

*Aus der Ernährungsphysiologischen Sektion des Niederländischen Institutes
für milchwirtschaftliche Forschungen, Ede (Niederlande)
(damaliger Direktor: Ir. H. L o l k e m a)*

Zur Wirkung von Thymin und Adenin in der Nahrung auf Folsäuremangelratten

Von H. de W a a r d¹⁾

Mit 1 Abbildung und 4 Tabellen

(Eingegangen am 25. März 1974)

Folsäure ist erforderlich in der Biosynthese von Nukleotiden, wobei sie in der Form einer Tetrahydro-Verbindung als Kofaktor in der Synthese der Purinbasen (als Nukleotiden) und der Pyrimidinbase Thymin wirkt. Weil die wichtigsten Purine, Adenin und Guanin – welches letztere aus dem ersteren gebildet werden kann (1, 2) – in Desoxyribonukleinsäuren (DNS) sowie auch in Ribonukleinsäuren (RNS) vorkommen und aus der Gruppe der Pyrimidine das Thymin nur in DNS, ist für den Aufbau von RNS die Anwesenheit von Folsäure nur im Hinblick auf die Purinsynthese erforderlich. Folsäure spielt auch eine Rolle in einigen anderen Stoffwechselbereichen, wie denen der Aminosäuren Serin und Glykokoll, von Homocystein zu Methionin und der Abspaltung der Formiminogruppe von Formiminoglutaminsäure (FiGlu) zu Glutaminsäure.

Aus dem Schema (Abb. 1) geht hervor, daß die bei der Purin-(Inosin-) und Thymidinsynthese erwähnten, von Folsäurederivaten abhängigen Reaktionen eng mit denen zusammenhängen, die bei den Umwandlungen der genannten Aminosäuren stattfinden. Weiter zeigt es sich, daß die Menge reduzierter Tetrahydrofolsäure-Koenzyme sich nur im Falle der Thymidinsynthese verringert, wobei Dihydrofolsäure entsteht. Bei dieser letzten Reaktion können die sogenannten Folsäureantagonisten von Einfluß sein, nämlich durch die Hemmung der Reduktion zu Tetrahydrofolsäure (Inaktivierung von Dihydrofolsäurereduktase).

So wird bei der Anwendung dieser Antagonisten die vorhandene Menge von Folsäure bald unwirksam, weil nicht ausreichend reduzierte Folsäure zur Verfügung steht.

Wir haben Untersuchungen über die Wirkung von der Nahrung zugesetzten Thymin und/oder Adenin bei Ratten angestellt, denen gleichzeitig ein Folsäureantagonist zugeführt wurde. Hierüber berichten wir in dieser Mitteilung.

Material und Methoden

Im ersten Abschnitt wurden sieben Gruppen von 6–8 jungen Ratten (Wistar-Stamm, ♂ und ♀) von etwa 70 g ernährt mit einem semisynthetischen Futter (ad libitum, freie Wasserzufuhr) folgender Zusammensetzung: Casein (mit 5%

¹⁾ Der Verfasser dankt der Abteilung Humanernährung der Landwirtschaftlichen Hochschule Wageningen für den zur Verfügung gestellten Tierstall.

Das Diagramm zeigt den Folsäurezyklus und seine Integration in den Purin-Stoffwechsel:

