesamt n = 12).

Während bei der Reduktion des N-Oxids zur freien Base keine Unterschiede in der Abbaugeschwindigkeit zwischen den einzelnen PANOs festgestellt werden konnten, war die Geschwindigkeit der weiteren Umwandlungsschritte, d.h. die Reduktion der Doppelbindungen, strukturabhängig. Während Senecionin, Seneciphyllin und Riddelliin sehr schnell abgebaut wurden, zeigten Jacobin, Jacolin oder Senkirkirin einen wesentlich langsameren Abbau. Insbesondere Jacolin, von dem selbst nach 20 h Inkubationszeit noch ca.  $73 \pm 8\%$  detektierbar waren, wies eine hohe Resistenz im Pansen auf (Abbildung 71).

In Bezug auf die Einordnung der strukturellen Veränderungen der PAs während des Pansenstoffwechsels kann darauf verwiesen werden, dass solche 1,2-gesättigten Necin-Grundstrukturen auch von Pflanzen produziert werden. Diese sind in der Literatur als Platyphyllin-Typ-PA bekannt. Da die Doppelbindung in 1,2 Position der Necinbase im Allgemeinen als strukturelle Voraussetzung gilt, dass in der Leber mittels Oxidation pyrrolische Metabolite gebildet werden und PAs so ihre Lebertoxizität entfalten, wird dieser Platyphyllin-Strukturtyp als weniger toxisch oder ungiftig beschrieben (Mattocks 1986; Ruan et al. 2014).

Beprobte Pansensäfte der Rinder, Schafe und Ziegen aus den Fütterungsstudien wurden auf die in Tabelle 24 aufgeführten Pansenmetaboliten untersucht. Die Konzentrationen der PA/PANOs und deren Pansenmetabolite der o.g. Matrices sind in Abbildung 72 dargestellt. Wie aus den *in-vitro* Versuchen erwartbar (schnelle Reduktion der N-Oxide zur korrespondieren freien Base, vergleiche Abbildung 69), waren in den Pansensaftproben keine oder nur sehr geringe Konzentrationen an N-Oxiden messbar. In Bezug auf die applizierten PAs waren in den *in vivo* Pansensaftproben hauptsächlich Jacobin und Jacolin nachweisbar, während z.B. Seneciphyllin, Senecionin oder Riddelliin nicht mehr nachweisbar waren.

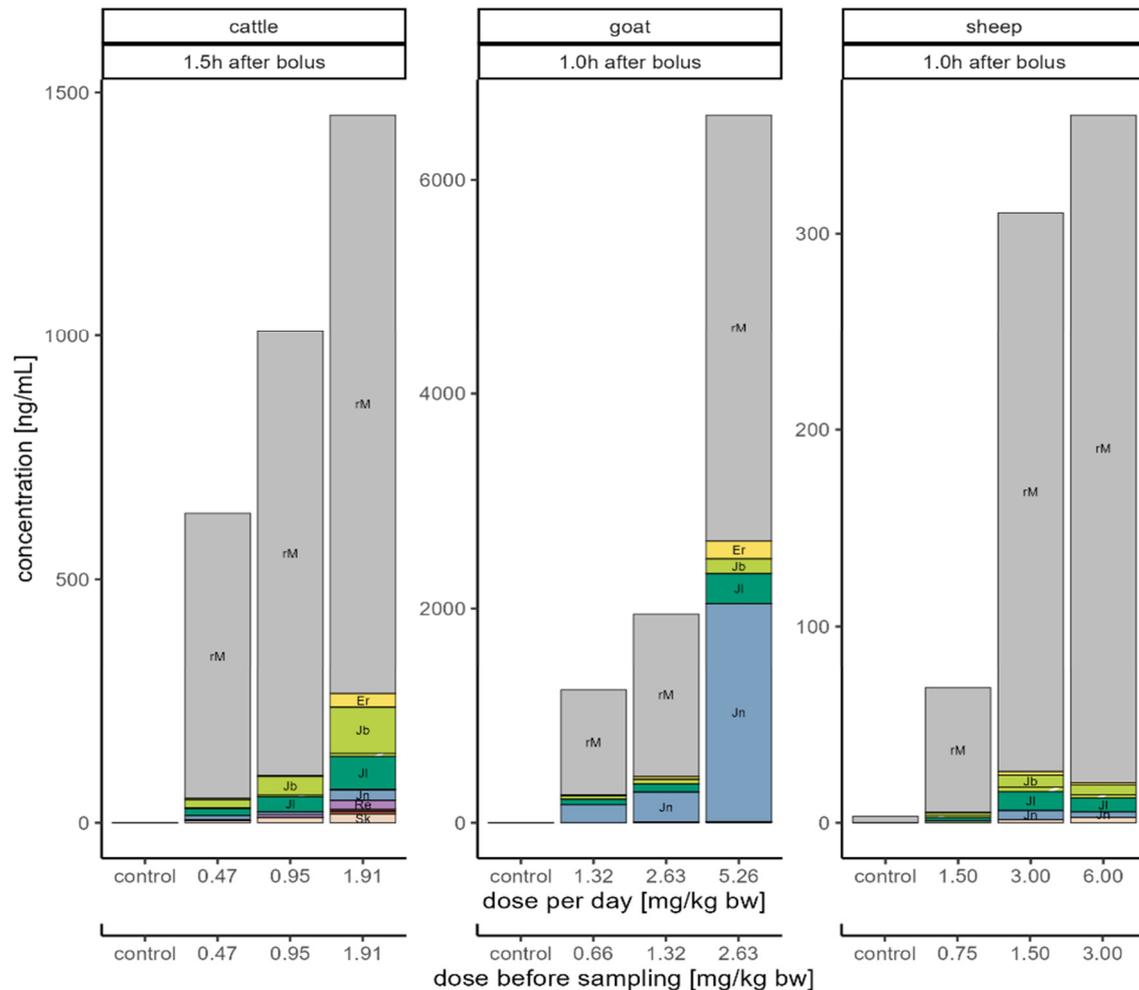


Abbildung 72: Nachgewiesene PAs und ihre Pansenmetaboliten (rM) in Pansenflüssigkeit von Kühen (links), Ziegen (Mitte) und Schafen (rechts) innerhalb der drei Dosisgruppen und in der jeweiligen Kontrollgruppe. Dargestellt sind die Mittelwerte der Probenahmetage während des Fütterungsversuchs (Tag 7, 14, 21). Die Proben wurden 1,5 h nach der Verabreichung bei Kühen und 1,0 h bei Schafen und Ziegen entnommen. Die tägliche PA-Dosis wurde bei Kühen als einmalige Gabe verabreicht, während sie bei Ziegen und Schafen auf zwei kleinere Gaben pro Tag aufgeteilt (halbiert) wurde. Erucifolin (Er), Jacobin (Jb), Jacolin (Jl), Jacolin (Jn), Retrorsin (Re) und Senkirkin (Sk).

Die qualitative Änderung der PA-Zusammensetzung ausgehend vom applizierten Extrakt hin zum gemessenen PA-Profil im Pansensaft ist in Abbildung 73 dargestellt und vermutlich durch die unterschiedlichen Abbaukinetiken der einzelnen PAs im Pansen erklärbar (vergleiche in vitro Daten zur Abbaukinetik [ Rind], Abbildung 71).

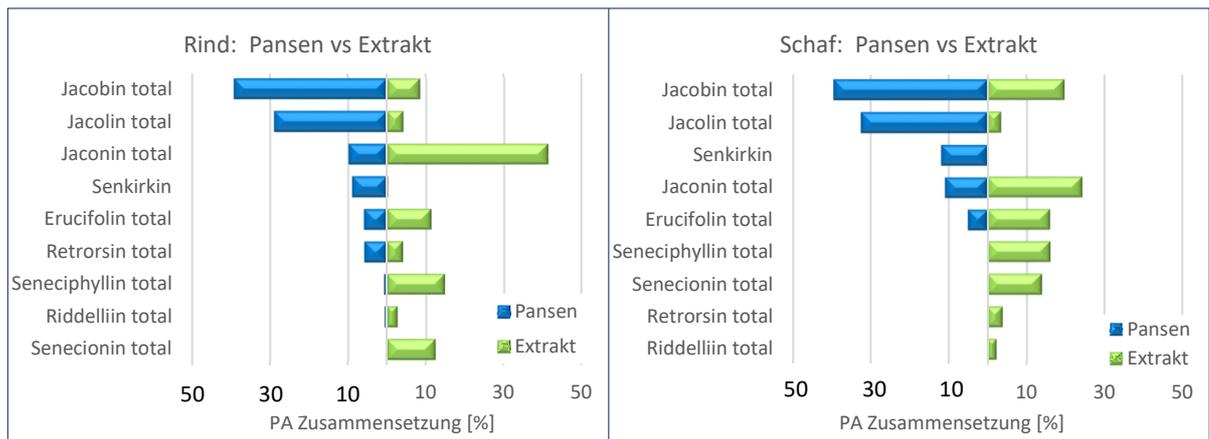


Abbildung 73: Prozentuale Darstellung des PA-Profiles (PA total= freie Base + korrespondierendes N-Oxid) im applizierten Extrakt (grün) im Vergleich zur Pansenflüssigkeit (balu) für Rind (links) und Schaf (rechts). Die Anordnung der PAs erfolgte nach deren Anteilen in der Pansenflüssigkeit.

#### 4.5.2. Hepatischer Metabolismus

Das Verhalten der *Senecio* PAs in der Leber wurde mittels Inkubationen der Einzelsubstanzen mit Mikrosomen von Kühen und Schafen simuliert und massenspektrometrisch untersucht (PANOs wurden nicht untersucht, da diese im Pansen zur korrespondierenden tertiären Base reduziert werden und für Ziegen waren keine Mikrosomen erwerbbar). Aufgrund der Transferrelevanz der PAs in das tierische Nutzwewebe wurden diese Untersuchungen weiterhin mit humanen Leber-Mikrosomen vorgenommen (und zusätzlich für die Spezies Ratte aufgrund der vergleichsweise guten Datenbasis in der Literatur). Des Weiteren wurden die mittels Inkubation erzeugten Pansenmetabolite mit Kuh- und Schafmikrosomen umgesetzt. Für keine der beiden untersuchten Spezies konnte mittels Mikrosomeninkubationen ein Abbau der Pansenmetabolite erzeugt werden. Dies deckt sich mit den Ergebnissen für den hepatischen Metabolismus von Platyphyllin, das ebenfalls eine gesättigte Neringgrundstruktur aufweist und für das auch kein Abbau und/bzw. keine Umwandlung in ungesättigte Ringstrukturen beobachtet wurde (Geburek et al. ATOX).

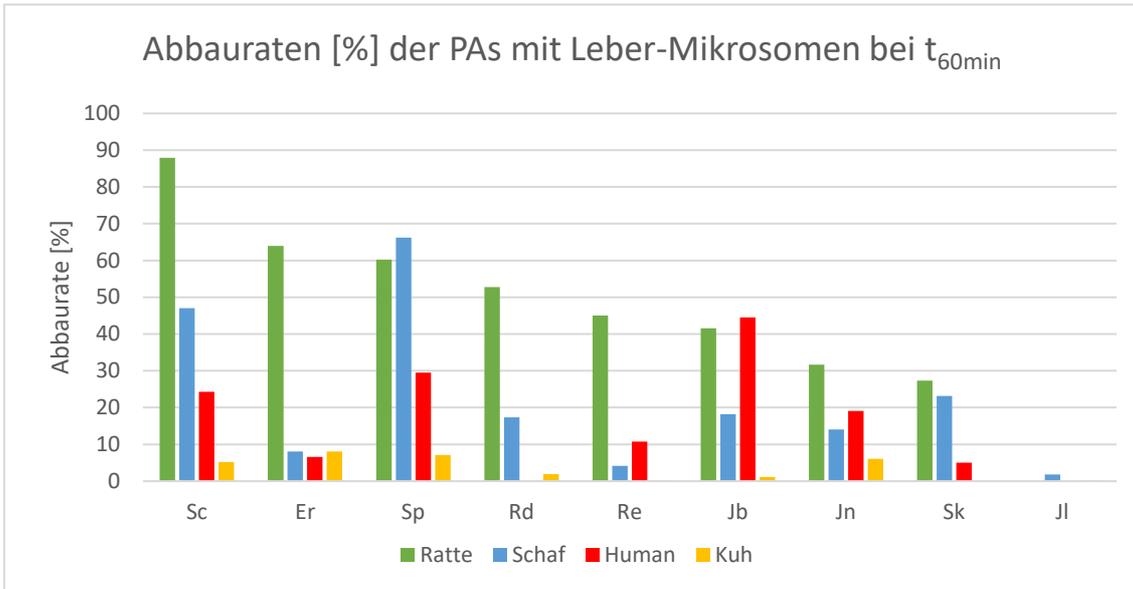


Abbildung 74: Darstellung des prozentualen Abbaus der Senecio PAs [15  $\mu\text{M}$ ] mit Lebermikrosomen verschiedener Spezies nach 60 min Inkubationszeit, die Anordnung erfolgte von der höchsten zur niedrigsten Abbauraten. Abkürzungen: Sc: Senecionin, Er: Erucifolin, Sp: Seneciphyllin, Rd: Riddelliin, Re: Retrorsin, Jb: Jacobin, Jn: Jaconin, Sk: Senkirkin, Jl: Jacolin.

In Abbildung 74 sind die Abbauraten der einzelnen PAs nach 60 min Inkubationszeit für die vier untersuchten Spezies dargestellt. Hieraus wird ersichtlich, dass im Durchschnitt die PAs bei der Inkubation mittels Ratten-Mikrosomen die höchsten Abbauraten aufwiesen, gefolgt von der Spezies Schaf, während die Kuh einen vergleichsweise geringen Abbau zeigte. Da laut Literatur das Isoenzym CYP 3A4 für die hepatische Verstoffwechslung verantwortlich ist, wurden alle im Versuch eingesetzten Mikrosomen (Spezies) auf ihre CYP Aktivität getestet. Dabei wiesen die Rindermikrosomen die höchste Aktivität auf, so dass es unklar ist, warum *in vitro* kein/kaum Abbau beobachtet wurde und ob somit die *in vitro* Daten die *in vivo* Situation widerspiegeln.

Auffällig ist auch, dass sich die einzelnen PAs in ihren Abbauraten unterscheiden und die mittels *in vitro* Versuchen bestimmten Abbauraten für den hepatischen und den Pansenmetabolismus eine gewisse Korrelation aufweisen (vergleiche Abbildung 74 und Abbildung 71). Unter den Senecio PAs wies Jacolin den geringsten Abbau bzw. keinen Abbau auf, beim Rind gefolgt von Senkirkin (Abbildung 74). Der geringe hepatische Abbau, in Kombination mit dem geringen Abbau im Pansen kann beim Rind die höheren Transferraten dieses (r) PAs in das Fleisch und in die Milch erklären. Dagegen wird Senkirkin bei Inkubation mit Schafmikrosomen abgebaut, was möglicherweise den fehlenden Übergang in Milch und Fleisch beim Schaf erklärt.

Für die Beschreibung des hepatischen Metabolismus der PAs wurden für die identifizierten Metaboliten hochaufgelöste Produkt-Ionen-Spektren aufgenommen. Auf Basis deren Auswertung wurden Strukturvorschläge vorgenommen. Für diese Strukturvorschläge ist festzustellen, dass für die meisten Transformationen häufig nur Bereiche des Moleküls eingegrenzt werden können, während die Doppelbindungsäquivalenzen (und somit der Sättigungsgrad) des Necinrings mittels Massenspektrometrie relativ gut beschrieben werden können. Des Weiteren wurden auf Basis der Fragmentationen Strukturvorschläge hinsichtlich des Veresterungsgrads (Monoester, offener oder zyklischer Diester) gemacht. Die strukturellen Veränderungen der PAs können wie folgt zusammengefasst werden.

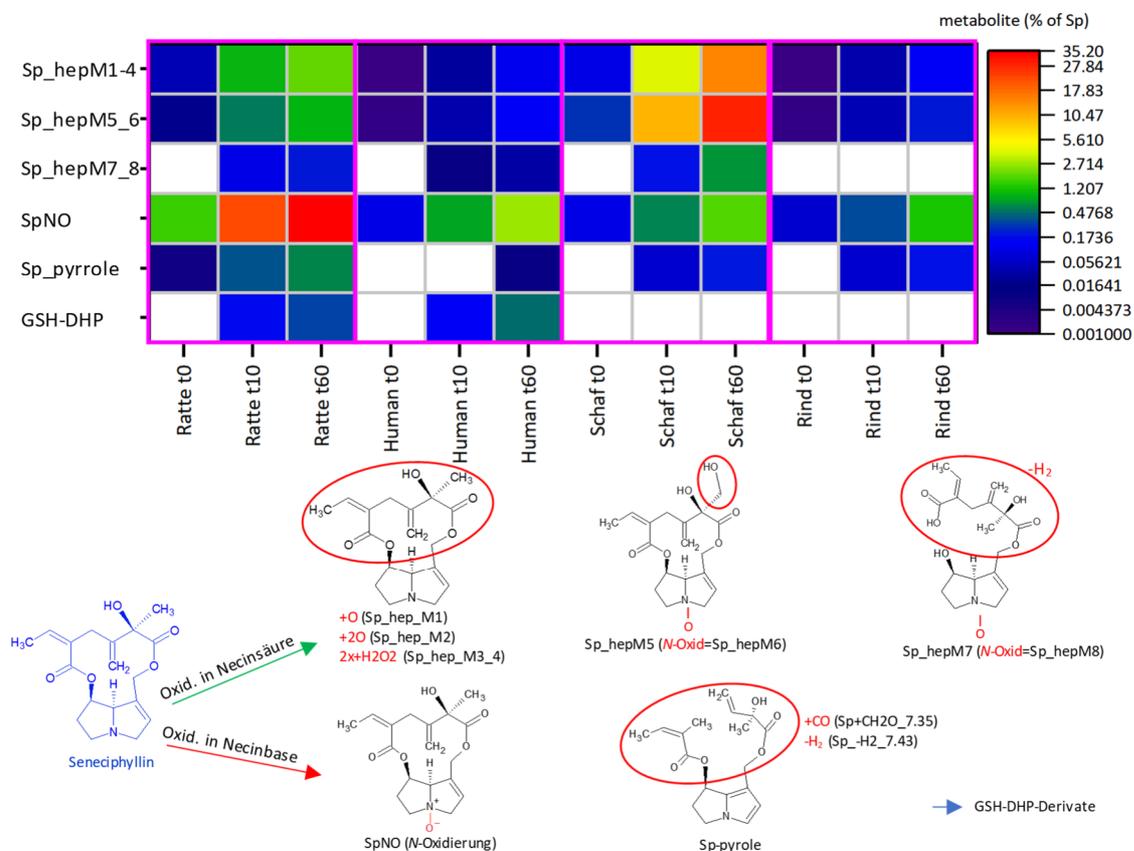


Abbildung 75: Darstellung der identifizierten hepatischen Metaboliten von Seneciophyllin durch Inkubationen mit Lebermikrosomen der Ratte, Mensch, Schaf und Kuh (von links nach rechts). Die Inkubation wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten gestoppt (t=0, 10 und 60 min). Die Strukturen sind Vorschläge auf Basis von hochaufgelösten Produkt-Ionen-Spektren. Ihre Konzentrationen sind als heat map dargestellt als prozentualer Anteil des abgebauten Seneciophyllins.

#### 4.6. Berechnung der verabreichten PA-Dosis in PA-Gehalte im Futter sowie in eine Anzahl an individuellen Jakobskreuzkraut-Pflanzen

##### 4.6.1. Umrechnung der verabreichten PA Dosis in eine PA Konzentration im Futter

Zur Einordnung der applizierten PA Dosen in die Praxis wurde berechnet, welche PA-Gehalte im Futter vorhanden sein müssten bzw. wie viele einzelne Jakobskreuzkraut-Pflanzen die jeweilige Tierart verzehren müsste, um den verabreichten (täglichen) PA-Dosen zu entsprechen. Das für die Berechnung benötigte durchschnittliche Körpergewicht (KG) wurde auf Basis der in der Studie eingesetzten Tiere ermittelt (siehe Abschnitt 3.4.1.1, Tabelle 4 und Tabelle 5) und betrug beispielsweise für die Milchkühe 650 kg. Demzufolge wurden in der niedrigsten Dosierungsgruppe (0,47 mg PA/kg KG/d) pro Tier 293 mg PA bzw. in der höchsten Dosierungsgruppe (1,91 mg PA/kg KG/d) 1242 mg PA absolut pro Tier verabreicht. Für die Aufnahme dieser absoluten PA-Mengen über das Futter wurden zwei Szenarien gerechnet: einmal erfolgte die Aufnahme über die durchschnittliche tägliche Total-Misch-Ration (TMR), die für die Milchkühe während des Versuchs 19 kg Trockenmasse (TM) betrug. Die an Milchkühe verabreichten PA-Dosen (0,47 bis 1,91 mg/kg KGW) würden somit PA-Konzentrationen zwischen 16 und 65 mg/kg in der TMR TM entsprechen (Tabelle 14). Da nach derzeitigem Kenntnisstand eine Kontamination des Kraftfutters mit PAs selten ist, wurde zusätzlich berechnet, dass die PA-Exposition der Tiere hauptsächlich über das Raufutter erfolgt. Unter der Annahme, dass der durchschnittliche Raufutteranteil bei einem 650 kg schweren Rind 13 kg TM beträgt, entspricht die niedrigste verabreichte PA-Dosis einer PA-Konzentration von 25 mg/kg TM und die höchste einer PA-Konzentration von 90 mg PA/kg TM (Tabelle 14). Die gleichen Berechnungen wurden für Schafe und Ziegen durchgeführt.

