

Aus dem Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin der Universität zu Köln  
Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin  
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. J. Dötsch

Pilotstudie zur Pyridoxalphosphattherapie bei Patienten mit primärer Hyperoxalurie Typ I  
(PHOX-B6-Pilot)

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Universität zu Köln

vorgelegt von  
Sina Dorothea Kohbrok  
aus Neumünster

promoviert am 11. Februar 2015





Die dieser Arbeit zugrunde liegende klinische Studie wurde durch Professor Dr. med. B. Hoppe nach dem Arzneimittelgesetz geplant und initiiert und gemäß „good clinical practice (GCP)“ durchgeführt.

Die Patienten wurden von mir gemeinsam mit der Studienärztin Frau Dr. med. H.-K. Hoyer-Kuhn untersucht.

Die erhobenen klinischen Daten und Laborbefunde wurden von mir in die Studiendatenbank übertragen.

Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Studienergebnisse sind von mir eigenständig ausgewertet worden.

## **Danksagung**

Mein Dank gilt meinem klinischen und wissenschaftlichen Lehrer und Doktorvater Professor Dr. med. Bernd Hoppe, für die Überlassung des Themas, seine fachliche Unterstützung und konstruktive Kritik.

Ich danke Dr. med. Heike-Katharina Hoyer-Kuhn für ihre tatkräftige Unterstützung während der gesamten Studiendauer, während des Schreibens und der Durchsicht meiner Dissertation. Sie hatte immer ein offenes Ohr für meine Probleme und Fragen, stand mir zu jeder Zeit geduldig mit Gesprächen und Anregungen motivierend zur Seite und war für mich immer eine kompetente Hilfe.

Bedanken möchte ich mich auch bei der ehemaligen Studienkordinatorin des Zentrums für Kinder und Jugendmedizin Köln, Sabine Schmidt, für ihre Gewissenhaftigkeit und Anleitung während der Bearbeitung der Studiendaten.

Ich danke meinem Freund für seine Geduld mit mir während des Studiums und dafür, dass er mich zu jeder Zeit unterstützt und immer wieder motiviert hat.

Ganz besonderer Dank gilt nicht zuletzt meinen Eltern, ohne die mein Medizinstudium und infolgedessen diese Dissertation nicht möglich gewesen wären. Ich danke Ihnen für ihre liebevolle Unterstützung, Anerkennung und dass sie immer vorbehaltlos hinter mir stehen.

Für meine Eltern



---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1 Definition und Einführung in die Thematik der primären Hyperoxalurien .....	1
1.2 Sekundäre Hyperoxalurie .....	4
1.3 Primäre Hyperoxalurie Typ I .....	6
1.3.1 Epidemiologie .....	6
1.3.2 Pathomechanismus .....	7
1.3.3 Der Glyoxylatstoffwechsel .....	10
1.3.3.1 Oxalat .....	11
1.3.3.2 Endogene Oxalatproduktion .....	11
1.3.3.3 Exogenes Oxalat .....	12
1.3.4 Diagnosestellung .....	13
1.3.4.1 Klinik der PH I .....	13
1.3.4.2 Urinanalyse .....	14
1.3.4.3 Plasma .....	15
1.3.4.4 Leberbiopsie .....	16
1.3.4.5 Molekulargenetische Diagnostik .....	18
1.3.5 Grundlagen der Genetik bei PH I .....	19
1.3.6 Therapieansätze .....	21
1.3.6.1 Medikamentöse Therapie .....	21
1.3.6.2 Urologische Therapieoptionen .....	25
1.3.6.3 Dialyseverfahren bei PH I .....	26
1.3.6.4 Transplantation .....	27
1.4 Hypothese und Fragestellung .....	31
1.4.1 Primärer Endpunkt .....	32
1.4.2 Sekundäre Endpunkte .....	33
<b>2. METHODIK .....</b>	<b>34</b>
2.1 Ablauf der Studie .....	34
2.2 Patientenkollektiv .....	37
2.2.1 Einschlusskriterien .....	37
2.2.2 Ausschlusskriterien .....	38
2.3 Studienmedikation .....	39
2.4 Datenerhebung .....	40

---

---

2.5 Statistik und Datenanalyse .....	41
<b>3. ERGEBNISSE .....</b>	<b>43</b>
3.1 Baseline .....	43
3.2 Urinoxalatausscheidung .....	44
3.3 Pyridoxalphosphatspiegel .....	48
3.4 Nephrokalzinose und Urolithiasis .....	50
3.5 Sicherheitsaspekte .....	51
<b>4. DISKUSSION .....</b>	<b>52</b>
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>60</b>
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>61</b>
<b>7. VORABVERÖFFENTLICHUNG VON ERGEBNISSEN .....</b>	<b>72</b>
<b>8. ANHANG .....</b>	<b>73</b>
8.1 Abbildungsverzeichnis .....	73
8.2 Diagrammverzeichnis .....	73
8.3 Tabellenverzeichnis .....	73

---

**Abkürzungsverzeichnis**

AE	= Adverse Event
AGT	= Alanin-Glyoxylat-Aminotransferase
AGXT	= Für die AGT codierendes Gen
βPCaOx	= Plasmacalciumoxalatsättigung
Bzgl.	= bezüglich
Ca.	= circa
CaOx	= Calciumoxalat
CAPD	= Continuous ambulatory peritoneal dialysis
CI	= Konfidenzintervall
CKD	= Chronic kidney disease
CNI	= Chronische Niereninsuffizienz
DAO	= D-Aminosäure-Oxidase
D. h.	= Das heißt
eGFR	= Estimated glomerular filtration rate
ESRF	= End stage renal failure
ESWL	= Extrakorporale Stoßwellenlithotripsie
Evtl.	= Eventuell
Ggf.	= Gegebenenfalls
GO	= Glykolat-Oxidase
GRHPR	= Glyoxylat-Reduktase/Hydroxypyruvat-Reduktase
HOGA1	= 4-Hydroxy-2-Oxoglutarat-Aldolase
HPLC	= High Performance Liquid Chromatography
Kb	= Kilobite
KDa	= Kilodalton
KOF	= Körperoberfläche
PD	= Peritonealdialyse
PGly	= Plasmaglykolat
PNL	= Perkutane Nephrolitholapaxie
POx	= Plasmaoxalat
PTS1	= Atypische peroxismale targeting Sequenz
RTA	= Renal tubuläre Azidose
SAE	= Serious Adverse Event

- U. a. = Unter anderem
- U. U. = Unter Umständen
- V. a. = Vor allem
- Z. B. = Zum Beispiel

## 1. Einleitung

### 1.1 Definition und Einführung in die Thematik der primären Hyperoxalurien

Die primären Hyperoxalurien (PH Typ I-III) sind definiert durch einen angeborenen Defekt des Glyoxylatstoffwechsels und der daraus resultierenden endogenen Überproduktion von Oxalsäure. Sie werden autosomal-rezessiv vererbt und zählen mit einer Prävalenz von 0,8 bis 2,9 pro 1 Million Einwohner zu den seltenen Erkrankungen. Die Inzidenz liegt bei 0,1 bis 0,2 pro 1 Mio. Einwohner, wobei die Dunkelziffer aufgrund von oftmals sehr verzögerter Diagnosestellung, vor allem aber wegen einer extremen Heterogenität der Erkrankungen auch mit leichteren Verläufen (v.a. bei der PH II) wahrscheinlich weitaus höher liegt (44).

Bei der PH I, die mit 80% die häufigste Form ist (70), liegt der charakteristischerweise extrem erhöhten Urinausscheidung von Oxalat eine endogene, also primäre Überproduktion von Oxalat und Glykolat zugrunde. Sie entsteht durch eine zu geringe oder komplett fehlende Aktivität, oder gar mitochondriale Mislokation der eigentlich peroxisomalen leberspezifischen Alanin-Glyoxylat-Aminotransferase (AGT) (32, 55), deren Gen auf Chromosom 2q36-37 lokalisiert ist (73). Das funktionelle Defizit dieses Enzyms führt zur massiven endogenen Oxalatproduktion, damit zur Hyperoxalurie, sowie zur Übersättigung des Urins für Calciumoxalat und letztlich zu rezidivierender Urolithiasis und/oder progredienter Nephrokalzinose. Dadurch, aber vor allem durch die durch die Kristallablagerungen im Nierengewebe ausgelöste Inflammationsreaktion (32, 50) kommt es bei fast allen Patienten mit PH I zum terminalen Nierenversagen (end stage renal failure, ESRF) und damit, Oxalat wird nicht mehr renal eliminiert, zur Multisystemerkrankung durch systemische Oxalatablagerung in allen Organsystemen (systemische Oxalose) (16).

Die infantile Oxalose gilt als die schwerste und problematischste Form der PH I und zeichnet sich durch einen sehr frühen Symptombeginn (meist schon im Säuglingsalter), frühzeitigem Nierenversagen und leider oft infauster Prognose aus (16).

Bei der wesentlich selteneren PH II (10% aller PH Fälle) ist die fehlende oder verminderte Aktivität der ubiquitär vorliegenden, d. h. nicht leberspezifischen Glyoxylat-Reduktase/Hydroxypyruvat-Reduktase (GRHPR), deren zugehöriges Gen auf Chromosom 9 liegt (17, 76), krankheitsverursachend. Auch hier findet sich eine signifikante Hyperoxalurie, sowie typischerweise eine vermehrte Ausscheidung von L-Glyzerinsäure (42, 79). Die PH II hat im Vergleich zur PH I den weniger fulminanten Verlauf, was auch zur fehlenden Diagnose bei vielen Patienten beitragen könnte (49). Ein terminales Nierenversagen findet sich bei etwa 20% der PH II Patienten.

Eine weitere Form der primären Hyperoxalurie, die PH III wird durch eine verminderte Aktivität wiederum leberspezifischer 4-Hydroxy-2-Oxoglutarat Aldolase (HOGA1) beeinflusst. Das HOGA1 Gen findet sich auf Chromosom 10 (5, 66). Der genaue pathophysiologische Hintergrund, der zur offensichtlichen endogenen Überproduktion von Oxalat führt, wird noch kontrovers diskutiert. Verglichen mit der PH I/II ist die Urinoxalatekretion bei dieser Form der PH etwas niedriger, jedoch sind die Calcium- und Harnsäureausscheidung höher, oder oftmals sogar erhöht (5, 66). Überraschenderweise zeigen die Patienten nach initial fulminantem Krankheitsverlauf mit stark rezidivierender Urolithiasis, in der 2. Oder 3. Lebensdekade plötzlich einen klinisch silenten Verlauf, dies obwohl vor allem die Hyperoxalurie persistiert. Ein terminales Nierenversagen wurde bisher noch bei keinem Patienten mit PH III beschrieben (32).

Weitere Patienten mit schwerer Hyperoxalurie und PH ähnlichem Phänotyp aber negativer genetischer Untersuchung für die bekannten PH Gene werden derzeit noch als unklassifizierte Hyperoxaluriker bezeichnet. Der genaue Pathomechanismus dieser non-PH I-III ist noch nicht gefunden (32).

Allen Formen von PH aber vor allem der PH I, die im Folgenden genauer erläutert werden soll, liegt eine übermäßige endogene Produktion von Oxalat zu Grunde. Da dieses Oxalat vom Menschen nicht weiter verstoffwechselt werden kann, wird es vor allem über die Niere ausgeschieden. Im Urin bindet Oxalat an Calcium, es entstehen unlösliche Calcium-Oxalat (CaOx) Komplexe, die in Form von rezidivierender Harnsteinbildung und/oder Nephrokalzinose, aber auch durch einen chronischen Inflammationsprozess

---

über kurz oder lang, v. a. bei PH I, aber auch bei PH II in einem terminalen Nierenversagen münden (21, 44).

Fällt im Zuge dessen die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) unter 30-40 ml/min\*1,73 m<sup>2</sup>, wird Oxalat nicht mehr ausreichend renal eliminiert und die Plasmaoxalatkonzentration (POx, Referenzwert < 7,4 µmol/l (36)) steigt an. PH I Patienten erreichen diesbezüglich höhere POx Werte (> 80 µmol/l) als non-PH Patienten (40-60 µmol/l) im Nierenversagen und sind so auch dann gut diagnostizierbar (55). POx Werte von > 30 µmol/l übersättigen als Konsequenz das Plasma für CaOx ( $\beta$ PCaOx > 1 (37)) und so kommt es zu systemischen Ablagerungen nicht mehr nur in der Niere, sondern auch in anderen Geweben. Dieses Stadium der Erkrankung wird systemische Oxalose genannt und ist nun als Multisystemerkrankung anzusehen und als solche zu therapieren. Es sollte versucht werden diesen Zustand unbedingt zu verhindern oder hinauszuzögern, da Calciumoxalatkristalle toxisch auf Zellen und Gewebe wirken (32, 67). Ansammlungen in den Knochen, der Retina, dem Myokard, den Gefäßwänden oder der Haut rufen Oxalatosteopathie, Retinopathie und Kardiomyopathie hervor, sind schwer zu therapieren und führen unbehandelt zum Tod des Patienten. Vor allem im Knochen und im Knochenmark reichern sich hohe Konzentrationen von Calciumoxalat an, dies führt zu Schmerzen, Verformungen und pathologischen Frakturen, bzw. zu therapieresistenter Anämie. Verglichen mit non-PH Patienten im Nierenversagen ist die Konzentration auch hier um ein Vielfaches höher (62).

