

## SCHUTZWIRKUNG HEPATOTOXISCHER STOFFE GEGEN LETALE DOSEN EINES TOXINS AUS *AMANITA PHALLOIDES* (PHALLOIDIN)

G. L. FLOERSHEIM

Pharmakologisches Institut der Universität Basel, Switzerland

(Received 20 December 1965; accepted 30 March 1966)

**Abstract**—By pretreatment with carbon tetrachloride or Na-Cinchophen, mice could be protected against the double LD<sub>95</sub> of phalloidin, a toxin of the "Death Cap" mushroom, *Amanita phalloides*.

The smallest doses giving full protection were 0.2 ml/kg carbon tetrachloride or 300 mg/kg Na-Cinchophen respectively. No effect was obtained with administration of these compounds after the phalloidin. The findings lend further support to the hypothesis that phalloidin is not toxic in itself, but is transformed into a toxic compound by drug-metabolizing enzymes of the liver. Hepatic cellular injury, affecting microsomal function, may prevent this transformation.

DIE Toxizität des grünen Knollenblätterpilzes (*Amanita phalloides*) ist vor allem durch die beiden zyklischen Oligopeptide Phalloidin und  $\alpha$ -Amanitin bedingt.<sup>1</sup> Diese Toxine zeigen eine besondere Affinität zur Leber. Nach zwei Stunden wurden bei Ratten 57% des injizierten Phalloidins in der Leber gefunden.<sup>2</sup> Auch seine Haftfähigkeit war stark; ein nicht toxisches Phalloidinderivat liess sich dagegen aus der Leber auswaschen.<sup>2</sup> Besonders empfindlich auf Phalloidin sind offenbar auch Strukturen der Leberkapillaren. Ihre Schädigung führt zum histologischen Bild der akuten roten Leberdystrophie. Auch das Versiegen des Gallenflusses unmittelbar nach der Phalloidin-zufuhr weist auf die Leberwirkung dieses Stoffes.<sup>3</sup> Die nach Amanita-Toxinen in der Leber beobachteten Stoffwechsel-, Enzym- und Elektrolytveränderungen lassen aber wohl noch keinen Schluss auf den spezifischen Angriffspunkt dieser Stoffe zu. Ähnliche Veränderungen werden auch nach anderen direkten Lebergiften wie Tetrachlorkohlenstoff, Chloroform und Phosphor gefunden und müssen daher eher als Sekundäreffekte angesehen werden, die als Folge des Zusammenbruchs der Leberfunktion eintreten.

Hypothesen über den Wirkungsmechanismus der Amanita-Toxine sollten die Beobachtung berücksichtigen, dass Vorbehandlung mit Alloxan Ratten gegen letale Dosen von Pilzextrakt<sup>4</sup> oder Phalloidin<sup>1</sup> schützen kann. Kürzlich wurde eine neue Erklärung für dieses Phänomen vorgeschlagen.<sup>5</sup> Sie basiert auf der auch schon von anderer Seite ausgesprochenen Vermutung,<sup>6</sup> dass nicht das Phalloidin selbst, sondern ein daraus in der Leber entstehender Metabolit der hepatotoxische Faktor sei. Weil dieser in der Leber entsteht, übe er auch dort seinen stärksten Effekt aus. Alloxan hemmt mikrosomale Leberenzyme, die Pharmaka metabolisieren.<sup>7</sup> Dadurch würde die Ueberführung des Phalloidins in den toxischen Metaboliten beeinträchtigt. Versuche mit neugeborenen Ratten, deren Pharmaka metabolisierende Enzyme in

der Leber noch nicht ausgebildet sind, stützen die Metabolit-Hypothese. Sieben Tage alte Ratten überlebten eine fünffach letale Phalloidinindosis.<sup>5</sup>

Wir untersuchten in der vorliegenden Arbeit, ob die Toxizität des Phalloidins durch Leberschädigung modifiziert werden kann.

#### METHODE

Wir verwendeten 18–25 g schwere männliche Mäuse (Swiss-Stamm). Das Phalloidin (Formel siehe Abb. 1) wurde uns freundlicherweise durch Herrn Prof. Dr. Th. Wieland, Frankfurt/M, zur Verfügung gestellt.

