

# Die Wirkung von Sulfhydrilkörpern auf die Histaminase des Mäusedarms

JOHANNES E. PANY

*Physiologisches Institut der Universität Wien, Österreich*

**ABSTRACT:** The effect of sulfhydryl compounds on the histaminase of the mouse intestine. Sulfhydryl compounds and biogenic amines could have a similar mode of action as radio-protectors. In order to check on this possibility, the influence of several sulfhydryl compounds on histaminase has been examined. Small known amounts of histamine were added to tissue homogenates in 0.1 M phosphate buffer pH 7.2 and fermentation at 37° C was interrupted after 60 minutes with perchloric acid. The estimation of remaining histamine was carried out fluorometrically by combining with o-Phthalaldehyde after extraction with butanol (modification of SHORE's method). In mouse ileum and jejunum it was found that the enzymes oxydizing and substituting histamine were blocked by the free SH-group. With AET, cysteamine and cysteine this effect was shown in homogenates in vitro as well as in the same tissue of animals in vivo after intraperitoneal injection of suitable concentrations of the compounds mentioned above. The effect depended on the concentration of the substances varying between  $10^{-3}$  and  $10^{-4}$  M. Compounds with their sulfhydryl group oxydized to the disulfide, e. g. cystine and cystamine, did not inhibit the enzymes in vitro and in vivo. This inhibition of enzymes which normally destroy histamine in the tissue by oxydation or substitution leads probably to an accumulation of histamine. It is assumed that this accumulation contributes to the prophylactic effect to the sulfhydryl compounds against irradiation, since histamine lowers the oxygen tension in the tissues and acts as a good radio-protector. The effect mentioned in this work would reveal a common feature in the mode of action as radio-protectors both of sulfhydryl compounds and biogenic amines.

## EINLEITUNG

Histamin und histaminähnliche Substanzen spielen in der Entwicklung des Bestrahlungssyndroms eine ziemlich große Rolle. Dies ist bald nach Beginn der Verwendung ionisierender Strahlung zu Heilzwecken erkannt worden. Die Literatur, die sich mit den Allgemeinwirkungen der ionisierenden Strahlen und der Zirkulation der diese Wirkungen erzeugenden Stoffe („Nekrohormone“, „H-Substanzen“) beschäftigt, ist sehr groß und auch vielfach widersprechend. Auf Grund der damals gemachten Beobachtungen wurde vor fast 30 Jahren von ELLINGER die Histaminhypothese der biologischen Strahlenwirkung aufgestellt. Neben der Steuerung physiologischer und pathologischer Prozesse durch den Regulationsmechanismus der biogenen Amine wirken diese Verbindungen aber auch als Schutzstoffe gegen ionisierende Strahlen, falls sie prophylaktisch angewendet werden. Dieser Schutz besteht bekanntlich in der durch diese Amine in den Geweben erzeugten Verringerung der Stauerstofftension. Bei der

Klassifizierung der Strahlenschutzstoffe wurde diesen Verbindungen neben der Gruppe der Sulfhydrylkörper ein besonderer Platz eingeräumt. Die Systemisierung der Strahlenschutzstoffe nach ihrer vermutlichen Wirkungsweise stellt jedoch nur eine Hilfs-hypothese dar. Es liegt nach neueren Erkenntnissen die Annahme nahe, daß die Strahlenschutzstoffe zwar in ihrer Primärwirkung den chemischen Gegebenheiten ihrer charakteristischen Gruppen (etwa SH- oder NH<sub>2</sub>-) folgen, daß aber in der Auswirkung dieser chemischen Primärreaktionen zwischen den verschiedenen Schutzstoffgruppen anscheinend funktionelle Zusammenhänge bestehen. In der hier referierten Arbeit wird versucht, diesen Zusammenhängen in gewisser Richtung nachzugehen.