Angesichts der schwerwiegenden Komplikationen und Folgen einer primären Hyperoxalurie sind eine frühzeitige Diagnose und ein schneller adäquater Therapiebeginn von größter Bedeutung für die Dauer des symptomfreien Intervalls und den Erhalt der Nierenfunktion. Jeder Patient mit Urolithiasis bzw. Nephrokalzinose sollte Anlass sein, weiterführende Diagnostik durchzuführen, denn wenn das Stadium der terminalen Niereninsuffizienz erreicht ist, erweist sich die Elimination von Oxalat über Dialyse immer als unzureichend (49). Erste Symptome zeigen sich bei der Mehrheit der Patienten schon vor dem 10. Lebensjahr (78) meist in Form von rezidivierenden Steinabgängen (bestehend aus CaOx Mono- und Dihydrat). Schwere Verläufe, die schon im Säuglingsalter symptomatisch werden (bis

zu 16% der PH I Patienten (14)), manifestieren sich dagegen eher in Form einer ausgeprägten Nephrokalzinose und frühzeitiger Niereninsuffizienz mit den Begleitproblemen von renaler Anämie, Azidose, Wachstums- und Gedeihstörungen und Hypertonus. Viele dieser Patienten mit infantiler Oxalose ist im Verlauf kaum mehr zu helfen und sie sterben noch bevor man hätte transplantieren können (16). Im Kontrast dazu gibt es aber auch immer wieder Patienten, die aus bisher noch nicht erklärbaren Gründen erst im Alter von 30-50 Jahren symptomatisch werden oder Patienten bei denen die richtige Diagnose erst dann gestellt wird (49). Bei bis zu 35% der PH I-Patienten geschieht dies erst, wenn das Stadium der chronischen Niereninsuffizienz (CNI) schon erreicht, und Symptome der systemischen Oxalose aufgetreten sind (32, 39). Bei einigen Patienten wird sogar erst nach Nierentransplantation und anschließendem Transplantatversagen durch erneute Oxalose die Diagnose PH I gestellt (39). Anfang der neunziger Jahre lag das Durchschnittsalter bei Eintreten der Niereninsuffizienz für die Hälfte der Patienten bei 15 Jahren (53). Studien aus den Folgejahren prognostizierten den statistischen Beginn der CNI nur noch für 20% der 15-jährigen bzw. 50% der 25-jährigen (10, 52). Grund zur Hoffnung geben neuere Studien, die den statistischen Beginn der Niereninsuffizienz auf > 30 Jahre datieren (15, 56, 87). Diese Entwicklung ist der heutzutage erhöhten Sensibilität, der schnelleren und besseren Diagnosestellung, v. a. im pädiatrischen Bereich und damit der Möglichkeit einer frühzeitigen Therapieeinleitung zu verdanken.

## **1.2 Sekundäre Hyperoxalurie**

Eine eigenständige Entität stellen die sekundären bzw. diätetischen/enteralen Hyperoxalurien dar. Sie führen durch eine exzessive exogene, nahrungsabhängige Aufnahme von Oxalat und/oder erhöhter Absorption im Gastrointestinaltrakt (Hyperabsorption > 10%) ebenfalls zu Hyperoxalurie und im weiteren Verlauf zu CaOx-Konkrementen im Urogenitaltrakt. Der überwiegende Teil der Harnsteine besteht wie bei den primären Hyperoxalurien aus einem Gemisch aus CaOx Monohydrat und CaOx Dihydrat. Der Pathomechanismus der überwiegend enteral

---

begründeten Variante basiert auf der Annahme, dass ein Übermaß an freien Fettsäuren im Darm Calcium und Magnesium bindet und folglich kaum Komplexbindungen mit Oxalat mehr zustande kommen. Die freie Oxalsäurekonzentration steigt, welches dann über die Darmwand absorbiert und im Urin ausgeschieden wird (4). Eine begleitende reduzierte Gallensäureadsorption kann die Oxalsäureresorption zusätzlich noch fördern. Als ein möglicher Kofaktor wird auch das Fehlen von normalerweise den Darmtrakt besiedelnden Oxalat degradierenden Bakterien (*Oxalobacter formigenes*), z. B. aufgrund von regelmäßigem Antibiotikaeinsatz angenommen (49). Hier fehlt dann der intestinale Oxalatabbau, damit liegt wieder vermehrt freie und damit resorbierbare Oxalsäure vor. Der diätetisch bedingten Hyperoxalurie liegt eine exzessive Aufnahme von Oxalat über die Nahrung zugrunde. Die Urinoxalatkonzentration beider Varianten ist zwar im Vergleich zur PH im Regelfall geringer (meist  $< 1,0$  mmol/24h), führt aber nichtsdestotrotz zu rezidivierender Urolithiasis. Diese Form der Hyperoxalurie findet sich vor allem bei Patienten mit Malabsorptionssyndromen, wie z. B. bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, Kurzdarmsyndrom oder Mukoviszidose (46). In der Mehrzahl der Fälle ist sie aber idiopathisch bedingt, das heißt, dass keine ausreichende Erklärung für den Symptomkomplex gefunden werden kann (83). Wichtig ist in jedem Fall eine klare Unterscheidung zwischen den primären Hyperoxaluriem und der sekundären Form, da die Therapieansätze sehr unterschiedlich sind.

Diagnostische Mittel sind die Untersuchung von 24h-Sammelurinen, Fragebögen zu Essgewohnheiten und evtl. übermäßigem Oxalatverzehr und die Erfassung von POx- und Uringlykolatkonzentrationen. Erhärtet sich der Verdacht auf eine sekundäre Hyperoxalurie, empfiehlt sich eine anschließende Stuhluntersuchung auf Oxalat abbauende Bakterien, wie z. B. *Oxalobacter formigenes*. Eine Studie aus dem Jahr 2008 diskutiert außerdem die Möglichkeit einer Quantifizierung der intestinalen Oxalatabsorption mit Hilfe von [ $^{13}\text{C}_2$ ]Oxalat (41, 83). Durch diesen Test konnte in einer kürzlich publizierten Arbeit gezeigt werden, dass in der Tat eine gesteigerte Oxalatabsorption bei Patienten mit M. Crohn zur Hyperoxalurie führt (46).

## 1.3 Primäre Hyperoxalurie Typ I

### 1.3.1 Epidemiologie

Die vorliegende Arbeit und die ihr zugrunde liegende Pilotstudie beschäftigen sich mit der häufigsten Form der Hyperoxalurie, der PH I, die im folgenden Abschnitt genauer erläutert werden soll. Eine genaue Angabe zur Prävalenz der Erkrankung ist aufgrund ihrer Seltenheit und der hohen Dunkelziffer schwierig. Unterschiedliche Prävalenzdaten sind beschrieben: 1/1 Mio. Einwohner in Frankreich, 2/1 Mio. Einwohner in der Schweiz und 2,9/1 Mio. Einwohner in den Niederlanden (10, 32, 52, 87). Damit wird in Europa die Prävalenz auf 1-2/1 Mio. Einwohner und die Inzidenz auf 0,1-0,2/1 Mio. Einwohner geschätzt (32, 44). Das bedeutet in Frankreich beispielsweise eine Inzidenzrate von 1/120.000 Lebendgeburten und in der Schweiz eine Rate von 1/98.000 Lebendgeburten (16, 52). In Deutschland waren Ende 2011 134 registrierte Fälle von PH I bekannt, wobei ein großer Teil erst in den letzten Jahren diagnostiziert werden konnte, vermutlich aufgrund der verbesserten Diagnosemöglichkeiten und Sensibilisierung für diese Erkrankung. Dennoch besteht weiterhin Bedarf an Aufklärung unter den Kinderärzten, den Urologen und Nephrologen, da die zeitliche Verzögerung zwischen dem Auftreten der ersten Symptome und der Diagnosestellung bei zwei Dritteln der Patienten noch immer durchschnittlich 8 Jahre beträgt und ein Drittel erst zum Zeitpunkt der terminalen Niereninsuffizienz diagnostiziert wird (39, 87). Bei einer Erkrankung wie der PH I ist das fatal, da ein früher Therapiebeginn entscheidend für den weiteren Verlauf ist. Die Erkrankung ist in der Gesamtschau in Europa für 0,5-2,7% und in Nordamerika für 0,5-0,7% der Dialysepatienten Grund für die Niereninsuffizienz bei Kindern (15, 65). Eine lokale Häufung der Krankheitsfälle findet man in Teilen Nordafrikas, auf den Kanarischen Inseln oder dem mittleren Osten, da dort eine erhöhte Zahl an konsanguinen Eheschließungen zu finden ist, was das Auftreten von PH I als autosomal-rezessive Erkrankung begünstigt (32, 55). In Kuwait beispielsweise ist die PH für ca. 10% und in Tunesien für ca. 13% der CNI bei Kindern verantwortlich (6, 15). Verglichen mit den anderen Subtypen

stellt die PH I mit 70-80% aller bekannten PH-Fälle den größten Anteil dar (70).

### **1.3.2 Pathomechanismus**

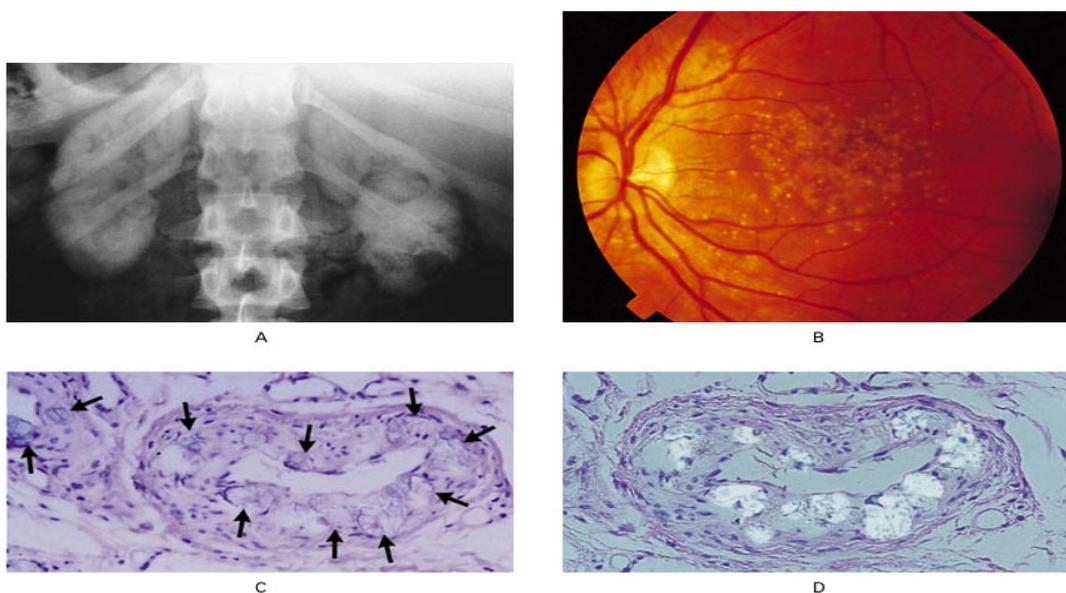
Die PH I wird verursacht durch einen angeborenen Mangel bzw. eine reduzierte Aktivität, oder eine mitochondriale Mislokation der eigentlich peroxisomalen leberspezifischen AGT. Als Kofaktor des defizienten Enzyms spielt Pyridoxalphosphat (Vitamin B6) eine wichtige Rolle (19, 69). Hauptproblem ist, dass Glyoxylat nicht zu Glycin abgebaut wird, damit akkumuliert und dann mittels Glyoxylatreduktase in Oxalat und Glykolat umgewandelt wird. Beide Endprodukte müssen als Endprodukte des Stoffwechsels renal eliminiert werden, wirken aber in der erhöhten Konzentration schon alleine cytotoxisch und induzieren in der Niere eine chronische Inflammationsreaktion. Die Nierenfunktion bzw. die GFR bleiben u. U. lange Zeit im Normbereich und die Patienten fallen lediglich durch teils unspezifische oder missgedeutete Symptome wie rezidivierende Harnwegsinfekte, Nierenkoliken, Hämaturie und/oder sporadische Steinabgänge auf (70). Im Regelfall führen diese ersten Symptome aber nicht gleich zur richtigen Diagnose, sondern es vergehen bei zwei Dritteln der Patienten durchschnittlich  $3,4 \pm 5,4$  Jahre bis die Symptome richtig gedeutet und wegweisende diagnostische Maßnahmen eingeleitet werden. Das übrige Drittel der Patienten erhält die Diagnose PH sogar erst im Stadium der terminalen Niereninsuffizienz (39). In seltenen Fällen sind die Betroffenen zum Zeitpunkt der Diagnose völlig symptomfrei und die Nephrokalzinose erweist sich als Zufallsbefund beispielsweise im Rahmen einer Abdomensonografie oder als Screeningbefund bei familiärer Häufung (52). Die am meisten betroffenen Kinder, die an der Form der infantilen Oxalose leiden (ca. 15% der PH I Patienten (87)), werden durch die charakteristische Trias aus Gedeihstörung, therapieresistenter Anämie und metabolischer Azidose meist schneller diagnostiziert. Sie präsentieren sich durchschnittlich im Alter von 6 Monaten mit meist schon stark eingeschränkter Nierenfunktion bzw. im Nierenversagen (80% der Patienten sind mit 3 Jahren niereninsuffizient (15)) und typischer Nephrokalzinose aber nur selten

Zeichen einer Urolithiasis. Die Hälfte dieser Kinder überlebt das erste Jahr nicht aufgrund von limitierten Therapieoptionen und folglich durch die Auswirkungen der systemischen Oxalose (14, 16).

