

**Bestimmung von
Oxalsäure im Blut
mit einer neu entwickelten
HPLC-Enzymreaktormethode**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn**

**Vorgelegt von
Arne Simon
aus Nümbrecht
2006**

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. A. Hesse
2. Gutachter: Prof. Dr. Siekmann

Tag der mündlichen Prüfung: 21.12.2005

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert

Aus der Abteilung für Experimentelle Urologie
Klinik und Poliklinik für Urologie Universitätsklinikum Bonn
Direktor: Prof. Dr. med. S.C. Müller

**Für meine Eltern
&
im Gedenken an meine Freunde**

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	7
1 Einleitung.....	9
1.1 Oxalsäure.....	11
1.1.1 Analysemethoden für Oxalsäure.....	11
1.1.2 Probenaufarbeitung.....	14
1.1.3 Physiologische und pathologische Oxalsäurewerte.....	20
1.1.4 Oxalsäurebedingte Erkrankungen.....	25
1.1.4.1 Kalziumoxalat-Nephrolithiasis.....	25
1.1.4.2 Primäre Hyperoxalurie.....	27
1.1.4.2.1 Primäre Hyperoxalurie Typ I.....	27
1.1.4.2.2 Primäre Hyperoxalurie Typ II.....	31
1.1.4.3 Sekundäre Hyperoxalurie.....	31
2 Eigene Untersuchungen.....	33
2.1 Material und Methoden.....	33
2.1.1 Oxalsäurebestimmungsmethoden.....	33
2.1.1.1 Hochdruckflüssigkeitschromatographie - Enzymreaktor.....	33
2.1.1.1.1 Chromatographisches System.....	33
2.1.1.1.2 Enzymreaktor.....	35
2.1.1.1.3 Arbeitsvorschrift für die Herstellung eines Enzymreaktors:.....	37
2.1.1.1.4 Elektrochemische Detektion.....	38
2.1.1.1.5 Standards.....	39
2.1.1.2 Probenaufbereitung.....	39
2.1.2 Verwendete Materialien.....	40
2.1.2.1 Chemikalien.....	40
2.1.2.2 Reagenzien (Enzyme und Testkits).....	41
2.1.2.3 Laborgeräte.....	41
2.1.3 Methodik der Blutuntersuchung.....	42
3 Ergebnisse.....	45
3.1 Entwicklung der Analysemethode.....	45
3.1.1 Blutaufbereitung.....	45
3.1.2 Bestimmung der Präzision.....	49
3.1.3 Nachweisgrenze / Bestimmungsgrenze.....	50
3.2 Blutuntersuchung an Gesunden und Kranken.....	54
3.2.1 Gesunde.....	54
3.2.2 Steinpatienten.....	54
3.2.3 Vergleich der ermittelten Plasmaoxalatkonzentrationen zwischen verschiedenen Alters- und Geschlechtsgruppen bei gesunden Probanden.....	56
3.2.4 Vergleich der ermittelten Plasmaoxalatkonzentrationen zwischen verschiedenen Alters- und Geschlechtsgruppen bei Kalziumoxalatsteinpatienten.....	57
3.2.5 Vergleich der ermittelten Plasmaoxalatkonzentrationen verschiedenener Alters- und Geschlechtsgruppen zwischen Gesunden und Kalziumoxalatsteinpatienten..	59
3.2.6 Untersuchung auf Zusammenhänge zwischen der Plasmaoxalatkonzentration und Serumkreatinin, Body-Mass-Index und Steinepisoden.....	60
3.2.6.1 Serumkreatinin.....	60
3.2.6.2 Body-Mass-Index.....	62

	3.2.6.3	Steinepisoden	64
4		Diskussion	66
4.1		Analysemethode	66
4.2		Blutuntersuchung	69
5		Zusammenfassung	73
6		Literaturverzeichnis	75
7		Anhang	99
7.1		Anamnese Blatt I (Bonner Nachsorgeprogramm für Harnsteinpatienten).....	99
8		Danksagungen	100

Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter
µmol	Mikromol
Abb.	Abbildung
AGT	Alanin-Glyoxylat-Aminotransferase
BG	Bestimmungsgrenze
bidest.	bidestilliert
BMI	Body Mass Index
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FAD	Flavin-Adenindinucleotid
FMN	Flavin-Mononucleotid
GR	Glyoxylat-Reduktase
h	Stunde
HPLC	high performance liquid chromatography
HPLC-ER	high performance liquid chromatography- Enzymreaktor
IC	Ionenchromatographie (Dionex System)
l	Liter
M	Molar
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter

mM	Millimolar
mmol	Millimol
mV	Millivolt
MW	Molgewicht
N	Normal
n	Anzahl
nA	Nanoampere
NAD	Nicotinamind-Adenin-Dinucleotid
NG	Nachweisgrenze
nm	Nanometer
p.A.	pro Analyse
PEEK	Polyetheretherketon
PH I	Primäre Hyperoxalurie Typ I
PH II	Primäre Hyperoxalurie Typ II
Pox.	Plasmaoxalatkonzentration
RT	Raumtemperatur
SEM	Standardabweichung
Tab.	Tabelle
Tr.	Tropfen
UF	Ultrafiltrat
V	Volt

1 Einleitung

Die Oxalsäure (Ethandicarbonsäure) gehört zur Gruppe der gesättigten, aliphatischen Dicarbonsäuren. Man findet sie als nutzloses Stoffwechselendprodukt im menschlichen und tierischen Organismus. Als Pflanzensäure ist die Oxalsäure besonders in der Form des Kaliumhydrogenoxalats im Sauerampfer, Sauerklee, Rhabarber und in der Sellerieknolle vertreten.

Schon früh wurde sie als physiologischer Bestandteil des Harns entdeckt. Mit Kalziumionen bildet sie schwerlösliche Salze. So kann in 70 % aller Harnsteine Kalziumoxalat als Bestandteil nachgewiesen werden [Herring 1962, Prien 1963, Flach 1996]. In einer epidemiologischen Umfrage der Bonner Universitätsklinik in Zusammenarbeit mit INFAS (Institut für Angewandte Sozialwissenschaften) zum Harnsteinleiden in der Bundesrepublik Deutschland 1979 und 2001 zeigte sich ein Anstieg der Prävalenz von 4% auf 4,7% und der Inzidenz von 0,54% auf 1,47% [Vahlensieck und Hesse 1981, Hesse 2002a, 2003]. Die Harnsteinentfernung ist durch die extrakorporale Stoßwellenlithotripsie zwar einfach, wirkt aber rein symptomatisch und ist keine kurative Maßnahme. Aufgrund der hohen Rezidivquote (50 - 60 %) ist eine Ursachenbekämpfung von großer Bedeutung. Die Basis hierfür ist eine ausführliche Anamnese der Ernährungsgewohnheiten des Patienten, die als Grundlage für eine Ernährungsumstellung dient [Scharrel & Siener 1993, Hesse et al. 1991]. Eine gezielte Diätberatung kann jedoch nur durchgeführt werden, wenn der Oxalsäuregehalt möglichst vieler Lebensmittel bekannt ist. Zusätzlich kann durch Harnsteinanalysen, Blutuntersuchungen und einer ständigen Kontrolle bestimmter Harnparameter sowie Belastungstests das Harnsteinbildungsrisiko besser abgeschätzt werden [Tiselius et al. 1978, Tiselius 1979, Hesse 1977, von Unruh et al. 2003]. So konnte durch eine individuelle Beratung im Bonner Nachsorgeprogramm für Harnsteinpatienten die Rezidivrate signifikant gesenkt werden [Nolde 1993].

Die Bestimmung der Oxalsäurekonzentration im Blutplasma ist von besonderer Bedeutung in der Diagnostik und Behandlung der primären Hyperoxalurie, der chronischen Niereninsuffizienz, insbesondere der dialysepflichtigen terminalen

Niereninsuffizienz, der Nephrolithiasis als auch bei Alkoholvergiftungen [Wolthers et al. 1986, Costello und Landwehr 1988]. So ist der wichtigste Schritt in der laborchemischen Diagnostik der primären Hyperoxalurie, eines autosomal rezessiv vererbten Enzymmangels, die Bestimmung des Oxalsäuregehaltes im Blut [Porowski et al. 2003].

Die Bestimmung von Oxalsäure im Blut ist jedoch aus vielerlei Hinsicht problematisch. So Bedarf es aufgrund der sehr geringen Menge von Oxalsäure im Blut einer Meßmethode von sehr hoher Spezifität und Sensitivität. Viele Nachteile wie geringe Sensitivität, hohe Laborkosten, aufwendige Meßapparaturen oder die Verwendung von radioisotopischen Methoden haben bisher die Entwicklung einer Meßmethode für größere Populationen verhindert. Desweiteren können verschiedene Störeinflüsse durch die komplexe Matrix der Blutproben bei der Probenaufarbeitung z.B. durch Extraktion, Präzipitation oder Ultrafiltration zu Fehlbestimmungen führen.

Während früher die Oxalsäure zunächst als Kalziumoxalat präzipitiert und anschließend titrimetrisch bestimmt wurde, kann heute durch den Einsatz von chromatographischen Trennsystemen oder enzymatischen Methoden auf eine zeitaufwendige und unpräzise Aufarbeitung verzichtet werden. Die enzymatischen Methoden besitzen aufgrund der selektiv arbeitenden Enzyme eine sehr hohe Spezifität. Häufig werden sie mittels freier Enzyme, Hilfsreaktionen und anschließender spektrometrischer Detektion durchgeführt. In jüngerer Zeit werden immer häufiger immobilisierte Enzyme eingesetzt. Während dabei zunächst die Senkung der Enzymkosten im Vordergrund stand, wird heute durch eine Kombination mit chromatographisch-apparativen Methoden und empfindlichen Detektionssystemen, zusätzlich eine weitgehende Automatisierung angestrebt [Assolant-Vinet et al. 1987, Galensa et al. 1988].

In der vorliegenden Arbeit wurde eine neue Methode zur Messung der Oxalsäurekonzentration im Blut entwickelt und erprobt. Anhand dieser Methode konnte erstmalig ein großes Kollektiv an Gesunden und Kranken untersucht werden. Es wurden Oxalsäurewerte für 133 Gesunde und 87 Kalziumoxalatsteinpatienten ermittelt. Das Kollektiv wurde nach Alter und Geschlecht in Gruppen unterteilt und auf signifikante Unterschiede untersucht. Zusätzlich wurde im Patientenkollektiv eine Korrelation

weiterer Parameter (Gewicht, Größe, BMI, Serumkreatinin) mit der Oxalsäurekonzentration im Blut geprüft.

1.1 Oxalsäure

Oxalsäure ist eine relativ starke organische Carbonsäure mit Dissoziationskonstanten von $K_{SI} = 2,4 \cdot 10^{-2}$ und $K_{SII} = 5,4 \cdot 10^{-5}$ mol/l ($pK_{SI} = 1,62$ und $pK_{SII} = 4,27$). Die relative Molmasse der Säure beträgt $M_r = 90$ g/mol. Die freie Säure ist mit 7,4 g/100 g Wasser bei 20 °C wenig wasserlöslich. In der Natur kommt Oxalsäure meist als Kalium-, Natrium- oder Kalziumsalz vor. Natrium- und Kaliumsalze sind leicht löslich, während Kalziumsalze extrem gering wasserlöslich sind. Das Kalziumsalz löst sich bei 20 °C mit nur 0,51 mg/100 g Wasser. Das thermodynamische Löslichkeitsprodukt L_0 in Wasser beläuft sich bei 37 °C auf $3,0 \cdot 10^{-9}$ (mol/l)² [Lax & Synowietz 1967].

1.1.1 Analysemethoden für Oxalsäure

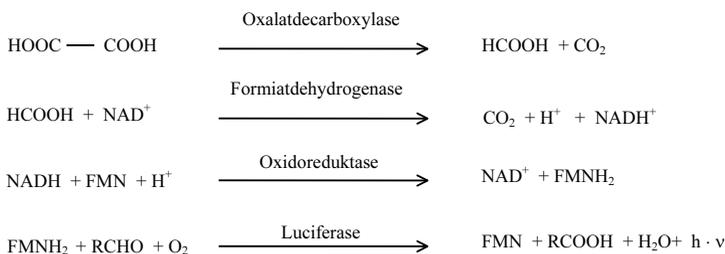
Seit Anfang des 20. Jahrhundert wurden viele Methoden zur Oxalsäureanalyse im Urin entwickelt. Lange Zeit war der eigentlichen quantitativen Analyse eine Separation der Oxalsäure vorgeschaltet. Zur Separation der Oxalsäure wurden Verfahren der Präzipitation, Lösungsmittlextraktion, daraus kombinierte Methoden sowie die Abtrennung auf Anionenaustauschern entwickelt [Luque de Castro 1988]. In neuerer Zeit werden zur Isolierung auch C₁₈-Cartridges verwendet. Hierbei wird Oxalsäure mit einem Methanol-Wasser-Gemisch eluiert, während unpolare und semipolare Substanzen aus der Probe entfernt werden [Larsson et al. 1985, Fry & Starkey 1991].

Zur quantitativen Analyse werden entsprechend dem Probenmaterial und der apparativen Ausrüstung eine Vielzahl von modernen Methoden beschrieben. Nur ein sehr geringer Teil der publizierten Methoden konnte sich jedoch in den Forschungs- und Routinelabors etablieren, da sowohl die Verlässlichkeit wie auch die Praktikabilität oft nicht ausreichend sind.

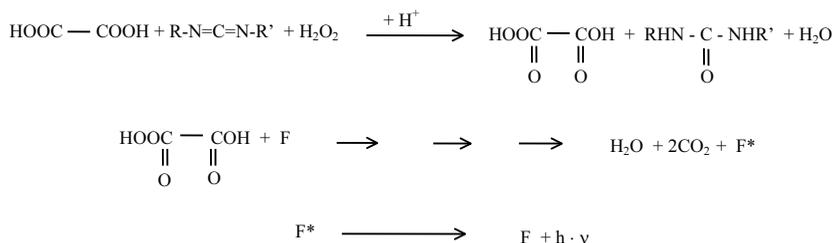
Aufgrund der komplexeren Matrix und der drei Zehnerpotenzen kleineren Oxalsäurekonzentration gegenüber Urinproben kann der Oxalsäuregehalt im Blut nicht immer mit den Methoden für Urin bestimmt werden. Aufgrund des Proteingehaltes im Blut ist eine direkte chromatographische Bestimmung nicht möglich. Während die meisten Matrixeinflüsse durch eine Ultrafiltration beseitigt werden können, muß aufgrund der geringen Oxalsäurekonzentration eine Methode gewählt werden, die eine genügend kleine Bestimmungsgrenze hat, ansonsten müßte die Oxalsäure vor der Analyse extrahiert und aufkonzentriert werden, was häufig die Wiederfindung und die Präzision negativ beeinflusst.

Oftmals wird eine Methode analog der enzymatischen Oxalatbestimmung mittels „Sigma-Kit“ verwendet [Petrarulo et al. 1994]. Dieses Kit wurde von der Firma Sigma-Diagnostics zur Oxalatbestimmung im Urin entwickelt. Hierbei wird eine Urinmenge von 1,5 ml in einer Küvette mit Enzym versetzt. Das entstandene H_2O_2 wird anschließend quantitativ durch Farbreaktion spektralphotometrisch bestimmt. Um auch kleinere Oxalsäurekonzentrationen zu bestimmen, kann die Kontaktzeit der Probe mit dem Enzym verlängert werden um die Umsatzrate und damit die H_2O_2 -Menge zu erhöhen. Außerdem kann die Detektorverstärkung heraufgesetzt werden [Kasidas & Rose 1986].

Auch Decarboxylase wird zur Oxalsäurebestimmung im Blut eingesetzt [Hatch et al. 1977, Costello und Landwehr 1988]. *Bennett* gibt vor der enzymatischen Umsetzung ^{14}C -markiertes Oxalat zu, und bestimmt die in der Probe vorhandene Oxalsäure aus dem Verhältnis $CO_2/^{14}CO_2$ [Bennett et al. 1979]. *Parkinson* erzielt eine hohe Empfindlichkeit, indem er das entstandene NADH mit FMN und Oxidoreduktase zu $FMNH_2$ reduziert. $FMNH_2$ wird mit Hilfe eines langkettigen Aldehyds (z.B: Decanal) und einer bakteriellen Luciferase wieder zu FMN oxidiert. Dabei wird Licht emittiert, das mit Hilfe eines Luminometers gemessen werden kann [Parkinson et al. 1985]:



Albrecht oxidiert Oxalsäure mit Wasserstoffperoxid und Carbodiimid zu Monoperoxyoxalsäure, die mit einem „Fluoreszer“ (F) unter Lichtemission zu Kohlendioxid und Wasser zerfällt. Auch hier wird die Lichtemission gemessen und auf die in der Probe enthaltene Oxalsäure zurückgerechnet [Albrecht et al. 1995].



Seit den neunziger Jahren wird auch die Ionenchromatographie zur Oxalsäurebestimmung im Blut verwendet [Hoppe et al. 1998, Reinholz 1994, Petrarulo et al. 1990b,c/1993]. In allen Publikationen wird der Ionenchromatograph der Firma Dionex verwendet.

Bei älteren Systemen war die Trennung des Oxalatpeaks vom Sulfatpeak aufgrund der ungünstigen Mengenverhältnisse schwierig. Laut *Hoppe et al.* ist bei neueren Trennsäulen (Dionex AS12), eine Basislinientrennung vom Sulfatpeak möglich und damit die Integration kleiner Oxalsäurepeaks wesentlich genauer. Ein typisches Chromatogramm zeigt Abbildung 1.

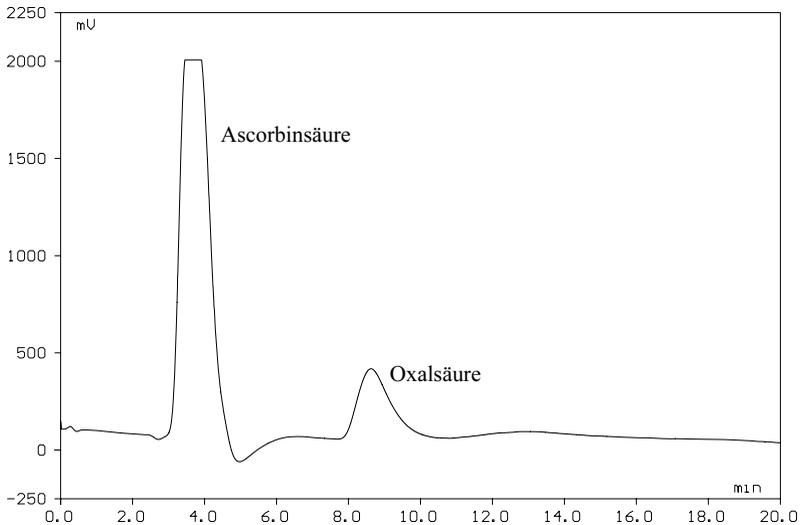


Abbildung 1: Chromatogramm einer Standardlösung von Ascorbinsäure und Oxalsäure, je 10 $\mu\text{mol/l}$; EDTA-Puffer pH 5,0 und Anionenaustauschersäule AS4-A x 4 mm, Dionex 2000i

1.1.2 Probenaufarbeitung

Um Störungen bei der quantitativen Bestimmung der Oxalsäure im Blut vorzubeugen, sollte bei der Probenaufarbeitung folgendes beachtet werden:

- Die Bildung von Protein-Oxalat-Komplexen muß verhindert werden, da sonst die gebundene Oxalsäure nicht detektiert wird.
- Eine Oxalsäureneubildung aus Ascorbinsäure muß unterdrückt werden. *Akay und Rose* vermuteten auch eine Oxalsäureneubildung aus Glyoxylsäure im Vollblut [Akay & Rose 1980]. Andere Autoren zeigten, daß diese Oxalsäureneubildung nur eine untergeordnete Rolle spielt [Marguire et al. 1988].

- Der Eiweißgehalt der Meßlösung sollte möglichst gering sein, damit das analytische System (Trennsäule, Filter, Kapillare, Meßelektrode) nicht belastet wird.

In der Literatur werden mehrere Möglichkeiten der Aufbereitung beschrieben:

Zur Enteiweißung der Proben können verschiedene Methoden angewendet werden. Häufig werden spezielle Ultrafiltrationsröhrchen benutzt. Diese Röhrchen besitzen ein Außenrohr und ein Innenrohr (sogenannter Schwimmer) mit einer Membran, die nur für Moleküle mit einer definierten maximalen Größe (cut-off) durchlässig ist [Skotty & Nieman 1995]. Die Ultrafiltration wird sowohl für Blutserum, wie auch für Plasma verwendet [Borland et al. 1987, Butz & Kohlbecker 1980]. Plasmaproben werden meist unbehandelt oder angesäuert ultrafiltriert [Berckman & Boer 1988, Costello & Landwehr 1988, Costello et al. 1991, Costello & Smith 1992, Kasidas & Rose 1986, Petrarulo et al. 1990b, Rolton et al. 1989, Wilson & Liedtke 1991]. Seltener werden aber auch Proben im Alkalischen aufbereitet. So ultrafiltrieren beispielsweise *Borland, Butz und Kohlbecker* das Serum, nachdem sie es auf pH 10,6 bzw. 11,6 eingestellt haben [Borland et al. 1987, Butz & Kohlbecker 1980]. *Petrarulo* verwendet neben der Ultrafiltration noch eine andere Methode zur Enteiweißung. Er mischt 500 µl Plasma mit einer 1,57 M Sulfosalicylsäurelösung und zentrifugiert anschließend die Proteine ab [Petrarulo et al. 1993,1994]. Andere Autoren fällen die Proteine durch Erhitzen des angesäuerten Plasmas oder durch Zugabe von Methanol aus. Anschließend werden die ausgefallenen Proteine durch Zentrifugieren von der Lösung abgetrennt [Albrecht 1993, Boer et al. 1984, Gebhardt et al. 1992, Yamato et al. 1994].

Fry und Starkey umgehen eine Ultrafiltration, indem sie die mit Acetatpuffer vermischte Probenlösung auf eine Bond-Elut-SAX-Säule geben. Anschließend wird die Oxalsäure mit Kaliumhydrogenphosphatlösung pH 3,0 eluiert. Das Eluat dient als Meßlösung. Diese Art der Aufbereitung hat den Vorteil, daß durch eine Veränderung des Elutionsvolumens eine Aufkonzentrierung der Oxalsäure möglich ist [Fry & Starkey 1991].

Auch *Petrarulo et al.* beschreiben, außer den oben bereits erwähnten Proteinabtrennungen, eine Extraktion der Oxalsäure aus dem Probenmaterial. Die Oxalsäure wird mit 1 ml Acetonitril aus 0,5 ml angesäuertem Plasma extrahiert [Petrarulo et al. 1993].

