Wissenschaft und Fortbildung

Oxalsäurebestimmung im Plasma mit Oxalat-Oxidase. Untersuchungen bei Gesunden und bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz vor und nach Dialyse

U. Rehmert, K. Wicher, W. Ruge und J. Bahlmann

Zentrum Innere Medizin und Dermatologie, Medizinische Hochschule Hannover (Geschäftsführender Direktor Prof. Dr. F. Hartmann)

Zusammenfassung:

Es wird eine enzymatische Bestimmung der Oxalsäurekonzentration im Plasma mittels Oxalat-Oxidase (E.C. 1.2.3.4.), basierend auf der Methode von Sugiura et al. (1), beschrieben. Sie zeichnet sich durch eine hohe Spezifität, große Empfindlichkeit und Genauigkeit sowie durch einfache und schnelle Handhabung aus. Die mögliche Neubildung von Oxalsäure aus Glyoxylsäure nach der Blutentnahme wird durch den Zusatz von Inhibitoren verhindert. Die Oxalsäurekonzentration im Plasma liegt bei 15 stoffwechselgesunden Probanden im Bereich von 0,08 bis 0,25 mg/dl (7,0–22,0 µmol/l) und bei 25 Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz zwischen 0,39 und 1,36 mg/dl (34,5–120,4 µmol/l). Nach Dialyse ist die Oxalsäurekonzentration auf den Medianwert von $\bar{x} = 56,3\%$ der Konzentration vor Dialyse gesunken. Die endogene Kreatinin-Clearance der niereninsuffizienten Patienten zeigt einen stärkeren Abfall als die Oxalsäure-Clearance.

Schlüsselwörter:

Oxalat-Oxidase – Oxalose – Oxalsäure – Oxalsäure-Clearance – terminale Niereninsuffizienz

Summary:

A method for the determination of human plasma oxalate concentration with oxalate oxidase (E.C. 1.2.3.4.), based on the method by Sugiura (1), is described. It shows a high specificity, sensitivity, exactness and a quick and simple handling. The possible conversion of glyoxalate to oxalate in whole blood is prevented by addition of inhibitors. The plasma oxalate concentration of 15 normal subjects is found to be 0.08–0.25 mg/dl (7.0–22.0 µmol/l), that of 25 patients with chronic renal failure in the range from 0.39–1.36 mg/dl (34.5–120.4 µmol/l). After dialysing the oxalate concentration falls to $\bar{x} = 56.3\%$ of the concentration before dialysing. The creatinin clearance of those patients with chronic renal failure shows a higher decrease than the oxalate clearance.

Keywords:

Oxalate oxidase – oxalose – oxalic acid – oxalate clearance – chronic renal failure

Einleitung

Die Messung der Oxalsäurekonzentration im Blut ist für die Erkennung einer primären Hyperoxalurie im Stadium einer terminalen Niereninsuffizienz von entscheidender Bedeutung. Aber auch bei Niereninsuffizienzen anderer Ätiologie läßt sich aus der Höhe des Plasmaoxalatspiegels möglicherweise das Risiko für das Auftreten von Oxalatniederschlägen in Organen

ablesen. Zusätzliche Informationen kann die Bestimmung bei den verschiedenen Formen der sekundären Hyperoxalurie und bei Oxalatsteinbildnern liefern. Während für die Messung der Oxalsäurekonzentration im Urin reproduzierbare, einfache Verfahren zur Verfügung stehen (2–4), bemüht man sich um eine allgemein durchführbare und spezifische Methode für die klinische Routinediagnostik zur Bestimmung der Oxalsäurekonzentration im Plasma.

Methodik

Probanden

Es wird die Oxalsäure- und Kreatininkonzentration im Plasma und Urin bei 15 stoffwechselgesunden Probanden unterschiedlichen Alters ohne Diätrestriktion sowie bei 25 Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz untersucht. Die Patienten sind 1 bis 8 Jahre in regelmäßiger Hämodialysebehandlung. Der Altersbereich liegt zwischen 24 und 70 Jahren, das Körpergewicht beträgt zwischen 53 und 80 kg. Die Hämodialyse wird über 5 Std. mit einem mittleren Blutdurchfluß von 300 ml/min und einem Dialysatfluß von 600 ml/min unter Einsatz von Dialysatoren mit 1,3 m² Cuprophanmembran durchgeführt. Bei 17 Patienten werden die Messungen vor Beginn und nach Beendigung der Dialyse, bei 8 Patienten nur vor der Dialyse vorgenommen. 10 der 25 Patienten weisen eine Resturinausscheidung auf, während die übrigen anurisch sind.

