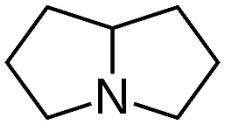
4th German Pharm-Tox Summit
Advanced Course in Toxicology
Stuttgart, 25. Februar 2019

Bewertung des kanzerogenen Risikos von Pyrrolizidin-alkaloiden

Huflattich (*Tussilago farfara*),
Heilpflanze (!) des Jahres 1994

Wikipedia, Foto: A. Trepte

Ralf Stahlmann
Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie
Charité – Universitätsmedizin Berlin



Grundstrukturen der Pyrrolizidin-Alkaloide (PA)

(es sind mehr als 500 bekannt; ca. 6.000 Pflanzenarten)

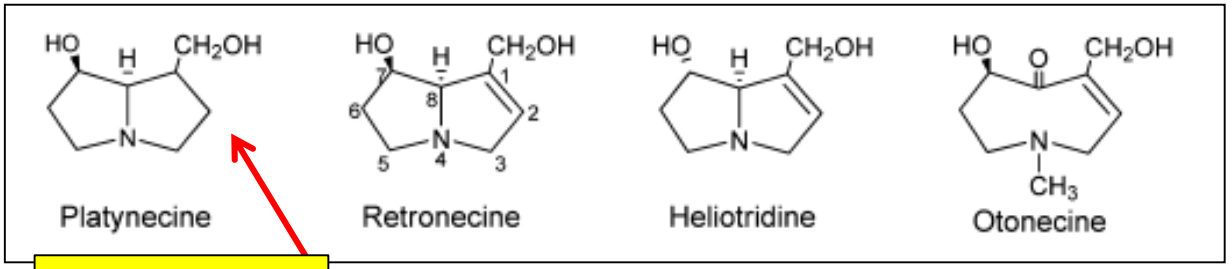
Pyrrolizidin kommt in der Natur nicht vor -
PA sind Esteralkaloide

Necinbasen
(Hydroxymethylpyrrolizidin)
verestert mit
Necinsäuren
(Mono- oder Dicarbonsäuren)

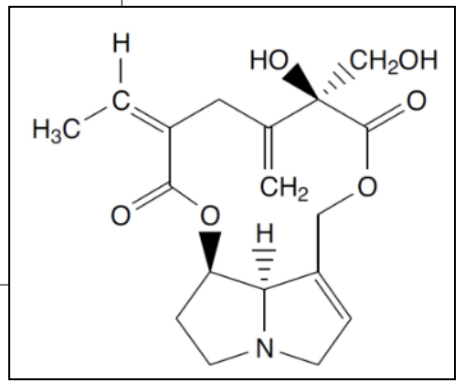
Diester oder
makrozyklisch, wenn
mit Dicarbonsäure verestert

Stereoisomere
Variationen

Koexistenz:
Tertiäres PA und
N-Oxid (wasserlöslich)



ohne Doppelbindung:
geringere Toxizität!



Riddelliin

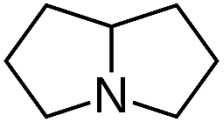
Symphytum officinale
(Beinwell)

Senecio jacobaea
Jacobs-Greiskraut

Abb. aus: **Biogene Gifte**
Teuscher / Lindequist, DVA, 3. Auflage

Struktur-Wirkungsbeziehungen

Ausgeprägte Toxizität, wenn…



- 1,2-Doppelbindung
- 1-Hydroxymethylgruppe
- Veresterung mit einer verzweigten C5-Carbonsäure

- zusätzliche OH-Gruppe in C7: verstärkte Wirkung
- weitere Verstärkung, wenn verestert

Zyklische Diester haben die höchste Toxizität.

Retronecin-Typ Otonecin-Typ

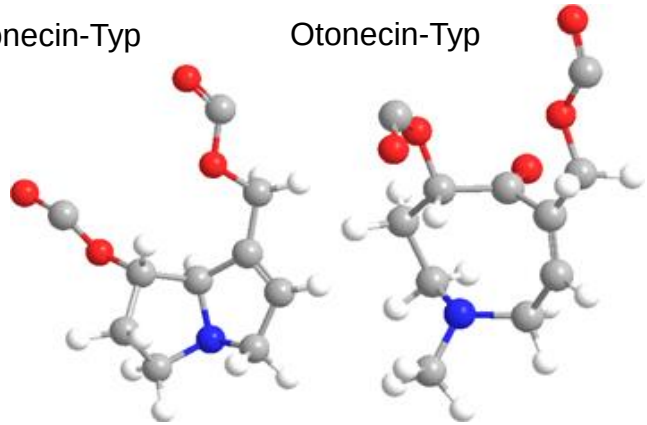
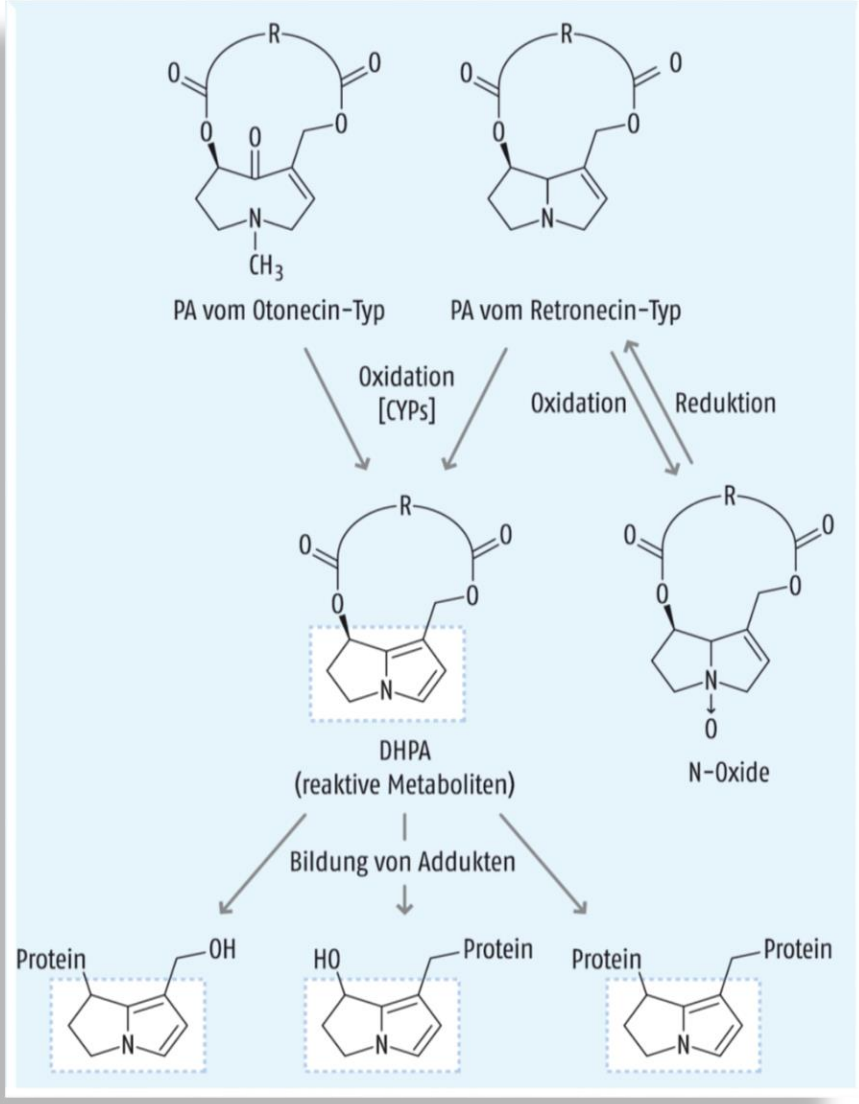