Als Ausgangssubstanzen für eine Oxalsäureneubildung werden Ascorbinsäure und Glyoxylsäure beschrieben [Marguire et al. 1981, Hoppe et al. 1998, Rolton et al. 1989]. *Marguire* zeigt durch Zusätze von Glyoxylat und Enzyminhibitoren, daß die von *Akcaj und Rose* postulierte enzymatische Oxidation der Glyoxylsäure im Vollblut nur eine untergeordnete Rolle spielt. Nach *Akcaj und Rose* findet eine enzymatische Umsetzung der Glyoxylsäure nur im Vollblut (enthält Xanthinoxidase, Lactatdehydrogenase und Glycolatoxidase) und nicht im Plasma statt. *Zarembski und Hodgkinson* konnten im Vollblut keine Glyoxylsäure ($< 4,5 \mu\text{mol/l}$) nachweisen. Daraus schlossen *Costello und Landwehr*, daß während der Plasmagewinnung keine nennenswerten Mengen an Oxalsäure entstehen können [Zarembski & Hodgkinson 1965b, Costello & Landwehr 1988]. Hauptursache für eine Erhöhung der Oxalsäure während der Lagerung bzw. Aufarbeitung ist die nicht-enzymatisch ablaufende Oxidation der Ascorbinsäure [Costello & Landwehr 1988, Boer et al. 1984]. Daher werden die Blutproben vor oder während der Ultrafiltration zur Stabilisierung der Ascorbinsäure angesäuert. *Fry und Starkey* verwenden zur Stabilisierung der Ascorbinsäure dl-Dithiothreitol ($12,5 \text{ mmol/l}$) [Fry & Starkey 1991].

Kasidas und Rose zerstören die Ascorbinsäure mit Natriumnitrit oder säuern das Plasma auf pH 3,6 - 4,0 an. Die Kontrolle durch Ascorbinsäurezugaben ergab, daß in beiden Fällen keine Oxalsäureneubildung stattfindet [Kasidas & Rose 1986]. Auch *Rolton* untersuchte mittels Ascorbinsäurezugaben, welche pH-Einstellung bei der Herstellung des Ultrafiltrates die besten Wiederfindungsraten liefert. Er fand, daß ein Ansäuern während der Ultrafiltration am günstigsten ist, weil so nicht nur die Ascorbinsäureoxidation verhindert wird, sondern auch eine Bildung von Protein-Oxalat-Komplexen [Rolton et al. 1989]. Die durch Zugabe von C^{14} -Oxalat ermittelten Wiederfindungsraten lagen bei

direkter Säurezugabe zum Plasma unter 70 %, während die Wiederfindungsraten bei einer Säurezugabe in das Innenröhrchen, auf 96 % stiegen. Die Bildung von Protein-Oxalat-Komplexen findet vorwiegend bei pH-Werten unterhalb von 5,0 statt [Hodgkinson & Zarembski 1968]. *Costello und Landwehr* geben eine Grenze von pH 6,0 für die Bildung solcher Komplexe an. Deshalb wurde in späteren Arbeiten das Plasma erst während der Ultrafiltration angesäuert, indem die Säure in das Innenrohr der Zentrifugenröhrchen gegeben wurde [Hoppe et al. 1998, Reinholz 1994].

Auch *Petrarulo* untersuchte durch Zugabe von C^{14} -Oxalat den Einfluß verschiedener Säuremengen auf die Wiederfindungsrate. Die Säure vermischte er vor der Ultrafiltration mit dem Plasma. Er fand, daß die Wiederfindungsrate bei der Zugabe von 40 µl konzentrierter Säure je ml Plasma höher ist (95 %), als bei der Zugabe von nur 10 - 30 µl je ml Plasma (57 - 71 %). Daraus folgert er, daß die Protein-Oxalat-Komplexe bei sehr niedrigen pH-Werten aufgelöst werden können [Petrarulo et al. 1990b]. Es muß aber beachtet werden, daß eine zu hohe Säurekonzentration in der Analysenlösung bei enzymatischen Methoden zu einem Aktivitätsverlust führen können. *Petrarulo et al.* verwenden die Ionenchromatographie, stellen aber in späteren Publikationen selbst fest, daß die Ionenchromatographie zu unempfindlich für die Analyse von Blutplasmaproben mit einem Oxalsäuregehalt im Normalbereich (Gesunde) ist [Petrarulo et al. 1993/94]

Bei Aufarbeitungen, die eine Ultrafiltration umgehen, muß die Ascorbinsäureoxidation durch Zusatz von Stabilisatoren und die Protein-Oxalat-Komplexbildung durch Verwendung eines Puffers (pH >5,0) vermieden werden [Fry & Starkey 1991].

Petrarulo et al. fanden, daß das Einfrieren des Ultrafiltrates bei -21 °C innerhalb von 24 h zu erhöhten Oxalsäurekonzentrationen führt (durchschnittlich von 12,0 auf 27,1 µmol/l). Deshalb empfehlen sie, die Proben direkt nach der Ultrafiltration zu analysieren [Petrarulo et al. 1990b, Petrarulo & Marangella 1990c].

Thakur und Pundir verwenden eine enzymatisch kolorimetrische Methode. Aufgearbeitet wird das Blut durch Ultrafiltration mit Ansäuerung im Sammelrohr durch 3,5N HCL. Als Enzym wird hier Oxalatoxidase von Hirseblättern verwendet. *Thakur* verbessert die Effizienz dieser Methode indem er die Oxidase und Peroxidase, welche *Pundir* als flüßige Reagenz verwendete, auf alkylaminierte Glassperlen immobilisierte und dadurch eine Wiederverwendbarkeit (>200 mal ohne Aktivitätsverlust) erreichte [Thakur 2000, Pundir 1998].

Ogura bestimmt Oxalsäure durch Kapillarelektrophorese. Nach Ultrafiltration und Kühlung wird die Probe mit 300 mM Borsäure und 50 mM Phosphorsäure verdünnt und angesäuert. Anschließend erfolgt die Auftrennung über eine 60 cm lange und im Durchmesser 100 micron große Siliziumdioxidkapillare. Auf einem Waters Quanta 4000 System wird bei 185nm Oxalsäure detektiert [Ogura 2000].

In einer aktuellen Studie untersuchen *Harris et al.* (2004) mit einem Ionenchromatographen die Fehlerquellen der Oxalsäureanalyse durch

1. unvollständige Ultrafiltration,
2. iatrogene Störungen durch Ultrafiltrationsröhrchen,
3. den Einfluß von Chloridionen.

Ad 1. Zur Objektivierung von Oxalsäureverlusten durch unvollständige Ultrafiltration wurde eine Testserie mit C¹⁴ markierter Oxalsäure durchgeführt. Dabei wurde vor der Ultrafiltration eine definierte Menge C¹⁴ Oxalat hinzugegeben und nach Filtration die Wiederfindungsrate bestimmt. Dieses Verfahren wurde mit 12 verschiedenen Ultrafiltrationsröhrchen durchgeführt. Jedes Röhrchen wurde zweimal mit 6 verschiedenen Proben gemessen. Dabei zeigte sich für die Einzelmessung der Röhrchen eine hohe Streuung hinsichtlich des Volumen und des C¹⁴ Oxalatverlustes (z.B. Millipore Centrifree 66-90% Volumen und 75-92% C¹⁴ Ox.verlust). Aufgrund der Streuung ließ sich kein Korrekturfaktor errechnen. Trotz des hohen Volumen und Markerverlustes fand

sich bei 6 Ultrafiltrationsröhrchen eine Wiederfindungsrate über 90%. Die Autoren geben eine Reduzierung der mittleren Oxalsäurekonzentration im Ultrafiltrat durch eine Säure-Harz-Bindung von $24\% \pm 2\%$ (mean \pm S.D.) an. Eine weitere Reduzierung um $6.0\% \pm 0.8\%$ (mean \pm S.D.) entsteht durch eine Oxalsäurebindung an das Silberharz, welches zur Chloridausfällung zugesetzt wird.

In einer weiteren Testreihe wurde der Einfluß von C^{14} Ox. auf die Wiederfindungsrate untersucht. Es wurden drei verschiedene Testseren (Mensch, Ratte, künstliches Serum) mit ansteigenden C^{14} Mengen (0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 μ Ci) versetzt. Gleichzeitig wurde der Grundgehalt an nicht markierter Oxalsäure erhöht (0.45, 0.9, 1.8, 3.6, 7.2 μ mol/l). Die Wiederfindungsraten lagen konzentrationsunabhängig bei allen Proben im künstlichen Serum bei 90%, im Menschenserum bei 80% und im Rattenserum bei 60%. Somit hat die Oxalatkonzentration keinen Einfluß auf die Wiederfindungsrate.

Ad 2. Die Autoren spülten die Ultrafiltrationsröhrchen vor Gebrauch mit Reinstwasser und analysierten das Spülwasser mittels Ionenchromatographie. Dabei zeigte sich ein Störpeak bei der Retentionszeit von Oxalsäure der einer Konzentration von 0.4 bis 2.6 μ mol/l entspricht. Durch entsprechende Vorwaschung der Röhrchen ließ sich dieser Einfluß beseitigen.

Ad 3. Zusatz von 150 μ mol/l und 171 μ mol/l NaCl reduzierte das Signal der Standardmessung um 48% und 56%. Zusatz von HCO_3^- von 21 μ mol/l hatte keinen Effekt auf das Signal. Der Einfluß von Cl^- kann durch Einsatz eines Ionenaustauscherharzes mit Silberkationen vor der Analyse beseitigt werden [Harris et al. 2004].

Porowski und Galasinski verwenden eine Analysemethode analog dem Sigma-Kit. Oxalsäureverluste werden durch die Zugabe von externem Oxalat verhindert. Störungen der enzymatischen Umsetzung und der Farbreaktion werden durch vorherige Präzipitation und Abtrennung von Kalziumoxalat ausgeschlossen [Porowski und Galasinski 2003].

1.1.3 Physiologische und pathologische Oxalsäurewerte

Aufgrund der unterschiedlichen Aufarbeitungs- und Analysenmethoden werden zum Teil sehr unterschiedliche Angaben zum Oxalsäuregehalt im Blut gemacht. Die durchschnittliche Oxalsäurekonzentration im Blutplasma wird bei Gesunden meist mit $< 6 \mu\text{mol/l}$ angegeben [Harris et al. 2004, Porowski et al. 2003, Thakur et al. 2000, Ogura et al. 2000, Pundir et al 1998, Gaulier et al.1998, Petrarulo et al. 1994].

Die Blutproben von Kranken enthalten oft sehr viel mehr Oxalsäure. *Albrecht et al.* fanden bei Kalziumoxalatsteinpatienten erhöhte Konzentrationen von $16.4 \pm 9.8 \mu\text{mol/l}$ ($n=20$). *Oehlschläger* beschreibt für ein gleich großes Kollektiv ($n=21$) Konzentrationen von $4.64 \pm 1.96 \mu\text{mol/l}$ [Albrecht et. al 1993, Oehlschläger et al. 1998]. Für die Primäre Hyperoxalurie Typ I werden Werte von $6.9 \pm 3.3\mu\text{mol/l}$ [Wilson et al. 1987] bis $178.2\mu\text{mol/l}$ [Petrarulo et al. 1994] angegeben. Für die Primäre Hyperoxalurie Typ II fanden *Milliner et al.* 2001 deutlich niedrigere Werte mit $3.8 \pm 3.3\mu\text{mol/l}$ bei einem Kollektiv von 8 Patienten. Im fortgeschrittenen Stadium der primären Hyperoxalurie Typ I mit dialysepflichtiger Niereninsuffizienz wurden deutlich erhöhte Oxalsäurekonzentrationen von $125.7 \pm 17.9\mu\text{mol/l}$ [Hoppe et al. 1999] festgestellt. Erhöhte Oxalsäurewerte finden sich auch bei chronischer Niereninsuffizienz ohne Steinanamnese ($14.0 \pm 1.21\mu\text{mol/l}$) [Hoppe et al. 1998], bei septischen Patienten [Albrecht et al. 1995] und bei Dialysepatienten ohne Steinanamnese ($38.0 - 608.0\mu\text{mol/l}$) [Borland 1987].

Beispiele von Literaturangaben für gesunde Erwachsene sind in Tabelle 1, für Kinder in Tabelle 2 und für Kranke in Tabelle 3 zusammengefaßt. Tabelle 4 gibt eine Übersicht über krankheitsbezogene Oxalsäurekonzentrationen im Blut.

Tabelle 1: Physiologische Oxalsäurekonzentrationen im Blut von Erwachsenen

Autor	Jahr	Methode / Aufbereitung	Plasmaoxalat µmol/l	Anzahl
Zarembki & Hodgkinson	1965	Fluorimetrie, mit Essigsäure kochen	22.7 – 36.4 15.3 – 31.8	n=15 n=15
Hodgkinson & Zarembki	1968	Chromotropsäuremethode	14.4 – 28.9	n=10
Hatch et al.	1977	Decarboxylase	♂ 11.3 – 26.7	n=20
			♀ 11.5 – 25.0	n=20
			♂ 8.1 – 22.1	n=24
			♀ 15.1 – 51.7	n=16
Akcay & Rose	1980	Decarboxylase	0 – 5.4	n=11
Butz & Kohlbecker	1980	Oxalsäureoxidase/ Ultrafiltrat	♂ 30.8 ± 8.8	n=50
			♀ 39.5 ± 10.5	n=49
Gelot et al.	1980	GC	9 – 41	n=21
Boer et al.	1984	Oxalsäureoxidase/ mit Säure erhitzt + Merthiolat	1.2 – 6.4	n=24
Kasidas & Rose	1986	Oxalsäureoxidase/ Ultrafiltrat	♂ 1.87	n= 12
			♀ 2.25	n= 9
Berckmans & Boer	1988	Oxalsäureoxidase/ Ultrafiltrat	0.4 – 3.7	n=49
Costello & Landwehr	1988	Decarboxylase / Ultrafiltrat	0,3 - 2,2	n=23
Wilson et al.	1988	Oxalsäureoxidase/ Ultrafiltrat +NaNO ₂	2.9 ± 1.2	n=19
Rolton et al.	1989	Oxalsäureoxidase / Ultrafiltrat	< 2 – 5	n=25
Petrarulo et al.	1990	IC / Ultrafiltrat	6.75 ± 2.62	n=18
Fry & Starkey	1991	Ionenpaarchrom./ + Dithiothreitol; Bond Elut Säule	(nüchtern)	n=32
			0.7 – 3.9	n=48
			(nicht nüchtern)	
Wilson & Liedtke	1991	Oxalsäureoxidase/ Ultrafiltrat	♂ 2.8 ± 0.7	n=21
			♀ 2.3 ± 0.7	(ges.)
Petrarulo et al.	1993	IC / Acetonitrilextrakt	0.8 – 3.4	n=31
Petrarulo et al.	1994	Oxalsäureoxidase/ SSA-Lösung +Aktivkohle	0.6 – 2.9	n=32
Albrecht et al.	1995	Chemiluminiszenz / Methanol- Proteinausfällung	3.2	ohne Angabe
Oehlschläger et al.	1998	Chemiluminiszenz/ Methanol- Proteinausfällung	3.2 ± 0.99	n=20
Pundir et al.	1998	UF/enzymatisch- kolorimetrisch	3.2 ± 0.5	n=15

Autor	Jahr	Methode / Aufbereitung	Plasmaoxalat μmol/l	Anzahl
Gaulier et al.	1998	Chemiluminiszenz	1.8 ± 1.0	n=30
Thakur et al.	2000	UF/enzymatisch- kolorimetrisch	3.6 - 5.7 4.5 ± 0.48	n=73 ♂ n=34 ♀ n=39
Ogura et al.	2000	Kapillar-Elektrophorese	2.39 ± 1.46	♂ n=8
Hönow & Simon	2002	UF/ HPLC-ER	2.65 ± 0.23	n=133
Porowski & Galasinski.	2003	Enzymatisch- kolorimetrisch	1.4 - 6.0	n=30
Harris et al.	2004	UF/ IC	1.47 ± 0.15	n=6

Tabelle 2: Physiologische Oxalsäurekonzentrationen im Blut von Kindern

Autor	Jahr	Methode	Plasmaoxalat μmol/l	Anzahl
Barrett et al.	1991	Oxalsäureoxidase	1,53 (0,78-3,02)	n=33
Gaulier et al.	1997	Chemiluminiszenz	3,3 ± 1,7	n=30
Hoppe et al.	1998	Ionenchromato-graphie	♂ 6,20 ± 1,06 ♀ 6,63 ± 1,09	n=23 n=27
Porowski et al.	2003	Enzymatisch- kolorimetrisch	1.1 – 6.0	n=40

Tabelle 3: Pathologische Oxalsäurekonzentrationen im Blut von Kranken

Autor	Jahr	Methode/ Aufbereitung	Krankheit	Plasmaoxalat μmol/l	Anzahl
Yamauchi	1985	Ø Angabe	Hämodialyse (ohne PH)	31.9 ± 11.1	n=14
			Peritonealdialyse (ohne PH)	30.2 ± 11.2	n=14
Borland et al.	1987	Enzymatisch	Hämodialyse (ohne PH)	38 – 608	n=11
			Peritonealdialyse (ohne PH)	50 - 400	n=10
Wilson et al.	1988	Oxalsäureoxidase/U ltrafiltrat +NaNO ₂	PH I	6,9 ± 3,3	n=14
Petrarulo et al.	1990	Ionenchromato- graphie	Hämodialyse (ohne PH)	Prä 48.1±15.9 Post 18.0±10.1	n=20
Costello et al.	1991	Ultrafiltration	Hämodialyse (ohne PH)	Prä 445μg/100ml Post 52μg/100ml	n=25

Autor	Jahr	Methode/ Aufbereitung	Krankheit	Plasmaoxalat µmol/l	Anzahl
McConnell	1991	Ø Angabe	Hämodialyse (ohne PH)	42.0	n=20
			Peritonealdialyse (ohne PH)	34.0	n=20
Costello et al.	1992	Ultrafiltration	Hämodialyse (ohne PH)	57 – 90	n=35
Albrecht et al.	1993	Chemiluminiszenz	CaOx Steinpat. Hämodialyse	16.4 ± 9.8 prä 141.4 ± 32.1 post 36.4 ± 12.7	n=20 n=20 n=14
			PH I Dialyse bei PH I Niereninsuffizienz (ohne PH)	16.4 – 178.2 prä 136 – 172 44.0 ± 6.9	n=7 n=3 n=10
Albrecht et al.	1995	Chemiluminiszenz/ Methanol- Proteinausfällung	Sepsis: -Kinder -Erwachsene	16.8 20.8	o.A.
			CaOx. Steinpat.	4,64 ± 1,96	n=21
Oehlschläger et al.	1998	Chemiluminiszenz/ Methanol- Proteinausfällung			
Hoppe et al	1998	IC	Niereninsuff. (ohne PH)	14.0 ± 1.21	n=54
			PH I (ohne Niereninsuff.)	17.1 ± 1.6	n=17
Gaulier et al.	1998	Chemiluminisiz.	PH I	16.9 - 54.4	n=5
Hoppe et al.	1999	IC	Hämodialyse (bei PH I)	125.7 ± 17.9	n=7
			Hämodialyse (ohne PH I)	44.2 ± 3.3	n=33
Nolkemper et al.	2000	Ø Angabe	PH I o Niereninsuff. 4 Wochen nach Lebertransplant.	17.0 – 33.0	n=4
			PH I	5.0 – 12.0	
Milliner et al.	2001	Ø Angabe	PH I	5.7 ± 3.5	n=12
			PH II	3.8 ± 3.3	n=8
Hönow et Simon	2002	UF/ HPLC-ER	CaOx.Steinpat.	4.34 ± 0.55	n=87
Porowski	2003	UF/ Semimicro- Methode	Nierenerkrankung ohne PH	10.0 – 50.0	n=24
Diaz et al.	2004	Ø Angabe	PH I mit Dialyse	3.2 – 12.0	n=1

Tabelle 4: Pathologische Oxalsäurekonzentrationen bei verschiedenen Erkrankungen

Krankheit	Jahr	Autor	Plasmaoxalat $\mu\text{mol/l/l}$	Anzahl
PH I ohne Angabe einer Niereninsuffizienz	1988	Wilson et al.	6.9 ± 3.3	n=14
	1998	Hoppe et al.	17.1 ± 1.6	n=17
	2001	Milliner et al.	5.7 ± 3.5	n=12
PH I mit Niereninsuffizienz	1994	Petrarulo et al.	16.4 - 178.2	n=7
	1998	Gaulier et al.	16.9 - 54.4	n=5
	2000	Nolkemper et al.	17.0 - 33.0	n=4
PH mit Hämodialyse I	1994	Petrarulo et al.	136.0 - 172.0	n=3
	2004	Diaz et al.	3.2 - 12.0	n=1
	1999	Hoppe et al.	125.7 ± 17.9	n=7
PH II	2001	Milliner et al.	3.8 ± 3.3	n=8
CaOx. Steinpatienten	1993	Albrecht	16.4 ± 9.8	n=20
	1998	Oehlschläger et al.	4.64 ± 1.96	n=21
	2002	Hönow & Simon	4.34 ± 0.55	n=87
Hämodialyse Steinanamnese ohne	1985	Yamauchi et al.	31.9 ± 11.1	n=14
	1987	Borland et al.	38.0 - 608.0	n=11
	1991	McConnell et al.	42.0	n=20
	1992	Costello & Smith	57.0 - 90.0	n=35
	1999	Hoppe et al.	44.2 ± 3.3	n=33
Hämodialyse Steinanamnese ohne (Prä-Dialyse)	1990	Petrarulo & Marangella	A 48.1 ± 15.9	n=20
	1991	Costello et al.	B 445 $\mu\text{g}/100\text{ml}$	n=25
	1993	Albrecht	C 141.4 ± 32.1	n=20
Hämodialyse Steinanamnese ohne (Post-Dialyse)			A 18.0 ± 10.1	
			B 52 $\mu\text{g}/100\text{ml}$	
			C 36.4 ± 12.7	
Peritonealdialyse Steinanamnese ohne	1985	Yamauchi et al.	30.2 ± 11.2	n=14
	1987	Borland et al.	50.0 - 400.0	n=10
	1991	McConnell et al.	34.0	n=20
Sepsis	1995	Albrecht et al.	16.8 20.8	1 Kind 1 Erw.
Niereninsuffizienz Steinanamnese, Nicht-Dialysepflichtig	1994	Petrarulo et al.	44.0 ± 6.9	n=10
	1998	Hoppe et al.	14.0 ± 1.21	n=54

1.1.4 Oxalsäurebedingte Erkrankungen

1.1.4.1 Kalziumoxalat-Nephrolithiasis

Aktuelle epidemiologische Untersuchungen zeigen für die Urolithiasis eine Prävalenz von 4,7% und eine Inzidenz von 1,47% in der Bundesrepublik Deutschland [Hesse 2003]. 85% aller Harnsteine enthalten Kalziumsalze als Hauptkomponente [Glauser et al. 2000]. Die Entdeckung von Kalziumoxalat in Harnsteinen gelang Bergmann bereits im Jahre 1776. Als physiologischer Bestandteil des Harns wurde Oxalsäure von *Donne* 1838 entdeckt und durch *Schultzen* 1869 gesichert [Wyngaarden & Elder 1966, Berg 1990]. Aufgrund der geringen Löslichkeit von Kalziumoxalat ist Harn mit ca. 2 - 5 mmol/l Kalzium und ca. 0,2 - 0,35 mmol/l Oxalsäure ein gesättigtes bzw. übersättigtes System. Diese Übersättigung mit Kalziumoxalat charakterisiert den Harn als kristallisationbereites Medium [Berg 1990]. Ein Ausfällen von Kalziumoxalatkristallen wird oft nur durch die Anwesenheit von Inhibitoren wie zum Beispiel Zitronensäure und Magnesium verhindert [Raaflaub 1963]. *Finlayson* zeigte durch seine Untersuchungen und Berechnungen mit dem Computerprogramm EQUIL, daß eine geringfügige Erhöhung der Oxalsäurekonzentration im Harn für die Entstehung von Kalziumoxalaturolithiasis einen größeren Risikofaktor darstellt, als eine Erhöhung der Kalziumionenkonzentration [Finlayson 1974/77]. Die absolute Höhe der Tagesausscheidung von Oxalsäure ist demnach für die Kristallisation nur von untergeordneter Bedeutung. Trotzdem wurden von einigen Autoren für Harnsteinpatienten auch höhere Oxalsäureausscheidungen als bei Gesunden gefunden [Hesse et al. 1987, Hodgkinson 1977, Robertson 1976, Robertson et al. 1972a]. *Robertson* zeigte außerdem, daß bei Harnsteinpatienten neben einer erhöhten Tagesausscheidung auch größere, zur Aggregation neigende Kalziumoxalatkristalle im Harn auftreten als bei Gesunden [Robertson et al. 1972b].

