

Folinsäure, ein neuer Wirkstoff der Vitamin-B-Gruppe

Von Dr. RUDOLF TSCHESCHE

Forschungslaboratorium der Kinderklinik Hamburg-Eppendorf

In den letzten 15 Jahren ist es der chemischen Forschung gelungen, den Vitamin-B-Komplex weitgehend zu entwirren und einen großen Teil der einzelnen Faktoren rein darzustellen, in ihrer Konstitution zu ermitteln und auch die Synthese durchzuführen. Wir kennen heute Ancurin, Lactoflavin, Adermin, Nikotinsäureamid, Biotin, Pantothersäure, p-Aminobenzoessäure und Inosit, ohne daß damit ausgesagt werden kann, daß alle Glieder der B-Gruppe bekannt wären, ja, es ist zu vermuten, daß weitere B-Vitamine existieren. Sobald ein neues Vitamin aufgefunden und rein dargestellt worden ist, muß es in seinen biologischen Wirkungen gegenüber den anderen B-Faktoren abgegrenzt werden, um die Grundlagen zu schaffen, auch die noch unbekannten Glieder dieses Komplexes zu ermitteln. Während des Krieges wurde in Amerika von mehreren Forschungskreisen ein neues B-Vitamin rein isoliert und in seiner Konstitution aufgeklärt, auch die Synthese konnte durchgeführt werden, es handelt sich um die sogenannte „Folinsäure“ (folic acid). Diese Bezeichnung wurde von Mitchell, Snell und Williams¹⁾ gewählt, weil diese Substanz von ihnen aus Blättern und zwar aus Spinat, in annähernd reiner Form erhalten wurde. Später wurde diese Benennung auch von anderen Bearbeitern übernommen, obwohl die genannten Autoren sie für eine bestimmte Substanz vorbehalten sehen wollen in einer Gruppe nahe verwandter Verbindungen²⁾. Die Verallgemeinerung ist aber insofern berechtigt, als die anderen Vertreter sich wahrscheinlich von der Folinsäure als Grundsubstanz ableiten durch Variationen in der an einen Heterocyclus angehängten Peptid-Kette.

Auffindung der Folinsäure

Wie schon häufig bei der Isolierung von Naturstoffen wurde die nun als Folinsäure bezeichnete Substanz von einer Reihe von Forschungskreisen gleichzeitig und unter verschiedenen Namen studiert. Wir wissen heute, daß Vitamin M, Vitamin B₁₂, Vitamin B₁₀ und B₁₁, Lactus casei-Faktor, Eluat-Faktor aus Leber, Folinsäure, Streptococcus lactis, R-Faktor und Faktor U von Stokstad im wesentlichen dieselbe Substanz sind, zum Teil mit Variationen in einem Teilstück der Molekel. 1935 veröffentlichten Day, Langston und Mitarb.³⁾ eine Serie von Arbeiten, in denen über mangelnde Zellbildung (Cytopenie) bei Affen durch Vitamin B-Mangel-Diät berichtet wird. Die Diät konnte durch Zugabe von Leberextrakt oder Brauereihefe ergänzt werden. Sie bezeichneten den fehlenden Faktor als Vitamin M. Ähnliche Untersuchungen wurden 1940 von Doan und Mitarb.⁴⁾ begonnen, um den blutbildenden (hämo-poetischen) oder genauer granulierenden (granulo-poetischen) Faktor für Affen besser zu charakterisieren. Sie konnten zeigen, daß die kristallisierte Folinsäure von Stokstad⁵⁾ aus Leber und ein hoch gereinigtes Konzentrat aus Hefe in der Lage sind, ähnlich wie parenteral verabfolgter Leberextrakt die normalen Werte für die weißen Blutkörperchen beim Affen wieder herzustellen. Das gleiche wurde von Waisman und

Elvehjem⁶⁾ im Jahre 1943 mit einem folinsäurereichen Norit-Eluat-Konzentrat bestätigt. 1945 berichteten dann Day und Mitarb.⁷⁾ über die erfolgreiche Behandlung der gleichen Mangelerscheinung mit hoch gereinigten Lactus casei-Faktor, so wurde die biologische Identität aller dieser Faktoren für die Behandlung der Affen-Ernährungsanaemie sicher gestellt.

Im Jahre 1939 berichteten Hogan und Parrott⁸⁾ über eine Anaemie an Küken durch eine Vitamin-B-Mangel-Diät, die durch einen Vitamin B₁₂ bezeichneten Stoff geheilt werden konnte, das C soll die benutzte Hühnerrasse kennzeichnen. Es handelt sich um eine hyperchrome megalocytaire Anaemie⁹⁾, die mit gereinigten Diäten besonders gut bei gleichzeitiger Verabreichung von Sulfonamiden zum Ausbruch kommt. 1943 konnten Pfiffner und Mitarb.¹⁰⁾ diese Substanz aus Leber in kristallisierter Form gewinnen und erklären, daß der Küken-Anaemie-Faktor B₁₂, Petersons Eluat-Faktor und Williams Folinsäure vermutlich die gleiche Substanz sind. 1945 isolierten die gleichen Bearbeiter¹¹⁾ eine zweite antianaemische Verbindung für junge Hühnchen aus Hefe, deren Molekulargewicht jedoch 2,8-mal so groß war als von Vitamin B₁₂ aus Leber, sie wurde als Vitamin B₁₂-Konjugat oder Hefe-Konjugat-Faktor bezeichnet. Durch Enzym-Behandlung konnte daraus Vitamin B₁₂ erhalten werden. Auch bei ausgewachsenen Hühnern konnten Scott und Mitarb.¹²⁾ eine schwere Hämorrhagie hervorrufen, die durch Injektion von Lactus casei-Faktor und Nikotinsäureamid behoben werden konnte. Die Vitamine B₁₀ und B₁₁ scheinen ebenfalls keine grundsätzlich neuen Verbindungen zu sein, es sind Wirkstoffe für das normale Wachstum und für die Federentwicklung bei Küken und nach Lancel¹³⁾ ebenfalls der Folinsäure nahestehend, wenn sie auch den Vitamin-M-Mangel am Affen nicht zu beheben vermögen, vielleicht weil der Konjugat-Faktor in ihnen enthalten ist¹⁴⁾.