Bezeichnend für die PH I ist ihre große Variabilität im Verlauf und in der individuellen Ausprägung der Symptome. Trotz identischen Genotyps kann der Phänotyp innerhalb einer Familie stark variieren, wie beispielsweise der Zeitpunkt der Erstsymptome oder der Beginn des CNI. Gründe hierfür sind noch nicht abschließend geklärt. Kontrovers diskutiert werden noch ungeklärte Auswirkungen des Genotyps, oder eine eventuelle Geschlechterabhängigkeit, wie sie Mandrile et al. beschreiben (59), aber auch äußere Einwirkungen auf die Nierenfunktion und in geringem Maße auch das Vorliegen von Oxalobacter im Dickdarm und folglich die individuelle Ausscheidungsfähigkeit von Oxalat über den Gastrointestinaltrakt. Dazu gehören aber auch begleitende Infektionen, unterschiedliche Flüssigkeitszufuhr und mit der Nahrung aufgenommenes Vitamin B<sub>6</sub>, wodurch die Löslichkeit von Oxalat im Urin und dadurch die Bildung von CaOx unabhängig von der Grunderkrankung beeinflusst wird. Auch die Folgen der *AGXT* Mutation im funktionellen Sinne (Lokalisation im Peroxisom oder Mitochondrium), eine eventuelle Restfunktion der AGT und die Medikamentencompliance sind Faktoren, die die Nierenfunktion beeinflussen und ganz interindividuelle Unterschiede bezüglich der klinischen Expression der Erkrankung innerhalb einer Familie bedingen können. Sogar eine für eine autosomal rezessive Erkrankung ungewöhnliche vertikale Vererbung innerhalb einer Familie, in der zwei aufeinanderfolgende Generationen betroffen waren, ist beschrieben (33). Aber nicht nur der Vererbungsmodus, sondern auch die fehlende Korrelation zwischen Genotyp und klinischem Phänotyp warfen nicht nur in dieser Familie Fragen auf. So werden auch immer wieder Familien beobachtet, in denen die Schwere der Erkrankung trotz gleichem Genotyp und vergleichbarer enzymologischer Aktivität stark variiert (33). Oder es stellen sich Familien vor, in denen sich der Patient mit der geringeren Restenzymfunktion als der klinisch gesündere erweist. Diese familiäre Heterogenität macht deutlich, dass bei dieser Erkrankung nicht von einem klaren Kausalzusammenhang zwischen Enzymaktivität und Phänotyp

---

auszugehen ist. Über die Gründe hierfür wird spekuliert, sie sind jedoch noch weitgehend ungeklärt (33, 59). In diesem Zusammenhang sei auch auf die Heterogenität in Bezug auf das Ansprechen auf eine Vitamin B6-Therapie hingewiesen (siehe Kapitel 1.3.6.1 Medikamentöse Therapie). Es wird auch in dieser Hinsicht eine Korrelation zum krankheitsspezifischen Genotyp vermutet, aber es gibt noch keine hinreichend erklärenden Studien hierzu. Durch dieses breite Symptomspektrum wird eine Diagnose erschwert und, wie schon erwähnt, zeitlich oft verzögert. Für die Patienten bedeutet das einen verspäteten Therapiebeginn und progredienten Abfall der GFR mit einer fortschreitenden Übersättigung des Urins und des Plasmas mit CaOx und schließlich Nierenversagen und systemische Oxalose. Ist dieses Stadium eingetreten, sind die Therapieoptionen begrenzt und es bleibt nur noch die Möglichkeit der aggressiven Hämo- und/oder Peritonealdialyse, wobei keines der Verfahren ausreichende Mengen an Oxalat aus dem Körper eliminieren kann (15, 55). Außerdem verhält sich das Outcome einer möglichen späteren Transplantation umgekehrt proportional zur Länge der Dialysezeit und dem Ausmaß der systemischen Oxalose. In Anbetracht dieses folgenschweren Verlaufs der PH I sollte das Augenmerk auf einer frühen Diagnosestellung anhand der Oxalatekretion im 24h-Sammelurin und weiterführendem Screening und der Beratung von Familienmitgliedern liegen.



**Abbildung 1:** Systemische Oxalose (2) Zu A: Diffuse Nephrokalzinose bei einer 22-jährigen PH I Patientin mit CNI; zu B: Oxalatablagerungen in der Retina; zu C und D: Oxalatablagerungen in den Wänden der Blutgefäße bei der gleichen Patientin

### 1.3.3 Der Glyoxylatstoffwechsel

Die defekte oder fehlende Enzymaktivität der AGT ist der ausschlaggebende Faktor, der zur endogenen Überproduktion von Oxalat führt. Im Glyoxylatstoffwechsel nimmt die AGT eine zentrale Rolle als Alanin-Glyoxylat- und Serin-Pyruvat-Transaminase ein. Das bedeutet, dass unter Verwendung von Vitamin B6 als Kofaktor, Glyoxylat und Alanin zu Pyruvat bzw. Glycin verstoffwechselt werden. Auf diese Weise wird Glyoxylat als grundsätzlich toxische Verbindung für Zellen und Gewebe in den Peroxisomen der Hepatozyten transaminiert und so entgiftet. Glyoxylat selbst wird einerseits durch Einwirkung der D-Amino-Oxidase (DAO) aus Glycin gebildet und entsteht andererseits durch Oxidation von Glykolat. Ein mistargeting der AGT in die Mitochondrien der Hepatozyten oder völlige Inaktivität dieses Enzyms führt bei PH zu einer Akkumulation von Glyoxylat. Alternativ wird diese Verbindung dann mit Hilfe der Glyoxylat-Oxidase (GO) oder durch Laktatdehydrogenase (LDH) in Oxalat umgewandelt. So entsteht das Stoffwechselendprodukt, welches in dieser Form in den Blutkreislauf gelangt und später, da frei filtriert, durch Komplexbildung mit Calcium zu den für die PH charakteristischen unlöslichen Calciumoxalatkristallen in den Tubuli der Nieren oder aber im Nierenparenchym führt. Des Weiteren reduziert die Glyoxylat-Reduktase/ Hydroxypyruvat-Reduktase (GRHPR) einen Teil des Glyoxylats in Glykolat, das ebenfalls bei einem Teil der PH I Patienten in erhöhten Mengen im Urin zu finden ist.

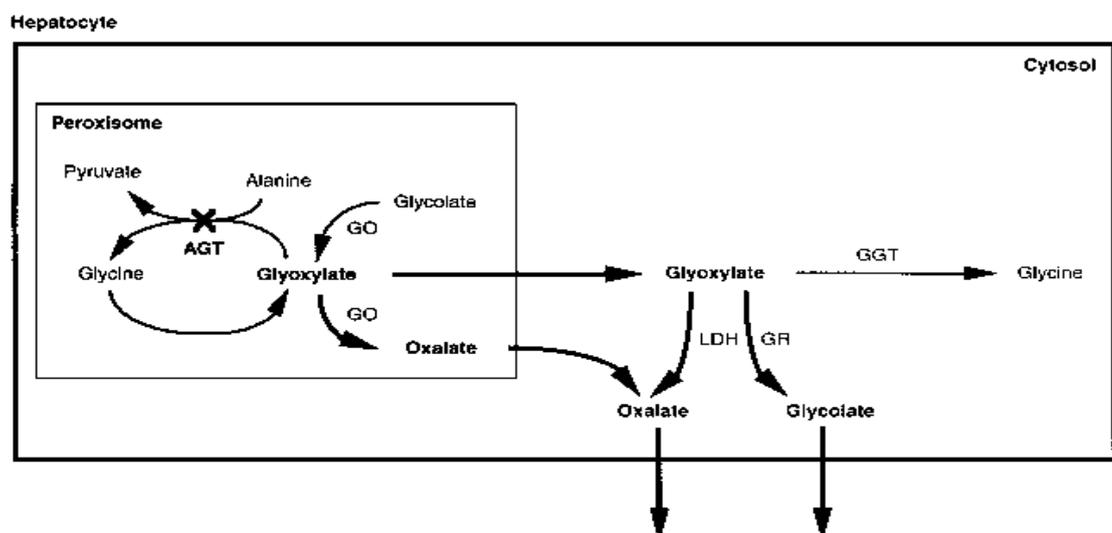


Abbildung 2: Der Glyoxylatstoffwechsel (16)

### 1.3.3.1 Oxalat

Oxalat (Oxalsäure) zählt aufgrund seiner Strukturformel zu den Dikarbonsäuren und gehört mit einer Dissoziationskonstanten von  $K_{s1} = 5,9 \cdot 10^2$  ( $pK_{s1} 1,27$ ) zu den mittelstarken Säuren. Es ist ubiquitär in vielen Pflanzen, Tieren und im menschlichen Körper in unterschiedlichen Konzentrationen vorhanden. Bei physiologischen PH-Werten entstehen aus Oxalat als Anion und Natrium oder Kalium als Kation im menschlichen Körper Alkalioxalate, die gut löslich sind und enteral oder renal eliminiert werden. Es entstehen aber auch unlösliche Calciumoxalatverbindungen.

Oxalat wird im Glomerulus frei filtriert und im proximalen Tubulus sowohl sezerniert als auch resorbiert. Dies führt zu einer netto Sekretionsrate von 10-30% (55). Chelatbindungen mit Calcium stellen bei der PH eines der zentralen Probleme dar, da diese lithogenen Komplexe wasserunlöslich sind und zu Calciumoxalatsteinen und/oder zu CaOx Ablagerungen im Nierenparenchym (Oxalose) und im Stadium der CNI zur systemischen Oxalose, d. h. Ablagerungen in jeglichen Körpergeweben führt. Aber nicht nur die Calciumoxalatkomplexe, sondern auch das Oxalat als solches wirkt in hohen Dosen als Zellgift u. a. auf die renalen Tubuluszellen. Dies geschieht durch seine unterstützende Funktion bei der Produktion von freien Radikalen (oxidativer Stress), was in einer verkürzten Lebensdauer und Wachstumsrate dieser Tubuluszellen deutlich wird (55).

### 1.3.3.2 Endogene Oxalatproduktion

Um die Pathogenese der PH und der sekundären Hyperoxalurie zu verstehen, ist die Unterscheidung zwischen endogen produziertem und exogen mit der Nahrung zugeführtem Oxalat essentiell. Denn gerade im Hinblick auf die Therapie der beiden Erkrankungen ist es wichtig zu verstehen warum bei der sekundären Hyperoxalurie eine oxalatarme Diät durchaus zielführend ist, wohingegen eine solche Restriktion bei der PH kaum nennenswerten Effekt in Bezug auf die Reduktion der Urinoxalatausscheidung hat. Dazu ist es wichtig zu wissen, dass die tägliche Menge an physiologisch anfallendem Oxalat von ca. 10-40 mg (0,17—0,5

mmol) im menschlichen Körper vor allem endogenen Ursprungs ist. Ungefähr 40% davon wiederum entfallen auf den in Abschnitt 1.3.3 beschriebenen Abbau von Glyoxylat in den Hepatozyten. Weitere Beiträge zu dem täglichen Oxalatpool liefern auch die Stoffwechselprozesse im Zuge der Umwandlung von Glykolat und Ascorbinsäure. Wie groß dieser Anteil ist, konnte noch nicht abschließend geklärt werden und scheint auch individuell zu variieren (63, 74).