Abb.: Wiedenfeld / Edgar, 2011



Wahrscheinlichkeit der Hepatotoxizität von Pyrrolizidin-Alkaloiden

Struktur-Wirkungsbeziehungen ermittelt *in-silico*

Methoden:

Random-Forrest(RF)-Algorithmen
artificial neural network (aNN)

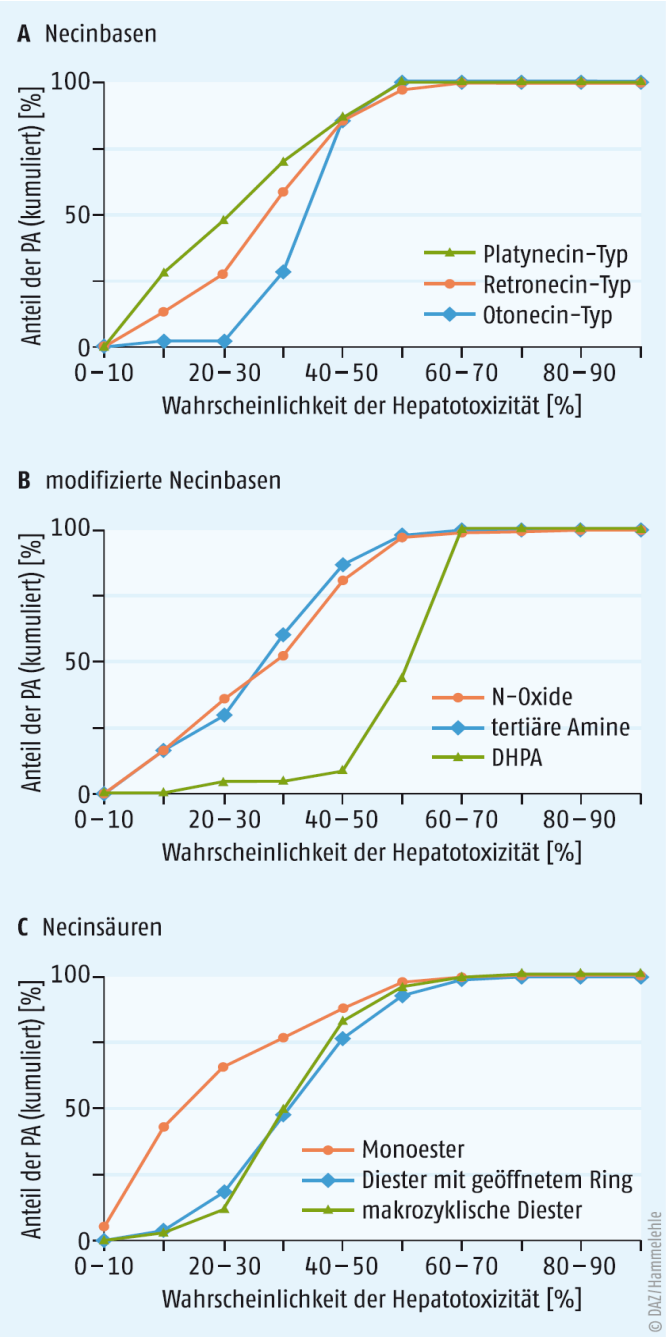


Abb. aus
Partosch / Stahlmann
DAZ Nr. 14, 2018
mod. Schöning et al., 2017
Toxicol Sci 2017

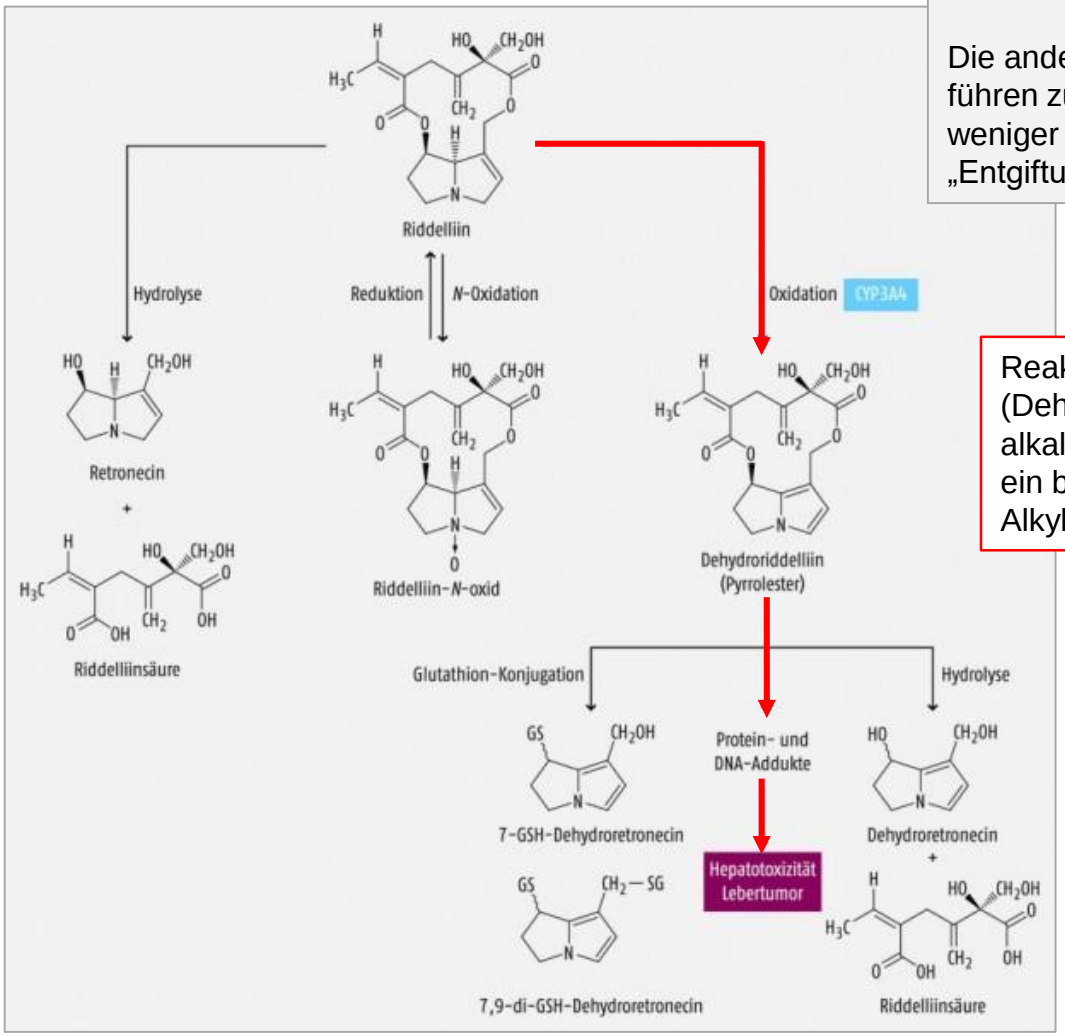
Metabolische Aktivierung von Riddelliin

- Bioaktivierung („Giftung“) von Riddelliin, einem Diester des Retronecins, zu einem sehr reaktiven Metaboliten