Mineralogisch werden die Kalziumoxalatsteine in Whewellit (Kalziumoxalat-Monohydrat) und Weddellit (Kalziumoxalat-Dihydrat) unterschieden. Klinisch relevant ist dieser Unterschied für die Therapie und Rezidivprophylaxe. Whewellit läßt sich mit

der Stoßwellenlithotripsie nur sehr schwer zertrümmern. Weddellit hat eine sehr hohe Rezidivquote [Hesse 2002b].

Aufgrund der multifaktoriellen Entstehung ist die Diagnostik für Kalziumoxalatsteine breitgefächert [Hesse 2002b]. Die radiologische Diagnostik erfolgt heute durch Kontrastmittel-Spiral-Computertomographie der ableitenden Harnwege. Diese ist aufgrund der höheren Sensitivität und der geringeren Strahlenbelastung gegenüber der traditionellen i.v.-Urographie die Methode der Wahl [Thoeny et al. 2003]. Nach Sicherung der Diagnose und Steinabgang steht die Steinanalyse an erster Stelle der Diagnostik. Die Steinanalyse wird heute durch Infrarotspektrometrie oder durch Röntgendiffraktion vorgenommen. Eine Spontanurin-Untersuchung gibt Aufschluß über eine Mikrohämaturie und/oder einen Harnwegsinfekt. Eine quantitative 24h-Urinanalyse ist zur weiterführenden Diagnostik unverzichtbar. Standardanalysen sind: spez. Gewicht; pH-Wert; Oxalsäure; Kalzium; Harnsäure; Zitronensäure; Magnesium; Kreatinin. In der Blutuntersuchung sind Kalzium, Magnesium, Harnsäure und Kreatinin wichtig [Hesse 2002]. Die Bestimmung der Oxalsäure im Blut kann ein wichtiger Hinweis für ein Hyperoxalurie sein. Bei Verdacht auf Hyperparathyreoidismus, renal tubulärer Azidose oder Hyperkalziämie infolge Sarkoidose müssen die Blutuntersuchungen entsprechend erweitert werden. Eine Hyperkalziurie kann durch einen Kalziumbelastungstest in resorptiv, absorptiv oder renal differenziert werden. Dieser sollte jedoch nur unter stationären Bedingungen durchgeführt werden [Hesse et al. 2002].

Das Ziel der Therapie ist die Rezidivprophylaxe. Die Therapie basiert auf zwei Pfeilern. Der medikamentösen Einstellung und der Optimierung der Ernährung. Alkalizitate, Thiazide und das Urikostatikum Allopurinol werden entsprechend ihrer Indikation verwendet. Alkalizitate bilden lösliche Komplexe mit Kalziumionen und hemmen ein Steinwachstum durch direkte Besetzung der Kristalloberfläche. In einer placebo-kontrollierten Studie konnte eine Senkung der Rezidivquote auf 12,9% (K-Mg-Zitrat) gegenüber 63,6% (Placebo) durch Einnahme von Kalium-Magnesium-Zitrat gezeigt werden [Ettinger et al. 1997]. Thiazide senken die Kalziumausscheidung durch

Reabsorption im distalen Tubulus. Allopurinol wird verwendet beim Auftreten einer Hyperurikosurie und einer Hyperurikämie. *Borghi et al.* konnten in ihrer Studie zeigen, daß auch durch Optimierung der Ernährung eine signifikante Reduzierung der Rezidivquote erreicht werden kann [Borghi et al. 2002]. In Studien an Gesunden konnte ebenfalls der Einfluß der Ernährung auf die Senkung des Harnsteinrisikos nachgewiesen werden [Siener & Hesse 2002 und 2003, Hönow et al. 2003].

Ein geeignete Methode zur Kontrolle des Therapieerfolges ist der BONN-Risk-Index. Nach Messung des ionisierten Kalziums und des Kristallisationspunktes nach Zugabe von Ammoniumoxalat kann das Kalziumoxalat-Kristallisationsrisiko berechnet werden [Laube et al. 2003].

1.1.4.2 Primäre Hyperoxalurie

Die Hyperoxalurie ist eine der Hauptrisikofaktoren für eine Kalziumoxalat-Nephrolithiasis. Man unterscheidet zwei Typen einer primären Form von den sekundären Hyperoxaluriën. Beide Formen der primären Hyperoxalurie sind autosomal-rezessiv vererbte Defekte des Glyoxylatstoffwechsels.

1.1.4.2.1 Primäre Hyperoxalurie Typ I

Die Primäre Hyperoxalurie Typ I ist durch einen Defekt der Alanin-Glyoxylat-Aminotransferase (AGT) in den Peroxisomen oder einer Fehllage in den Mitochondrien der Hepatozyten gekennzeichnet. Durch den Mangel an AGT wird Glyoxylsäure nicht mehr verstoffwechselt und es resultiert eine Hyperoxalurie mit erhöhter Ausscheidung von Glykolat [Danpure et al., Motley et al. 1995].

Epidemiologische Untersuchungen zeigen eine Prävalenz von 1,05 – 2,9/ Mio. bei einer Inzidenz von 0,12-0,15/Mio. in Europa [Cochat et al., Kopp et al. 1995, von Wörden et al. 2003]. Die PH I ist eine sehr heterogene Erkrankung. Sogar Geschwister mit gleichem

Genotyp können einen komplett unterschiedlichen Krankheitsverlauf haben. Besonders dramatisch kann die infantile Form der Erkrankung verlaufen, die schon recht bald zur Niereninsuffizienz führen kann. Laut *Cochat et al.*(1995) waren 50% aller Patienten mit PH I bei Erstdiagnose jünger als 10 Jahre alt. *Hoppe und Latta* (2000) geben ein mittleres Alter von 2,6 Jahren (Range von 0,1 – 13 Jahre) bei Erstsymptom an. Klinisch auffällig werden die Patienten erstmals durch die Symptome (Koliken, Hämaturie) der Urolithiasis und Nephrokalzinose. Leider wird die Diagnose aber häufig erst Jahre nach dem Erstsymptom gestellt. So gibt *Jamieson* (1998) nach Auswertung des europäischen PH I - Transplantationsregisters eine mittlere Verzögerung der Diagnosestellung von $4,2 \pm 6,3$ Jahren an (n=80). Deshalb sollte schon beim ersten Harnstein, aber auch bei Nephrokalzinoseverdacht im Ultraschall, sowie bei Hämaturie unbedingt auch die Oxalatausscheidung im Urin und die Plasmaoxalatkonzentration gemessen werden [Chung et al. 2004].

Die massive Hyperoxalurie mit erhöhter Kalziumoxalat-Sättigung im Urin führt zu rezidivierender Urolithiasis und/oder progredienter Nephrokalzinose mit konsekutiver Niereninsuffizienz. In der Niereninsuffizienz führen die weiter ansteigende Plasmaoxalatkonzentration und Kalziumoxalat-Sättigung zur systemischen Oxalose mit Ablagerung von Kalziumoxalat-Kristallen in der Retina, im Knochenmark sowie im Parenchym fast aller Organe. Chronische Anämie, Visusverlust, Wachstumsstörungen, hypertrophe Kardiomyopathie [Hoppe et al. 1996a, Yoshioka et al., Palka et al. 2001], terminales Nierenversagen sind die Folgen [Latta et al. 1990 und 1999, Cochat et al. 1995].

Bei 50% der Patienten hatte sich bereits im Alter von 15 Jahren ein terminales Nierenversagen entwickelt. Bis zum 30. Lebensjahr stieg die Anzahl auf 80% [Nolkemper et al. 2000]. Im Stadium des terminalen Nierenversagens steigt die Mortalität signifikant an. *Saborio* (1999) beschreibt eine Senkung der Überlebensrate nach 9 Jahren mit

dialysepflichtigem Nierenversagen von 63% auf 20% wenn keine Transplantation (Leber und/oder Niere) durchgeführt wird.

In der Diagnostik wird die Oxalsäure, Glycolat und L-Glyzerinsäure im Urin sowie Oxalsäure im Plasma bestimmt. Gesichert wird die Diagnose durch den Nachweis der verminderten Enzymaktivität (Alanin-Glyoxylat-Aminotransferase bzw. Glyoxylat-Reduktase) im Leberbiopsat. Die Harnsteine bei PH I bestehen ausschließlich aus Kalziumoxalatmonohydrat (Whewellit). Daher kann die Steinanalyse nicht nur einen wichtigen Hinweis geben, sondern auch beim mikroskopischen Nachweis des Subtyps 1c nahezu beweisend sein [Daudon et al. 1998, Neuhaus et al. 2000]. Eine weiteres Diagnostikum das zunehmend an Bedeutung gewinnt ist die Genanalyse. *Rumsby et al.* (2004) konnten bisher durch den Nachweis von drei Mutationen für das AGT-Gen und einer Mutation für das GR-Gen einen Prognosewert von 62% für die PH Typ I und von 2% für die PH Typ II erzielen. Möglicherweise kann die Leberbiopsie in Zukunft durch die Genanalyse ersetzt oder auf ein Minimum reduziert werden [Milosevic et al. 2002, Rumsby et al. 2000, 2004].

Das Ziel der konservativen Therapie ist die Verringerung der Oxalatproduktion und die Erhöhung der Kalziumoxalat-Löslichkeit im Urin. *Latta et al.* zeigen eine signifikante Reduzierung der Oxalatausscheidung um 30% bei einem Drittel aller Patienten unter Medikation von Pyridoxin (syn. Vit. B6), einem wichtigen Kofaktor von AGT. Voraussetzung für die Wirkung ist jedoch eine Restaktivität der AGT [Latta et al. 1999]. Zur Erhöhung der Löslichkeit wird eine hohe Flüssigkeitszufuhr (> 2 Liter/d) und die Einnahme von Zitraten oder Orthophosphaten empfohlen. Zitrat bindet freies Kalzium und verzögert die Kristallisation [Milliner et al. 1994, Leumann et al. 1995, Coe & Parks 1997]. Zusätzlich sollte eine oxalatarne Ernährung mit normaler Kalziumeinnahme (800 – 1200mg/d) erfolgen [Hesse et al. 2002]. *Hesse und von Unruh* zeigen durch ¹³C-Oxalat-Absorptionstests bei gesunden Probanden, das der enteral absorbierte Anteil des Gesamtoxalats <10% (7.9% ± 4.0%, mean ± SD) ist . Abhängig von der Ernährung

und der Absorption kann der Anteil des exogenen Oxalat jedoch bis zu 50% des Harnoxalats ausmachen. Bei einer Kalziumunterversorgung (<800 mg/d) konnten von *Unruh et al.* einen signifikanten Anstieg der Oxalatabsorption feststellen, währenddessen eine Kalziumaufnahme über 1200 mg/d keine relevante Senkung der Oxalatabsorption ergab [Hesse et al. 1999, Holmes et al. 2001, von Unruh et al. 2003,2004]. Ein neuer Therapieansatz zeigt sich in Versuchen mit dem Bakterium *Oxalobacter formigenes*. Dieses anaerobe, gram-negative Stäbchen ist physiologischer Bestandteil der menschlichen Darmflora und baut Oxalat ab. Im Tierexperiment konnte durch Substitution eine signifikante Senkung der renalen Oxalatausscheidung erzielt werden [Sidhu et al.1999]. Weitere Faktoren mit Einfluß auf die enterale Oxalatabsorption werden im Kapitel der sekundären Hyperoxalurien besprochen.

Bei zunehmender Niereninsuffizienz werden die Patienten dialysepflichtig. Sowohl die Hämodialyse als auch die Peritonealdialyse sind nicht in der Lage die Plasmaoxalatkonzentration ausreichend zu senken (siehe auch Tab. 3) [Marangella et al. 1991, Hoppe et al. 1996a,b]. So können zwar die harnpflichtigen Substanzen eliminiert werden, eine systemische Oxalose läßt sich jedoch nicht verhindern. Auch die Kombination beider Dialyseverfahren oder die Hämofiltration können diesen Progress nicht aufhalten [Bunchman et al. 1994]. Die noch verbleibende Therapieoption ist dann die kombinierte Leber-Nieren-Transplantation [Hoppe et al. 1996a]. Nach Auswertung des europäischen Oxalose-Registers ergab sich für 100 Transplantierte im Zeitraum von 1984 bis 1999 eine 5 Jahres Überlebensrate von 80% [Jamieson et al. 1995 und 1999]. Die in den achtziger Jahren durchgeführte isolierte Nierentransplantation ist in Europa zugunsten der Kombinationstransplantation verlassen worden. Außer bei Pyridoxin-sensitiven Patienten zeigte sich eine hohe Rezidivquote bei zusätzlich schlechten Transplantationsergebnissen unter Verwendung von toten Spenderorganen [Marangella 1999, Broyer 1990]. Eine retrospektive Studie in den USA zeigte für die isolierte Nierentransplantation unter bevorzugter Verwendung von Lebendspendern bessere Ergebnisse im Vergleich zur Kombinationstransplantation [Saborio und Scheinmann 1999]. Die von *Nolkemper et al.* proklamierte und an vier Kindern erfolgreich

durchgeführte präventive (vor Auftreten eines Nierenversagens), isolierte Lebertransplantation wird kontrovers diskutiert. Insgesamt wurde diese Therapie bisher nur an 10 Patienten durchgeführt [Nolkemper et al. 2000].

1.1.4.2.2 Primäre Hyperoxalurie Typ II

Der Typ II der primären Hyperoxalurie ist gekennzeichnet durch eine erhöhte Ausscheidung von L-Glyzerinsäure und Oxalsäure. Diese resultiert aus einer verminderten Aktivität oder dem Fehlen der Hydroxypyruvat-Reduktase, ein Enzym auch mit D-Glyzerat Dehydrogenase- und Glyoxylat Reduktase Aktivität [Kemper et al. 1997, Danpure et al. 1995, Cochat 1999].

Der Typ II hat einen deutlich leichteren Verlauf und tritt seltener auf als der Typ I. In der Literatur wird über weniger als 30 Fälle berichtet. Sie manifestiert sich primär in einer Urolithiasis und/oder einer Nephrokalzinose. Eine Oxalose als Primärmanifestation ist selten. Mit Ausnahme von Pyridoxin erfolgt die Therapie analog zur PH I [Kemper et al. 1997, Cramer et al. 1999]

1.1.4.3 Sekundäre Hyperoxalurie

Die Urinoxalatausscheidung ist bei den sekundären Hyperoxalurien niedriger, als bei den primären Hyperoxalurien, kann aber Werte von $1,0\text{mmol}/1,73\text{m}^2/\text{d}$ erreichen und somit auch zur rezidivierenden Urolithiasis oder Nephrokalzinose führen. Die sekundäre Hyperoxalurie wird durch eine gesteigerte endogene Produktion, erhöhte intestinale Absorption oder durch eine exzessive Aufnahme von Oxalat über die Nahrung ausgelöst.

Ein Mangel an Vitamin B₆, einem Coenzym der Alanin-Glyoxylat-Aminotransferase (AGT), führt zur gesteigerten Oxalatproduktion [Morgan et al. 1987]. Auch die Aufnahme von Oxalatprekusoren wie Ethylenglykol oder Ascorbinsäure kann eine erhöhte endogene Produktion verursachen [Birwe et al. 1991, Stryer 1988].

Die sogenannte enterale Hyperoxalurie tritt oft bei Malabsorptionssyndromen auf. Bei Patienten mit cystischer Fibrose, chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (M.Crohn, Colitis ulcerosa), operativ bedingten Kurzdarmsyndromen oder Pankreasinsuffizienz wird Kalzium intestinal an Fette statt an Oxalat gebunden, damit wird konsekutiv vermehrt freie Oxalsäure absorbiert [Lindsjö et al. 1989, Sidhu et al. 1998]. *Rampton und Sarner* beschreiben als weiteren Effekt der Malabsorption eine gesteigerte Permeabilität der Kolonmukosa mit erhöhter Oxalataufnahme [Rampton & Sarner 1988]. Aber auch ein Mangel an intestinalen oxalatdegradierenden Bakterien (*Oxalobacter formigenes*), ausgelöst durch regelmäßige Antibiotikagaben, kann zur erhöhten intestinalen Oxalatabsorption führen [Sidhu 1998, Mittal 2004].

Die diätetische Form der sekundären Hyperoxalurie ist gekennzeichnet durch einen Überkonsum an oxalathaltigen Nahrungsmitteln. So werden z.B. Rote Beete, Spinat, Mangold, Petersilie, Nüsse, Kakao oder schwarzer Tee von vielen Autoren als Nahrungsmittel mit hohem Oxalatgehalt angegeben [Kasidas & Rose 1980, Hodgkinson 1977, Ohkawa 1985, Hönow & Hesse 2002].

Diagnostisch erfolgt bei Hyperoxalurie die Untersuchung von 24 h Urin, Plasmaoxalat, Oxalat und Glykolatbestimmung im Urin. Anhand des Computerprogrammes EQUIL2 und dem BONN-Risk-index wird das Harnsteinbildungsrisiko bestimmt. Zusätzlich werden Stuhlproben auf *Oxalobacter formigenes* überprüft. Ein Oxalatabsorptionstest mittels stabilem Isotopen ($[^{13}\text{C}_2]$ -Oxalat) kann weiteren Aufschluß über den Charakter der sekundären Hyperoxalurie geben.

Die Therapie bei diesen Patienten basiert auf diätetischen Ratschlägen (oxalatarme, kalziumreiche Diät), einer hohen Flüssigkeitszufuhr, sowie der Gabe von Alkalizitraten, um die Löslichkeit des Urins für Kalziumoxalat zu verbessern. Bei fehlendem *Oxalobacter formigenes* empfehlen *Hoppe et al.* eine Rekolonialisierung des Kolons [Hoppe et al. 2003].

2 Eigene Untersuchungen

2.1 Material und Methoden

2.1.1 Oxalsäurebestimmungsmethoden

2.1.1.1 Hochdruckflüssigkeitschromatographie - Enzymreaktor

2.1.1.1.1 Chromatographisches System

Die Hochdruckflüssigkeitschromatographie-Enzymreaktor-Methode (HPLC-ER) ist eine Kombination aus chromatographischer Trennung, selektiver Umsetzung und sensitiver Detektion. Der erste Schritt beruht auf der Abtrennung der Oxalsäure durch eine Anionenaustauschersäule. Hinter die Trennsäule ist ein Enzymreaktor geschaltet, der Oxalsäure zu Wasserstoffperoxid und Kohlendioxid oxidiert. Das entstandene Wasserstoffperoxid wird extrem empfindlich elektrochemisch gemessen. Die genaue Zusammenstellung des Systems ist in Abbildung 2 und Tabelle 5 dargestellt.

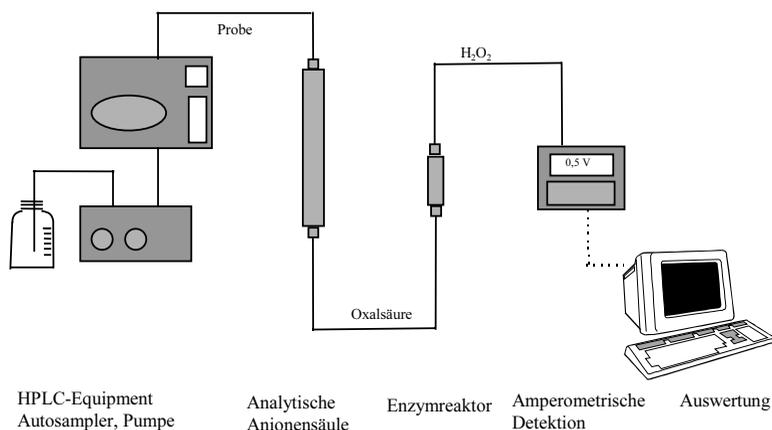


Abbildung 2: Chromatographisches System HPLC-ER

Tabelle 5: Chromatographisches System HPLC-ER (Gynkotec, Germering b. München)

Eluentenpumpe:	Gynkotec Modell 300 (Titanausführung)
Flußrate:	0,6 ml/min
Autosampler:	Gynkotec, Gina 50 Injektionsvolumen 20 µl
Mobile Phase:	2 g EDTA /l, pH 5,0
Vorsäule:	DIONEX Ionpac AG4A-SC (4 x 50 mm)
Trennsäule:	DIONEX Ionpac AS 4 A - SC (4 x 250 mm)
Enzymreaktor:	Leersäule (4 x 40 mm), Knauer Trägermaterial: VA Epoxy, Riedel de Häen Oxalsäureoxidase 5 U, SIGMA
elektrochemischer Detektor:	Gynkotec PED 300, Range 10 nA (LM/Urin) Range 2 nA (Blutserum) Platinelektrode, Ag/AgCl Potential: 0,5 V
Auswertungssoftware:	Gynkosoft 5.42

EDTA wird zur mobilen Phase zugegeben, um eventuell vorhandene Kalziumionen zu komplexieren. Dadurch wird verhindert, daß Kalziumoxalat ausfällt. Der pH-Wert der mobilen Phase wird mit 0,3 N Natronlauge auf pH 5,0 eingestellt. So wird der Enzymreaktor beim pH-Optimum betrieben [Pabel 1993].

Die Anionenaustauschersäule wurde gewählt, um Ascorbinsäure und Proteine sowie unpolare Substanzen, die ebenfalls bei dem angelegten Potential detektierbar sind, abzutrennen. Die Oxalsäure hat eine Retentionszeit von ca. 8 Minuten, ein typisches Chromatogramm zeigt Abbildung 3 für Blut und Abbildung 1 für eine Standardlösung.

