

FOLAT-KATALYSIERTE ELIMINATION DER AMEISENSÄURE BEI METHANOLVERGIFTUNG

N. RIETBROCK,* W. HERKEN und U. ABSHAGEN

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Würzburg

(Received 16 February 1971; accepted 25 March 1971)

Abstract—The elimination of formate as catalysed by folate has been investigated during the course of methanol poisoning. The speed of formate elimination varies for different species; the half life ($t_{1/2}$) of formate is 12 min in rats and 32 min in rabbits. In contrast it is 55 min in man and 77 min in the dog. A reciprocal correlation exists between formate half life and folate concentrations in plasma as determined with *S. faecalis* and *L. casei*.

Treatment of methanol poisoned dogs with amethopterin leads to a remarkable rise of formate concentrations both in plasma and urine. On the contrary, an almost complete lack of accumulation of formate in plasma and urine was observed after preventive application of folate. It is suggested that therapeutic doses of folic acid enable the organism to eliminate toxic formic acid at a sufficient speed. An optimal effect was obtained with 2.5 mg/kg for dogs. An explanation for this can be found in the increased concentration of reduced folate enzymes leading to a faster elimination of formate. The occurrence of a stimulation of folate dependent enzyme systems, e.g. dihydrofolate reductase, is also discussed.

DIE TATSACHE, daß der Folatbestand der Gewebe von Spezies zu Spezies bzw. von Mensch zu Mensch in weiten Grenzen schwankt,¹ könnte für die unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber Methanol verantwortlich sein. Die spezifisch toxischen Wirkungen bei der Methanolvergiftung beruhen nämlich, wie neuere Untersuchungen^{2,3} zeigen, auf der im Organismus akkumulierten Ameisensäure. Die durch den Ameisensäureanstau hervorgerufene metabolische Acidose korreliert nach Ausmaß und Zeit genau mit den Ameisensäurekonzentrationen im Plasma.³ Offenbar ist die Entgiftung des Formiats im C₁-Stoffwechsel durch den Folatbestand des Organismus begrenzt. Dafür spricht, daß sich durch Folsäuremedikation das Auftreten von toxischen Ameisensäurekonzentrationen im Plasma methanolvergifteter Hunde weitgehend unterdrücken läßt.⁴ Der gleiche Effekt ist jedoch auch mit Vitamin B₁₂ zu erreichen.⁵

Ziel der Arbeit ist daher zu prüfen, ob zwischen der Geschwindigkeit der Ameisensäureelimination und der Folatkonzentration im Plasma verschiedener Spezies eine Korrelation besteht. Daran schließt sich die Aufgabe an, die Methanolelimination beim Hund unter Folsäure- und Amethopterin-Zufuhr anhand der Plasma- und Urinkonzentrationen quantitativ zu untersuchen. Um festzustellen, welche Folsäurespiegel im Plasma methanolvergifteter Hunde zur raschen und wirksamen Ameisensäureelimination notwendig sind, werden definierte Dosen von Folsäure intravenös verabfolgt und die Dosiswirkungsbedingungen festgelegt. Schließlich sollen die durch

* Present address: Institut f. Klinische Pharmakologie, Klinikum Steglitz der FU Berlin, Berlin 45, Hindenburgdamm 30.

exogene Folatezufuhr auftretenden Änderungen der Folateaktivitäten im Plasma verfolgt werden.

METHODIK

Die Versuche wurden an Ratten (Wistar, Af/Han 200–300 g), Kaninchen (2–4 kg und Hunden beiderlei Geschlechts durchgeführt. Das Körpergewicht der Hunde lag zwischen 12 bis 34 kg. Als Nahrung erhielten die Tiere "Altromin" der Firma Altrogge GmbH., Lage/Lippe, und Leitungswasser ad libitum. Für die Wahl der Spezies waren zwei Gesichtspunkte maßgebend. Erstens sollten die Tiere mit rascher Ameisensäureelimination mit solchen verglichen werden, bei denen die Elimination langsamer erfolgt. Ferner sollte besonderen Wert auf den Hund gelegt werden, da diese Spezies den Verhältnissen am Menschen so nahe kommt, daß sie als repräsentatives Versuchstier für die Methanolintoxikation benutzt werden kann.⁴ Neben Versuchsreihen an verschiedenen Tierspezies sind Versuche an gesunden Probanden durchgeführt worden.