- Ursache der hepatotoxischen, gentoxischen und kanzerogenen Wirkung

Rote Pfeile:
Aktivierung zum sehr reaktiven DHPA

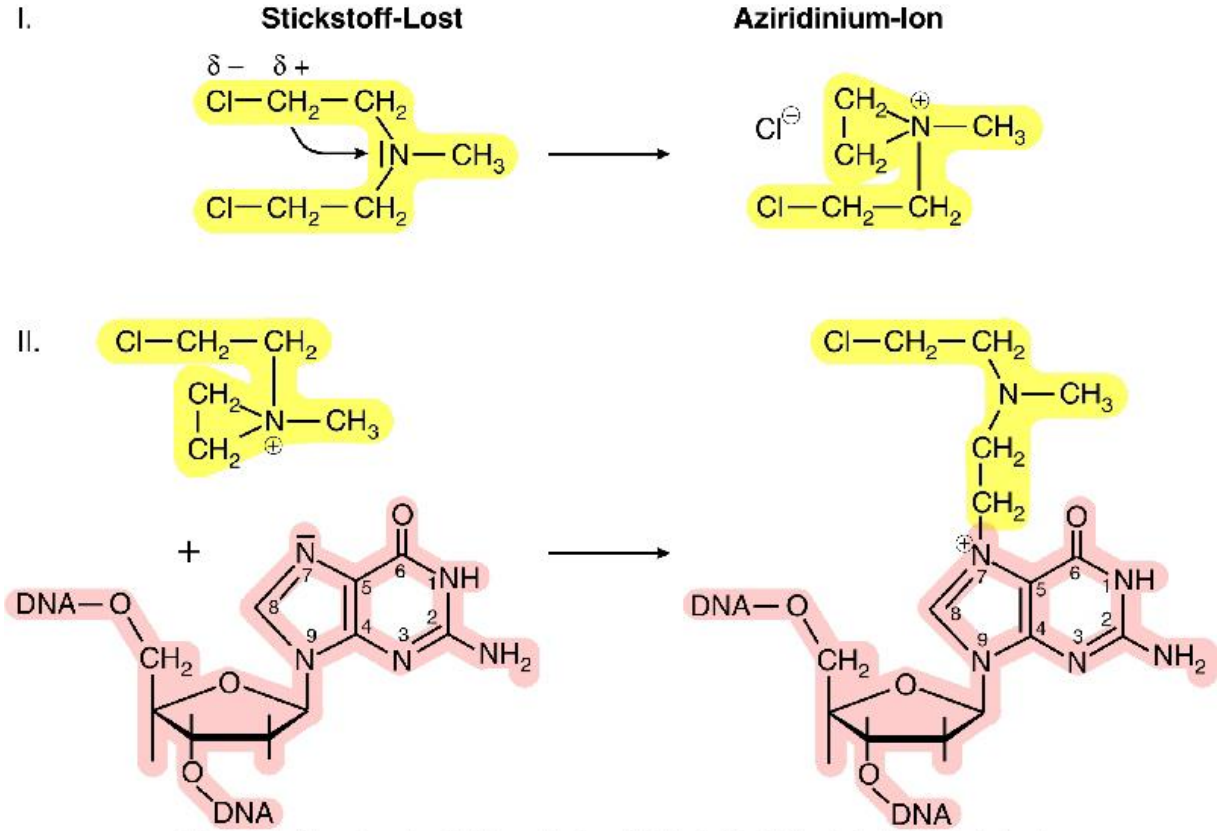
Die anderen Reaktionen führen zu einer mehr oder weniger deutlichen „Entgiftung“



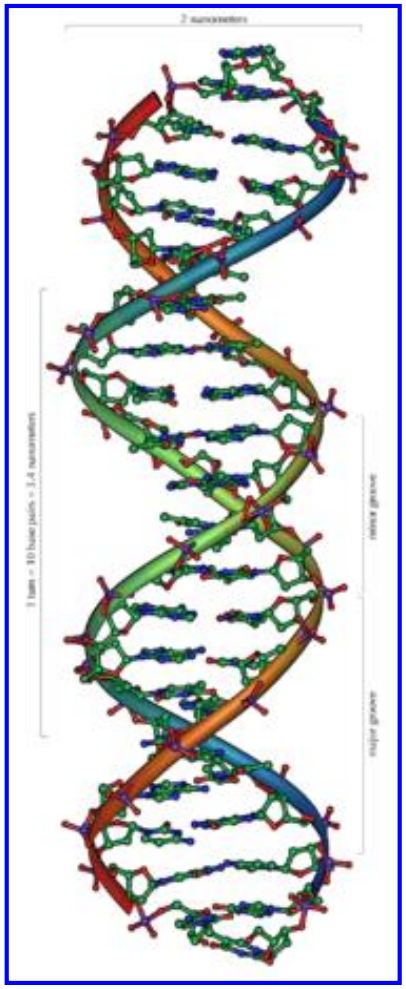
Reaktiver Metabolit (Dehydropyrrolizidin-alkaloid, DHPA) ein bifunktionelles Alkylans

aus: Stahlmann, DAZ Nr. 46, 2013
mod. nach Li, N. et al., 2011, Curr Drug Metabolism