Bei der Auswertung von Versuchen, die auf der Bestimmung des Histamins fußen, ist jedoch folgender Umstand von Wichtigkeit. Die Freisetzung und Beseitigung des Histamins in den Geweben erfolgt unter physiologischen Bedingungen mit der Steuerung durch zahlreiche Fermente. Dies kompliziert die Deutung experimentell gesetzter Veränderungen dieser Verhältnisse und macht das Studium der Histaminregulation an diesen einzelnen Fermentsystemen notwendig. Hierzu zählen: das histaminbildende Ferment Histidindecaboxylase und die Fermente, welche das Histamin in den Geweben inaktivieren beziehungsweise durch Abtransport beseitigen. Die Inaktivierung des Histamins kann erfolgen durch: 1. Methylierung an der Aminogruppe, 2. Methylierung am Ring, 3. Acetylierung und 4. Oxydation. Die Wirkung der Amino-oxydase, bisher allgemein als „Histaminase“ bezeichnet, ist schon lange bekannt, doch hat die Substitution an der Aminogruppe anscheinend die größte Bedeutung. Dazu kommt noch der in letzter Zeit besonders klinisch studierte Transport des Histamins (und auch anderer biogener Amine) durch lockere Bindung an eine den Gammaglobulinen angehörende Plasmaeiweißfraktion, dem Plasmapexin. Die Erscheinung wird Histaminopexie genannt.

#### METHODIK

Methodisch können hier nur wenige Hinweise gegeben werden. Das Histamin wurde der Eindeutigkeit halber fluorometrisch nach einer für unsere Erfordernisse modifizierten Methode von SHORE bestimmt. Die Versuche wurden am Dünndarm von Mäusen der Stämme C3H und C57Bl in vitro an Homogenaten, in vivo nach Injektion der Drogen i. p. durchgeführt. Die Sulfhydrile beziehungsweise aus AET entstehendes Mercaptoäthylguanidin sowie Cysteamin und Cystein und die Disulfide Cystin und Cystamin wurden in vitro in Molaritäten von 10<sup>-3</sup> bis 10<sup>-4</sup> den Fermentansätzen zugesetzt, in vivo dieselben Molaritäten für 70% des Körpergewichts berechnet, 15 Minuten vor Versuchsbeginn i. p. injiziert. Die Homogenatansätze in m/15 Phosphatpuffer pH 7,2, denen eine bekannte Histaminmenge (etwa 2 Gamma/ml Ansatz) zugesetzt wird, laufen eine Stunde bei 37° C, und das verbliebene Histamin wird nach der oben zitierten Methode extrahiert. Bei den Versuchen in vivo wird das zu prüfende Darmstück nach Homogenisieren sofort enteivweißt und der Histamingehalt in derselben Weise bestimmt. In allen Versuchsserien laufen Ansätze mit unbeeinflusster, sowie mittels Aminoguanidin (10<sup>-3</sup>molar) vollständig gehemmter Fermentwirkung mit. Alle Ansätze werden in Doppelbestimmungen ausgeführt. Der Fragestellung entsprechend, wurden nur solche Sulfhydrylverbindungen und Disulfide untersucht, die als Strahlen-

schutzstoffe erprobt sind und eine positive oder negative Wirkung haben. Die vorliegenden Untersuchungen beziehen sich allein auf die Beeinflussung der Aktivität der histaminabbauenden Fermente. Wahrscheinlich wirken die Sulfhydrile nicht nur auf die Fermente mit der älteren Bezeichnung „Histaminase“, sondern auch auf alle anderen genannten Fermentkomplexe, was jedoch im einzelnen noch untersucht werden muß.