Von den verwendeten Substanzen wurden intravenös appliziert: Methanol (p.a.) nach Verdünnung in 0,9% NaCl als 30% Lösung, Natriumformiat bei Tieren als 0,4 M Lösung, beim Menschen als 0,15 M, isotone, sterilisierte Lösung, Folsäure als Natriumsalz, wozu die kristalline Substanz zunächst in 1n NaOH gelöst und mit Phosphatpuffer auf pH 7 eingestellt wurde.

Amethopterin (Methotrexat,^R Lederle) wurde in Substanz per os verabreicht.

ANALYTISCHE METHODEN

Die Methanolbestimmung erfolgte über die Oxydation von Methanol zu Formaldehyd durch phosphorsaure, gesättigte Kaliumpermanganatlösung und dessen Bestimmung mit Chromotropsäure. (Einzelheiten bei Rietbrock⁶), die Ameisensäurebestimmung nach der Methode von Rietbrock und Hinrichs,⁷ die Folsäurebestimmung nephelometrisch nach einem von Waters und Mollin⁸ sowie Spray⁹ angegebenen Verfahren. Als Nährmedien dienten die vollständig dehydrierten Medien der Firma Difco, Lab., die frei von Folsäure sind, jedoch alle übrigen zum Wachstum des jeweiligen Bakterienstammes erforderlichen Faktoren enthalten: Folic acid casei medium ATCC 7469, code 8022, zur Bestimmung von Folat mittels *L. casei* ATCC 7469 und Bacto-folic TE medium ATCC 8043, code 0968 zur Folatbestimmung mittels *Str. faecalis* ATCC 8043.

ERGEBNISSE

1. Korrelation zwischen Folatkonzentration und Formiat-Halbwertszeit im Plasma verschiedener Spezies

Mit Hilfe mikrobiologischer Methoden ist es möglich, zwei verschiedene Aktivierungsstufen von Folat im Plasma zu differenzieren: *Streptococcus faecalis* ATCC 8043 spricht nicht auf 5-Methyltetrahydrofolat an, dagegen auf alle anderen reduzierten Stufen von Tetrahydrofolat. *Lactobazillus casei* ATCC 7469 erfaßt dagegen die Gesamtfolate, die im Organismus ganz überwiegend in Form von 5-Methyltetrahydrofolat, der Speicher- und Transportform der Folsäure, vorliegen. Die Folatkonzentrationen im Plasma bei Mensch, Hund, Kaninchen und Ratte wurden gemessen und in Beziehung zur FormiatHWZ gesetzt. Über die Resultate gibt Tabelle 1 Aufschluß.

TABELLE 1. HALBWERTZEITEN (HWZ) VON FORMIAT IN BEZIEHUNG ZU DEN PLASMAFOLATAKTIVITÄTEN BEI VERSCHIEDENEN SPEZIES

Spezies	Folataktivität (ng/ml)		Formiat-HWZ (min)
	<i>L. casei</i>	<i>Str. faecalis</i>	
Mensch (<i>n</i> = 11)	15,5 ± 2,2	6,6 ± 0,7	55
Hund (<i>n</i> = 37)	15,5 ± 1,7	6,1 ± 0,9	77
Kaninchen (<i>n</i> = 17)	49,2 ± 6,9	15,2 ± 1,4	32
Ratte (<i>n</i> = 21)	126,0 ± 16,6	37,8 ± 8,9	12

Die Gesamtkonzentrationen an Folat sind bei Mensch und Hund etwa gleich groß. Demgegenüber liegen die Konzentrationen beim Kaninchen 3 mal bzw. bei der Ratte 8–9 mal höher als bei Mensch und Hund. Das Verhältnis der im Plasma mit *Str. faecalis* und *L. casei* bestimmten Anteile ist annähernd konstant. Die Relationen schwanken zwischen 0,30 und 0,43. In der rechten Spalte von Tabelle 1 sind die Halbwertszeiten für Ameisensäure im Plasma bei den untersuchten Spezies aufgeführt. Höhere Folsäurekonzentrationen im Plasma sind mit niedrigeren Formiat-Halbwertszeiten korreliert. Dieses gilt gleichermaßen für die mit *L. casei* bestimmten Folate wie auch für die mit *Str. faecalis* bestimmten reduzierten Anteile.