Tabelle 14: Zusammenstellung der Dosisgruppen, der mittleren Körpergewichte pro Tierart und der daraus resultierenden absolut applizierten PA Menge. Diese wurde in die entsprechenden PA-Konzentrationen im Futter umgerechnet (einmal unter der Annahme die PA-Exposition der Tiere ausschließlich über Raufutter erfolgt und auf der Basis einer Total-Misch-Ration (TMR)).

Tierart	applizierte PA Dosis [mg/kg bw/d]	Ø KGW [kg]	PA absolut pro Tag [mg/d]	PA-Kontaminationsquelle			
				über gesamtes Futter		nur über Raufutter	
				Futterbedarf TMR [kg]	c PA in TMR [mg/kg]	Futterbedarf Raufutter [kg]	c PA in Raufutter [mg/kg]
Rind	0,47	650	306	19	16	13	24
Rind	0,95	650	618	19	33	13	48
Rind	1,91	650	1242	19	65	13	96
Schaf	1,5	60	90	2,16	42	1,7	53
Schaf	3	60	179	2,16	83	1,7	105
Schaf	6	60	360	2,16	167	1,7	212
Ziege	1,32	45	60	2,06	29	1,6	37
Ziege	2,63	45	119	2,06	58	1,6	75
Ziege	5,26	45	239	2,06	116	1,6	149

#### 4.6.2. Umrechnung der verabreichten PA/PANO-Dosis in eine Anzahl an individuellen Jakobskreuzkrautpflanzen

Für die Berechnung der Anzahl einzelner Jakobskreuzkraut-Pflanzen, die ein Tier pro Tag fressen müsste, um die applizierten Dosen zu erreichen, müssen folgende Parameter bekannt sein:

1. die PA/PANO-Konzentration der Pflanzen
2. die relative Trockenmasse der Pflanze
3. die Größe/Gewicht der Pflanze

In der Literatur liegen zwar vergleichsweise viele Daten zum PA/PANO-Gehalt von Pflanzen vor, jedoch keine oder kaum ergänzende Angaben dazu, in welchem Entwicklungsstadium sich die Pflanze befand, d.h. wann war der Erntezeitpunkt, welche Frisch- und Trockenmasse bzw. Wuchshöhe hatte die Pflanze. D.h. für die nachfolgende Modellierung konnte nicht auf einen vollständig erhobenen Datensatz zurückgegriffen werden, sondern es mussten verschiedene Datensätze kombiniert werden.

1. Daten zur PA Konzentration der Pflanzen

Im Rahmen eines Forschungsprojektes der Tierärztlichen Hochschule Hannover (Dr. S. Aboling) wurden auf einer Fläche in Norddeutschland monatlich 25 Einzelpflanzen des Jakobskreuzkrautes beprobt (Abbildung 76). Es zeigte sich, dass die biologische Variabilität der Pflanzen eines Standortes zum gleichen Erntezeitpunkt sehr hoch ist, dass aber im Mittel über die gesamte Vegetationsperiode die Gesamt-PA-Gehalte in vergleichbaren Größenordnungen liegen. Die höchsten PA/PANO-Gehalte wurden im Juni ermittelt (Abbildung 76).

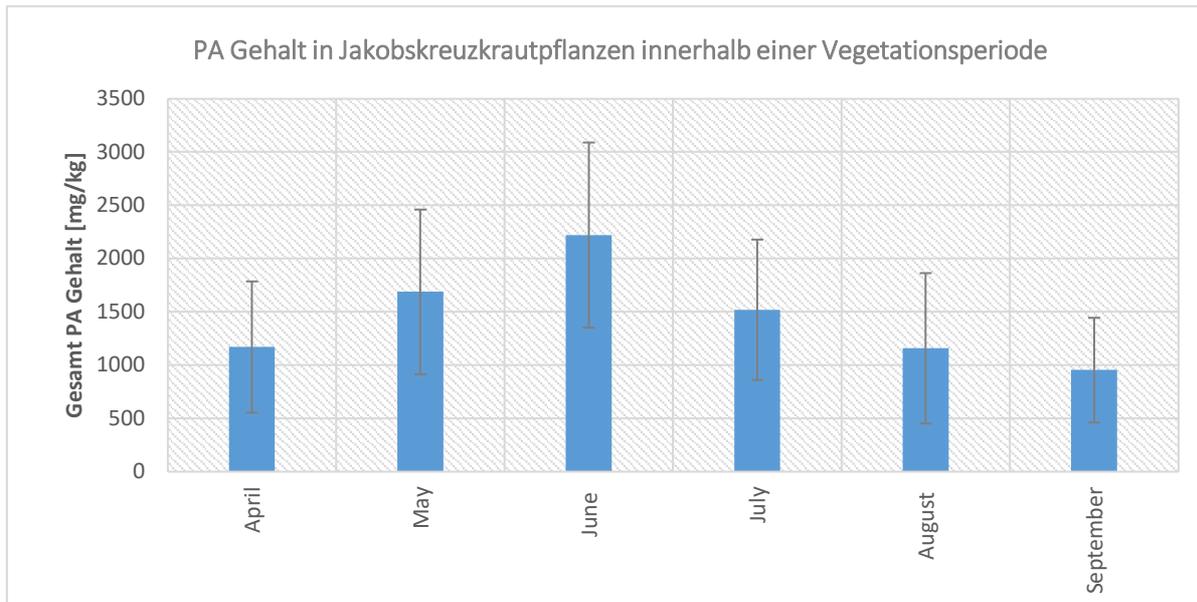


Abbildung 76: Darstellung des mittleren Gesamt-PA/PANO Gehalts in Jakobskreuzkrautpflanzen von April bis September. Die Standardabweichung zeigt die Variabilität des Gesamt-PA Gehalts der 25 beprobten Pflanzen.

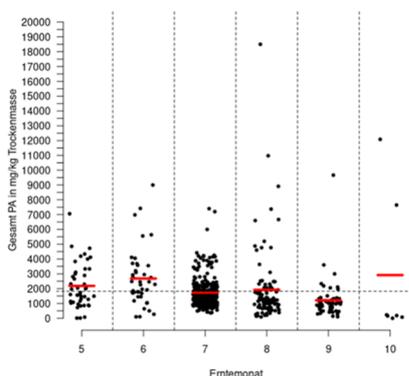


Abbildung 77: Gesamt PA/PANO-Gehalt in *Jacobaea vulgaris* aus verfügbaren Literaturdaten aus 2010-2021 (n=627). Der Mittelwert pro Monat ist als roter Strich eingefügt.

Zusätzlich wurden alle in der Literatur vorhandenen Daten (n= 627) nach ihrem PA/PANO-Gehalt pro Erntemonat geplottet (Abbildung 77). Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass, wie in den zuvor dargestellten Daten, dass die Pflanzen im Mittel im Juni die höchsten Gehalte erreichen, jedoch keine eindeutige Korrelation zwischen dem Erntemonat und dem PA/PANO-Gehalt erkennbar ist. Unter Berücksichtigung aller Daten wurde ein mittlerer Gesamt-PA-Gehalt von 2000 mg/kg bzw. 0,2 % in der TM errechnet.

## 2. Daten zur relativen Trockenmasse der Pflanzen

Der Anteil der Trockenmasse an der Frischmasse (relative Trockenmasse) stammt aus Daten (n=37) von 2018-2021. Dabei zeigt sich, dass die relative Trockenmasse von Mai bis September zunimmt und im Mai durchschnittlich 15% bzw. im Oktober ca. 30% beträgt.

## 3. Daten zur Größe/Gewicht der Pflanzen

Es liegen derzeit relativ wenig Daten zur absoluten Trockenmasse bzw. zum Trockengewicht einzelner *Senecio* Pflanzen vor. In der Literatur sind häufig Daten veröffentlicht, bei denen die Wurzeln mit ausgewogen wurden (es wird nicht davon ausgegangen, dass diese bei der Beweidung mitgefressen oder mitgeerntet werden). Aus den Literaturdaten (n=21, davon häufig MW mit jeweils 5 Einzelpflanzen) wurde abgeleitet, dass die Trockenmasse/das Trockengewicht von Mai bis September zunimmt (in diesem Zeitraum findet das Größenwachstum der Pflanzen statt), wobei die Trockenmasse im Mai durchschnittlich 10 g und im August ca. 35 g beträgt. Dies bedeutet, dass die „PA/PANO-Fracht“ vom Entwicklungsstadium der Pflanze abhängt und dass mit zunehmender Größe der Pflanze (Zunahme der Biomasse) die PA/PANO-Menge pro Pflanze zunimmt. Die durchschnittliche „PA/PANO-Fracht“ einer Pflanze wurde auf 50 mg geschätzt.

**Fazit:** Unter Einbeziehung aller Daten wurde für jede Tierart (in Abbildung 78 exemplarisch für das Rind) modelliert, wie viele Einzelpflanzen (in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium der Pflanze) ein Tier aufnehmen müsste, um der applizierten Dosis zu entsprechen. In Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium der Pflanze entspräche die niedrigste Dosis der Rinder (306 mg PA abs.) durchschnittlich 5-10 Pflanzen pro Tag, die mittlere Dosis (618 mg PA abs.) durchschnittlich 10-16 Pflanzen pro Tag und die höchste Dosis (1242 mg PA abs.) durchschnittlich 20-30 Pflanzen pro Tag. Für das Schaf entspräche die niedrigste Dosis (90 mg PA abs.) durchschnittlich 2-3 Pflanzen pro Tag, die mittlere Dosis (179 mg PA abs.) durchschnittlich 3-5 Pflanzen pro Tag und die höchste Dosis (360 mg PA abs.) durchschnittlich 6-15 Pflanzen pro Tag. Für die Ziege entspräche die niedrigste Dosis (59 mg PA abs.) durchschnittlich 2-3 Pflanzen pro Tag, die mittlere Dosis (118 mg PA abs.) durchschnittlich 3-5 Pflanzen pro Tag und die höchste Dosis (237 mg PA abs.) durchschnittlich 4-7 Pflanzen pro Tag.

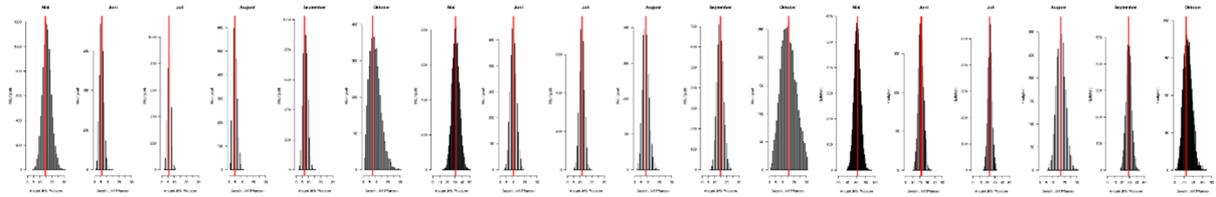


Abbildung 78: Schätzung der wahrscheinlichsten Anzahl an einzelnen PA/PANO Pflanzen (roter Strich) in Abhängigkeit vom Monat, die ein Rind verzehren müsste, um die (links) die niedrigste applizierte PA-Dosis (0,45 mg/kg KGW), (Mitte) die mittlere applizierte PA-Dosis (0,9 mg/kg KGW) sowie (rechts) die höchste applizierte PA/PANO-Dosis (1,8 mg/kg KGW) zu erreichen. Die Enden der Verteilung zeigen jeweils die minimale und die maximale Anzahl an.

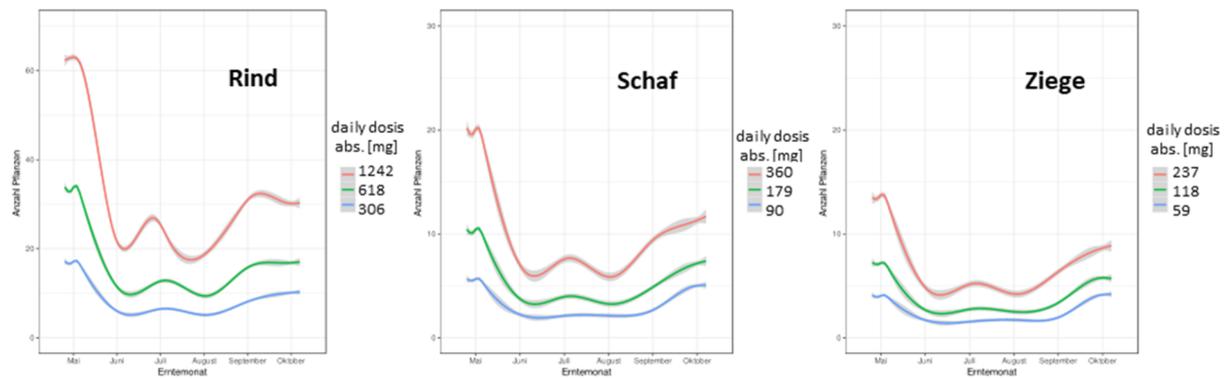


Abbildung 79: Schätzung der wahrscheinlichsten Anzahl an einzelnen PA/PANO Pflanzen in Abhängigkeit vom Monat pro Tierart und pro applizierte Dosis, dabei ist die niedrigste Dosis jeweils in blau, die mittlere Dosis in grün und die höchste Dosis in rot dargestellt.

#### 4.6.3. Umrechnung der verabreichten PA/PANO Dosis in eine Anzahl an individuellen Frühlingskrenzkrautpflanzen

Zur Verbesserung der Datenlage wurden im Frühjahr 2024 insgesamt 111 Pflanzen des Frühlingskrenkrautes (*Senecio vernalis*) unterschiedlicher Wuchshöhen gesammelt. Für alle Pflanzen wurden die Wuchshöhe sowie das Gewicht der frischen- und der getrockneten Pflanze bestimmt (Tabelle 15). Anschließend wurden die Pflanzen nach ihrer Wuchshöhe gruppiert und die Pflanzen jeder Gruppe in Blüten- bzw. -Stängelbereich separiert. Die ermittelten PA-Gehalte sind in Tabelle 15 zusammengefasst. Die Daten zeigen, dass der PA/PANO-Gehalt im Blütenbereich 7 bis 8-mal höher war als im Rest der Pflanze, dass aber die Wuchshöhe nicht mit dem PA-Gehalt der Pflanze korreliert. Der Gesamt-PA-Gehalt variierte zwischen 1721 und 2279 mg/kg TM und betrug im Mittel 1967 mg/kg, d.h. ca 0,2 % in der TM. Das bedeutet, dass die PA-Fracht einer Pflanze in erster Linie von ihrer Größe und damit von ihrem Gewicht abhängt. Beispielsweise hätte eine Pflanze von ca 32 cm Wuchshöhe, ein mittleres Frischgewicht von 3,7 g bzw. 0,63 g Trockengewicht (bei 17 % rel. TS) und damit eine mittlere

absolute PA-Fracht von ca. 1 mg (Tabelle 15). Für eine 59 cm große Pflanze mit einer mittleren Frischmasse von 30g wären eine mittlere PA-Fracht von 14mg erwartbar.

Tabelle 15: Untersuchung von *Senecio vernalis* Pflanzen auf das Frischmassegewicht inklusive Spannbreite, die relative Trockenmasse (TM), sowie deren Gesamt-PA/PANO Gehalt bei unterschiedlicher Wuchshöhe.

Wuchshöhe	Anzahl Pflanze n [n]	mittleres Gewicht FM pro Pflanze [g]	Min Gewicht FM [g]	Max Gewicht FM [g]	mittlere relative TM (%)	PA Gehalt [mg/kg] in TM			PA-Fracht [mg] pro Einzelpflanze
						Blüte	Stängel	Ganze Pflanze	
32 cm	16	3,7	1,1	7,2	17	7201	1381	2067	1
40 cm	22	8,8	2	30,9	20	6107	718	1928	3
42 cm	9	10,2	5,4	22,5	18	5292	544	1741	3
46 cm	13	16,7	5	76,5	19	6103	865	1770	5
49 cm	17	19,2	3,7	58,6	20	6087	710	1721	7
51 cm	15	18,3	4,6	50,9	20	7175	845	2279	8
57 cm	12	24,3	9,2	45,3	19	7516	694	2154	10
59 cm	7	30,1	4,8	59	20	7031	1052	2270	14

## 5. Diskussion

### 5.1. Charakterisierung des eingesetzten Extrakts

Für die durchgeführte Studie wurden Extrakte aus Jakobskreuzkraut (*Jacobaea vulgaris* Gaertn.) hergestellt, die eine exakte und vergleichbare PA-Dosierung aller Versuchstiere über den gesamten Versuchszeitraum ermöglichte (aufgrund der großen benötigten Mengen erfolgte die Produktion in mehreren Chargen). Die Charakterisierung zeigte, dass die Extrakte im Vergleich zur Pflanze einen geringeren N-Oxid Anteil aufwiesen. Der Anteil der PANO betrug in der Pflanze ca. 88 % und in den Extrakten zwischen 30-60 % (siehe Tabelle 16). Die Analyseergebnisse des getrockneten Pflanzenmaterials sowie der drei Chargen ist in Tabelle 16 dargestellt. Während der Extrakt der Dosisfindungsstudie eine sehr ähnliche Zusammensetzung wie das Ausgangsmaterial aufwies, wiesen die Extrakte von Rind und Ziege einen niedrigeren PANO-Anteil auf (Tabelle 16). Da die N-Oxid Form im Pansen der Wiederkäuer in die korrespondierende freie Base reduziert wird, gibt es derzeit keinen Hinweis darauf, dass der geringere PANO Anteil das Ergebnis der Studie beeinflusst.

Da im Pansen der Wiederkäuer das N-Oxid zur entsprechenden freien Base reduziert wird und in der Leber die freien Basen wieder zum N-Oxid oxidiert werden, wird in diesem Bericht häufig die Summe aus N-Oxid und freien Basen als „PA gesamt“ betrachtet.

Außerdem unterschied sich der Extrakt von der Pflanze im Verhältnis von Jacobin zu Jaconin. Während in der Pflanze ein Jacobinanteil (total=PA+PANO) von 39% und einen Jaconinanteil (total) von 7% vorlag, wies der Extrakt (beispielsweise für Rind und Ziege) einen Jacobinanteil (total) von 8% und einen Jaconinanteil (total) von ca. 40% auf (Tabelle 16). Da die anderen PA (total) in relativ ähnlichen Anteilen in Pflanze und Extrakt enthalten waren, ist davon auszugehen, dass während des Extraktionsprozesses Jacobin in Jaconin umgewandelt wurde. Die in der Studie erhobenen Daten deuten darauf hin, dass Jacobin und Jaconin a) vergleichbare Halbwertszeiten im Pansen aufweisen (Abbildung 71), b) vergleichbare Abbauraten im hepatischen Metabolismus zeigen (Abbildung 74) und c) vergleichbare Werte für den Transfer in die Milch (Tabelle 19) bzw. in den Muskel (Tabelle 22) bestimmt wurden. Aufgrund dieser Ergebnisse wird davon ausgegangen, dass das veränderte Verhältnis von Jacobin zu Jaconin keinen Einfluss auf die Ergebnisse der Studie hat.

Neben den PA/PANO bestand der verwendete Extrakt zu etwa einem Drittel aus Kohlenhydraten, was zu einer Pansendysbiose in Verbindung mit einer Pansenazidose führen könnte (Sharp et al. 1982). Daher würde das gleichzeitige Auftreten von PA/PANO und großen Mengen an Zucker durch den PA/PANO-Extrakt nicht nur zu einer erhöhten PA/PANO-Belastung, sondern auch zu einer steigenden Zuckerbelastung im Pansen führen. Zum Ausgleich des Zuckeranteils des verabreichten PA/PANO-Extraktes in der höchstdosierten Gruppe wurde Melasse in den beiden niedrigeren dosierten Gruppen zum PA/PANO-Extrakt zugesetzt bzw. in der jeweiligen Kontrollgruppe der kleinen Wiederkäuer verabreicht. Außerdem wurden im Rinderhauptversuch zwei Kontrollgruppen implementiert, eine Wasser-Kontrollgruppe (CONWasser) und eine Melasse-Kontrollgruppe (CONMelasse), um mögliche reine Zuckereffekte ohne den Einfluss von PA zu identifizieren (

Tabelle 3).

Im Rahmen des Projektes wurden Transferparameter für Gesamt-PA/PANO und alle einzelnen Senecio-PAs (gesamt) erhoben. Damit ist es möglich abzuschätzen, mit welchem PA-Transfer zu rechnen wäre, wenn nicht das Jakobskreuzkraut (*Jacobaea vulgaris* Gaertn.), sondern andere Kreuzkrautarten das Futter kontaminiert hätten. Dazu wurden die PA-Profile der in Deutschland relevanten Kreuzkrautarten in Tabelle 16 zusammengestellt.

Tabelle 16: PA-Gehalte der in Kreuzkrautarten typischerweise enthaltenen PAs (Gehalt angegeben als Summe von N-Oxid und freier Base). Die Strukturen der Verbindungen sind in Abbildung 1 dargestellt.

