

Universitätsklinikum Ulm
Klinik für Urologie und Kinderurologie
Leiter: Prof. Dr. med. Dr. med. h.c. R. Hautmann

**Abhängigkeit der renalen Oxalatexkretion vom Säure- Basen-
Gleichgewicht
-eine Grundlagenstudie am Rattenmodell-**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der Medizinischen
Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von

Wolfgang Michael Emanuel Meilinger

Böblingen

2007

Amtierender Dekan: Prof. Dr. med. K.-M. Debatin

1. Berichterstatter: PD Dr. med. R. Bachor

2. Berichtersatter: Prof. Dr. med. E. Calzia

Tag der Promotion: 18. Juli 2008

Inhaltsverzeichnis	Seite
Abkürzungsverzeichnis	4
1. Einleitung	5
1.1 Historischer und epidemiologischer Überblick	5
1.2 Pathogenese und Voraussetzung der Steinbildung	9
1.2.1 Übersättigung des Urins	9
1.2.2 Risikofaktoren der Calciumoxalat- Urolithiasis	10
1.2.3 Oxalat- physiologische Grundlagen	11
1.3 Steuerung der Oxalatausscheidung im Clearanceversuch	13
1.4 Problemstellung und Ziele der Studie	13
2. Material und Methoden	15
2.1 Renale Clearance- Versuche am Gesamttier	15
2.2 Clearanceberechnungen und Statistik	20
3. Ergebnisse- Darstellung der eigenen Untersuchungen	21
3.1 Untersuchungen zur Clearankestabilität	21
3.2 Untersuchungsparameter	22
3.2.1 Urin- pH	22
3.2.2 Fraktionelle Oxalatclearance (FeOx)	23
3.2.3 Nettooxalatexkretion (OxEx)	25
3.3 Betrachtungen von CHANGE FROM BASELINE und Korrelationen der untersuchten Parameter	27
4. Diskussion der Ergebnisse und Methoden	31
4.1 Calciumoxalat- Urolithiasis: ein Rezidivproblem	31
4.2 Volkswirtschaftliche Aspekte	31
4.3 Paradigmenwechsel von Calcium nach Oxalat	33
4.4 Risikofaktor „milde Hyperoxalurie“- pathologischer Oxalattransport	34

4.5 Ulmer Modell: Oxalatexkretion der proximalen Tubuluszelle	37
4.6 Renale Säureexkretionsmechanismen im proximalen Tubulus	39
4.7 Neue Diätkonzepte: Wechsel von Calcium zu Oxalat	41
4.8 Bedeutung der Gesamttierergebnisse	43
4.9 Schlussfolgerung	44
5. Zusammenfassung	45
6. Literaturverzeichnis	47
7. Danksagung	54

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AE1	Anionen Membrantransportprotein 1
CaOx	Calciumoxalat
CfB	Change from Baseline
ESWL	Extrakorporale Stoßwellenlithotripsie
FeOx	Fraktionelle Oxalatclearance
g	Gramm
h	Stunde/n
l	Liter
MED	Median
mg	Milligramm
min.	Minuten
mg	Milligramm
MW	Mittelwert
NHE	Natrium- Wasserstoffionen Exchanger
Nr.	Nummer
OxEx	Oxalatekretion
SEM	Standard Error of the Mean (Standardfehler)
µl	Mikroliter
pH	pH- Wert
R	Korrelationskoeffizient

1 Einleitung

1.1 Historischer und epidemiologischer Überblick

Harnsteine begleiten den Menschen seit mindestens 9000 Jahren. Früheste Zeugnisse werden auf das alte Ägypten um 7000 bis 3100 vor Christus zurückdatiert. Sir G.E. Smith fand 1901 bei El Amrah in Oberägypten unter den Beckenknochen eines jungen Mannes einen Mischstein aus Harnsäure, Calciumoxalat und Magnesiumphosphat. Auch in klassischen chinesischen Schriften, ‚Pen Tsao‘ und ‚Nei Ching‘ (ca. 3000 bis 2000 vor Christus) werden Harnsteinerkrankungen beschrieben und mit Magnesiumsilikat und trisulus terrestris behandelt [66].

Anton von Heyde machte sich erstmals 1684 Gedanken über die physikalisch-chemischen Grundlagen der Harnsteinbildung. Er schrieb damals, daß bestimmte kristalline Elemente eines Harnsteins herausgelöst werden können, ohne die gesamte Struktur zu zerstören. Scheele fand 1780 in frühen chemischen Studien Harnsäure in Blasensteinen; bereits um 1820 war die Zusammensetzung der Kristalle recht gut verstanden [66]. Genauere Zusammenhänge brachten erst 1950 lichtmikroskopische und 1970 elektronenmikroskopische Untersuchungen [60].

Noch im vorigen Jahrhundert waren über 90 % der Harnsteine Blasensteine, die zum großen Teil aus Harnsäure oder Phosphaten bestanden. Veränderte Lebensgewohnheiten (vor allem in Bezug auf Ernährung und Hygiene) haben in den industrialisierten Ländern einen Wandel hinsichtlich der Steinlokalisationen hervorgerufen. Für Deutschland und Europa gilt heute allgemein, dass 97% aller Harnsteine bei Diagnosestellung in der Niere und im Harnleiter lokalisiert sind und nur 3% in der Blase oder Harnröhre [25].

Führt man die asservierten Konkremente der Analyse zu, so findet man mit Abstand am häufigsten Calciumoxalat. LEUSMANN (1990) wies für die alten Bundesländer einen Anteil 72,5 % und BERG (1992) für die neuen Bundesländer 72,9 % Calciumoxalat nach. Calciumphosphat wird in 10- 15 % aller Harnsteine gefunden. Struvitsteine machen 10%, Harnsäuresteine 10 –15 % und Steine anderer lithogener Substanzen z.B. Zystin mit 1-3 % aus. Weitere Zusammensetzungen sind Raritäten [16;59].

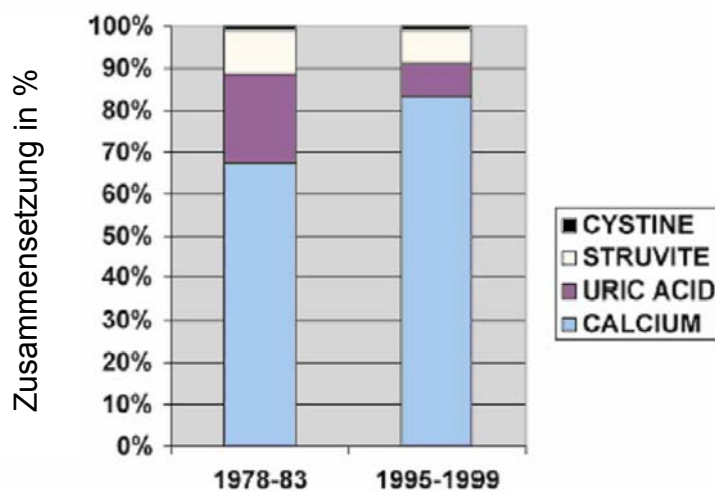


Abb. 1: Verteilung der chemischen Zusammensetzung für Nierensteine im zeitlichen Verlauf und Zunahme von Calciumoxalat (nach LEUSMANN und MICHELS 2000)

Calciumoxalat kommt in Harnsteinen in zwei Kristallformen, als Calciumoxalatmonohydrat (Whewellit) oder Calciumoxalatdihydrat (Wedellit) vor. Für die Bildung von Wedellit ist meist eine ausgeprägte Hyperkalziurie verantwortlich, während Whewellit bevorzugt durch Hyperoxalurie und Hyperurikosurie begünstigt wird. Wedellit- Steine können sich in vivo in Whewellit- Steine umwandeln, indem sie 1 mol Kristallwasser abspalten [90].

Aus epidemiologischer Sicht muß das Harnsteinleiden als Volkskrankheit - vergleichbar dem Diabetes mellitus Typ II - betrachtet werden. Wie Tabelle 1 zeigt ist es innerhalb der letzten 10 Jahre zu einer Verdreifachung der Erkrankungsinzidenz gekommen.

Tabelle 1: Entwicklung der Prävalenz und Inzidenz des Harnsteinleidens in Deutschland (INFAS – Studien 1979, 1984, 2000).

Jahr	Prävalenz	Inzidenz
1979	4%	0,54%
1984	4%	0,4%
2000	4,7%	1,47%

Rund fünf Prozent der Deutschen sind vom Harnsteinleiden betroffen. Nach Tschöpe steigt die Inzidenz bei über 50 jährigen Frauen auf 16,6%, bei über 50 jährigen Männern auf 20,6% [46;88]. Bei Kindern sind Steinepisoden selten [25]. Abbildung 2 zeigt die Prävalenz westlicher Staaten bezogen auf Alter und Geschlecht:

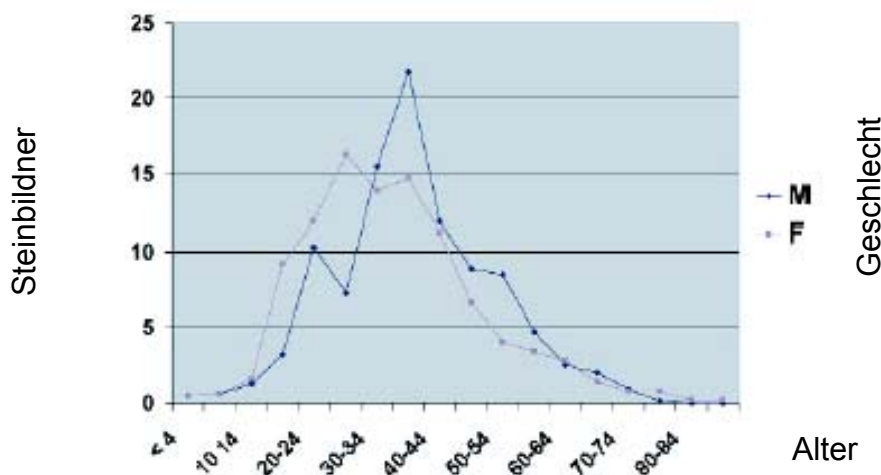


Abb. 2: Verteilung der Calciumoxalat-Steinbildner auf Alter und Geschlecht (Internationale Verteilung nach ROBERTSON [67])

Dem steht gegenüber, dass im letzten Viertel des 20. Jahrhunderts beachtliche Fortschritte für die Behandlung von Harnsteinen erzielt wurden. Vor allem ESWL (Extracorporale Stoßwellen Lithotripsie), aber auch PNL (Percutane Nephrolitolapaxie) und URS (Ureterorenoskopische Lithotripsie) konnten die Morbidität des Harnsteinleidens senken und machten die Schnittoperationen zur Rarität. Mittlerweile werden nahezu 99% aller Nierensteine mittels ESWL und interventionellen Maßnahmen wie der Ureterorenoskopie behandelt, die Indikation zur Schnittoperation wird hauptsächlich bei primären oder sekundären Fehlbildungen der ableitenden Harnwege gestellt und machen 1-2% aller Eingriffe aus [76].

Dennoch weist das Harnsteinleiden nach wie vor eine hohe Rezidivquote auf: bei 3/5 aller Steinepisoden handelt es sich um Rezidive; nach dem ersten Steinereignis besteht eine bis zu 50 - 100% Wahrscheinlichkeit einer erneuten Steinbildung, sofern keine konsequente Rezidivprophylaxe betrieben wird [76;77]. Präventive Maßnahmen und spezielle Diäten können das Rezidiv-Risiko auf immerhin 10-15% senken [33;55;64]. Sie stoßen jedoch auf wenig „Gegenliebe“ bei den Steinpatienten und bleiben demzufolge meist ineffektiv; vor allem dann, wenn das letzte Kolikereignis länger zurückliegt [46].

Moderne nierenphysiologische Untersuchungstechniken ermöglichten die Klärung zellulärer Transportprozesse im proximalen Tubulus. Das Verständnis der intrarenalen Prozesse und damit die gezielte Beeinflussung renaler Transportmechanismen könnte der Schlüssel zur effektiven Harnsteinmetaphylaxe sein.

1.2 Pathogenese und Voraussetzung der Steinbildung

1.2.1 Übersättigung des Urins

Die Harnsteinbildung setzt einen mit lithogenen Substanzen übersättigten Urin voraus. Die Kristallisation ist ein thermodynamischer Prozeß, für den die Konzentration der lithogenen und inhibitorischen Substanzen maßgeblich ist. Man geht davon aus, daß Epithelzellen, Urothelläsionen oder andere Kristalle die Nukleation induzieren können, einzelne Kristalle sukzessiv zu größeren Kristallformationen und schließlich zu Harnsteinen aggregieren. Während sich dieses homogene Prinzip auf Harnsäure- und Zystinsteine anwenden läßt, liegt bei den Calciumoxalatsteinen eine heterogene Nukleation vor [33;93].