Schließlich berichten Snell und Peterson¹⁵⁾ über eine Substanz, die für die Entwicklung von Lactobacillus casei auf einem künstlichen Nährboden notwendig ist und die sie in Hefe, Leber und anderen natürlichen Materialien fanden. Stockstad¹⁶⁾ und Hutchings, Bohonos und Peterson¹⁷⁾ führten die Anreicherung dieses Norit-Eluat-Faktors durch und zeigten, daß das Konzentrat auch antianaemische Wirksamkeit für Küken besitzt¹⁷⁾. Ebenso wurde die chemische Ähnlichkeit mit dem Faktor U von Stokstad und dem Alkohol-Präzipitat-Faktor von Schumacher¹⁸⁾ erkannt. Es ist bemerkenswert, daß die Kristallisate aus Leber und aus Hefe etwa die gleiche Wirksamkeit für Lactobacillus casei haben, daß jedoch für Streptococcus lactis R die Aktivität

¹⁾ Amer. chem. Soc. 63, 2284 [1941].

²⁾ H. K. Mitchell, E. E. Snell u. R. J. Williams, Amer. chem. Soc. 66, 267 [1944].

³⁾ P. L. Day, W. C. Langston u. C. F. Shukers, J. Nutrit. 9, 637 [1935]. Dieselben, J. biol. Chemistry, 114, 25, [1936].

⁴⁾ P. L. Day, W. C. Langston u. W. J. Darby, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 38, 860 [1938]. Dieselben mit J. G. Wahlin u. V. Mims, J. exp. Medicine 72, 463 [1940].

⁵⁾ W. C. Langston, W. J. Darby, C. F. Shukers u. P. L. Day, J. exp. Medicine 68, 923 [1938].

⁶⁾ S. Saslaw, H. E. Wilson, C. A. Doan u. J. L. Schwab, Science 97, 514 [1943]; Proc. Soc. exp. Biol. Med. 50, 341 [1942].

⁷⁾ H. E. Wilson, S. Saslaw u. C. A. Doan, J. Lab. clin. Med. 31, 631 [1946].

⁸⁾ E. L. R. Stokstad u. P. D. V. Manning, J. biol. Chemistry 125, 687 [1938].

⁹⁾ J. Nutrit. 26, 361 [1943].

¹⁰⁾ P. L. Day, V. Mims, J. R. Totter, E. L. R. Stokstad, B. L. Hutchings u. N. H. Sloane, J. biol. Chemistry 157, 123 [1945].

¹¹⁾ Ebenda, 128, 46 [1939].

¹²⁾ Ebenda, 132, 507 [1940].

¹³⁾ B. L. O'Dell u. A. G. Hogan, ebenda 149, 323 [1943].

¹⁴⁾ J. J. Pfiffner, S. B. Binkley, E. S. Bloom, R. A. Browns, O. D. Bird, A. D. Emmet, A. G. Hogan u. B. L. O'Dell, Science 97, 404 [1943].

¹⁵⁾ J. J. Pfiffner, D. G. Calkins, B. L. O'Dell, E. S. Bloom, R. A. Browns, C. J. Campbell u. O. D. Bird, ebenda 102, 228 [1945].

¹⁶⁾ M. L. Scott, L. C. Norris u. G. F. Heuser, ebenda 103, 303 [1946].

¹⁷⁾ Lancet 250 Nr. 6428, S. 680 [1946].

¹⁸⁾ J. M. Coopermann, C. A. Elvehjem, K. B. McCall u. W. R. Ruegamer, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 61, 92 [1946].

¹⁹⁾ J. Bacteriol. 39, 273 [1940].

²⁰⁾ J. biol. Chemistry 139, 475 [1941].

²¹⁾ Ebenda, 141, 521 [1944].

²²⁾ B. L. Hutchings, N. Bohonos, D. M. Hegsted, C. A. Elvehjem u. W. H. Peterson, ebenda 140, 681 [1941].

²³⁾ R. C. Mills, G. M. Briggs, J. C. A. Elvehjem u. E. B. Hart, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 49, 186 [1942].

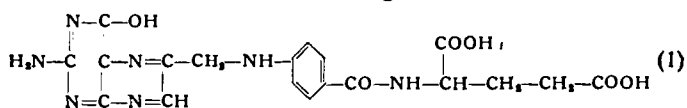
²⁴⁾ A. E. Schumacher, G. F. Heuser u. L. C. Norris, J. biol. Chemistry 135, 313 [1940].

²⁵⁾ Blutarmut mit stark gefärbten, besonders großen Erythrocyten.