PA (total)	Gehalte individueller PAs [mg/kg] in der jeweiligen Senecio Art*			
	Wasser-Kreuzkraut	Gewöhnliches Kreuzkraut	Frühlings-Kreuzkraut	Jakobs-Kreuzkraut
Jacolin	0,0	0,0	0,0	87,6
Senkirkin	2,7	0,0	260,3	30,3
Jaconin	0,0	0,0	0,0	16,0
Jacobin	0,0	0,0	0,1	409,3
Retrorsin**	42,2	442,0	221,9	58,5
Seneciophyllin**	11,2	368,9	600,4	134,7
Senecionin**	40,4	631,3	3855,2	125,1
Erucifolin	1017,0	0,0	7,0	220,4
Riddelliin	0,0	17,7	0,5	38,7
Gesamt PA Gehalt	1113,5	1459,9	4945,4	1120,5

\* eigene Analysen des BfR, teilweise publiziert in (Jung et al. 2020; Mädge et al. 2020)

\*\* jeweilige Isomere sind hier als Gruppe analysiert und summarisch dargestellt

## 5.2. Tiergesundheitliche Aspekte

Erste Symptome einer PA/PANO-Vergiftung sind Appetitlosigkeit, Abseitsstehen von anderen Tieren, Depression, gekennzeichnet durch Desinteresse, Abneigung gegen Bewegung oder Umherlaufen sowie Durchfall (Bull et al. 1968; Craig et al. 1991; Johnson 1978). Frühere Studien zeigten, dass Kühe sehr individuell auf eine PA/PANO-Exposition reagierten (Johnson 1978; Craig et al. 1991). Im vorliegenden Rinderhauptversuch wurden keine Anzeichen von Appetitlosigkeit beobachtet, da sich die TM-Aufnahme zwischen den Gruppen nicht unterschied (Abbildung 12, [A]). Schwankungen in der TM-Aufnahme im Verlauf des Versuchs traten bei allen Behandlungsgruppen in ähnlicher Weise auf und verursachten ähnlich gerichtete Schwankungen in KG und EB (Abbildung 12, [B], [C]). Die klinischen Untersuchungen zeigten während des gesamten Versuchs keine Anzeichen von zentralnervösen Störungen aufgrund der erhöhten PA/PANO-Exposition. Die Pansenkontraktionen blieben im normalen Bereich mit etwa drei Kontraktionen innerhalb von 120 Sekunden. Außerdem erschien der Kot unauffällig, was darauf hindeutete, dass Wiederkäuen und Verdauung durch die PA/PANO-Exposition nicht beeinträchtigt wurden. Die in diesem Projekt erzeugten Ergebnisse von Taenzer et al. 2022 zeigten, dass der Pansenstoffwechsel als PA/PANO-Entgiftung fungiert, indem PA in die ungiftige gesättigte Form umgewandelt werden. Daher dürften unter den gegebenen Bedingungen keine PA/PANO-induzierten Auswirkungen auf die klinischen Merkmale bestehen. Jedoch zeigten Dickinson et al. (1976), dass eine sehr hohe Exposition von 16 mg (PA/PANO)/kg KG/d (verabreicht als getrocknetes und gehäckseltes Pflanzenmaterial, über eine Pansenfistel, bei Milchkühen zu einem gleichmäßig verringerten KG und reduzierter Milchleistung führte. Mulder et al. (2020) führte eine

Studie mit Michkühen durch, bei der nacheinander für vier Tage je 200 g Pflanzenmaterial von drei PA-Pflanzen verabreicht wurde (1.Periode: Mischung aus *J. vulgaris* und *S. inaequidens*; 2 Periode: *S.vulgaris*; - beides Kreuzkrautarten; 3 Periode: *Echium vulgare*; eine Boraginaceae). Die PA/PANO-Konzentrationen in der Pflanzenmaterialmischung aus *J. vulgaris* und *S. inaequidens* betragen bis zu 3767 mg/kg (was einer PA-Dosis von  $\sim 1,1 \pm 0,1$  mg/kg KG/d entsprach und somit im vergleich zur vorliegenden Studie zwischen der mittleren und höchsten Dosis lag). Hier wurde von keiner Abnahme der Futteraufnahme oder der Milchleistung berichtet (Mulder et al. 2020), allerdings war die jeweilige Expositionszeit mit nur 4 Tagen sehr kurz. In der vorliegenden Studie der Milchkühe war mit zunehmender PA/PANO-Exposition weder ein Rückgang des Körpergewichts noch der Milchleistung zu beobachten (Abbildung 12). Der anfängliche Rückgang der TM-Aufnahme und die damit zusammenhängenden Parameter KG, ECM und EB wurde durch Stress verursacht, der durch die hohe Häufigkeit der Blutentnahme am ersten Tag des Experiments verursacht wurde (Abbildung 12). Diese Ergebnisse bezüglich KG und Milchleistung sind vergleichbar mit Untersuchungen von Craig et al. (1991) mit ähnlichen PA/PANO-Dosen (1,3 mg (PA/PANO)/kg BW/d, bereitgestellt durch intaktes Pflanzenmaterial), die über einen Zeitraum von 2 Monaten verabreicht wurden und keinen Einfluss auf das Körpergewicht hatten. Darüber hinaus beobachteten Hoogenboom et al. (2011) keine Veränderungen bei der Milchleistung oder bei den Milchbestandteilen Milchprotein, Fett oder Laktose, was auch durch Ergebnisse des vorliegenden Rinderhauptversuch bestätigt wurde.

## PA-SAFE-FEED Abschlussbericht

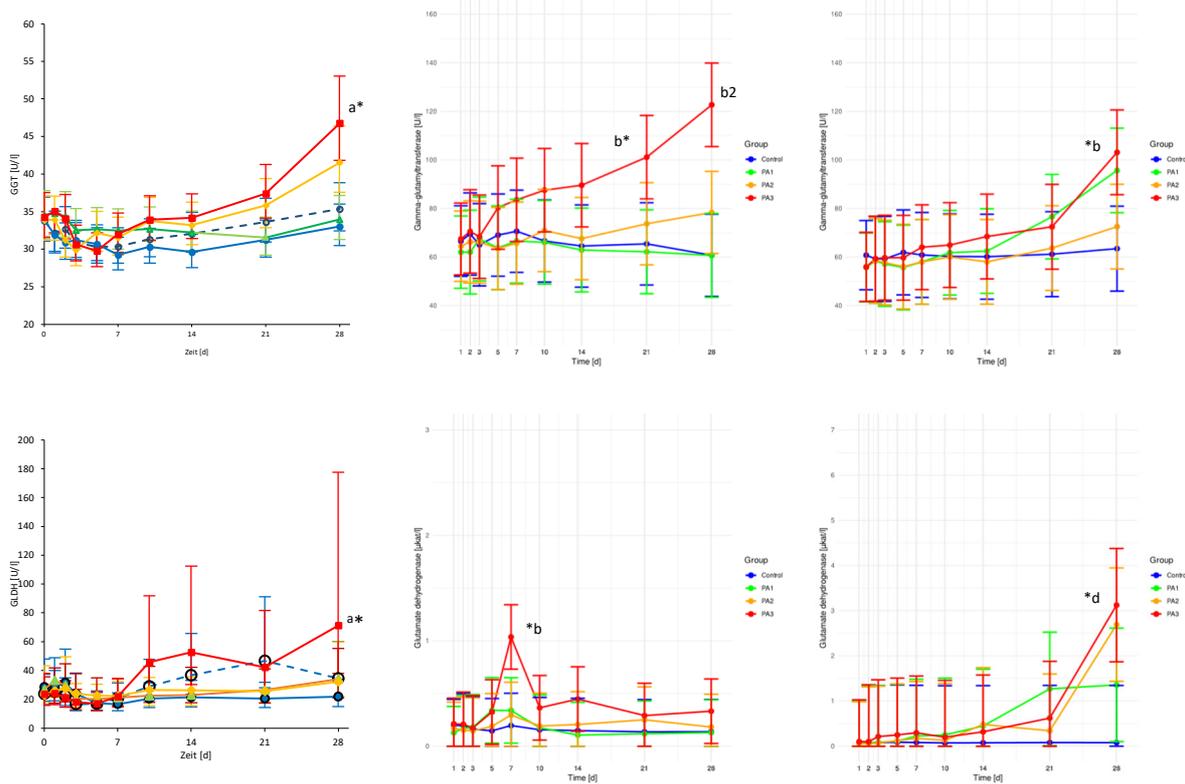


Abbildung 80: Vergleichende Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Gamma-Glutamyltransferase (GGT) [oben], Glutamat-Dehydrogenase (GLDH) [unten] im Blutserum der Kontroll- und Expositionsgruppen drei getesteten Spezies. Links Kühe, Mitte Schafe, Rechts: Ziegen.: In blau: Kontrollgruppe(n), in grün: niedrigste Dosisgruppe, in orange: mittlere Dosisgruppe und in rot: höchste Dosisgruppe (Dosis pro Tierart kann aus

Tabelle 3 bis Tabelle 5 entnommen werden). Die Symbole stellen LS-Means (n=4) mit Fehlerindikatoren oder als 95% Konfidenzintervalle für Box-Cox- und rücktransformierte Daten dar.

**Rind:** GGT: Gruppe:  $p=0,072$ , Tag:  $p<0,001$ , Gruppe x Tag:  $p=0,011$ ; GLDH: Gruppe:  $p=0,857$ , Tag:  $p<0,001$ , Gruppe x Tag:  $p=0,033$ , a: Signifikante Unterschiede zwischen Gruppe PA3 und CONMelasse an Tag 28

\*: Signifikante Unterschiede zwischen Tag 0 und 28 in der Gruppe PA/PANO-3

**Schaf:** GGT: Gruppe:  $p = 0,457$ , Tag:  $p = 0,001$ , Gruppe x Tag:  $p < 0,001$ , \*b = signifikante Unterschiede zwischen Kontrolle - PA3 an Tag 21  $p = 0,032$  und PA1 - PA3 an Tag 21  $p = 0,024$ , \*b2 = signifikante Unterschiede zwischen Kontrolle - PA3 an Tag 28  $p < 0,001$  und PA1 - PA3 an Tag 28  $p < 0,001$  und PA2 - PA3 an Tag 28  $p = 0,009$ ; GLDH: Gruppe:  $p = 0,31$ , Tag:  $p = 0,015$ , Gruppe x Tag:  $p = 0,322$ , \*b = signifikante Unterschiede zwischen Kontrolle - PA3 an Tag 7  $p = 0,006$  und zwischen PA1 - PA3 an Tag 7  $p = 0,021$  und zwischen PA2 - PA3 an Tag 7  $p = 0,015$ .

**Ziege:** GGT: Gruppe:  $p = 0,88$ , Tag:  $p < 0,001$ , Gruppe x Tag:  $p = 0,368$ , \*b = signifikanter Unterschied zwischen Kontrolle - PA3 an Tag 28  $p = 0,021$ ; GLDH: Gruppe:  $p = 0,558$ , Tag:  $p < 0,001$ , Gruppe x Tag:  $p = 0,766$ , \*d = signifikante Unterschiede zwischen Kontrolle - PA2 an Tag 28  $p = 0,036$  und zwischen Kontrolle - PA3 an Tag 28  $p = 0,014$ .

Betrachtet man die PA/PANO-Konzentrationen im Blut (Abbildung 16) der einzelnen Tiere als Indikator für die innere PA/PANO-Exposition, so fiel eine Kuh der Gruppe PA/PANO-2 auf, deren PA/PANO-Konzentrationen ( $243,5 \pm 56,1$  ng/ml) sogar höher waren als die der Tiere in Gruppe PA/PANO-3. Diese

einzelne Kuh der Gruppe PA/PANO-2 zeigte durchweg höhere PA/PANO-Konzentrationen im Blut im Vergleich zu ihren Artgenossen. Dies könnte auf eine individuelle Empfindlichkeit gegenüber PA/PANO aufgrund einer genetischen Komponente für die PA/PANO-Kinetik und/oder einer Vorgeschichte von Leber- oder anderen Krankheiten hinweisen. Interessanterweise wies die beschriebene Kuh nicht nur höhere PA/PANO-Konzentrationen im Blut auf, sondern auch einen ausgeprägteren Anstieg von GGT, GLDH und AST (Abbildung 15) im Vergleich zu ihren Artgenossen, was auf einen veränderten hepatischen PA/PANO-Stoffwechsel hindeuten könnte, der möglicherweise auf hepatozelluläre Läsionen zurückzuführen ist. Neben diesem tierindividuellen Vorgang führte die höchste PA/PANO-Exposition im Allgemeinen zu einem signifikanten zeitabhängigen Anstieg der Serumenzyme, die auf Leberschäden hinweisen (GGT, GLDH und AST) mit einem ähnlichen Trend für ALP (Abbildung 15). Der exponentielle Anstieg der Enzymaktivitäten im peripheren Blut, die auf Leberläsionen hinweisen, einschließlich GGT, in der Gruppe PA/PANO-3 und auch in der Gruppe PA/PANO-2 von der dritten bis zur vierten Woche des Versuchs, könnte auf den Beginn einer chronischen Toxizität hindeuten, die bei einer Expositionszeit von mehr als den in der vorliegenden Studie untersuchten vier Wochen deutlicher sichtbar geworden wäre (Abbildung 15). Der Anstieg der Leberenzyme in der vorliegenden Milchkuhstudie wird durch Ergebnisse von Johnson (1978) gestützt, wo die Enzyme AST und GGT infolge einer Verabreichung von  $\geq 1,5$  g JKK/kg KG/d nach etwa 14 Tagen anstiegen (bei Annahme von 0,2% PA in TM, entspräche die JKK Menge einer PA Dosis  $\geq 3$  mg/kg KG/d). Eine Fallstudie von Shimshoni et al. (2015) beschrieb signifikante Erhöhungen der Konzentrationen von GGT, AST, Kreatinin und ALP und eine Letalität von 30 % bei Rindern (15-18 Monate alt) innerhalb von 26 Wochen bei einer durchschnittlichen PA/PANO-Gesamtexposition (hier *Heliotropium europaeum*; Boraginaceae) von 33 mg/kg KG/d. Im Gegensatz dazu hatte in der Studie von Molyneux et al. (1991) eine Exposition von 4,5 mg Riddelliin/kg KG/d über einen Zeitraum von 20 Tagen keinen Einfluss auf die Serumenzyme GGT und AST; dies stimmte mit unseren Beobachtungen überein, bei denen der signifikante Unterschied erst am Tag 28 auftrat und den progressiven Charakter einer PA/PANO-Vergiftung unterstützte. Neben den signifikanten Veränderungen von GGT, GLDH und AST am Tag 28 (Abbildung 15, [B], [C], [D]) der vorliegenden Studie gab es einen sichtbaren Anstieg der ALP-Aktivität im Blut in der am höchsten exponierten Gruppe (PA/PANO-3) und am selben Tag wurden sogar signifikante Unterschiede im Vergleich zur Gruppe CON<sub>Wasser</sub> erreicht (Abbildung 15, [A]). Basierend auf anderen Studien (Craig et al. 1991; Shimshoni et al. 2015) wäre ein progressiver Anstieg von ALP in einem längeren Expositionsszenario zu erwarten gewesen und wird durch die Tatsache unterstützt, dass fast alle Tiere der Gruppen PA/PANO-2 und PA/PANO-3 tatsächlich einen numerischen ALP-Anstieg am Tag 28 zeigten.

Während GGT, GLDH und AST nachweislich empfindlich auf das PA/PANO-Expositionsszenario reagieren, blieben die anderen klinisch-chemischen Merkmale (Gesamtprotein, Albumin, Bilirubin, Harnstoff, Kreatinin und ALT) unauffällig. Auch wenn die Energieaufnahme nicht beeinträchtigt wurde, könnten die PA-induzierten hepatotoxischen Effekte, die insbesondere in der am höchsten exponierten Gruppe beobachtet wurden, den Energiestoffwechsel deutlich beeinflussen. Allerdings wurden weder Glukose, NEFA und BHB als kurzfristige Stoffwechselindikatoren für den Energiestatus, die Lipolyse bzw. Ketogenese noch Veränderungen im Fettdepot (Abbildung 17) als längerfristiger Indikator für die Lipolyse durch die zunehmende PA/PANO-Exposition beeinflusst.

Die Leber ist das zentrale Stoffwechselorgan und spielt eine entscheidende Rolle beim Stoffwechsel sowohl von Nährstoffen als auch von Xenobiotika (Drackley et al. 2001). Gleichzeitig ist die Leber ein Zielorgan für die toxischen Wirkungen von PA/PANO und deren Metaboliten.

Obwohl mikroskopische Untersuchungen eine Vergrößerung der Hepatozytenkerne zeigten (Abbildung 18, [A]), wurden im Rinderhauptversuch keine Stoffwechselstörung mit möglichem Funktionsverlust, Steatose, Zirrhose und Karzinogenese nachgewiesen, wie in früheren Studien berichtet wurde (Mulder et al. 2016; Johnson 1978; Mattocks 1986; Roeder und Pflueger 1995). Bei den Milchkühen gab es keine histologischen Hinweise auf eine hepatozelluläre Lipidakkumulation oder einen Anstieg der Gesamtlipidkonzentration in der Leber (Abbildung 17, [B]). Auch die makroskopische Beurteilung der Leber ergab keine Veränderungen, fettige oder fibrotische Strukturen oder Anzeichen für eine Hyperbilirubinämie.

Aktivierte PA (Pyrrole) bilden DNA- und Proteinaddukte. Diese Addukte haben eine antimitotische Wirkung, hemmen aber nicht die DNA-Synthese, was zu vergrößerten Zellen und Kernen führt, die auch als Megalozyten bezeichnet werden (Jago 1969; Stegelmeier et al. 1999). Im vorliegenden Rinderhauptversuch wurden diese Megalozyten auch in der Leber beobachtet, wobei die Zellmorphometrie, einschließlich der Fläche der Hepatozytenkerne, in den Gruppen PA/PANO-2 und PA/PANO-3 im Laufe der Zeit deutlich zunahm (Abbildung 18, [A]). Zur Unterstützung dieser morphometrischen Bewertung bestätigte der Wert für die Vergrößerung der Hepatozytenkerne einen Trend zu vergrößerten Kernen in der am stärksten exponierten Gruppe (

Abbildung 19). Eine Vergrößerung und eine Zunahme der Anzahl von vesikulären (euchromatischen) Kernen in Hepatozyten kann im Allgemeinen als Anpassung an physiologische Prozesse auftreten oder durch (sub)toxische Einflüsse verursacht werden.

Der immunologische Leberaktivitäts-Score zeigte keine Gruppeneffekte. Jedoch ist anzumerken, dass nur die höher exponierten Gruppen PA/PANO-2 und PA/PANO-3 einen Anstieg der Immunzellinfiltrationen aufwiesen (

Abbildung 19). Daher kann eine hepatische neutrophile Infiltration, wie bei einer Kuh in Gruppe PA/PANO-3, in Verbindung mit degenerativen Veränderungen in der Leber auftreten (Altamirano et al. 2014; Greuter und Shah 2016).

Darüber hinaus entwickelten die Gruppen PA/PANO-2 und PA/PANO-3 eine Pyknose der Hepatozyten, die mit PA/PANO-Toxizität in Verbindung gebracht wurde (Mattocks 1986). Dieser histologische Befund könnte als Anzeichen für eine beginnende Leberschädigung gewertet werden.

Bei der makroskopischen Untersuchung der Organe wurden keine Veränderungen oder Schäden festgestellt. Der offensichtliche dosisabhängige Anstieg der Gallenblasenfüllung deutet jedoch stark auf einen Zusammenhang mit der PA/PANO-Exposition hin. Eine fehlende Futteraufnahme (24-48 h Futterabstinenz) führt ebenfalls zu einer erhöhten Gallenblasenfüllung bei Kühen, denen neuronale oder hormonelle Reize fehlen, die eine Kontraktion und damit Entleerung der Gallenblase bewirken (Housset et al. 2016). Dies kann in der vorliegenden Studie ausgeschlossen werden, da die Tiere bis zum Ende des Versuchs fressen konnten und keine signifikante Korrelation ( $r=0,169$ ,  $p=0,620$ ,  $r^2=0,029$ ) zwischen der letzten Futteraufnahme und der Gallenmenge besteht. Die ausgeprägte Füllung der Gallenblase in den am stärksten exponierten Gruppen kann auf eine Cholestase hinweisen. Die Cholestase ist gekennzeichnet durch die Zurückhaltung von gallebildenden Substanzen aufgrund einer Störung des Gallenflusses. Die intrahepatische Cholestase, die durch verschiedene Leberverletzungen verursacht wird, stört die Fähigkeit der Hepatozyten, Galle auszuscheiden (Zollner und Trauner 2008). Die Studie von Dickinson et al. (1976) zeigte eine vergrößerte Gallenblase mit großer Mengen an Galle. Da es in der vorliegenden Studie keine Unterschiede im Gewicht der leeren Gallenblase gab, konnte ein Gallenwandödem und/oder eine Hyperproliferation als Erklärung für die Unterschiede im Gewicht der gefüllten Gallenblase ausgeschlossen werden. ALP und insbesondere GGT gelten als Marker der Cholestase (Liu et al. 2012; Puppel und Kuczyńska 2016), die beide in der PA/PANO-3-Gruppe der vorliegenden Studie erhöht waren, was die Annahme einer PA/PANO-induzierten Cholestase stützt.