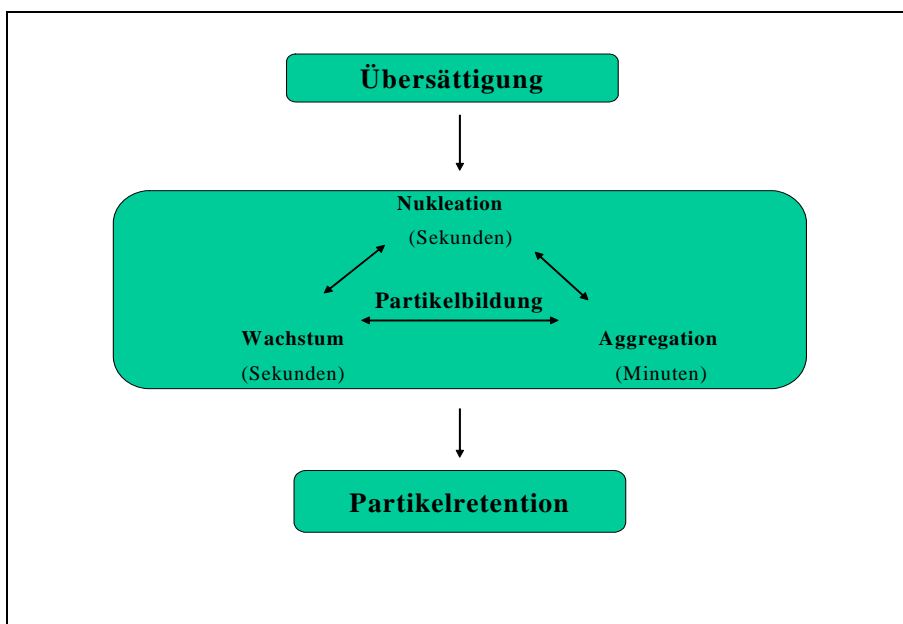


Abb. 3: Urinübersättigung, Partikelbildung und Partikelretention als Teilschritte der Nierensteinentstehung (nach BRAENDLE 2000).

Dieses einfache Modell läßt sich vor allem auf Infekt-, Zystin- und Harnsäuresteine anwenden [33]. Anders bei Calciumoxalat-Steinbildnern, für diese wird ein Risikofaktoren-Modell favorisiert [25].

1.2.2 Risikofaktoren der Calciumoxalat- Urolithiasis

Als Risikofaktoren sind erhöhte Konzentrationen von Calcium und Oxalat, ein vermindertes Harnvolumen und ein Urin- pH im alkalischen Bereich von Bedeutung. Diese führen direkt zu einer Übersättigung des Urins mit Calciumoxalat.

Komplexchemische Berechnungen sowie experimentelle und klinische Untersuchungen konnten nachweisen, daß die relative Übersättigung von Calciumoxalat und damit das Steinbildungsrisiko durch eine geringe Steigerung der Oxalsäure-Konzentration wesentlich stärker beeinflusst wird, als eine äquimolare Erhöhung der Calcium- Konzentration[2;11]. Während Calciumionen im Urin im Überschuß vorliegen (Verhältnis Calcium : Oxalat > 5 : 1),

erfolgt die Kristallisation stöchiometrisch im Verhältnis 1:1. Dies bedeutet, daß Oxalat der limitierende Faktor der Calciumoxalatkristallisation im Urin ist.

Neben der Übersättigung des Urins spielt ein Mangel an Inhibitoren - das sind nieder- und hochmolekulare Substanzen im Urin, die der Kristallisation entgegenwirken - eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Calciumoxalatsteinen. Die makromolekularen Inhibitoren bestehen zu 80 - 90% aus sauren Mukopolysacchariden, deren Bindung an Kristalloberflächen ein weiteres Kristallwachstum verhindern. Vorhandene Urat- Kristalle absorbieren die sauren Mukopolysaccharide und entziehen sie dem mit Calciumoxalat übersättigtem Urin. Dadurch wird die Hyperurikosurie zu einem weiteren Risikofaktor. Citrat und Magnesium sind die wichtigsten niedermolekularen Inhibitoren.

1.2.3 Oxalat - physiologische Grundlagen

Pharmakokinetik des Oxalats

Der Oxalatverteilungsraum beim erwachsenen Menschen beträgt im Mittel 32,5 l. Damit ist er doppelt so groß wie der Extrazellulärraum. Bei diesem Verteilungsraum handelt es sich um eine fiktive Größe. Oxalat verteilt sich in etwa 70 –80% des Körperwassers. HAUTMANN und OSSWALD entwickelten 1979 ein Oxalatpoolmodell, mit dem sich die Oxalatverfügbarkeit und dessen Elimination beschreiben ließ [44].

Die mittlere Eliminationshalbwertszeit des Oxalats beträgt 90 Minuten. Die Größe des Oxalatpools liegt beim Menschen um ca. 3,5 mg; das heißt, im steady state enthält der Oxalatverteilungsraum 3,5 mg Oxalat. Aus pharmakokinetischen Daten beim Gesunden errechnet sich ein Plasmaoxalatspiegel von ca. 10 µm/100ml Plasma [44;49]. Die Quelle des Oxalatpools bilden endogenes Oxalat, überwiegend aus der Leber und auch ionisiertes Oxalat im Darmlumen, das durch einen passiven Diffusionsprozeß resorbiert wird (der Anteil der intestinalen Oxalatabsorption beträgt neuesten Zahlen zufolge 6- 20 %, [47;50]. Wegen der kleinen Poolgröße ist bei der kurzen Halbwertszeit von 90 Minuten der Turn- over hoch. Die totale Wiederfindung des markierten Oxalats im Urin beträgt 97%, was auf eine ausschließlich renale Elimination des Oxalats hinweist.

Dieses Oxalatpoolmodell bildet die nierenphysiologische Grundlage für die vorliegenden Untersuchungen.

Renale Eliminationsmechanismen / Oxalathandling

Erste befriedigende Aussagen über die renalen Eliminationsmechanismen des Oxalats konnten mit Hilfe der Mikropunktionstechnik gemacht werden. In jeweils drei unabhängigen Studien konnten GREGER, HAUTMANN und OSSWALD sowie WEINMAN nachweisen, dass die Oxalatclearance stets über der Inulinclearance liegt, das heißt, das zusätzlich zur glomerulären Filtration ein weiterer Ausscheidungsmechanismus bestehen muss [36-38;43;62;95;96].

Dieser wurde im proximalen Nierentubulus vermutet, wenngleich andere Nephronabschnitte nicht ausgeschlossen werden konnten.

Ulmer Oxalattransport-Modell

Ebendiesen Transportprozeß, seine Lokalisation und die Antriebsmechanismen konnte die Ulmer Gruppe um BRAENDLE und STRAUB in noch aufwendigeren Mikropunktionsversuchen klären. Folgende Abbildung zeigt eine schematische Darstellung der Prozesse, auf die genauen Mechanismen und die Bedeutung für vorliegenden Versuch wird im Diskussionsteil eingegangen.

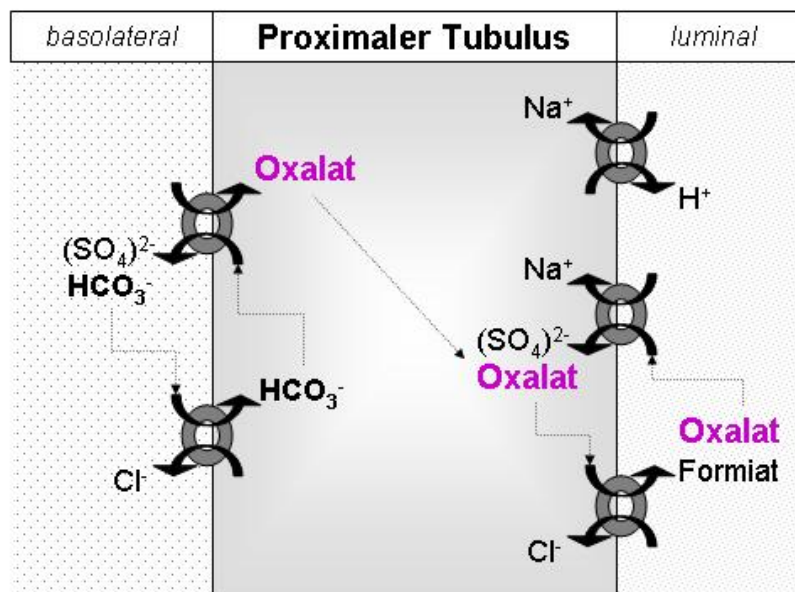


Abb. 4: Ulmer Modell des transzellulären Oxalattransports [19]

1.3 Steuerung der Oxalatausscheidung im Clearanceversuch

Der tubuläre Oxalattransport ist Carriervermittelt. Oxalat wird in der Niere frei glomerulär filtriert und tubulär sezerniert [33;45;72].

Mikropunktionsuntersuchungen im Bereich des proximalen Tubulus lassen mehrere oxalatabhängige transzelluläre Transportprozesse vermuten [33;45;94]:

1. Ox/ SO₄ (HCO₃) - Transporter
2. Ox (Fo)/ Cl - Transporter
3. Na⁺ -SO₄ – (Ox) - Transporter
4. Ox/OH⁻ und OH⁻ / CL⁻ - Transporter [4-6;19]

Über den zellulären Mechanismus der Oxalat- Sekretion im Bereich des proximalen Tubulus liegen bisher nur die wenigen oben genannten, zum Teil widersprüchlichen Ansätze vor.

Neue, schlüssige Ergebnisse konnte die Ulmer Arbeitsgruppe um BRAENDLE und STRAUB vorweisen, die Transportprozesse an der basolateralen und luminalen Membran unterscheiden konnte. Auf dem daraus erstellten Oxalattransportmodell baut die hier dargestellte Untersuchung auf und konnte diese isolierten Ergebnisse in vivo belegen [19].

1.4 Problemstellung und Ziele der Studie

Aus empirischen Untersuchungen an Calciumoxalat- Steinpatienten kann ein Zusammenhang zwischen dem Säure-Basen-Haushalt und Oxalatausscheidung der Niere vermutet werden. Allerdings sind die Untersuchungsbedingungen im Menschen sehr komplex und damit nicht geeignet, einen solchen Zusammenhang direkt zu klären [48;54;62;80]. Zur Bestimmung von Risikogruppen wurden Tests entwickelt, mit denen Parameter wie Calcium und Oxalat im Urin bestimmt werden, jedoch sind die genauen Zusammenhänge noch nicht bekannt [58].

Es wurde daher ein Rattenmodell eingesetzt, in dem sich die Einflussfaktoren besser kontrollieren lassen. Lokale Veränderungen in der Niere mit ihrer Wirkung auf das Nephron können so besser studiert werden.

Ziel der Untersuchungen war die Klärung, ob die renale Nettooxalatexkretion durch eine Veränderung des Säure-Basen-Haushaltes beeinflusst wird.

Im einzelnen wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

1. Ableitung einer Oxalatclearance und Fraktionellen Oxalatclearance unter Normalbedingungen und unter akuter Säurebelastung.
2. Veränderung der Oxalatclearance unter leichter Acidose
3. Veränderung der Oxalatclearance unter leichter Alkalose.

2 Material und Methoden

2.1 Renale Clearance- Versuche am Gesamttier

Methoden

Die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche wurden mit der im Harnsteinlabor der Urologischen Klinik standardisierten renalen Clearance-Technik - modifiziert nach Stitzer und Martinez – Maldonado- durchgeführt [75].

Versuchstiere

Für die Clearanceuntersuchungen wurden männliche, 220-250 g schwere Sprague- Dawley- Ratten (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) verwendet. Die Tiere wurden unter LD 12/12 Bedingungen gehalten und erhielten als Nahrung eine Altromin ® - Standarddiät. In Abhängigkeit der Einzelversuche hatten sie freien Zugang zu pH- neutralem oder angesäuertem Trinkwasser.

Genehmigung der Versuche gemäß § 8 Tierschutzgesetz

Für die oben beschriebenen Versuche wurde ein Antrag auf Genehmigung von Versuchsvorhaben gemäß § 8 Abs.1 Tierschutzgesetz beim Regierungspräsidenten Tübingen gestellt und genehmigt (Versuchs- Nr.: 515 und 600, Aktenzeichen 37-9185.81-3). Die Pflege und Betreuung der Tiere erfolgte durch die Tierpfleger der Zentralen Tierversuchsanlage der Universität Ulm (Oberberghof, 89081 Ulm).

Versuchsablauf

Zur Anästhesie wurde 100 mg / kg Körpergewicht Thiopental (Trapanal ® ; Fa. Byk- Gulden, Konstanz) intraperitoneal injiziert. Um einem Lungenödem vorzubeugen, bekamen die Ratten zusätzlich eine einmalige Injektion von 0,005 mg/100 g Ratte Atropin. Das narkotisierte Tier wurde auf einem beheizten Tierversuchs- OP- Tisch gelagert, die Körpertemperatur zwischen 37,5 - 38,5 Grad Celsius konstant gehalten.

Sobald die erforderliche Narkosetiefe erreicht war, erfolgte die Präparation der rechten Vena jugularis, anschließend wurde durch Venotomie ein Venenverweilkatheter eingeführt. Die Harnblase wurde mittels suprapubischer Minilaparotomie freigelegt, so dass ein Blasen Katheter- Polyäthylenschlauch implantiert werden konnte.

Zum Ausgleich der perioperativen Flüssigkeitsverluste wurde über den Jugulariskatheter 0,9 prozentige NaCl- Lösung über 60 Minuten infundiert (1,5 ml/ h „Vorlaufinfusion“) - Equilibrierungsphase.