### **1.3.3.3 Exogenes Oxalat**

Der oft frustrane Versuch bei einer Erkrankung wie der PH einen suffizienten Therapieansatz zu finden, hat logischerweise schon zu vielen Untersuchungen geführt, die das Ziel hatten, herauszufiltern ob und in welchem Umfang eine erhöhte Zufuhr von exogenem Oxalat Einfluss auf die Bildung von Calciumoxalatsteinen hat. Statistisch gesehen nimmt die Bevölkerung in den westlichen Industrienationen zwischen 44 und 351 mg/24h (0,5-4,0 mmol/24h) mit der täglichen Nahrung zu sich. Bei erhöhtem Konsum von besonders oxalatreichen Lebensmitteln wie Spinat und Rhabarber kann dieser Wert auch weitaus höher liegen. Wieviel Oxalat, aber tatsächlich über die Darmwand des Kolons und des Dünndarms absorbiert wird, ist laut Studien schwer vorherzusagen, da die Aufnahme nicht linear zur Menge am aufgenommenen Oxalat bzw. zur Absorptionsrate erfolgt. Sie ist neben Kohlenhydraten, Proteinen und Zuckern beispielsweise abhängig von der begleitend konsumierten Menge an Calcium und Magnesium. Diese und weitere Spurenelemente gehen mit dem Großteil des Oxalats im Intestinaltrakt feste Verbindungen ein, die dann enteral ausgeschieden werden und keinen Beitrag mehr zur renalen Oxalatbelastung leisten. Auch das Fäkalbakterium *Oxalobacter formigenes*, versehen mit zwei oxalatdegradierenden Enzymen, trägt dazu bei, dass die Menge an exogenem zugeführtem Oxalat noch vor der Absorption verringert wird. Zur massiven Hyperoxalurie kann es aber dennoch kommen, wenn bei durchschnittlicher Absorptionsrate die Nahrung übermäßig stark oxalathaltig ist, kaum Komplexbindungen intestinal zustande kommen, die enterale Kolonisationsrate an *Oxalobacter formigenes* sehr gering ist oder aus

anderen Gründen eine übermäßig starke Aufnahme des Oxalats vorliegt (74). Auch Mutationen in Genen, die den Transport über die Darmmucosa regulieren, könnten eine mögliche Ursache darstellen (83). Darüber hinaus kann ebenfalls eine übermäßige Zufuhr von Ascorbinsäure zu erhöhten Oxalatspiegeln und folglich zu lithogenen Prozessen im Urogenitaltrakt führen (63). Studien mit [<sup>13</sup>C]-markiertem Oxalat haben erwiesen, dass bei gesunden Probanden nur 2,2-18,5% des mit der Nahrung aufgenommenen Oxalats tatsächlich absorbiert wird. Ab einem Wert von > 15% spricht man von einer übermäßigen Absorption. Wissenschaftliche Ergebnisse zeigen, dass die Absorptionsrate bei PH Patienten mit durchschnittlich 7% sogar noch unter der von gesunden Probanden liegt. Gleichzeitig haben die PH Patienten aber auch die höchste Urinoxalatausscheidung. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass der wesentliche Teil an Oxalat bei dieser Erkrankung endogen produziert wird und diätetische Restriktionen wenig Auswirkungen auf die systemische Oxalatbelastung haben (15). Dies gilt aber lediglich für die PH, denn Patienten mit sekundärer Hyperoxalurie oder idiopathischem Steinleiden zeigen typischerweise signifikant höhere Absorptionsraten (74, 83).

### **1.3.4 Diagnosestellung**

#### **1.3.4.1 Klinik der PH I**

Wie schon erwähnt, ist eine sichere Diagnosestellung allein anhand der klinischen Zeichen wegen der großen Variabilität der Erkrankung nicht möglich. Charakteristische Erstsymptome wie Urolithiasis (57%), fragliche Harnwegsinfekte (14,9%), Hämaturie (5%) und Nephrokalzinose (45%) sind bei den meisten Patienten laut einer deutschen Studie als erste wegweisende Anhaltspunkte zu finden (40), treten aber auch bei anderen Erkrankungen im Kindes- und Erwachsenenalter regelhaft auf. 8,5% der Patienten sind bei Diagnosestellung beispielsweise im Rahmen eines familiären Screenings symptomfrei. Einen Nierenstein entwickeln 5% der erwachsenen Bevölkerung mindestens einmal im Leben (42), sodass dies als relativ unspezifisch zu werten ist. Bei Kindern ist es allerdings ein wesentlich

selteneres Phänomen und muss eine konsequente Diagnostik nach sich ziehen. Differentialdiagnostisch sollte auch an andere Stoffwechseldefekte wie beispielsweise M. Dent, M. Bartter oder eine RTA gedacht werden. Da bei der PH I auch das Alter bei Auftreten der Erstsymptome sehr variabel ist und kein hartes Diagnosekriterium darstellt, wurde schon oft versucht einen allgemeingültigen Leitfaden zu diesem Zweck zu erstellen, der aber immer wieder überarbeitet und angepasst wurde (65). Unumstritten ist allerdings, dass bei Patienten mit Harnsteinleiden v. a. im pädiatrischen Bereich als erste und kostengünstige diagnostische Maßnahmen eine Sonographie der Nieren und ableitenden Harnwege sowie eine Untersuchung von 24h-Sammelurinen auf lithogene Substanzen angeschlossen werden sollten (38).

#### **1.3.4.2 Urinanalyse**

Wichtigstes Diagnosekriterium und Hauptmerkmal ist sicherlich die laborchemische Untersuchung von 24h-Sammelurinen. Dabei dient die Bestimmung des Oxalats im Sammelurin auch als Kontrollparameter des Krankheitsverlaufs. Aber nicht nur Oxal- sondern auch Glykolsäure und L-Glycerinsäure (zum Ausschluss einer PH II) können heutzutage durch Ionenchromatographie, high performance liquid chromatography (HPLC) oder andere Methoden bestimmt werden. Wird in einem ersten 24h-Sammelurin eine Oxalatausscheidung von deutlich mehr als 0,5 mmol/1,73 m<sup>2</sup>/24h (oberer Normalwert) ermittelt, sollte mindestens eine zweite Analyse zur Bestätigung der Diagnose, am besten aber weitere Sammelurinanalysen unter oxalatarmer und oxalatreicher Ernährung folgen. Findet sich hierbei immer eine deutliche Hyperoxalurie, meist weiter über 1,0 mmol/1,73 m<sup>2</sup>/24h und auch der klinische Verlauf ist eindeutig, so ist der Verdacht auf eine primäre Hyperoxalurie naheliegend. Erwähnt sei allerdings an dieser Stelle, dass bei ca. 25-30% der Patienten mit PH I keine Erhöhung der Glykolatausscheidung im Urin messbar ist und auch bei Dialysepatienten dieser Wert durch die oligurische/anurische Phase keine Aussagekraft hat. Hier kann u. U. eine Plasmaglykolatbestimmung angeschlossen werden, um die Diagnose weiter zu bestätigen (61, 72). Anhand der Ergebnisse der Sammelurine (Oxalatekretion und relative Urinübersättigung für CaOx)

können bei anschließenden Kontrollen Aussagen über den Verlauf und das Therapieansprechen gemacht werden. Im Umkehrschluss kann allerdings eine PH I bei typischer Klinik und normalen Oxalatwerten im Sammelurin nicht kategorisch ausgeschlossen werden, denn es sind Einzelfälle bekannt, bei denen der Genotyp eindeutig pathologisch, der Phänotyp, hier rezidivierende Urolithiasis oder Nephrokalzinose, aber lange Zeit nicht gegeben ist (59). Folglich müssen in den einzelnen Zentren, in denen eine solche Diagnostik durchgeführt wird, diese möglichen individuellen Schwankungen in die Diagnosefindung mit einbezogen werden. Den Spontanurin als Untersuchungsmaterial verwendet man v. a. bei Säuglingen und Kleinkindern, wenn eine 24h-Urinsammlung sich als schwierig erweist. In diesem Fall wird der Oxalat/Kreatininquotient bestimmt, wobei man die physiologisch erhöhten und nahrungsabhängigen Werte bei Frühgeborenen aber auch termingeborenen Kindern berücksichtigen muss (42). Treten Zeichen des Nierenversagens auf, verliert die Bestimmung des Oxalats im Sammelurin aufgrund der erniedrigten GFR an Aussagekraft als Kontrollparameter. In diesen Fällen wird die Bestimmung des Plasmaoxalatspiegels vorgezogen (14).

#### **1.3.4.3 Plasma**

Die laborchemische Bestimmung der Konzentration von Oxalat und Glykolat im Plasma wird routinemäßig dem Screening des Urins angeschlossen, hat aber im Anfangsstadium der Erkrankung keine vergleichbare Aussagekraft. Bei terminaler Niereninsuffizienz, d.h. bei stark eingeschränkter GFR und systemischer Oxalose hingegen, bleiben POx, die Plasmasättigung für CaOx ( $\beta$ PCaOx) und vor allem PGly als aussagekräftige Kontrollparameter übrig. Einschränkend muss aber gesagt werden, dass POx bei allen terminal niereninsuffizienten Patienten erhöht ist und aufbauend auf diesem Parameter auch die  $\beta$ CaOx. Es gibt zwar quantitative Unterschiede zwischen PH I Patienten mit CNi (POx > 80  $\mu$ mol/l) und non-PH Patienten mit CNi (40-60  $\mu$ mol/l) aber um letztendlich eine PH im Stadium des CNi klar ausschließen zu können, wird zusätzlich der Plasmaglykolatspiegel gemessen (61, 72). Die Bestimmung von L-Glyzerinsäure dient als Mittel zur

Unterscheidung zwischen PH II und den anderen beiden PH Formen da nur Patienten mit PH II erhöhte Spiegel im Blut aufweisen. Bei PH III findet sich ein erhöhter Hydroxy-Oxo-Gluaratwert im Urin, im Plasma und in der Leber.

Im Labor wird POx mittels diverser Methoden, z .B. Ionenchromatographie, Gaschromatographie oder einer enzymatischen Methode bestimmt und gilt je nach Methode ab einem Wert von  $> 6-10 \mu\text{mol/l}$  bzw. teilweise auch schon ab  $> 3 \mu\text{mol/l}$  als pathologisch (36). Bei PH I Patienten finden sich unter Umständen bei noch normaler Nierenfunktion schon Werte von  $> 10-20 \mu\text{mol/l}$  (42). Im Falle einer systemischen Oxalose bei CNI treten auch Werte von  $> 100 \mu\text{mol/l}$  auf. Die Plasmasättigung für Calcium-Oxalat ( $\beta\text{PCaOx}$ ) wird mit Hilfe eines „Solution Equilibrium Programms“ bestimmt und liefert wichtige Erkenntnisse wenn es darum geht, abzuschätzen wie hoch das Risiko der CaOx Kristallablagerung in den Organen ist. Der pathologische Grenzwert von  $> 1$  wird bei PH I Patienten schon ab einer GFR von  $< 35 \text{ ml/min} \cdot 1,73\text{m}^2$  erreicht. Zum Vergleich: Bei Patienten, die aus anderen Gründen niereninsuffizient werden, ist eine Übersättigung des Plasmas erst ab einer Filtrationsrate von  $< 8 \text{ ml/min} \cdot 1,73\text{m}^2$  zu verzeichnen (62). Anders ausgedrückt liegt eine Plasmaübersättigung vor, wenn der POx-Wert über  $30 \mu\text{mol/l}$  angestiegen ist. Dies findet sich bei PH I Patienten schon im Stadium III-IV der Niereninsuffizienz.

#### **1.3.4.4 Leberbiopsie**

Die perkutane Leberbiopsie war lange Zeit ein wichtiges diagnostisches Instrument in der Diagnosesicherung der PH und galt diesbezüglich jahrelang als Goldstandard (32). Hinweise auf eine mögliche Erkrankung aus Urin- und Plasmauntersuchungen konnten durch diesen minimal invasiven Eingriff selbst bei schon niereninsuffizienten Patienten bestätigt werden. Gleichzeitig konnte eine genaue Differenzierung zwischen Typ I und II erfolgen und Aussagen über die intrazelluläre Lokalisation der AGT und der GRHPR und deren eventuelle Restaktivität getroffen werden (42). Gesunde Personen weisen AGT Aktivitäten von  $19,1-47,9 \mu\text{mol/mg Protein/h}$  auf. Bei 82% der Patienten mit PH I kann keine katalytische Aktivität nachgewiesen

werden. Die Werte der übrigen Betroffenen variieren zwischen 5 und 50% der normalen Aktivität (16). Pathologische Ergebnisse werden grundsätzlich in einem nächsten Schritt in die katalytische Aktivität und die Immunreaktivität der AGT mittels Western-Blot unterteilt und es werden dabei drei Formen unterschieden: Typ 1 zeigt weder katalytische noch immunreaktive Aktivität (crm-/enz-), da z. B. kein AGT Protein synthetisiert wird, Typ 2 ist charakterisiert durch fehlende katalytische Aktivität bei erhaltener Immunreaktivität (crm+/enz-) als Folge der Unfähigkeit des Enzyms an den Kofaktor Pyridoxalphosphat zu binden, und bei Typ 3 (ca. 30% der PH I Patienten) sind beide Aktivitäten vorhanden (crm+/enz+). In letzterem Fall liegt der Defekt in der Verschiebung des Enzyms von den Peroxisomen in die Mitochondrien, wo sich dessen Funktion nicht entfalten kann (16, 21).

Da mittlerweile die molekulargenetische Diagnostik sehr aussagekräftig, weit weniger invasiv ist und weniger Risiken birgt (Blutungen, Infektionen), wird der Nutzen einer Leberbiopsie zur Diagnosesicherung heftig diskutiert und diese nur noch in Ausnahmen angewandt. Beispielsweise vor einer geplanten Leber- bzw. kombinierten Leber-/Nierentransplantation, wenn der Genotyp, warum auch immer, nicht definierbar war. Denn es darf nicht vergessen werden, dass in dem Fall eine ansonsten gesunde Leber entfernt wird, was bedeutet, dass die PH bewiesen sein muss. In den meisten Fällen ist eine molekulargenetische Diagnostik allerdings zielführend und ausreichend.