Die pathologischen Auswirkungen einer PA/PANO-Vergiftung sind hauptsächlich in der Leber und zusätzlich in der Lunge zu beobachten. In einigen Fällen können auch die Nieren und der Magen-Darm-Trakt betroffen sein (Mattocks 1986; Prakash et al. 1999; Huxtable et al. 1996). PA/PANO-Metaboliten, die nicht über die Galle ausgeschieden oder in der Leber gespeichert werden, gelangen in den

systemischen Kreislauf und können zusätzlich zu den hepatotoxischen Wirkungen extrahepatische Schäden verursachen (Roeder und Pflueger 1995). In der vorliegenden Studie an Milchkühen bleibt die klinische Bedeutung der histologischen Befunde in der Lunge unklar. Die Veränderungen in der Gallenblase sollten als Teil eines physiologischen Prozesses betrachtet werden. Die Pustelbildung im Pansenepithel der Gruppen CON<sub>Melasse</sub> und PA/PANO-1 kann durch eine Reizung des Gewebes (z.B. infolge einer Pansenazidose) verursacht werden. Lymphoplasmozytische Infiltrate treten in Verbindung mit Infektionen auf, möglicherweise als Folge einer vorangegangenen Gewebeschädigung oder -reizung. Die Anzeichen von Azidose und Gewebereizung können eine Folge des hohen Kohlenhydratgehalts des verwendeten PA/PANO-Extrakts und der täglich über die Magensonde verabreichten Melasse sein, scheinen aber nicht mit der PA/PANO-Exposition in Zusammenhang zu stehen. Auch die histologischen Befunde in der Niere stehen wahrscheinlich nicht im Zusammenhang mit der PA/PANO-Behandlung. Die histologischen Befunde in Lunge, Gallenblase, Pansen und Nieren sind aufgrund ihrer geringen Häufigkeit wahrscheinlich von geringer klinischer Bedeutung (Baumgärtner und Gruber 2020). Insgesamt hatte eine kurzzeitige Exposition gegenüber PA/PANO über 28 Tage in der vorliegenden Konzentration und Zusammensetzung von PA/PANO keine Auswirkungen auf andere Organe als die Leber. Allerdings könnte eine andere PA/PANO-Quelle oder eine andere Expositionsdauer die Ergebnisse verändern.

Anhand der berechneten  $\alpha$ - und  $\beta$ -Diversität des Pansenmikrobiom, sind sowohl Gruppencluster erkennbar, die zeitunabhängige und damit auch behandlungsunabhängige Unterschiede zwischen den Gruppen indizieren (Abbildung 20; Abbildung 21). Weiterhin sind jeweils Veränderungen über die Zeit erkennbar, die allerdings nicht in Einklang zu bringen sind mit der PA/PANO-Eingabe. Aufgrund der geringgradigen Veränderungen innerhalb der Gruppen, was durch fehlende Signifikanzen der Interaktionen der Einflussfaktoren weiter verdeutlicht wird, und durch die grundlegenden behandlungsunabhängigen Unterschiede zwischen den Gruppen ist davon auszugehen, dass die jeweilige Behandlung in den einzelnen Gruppen keinen direkten oder relevanten Einfluss auf die Diversität hatte. Hierbei ist jedoch nicht auszuschließen, dass einzelne Taxa auf die Behandlung reagiert haben und durch PA gehemmt wurden bzw. durch Energiegewinnung durch einen möglichen PA Abbau gefördert wurden. Dieses muss in weiteren detaillierten bioinformatischen Analysen herausgearbeitet werden.

Anhand ersten Auswertungen der Genomanalyse konnten deutliche additiv-genetische Unterschiede der 16 Kühe aufgezeigt werden, diese sind jedoch nicht der Exposition von PA/PANO zuzuordnen. Dies zeigten die Vergleiche zwischen den Gruppen, da in diesen Vergleichen keine signifikanten oder

dosisabhängigen Effekte zu erkennen waren. Das bedeutet, dass die Tiere individuell auf die Verabreichung von Pyrrolizidinalkaloiden reagieren, diese Reaktion jedoch dosis-unabhängig erfolgt.

Die klinischen, serologischen, pathologischen und histologischen Befunde werden vergleichend für Schafe und Ziegen in Tabelle 17 dargestellt und im folgenden diskutiert.

#### *Klinische Auffälligkeiten*

Während der 28-tägigen Supplementierung traten bei beiden Spezies sowohl in der Kontrollgruppe (Gruppe 1) als auch in der niedrigsten Dosierungsgruppe (Gruppe 2) keine klinischen Symptome auf. Dagegen konnten in den höheren Dosierungsgruppen (Gruppe 3 und Gruppe 4) bei Schafen und Ziegen klinische Auffälligkeiten festgestellt werden.

Zwei Ziegen aus der Gruppe 3 (37 und 38) zeigten von dem 3. bis 9. Versuchstag wiederholt eine verminderte Futteraufnahme nach der PA- Eingabe. Diese Befunde traten nach dem 9. Versuchstag nicht mehr auf, so dass möglicherweise über eine Anpassung des Pansenmikrobioms eine Gewöhnung an die Supplementierung eingetreten ist (Lu et al. 2023). Eine Ziege (47) aus der Gruppe 4 fiel ab dem 5. Versuchstag durch Reduktion von Futteraufnahme und Wiederkauaktivität direkt nach der PA-Eingabe auf. Diese Symptome normalisierten sich innerhalb von 1 bis 2 Stunden. Ab dem 18. Versuchstag verringerte sich zusätzlich die Pansenmotorik, so dass die Supplementierung am 21. Versuchstag abgebrochen wurde. Da die Symptome der Ziegen immer direkt nach der Supplementierung auftraten und nach einer Gewöhnungsphase (37 und 38) bzw. dem Abbruch (47) nicht mehr festgestellt wurden, ist davon auszugehen, dass sie durch die Exposition mit PA/PANO hervorgerufen wurden.

Bei drei Schafen (32, Gruppe 3; 14 und 44, Gruppe 4) wurde die Supplementierung auf Grund von klinischen Befunden (Fieber, reduzierte Futteraufnahme) vorzeitig abgebrochen. Da Schaf 32 und 44 bereits vor Versuchsbeginn durch eine leichte Atemwegserkrankung aufgefallen waren und Schaf 14 sich bei der PA-Eingabe durch stark wehrhaftes Verhalten verschluckt hatte, scheinen ihre Symptome nicht durch die PA-Toxizität, sondern durch Vorschädigung (32, 44) bzw. Aspiration des Extraktes (14) hervorgerufen worden zu sein.

Frühere Studien zeigen, dass bei einer PA/PANO-Vergiftung von kleinen Wiederkäuern Appetitlosigkeit, Mattigkeit, Atemnot, Gewichtsverlust, Reduktion der Pansenmotorik und Absonderung von der Herde auftreten können. Dabei scheinen sich die Symptome bei Ziegen ausgeprägter darzustellen als bei Schafen (Abu Damir et al. 1982), was den Beobachtungen aus der hier vorliegenden Studie entspricht.

### *Serologische Befunde*

Grundsätzlich trat bei den klinisch auffälligen Tiere beider Spezies keine Erhöhung der Leberenzyme auf. Da bei den Schafen alle drei klinisch auffälligen Tiere (32, 14, 44) und bei den Ziegen ein Tier (47) vor dem Versuchsende aus der Supplementierung genommen wurde, lässt sich nicht ausschließen, dass die Leberenzyme bei einer fortgesetzten PA/PANO-Gabe weiter angestiegen wären.

Bei den Schafen wurden serologische Befunde erst in der höchsten Dosierung (Gruppe 4) festgestellt und traten nur bei einem Tier (42) auf. Die Erhöhung der Leberenzymwerte GLDH und GGT bei Schaf 42 stehen vermutlich im Zusammenhang mit der unbeabsichtigten Überdosierung und passen zu den erhöhten PA-Konzentrationen, die bei diesem Tier im Blut an Tag 5 nachgewiesen wurden. Bei den klinisch auffälligen Tieren Schaf 14 und Schaf 32 zeigte die AST jeweils einen leichten Anstieg, der nach Abbruch der Supplementierung wieder zurückging. Es bleibt unklar, ob die Werte bei fortgesetzter PA/PANO-Gabe noch weiter angestiegen wären.

Bei den Ziegen traten im Vergleich zu den Schafen serologische Veränderungen bereits in der niedrigsten Dosisstufe (Gruppe 2) und bei deutlich mehr Tieren (Schafe: 1 Tier, Ziegen: 5 Tiere) auf. Zudem war die Erhöhung der Leberenzymwerte bei den Ziegen wesentlich stärker ausgeprägt als bei den Schafen (Schafe: maximal 8,7-fache Erhöhung der GLDH, Ziegen: maximal 310-fache Erhöhung der GLDH). Dabei war das Ausmaß der Erhöhung unabhängig von der verabreichten Dosis. So zeigte Ziege 35 (Gruppe 3) beispielsweise eine Erhöhung der GLDH um den Faktor 310, während bei der höher dosierten Ziege 45 (Gruppe 4) eine Erhöhung der GLDH um den Faktor 112 gemessen wurde. Diese deutliche tierindividuelle Empfindlichkeit passt zu den Beobachtungen an Rindern, die in verschiedenen Studien (Craig et al. 1991; Johnson 1978) ebenfalls tierindividuelle Reaktionen auf eine PA-Exposition zeigten.

### *Sektion und Histologie*

Während der Sektion konnte nur bei Schaf 42 eine makroskopische Veränderung der Leber festgestellt werden. Auf Grund des brüchigen, aufgehellten Parenchyms wurde der Verdacht auf hepatische Lipidose geäußert. Derartige Veränderungen können im Zusammenhang mit einer toxischen Gewebeschädigung auftreten (Hafner-Marx et al. 2006) und passen daher gut zu den serologischen Befunden bei diesem Schaf. Allerdings konnte der makroskopische Befund nicht histologisch bestätigt werden. Diese Diskrepanz lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass die beschriebenen Befunde

nur 10% des Lebergewebes betrafen und histologisch möglicherweise ein unverändertes Gewebestück untersucht wurde. Histologisch konnten bei fast allen Schafen sowie bei 9 der 16 Ziegen unabhängig von der verabreichten Dosis unspezifische entzündliche Reaktionen nachgewiesen werden. Die beobachteten Veränderungen treten infolge verschiedener chronischer Prozesse in der Leber auf und sind überwiegend unspezifische Reaktionen (Reparationsvorgänge) des Lebergewebes (Hafner-Marx et al. 2006). Da diese Befunde bei beiden Spezies sowohl in der Kontrollgruppe als auch in allen Versuchsgruppen auftraten, lässt sich kein Zusammenhang zur PA-Supplementierung herstellen. Es ist dagegen eher wahrscheinlich, dass sie durch die endoparasitäre Vorbelastung aller Tiere hervorgerufen wurden.

Bei den Ziegen konnten zusätzlich zu den bereits beschriebenen unspezifischen Befunden weitere Veränderungen festgestellt werden. Obwohl in keiner Gruppe makroskopische Veränderungen an der Leber auftraten, wurden histologisch bei jeweils 2 Tieren aus jeder Dosierungsgruppe Gewebeveränderungen (Einzelzellnekrosen) nachgewiesen. Weiterhin wurde bei insgesamt vier Tieren aus den beiden höchst dotierten Gruppen eine Vergrößerung der Milz (Splenomegalie) diagnostiziert. Diese beschriebenen Veränderungen an Leber und Milz können im Zusammenhang mit Intoxikationen auftreten (Ribeiro et al. 2024; Elgerwi et al. 1999). Da diese Befunde ausschließlich bei den Versuchsgruppen und nicht in der Kontrollgruppe auftraten, könnte ein Zusammenhang zur PA Supplementierung bestehen.

Bei den vorzeitig aus dem Versuch genommenen Tieren beider Spezies (Schaf 14, 32 und 44) sowie Ziege 47 konnten keine pathologisch-anatomischen Veränderungen festgestellt werden, die mit ihren klinischen Befunden im Zusammenhang standen. Es ist allerdings möglich, dass eventuelle Befunde reversibel und durch den zeitlichen Abstand zwischen Abbruch der Supplementierung und Euthanasie sowie durch die erfolgreiche Behandlung makroskopisch nicht mehr darstellbar waren.

### ***Zusammenfassung***

Sowohl bei den Schafen als auch bei den Ziegen konnte kein Zusammenhang zwischen klinischen Auffälligkeiten und serologischen Befunden festgestellt werden. Dabei bleibt allerdings fraglich, ob die Serumwerte bei den vorzeitig aus der Supplementierung ausgeschlossenen Tiere noch weiter angestiegen wären. Bei einem Schaf sowie bei insgesamt fünf Ziegen zeigte sich eine deutliche Korrelation von serologischen und pathologischen Befunden, allerdings kamen histologische Befunde an der Leber bei einer Ziege auch ohne passende serologische Auffälligkeiten vor. Grundsätzlich traten bei den Ziegen im Vergleich zu den Schafen deutlich mehr serologische und histologische Befunde auf, die für eine Schädigung des Lebergewebes spezifisch sind und mit einer PA/PANO-Exposition in Zusammenhang stehen können (Fu et al. 2017; Goeger et al. 1982). Besonders hervorzuheben ist, dass bei beiden Spezies eine tierindividuelle Empfindlichkeit gegenüber den verabreichten PA/PANO festgestellt wurde. Dies wurde bei den Ziegen besonders deutlich, da bei dieser Spezies in jeder Dosierungsgruppe bei einzelnen Tieren spezifische, auf die PA-Supplementierung zurückzuführende Symptome auftraten, während andere Tiere der selben Dosierungsgruppe unauffällig blieben. Insgesamt bestätigen die Ergebnisse dieser Studie die Beobachtungen aus der Literatur, dass Schafe unempfindlicher auf eine PA-Exposition reagieren als Ziegen (Sharrow und Mosher 1982; Abu Damir et al. 1982). Bei der Ableitung von Handlungsempfehlungen sollte allerdings beachtet werden, dass die Supplementierungsdauer von 28 Tagen keine Langzeitexposition darstellt und typische PA-induzierte serologische und histologische Befunde auch bei einem klinisch völlig unauffälligen Schaf nachgewiesen werden konnten. Daher sollte von einer unkritischen Verfütterung von PA-haltigen Pflanzen an Schafe aus Tierschutzgründen abgesehen werden.

Tabelle 17: Vergleich der histologischen, serologischen, pathologischen und klinischen Befunde bei Schafen und Ziegen

Gruppe	Tier	Klinik	Schafe		
			Serologie	Pathologie	Histologie
2	21	-	-	-	-
	22	-	-	-	-
	23	-	-	-	-
	24	-	-	-	-
	31	-	-	-	-
3	32	+ (d17)	-	-	-
	33	-	-	-	-
	34	-	-	-	-
4	41	-	-	-	-
	42	-	+ (GLDH d7, GGT d10)	Leber +	-
	14	+ (d10)	-	-	-
	44	+ (ab d7, Abbruch d22)	-	-	-

Gruppe	Tier	Klinik	Ziegen		
			Serologie	Pathologie	Histologie
2	25	-	-	-	-
	26	-	-	-	-
	27	-	+ (GGT d28, GLDH	-	Leber +
	28	-	+ (GGT, GLDH d21)	-	Leber +
	35	-	+ (AST, GLDH d28)	Milz +	Leber +
3	36	-	-	-	Leber +
	37	+ (d3-9)	-	-	-
	38	+ (d3-9)	-	-	-
4	45	-	+ (AST, GGT, GLDH	Milz +	Leber +
	46	-	+ (GLDH d 28)	Milz +	Leber +
	47	+ (ab d5)	-	Milz +	-
	48	-	-	-	-

**Klinik:** (-) keine klinischen Befunde im Verlauf der Supplementierung, (+) klinische Befunde im Verlauf der Supplementierung; **Serologie:** - = kein Anstieg der Leberenzyme über den 2-fachen Ausgangswert, + = Erhöhung der Leberenzyme über den 2-fachen Ausgangswert, in Klammern Angabe der Leberenzyme und Tag des ersten Nachweisen einer Erhöhung; **Pathologie:** Hinweis auf toxische Schädigung mit Angabe des auffälligen Organs; **Histologie Leber:** - = kein Hinweis auf toxische Leberzellschäden, + = Hinweis auf toxische Leberzellschäden

### 5.3. Transfer in die tierischen Produkte

#### 5.3.1. Transfer in die Milch

Die im Rahmen des PA-SAFE-Projekts erzielten Ergebnisse zum Transfer von PA/PANO in Milch zeigen, dass Jacolin (Jl), Jaconin (Jn) und Jacobin (Jb) die Hauptanalyten in Kuh-, Schaf- und Ziegenmilch waren (Tabelle 18). Die jeweiligen N-Oxide dieser PAs waren nur in sehr geringen Mengen (1-2%) nachweisbar. Zusammen mit ihren N-Oxiden machten diese PAs ca. 97 % der PA-Fracht aus, wobei

Jacolin-total (PA+PANO) mit 75-77 % (Rind, Schaf) den größten Anteil ausmachte und in Ziegenmilch sogar 87 %. Andere PAs, die ebenfalls über den Extrakt verabreicht wurden, waren nur in Spuren nachweisbar. Eine Ausnahme bildete Senkirkin, das in der Milch von Rindern in höheren Anteilen nachgewiesen wurde als im verabreichten Extrakt. Hier ist anzumerken, dass Senkirkin ein *minores* PA des Jakobskreuzkrauts ist und daher auch nur in geringen Mengen appliziert wurde. In solchen Fällen ist bei der Bestimmung der Transferparameter mit größeren Schwankungen zu rechnen. Es ist auch möglich, dass Senkirkin in geringen Mengen metabolisch gebildet wird. Die im Pansen gebildeten gesättigten Metaboliten (Abbildung 70) waren in der Milch nicht nachweisbar.

Tabelle 18: PA/PANO Zusammensetzung in Prozent der Milch der untersuchten Wiederkäuer

Spezies	Jl	JlNO	Jn	JnNO	Jb	JbNO	andere
Rind	74	1	11	1	7	3	<3
Schaf	76	1	13	<1	8	2	<1
Ziege	85	2	5	<1	6	<1	<2

Generell ist festzustellen, dass Kuh-, Schaf- und Ziegenmilch ein sehr ähnliches PA-Profil aufweisen (Tabelle 18) und die PA-Profile der Milch wiederum eine große Ähnlichkeit mit denen von Fleisch und Leber aufweisen (Abbildung 83). Vergleicht man die PA/PANO-Zusammensetzung des Extrakts und der Milch, ist festzustellen, dass ein sehr selektiver Transfer in Lebensmittel tierischer Herkunft – sowohl Milch als auch Fleisch und Leber - stattfindet. PA/PANO durchlaufen von der Aufnahme des PA/PANO-haltigen Pflanzenmaterials bis zum Übergang in die Milch eine Reihe von Stoffwechselprozessen, wobei sie hauptsächlich im Pansen und in der Leber metabolisiert werden. Die Halbwertszeiten, die mittels Batch culture Inkubation mit Pansenchymus ermittelt wurden, sind in Abbildung 71 dargestellt. Es zeigte sich, dass Jacolin und Senkirkin beim Rind die höchste Stabilität im Pansen aufwiesen, gefolgt von Jaconin und Jacobin, während z.B. Seneciphyllin und Senecionin sehr schnell verstoffwechselt wurden. Diese *in vitro* ermittelten Daten decken sich gut mit den *in vivo* Daten der hier durchgeführten Transferstudie (Abbildung 72). Interessanterweise wiesen die hepatischen Abbauraten der einzelnen PAs, die durch *in vitro* Inkubation mit Lebermikrosomen ermittelt wurden, eine gewisse Kongruenz mit denen des Pansenmetabolismus auf. (Abbildung 74). Während Jacolin und Senkirkin bei Ratte, Mensch und Rind den geringsten Abbau aufwiesen, wurden Seneciphyllin und Senecionin vergleichsweise schnell metabolisiert. Dies spricht dafür, dass bestimmte Strukturelemente Voraussetzung sind, einen mikrobiellen Abbau zu ermöglichen, während andere diesen verhindern bzw. verlangsamen. Nach dem hepatischen Metabolismus gelangen die PA/PANO in das Blut und von

dort gehen sie in die Milch über. In Abbildung 81 ist für jede Tierart (höchste Dosisgruppe) das PA-Profil im Blut (6 h nach Verabreichung) und in der Milch vergleichend dargestellt.

Für die drei Spezies wurde keine Abhängigkeit der Transferrate von der applizierten PA-Dosis beobachtet, so dass die mittleren Transferraten aus den drei Dosisgruppen berechnet und in Tabelle 19 zusammengefasst wurden.

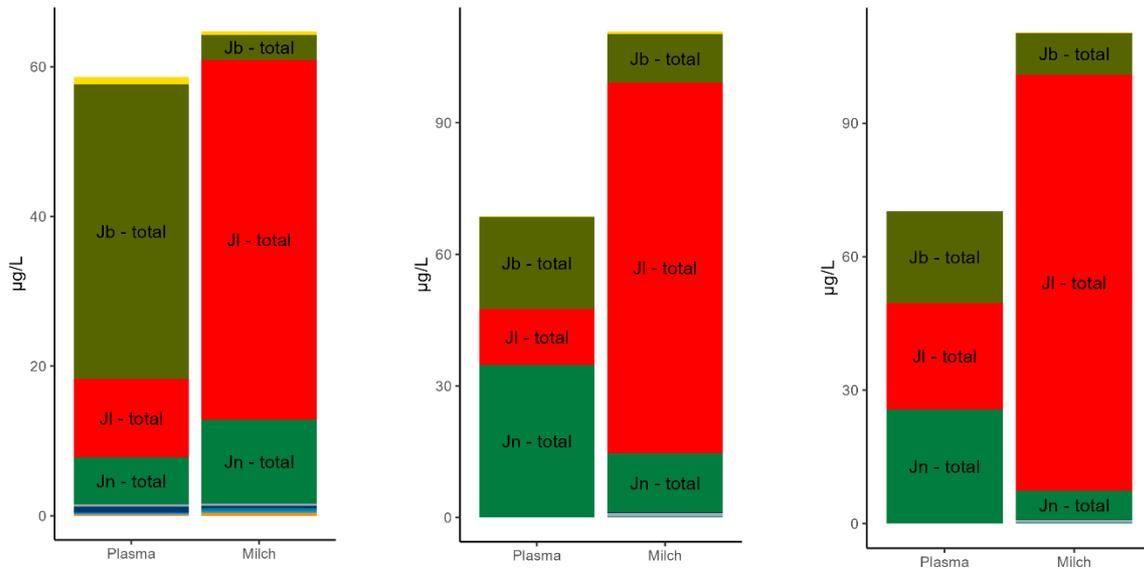


Abbildung 81: Vergleichende Darstellung der PA-Profile im Plasma (6 h nach Gabe) und in der Milch der Tiere in der höchsten Dosisgruppe: Rinder (links), Schafe (mitte), Ziegen (rechts). Hierbei sind Jb-total (Summe aus Jacobin + N-Oxid), JI-total (Summe aus Jacolin + N-Oxid), Jn-total (Summe aus Jaconin + N-Oxid).