Für den Clearance- Versuch wurden den Ratten mittels Perfusor (Firma B. Braun, Melsungen) folgendes Infusionsschema appliziert:

- Kontroll-Lösung
- Kontroll-Lösung + Säureload-Lösung
- Kontroll-Lösung + Alkaliload-Lösung

Nach 60-minütiger Equilibrierungsphase schloß sich die Kontrollphase mit zwei bzw. drei Urinsammelperioden (á 20 beziehungsweise á 15 Minuten) an. Jeweils in der Mitte der Urinsammelperioden erfolgten die Blutabnahmen mit je zwei geeichten 100 µl Kapillaren (Fa. Hirschmann Laborgeräte, Deutschland). Das Studiendesign stellte sich wie folgt dar:

Im Säureload-Aufbau:

Narkose → Wiegen → OP → Equilibrierung/ Priming Dose → Kontrollphase

Säure- Equilibrierung → Säurephase

Im Alkaliload- Aufbau:

⇒ Kontrollphase → Basen- Equilibrierung → Basenphase

Versuchslösungen

Die Zusammensetzung der im Versuch verwendeten Lösungen geht aus Tabelle 2 hervor.

Die Kontrolllösung (physiologische Kochsalzlösung) diente zur Referenzbestimmung,

Die Säureloadlösung (pH 3,7), versetzt mit HCl zur Acidifizierung und die Alkaliloadlösung (pH 8,6), versetzt mit NaHCO₃ zur Alkalisierung wurden jeweils mit radioaktiv markiertem ¹⁴C- Oxalat (spezifische Aktivität 103 mCi/ mmol, Amersham International, Buckinghamshire, UK) und ³H- Inulin (spezifische Aktivität 1Ci/ mmol, Amersham International, Buckinghamshire, UK) versetzt; ebenso eine

Primingdose (0,2 ml 0,9% NaCl + 1µl ¹⁴C- Oxalat + 3µl ³H-Inulin), die zu Beginn der ersten radioaktiv markierten Dauerinfusion als Bolus injiziert wurde (siehe *Tabelle 1*).

Tabelle 2: Die unterschiedlichen Infusionslösungen im Überblick.

Infusionslösung	Ausgangslösung	Säure- / Basenload	Radioaktive Markierung
Primingdosis	0,9 % NaCl	kein	15 μCi ^3H - Inulin / ml 5 μCi ^{14}C - Oxalat / ml
Kontrollösung	0,9 % NaCl	kein	3 μCi ^3H - Inulin / 3ml 1 μCi ^{14}C - Oxalat / 3ml
Säureload	0,9 % NaCl	55 μg 1M HCl / ml	3 μCi ^3H - Inulin / 3ml 1 μCi ^{14}C - Oxalat / 3ml
Alkaliload	aqua dest.	0,15 mol NaHCO_3 / l	3 μCi ^3H - Inulin / 3ml 1 μCi ^{14}C - Oxalat / 3ml

Die Größe der Primingdosis sowie die später konstant infundierte Menge an ^{14}C - Oxalat war so berechnet, daß die Serumkonzentration von ^{14}C -Oxalat ca. 0,02 $\mu\text{mol/l}$ betrug. Die Oxalat Serumkonzentration bei Ratten beträgt ungefähr 2 $\mu\text{mol/l}$ [20], so daß man annehmen kann, daß mit dieser Konzentration die Serumkonzentration nicht wesentlich verändert wurde und die Clearanceversuche physiologische Verhältnisse widerspiegeln.

Da die Bestimmung der Inulin- Clearance unabhängig von der Serumkonzentration ist, wurde aus messtechnischen Gründen der Szintillationszählung die ^3H -Inulin- Konzentration so der ^{14}C -Oxalatkonzentration angepaßt, daß das CPM- Verhältnis von ^3H - Inulin zu ^{14}C -Oxalat etwa 3: 1 betrug.

Zur Diskriminierung von sowohl **chronischem** und **akutem Säureload** als auch **Basenload** wurden die Versuchstiere nach dem Schema in Tabelle 2 eingeteilt.

Tabelle 3: Versuchsgruppe und jeweiliger Versuchsaufbau, in Klammern die verstorbenen Tiere

Versuchsgruppe	Versuchstier	Versuchsaufbau
Säureload pH 3,7	13- 34 N = 14 (21)	Säureload chronisch: Tiere nüchtern, Trinkwasser angesäuert Sammelperioden: 3 * 10 Minuten Kontrolle und Säureload
Säureload pH 3,7 neu	35- 59 N = 20 (24)	Säureload chronisch: Tiere nüchtern, Trinkwasser angesäuert Sammelperioden: 2 * 20 Minuten Kontrolle und Säureload
Säureload pH 3,7 aliment	60-75 N = 12 (15)	Säureload chronisch: Tiere alimentiert, Trinkwasser angesäuert Sammelperioden: 2 * 20 Minuten Kontrolle und Säureload
Säure- Alkaliload (I)	76- 80 N = 4 (5)	Säureload akut und Alkaliload akut: Tiere alimentiert, Trinkwasser pH- neutral Sammelperioden: 3 * 15 Minuten Kontrolle, Säureload und Alkaliload
Säure- Alkaliload (II)	81- 94 N = 9 (13)	Säureload akut und Alkaliload akut: Tiere nüchtern, Trinkwasser pH- neutral Sammelperioden: 3 * 15 Minuten Kontrolle, Säureload und Alkaliload; randomisiert

Probengewinnung und Auswertung

Die unter dem Versuch ausgeschiedenen Urinmengen wurden in zuvor gewogenen Eppendorfhütchen aufgefangen.

Über die Differenz zwischen Taragewicht und Urinprobe konnte das Volumen bestimmt werden. Die Messungen erfolgten mit einer analytischen Waage bei einer Präzision von 0,1 mg (Firma Mettler Toledo, Gießen, Deutschland).

Die beiden Kapillarblutproben aus der Schwanzvene wurden nach Versiegelung der Kapillare bei 3000 U/Min zentrifugiert (Heraeus Christ Labofuge), um das Serum von den zellulären Blutbestandteilen zu trennen.

Die anschließende Probenanalyse erfolgte nach folgendem Schema:

1. Die Urinproben wurden pH-metrisch bestimmt, die
2. Hämatokritbestimmung der Blutproben erfolgte über die Flüssigkeitssäulendifferenz in der Glaskapillare.
3. Zur Messung der Radioaktivität wurden jeweils 10µl Serum oder 20µl Urin in 4ml Szintillationscocktail (Packard Ultima Gold, Canberra Packard Company, Frankfurt am Main, Deutschland) gelöst.
4. Die Radioaktivität jeder Probe wurde in einem Packard Szintillationscounter (Tri-Carb 1600 TR, Canberra Packard Company, Frankfurt am Main) über 20 Minuten gemessen.

Clearanceberechnungen und Statistik

Die statistischen Daten wurden mit Hilfe der Statistikprogramme SigmaStat® und SigmaPlot® (Jandel Scientific, USA) berechnet.

Alle Werte sind dargestellt in der Form von **Mittelwert +/- SEM**,

statistisch signifikante Unterschiede wurden mittels **T-Test** (mit Hilfe dieses Tests werden Hypothesen über Erwartungswerte einer oder zweier normalverteilter Grundgesamtheiten getestet) und **Mann-Whitney-Wilcoxon-Test** (dieser Test ist das non-parametrische, ohne Voraussetzung der Normalverteilung, Analogon zum t-Test und testet zwei statistisch unabhängige Gruppen auf Gleichheit der Mediane) untersucht.

Um die Abhängigkeit der fraktionellen Oxalatclearance FeOx und der ¹⁴C-Oxalatekretion vom Urin-pH zu zeigen, wurden **Varianzanalysen** (das Verfahren untersucht, ob sich die Erwartungswerte der metrischen Zufallsvariablen in verschiedenen Gruppen unterscheiden. Mit den Prüfgrößen des Verfahrens wird getestet, ob die Varianz zwischen den Gruppen größer ist als die Varianz innerhalb der Gruppen. Dadurch kann ermittelt werden, ob die Gruppeneinteilung sinnvoll ist oder nicht bzw. ob sich die Gruppen signifikant unterscheiden oder nicht) und **lineare Regressionen** (Ziel ist es, Beziehungen zwischen einer abhängigen und einer oder mehreren unabhängigen Variablen festzustellen) durchgeführt, als statistisch signifikant galten p- Werte von $p < 0,05$.

Die intraindividuelle Veränderung der Oxalatwerte wird durch den Change from Baseline (CfB) beschrieben. CfB = Belastungswert- Kontrollwert.

3 Ergebnis - Darstellung der eigenen Untersuchungen

3.1 Untersuchungen zur Clearancestabilität

Um Aussagen über Unterschiede der Clearanceleistung unter Säure- und Alkalibelastung machen zu können, wurde in jedem einzelnen Tierversuch die Inulinclearance bestimmt. Tabelle 4 zeigt die Inulinclearance ($\mu\text{l}/\text{min}$) in der Kontrollphase und unter Säurebelastung.

Ebenso wurde die Clearancestabilität für Inulin unter Belastung mit Baseninfusion bestimmt, im Vergleich dazu die Kontrollbedingungen.

Der Inulinclearancewert bleibt zwischen Kontrollstichprobe, Säureloadstichprobe und Basenloadstichprobe nahezu konstant und die Clearanceleistung über den gesamten Versuch stabil (Säureload $n = 46$ Versuchstiere, Alkaliload $n = 13$ Versuchstiere).

Tabelle 4: Inulinclearance (angegeben in $\mu\text{l}/\text{min}$) in der Kontrollgruppe und bei mit Säurelösung und mit Alkalilösung infundierten Ratten als Median, Range, Mittelwert und Standard Error Mean

	MED	Range	MW	SEM
Kontrolle	1703,34	4428,82	1961,11	$\pm 147,86$
Säureload	1595,69	4906,15	1863,83	$\pm 159,13$
Alkaliload	1944,68	3070,55	1944,68	$\pm 102,70$

3.2 Untersuchungsparameter

3.2.1 Urin-pH

Der pH- Wert des Urins hat Einfluß auf das Harnsteingesehen. Ein pH- Wert im Urin unter 5,5 begünstigt beispielsweise bereits deutlich die Auskristallisation von Harnsäure, es besteht auch ein Zusammenhang zwischen Urin- pH und fraktioneller Oxalatclearance [21;60].

Sowohl die Infusion von Säurelösung als auch von Alkalilösung zieht Veränderungen im Urin- pH nach sich. Lag der Urin -pH im Kontrollabschnitt bei 6,1 , fiel der Wert unter Säurebelastung auf 5,6 .

Table 5: Urin pH unter Säurebelastung in der Kontrollgruppe und bei mit Säurelösung infundierten Ratten als Median, Range, Mittelwert und Standard Error Mean

	MED	Range	MW	SEM
Kontrolle	6	1,2	6,08	± 0,05
Säureload	5,7	0,7	5,63	± 0,03

Die Deskriptive Beobachtung zeigt einen Abfall der Urin- pH –Werte unter Säurebelastung. Der Abfall ist im MANN-WHITNEY-WILCOXON- Test hoch signifikant ($p < 0,001$).

Unter Infusion von Alkalilösung steigt der pH- Wert um 2,0 im Urin an. Die Differenz wird noch deutlicher als unter Säurebedingungen: pH 7,7; im Vergleich der Wert unter Säurebelastung: 5,7.

Tabelle 6: Urin-pH unter Alkalibelastung in der Kontrollgruppe und bei mit Alkalilösung infundierten Ratten als Median, Range, Mittelwert und Standard Error Mean

	MED	Range	MW	SEM
Kontrolle	5,9	1,4	5,97	± 0,13
Alkaliload	7,9	0,4	7,72	± 0,07

Nach Infusion alkalischer Lösung steigt der pH- Wert im Urin der Versuchstiere. Der t-Test erkennt einen hoch signifikanten Unterschied ($p < 0,001$).

3.2.2 Fraktionelle Oxalatclearance (FeOx)

Untersuchungen zur fraktionellen Oxalatclearance ergaben mit dem t-Test-Verfahren hoch signifikante Unterschiede bei den jeweiligen Versuchsbedingungen; sowohl unter Säurebelastung als auch unter Alkalibelastung ($p < 0,001$). Es liegt also eine Nettooxalatexkretion vor.

Die deskriptive Beobachtung in Tabelle 7 bestätigt den Anstieg der fraktionellen Oxalatclearance.

Tabelle 7: Kontroll- und Säureloadwerte unter Säurebelastung Fraktionelle Oxalatclearance in der Kontrollgruppe und bei mit Säurelösung infundierten Ratten als Median, Range, Mittelwert und Standard Error Mean

	MED	Range	MW	SEM
Kontrolle	1,52	1,32	1,522	± 0,0270
Säureload	1,63	1,91	1,672	± 0,0326

Dieser Trend setzt sich in den Ergebnissen für die Alkalibelastung fort. Wird nun anstatt einer hohen Säurebelastung eine niedrige durch Alkalisierung erzeugt, so hat dies erneut Einfluß auf die FeOx. Liegt der Kontrollwert für die fraktionelle Oxalatclearance bei 1,59, fällt er unter basischer Infusionsbelastung, und zwar auf 1,36.

Tabelle 8 zeigt die deskriptive Statistik für die Werte unter Kontrollbedingungen und unter Alkaliloadbedingungen.