- Folsäurezyklus (oben):**
 - THF** (Tetrahydrofolsäure) wird zu **DHF** (Dihydrofolsäure) oxidiert, wobei **Amethopterin** als Inhibitor wirkt.
 - Thymidin-MP** wird zu **Uridin-dMP** reduziert, wobei **NADPH** zu **NADP** oxidiert wird.
 - 5-10-methylen-THF** wird zu **5-methyl-THF** oxidiert, wobei **NADPH** zu **NADP** oxidiert wird.
 - 5-methyl-THF** wird zu **THF** reduziert, wobei **NADP** zu **NADPH** reduziert wird.
 - THF** wird zu **10-formyl-THF** oxidiert, wobei **ATP** zu **ADP** oxidiert wird.
 - 10-formyl-THF** wird zu **5-formyl-THF (Leukovorin)** oxidiert, wobei **ATP** zu **ADP** oxidiert wird.
 - 5-formyl-THF (Leukovorin)** wird zu **5-10-methylen-THF** oxidiert, wobei **ATP** zu **ADP** oxidiert wird.
 - 5-10-methylen-THF** wird zu **5-methyl-THF** oxidiert, wobei **NADPH** zu **NADP** oxidiert wird.
- Verbindungen (links):**
 - Serin** und **Glykokoll** sind mit **THF** und **5-10-methylen-THF** verbunden.
 - Homocystein** und **Methionin** sind mit **5-methyl-THF** und **THF** verbunden.
 - Histidin** wird zu **Urocaninsäure** und dann zu **Formiminoglutaminsäure** oxidiert.
 - Formiminoglutaminsäure** wird zu **Glutaminsäure** oxidiert, wobei **NH₃** freigesetzt wird.
- Purin-Stoffwechsel (rechts):**
 - C₂-"formiat"** wird zu **Purine** oxidiert.
 - Purine** werden zu **Adenosin-MP**, **Inosin-MP** und **Guanosin-MP** oxidiert.
 - C₈-"formiat"** wird zu **Purine** oxidiert.

²⁾ Pro kg Futter enthaltend: Thiamin 7 mg, Riboflavin 13 mg, Nicotinsäureamid 70 mg, Pyridoxin 7 mg, Ca-DL-Pantothenat 40 mg, Biotin 0,2 mg, Myo-Inosit 1,5 g, Cholinchlorid 3,0 g, Cyanocobalamin 0,05 mg, Retinol 6 mg, Cholecalciferol 0,06 mg, α -Tocopherolazetat 200 mg und Menadion 3 mg.

Die Gewichte (1 \times pro Woche) und der Futterverbrauch der Ratten wurden gemessen.

Nach einer Woche und nach zwei Wochen wurde Blut abgenommen (mit heparinierten Glaskapillarröhrchen aus dem Orbitaplexus unter leichter Anästhesie) zur Bestimmung der Hämoglobin-, Hämatokrit-, Erythrozyten- und Leukozytenwerte. Die Hämoglobinkonzentration wurde kolorimetrisch bestimmt in einer 0,3%igen EDTA-Lösung, die auf einen Cyanhämiglobinnormalwert bezogen war. Die Hämatokritwerte wurden (in duplo) bestimmt nach Zentrifugieren in einer dazu geeigneten Zentrifuge (Marke: Hawksley). Erythrozyten und Leukozyten wurden in einer normalen Zählkammer (Bürger-Türk) gezählt.

Im zweiten und letzten Abschnitt wurde an drei Gruppen von 5 männlichen Ratten von etwas über 200 g (Alter 10 Wochen) und einer Kontrollgruppe von 3 derartigen Ratten das gleiche Basisfutter verabreicht, in dem sich jetzt, pro 100 g, 1 mg Folsäure neben 2½ mcg des Folsäureantagonisten befand, mit folgenden weiteren Zusätzen (Tab. 2), wobei abermals die erste Gruppe Kontrollgruppe war.

Tab. 2. Zusatz zum Futter (g/kg) der verschiedenen Gruppen Ratten (2. Teil)

Gruppe	Amethopterin (2½ mg in 100 g Puderzucker)	Thymin	Adenin	Cellulose	Folsäure
I	—	—	—	10	—
II	1	2	—	7	0,01
III	1	—	4	5	0,01
IV	1	2	4	3	0,01

Bei diesen Tieren wurden hinsichtlich der Blutproben nur die Hämatokritwerte bestimmt, weil im ersten Abschnitt alle angewendeten hämatologischen Parameter signifikante Differenzen gezeigt hatten. Der wichtigste Parameter aber war in diesem Fall die Überlebensdauer.

Die Ergebnisse wurden statistisch ausgewertet, und zwar nach der Methode von Scheffé (3), also mit Varianzanalyse und folgender Ermittlung der Kontraste (multiple Gleichung).

Ergebnisse

In der ersten Woche verringerten sich die Blutwerte nur wenig, aber in der zweiten Woche war diese Verringerung in den Gruppen II–VI sehr erheblich (Tab. 3). Die Ratten dieser Gruppen starben um diese Zeit alle, einige schon vor dem Ende der zweiten Woche, was die in diesen Gruppen gefundenen Blutwerte vermutlich einigermaßen beschönigt.