2. Beeinflussung der Methanolelimination durch Folsäure und Amethopterin

Nachdem somit eine positive Korrelation zwischen der jeweiligen Geschwindigkeit der Ameisensäureelimination und den Plasmafolatspiegeln der untersuchten Spezies festgestellt war, sollte im folgenden geprüft werden, ob Änderungen des aktuellen Folatbestandes des Organismus durch exogene Zufuhr von Folsäure einerseits und Gabe von Amethopterin andererseits gleichsinnige Änderungen in der Elimination der Ameisensäure nach Methanolgabe bedingen. Hierzu erhielt eine Gruppe von 4 Hunden 72, 48 und 24 Std. vor der Methanolvergiftung 10 mg/kg Folsäure als Natriumsalz intravenös, eine andere Gruppe von 5 Tieren einzeitig 0,75 mg/kg Amethopterin per os 3 Tage vor Versuchsbeginn. Eine weitere Gruppe von 10 Tieren, der nur 2 g/kg Methanol verabfolgt wurde, diente als Kontrolle. Die Resultate sind in Abb. 1 aufgezeichnet.

Die Methanolelimination aus dem Plasma bei Kontrollhunden ergibt eine reguläre Ausscheidungskurve. Wenige Stunden nach der Zufuhr des Methanols steigt der Ameisensäurespiegel im Plasma an. Zwischen 24 und 48 Stunden erreichen die Werte ihr Maximum mit ca. 3,5 mmole/l. Ab dem dritten Tag nach Methanolzufuhr sinkt die Formiatkonzentration langsam ab, um zwischen dem 4. und 5. Tag zur Norm zurückzukehren. Die Konzentrationen an Methanol und Ameisensäure im Harn entsprechen bezüglich des zeitlichen Verlaufs denen im Plasma. Eine Vorbehandlung mit Amethopterin* führt bei methanolvergifteten Hunden zu einer erheblichen Steigerung der Ameisensäureakkumulation im Plasma. Dementsprechend scheiden

* Die Wirkung des Folsäureantagonisten beruht bekanntlich darauf, daß eine Aktivierung des Folsäurezyklus durch Reduzierung zum Tetrahydrofolat blockiert wird. Hunde reagieren nach Dosen ab 2 mg/kg mit toxischen Erscheinungen: Neben allgemeiner Abgeschlagenheit, rapider Abmagerung und Exsikkose stellen sich vor allem profuse Diarrhöen und mehr oder weniger stark ausgebildete Blutungen der Darmschleimhaut ein. Bei der hier eingesetzten Dosis von 0,75 mg/kg Amethopterin sind Unverträglichkeitserscheinungen auf gelegentliche Durchfälle ohne Blutungen und eine Nahrungsverweigerung für wenige Tage beschränkt.