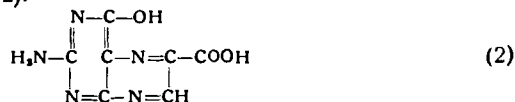
des Hefepräparates nur annähernd halb so groß ist wie die des Kristallisats aus Leber¹⁹). Schließlich wurde noch über die Gewinnung einer Substanz berichtet (Stokes und Mitarb.²⁰), die für Streptococcus lactis R Folinsäure wirkungsvoll ersetzen kann, die aber unwirksam ist als Wachstumsfaktor für Lactobacillus casei. Es konnte aber weiter gezeigt werden, daß der erwähnte Streptococcus diesen Faktor enzymatisch abbaut zu einer Form, in der er auch für Lactobacillus casei verwertbar wird. 1944 wurden die UV-Spektren all dieser Faktoren miteinander verglichen und der Name „Lactus casei-Faktor“ angewandt²¹). 1941 haben Snell und Mitarb.¹) den Namen Folinsäure für ihre aus Blättern gewonnene Substanz gewählt und gezeigt, daß sie auch für Streptococcus faecalis R ein Wachstumsfaktor ist, ebenso für Hefen und Tetanus-Erreger. Stokstad⁶), der wohl als erster kristallisierte Folinsäure in den Händen hatte, erhielt ca. 3 g aus einer Tonne Frischleber.

Konstitution

Im Mai 1946 berichteten Angier und 15 Mitarb.²²) über die Konstitutionsermittlung der Folinsäure, des Lactus casei-Faktors, und es wurden zwei Verfahren der Synthese angegeben. Die Abbaureaktionen wurden nicht mit dem Lactus casei-Faktor selbst, sondern mit dem „Fermentation-Lactus casei-Faktor“ durchgeführt, es handelte sich hierbei wohl um das enzymatische Abbauprodukt der Substanz von Stokes durch Streptococcus lactis R. Die Folinsäure hat nachfolgende Konstitution:



Für die Aufstellung der Formel waren folgende Befunde maßgebend: Bei der aeroben alkalischen Hydrolyse wurden zwei Fraktionen erhalten, von denen die eine hochfluoreszierend war, während die andere eine positive Reaktion auf eine aromatische Aminogruppe lieferte und aus der p-Aminobenzoesäure isoliert werden konnte. Die fluoreszierende Verbindung war eine dibasische Säure mit den p_K Werten 3,9 und 7,7. Wurde diese Substanz auf 300° erhitzt, verlor sie ein Mol CO_2 und lieferte eine monobasische Säure mit dem p_K -Wert 8. Aus diesen Ergebnissen wurde auf das Vorliegen einer Monocarbonsäure geschlossen. Oxydierte man die ursprüngliche Substanz mit Chlorwasser und führte eine nachfolgende Hydrolyse mit n/10 Salzsäure durch, so konnte eine positive Reaktion auf Guanidin beobachtet werden. Das Ultraviolettpektrum, die starke Fluoreszenz, ließen auf das Vorliegen eines Pteridinderivates schließen, das eine Aminogruppe in 2-Stellung, eine OH-Gruppe an 4 und eine Carboxylgruppe an 6 hatte. Diese Verbindung wurde synthetisiert und mit 2-Amino-4-hydroxypteridin-6-carbonsäure identisch befunden (Formel 2).



Die Synthese dieser Verbindung wurde über die 2-Amino-4,7-dihydroxy-pteridin-6-carbonsäure durchgeführt. Sie gab mit PCl_5 eine 7-Chlorverbindung, in der durch nachfolgende Reduktion mit HJ das Chlor durch Wasserstoff ersetzt wurde. Daß wirklich das 7-ständige Hydroxyl in dieser Reaktionsfolge erfaßt wurde, ergab sich durch Decarboxylierung zu 2-Amino-4-hydroxy-pteridin, das auch aus 2, 4, 5-Triamino-pyrimidin und Glyoxal aufgebaut werden konnte. Die 2-Amino-4-hydroxy-pteridin-6-carbonsäure konnte auch aus dem entsprechenden 6-Methyl- und 6-Essigsäure-Derivat, sowie aus dem 6-Methyl-N-pyridiniumjodid-Abkömmling mit heißem alkalischen Kaliumpermanganat bereitet werden.

Auch der Schwefelsäure-Aufschluß unter aeroben Bedingungen ergab eine Pteridin-Fraktion und ein aromatisches Amin.

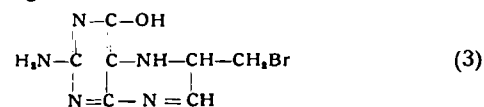
- ¹⁹) E. L. R. Stokstad, ebenda 149, 573 [1943].
²⁰) J. L. Stokes, J. C. Keresztesy u. J. W. Foster, Annu. Rev. Biochem. 5, 385–387, [1944].
²¹) J. C. Keresztesy, R. L. Rickes u. J. L. Stokes, Science 97, 465 [1943].
²²) B. L. Hutchings, E. L. R. Stokstad, N. Bohonos u. N. H. Slobodkin, Science 99, 371 [1944].
²³) R. B. Angier, J. H. Broothe, L. Brian, B. L. Hutchings, J. H. Mowat, J. Semb, E. L. R. Stokstad, Y. Subbarow, C. W. Waller, D. B. Cosulich, M. J. Fahrenbach, M. E. Hultquist, E. Kuh, E. H. Northey, D. R. Seeger, J. P. Stickels, J. M. Smith, ebenda 103, 667 [1946]; 102, 227 [1945] u. Lancet 250, 469 [1946].