Alkylierung von DNA-Basen durch Stickstoff-Lost - ein bifunktionelles Alkylans -

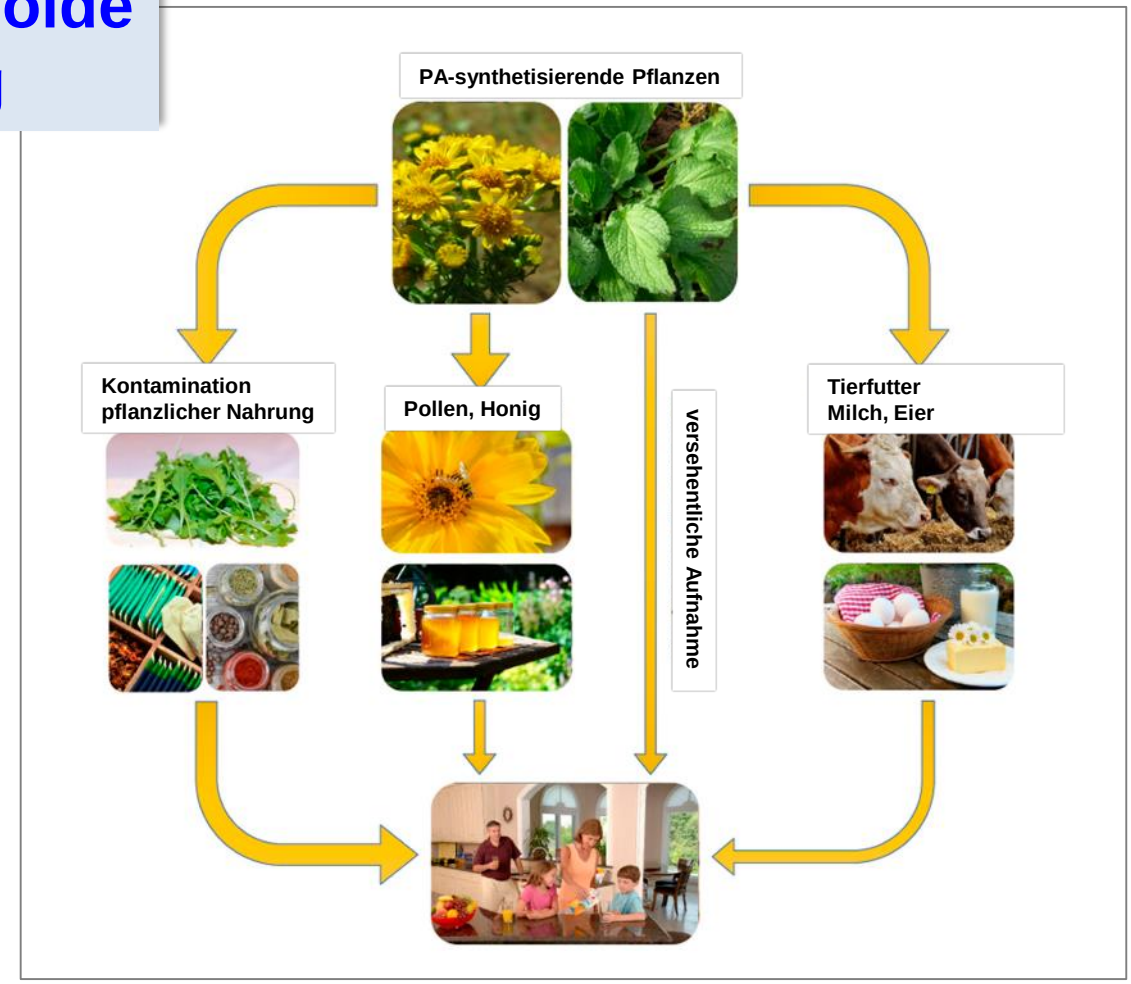


Aktories et al., Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 10. A. © Elsevier GmbH 2009, Deutschland



Aufnahme der Pyrrolizidinalkaloide mit der Nahrung

- Rucula
- Rooibostee
- Kräutertees
- Schwarztee
- Honig
- Getreide
- Milch, Käse etc. (Tierfutter)



Habs et al., 2018

Konzentrationen von Pyrrolizidin-Alkaloiden in Kräutertees

Berechnungen des BfR (2013)		
Kinder	0,655 µg/kg (worst case!!)	"akute Gesundheitsschädigung unwahrscheinlich bei kurzfristiger, z. B. 14-tägiger Einnahme"
Erwachsene	0,308 µg/kg	
	0,007 µg/kg tägl. (MOE Abschätzung; Faktor 10.000 Lasiocarpin-Daten, BMDL10 = 73 µg/kg)	„hinsichtlich möglicher Krebsrisiken wenig bedenklich"

- berechnet für eine Person mit durchschnittlichem Körpergewicht von 70 kg; entspricht einer maximal zulässigen Menge von 10 µg, 1 µg bzw. 0,1 µg täglich

„Gelb ist nicht gleich gelb“

Kontaminationsgefahr mit katastrophalen Folgen

„Beikräuter“ als Verureinigungen von Arzneipflanzen

Zündorf, Dingermann, DAZ Nr. 11, 2016

Johanniskraut
Hypericum perforatum

Kreuzkraut
Senecio jacobaea

BfArM, 1. 3. 2016
PA in Phytopharmaka

A = sehr geringe oder keine Kontaminationsproblematik
►Stichprobenprüfung
sehr geringe / keine Kontamination
90% der Proben unterhalb
≤ 0,1 µg pro Tagesdosis
keine Probe
≥0,35 µg pro Tagesdosis

B = geringe Kontaminationsproblematik
► engmaschigere Stichprobenprüfung
90% der Proben unterhalb
≤ 0,35 µg pro Tagesdosis
keine Probe
≥ 1,0 µg pro Tagesdosis

C = Relevante Kontaminationsproblematik
► Routineprüfung in Freigabespezifikation
z. B. keine Daten oder
nicht A bzw. B
oberer Grenzwert:
1,0 µg pro Tagesdosis

Case reports

Herbal tea induced hepatic veno-occlusive disease: quantification of toxic alkaloid exposure in adults

C R KUMANA, M NG, HSIANG JU LIN, WENDY KO, PUI-CHEE WU, AND D TODD

From the Department of Medicine, Queen Mary Hospital, Clinical Biochemistry Unit, Queen Mary Hospital, and the Department of Pathology, Prince Philip Dental Hospital, University of Hong Kong, Hong Kong

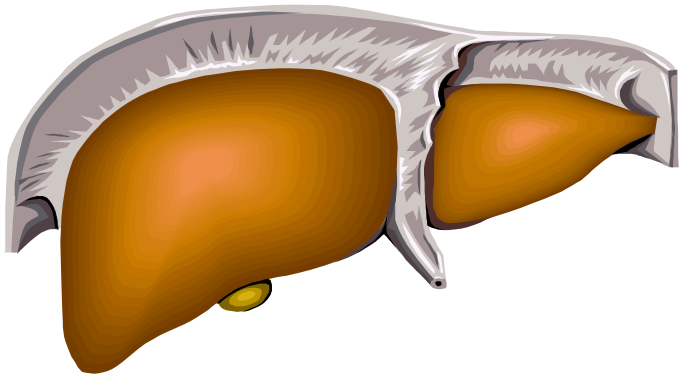
SUMMARY Four young Chinese women took daily doses of an unidentified 'Indian' herbal tea as treatment for psoriasis. Three (one of whom died), developed ascites, hepatomegaly and biochemical abnormalities within 19–45 days. The fourth patient discontinued herbal tea after 21 days when she developed a skin rash. Two patients had portal hypertension, while all had liver histology showing features of veno-occlusive disease. Pyrrolizidine alkaloids were identified spectrophotometrically in the brewed tea, and in the chopped leaves of the herbal mixture; the mean dose in the tea prepared for consumption being 12 mg/day of alkaloid base and 18 mg/day of N-oxide. The mean cumulative dose of alkaloids (base + N-oxide) before onset of symptoms (three patients), was estimated to be 18 mg/kg. In the asymptomatic patient with histological liver disease only, the corresponding dose was 15 mg/kg. These cases thus provide some measure of pyrrolizidine alkaloid toxicity in adults.