Material

2 - Hydrazono - 2,3 - dihydro - 3 - methylbenzothiazolhydrochlorid zur Analyse (MBTH), Merck Art. 4527; Peroxidase Typ II (POD), Sigma No. P 8250; N,N-Dimethylanilin zur Synthese (DMA), Merck-Schuchardt Art. 803060; Oxalat-Oxidase aus Gerstenkeimlingen, Boehringer, Mannheim, Best.-Nr. 567698; Oxalsäure suprapur, Merck Art. 489; Borsäure zur Analyse; Allopurinol, Sigma No. A 8003; DL- β -Phenylmilchsäure, Sigma P 7251; Kreatinin UV-Test enzymatisch, Boehringer, Best.-Nr. 166413; Natr. citric neutr. (Erg. B. 6); 3,8 g in Aqua bidest. ad 100 ml, Braun-Melsungen, Best.-Nr. 88407-A.

Durchführung

Die bei *Sugiura* (1) angegebenen Konzentrationen der Peroxidase und der Oxalat-Oxidase reichen nicht aus, um eine lineare Beziehung zwischen Oxalsäurekonzentration und Extinktion zu ergeben. Das Verfahren nach *Sugiura* wird in folgender Weise modifiziert:

– Versetzen des Probanden- bzw. Patientenblutes im Verhältnis 1:4 mit Natriumzitat und anschließendes Zentrifugieren.

– Doppelte Konzentrationen der Peroxidase und der Oxalat-Oxidase.

– Bernsteinsäure-Puffer nach *Gomori* (5): 25 ml einer 0,2 mol/l Bernsteinsäure (23,62 g/l) werden mit 0,2 mol/l NaOH auf pH-Wert 3,5 eingestellt und mit quartzdest. Wasser auf 100 ml aufgefüllt.

– Zusatz einer Inhibitorlösung (71,9 mmol = 4,44 g Borsäure; 1,76 mmol = 240 mg Allopurinol; 27,1 mmol = 4,5 g DL- β -Phenylmilchsäure in 100 ml Wasser gelöst und auf pH 7,4 eingestellt) zum Blut.

– Messung der Extinktion bei 578 nm.

In einer Spritze werden 0,4 ml Natriumzitat-Lösung aufgezogen, mit Patientenblut auf 2 ml aufgefüllt und sofort mit 0,2 ml Inhibitor-Lösung versetzt. Nach 3minütigem Zentrifugieren bei 1000 $\times$ g wird das Plasma abgehoben und kühl gelagert (4–8°C). Als Reagenzgemisch werden 125 μ l DMA, 5 mg MBTH und 200 U POD in 100 ml des Puffers gelöst. 2,4 ml des Reagenzgemisches werden 50 μ l des Zitratplasmas zugefügt und für 3 min bei 37°C vorinkubiert. Danach werden 50 μ l der Oxalat-Oxidase-Lsg. (0,56 U/ml) zugefügt und für weitere 30 min bei gleicher Temperatur inkubiert und anschließend im Eisbad gekühlt. Die Messung der Extinktion erfolgt mit einem Eppendorf-Photometer (Typ 1100 M) bei 578 nm und einer Schichtdicke von 2 cm. Zur Bestimmung der Wiederfindung werden 7 μ g wasserfreie Oxalsäure pro ml Zitratplasma zugesetzt.

Die Bestimmung der Oxalsäurekonzentration im Urin erfolgt photometrisch mit Chromotropsäure nach einem Verfahren von Hodgkinson und Williams (4).

Die Kreatininkonzentrationen im Plasma sowie im Urin werden mit einem Kreatinin-UV-Test gemessen.