Die Pteridin-Fraktion reagierte schnell mit Aldehydreagenzien unter Bildung unlöslicher Derivate, so wurde das Vorliegen einer Aldehydgruppe erwiesen. Der Aldehyd unterlag mit verd. Alkali der Cannizzaro-Reaktion unter Bildung der schon erwähnten 2-Amino-4-hydroxy-pteridin-6-carbonsäure und eines anderen Pteridins, das sich als die 6-Methyl-Verbindung erwies. Letztere Substanz wurde durch Decarboxylierung von 2-Amino-4-hydroxy-pteridin-6-essigsäure gewonnen, die wieder durch Kondensation von 2, 4, 5-Triamino-6-hydroxy-pyrimidin und γ -Dimethoxy-acetessigester bereitet werden konnte. Schließlich wurde das 6-Methylderivat auch noch oxydativ abgebaut zu 2-Amino-5-methyl-pyrazin und diese Substanz mit einer authentischen Probe dieser Verbindung verglichen. Damit wurde sichergestellt, daß die Methyl-Gruppe wirklich die 6-Stellung im Pteridinkern besetzt.

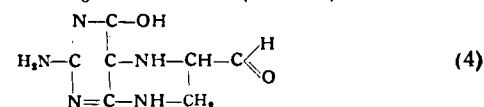
Die saure Hydrolyse der Amin-Fraktion lieferte 75% des Stickstoffs als α -Aminostickstoff und aus dem Hydrolysat konnte wieder p-Aminobenzoesäure gefaßt werden. Weiter konnten auf biologischem Wege 3 Molekeln Glutaminsäure nachgewiesen werden, die auch noch in Form der Pyrrolidincarbonsäure isoliert werden konnten. Keine Anzeichen von weiteren Spaltprodukten ließen sich finden. Da der „Fermentation Lactus casei-Faktor“ durch anaerobe alkalische Hydrolyse den „Leber Lactus casei-Faktor“ unter Freisetzung von 2 Mol Glutaminsäure ergab, so wurde für ihn die obige Formel aufgestellt, während eine Formulierung für den „Fermentation Lactus casei-Faktor“ für eine spätere Veröffentlichung in Aussicht gestellt wurde.

Synthesen

Die Synthese der Folinsäure wurde auf zwei Wegen durchgeführt. Die erste Methode bestand in der Umsetzung von aequimolekularen Mengen von 2, 4, 5-Triamino-6-hydroxy-pyrimidin, p-Aminobenzoyl-l-(+)-glutaminsäure und 2,3-Dibrompropionaldehyd in Gegenwart von Natriumacetat. Die Ausbeute nach diesem Verfahren betrug 15% d. Th. gemessen durch biologischen Test. Es wurde angenommen, daß die Reaktion über ein Dihydro-Derivat verläuft, das im Laufe der Umsetzung dehydriert wurde. Wie auch in einer Arbeit in Lancet²³) ausgeführt, soll die Aldehydgruppe des Dibrompropionaldehyds mit der NH_2 -Gruppe in 4-Stellung reagieren und dann das 2-ständige Bromatom mit der NH_2 -Gruppe in 5 des Pyrimidinkerns den neuen Ring schließen. So würde ein Dihydro-Derivat entstehen mit einer CH_2Br -Gruppierung in der Seitenkette, wie es die Formulierung 3 zeigt, das dann weiter unter HBr-Abspaltung mit dem p-Aminobenzoylglutaminsäurerest reagieren müßte.



Ob der Reaktionsverlauf wirklich so ist, erscheint mir zweifelhaft, denn Dihalogenpropionaldehyd spaltet schon unter sehr milden Bedingungen Halogen ab und geht in α -Halogen-acrolein über, auch mit Natriumacetat. Dieses, wie auch Acrolein selbst, lagert leicht Substituenten in β -Stellung an, so könnte auch die NH_2 -Gruppe des Pyrimidin-Derivates angelagert werden. Dann würde das α -ständige Bromatom mit der zweiten NH_2 -Gruppe reagieren und so ein Pteridin-Derivat entstehen mit einer Aldehyd-Gruppe in der Seitenkette und 4 zusätzlichen Wasserstoffatomen im Pyrazinkern. Der Aldehyd würde nun mit der p-Aminobenzoylglutaminsäure unter Bildung einer Schiff'schen Base reagieren, die dann durch intramolekulare Wasserstoffverschiebung hydriert werden könnte. Auch so würde ein Dihydro-Derivat der Folinsäure primär entstehen, daß dann durch Nebenreaktionen dehydriert werden müßte. Dieser Reaktionsverlauf würde der Vorstellung entsprechen, wie sie für die Skraupsche Chinolinsynthese angenommen wird. (Formel 4).

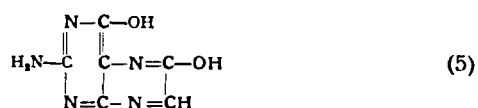


Die zweite Synthese ging von den gleichen Ausgangsmaterialien aus, nur wurde der Dibrompropionaldehyd zuerst mit Pyridin umgesetzt, und dieses Produkt sollte dann mit 2, 4, 5-Triamino-6-hydroxy-pyrimidin und KJ zu N-(2-amino-4-hydroxy-6-pteridyl)-(methyl)-pyridinium-jodid kondensiert werden. Dann wurde mit p-Aminobenzoylglutaminsäure und Natriummethylat in Äthylenglykol auf 140° erhitzt und ein Rohprodukt gewonnen, das ebenfalls 15% Folinsäure enthielt.

Durch ein im Original beschriebenes Reinigungsverfahren konnte die Substanz mit allen ihr zukommenden physikalischen und biologischen Eigenschaften kristallisiert erhalten werden. Sie bildet dünne gelbe, zu Gruppen vereinigte Nadeln, die bis 360° nicht schmelzen und bei 250° sich dunkel verfärben⁹⁾. In organischen Lösungsmitteln ist die Folsäure nicht löslich, Säuren (pH 1) zerstören schnell, während die Beständigkeit gegen Alkali etwas größer ist¹⁸⁾. Es lassen sich Salze mit Basen und Ester mit Alkoholen herstellen.