Tabelle 8: Kontroll- und Alkaliloadwerte Fraktionelle Oxalatclearance in der Kontrollgruppe und bei mit Alkalilösung infundierten Ratten als Median, Range, Mittelwert und Standard Error Mean

	MED	Range	MW	SEM
Kontrolle	1,63	0,65	1,60	± 0,04
Alkaliload	1,36	0,49	1,36	± 0,03

3.2.3 Nettoxalatexkretion (OxEx)

Um den Einfluß von Säurebelastung und Alkalibelastung weiter beurteilen zu können, wurden neben der FeOx auch Werte für die Nettoxalatexkretion erhoben. Auch bei diesen Untersuchungen wurden die Ergebnisse bestätigt. Der MANN-WHITNEY-WILCOXON- Test erkennt einen hoch signifikanten Unterschied zwischen den Kontroll- und Säureloaddaten ($p < 0,001$), der t-test erkennt einen hoch signifikanten Unterschied zwischen den Kontroll- und Alkaliloaddaten ($p < 0,001$).

Die Ergebnisse der deskriptiven Statistik sind in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9: Gesamtoalatclearance unter Säurebelastung im in der Kontrollgruppe und bei mit Säurelösung infundierten Ratten als Median, Range, Mittelwert und Standard Error Mean

	MED	Range	MW	SEM
Kontrolle	73,32	181,68	72,95	± 4,38
Säureload	109,45	306,56	123,69	± 7,20

Die Oxalatexkretion fällt während der Belastung mit basischer Infusionlösung auf circa 78 % der OxEx unter Kontrollbedingungen ab.

Auch die deskriptive Statistik kann die Ergebnisse für die Oxalatclearance während der basischen Belastung bestätigen:

Tabelle 10: Oxalatexkretion während der Akalibelastung in der Kontrollgruppe und bei mit Alkalilösung infundierten Ratten als Median, Range, Mittelwert und Standard Error Mean

	MED	Range	MW	SEM
Kontrolle	100,33	57,34	97,37	± 3,81
Alkaliload	77,17	54,78	76,78	± 4,57

3.3 Betrachtung von CHANGE FROM BASELINE und Korrelationen der untersuchten Parameter

Die graphische Darstellung des CHANGE FROM BASELINE (CfB) zeigt die Abhängigkeit der Werte untereinander im direkten Vergleich. Der Zusammenhang zwischen Urin- pH- Wert und fraktioneller Oxalatclearance ist in Abbildung 5 dargestellt.

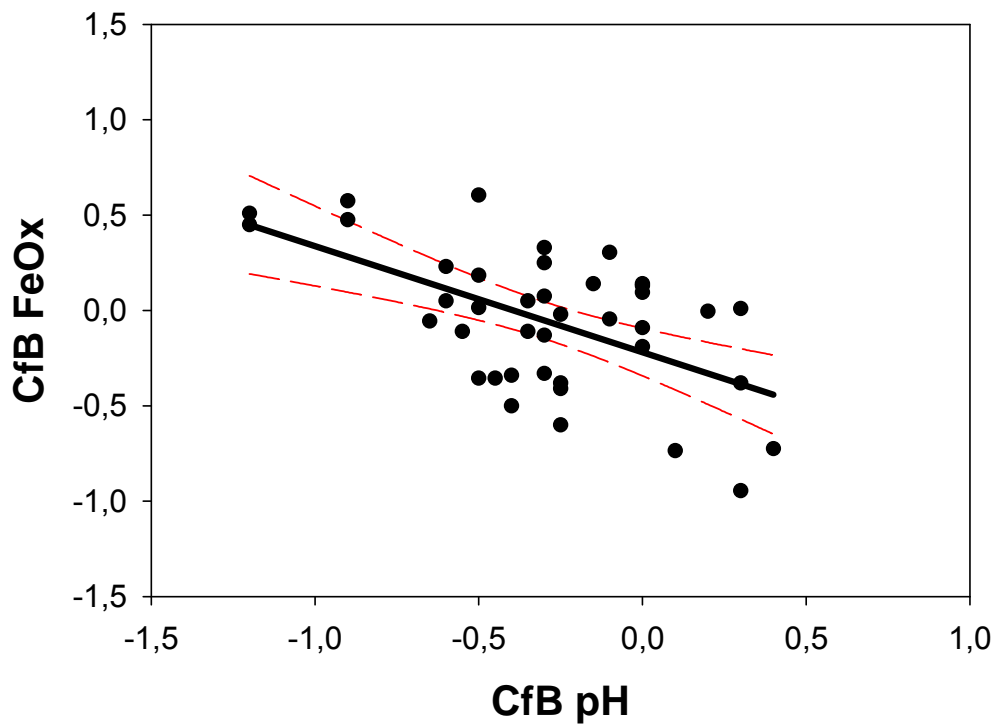


Abb. 5: Change from Baseline (CfB) von Fraktioneller Oxalatclearance versus Urin- pH Wert bei mit Säurelösung infundierten Ratten, $R= 0,57$, 99% Konfidenzintervall (0,16; 0,13)

Ebenso lässt sich der CHANGE FROM BASELINE für Urin- pH- Werte und Nettoxalatekretion bestimmen. Abbildung 6 zeigt die graphische Darstellung unter Säurebelastung.

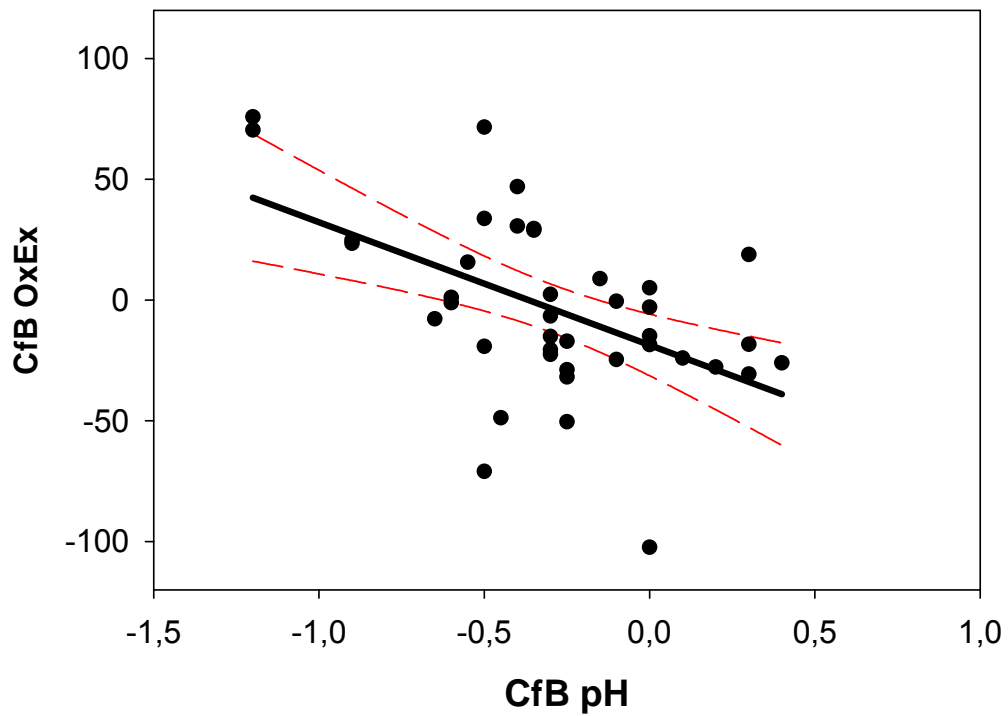


Abb. 6: Change from Baseline (CfB) von Oxalatekretion (OxEx) versus Urin-pH Wert bei mit Säurelösung infundierten Ratten

R= 0,52, 99% Konfidenzintervall (30,94; 0,13)

Der Trend, welcher sich bei der Säurebelastung gezeigt hatte, war in gleicher Weise für die Alkalibelastung nachzuweisen. Abbildung 7 zeigt die graphische Darstellung der fraktionellen Oxalatclearance, Abbildung 8 die graphische Darstellung der Oxalatgesamtexkretion.

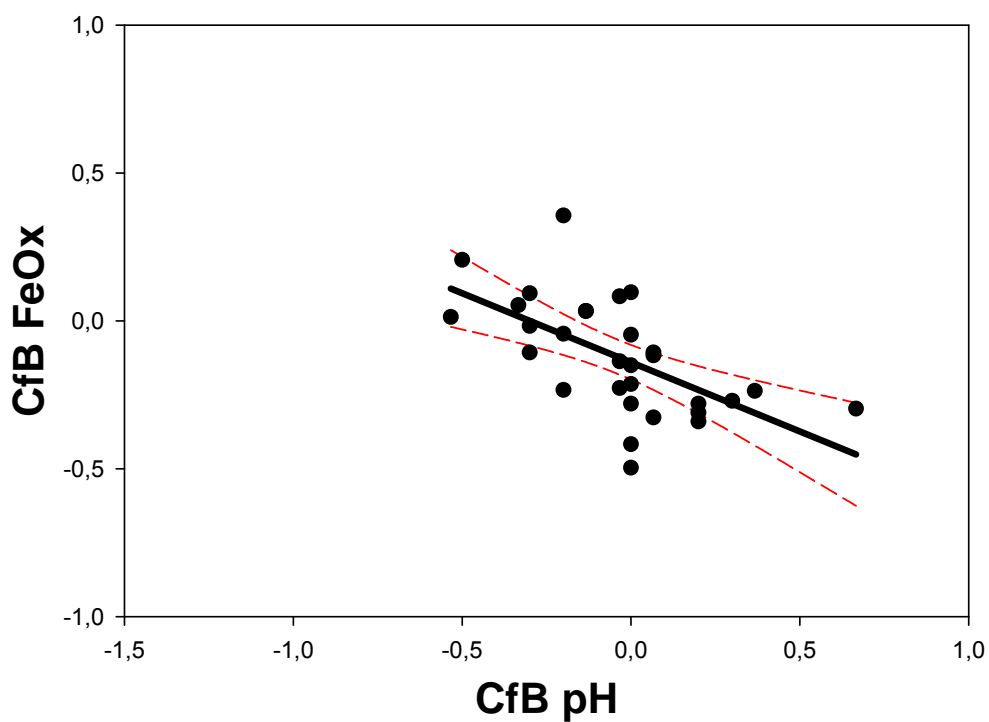


Abb. 7: Change from Baseline (CfB) Fraktionelle Oxalatclearance (FeOx) versus Urin- pH Wert bei mit Alkalilösung infundierten Ratten, $R= 0,47$, 99% Konfidenzintervall (0,1;0,4)

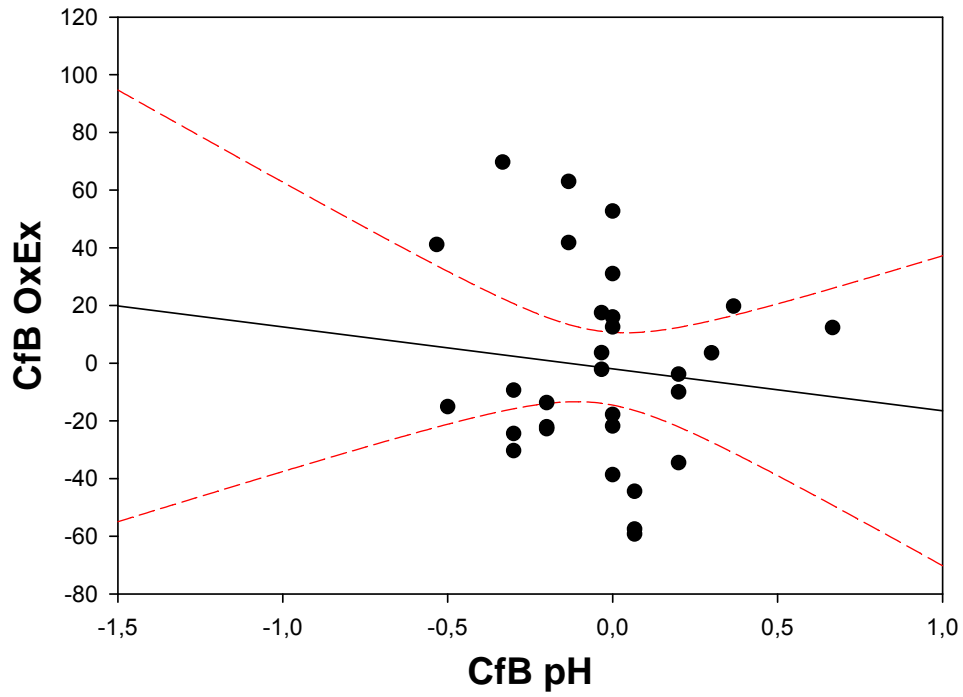


Abb. 8: Change from Baseline (CfB) Oxalate excretion (OxEx) versus Urin- pH Wert bei mit Alkalilösung infundierten Ratten, $R = 14,54$, 99% Konfidenzintervall (16,8; 0,4)

4 Diskussion der Ergebnisse

4.1 Calciumoxalat- Urolithiasis: Ein Rezidivproblem

Calciumoxalat ist der wichtigste Faktor der Lithogenese in der idiopathischen Urolithiasis. Etwa 75 % aller Harnsteine bestehen aus Calciumoxalat [90].

Die Extrakorporale Stoßwellenlithotripsie (ESWL) ist derzeit neben einigen aus langfristiger rezidivprophylaktischer Sicht gesehenen, unbefriedigenden Diättherapien [55;74] das wichtigste und häufigste Therapieverfahren. Die chirurgisch-invasive Steinentfernung stellt heute eine Rarität dar [30;31].