Dies gilt auch für die pränatale Diagnostik, die lange Zeit nur mittels fetaler Leberbiopsie sichere Ergebnisse lieferte, da im Fruchtwasser, bzw. in den Chorionzotten nicht genügend kindliche enzymatische Aktivität der AGT nachgewiesen werden konnte (19). Heutzutage wird bei begründetem Verdacht eine molekulargenetische Untersuchung mittels Chorionzottenbiopsie durchgeführt.

### 1.3.4.5 Molekulargenetische Diagnostik

Wie erwähnt wird die molekulargenetische Diagnosesicherung heutzutage der Leberbiopsie vorgezogen, da sie weniger invasiv ist und vor allem bei der Pränataldiagnostik sehr viel geringere Risiken (z. B. für eine Fehlgeburt) birgt und schon im ersten Trimester zur Anwendung kommt (78). Da die Sequenzierung des *AGXT*-Gens anhand von EDTA-Blut durchgeführt werden kann, gibt es weniger Probleme bei der Materialgewinnung als bei einer relativ aufwendigen Leberbiopsie. Den Vorteilen entgegenzuhalten war lange Zeit die Tatsache, dass bei bis jetzt über 150 krankheitsverursachenden Mutationen eine komplette Untersuchung aller 11 Exone des *AGXT*-Gens eher aufwendig, zeitintensiv und teuer war, sodass im Regelfall nur eine Sequenzierung der häufigsten Mutationen (c33\_34insC, c.508G>A und c.731T>C für PH I und c.103delG für PH II) durchgeführt wurde. Damit konnten allerdings nur in 34% der Fälle beide Mutationsallele identifiziert werden. Bei einem weiteren Drittel konnte auf diese Weise eines der veränderten Allele aufgedeckt werden und bei den restlichen Patienten wurde mit dieser Methode kein mutiertes Allel indentifiziert (32, 78). Heutzutage wird standardmäßig das ganze Gen sequenziert, aber auch eine Untersuchung des kompletten Gens liefert nicht in allen, aber immerhin in 95% der Fälle eine sichere Diagnose. Molekulargenetische Diagnostik bei Verdacht auf non-PH I/non-PH II bzw. PH III ist derzeit noch nicht möglich, da noch keine krankheitsverursachende Mutation nachgewiesen wurde (32). Nichtsdestotrotz ist die Molekulargenetik das diagnostische Mittel der Wahl, da mit ihrer Hilfe die Indikation zur Leberbiopsie eingeschränkt werden kann, sie die pränatale Diagnostik einfacher und risikoärmer gestaltet und besonders der Trägerstatus der Mutation(en) innerhalb einer Familie bei bekannter PH I bzw. PH II oder III problemlos evaluiert werden kann. In betroffenen Familien sollte ein konsequentes Screening nicht nur bei den klinisch auffälligen Familienmitgliedern, sondern auch bei symptomfreien Geschwistern durchgeführt werden.

### 1.3.5 Grundlagen der Genetik bei PH I

Das menschliche *AGXT*-Gen ist auf dem Chromosom 2q36-37 lokalisiert und besteht aus 11 Exons und insgesamt 10kb genomischer DNA (73). Es wurde 1987 erstmals von Danpure et al. als ursächlich für den metabolischen Defekt der PH I deklariert (18) und ist nach wie vor das einzige Gen, das bei der PH I als krankheitsverursachend gilt. Seine Funktion liegt in der Synthese der AGT, einem 43kDA großen Protein, das aus 329 Aminosäuren besteht und nur in den menschlichen Hepatozyten exprimiert wird. An jede Untereinheit der AGT ist ein Molekül Pyridoxalphosphat als Kofaktor gekoppelt. Eine auf dem C-terminalen Ende des Enzyms lokalisierte peroxismale targeting Sequenz (PTS1) katalysiert die Überführung des Proteins in die Peroxisomen, wo es seine Aktivität entfaltet. 5-10% der AGT werden in die Mitochondrien geschleust, bleiben dort aber inaktiv. Durch unterschiedliche Gendefekte ist dieser Anteil bei der PH durch eine Störung des Enzyms selbst und/ oder durch den defekten Transport in die Peroxisomen wesentlich größer, sodass erhebliche Anteile fälschlicherweise in die Mitochondrien überführt werden, wo das Enzym im inaktiven Zustand verbleibt (69). Das liegt u. a. daran, dass durch begleitende Polymorphismen der stabilisierende Faltungsprozess des Enzyms zu einem Homodimer ausbleibt, sodass die Monomere ungehindert ins Mitochondrium überführt werden können. Homodimere können dort hingegen nicht aufgenommen werden.

Bis heute sind > 150 Mutationen im *AGXT*-Gen, verteilt auf alle 11 Exone beschrieben worden. Ursächlich für 75% der Defekte sind homozygote oder heterozygote Punktmutationen, darunter 73 Missense-, 19 Nonsense- und 18 Splice-Mutationen (86). Die sogenannten Missense Mutationen führen zu einer fehlerhaften Faltung und folglich zum Funktionsverlust des Proteins. Nonsense Mutationen lösen durch den Einbau von Stopp-Codons den vorzeitigen Abbruch der Transkription aus, d.h. es entsteht ein funktionsloses Enzym, und Splice-Mutationen führen zu aberranten Proteinen, ausgelöst durch die Insertion oder Deletion von Aminosäuren an für das Spleißen markanten Punkten, sodass einige Exone nicht als solche bei der

Transkription erkannt werden. Die restlichen 25% der Defekte umfassen verschiedenste Insertionen und Deletionen von Basen. Bezüglich des *AGXT*-Gens werden zwei verschiedene Haplotypen unterschieden: das Major-Allel (AGT-Ma) und das Minor-Allel (AGT-Mi). Diese liegen mit einer statistischen Häufigkeit von 80% bzw. 20% in der europäischen und nordamerikanischen Bevölkerung vor (1). Diese Polymorphismen haben an sich keinen relevanten Krankheitswert, da sie nicht in die Funktion, wohl aber die Aminosäuresequenz der AGT eingreifen. Es wird dahingehend aber eine Auswirkung auf die doch erhebliche Heterogenität in Bezug auf die Schwere der Erkrankung diskutiert (86).

Die häufigste bekannte Mutation bei 24-37% der PH I Patienten ist die c.508G>A Mutation auf dem Minor-Allel, der ein Austausch von Glycin zu Arginin auf Position 170 des Exons 4 zugrunde liegt (Gly170Arg) (27, 68, 86). Sie führt zusammen mit dem Polymorphismus P11L zu einer erheblichen Reduktion der AGT Aktivität in vitro (Reduktion um den Faktor drei), einer gestörten Dimerisierung der AGT Untergruppen im Zytosol in vitro und dadurch zu einem vermehrten Transport des Enzyms in die Mitochondrien (21, 57). Interessant ist, dass diese Mutation allein keinen Krankheitswert hätte. Der P11L Polymorphismus hebt sich von anderen Polymorphismen in der Hinsicht ab, dass er durch den Synergismus mit der c.508G>A Mutation einen krankheitsauslösenden Faktor darstellt (1, 68). Für diesen Genotyp liegen Studien vor, die dieser Mutation in der homozygoten Form eine signifikant höhere katalytische Restfunktion der AGT, einen günstigeren Verlauf und ein gutes Ansprechen auf Vitamin B6-Medikation bescheinigen (27, 43, 67). Homozygote Anlageträger wurden durchschnittlich erst mit 47 Jahren niereninsuffizient, heterozygote Träger dieser Mutation erreichten dieses Stadium mit 35 Jahren und andere Mutationen des *AGXT*-Gens führten im Durchschnitt schon im Alter von 21 Jahren zu terminaler Niereninsuffizienz (27).

Die zweithäufigste Mutation bei PH I Patienten ist die c.454T>A Mutation, die einen Anteil von insgesamt ca. 19 % unter den PH I typischen genetischen Veränderungen hat. Sie führt zur missense Mutation Phe152Ile, die ebenso wie die oben genannte, häufigste Mutation klinische Bedeutung durch ihre

hohen Ansprechraten auf Pyridoxin und folglich ein verbessertes Outcome hat (88).

Eine ebenfalls relativ häufige Mutation bei PH I Patienten stellt die c33\_34insC Mutation mit durchschnittlich 11-15% dar. Sie ist gleichzeitig die häufigste Mutation auf dem Major-Allel und codiert für ein trunkiertes, sprich verkürztes und funktionloses Protein (32). Homozygote Patienten mit dieser Mutation zeigen keinerlei immunreaktive oder katalytische Enzymaktivitäten (21) und werden leider oft frühzeitig niereninsuffizient. Das Ansprechen auf eine Therapie mit Vitamin B6 ist schlecht (88).

Die c.731T>C Mutation stellt mit einem Anteil von 6-9% der PH I Patienten ebenfalls eine nennenswerte Veränderung des *AGXT*-Gens auf dem Minor-Allel dar. Sie führt zu einem instabilen Protein mit einer geringen Restaktivität und ist wesentlich häufiger bei Spanischen und Nordamerikanischen Patienten, speziell auf den Kanarischen Inseln zu finden (77, 81).

Um einen Bogen zum Thema dieser Arbeit zu spannen, ist es in diesem Abschnitt natürlich interessant wie die Genotyp-Phänotyp Korrelation im Hinblick auf das Ansprechen auf Vitamin B6-Medikation zu bewerten ist. Die Autoren einiger Studien sehen, wie schon erwähnt, einen klaren Zusammenhang zwischen der homozygoten c.508G>A Mutation und dem verbesserten Outcome der Patienten durch Vitamin B6 bzw. im weiteren Sinne eine Vorhersagbarkeit der Nierenfunktion bei guter Pyridoxinsensitivität (27, 67, 87). Dennoch ist ein solcher Zusammenhang nicht unkritisch zu sehen, zumal in allen Studien nur ein kleines Patientenkollektiv untersucht wurde und darunter nur wenige Patienten mit einer homozygoten c.508G>A Mutation waren.

### **1.3.6 Therapieansätze**

#### **1.3.6.1 Medikamentöse Therapie**

Eine kausale Therapie ist im Falle der PH bei heutigem Kenntnisstand noch nicht möglich. Dennoch gibt es einige unterstützende bzw. nephroprotektiv wirkende medikamentöse Therapieansätze, die bei früher Diagnosestellung,

---

schnellem Therapiebeginn und guter Compliance das Einsetzen der Niereninsuffizienz verzögern können. Grundlegend bei jeder Art von Therapie bei der PH ist die Flüssigkeitszufuhr. Es wird eine tägliche Trinkmenge von 2-3l/m<sup>2</sup> Körperoberfläche (KOF)/24h empfohlen, um die Löslichkeit von Calcium-Oxalat (CaOx) im Urin zu verbessern. Dies ist eine einfache aber sehr wirkungsvolle Methode, die allerdings gerade im Kindes- und Jugendalter häufig viel Disziplin erfordert und im Alltag oft an der Compliance scheitert. Bei Säuglingen und Kleinkindern kommt deswegen häufig eine nasogastrale Sonde oder ein Gastrostoma/PEG zum Einsatz (15, 22, 42). Bei erhöhtem Flüssigkeitsbedarf durch Fieber, Erbrechen oder Diarrhoe sollte die Flüssigkeitszufuhr noch erhöht und ggf. intravenös appliziert werden (32). Eine eventuelle Überlegenheit der parenteralen gegenüber der oralen Flüssigkeitssubstitution ist nicht erwiesen (22). Eine spezielle Diät muss bei der PH nicht eingehalten werden, da wie schon erwähnt das exogene Oxalat nur wenig Anteil an der renal ausgeschiedenen Oxalatmenge hat, allerdings sollten oxalatreiche Lebensmittel wie Spinat, Rhabarber und Schokolade gemieden werden. Auch eine dauerhafte Supplementierung mit Ascorbinsäure (Vitamin C) als Vorläufermolekül von Oxalat sollte genauso wenig erfolgen wie eine Restriktion von Calcium, da dies im Darm an Oxalat binden und so dessen Absorption minimieren kann (42).

Einer der Eckpunkte in der medikamentösen Therapie der PH ist die orale Gabe von 0,1-0,15 g/kg KG/24h Natrium- oder Kaliumzitat. Der Wirkmechanismus besteht darin, dass Citrat im Urin an Calcium zu löslichen Komplexen gebunden und ausgeschieden wird, dementsprechend weniger Calcium zur Bindung an Oxalat zur Verfügung steht. Als Konsequenz nimmt die Urinübersättigung für CaOx deutlich ab. Zudem wird die Trikarbonsäure Citrat in der Leber zu Bikarbonat verstoffwechselt, was den Urin alkalisiert, die Citratrückresorption minimiert und folglich neben der höheren Citratausscheidung durch den alkalischen Urin pH-Wert die Löslichkeit von CaOx verbessert wird. (32, 42). Eine Langzeitstudie hat gezeigt, dass diese Therapieform die Frequenz von Steinabgängen reduzieren und die Nierenfunktion langfristig stabilisieren und sogar verbessern kann (54). Als Kontrollparameter eignen sich der Urin pH-Wert (6,2-6,8) und die

---

Citratkonzentration im Urin, die  $> 2 \text{ mmol/1,73 m}^2/24\text{h}$  betragen sollte (40). Orthophosphat hat eine ähnliche inhibitorische Wirkung auf die CaOx-Übersättigung des Urins wie die Alkalisalze, indem es als Bindungspartner für Calcium fungiert (42). Eine Langzeitstudie konnte den therapeutischen Nutzen in Form von reduzierter CaOx-Ausscheidung im Urin und verminderter Nephrokalzinose belegen (64).