Mit den gleichen Syntheseverfahren wurde auch mit p-Aminobenzoesäure allein ein Pteridyl-Derivat gewonnen, das den Namen Pteroinsäure erhielt und das sich wirksam erwies als Wachstumsfaktor für *Streptococcus faecalis* R, aber unwirksam im Kükenversuch. Für die Folsäure wurde die Bezeichnung Pteroyl-glutaminsäure in Vorschlag gebracht. In Hefe findet sich die Pteroinsäure an 7 Molekeln Glutaminsäure geknüpft und durch ein im Körper weit verbreitetes Enzym, — die Konjugase — kann daraus nach Pfiffner Folsäure bereitet werden. In dieser gebundenen Form ist die Vitamin M-Wirkung beim Affen verschwunden.

In der Folsäure ist zum zweiten Male ein Pteridin-Derivat in der Natur aufgefunden worden, dem zweifellos eine bedeutende Rolle bei der Blutbildung zukommt. Im Jahre 1936 konnte ich zusammen mit H. J. Wolf²³⁾ wohl als erster zeigen, daß Xanthopterin, der gelbe Farbstoff der Flügel des Zitronenfalters und anderer Pteriden, der kurz vorher von Koschara²⁴⁾ auch im Harn aufgefunden worden war, in der Lage ist, die Milchanämie junger wachsender Ratten in Mengen von 1 γ pro Tag günstig zu beeinflussen und die Zellzahlen zu normalisieren. Ferner, daß die Substanz auch im Rattenreticulocyten test nach Singer²⁵⁾ und im Typhusanämietest hoch wirksam ist. Leider wurde es mir unmöglich gemacht, diesen interessanten Befund weiter zu verfolgen. Es war schon damals nicht ausgeschlossen, daß das Xanthopterin im Harn vielleicht nur das Endprodukt des Stoffwechsels darstellt und eine Vorstufe hat, die der eigentliche Wirkstoff sein mußte. 1941 zeigten Simmons und Norris²⁶⁾, daß Xanthopterin eine durch sehr eiweißreiche Ernährung an Fischen hervorgerufene Anämie in Mengen von 50 γ zu heilen vermag. Nach Totter und Mitarb.²⁸⁾ soll auch die Affenanämie durch synthetisches Xanthopterin heilbar sein. Diese Angabe ist nicht unwidersprochen geblieben²⁷⁾, aber 1944 von Totter²⁸⁾ erneut behauptet worden. Wir wissen heute, daß die Leber offenbar in der Lage ist, Xanthopterin (Formel 5) in Folsäure zu verwandeln, jedenfalls ist die Bildung dieser Verbindung aus Xanthopterin mit Rattenleber-Schnitten in vitro nachgewiesen worden²⁹⁾.



Biologische Wirkungen

Über die Folgen eines Folsäuremangels bei Tieren war bei der Auffindung dieser Substanz in der Natur schon in großen Zügen berichtet worden. Beim Affen entwickelt sich ein ausgesprochener Mangel an Leukozyten (Leucopenie), die in der Mehrzahl der Fälle von einer Anämie begleitet ist. Besonders der Verlust der polymorphkernigen Zellen ist ein hervorstechendes Zeichen des Folsäuredefizits. Ferner werden Zahnfleischentzündungen (Gingivitis), Zahnfleischnekrosen, Appetitlosigkeit und Diarrhoeen beobachtet²⁶⁾. Die Tiere, die im allgemeinen wenig empfänglich gegen Influenza-Virus und hämolytische Streptococci der Gruppe C sind, werden äußerst empfindlich gegen diese Erreger und zeigen eine hohe Mortalitätsrate. Dabei werden die spezifischen Abwehrstoffe im Blut der infizierten Tiere in gleicher Weise und Menge gebildet wie bei nicht an Fo-

linsäuremangel leidenden Tieren, der einzige Unterschied ist die verringerte Zahl und Qualität der circulierenden Granulocyten und Verminderung der Knochenmarksubstanz (Hypoplasie³⁰⁾. 2–6 mg kristallisierte Folsäure, injiziert an 3–4,5 kg schwere Tiere, ergeben eine dramatische Änderung des Blutbildes mit Anstieg der Leukocyten, Reticulocyten und Erythrocyten, sowie promptes Verschwinden der Durchfälle. Bei Ratten ist es mit einer Folsäure-Mangel-Diät nur schlecht möglich Mangel-symptome hervorzurufen, da diese Tiere durch die Tätigkeit ihrer Darmflora ausreichend mit diesem Wirkstoff versehen werden³²⁾. Die B-Vitamine werden in folgender Reihe mengenmäßig gebildet: Biotin, Adermin, Folsäure und Pantothensäure, während Aneurin, Lactoflavin, Nikotinsäureamid und Inosit nur in sehr kleiner Menge durch die Darmflora aufgebaut werden³³⁾. Füttert man jedoch Sulfonamide mit der Diät, so wird die Folsäurebildung verhindert und jetzt antworten die Tiere mit einem Schwund der granulierten Leukozyten (Granulocytopenie^{13, 27, 31)}. Ist die Diät auch frei von Pantothensäure, so entwickelt sich gleichzeitig eine schwere Anämie, die nur auf Zulage beider Faktoren geheilt werden kann. Wright und Welch³⁴⁾ fanden, daß bei diesen Ratten ein ausgesprochener Mangel an Folsäure, Biotin und Pantothensäure in der Leber herrscht und daß Zulage von Biotin und Folsäure auch den Pantothensäuregehalt der Leber normalisiert. Sie schließen, daß Biotin und Folsäure von der Darmflora offenbar zur Pantothensäuresynthese benötigt werden, oder aber die Ausnutzbarkeit oder Speicherung in der Leber begünstigt wird. Für Hühner ist Folsäure ebenfalls ein antianaemischer Wirkstoff und gleichzeitig ein Wachstumsfaktor.

