

## Serumfolsäurespiegel unter antiepileptischer Langzeittherapie

K.-H. Krause, H. Schmidt-Gayk, D. Gutscher und G. Gutscher

Abteilung für Epileptologie und klinische Neurophysiologie (Direktor: Prof. Dr. W. Christian) der Neurologischen Universitätsklinik (Direktor: Prof. Dr. H. Gänshirt) und Medizinische Universitätsklinik (Direktor: Prof. Dr. G. Schettler) Heidelberg

### Serum Folic Acid in Anticonvulsant Long Term Therapy

**Summary.** No significant difference was found in a comparison between the values of unreduced serum folic acid of 48 epileptics treated with hydantoin and 38 controls as measured by a competitive protein-binding assay. The average folic acid value was 7.73 nmol/l in the epileptics, a little higher than the 7.18 nmol/l found in the controls. This result supports the hypothesis that the folate deficiency in epileptics is caused by blocking the conversion of folic acid to 5-methyltetrahydrofolic acid by phenytoin.

**Key words:** Phenytoin toxicity – Anticonvulsant long-term therapy – Folic acid – Competitive protein-binding assay.

**Zusammenfassung.** Bei einem Vergleich der mit Hilfe der kompetitiven Protein-Bindungs-Analyse gemessenen Werte der unreduzierten Folsäure im Serum zwischen 48 mit Hydantoin behandelten Epileptikern und 38 Normalpersonen ergab sich kein signifikanter Unterschied der Mittelwerte. Durchschnittlich lag der Folsäurespiegel bei den Epileptikern mit 7,73 nmol/l gegenüber 7,18 nmol/l bei den Kontrollpersonen etwas höher. Dieser Befund stützt die Hypothese, daß der Folatmangel bei Epileptikern auf einer Blockierung der Umwandlung von Folsäure in 5-Methyltetrahydrofolsäure durch Diphenylhydantoin beruht.

**Schlüsselwörter:** Hydantoin-Nebenwirkungen – Antikonvulsive Langzeitbehandlung – Folsäure – Kompetitive Protein-Bindungs-Analyse.

### Einleitung

Mit einer kompetitiven Protein-Bindungs-Analyse ist es möglich, bei der Messung der Folate ganz überwiegend den unreduzierten Anteil, die Pteroylglutaminsäure, zu erfassen. Zur weiteren Klärung der Frage, auf welchem Mechanismus der

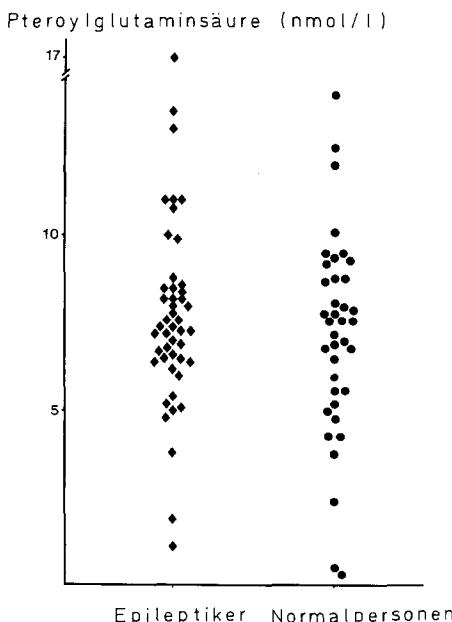
*Sonderdruckanforderungen an:* Dr. med. K.-H. Krause, Neurologische Universitätsklinik, Voßstr. 2, D-6900 Heidelberg, Bundesrepublik Deutschland

bekannte Folatmangel unter Einnahme von Antiepileptika beruht, erschien es daher von Interesse, die mit dieser Methodik bei Normalpersonen festgestellten Folsäurespiegel im Serum mit denen von antiepileptisch behandelten Patienten zu vergleichen.