In den Gruppen, in denen Adenin verabreicht wurde, starben vor dem Ende der zweiten Woche keine Tiere, obgleich sie einige Tage später auch alle tot waren und zuvor einen hämatologisch ebenso schlechten Befund zeigten wie die Ratten der Gruppen II, III und VI. Diese Differenz in der frühzeitigen Mortalität kann mit dem geringeren Futterverbrauch der Gruppen IV und V während der ersten Woche zusammenhängen, indem eine niedrigere Dose des Antimetaboliten aufgenommen wurde. Dieser

Tab. 3. Blutwerte, Futterverbrauch und Gewichtszunahme der verschiedenen Rattengruppen nach einer Woche und nach zwei Wochen (I. Teil)

	I	II	III	Gruppen IV		V	VI	VII
Hämoglobin (g/100 ml)	12,1	11,4*	10,8	11,4	8,6	11,0	10,4	12,2
Hämatokrit (%)	39	37*	35	40	27	32	32	38
Erythrozyten pro mm ³ /10*	3,4	3,5*	3,2	3,3	2,5	3,2	2,9	3,5
Leukozyten pro mm ³ /10*	99	82*	80	77	36	93	66	92
Zahl + innerhalb 2 Wochen	-	2	3	-	-	-	2	-
Futterverbrauch S.F.M.**)	57*	48	50	41	44	44	52	56*
Gewichtszunahme S.F.M.**)	3,3 20* 2,7	4,6 2,2 1,9	5,0 1,9 1,8	3,5 3 3,0	3,8 6 3,8	1,7 6 2,9	4,1 7 3,0	5,6 2,7 4,4
								68* 2,1 27* 2,2 1,5

Futterverbrauch und Gewichtszunahme in g pro Woche

*) Die Gruppen I und VII zeigen nach Varianzanalyse und Kontrastermittlung der Differenzen zwischen den Blutwerten der ersten und zweiten Woche eine signifikante Differenz zu den Gruppen II-VI ($p = 0,05$), die dieser Methode nach untereinander nicht signifikant differierten. Diese Differenz gab es schon in der ersten Woche auch hinsichtlich des Futterverbrauches und der Gewichtsunterschieden den Ausgangswerten (wie schon erwähnt, etwa 70 g) gegenüber.

**) S.F.M. = Standardfehler des Mittelwertes.

geringere Konsum könnte eine Folge einer trivialen Ursache sein, z. B. des schlechteren Geschmacks des Adenin enthaltenden Futters.

Die Gruppen I (Kontrolle) und VII (Leukovorin) zeigten in dieser Untersuchung keine Mangelsymptome, im allgemeinen wie auch hämatologisch. Nur Leukovorin (N-5-Formyltetrahydroverbindung von Folsäure) war also fähig, dem vom Folsäureantagonisten erzeugten Mangel vorzubeugen.

Die Tiere mögen wohl an etwas anderem als einem Nukleinsäuremangel gestorben sein. Jedenfalls wurden sie stark anämisch. Der Leukozytenfall aber zeigt, daß es sich nicht nur um einen Block der Pyrrol- oder Hämsynthese handelte.

Im zweiten Abschnitt wurde den Ratten, neben dem Folsäureantagonisten in Kombination mit den „Nukleinbasen“, auch Folsäure selbst verabreicht. Es war möglich, daß diese etwas älteren Tiere länger am Leben blieben und größere Gruppendifferenzen zeigen würden.

Zwischen der zweiten und vierten Woche wurde bei allen Ratten, die den Antimetaboliten erhielten, ein Hämatokritabfall gefunden, der für Gruppe II nach zwei, für Gruppe III nach drei und für Gruppe IV nach vier Wochen statistisch signifikant war (Tab. 4).