Tabelle 19: Ermittelte Transferraten [%] der PAs in Kuh-, Ziegen- und Schafsmilch dargestellt als PA-Total (Summe des jeweiligen PAs und PANOs) geordnet von der höchsten zu kleinsten TR in die Kuhmilch

PA	Kuh	Schaf	Ziege
Gesamt-PA	0,064	0,032	0,125
Jl-total	1,126	0,702	1,886
Sk	0,303	<0,004*	<0,015*
Jb-total	0,076	0,015	0,107
Jn-total	0,019	0,017	0,016
Re-total	0,006	0,005	0,025
Rd-total	0,003	0,001	0,007
Sc-total	0,002	0,0004	0,002
Er-total	0,001	0,001	0,002
Sp-total	0,001	0,0002	0,001

\*Sk wurde zwar appliziert, war in der Milch aber in keinem Fall nachweisbar, bei fehlendem Nachweis von PA/PANO bei Einzeltieren Verwendung des LOD der Methode zur Schätzung der maximalen Transferrate.\*

Daraus wird ersichtlich, dass die Transferrelevanz der einzelnen *Senecio*-PAs unterschiedlich ist. Diese Unterschiede haben zur Folge, dass je nach gefressener Kreuzkrautart unterschiedliche Gehalte an Gesamt-PA (Summe der einzelnen Kongenere) in die Milch übergehen. Je nachdem, ob die jeweilige Kreuzkrautart hohe Anteile dieser transferrelevanten PAs bildet oder nicht, wird die Milch bei Aufnahme gleicher Mengen verschiedener Kreuzkrautarten unterschiedliche Gesamt-PA-Gehalte aufweisen (wird weiter unten diskutiert).

In der Literatur werden zwei Transferstudien beschrieben, in denen Milchkühen verschiedene *Senecio*-Arten oral (über eine Schlundsonde) verabreicht wurden und Transferraten für die einzelnen PAs (total) bzw. deren Summen als Gesamt-PA-Gehalt berechnet werden konnten (Hoogenboom et al. 2011; Mulder et al. 2020).

Tabelle 20: Darstellung der in der Literatur veröffentlichten Transferraten sowie der im vorliegenden Projekt erzielten Transferraten für die in den Senecio Arten vorkommenden PAs (hier Total als Summe aus freier Base und N-Oxid)

PA (total)	Transferrate % <sup>1</sup>	Transferrate % <sup>2</sup>	Transferrate % <sup>3</sup>	PA-SAFE-FEED Rinder
Jacolin	3,914	1,354	-	1,126
Senkirkin	1,000	0,116	-	0,303
Jaconin	0,150	0,010	-	0,019
Jacobin**	0,015	0,033	-	0,076
Seneciphyllin**	< 0,152*	< 0,074*	0,004	0,001
Riddelliin	< 0,083*	< 0,039*	< 0,030*	0,003
Retrorsin**	< 0,025*	0,003	0,002	0,006
Senecionin**	< 0,015*	0,003	0,001	0,002
Erucifolin	<0,004*	0,080		0,001

1) Berechnet aus Hoogenboom et al. 2011 bei Applikation einer Mischung aus *Senecio jacobaea* und *Senecio inaequidens*, 2) Berechnet aus Mulder et al. 2020 bei Applikation einer Mischung aus *Senecio jacobaea* und *Senecio inaequidens*, 3) Berechnet aus Mulder et al. 2020 bei Applikation von *Senecio vulgare*.

\* PA wurde zwar über die Pflanze verabreicht, waren aber in der Milch nicht mehr nachweisbar. Auf Basis des in der Publikation angegebenen LOQs wurde der maximale Transfer zur Orientierung berechnet; \*\* Isomere PAs wurden aufsummiert; - keine Bestimmung, da PA nicht in von der applizierten Spezies gebildet wird

Eine Zusammenfassung der Durchführung der Studien ist in Kapitel 2 beschrieben. Die in den Studien ermittelten Transferraten sind in Tabelle 20 zusammengefasst und mit den im PA-SAFE-Projekt ermittelten Daten verglichen. Die Daten zeigen eine sehr gute Übereinstimmung. Auffällig sind die unterschiedlichen Transferraten für Jacolin, die Hoogenboom et al (2011) im Vergleich zu Mulder et al (2020) unter Verwendung der gleichen Kreuzkraut-Charge erzielt hat. Hier ist aber anzumerken, dass die Gabe bei Hoogenboom zweimal täglich, bei Mulder einmal täglich erfolgte und die Tiere sich auch in der Milchleistung unterschieden (40 L vs 31 L). Auf Grund der eigenen Beobachtungen sind auch tierindividuelle Unterschiede in Betracht zu ziehen.

Um abzuschätzen, wie hoch der Übergang von PA/PANO in die Milch wäre, wenn Milchkühe anderen Kreuzkrautarten ausgesetzt wären, wurden die in der PA-SAFE Studie ermittelten Transferraten (Tabelle 20) mit den PA/PANO-Gehalten und -Profilen der relevanten Kreuzkrautarten kombiniert (Tabelle 16). Die Daten deuten darauf hin, dass Rinder etwa die 40-fache Menge an *Senecio aquaticus*, die 20-fache Menge an *Senecio vulgaris* bzw. die doppelte Menge an *Senecio vernalis* fressen müssten, um vergleichbare PA/PANO-Konzentrationen in der Milch zu erreichen, wie nach Aufnahme von Jakobskreuzkraut.

Tabelle 21: Abschätzung der erwartbaren PA-Konzentration [ $\mu\text{g/L}$ ] in der Milch auf Basis der im PA-SAFE-FEED Projekt bestimmten Transferraten für Rinder. Die Abschätzung erfolgte unter der Annahme, dass die Kuh 1 kg der jeweiligen *Senecio* Art-mit den angegebenen PA-Gehalten frisst (Tabelle 16) und am Tag durchschnittlich 33 L Milch gibt

PA (total)	Transferrate %	Konzentration Pflanze/Milch	<i>Senecio aquaticus</i>	<i>Senecio vulgaris</i>	<i>Senecio vernalis</i>	<i>Senecio jacobaea</i>
Jacolin	1,126	C <sub>Pflanze</sub> [mg/kg]	/	/	/	88
		C <sub>Milch</sub> [ $\mu\text{g/L}$ ]	/	/	/	30
Senkirkin	0,303	C <sub>Pflanze</sub> [mg/kg]	2,73	/	260	30
		C <sub>Milch</sub> [ $\mu\text{g/L}$ ]	0,25	/	23,9	2,8
Jaconin	0,019	C <sub>Pflanze</sub> [mg/kg]	/	/	/	16
		C <sub>Milch</sub> [ $\mu\text{g/L}$ ]	/	/	/	0,09
Jacobin	0,076	C <sub>Pflanze</sub> [mg/kg]	/	/	/	409
		C <sub>Milch</sub> [ $\mu\text{g/L}$ ]	/	/	/	9,4
Retrorsin	0,006	C <sub>Pflanze</sub> [mg/kg]	42	442	222	59
		C <sub>Milch</sub> [ $\mu\text{g/L}$ ]	0,1	0,8	0,4	0,1
Seneciphyllin	0,001	C <sub>Pflanze</sub> [mg/kg]	11	3700	600	135
		C <sub>Milch</sub> [ $\mu\text{g/L}$ ]	/	0,1	0,22	0,04
Senecionin	0,002	C <sub>Pflanze</sub> [mg/kg]	40	631	3855	125
		C <sub>Milch</sub> [ $\mu\text{g/L}$ ]	0,02	0,38	2,34	0,08
Erucifolin	0,001	C <sub>Pflanze</sub> [mg/kg]	1017	/	7	220
		C <sub>Milch</sub> [ $\mu\text{g/L}$ ]	0,31	/	/	0,07
Riddelliin	0,003	C <sub>Pflanze</sub> [mg/kg]	/	18	/	39
		C <sub>Milch</sub> [ $\mu\text{g/L}$ ]	/	0,02	/	0,04
<b>Gesamt-PA</b>		<b>C<sub>Pflanze</sub> [mg/kg]</b>	<b>1114</b>	<b>1460</b>	<b>4945</b>	<b>1121</b>
		<b>C<sub>Milch</sub> [<math>\mu\text{g/L}</math>]</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>27</b>	<b>43</b>

Der Transferversuch mit Kühen, denen einmal täglich PA verabreicht wurde, zeigte einen großen Konzentrationsunterschied zwischen Morgen- und Abendmelk (Abbildung 40). Dieser Konzentrationsunterschied wurde auch in der Studie von Hoogenboom et al. (2011) beobachtet. Auch im Rahmen des PA-SAFE-Feed-Projektes war dieser Effekt bei kleinen Wiederkäuern zu beobachten (Abbildung 44), wo der zeitliche Abstand zur letzten Supplementierung bei der Abendmelkzeit 9 h und bei der Morgenmelkzeit 13 h betrug. Trotz der nur geringfügigen Unterscheide bezüglich der Zet

zwischen Exposition und Melken wurden bei kürzerem Intervall höhere Konzentrationen gefunden. In Abbildung 82 ist der zeitliche Verlauf der PA-Konzentration (hier Daten aus der Kinetikstudie: Summe Retrorsin und dessen N-Oxid) in der Milch für die drei Tierarten gemeinsam dargestellt. Die Daten zeigen am Beispiel von Retrorsin/Retrorsin-NO, dass nach Exposition der Tiere, PAs eine schnelle Abnahme der Konzentration aufweisen und es keinen Hinweis auf Akkumulation gibt (vergleichbar zur Muskulatur).

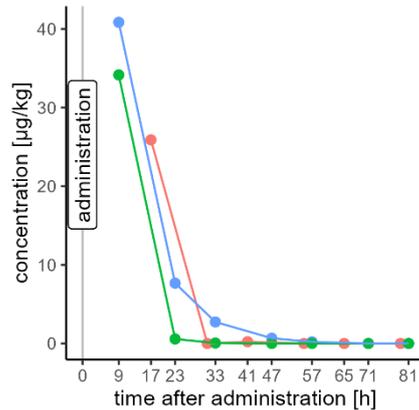


Abbildung 82: Zeitlicher Verlauf der PA Konzentration in der Milch der Wiederkäuer nach einmaliger oraler PA-Exposition (Kinetikstudie). Rot: Rind, Grün: Ziege, Blau: Schaf

Zu beachten ist, dass sich die hier gezogenen Schlüsse bei Verwendung anderer Pflanzenarten nur auf die diskutierten Transferdaten beziehen. Mögliche Auswirkungen auf die Tiergesundheit können bei gleicher Dosis schwächer oder stärker sein. Zwar wird für verschieden PAs zurzeit noch Äquipotenz angenommen, jedoch gibt es auch Ansätze die Potenz der verschiedenen Kongenere auf Grund von Laborergebnissen unterschiedlich einzustufen (Merz und Schrenk 2016). In diesem Fall wäre zur Abschätzung der tiergesundheitlichen Auswirkungen nicht nur der gesamte aufgenommenen PA-Gehalt, sondern auch die Zusammensetzung von großer Bedeutung.

### 5.3.2. Transfer in das Fleisch

Das Muskelfleisch von Schafen und Ziegen wies zwar einen höheren Anteil an Jacolin auf, aber dieser Unterschied ist vermutlich durch den zeitlichen Versatz der Schlachtzeiten zu erklären (wird noch nachfolgend erläutert). Die gemessenen PA-Konzentrationen im Fleisch der Tiere lagen für die jeweiligen Dosisgruppen in einem vergleichbaren Konzentrationsbereich (Abbildung 83).

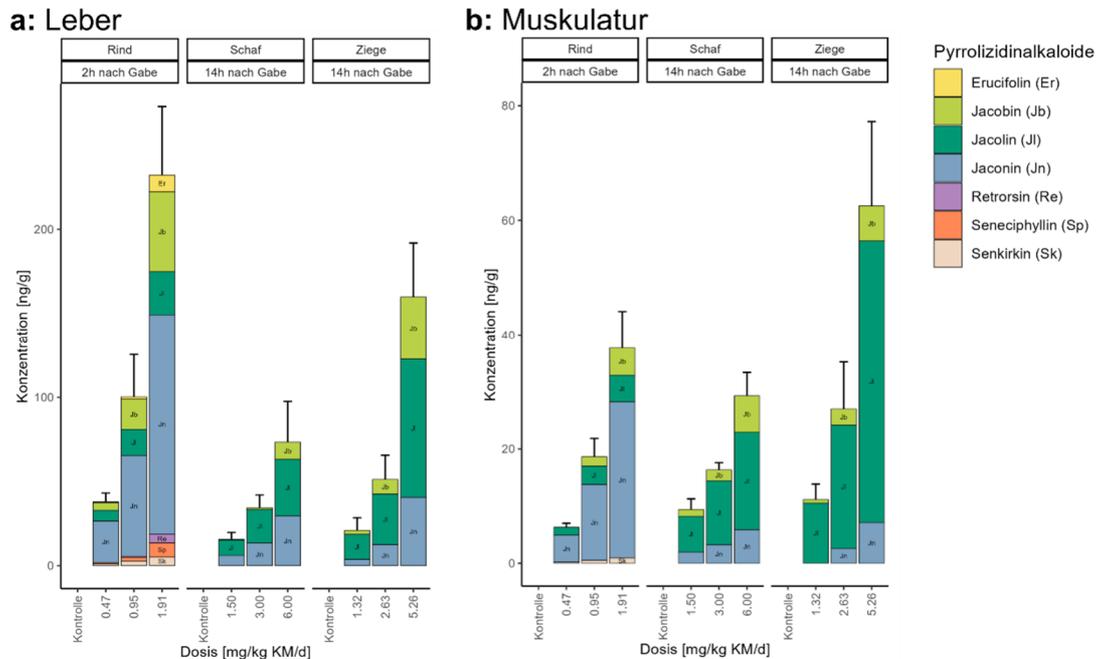


Abbildung 83: Mittlere PA-Gehalte [ng/g Frischgewicht] in a) Leber- und b) Muskelgewebe von Milchkühen (links), Ziegen (Mitte) und Schafen (rechts) je Dosis- und Kontrollgruppe. Die Fehlerbalken sind als Standardabweichungen der Summen der detektierten PAs der vier Tiere pro Dosisgruppe berechnet. Die Zusammensetzung des applizierten Extraktes ist in Tabelle 7 dargestellt.

Vor dem Hintergrund, dass Ziege und Schaf zwar einen um den Faktor zwei höhere Tagesdosis erhielten, diese aber auf zwei Dosen verteilt (nur eine einmalige Gabe pro Tag beim Rind) waren die vor der Tötung applizierten Dosen zwischen den Spezies vergleichbar, sodass das vergleichbare PA-Profil bzw. die vergleichbaren PA Konzentrationen im Fleisch darauf schließen lassen, dass sehr ähnliche Transformationsprozesse und vergleichbare Kinetiken in den getesteten Wiederkäuern ablaufen.

Bezüglich der Auswaschrates (clearance) der PAs aus dem Fleisch und aus den Lebern der Tiere legen die vorliegenden Daten nahe, dass die berechneten Transferparameter sehr stark von der zeitlichen Differenz zwischen der letzten Exposition und der Schlachtung der Tiere abhängen. In Abbildung 84 sind die PA-Gehalte in Muskelfleisch und Lebern von Tieren aus den Transferstudien und der vorangegangenen Dosisfindungsstudie in Abhängigkeit von der zeitlichen Differenz zwischen letzter PA-

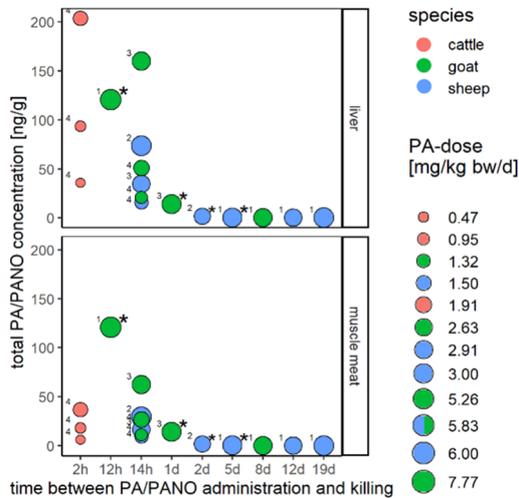


Abbildung 84: Ermittelte Gesamt-PA-Gehalte [ng/g] in Leber (oben) und Muskel (unten) bei Milchkühen (rote Punkte), Ziegen (grüne Punkte) und Schafen (blaue Punkte) in Abhängigkeit von der Zeitdifferenz zwischen letzter Verabreichung und Tötung. Zusätzlich sind die Daten aus der Dosisfindungsstudie für Schafe und Ziegen dargestellt und mit "\*" gekennzeichnet. Die hochgestellte Zahl gibt die Anzahl der Tiere an, von denen die Daten stammen.

erreicht ist) zu berechnen (Krause et al. 2023). Diese Transferparameter wurden für Gesamt-PA und die einzelnen PAs im Muskelfleisch und Lebergewebe von Milchvieh, Ziege und Schaf berechnet und sind in Tabelle 22 aufgeführt. Für PAs, die verabreicht wurden, aber im Gewebe nicht mehr nachweisbar sind, wurde deren LODs verwendet, um den Maximalwert des jeweiligen Transferparameters abzuschätzen.

Gabe und Tötung aufgeführt. Diese Daten zeigen, dass es A) keinen Hinweis darauf gibt, dass PAs im Fleisch bzw. in den Lebern der Tiere bioakkumulieren und B), dass ca. 48 h nach letzter Aufnahme die Gewebe praktisch PA frei sind (<LOD).

Zur Einordnung des Transfers wurden die Daten genutzt, um Transferfaktoren (TF, Verhältnis der Konzentration einer Verbindung in einem tierischen Produkt zur Konzentration der Verbindung in Tierfutter) und Biotransferfaktoren (BTF, Verhältnis von Steady-State Konzentration des Anayten im tierischen Gewebe und im Futter) und Übertragungsraten (TR, täglicher Anteil einer Verbindung, der beispielsweise über die Milch ausgeschieden wird, geteilt durch die tägliche Aufnahme mit der Nahrung, wenn der Steady State

Tabelle 22: Ermittelte Transferparameter wie die Transferrate (TR), der Transferfaktor (TF) und der Biotransferfaktor (BTF) für Leber und Muskel von Kuh, Ziege und Schaf. Zusätzlich zu Gesamt-PA wurden Einzelwerte für Jacolin (Jl), Jacobin (Jb), Jaconin (Jn) und Senkirkin (Sk) berechnet. Für diejenigen PA, die zwar verabreicht wurden, aber in Muskeln bzw. Leber nicht nachweisbar waren, wie Retrorsin (Re), Erucifolin (Er), Senecionin (Sc) und Seneciphyllin (Sp), wurden die LODs der analytischen Methode verwendet, um die maximalen Transferwerte zu schätzen (in grau).

	PA	Muskel			Leber		
		TR [%]	TF	BTF [d/kg]	TR [%]	TF	BTF [d/kg]
Kuh <sup>a</sup>	Gesamt-PA	0.62	0.00049	0.00003	0.16	0.00291	0.00016
	Sk	6.90	0.00539	0.00030	1.87	0.03312	0.00179
	Jl	2.52	0.00195	0.00011	0.55	0.00953	0.00052
	Jn	1.11	0.00088	0.00005	0.24	0.00422	0.00023
	Re	<0.87	<0.00075	<0.00004	0.04	0.00075	0.00004
	Jb	0.59	0.00045	0.00002	0.33	0.00586	0.00032
	Er	<0.32	<0.00027	<0.00001	0.03	0.00065	0.00003
	Sc	<0.29	<0.00025	<0.00001	<0.01	<0.00024	<0.00001
	Sp	<0.24	<0.00021	<0.00001	0.03	0.00051	0.00003
Ziege <sup>b</sup>	Gesamt-PA	0.35	0.00091	0.00018	0.04	0.00192	0.00038
	Jl	6.06	0.01575	0.00317	0.44	0.02337	0.00467
	Sk	<1.34	<0.00348	<0.00060	<0.10	<0.00581	<0.00101
	Re	<1.06	<0.00275	<0.00048	<0.05	<0.00275	<0.00048
	Jb	0.54	0.00140	0.00028	0.11	0.00602	0.00120
	Er	<0.38	<0.00098	<0.00017	<0.02	<0.00098	<0.00017
	Sc	<0.34	<0.00089	<0.00015	<0.02	<0.00089	<0.00015
	Sp	<0.27	<0.00071	<0.00012	<0.01	<0.00071	<0.00012
	Jn	0.05	0.00014	0.00003	0.02	0.00092	0.00018
Schaf <sup>b</sup>	Gesamt-PA	0.11	0.00043	0.00007	0.01	0.00084	0.00013
	Jl	1.99	0.00797	0.00121	0.17	0.01312	0.00200
	Re	<0.63	<0.00251	<0.00039	<0.03	<0.00251	<0.00039
	Sk	<0.45	<0.00181	<0.00028	<0.03	<0.00301	<0.00046
	Sc	<0.18	<0.00072	<0.00011	<0.01	<0.00072	<0.00011
	Er	<0.17	<0.00063	<0.00010	<0.01	<0.00063	<0.00010
	Sp	<0.16	<0.00062	<0.00010	<0.01	<0.00062	<0.00010
	Jn	0.10	0.00038	0.00006	0.02	0.00135	0.00021
	Jb	0.08	0.00030	0.00005	0.00	0.00024	0.00004

Tiere wurde a) 2h and b) 14h nach letzter PA-Gabe getötet.