Als ausschließlich symptombezogenes Verfahren hat die ESWL keinen positiven Einfluß auf Steinrezidive der Urolithiasis, im Gegenteil zeigte sich ein erhöhtes Risiko für wiederholte Steinbildung auf dem Boden verbliebener Steinfragmente nach ESWL- Therapie und Tubulusschäden nach mehrfachen ESWL-Schocks, es konnte also die Häufigkeit des Harnsteinleidens nicht vermindert werden, da die Grunderkrankung nicht behandelt wird [86]. Die bisherigen Therapieverfahren behandeln lediglich die Symptome des Harnsteinleidens. Bis 40 % der Calciumoxalat- Patienten erleiden eine, 20 % sogar mehr als drei Rezidivepisoden [46].

Effektive, präventiv-therapeutische Ansätze zur Behandlung der Calciumoxalat-Urolithiasis fehlen bis heute.

4.2 Volkswirtschaftliche Aspekte

Besonders in sozialökonomisch starken Ländern steigt die Inzidenz des Harnsteinleidens an. Die Angaben in der internationalen Literatur zur Prävalenz sind schwankend, die Krankheitshäufigkeit während des Lebens liegt laut diesen Angaben zwischen 4- 15 %, Trinchieri zufolge bis zu 20 %. [17;82].

Weltweit unterscheidet sich die Epidemiologie der Urolithiasis im Bezug zur geographischen Lage, abhängig von Rasse, Ernährung und klimatischen Faktoren. Europäische Länder weisen ein Nord- Süd- Gefälle in der Harnstein-Prävalenz auf; Untersuchungen in Schweden dokumentieren bis zu 20%, in Kroatien dagegen um knapp 6 % [65].

Hesse et al. konnten 1979 in repräsentativen Untersuchungen für Deutschland eine Prävalenz von 4% und eine jährliche Inzidenz von 0,54% ermitteln (INFAS-Studie). Eine aktuelle Erhebung aus dem Jahr 2001 (INFAS) zeigte bei der Untersuchung mit der gleichen Fragestellung wie 1979 einen Anstieg der Prävalenz auf 4,7% und einen Anstieg der Inzidenz auf 1,47 % [23].

Unter den Deutschen über 50 Jahren liegt das Erkrankungsrisiko laut Tschope bei Männern sogar bei über 20%, bei Frauen über 16 % [88].

Diese Studien machen deutlich, daß die Urolithiasis in Deutschland als Volkskrankheit anzusehen ist, die Zahl der erkrankten Patienten wird auf 2,8 Millionen geschätzt. Nach einer aktuellen Studie betragen die Kosten bei einer gesetzlichen Krankenkasse in Süddeutschland pro Harnsteinpatient etwa 5500 Euro, 70% der Patienten mußten stationär behandelt werden, häufig ist eine Harnsteinepisode mit langer Krankschreibung verbunden [82], es muß von bis zu 5,6 Millionen Arbeitsausfalltagen durch Steine ausgegangen werden [79]. Epidemiologisch ist die Urolithiasis so gesehen mit anderen Volkskrankheiten wie dem Diabetes Mellitus zu vergleichen. Die volkswirtschaftlichen Einsparungspotentiale und nicht zuletzt die Verbesserung der Lebensqualität für die betroffenen Patienten durch die Entwicklung einer suffizienten medikamentösen Prophylaxe sind somit als sehr hoch einzuschätzen, da die bisherigen Therapieansätze lediglich auf die Symptombeseitigung abzielen: Citrat zur Urinalkalisierung, Magnesiumgabe und Calciumsenkung zur Inhibition. Ein direktes Eingreifen in die Lithogenese durch eine Senkung des Oxalats ist bisher nicht möglich, wohingegen die Regulation der Oxalatausscheidung jedoch die meiste Effektivität verspricht. Im vorliegenden Versuch konnten die im in vitro -Modell vermuteten Einflußfaktoren für die renale Oxalatexkretion auf den Gesamtorganismus übertragen und damit bestätigt werden.

4.3 Paradigmenwechsel von Calcium nach Oxalat

Entscheidender Faktor in der Genese von Calciumoxalatsteinen ist nicht, wie lange Zeit angenommen Calcium, sondern Oxalat. Robertson konnte 1993 zeigen, daß für die Pathogenese von Calciumoxalatsteinen eine milde Hyperoxalurie eine größere Rolle spielt als wie lange Zeit angenommen die Hypercalciurie. Bei der Untersuchung von Steinpatienten auf der arabischen Halbinsel konnte festgestellt werden, daß sich schwache Anstiege der Oxalatkonzentration bei gleichem Übersättigungsgrad des Urins stärker auf das Calcium- Oxalatverhältnis im Urin, das Gesamtvolumen ausgeschiedener Oxalatkristalle, auf die Proportionen abnormal großer Calciumoxalatkristalle und den Verlauf der Erkrankung im Bezug auf die Rezidivrate auswirken als Anstiege der Calciumkonzentration. Die Hypercalciurie spielte hierbei eine untergeordnete Rolle.

Zum einen kam es zur Bildung von Calciumoxalatsteinen unter fast vollständiger Abwesenheit einer Hypercalciurie. Zum anderen erhöht sich das Risiko einer Calciumoxalat- Urolithiasis signifikant mit dem Bestehen einer „milden Hyperoxalurie“, demnach korreliert die Steinprävalenz streng mit der durchschnittlichen täglichen Oxalatausscheidung im Urin. Dahingegen besteht diese Korrelation nicht im Bezug zur täglichen Calciumausscheidung [24].

Tiselius untersuchte 1995 das Ionenaktivitätsprodukt von Calciumoxalat und Calciumphosphat in Bezug auf die 16-h- Ausscheidung von Calcium, Oxalat, Citrat, Magnesium und Phosphat sowohl bei Steinbildnern als auch bei nicht-steinbildenden Probanden.

Das Ionenaktivitätsprodukt war von beiden Parametern, Calciumphosphat und Calciumoxalat, in der Gruppe der Steinbildner signifikant erhöht. Diese Unterschiede in der Urinzusammensetzung in Verbindung mit tageszeitabhängigen pH- Schwankungen können in Übersättigung des Urins mit Calciumoxalat und Calciumphosphat resultieren, Auskristallisation der Salze ist eine mögliche Folge [81]. Die nierenphysiologischen Zusammenhänge von milder Säurebelastung und erhöhter Oxalatekretion blieben dennoch weiterhin ungeklärt. Vor diesem Hintergrund sollten im vorher dargestellten

Grundlagenversuch die hormonellen und lokalen Einflüsse auf die Oxalatexkretion der Niere charakterisiert werden.

4.4 Risikofaktor „milde Hyperoxalurie“ – pathologischer Oxalattransport

Bisher noch unvollständige Untersuchungen zur Pathophysiologie der idiopathischen Calciumoxalat-Steinbildung sehen als wichtigste Voraussetzung für die Entstehung von CaOx- Kristallen die relative Übersättigung des Urins mit Calcium und Oxalat; bereits geringfügige Erhöhungen der Konzentration beider Substanzen im Harn erhöhen das lithogene Risiko erheblich. Das Löslichkeitsprodukt beider Substanzen ist außerdem abhängig vom pH- Milieu des Urins. Saure Verhältnisse begünstigen die Auskristallisation [11;34;42;52;72;87;93].

Eine zentrale Rolle in der Steuerung der renalen Oxalatexkretion spielen tubuläre Transportmechanismen. Auf Mikropunktionsversuchen basierende zelluläre Modelle im proximalen Tubulus koppeln den carriervermittelten luminalen Oxalattransport an die NaCl – Rückresorption und damit an einen Natrium- Protonen- Exchanger [21;33].

Eine spezifische Ursache für die Calciumoxalat- Urolithiasis lässt sich in einem Großteil der Fälle nicht ausmachen (zum Beispiel primärer Hyperparathyreoidismus, distal renal- tubuläre Acidose, Markschwammnieren, Sarkoidose, primäre Hyperoxalurie, enterische Hyperoxalurie)[29;70;81;87].

Die Genese der idiopathischen Calcium- Oxalat- Steinbildung ist ein multifaktorielles Geschehen, das durch verschiedene Kausalfaktoren und physikalisch- chemische Gesetzmäßigkeiten bestimmt wird [2;3;14;45] [35]. Sehr häufig dagegen ist das sogenannte idiopathische Calciumoxalatsteinleiden, mit 75% aller auftretenden Harnsteine häufigste Steinart. Es ist die Folge einer erhöhten Urinexkretion und – Konzentration von Oxalat und Calcium, zweitrangig von Phosphat und einem Citratmangel und somit Inhibitormangel [1;8;15;24;63]. Ebenso ist die Konzentration der einzelnen

lithogenen Substanzen Substanzen von Bedeutung, wie Trinchieri in ausführlichen Steinanalysen zeigen konnte [83].

Zur Beschreibung einer vermehrten Oxalat- Ausscheidung bei idiopathischen Calciumoxalatsteinbildnern wurde der Begriff der milden Hyperoxalurie eingeführt. Robertson beschrieb eine Oxalatausscheidung zwischen 0,45 und 0,85 mmol/d als Kriterium zur Diagnose milde Hyperoxalurie [24]. Bei 63% - 65% aller idiopathischen Calciumoxalat- Steinbildner kann diese Diagnose anhand der Parameter gestellt werden [23-25;30;82]. Verschiedene Faktoren werden für die Entstehung der milden Form der Hyperoxalurie diskutiert: vermehrte endogene Produktion, vermehrte enterale Absorption, vermehrte renal- tubuläre Sekretion oder verminderte renal- tubuläre Reabsorption, ebenso scheinen hydrodynamische Faktoren eine Rolle zu spielen [68]. Zur Harnsteinbildung kommt es nur dann, wenn der Urin mit Substanz (zum Beispiel Calciumoxalat) übersättigt ist. Während die Kristallisation von Calcium und Oxalat im stöchiometrischen Verhältnis 1:1 abläuft, liegt im Urin ein Verhältnis 5:1 Calcium zu Oxalat vor. Schon geringe Änderungen der Oxalatkonzentration führen daher zu einer wesentlichen Verschiebung des Reaktionsgleichgewichts [13;24;47;51;62;69;87].

Entscheidend geprägt wurde das aktuelle Verständnis zur Pathophysiologie der Calciumoxalat- Steinbildung durch Baggio und Gambaro.

Baggio et al. vermuten einen genetisch bedingten Defekt im Oxalattransport als Ursache der milden Hyperoxalurie bei der idiopathischen Hyperoxalurie. In einer Studie mit idiopathischen Calciumoxalat- Steinbildnern wies diese Arbeitsgruppe bei 68% der Untersuchten an den Erythrozyten einen erhöhten transmembranösen Oxalat- Exchange im Steady- State nach, der mit dem Phosphorylierungszustand des Anionen- Membrantransportprotein (AE1), dem sogenannten Bande- 3-Protein zusammenhing [12;40;61;89]. Gleichzeitig fiel auf, daß zwischen dem transmembranösen Oxalatexchange in den Erythrozyten und der Oxalatekretionsrate im Urin idiopathischer Calciumoxalatsteinbildner eine hochsignifikante Korrelation besteht. Bei Patienten mit einer primären Hyperoxalurie und mit Hyperparathyreoidismus fanden sich normale Oxalatexchange- Raten in den Erythrozyten. Baggio et al.

gehen davon aus, daß der veränderte Oxalat- Transport Ausdruck einer gestörten intrazellulären Regulation des Oxalat- Transportes ist und das diese Mißregulation auch in Organen wie zum Beispiel in der Niere vorliegt. Dabei vermutet die Arbeitsgruppe folgenden Regelmechanismus: Ein verminderter Gehalt an Glykosaminoglykanen in der Zellmembran bedingt eine erhöhte Aktivität der Proteinkinase C, es resultiert eine erhöhte Membranphosphorylierung und ein erhöhter Oxalattransport. Baggio et al. konnten ebenso zeigen, daß durch die Gabe von Glykosaminoglykanen die renale Oxalatekretion bei idiopathischen Calciumoxalatsteinbildnern vermindert werden kann [61].

Die Harnsteinforschungsgruppe um Baggio und Gambaro vermutete bereits 1986 einen gesteigerten Oxalattransport auf zellulärer Ebene als entscheidenden Faktor in der Harnsteingenesese. Untersucht wurde der Oxalatinflux in Erythrocyten bei Gesunden und im Vergleich dazu bei idiopathischen Calciumoxalatsteinbildnern, da auffiel, daß 79% aller Calciumoxalat- Steinbildner eine Abnormität des AE1/ Bande- 3- Protein aufwiesen. In der Versuchsgruppe der Gesunden Probanden betrug der Oxalatinflux $-0,31 \pm 0,12 \cdot 10^{-2}$ / min, in der Vergleichsgruppe der idiopathischen Calciumoxalatsteinbildner $-1,10 \pm 0,12 \cdot 10^{-2}$ /min. Ein erhöhter Influx konnte bei 79% der idiopathischen Calciumoxalatsteinbildner festgestellt werden [12;71].