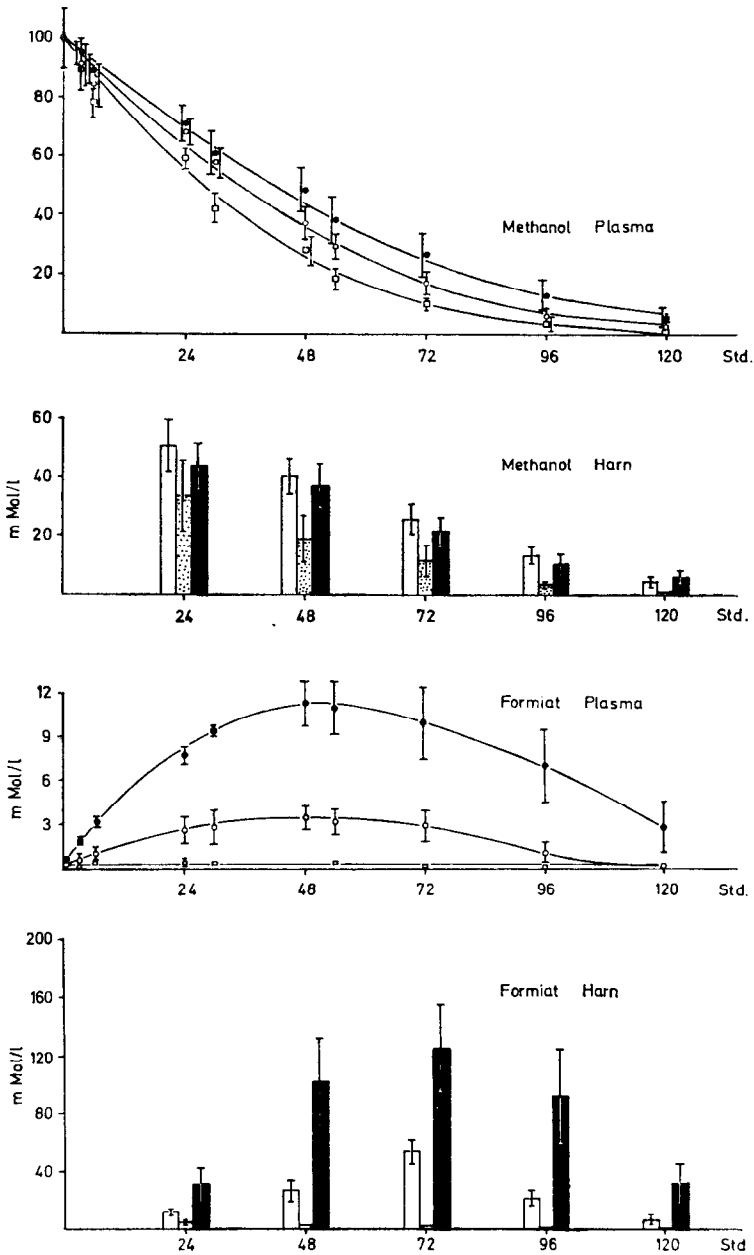


ABB. 1. Methanol- und Ameisensäurespiegel im Plasma und Harn bei 10 Kontrolltieren, 4 mit Folsäure und 5 mit Amethopterin behandelten Hunden. Methanolkonzentrationen im Plasma normiert ($C_0 = 100$). Offene Kreise und weiße Säulen: 2 g/kg Methanol i.v., geschlossene Kreise und schwarze Säulen: 2 g/kg Methanol und Vorbehandlung mit einmal 0,75 mg/kg Amethopterin p.o., offene Vierecke und gepunktete Säulen: Vorbehandlung mit 10 mg/kg Folsäure i.v. über 3 Tage.

diese Tiere auch wesentlich mehr Ameisensäure im Harn aus als die nicht mit Amethopterin behandelten Hunde. Die Methanolausscheidung im Harn zeigt dagegen im Vergleich mit den Kontrollhunden keine Veränderung.

Umgekehrt sollte es durch prophylaktische Folsäuregaben möglich sein, das Eliminationsvermögen für Ameisensäure zu steigern. Tatsächlich bleibt unter Vorbehandlung der Hunde mit Natriumfolat in der bereits genannten Dosierung eine Anhäufung von Ameisensäure in Plasma und Harn vollständig aus.

Betrachtet man vergleichend die Methanolkonzentrationen in Plasma und Harn für die drei Versuchsgruppen, so sind die gefundenen Unterschiede gering. Eine Beschleunigung bzw. Hemmung der Methanolelimination unter Folsäure und Amethopterin findet offenbar nicht statt. Es besteht auch kein Anhalt für die Annahme, daß Folatcoenzyme an der Methanoloxydation direkt beteiligt sind.