Für einzellige Lebewesen ist Folsäure ein Wachstumsstoff, den sie zum Teil aus der Umgebung aufnehmen müssen, wie es *Lactobacillus casei*, *Streptococcus faecalis* R und *Streptococcus lactis* tuer, andere vermögen ihn anscheinend selbst zu synthetisieren³⁵⁾. Jedenfalls kommt Folsäure in allen Organextrakten vor und findet sich auch bei jedem einzelligen Lebewesen.

Beim Menschen ist eine ausgesprochene Folsäure-Mangel-Erkrankung bisher nicht mit Sicherheit beobachtet worden, wohl auf Grund der weiten Verbreitung dieser Substanz in der Natur. Leber, Niere, Pilze, Hefen und besonders grüne Blätter und Gras enthalten die Substanz in reichlicher Menge¹²⁾. Dennoch finden sich auch beim Menschen eine Reihe von Krankheitszuständen, die außerordentlich günstig auf eine Folsäurebehandlung ansprechen, obwohl die Zufuhr mit der Nahrung eigentlich ausreichend sein müßte. Es scheinen hier Resorptionsstörungen und die Unmöglichkeit, die Folsäure aus ihrer gebundenen Form in Freiheit zu setzen, verantwortlich zu sein.

Die Folsäure ist ein ausgesprochenes Heilmittel bei hyperchromen megalocytären Anaemien, bei gewissen Arten von Schwangerschaftsanaemien, bei Sprue, bei macrocytischer Anämie, vergesellschaftet mit Pellagra und erstaunlicherweise bei der perniziösen Anämie. Nach der Behandlung kommt es zur Bildung großer Mengen von Erythrocyten-Vorstufen (Reticulocyten) (im Durchschnitt 172% Reticulocyten auf dem Gipfel der Krisis) mit nachfolgendem Anstieg von Erythrocytenwerten und Hämoglobin. Mit der Besserung des Blutbildes geht eine auffällige Besserung des subjektiven Befindens der Patienten einher. Die Anwendung hat keinen Wert bei Eisenmangelanaemien und solchen Krankheiten, bei denen eine mangelnde Entwicklung (Hypoplasie) oder völliges Fehlen (Aplasie) des Knochenmarks besteht, ebenso bei raschem Zerfall der Leucocyten (Leucämie). Sie ist ferner nicht angezeigt bei selbständig entstandener Granulocytopenie oder einer solchen Granulocytopenie, wie sie gelegentlich als Folge einer Sulfonamidtherapie oder durch die Verwendung anderer Heilmittel wie z. B. Thiouracil entsteht. Ein posi-

⁹⁾ R. Tschesche u. H. J. Wolf, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 244, 1 [1936]; 248, 21, 34 [1937].
¹⁰⁾ R. Tschesche, diese Ztschr., 51, 349 [1938].
¹¹⁾ W. Koschara, Hoppe-Seyler's Ztschr. physiol. Chem. 277, 240, 127 [1936].
¹²⁾ R. W. Simmons u. E. R. Norris, J. biol. Chemistry 140, 679 [1941].
¹³⁾ J. R. Totter u. P. L. Day, ebenda 147, 257 [1943].
¹⁴⁾ S. F. Daft u. W. H. Sebrell, Public Health Rep. 58, 1542 [1943].
¹⁵⁾ A. E. Axelrod, P. Gross, M. D. Bosse u. K. F. Swingle, J. biol. Chemistry 148, 721 [1943].
¹⁶⁾ J. R. Totter, C. F. Shukers, J. Kolson, V. Mins, P. L. Day, ebenda 152, 177 [1944].
¹⁷⁾ L. D. Wright u. A. D. Welch, Science 98, 179 [1943].

²⁰⁾ C. A. Doan, Amer. J. Med. Sci. 257, Sept. [1946].
²¹⁾ E. Nielsen u. C. A. Elvehjem, J. biol. Chemistry 145, 713 [1942].
²²⁾ A. D. Welch, P. A. Mattis u. A. R. Latven, J. Pharmacol. Exp. 75, 231 [1942]. S. S. Spicer, F. S. Daft, W. H. Sebrell u. L. L. Ashburn, Publ. Health Rep. 57, 1559 [1942].
²³⁾ B. Ransone u. C. A. Elvehjem, J. biol. Chemistry 151, 109 [1943].
²⁴⁾ H. K. Mitchell u. E. R. Isbell, Univ. Texas Publ. 4237, 125 [1942].
²⁵⁾ A. Taylor, D. Pennington u. J. Thacker, Univ. Texas Publ. 4237 134 [1942].
²⁶⁾ J. Nutrit 27, 55 [1944].
²⁷⁾ J. H. Mueller u. P. A. Miller, J. Bacteriol. 43, 763 [1942] u. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 49, 211 [1942].
²⁸⁾ 0,00005 mg pro cm² dem geeigneten Nährboden zugesetzt, ergeben bei *Lactobacillus casei* ein halbmaximales Wachstum.

tives Ergebnis ist im allgemeinen immer dann zu erwarten, wenn bei den Patienten ein sternales Knochenmark beobachtet wird, das definierte Änderungen megaloblastischen Charakters aufweist. Ferner wirkt Folsäure zur Verbesserung des Blutbildes und Verminderung der Nebenerscheinungen günstig bei Patienten, die kräftig oder lang dauernd bestrahlt werden. Bei Perniciosakranken mit Überempfindlichkeit gegen verschiedene Formen von Leberextrakten wird man diese am besten durch Folsäure ersetzen. Als Dosis hat sich im allgemeinen eine Menge von 20 mg peroral eingeführt. Man kann sie aber auch parenteral geben, dann aber nicht mehr als 150 mg auf einmal, da größere Dosen histaminähnliche vasomotorische Störungen erzeugen können. Peroral werden 400 mg anstandslos vertragen³⁹⁾. Nach pharmakologischen Prüfungen soll Folsäure im allgemeinen akut und chronisch wenig toxisch sein, ausgenommen für Meerschweinchen.