## 6. Nutzen und zur Verwertbarkeit der Ergebnisse

Die im Projekt erzielten Ergebnisse liefern eine Datengrundlage, auf deren Basis verantwortliche Behörden ableiten können, ob PA/PANO-Gehalte in Futtermitteln, unter Berücksichtigung tierartenspezifischer Unterschiede tolerabel sind oder nicht. Die Ableitung von Orientierungswerten für PA/PANO in Futtermitteln, bei deren Einhaltung das Risiko sowohl für die Tiergesundheit als auch für die menschliche Gesundheit durch den Transfer der PA/PANO in das tierische Produkt gering ist, könnte dazu beitragen das Vertrauen in landwirtschaftliche Produkte zu stärken, die unter ökologischen Bedingungen produziert wurden, d.h. mit artenreichem Grünland.

Die *in vitro* und *in vivo* erzielten Projektergebnisse tragen zu einem vertieften Verständnis der Metabolisierung von PA/PANO in den Tierarten Schaf, Ziege und Rind bei. Die umfassende Erhebung von tiergesundheitslichen Daten bei Schafen, Ziegen und Kühen während der Transferstudien wird es ermöglichen, die Auswirkungen einer PA/PANO-Exposition bei verschiedenen PA-Dosierungen besser abzuschätzen und möglicherweise Dosis-Wirkungs-Beziehungen abzuleiten. In Kombination mit den ermittelten PA/PANO-Transferdaten in Milch und Fleisch hat sich die Datenlage zur Bewertbarkeit einer PA/PANO-Kontamination in Futtermitteln deutlich verbessert

Darüber hinaus wurden im Rahmen des Projektes zahlreiche analytische Methoden zur Bestimmung von PA/PANO in verschiedenen Matrices erfolgreich entwickelt. Diese wurden in Peer-Review-Publikationen veröffentlicht und stehen somit der breiten Öffentlichkeit und der Forschung zur Verfügung, insbesondere durch Open-Access-Zugang.

## 7. Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich Ziele

Im Rahmen des Projektes wurden verschiedene Ziele formuliert, die im Laufe des Vorhabens teilweise erreicht und in einigen Aspekten sogar übertroffen wurden. Im Folgenden werden die geplanten Ziele den tatsächlich erreichten Ergebnissen gegenübergestellt.

Die Ziele bezogen sich u.a. auf die Entwicklung von Strategien zur Verbesserung der Tiergesundheit und des Tierwohls, insbesondere zur Gewährleistung einer tiergerechten Weidehaltung nach ökologischen Anforderungen. Durch die gewonnenen Erkenntnisse könnte eine grobe Abschätzung vorgenommen werden, bei welcher Besatzdichte mit Pflanzen wie Jakobskreuzkraut auf einer Weide eine tiergerechte Haltung noch möglich ist. Dies unterstützt die praktische Umsetzung der ökologischem Weidehaltung. Die im Projekt generierten Daten können eine Grundlage zur Ableitung von Handlungsempfehlungen für den Umgang mit Weiden mit Kreuzkrautbesatz bzw. mit kontaminiertem Futter sein.

Im Hinblick auf die Qualität tierischer Produkte und die Erwartungen der Verbraucher an die Lebensmittelsicherheit konnte das Projekt zeigen, dass der Übergang von PA/PANO in tierische Lebensmittel wie Milch und Fleisch gering und selektiv ist und somit die Erwartungen erfüllt werden.

Die Untersuchungen zur Kinetik und Metabolisierung von PA/PANO in den untersuchten Wiederkäuern wurde erfolgreich erreicht. In vitro-Experimente führten zur Identifizierung von Pansen-Metaboliten, die in vivo bestätigt wurden. Der Kinetikversuch ermöglichten es, den Verbleib von PA/PANO und deren Metaboliten in den Tieren zu verfolgen bzw. zu beschreiben.

Zusammengefasst lässt sich feststellen, dass die meisten der formulierten Ziele im Projekt erreicht wurden und die gewonnenen Erkenntnisse wertvolle Beiträge zur Verbesserung der Tiergesundheit, der Qualität tierischer Produkte und zur Entwicklung von Handlungsempfehlungen im ökologischen Landbau leisten.

## 8. Zusammenfassung

Im Rahmen des PA-SAFE-FEED-Projektes wurde eine 28-tägige Fütterungsstudie mit laktierenden Rindern, Schafen und Ziegen durchgeführt, bei der jeweils drei Dosisstufen eines Extraktes aus Jakobskreuzkraut oral verabreicht wurden (einschließlich mindestens einer Kontrollgruppe). Die Tiere wurden hinsichtlich ihrer Leistungs- und Gesundheitsparameter untersucht, wobei leberassoziierte Parameter wie die Leberenzyme im Blut als toxikologische Endpunkte bei allen drei Tierarten identifiziert wurden. Darüber hinaus wurden die Gehalte an Pyrrolizidinalkaloiden (PA) und deren N-Oxiden (PANO) u.a. in Milch und Fleisch als Lebensmittel tierischen Ursprungs quantifiziert. Auf Grundlage dieser Daten wurden die Transferparameter sowohl für Gesamt-PA/PANO als auch für die einzelnen Senecio-PAs bestimmt. Es zeigte sich, dass ein geringer und selektiver Transfer in tierische Produkte stattfindet und dass die Höhe des Transfers maßgeblich von Jacolin, Jacobin, Jaconin und Senkirkin bestimmt wurde, da diese die höchste Transferrelevanz aufwiesen.

Ergänzend zur Fütterungsstudie wurden *in vitro* Untersuchungen zum Pansen- und Lebermetabolismus der Senecio-PAs durchgeführt, die insbesondere in Kombination mit Ergebnissen einer durchgeführten Kinetikstudie mit Reinsubstanzen (einmalige Gabe von Retrorsin bzw. dessen N-Oxid), eine Bilanzierung des Verbleibs der PA und ihrer Metaboliten ermöglichen.

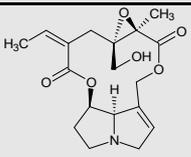
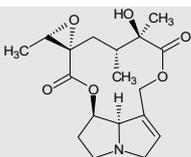
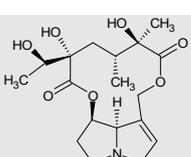
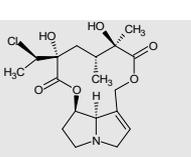
## 9. Anhang

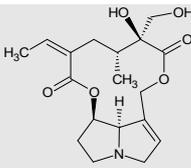
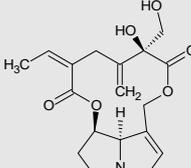
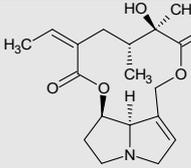
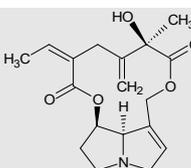
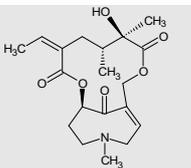
Detaillierte Beschreibung der durchgeführten Analysen.

## 9.1. LC-MS/MS Analytik

Im Rahmen des PA-SAFE-FEED Projektes wurden die in Tabelle 23 aufgeführten PA/PANOs analysiert. Diese entsprechen dem typischen PA/PANO Spektrum der Gattung *Senecio* und stellen deren Markersubstanzen dar. Einige dieser *Senecio* PAs kommen in Pflanzen natürlicherweise als Isomere vor, die chromatographisch nicht oder nicht immer vollständig getrennt werden. Solche Isomerengruppen wurden nicht unterschieden, sondern gemeinsam als Summe erfasst. Das heißt beispielsweise, falls in der jeweiligen Pflanze Retrorsin und Usaramin zusammen vorkamen, wurden beide Verbindungen erfasst, aber als Retrorsin reportiert.

Tabelle 23: Analytspektrum des PA-SAFE-FEED Projektes.

Analyt [Abkürzung]	Isomere	Summenformel	Struktur
Erucifolin [Er]	-	C <sub>18</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>6</sub>	
Erucifolin-N-Oxid [ErN]	-	C <sub>18</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>7</sub>	
Jacobin [Jb]	Merepoxin [Mp]	C <sub>18</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>6</sub>	
Jacobin-N-Oxid [JbN]	Merepoxin-N-Oxid [MpN]	C <sub>18</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>7</sub>	
Jacolin [Jl]	Sceleratin [St]	C <sub>18</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>7</sub>	
Jacolin-N-Oxid [JlN]	Sceleratin-N-Oxid [StN]	C <sub>18</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>8</sub>	
Jaconin [Jn]	Merenskin [Mk]	C <sub>18</sub> H <sub>26</sub> ClNO <sub>6</sub>	

Jaconin-N-Oxid [JnN]	Merenskin-N-Oxid [MkN]	C18H26ClNO7	
Retrorsin [Re]	Usaramin [Us]	C18H25NO6	
Retrorsin-N-Oxid [ReN]	Usaramin-N-Oxid [UsN]	C18H25NO7	
Riddelliin [Rd]	-	C18H23NO6	
Riddelliin-N-Oxid [RdN]	-	C18H23NO7	
Senecionin [Sc]	Senecivernin [Sv], Integerrimin [Ig]	C18H25NO5	
Senecionin-N-Oxid [Sc]	Senecivernin-N-Oxid [SvN], Integerrimin-N- Oxid [IgN]	C18H25NO6	
Seneciphyllin [Sp]	Spartiodin [Sd]	C18H23NO5	
Seneciphyllin-N-Oxid [SpN]	Spartiodin-N-Oxid [SdN]	C18H23NO	
Senkirkin [Sk]	-	C19H27NO6	

### 9.1.1. Referenzstandards und Chemikalien

Folgende Referenzstandards wurden verwendet: von PhytoLab (Vestenbergsgreuth, Germany): Erucifolin, Erucifolin-N-Oxid, Jacobin, Jacobin-N-Oxid, Retrorsin, Retrorsin-N-Oxid, Senecionin, Senecionin-N-Oxid, Seneciphyllin, Seneciphyllin-N-Oxid, Senecivernin, Senecivernin-N-Oxid und

Senkirkin, Von CFM Oskar Tropitzsch (Marktrechwitz, Germany): Integerrimin, Integerrimin-N-Oxid, Jacolin, Jacolin-N-Oxid, Jaconin, Merenskin, Merenskin-N-Oxid, Merepoxin, Merepoxin-N-Oxid, Riddelliin, Riddelliin-N-Oxid, Spartioidin, Sceleratin, Sceleratin-N-Oxid, Usaramin und Usaramin-N-Oxid. Aus allen Referenzstandards wurden einzelne Standardlösungen der Konzentration 1 mg/mL erstellt. Dazu wurden Sceleratin, Sceleratin-N-Oxid, Merepoxin und Merepoxin-N-Oxid in einem Acetonitril-Wasser-Gemisch (50/50, v/v) gelöst. Alle anderen Referenzstandards wurden in Methanol gelöst. Aliquote der Standardlösungen wurden mit Methanol verdünnt und daraus ein Standard-Mix aus allen Analyten hergestellt. Alle Standardlösungen wurden bei -20°C unter Lichtausschluss gelagert.

### 9.1.2. Probenvorbereitung und Analyse zur Bestimmung der PA und PANO-Gehalte im applizierten Extrakt

Jakobskreuzkraut-Extrakt wurde eingewogen, mit Wasser verdünnt und filtriert (0,2 µm, regenerierte Zellulose, Macherey-Nagel, Düren, Deutschland). Die Quantifizierung erfolgte mittels externer Kalibrierung durch Messung von sechs Kalibrierstandards in Methanol/Wasser (10/90, v/v) im Bereich von 0,5 bis 50 ng/mL je Analyt oder mittels Standardaddition. Die LC-MS/MS-Analysen des Jakobskreuzkraut-Extraktes wurden sowohl unter Verwendung saurer chromatographischer Lösungsmittelbedingungen (Kaltner et al. 2019; Taenzer et al. 2022), als auch basischer Lösungsmittel (10 mM Ammoniumcarbonat bei pH 9) durchgeführt. Die genauen massenspektrometrischen Einstellungen, das Gradientenprogramm sowie die Massenübergänge sind ausführlich in Kaltner et al. (2019), Tänzler et al. (2022) und Klein et al. (2022) beschrieben.

### 9.1.3. Probenvorbereitung und Analyse zur Bestimmung der PA und PANO-Gehalte im Futter und in der Melasse

Zur Bestimmung der PA/PANO-Gehalte in Futterbestandteilen und Melasse wurden jeweils 2 g Melasse bzw. Futtermittel mit 40 mL wässriger Ameisensäure (2%) gemischt, anschließend zentrifugiert und über Faltenfilter filtriert. Es folgte eine Festphasenextraktion (SPE) mit PCX-Kartuschen (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland). Die Kartuschen wurden mit ammoniakhaltigem Methanol eluiert. Die Eluate wurden mit Stickstoff bei 50 °C eingedampft und in 500 µL Methanol/Wasser (10/90, v/v) rekonstituiert (Knoop et al. 2023). Die Quantifizierung erfolgte mittels LC-MS/MS unter Verwendung einer externen Lösungsmittelkalibrierung. Der niedrigste Kalibrierungspunkt wurde als Bestimmungsgrenze (LOQ) je Analyt verwendet, für den die formalen

Spezifikationen noch erfüllt waren. Die Nachweisgrenzen (LOD) lagen für alle Analyten zwischen 0,01 und 1,0 µg/kg (Knoop et al. 2023). Es wurde ein Shimadzu LC-System (DGU-405, LC-20AB, SIL-20AC HT, CTO-20AC, CBM-20A, Duisburg, Deutschland) gekoppelt mit einem API4000 Tandem-Massenspektrometer (Sciex, Darmstadt, Deutschland) zur Analyse verwendet. Zur Messung wurden die Messparameter aus Klein et al. (2022) verwendet.

#### 9.1.4. Probenvorbereitung und Analyse zur Bestimmung der PA und PANO-Gehalte in den Milchproben

Die Milchproben wurden auf die in Tabelle 23 aufgeführten PA/PANO analysiert. Alle Proben wurden bei -20°C unter Lichtausschluss gelagert.

**Kuhmilch:** Drei Milliliter der aufgetauten Milchprobe wurden mit 30 mL 2%iger wässriger Ameisensäure und 15 mL n-Hexan in einem 50-mL-Zentrifugenröhrchen bei 450 U/min und Raumtemperatur in einem Horizontalschüttler für 30 Minuten extrahiert. Nach der Zentrifugation (2600 × g, 15 min, 20 °C) wurde die wässrige Phase in ein neues 50-mL-Zentrifugenröhrchen überführt. Eine Festphasenextraktion mit Bond Elut Plexa PCX 200 mg-Kartuschen (Agilent, Waldbronn, Deutschland) wurden mit 5 mL Methanol und 5 mL 2%iger wässriger Ameisensäure konditioniert, bevor 15 mL des wässrigen Rohprobenextrakts auf die Kartuschen gegeben wurden. Nach dem Waschen mit 10 mL Wasser und 10 mL Methanol wurden die Analyten mit 6 mL ammoniakhaltigem Methanol (5%) in ein Glasfläschchen eluiert. Die Eluate wurden in einem Wasserbad bei 50 °C unter leichtem Stickstoffstrom getrocknet. Der Rückstand wurde in 500 µL Methanol/Wasser (10/90, v/v) rekonstituiert, geschüttelt, 30 s lang mit Ultraschall behandelt und mit einem Spritzenfilter (0,2 µm, Polyvinylidenfluorid PVDF) in ein Messgefäß filtriert (Klein et al. 2022). PA/PANO wurden mittels einer externen Matrix-Kalibrierungskurve (0-10 µg/L in der Messlösung) quantifiziert. Für die Erstellung der externen Matrix-Kalibrierung wurde Blindmilch (ohne Analyten) der Versuchstiere vor Versuchsbeginn verwendet. Die Milchproben wurden als Doppelbestimmung analysiert. Wenn die Analytkonzentrationen den kalibrierten Bereich überstiegen, wurden die Proben verdünnt und zusätzlich gegen eine externe Matrix-Kalibriergerade gemessen; die enthaltene Matrix wurde dabei analog zur Probe verdünnt. Zur Verdünnung wurde ein 10/90 (v/v) Methanol/Wasser-Gemisch verwendet. Der Gehalt an Analyten, die in Konzentrationen zwischen der Nachweisgrenze (LOD) und der Bestimmungsgrenze (LOQ) nachgewiesen wurden, wurde als 0,5\*LOQ angegeben. Zur Berechnung des PA/PANO-Summengehalts wurden Werte unterhalb der LOD mit 0,0 µg/L angesetzt.

**Schaf- und Ziegenmilch:** Die Analyse der Schaf- und Ziegenmilchproben erfolgte analog zur Analyse der Kuhmilchproben. In Einzelfällen war wegen zu wenig Probenmaterial keine Doppelbestimmung möglich. Die Probenaufarbeitung wurde angepasst, da die Versuchstiere Schafe und Ziegen höhere Extrakt-Dosierungen erhalten hatten. Das eingesetzte Probevolumen wurde von 3 mL auf 2,5 mL und das Volumen der 2%iger wässriger Ameisensäure bei der Flüssig-Flüssig-Extraktion entsprechend auf von 30 mL auf 25 mL reduziert. Die anschließende Zentrifugation erfolgte mit  $3600 \times g$  bei  $20\text{ °C}$  für 15 min. Des Weiteren wurde das Volumen des Methanol/Wasser-Gemisches bei der Rekonstitution von 500  $\mu\text{L}$  auf 1000  $\mu\text{L}$  verdoppelt.

Für die Messungen wurde ein Shimadzu Hochleistungsflüssigkeitschromatograph (LC-20AB, DGU-405, SIL-20AC HT, CTO-20AC, CBM-20A, Duisburg, Deutschland) gekoppelt an ein API4000-Triplequadrupol-Massenspektrometer (Sciex, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Zur Ionisierung wurde die Elektrospray-Ionisation (ESI) im positiven Modus verwendet: ionisation voltage, 2.500 V; nebuliser gas, 50 psi; heating gas, 50 psi; curtain gas, 30 psi; Temperatur,  $600\text{ °C}$ ; collision gas level, 7. Die Temperatur des Säulenofens war auf  $30\text{ °C}$  eingestellt und das Injektionsvolumen betrug 10  $\mu\text{L}$ . Die chromatographische Trennung erfolgte mit einer  $100 \times 2,1\text{ mm}$  Kinetex™ 2,6  $\mu\text{m}$  EVO C18 100 Å Säule, mit einer SecurityGuard™ ULTRA EVO C18 2,1 mm Vorsäule (beide Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland). Wässriges 10 mM Ammoniumcarbonat mit einem pH von 9,0 (A) und Acetonitril (B) wurden als Fließmittel für die HPLC-Trennung verwendet. Die binären Gradientenbedingungen waren wie folgt: 0,0 min 0% B, 0,2 min 5% B, 6,0 min 10% B, 19,0 min 28,6% B, 22,5 min 33,6% B, 22,6 min 95% B und 24,0 min 95% B. Die Flussrate betrug 0,3 mL/min. Die Säule wurde vor jedem Lauf 7,0 min lang mit den Startbedingungen equilibriert. Als Software für die Datenerfassung und -verarbeitung wurde Analyst (Version 1.6.2, Sciex) und MultiQuant (Version 3.0.1, Sciex) verwendet. Die verarbeiteten Daten wurden mit Microsoft Excel (Version 2019, Microsoft) weiter analysiert. Die Validierungsdaten sind in Klein et al. (2022) veröffentlicht.

#### 9.1.5. Probenvorbereitung und Analyse zur Bestimmung der PA und PANO-Gehalte in den Muskel- und Leberproben

Für die Analyse des Leber- und des Muskelfleischs wurden die leicht angetauten Proben mit einem Skalpell in kleine Stücke (ca. 0,5 cm) geschnitten, anschließend bei  $-20\text{ °C}$  oder  $-80\text{ °C}$  eingefroren und nachfolgend gefriergetrocknet. Der Gewichtsverlust jeder Probe nach der Gefrier Trocknung wurde aufgezeichnet, um die Berechnung der PA/PANO-Konzentration bezogen auf das Frischgewebe zu ermöglichen. Das resultierende Material (etwa 3-4 g) wurde in einer Mühle mit Einwegmahlkammern (IKA, Staufen, Deutschland) gemahlen, um ein feines Pulver zu erhalten. Eine Menge von 10 mg des

gefriergetrockneten Materials wurde mit 1 mL des Extraktionspuffers (1 % Ameisensäure in Methanol) gemischt, 15 min bei Raumtemperatur geschüttelt und 10 min bei 12000 g zentrifugiert. 500 µL des Überstandes wurden vorsichtig im Stickstoffstrom bei 50 °C getrocknet und 100 µL Wasser mit 0,1% Ameisensäure und 5 mM Ammoniumformiat (Lösungsmittel A) zugegeben, auf einem Vortex geschüttelt, 15 min bei 12400 g zentrifugiert, durch einen 0,2 µm Zentrifugalfilter (modifiziertes Nylon) von VWR International (Darmstadt, Deutschland) filtriert und in ein 1-mL-Glasfläschchen überführt und bei -20 °C gelagert. Für die Matrixkalibration wurden Proben aus der entsprechenden Kontrollgruppe verwendet und denselben Aufarbeitungsschritten unterzogen, außer dass der 1 ml des Extraktionspuffer (1 % Ameisensäure in Methanol) durch 980 µl desselben Extraktionspuffers zusammen mit 20 µl der entsprechenden PA/PANO-Standardmischung (0,005, 0,025, 0,1, 0,25 und 1,0 µg/ml) ersetzt wurde, um Kalibrierstandards von 10, 50, 200, 500 und 2000 µg/kg zu erhalten. Zur Messung wurden die Messparameter aus Taenzer et al. (2025) verwendet.