In einer späteren Studie untersuchten Gambaro und Baggio idiopathische Calciumoxalatsteinpatienten mit einem bekannten genetisch determiniertem Erythrocytenmembrandefekt. Im Vergleich zur Kontrollgruppe mit gesunden Probanden wurde eine erhöhte fraktionelle Oxalatclearance augenscheinlich. Diese korrelierte auffälligerweise ebenso mit dem Oxalatfluß aus den Erythrocyten. Für den Oxalatfluß ergaben sich Werte bei $0,26 \pm 0,07$ [$K \cdot 10^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$] bei den Gesunden und $0,90 \pm 0,27$; die fraktionelle Oxalatclearance war bei den Calciumoxalatpatienten auf $1,84 \pm 0,59$ erhöht, bei den Gesunden lag diese bei $1,08 \pm 0,46$ [72].

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen lassen eine Störung des Oxalattransports auf zellulärer Ebene vermuten. Im Erythrocyten fanden Baggio und Gambaro 1998 parallel mit Oxalat einen Chlorid- Bicarbonat- Exchanger,

ein Bande- 3- Protein, von diesen AE1 genannt. Demnach ist der Oxalatfluß direkt Abhängig vom Phosphorylierungsgrad des AE1, der reguliert wird durch Proteinkinasen. Dieser Studie zufolge ist die Hyperoxalurie Ursache einer Regulationsstörung der Oxalattransporter, einem Defekt der Anionen-Exchanger.

Hieraus kristallisierte sich ein ein pathophysiologisches Modell, das die Ursache der Calciumoxalat- Steinbildung einer bislang nicht gekannten zellulären Transportstörung für Oxalat im proximalen Tubulus zuschrieb [33;41]. Zur genauen Aufklärung dieser vermuteten Oxalat-Transportstörung musste die Grundlagenforschung zuerst die am Oxalattransport beteiligten Carrier des proximalen Tubulus charakterisieren und danach die Einflußfaktoren und Regulationsmechanismen dieses Carriersystems genau untersuchen, bevor das pathophysiologische Modell weiterzuentwickeln war.

4.5 Ulmer Modell: Oxalatexkretion der proximalen Tubuluszelle

Seit 1994 wurden durch die Ulmer Arbeitsgruppe um Brändle die Grundlagen des Oxalattransports am Rattenmodell untersucht.

Zum einen konnten die am Oxalattransport beteiligten Carriersysteme beschrieben werden, zum anderen ließ sich der Oxalattransport als transzellulärer Transportprozeß der proximalen Tubuluszelle nachweisen.

In Micropunktionsversuchen des proximalen Tubulus lebender Ratten wurde der luminaire Oxalattransport nach der In- situ-stopped- flow- Perfusionstechnik charakterisiert. Nach Stimulation der intrazellulären Mediationssysteme und lokaler Hormonstimulation beziehungsweise Hormoninhibition wurde der resultierende luminaire Oxalattransport gemessen (¹⁴C- markiert).

Sowohl an der basolateralen Membran (Blutseite) als auch an der luminalen Membran (Urinseite) des proximalen Tubulus konnten substratspezifische, sättigbare Carrier identifiziert werden, die Oxalat über die beiden Membranen hinweg transportieren.

Transzellulärer Oxalattransport im proximalen Tubulus:

Basolaterale Membran: Oxalat/ Sulfat(Bicarbonat) -Exchanger

Luminale Membran: Oxalat (Formiat)/ Chlorid -Exchanger
Natrium- Sulfat(Oxalat) –Cotransporter

Diese Oxalattransporter sind zum Teil an andere Transportprozesse der proximalen Tubuluszelle wie den basolateralen Chlorid/ Bicarbonataustausch oder den luminalen Natrium/ Protonenaustausch gekoppelt.

Seit 2000 beschäftigte sich die Ulmer Arbeitsgruppe unter STRAUB mit verschiedenen Einflußfaktoren, die zu einer Änderung des transzellulären Oxalattransports führen. Vornehmlich wurden die hormonelle und intrazelluläre Regulation des Oxalattransports untersucht, folgende Faktoren scheinen beteiligt:

Angiotensin II und Parathormon (extrazelluläre Mediatoren) hemmen konzentrationsabhängig den luminalen Oxalattransport.

Von zentraler Bedeutung ist die Proteinkinase C (intrazellulärer Regulator) :

Eine Aktivierung der Proteinkinase C durch Phorbol steigerte dosisabhängig den luminalen Oxalattransport. Staurosporine, ein Proteinkinase- C- Inhibitor hemmte den Oxalattransport. Wurde die Proteinkinase A mit Forskolin aktiviert trat eine dosisabhängige Hemmung des luminalen Oxalattransports auf. Nach Hemmung des Calcium- Calmodulin- Systems mit Trifluoperazine blieb der Oxalattransport unverändert.

Als intrazelluläre Regulatoren des luminalen Oxalatransports konnten Brändle et. al. folglich die C-AMP- abhängige Proteinkinase A und Proteinkinase C identifizieren.

Ungeklärt blieb, ob der beschriebene Transportmechanismus tatsächlich stoffwechselrelevante Auswirkungen auf die Oxalatekretion und damit auf die Harnsteingenesese besitzt.

Der Clearanceversuch am Gesamttier bot im vorliegenden Versuch die Möglichkeit, die pathophysiologischen Vorstellungen zum erstenmal im Gesamtorganismus unter möglichst einfachen Bedingungen und somit unter Ausschluß möglichst vieler Störfaktoren zu beurteilen. Dennoch lassen sich diese Ergebnisse nicht direkt auf den Menschen übertragen und können lediglich die bisher angestellten nierenphysiologischen Vermutungen in einem Säugetiermodell bestätigen. Besonders bezüglich Urin – pH und Fraktioneller Oxalatclearance könnten sind Unterschiede zwischen Mensch und Ratte bekannt [36;53;75]. Dies bleibt in weiteren Studien zu klären.

Dennoch konnte die vorliegende Arbeit nun an einer großen Anzahl von Versuchstieren zeigen, daß das theoretische Modell sich in vivo tatsächlich nachvollziehen und steuern läßt. Sowohl zugunsten einer gesteigerten Oxalatsekretion im proximalen Tubulus durch eine milde Azidose als auch deren Inhibition über eine milde Alkalisierung.

4.6 Renale Säureexkretionsmechanismen im proximalen Tubulus

Ein Zusammenhang zwischen erhöhter Ausscheidung von Wasserstoffionen und der Bereitschaft zur Lithogenese wird seit langem vermutet. Gontmakher et al. konnten zeigen, dass bei Kindern mit Oxalat-Phosphatsteinen im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe die Säureausscheidung in 100% (bilaterale Nephrolithiasis) bzw. 81,6 % (unilaterale Nephrolithiasis) im Sinne einer metabolischen Azidose gestört war [73].

In einer weiteren Studie belasteten Knispel et al. Steinbildner [92] und eine Kontrollgruppe akut mit Säure. Nach Einnahme von Ammoniumchlorid erhöhte sich die Konzentration von Gesamtcalcium, ionisiertem Calcium und Magnesium signifikant; Citrat als wichtiger Hemmstoff der Harnsteinbildung

nahm in der Konzentration signifikant ab. Während der akuten Säurebelastung war in der Steinbildnergruppe gegenüber der Kontrollgruppe die Konzentration von Oxalat, Gesamtcalcium und Harnsäure nochmals erhöht. Diese Ergebnisse bestätigten den Einfluß einer Säurebelastung auf die Calciumoxalatsteinbildung und zeigten erstmals die Möglichkeit auf, Risikopatienten von Nicht-Steinbildnern zu diskriminieren. Ein solcher Test existiert bislang dennoch nicht. Eine wichtige Rolle in der Säure- Base- Regulation des Nephrons spielt der Na^+/H^+ Exchanger NHE. In der Niere von Säugetieren konnten 4 Isoformen der NHE charakterisiert werden (NHE 1- 4). Immunzytochemische Studien fanden im proximalen Tubulus die Isoform 3.

Vallon et al zeigten 2000 in einer Mikropunktionsstudie mit S3226, einem Inhibitor der NHE3, das die Rückresorption von Natrium im proximalen Tubulus durch Hemmung der NHE3 um 30% reduziert werden konnte [91].

Die Gruppe um Brändle et al. untersuchte in Micropunctionsversuchen den Einfluß von Oxalat auf multiple Transportmechanismen im proximalen Tubulus, insbesondere durch Stimulierung der NHE3. Mehrere Substanzen verbindet ein direkter Carrierprozeß mit Oxalat und bewirken unter anderem einen gradientenabhängigen Austausch von H^+ -Ionen und Oxalat zwischen Blutkreislauf und Urin in der Zelle des proximalen Tubulus.

Ein hohes Angebot von H^+ -Ionen aktiviert das Bikarbonat- Puffer –System der proximalen Tubuluszelle und das Regulationsenzym Carboanhydrase.

Nach Brändle et al. wird HCO_3^- (mit SO_4^{2-}) aus der Zelle transportiert, gekoppelt an einen Oxalattransport in die Tubuluszelle. Dieses Überangebot von Oxalat wird über einen Chlorid/ Oxalat- Formiat-Exchanger ins Tubuluslumen transportiert.

Ebenso wird H^+ an den Urin abgegeben, vermittelt über einen H^+ - Na^+ - Exchanger. Dadurch erhöht sich weiter die Oxalatkonzentration im Tubuluslumen, denn die Rückresorption von Oxalat (und SO_4^-) ist an ein vermindertes Na^+ - Angebot in der Zelle gebunden [21;33].

Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Aronson und Kuo, die einen Cl^- Formiat-Exchanger und einen Cl^- Oxalat- Exchanger demonstrierten. Demnach bewirkt ein Cl^- -Steady- State eine Reabsorption von Formiat und Oxalat aus dem

Lumen in die Zelle. Andererseits führt eine Exkretion von H^+ -Ionen über den Na^+/H^+ -Exchanger parallel zu einer Exkretion von Formiat ins Tubuluslumen.

Beide Untersuchungen machen den Einfluß einer Säurebelastung auf die Oxalatexkretion an der basolateralen Membran des proximalen Tubulus deutlich [4;5;32;56;57;91].

Oxalat wird nicht an Proteine gebunden. Die Elimination in der Niere erfolgt daher durch freie glomeruläre Filtration und zusätzliche tubuläre Sekretion [32]. Beim Menschen macht der tubulär sezernierte Anteil zwischen 60% und 130 % des glomerulär filtrierte Oxalats aus. Sind die am tubulären Oxalattransport beteiligten Regulationssysteme genau bekannt, besteht längerfristig die Möglichkeit diesen Anteil pharmakologisch zu senken. Damit wäre das Ziel einer pharmakologischen Steinprävention erreicht.

Im vorliegenden Versuch konnten die direkten Auswirkungen der Manipulation dieser Regulationsmechanismen in vivo und am Gesamtorganismus demonstriert werden. Sämtliche clearancerelevanten Parameter wie Urin- pH-Wert, fraktionelle Oxalatclearance und Gesamtoxalatexkretion konnten auf Grundlage dieser Modelle signifikant positiv oder negativ reguliert werden, entsprechend einer Säure- beziehungsweise Alkalibelastung des Rattenstoffwechsels.

In einem Folgeversuch der Arbeitsgruppe führte die Veränderung des lokalen Säure- Basen Gleichgewichtes durch unspezifische Hemmung der Carboanhydrase mit Acetazolamid zu einem Anstieg der Oxalatexkretion. Hier wird vermutet, daß durch vermehrte Chloridrückresorption aus dem Tubuluslumen der luminale Oxalat (Formiat)/ Chloridaustausch gesteigert ist. Die Versuche hierzu sind noch nicht abgeschlossen.

4.7 Neue Diätkonzepte: Wechsel von Calcium zu Oxalat

Der Einfluß diätetischer Faktoren auf die Lithogenese von $CaOx$ - Steinen wurde bereits in verschiedenen Studien untersucht. Lange Zeit konzentrierten sich die Untersuchungen auf den direkten und indirekten Calciumstoffwechsel.

Tatsächlich kann erhöhte Zufuhr von Natrium, Eiweißen und Kohlenhydraten die Calciumexkretion in den Urin beeinflussen [7;9;18;22;39;97]. Besonders ein

Anstieg der Calciumexkretion nach akuter oder chronischer Proteinbelastung wurde von mehreren Autoren beobachtet [22;84;85].

Einerseits bedingt die Oxidierung von Proteinen eine milde Azidose mit einer konsekutiven Calciummobilisierung aus dem Knochen. Zum anderen wird jedoch die Rolle der Calciumaufnahme mit der Nahrung kontrovers diskutiert.

Untersuchungen zur diätetischen Calciumbelastung zeigten einen linearen Zusammenhang zwischen oraler Aufnahme und Ausscheidung im Urin lediglich bis zu einer Einnahme von 20 mmol/ Tag, höhere Belastungen zeigten dagegen kleinere Urin- Exkretionsraten [10].

Curhan et al. demonstrierten sogar einen inversen Zusammenhang zwischen Calcium- Aufnahme und – Exkretion [26-28].

Neuere Studien zur diätetischen Metaphylaxe der Calciumoxalat- Urolithiasis verlassen den Ansatz der Calciumrestriktion.

Borghi et al. untersuchten über fünf Jahre 120 Männer mit rezidivierender Calciumoxalat- Urolithiasis. 60 Männern wurde eine traditionelle, calciumarme Diät zugewiesen; 60 Männern eine Diät mit normalem Calciumgehalt (30 mmol/ Tag) aber mit reduziertem tierischem Protein (52g/ Tag) und reduziertem Salzgehalt (50 mmol NaCl/ Tag).