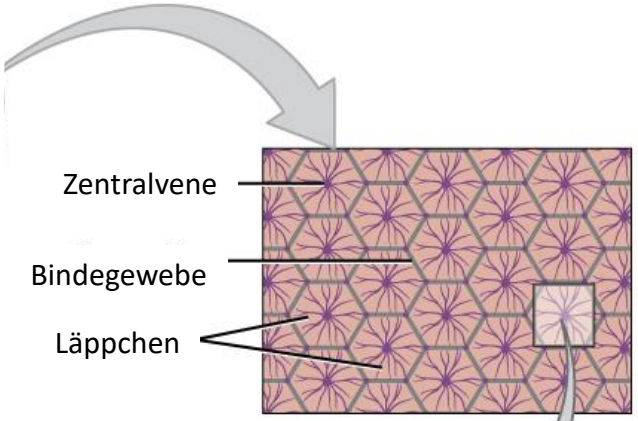
Kumana et al., Gut 1985; 26:101

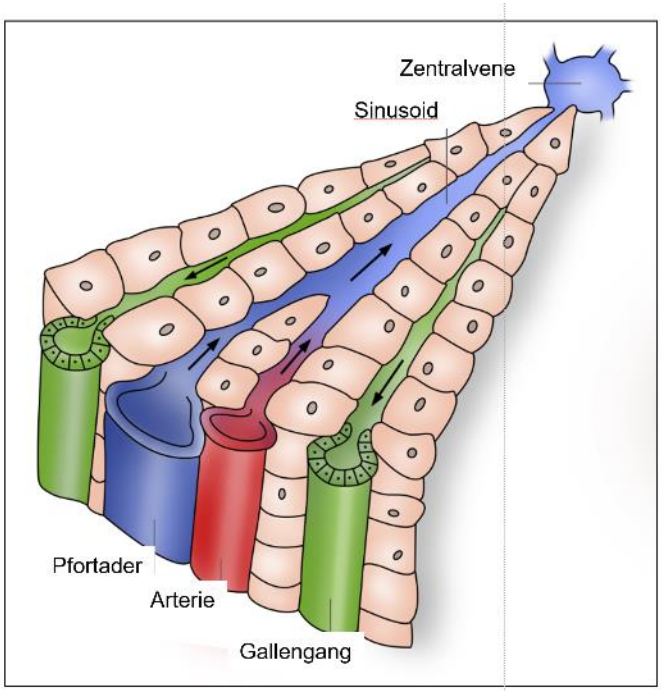
Akute Intoxikationen bei Kindern und Erwachsenen durch Pyrrolizidin-Alkaloide

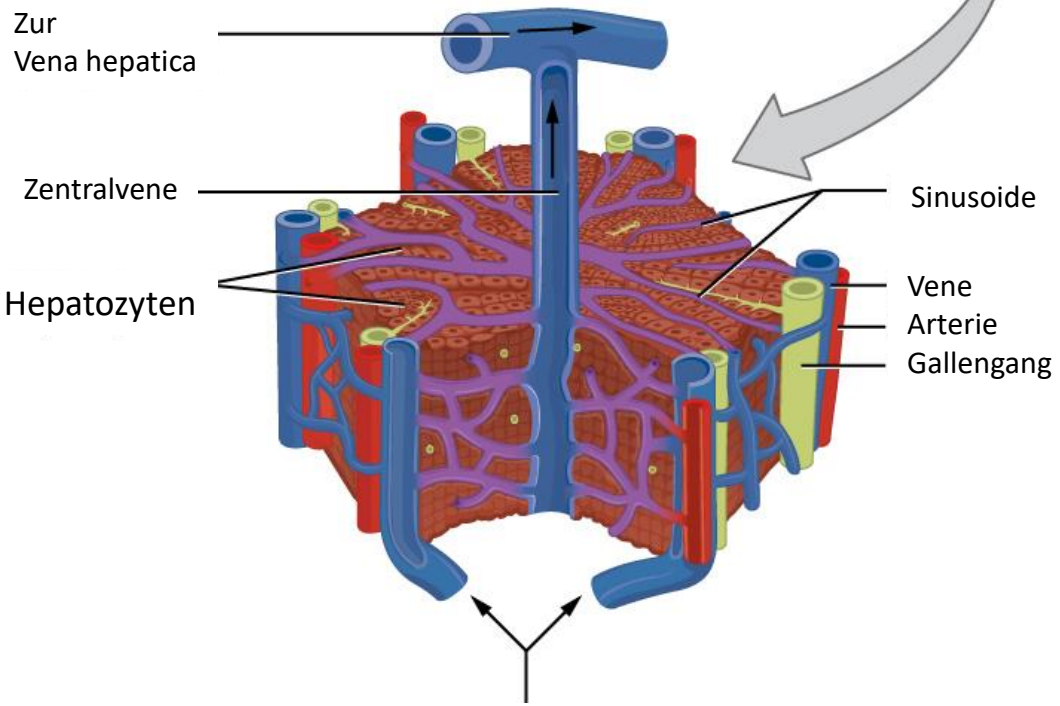
Patient	Konzentration im Tee (Alkaloid bzw. Pflanze)	Geschätzte tägliche PA Exposition (µg/kg)	Zeitdauer	Wirkung	Lit.
Knabe, 2 Monate	Sencio longilobus 0,5% PA 1% N-Oxide	3000	4 Tage	Hämatemesis, Ikterus, Hepatomegalie, Krampfanfälle, **Tod nach 6 Tagen**	Huxtable, 1980
Mädchen, 6 Monate	Sencio longilobus 0,3% PA (Riddelliin) 1% Retrorsin-N-Oxid u.a.	800 bis 1700	2 Wochen	akut: Aszitis, Pleuraerguss, nach 2 Monaten: Leberfibrose, nach 6 Monaten: **Leberzirrhose**	Huxtable, 1980
4 Frauen (China)	Gemisch von Pflanzenteilen 0,04% PA 0,14% N-Oxid (empfohlen und angewandt zur Behandlung von Psoriasis)	490 bis 710	ca. 3 bis 7 Wochen	VOD (veno occlusive disease, Lebervenen-Verschlusskrankheit), **tödlicher Verlauf** bei einer Frau nach 46 Tagen	Kumana et al., 1985

Leber




Zentralvene
Bindegewebe
Läppchen


Zentralvene
Sinusoid
Pfortader
Arterie
Gallengang


Zur
Vena hepatica
Zentralvene
Hepatozyten
Sinusoide
Vene
Arterie
Gallengang
Pfortader

Venenverschlusskrankheit

Venoocclusive Disease (VOD) /
Sinusoidal obstruction syndrome (SOS)