#### 9.1.6. Probenvorbereitung und Analyse zur Bestimmung der PA und PANO-Konzentrationen in den Plasmaproben

Für die Analyse wurden 200 µL Plasma unter Schütteln in 800 µl Acetonitril injiziert (Fällung der Proteine). Anschließend wurden die Proben im Ultraschallbad behandelt und bei 14000 rpm zentrifugiert. 800 µl des Überstandes wurden unter Stickstoff getrocknet, der Rückstand wurde in 400 µl wässrigem Methanol (5%) gelöst, durch ein Zentrifugalfilter filtriert und mittels LC-MS/MS analysiert. Zur Messung wurden die Messparameter aus Tänzer et al. (2025) verwendet.

#### 9.1.7. Probenvorbereitung und Analyse zur Bestimmung der PA und PANO-Konzentrationen im Pansensaft, Darminhalt und Galle

Für die Analyse wurden 425 µL **des Pansensafts bzw. Darminhalts** direkt nach dem Auftauen mit 75 µL 100% MeOH versetzt. Anschließend wurden die Proben bei 14000 rpm durch einen Zentrifugalfilter zentrifugiert und ohne weitere Aufarbeitungsschritte mittels LC-MS/MS analysiert.

Zur Analyse der **Galle -Proben** wurden 1 mL der Galle mit 5 mL 100% MeOH extrahiert. Nach Behandlung im Ultraschallbad wurde die Probe bei 4000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde unter Stickstoff getrocknet und der Rückstand in 10 mL Wasser aufgenommen. Nach pH-Wert Einstellung auf 6-7 wurde erneut zentrifugiert und der Überstand über eine C18-Festphasenextraktion aufgereinigt. Die Probe wurde mit 10 mL 100% MeOH eluiert und unter Stickstoff eingengt. Der Rückstand wurde

in 1 mL 5% MeOH aufgenommen, über einen Zentrifugalfilter filtriert und mittels LC-MS/MS analysiert. Zusätzlich zu den in Tabelle 23 aufgeführten PA/PANO wurde auf die in Tabelle 24 aufgeführten Pansenmetabolite analysiert).

Tabelle 24: Identifizierte Pansenmetaboliten der Senecio PANO/PAs einschließlich der für den Nachweis relevanten massenspektrometrischen Informationen \*\*

Information *	Pansen metabolite	Summenformel	Monoisotopic Mass	(M+H) <sup>+</sup>	confirming-ion 1 [m/z]	confirming-ion 2 [m/z]
A, B, C, D, E	rM3	C <sub>18</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>5</sub>	337.1887	338.1960	122.0965	140.1072
A, B, C, D, E	rM4	C <sub>18</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>5</sub>	339.2043	340.2119	122.0964	140.1070
A, B, C, D, E	rM10	C <sub>18</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>6</sub>	353.1836	354.1910	140.1071	122.0964
A, B, C, D, E	rM11	C <sub>18</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>6</sub>	353.1840	354.1912	140.1070	122.0964
A, B, C, D, E	rM12	C <sub>18</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>6</sub>	353.1833	354.1928	122.0964	140.1070
A, B, C, D, E	rM14	C <sub>18</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>6</sub>	355.1993	356.2062	140.1071	122.0966
B, C, D, E	rM9	C <sub>18</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>6</sub>	353.1836	354.1907	140.1071	122.0964
A, C, E	rM32	C <sub>18</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>5</sub>	335.1727	336.1806	140.1071	122.0965
A, C, E	rM3b	C <sub>18</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>5</sub>	337.1884	338.1960	140.1072	122.0965
A, C, E	rM8	C <sub>18</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>6</sub>	351.1679	352.1758	140.1069	122.0964
B, D, E	rM30	C <sub>18</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>6</sub>	353.1833	354.1911	140.1071	122.0965
C, D, E	rM7	C <sub>18</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>6</sub>	351.1679	352.1755	122.0964	140.1070
C, D, E	rM17	C <sub>18</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>7</sub>	371.1944	372.2018	140.1070	122.0964
C, D, E	rM18	C <sub>18</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>7</sub>	371.1946	372.2021	140.1071	122.0965
A, B, C, D, E	rM6	C <sub>18</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>6</sub>	351.1682	352.1752	120.0808	138.0914

\*A: wichtigste *in vivo* Metabolite; B: wichtigste *in vitro* Metabolite; C: detektiert *in vivo*;  
 \*\* Metabolite mit einer 1,2 ungesättigten Necinbase sind grau unterlegt

#### 9.1.8. Probenvorbereitung und Analyse zur Bestimmung der PA und PANO-Konzentrationen im Urin

Zur Analyse wurden 1,5 mL Urin mit 6 mL Wasser (Zugabe von Monocrotalin als internen Standard) versetzt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur im Ultraschallbad extrahiert. Der pH-Wert der Probe wurde (falls nötig) auf 6-7 eingestellt. Für die Anreicherung mittels C18 SPE wurden die SPE-Kartuschen konditioniert (5 mL MeOH, 5 mL Wasser). Anschließend wurde die komplette Probe auf die Kartusche gegeben, mit 10 mL Wasser gewaschen, getrocknet und mit 10 mL MeOH eluiert. Das Eluat

wurde zur Trockne eingedampft und in 750 µL 5%igem MeOH aufgenommen (Anreicherungsfaktor 2). Die Probe wurde über einen Zentrifugalfilter filtriert und mittels LC-MS/MS analysiert. Zusätzlich zu den in Tabelle 23 aufgeführten PA/PANOs wurde auf die in Tabelle 24 aufgeführten Pansenmetabolite analysiert. Zur Messung wurden die Messparameter aus Tänzer et al. (2024) verwendet.

#### 9.1.9. Probenvorbereitung und Analyse zur Bestimmung der PA und PANO-Gehalte im Kot

Zur Analyse wurden 2,0 g getrockneter Kot mit 40 mL Wasser (Zugabe von Monocrotalin als internen Standard) suspendiert und für 20 Minuten bei Raumtemperatur im Ultraschallbad extrahiert. Der pH-Wert der Probe wurde (falls nötig) auf 6-7 eingestellt. Die Probe wurde zentrifugiert und der klare Überstand abgenommen. Für die Anreicherung mittels C18 SPE wurden die SPE-Kartuschen konditioniert (5 mL MeOH, 5 mL Wasser). Anschließend wurden 20 mL Probe aufgegeben, mit 10 mL Wasser gewaschen, getrocknet und mit 10 mL MeOH eluiert. Das Eluat wurde zur Trockne eingedampft und in 1,0 mL 5%igem MeOH aufgenommen (Aufarbeitungsfaktor 2 g/mL). Die Probe wurde über einen Zentrifugalfilter filtriert und mittels LC-MS/MS analysiert.

Zusätzlich zu den in Tabelle 23 aufgeführten PA/PANOs wurde auf die in Tabelle 24 aufgeführten Pansenmetabolite analysiert. Zur Messung wurden die Messparameter aus Tänzer et al. (2024) verwendet.

#### 9.2. Kohlenhydratanalyse in PA-Extrakt und Melasse

Eine erste Untersuchung des für den Dosis-Findungsversuch verwendeten PA-Extraktes auf den Kohlenhydratanteil erfolgte durch die Landwirtschaftliche Kommunikations- und Servicegesellschaft (LKS), Futtermittel und Bodenlabor, Niederwiesau. Im Rinder-Transferversuch erfolgte die Quantifizierung von freier Glukose, Fruktose, Saccharose und Fruktanen nach Larsson und Bengtsson (1983), während die Quantifizierung von Nicht-Stärke-Polysacchariden (NSP) und Kohlenhydraten mit niedrigem Molekulargewicht (LMW) nach dem Verfahren durchgeführt wurde, das im Wesentlichen von Knudsen (1997) erläutert und von (Lærke et al. 2015) weiter angepasst wurde.

#### 9.3. Bestimmung des Methanol-, Stickstoff- und Wassergehalts in PA-Extrakt und Melasse

Der PA-Extrakt für den Dosis-Findungsversuch wurde wie folgt untersucht: Rohprotein nach VDLUFA III, 4.1.1 3. Erg. 1993 (LKS Niederwiesau). Methanol nach LUFA Nord-West 1/3A-038; 20015-11 (LUFA

Nord-West, Oldenburg). Wassergehalt nach VO (EG) 152 Anhang III, A: 2009 WLKH - LKS FMUAA 194, Rev. 02/04/2019 (LUFÄ Nord-West, Oldenburg).

Zur Untersuchung von Melasse und PA-Extrakt für den Rinder-Transferversuch wurde für die Bestimmung des Methanols die Methode nach DIN EN 14110 verwendet, für den Wassergehalt die Methode nach DIN 51777-1.

#### **9.4. Weender-Analyse**

Zusammensetzung des Futters

Die gepoolten Futterproben wurden bei 60°C getrocknet, gemahlen und der Weender-Analyse nach den Methoden des Verbands Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFÄ 2006) unterzogen. Hierbei wurde der TS-, Rohasche-, Rohprotein-, Rohfett- und Rohfasergehalt sowie der Gehalt an sauren und neutralen Detergenzien bestimmt.

#### **9.5. Bestimmung der Milchinhaltsstoffe**

Die Milchproben wurden mit einem Infrarot-Milchanalysator (Milkoscan FT 6000; Foss Electric, Hillerød, Dänemark) auf ihre Bestandteile Fett, Eiweiß, Harnstoff und Laktose untersucht, während der Gehalt an somatischen Zellen (SCC) durch eine durchflusszytometrische Messung (Fossomatic 5000 bzw. Fossomatic FC, Foss Electric, Hillerød, Dänemark) ermittelt wurde. Die Analysen von Schaf- und Ziegenmilch erfolgten am Landeskontrollverband Schleswig-Holstein, Kiel.

#### **9.6. Hämatologie**

Die hämatologischen Parameter wurden beim Rind direkt nach der Entnahme von EDTA-Vollblut mit einem automatischen Analysegerät (Celltac- $\alpha$  MEK 6450, Nihon Kohden, Qinlab Diagnostik, Weichs, Deutschland) bestimmt. Dabei wurde folgende Parameter des weißen und roten Blutbildes erfasst: Leukozytenzahl, Lymphozyten, Monozyten, Granulozyten, Eosinophile, Erythrozytenzahl (RBC), Hämoglobinkonzentration (HGB), Hämatokrit (HCT), mittleres korpuskulares Hämoglobin (MCH), mittleres korpuskulares Volumen (MCV), mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration (MCHC) und Erythrozytenverteilungsbreite (RDW), Thrombozytenzahl (PLT), Thrombozytenkrit (PCT), mittleres Thrombozytenvolumen (MPV) und Thrombozytenverteilungsbreite (PDW).

Die Analysen von Schaf und Ziege wurden durch das Auftragslabor Fa. Synlab vet GmbH (Geesthacht, DE) nach Versand von EDTA-Vollblut-Proben mittels Kurier durchgeführt. Folgende Parameter wurden

erfasst: Leukozyten, Erythrozyten, Hämoglobin, Hämatokrit, MCV, MCH, MCHC, Thrombozyten sowie Differentialblutbild.

### 9.7. Klinisch-chemische Analyse (Serologie)

Die klinisch-chemischen Parameter (Albumin, Bilirubin, Harnstoff, Alkalische Phosphatase (ALP), Kreatinin, Gamma-Glutamyl-Transferase (GGT), Gesamtprotein, Alanin-Aminotransferase (ALT), Aspartat-Aminotransferase (AST), Glutamat-Dehydrogenase (GLDH), Glukose, beta-Hydroxybutyrat (BHB), freie Fettsäuren (NEFA)) und ausgewählte Elektrolyte (Natrium, Kalium, Chlorid) wurden im Blutserum mit einem photometrischen System (Indiko™ Plus von Thermo Fisher Scientific, Hennigsdorf, Deutschland) sowohl für Rinder als auch für die kleinen Wiederkäuer durchgeführt.

### 9.8. Durchflusszytometrische Untersuchungen des Blutes von Rindern

#### Phänotypisierung von Leukozyten-Untergruppen

In EDTA-Vollblut wurde die Immunphänotypisierung innerhalb der PBMC-Population mittels spezifischer Oberflächenmarker (CD) unter Verwendung spezifischer monoklonaler Maus-Anti-Rinder Antikörper (mAb, alle von AbD serotec, Bio-Rad laboratories GmbH, Feldkirchen, Deutschland) durchgeführt. Zur Identifizierung der Zellpopulationen wurden durchflusszytometrisch phänotypische Merkmale, wie die Größe (FCS) und Komplexität (SSC) der Zellen, sowie die Expression von CD4 (T-Helferzellen), CD8 (zytotoxische T-Zellen), CD4+CD25 (regulatorische T-Zellen), CD45Ro (Gedächtnis T-Zellen), CD21 (B-Zellen) und CD14 (Monozyten) verwendet.

#### Phagozytose

Unmittelbar nach der Probenahme wurde in heparinisiertem Blut die phagozytische Aktivität der mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) und der polymorphkernigen Neutrophilen (PMN) unter Verwendung des Reagenzienkits PHAGOTEST™ (Glycotope Biotechnology, Heidelberg, Deutschland) mittels Durchflusszytometrie (FACSCanto™II, BD Biosciences, San Jose, USA) gemessen. Hierbei wurden der Anteil phagozytischer Blutzellen und die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) als Parameter der Phagozytosekapazität der Zellen bestimmt.

#### Intrazelluläre Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)

Die Produktion von intrazellulären ROS durch PMN und PBMC wurde mittels Durchflusszytometrie (FACSCanto™II, BD Biosciences, San Jose, USA) in lysierten EDTA-Vollblutproben untersucht. Die Methode umfasste die intrazelluläre Oxidation des nicht fluoreszierenden Farbstoffs Dihydrorhodamin-(DHR)-123 zum fluoreszierenden Rhodamin-123 (R123) durch freie Radikale und

Peroxidase. Ermittelt wurde der Anteil an ROS-produzierender Zellen (R123-positive Zellen) sowie das Ausmaß an Radikale pro Zelle (MFI R123-positiver Zellen).

#### Apoptose

Der Anteil apoptotischer und nekrotischer peripherer Leukozyten wurde mittels eines FITC Annexin V-Apoptosis Detection Kit II (BD Pharmingen™, BD Biosciences, San Diego, CA, USA) durchflusszytometrisch untersucht. Dazu wurde EDTA-Vollblut mit FITC-konjugiertem Annexin und einem DNA-Farbstoff (Propidiumjodid, PI) inkubiert und anschließend der Anteil Annexin-positiven Zellen als frühe apoptotische Zellen, PI-positive Zellen als nekrotische Zellen und doppelt gefärbte Zellen (Annexin und PI-positive Zellen) als späte apoptotische Zellen identifiziert.

### 9.9. Bestimmung von inflammatorischen Markern im Blut von Rindern

Zur Bestimmung der inflammatorischen Marker Tryptophan, Kynurenin und Niacin im Blutplasma wurden die Proteine mit Ethanol und methanolischer Titriplex V-Lösung gefällt und Fette und Phosphorlipide mit Hexan entfernt. Die chromatographische Trennung der Analyten erfolgte auf einer Silicagel Phase (Intersil 150 A; ODS-2; 5 µm; 200 x 3.0 mm) mit 0,5% ACN versetzt mit Hexansulfonsäure (10,9 mmol/L) und 2M Phosphorsäure (9,7 mmol/L) als Eluent A und ACN als Eluent B.

### 9.10. Untersuchung des Pansenmetaboloms von Rindern

Für die Analyse des Pansenmikrobioms wurden 2 mL Pansenflüssigkeit in Kryo-Röhrchen überführt und direkt in flüssigen Stickstoff eingefroren. Die Lagerung der Proben bis zur weiteren Bearbeitung erfolgte bei -80°C. Aus dem Pansensaft wurde die DNA mit Hilfe eines Kits (innuPREP Stool DNA Kit, Analytik Jena GmbH+Co. KG, Jena, Deutschland) präpariert und anschließend mittels PCR vervielfältigt. Nach Qualitätskontrolle wurden die gepoolten PCR-Produkte der V4 Region des 16S rRNA Gens verdünnt und in einer 2. PCR eigensetzt um jede Probe eine eindeutige Barcode-Sequenz zur Identifizierung zuzuordnen und andererseits eine Sequenzierung mittels IonTorrent 5S Sequenzierer (Thermo Fisher Scientific) zu ermöglichen. Die Konzentrationen der mit Barcodes ausgestatteten PCR-Produkte wurden vorab fluorometrisch bestimmt und die einzelnen Proben in Äquimolaren zu einer Sequenzierbibliothek gepoolt, welche abschließend über ein Gel aufgereinigt wurde.

Nach erfolgter Sequenzierung wurde eine Qualitätskontrolle durchgeführt und die Sequenzdaten anschließend in das Qiime2 Framework geladen. Im weiteren Verlauf wurden die verbliebenden Barcode- und Adaptersequenzen entfernt und die Daten mit Hilfe von Dada2 aufgereinigt. Die statistische Auswertung und Darstellung der Diversitäten erfolgten mittels verschiedener R-Pakete und Qiime2-Plugins.

#### **9.11. Bestimmung von Purinen im Harn**

Die Bestimmung von Allantoin, Harnsäure und Kreatinin erfolgt nach einer Methode von Shingfield und Offer (1999). Hierfür wurden die Urinproben 1:50 verdünnt, membranfiltriert und per HPLC analysiert. Die chromatographische Trennung erfolgt auf einer Silicagel Phase (Intersil 150 A; ODS-2; 5 µm; 200 x 3.0 mm) mit 0,5% ACN versetzt mit Hexansulfonsäure (10,9 mmol/L) und 2M Phosphorsäure (9,7 mmol/L) als Eluent A und ACN als Eluent B.

#### **9.12. Bestimmung des Leberfettgehaltes bei Rindern**

Der Gesamtlipidgehalt der Leber wurde mit einer gravimetrischen Methode bestimmt, wie von Starke et al. (2010) ausführlich beschrieben.

#### **9.13. Lebertranskriptom von Rindern**

Leberbiopate wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert. Die Gesamt-RNA wurde mit dem NucleoSpin® RNA Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland) gemäß dem Protokoll des Herstellers isoliert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

Vor der Erstellung der Sequenzierungsbibliotheken wurde die RNA-Integrität von 12 Beispielproben mit dem Agilent RNA 6000 Nano Kit auf einem Bioanalyzer (Agilent 2100, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) bewertet. Die mRNA wurde unter Verwendung des Dynabeads™ mRNA DIRECT™ Micro Purification Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) gemäß den Anweisungen des Herstellers angereichert. Strangspezifische Barcode-Bibliotheken wurden mit dem Invitrogen™ Collibri™ Stranded RNA Library Prep Kit für Illumina™ (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) gemäß dem Protokoll des Herstellers generiert. Die Sequenzierung wurde am Heinrich-Pette-Institut, Hamburg, auf einem NextSeq v2 durchgeführt, der im Single-End-75 -Zyklusmodus lief.

#### **9.14. Pansensaftanalysen bei Rindern**

Der pH-Wert der Pansensaftproben wurde unmittelbar nach der Entnahme mit einer Glaselektrode (sentixs 41, WTW, Weilheim, Deutschland) gemessen. Für die weiteren Analysen wurde der Pansensaft zentrifugiert. Anschließend wurde der Ammoniumstickstoff via Stromdestillation nach DIN38406, E5-2 (47) analysiert. Die Bestimmung der freien Fettsäuren erfolgte nach Geissler et al (1976). Hierfür wurden die Proben nach der Zentrifugation mit einer Mischung aus Ameisensäure und Phosphorsäure (5%) angesäuert und bis zur Analyse bei -20°C gelagert. Die freien Fettsäuren wurden auf einem Gaschromatographen mit Flammenionisationsdetektor (Clarus 689, PerkinElmer LAS GmbH, Rodgau,

Germany) analysiert, wobei die chromatographische Trennung der freien Fettsäuren über eine Zebron ZB-FFAP GC Säule (30 m x 0,32 mm, 0,5µm, Phenomenex LTD, Aschaffenburg, Deutschland) erfolgte.

Für die Laktatbestimmung wurde der Pansensaft mit 0,016N Schwefelsäure angesäuert und anschließend bis zur Analyse bei -20°C eingefroren. Für die Analyse wurde der angesäuerte Pansensaft zentrifugiert und der Überstand mit Schwefelsäure verdünnt. Anschließend wurde das Laktat chromatographisch (Rezex ROA-Organic Acid H+ (8%); 300 x 7.8 mm ID (Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland)) mit 0,016N Schwefelsäure als Fließmittel getrennt. Die Detektion erfolgte mittels Dioden-Array-Detektor bei einer Wellenlänge von 210 nm.