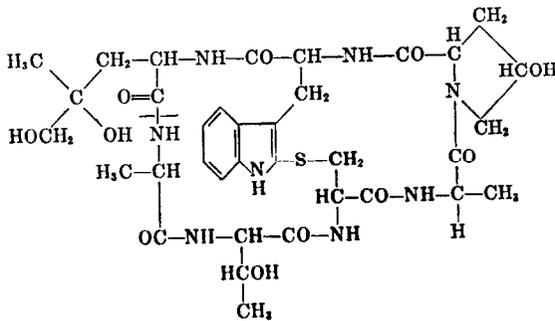


ABB. 1. Phalloidin (nach Wieland<sup>1</sup>).

Vorerst wurde die Toxizität des Phalloidins bestimmt. Es wurde stets intraperitoneal verabreicht. Wie aus Tabelle 1 ersichtlich ist, betrug die  $LD_{50} < 2$  mg/kg, die  $LD_{ca,95}$  3 mg/kg.

TABELLE I. TOXIZITÄT VON PHALLOIDIN BEI MÄUSEN

Dosis i.p. (mg/kg)	Letalität*
1	0/5
2	10/12
3	13/14

\* Gestorbene/verwendete Mäuse

Danach untersuchten wir die Schutzwirkung gegen 6 mg/kg Phalloidin. Sämtliche in den Versuch einbezogenen Mäuse erhielten diese Dosis. Sie führte -in dieser gut dreifachen  $LD_{50}$ - stets innert 2–5 Stunden zum Tode.

Die zu prüfenden Stoffe wurden den Mäusen in verschiedenen Dosierungen und Zeitabständen vor der Phalloidin-Injektion verabreicht. Das Ueberleben der Mäuse wurde darauf stündlich kontrolliert. In den Ergebnissen sind die Ueberlebensraten nach 24 Stunden angeführt. Danach kam es zu keinen Todesfällen mehr. Die überlebenden Mäuse zeigten normales Verhalten.

Der Tetrachlorkohlenstoff wurde in Oleum arachidis gelöst, Na-Cinchophen in aq. dest. Beide Stoffe wurden subcutan in 0,1 ml/10 g appliziert. Oleum arachidis allein wies keine Schutzwirkung auf.

#### ERGEBNISSE

Die protektiven Wirkungen hepatotoxischer Stoffe auf die Applikation von 6 mg/kg Phalloidin sind in Abb. 2 und 3 und in Tabelle 2 zusammengestellt. Ein klarer Schutzeffekt konnte sowohl durch Vorbehandlung mit Tetrachlorkohlenstoff ( $\text{CCl}_4$ ) als auch mit Na-Cinchophen (Na-phenyleinchoninicum) erzielt werden. Bei der Vorbehandlung mit mindestens 0,2 ml/kg  $\text{CCl}_4$  überlebten gesamthaft 39 von 45 Mäusen (87%). 0,08 ml/kg  $\text{CCl}_4$  zeigten noch eine gewisse Schutzwirkung; 0,025 ml/kg  $\text{CCl}_4$  blieben wirkungslos (Abb. 2). Dabei wurden die verschiedenen  $\text{CCl}_4$ -Dosen einen Tag vor dem Phalloidin verabfolgt. Wurde 1 ml/kg  $\text{CCl}_4$  nur vier Stunden

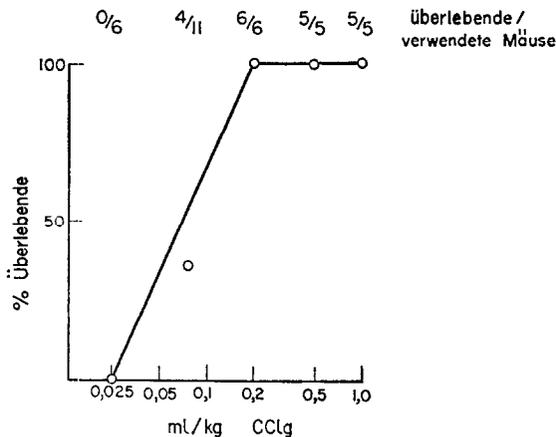


ABB. 2. Ueberlebensrate von Mäusen nach 6 mg/kg Phalloidin und Vorbchandlung mit verschiedenen Dosen  $\text{CCl}_4$ . Das  $\text{CCl}_4$  wurde 24 Stunden vor dem Phalloidin verabfolgt.

vor dem Phalloidin gegeben, so überlebten die Tiere noch. Bei einer Applikation 30 Min vor oder 20 Min nach dem Phalloidin vermochte 1 ml/kg  $\text{CCl}_4$  die Mäuse nicht mehr vor dem Tod zu schützen.