- Endothelschädigung durch Bildung von Proteinaddukten mit Alkylanzien

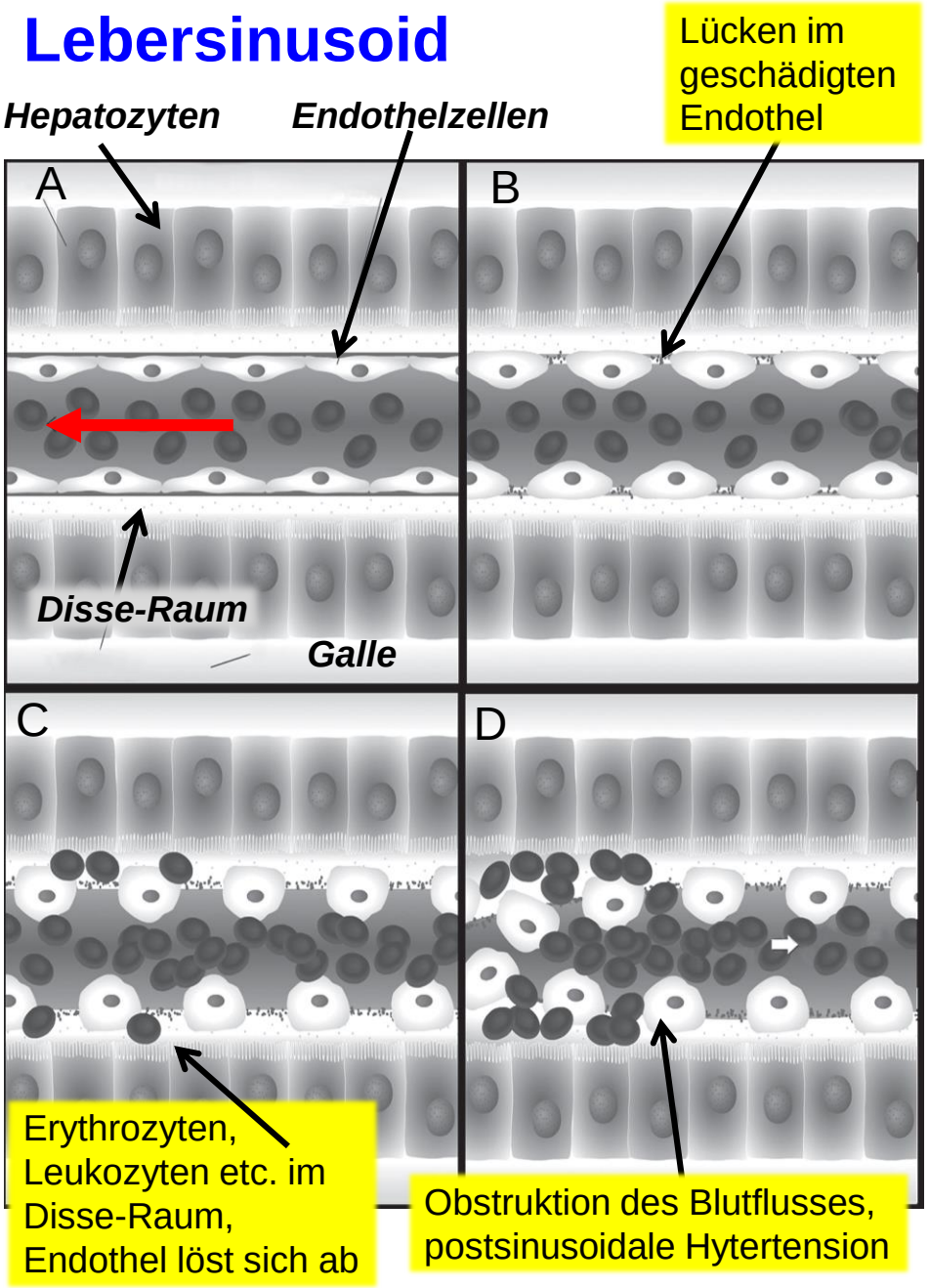
- portale Hypertension mit parenchymaler Dysfunktion

- Hepatomegalie
- Ödeme, Aszites
- hämorrhagische Nekrosen

- Hyperbilirubinämie
- Transaminasenanstieg

- Leberversagen
- bei chronischem Verlauf: Zirrhose

Lebersinusoid



Mohti et al., 2015 Bone Marrow Transplan 2015

Kanzerogene Wirkungen der Pyrrolizidinalkaloide
IARC-Bewertungen (1976, 1983, 2002)

Alkaloid	Spezies	Tumore	Evidenz aus Tierversuchen	IARC Class.
Riddelliin	Ratte, Maus	Leber u.a.	Sufficient	2B
Monocrotalin	Ratte	Leber	Sufficient	2B
Lasiocarpin	Ratte	Leber, Haut, Darm	Sufficient	2B
Isatidin	Ratte	Leber	Limited	3
Retrorsin	Ratte	Leber u.a.	Limited	3
Senkirkin	Ratte	Leber	limited	3
Jacobin	no data		inadaequate	3
Symphytin	insuff. data		inadaequate	3
Seneciphyllin	no data		no data	3
18-Hydroxy-Senkirkin	insuff. data		inadaequate	3

Group 2B: possible carcinogenic to humans; **Group 3:** not classifiable

Kanzerogenitätsstudien mit Pyrrolizidin-Alkaloiden bei Ratten

Spezies, Geschlecht	Alkaloid, (Verabrei-chung)	Tägliche Dosis (µg/kg, oral verabreicht)	Versuchs-dauer	Häufigkeit der Hämangiosarkome	Referenz
Ratte, weiblich	**Lasiocarpin** (Futter)	1500 750 350	2 Jahre	2 / 9 7 / 24 8 / 24	NTP, 1978, BfR, 2013
Ratte, weiblich	**Riddelliin** (Schlund-sonde, 5 Tage / Woche)	1000 330 100 33 10	2 Jahre	38 / 50 3 / 50 0 / 50 0 / 50 (kein Effekt)	NTP, 2003 Chan et al., 2003

Hämangiosarkome

►Charakteristischer Tumor im Tierexperiment
(hepatozelluläre Adenome und Leukämien waren ebenfalls häufiger als in den Kontrollgruppen!)

►Sehr seltener Tumor beim Menschen, Häufigkeit erhöht durch Vinylchlorid, Arsen etc.
(bisher keine Assoziation mit Kräuterverzehr bekannt!)

***N*o**
***O*bserved**
***A*dverse**
***E*ffect**
***L*evel**

NOAEL –
häufiger Referenzpunkt bei nicht-genotoxischen Soffen

***A*s**
***L*ow**
***A*s**
***R*easonbly**
***A*chievable**

Generelle Empfehlung für genotoxisch-kanzerogene Stoffe (keine untere Wirkschwelle)

***M*argin**
***o*f**
***E*xposure**

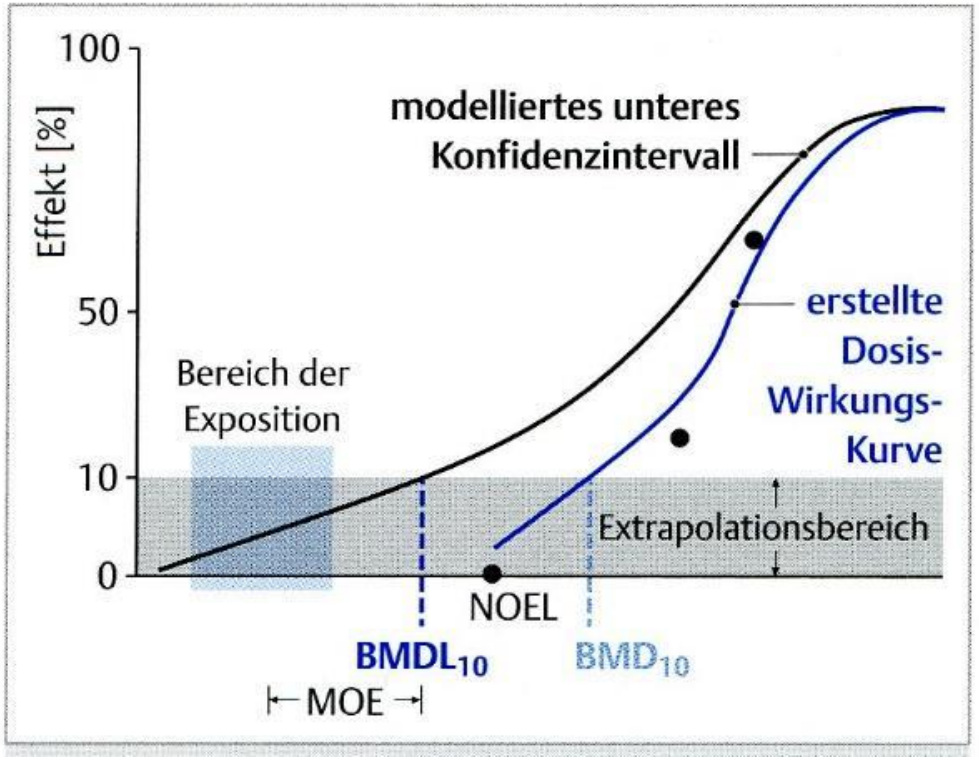
MoE -
kein gesundheitsbasierter Grenzwert!
Referenzpunkt: $BMDL_{10}$
Benchmark Dose Lower Confidence Limit 10