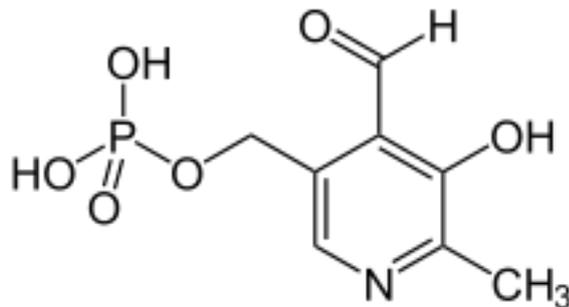
Eine weitere wichtige Grundlage der konservativen Therapie der PH I stellt die Medikation mit Pyridoxin (Vitamin B6) als Kofaktor des defizienten, bzw. nur in minimaler Konzentration im Peroxisom vorliegenden Enzyms AGT dar. Die Wirksamkeit ist in diversen retrospektiven Fallstudien belegt und basiert auf jahrzehntelanger klinischer Erfahrung, dass Vitamin B6 die Oxalsäureausscheidung reduzieren und teilweise sogar normalisieren kann. Einige Patienten benötigen dafür nur physiologische Dosen, bei anderen haben erst relativ hohe Dosen ( $> 20 \text{ mg/kg KG/24h}$ ) einen sichtbaren Effekt gezeigt (32).

Pyridoxin wird nach oraler Aufnahme in der Leber phosphoryliert und übt, gebunden an den Lysinrest des Enzyms, in dieser Form seine Funktion als Kofaktor für die AGT aus. Aber nicht alle Patienten, die unter PH leiden sind erfahrungsgemäß Pyridoxin-sensibel. Die Ansprechrate liegt nach heutigen Erkenntnissen bei ca. 30%, wobei die Definition der Sensitivität an eine relative Reduktion der Urinoxalatausscheidung von mindestens 30% geknüpft ist. Einige Studien gehen davon aus, dass die Wirksamkeit von Pyridoxin bei der PH einerseits an die Lokalisation, sprich Mitochondrium vs. Peroxisom, und andererseits an bestimmte Genotypen gekoppelt ist. In diesem Zusammenhang ist insbesondere die *AGXT*-Mutation c.508G>A zu nennen. Für ihren homozygoten Genotyp wird in der Literatur das beste Ansprechen auf Pyridoxin beschrieben. Ohne Vitamin B6-Medikation kommt es zu einer Mislokalisierung der AGT in die Mitochondrien, unter Medikation aber zu einer Stabilisierung/Defolding der AGT im Cytosol (45) und damit zu einer Aufnahme in die Peroxisomen der Leber, wo es seine physiologische Aktivität wieder ausüben kann. Ein anderer Erklärungsansatz wäre die Steigerung der Restaktivität des korrekt lokalisierten Enzyms im Peroxisom, die ebenfalls Genotyp-spezifisch ist. Das würde wieder zu einer

---

physiologischen Verstoffwechslung von Glyoxylat zu Glycin und Pyruvat führen. Trotz der starken Vermutung, dass die Pyridoxin-Sensitivität Genotyp-determiniert ist, sollten alle PH I Patienten einer Vitamin B6-Therapie zugeführt werden, denn auch andere, vor allem missense Mutationen im *AGXT*-Gen zeigen partielles Ansprechen auf Pyridoxin und die Patienten könnten von einer derartigen Therapie durchaus profitieren. Die hier dargelegten Vermutungen und Erfahrungen basieren aber auf retrospektiven Einzelfallberichten und kleinen Fallstudien. Eine prospektive Evaluation bezüglich der anzuwendenden Dosierung, der Wirksamkeit und einer systemischen Genotyp-Phänotypkorrelation sind ausstehend. Dennoch ist es internationale Expertenmeinung, dass ein Therapieversuch mit Pyridoxin über mindestens 3-6 Monate durchzuführen ist und zwar mit dem Parameter der Urinoxalatekretion als Effektivitätskriterium (32).

Bei der PH II und III ist eine Therapie mit Pyridoxin nicht sinnvoll, da die GRHPR bzw. die HOGA1 als defekte Enzyme kein Vitamin B6 als Kofaktor benötigen.



**Abbildung 3:** Pyridoxalphosphat (90)

Ein vielversprechender Therapieansatz ist seit einigen Jahren auch die orale Anwendung von Oxalat degradierenden Darmbakterien. Dazu gehören *Oxalobacter formigenes*, *Enterococcus faecalis*, Lactobakterien und *Eubacterium lentum*, doch der größte therapeutischen Effekt wird *Oxalobacter formigenes* zugeschrieben. Dieses obligat anaerobe gram negative Bakterium gehört bei 70-80% der gesunden Bevölkerung ab dem 5. Lebensjahr zur physiologischen Darmflora. Patienten mit primärer oder sekundärer Hyperoxalurie weisen z. B. durch häufige Antibiotikaeinnahme, oder aufbauend auf Malabsorptionssyndromen, wie der zystischen Fibrose sowie chronisch entzündlichen Darmerkrankungen nur selten eine

Besiedelung auf, könnten aber vom Wirkmechanismus dieses Bakteriums enorm profitieren. *Oxalobacter formigenes* verfügt dabei über zwei Oxalat abbauende Enzyme, die Oxalyl-CoA Decarboxylase und die Formyl-CoA Transferase, die anfallendes exogenes, aber unter Umständen auch endogen produziertes Oxalat zu CO<sub>2</sub> und Formiat verstoffwechseln. Diese Zwischenprodukte werden dann mit dem Stuhl ausgeschieden, allerdings kann Formiat auch wieder rückresorbiert werden (42). In der Interaktion mit der intestinalen Mucosa und intestinalen Anionentransportern ist *Oxalobacter* außerdem wichtig für die Oxalathomöostase und das Sekretions-/Exkretionsgleichgewicht. Es konnte in einem Tierversuch mit Ratten gezeigt werden, dass über einen hohen transepithelialen Gradienten über den luminalen Epithelzellen des Darms sogar endogen produziertes Oxalat sezerniert und damit verstoffwechselt werden kann. So kann die renale Urinoxalatausscheidung reduziert werden (28). Eine Pilotstudie mit PH Patienten bekräftigte zunächst diese Annahme aus den Tierversuchen, allerdings konnten die folgenden doppel-blinden Placebo kontrollierten Multicenterstudien keinen signifikanten Unterschied in der renalen Urinoxalatausscheidung mit *Oxalobacter* im Vergleich zu Placebo feststellen (31, 35).

### **1.3.6.2 Urologische Therapieoptionen**

Werden die Patienten im Verlauf der Erkrankung durch obstruktive Nierensteine, häufige schmerzhafte Steinabgänge oder infizierte Steine symptomatisch, muss neben der Schmerztherapie ein möglichst minimal invasiver Eingriff erfolgen. Bei größeren Steinen sind die perkutane Nephrolitholapaxie (PNL) oder sogar die transureterale Lithotrypsie und Steinentfernung die Therapien der Wahl. Bei kleineren Steinen, die sich schon im Harnleiter befinden kann eine endoskopische Entfernung mit anschließender Einbringung eines Doppel-J-Katheters erfolgen. Die extrakorporale Stoßwellenlithotrypsie (ESWL) ist ebenfalls eine Alternative auch zum offenen Eingriff, die nur bei ganz kleinen Kindern einer Narkose bedarf und lange Zeit gerade auch im pädiatrischen Bereich häufig zur Anwendung kam (48). Die Indikation hierfür sollte nach neuen Erkenntnissen

aber nur sehr zurückhaltend gestellt werden, da gerade bei begleitender Nephrokalzinose die Gefahr besteht, dass die Stoßwellen das Nierenparenchym irreversibel schädigen und die eventuell schon erniedrigte GRF weiter abfällt. In der Literatur mehren sich die Berichte von signifikanten inflammatorischen Prozessen in der Niere, Einblutungen ins Nierenparenchym, Nierenfunktionsstörungen und sogar komplettem Nierenversagen nach Einsatz von ESWL (25, 42, 60, 75). Aufgrund dieser Erfahrungen sollte man dieses Verfahren nicht aus der pädiatrischen Urologie verbannen, aber es muss unter Vorbehalt und mit strenger Indikationsstellung angewendet werden.

### **1.3.6.3 Dialyseverfahren bei PH I**

Viele PH Patienten erreichen im Verlauf der Erkrankung ein Stadium in dem die Nierenfunktion soweit eingeschränkt ist, dass eine Nierenersatztherapie längerfristig oder zumindest zur Überbrückung der Wartezeit bis zu einer Transplantation nötig wird. Das große Dilemma ist dabei, dass bis heute keine Form der Dialyse in der Lage ist, ausreichend Oxalat aus dem Körper zu eliminieren (9, 34, 42), um eine systemische Ablagerung von Oxalat in den Geweben zu verhindern. Dass gerade Oxalat so schwierig zu dialysieren ist, liegt u. a. daran, dass es sich im Plasma sehr schlecht löst und die Mobilisation der Oxalatsalze aus den Geweben im zeitlichen Rahmen einer Dialyse kaum möglich ist (9, 47). Bunchman et al. diskutieren in diesem Zusammenhang die mögliche Steigerung der Effektivität durch eine langsamere und konstantere Elimination mittels Equilibration Bauchfelldialyse, z. B. auch in Kombination mit einer Hämodialyse (9). Illies et al. befürworten eher eine hohe Dialysefrequenz bei kürzerer Dauer (47). Vergleicht man die Dialysemöglichkeiten untereinander so liefert die Hämodialyse (HD) bei Erwachsenen und Kindern mit PH I im Vergleich zur Peritonealdialyse (hier meist nächtliche PD) ein mit ca.  $115 \text{ ml/min} \cdot 1,73 \text{ m}^2$  KOF ( $2,737 \text{ } \mu\text{mol}/24\text{h} \cdot 1,73 \text{ m}^2$  KOF) besseres Ergebnis als die PD mit ca.  $5\text{-}8 \text{ ml/min} \cdot 1,73 \text{ m}^2$  KOF ( $1,34 \text{ } \mu\text{mol}/24\text{h} \cdot 1,73 \text{ m}^2$  KOF) (34, 42). Wobei anzumerken ist, dass eine Steigerung der täglichen Zyklen (PD Dauer) eine Verbesserung der Oxalatelimination herbeiführen kann (34, 47). Bei der PD

gibt es außerdem sichtbare Unterschiede zwischen Erwachsenen und Kindern, bei denen diese Methode aufgrund der größeren peritonealen Oberfläche im Vergleich zur KOF zu einer 50% besseren Oxalat-Dialysance führt (85). Betrachtet man die wöchentliche Eliminationsrate von Oxalat bei PH I Patienten, so gibt es zwischen der HD und der PD aber keine signifikanten Unterschiede (6650-9900  $\mu\text{mol}/\text{Woche}$  bei Standarddialyse). Die Eliminationsrate ist aufgrund einer Korrelation zwischen der Plasmaoxalatkonzentration und der Oxalat-Dialysance bei PH I Patienten doppelt so hoch wie bei non-PH Patienten an der Dialyse (34). Nichtsdestotrotz stehen diese Ergebnisse in keinem akzeptablen Verhältnis zur täglichen endogenen Oxalatproduktion von ungefähr 3500-7500  $\mu\text{mol}$  bei PH I. Wird die Nierenersatztherapie unterbrochen, so werden innerhalb von ca. 48h entsprechende Plasmaoxalatwerte wie vor Dialysebeginn erreicht. Zur präoperativen Vorbereitung auf eine Transplantation und zur Elimination von möglichst viel Oxalat aus dem Körper zugunsten des Spenderorgans ist es dennoch sinnvoll ein aggressiveres Dialyseschema zu verfolgen. Studien empfehlen die Kombination aus Peritonealdialyse und hochfrequenter Hämodialyse (6x3 h/Woche oder mehr), einen möglichst hohen Blutfluss, sowie die Nutzung von high Flux Filtern mit großer Oberfläche. Diese Herangehensweise zeigte durchweg eine verbesserte Dialysance und konnte teilweise einen zumindest stagnierenden Plasmaoxalatwert gewährleisten (9, 34, 42, 47, 70).