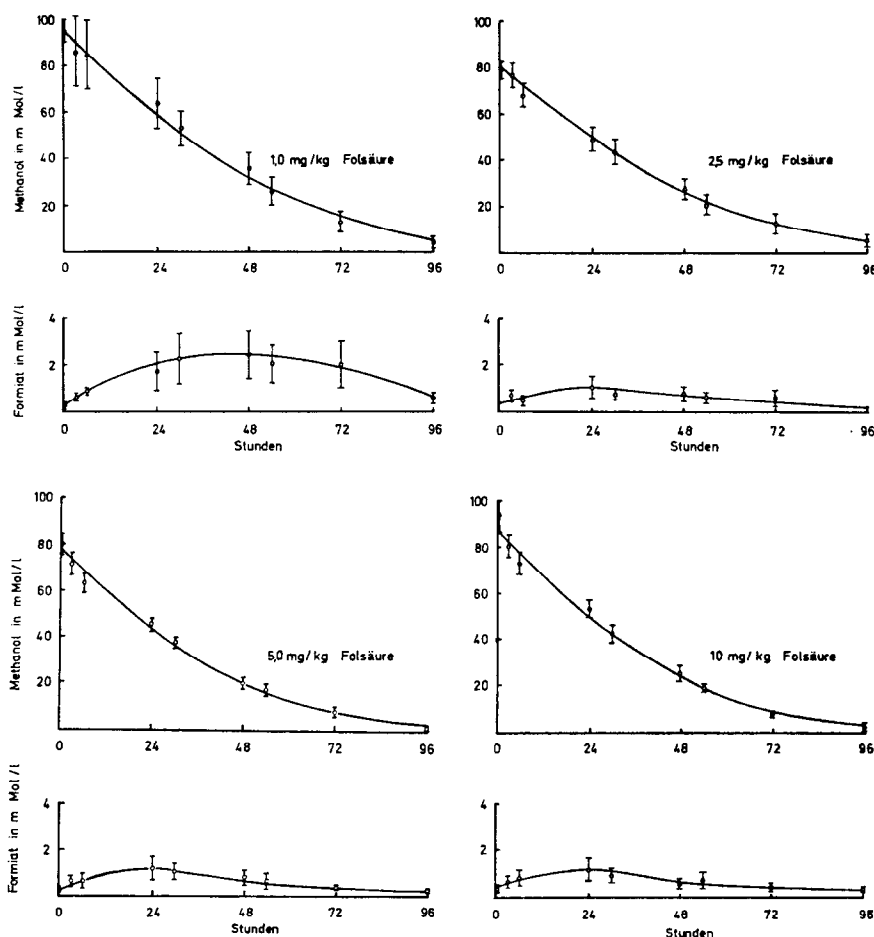


ABB. 2. Beeinflussung der Ameisensäureelimination bei mit 2 g/kg Methanol vergifteten Hunden durch intravenöse Folsäuregaben in einer Dosierung von 1 mg/kg Folsäure ($n = 5$), 2,5 mg/kg Folsäure ($n = 5$), 5 mg/kg Folsäure ($n = 5$) und 10 mg/kg Folsäure ($n = 10$) 15 min, 24 und 48 Std. nach Methanolzufuhr. Kontrolltiere vgl. Abb. 1.

3. Beeinflussung der Methanolelimination durch therapeutische Folsäuregaben—Dosis-Wirkungsbeziehungen

Die Unterdrückung der Ameisensäureakkumulation bei der Methanolvergiftung des Hundes durch Folsäureprämedikation, ließ den Versuch aussichtsreich erscheinen, Folsäure in therapeutischen Dosen bei der Methanolvergiftung des Hundes einzusetzen. Zu diesem Zwecke erhielten 3 Gruppen von jeweils 5 Hunden und eine Gruppe mit 13 Hunden abgestufte Dosierungen von Folsäure als Na-Salz: Gruppe (1) 10,0 mg/kg, Gruppe (2) 5 mg/kg, Gruppe (3) 2,5 mg/kg und Gruppe (4) 1,0 mg/kg an drei aufeinanderfolgenden Tagen nach Gabe von 2 g/kg Methanol i.v. Die Kontrollgruppe von 5 Tieren erhielt nur 2 g/kg Methanol. Die Resultate dieser Versuchsserie sind in Abb. 2 dargestellt. Im Plasma aller 5 Gruppen fallen die Methanolkonzentrationen gleichmäßig ab. Innerhalb der 4 mit Folsäure behandelten Gruppen sind keine signifikanten Unterschiede in der Eliminationsgeschwindigkeit des Methanols festzustellen. Demgegenüber wird der Ameisensäurespiegel im Plasma unter Folsäure signifikant gesenkt. Nach Zufuhr von 1 mg/kg Folsäure an drei aufeinanderfolgenden Tagen wird das Maximum nach 48 Stunden erreicht—6 Stunden früher als bei der Kontrollgruppe—und beträgt etwa die Hälfte des bei dieser gefundenen Wertes von 3,5 mmole/l. Die nächst höhere Dosierung von 2,5 mg/kg Folsäure hingegen unterdrückt die Akkumulation noch stärker. Das Maximum von 1,1 mmole/l. liegt hier bei 24 Stunden. Analoge Verhältnisse finden sich bei einer Dosierung von 5,0 und 10,0 mg/kg Folsäure.