Ergebnisse

Linearität

Die Extinktion bei 578 nm verläuft linear zur Oxalsäurekonzentration im Bereich von 0–3,5 mg/dl. Ab 3,5 mg/dl nimmt die Extinktion im Verhältnis zur Konzentration leicht ab. Die klinisch relevanten Werte liegen im linearen Bereich der Funktionsverlaufskurve (Abb. 1).

Extinktion
(578 nm)

Abb. 1: Abhängigkeit der Extinktion von der Oxalsäurekonzentration (mg/dl)

mg/dl

Abb. 2: Zeitliche Abhängigkeit der Oxalsäurekonzentration mit und ohne Inhibitoren

Wiederfindung

Die Wiederfindung dem Plasma zugesetzter Oxalsäure beträgt $98,9 \pm 6,95\%$ ($\bar{x} \pm S_x$; $n = 40$).

Reproduzierbarkeit der Messungen

Zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit der Messungen wird das Zitratplasma eines Patienten 10mal gemessen. Der Variationskoeffizient in Serie beträgt $VK_s = 2,77\%$.

Einfluß von Inhibitoren

Es wird die Oxalsäurekonzentration eines Zitratplasmas ohne Inhibitoren am 1., 2., 3., 5. und 7. Tag nach Blutentnahme gemessen (Abb. 2).

Die Oxalsäurekonzentration steigt im Plasma ohne Inhibitoren im Laufe der Zeit an, erreicht am 7. Tag etwa den dreifachen Ausgangswert, um sich dann anscheinend einem Höchstwert asymptotisch zu nähern. Dagegen bleibt die Konzentration im Plasma mit Inhibitoren im Rahmen der Meßgenauigkeit konstant.

Normbereich

Die Meßergebnisse von 15 stoffwechselgesunden Probanden ohne Diätrestriktionen zeigt Tab. 1.

Niereninsuffizienz

Die Werte der Oxalsäurekonzentration bei 25 Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz sind in Tab. 2 dargestellt. Der Medianwert liegt 5,5mal so hoch wie derjenige des Normal-kollektivs (Abb. 3).

Bei 17 dieser 25 Patienten wird der Plasmaoxalsäurespiegel vor und nach Dialyse gemessen (Tab. 2 und Abb. 4). Durch die Dialyse kommt es zu einem Abfall auf 56,3% des prädialytischen Wertes.

Tab. 1: Meßergebnisse bei stoffwechselgesunden Probanden

	n	Minimum	1 S	Median	3 S	Maximum
Oxalsäurekonzentration im Plasma [mg/dl]	15	0,08	0,11	0,18	0,21	0,25
Oxalsäureausscheidung im Urin [mg/24 Std.]	15	27,4	33,8	42,3	50,8	61,0
Oxalsäure-Clearance [ml/min]	15	8,9	15,5	18,9	25,0	37,9
Kreatinin-Clearance [ml/min]	15	93,8	104,7	116,4	123,0	144,0
Oxalsäure-Clearance/Kreatinin-Clearance	15	0,09	0,12	0,15	0,23	0,33

Tab. 2: Meßergebnisse bei niereninsuffizienten Patienten

	n	Minimum	1 S	Median	3 S	Maximum
Oxalsäurekonzentration im Plasma vor Dialyse [mg/dl]	25	0,39	0,75	0,98	1,28	1,36
Oxalsäurekonzentration im Plasma vor Dialyse [mg/dl]	17	0,75	0,96	1,21	1,29	1,36
Oxalsäurekonzentration im Plasma nach Dialyse [mg/dl]	17	0,40	0,61	0,67	0,69	0,94
Abfall der Plasmakonzentration durch Dialyse auf [%]	17	43,9	52,7	56,3	63,4	85,1

Tab. 3: Meßergebnisse bei niereninsuffizienten Patienten mit Restharnausscheidung

	n	Minimum	1 S	Median	3 S	Maximum
Oxalsäureausscheidung im Urin [mg/24 Std.]	10	1,1	10,4	17,3	28,5	38,1
Oxalsäure-Clearance [ml/min]	10	0,06	0,86	1,68	1,96	3,78
Kreatinin-Clearance [ml/min]	10	0,05	0,83	0,91	1,45	3,54
Oxalsäure-Clearance/Kreatinin-Clearance	10	0,42	1,10	1,42	2,33	2,61