#### 9.15. Histopathologie der Organe und Morphometrie der Hepatozytenkerne

Leberbiopate sowie Proben der Gallenblase, der Pansenwand, der Nieren und der Lungen wurden für mindestens 24 Stunden in einer mit Calciumcarbonat gepufferten 10%igen Formaldehydlösung fixiert und in Paraffin eingebettet. Anschließend wurden 5 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt und für die histologische Untersuchung mit Hämatoxylin und Eosin (H & E) gefärbt.

Für die histopathologische Bewertung wurden die Gewebeschnitte visuell nach dem Auftreten morphologischer Veränderungen, Läsionen und der Infiltration mit Entzündungszellen eingestuft (Punktzahl 1, 2 und 3 für geringen, mittleren bzw. hohen Grad), ohne dass dem Untersucher die Behandlungen bekannt waren.

Für die Histomorphometrie wurde, mittels Mikroskops, die Fläche der Leberzellkerne auf den H&E-gefärbten histologischen Schnitten gemessen (VWR VisiCam 16 Plus; WaveImage).

Bei den kleinen Wiederkäuern wurden die histologischen Untersuchungen zu den Tieren der Dosis-Findungsstudie in der Pathologie des Landeslabors Schleswig-Holstein durchgeführt.

Im Schaf-Transferversuch erfolgte die Präparation und histologische Auswertung am Institut für Pathologie der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover. Hier wurden auch die Organproben des Ziegen-Transferversuches ausgewertet, nachdem die Herstellung der Präparate am Institut für Physiologie und Biochemie der Ernährung des MRI erfolgten.

## 10. Literaturverzeichnis

- Aboling, Sabine (2023): Do Poisonous Plants in Pastures Communicate Their Toxicity? Meta-Study and Evaluation of Poisoning Cases in Central Europe. In: *Animals* 13 (24). DOI: 10.3390/ani13243795.
- Abu Damir, H.; Adam, S. E.; Tartour, G. (1982): The effects of *Heliotropium ovalifolium* on goats and sheep. In: *The British veterinary journal* 138 (6), S. 463–472. DOI: 10.1016/S0007-1935(17)30931-4.
- Altamirano, José; Miquel, Rosa; Katoonizadeh, Aezam; Abrales, Juan G.; Duarte-Rojo, Andrés; Louvet, Alexandre et al. (2014): A histologic scoring system for prognosis of patients with alcoholic hepatitis. In: *Gastroenterology* 146 (5), 1231-9.e1-6. DOI: 10.1053/j.gastro.2014.01.018.
- Baumgärtner, Wolfgang; Gruber, Achim (2020): Allgemeine Pathologie für die Tiermedizin.
- Brauchli, J.; Lüthy, J.; Zweifel, U.; Schlatter, C. (1982): Pyrrolizidine alkaloids from *Symphytum officinale* L. and their percutaneous absorption in rats. In: *Experientia* 38 (9), S. 1085–1087. DOI: 10.1007/BF01955382.
- Bull, Lionel B.; Culvenor, C. C.; Dick, A. T. (1968): The pyrrolizidine alkaloids: North-Holland Publ. Comp.
- Craig, A. M.; Pearson, E. G.; Meyer, C.; Schmitz, J. A. (1991): Serum liver enzyme and histopathologic changes in calves with chronic and chronic-delayed *Senecio jacobaea* toxicosis. In: *American journal of veterinary research* 52 (12), S. 1969–1978.
- Craig, J. F.; Kearney, W.; Timoney, J. F. (1930): Ragwort poisoning in cattle and cirrhosis of the liver in horses. In: *Veterinary Record* 10, S. 159–174.
- Deinzer, Max L.; Arbogast, Brian L.; Buhler, Donald R.; Cheeke, Peter R. (1982): Gas chromatographic determination of pyrrolizidine alkaloids in goat's milk. In: *Analytical Chemistry* 54 (11), S. 1811–1814. DOI: 10.1021/ac00248a035
- Dickinson, J. O.; Cooke, M. P.; King, R. R.; Mohamed, P. A. (1976): Milk transfer of pyrrolizidine alkaloids in cattle. In: *Journal of the American Veterinary Medical Association* 169 (11), S. 1192–1196.
- Drackley, James K.; Overton, Thomas R.; Douglas, G. Neil (2001): Adaptations of Glucose and Long-Chain Fatty Acid Metabolism in Liver of Dairy Cows during the Periparturient Period. In: *Journal of Dairy Science* 84, E100-E112. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(01)70204-4.
- Edmonson, A. J.; Lean, I. J.; Weaver, L. D.; Farver, T.; Webster, G. (1989): A Body Condition Scoring Chart for Holstein Dairy Cows. In: *Journal of Dairy Science* 72 (1), S. 68–78. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(89)79081-0.
- Elgerwi, A.; Bířeš, J.; Levkut, M. (1999): Industrial Copper Intoxication in Sheep: Clinical and Pathological Findings. In: *Acta Veterinaria Brno* 68 (3), S. 197–202. DOI: 10.2754/avb199968030197.
- Flachowsky, Gerhard; Jeroch, Heinz; Kirchgeßner, Manfred; Pallauf, Josef; Pfeffer, Ernst; Schulz, Edgar; Staudacher, Walter (2001): Empfehlungen zur Energie- und Nährstoffversorgung der Milchkühe und Aufzuchttrinder. In: *Energie- und Nährstoffbedarf landwirtschaftlicher Nutztiere* 8, S. 136.
- Fletcher, M. T.; McKenzie, R. A.; Reichmann, K. G.; Blaney, B. J. (2011): Risks from plants containing pyrrolizidine alkaloids for livestock and meat quality in Northern Australia. In: F. Riet-Correa, J. Pfister, A. L. Schild und T. Wierenga (Hg.): *Poisoning by plants, mycotoxins and related toxins*. UK: CABI, S. 208–214.

- Fu, Peter P.; Xia, Qingsu; He, Xiaobo; Barel, Shimon; Edery, Nir; Beland, Frederick A.; Shimshoni, Jakob A. (2017): Detection of Pyrrolizidine Alkaloid DNA Adducts in Livers of Cattle Poisoned with *Heliotropium europaeum*. In: *Chemical research in toxicology* 30 (3), S. 851–858. DOI: 10.1021/acs.chemrestox.6b00456.
- Geburek, Ina; Preiss-Weigert, Angelika; Lahrssen-Wiederholt, Monika; Schrenk, Dieter; These, Anja (2020a): In vitro metabolism of pyrrolizidine alkaloids – Metabolic degradation and GSH conjugate formation of different structure types. In: *Food and Chemical Toxicology* 135, S. 110868. DOI: 10.1016/j.fct.2019.110868.
- Geburek, Ina; Schrenk, Dieter; These, Anja (2020b): In vitro biotransformation of pyrrolizidine alkaloids in different species: part II—identification and quantitative assessment of the metabolite profile of six structurally different pyrrolizidine alkaloids. In: *Archives of Toxicology* 94 (11), S. 3759–3774. DOI: 10.1007/s00204-020-02853-9.
- de Goeger; Cheeke, P. R.; Schmitz, J. A.; Buhler (1982): Toxicity of tansy ragwort (*Senecio jacobaea*) to goats. In: *American Journal of Veterinary Research* 43(2):252-4.
- Greuter, Thomas; Shah, Vijay H. (2016): Hepatic sinusoids in liver injury, inflammation, and fibrosis: new pathophysiological insights. In: *Journal of gastroenterology* 51 (6), S. 511–519. DOI: 10.1007/s00535-016-1190-4.
- Hafner-Marx, Angela; Käufer-Weiss, Ilse; Matiasek, Kaspar; Pospischil, Andreas; Reinacher, Manfred; Rudolph, Roland et al. (2006): Grundriss der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere. 6., völlig neu bearbeitete Auflage. Hg. v. Erwin Dahme und Eugen Weiss. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Hicks, Damien M.; Ouvrard, Pierre; Baldock, Katherine C. R.; Baude, Mathilde; Goddard, Mark A.; Kunin, William E. et al. (2016): Food for Pollinators: Quantifying the Nectar and Pollen Resources of Urban Flower Meadows. In: *PloS one* 11 (6), e0158117. DOI: 10.1371/journal.pone.0158117.
- Hoogenboom, L.A.P.; Mulder, P.P.J.; Zeilmaker, M. J.; van den Top, H. J.; Rummelink, G. J.; Brandon, E.F.A. et al. (2011): Carry-over of pyrrolizidine alkaloids from feed to milk in dairy cows. In: *Food Additives & Contaminants: Part A* 28 (3), S. 359–372. DOI: 10.1080/19440049.2010.547521.
- Housset, Chantal; Chrétien, Yves; Debray, Dominique; Chignard, Nicolas (2016): Functions of the Gallbladder. In: *Comprehensive Physiology* 6 (3), S. 1549–1577. DOI: 10.1002/cphy.c150050.
- Huxtable, R. J.; Yan, C. C.; Wild, S.; Maxwell, S.; Cooper, R. (1996): Physicochemical and metabolic basis for the differing neurotoxicity of the pyrrolizidine alkaloids, trichodesmine and monocrotaline. In: *Neurochemical research* 21 (2), S. 141–146. DOI: 10.1007/BF02529131.
- Jago, Marjorie V. (1969): The development of the hepatic megalocytosis of chronic pyrrolizidine alkaloid poisoning. In: *The American journal of pathology* 56 (3), S. 405.
- Johnson, A. E. (1978): Tolerance of cattle to tansy ragwort (*Senecio jacobaea*). In: *American journal of veterinary research* 39 (9), S. 1542–1544.
- Jung, Stefanie; Lauter, Jan; Hartung, Nicole M.; These, Anja; Hamscher, Gerd; Wissemann, Volker (2020): Genetic and chemical diversity of the toxic herb *Jacobaea vulgaris* Gaertn. (syn. *Senecio jacobaea* L.) in Northern Germany. In: *Phytochemistry* 172, S. 112235. DOI: 10.1016/j.phytochem.2019.112235.
- Kaltner, Florian; Stiglbauer, Benedikt; Rychlik, Michael; Gareis, Manfred; Gottschalk, Christoph (2019): Development of a sensitive analytical method for determining 44 pyrrolizidine alkaloids in teas and

- herbal teas via LC-ESI-MS/MS. In: *Analytical and bioanalytical chemistry* 411 (27), S. 7233–7249. DOI: 10.1007/s00216-019-02117-1.
- Klein, Lisa Monika; Gabler, Angelika Miriam; Rychlik, Michael; Gottschalk, Christoph; Kaltner, Florian (2022): A sensitive LC-MS/MS method for isomer separation and quantitative determination of 51 pyrrolizidine alkaloids and two tropane alkaloids in cow's milk. In: *Analytical and bioanalytical chemistry* 414 (28), S. 8107–8124. DOI: 10.1007/s00216-022-04344-5.
- Knoop, Kirsten; Knappstein, Karin; Kaltner, Florian; Gabler, Angelika Miriam; Taenzer, Julian; These, Anja et al. (2023): Short-term exposure of dairy cows to pyrrolizidine alkaloids from tansy ragwort (*Jacobaea vulgaris* Gaertn.): effects on health and performance. In: *Archives of animal nutrition* 77 (5), S. 363–384. DOI: 10.1080/1745039X.2023.2261806.
- Knudsen, Knud Erik Bach (1997): Carbohydrate and lignin contents of plant materials used in animal feeding. In: *Animal Feed Science and Technology* 67 (4), S. 319–338. DOI: 10.1016/S0377-8401(97)00009-6.
- Krause, Torsten; Moenning, Jan-Louis; Lamp, Julika; Maul, Ronald; Schenkel, Hans; Fürst, Peter et al. (2023): Transfer of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans (PCDD/Fs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) from oral exposure into cow's milk - Part I: state of knowledge and uncertainties. In: *Nutrition research reviews* 36 (2), S. 448–470. DOI: 10.1017/S0954422422000178.
- Lærke, H. N.; Arent, S.; Dalsgaard, S.; Bach Knudsen, K. E. (2015): Effect of xylanases on ileal viscosity, intestinal fiber modification, and apparent ileal fiber and nutrient digestibility of rye and wheat in growing pigs. In: *Journal of animal science* 93 (9), S. 4323–4335. DOI: 10.2527/jas.2015-9096.
- Larsson, K.; Bengtsson, S. (1983): Bestämning av lättillgängliga kolhydrater i växtmaterial (Determination of readily available carbohydrates in plant material). In: *Methods report* (22).
- Liu, Ping; He, Bao Xiang; Yang, Xian Ling; Hou, Xiao Lu; Han, Jian Bin; Han, Yin Hua et al. (2012): Bioactivity Evaluation of Certain Hepatic Enzymes in Blood Plasma and Milk of Holstein Cows. In: *Pakistan Veterinary Journal* 32 (4), S. 601–604.
- Lu, Zhongyan; Kong, Lingmeng; Ren, Shenhao; Aschenbach, Jörg R.; Shen, Hong (2023): Acid tolerance of lactate-utilizing bacteria of the order Bacteroidales contributes to prevention of ruminal acidosis in goats adapted to a high-concentrate diet. In: *Animal nutrition (Zhongguo xu mu shou yi xue hui)* 14, S. 130–140. DOI: 10.1016/j.aninu.2023.05.006.
- Mädge, Inga; Gehling, Matthias; Schöne, Cindy; Winterhalter, Peter; These, Anja (2020): Pyrrolizidine alkaloid profiling of four Boraginaceae species from Northern Germany and implications for the analytical scope proposed for monitoring of maximum levels. In: *Food Additives & Contaminants: Part A* 37 (8), S. 1339–1358. DOI: 10.1080/19440049.2020.1757166.
- Mattocks, A. R. (1986): Chemistry and toxicology of pyrrolizidine alkaloids. London: Academic Press.
- Merz, Karl-Heinz; Schrenk, Dieter (2016): Interim relative potency factors for the toxicological risk assessment of pyrrolizidine alkaloids in food and herbal medicines. In: *Toxicology letters* 263, S. 44–57. DOI: 10.1016/j.toxlet.2016.05.002.
- Molyneux, R. J.; Johnson, A. E.; Olsen, J. D.; Baker, D. C. (1991): Toxicity of pyrrolizidine alkaloids from Riddell groundsel (*Senecio riddellii*) to cattle. In: *American journal of veterinary research* 52 (1), S. 146–151.

- Moser, Gerhard; Lee, Sang Hong; Hayes, Ben J.; Goddard, Michael E.; Wray, Naomi R.; Visscher, Peter M. (2015): Simultaneous discovery, estimation and prediction analysis of complex traits using a bayesian mixture model. In: *PLoS genetics* 11 (4), e1004969. DOI: 10.1371/journal.pgen.1004969.
- Mulder, Patrick P. J.; Klijnstra, Mirjam D.; Goselink, Roselinde M. A.; van Vuuren, Ad M.; Cone, John W.; Stoopen, Geert; Hoogenboom, Ron L. A. P. (2020): Transfer of pyrrolizidine alkaloids from ragwort, common groundsel and viper's bugloss to milk from dairy cows. In: *Food Additives & Contaminants: Part A* 37 (11), S. 1906–1921. DOI: 10.1080/19440049.2020.1798028.
- Mulder, Patrick P. J.; Witte, Susannah L. de; Stoopen, Geert M.; van der Meulen, Jan; van Wikselaar, Piet G.; Gruys, Erik et al. (2016): Transfer of pyrrolizidine alkaloids from various herbs to eggs and meat in laying hens. In: *Food Additives & Contaminants: Part A* 33 (12), S. 1826–1839. DOI: 10.1080/19440049.2016.1241430.
- Ohlsen, Susanne; Ganter, Martin; Wohlsein, Peter; Reckels, Bernd; Huckauf, Aiko; Lenzewski, Nikola; Aboling, Sabine (2022): Grazing Ecology of Sheep and Its Impact on Vegetation and Animal Health in Pastures Dominated by Common Ragwort (*Senecio jacobaea* L.)-Part 1: Vegetation. In: *Animals : an open access journal from MDPI* 12 (8). DOI: 10.3390/ani12081000.
- Panariti, E.; Xinxo, A.; Leksani, D. (1997): Transfer of 14C-seneciphylline into sheep milk following multiple oral intakes. In: *DTW. Deutsche tierärztliche Wochenschrift* 104 (3), S. 97–98.
- Prakash, A. S.; Pereira, T. N.; Reilly, P. E.; Seawright, A. A. (1999): Pyrrolizidine alkaloids in human diet. In: *Mutation research* 443 (1-2), S. 53–67. DOI: 10.1016/S1383-5742(99)00010-1.
- Puppel, Kamila; Kuczyńska, Beata (2016): Metabolic profiles of cow's blood; a review. In: *Journal of the Science of Food and Agriculture* 96 (13), S. 4321–4328. DOI: 10.1002/jsfa.7779.
- Raschka, C.; Ruda, L.; Wenning, P.; Stemm, C-I von; Pfarrer, C.; Huber, K. et al. (2016): In vivo determination of subcutaneous and abdominal adipose tissue depots in German Holstein dairy cattle. In: *Journal of animal science* 94 (7), S. 2821–2834. DOI: 10.2527/jas.2015-0103.
- Ribeiro, Marlon; Bianchi, Isadora N.; Silva, Wuglenya D. M.; Cavasani, João Paulo S.; Santos, Ícaro G.; Dias, Luana et al. (2024): Subacute and chronic toxic hepatopathy in cattle grazing pasture with *Crotalaria spectabilis*. In: *Veterinary pathology*, 3009858241281899. DOI: 10.1177/03009858241281899.
- Roeder, Erhard; Pflueger, Thomas (1995): Analysis of pyrrolizidine alkaloids: A competitive enzyme-linked immunoassay (ELISA) for the quantitative determination of some toxic pyrrolizidine alkaloids. In: *Natural Toxins* 3 (4), S. 305–309. DOI: 10.1002/nt.2620030426.
- Ruan, Jianqing; Yang, Mengbi; Fu, Peter; Ye, Yang; Lin, Ge (2014): Metabolic activation of pyrrolizidine alkaloids: insights into the structural and enzymatic basis. In: *Chemical research in toxicology* 27 (6), S. 1030–1039. DOI: 10.1021/tx500071q.
- Sharp, W. M.; Johnson, R. R.; Owens, F. N. (1982): Ruminant VFA production with steers fed whole or ground corn grain. In: *Journal of animal science* 55 (6), S. 1505–1514. DOI: 10.2527/jas1982.5561505x.
- Sharrow, Steven H.; Mosher, Wayne D. (1982): Sheep as a Biological Control Agent for Tansy Ragwort. In: *Journal of Range Management* 35 (4), S. 480. DOI: 10.2307/3898610.
- Shimshoni, Jakob Avi; Mulder, Patrick P. J.; Bouznach, Arieli; Edery, Nir; Pasval, Israel; Barel, Shimon et al. (2015): *Heliotropium europaeum* Poisoning in Cattle and Analysis of Its Pyrrolizidine Alkaloid

- Profile. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63 (5), S. 1664–1672. DOI: 10.1021/jf5052199.
- Stegelmeier, B. L.; Edgar, J. A.; Colegate, S. M.; Gardner, D. R.; Schoch, T. K.; Coulombe, R. A.; Molyneux, R. J. (1999): Pyrrolizidine alkaloid plants, metabolism and toxicity. In: *Journal of natural toxins* 8 (1), S. 95–116.
- Taenzer, Julian; Gehling, Matthias; Klevenhusen, Fenja; Saltzmann, Janine; Dänicke, Sven; These, Anja (2022): Rumen Metabolism of Senecio Pyrrolizidine Alkaloids May Explain Why Cattle Tolerate Higher Doses Than Monogastric Species. In: *Journal of agricultural and food chemistry* 70 (33), S. 10111–10120. DOI: 10.1021/acs.jafc.2c01332.
- Taenzer, Julian; These, Anja; Knappstein, Karin; Lamp, Julika; Dänicke, Sven; Saltzmann, Janine et al. (2025): Selective and low transfer of pyrrolizidine alkaloids from *Jacobaea vulgaris* Gaertn. into muscle and liver of dairy cattle, goat and sheep. In: *Food Control* 167, S. 110766. DOI: 10.1016/j.foodcont.2024.110766.
- VDLUFA (Hg.) (2006): Handbuch der Landwirtschaftlichen Versuchs- und Untersuchungsmethodik (VDLUFA- Methodenbuch). Bd. III Die chemische Untersuchung von Futtermitteln. Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten. Darmstadt.
- Vockrodt, H. (1973): Plant poisoning in farm animals (*Senecio jacobaea* and *Inula conyza*) and its prevention. In: *Monatshefte für Veterinärmedizin* 28, (2), 59-62
- Wang, Changhong; Li, Yan; Gao, Jiangguo; He, Yuqi; Xiong, Aizhen; Yang, Li et al. (2011): The comparative pharmacokinetics of two pyrrolizidine alkaloids, senecionine and adonifoline, and their main metabolites in rats after intravenous and oral administration by UPLC/ESIMS. In: *Analytical and bioanalytical chemistry* 401 (1), S. 275–287. DOI: 10.1007/s00216-011-5075-3.
- Williams, Lee; Chou, Ming W.; Yan, Jian; Young, John F.; Chan, Po C.; Doerge, Daniel R. (2002): Toxicokinetics of riddelliine, a carcinogenic pyrrolizidine alkaloid, and metabolites in rats and mice. In: *Toxicology and applied pharmacology* 182 (2), S. 98–104. DOI: 10.1006/taap.2002.9441.
- Zollner, Gernot; Trauner, Michael (2008): Mechanisms of cholestasis. In: *Clinics in liver disease* 12 (1), 1-26, vii. DOI: 10.1016/j.cld.2007.11.010.