### VERSUCHE IN VITRO

Mit dem Mercaptoäthylguanidin – entstehend aus dem Aminoäthylisothiuroniumchlorid-Hydrochlorid (AET) – wurde die stärkste Hemmung der Fermente erzielt. Dabei darf nicht übersehen werden, daß die Hemmung in erster Linie auf das Vorhandensein des Guanidinrestes im umgelagerten Molekül des AET zurückzuführen sein wird. Da jedoch auch die SH-Gruppe, wie in Versuchen mit Cystein und Cysteamin festge-

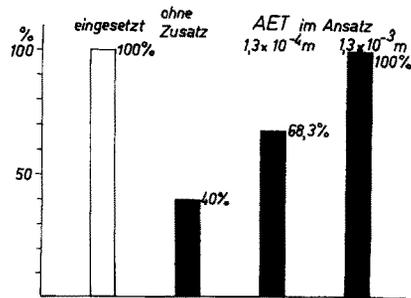


Abb. 1: Histaminabbau pro Gramm Darmgewebe (Homogenat)

stellt werden konnte, einen wesentlichen Einfluß auf die Fermentaktivität besitzt, muß die hemmende Wirkung beiden Teilen des Moleküls zugeschrieben werden. Sie ist daher besonders stark (Abb. 1). In den Versuchsserien am Dünndarmhomogenat ist bei Verwendung verschiedener Konzentrationen von AET eine Molarität von  $10^{-4}$  bereits ausreichend, die Umsetzung der vorgelegten Histaminmenge etwa zur Hälfte zu hemmen. Eine AET-Konzentration von  $10^{-3}$  molar verhindert jede Umsetzung, und die eingesetzte Histaminmenge wird zur Gänze wiedergefunden. Dies entspricht dem Ergebnis der Wirkung von Aminoguanidin gleicher Konzentration. Dagegen werden in Kontrollansätzen desselben Homogenats ohne jeden Zusatz zwei Drittel der vorgelegten Histaminmenge abgebaut. Dieser Wirkung des AET kommt diejenige des Cysteamins sehr nahe (Abb. 2). Bei einer Konzentration von  $2 \times 10^{-3}$  molar wird vollständige Hemmung erzielt, und eine Verringerung der Cysteaminkonzentration hat eine Steigerung des Histaminabbaus zur Folge. Eine etwas schwächere Wirkung als AET und Cysteamin hat das Cystein, mit dem bei einer  $10^{-3}$ -Molarität im Ansatz nur etwa die Hälfte der Fermentwirkung erzielt werden kann. Bei geringeren Konzentrationen steigt die Fermentwirkung entsprechend (Abb. 3).

Nachdem die Wirkung der freien Sulfhydrilgruppe auf die Fermente des Histaminabbaus derart nachgewiesen werden konnte, lag es nahe, durch die Anwendung von

Disulfidverbindungen, also bei einer Blockierung der Sulfidhydrylgruppe in den angewendeten Strahlenschutzstoffen in der oxydierten Form derselben, z. B. Cystein→Cystin und Cysteamin→Cystamin, die Abhängigkeit der Hemmung der Ferment-

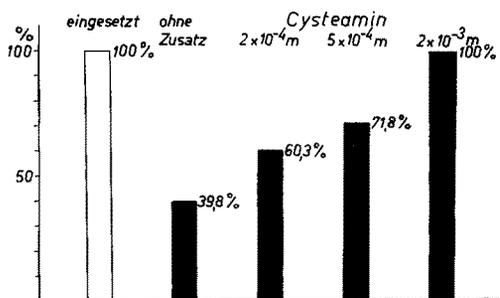


Abb. 2: Histaminabbau pro Gramm Darmgewebe (Homogenat)

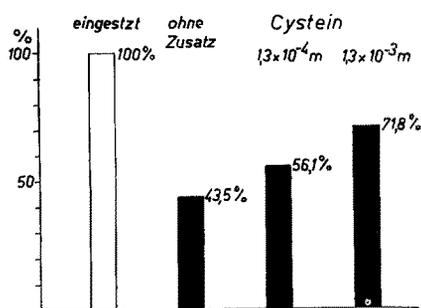


Abb. 3: Histaminabbau pro Gramm Darmgewebe (Homogenat)