Hauptunterschied beider Diäten war die Oxalatexkretion, erhöht unter calciumarmer Diät (um circa 7,2 mg/ Tag) aber erniedrigt unter der proteinarmen, kochsalzarmen Diät bei normalem Calcium (um circa 4,2 mg/ Tag).

Borghi vermutet den Oxalatanstieg im Urin durch gesteigerte intestinale Absorption bei niedrigem Calciumangebot zur Komplexbildung mit Oxalat im Darmlumen [18].

Die Vermutung, allein das üppige Calciumangebot zur Calcium-Oxalat-Komplexbildung im Darmlumen bei reduzierter Oxalatsynthese durch Proteinmangel sei für die verminderte Exkretion verantwortlich erscheint unbefriedigend.

Die Ergebnisse im Clearanceversuch konnten zeigen, daß eine milde Säurebelastung signifikant die Oxalatexkretion im proximalen Tubulus erhöht. Dies legt nahe, den Oxalatanstieg im Zusammenhang mit der milden Azidose durch gesteigerte Proteinaufnahme zu sehen, zum Einen durch enterale Oxalat-Absorption, zum Anderen durch renale Oxalatsekretion und durch eine Addition

der beiden Effekte. Man geht davon aus, dass in 75% der Patienten eine dementsprechende Diät das Rezidivrisiko senken könnte, weitere 25% dieses Risiko mit einer entsprechenden Medikation senken könnten [78].

4.8 Bedeutung der Gesamttieregebnisse

Trotz mittlerweile verschiedener Erkenntnisse über den Zusammenhang von milder Hyperoxalurie und saurer Stoffwechselbelastung durch dietätische Faktoren indirekt oder direkt durch milde Säureinfusion lieferte die entscheidende physiologische Grundlage erst das Ulmer Transportmodell.

Im vorliegenden Clearanceversuch konnte mit der Clearanceuntersuchung erstmalig die Stoffwechselrelevanz der vermuteten Transportprozesse in vivo bewiesen werden. Darüber hinaus war es möglich, die Oxalatekretion im proximalen Tubulus und damit den Oxalatgehalt im Rattenurin zu steuern.

Es wird deutlich, daß die Oxalatekretion an der basolateralen Membran im proximalen Tubulus im engen Zusammenhang mit einem erhöhten Säureangebot im Organismus und der daraus resultierenden ansteigenden H⁺-Exkretion steht.

Während die Inulin-clearance sowohl unter Säureload als auch unter Alkaliload kontinuierlich stabil blieb ließen sich die clearancerelevanten Parameter durch Verschiebung des Rattenblut- pH zugunsten eines erhöhten lithogenen Risikos verändern, ebenso ließ sich eine Inhibition via Alkaliload erreichen.

Der Urin -pH fiel im Mittelwert von 6,08 auf 5,63 unter Säurebelastung und stieg auf im Mittelwert 7,72 zum Kontrollwert von 5,97 unter Alkalibelastung. Auch fraktionelle Oxalatclearance und Gesamtoxalatclearance sind pH- Load abhängig. Der Versuch zeigte eine signifikante Steigerung unter Säurebelastung und einen signifikanten Abfall unter Alkalibelastung.

Bislang sind dietätische und medikamentöse Konzepte zur Prophylaxe und Therapie des Calciumoxalatsteinleidens unbefriedigend.

Mit den Nierenphysiologischen Ergebnissen aus den Mikropunktionsversuchen der Ulmer Gruppe um Brändle wurde eine mögliche Grundlage des Oxalattransports im proximalen Tubulus erkannt, die Auswirkungen auf den

Gesamtorganismus blieben jedoch weiterhin offen. Im Clearanceversuch am Gesamttier konnten diese nun im Stoffwechselfzusammenhang beobachtet werden.

Die direkte Hemmung der Oxalatekretion im proximalen Tubulus könnte eine medikamentöse Steuerung der Oxalatekretion ermöglichen und liefert einen entscheidenden Ansatz zur ursächlichen Therapie des Calciumoxalat-Harnsteinleidens im Rahmen der Alkalisierung sowie neue beziehungsweise bisher wissenschaftlich- physiologisch unbestätigte Diätkonzepte.

Die hier gewonnenen Erkenntnisse müssen nun in klinischen Versuchen belegt werden.

4.9 Schlussfolgerung

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten auf eine Beeinflussbarkeit und Steuerbarkeit von Urin- pH, fraktioneller Oxalatclearance und Gesamtoxalatclearance durch Säurebelastung und Alkalibelastung, also eine Abhängigkeit der Oxalatparameter vom Säure Basen- Equilibrium des Gesamttierorganismus hin. Die Stabilität der Inulinclearance und damit der allgemeinen Clearanceleistung der Niere bleibt trotzdem gewährleistet, es änderte sich interessanterweise trotz Variation des pH- Wert nicht die Clearanceleistung, repräsentiert durch die Inulinclearance. Ob sich diese Ergebnisse auch in klinischen Versuchen wiederholen lassen bleibt vorerst abzuwarten. Ebenso müssen Wege zur milden medikamentösen Alkalisierung gefunden werden und die möglichen unerwünschten Wirkungen untersucht werden.

5. Zusammenfassung

Oxalat ist einer der wichtigsten Risikofaktoren für die Entstehung von Kristallkonkrementen in den ableitenden Harnwegen. Die Inzidenz des Harnsteinleidens beträgt für Deutschland 1,5 %, die Prävalenz für Europa und Nordamerika bis zu 15 %. Rezidive sind häufig, nach dem Erstereignis besteht ein 50-100 % iges Risiko eine erneute Steinepisode zu erleiden. Die Kosten durch Interventionen und Ausfälle in gesamtwirtschaftlicher Sicht sind immens. Für einen Großteil der Erkrankungen kann die idiopathische Calciumoxalaturolithiasis verantwortlich gemacht werden. 12-63 % aller Steinereignisse lassen sich auf eine milde Hyperoxalurie zurückführen, 60-75 % aller Harnsteine enthalten Oxalat als mindestens einen Bestandteil der Zusammensetzung. Erstmals in diesem Zusammenhang genannt wurde der Begriff der milden Hyperoxalurie von Robertson und Peacock, als kritische Oxalatexkretionsrate wurde ein Wert zwischen 0,4 und 0,8 mmol/d festgelegt. Zum Transportmechanismus des Oxalats im proximalen Tubulus wurden verschiedene Modelle entwickelt, favorisiert wird heute das Ulmer Modell, welches in „in-vivo“ – Versuchen an Ratten die enge Koppelung der Oxalatexkretion an den Säureaustausch im proximalen Tubulus belegen konnte.

Im vorliegenden Versuch wurde narkotisierten Ratten unter Tierversuchs-Operationsbedingungen eine Primingdosis mit radioaktiv markiertem Oxalat injiziert, später wurden sie mit einer Kontrolllösung, einer Säurelösung sowie mit einer Alkalilösung perfundiert. Daraufhin wurden die Ausscheidungsparameter Urin-pH sowie Oxalatexkretion gemessen, Oxalatclearance sowie Fraktionelle Oxalatclearance berechnet.

Es zeigte sich, dass sich das Gedankenmodell tatsächlich reproduzierbar auf das Gesamttier übertragen ließ. Es konnte bestätigt werden, dass sich die Oxalatexkretion signifikant durch Säureload von 72,9 auf 123,7 steigern so wie im Gegenzug signifikant durch Basenload des Gesamttierorganismus von 97,4 auf 76,8 hemmen ließ. Ebenso konnte eine Veränderung des Urin- pH- Wertes durch Azidifizierung auf pH 5,6 bzw. durch Alkalisierung auf pH 7,7 erreicht werden. Dieser spielt eine nicht unerhebliche Rolle für das Aktivitätsprodukt und damit auch für den Kristallisationsgrad der Harnsteine.

Nun gilt es auf Grundlage dieses Versuches zu untersuchen, inwieweit die Ergebnisse auf den menschlichen Organismus übertragbar sind. Im Vergleich zur renalen Oxalatclearance des Menschen, die sogar höher liegt als die der Ratte, sind unter Umständen noch eindrucksvollere Werte zu erwarten.

In klinischen Studien kann nun die medikamentöse Senkung der Oxalatekretion untersucht werden, hierdurch sind große Einsparpotentiale im Bereich der Gesundheitskosten denkbar, auch könnten Testverfahren zur frühen Erkennung der Risikopatienten entwickelt werden.

6. Literaturverzeichnis

1. Ahlstrand C, Larsson L, Tiselius HG: Variations in urine composition during the day in patients with calcium oxalate stone disease. *J. Urol.* 131:77-81, 1984
2. Ahlstrand C, Tiselius HG, Larsson L: Studies on crystalluria in calcium oxalate stone formers. *Urol. Res.* 12:103-106, 1984
3. Amlal H, LeGoff C, Vernimmen C, Paillard M, Bichara M: Na(+)-K+(NH4+)-2Cl- cotransport in medullary thick ascending limb: control by PKA, PKC, and 20-HETE. *Am. J. Physiol* 271:C455-C463, 1996
4. Aronson PS: Ion exchangers mediating NaCl transport in the renal proximal tubule. *Cell Biochem. Biophys.* 36:147-153, 2002
5. Aronson PS, Giebisch G: Mechanisms of chloride transport in the proximal tubule. *Am. J. Physiol* 273:F179-F192, 1997
6. Aronson PS, Kuo SM: Heterogeneity of anion exchangers mediating chloride transport in the proximal tubule. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 574:96-101, 1989
7. Assimos DG, Holmes RP: Role of diet in the therapy of urolithiasis. *Urol. Clin.North Am.* 27:255-268, 2000
8. Atmani F, Lacour B, Daudon M: Uronic-acid-rich protein: a new glycoprotein inhibiting the crystallization of calcium oxalate in vitro. *Nephrologie* 17:157-162, 1996
9. Baggio B: Genetic and dietary factors in idiopathic calcium nephrolithiasis. What do we have, what do we need? *J. Nephrol.* 12:371-374, 1999
10. Baggio B, Favaro S, Antonello A, Borsatti A: Preliminary studies on a rat kidney phospholipase A2 activating a renin preinhibitor. *Res. Exp. Med. (Berl)* 169:77-81, 1976
11. Baggio B, Gambaro G, Favaro S, Borsatti A: Prevalence of hyperoxaluria in idiopathic calcium oxalate kidney stone disease. *Nephron* 35:11-14, 1983
12. Baggio B, Gambaro G, Marchini F, Cicerello E, Borsatti A: Raised transmembrane oxalate flux in red blood cells in idiopathic calcium oxalate nephrolithiasis. *Lancet* 2:12-13, 1984
13. Baggio B, Plebani M, Gambaro G: Pathogenesis of idiopathic calcium nephrolithiasis: update 1997. *Crit Rev. Clin. Lab Sci.* 35:153-187, 1998

14. Berg C, Tiselius HG: The effect of pH on the risk of calcium oxalate crystallization in urine. *Eur. Urol.* 12:59-61, 1986
15. Berg C, Tiselius HG: The effects of citrate on hydroxyapatite induced calcium oxalate crystallization and on the formation of calcium phosphate crystals. *Urol. Res.* 17:167-172, 1989
16. Berg W, Schanz H, Eisenwinter B, Schorch P: The incidence distribution and development of a trend of urinary stone substances. An evaluation of the data on over 210,000 urinary stone analyses from the area of the former DDR. *Urologe A* 31:98-102, 1992
17. Bichara M, Paillard M, Corman B, de Rouffignac C, leviel F: Volume expansion modulates NaHCO₃ and NaCl transport in the proximal tubule and Henle's loop. *Am. J. Physiol* 247:F140-F150, 1984
18. 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.* 346:77-84, 2002
19. Brandle, E. Mechanismus des transzellulären Oxalattransportes im proximalen Tubulus der Rattenniere. 18-7-2000. Universität Ulm, Urologische Universitätsklinik und Poliklinik.
Ref Type: Thesis/Dissertation
20. Brandle E, Bernt U, Hautmann R: Influence of diuresis, oxalate serum concentration, sulfate and GAGS on the renal tubular oxalate transport. *Urologe A* 34:55, 1995
21. Brandle E, Bernt U, Hautmann RE: In situ characterization of oxalate transport across the basolateral membrane of the proximal tubule. *Pflugers Arch.* 435:840-849, 1998
22. Brandle E, Sieberth HG, Hautmann RE: Effect of chronic dietary protein intake on the renal function in healthy subjects. *Eur. J. Clin. Nutr.* 50:734-740, 1996
23. Carlisle EJ, Donnelly SM, Halperin ML: Renal tubular acidosis (RTA): recognize the ammonium defect and pHorget the urine pH. *Pediatr. Nephrol.* 5:242-248, 1991
24. Chan JCM: The rapid determination of urinary titratable acid and ammonium and evaluation of freezing as a method of preservation. *Clin.Biochem.* 5:94-98, 1972
25. Chan JCM: Urinary organic anions: Clinical significance and evaluation of a method for determination and preservation. *Clin. Biochem.* 5:182-185, 1972
26. Curhan GC: Dietary calcium, dietary protein, and kidney stone formation. *Miner. Electrolyte Metab* 23:261-264, 1997