4. Folsäurespiegel im Plasma des Hundes nach Zufuhr von Folsäure

Es war weiter zu klären, inwieweit durch exogene Folatzufuhr Änderungen der Folataktivitäten im Plasma des Hundes auftreten. Zwei Gruppen mit jeweils 5 Tieren

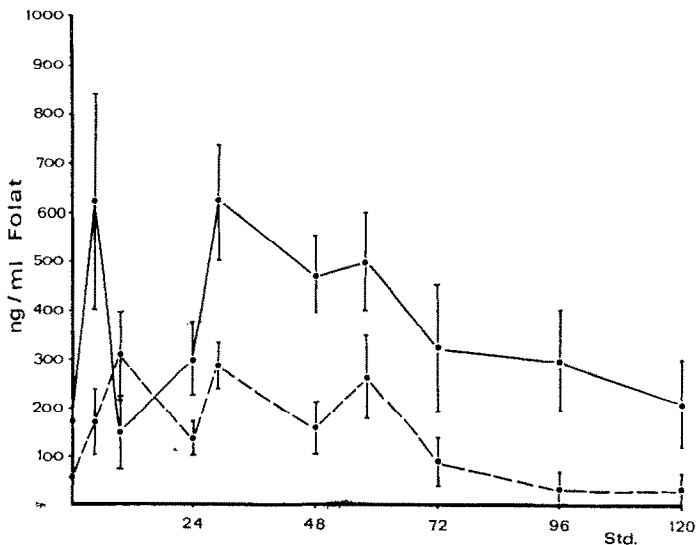


ABB. 3 (a). Folatkonzentrationen im Plasma bei mit 2 g/kg Methanol vergifteten Hunden nach 1 mg/kg Folsäure i.v. nach 15 min, 24 und 48 Std. nach Methanolgabe. Obere Kurve: Bestimmung mit *L. casei*, untere Kurve: Bestimmung mit *Str. faecalis* ($n = 5$).

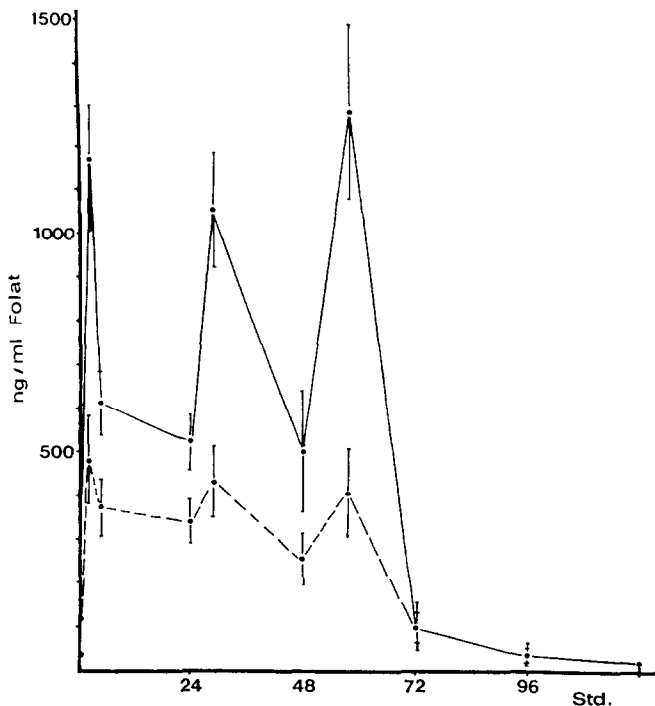


ABB. 3 (b). Folatkonzentrationen im Plasma bei mit 2 g/kg Methanol vergifteten Hunden nach 2,5 mg/kg Folsäure i.v. 15 min, 24 und 48 Std. nach Methanolgabe. Obere Kurve: Bestimmung mit *L. casei*, untere Kurve: Bestimmung mit *Str. faecalis* ($n = 5$).