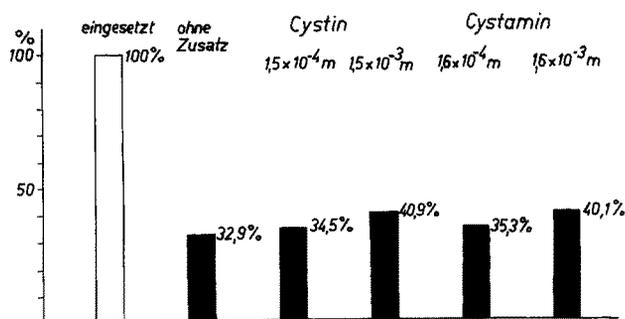


Abb. 4: Histaminabbau pro Gramm Darmgewebe (Homogenat)

aktivität von der freien Sulfhydrylgruppe indirekt zu bestimmen. Es wurde daher am Dünndarm der Maus unter denselben Versuchsbedingungen die Wirkung der beiden Disulfide untersucht. Cystin hat keine Strahlenschutzwirkung. Dem Cystamin ist eine schwache, vorwiegend pharmakologisch bedingte Wirkung im Strahlenschutzversuch zugeschrieben worden, die allerdings umstritten ist (VAN DER MEER). Die Versuchs-

ordnung, die Wahl der Konzentrationen, die gleichzeitige Prüfung von Homogenat mit und ohne Fermenthemmung mittels Aminoguanidin und die Auswertung der Resultate wurde in derselben Weise durchgeführt wie in den Versuchen mit den Sulfhydrilkörpern. Cystin, das in Wasser schwer löslich ist, wurde in der berechneten Menge Natronlauge gelöst und der pH-Wert möglichst schwach alkalisch gehalten. Cystamindihydrochlorid ist in isotoner Kochsalzlösung leicht löslich und reagiert fast neutral. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abbildung 4 dargestellt. Daraus ergibt sich, daß bei Versuchen an Darmhomogenat bei geringen Konzentrationen wie etwa  $10^{-4}$ molar keinerlei Hemmung, bei höheren Konzentrationen von  $10^{-3}$ molar eine sehr geringe, kaum als signifikant anzusprechende Hemmung eintritt. Damit erscheint die Abhängigkeit der Hemmung der Fermente, welche das Histamin abbauen, von der freien SH-Gruppe auch indirekt bestätigt.

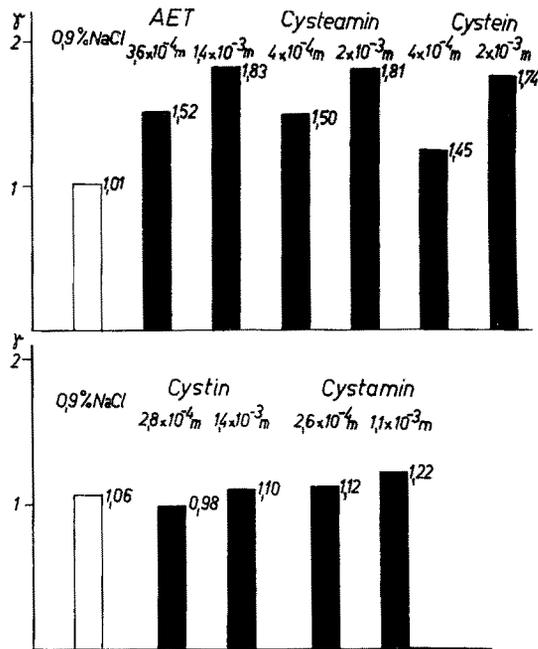


Abb. 5: Histamingehalt pro Gramm Dünndarm 15 Minuten nach i. p. Injektion

## VERSUCHE IN VIVO

Diese *in vitro* erzielten Resultate veranlaßten die Untersuchung der Wirkung beider Substanzgruppen auf die Umsetzung des Histamins in Organen des lebenden Tieres. Die systematische Untersuchung erfolgte nach einigen Vorversuchen an anderen Organen wieder am Dünndarm. Die Veränderung des Histaminspiegels im Dünndarm, der genau 15 Minuten nach Injektion der schon bei den Versuchen *in vitro* verwendeten Substanzen AET, Cysteamin und Cystein durch Töten des Tieres und sofortige Ver-