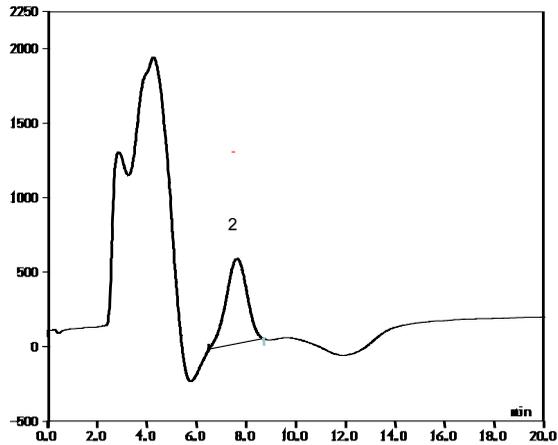


Abbildung 3: Chromatogramm einer Blutprobe(2 = Oxalat, Konzentration = 5 $\mu\text{mol/L}$)

2.1.1.1.2 Enzymreaktor

Als Trägersubstanz wird VA Epoxy Biosynth[®] der Firma Riedel-de-Häen verwendet. Hierbei handelt es sich um ein sphärisches makroporöses Perlpolymerisat aus Vinylacetat und Divinylethylen-Harnstoff, dessen Oberfläche nach Hydrolyse der Acetatgruppen mit Oxirangruppen modifiziert wurde. Die Eigenschaften von VA Epoxy Biosynth sind in Tabelle 6 beschrieben [Pabel 1993]. Die Bindung des Enzyms ist schematisch in Abbildung 4 wiedergegeben.

Tabelle 6: Eigenschaften von VA Epoxy Biosynth[®]

Korngröße [μm]	50 – 200
Porendurchmesser [nm]	60
Oberfläche [m^2/g]	140 (spezifisch)
Epoxidgehalt [$\mu\text{mol/g}$]	300

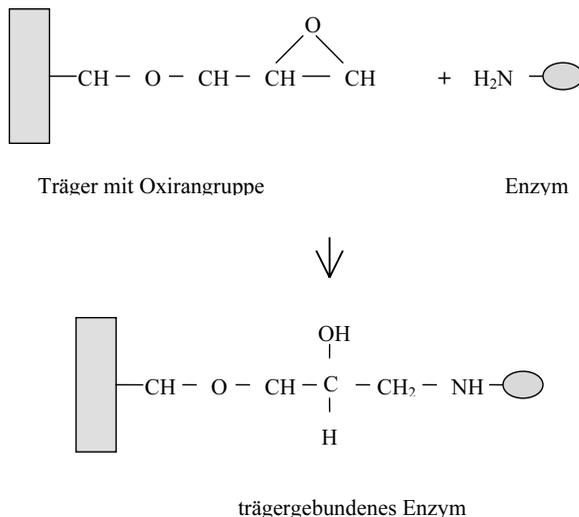


Abbildung 4: Enzymbindung an einen Träger mit Oxirangruppen

Die zur Immobilisierung der Oxalsäureoxidase an eine Trägersubstanz verwendeten Materialien und Lösungen sind in Tabelle 7 zusammengefaßt.

Tabelle 7: Materialien und Lösungen zur Herstellung eines Enzymreaktors

Phosphatpuffer pH 7,5:	1 Molar: 1,1 g Kaliumdihydrogenphosphat, wasserfrei 7,5 g Dinatriumhydrogenphosphatdo- decahydrat in 50 ml bidest. Wasser im Ultraschallbad lösen
	0,1 Molar: 1 M Phosphatpuffer mit bidest. Wasser 1 : 10 verdünnen
Oxalsäureoxidase	5 Units in 800 µl 1 M Phosphatpuffer lösen
VA Epoxy Biosynth	150 mg in 3,8 ml 1 M Phosphatpuffer suspendieren

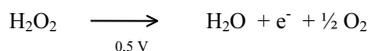
Bernsteinsäurepuffer pH 5,0:	0,05 Molar: 6 g Bernsteinsäure, wasserfrei in 1 Liter bidest. Wasser lösen und mit 30 % Natronlauge auf pH 5,0 einstellen eine Spatelspitze Natriumazid (0,005 %) zugeben
Wasserstoffperoxidlösung 0,03 %	30 % Wasserstoffperoxidlösung mit bidest. Wasser 1 : 100 verdünnen
Oxalsäurestandard 0,1 M	126 mg Oxalsäure-Dihydrat in 100 ml bidest. Wasser lösen und 1 : 100 verdünnen

2.1.1.1.3 Arbeitsvorschrift für die Herstellung eines Enzymreaktors:

Die Phosphatpuffer (1 M, 0,1 M) werden entsprechend den Angaben in der Tabelle 7 hergestellt. Die Oxalsäureoxidase-Lösung (5 Units/800 ml 1 M Phosphatpuffer) wird zur VA-Epoxy-Biosynth-Suspension (150 mg/3,8 ml 1 M Phosphatpuffer) gegeben und bei Raumtemperatur langsam geschüttelt. Nach 24 h wird die Suspension bei 3600 U/min (2.500 x g) zentrifugiert. Die überstehende Pufferlösung wird verworfen. Der Rückstand wird dreimal mit 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,5) gewaschen (die Waschlösungen werden jeweils abzentrifugiert und verworfen). Danach wird der Rückstand in 5 ml 0,05 M Bernsteinsäurepuffer (pH 5,0) suspendiert und mit Hilfe einer Spritze in eine Leersäule (4 x 40 mm) gefüllt. Die Säule wird, vergleichbar mit einer chromatographischen Trennsäule, mit den dazugehörigen Siebsätzen versehen und verschlossen. Der fertige Enzymreaktor kann, ohne Aktivitätsverlust, bei 4 °C bis zu einem Jahr gelagert werden. Beim erstmaligen Gebrauch empfiehlt es sich, eine 0,03 % Wasserstoffperoxidlösung oder eine 0,1 mM Oxalsäurestandardlösung zur Freispülung der aktiven Zentren zu injizieren.

2.1.1.1.4 Elektrochemische Detektion

Als Detektionsmethode wurde die amperometrische Detektion gewählt. Dabei wird an eine elektrochemische Zelle eine konstante Spannung angelegt und die durch oxidierbare bzw. reduzierbare Stoffe hervorgerufene, Änderung des Stromflusses gemessen. Die Stromflußänderung ist proportional zur Konzentration des Analyten. Das durch enzymatische Umsetzung entstandene Wasserstoffperoxid wird bei einem festen Potential von 0,5 Volt an der Platinarbeits Elektrode umgesetzt:



Die Referenzelektrode (Silber/Silberchlorid) ist dicht über der Arbeitselektrode angebracht. Die verwendete Dünnschichtzelle hat ein Zellvolumen von ca. 5 μl . Es wird durch einen Spacer, der aus isolierendem Material besteht, gebildet. Abbildung 5 zeigt den Aufbau einer Dünnschichtzelle mit den Elektroden.

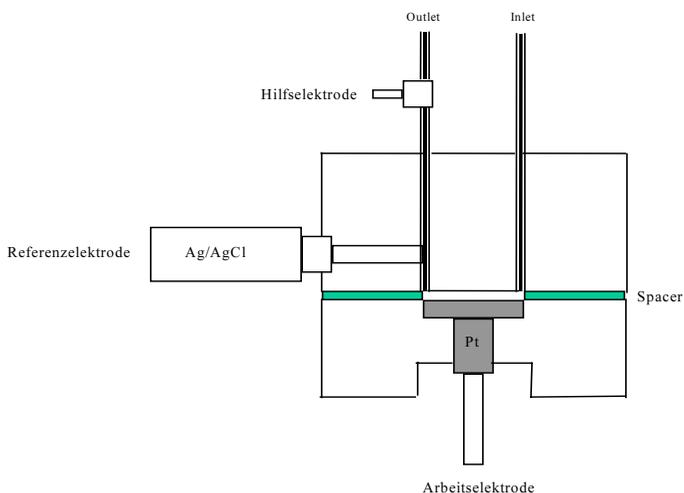


Abbildung 5: Schematischer Aufbau einer elektrochemischen Dünnschichtmeßzelle

Beim Nachlassen der Detektorempfindlichkeit sollte die Pt-Elektrode, die durch Redoxprodukte und Verunreinigungen aus dem Eluenten passiviert sein kann, gereinigt werden. Dazu legt man bei einer Rangeeinstellung von 2000 nA eine Minute ein Potential von + 1,6 Volt und anschließend fünf Minuten ein Potential von - 1,6 Volt an. Danach wird bei 0,5 Volt und einer Rangeeinstellung von 10 nA gewartet, bis sich die Basislinie stabilisiert hat.

2.1.1.1.5 Standards

Zur Herstellung der Stammlösung wurden 126 mg Oxalsäure-Dihydrat (entspricht 1 mmol/l Oxalat) in einen 100 ml Meßkolben eingewogen und mit bidest. Wasser aufgelöst. Diese Lösung wurde im Kühlschrank maximal eine Woche aufbewahrt. Aus dieser Stammlösung wurden nach dem Erwärmen auf Raumtemperatur die Standardlösung (100, 10 und 5 $\mu\text{mol/l}$) durch Verdünnen mit bidest. Wasser hergestellt. Die Probenlösungen wurden abwechselnd mit dem Oxalsäurestandard gemessen. Die Berechnung der Oxalsäurekonzentration in der Probe erfolgte mit Hilfe der mittleren Peakhöhe der Oxalsäurestandards, die vor und nach der Probe gemessen wurden.

2.1.1.2 Probenaufbereitung

Aufgrund der geringen Oxalsäuremenge im Blutplasma muß eine Methode gleichzeitig sehr sensitiv und spezifisch, aber auch unempfindlich gegenüber Störsubstanzen sein. Die HPLC-ER erfüllt diese Kriterien. Jedoch müssen bei der Probenaufbereitung die im Plasma enthaltenen Proteine abgetrennt werden, weil ansonsten die Trennsäule zu sehr belastet wird. Bei der Aufbereitung ist darauf zu achten, daß keine Oxalsäureverluste und keine Oxalsäureneubildungen die Ergebnisse verfälschen. Zur Vermeidung einer Oxalsäureneubildung ist eine sofortige Verarbeitung der Blutprobe nach Entnahme erforderlich.

Aufbereitung von Blutproben für die HPLC-ER Analyse:

1. Zunächst werden ca. 10 ml Blut von nüchternen Probanden oder Patienten in ein Lithium-Heparinröhrchen (Fa. Sarstedt) abgenommen. Das heparinisierte Blut wird bei 4 °C und 1600 U/min (1000 x g) 20 min lang zentrifugiert.
2. Das erhaltene Plasma wird mit Hilfe von Centrisart-I-Röhrchen (Cut-Off 20.000 Dalton) ultrafiltriert. Dazu werden 0,5 ml Plasma und 0,5 ml bidest. Wasser in das Außenrohr pipettiert.
3. In ein zweites Centrisart-I-Röhrchen werden 0,5 ml Plasma und 0,5 ml wäßrige Oxalsäurestandardlösung (10 µM) pipettiert. Durch dieses zweite Röhrchen wird die Wiederfindungsrate als Differenz aus den Ergebnissen der Probe ohne Zusatz und der Probe mit Oxalsäurezusatz bestimmt.
4. Das Innenröhrchen (= Schwimmer) wird langsam in das Außenröhrchen eingesetzt. Auf den Boden dieses Röhrchens (= Membran) werden 10 µl 1 N Salzsäure pipettiert.
Danach werden beide Centrisart-I-Röhrchen bei 4 °C und 3900 U/min (2500 x g) für 60 Minuten zentrifugiert.
5. Das erhaltene Ultrafiltrat (im Innenröhrchen) wird unverdünnt mittels HPLC-ER bei einer elektronischen Verstärkung von 2 nA analysiert.

2.1.2 Verwendete Materialien

2.1.2.1 Chemikalien

Ammoniumchlorid, p.a.	E. Merck
Ascorbatoxidase	Boehringer
Ascorbinsäure L(+), reinst	KMF Laborchemie
Kalziumchlorid Dihydrat, p.a.	E. Merck
Creatinin, zur Bestimmung im Blut	E. Merck
Dehydroascorbinsäure, als Methanolkomplex	ICN

Diammoniumoxalat Monohydrat, p.a.	E. Merck
Dinatriumhydrogenphosphatdecahydrat,p.a.	E. Merck
Dinatriumoxalat, p.a.	E. Merck
Ethylendiamintetraessigsäure, p.a.	E. Merck
Methanol, HPLC-Reagent	J.T. Baker
Natronlauge, 30%, suprapur	E. Merck
Oxalsäure Dihydrat, suprapur	E. Merck
Salzsäure 25 %, p.a.	E. Merck
Tri-Natriumcitrat Dihydrat, p.a.	E. Merck
VA Epoxy Biosynth®	Riedel-de-Häen
Wasserstoffperoxid, 30 %	E. Merck
Water, HPLC-Reagent	J.T. Baker

2.1.2.2 Reagenzien (Enzyme und Testkits)

Tabelle 8: Enzyme und Testkits

Oxalsäurestandardlösungen No.: 591-3	
Oxalsäureoxidase von Gerstenkeimlingen E.C. 1.2.3.4	
L-Ascorbinsäurespatel Nr.: 736699	
5 Units	Boehringer, Mannheim
L-Ascorbinsäure-Farbstest für Lebensmittelanalytik Nr.: 409677	
L-Ascorbinsäureoxidase E.C.1.10.3.3	
Rapignost-Teststreifen auf Ketonkörper, Behring, Marburg	
Glucose und Ascorbinsäure, 610680 A	

2.1.2.3 Laborgeräte

Ultrafiltrationsröhrchen, Centrisart I Cut off 20.000	Sartorius
Analysenwaage, BP61 10 mg - 61 g	Sartorius
Zentrifuge, Typ 4129	Hereaus, Christ

2.1.3 Methodik der Blutuntersuchung

Im zweiten Teil der Arbeit wurde diese Methode erstmals zur Untersuchung eines großen Probandenkollektivs verwendet. Nach Bewilligung der Studie durch die Ethikkommission wurden, unter Beachtung der Deklaration von Helsinki [Fassung der 48. Vollversammlung der World Medical Association 1996], Blutproben von 133 Gesunden (im Sinne einer Harnsteinanamnese) und 87 Patienten mit einer Kalziumoxalatstein-Anamnese untersucht. Unter Anwendung des Anamneseblattes I des Bonner Nachsorgeprogramms für Harnsteinpatienten der urologischen Universitätsklinik (siehe Anlage) wurde bei den Gesunden eine Harnsteinerkrankung ausgeschlossen. Die größte Anzahl der gesunden Probanden rekrutierte sich aus Blutspendern der Blutbank der Universität Bonn. Diesen wurde nach Einverständniserklärung und negativer Harnsteinanamnese im Rahmen der Blutspende eine zusätzliche Probe entnommen. Das Kollektiv der Steinpatienten rekrutierte sich aus Patienten der urologischen Universitätsklinik. Einschlußkriterium für Kalziumoxalatsteinpatienten war der Nachweis von Kalziumoxalat in der Harnsteinanalyse. Im Rahmen des stationären Aufenthaltes in der urologischen Universitätsklinik wurden nach Einverständniserklärung bei der Routineblutuntersuchung Blutproben entnommen. Zusätzlich erhobene Daten (Body-Mass-Index, Serumkreatinin, Steinepisoden im Jahr) der stationären Patienten wurden auf eine Korrelation zum Plasmaoxalat untersucht. Das Serumkreatinin wurde im Routinelabor der Universitätsklinik bestimmt. Der Body-Mass-Index wurde aus den Meßdaten zu Größe

und Gewicht bei der stationären Aufnahmeuntersuchung errechnet. Die Anzahl der Steinepisoden im Jahr basiert auf den anamnestischen Angaben der Patienten und wurde von uns durch Einsicht alter Krankenakten überprüft.

Zur Untersuchung von signifikanten Unterschieden bezüglich Geschlecht und Alter wurden die Probanden nach Geschlecht in drei Altersgruppen unterteilt [(Gruppe I: 19-40 Jahre); (Gruppe II: 41-60 Jahre); (Gruppe III: > 60 Jahre)]. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem U-Test (nichtparametrischer Zwei-Stichprobentest für zwei unabhängige Stichproben) nach Mann-Whitney-Wilcoxon bei Signifikanzgrenzen von $p < 0.05$, $p < 0.01$ und $p < 0.001$. Zur Auswertung wurde die SPSS-Software Version 12.0 verwendet.

Zunächst wurden Plasmaoxalatwerte für Gesunde gemessen. Dann wurde überprüft ob sich mit zunehmenden Alter oder zwischen den Geschlechtern die Plasmaoxalatwerte signifikant unterscheiden. Analog erfolgte die Auswertung der Steinpatienten. Im nächsten Schritt wurden die Gesunden bezüglich Alters und Geschlechtsabhängigkeit mit den Kranken verglichen.

Die Auswertung der zusätzlichen Patientendaten (Serumkreatinin, BMI, Steinepisoden im Leben und pro Jahr) auf einen Zusammenhang mit der Höhe der Plasmaoxalatkonzentration wurde mit dem Korrelationstest nach Pearson berechnet. Die Werte für Serumkreatinin und den Body-Mass-Index wurden in Gruppen für physiologische und pathologische Werte unterteilt.

Die Einteilung der Serumkreatininwerte erfolgte gemäß des physiologischen Grenzwertes von 1,0 mg/dl.

Die Einteilung der Body-Mass-Index-Werte erfolgte gemäß der Einteilung der WHO (BMI: $< 18,5 \text{ kg/m}^2$ = Untergewicht; $18,5$ bis 25 kg/m^2 = Normalgewicht; 25 bis 30 kg/m^2 = Übergewicht; 30 bis 35 kg/m^2 = Fettsucht Grad I; 35 bis 40 kg/m^2 = Fettsucht Grad II; $> 40 \text{ kg/m}^2$ = Fettsucht Grad III) (World Health Organisation 1995). Untersucht wurde einerseits auf signifikante Unterschiede der Plasmaoxalatkonzentration zwischen Norm und Übergewichtigen sowie andererseits auf eine Korrelation der Plasmaoxalatkonzentration mit der Höhe des Body-Mass-Index. In der ersten Untersuchung wurde ein Body-Mass-Index von 25 kg/m^2 zur Unterteilung der Gruppen genommen. In einer zweiten Auswertung wurde unter Berücksichtigung der aktuellen Literatur, die einen Body-Mass-Index $> 30 \text{ kg/m}^2$ als erhöhtes Risiko für ein Harnsteinleiden belegt, die Gruppe der Fettsüchtigen über 30 kg/m^2 gegen die Gruppe der Normgewichtigen unter 25 kg/m^2 getestet.

Die Patienten wurden nach Anzahl der Steinepisoden pro Jahr in drei Gruppen unterteilt (Gruppe1: bis 1 Episode/Jahr; Gruppe2: bis 6 Episoden/Jahr; Gruppe3: über 6 Episoden pro Jahr).

3 Ergebnisse

3.1 Entwicklung der Analysemethode

3.1.1 Blutaufbereitung

Die Enteiweißung mittels Methanol bzw. organischen Lösungsmitteln führte im Chromatogramm zu Störpeaks. Eine Oxalsäureneubildung aus Ascorbinsäure kann durch eine Säurezugabe verhindert werden. Durch einen direkten Säurezusatz zum Plasma werden die im Plasma enthaltenen Proteine ausgefällt [Petrarulo et al. 1990b]. Dieser voluminöse Niederschlag kann aber Oxalsäure mitreißen, so daß ein Teil der Oxalsäure bei der Analyse nicht miterfaßt wird. Nach *Petrarulo et al.* kann dieser Niederschlag durch die Zugabe von großen Mengen an konzentrierter Säure (Analyselösung 0,3 M) wieder aufgelöst werden. Eine zu große Säurekonzentration in der Analysenlösung würde aber die Enzymaktivität der Oxalsäureoxidase zu stark herabsetzen. Deshalb wird für die HPLC-ER-Analyse eine Ultrafiltration mit Centrisart-I-Röhrchen durchgeführt. Dabei wird das Plasma (500 µl Plasma + 500 µl bidest. Wasser) in das Außenröhrchen und die Salzsäure (10 µl) in das Innenröhrchen gegeben. So wird das Ultrafiltrat während der Ultrafiltration angesäuert und die darin enthaltene Ascorbinsäure stabilisiert. Um sicherzustellen, daß durch eine Säurezugabe in das Innenröhrchen keine Oxalsäureverluste mehr auftreten, wurde zu jeder Plasmaprobe eine Wiederfindungsrate bestimmt. Dazu wurden in das Außenröhrchen 500 µl Plasma und 500 µl einer Oxalsäurestandardlösung (10mM) und in das Innenröhrchen 10 µl 25%ige Salzsäure, 2 N Salzsäure oder 1 N Salzsäure pipettiert. Die erwartete Wiederfindung (100 %) ergibt sich dann aus der zugegebenen Oxalsäuremenge plus der Oxalsäuremenge, die in der Probe ohne Oxalsäurezusatz bestimmt wurde. Der Einfluß der verschiedenen Salzsäurekonzentrationen auf die Wiederfindungsrate ist in Tabelle 9 zusammengefaßt.

Tabelle 9 zeigt, daß der Zusatz von 20 µl 25 %iger Salzsäure zu einer geringen Wiederfindungsrate führt. Vermutlich diffundieren H^+ -Ionen durch die Membran der Ultrafiltrationsröhrchen und verursachen noch während der Ultrafiltration eine Denaturierung der Plasmaproteine. Die ausgefällten Proteine reißen Oxalsäure mit, so daß ein Teil der Oxalsäure nicht ins Ultrafiltrat gelangt. Außerdem setzen denaturierte Proteine die Membranporen zu, wodurch eine vollständige Ultrafiltration verhindert wird. Das ist an einem geringeren Ultrafiltratvolumen erkennbar (aus 1 ml Plasma 400 µl statt 700 µl Ultrafiltrat). Wird 2 N Salzsäure verwendet, ist die Wiederfindungsrate im Durchschnitt > 80 %. In drei von dreizehn Proben lag sie jedoch nur bei ca. 50 %. Eine Überprüfung des pH-Wertes ergab in diesen Ultrafiltraten pH-Werte von 1,5 - 3,0, während in den Ultrafiltraten mit Wiederfindungsraten > 80 % der pH-Wert zwischen 3,5 - 5,5 lag. Die Ursache liegt wahrscheinlich in einer geringeren Pufferkapazität einiger Plasmaproben. Die Ultrafiltration mit 1 N Salzsäure liefert Wiederfindungsraten von durchschnittlich 94,7 %. Der pH-Wert des Ultrafiltrates liegt zwischen 4,0 und 5,5.

Tabelle 9: Wiederfindungsrate für Oxalsäure im Ultrafiltrat von Blutplasma, das mit unterschiedlichen Säurekonzentrationen im Innenröhrchen des Centrisart-I-Röhrchens hergestellt wurde. Es wurden 10 µl Salzsäure in das Innenröhrchen und 500 µl Plasma plus 500 µl Oxalsäurestandardlösung (10µM) in das Außenröhrchen gegeben.