Na-Cinchophen erwies sich ebenfalls als deutlich wirksam. Hier überlebten insgesamt 26 von 29 Mäusen (90%), sofern das Na-Cinchophen in Dosen von 300–500 mg/kg und spätestens mit dem Phalloidin appliziert wurde (Abb. 3). 200 mg/kg Na-Cinchophen hatten noch eine reduzierte Schutzwirkung, 100 mg/kg blieben unwirksam. Wurde das Na-Cinchophen 15 Min nach dem Phalloidin verabfolgt, so war seine Wirksamkeit praktisch aufgehoben (Tabelle 2).

Unter den weiteren Substanzen, die ihrer hepatotoxischen Wirkungskomponenten wegen ebenfalls geprüft wurden, wies nur Chloroform noch eine schwache Schutzwirkung auf. 0,15 ml/kg, einen Tag vor dem Phalloidin s.c. verabreicht, schützten ca. 30% der so behandelten Mäuse. Tetrachloräthylen, Aethanol, Chlorpromazin, Promethazin und 6-Mercaptopurin hatten keinen Schutzeffekt. Auch 100 mg/kg Alloxan, einen Tag vor dem Phalloidin i.v. injiziert, vermochte die Mäuse nicht gegen 6 mg/kg Phalloidin zu schützen.

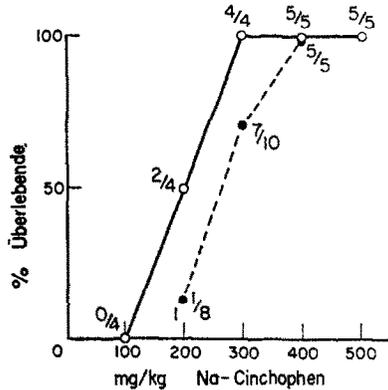


ABB. 3. Ueberlebensrate von Mäusen nach 6 mg/kg Phalloidin und Vorbehandlung mit verschiedenen Dosen Na-Cinchophen. Das Na-Cinchophen wurde entweder einmalig 30 Min vor dem Phalloidin (○—○) oder täglich während drei Tagen und letztmals 30 Min vor dem Phalloidin (●---●) appliziert. Nominator und Denominator neben den Punkten der Kurven entsprechen den überlebenden und verwendeten Mäusen pro Dosis und Applikationsformel des Na-Cinchophens.

TABELLE 2. UEBERLEBENSRATE VON MÄUSEN NACH 6 mg/kg PHALLOIDIN UND BEHANDLUNG MIT 400 mg/kg Na-CINCOPHEN

Zeitpunkt der Applikation des Na-Cinchophens vor (-) oder nach (+) dem Phalloidin (Min)	Überlebende/verwendete Mäuse
-30	5/5
gleichzeitig	4/4
+15	1/11

#### DISKUSSION

Die Ergebnisse zeigen, dass die Toxizität von Phalloidin bei vorgeschädigter Leber deutlich vermindert ist. Das könnte -im Sinne der Hypothese von der Deckens und Fumes- für eine in der Leber stattfindende Umwandlung des Phalloidins in einen toxischen Metaboliten sprechen. Auch dürfte damit die Latenzzeit der Knollenblätterpilzvergiftung in Zusammenhang stehen, ferner u.U. die "immunisierende" Wirkung kleiner Toxindosen, die ebenfalls zu einer Leberschädigung führen könnten, auf Grund derer dann normalerweise letale Phalloidindosen toleriert würden. Auch die Unwirksamkeit von  $\text{CCl}_4$  und Na-Cinchophen nach der Phalloidin-Gabe spricht eher dafür, dass diese Stoffe nicht die Wirkung des Toxins, sondern dessen Entstehung beeinflussen.