## Material und Methode

Das Prinzip der Protein-Bindungs-Analyse ist die Konkurrenz zwischen markierter Folsäure (Tracer) und Serumfolsäure um die Bindungsstellen am Bindungsprotein. Da am Ende der Inkubation der gebundene radioaktive Tracer im Gamma-Zähler gemessen wird, gilt folgende Regel: Je mehr Folsäure im Serum ist, desto weniger Tracer wird gebunden und anschließend gemessen. In Modifikation des von Dunn und Foster [3] angegebenen Verfahrens verwenden wir mit  $J_{125}$  markierte Folsäure als Tracer (Fa. Becton und Dickinson, Heidelberg) und einen Milchextrakt in Phosphatpuffer pH 7,4 als Bindungsprotein (enthält Laktoglobulin). Der Milchextrakt wurde nach dem von Rothenberg et al. [18] angegebenen Verfahren gewonnen. An Aktivkohle (Norit A, Partikelgröße 4–7  $\mu$ , Fa. Serva, Heidelberg), 5 mg/Ansatz, versetzt mit Dextran T 70 (Fa. Roth, Karlsruhe), 0,5 mg/Ansatz, wird die nicht gebundene Folsäure adsorbiert und abgetrennt. Mit Hilfe von Folsäure-Standards lässt sich eine Eichkurve konstruieren, anhand derer man die Serumfolsäurespiegel ermittelt. Mit dieser Methode wurden die Folsäurespiegel von 48 erwachsenen Patienten der Heidelberger Anfallambulanz mit einem Durchschnittsalter von  $40,8 \pm 16,3$  ( $\bar{x} \pm s.d.$ ) bestimmt, die mindestens ein Jahr lang Hydantoin, teils als Monotherapie ( $n = 8$ ), teils in Kombination mit Primidon, Phenobarbital oder Carbamazepin ( $n = 40$ ) erhalten hatten (durchschnittliche Behandlungsdauer  $9,4 \pm 5,2$  Jahre). Als Vergleichsgruppe dienten 38 gesunde Kontrollpersonen im Alter von 20–40 Jahren ( $\bar{x} \pm s.d.$ :  $30,2 \pm 5,7$ ), deren Seren alternierend mit den Epileptiker-Seren im selben Assay gemessen wurden.

Der statistische Vergleich der für die beiden Gruppen gefundenen Meßwerte erfolgte mit dem Wilcoxon-Test.



**Abb. 1.** Serumspiegel der Pteroylglutaminsäure in nmol/l bei mit Hydantoin behandelten Epileptikern ( $n = 48$ ) und bei Normalpersonen ( $n = 38$ )

## Ergebnis

Bei den 48 Epileptikern betragen die Folsäurespiegel im Serum  $7,73 \text{ nmol/l} \pm 2,68$  ( $\bar{x} \pm \text{s. d.}$ ), bei den Kontrollpersonen  $7,18 \text{ nmol/l} \pm 2,88$  (Abb. 1). Bei Untersuchung mit dem Wilcoxon-Test lag die Prüfgröße K bei einem Signifikanzniveau von 0,05 und zweiseitiger Alternativhypothese mit 0,726 im Sicherheitsbereich; es ließen sich somit keine Unterschiede zwischen den Folsäurespiegeln der Epileptiker und der Kontrollpersonen nachweisen.