Salzsäurekonzentration (10 µl in das Innenröhrchen)	∅ WF im Ultrafiltrat	Bereich WF	Plasmaprobenzahl
25 % HCl	65,5 %	34 - 102 %	n = 13
2 N HCl	82,5 %	51 - 107 % ¹	n = 13
1 N HCl	94,7 %	83 - 107 %	n = 13

Anhand einer Plasmaprobe wurde überprüft, ob 10 µl 1 N Salzsäure ausreichen, um die in 500 µl Plasma enthaltene Ascorbinsäure zu stabilisieren. Dazu wurde die Plasmaprobe (und die dazugehörige Wiederfindungsbestimmung) einmal mit und einmal ohne Säurezugabe ultrafiltriert. Die Ultrafiltrate wurden in verschiedenen Zeitabständen analysiert. Die Wiederfindungsraten wurden nach jeder Messung, entsprechend den

¹ in 3 von 13 Proben WF < 80 %

gefundenen Oxalsäuregehalten der Probe, neu berechnet. Tabelle 10 zeigt, daß in den Ultrafiltraten, die mit 1 N Salzsäure hergestellt wurden, keine Oxalsäureneubildung stattfindet. Im Gegensatz dazu, zeigt die Analyse der nicht angesäuerten Plasmaprobe 13 Stunden nach der Ultrafiltration immer noch steigende Oxalsäurekonzentrationen.

Tabelle 10: Oxalsäuregehalte ($\mu\text{mol/l}$) der Ultrafiltrate einer Blutplasmaprobe. Ein Ultrafiltrat wurde mit Salzsäure ($10 \mu\text{l}$ 1 N Säure), eines ohne Säure hergestellt. Die Wiederfindungsraten ($500 \mu\text{l}$ Plasma + $500 \mu\text{l}$ Oxalsäurestandard $10 \mu\text{M}$) wurden parallel zu den Proben gemessen und nach jeder Messung neu berechnet. Die Ultrafiltrate wurden bei 4°C gelagert.

Zeit	ohne HCl im Innenröhrchen des Centrisart-I- Röhrchens		1 N HCl ($10\mu\text{l}/0,5 \text{ ml}$ Plasma) im Innenröhrchen des Centrisart-I- Röhrchens	
	Oxalat $\mu\text{mol/l}$	WF [%]	Oxalat $\mu\text{mol/l}$	WF [%]
0 h	5,4	103	1,6	82
5 h	12,2	85	1,5	87
7,5 h	15,6	89	1,4	94
10 h	19,2	92	1,5	104
13 h	22,3	94	1,7	-
Mittelwert		93		92

Da die Pufferkapazität einiger Plasmaproben schwanken kann (siehe oben), sollte durch zeitlich versetzte Messungen der Ultrafiltrate, sichergestellt werden, daß tatsächlich keine Oxalsäureneubildung stattfindet. Bei erhöhten Oxalsäurewerten in der zweiten Messung, muß die Analyse mit 2 N Salzsäure wiederholt werden.

Neben der oben beschriebenen Stabilisierungsmethode wurde auch die in der Literatur häufig angewendete Oxidation der Ascorbinsäure zur Dehydroascorbinsäure getestet. Zur Oxidation der Ascorbinsäure wurde Ascorbinsäureoxidase gewählt. Eine wäßrige Lösung von 5 Units Ascorbinsäureoxidase in $500 \mu\text{l}$ bidest. Wasser² wurde zu $500 \mu\text{l}$ Plasma pipettiert. Die gleiche Plasmaprobe wurde entsprechend den oben erwähnten Aufarbeitungen mit oder ohne Säurezusatz ultrafiltriert. Die Wiederfindungsrate wurde wie in den vorangegangenen Versuchen ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 11 zusammengefaßt. Auch hier wurde durch eine zweite Analyse nach 160 min auf eine Oxalsäureneubildung geprüft.

² der pH-Wert von 7,9 entspricht nicht dem pH-Optimum der Ascorbinsäureoxidase, trotzdem konnte durch Teststreifen von Rapignost festgestellt werden, daß keine nennenswerten Ascorbinsäuremengen im Ultrafiltrat vorhanden waren (im Gegensatz zur unbehandelten Probe)

Tabelle 11: Oxalsäuregehalte [$\mu\text{mol/l}$] der Ultrafiltrate (UF) einer Plasmaprobe mit und ohne Säurezusatz im Innenröhrchen, oder unter Zusatz von 5 Units Ascorbinsäureoxidase (500 μl Plasma+ 500 μl wäßriger Ascorbinsäureoxidase-Lösung). Die UF wurden sofort nach der Filtration analysiert und 160 min nach der ersten Analyse. Die UF wurden bei 4 °C gelagert.

Außenröhrchen	500 μl Plasma + 500 μl bidest. Wasser		500 μl Plasma + 5 Units Ascorbinsäureoxidase in 500 μl bidest. Wasser		500 μl Plasma + 500 μl bidest. Wasser		500 μl Plasma + 500 μl bidest. Wasser	
Innenröhrchen	ohne Säure		ohne Säure		10 μl 2 N HCl		10 μl 1 N HCl	
pH-Wert des UF	pH 7,0		pH 7,0		pH 1,5		pH 5,0	
Oxalat	$\mu\text{mol/l}$	WF %	$\mu\text{mol/l}$	WF %	$\mu\text{mol/l}$	WF %	$\mu\text{mol/l}$	WF %
Direkt nach Ultrafiltration	6,34	90	4,57	99	1,19	51	1,65	94
Nach 160 min	15,6	87	9,64	94	1,08	43	1,50	100

Die in Tabelle 11 zusammengefaßten Ergebnisse zeigen, daß in den Ultrafiltraten, die ohne Säurezusatz hergestellt wurden, eine Oxalsäureneubildung stattfindet. Der Oxalsäuregehalt des Ultrafiltrates ohne Ascorbinsäureoxidasezusatz und ohne Säurezusatz steigt in 160 min von 6,3 $\mu\text{mol/l}$ auf 15,6 $\mu\text{mol/l}$ an. Der Oxalsäuregehalt des Ultrafiltrates mit Ascorbinsäureoxidasezusatz steigt in 160 min von 4,57 $\mu\text{mol/l}$ auf 9,64 $\mu\text{mol/l}$ an. Daraus wird erkennbar, daß die Oxidation der Ascorbinsäure zur Dehydroascorbinsäure eine Oxalsäureneubildung nur geringfügig hemmt. Die Oxalsäuregehalte in den Ultrafiltraten ohne Säurezusatz liegen bereits direkt nach der Filtration über den Oxalsäuregehalten der Ultrafiltrate mit Säurezusatz. Daraus kann geschlossen werden, daß trotz einer Kühlung auf 4 °C eine Oxalsäureneubildung schon während der Ultrafiltration stattfindet. Durch die Bestimmung der Wiederfindungsraten konnte auch hier (Tabelle 10 und Tabelle 11) gezeigt werden, daß in Proben, die mit 1 N Salzsäure angesäuert wurden, keine Oxalsäure durch ausfallende Proteine der Analyse entzogen werden. Gleichzeitig zeigt die Kontrollanalyse nach 160 min, daß eine Oxalsäureneubildung verhindert wurde.

3.1.2 Bestimmung der Präzision

Die Verlässlichkeit eines analytischen Systems wird im wesentlichen durch die Begriffe Präzision und Richtigkeit beschrieben [The european Agency for the evaluation of medicinal products 1995]. Die Präzision wird durch den relativen Variationskoeffizienten von mehreren Wiederholungsmessungen ein und derselben Probe bestimmt [Haeckel 1980/1982]. Man unterscheidet zwischen Präzision der Serie (within-run-imprecision) und Präzision von Tag zu Tag (between-batch-imprecision).

Zur Bestimmung der Serienpräzision wurde eine Blutplasmaprobe 10 mal hintereinander und zur Präzision von Tag zu Tag an 6 verschiedenen Meßtagen analysiert.

Aus den ausreißerfreien Werten wurde der relative Variationskoeffizient [% berechnet.:

$$rV = \frac{s}{X} \cdot \frac{1}{\sqrt{n}} \cdot 100$$

Die Bestimmung der Serienpräzision (n = 10) ergab einen relativen Variationskoeffizienten von 2,2 % (siehe Tabelle 12).

Tabelle 12: Bestimmung der Serienpräzision

Probenbestimmung	Plasmaoxalat in $\mu\text{mol/l}$		
1	1,36		
2	1,11		
3	1,13		
4	1,28		
5	1,19		
6	1,26		
7	1,12		
8	1,29		
9	1,17		
10	1,15		
	Mittelwert	Standard- abweichung	Relativer Variations- koeffizient in %
	1,21	0,09	2,2

Die Bestimmung der Präzision von Tag zu Tag ($n = 6$) ergab einen relativen Variationskoeffizienten von 3,0 % (siehe Tabelle 13).

Tabelle 13: Bestimmung der Präzision von Tag zu Tag

Probenbestimmung	Plasmaoxalat in $\mu\text{mol/l}$		
1	1,14		
2	1,11		
3	1,23		
4	1,29		
5	1,09		
6	1,27		
	Mittelwert	Standard- abweichung	Relativer Variations- koeffizient in %
	1,19	0,09	3,0

3.1.3 Nachweisgrenze / Bestimmungsgrenze

Für die Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der HPLC-ER wurde das Eichgeradeverfahren von *Frehse und Thier* genutzt [Frehse & Thier 1991].

Die Eichkurven wurden mit Standardproben erstellt. Dazu wurden Standardlösungen mit verschiedenen Oxalsäuremengen erstellt. Die Zusätze beginnen im Bereich der vermuteten Nachweisgrenze. Die Proben wurden deshalb auf 1, 2, 5 und 10 $\mu\text{mol/l}$ eingestellt. Jede Oxalsäurekonzentration wurden viermal analysiert, so daß die Eichkurve aus 16 Punkten (keine Mittelwertbildung) erstellt wurde. Die Regressionsgeraden wurde aus den Soll-Werten (x-Werte) und den Ist-Werten (y-Werte) berechnet. Die Tabelle 14 zeigt ein Rechenschema nach *Frehse und Thier*. Nach diesem Rechenschema wird ein Prognoseintervall erstellt, das die Regressionsgerade symmetrisch einhüllt [Frehse & Thier 1991].

In der graphischen Darstellung der Eichgeraden mit den Prognoseintervallen zieht man eine Parallele zur x-Achse durch Y_{OB} (= Durchstoßpunkt des oberen Prognoseintervalls

durch die y-Achse). Vom Schnittpunkt dieser Parallelen mit dem unteren Prognoseintervall zieht man eine Parallele zur y-Achse und erhält mit dem Schnittpunkt auf der x-Achse einen Wert. Dieser gibt die Nachweis-grenzenkonzentration an (siehe Abbildung 7)

Die Ermittlung der Bestimmungsgrenze BG ist an drei Forderungen gebunden, da sie die Konzentration eines Stoffes angibt, die mit ausreichender Sicherheit quantifiziert werden kann. Die BG-Forderung I ist erfüllt, wenn die BG soweit oberhalb der NG liegt, daß beide statistisch signifikant voneinander verschieden sind. Die BG-Forderung I kann ebenfalls graphisch ermittelt werden, indem man eine Parallele zur y-Achse durch die NG zieht und vom Schnittpunkt dieser Parallelen mit Y_{OB} eine Parallele zur x-Achse, bis zum Schnittpunkt mit der Eichgeraden. Der dazu gehörige x-Wert gibt die Bestimmungsgrenze an, wenn die Forderungen II und III erfüllt sind. Forderung II ist erfüllt, wenn die Wiederfindungsraten über 70 % liegen, Forderung III ist erfüllt, wenn der Variationskoeffizient der Serienpräzision kleiner als 0,2 ist. Da in der Praxis eine Abschätzung der Variationskoeffizienten für jede Konzentration selten möglich ist, kann auch die Bestimmungsgrenze zur Forderung III mit dem Eichkurvenverfahren ermittelt werden. Dazu berechnet man eine Hilfsgerade, indem man zu zwei beliebigen Punkten x' und x'' , die zugehörigen y' und y'' aus der Eichgeraden berechnet. Die erhaltenen y-Werte multipliziert man mit $1 + 0,2 \cdot t^3$. Der Schnittpunkt dieser Hilfsgeraden mit dem oberen Prognoseintervall liefert einen Y_{VK} -Wert. Dieser Y_{VK} -Wert ergibt, eingesetzt in die Eichgeradengleichung die Bestimmungsgrenze III. Forderung (= X_m).

Für die endgültige Festlegung der Bestimmungsgrenze vergleicht man die Bestimmungsgrenze I. Forderung mit der Bestimmungsgrenze III. Forderung. Die größere der beiden Zahlen wird als Bestimmungsgrenze festgesetzt, wenn die Steigung der Eichgeraden größer als 0,7 ist (II. Forderung).

³ t aus der zweiseitigen t-Verteilung für 99 % bei $F = n - 2$ Freiheitsgrade

Tabelle 14: Rechenschema zur Nachweisgrenzenbestimmung

Wertepaare aus je einem Zusatzversuch pro Gehaltsstufe (jeweils in $\mu\text{g}/\text{kg}$)	X_i, Y_i
Anzahl Wertepaare	n
Summenwerte	
$\sum X_i$	E
$\sum X_i^2$	F
$\sum Y_i$	G
$\sum Y_i^2$	H
$\sum X_i \cdot Y_i$	J
Quadrat und Produktsummenwerte	
$\sum (X_i - \bar{X})^2$	$K = F - \frac{E^2}{n}$
$\sum (X_i - \bar{X}) \cdot (Y_i - \bar{Y})$	$L = J - \frac{E \cdot G}{n}$
$\sum (Y_i - \bar{Y})^2$	$M = H - \frac{G^2}{n}$
N (Hilfsgröße)	$N = \frac{L^2}{K}$
Mittelwerte	
\bar{X}	$\bar{X} = \frac{E}{n}$
\bar{Y}	$\bar{Y} = \frac{G}{n}$
Parameter der Eichgeraden	
A (Steigung)	$A_{\text{neu}} = \frac{L}{K}$
B (theor. Blindwert)	$B_{\text{neu}} = \bar{Y} - B \cdot \bar{X}$
Durchstoßpunkte des Prognoseintervalls	
S_R (Standardfehler)	$S_R = \sqrt{\frac{ M - N }{n - 2}}$
P (Hilfsgröße)	$P = \frac{\bar{X}^2}{K}$
W (Wurzelausdruck)	$W = \sqrt{1 + \frac{1}{n} + P}$
Y_{OB} (oberer Durchstoßpunkt)	$Y_{OB} = A + t \cdot S_R \cdot W$
Y_{UN} (unterer Durchstoßpunkt)	$Y_{UN} = A - t \cdot S_R \cdot W$

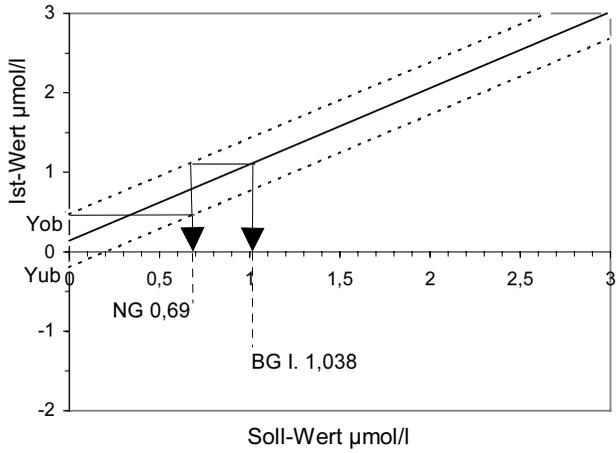


Abbildung 7: Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze der I. Forderung für die HPLC-ER nach dem Eichgeradenverfahren von Frehse und Thier bei Range 2 nA, n = 16

3.2 Blutuntersuchung an Gesunden und Kranken

3.2.1 Gesunde

Für 133 gesunde Probanden (70 Frauen, 63 Männer) im Alter von 20 bis 94 Jahren (Mean 53 Jahre) ermittelten wir eine mittlere Plasmaoxalatkonzentration von $2.65 \pm 0.23 \mu\text{mol/l}$ bei einer Meßbreite von 1.03 bis $15.9 \mu\text{mol/l}$.

Für die Gruppe der Frauen (n=70) ergab sich eine Konzentration von $2.64 \pm 0.32 \mu\text{mol/l}$ bei einem Durchschnittsalter von 56 Jahren. Aufgeteilt in Altersgruppen ermittelten wir für die 20 bis 40-jährigen (n=24, Mean 32 Jahre) einen durchschnittlichen Wert von $1.57 \pm 0.82 \mu\text{mol/l}$, für die 41 bis 60-jährigen (n=20, Mean 53 Jahre) $3.07 \pm 0.72 \mu\text{mol/l}$ und für die über 60-jährigen (n=26, Mean 80 Jahre) einen Wert von $3.29 \pm 0.57 \mu\text{mol/l}$.

Für die Gruppe der Männer (n=63) wurde eine mittlere Plasmaoxalatkonzentration von $2.67 \pm 0.35 \mu\text{mol/l}$ bei einem Durchschnittsalter von 51 Jahren gemessen. Für die 20 bis 40-jährigen (n=21, Mean 29,5 Jahre) betrug der Wert $1.49 \pm 0.18 \mu\text{mol/l}$, für die 41 bis 60-jährigen (n=22, Mean 52 Jahre) $3.02 \pm 0.75 \mu\text{mol/l}$ und für die über 60-jährigen (n=20, Mean 73 Jahre) $3.52 \pm 0.63 \mu\text{mol/l}$.

3.2.2 Steinpatienten

Für 87 Kalziumoxalatsteinpatienten (26 Frauen, 61 Männer) im Alter von 19 bis 77 Jahren (Mean 47 Jahre) ermittelten wir eine durchschnittliche Plasmaoxalatkonzentration von $4.34 \pm 0.55 \mu\text{mol/l}$ bei einer Meßbreite von $1.03 \mu\text{mol/l}$ bis $25.9 \mu\text{mol/l}$.

Für die Gruppe der Frauen (n=26) wurde eine durchschnittliche Plasmaoxalatkonzentration von $3.44 \pm 0.65 \mu\text{mol/l}$ bei einem Durchschnittsalter von 47 Jahren gemessen. In der Aufteilung nach Alter wurde für die 20 bis 40-jährigen (n=10, Mean 34,5 Jahre)

4.29 ± 1.29 µmol/l, für die 41 bis 60-jährigen (n=11, Mean 52 Jahre) 3.01 ± 0.9 µmol/l und für die über 60-jährigen (n=5, Mean 69 Jahre) eine Konzentration von 2.69 ± 1.06 µmol/l gemessen.

In der Gruppe der Männer (n=61, Mean 47 Jahre) analysierten wir eine durchschnittliche Plasmaoxalatkonzentration von 4.72 ± 0.74 µmol/l. In der Gruppe der 20 bis 40-jährigen (n=27, Mean 32 Jahre) wurde eine Plasmaoxalatkonzentration von 4.56 ± 1.13 µmol/l, für die Gruppe der 41 bis 60-jährigen (n=18, Mean 51 Jahre) eine Konzentration von 4.11 ± 0.99 µmol/l und für die Gruppe der über 60-jährigen (n=16, Mean 66 Jahre) 5.65 ± 1.79 µmol/l ermittelt.

Tabelle 15: Plasmaoxalatkonzentration für gesunde Probanden und Steinpatienten

	Gesunde		Steinpatienten	
n	133		87	
Alter (Jahre)	20-94		19-77	
Mittelwert der Oxalsäurekonzentration im Plasma ± Std.-abweichung (µmol/l)	2.65 ± 0.23		4.34 ± 0.55	
Messbreite (µmol/l)	1.03 – 15.9		1.03 – 25.9	
	n	Plasmaoxalat	n	Plasmaoxalat
Frauen (Gesamt)	n=70	2.64 ± 0.32	n=26	3.44 ± 0.65
Gruppe I (19-40 Jahre)	n=24	1.57 ± 0.82	n=10	4.29 ± 1.29
Gruppe II (41-60 Jahre)	n=20	3.07 ± 0.72	n=11	3.01 ± 0.9
Gruppe III (>60 Jahre)	n=26	3.29 ± 0.57	n=5	2.69 ± 1.06
Männer (Gesamt)	n=63	2.67 ± 0.35	n=61	4.72 ± 0.74
Gruppe I (19-40 Jahre)	n=21	1.49 ± 0.18	n=27	4.56 ± 1.13
Gruppe II (41-60 Jahre)	n=22	3.02 ± 0.75	n=18	4.11 ± 0.99
Gruppe III (>60 Jahre)	n=20	3.52 ± 0.63	n=16	5.65 ± 1.79

3.2.3 Vergleich der ermittelten Plasmaoxalatkonzentrationen zwischen verschiedenen Alters- und Geschlechtsgruppen bei gesunden Probanden

Im Rahmen der Auswertung der verschiedenen Alters- bzw. Geschlechtsgruppen bei gesunden Probanden zeigte sich ein Anstieg der Plasmaoxalatwerte mit zunehmenden Lebensalter. Beim Vergleich der Plasmaoxalatwerte der Gruppen I (19-40 Jahre) und III (> 60 Jahre) konnte ein statistischer Zusammenhang zwischen den beiden Merkmalen Alter und Plasmaoxalatkonzentration ($p < 0,01$) für beide Geschlechter aufgezeigt werden. Die Vergleiche der weiteren Altersgruppen untereinander, sowie der Gesamtgruppe der Männer mit der Gesamtgruppe der Frauen (s. Tabelle 16) zeigte keine statistischen Zusammenhänge.