Tab. 4. Hämatokritwerte (%) und Futterverbrauch (g pro Woche) der verschiedenen Gruppen Ratten (2. Teil)

	Gruppen							
	I		II		III		IV	
	Hkt	Konsum	Hkt	Konsum	Hkt	Konsum	Hkt	Konsum
1. Woche	42	124	39	121	45	75*	46	67*
2. Woche	43	106	26*	79*	39	80*	42	93*
3. Woche	42				33*		37	
4. Woche	42						27*	
Überleben (Tage \pm S.F.M.+)			16 ($\pm 1,0$)***		29 ($\pm 2,5$)**		38 ($\pm 3,0$)*	

* statistisch signifikante Differenz zur Kontrollgruppe ($p = 0,05$)

** statistisch signifikante Differenz zu Gruppe IV ($p = 0,05$)

*** statistisch signifikante Differenz zu Gruppe III ($p = 0,05$)

+) Standardfehler des Mittelwertes

Da in diesem Versuch eine Gruppe mit den Zusätzen Amethopterin und Folsäure fehlte, kann ein Vergleich ihrer Wirkung mit der von Thymin nicht festgestellt werden. Im ersten Abschnitt starben die Mangel-Tiere alle nach einer gleichen Periode von zwei Wochen wie jetzt die Gruppe II, diese aber waren jüngeren Alters. Der Futterverbrauch der Gruppen mit Adeninzusatz war in der ersten Woche diesmal auch signifikant niedriger als jener der anderen Gruppen.

Auch die Überlebensdauer wurde von den verschiedenen Zusätzen statistisch signifikant beeinflusst (Tab. 4, unterer Abschnitt). Der Sektionsbefund der verstorbenen Ratten war: eine blasse Leber, blasse Nieren und Nebennieren, mäßig blasse Lungen, normales Aussehen von Herz und

Milz, keine Blutungen, Blase und Magen oft nicht entleert. Die Kontrollratten blieben normal am Leben.

Diskussion

Aus diesen statistisch signifikanten Ergebnissen der Blutwerte und der Überlebensdauer im zweiten Abschnitt könnte man schließen, daß Zusatz von 0,4 % Adenin zum Futter auf das Entstehen eines Folsäuremangels bei Ratten sich hemmend auswirkt und daß Zusatz von 0,2 % Thymin noch einen weiteren Beitrag hinzufügt. Die Resorption aus dem Darm von Purinen (4) und Pyrimidinen (5) ist unproblematisch. Daß die Differenz der Dosis die Auswirkung von Adenin in dieser Hinsicht verstärkt hätte, ist nur scheinbar, weil aus der Purinbase auch Guanin gebildet wird (1, 2) und diese beiden außerdem für die RNS-Synthese erforderlich sind, so daß mit diesem Verhältnis eher das Gegenteil der Fall wäre (6).

Auch im ersten Abschnitt war schon eine Andeutung vorhanden, daß Adenin möglicherweise eine etwas günstigere Wirkung auf den Folsäuremangel ausübe, nämlich das Fehlen einer frühzeitigen Mortalität der Ratten (innerhalb zwei Wochen). Wie aber schon erwähnt, war in beiden Proben der Konsum des Adenin enthaltenden Futters niedriger (vielleicht wegen des Geschmacks), aber der Methode der multiplen Gleichung nach in den Gruppen IV und V nicht signifikant verschieden von dem in den Gruppen II, III und VI. So kann das Ergebnis der Untersuchung auch auf die geringere Aufnahme des Folsäureantagonisten in den mit Adenin gefütterten Gruppen zurückgeführt werden. Dieses Problem würde durch Injektion des Amethopterins auch nicht völlig gelöst sein, aber vielleicht wohl bei paarweiser Fütterung. Man könnte dann eben der Wirkung von Thymin eine wichtigere Bedeutung beilegen. Dieses wurde aber im ersten Abschnitt nicht festgestellt. In Gruppe IV des zweiten Teils erreichte der Zusatz aber nur kaum die 5%-Probabilitätsgrenze, während der Zusatz von Thymin, in bezug auf Amethopterin allein, in diesem Abschnitt wie erwähnt nicht untersucht wurde.

Auch wenn das signifikante Ergebnis nicht nur ein Artefakt ist, ist er doch jedenfalls so klein, daß der tödliche Ausgang vom Zusatz des Antimetaboliten nicht wie von Leukovorin verhindert wurde. Auch Windmüller und Mitarbeiter haben darauf hingewiesen, daß biosynthetisiertes Adenin vorzugsweise genutzt wird (7). Wohl hat es sich gezeigt, daß Zusatz von Adenin das Auftreten einer durch höhere Orotsäuregaben bedingten Fettleber verhindern kann (4, 7). Dabei spielt aber kein Folsäuremangel eine Rolle.