27. Curhan GC, Curhan SG: Dietary factors and kidney stone formation. *Compr. Ther.* 20:485-489, 1994
28. Curhan GC, Willett WC, Speizer FE, Spiegelman D, Stampfer MJ: Comparison of dietary calcium with supplemental calcium and other nutrients as factors affecting the risk for kidney stones in women. *Ann. Intern. Med.* 126:497-504, 1997
29. Donnelly J, Hackler RH, Bunts RC: Present urologic status of the World War II paraplegic: 25-year followup. Comparison with status of the 20-year Korean War paraplegic and 5-year Vietnam paraplegic. *J. Urol.* 108:558-562, 1972
30. Drach GW: Surgical overview of urolithiasis. *J. Urol.* 141:711-713, 1989
31. Drach GW: Renal calculi. *Curr.Opin.Urol.* 9:101-105, 1999
32. Eggert W, Eggert S, Schar K, Schar O, Zoellner K: The incidence of kidney diseases in a pediatric kidney dispensary. *Z. Urol. Nephrol.* 81:379-385, 1988
33. Friedland BR, Maren TH: Carbonic Anhydrase: Pharmacology of Inhibitors. *Urolithiasis with Carbonic Anhydrase Inhibitors.* 1 A.D.
34. Gambaro G, Cicerello E, Marchini F, Paleari C, Borsatti A, Baggio B: Are calcium antagonists potential antilithiasic drugs? *Contrib. Nephrol.* 58:181-183, 1987
35. Gekle D, Fischer V: Urolithiasis in childhood. *Monatsschr. Kinderheilkd.* 116:58-63, 1968
36. Greger R: Renal transport of oxalate, in *Renal transport of organic substances*, edited by Greger R, Silbernagl S, Berlin, Heidelberg, New York, Springer Verlag, 1981, pp 224-281
37. Greger R, Lang F, Oberleithner H: Distal site of calcium reabsorption in the rat nephron. *Pflugers Arch.* 374:153-157, 1978
38. Greger R, Lang F, Oberleithner H, Deetjen P: Handling of oxalate by the rat kidney. *Pflugers Arch.* 374:243-248, 1978
39. Gresser U, Gathof B, Zollner N: Uric acid levels in southern Germany in 1989. A comparison with studies from 1962, 1971, and 1984. *Klin. Wochenschr.* 68:1222-1228, 1990
40. Grosse H: Frequency, localization and associated disorders in urinary calculi. Analysis of 1671 autopsies in urolithiasis. *Z. Urol. Nephrol.* 83:469-474, 1990

41. Guntupalli J, DuBose TD, Jr.: Effects of endothelin on rat renal proximal tubule Na(+)-Pi cotransport and Na⁺/H⁺ exchange. *Am. J. Physiol* 266:F658-F666, 1994
42. Hautmann R: Prevention of calculus recurrence in impaired kidney function. *Urologe A* 23:82-86, 1984
43. Hautmann R, Osswald H: Renal handling of oxalate. A micropuncture study in the rat. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 304:277-281, 1978
44. Hautmann R, Osswald H: Pharmacokinetic studies of oxalate in man. *Invest Urol.* 16:395-398, 1979
45. Hautmann R, Terhorst B, Stuhlsatz HW, Lutzeyer W: Mercaptopropionylglycine: a progress in cystine stone therapy. *J. Urol.* 117:628-630, 1977
46. Hesse A, Brandle E, Wilbert D, Kohrmann KU, Alken P: Study on the prevalence and incidence of urolithiasis in Germany comparing the years 1979 vs. 2000. *Eur. Urol.* 44:709-713, 2003
47. 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.* 10 Suppl 14:S329-S333, 1999
48. Hesse A, Siener R: Current aspects of epidemiology and nutrition in urinary stone disease. *World J.Urol.* 15:165-171, 1997
49. Hodgkinson A, Zarembski PM: Oxalic acid metabolism in man: a review. *Calcif.Tissue Res.* 2:115-132, 1968
50. Holmes RP: Oxalate synthesis in humans: assumptions, problems, and unresolved issues. *Mol.Urol.* 4:329-332, 2000
51. Hoppe B, Langman CB: A United States survey on diagnosis, treatment, and outcome of primary hyperoxaluria. *Pediatr. Nephrol.* 18:986-991, 2003
52. Jackson EK, Garrison JC: Renin und Angiotensin, chap. 31, in *Pharmakologische Grundlagen der Arzneimitteltherapie*, edited by Gilman, Goodman, London, McGraw-Hill International (UK) Ltd., 1997, pp 753-779
53. Knight TF, Sansom SC, Senekjian HO, Weinman EJ: Oxalate secretion in the rat proximal tubule. *Am. J. Physiol* 240:F295-F298, 1981
54. Knispel HH, Fitzner R, Kaiser M, Butz M: Acute acid load in recurrent oxalate stone formers. *Urol.Int.* 43:93-96, 1988
55. Kodama H, Ohno Y: Descriptive epidemiology of urolithiasis. *Hinyokika Kiyo* 35:923-934, 1989

56. Kuo SM, Aronson PS: Oxalate transport via the sulfate/HCO₃ exchanger in rabbit renal basolateral membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* 263:9710-9717, 1988
57. Kuo SM, Aronson PS: Pathways for oxalate transport in rabbit renal microvillus membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* 271:15491-15497, 1996
58. Laube N, Hergarten S: Can the Bonn Risk Index be replaced by a simple measurement of the urinary concentration of free calcium ions? *J. Urol.* 173:2175-2177, 2005
59. Leusmann DB, Blaschke R, Schmandt W: Results of 5,035 stone analyses: a contribution to epidemiology of urinary stone disease. *Scand.J. Urol. Nephrol.* 24:205-210, 1990
60. Lin SL, Chan JCM: Urinary bicarbonate: a titrimetric method for determination. *Clin.Biochem.* 6:207-210, 1973
61. Miller SB, Martin DR, Kissane J, Hammerman MR: Rat models for clinical use of insulin-like growth factor I in acute renal failure. *Am. J. Physiol* 266:F949-F956, 1994
62. Osswald H, Hautmann R: Renal elimination kinetics and plasma half-life of oxalate in man. *Urol. Int.* 34:440-450, 1979
63. Pak CY: Citrate and renal calculi: an update. *Miner.Electrolyte Metab* 20:371-377, 1994
64. Pak CY: Medical management of urinary stone disease. *Nephron Clin. Pract.* 98:c49-c53, 2004
65. Prigent A, Bichara M, Paillard M: Hydrogen transport in papillary collecting duct of rabbit kidney. *Am. J. Physiol* 248:C241-C246, 1985
66. Richterich R, Colombo JP: Säure-Basen im Urin, Basel; München; Paris; London; New York; Sydney, S. Karger, 1978, pp 562-566
67. Robertson WG: Epidemiology of urinary stone disease. *Urol. Res.* 18 Suppl 1:S3-S8, 1990
68. Robertson WG: Kidney models of calcium oxalate stone formation. *Nephron Physiol* 98:21-30, 2004
69. Robertson WG, Hughes H: Importance of mild hyperoxaluria in the pathogenesis of urolithiasis-- new evidence from studies in the Arabian peninsula. *Scanning Microsc.* 7:391-401, 1993
70. Robertson WG, Peacock M, Nordin BE: Calcium crystalluria in recurrent renal-stone formers. *Lancet* 2:21-24, 1969

71. Robertson WG, Peacock M, Nordin BE: Inhibitors of the growth and aggregation of calcium oxalate crystals in vitro. *Clin. Chim. Acta* 43:31-37, 1973
72. Rollinghoff W: Effects of a stay in the tropics on the origin and course of renal calculus disease (II). *Z. Tropenmed. Parasitol.* 18:133-140, 1967
73. Roscoe JM, Goldstein MB, Halperin ML, Wilson DR, Stinebaugh BJ: Lithium-induced impairment of urine acidification. *Kidney Int.* 9:344-350, 1976
74. Schubert G, Chudnovskaia MV, Brien G, Tynaliev MT, Popovkin NN, Timin AR: The characteristics of the chemical composition and structure of urinary stones and their prevalence in the cities of Moscow, Berlin and of the Kirghiz SSR. *Urol. Nefrol. (Mosk)*49-54, 1990
75. Stitzer SO, Martinez-Maldonado M: Clearance methods in the rat, chap. 2, in *Renal Pharmacology (vol 4B)*, edited by Martinez-Maldonado M, New York and London, Plenum Press, 1978, pp 23-40
76. Straub M, Hautmann RE: Prevention of nephrolithiasis. Established strategies and new concepts. *Urologe A* 43:440-449, 2004
77. Straub M, Hautmann RE: Developments in stone prevention. *Curr. Opin. Urol.* 15:119-126, 2005
78. Straub M, Strohmaier WL, Berg W, Beck B, Hoppe B, Laube N, Lahme S, Schmidt M, Hesse A, Koehrmann KU: Diagnosis and metaphylaxis of stone disease. Consensus concept of the National Working Committee on Stone Disease for the upcoming German Urolithiasis Guideline. *World J. Urol.* 23:309-323, 2005
79. Strohmaier WL: Socioeconomic aspects of urinary calculi and metaphylaxis of urinary calculi. *Urologe A* 39:166-170, 2000
80. Tiselius HG: The effect of pH on the urinary inhibition of calcium oxalate crystal growth. *Br. J. Urol.* 53:470-474, 1981
81. Tiselius HG, Bek-Jensen H, Fornander AM, Nilsson MA: Crystallization properties in urine from calcium oxalate stone formers. *J. Urol.* 154:940-946, 1995
82. Trinchieri A: Epidemiology of urolithiasis. *Arch. Ital. Urol. Androl* 68:203-249, 1996
83. Trinchieri A, Castelnovo C, Lizzano R, Zanetti G: Calcium stone disease: a multiform reality. *Urol. Res.* 33:194-198, 2005
84. Trinchieri A, Mandressi A, Luongo P, Longo G, Pisani E: The influence of diet on urinary risk factors for stones in healthy subjects and idiopathic renal calcium stone formers. *Br. J. Urol.* 67:230-236, 1991

85. Trinchieri A, Mandressi A, Luongo P, Rovera F, Longo G: Urinary excretion of citrate, glycosaminoglycans, magnesium and zinc in relation to age and sex in normal subjects and in patients who form calcium stones. *Scand. J. Urol. Nephrol.* 26:379-386, 1992
86. Trinchieri A, Mandressi A, Zanetti G, Ruoppolo M, Tombolini P, Pisani E: Renal tubular damage after renal stone treatment. *Urol. Res.* 16:101-104, 1988
87. Trinchieri A, Ostini F, Nespoli R, Rovera F, Zanetti G, Pisani E: Hyperoxaluria in patients with idiopathic calcium nephrolithiasis. *J. Nephrol.* 11 Suppl 1:70-72, 1998
88. Tschope W, Ritz E, Haslbeck M, Mehnert H, Wesch H: Prevalence and incidence of renal stone disease in a German population sample. *Klin. Wochenschr.* 59:411-412, 1981
89. Vahlensieck EW, Bach D, Hesse A: Incidence, Prevalence and mortality of urolithiasis in the German Federal Republic. *Urol. Res.* 10:161-164, 1982
90. Vahlensieck EW, Bach D, Hesse A, Strenge A: Epidemiology, Pathogenesis and diagnosis of calcium oxalate urolithiasis. *Int. Urol. Nephrol.* 14:333-347, 1982
91. Vallon V, Schwark JR, Richter K, Hropot M: Role of Na(+)/H(+) exchanger NHE3 in nephron function: micropuncture studies with S3226, an inhibitor of NHE3. *Am. J. Physiol Renal Physiol* 278:F375-F379, 2000
92. Vasuvattakul S, Gougoux A, Halperin ML: A method to evaluate renal ammoniogenesis in vivo. *Clin. Invest Med.* 16:265-273, 1993
93. Von Niederhausern W: Problems in the clinical evaluation of an endoscopic lithotripter. The case of the Lithoclast EMS. *Ann. Urol. (Paris)* 28:84-90, 1994
94. Wang YX, Clarke GD, Sbacchi M, Petrone G, Brooks DP: Contribution of alpha-2 adrenoceptors to kappa opioid agonist-induced water diuresis in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 270:244-249, 1994
95. Weinman EJ, Bennett SC, Brady RC, Harper JF, Hise MK, Kahn AM: Effect of cAMP and calmodulin inhibitors on water absorption in rat proximal tubule. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 176:322-326, 1984
96. Weinman EJ, Dubinsky WP, Jr., Shenolikar S: Regulation of the renal Na⁺-H⁺ exchanger. *Hosp. Pract. (Off Ed)* 24:157-61, 164, 167, 1989
97. Williams AW, Wilson DM: Dietary intake, absorption, metabolism, and excretion of oxalate. *Semin. Nephrol.* 10:2-8, 1990

7. Danksagung

An erster Stelle gebührt mein Dank Herrn Dr. Michael Straub, für seine stete Hilfsbereitschaft, für viel Geduld und kreative Ideen.

Für eine insgesamt hervorragende Betreuung, die großen Spaß gemacht hat.

Meinem Doktorvater und lt. Oberarzt Herrn Prof. Dr. Jürgen Gschwend.

Frau Lydia Weber.

Für alle guten Taten im Labor.

Meinen Eltern.

Meinen Brüdern Andreas und Stefan.

Gewidmet ist die Arbeit in memoriam meiner Mutter Helga Meilinger.