erhielten nach Gabe von 2 g/kg Methanol 1,0 bzw. 2,5 mg/kg Folsäure an drei aufeinanderfolgenden Tagen. In regelmäßigen Abständen wurden im Plasma Gesamtfolat und reduzierte Anteile bestimmt. Die Resultate sind in Abb. 3a und 3b aufgezeichnet. Man erkennt als charakteristisch für den Verlauf der Folatspiegel, daß zwar nach jeder Folsäuregabe Gesamtfolat und reduzierte Anteile rasch ansteigen, zwischen zwei Folatgaben aber ein ebenso schneller Abfall erfolgt. Die Halbwertszeit exogen zugeführter Folsäure im Plasma des Hundes beträgt nach eigenen Beobachtungen etwa 40 min.* Das Konzentrationsverhältnis reduzierter Folsäure zu Gesamtfolsäure steigt nach 1 mg/kg von 0,32 im Mittel auf 0,65. Somit stehen dem Organismus nach höheren Dosen Folsäure auch höhere Konzentrationen reduzierter Folatstufen zur Entgiftung der Ameisensäure zur Verfügung.

DISKUSSION

Ameisensäure wird im Gegensatz zu Formaldehyd von verschiedenen Spezies langsamer und mit unterschiedlicher Geschwindigkeit umgesetzt.^{6,12} Bei vergleichbarer Dosierung beträgt die Formiat-HWZ bei Mensch und Hund 55 bzw. 77 min, bei der Ratte nur 13 min. Zwischen diesen Extremen liegen die Halbwertszeiten von Katze, Kaninchen und Meerschweinchen. Der limitierende Faktor für die Geschwindigkeit der Formiatelimination ist offenbar der Folatbestand des Organismus. Dem entspricht

* Beim Menschen soll die Halbwertszeit der Folsäure in gleicher Größenordnung liegen.^{10,11}

In diesem Zusammenhang ist in erster Linie eine Stimulierung folatabhängiger Enzymsysteme durch Folsäuregabe zu diskutieren. Ein Modell für derartige coenzymbedingte Enzyminduktionen haben Untersuchungen von Reinauer und Mitarb.¹⁴ geliefert. Sie beobachteten nach Thiamingabe bei Thiaminmangeltieren einen Aktivitätsanstieg der Pyruvatdehydrogenase, der nicht durch eine einfache Aktivierung mittels Thiamin-Pyrophosphat bedingt sein konnte. Während das Maximum der Aktivität von Pyruvatdehydrogenase erst nach 10–12 Std. auftrat, war der normale TPP-Gehalt bereits nach 4–6 Std. erreicht. Der Aktivitätsanstieg konnte durch Aktinomycin D und Cyclohexamid gehemmt werden. Es wurde demnach durch Thiamingabe eine Enzymneusynthese ausgelöst, die extramitochondrial in den Ribosomen abläuft.¹⁵ Durch Untersuchungen unseres Arbeitskreises¹⁴ wird ein derartiger Mechanismus auch für Folsäure und folatabhängige Enzymsysteme nahegelegt. Nach intraperitonealer Gabe von 3×10 mg/kg Folsäure an drei aufeinanderfolgenden Tagen konnte bei Ratten ein Aktivitätsanstieg der Dihydrofolatreduktase nachgewiesen werden, der 24 Stunden nach Gabe der ersten Dosis einsetzte.