arbeitung des Organs bestimmt wurde, zeigt dieselbe Tendenz wie in den Untersuchungen mit Homogenat (Abb. 5). Die Wirkung ist auch im Organ des lebenden Tieres deutlich konzentrationsabhängig. Ein Unterschied in der Wirkung der drei Substanzen, wie er bei den Versuchen *in vitro* festgestellt werden konnte, trat hier nicht auf. Der Einfluß der Drogen ist auch hier eindeutig, aber die Intensität des Histamingehaltes im Gewebe ist bei den Versuchen *in vivo* wesentlich geringer, was bei der ständigen Regulation dieser Vorgänge im lebenden Organismus zu erwarten war. Damit wird die *in vitro* festgestellte Beeinflussung der das Histamin in den Geweben verändernd beziehungsweise abbauenden Fermente durch Verbindungen, welche die freie Sulfhydrylgruppe enthalten, auch *in vivo* bestätigt. Die Anwendung von Disulfiden am lebenden Tier hat die Wirkungslosigkeit dieser Verbindungen auf die untersuchten Vorgänge bestätigt, wie aus Abbildung 5 ebenfalls ersichtlich ist. Eine Erklärung der geringen Steigerung der Histaminmenge nach Injektion der Konzentration von  $10^{-8}$ -molar ist angesichts der komplexen Vorgänge nach Injektion solcher Konzentrationen nicht möglich. Eindeutig ist jedoch der Unterschied zu der Wirkung der Substanzen mit freier Sulfhydrylgruppe. Nach den quantitativen Verhältnissen zu schließen, dürfte diese Wirkung der freien SH-Gruppe nicht nur auf die „Histaminase“ beschränkt sein, sondern wahrscheinlich alle das Histamin abbauenden Fermente erfassen.

#### DISKUSSION

Die Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß ein strahlenschutzwirksamer Sulfhydrylkörper nicht nur mit seiner SH-Gruppe strahlenempfindliche Teile und Reste (etwa Protein-SH) in hoch- und niedermolekularen Zellbestandteilen durch chemische Abschirmung oder durch Reaktion mit strahleninduzierten Radikalen zu schützen vermag, wie dies in zahlreichen Arbeiten nachgewiesen wurde. In der vorliegenden Arbeit wird eine weitere Möglichkeit einer indirekten Wirkung wahrscheinlich gemacht. Die Störung der Histaminregulation im Sinne einer Hemmung der Beseitigung des im Gewebe freigesetzten Histamins durch die SH-Gruppe könnte infolge lokaler Häufung des Histamins zu einer pharmakologisch bedingten Schutzwirkung führen, wie sie für einige biogene Amine bekannt ist. Die Steigerung der Hemmung und das damit verbundene Ansteigen des Histaminspiegels mit steigender Konzentration des SH-Körpers unterstreicht die Möglichkeit dieser Wirkungsweise. Im Strahlenschutzversuch läuft die Wirksamkeit einer SH-Verbindung bis zu einem gewissen Grade mit deren Konzentration im Gewebe parallel. Die Resultate weisen auf eine weitere, wenn auch indirekte Möglichkeit der Schutzwirkung der SH-Verbindungen hin. Sie zeigen aber auch, daß eine strenge Schematisierung der Wirkung eines Strahlenschutzstoffes, wie sie manchmal getroffen wird, nicht zulässig erscheint, weil sie biologischen Prinzipien widerspricht.