## Diskussion

Seit der Erstbeschreibung einer Megaloblastenanämie unter Antiepileptika durch Mannheimer et al. [13] wurden zahlreiche Untersuchungen des Folats bei entsprechenden Patienten durchgeführt. Eine Erniedrigung der Folatwerte im Serum bei behandelten Epileptikern wurde in 27 bis 91% festgestellt [1, 2, 7-9, 12, 16, 17, 19, 20]. In allen diesen Untersuchungen erfolgte die Messung in einem mikrobiologischen Assay mit *Lactobacillus casei*, wobei ganz überwiegend die 5-Methyl-Tetrahydropteroylglutaminsäure bestimmt wird [5]. Die Ursache des mit dieser Methodik festgestellten Folatmangels bei Epileptikern ist unklar. Eine Interferenz mit der Folsäureabsorption [6] oder eine Verdrängung der Folsäure von ihrem Plasmaprotein durch Diphenylhydantoin [10] wurde ebenso vermutet wie eine kompetitive Hemmung bei der Bildung von 5-Methyltetrahydrofolat aus Folsäure [5]. Fehling et al. fanden bei ihrer Untersuchung der Absorption von oral zugeführter Folsäure keinen Unterschied zwischen einem Normalkollektiv und Epileptikern; sie folgerten, daß als Ursache der erniedrigten Folatspiegel bei Epileptikern eine Interferenz mit der intestinalen Konjugase oder dem Mechanismus der Absorption selbst nicht wahrscheinlich sei [4]. Zum gleichen Ergebnis kamen kürzlich Nelson et al., die bei Normalpersonen keine verminderte Folat-Absorption nach Gabe von Diphenylhydantoin sahen [15]. Mattson et al. fanden, daß die Folatspiegel im Liquor bei Gabe von Folsäure nicht signifikant anstiegen, wohl aber bei Gabe von 5-Formyltetrahydrofolsäure (Leucovorin); da Folsäure in Gegenwart von Hydantoin kaum [21], 5-Methyltetrahydrofolat dagegen gut vom Blut in den Liquor transportiert wird [11], schlossen sie daraus, daß die Antikonvulsia wahrscheinlich mit der Konversion von Folsäure zu 5-Methyltetrahydrofolsäure interferieren [14]. Das von uns mit dem Protein-Bindungs-Assay festgestellte Fehlen eines Unterschiedes zwischen Epileptikern und Normalpersonen hinsichtlich der durchschnittlichen Serumwerte für die unreduzierte Folsäure bestätigt die Richtigkeit dieser Annahme. Danach liegt auch bei antiepileptisch Langzeitbehandelten eine normale Absorption von Folsäure aus dem Darm mit weitgehend gleichem Folsäurespiegel im Blut vor. Eine der Wirkformen der Folsäure im Organismus stellt aber die reduzierte Form, die 5-Methyltetrahydrofolsäure, dar, die bei den bisherigen Untersuchungen, die mit dem mikrobiologischen Assay vorzugsweise diese Fraktion erfaßten, erniedrigt war. Es sollte daher geprüft werden, ob bei Fällen, in denen wegen des Vorliegens von neurologischen oder hämatologischen Symptomen des Folatmangels eine Substitution erfolgen muß, durch Anwendung von 5-Methyltetrahydrofolat auch in niedrigerer Dosis gegenüber der bisher durchgeführten

Folsäuregabe ein besserer therapeutischer Effekt zu erreichen ist. Für die richtige Interpretation der Folatwerte im Hinblick auf eine mögliche Störung des Folatstoffwechsels bei unter chronischer Antiepileptika-Medikation stehenden Anfallskranken erscheint es nach unserer Untersuchung unbedingt erforderlich, daß die Folsäure-bestimmenden Laboratorien angeben, welche Fraktionen bei ihrem Nachweisverfahren erfaßt werden (Folsäure oder reduzierte Folate).