Abb. 3: Oxalsäure-Konzentration im Plasma, Oxalsäure-Clearance und Oxalsäure-Ausscheidung im Urin bei I stoffwechselgesunden Probanden ($n = 15$), II Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz ($n = 25$ bei Plasmakonzentration, $n = 10$ bei Clearance und Urin-Ausscheidung) und III einer Patientin mit Oxalat-Niederschlägen in Organen ($n = 1$). Dargestellt sind Medianwert, Minimum und Maximum

Der Medianwert der Oxalsäure-Clearance beträgt bei den 10 Patienten mit Restharnausscheidung bei terminaler Niereninsuffizienz 1,68 ml/min (Tab. 3) und ist damit auf 8,9% des Wertes bei Gesunden abgefallen (Abb. 3). Der Medianwert der Kreatinin-Clearance beträgt bei diesen Patienten 0,91 ml/min. Das Verhältnis der Oxalsäure-Clearance zur Kreatinin-Clearance liegt bei den niereninsuffizienten Patienten zwischen 0,42 und 2,61 ($\bar{x} = 1,42$) (Tab. 3), während es bei dem stoffwechselgesunden Kollektiv 0,09–0,33 ($\bar{x} = 0,15$) beträgt (Tab. 1).

Abb. 4: Oxalsäure-Konzentration im Plasma bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz ($n = 17$) vor und nach Dialyse. Dargestellt sind Medianwert, Minimum und Maximum

Oxalose

Bei zwei Patienten mit nachgewiesenen Oxalatniederschlägen in Geweben betragen die Oxalsäurekonzentrationen im Plasma 2,65 mg/dl und 1,37 mg/dl. Die letztere Patientin scheidet 323,7 mg Oxalsäure/24 Std. aus (Abb. 3).

Diskussion

Die von uns gemessenen Oxalsäurekonzentrationen im Plasma stimmen mit den Meßergebnissen überein, die andere Untersucher mit technisch und zeitlich aufwendigeren Methoden finden: *Bennett* (8) mit einer Isotopenverdünnungsmethode (0,046–0,141 mg/dl im Plasma), *Hatch* (9) enzymatisch mit Formiat-Dehydrogenase (0,07–0,19 mg/dl im Serum), *Kruegers Dagheaux* (10) kolorimetrisch mit Chromotropensäure (0,117–0,250 mg/dl im Plasma) sowie *Kohlbecker* und *Butz* (11) mit Oxalat-Oxidase in einer Katalase-Reaktion (0,15–0,40 mg/dl im Serum).

Bei der Bestimmung der Oxalsäurekonzentration im Plasma muß berücksichtigt werden, daß sich sofort nach der Blutentnahme die Konzentration durch Neubildung aus dem Präkursor Glyoxylsäure erhöhen kann (6), was *Akca* (7) hat nachweisen können. Daher können sich zu hohe Konzentrationen ergeben. Die Reaktion Glyoxylsäure $\rightarrow$ Oxalsäure wird durch die Enzyme Xanthin-Oxidase, Glykolat-Oxidase und Laktat-Dehydrogenase katalysiert (6), die wiederum durch Allopurinol, Phenylmilchsäure und Borsäure gehemmt werden können (7). Ohne Inhibitoren dieser Reaktion steigt die Oxalsäurekonzentration in 7 Tagen auf etwa den dreifachen Ausgangswert an (Abb. 2). Anschließend scheint sich die Konzentration nicht mehr entscheidend zu erhöhen, was damit zu erklären ist, daß Oxalsäure selbst wiederum Glykolat-Oxidase und Laktat-Dehydrogenase hemmt. So ist es bei Zusatz der Inhibitoren nicht mehr erforderlich, die Proben sofort zu untersuchen. Dadurch wird die klinische Praktikabilität erhöht.

Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz weisen gegenüber Gesunden signifikante Erhöhungen der Oxalsäurekonzentration im Plasma auf. Neben der Niereninsuffizienz ist hierfür möglicherweise auch eine durch die Urämie gesteigerte Syntheserate aus Präkursoren verantwortlich. Ebenso wie *Leber* (13) mit einem isotachophoretischen Verfahren zur Bestimmung der Oxalsäurekonzentration finden auch wir postdialytisch eine Erniedrigung der Konzentration auf 56%. Daraus ergibt sich, daß Oxalsäure als kleinmolekulare Substanz dialysierbar ist.