#### ZUSAMMENFASSUNG

1. Strahlenschutzstoffe der Sulfhydrylreihe und einzelne biogene Amine, insbesondere das Histamin, werden auf die Möglichkeit des Zusammenhanges ihrer Wirkungsweise hin untersucht.

2. Es wird am Gewebe des Mäusedünndarms festgestellt, daß die freie SH-Gruppe eine Hemmung der verschiedenen Fermentkomplexe hervorruft, welche das in den Geweben freigesetzte Histamin oxydieren oder substitutiv verändern. Diese Beobachtung wird sowohl *in vitro* an Darmhomogenat als auch *in vivo* nach intraperitonealer Injektion des jeweiligen strahlenschutzwirksamen SH-Körpers gemacht.
3. Die Hemmung ist in beiden Fällen von der Konzentration des verwendeten SH-Schutzstoffes abhängig.
4. Disulfide, die als Strahlenschutzstoffe keine oder eine nur sehr geringe Wirkung haben, zeigen diese Hemmung weder *in vitro* noch nach Injektion am lebenden Tier. Die Hemmung der Aktivität der Fermente, welche das im Gewebe gebildete Histamin abbauen oder verändern, ist daher in diesem Falle vom Vorhandensein der freien SH-Gruppe abhängig.
5. Auf Grund dieser Ergebnisse wird vermutet, daß die durch diese Vorgänge erzeugte lokale Häufung des Histamins im Gewebe möglicherweise eine zusätzliche Schutzwirkung hervorruft, die auf der bereits bekannten, pharmakologisch bedingten Schutzwirkung des Histamins beruht.

#### ZITIERTE LITERATUR

sowie eine eingehende Darstellung der angewandten Methodik finden sich in:

PANY, J., 1963. Der Einfluß schwefelhaltiger Strahlenschutzstoffe auf den Stoffwechsel des Histamins. *Z. ges. exp. Med.* **137**, 609–618.

#### *Diskussion im Anschluß an den Vortrag PANY*

OHNESORGE: Wirken Histaminliberatoren strahlenschützend? In welchem Allgemeinzustand befinden sich die Tiere nach wirksamen Dosen von Strahlenschutzstoffen?

PANY: Wir haben die Konzentrationen der Sulfhydrilkörper so gewählt, wie sie im Strahlenschutzversuch am lebenden Tier auch verwendet werden. Die Tiere zeigen keine besonderen Erscheinungen und überleben alle. Es sind alle diese Substanzen hinsichtlich ihrer Toxizität untersucht worden, und wir sind in allen Fällen ziemlich unter dieser toxischen Dosis geblieben. Die Tiere haben also durch die Sulfhydrilverbindungen keinerlei nachhaltige Störungen erlitten.

OHNESORGE: Und Sie unterkühlen auch nicht?

PANY: Im Zusammenhang mit den von mir hier mitgeteilten Untersuchungen haben wir diese Frage nicht untersucht.

LOCKER: In einer gemeinsam mit Herrn PANY durchgeführten, noch nicht abgeschlossenen Untersuchung wurde der Einfluß der SH-Gruppen tragenden Strahlenschutzstoffe AET und Cysteamin auf den Gesamtstoffwechsel und die Körpertemperatur geprüft. Es zeigte sich, daß beide Substanzen in strahlenschützenden Dosen den O<sub>2</sub>-Verbrauch und die Körpertemperatur der Maus herabsetzen. Was die von Herrn OHNESORGE vorhin gestellte Frage nach einem möglichen Strahlenschutzeffekt von Histaminliberatoren betrifft, so darf auf die noch nicht veröffentlichten Ergebnisse hingewiesen werden, die Herr GABLER in Wien mit dem Histaminliberator 48/80 erzielte. Dieser Stoff wirkt nicht nur bei Mäusen, Ratten und Meerschweinchen strahlenschützend, sondern zeigt auch, zu einem bestimmten Zeitpunkt nach der Bestrahlung appliziert, einen therapeutischen Effekt.