Der beobachtete Schutzeffekt kommt zwei Stoffen zu, die beide zu einer akuten Lebernekrose führen können. Das deutet auf einen gemeinsamen Wirkungsmechanismus. Bei der Schutzwirkung gegen Phalloidin liesse er sich auf folgende Weise interpretieren: Phalloidin ist offenbar in besonderem Masse an die Mikrosomenfraktion der Leberzellen gebunden.<sup>2</sup> Seine Umwandlung in einen toxischen Metaboliten erfolgt wahrscheinlich durch hier lokalisierte Enzyme. Als Folge davon können

hepatozelluläre Enzymfunktionen gestört sein.<sup>6</sup> CCl<sub>4</sub> hemmt bekanntlich die Enzymaktivität von Lebermikrosomen.<sup>8</sup> Für das Cinchophen scheint ein solcher Angriffspunkt ebenfalls nicht ausgeschlossen. Die protektiv wirksamen Stoffe wie Alloxan, CCl<sub>4</sub> und Cinchophen würden somit die durch mikrosomale Enzyme erfolgende Umwandlung des Phalloidins in einen toxischen Metaboliten blockieren.

CCl<sub>4</sub> und Na-Cinchophen scheinen den Alloxan-Effekt zu übertreffen. Alloxan zeigte in hoher ( $\frac{1}{2}$  LD<sub>50</sub>), optimal diabetogener Dosierung in unserem Versuch keinen Schutzeffekt mehr. Dreimalige subcutane Gabe von ca. 175 mg/kg Alloxan hatte Ratten gegen die doppelte LD<sub>50</sub> eines Amanita-Extraktes geschützt, nicht aber gegen dessen dreifache LD<sub>50</sub>.<sup>4</sup>

Ob diesen Befunden für die Behandlung der Knollenblätterpilzvergiftung Bedeutung zukommt, bedarf weiterer Abklärung. Im Lichte der angeführten Hypothese dürfte es eher unwahrscheinlich sein, dass mit der Applikation von experimentell nur prophylaktisch wirksamen Stoffen nach dem Auftreten der klinischen Symptome noch Effekte erzielt werden können. Immerhin müsste vorerst geprüft werden, ob mit den erwähnten Stoffen gegenüber weniger ausgeprägt supraletalen Phalloidindosen auch kurative Wirkungen zu erhalten sind. Für eine Anwendung im erwähnten Sinne spräche beim CCl<sub>4</sub>, dass es in relativ kleinen Dosen aktiv ist. Seine LD<sub>50</sub> betrug ca. 18 ml/kg s.c. Mit 0,2 ml/kg wies es demnach in der 1/90 LD<sub>50</sub> vollen Schutzeffekt auf. Ein Vorzug des Na-Cinchophens könnte darin bestehen, dass seine Applikation weniger lange vor dem Phalloidin erfolgen muss. Dafür war es allerdings nur in relativ hohen Dosen wirksam (ca. 1/3 LD<sub>50</sub>).

#### ZUSAMMENFASSUNG

Mäuse konnten durch Vorbehandlung mit Tetrachlorkohlenstoff oder Na-Cinchophen gegen die doppelte LD<sub>95</sub> des Knollenblätterpilzgiftes Phalloidin geschützt werden. Die kleinste noch voll wirksame Dosis betrug beim Tetrachlorkohlenstoff 0,2 ml/kg, beim Na-Cinchophen 300 mg/kg. Mit der Applikation dieser Stoffe nach dem Phalloidin liess sich kein Schutzeffekt mehr erzielen. Die Befunde stützen die Hypothese, wonach Phalloidin erst durch Pharmaka metabolisierende Leberenzyme in eine toxische Verbindung übergeführt wird. Hemmfaktoren solcher mikrosomalen Enzyme stören offenbar diese Umwandlung.

#### LITERATUR

1. T. WIELAND und O. WIELAND, *Pharmac. Rev.* **11**, 87 (1959).
2. D. REHBINDER, G. LÖFFLER, O. WIELAND und T. WIELAND, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **331**, 132 (1963).
3. F. MATSCHINSKY, U. MEYER und O. WIELAND, *Biochem. Z.* **333**, 48 (1960).
4. J. VERNE, P. F. CECCALDI und S. HÉBERT, *C.r. Séanc. Soc. Biol.* **144**, 645 (1950).
5. L. FIUME, *Lancet*, **1**, 1284 (1965).
6. A. VON DER DECKEN, H. LÖW und T. HULTIN, *Biochem. Z.* **332**, 503 (1960).
7. R. L. DIXON, L. G. HART und J. R. FOUTS, *J. Pharmac. exp. Ther.* **133**, 7 (1961).
8. V. A. DRILL, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **104**, 858 (1963).