#### **1.3.6.4 Transplantation**

Eine Transplantation ist bei der PH I die einzige kurative Therapieoption, da derzeit nur durch eine Spenderleber der zugrunde liegende enzymatische Defekt korrigiert werden kann. Es werden an den verschiedenen Zentren unterschiedliche Transplantationsregime diskutiert und durchgeführt, die alle ihre Berechtigung haben, aber genau auf den jeweiligen Patienten und das Stadium der Erkrankung abgestimmt werden müssen. Die bei der PH I am häufigsten durchgeführte Transplantation ist die kombinierte Leber- und Nierentransplantation. Sie hat mittlerweile deutliche Überlegenheit gegenüber der isolierten Nierentransplantation gezeigt und ist die Therapie

der ersten Wahl bei PH I Patienten im Stadium der terminalen Niereninsuffizienz (7). Den besten Zeitpunkt markiert der Abfall der GFR unter  $40\text{-}25\text{ ml/min}\cdot 1,73\text{ m}^2$  KOF noch bevor der Zustand der systemischen Oxalose und die Ablagerung von Calciumoxalatkrystallen in Knochen, Retina, Haut und Gefäßwänden erreicht werden. Diese Voraussetzungen zusammen mit einer möglichst kurzen bzw. einer Umgehung der Dialysezeit zeigen das beste Outcome bei einer solchen Transplantation. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei der kombinierten Leber- und Nierentransplantation bei 80% und nach 10 Jahren sind noch 69% der Patienten am Leben (12). Bei einigen Patienten wurde zunächst nur die Leber ersetzt und erst in einer zweiten Operation auch die Niere. Verglichen mit denen, die nur ein Nierentransplantat erhielten, waren die 5-Jahres-Transplantat Überlebensraten leicht unterschiedlich (64 vs. 45 %), aber das Gesamtüberleben der Patienten wesentlich besser (67 vs. 100%) (7). Das liegt einerseits daran, dass zum Teil die Patienten, die sich einer isolierten Nierentransplantation unterziehen oft erst bei Transplantatversagen die Diagnose einer PH I erhalten und andererseits diese Niere dann natürlich der weiter bestehenden Oxalatbelastung ausgesetzt ist, da die endogene Oxalatproduktion ja nicht abnimmt. Das Europäische Transplantationsregister publizierte Daten, die der isolierten Nierentransplantation mit einer 3-Jahres-Transplantatüberlebensrate von 23% nach Lebendspenden und 17% nach Kadaverspenden ein enttäuschendes Ergebnis zuschreiben (8). Auf der anderen Seite können lange Wartezeiten an der Dialyse auf ein kombiniertes Transplantat dazu führen, dass die Entscheidung zugunsten eines isolierten Nierenersatzes getroffen werden muss. Gerade bei Pyridoxin-sensiblen Patienten mit keiner bis geringer systemischer Oxalose kann dies eine akzeptable Therapieform darstellen, wenn begleitend eine intensive medikamentöse Therapie postoperativ mit Vitamin B6 durchgeführt wird (12, 51).

Das Problem bei Säuglingen mit infantiler Oxalose ist, dass bei diesen Kindern oft kein HD Zugang platzierbar ist, oder das technische Problem besteht große Spenderorgane, d. h. Niere und Leber in dem noch kleinen, im Wachstum befindlichen Körper zu platzieren. Erfolgreiche Fälle von isolierter Leber (zell)- und späterer Leber- bzw. Nierentransplantation bei PH I sind

beschrieben worden (3, 58), allerdings fehlen größere Studien dazu. Dringend wären hier neue Therapieoptionen notwendig, eine Gentherapie würde gerade bei den kleinsten Patienten erfolgversprechend sein können.

Bei einer sehr jungen PH I Patientin mit problematischer Klinik bei infantiler Oxalose wurde in unserem Zentrum 2010 erstmalig eine isolierte Leberzelltransplantation im Sinne eines individuellen Heilversuches durchgeführt (3). Ziel war es, Zeit zu gewinnen und die endogene Oxalatlast zu reduzieren, um damit eine bessere Ausgangslage für eine spätere kombinierte Transplantation zu schaffen, die dann, zwölf Monate später in stabilisiertem Allgemeinzustand mit niedrigeren Plasmaoxalatwerten, aber weiterhin ausgeprägter Oxalose erfolgreich durchgeführt wurde.

Kontrovers diskutiert wird derzeit auch die Option der präemptiven Lebertransplantation, noch bevor PH Patienten das Stadium der terminalen Niereninsuffizienz erreichen ( $GFR > 40 \text{ ml/kg/1,73 m}^2$ ) und die Komplikationen der systemischen Oxalose zum Tragen kommen. Das ist in der Theorie ein vorsorglicher Ansatz, aber da die PH eine sehr heterogene Erkrankung ist, ist es kaum möglich vorherzusagen wie sich der Verlauf bei einem individuellen Patienten gestalten wird. Folglich stellt es sich als sehr schwierig heraus, den Zeitpunkt für eine solche Transplantation festzulegen, denn der Patient hat subjektiv noch keinen Leidensdruck. Dementsprechend muss genau abgewägt werden, ob es ethisch gerechtfertigt ist einem symptomfreien Patienten seine, bis auf die defekte AGT, völlig funktionsfähige Leber zu entnehmen (12). Darüber hinaus ist eine Lebertransplantation durch anschließende aggressive Immunsuppression, sekundäre Malignome und Abstoßungsreaktionen bis hin zum Transplantatversagen mit einer hohen Morbidität und Mortalität verbunden (30% allgemeine Mortalität, 18% in den ersten zwei Jahren nach Transplantation) (82). Dennoch sind Fälle beschrieben, in denen die präemptive Lebertransplantation zu sehr guten Langzeitergebnissen geführt hat (12, 71).

Transplantation strategy	Combined simultaneous liver + kidney	Liver first, kidney as a second step	Isolated kidney	Isolated liver
HD strategy	Perioperative ± postoperative according to Pox and GFR	Standard HD following liver transplantation aiming at Pox <20 µmol/l	Preoperative and perioperative	Sometimes perioperative
40 < GFR < 60	No	No	No	Adapted to individual condition
20 < GFR < 40	Yes	No	In developing countries; and in very selected patients	No
GFR < 20	Yes	Yes	No	No
Infantile form (ESRD < 2 years)	Yes	Yes (emergency)	No	No

ESRD, end-stage renal disease; GFR, glomerular filtration rate; HD, hemodialysis; Pox, plasma oxalate. Adapted from [1,4\*] [(Scheinman JI. Liver transplantation in oxalosis prior to advanced chronic kidney disease (in preparation); (Bergstrahl EJ, et al. Transplantation in primary hyperoxaluria (in preparation)].

#### Abbildung 4: Empfehlungen zur Transplantation bei PH I (12)

Unabhängig von der Art der Transplantation ist es für den Patienten wichtig zu wissen, dass auch nach einer erfolgreichen Transplantation eine intensive medikamentöse Therapie und u. U. auch eine begrenzte Zeit an der Dialyse weiterhin notwendig ist, denn auch wenn der Plasmaoxalat Spiegel sich normalisiert, kann der Urin noch Monate bis Jahre erhöhte Oxalatwerte aufweisen. Das liegt daran, dass die CaOx-Ablagerungen in den Geweben größtenteils reversibel sind und bei physiologischer Funktion der AGT langsam abgebaut werden. Die renale Elimination durch das Nierentransplantat stellt eine erneute Belastung für das Organ dar, sodass alle möglichen Maßnahmen (erhöhte Flüssigkeitszufuhr, evtl. überbrückende Dialyse, Pyridoxin-, Citrat- und Magnesiumaufnahme) für dessen Erhalt getroffen werden sollten (7, 12, 42).

## 1.4 Hypothese und Fragestellung

Die Erläuterungen der Therapieoptionen bei PH I in der Einleitung dieser Arbeit haben deutlich gezeigt, dass es einige therapeutische Ansätze und symptomorientierte Therapieoptionen gibt, aber dennoch nur begrenzt erfolgreiche Behandlungskonzepte zur Verfügung stehen, die zudem oft auch wenig Verbesserung bringen. Pyridoxalphosphat wird bei fast allen PH I Patienten eingesetzt, da dessen positive Effekte bei vielen Patienten Wirkung zeigen und die Erfahrung im klinischen Alltag sowie zahlreiche nicht randomisierte Studien dies belegen. Dennoch ist die Gabe von Vitamin B6, welches derzeit meist per os in Form von Kapseln verabreicht wird, noch immer eine off-label Therapie, deren Wirksamkeit, Sicherheit und Nutzen bisher nur durch Einzelfallstudien und kleinere Fallserien belegt werden konnte. Schwierig ist außerdem die Dosierung, da im pädiatrischen Bereich zur oralen Anwendung lediglich Kapseln mit den Dosierungen von 40, 80, 100 und 300 mg zu Verfügung stehen. Wie gut diese Applikationsform im Intestinaltrakt resorbiert und absorbiert wird ist fraglich, da es im Rahmen von Therapiekontrollen teilweise trotz guter Compliance und hohen Dosen Pyridoxalphosphat zu unerwartet niedrigen Vitamin B6-Serumspiegeln kommt. Eine systematische Untersuchung zur Galenik, zur Wirksamkeit und zur Sicherheit von oral verabreichten i.v. Pyridoxalphosphatlösung existiert bisher noch nicht, obwohl man bei dieser Applikationsform von einer besseren Absorption, folglich höheren Wirkspiegeln im Blut, niedrigeren Urinoxalatkonzentrationen und somit einem besseren Outcome bezüglich der Nephrokalzinose und dem Erhalt der Nierenfunktion ausgehen kann. Aber nicht nur die Frage nach der Applikationsform, sondern auch die Wahl der geeigneten Dosis ist noch nicht wissenschaftlich erforscht. Derzeit gibt es keine hinreichenden Belege für die Wirksamkeit bzw. Sicherheit einer bestimmten Dosis bzw. den korrelierenden Serumspiegeln von Vitamin B6.

Aufgrund dieser unzureichenden Datenlage ist es das Ziel dieser Pilotstudie, mit PH I Patienten, die eine noch kompensierte Nierenfunktion aufweisen, wissenschaftliche und systematische Belege zu erbringen, die Aufschluss über die Sicherheit, Wirksamkeit und Titrierbarkeit von i.v.

Pyridoxalphosphatlösung per os als Therapieoption geben. Dabei wird die Reduktion der Urinoxalatkonzentration als quantifizierbarer Kontrollparameter herangezogen, verglichen mit den Vitamin B6-Serumspiegeln vor und während der Therapie. Da in der Literatur unter den PH I Patienten auch immer wieder Vitamin B6 resistente Patienten beschrieben werden, ist die Therapiesensibilität definiert als eine relative Reduktion der Urinoxalatausscheidung  $\geq 30\%$  und eine Reduktion von  $\geq 50\%$  bezeichnet definitionsgemäß ein komplettes Ansprechen auf die Therapie mit Pyridoxalphosphat. Umstritten ist nach wie vor der Einfluss der AGXT Mutation auf den Therapieerfolg mit Vitamin B6 und in welchem Ausmaß spezifische Mutationen das Ansprechen beeinflussen, oder ob lediglich ein konstanter Serumspiegel an Pyridoxalphosphat für eine erfolgreiche Therapie mit Vitamin B6 verantwortlich ist. Für die geplante multizentrische Folgestudie, die einen möglichen Zusammenhang zwischen Genotyp und Therapie analysieren wird, wäre es von großem Vorteil, genauere Informationen über das Dosis-Wirkungsprinzip zu haben, um auch in Bezug auf den Genotyp des individuellen Patienten Aussagen über die Wirksamkeit einer Pyridoxalphosphattherapie machen zu können, um eine optimale Dosierung und eine bestmögliche Compliance zu ermöglichen.

#### **1.4.1 Primärer Endpunkt**

Als primärer Endpunkt dieser Studie wurde die Reduktion der Urinoxalatausscheidung nach 24 Wochen (prozentuale Veränderung des Urinoxalats in  $\text{mmol}/1,73 \text{ m}^2/24 \text{ h}$ ) verglichen mit den Werten zum Zeitpunkt der Baseline (Studienbeginn) festgelegt, denn die Urinoxalatwerte gelten als standardisiertes Messinstrument für den Therapieerfolg bei PH I Patienten. Außerdem steht die Höhe der Urinoxalatausscheidung als ursächlicher Parameter von Urolithiasis und Nephrokalzinose in direktem Zusammenhang mit dem Fortschreiten des Verlusts der Nierenfunktion. Letzteres ist wiederum ein starker Prädiktor für den Verlauf und die Mortalität der Erkrankung, die es letztendlich zu beeinflussen gilt.

### 1.4.2 Sekundäre Endpunkte

- Sekundärer Endpunkt ist einerseits das Dosis-Wirkungs-Verhältnis gemessen an den Serumspiegeln von Pyridoxalphosphat und deren Beziehung zu der Urinoxalatausscheidung in Woche 6, 12, 18 und 24.
- Andererseits wird der Plasmaoxalatwert herangezogen, um einen prozentualen Vergleich zwischen den Baseline Werten und der Plasmakonzentration von Oxalat in Woche 6, 12, 18 und 24 herzustellen. Dies basiert auf dem Wissen, dass Pyridoxalphosphat ähnlich wie bei der Urinoxalatkonzentration einen positiven Effekt auf die Plasmaoxalatkonzentration haben kann. Letztere ist häufig schon bei nur leicht reduzierter GFR (CKD 2), d. h. im Anfangsstadium der PH erhöht.
- Einen weiteren sekundären Endpunkt stellt die regelmäßige Kontrolle der Urinoxalatausscheidung (prozentuale Veränderungen des Urinoxalats in  $\text{mmol}/1,73 \text{ m}^2/24 \text{ h}$ ) in Woche 6, 12, 18 und 24 verglichen mit den Werten zum Zeitpunkt der Baseline dar.
- Als übergeordneter sekundärer Endpunkt gilt letztendlich auch die Sicherheit der oralen Applikation einer i.v. Pyridoxalphosphatlösung.