In den meisten Krankheitszuständen des Menschen sind als Folge exogener Zusätze von Purin- und Pyrimidinbasen keine erheblichen Ergebnisse zu erwarten. Eine Normalkost enthält pro Tag gut 1 g Nukleinsäuren (8).

In Fällen erblicher Orotsäureexkretion (ein angeborener Fehler des Stoffwechsels) oder bei mit 6-Azauridin behandelten Patienten ist eine Wirkung von exogen zugeführtem Uridin zu erhalten (9, 10, 11). Zusatz von Uracil aber an einen erfolgreich mit Uridin behandelten Patienten

zeigte sich unwirksam (9). Zuweilen kann eine derartige biochemische Einzelheit also bedeutungsvoll sein.

Zusammenfassung

Nachdem ein Schema der bekannten Reaktionen von Folsäure in der Synthese der Nukleinsäuren gegeben wurde, werden die Ergebnisse einiger Versuche an Ratten mit Zusätzen von Thymin und Adenin zu ihrem Futter, das auch Amethopterin enthielt, um einen Folsäuremangel zu erzeugen, mitgeteilt.

Der Zusatz von entweder 0,4 % Adenin oder 0,2 % Thymin oder von beiden Stoffen zu dem Futter zeigte sich in der Vorbeugung von Folsäuremangelsymptomen als wirksam. Die statistisch signifikanten Differenzen in den Ergebnissen der Zusätze von Thymin und Adenin sind eher durch eine Differenz im Futterverbrauch zu erklären als durch eine bevorzugte Verwendung von Folsäure für die Thymidinsynthese.

Summary

After a scheme is provided of the well-known reactions of folates in the synthesis of the nucleic acids, results are given of some experiments with rats, in which thymine and adenine were added to their food. This food also contained methotrexate, in order to induce a state of folate deficiency.

Neither the addition of 0.4 % adenine nor of 0.2 % thymine nor of both substances to the diets was able to prevent folate deficiency symptoms. The statistically significant differences between the results of the addition of thymine and adenine could be accounted for by differences in food consumption, rather than by preferential utilization of folate in thymidine synthesis.

Literatur

1. Setlow, B., R. Burger und J. M. Lowenstein, *J. Biol. Chem.* **241**, 1244–1245 (1966). – 2. Herschko, A., A. Razin, T. Shoshani und J. Mager, *Biochem. Biophys. Act.* **149**, 59–73 (1967). – 3. Scheffé, H., *Biometrika* **40**, 87–104 (1953). – 4. Handschuhmacher, R. E., W. A. Crasey, J. J. Jaffé, C. A. Pasternak und L. Hankin, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* **46**, 178–186 (1960). – 5. Schanker, L. S. und D. J. Tocco, *J. Pharmacol. exp. Therap.* **128**, 115–121 (1960). – 6. Bell, G. H., J. N. Davidson und H. Scarborough, *Textbook of Physiology and Biochemistry*, VIIth Ed., Chapter 6, 82–86 (Table 6, 8) (Livingstone, Edinburgh and London 1968). – 7. Windmüller, H. G. und A. E. Spaeth, *J. Biol. Chem.* **240**, 4398–4405 (1965). – 8. Lang, K. und E. Schöffner, *Z. Ernährungswiss.* **4**, 235–245 (1964). – 9. Becroft, D. M. O., L. I. Philips und A. Simmonds, *J. Pediat.* **75**, 885–891 (1969). – 10. Tubergen, D. G., R. S. Krooth und R. M. Heyn, *Amer. J. Dis. Child.* **118**, 864–870 (1969). – 11. Haggard, M. E. und L. H. Lockart, *Amer. J. Dis. Child.* **113**, 733–740 (1967).

Anschrift des Verfassers:

H. de Waard, Kinderarzt, Ernährungsphysiologische Sektion des
Niederländischen Institutes für milchwirtschaftliche Forschungen,
Postfach 20, Ede (Niederlande)