Die den Blutstatus regenerierende Wirkung der Folsäure bei Perniciosa ist besonders bemerkenswert, da eine sichere Beeinflussung dieser Krankheit bisher nur mit Leberextrakt möglich war, der in seinen reinsten Präparaten sicher keine nennenswerten Mengen an Folsäure mehr enthält. Wir wissen heute, und darüber sind sich alle Bearbeiter einig, daß der wirksame Faktor in diesen Extrakten nicht die Folsäure ist. Dafür sprechen folgende Tatsachen: 1. Der Leberwirkstoff ist farblos³⁶⁾ während die Folsäure gelb ist. 2. Das UV-Spektrum ist so verschieden, daß sich schon kleine Mengen an Folsäure in diesen reinsten Präparaten bemerkbar machen müßten. 3. Die minimal wirksame Dosis an Folsäure bei Perniciosa ist 1 mg, meist aber mehr, bis 20 mg, während 0,035 bis 0,7 mg hochgereinigter Leberpräparate adäquate Wirkung hervorzubringen vermögen. 4. Die minimale perorale Dosis nähert sich der minimalen parenteralen Dosis bei der Folsäure, während bei den Leberpräparaten auf dem Wege über den Magen-Darm-Kanal im allgemeinen das 10-fache gerechnet wird. 5. Schließlich ist bisher eine antigene Sensibilisierung mit Folsäure nicht beobachtet worden, wie eine solche von Leberextrakten nicht unbekannt ist³⁰⁾. 6. Das Molekulargewicht der Folsäure ist 441, während von *Dakin* und *West*³⁸⁾ für den Leberwirkstoff einige Tausend angegeben werden.

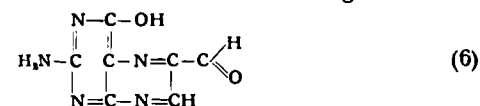
Es wäre jedoch möglich, daß die Folsäure zum mindesten in ihrer gebundenen Form, wie im-Hefe-Konjugat-Faktor, dem sogenannten „extrinsic-Faktor“ von *Castle* nahe steht, der bekanntlich durch einen „intrinsic-Faktor“ im Magen in den eigentlichen Antiperniciosa-Faktor übergeführt werden soll. *Moore*³⁷⁾ hat dieser Vermutung Ausdruck gegeben, aber *Welch*³⁸⁾ fand, daß die Bebrütung der gebundenen Form von Folsäure mit Magensaft eines Gesunden, die Menge der gebundenen Form nicht ändert und daß Fütterung dieser Form mit Magensaft an einen Perniciosakranken dessen Blutbild nicht beeinflusst. Andererseits fand *Pfiffner*³⁸⁾, daß Perniciosakranke die gebundene Form der Folsäure nicht auszunutzen vermögen und nach der Behandlung keine freie Folsäure im Harn ausscheiden wie normale Personen. Ganz klar sind die Verhältnisse also noch nicht. *Weich* fand weiter, daß der Leberwirkstoff die Konjugase-Aktivität, also die Enzymwirkung, die auf die Freisetzung von Folsäure aus ihrer gebundenen Form gerichtet ist, im Knochenmark erhöht und bei Perniciosakranken eine vermehrte Ausschwemmung von Folsäure im Harn hervorruft. Gewisse Fälle von refraktärer perniziöser Anaemie werden durch Folsäure allein nicht beeinflusst, wohl aber nach *Davidson* und Mitarb.³⁹⁾ durch Zulage von proteolysierter Leber, die also noch einen weiteren Wirkstoff enthalten muß.

Assimilation

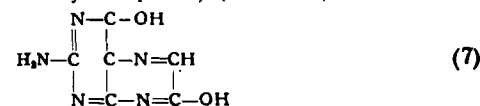
Es kann heute schon kein Zweifel darüber mehr sein, daß die Folsäure eine grundlegende Bedeutung für die Entwicklung aller Zelltypen des Knochenmarks hat und darüber hinaus vielleicht für alle jungen, wachsenden Zellen von entscheidender Wichtigkeit ist. Über die Art ihrer Wirksamkeit liegen zur Zeit nur Vermutungen vor. Nach *Welch*³⁸⁾ soll sie für die Thyminsynthese notwendig sein, eines wichtigen Bausteines

für den Aufbau der Nukleinsäuren. *Spies*⁴⁰⁾ erörtert die Hypothese in gleicher Weise und steuert die bedeutsame Beobachtung bei, daß Thymin (2,4-Dihydroxy-5-methyl-pyrimidin) in Mengen von 4,5 bis 20 g Reticulocytenkrise und Verbesserung des Blutbildes bei macrocytischer Anaemie hervorbringt. Die Reifungssperre der Blutkörperchen im Knochenmark ließe sich so gut verstehen, daß ihnen ein wichtiger Baustoff fehlt. *Deff*³⁹⁾ äußert die Ansicht, daß die Folsäure in eine bestimmte Phase des Proteinstoffwechsels eingreift. Schließlich soll sie ein Enzym oder Coenzym für die Bildung des eigentlichen Leberstoffes sein⁴¹⁾. *Davis*³⁹⁾ fand, daß Folsäure die Serumcholinesterase vermehrt und die Blutzahl von Hunden restoriert, die mit Cholinhydrochlorid gefüttert worden waren.