## Literatur

- Child, J. A., Khattak, B. Z., Knowles, J. P.: Macrocytosis in patients on anticonvulsant drugs. *Br. J. Haematol.* **16**, 451—455 (1969)
- Davis, R. E., Reed, P. A., Smith, B. K.: Serum pyridoxal, folate, and vitamin B 12 levels in institutionalized epileptics. *Epilepsia* **16**, 463—468 (1975)
- Dunn, R. T., Foster, L. B.: Radioassay of serum folate. *Clin. Chem.* **19**, 1101—1105 (1973)
- Fehling, C., Jagerstad, M., Lindstrand, K., Westesson, A. K.: The effect of anticonvulsant therapy upon the absorption of folates. *Clin. Sci.* **44**, 595—600 (1973)
- Herbert, V., Zalusky, R.: Selective concentration of folic acid acitivity in cerebrospinal fluid. *Fed. Proc.* **20**, 453 (1961)
- Hoffbrand, A. V., Necheles, T. F.: Mechanism of folate deficiency in patients receiving phenytoin. *Lancet* **2**, 528—530 (1968)
- Horwitz, S. J., Klipstein, F. A., Lovelace, R. E.: Relation of abnormal folate metabolism to neuropathy developing during anticonvulsant drug therapy. *Lancet* **1**, 563—565 (1968)
- Ibbotson, R. N., Dilena, B. A., Horwood, J. M.: Studies on deficiency and absorption of folates in patients on anticonvulsant drugs. *Australas. Ann. Med.* **16**, 144—150 (1967)
- Jensen, O. N., Olesen, O. V.: Folic acid and anticonvulsive drugs. *Arch. Neurol.* **21**, 208—214 (1969)
- Klipstein, F. A.: Subnormal serum folate and macrocytosis associated with anticonvulsant drug therapy. *Blood* **23**, 68—86 (1964)
- Levitt, M., Nixon, P. F., Pincus, J., Bertino, J. R.: Transport characteristics of folates in cerebrospinal fluid: A study using doubly labeled 5-methyltetrahydrofolate and 5-formyltetrahydrofolate. *J. Clin. Invest.* **50**, 1301—1308 (1971)
- Malpas, J. S., Spray, G. H., Witts, L. J.: Serum folic acid and vitamin B<sub>12</sub> levels in anticonvulsant therapy. *Br. Med. J.* **1**, 955—957 (1966)
- Mannheimer, E., Pakesch, F., Reimer, E. E., Vetter, H.: Die hämatologischen Komplikationen der Epilepsiebehandlung mit Hydantoinkörpern. *Med. Klin.* **47**, 1397—1401 (1952)
- Mattson, R. H., Gallagher, B. B., Reynolds, E. H., Glass, D.: Folate therapy in epilepsy. *Arch. Neurol.* **29**, 78—81 (1973)
- Nelson, E. W., Cerda, J. J., Wilder, B. J., Streiff, R. R.: Effect of diphenylhydantoin on the bioavailability of citrus folate. *Am. J. Clin. Nutr.* **31**, 82—87 (1978)
- Preece, J., Reynolds, E. H., Johnson, A. L.: Relationship of serum to red cell folate concentrations in drug treated epileptic patients. *Epilepsia* **2**, 335—340 (1971)
- Reynolds, E. H., Milner, G., Matthews, D. M., Chanarin, I.: Anticonvulsant therapy, megaloblastic haemopoiesis and folic acid metabolism. *Quart. J. Med.* **35**, 521—537 (1966)
- Rothenberg, S. P., Dacosta, M., Rosenberg, Z.: A radioassay for serum folate: Use of a two-phase sequential incubation, ligand-binding system. *New Engl. J. Med.* **286**, 1335—1339 (1972)
- Snaith, R. P., Mehta, S., Raby, A. H.: Serum folate and vitamin B<sub>12</sub> in epileptics with and without mental illness. *Br. J. Psychiatr.* **116**, 179—183 (1970)
- Taguchi, C.: Clinical and experimental studies on folic acid deficiency due to anticonvulsants. II. Investigations on patients receiving anticonvulsants and experimental study on the effect of diphenylhydantoin on the absorption of folic acid in rats. *Acta Med. Okayama* **25**, 551—566 (1971)
- Woodbury, D. M., Kemp, J. W.: Pharmacology and mechanisms of action of diphenylhydantoin. *Psychiatr. Neurol. Neurochir.* **74**, 91—115 (1971)