Tabelle 16: Vergleich der Plasmaoxalatkonzentrationen verschiedener Alters- und Geschlechtsgruppen bei gesunden Probanden

Gruppe	Alter (Jahre)	n =	Mittelwert \pm Std. Abw. ($\mu\text{mol/l}$)	Mann-Whitney U-Test
Männer gesund, gesamt	20-94	63	2.67 ± 0.35	p = 0,968
Frauen gesund, gesamt	22-92	70	2.64 ± 0.32	
Männer gesund Gruppe I	20-40	21	1.49 ± 0.18	p = 0,114
Männer gesund Gruppe II	41-60	22	3.02 ± 0.75	
Männer gesund Gruppe II	41-60	22	3.02 ± 0.75	p = 0,296
Männer gesund Gruppe III	>60	20	3.52 ± 0.63	
Männer gesund Gruppe I	20-40	21	1.49 ± 0.18	p = 0,004 *
Männer gesund Gruppe III	>60	20	3.52 ± 0.63	
Frauen gesund Gruppe I	20-40	24	1.57 ± 0.82	p = 0,546
Frauen gesund Gruppe II	41-60	20	3.07 ± 0.72	

Gruppe	Alter (Jahre)	n =	Mittelwert ± Std. Abw. (µmol/l)	Mann-Whitney U-Test
Frauen gesund Gruppe II	41-60	20	3.07 ± 0.72	p = 0,176
Frauen gesund Gruppe III	>60	26	3.29 ± 0.57	
Frauen gesund Gruppe I	20-40	24	1.57 ± 0.82	p = 0,008 *
Frauen gesund Gruppe III	>60	26	3.29 ± 0.57	
Männer gesund Gruppe I	20-40	21	1.49 ± 0.18	p = 0,632
Frauen gesund Gruppe I		24	1.57 ± 0.82	
Männer gesund Gruppe II	41-60	22	3.02 ± 0.75	P = 0,553
Frauen gesund Gruppe II		20	3.07 ± 0.72	
Männer gesund Gruppe III	>60	20	3.52 ± 0.63	p = 0,816
Frauen gesund Gruppe III		26	3.29 ± 0.57	

3.2.4 Vergleich der ermittelten Plasmaoxalatkonzentrationen zwischen verschiedenen Alters- und Geschlechtsgruppen bei Kalziumoxalatsteinpatienten

Ähnliche statistische Zusammenhänge wie bei den Gesunden Probanden, ließen sich in der Gruppe der Kalziumoxalatsteinpatienten nicht nachweisen. (s.auch Tabelle 17)

Tabelle 17: Vergleich der Plasmaoxalatkonzentrationen verschiedener Alters- und Geschlechtsgruppen bei Kalziumoxalatsteinpatienten

Gruppe	Alter (Jahre)	n =	Mittelwert ± Std. Abw. (µmol/l)	Mann-Whitney U-Test
Männer krank gesamt	19-77	61	4.72 ± 0.74	p = 0,808
Frauen krank gesamt	19-75	26	3.44 ± 0.65	

Gruppe	Alter (Jahre)	n =	Mittelwert \pm Std. Abw. ($\mu\text{mol/l}$)	Mann-Whitney U-Test
Männer krank Gruppe I	19-40	27	4.56 ± 1.13	p = 0,861
Männer krank Gruppe II	41-60	18	4.11 ± 0.99	
Männer krank Gruppe II	41-60	18	4.11 ± 0.99	p = 0,6
Männer krank Gruppe III	>60	16	5.65 ± 1.79	
Männer krank Gruppe I	20-40	27	4.56 ± 1.13	p = 0,686
Männer krank Gruppe III	>60	16	5.65 ± 1.79	
Frauen krank Gruppe I	19-40	10	4.29 ± 1.29	p = 0,809
Frauen krank Gruppe II	41-60	11	3.01 ± 0.9	
Frauen krank Gruppe II	41-60	11	3.01 ± 0.9	p = 0,82
Frauen krank Gruppe III	>60	5	2.69 ± 1.06	
Frauen krank Gruppe I	20-40	10	4.29 ± 1.29	p = 0,665
Frauen krank Gruppe III	>60	5	2.69 ± 1.06	
Männer krank Gruppe I	19-40	27	4.56 ± 1.13	p = 0,918
Frauen krank Gruppe I		10	4.29 ± 1.29	
Männer krank Gruppe II	40-60	18	4.11 ± 0.99	p = 0,964
Frauen krank Gruppe II		11	3.01 ± 0.9	
Männer krank Gruppe III	>60	16	5.65 ± 1.79	p = 0,561
Frauen krank Gruppe III		5	2.69 ± 1.06	

3.2.5 Vergleich der ermittelten Plasmaoxalatkonzentrationen verschiedener Alters- und Geschlechtsgruppen zwischen Gesunden und Kalziumoxalatsteinpatienten

Der Vergleich der gesunden Probanden (Männer und Frauen gesamt) mit der Gruppe der Kalziumoxalatsteinpatienten (Männer und Frauen gesamt) zeigt in der Altersgruppe I einen statistisch signifikanten Unterschied (Signifikanzniveau: $p < 0,05$) der Plasmaoxalatkonzentration (Pox.: 1.54 vs. 4.49 $\mu\text{mol/l}$). Die weitere statistische Auswertung der gesunden Probanden mit der Gruppe der Kalziumoxalatsteinpatienten in den verschiedenen Alters- bzw. Geschlechtsgruppen zeigt insgesamt keine signifikanten Zusammenhänge. (s.auch Tabelle 18)

Tabelle 18: Vergleich der Plasmaoxalatkonzentrationen verschiedener Alters- und Geschlechtsgruppen zwischen gesunden Probanden und Kalziumoxalatsteinpatienten

Gruppe	Alter (Jahre)	n =	Mittelwert \pm Std. Abw. ($\mu\text{mol/l}$)	Mann-Whitney U-Test
Gesunde gesamt	20-94	133	2.65 \pm 0.23	p = 0,18
Kranke gesamt	19-77	87	4.34 \pm 0.55	
Gesunde gesamt Gruppe I	19-40	45	1.54 \pm 0.12	p = 0,030*
Kranke gesamt Gruppe I		37	4.49 \pm 0.43	
Gesunde gesamt Gruppe II	41-60	42	3.04 \pm 0.52	p = 0,643
Kranke gesamt Gruppe II		29	3.69 \pm 0.7	
Gesunde gesamt Gruppe III	>61	46	3.39 \pm 0.42	p = 0,946
Kranke gesamt Gruppe III		21	4.94 \pm 1.4	
Männer gesund gesamt	20-94	63	2.67 \pm 0.35	p = 0,328
Männer krank gesamt	19-77	61	4.72 \pm 0.74	
Frauen gesund gesamt	20-94	70	2.64 \pm 0.32	p = 0,460
Frauen krank gesamt	19-75	26	3.44 \pm 0.65	

Gruppe	Alter (Jahre)	n =	Mittelwert \pm Std. Abw. ($\mu\text{mol/l}$)	Mann-Whitney U-Test
Männer gesund Gruppe I Männer krank Gruppe I	19-40	21 27	1.49 \pm 0.18 4.56 \pm 1.13	p = 0,084
Männer gesund Gruppe II Männer krank Gruppe II	41-60	22 18	3.02 \pm 0.75 4.11 \pm 0.99	p = 0,924
Männer gesund Gruppe III Männer krank Gruppe III	>60	20 16	3.52 \pm 0.63 5.65 \pm 1.79	p = 0,873
Frauen gesund Gruppe I Frauen krank Gruppe I	19-40	24 10	1.57 \pm 0.82 4.29 \pm 1.29	p = 0,16
Frauen gesund Gruppe II Frauen krank Gruppe II	41-60	20 11	3.07 \pm 0.72 3.01 \pm 0.9	p = 0,468
Frauen gesund Gruppe III Frauen krank Gruppe III	>60	26 5	3.29 \pm 0.57 2.69 \pm 1.06	p = 0,555

3.2.6 Untersuchung auf Zusammenhänge zwischen der Plasmaoxalatkonzentration und Serumkreatinin, Body-Mass-Index und Steinepisoden

In der Gruppe der Steinpatienten wurden für 57 Patienten (16 Frauen, 41 Männer) der Serumkreatininwert, für 81 Patienten (24 Frauen, 57 Männer) der BMI und für 50 Patienten (13 Frauen, 37 Männer) die Steinepisoden pro Jahr erhoben.

3.2.6.1 Serumkreatinin

Der durchschnittliche Serumkreatininwert bei 57 Patienten betrug $1,04 \pm 0,02$ mg/dl bei einer Meßbreite von 0,7 bis 1,69 mg/dl und einer durchschnittlichen Plasmaoxalatkonzentration von $4,53 \pm 0,71$ $\mu\text{mol/l}$.

Davon wurde bei 24 Patienten (4 Frauen, 20 Männer) ein Kreatininwert (Mean $1,2 \pm 0,03$ mg/dl) über dem physiologischen Grenzwert von 1,0 mg/dl festgestellt. Die Plasmaoxalatkonzentration dieser Gruppe betrug $3,72 \pm 0,91$ μ mol/l.

Bei den 33 Patienten (12 Frauen, 21 Männer) mit Kreatininwerten (Mean $0,92 \pm 0,01$ mg/dl) im physiologischen Bereich wurde eine Plasmaoxalatkonzentration von $5,13 \pm 1,02$ μ mol/l ermittelt (siehe Tabelle 20).

Im U-Test nach Mann-Whitney ergab sich kein signifikanter Unterschied ($p = 0,247$) der Plasmaoxalatkonzentration (Pox.: $5,13$ vs. $3,72$ μ mol/l) zwischen den Patienten mit physiologischen und pathologischen Kreatininwerten (siehe Tabelle 19).

Tabelle 19: Untersuchung auf signifikanten Unterschied der Plasmaoxalatkonzentration bei physiologischem und pathologischem Serumkreatinin (U-Test nach Mann-Whitney)

Gruppe	n	Plasmaoxalatkonzentration Mittelwert \pm Standardabweichung	Mann-Whitney U-Test
Kreatinin $\leq 1,0$ mg/dl	33	$5,13 \pm 1,02$ μ mol/l	$p = 0,247$
Kreatinin $> 1,0$ mg/dl	24	$3,72 \pm 0,91$ μ mol/l	

Tabelle 20: Serumkreatinin und Plasmaoxalatkonzentration bei Kalziumoxalatsteinpatienten

	$\leq 1,0$ mg/dl	$> 1,0$ mg/dl	Gesamt
Kreatinin			$0,7 - 1,69$ mg/dl
n =	33	24	57
Kreatinin Mittelwert \pm Standardabweichung	$0,92 \pm 0,01$ mg/dl	$1,2 \pm 0,03$ mg/dl	$1,04 \pm 0,02$ mg/dl
Plasmaoxalat Mittelwert \pm Standardabweichung	$5,13 \pm 1,02$ μ mol/l	$3,72 \pm 0,91$ μ mol/l	$4,53 \pm 0,71$ μ mol/l

In der Korrelationsberechnung nach Pearson konnte für die 57 Serumkreatininwerte mit $r = -0,096$ und $p = 0,478$ keine Abhängigkeit nachgewiesen werden. In der Aufspaltung der Gruppe nach pathologischen Kreatininwerten konnte mit $r = -0,18$ und $p = 0,934$ ebenfalls keine Abhängigkeit nachgewiesen werden (siehe Tabelle 21).

Tabelle 21: Untersuchung auf Abhängigkeit der Plasmaoxalatkonzentration vom Serumkreatinin (Korrelationstest nach Pearson)

Gruppe	n	Plasmaoxalat Serumkreatinin	versus	
			Korrelation nach Pearson	
Kreatinin > 1,0 mg/dl	24	3,72 $\mu\text{mol/l}$ vs. 1,2 mg/dl	$r = -0,18$	$p = 0,934$
Gesamt	57	4,53 $\mu\text{mol/l}$ vs. 1,04 mg/dl	$r = -0,096$	$p = 0,478$

3.2.6.2 Body-Mass-Index

Für 81 Patienten wurde ein durchschnittlicher BMI von $26,7 \text{ kg/m}^2$ errechnet. Davon waren 2 untergewichtig (Mean $18,4 \pm 0,05 \text{ kg/m}^2$; Mean-Pox. $1,9 \pm 1,1 \mu\text{mol/l}$), 26 normgewichtig (Mean $21,9 \pm 0,36 \text{ kg/m}^2$; Mean-Pox. $5,62 \pm 1,23 \mu\text{mol/l}$), 38 übergewichtig (Mean $27,2 \pm 0,21 \text{ kg/m}^2$; Mean-Pox. $3,78 \pm 0,83 \mu\text{mol/l}$), 9 fettsüchtig Grad I (Mean $32,2 \pm 0,4 \text{ kg/m}^2$; Mean-Pox. $6,54 \pm 1,2 \mu\text{mol/l}$), 3 fettsüchtig Grad II (Mean $35,8 \pm 0,29 \text{ kg/m}^2$; Mean-Pox. $1,02 \pm 0,42 \mu\text{mol/l}$) und 3 fettsüchtig Grad III (Mean $42,5 \pm 0,01 \text{ kg/m}^2$; Mean-Pox. $2,3 \pm 0,2 \mu\text{mol/l}$) (siehe Tabelle 22).

Eine Korrelation zwischen der Höhe der Plasmaoxalatkonzentration und dem Body-Mass-Index bei $n = 81$ konnte mit $r = -0,70$ und einer Signifikanz von $p = 0,535$ nach Pearson nicht nachgewiesen werden. Eine gesonderte Auswertung der Risikogruppe mit einem Body-Mass-Index über 30 kg/m^2 ($n = 15$) konnte ebenfalls keinen Zusammenhang zeigen ($r = -0,404$, $p = 0,136$ nach Pearson) (siehe Tabelle 23).

Tabelle 22: Plasmaoxalatkonzentration unterteilt nach Body-Mass-Index bei Kalziumoxalatsteinpatienten

	Unter- gewichtig	Norm- gewichtig	Über- gewichtig	Fettsucht Grad I	Fettsucht Grad II	Fettsucht Grad III	
BMI	< 18,5 kg/m ²	18,5 – 25 kg/m ²	25 – 30 kg/m ²	30 – 35 kg/m ²	35 – 40 kg/m ²	> 40 kg/m ²	Gesamt
n	2	26	38	9	3	3	81
BMI Mean ± SEM	18,4±0,05 kg/m ²	21,9±0,36 kg/m ²	27,2±0,21 kg/m ²	32,2±0,4 kg/m ²	35,8±0,29 kg/m ²	42,5±0,01 kg/m ²	26,7±0,57 kg/m ²
Pox. Mean ± SEM	1,9 ± 1,1 µmol/l	5,62±1,23 µmol/l	3,78±0,83 µmol/l	6,54±1,2 µmol/l	1,02±0,42 µmol/l	2,3±0,2 µmol/l	4,48±0,58 µmol/l

Tabelle 23: Untersuchung auf Abhängigkeit der Plasmaoxalatkonzentration vom Body-Mass-Index (Korrelationstest nach Pearson)

Gruppe	n	Pox. vs. BMI	Korrelation nach Pearson	
BMI gesamt	81	4,48 µmol/l vs. 26,7 kg/m ²	r = -0,70	p= 0,535
BMI > 30 kg/m ²	15	4,73 µmol/l vs. 34,4 kg/m ²	r = -0,404	p= 0,136

Ein signifikanter Unterschied zwischen der Plasmaoxalatkonzentration der Übergewichtigen und Fettsüchtigen (BMI >25 kg/m², n=53) verglichen mit den Norm- und Untergewichtigen (BMI <25 kg/m², n= 28) ließ sich nicht feststellen (p= 0,315; Mean-Pox. 5,37 ± 1,15 µmol/l versus 4,01 ± 0,65 µmol/l).

Die Untersuchung der Risikogruppe (BMI >30 kg/m², Mean-Pox.: 4,73 ± 1,04 µmol/l) gegen die Normgewichtigen (18,5 < BMI <25 kg/m², Mean-Pox.: 5,62 ± 1,23 µmol/l) ergab ebenfalls keinen signifikanten Unterschied (siehe Tabelle 24).

Tabelle 24: Untersuchung auf signifikanten Unterschied der Plasmaoxalatkonzentration zwischen Unter-, Norm-, Übergewichtigen und Fettsüchtigen (U-Test nach Mann-Whitney)

Gruppe	n	Pox	Mann-Whitney U-Test
Norm und Untergewichtige (BMI < 25 kg/m ²)	28	5,37 ± 1,15 µmol/l	p= 0,315
Übergewichtige und Fettsüchtige (BMI > 25 kg/m ²)	53	4,01 ± 0,65 µmol/l	
Normgewichtige (BMI 18,5 – 25 kg/m ²)	26	5,62 ± 1,23 µmol/l	p = 0,921
Fettsüchtige (BMI > 30 kg/m ²)	15	4,73 ± 1,04 µmol/l	

3.2.6.3 Steinepisoden

Für die Gruppe 1 (n=24, 1 oder weniger Steinepisoden/Jahr) wurde eine durchschnittliche Plasmaoxalatkonzentration von 5,7 ± 1,34 µmol/l gemessen. In der Gruppe 2 (n=21, bis 6 Steinepisoden/Jahr) ermittelten wir eine Plasmaoxalatkonzentration von 2,39 ± 0,59 µmol/l und für die Gruppe 3 (n=5) einen Wert von 3,26 ± 0,61 µmol/l (siehe Tabelle 25).

Tabelle 25: Plasmaoxalatkonzentration unterteilt nach Häufigkeit von Steinepisoden pro Jahr

Steinepisoden / Jahr	≤ 1 Episode	2 bis 6 Episoden	über 6 Episoden
n	24	21	5
Pox. Mean ± SEM	5,7 ± 1,34 µmol/l	2,39 ± 0,59 µmol/l	3,26 ± 0,61 µmol/l

Zwischen den Plasmaoxalatkonzentrationen der einzelnen Gruppen konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (siehe Tabelle 26).

Tabelle 26: Untersuchung auf signifikanten Unterschied der Plasmaoxalatkonzentration bei unterschiedlicher Häufigkeit von Steinepisoden pro Jahr (U-Test nach Mann-Whitney)

Steinepisoden / Jahr	n	Plasmaoxalatkonzentration	Mann-Whitney U-Test
≤ 1 Episode	24	5,7 ± 1,34 µmol/l	p = 0,083
2 bis 6 Episoden	21	2,39 ± 0,59 µmol/l	
≤ 1 Episode	24	5,7 ± 1,34 µmol/l	p = 0,77
über 6 Episoden	5	3,26 ± 0,61 µmol/l	
2 bis 6 Episoden	21	2,39 ± 0,59 µmol/l	p = 0,121
über 6 Episoden	5	3,26 ± 0,61 µmol/l	

Auch zwischen der Anzahl der Steinepisoden und der Höhe der Plasmaoxalatkonzentration konnte keine ($r = -0,202$ und $p = 0,159$) Korrelation nachgewiesen werden (siehe Tabelle 27).

Tabelle 27: Untersuchung auf Abhängigkeit der Plasmaoxalatkonzentration von der Häufigkeit von Steinepisoden pro Jahr (Korrelationstest nach Pearson)

Gruppe	n	Pox. vs. Steinepisoden / Jahr	Korrelation nach Pearson	
Kalziumoxalatsteinpatienten	50	4,2 ± 0,73 µmol/l vs. Häufigkeit der Steinepisoden	$r = -0,202$	$p = 0,159$

4 Diskussion

4.1 Analysemethode

Bei der Verwendung der bisherigen Methoden zur Oxalsäurebestimmung ergaben sich Probleme durch den sehr niedrigen Meßbereich der physiologischen Oxalsäurekonzentration im Blut, die Proteinbindung und die Neuentstehung von Oxalsäure aus Ascorbinsäure. Wir konnten zeigen das die Aufarbeitung und Konservierung der Blutproben von entscheidender Wichtigkeit sind. In der Probenaufarbeitung konnten vorbeschriebene Matrixeinflüsse der Analyse, wie z.B. unzureichende Matrixabtrennung, Oxalsäureneubildung während der Aufarbeitung und Analyse und methodische Schwächen wie zu niedrige Wiederfindungen, beseitigt werden. Abhängig von Aufarbeitung und Meßmethode berichten verschiedene Autoren über Störeinflüsse.

In der Aufarbeitung der Blutproben hat sich die Zentrifugation bei 4°C mit anschließender Ultrafiltration und Ansäuerung im Sammelrohr international etabliert [Pundir et al. 1998, Hoppe 1999, Thakur et al. 2000, Ogura 2000, Harris et al. 2004].

Petrarulo et al. (1990) zeigten das eine Ansäuerung die Neubildung von Oxalsäure verhindert und bei starker Ansäuerung die Oxalsäure-Eiweißbindung gelöst wird. Da eine starke Ansäuerung die Aktivität der Oxalat-Oxidase hemmt konnten wir die Ausführungen Petrarulos nicht überprüfen. Wir konnten jedoch feststellen, das eine milde Ansäuerung, wenn sie im Innenrohr des Ultrafiltrationsröhrchens erfolgt, eine Oxalsäure-Neuentstehung ausreichend verhindert. Auch unter Zugabe von Ascorbinsäure blieb die Oxalsäurekonzentration im angesäuerten Ultrafiltrat stabil.

Zugabe von Ascorbinsäureoxidase konnte eine Neuentstehung jedoch nicht verhindern. Dies bestätigt die These von *Lewin* (1974) der die Oxidation von Ascorbinsäure zu Dehydroascorbinsäure als ersten Schritt in der Konversion zur Oxalsäure sieht.

Die Oxalogenese aus anderen Vorstufen wie z.B. Glyoxylsäure erscheint sehr unwahrscheinlich. Nach *Akçay und Rose* findet eine enzymatische Umsetzung der Glyoxylsäure nur im Vollblut (enthält Xanthinoxidase, Lactatdehydrogenase und Glycolatoxidase) und nicht im Plasma statt. *Zarembski und Hodgkinson* konnten im Vollblut keine Glyoxylsäure ($< 4,5 \mu\text{mol/l}$) nachweisen. Daraus schlossen *Costello und Landwehr*, daß während der Plasmaherstellung keine nennenswerten Mengen an Oxalsäure entstehen können [Zarembski & Hodgkinson 1965b, Costello & Landwehr 1988].

Harris et al. fanden bei der Untersuchung von zwölf verschiedenen Ultrafiltrationsröhrchen eine deutliche Reduzierung der Oxalsäurekonzentration um $24\% \pm 2\%$ (mean \pm S.D.) nach der Filtration. In Abweichung zu den vorgenannten Autoren verwenden *Harris et al.* zur Ansäuerung ein Austauschharz. Störpeaks durch Chloridionen werden durch Silberchloridbildung unterbunden [Harris et al. 2004]. Da Silber sowohl mit Chlorid einen Niederschlag bildet der Oxalsäure mitreißen kann als auch direkt einen Oxalsäure-Silberharzkomplex bilden kann lassen sich die schlechten Wiederfindungsraten der Ultrafiltrationsröhrchen erklären. Durch die selektive, enzymatische Umsetzung von Oxalsäure mit amperometrischer Detektion des Wasserstoffperoxids bei der HPLC-ER-Methode haben Anionen im Gegensatz zur Konduktivitätsmessung der Ionenchromatographie keinen Einfluß auf die Messung. Deshalb ist eine Chloridentfernung bei der HPLC-ER Methode nicht notwendig.

In der gleichen Studie stellen die Autoren eine Verunreinigung der neuen Ultrafiltrationsröhrchen fest. Nach Analyse von Spülwasser zeigte sich ein Störpeak bei der Retentionszeit von Oxalsäure der einer Konzentration von 0.4 bis 2.6 $\mu\text{mol/l}$ entspricht. Der von uns verwendete Typ der Firma Sartorius erzielte dabei den geringsten Wert für Kontamination. Durch entsprechende Vorwaschung der Röhrchen ließ sich dieser Einfluß beseitigen.

Für die Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze der HPLC-ER wurde das Eichgeradenverfahren von *Frehse und Thier* genutzt [Frehse & Thier 1991].

Das Eichgeradenverfahren nach *Frehse und Thier* hat gegenüber anderen Verfahren (z.B. Blindwerte + dreifacher Standardabweichung) den Vorteil, daß auch vorlaufende Faktoren aus der Aufbereitung, bzw. der Konservierung der Proben berücksichtigt werden. Außerdem werden weder Kontrollproben benötigt, noch müssen Blindwerte für die Berechnung herangezogen werden.

Die graphische Auswertung der Eichgeraden und der Prognoseintervalle ergab für die HPLC-ER, bei einer Rangeeinstellung (elektronische Verstärkung am Detektor) von 2 nA, eine Nachweisgrenze von 1,03 µmol/l und eine Bestimmungsgrenze von 0,69 µmol/l (I. Forderung). Da die Bestimmungsgrenze dritter Forderung kleiner als die zweiter Forderung war, wurde auf die graphische Darstellung verzichtet.

Einige Autoren erreichen mit anderen Verfahren ebenfalls niedrige Nachweisgrenzen.