Vielleicht wird man jetzt nach der Auffindung der Folsäure auch die antibakterielle Wirkung der Sulfonamide besser verstehen lernen. Es ist denkbar, daß diese Verbindungen die Folsäurebildung der sulfonamidempfindlichen Bakterien stören in der Weise, daß der von ihnen intermediär gebildete Pteridinaldehyd (Formel 6) an Stelle von p-Amino-benzoylglutaminsäure oder homologen Verbindungen mit den Sulfonamiden reagiert. Es würde dadurch zu einer Verarmung des Mikroorganismus an diesem Wirkstoff kommen und so die Lebensäußerungen gehemmt werden. Ob diese von mir geäußerte Hypothese richtig ist^{41a)}, müssen Enthemmungsversuche an mit Sulfonamiden vergifteten Bakterien mit Folsäure und verwandten Verbindungen erweisen.



Ob mit Folsäure und Xanthopterin die einzigen biologisch wirksamen Verbindungen der Pteridindergruppe bekannt sind, muß zweifelhaft erscheinen. Bekanntlich hat *Koscharka*⁴²⁾ im Harn noch ein zweites Pteridin-Derivat aufgefunden, das Urothion, in dem an das Pteridinskelett noch eine zuckerähnliche Seitenkette geknüpft ist und das außerdem noch Schwefel enthält. Es ist schwer vorstellbar, daß das Urothion nur ein harnfähig gemachtes Abbauprodukt des Folsäurestoffwechsels ist. Weiterhin sei noch das Vorkommen eines Pteridin-Derivates in Fischschuppen, des Ichthyopterins (Fluorescyanin) erwähnt⁴³⁾, das vielleicht mit Isoxanthopterin (8-Desoxy-leucopterin) (Formel 7) identisch ist.



Auch diese Verbindung ist, allerdings erst mit 200 γ, bei $\frac{2}{3}$ der diätanaemischen Ratten wirksam befunden worden. Schließlich mag auf die Arbeiten von *Jacobsen* hingewiesen werden, der Pterine in den enterochrom-argentoaffinen Zellen von *Nicolas-Masson* auffand, und nach *Busuel* kommt Xanthopterin in den argentoaffinen Zellen des Magens vor und verschwindet daraus bei Sprue und Perniciosa⁴⁶⁾.

Den Pterinen kommt also zweifellos im biologischen Geschehen eine bedeutende Aufgabe zu und es mag vermerkt werden, daß wieder einmal Naturprodukte, die bei ihrer Auffindung mehr ein interessantes Kuriosum darstellten, plötzlich in den Mittelpunkt des Interesses rücken. Als die Farbstoffe der Pteriden durch die Arbeitskreise um *Wieland* und *Schöpf*⁴⁴⁾ bearbeitet wurden, faßte man sie als Abfall- oder Ablagerungsprodukte des Insektenstoffwechsels auf und es schien die Mühe nicht recht verständlich, die man auf die Erforschung dieser schwierig zu beschaffenden Substanzen verwandte. Heute haben diese Arbeiten mit die Grundlage gebildet, die in Amerika eine so schnelle Erforschung dieses interessanten Gebietes ermöglicht haben.

Eingeg. 15. Jan. 1947 [A 19]

³⁶⁾ R. Tschesche, Naturwiss. 27, 176 [1939].
³⁷⁾ J. F. Wilkison, M. C. G. Isaacs u. F. Fletcher, Lancet Nr. 250 6414 156 [1946]. Ebenda Nr. 250 6409, S. 969 [1946].
³⁸⁾ J. Biol. Chemistry 115, 782 [1936].
³⁹⁾ C. V. Moore, O. S. Bierbaum, A. D. Welch u. L. D. Wright, J. Lab. clin. Med. 30, 1056 [1945].
⁴⁰⁾ Report on the Conference on folic acid at The New York Academy of Sciences, May 1946.

⁴¹⁾ L. S. P. Davidson u. R. H. Gridwood, Lancet 250 373 [1946].
⁴²⁾ T. D. Spies, C. F. Viller, J. K. Cline u. W. B. Frommeyer, South. Med. J. 39, 269 [1946].
⁴³⁾ J. Lab. clin. Med. 31, 643 [1946].
⁴⁴⁾ Lancet 250 Nr. 6409, S. 969 [1946].
⁴⁵⁾ R. Tschesche, Z. Naturforsch.: im Druck.
⁴⁶⁾ Nach British Medical Journ.⁴⁵⁾ soll Folsäure das Tumorstadium hemmen; so sollen bei brustkrebskranken Mäusen 43% der Tiere durch 5 γ täglich geheilt worden sein.
⁴⁷⁾ Brit. Med. J. v. 21. 7., S. 91 [1945].
⁴⁸⁾ W. Koscharka, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 279, 44 [1943].
⁴⁹⁾ R. Hüttel u. G. Sprengling, Liebigs Ann. Chem. 554, 69 [1943].
⁵⁰⁾ M. Polonovsky, R. G. Busuel u. M. Pesson, Helv. chim. Acta 29, 1328 [1946].
⁵¹⁾ R. Purrmann, „Über die Farbstoffe der Schmetterlinge“; diese Ztschr. 60, 253 [1943].