►dient der Priorisierung von Risikomanagementaufgaben (geringe Priorität, wenn > 10.000)

Risikoabschätzung für genotoxische Kanzerogene

MoE = Margin of Exposure (EFSA)

Abstand zwischen einer
► **kanzerogenen Dosis**,
(aus Daten des Tierversuchs modelliert)
die noch keine erkennbare Wirkung auslöst
und der
► **Exposition des Menschen**



Beispiele:

Acrylamid	200
Aflatoxin B	600
Furan	4.000
Benzo[a]pyren	20.000
PhiP (arom. Amin)	80.000
NDMA (Nahrung)	> 12.000
NDMA (Valsartan)	170

Bezugspunkt:
BMDL10 (untere statistische Vertrauensgrenze einer Dosis, die zu einer um 10% erhöhten Tumorinzidenz führt)

Abb.: Knasmüller,
Ernährung und Krebs, Thieme 2014

Benchmarkdose Modelling

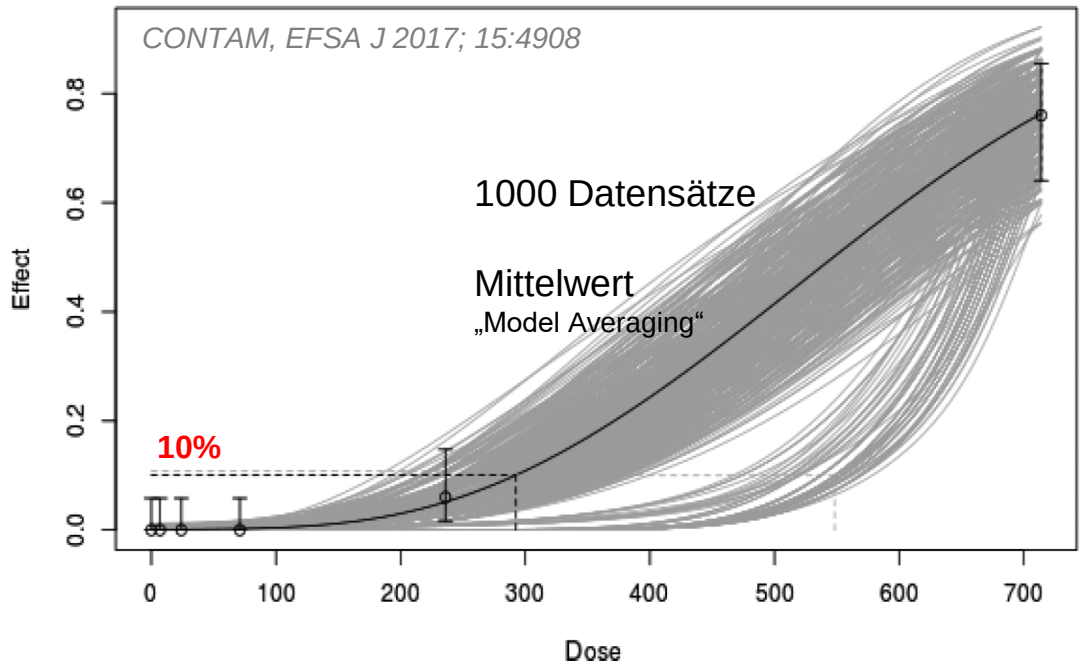
Riddelliin-Studie, weibliche Ratten [NTP, Chan et al., 2003]

Dosis Gavage 5 Tage pro Woche	Umrechnung (5 Tage / 7 Tage)	Hämangio-sarkome (je 50 Ratten)
10 µg/kg	7 µg/kg	0
33 µg/kg	24 µg/kg	0
100 µg/kg	71 µg/kg	0
330 µg/kg	236 µg/kg	3
1000 µg/kg	714 µg/kg	38

LOEL: 236 µg/kg
NOEL: 71 µg/kg
$BMDL_{10}$: 237 µg/kg

BMD_{10}	$BMDL_{10}$	$BMDU_{10}$
292.53	236.58	548.31

Averaged response model



Wichtige Annahme für die Risikoabschätzung:

- vergleichbare kanzerogene Potenz der PA
- Datenlage erlaubt keine Aufstellung von Potenzfaktoren

PA-Gesamtaufnahme und MOE bei Kindern und Erwachsenen

Verzehr von Kräutertee, MOE-Werte gerunded

	Kinder **Median**	**Kinder** 95te Perzentil	**Erwachsene** **Median**	**Erwachsene** 95te Perzentil
Aufnahme (µg/kg KG pro Tag)	0,019	0,079	0,026	0,108
MOE	12.000	3.000	9.000	2.000

95te Perzentil: hoher Verzehr, aber mittlere Gehalte

PA-Gesamtaufnahme und MOE bei Kindern und Erwachsenen

Verzehr von Kräutertee, MOE-Werte gerunded

	Kinder **Median**	**Kinder** 95te Perzentil	**Erwachsene** **Median**	**Erwachsene** 95te Perzentil
Aufnahme (µg/kg KG pro Tag)	0,019	0,079	0,026	0,108
MOE	12.000	3.000	9.000	2.000
ZUM VERGLEICH				
MOE Roiboostee	11.000	3.000	6.000	2.000
MOE Schwarztee	11.000	3.000	8.000	2.000

BfR Stellungnahme 20/2018 „Aktualisierte Risikobewertung…“

Toxizität der Pyrrolizidin-Alkaloide - offene Fragen:

Welche Personen zeigen eine erhöhte Suszeptibilität ?
Die Datenlage ist insgesamt schlecht!

Zum Beispiel:

Männlich > weiblich (??)

Während der prä- und postnatalen Entwicklung (??)

Gleichzeitige Exposition gegenüber anderen alkylierenden Stoffen (???)
(Pflanzeninhaltsstoffe, Zytostatika, etc.)

Gleichzeitige Exposition gegenüber Enzym-induzierenden Fremdstoffen (???)
(z. B. Johanniskraut-Präparate), Risiko erhöht oder erniedrigt?

Patienten mit Exposition gegenüber anderen hepatotoxischen Stoffen (???)
(Alkohol, Arzneistoffe, andere Pflanzeninhaltsstoffe, etc.)

Patienten mit chronischer Lebererkrankung (???)
(Hepatitis B, Hepatitis C)

ZUSAMMENFASSUNG

1. **Pyrrolizidinalkaloide sind weitverbreitete Pflanzeninhaltsstoffe**

2. **1,2-ungesättigte Pyrrolizidinalkaloide sind nach metabolischer Aktivierung hepatotoxische, genotoxische, kanzerogene Stoffe (Alkylanzien)**

3. **Die Exposition mit alkylierenden Stoffen in unserer Nahrung (Umwelt) sollte so niedrig wie möglich gehalten werden**

4. **Zahlreiche offene Fragen zur Toxizität der Pyrrolizidin-Alkaloide (Toxikokinetik, Toxikodynamik)**

?