In früheren Versuchen wurden zur Unterdrückung der Ameisensäureakkumulation nach 2 g/kg Methanol Folatdosen von 3×10 mg/kg als therapeutische Maßnahme empfohlen.⁴ Nach den vorliegenden Befunden würde schon eine Dosis von 2,5 mg/kg an 3 aufeinanderfolgenden Tagen genügen, da mit 5,0 bzw. 10,0 mg/kg Folsäure keine Steigerung des therapeutischen Effekts erzielt werden konnte. Ein Nachteil der Therapie mit Folsäure ist darin zu sehen, daß erst eine Latenzzeit von 12–24 Stunden vergeht, bis diese Medikation voll wirksam wird. Daraus läßt sich ableiten, daß Folsäuregaben keineswegs als alleiniges Behandlungsprinzip zur Anwendung gelangen sollten. Die optimale Behandlung der Methanolvergiftung liegt in einer sinnvollen Kombination von drei Behandlungsprinzipien: nämlich der Gabe von Äthanol, von Folsäure und von alkalisierenden Substanzen.⁶

Zusammenfassung—Es wird die Folat-katalysierte Elimination der Ameisensäure bei Methanolvergiftung untersucht. Ameisensäure wird von verschiedenen Spezies mit unterschiedlicher Geschwindigkeit eliminiert. Am schnellsten entgiftet die Ratte (HWZ 12 min), es folgt das Kaninchen (HWZ 32 min). Dagegen entgiften Hund (HWZ 77 min) und Mensch (HWZ 55 min) relativ langsam. Zwischen den Formiathalbwertzeiten und den mit *Str. faecalis* und *L. casei* bestimmten Plasma-Folatkonzentrationen der untersuchten Spezies besteht eine enge Beziehung. Höhere Folatkonzentrationen im Plasma sind mit niedrigeren Formiathalbwertzeiten korreliert.

Vorbehandlung mit Amethopterin führt bei methanolvergifteten Hunden zu einer starken Steigerung der Ameisensäureakkumulation im Plasma und Harn. Demgegenüber bleibt eine Akkumulation von Ameisensäure im Plasma und Harn unter prophylaktischer Folsäuregabe vollständig aus. Eine curative Zufuhr von Folsäure vermag die Formiathanhäufung im Organismus weitgehend zu unterdrücken. Die optimale therapeutische Folatdosis bei methanolvergifteten Hunden liegt bei 2,5 mg/kg. Durch Folsäuregabe wird die Konzentration an reduzierten, leicht verwertbaren Folatenzymen angehoben und damit die Elimination der Ameisensäure beschleunigt. Darüber hinaus wird eine Stimulierung folatabhängiger Enzymsysteme durch Folsäuregaben diskutiert.

LITERATUR

1. F. A. ROBINSON, *The Vitamin Co-Factors of Enzyme Systems*. Pergamon Press, Oxford (1966).
2. W. HERKEN, N. RIETBROCK und D. HENSCHLER, *Arch. Tox.* **24**, 214 (1969).
3. N. RIETBROCK, W. HERKEN und D. HENSCHLER, *Arch. Tox.* **24**, 229 (1969).
4. N. RIETBROCK, B. STIEREN und G. MALORNY, *Klin. Wschr.* **44**, 1318 (1966).
5. G. MALORNY und B. STIEREN, *Med. Pharmac. Exp.* **17**, 315 (1967).
6. N. RIETBROCK, Habilitationsschrift, Würzburg (1968).
7. N. RIETBROCK und W. D. HINRICHS, *Klin. Wschr.* **42**, 981 (1964).

8. A. H. WATERS und D. L. MOLLINS, *J. clin. Path.* **14**, 335 (1961).
9. G. H. SPRAY, *J. clin. Path.* **17**, 660 (1964).
10. G. H. SPRAY und L. J. WITTS, *Clin. Sci.* **11**, 273 (1952 a).
11. G. H. SPRAY und L. J. WITTS, *Br. med. J.* **2**, 62 (1952 b).
12. G. MALORNY, N. RIETBROCK und M. SCHNEIDER, *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmak. exp. Path.* **250**, 419 (1965).
13. V. DU VIGNEAUD, W. VERLY, J. E. WILSON, J. R. RACHELE, CH. RESSLER und J. M. KINNEY, *Am. chem. Soc.* **73**, 2787 (1951).
14. H. REINAUER, G. GRASSOW und S. HOLLMANN, *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* **349**, 969 (1968).
15. H. REINAUER und S. HOLLMANN, *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* **350**, 40 (1969).
16. M. NAGHDI, Dissertation, Würzburg (1970).