Der bei terminaler Niereninsuffizienz gegenüber der Kreatinin-Clearance deutlich geringere Abfall der Oxalsäure-Clearance ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß Oxalsäure nicht nur glomerulär filtriert wird, sondern entweder durch passive Ionendiffusion (14) oder durch Sekretion im proximalen Tubulus, wie *Weinman* (15) durch Mikropunktion an Ratten nachweist, ausgeschieden wird. Die höchsten Plasmakonzentrationen der Oxalsäure finden wir bei zwei Patienten mit primärer Hyperoxalurie. Bestimmungen der Oxalsäure im Plasma können somit bei Verdacht auf Oxalose, insbesondere wenn die Oxalatausscheidung in Folge der fortschreitenden Niereninsuffizienz in den Normbereich abfällt, zur Sicherung der Diagnose herangezogen werden.

Schrifttum

1. SUGIURA, M. et al.: Enzymic determination of serum oxalate. *Clin. Chim. Acta* 105, 393–399 (1980).
2. ARCHER, H. E., DORMER, A. E., SCOVEN, E. F., WATTS, R. W. E.: Studies on the urinary excretion of oxalate by normal subjects. *Clin. Sci. (London)* 16, 405–411 (1957).
3. HAUSMAN, E. R., MCANALLY, J. S., LEWIS, G. T.: Determination of oxalate in urine. *Clin. Chem. (New York)* 2, 439–444 (1956).
4. HODGKINSON, A., WILLIAMS, A.: An improved colorimetric procedure for urine oxalate. *Clin. Chim. Acta (Amsterdam)* 36, 127–132 (1972).
5. GOMORI, G., COLDWICK, K. and KAPLAN: *Methods in Enzymology*. (New York) Bd. I, 138 (1955).
6. HODGKINSON, A.: Oxalic Acid in Biology and Medicine, Academic Press London, 126 (1977).
7. AKCAY, T., ROSE, G. A.: The real and apparent plasma oxalate. *Clin. Chim. Acta* 101, 305–311 (1980).
8. BENNETT, D. J. et al.: A radioenzymatic isotope-dilution assay for oxalate in serum or plasma. *Clin. Chem.* 25/10, 1810–1813 (1979).
9. HATCH, M., BOURKE, E., COSTELLO, J.: New enzymatic method for serum oxalate determination. *Clin. Chem.* 23/1, 76–78 (1977).
10. KRUEGERS DAGHEAUX, P. G., L. C. et al.: Oxalic acid determination in plasma. *Clin. Chim. Acta* 71, 319–325 (1976).
11. KOHLBECKER, G., BUTZ, M.: Direct spectrophotometric determination of serum and urinary oxalate with oxalate oxidase. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* Vol. 19, 1103–1106 (1981).
12. ZAREMBSKI, P. M., HODGKINSON, A.: The renal clearance of oxalic acid in normal subjects and in patients with primary hyperoxaluria. *Investigative Urology* 1, 87–93 (1963).
13. LEHR, H. W., MÜNZEL, U., RAWER, P. et al.: Oxalsäurestoffwechsel bei chronischer Urämie: Untersuchungen über das Verhalten der Oxalsäure im Plasma von Dialysepatienten. *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin*, 87. Kongreß, 717–722 (1981).
14. HAUTMANN, R., OSSWALD, H.: Pharmacokinetic studies of oxalate in man. *Invest. Urol.* 16, 395–398 (1978).
15. WEINMAN, E. J., FRANKFURT, S. J., INCE, A., SANSOM, S.: Renal tubular transport of organic acids. Studies with oxalate and para-aminopropionate in the rat. *J. Clin. Invest.* 61, 801–806 (1978).

Für die Verfasser:

Prof. Dr. W. Ruge
Medizinische Klinik im Krankenhaus Oststadt
der Medizinischen Hochschule Hannover
Podbielskistraße 380
D-3000 Hannover 51