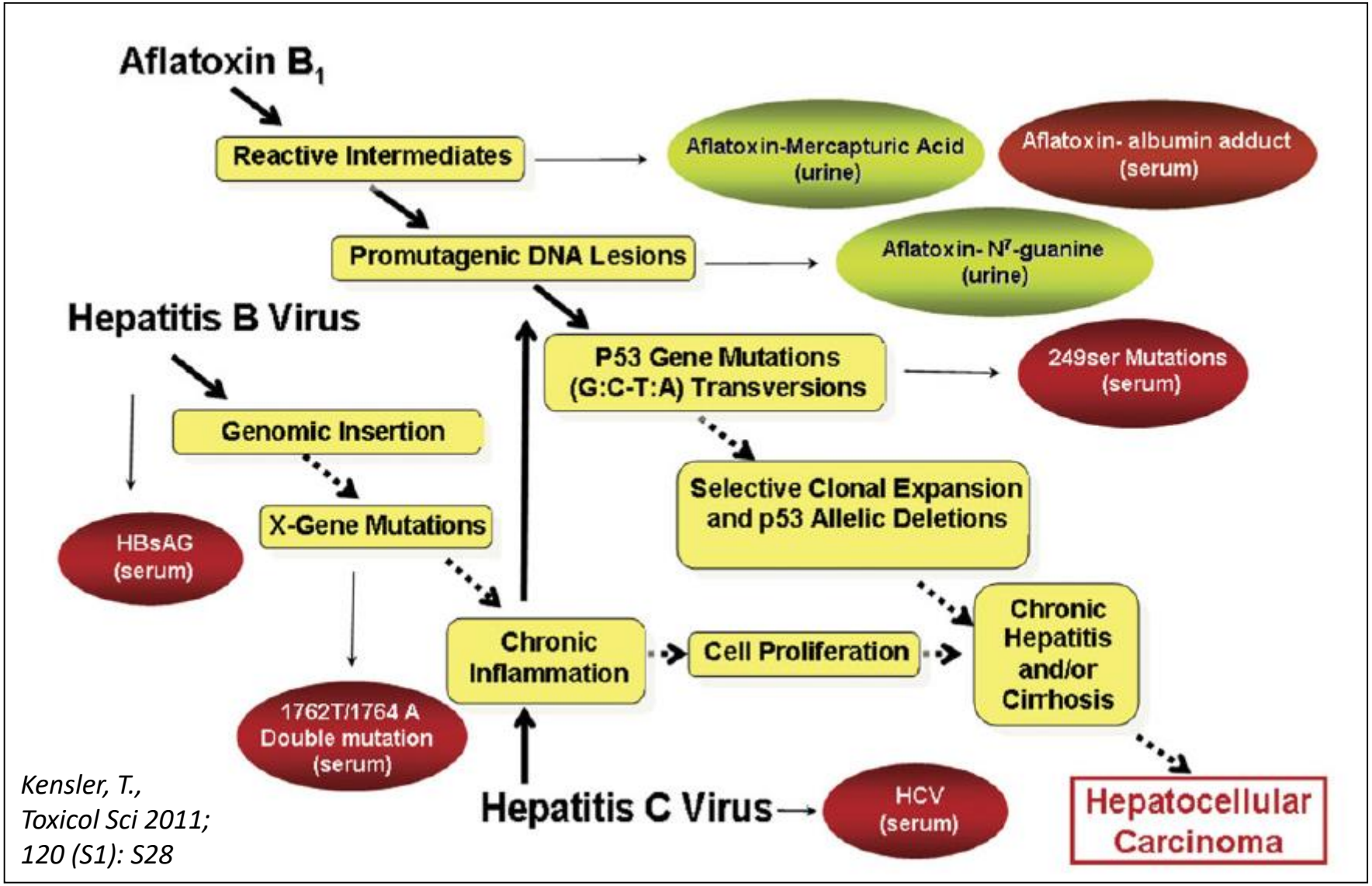
Tyria jacobaeae, Jakobskrautbär Wikipedia, Foto: T. Huntke

Besten Dank für Ihre Aufmerksamkeit!

Kanzerogenitätsstudien mit Pyrrolizidin-Alkaloiden bei Ratten

Spezies, Geschlecht	Alkaloid, (Verabrei-chung)	Tägliche Dosis (µg/kg, oral verabreicht)	Versuchs-dauer	Häufigkeit der Hämangiosarkome	Refe-renz
Ratte, weiblich	Lasiocarpin (Futter)	1500 750 350	2 Jahre	2 / 9 7 / 24 8 / 24	NTP, 1978, BfR, 2013
Ratte, männlich	Lasiocarpin (Futter)	1500 750 350	2 Jahre	13 / 24 11 / 24 5 / 24	NTP, 1978; BfR, 2013
Ratte, weiblich *	Riddelliin (Schlundsonde, 5 Tage / Woche)	1000 330 100 33 10	2 Jahre	38 / 50 3 / 50 (kein Effekt)	NTP, 2003 Chan et al., 2003
Ratte, männlich *	Riddelliin (Schlundsonde, 5 Tage / Woche)	1000	2 Jahre	43 /50	NTP, 2003; Chan et al., 2003

HBsAg-**positiv** / Aflatoxin-Biomarker **negativ**: **RR 7**
HBsAg-**positiv** **/** Aflatoxin-Biomarker **positiv**: **RR 59**
Kensler, 2011; Ross et al., 1992; Quian et al., 1994)



Kensler, T., Toxicol Sci 2011; 120 (S1): S28

AFLATOXIN: A 50-YEAR ODYSSEY

1961
AFB1 Causes Liver Cancer in Rats

1968
AFB1 Levels in Diet Linked to Liver Cancer

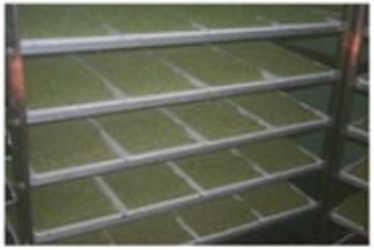
1969
FDA Sets Action Levels for Aflatoxin

1977
DNA Adduct Identified

1984
Monoclonal Antibodies and IAC

1991
Aflatoxin/HBV Synergy in Liver Cancer Etiology

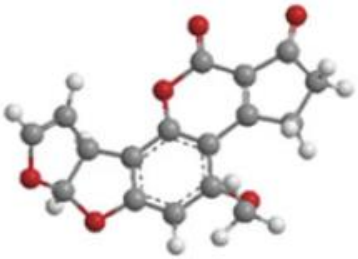
1993
IARC Classifies Aflatoxins as Group1 Carcinogens



1995 →
Oltipraz/CHL/NovaSil/ Broccoli Sprouts Clinical Trials

ca 1960
Aflatoxin Named

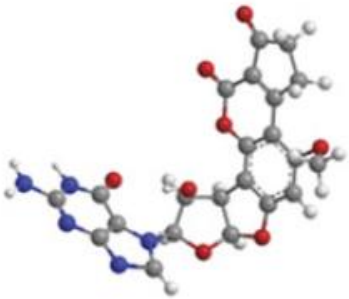
1963
Structures Elucidated



1967 →
Toxicology and Metabolism

1972
First IARC Evaluation

1981
DNA Adduct in Urine



1987
Albumin Adduct Identified

1988-92
Food Intake/ Biomarkers China & Africa

1991
p53 mutations at Codon 249 in Liver Cancer

2001→
p53 and HBV Mutations in Plasma

Kensler, T., Toxicol Sci 2011; 120 (S1): S28