So wird zum Beispiel mit der enzymatischen Sigma-Methode, deren Nachweisgrenze rechnerisch für die Analyse von Blutplasmaproben (ca. 5 µmol/l) nicht ausreicht, durch Abwandlungen (größere Probenmenge, längere Reaktionszeit und Konzentrationsberechnungen aus sehr kleinen Absorptionsdifferenzen (3-4 m Absorption)) eine minimal detektierbare Oxalsäurekonzentration von 0,6 µmol/l erreicht [Sugiura et al. 1980, Petrarulo et al. 1994, Fan et al. 1998].

Für die Ionenchromatographie berechneten *Petrarulo et al.* aus dem 5fachen Grundrauschen (Blindwertmethode) eine Nachweisgrenze von 0,5 µmol/l [Petrarulo et al. 1993]. Auch *Hoppe et al.* fanden als kleinste nachweisbare Oxalsäuremenge im Plasma eine Konzentration von 0,3 µmol/l [Hoppe et al. 1998]. In keiner der Publikationen ist angegeben, ob diese Nachweisgrenze auch erreicht wird, wenn die für Plasma typische Sulfatmenge in der Blindprobe enthalten ist. Die Sulfatmenge ist aber entscheidend, weil der Oxalatpeak vom Sulfatpeak, je nach Mengenverhältnis der beiden Ionen, nicht basisliniengetrent ist.

4.2 Blutuntersuchung

In der Literatur der letzten 20 Jahre werden die Normalwerte für Oxalsäure im Blut im Bereich von 0,6 bis 6 $\mu\text{mol/l}$ angegeben. In älteren Publikationen werden dreifach erhöhte Werte angegeben. Das erklärt sich durch eine unzureichende Aufarbeitung und Konservierung der Proben mit unzureichender Hemmung der *in vitro* Oxalogenese. Die von uns ermittelten Werte für Gesunde ($2.65 \pm 0.23 \mu\text{mol/l}$) decken sich mit den Angaben der aktuellen Literatur. So geben *Pundir et al.* Werte von $3.2 \pm 0.5 \mu\text{mol/l}$, *Ogura et al.* $2.39 \pm 1.46 \mu\text{mol/l}$, *Porowski et al.* 1.4 bis 6.0 $\mu\text{mol/l}$ und *Harris et al.* $1.47 \pm 0.15 \mu\text{mol/l}$ an (*Pundir et al.* 1998, *Ogura et al.* 2000, *Porowski et al.* 2003, *Harris et al.* 2004).

Verschiedene Autoren fanden geschlechtsabhängig signifikant unterschiedliche Plasmaoxalatwerte. *Kasidas und Rose* fanden signifikant höhere Werte für Frauen. Im Gegensatz dazu geben *Costello und Landwehr* höhere Werte für Männer an. Beide Autoren überblicken jedoch nur ein kleines Kollektiv von $n=21$ (9 Frauen, 12 Männer; *Kasidas & Rose* 1986) bzw. $n=23$ (12 Frauen, 11 Männer; *Costello & Landwehr* 1988). Die von uns durchgeführte Untersuchung an 133 Gesunden (70 Frauen, 63 Männer) konnte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Geschlechtern zeigen. Untersuchungen am Menschen zum Einfluß der Geschlechtshormone auf die Plasmaoxalatkonzentration gibt es bisher nicht. In einer experimentellen Studie fanden *Fan et al.* einen Anstieg der Plasmaoxalatkonzentration und der renalen Oxalatausscheidung bei Testosteron behandelten Ratten. Dagegen zeigte eine Behandlung mit Östrogen eine Erniedrigung der Oxalatwerte [*Fan et al.* 1998]. Ob hier der Ansatz zur Erklärung der epidemiologisch höheren Inzidenz einer Nephrolithiasis bei Männern liegt müssen weitere Studien zeigen.

Auch altersabhängige Unterschiede in der Plasmaoxalatkonzentration wurden bisher nicht berichtet. Beim Vergleich der Plasmaoxalatkonzentration von Gesunden,

der Gruppen I (19-40 Jahre) und III (>60 Jahre), konnten wir einen statistischen Zusammenhang zwischen den beiden Merkmalen Alter und Plasmaoxalatkonzentration für beide Geschlechter aufzeigen. Wir vermuten die Ursache in einer altersbedingten reduzierten Nierenfunktion, z.B. durch Einnahme von nephrotoxischen Medikamenten (z.B. Nicht-steroidale Antiphlogistika bei Arthrose) oder mangelnder Flüssigkeitsaufnahme. Diese These wird gestützt durch die Beschreibung einer linearen Abhängigkeit von Plasmaoxalat und Plasmakreatinin bei chronischer Niereninsuffizienz durch *Kasidas und Rose* (1986) und *Barratt et al.* (1991). Eine Kreatinin Mitbestimmung in der Gruppe der Gesunden ist bisher nicht erfolgt, würde jedoch zum Beleg der genannten These eine interessante Ergänzung für zukünftige Untersuchungen darstellen.

Auch die Literaturangaben über pathologische Oxalatwerte zeigen einen deutlichen Anstieg der Plasmaoxalatwerte in Abhängigkeit der Schädigung der Niere. So können die Werte bei Kalziumoxalatsteinpatienten ohne Einschränkung der Nierenfunktion durchaus im Normbereich liegen [Oehlschläger et al. 1998]. *Albrecht et al.* fanden im Gegensatz dazu für ein gleich großes Kollektiv dreifach erhöhte Werte [Albrecht et al. 1993]. Aufgrund der geringen Anzahl an Patienten und fehlenden Angaben zum Grad der Nierenschädigung ist die Interpretation der Ergebnisse schwierig. Wir konnten in unserer Untersuchung an 87 Kalziumoxalatsteinpatienten durchschnittlich höhere Plasmaoxalatkonzentrationen gegenüber den Gesunden ermitteln, ein statistischer Zusammenhang (Signifikanzniveau: $p < 0.05$) konnte jedoch nur in der Altersgruppe I aufgezeigt werden. Da sich die Plasmaoxalatkonzentration der jungen Gesunden (20 bis 40 jährigen) sowohl gegenüber den gleichaltrigen Kranken als auch gegenüber den älteren Gesunden (über 60 jährigen) signifikant unterscheidet, kann hier die Bestimmung der Plasmaoxalatkonzentration hinsichtlich der Diagnostik einer Hyperoxalurie, Kalziumoxalatnephrolithiasis oder Niereninsuffizienz von großer Bedeutung sein.

Die von uns ermittelten Werte für Kranke (Mean $4.34 \pm 0.55 \mu\text{mol/l}$) liegen im oberen Normbereich der für Gesunde allgemein akzeptierten Werte. Die Werte decken sich mit

Angaben von *Oehlschläger et al.* der 1998 für Kalziumoxalatsteinpatienten (n=21) eine durchschnittliche Konzentration von $4.64 \pm 1.96 \mu\text{mol/l}$ ermittelt hat.

Die von *Kasidas & Rose* im Jahre 1986 ($r = 0,92$; $p < 0,001$) und von *Barratt et al.* im Jahre 1991 ($r = 0,93$; $p < 0,0001$) beschriebene Korrelation von Serumkreatinin und Plasmaoxalatkonzentration ergab sich erst unter Einbeziehung von Patienten mit deutlich erhöhten Kreatininwerten über $2,0 \text{ mg/dl}$. Im Bereich der diskreten Kreatininerhöhung bis $1,4 \text{ mg/dl}$ konnten die Autoren keinen Zusammenhang ($r = 0,09$, $p > 0,1$) zwischen Plasmaoxalatkonzentration und Serumkreatinin finden. Diese Beobachtung können wir für unser Kollektiv ($r = -0,096$, $p = 0,478$) bei einem durchschnittlichen Serumkreatininwert von $1,04 \pm 0,02 \text{ mg/dl}$ bestätigen.

Drei aktuelle Studien belegen ein deutlich erhöhtes Risiko für übergewichtige Menschen an einem Harnsteinleiden zu erkranken bzw. bei bekanntem Steinleiden einer erhöhten Rezidivquote zu unterliegen. *Amato et al.* geben einen Body-Mass-Index über 32 kg/m^2 als Risikofaktor an. *Siener et al.* konnten einen signifikanten Zusammenhang zwischen ansteigendem Body-Mass-Index und ansteigendem Harnsteinrisiko belegen. *Ekuro et al.* konnten ein signifikant höheres Auftreten von metabolischen Erkrankungen (Hypocitraturie, Hyperurikurie, Gicht) als Risikofaktoren für ein Harnsteinleiden bei Menschen mit einem Body-Mass-Index über 30 kg/m^2 feststellen (Siener et al. 2004, Amato et al. 2004, Ekuro et al. 2004). In unseren Untersuchungen konnte keine Korrelation zwischen der Plasmaoxalatkonzentration und der Höhe des Body-Mass-Index nachgewiesen werden. Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen ließen sich nicht feststellen. Verglichen mit den Studien von *Siener et al.* und *Ekuro et al.*, die ein Kollektiv von $n = 282$ bzw. $n = 140$ ($\text{BMI} > 30 \text{ kg/m}^2$) überblicken, wäre unsererseits eine höhere Fallzahl zur Objektivierung der Aussagen erforderlich.

Die Untersuchung der Steinepisoden pro Jahr diene zur Klärung der Frage ob die Menge an Steinabgängen verbunden mit Koliken in Zusammenhang mit einer Erhöhung der

Plasmaoxalatkonzentration steht. Eine Korrelation nach Pearson ließ sich jedoch für unser Kollektiv nicht nachweisen. Signifikante Unterschiede für die Plasmaoxalatkonzentration zwischen den Patienten mit einer, bis zu sechs oder über sechs Steinepisoden waren nicht nachweisbar. Die Hypothese das häufige Steinereignisse mit einer erhöhten Plasmaoxalatkonzentration einhergehen konnte nicht bewiesen werden. Da die Zahlen zumeist auf subjektiven Angaben auf der Erinnerung der Patienten basieren, kann man die Daten als unsicher bezeichnen. Eine Überprüfung der Angaben durch objektive Befunde wie z.B. stationäre Krankenakten von Voraufenthalten oder hausärztliche Aufzeichnungen würden zur Validität der Daten beitragen. Dieses war uns in unserem Kollektiv jedoch nicht immer möglich.

5 Zusammenfassung

Die Bestimmung der Oxalsäure im Blut ist von besonderer Bedeutung in der Diagnostik und Behandlung der primären Hyperoxalurie, der chronischen Niereninsuffizienz, insbesondere der dialysepflichtigen terminalen Niereninsuffizienz, der Nephrolithiasis als auch bei Alkoholvergiftungen.

Im ersten Teil der Arbeit wurde eine neue Meßmethode zur Bestimmung von Oxalsäure im Blut entwickelt. Um eine Oxalatbestimmung im Blut zu ermöglichen, mußte vor allem eine sehr hohe Empfindlichkeit erreicht werden. Deshalb sollte das Detektionssystem eine hohe Spezifität und Selektivität aufweisen. Dazu wurde ein kombiniertes Detektionssystem aus enzymatischer Umsetzung mittels Oxalsäureoxidase und elektrochemischer Detektion gewählt. Die Oxalsäureoxidase gewährleistet eine hohe Spezifität und eine hohe Selektivität, die elektrochemische Detektion eine hohe Empfindlichkeit. Störsubstanzen wie Ascorbinsäure werden chromatographisch durch eine Anionenaustauschersäule abgetrennt (HPLC). Um die Kosten zu senken und dadurch eine Routineanalyse zu ermöglichen, wurde die Oxalsäureoxidase auf einen Träger immobilisiert und in eine Leersäule gefüllt. Der so entstandene Enzymreaktor (ER) setzt Oxalsäure zu Wasserstoffperoxid um. Wasserstoffperoxid wird anschließend an einer Platin-Elektrode elektrochemisch zu Sauerstoff und Wasser umgesetzt. Der dabei fließende Strom ist proportional zur umgesetzten Oxalsäuremenge.

Die Nachweisgrenze der HPLC-ER-Methode liegt bei $0,69 \mu\text{mol/l}$ und die Bestimmungsgrenze bei $1,03 \mu\text{mol/l}$. Damit besitzt sie eine ausreichende Empfindlichkeit für die Analyse von Blutproben. Die HPLC-ER-Methode ist für Serienuntersuchungen, aufgrund geringer laufender Kosten und kurzer Arbeitszeit kostengünstig.

Blutplasmaproben wurden zur Schonung des chromatographischen Systems mit Hilfe von Ultrafiltrationsröhrchen enteiweißt. Um eine Oxalsäureneubildung und eine Bindung der Oxalsäure an die im Plasma vorhandenen Proteine zu verhindern, wurden $10 \mu\text{l}$ 1 N Salzsäure in den Schwimmer des Röhrchens gegeben. Der pH-Wert des Ultrafiltrates betrug dann zwischen $4,0 - 5,5$. Die Wiederfindungsrate lag bei durchschnittlich $94,7 \%$.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde anhand dieser Methode die Plasmaoxalatkonzentration, für das in der Literatur bisher größte Kollektiv an Gesunden und Kalziumoxalatsteinpatienten ($n_{\text{ges}} = 220$), bestimmt. Die Ergebnisse wurden auf Alters und Geschlechtsabhängigkeit untersucht. Zusätzlich erhobene Parameter wie der Body-Mass-Index, das Serumkreatinin und die Häufigkeit von Steinepisoden wurden auf eine Korrelation zur Plasmaoxalatkonzentration untersucht. Für 133 Gesunde ermittelten wir eine mittlere Plasmaoxalatkonzentration von $2.65 \pm 0.23 \mu\text{mol/l}$. Für 87 Kalziumoxalatsteinpatienten ermittelten wir eine durchschnittliche Plasmaoxalatkonzentration von $4.34 \pm 0.55 \mu\text{mol/l}$. In der Auswertung der Altersgruppen zeigte sich ein geschlechtsunabhängiger statistisch signifikanter Unterschied zwischen Alter und Plasmaoxalatkonzentration für junge Gesunde (20-40 Jahre) gegenüber gleichaltrigen Kranken und gegenüber älteren Gesunden (> 60 Jahre).

Dieser Zusammenhang zeigt die besondere Bedeutung der Bestimmung von Oxalsäure im Blut junger Patienten hinsichtlich der Diagnostik und Verlaufskontrolle einer Hyperoxalurie, Kalziumoxalatnephrolithiasis oder Niereninsuffizienz.

Eine Korrelation zwischen der Plasmaoxalatkonzentration und der Höhe des Body-Mass-Index, der Höhe des Serumkreatinins und der Häufigkeit von Steinabgängen konnte nicht nachgewiesen werden.

Mit dieser Arbeit konnten wir die besondere Bedeutung der Bestimmung von Oxalsäure im Blut zeigen. Insbesondere beim jungen Menschen kann sie einen entscheidenden Hinweis für das Vorliegen einer primären Hyperoxalurie und/oder einer Kalziumoxalatnephrolithiasis geben. Deshalb sollte schon beim ersten Harnstein, aber auch bei Nephrokalzinoseverdacht im Ultraschall, sowie bei Hämaturie unbedingt die Plasmaoxalatkonzentration bestimmt werden. Mit der von uns entwickelten HPLC-ER-Methode steht ein präzises und kostengünstiges Analyseverfahren zur Verfügung.

6 Literaturverzeichnis

Akçay T, Rose GA.

The real and apparent plasma oxalate.

Clin Chim Acta 1980; 101: 305-311

Albrecht S.

Zur Anwendung moderner Chemilumineszenzsysteme in der biochemischen Analytik.

Habilitationsschrift 1993, Dresden

Albrecht S, Zimmermann T, Beutner M, Distler W.

Chemiluminometric measurement of plasma and intercellular oxalate concentration in pediatric and adult septic patients.

In: Eur J Clin Chem Clin Biochem 1995; 33 (4): A32; Abstracts of the 14th Int. Congress for Biochemical Analysis, Leipzig

Amato M, Lusini ML, Nelli F.

Epidemiology of nephrolithiasis today.

Urol Int. 2004; 72 Suppl 1:1-5.

Assolant-Vinet CH, Bardeletti G, Coulet PR.

A novel enzyme membrane electrode for oxalate determination in foodstuffs.

Anal Lett 1987; 20(4): 513-527

Barratt TM, Kasidas GP, Murdock I, Rose GA.

Urinary oxalate and glycolate excretion and plasma oxalate concentration.

Arch Dis Child 1991; 66(4): 501-503

Bennett, DJ, Cole FE, Frohlich ED, Erwin DT.

A radioenzymatic isotope-dilution assay for oxalate in serum or plasma.

Clin Chem 1979; 25(10): 1810-1813

Berckmann RJ, Boer P.

An inexpensive method for sensitive enzymatic determination of oxalate in urine and plasma.

Clin Chem 1988; 34(7): 1451-1455

Berg W.

Stoffwechsel und Pathophysiologie der Oxalsäure

Z Urol Nephrol 1990; 83: 481-488

Berg W, Haerting R, Bothor C, Meinig S, Eschholz A, Schulze HP.

Diagnostik der enteralen Oxalathyperabsorption bei Patienten mit idiopathischem rezidivierendem Kalziumoxalatharnsteinleiden.

Urologe A 1990; 29: 148-151

Birwe H, Schneeberger W, Hesse A.

Investigations of the efficacy of ascorbic acid therapy in cystinuria.

Urol Res. 1991; 19(3):199-201

Boer P, van Leersum L, Endeman HJ.

Determination of plasma oxalate with oxalate oxidase.

Clin Chim Acta 1984; 137:53-60

Borghi L, Schianchi T, Meschi T, Guerra A, Allegri F, Maggiore U, Novarini A.

Comparison of two diets for the prevention of recurrent stones in idiopathic hypercalciuria.

N Engl J Med. 2002; 346(2):77-84.

Borland WW, Payton CD, Simpson K, Naccdougall AI.

Serum oxalate in chronic renal failure.

Nephron 1987; 45: 119-121

Broyer M, Brunner FP, Brynger H, Dykes SR, Ehrlich JHH.

Kidney transplantation in primary oxalosis: Data from the EDTA registry.

Nephrol Dial Transplant 1990; 5: 332-336

Bunchman TE, Donckerwolcke RA.

Continuous arterial-venous diahemofiltration and continuous veno-venous diahemofiltration in infants and children.

Pediatr Nephrol. 1994; 8(1):96-102.

Butz M, Kohlbecker E.

Oxalate urolithiasis: significance of serum and urinary oxalate.

Urol Int 1980; 35: 303-308

Chung TT, Summers S, Sheaff M, Cunningham J.

Always look beyond the stones: hyperoxaluria overlooked.

Clin Nephrol. 2004; 62(1):58-61.

Cochat P, Deloraine A, Rotily M, Olive F, Liponski I, Deries N.

Epidemiology of primary hyperoxaluria type 1.

Nephrol Dial Transplant. 1995; 10 Suppl 8:3-7

Cochat P, Koch Nogueira PC, Mahmoud MA, Jamieson NV, Scheinman JI, Rolland MO.

Primary hyperoxaluria in infants: medical, ethical, and economic issues.

J Pediatr. 1999; 135(6):746-50.

Coe FL, Parks JH.

New insights into the pathophysiology and treatment of nephrolithiasis: New research venues.

J Bone Miner Res 1997; 12:522-533

Costello J, Landwehr DM.

Determination of oxalate concentration in blood.

Clin Chem 1988; 34(8): 1540-1544

Costello JF, Sadovnic MJ, Cottington EM.

Plasma oxalate levels rise in hemodialysis patients despite increased oxalate removal.

J Am Soc Nephrol 1991; 1 (12): 1289-1298

Costello JF, Smith M.

Determination of evolved $^{14}\text{CO}_2$ in decarboxylase reactions with applications to measurement of ^{14}C oxalic acid.

Anal Biochem 1992; 202: 337-339

Cramer SD, Ferree PM, Lin K, Milliner DS, Holmes RP.

The gene encoding hydroxypyruvate reductase (GRHPR) is mutated in patients with primary hyperoxaluria type II.

Hum Mol Genet. 1999; 8(11):2063-9

Danpure CJ.

Advances in the enzymology and molecular genetics of primary hyperoxaluria type 1. Prospects for gene therapy.

Nephrol Dial Transplant. 1995; 10 Suppl 8:24-9.

Daudon M, Estepa L, Lacour B, Jungers P.

Unusual morphology of calcium oxalate calculi in primary hyperoxaluria.

J Nephrol. 1998; 11 Suppl 1:51-5.

Diaz C, Catalinas FG, de Alvaro F, Torre A, Sanchez C, Costero O.

Long daily hemodialysis sessions correct systemic complications of oxalosis prior to combined liver-kidney transplantation: case report.

Ther Apher Dial. 2004; 8(1):52-55

Ekeruo WO, Tan YH, Young MD, Dahm P, Maloney ME, Mathias BJ, Albala DM, Preminger GM.

Metabolic risk factors and the impact of medical therapy on the management of nephrolithiasis in obese patients.

J Urol. 2004; 172(1):159-63.

Ettinger B, Pak CY, Citron JT, Thomas C, Adams-Huet B, Vangessel A.

Potassium-magnesium citrate is an effective prophylaxis against recurrent calcium oxalate nephrolithiasis.

J Urol. 1997; 158(6):2069-73.

Fan J, Chandhoke PS, Yagisawa T.

Rat plasma oxalate measurement using the sigma oxalate diagnostic kit.

Rocksociety San Diego 1998, Abstracts p.12

Finlayson B.

Renal lithiasis in review.

Urol Clin Nor Am 1974; 1(2): 181-213

Finlayson B.

Calcium stones: Some physical and clinical aspects.

In: David DC (eds) Calcium Metabolism in Renal Failure and Nephrolithiasis, John Wiley & sons, New York, London, Sidney Toronto pp. 1979, 337-382

Flach S.

Epidemiologische Studie über das Harnsteinleiden in Deutschland.

Dissertation 1996, Bonn

Frehse H, Thier HP.

Die Ermittlung der Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze bei Rückstandsanalysen nach dem neuen DFG-Konzept.

GIT Fachz Lab 1991; 4: 285-290

Fry JDR, Starkey BJ.

The determination of oxalate in urine and plasma by high performance liquid chromatography.

Ann Clin Biochem 1991; 28: 581-587

Galensa R, Müller G Schirmer A, Hippe H, Staedler H.

Bestimmung von Lebensmittelinhaltsstoffen durch HPLC-Enzymreaktor-Kopplung.

Lebensmittelchem Gerichrtl Chem 1988; 42: 84-85

Gaulier JM, Cochat P, Lardet G, Vallon JJ.

Serum oxalate microassay using chemiluminiscence detection.

Kidney Int 52: 1997a; 1700-1703

Gaulier JM, Cochat P, Lardet G, Vallon JJ.

Serum oxalate determination in children by chemiluminescence detection. Proceedings of the 7th European Symposium on Urolithiasis 1997b; 63: 13

Gaulier JM, Lardet G, Cochat P, Vallon JJ.

A serum oxalate assay using chemiluminescence detection, adapted to a paediatric population.

J Nephrol. 1998; 11 Suppl 1:73-4.

Gebhardt A, Bergmann A, Kluthe R.

Contribution to discussion- „Vitamin C and oxalic acid“.

Nieren Hochdruckkr 1992; 21: 562-563

Gelot MA, Lvoue G, Belleville F, Nabet P.

Determination of oxalates in plasma and urine using gas chromatography.

Clin Chim Acta 1980; 106: 279-285

Glaser A, Hochreiter W, Jaeger P, Hess B.

Determinants of urinary excretion of Tamm-Horsfall protein in non-selected kidney stone formers and healthy subjects.

Nephrol Dial Transplant. 2000; 15(10):1580-7

Haeckel R.

Statistische Probleme beim Vergleich von klinischen-chemischen Analysen-Verfahren.

J Clin Chem Clin Biochem 1980; 18: 433-437

Haeckel R.

Empfehlungen zur Anwendungen statistischer Methoden beim Vergleich klinisch-chemischer Analysenverfahren.

J Clin Chem Clin Biochem 1982; 20: 107-110

Harris AH, Freel RW, Hatch M.

Serum oxalate in human beings and rats as determined with the use of ion chromatography.

J Lab Clin Med. 2004; 144(1):45-52.

Hatch M, Bourke E, Costello J.

New enzymatic method for serum oxalate determination.

Clin Chem 1977; 23(1): 76-78

Herring LC.

Observations on the analysis of ten thousand urinary calculi.

J Urology 1962; 88(4): 545-562

Hesse A, Berg W, Schneider HJ, Hienzsch E.

Erarbeitung eines Ca-Oxalat-Screening Programmes auf der Grundlage biochemischer Meßdaten.

Fortschr Urol Nephrol 1977; 9: 278-285

Hesse A, Claßen A, Vahlensieck W.

Zur Bedeutung der Oxalsäureausscheidung im Harn bei Kalziumoxalat-Urolithiasis.

Urologe B 1987; 27: 87-90

Hesse A, Siener R, Heynck H, Vahlensieck W.

Diät und Diätberatung beim Harnsteinleiden.

Urologe B 1991; 31: 135-139

Hesse A, Schneeberger W, Engfeld S, von Unruh GE, Sauerbruch T.

Intestinal hyperabsorption of oxalate in calcium oxalate stone formers: Application of a new test with [¹³C₂]oxalate.

J Am Soc Nephrol 1999; 10[Suppl 14]:329-333

Hesse A.

Metaphylaxe bei Urolithiasis.

J. Urol. Urogynäkol. Sonderheft 2002a; 2: 10-12

Hesse A.

Harnsteine, Teil: Stoffwechseldefekte, Ernährungsfehler und Metaphylaxe.

Urologe A 2002b; 43:616-629

Hesse A, Tiselius H-G, Jahn A.

Urinary stones, diagnosis, treatment and prevention of recurrence.

Basel: Karger, 2002; 2nd Edn. Basel

Hesse A, Brändle E, Wilbert D, Köhrmann KU, Alken P.

Study on the prevalence and incidence of urolithiasis in Germany comparing the years 1979 vs. 2000.

Eur Urol.2003; 44(6):709-13

Hodgkinson A.

Oxalic acid in biology and medicine.

Arrowsmith JW (eds), Academic press, London, New York, San Francisco, 1977; pp. 159-200

Hodgkinson A, Zarembski PM.

Oxalic acid metabolism in man: A review.

Calc Tiss Res 1968 ;2: 115-132

Hodgkinson A.

Calcium-containing stones: their causation and treatment.

Postgrad Med J. 1977; 53 Suppl 2:25-34

Holmes RP, Goodman HO, Assimos DG.

Contribution of dietary oxalate to urinary oxalate excretion.

Kidney Int. 2001; 59(1):270-6

Hönow R, Hesse A.

Comparison of extraction methods for determination of soluble and total oxalate in foods by HPLC-enzyme-reactor.

Food Chemistry 2002; 78: 511-521

Hönow R, Laube N, Schneider A, Keßler T, Hesse A.

Influence of grapefruit-, orange- and apple-juice consumption on urinary variables and risk of crystallization.

Br J Nutr. 2003; 90(2):295-300.

Hönow R, Simon A, Hesse A.

Interference-free sample preparation for the determination of plasma oxalate analyzed by HPLC-ER: preliminary results from calcium oxalate stone-formers and non-stone-formers.

Clin Chim Acta. 2002; 318(1-2):19-24

Hoppe B, Hesse A, Leumann E.

Die primäre Hyperoxalurie Typ I.

Urologe B 1996a; 36: 113-118

Hoppe B, Graf D, Offner G, Latta K, Byrd DJ, Michalk D, Brodehl J.

Oxalate elimination via hemodialysis or peritoneal dialysis in children with chronic renal failure.

Pediatr Nephrol. 1996b; 10(4):488-92

Hoppe B, Kemper MJ, Hvizd MG, Sailer DE, Langman CB.

Simultaneous determination of oxalate, citrate and sulfate in plasma with ion-chromatography: Normal values in childhood.

Kidney Int 1998; 53: 1348-1352

Hoppe B, Kemper MJ, Bökenkamp A, Portale AA, Cohn RA, Langman B.

Plasma calcium oxalate supersaturation in children with primary hyperoxaluria and end-stage renal failure.

Kidney Int 1999; 56: 268-27

Hoppe B, Leumann E, von Unruh G, Laube N, Hesse A.

Diagnostic and therapeutic approaches in patients with secondary hyperoxaluria.

Front Biosci. 2003; 01;8:e437-43.

Jamieson NV.

On behalf of the European PH 1 Transplantation Study Group: The European Hyperoxaluria Type I Transplant registry report on the results of combined liver/kidney transplantation for primary hyperoxaluria 1984-1994.

Nephrol Dial Transplant 1995; 10 [Suppl 8]:33-37, 1995

Jamieson NV.

The results of combined liver/kidney transplantation for primary hyperoxaluria (PH1) 1984-1997. The European PH1 transplant registry report. European PH1 Transplantation Study Group.

J Nephrol. 1998; 11 Suppl 1:36-41

Jamieson NV.

Oxalosis registry 1987-1999 [Abstract]

Nephrol Dial Transplant 1999; 14:2788, 1999

Kasidas GP, Rose GA.

Oxalate contents of some common foods: Determination by an enzymatic method.

J of Human Nutri 1980; 34: 255-266

Kasidas GP, Rose GA.

Measurement of plasma oxalate in healthy subjects and in patients with chronic renal failure using immobilised oxalate oxidase.

Clin Chim Acta 1986; 154; 49-58

Kemper MJ, Conrad S, Muller-Wiefel DE.

Primary hyperoxaluria type 2.

Eur J Pediatr. 1997; 156(7):509-12

Kopp N, Leumann E.

Changing pattern of primary hyperoxaluria in Switzerland.

Nephrol Dial Transplant. 1995; 10(12):2224-7

Larsson L, Libert B, Asperud M.

Determination of urinary oxalate by reversed phase ion pair „High-Performance“ liquid chromatography. In: Schuille PO, Smith LS, Robertson WG, Vahlensieck W (eds.), Urolithiasis and Related Clinical Research, Plenum Press, New York, London, 1985; pp. 661-664

Latta K, Brodehl J.

Primary hyperoxaluria type I.

Eur J Pediatr 1990; 149:518-522

Latta K.

Kidney transplantation in children

Kinderkrankenschwester 1999; 18(4):151-4.

Laube N, Schmidt M, Hesse A.

Monitoring of the treatment of calcium-oxalate stone formers with the Bonn-Risk-Index
Urologe A. 2003; 42(2):243-9. Epub 2003;11.

Lax E (eds), Synowietz C.

Taschenbuch für Chemiker und Physiker.

3. Auflage, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1967, Band 1, pp. 6, 864,
1129

Leumann E, Hoppe B.

The Primary Hyperoxalurias.

J Am Soc Nephrol 2001; 12:1986-1993, 2001

Leumann E, Hoppe B, Neuhaus T, Blau N.

Efficacy of oral citrate administration in primary hyperoxaluria.

Nephrol Dial Transplant 1995; 10[Suppl 8]: 14-16, 1995

Lewin S.

Recent advances in the molecular biology of Vitamin C. In: Birch GG, Parker KJ,
Vitamin C, Recent Aspects of its Physiological and Technical Importance, London 1974,
Appl. Sci. Publishers Ltd, 221-151

Lindsjö M, Danielson BG, Fellström B, Lithell H, Ljunghall S, Skarfors E, Vessby B.

Oxalate and calcium absorption tests in patients after jejunioileal anastomosis and in
idiopathic renal stone formers in comparison with healthy persons.

Scand J Urol Nephrol 1989; 23: 55-59

Luque de Castro MD.

Determination of oxalic acid in urine: A review.

J Pharm Biomed Ana 1988; 6(1): 1-13

Marguire M, Fituri N, Keogh B, Costello J.

The effect of storage on serum oxalate values.

In: Smith LH, Robertson WG, Finlayson (eds), Urolithiasis, Clinical and basic Research, Plenum Press New York, London 1981, pp. 963-967

Marangella M.

Transplantation strategies in type I primary hyperoxaluria: The issue of pyridoxine responsiveness

Nephrol Dial Transplant 1999; 14:301-303

Marangella M, Petrarulo M, Vitale C, Daniele PG, Sammartano S, Cosseddu D, Linari F.

Serum calcium oxalate saturation in patients on maintenance hemodialysis for primary hyperoxaluria or oxalosis-unrelated renal diseases

Clin Sci 1991; 81:483-490

McConnell KN, Rolton HA, Modi KS, Macdougall AI.

Plasma oxalate in patients with chronic renal failure receiving continuous ambulatory peritoneal dialysis or hemodialysis.

Am J Kidney Dis. 1991; 18(4):441-5.

Milliner DS, Eickholt JT, Bergstralh EJ, Wilson DM, Smith LH.

Results of long term treatment with orthophosphate and pyridoxine in patients with primary hyperoxaluria.

N Engl J Med 1994; 331: 1553-1558

Milliner DS, Wilson DM, Smith LH.

Phenotypic expression of primary hyperoxaluria: comparative features of types I and II.

Kidney Int. 2001; 59(1):31-6.

Milosevic D, Rinat C, Batinic D, Frishberg Y.

Genetic analysis--a diagnostic tool for primary hyperoxaluria type I.

Pediatr Nephrol. 2002; 17(11):896-8. Epub 2002 Oct 09.

Mittal RD, Kumar R.

Gut-inhabiting bacterium Oxalobacter formigenes: role in calcium oxalate urolithiasis.

J Endourol. 2004; 18(5):418-24

Morgan SH, Purkiss P, Watts RW, Mansell MA.

Oxalate dynamics in chronic renal failure. Comparison with normal subjects and patients with primary hyperoxaluria.

Nephron. 1987; 46(3):253-7.

Motley A, Lumb MJ, Oatey PB, Jennings PR, De Zoysa PA, Wanders RJ, Tabak HF, Danpure CJ.

Mammalian alanine/glyoxylate aminotransferase 1 is imported into peroxisomes via the PTS1 translocation pathway. Increased degeneracy and context specificity of the mammalian PTS1 motif and implications for the peroxisome-to-mitochondrion mistargeting of AGT in primary hyperoxaluria type 1.

J Cell Biol. 1995; 131(1):95-109.

Neuhaus TJ, Belzer T, Blau N, Hoppe B, Sidhu H, Leumann E.

Urinary oxalate excretion in urolithiasis and nephrocalcinosis

Arch Dis Child 2000; 82:322-326

Nolde A, Hesse A, Scharrel O, Vahlensieck W.

Modellprogramm zur Nachsorge bei rezidivierenden Harnsteinpatienten.

Urologe [B] 1993; 33: 148-154

Nolkemper D, Kemper MJ, Burdelski M, Vaismann I, Rogiers X, Broelsch CE, Ganschow R, Muller-Wiefel DE.

Long-term results of pre-emptive liver transplantation in primary hyperoxaluria type 1. *Pediatr Transplant.* 2000; 4(3):177-81.

Oehlschläger S, Albrecht S, Pilarshin Ch, Wirth MP.

Determination of serume and urine oxalate and oxalate concentration of red blood cells by chemiluminiscence in idiopathic calcium oxalate nephrolithiasis.

J Urology 1998; 159/5: 175

Ogura H.

Determinations of oxalate in urine and plasma by capillary electrophoresis.

Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi. 2000; 91(6):547-55

Ohkawa H.

Gas chromatographie determination of oxalic acid in foods.

J Assoc Off Anal Chem 1985; 68: 108-111

Pabel B.

Bestimmung von organischen Säuren und Aminosäuren mit HPLC-Enzymreaktor - Kopplung und elektrochemischer Detektion.

Dissertation Institut für Lebensmittelchemie 1993, Universität Braunschweig

Palka P, Duhig E, Carey L, Galbraith A.

Primary oxalosis with cardiac involvement: echocardiographic features of an unusual form of cardiomyopathy.

Circulation. 2001; 19;103(24):E122-3

Parkinson IS, Kealey T, Laker MF.

The determination of plasma oxalate concentrations using an enzyme/bioluminescent assay.

Clin Chim Acta 1985; 152: 335-345

Petrarulo M, Marangella M, Bianco O, Marchesini A, Linari F.

Preventing ascorbate interference in ion-chromatographic determinations of urinary oxalate: Four methods compared.

Clin Chem 1990a; 36(9): 1642-1645

Petrarulo M, Bianco O, Marangella M, Pellegrino S, Linari F.

Ion chromatography determination of plasma oxalate in healthy subjects, in patients with chronic renal failure and in cases of hyperoxaluric syndromes.

J Chromatogr 1990b; 511: 223-231

Petrarulo M, Marangella M.

Proper handling of blood samples in crucial for accurate ion chromatographic determination of oxalate.

Clin Chimica Acta 1990c; 189:249-252

Petrarulo M, Cerelli E, Marangella M, Maglienti F, Linari F.

Ion chromatographic determination of plasma oxalate reexamined.

Clin Chem 1993; 39(3): 537-539

Petrarulo M, Cerelli E, Marangella M, Cosseddu D, Vitall C, Linari F.

Assay of plasma oxalate with soluble oxalate oxidase.

Clin Chem 1994; 40(11): 2030-2034

Porowski T, Galasinski W.

A semi-micromethod for determination of oxalate in human plasma.

Acta Pol Pharm. 2003; 60(4):239-45.

Prien EL.

Crystallographic analysis of urinary calculi: A 23 year study.

J Urology 1963; 89. 917-924

Pundir CS, Kuchhal NK, Thakur M, Satyapal.

Determination of plasma oxalate with chloride ion insensitive oxalate oxidase.

Indian J Biochem Biophys. 1998; 35(2):120-2.

Raaflaub J.

Komplexchemische Grundlagen der Harnsteingenesse.

Helv med Acta 1963; 49: 724-755

Rampton DS, Sarner M in: Rose GA.

Oxalate metabolism in relation to urinary stone

Springer London 1988, 103

Reinholz J.

Ionenchromatographische Oxalatbestimmung im Blutplasma unter Beachtung von urologischen Aspekten.

Diplomarbeit 1994, Universität Bonn, Experimentelle Urologie

Robertson WG, Peacock M, Nordin BEC.

Measurement of activity products in urine from stone-formers and normal subjects.

In: Finlayson B, Hench LL, Smith LH (eds), Urolithiasis: Physical aspects, Proceedings of a Conference 8/1971, National Academy of Science Washington DC 1972a, pp. 79-94

Robertson WG, Peacock M, Nordin BEC.

Crystalluria In: Finlayson B, Hench LL, Smith LH (eds), Urolithiasis: Physical Aspects, Proceedings of a Conference 8/1971, National Academy of Science Washington DC 1972b, pp. 243-254

Robertson WG .

Physical chemical aspects of calcium stone-formation in the urinary tract. In: Fleisch H, Robertson WG, Smith LH, Vahlensieck W (eds), Urolithiasis Research. Plenum Press New York, London 1976, pp. 25-39

Rolton HA, McConnel KN, Modi KS, Macdougall AI.

A simple, rapid assay for plasma oxalate in uraemic patients using oxalate oxidase, which is free from Vitamin C interference.

Clin Chim Acta 1989; 182: 247-254

Rumsby G.

Biochemical and genetic diagnosis of the primary hyperoxalurias: a review.

Mol Urol. 2000; Winter 4(4):349-54

Rumsby G, Williams E, Coulter-Mackie M.

Evaluation of mutation screening as a first line test for the diagnosis of the primary hyperoxalurias.

Kidney Int. 2004; 66(3):959-63.

Saborio P, Scheinman JI.

Transplantation for primary hyperoxaluria in the United States.

Kidney Int. 1999; 56(3):1094-100.

Scharrel O, Siener R.

Die Bedeutung der Ernährung beim Harnsteinleiden.

Urologe [B] 1993; 33: 83-88

Sidhu H, Hoppe B, Hesse A, Tenbrock K, Bromme S, Rietschel E, Peck AB.

Absence of *Oxalobacter formigenes* in cystic fibrosis patients: a risk factor for hyperoxaluria.

Lancet. 1998; 26;352(9133):1026-9.

Sidhu H, Schmidt ME, Cornelius JG, Thamilselvan S, Khan SR, Hesse A, Peck AB.

Direct correlation between hyperoxaluria/oxalate stone disease and the absence of the gastrointestinal tract-dwelling bacterium *Oxalobacter formigenes*: possible prevention by gut recolonization or enzyme replacement therapy.

J Am Soc Nephrol. 1999; 10 Suppl 14:S334-40.

Siener R, Hesse A.

The effect of different diets on urine composition and the risk of calcium oxalate crystallisation in healthy subjects.

Eur Urol. 2002; 42(3):289-96.

Siener R, Hesse A.

The effect of a vegetarian and different omnivorous diets on urinary risk factors for uric acid stone formation.

Eur J Nutr. 2003; 42(6):332-7.

Siener R, Glatz S, Nicolay C, Hesse A.

The role of overweight and obesity in calcium oxalate stone formation.

Obes Res. 2004; 12(1):106-13

Skotty DR, Nieman TA.

Determination of oxalate in urine and plasma using reversed phase ion-pair high performance liquid chromatography with tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium II-electrogenerated chemiluminescence detection.

J Chromatogr B Biomed Appl 1995; 665: 27-36

Stryer L.

Biochemie

Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft, Heidelberg 1988, 204

Sugiura M, Yamamura H, Hirano K, Ito Y, Sasaki M, Morikawa M, Inoue M, Tsuboi M.

Enzymatic determination of serum oxalate.

Clin Chim Acta 1980; 105: 393-399

Thakur M, Goyal L, Pundir CS.

Discrete analysis of plasma oxalate with alkylamine glass bound sorghum oxalate oxidase and horseradish peroxidase.

J Biochem Biophys Methods. 2000; 10;44(1-2):77-88.

The european agency for the evaluation of medicinal products.

EU-Guidelines: „Note for guidance on validation of analytical procedures: Methodology“ 1995; CPMP/ICH/281/95

Thoeny HC, Tuma J, Hess B.

Diagnostic imaging of calculi in the upper urinary tract--sonography vs. computerized tomography.

Ther Umsch. 2003; 60(2):73-8.

Tiselius HG, Almgard LE, Larrson L, Sörbo B.

A biochemical basis of grouping of patients with urolithiasis.

Eur Urol 1978; 4: 241-249

Tiselius HG.

Relationship between the severity of renal stone disease and urine composition.

Eur Urol 1979; 5: 323-327

Unruh von GE, Voss S, Sauerbruch T, Hesse A.

Reference range for gastrointestinal oxalate absorption measured with a standardized [13C2]oxalate absorption test.

J Urol. 2003; 169(2):687-90.

Unruh von GE, Voss S, Sauerbruch T, Hesse A.

Dependence of oxalate absorption on the daily calcium intake.

J Am Soc Nephrol. 2004; 15(6):1567-73

Vahlensieck W, Hesse A, Bach D.

Inzidenz, Prävalenz und Mortalität des Harnsteinleidens in der BRD.

Fortschr Urol Nephrol 1981; 17: 1-5

Wilson DM, Smith LH, Erichson SB, Torres VE, Liedtke RR.

Renal oxalate handling in normal subjects and patients with idiopathic renal lithiasis: Primary and secondary hyperoxaluria.

In: Walker VR (eds), Urolithiasis, Plenum Press New York, London 1988, pp. 453-455

Wilson DM, Liedtke RR.

Modified enzyme-based colorimetric assay of urinary and plasma oxalate with improved sensitivity and no ascorbate interference: Reference values and sample handling procedures.

Clin Chem 1991; 37(7): 1229-1235

Wolthers BG, Hayer M.

The determination of oxalic acid in plasma and urine by capillary gas chromatography.

Clin Chim Acta 1982; 120: 87-102

Woerden van CS, Groothoff JW, Wanders RJ, Davin JC, Wijburg FA.

Primary hyperoxaluria type 1 in The Netherlands: prevalence and outcome.

Nephrol Dial Transplant. 2003; 18(2):273-9.

World Health Organisation.

Physical Status: The use and interpretation of anthropometry.

Technical Report Series 854, Geneva 1995

World Medical Association.

Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects
Adopted by the 18th WMA General Assembly, Helsinki, Finland, June 1964, and
amended by the 29th WMA General Assembly, Tokyo, Japan, October 1975
35th WMA General Assembly, Venice, Italy, October 1983
41st WMA General Assembly, Hong Kong, September 1989
48th WMA General Assembly, Somerset West, Republic of South Africa, October 1996

Wygarden JB, Elder DT.

Primary hyperoxaluria and oxalosis. In: Stauburg JB et al, The Metabolic basis of inherited disease, McGrawHill, New York, Toronto, Sydney, London 1966, second Edition, 189-209

Yamato S, Wakabayashi H, Nahajima M, Shimada K.

Amperometric determination of oxalate in plasma and urine by liquid chromatography with immobilized oxalate oxidase.

J Chromatogr B 1994; 656: 29-35

Yamauchi A, Fujii M, Shirai D, Mikami H, Okada A, Imai E, Ando A, Orita Y, Kamada T.

Plasma concentration and peritoneal clearance of oxalate in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD).

Clin Nephrol. 1986; 25(4):181-5.

Yoshioka J, Park YD, Tanaka Y, Kobayashi Y, Miyajima M, Tani A, Hori M, Shirai D.

Echocardiographic features in a patient with primary oxalosis.

Echocardiography. 2001; 18(7):599-602.

Zaremski PM, Hodgkinson A.

The fluorimetric determination of oxalic acid in blood and other biological materials.

Biochem J 1965a; 96: 717-721

Zaremski PM, Hodgkinson A.

The fluorimetric microdetermination of glyoxylic acid in blood, urine and bacterial extracts.

Biochem J 1965b; 96: 218-223

8 Danksagungen

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Albrecht Hesse und den Mitarbeitern der Abteilung für Experimentelle Urologie danke ich für die freundliche Überlassung des Themas und die Förderung meiner Doktorarbeit.

Fr. Dr. rer. nat. Ruth Hönow, unter deren Leitung diese Arbeit entstand, danke ich für die sehr gute Betreuung.

Herrn Dr. med. Moritz Hemicker danke ich für die Beratung und Lektoratstätigkeit.

Herrn Prof. Dr. med. Peter Hanfland und den Angestellten der Blutbank der Universitätsklinik Bonn danke ich für äußerst kooperative Zusammenarbeit.

Danken möchte ich auch allen Probanden die sich für diese Arbeit zur Verfügung gestellt haben.