## 2. Methodik

### 2.1 Ablauf der Studie

Die vorliegende Pilotstudie ist eine monozentrische, nicht-randomisierte, einarmige, offene, klinische Phase II Pilotstudie mit dem Ziel, die Effektivität, das Dosis-Wirkungsprinzip und die Sicherheit der Pyridoxalphosphattherapie bei Patienten mit primärer Hyperoxalurie Typ I zu analysieren.

Nach Genehmigung durch die Ethikkommission der Universität Köln konnte die Studie im Januar 2011 beginnen. Der zeitliche Studienablauf umfasste pro Patient 24 Wochen und begann mit einem Screening Besuch des Patienten/ der Patientin in der kindernephrologischen Abteilung der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Köln. Hierbei wurde die Diagnose PH I anhand von molekulargenetischen Gutachten oder einer Leberbiopsieresultat verifiziert, die schriftliche Einwilligung seitens der/des Erziehungsberechtigten sowie des Patienten/der Patientin eingeholt, eine grundlegende körperliche Untersuchung mit Bestimmung des Körpergewichts und der Größe und die Erfassung der medizinischen Vorgeschichte und eventueller Dauermedikation durchgeführt. Neben einem Differentialblutbild und einer Bestimmung der Blutchemie (Elektrolyte, Metabolite und Proteine, Serum) wurde ein Schwangerschaftstest ( $\beta$ -HCG, Serum) und eine Untersuchung des Urins auf Leukozyten, Erythrozyten, Protein, Glucose und Nitrit veranlasst. Die eGFR nach Schwartz ( $\text{ml}/\text{min} \cdot 1,73 \text{ m}^2 = \text{Korrekturfaktor} \times \text{Körperlänge (cm)} / \text{Kreatininkonzentration im Plasma (mg/dl)}$ ) zur Bestimmung der GFR bei Kindern bis zum 18. Lebensjahr) wurde errechnet und der Vitamin B6-Spiegel per High Performance Liquid Chromatographie (Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie) im Serum bestimmt, wobei es sich hier um die quantitative Bestimmung der Kombination von Pyridoxin und Pyridoxalphosphat handelt. Bei den Patienten mit regelmäßiger Vitamin B6 Einnahme bis zum Screening und einem Serum B6-Spiegel  $> 30 \mu\text{g/l}$  wurde eine mindestens vierwöchige Auswaschphase begonnen, bis der Serumspiegel nur noch im Normbereich lag. Bei den anderen Patienten konnte sofort mit der Studienmedikation begonnen werden (Vitamin B6 im Serum  $< 30 \mu\text{g/l}$ ). Insgesamt wurde den

Patienten pro Visitertermin 4-5ml Blut entnommen. Bei den mit Vitamin B6 vorbehandelten Studienteilnehmern wurde nach einer vierwöchigen Einnahmepause erneut der Pyridoxalphosphatspiegel im Serum bestimmt. Nur wenn dieser  $< 30 \mu\text{g/l}$  lag, konnte mit der Studie begonnen werden, ansonsten verlängerte sich die Auswaschphase bis zum Erreichen des Normalwertes. Bei Studienbeginn wurden die Baselinewerte ermittelt, dazu gehörten eine erneute körperlichen Inspektion, Urin- und Blutuntersuchungen (siehe Tabelle 1), die Analyse von 2 x 24h-Sammelurin auf Oxalat, Calcium, Kreatinin und Citrat mit pH-Wert Bestimmung, die Ermittlung des Plasmaoxalatwertes und einer Ultraschalluntersuchung der Nieren und ableitenden Harnwege. Dann startete der Patient/die Patientin am Tag 0 mit der Studienmedikation in einer Dosis von 5 mg/kg KG/24h in zwei gleichen Dosen morgens und abends. In sechswöchigem Abstand, d. h. in Woche 6, 12, 18 und 24 stellte sich der Patient/die Patientin erneut in der Kölner Nierenambulanz vor, um nochmals Untersuchungen wie zum Zeitpunkt der Baseline durchführen zu lassen (siehe Tabelle 1) und zeitgleich wurde bei fehlenden Kontraindikationen (keine Nebenwirkungen) die Studienmedikation um jeweils 5 mg/kg KG/24h bis auf eine Maximaldosis von 20 mg/kg KG/24h in Woche 18 erhöht. In den Wochen 8, 10, 14, 16, 20 und 22 wurden Telefonate mit den Erziehungsberechten, bzw. den Patienten selbst geführt, um zwischenzeitlich aufgetretene Komplikationen, Nebenwirkungen, adverse Events und die Compliance der Patienten zu erfassen und zu dokumentieren. Vier Wochen nach Beendigung der Studie, also in Woche 28 erfolgte ebenfalls ein solches Telefonat zwecks Eigenangaben des Probanden zu verspätet aufgetretenen Nebenwirkungen.

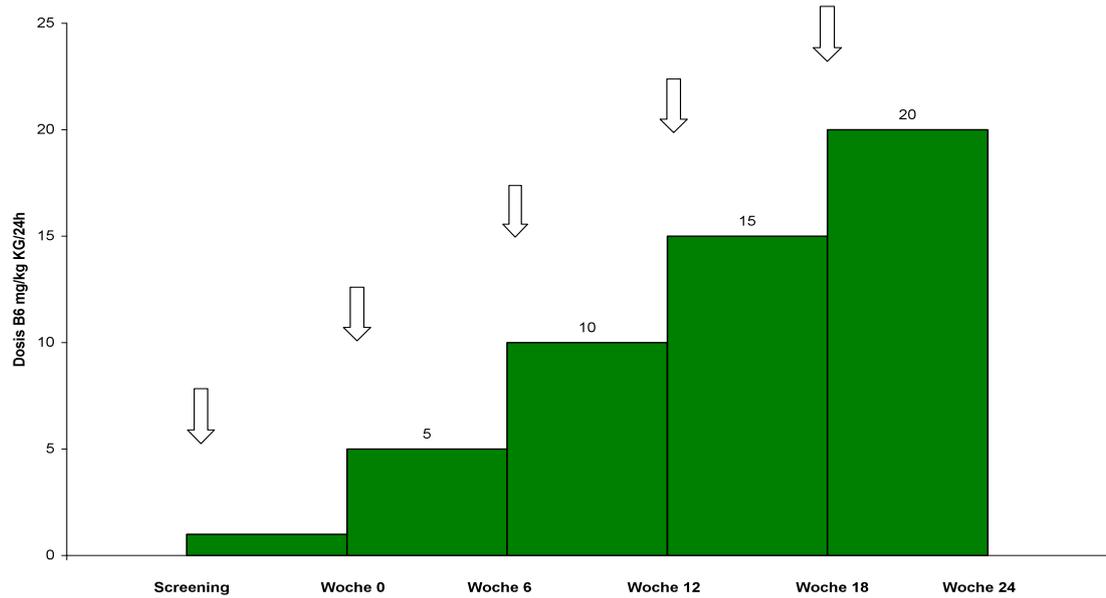


Abbildung 5: Studiendesign

	Screening	Tag 0	Woche 6	Woche 12	Woche 18	Woche 24	Woche 28
Medizinische Vorgeschichte	X						
Behandlungsbeginn		X					
Dokumentation der Erkrankung PH I	X						
Überprüfung der (Begleit-) Medikation	X	X	X	X	X	X	X
Nebenwirkungen	X	X	X	X	X	X	X
Körperliche Untersuchung	X	X	X	X	X	X	
Gewicht	X	X	X	X	X	X	
Größe	X					X	
Schwangerschaftstest (Serum)		X					
Schwangerschaftstest (Urin)			X	X	X	X	
Sonographie der Nieren		X				X	
24h-Sammelurin		X	X	X	X	X	
Urinoxalatmessung		X	X	X	X	X	

Vitamin B6 Messung (Serum)	X	X	X	X	X	X	
Serumoxalatmessung		X	X	X	X	X	
Blutentnahme Sicherheitsparameter	X	X	X	X	X	X	
Nierenfunktionsberechnung		X	X	X	X	X	

**Tabelle 1:** Studienablauf

## 2.2 Patientenkollektiv

Zur Zeit gibt es ca. 150 diagnostizierte Fälle von PH I in Deutschland. Etwa 20 Patienten mit PH I wurden durch die kindernephrologische Ambulanz der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Köln betreut und stellten sich dort alle drei Monate zu Kontrolluntersuchungen vor. Die meisten anderen Patienten kommen in größeren Abständen, um die Therapie zu optimieren und den Erkrankungsprogress kontrollieren zu lassen. Aufgrund dessen wurde der größte Teil der zwölf Studienteilnehmer aus dem Kölner Patientenpool rekrutiert, sofern die Einschlusskriterien erfüllt wurden.

### 2.2.1 Einschlusskriterien

- Dokumentation der Diagnose PH I
  - a. In Form einer Leberbiopsie mit einem nachgewiesenen funktionellen Defekt bzw. einer Mislokalisierung der leberspezifischen peroxisomalen AGT.
  - b. Vorliegen eines molekulargenetischen Gutachten mit dem Nachweis einer bekannten homozygoten oder compound heterozygoten Mutation im AGXT Gen.
- Männliche oder weibliche Patienten im Alter von 5 bis 60 Jahren
- Nierenfunktion mit einer geschätzten GFR von  $> 60 \text{ ml/min} \cdot 1,73 \text{ m}^2$
- Patienten mit vorausgegangener Vitamin B6-Therapie müssen in eine eventuell notwendige mindestens vierwöchige Auswaschphase

einwilligen, bis der Pyridoxalphosphatspiegel im Serum sich normalisiert hat.

- Die schriftliche Einwilligungserklärung des Patienten/der Patientin und der/des Erziehungsberechtigten müssen vorliegen.

### **2.2.2 Ausschlusskriterien**

- Schwangerschaft und Stillperiode
- Sexuell aktive Frauen im gebärfähigen Alter ohne sichere Verhütungsmaßnahmen (sichere Verhütungsmaßnahmen sind definiert durch einen Pearl-Index  $< 1$ ), sofern keine chirurgische Sterilisation durchgeführt wurde. Die Einwilligung zur Durchführung einer sicheren Kontrazeption während der gesamten Dauer der Studie muss gewährleistet sein.
- Patienten nach einer Leber- oder Nierentransplantation oder einer kombinierten Leber-Nierentransplantation
- Chronische Diarrhoe oder eine chronisch entzündlichen Darmerkrankung in der Vorgeschichte mit dem Risiko einer intestinalen Malabsorptionsstörung
- Begleiterkrankungen und/ oder Abnormalitäten die nach Ermessen des Prüfarztes zu einer unsicheren Absorption bzw. einer mit Risiken behafteten Einnahme des Pyridoxalphosphats führen können.
- Teilnahme an anderen interventionellen Studien vier Wochen vor Studienbeginn, während der Studie und vier Wochen nach Studienende
- Patienten, denen es nicht möglich ist die Studienmedikation zu schlucken
- Patienten, denen es nicht möglich ist 24-Unrinsammlungen durchzuführen oder anderen Studienabläufen zu folgen
- Gleichzeitige Einnahme von Begleitmedikation, deren Wechselwirkung mit Pyridoxalphosphat bekannt ist und die den Pyridoxalphosphatspiegel im Serum beeinträchtigen könnten (L-Dopa, Isoniazid, D-Penicillamin)
- Patienten mit einer bekannten Allergie gegen eine oder mehrere der enthaltenen Substanzen in der Studienmedikation (z. B. Kaliumsorbit, Himbeersirup, Pyridoxalphosphat)

- Patienten, die durch gerichtliche oder behördliche Anordnung in einer Anstalt untergebracht sind
- Patienten, die in einem Abhängigkeitsverhältnis zum Sponsor oder Prüfarzt der Studie stehen

### **2.3 Studienmedikation**

Die Studienmedikation mit dem Namen Pyridoxal-Phosphatlösung wurde von der Apotheke der Johannes Gutenberg Universität Mainz hergestellt und beinhaltet 100 mg Pyridoxin-HCl/3ml Lösung, Kaliumsorbitat als Konservierungsmittel und Himbeersirup zur Geschmacksneutralisation. Die Grundsubstanz (Vitamin B6 i.v. Lösung) ist handelsüblich erhältlich unter dem Namen Vitamin B6-ratiopharm Injektionslösung 50mg/ml. Die Behälter mit der Studienmedikation wurden regelmäßig vor der Ausgabe an die Patienten und nach der Rückgabe an das Studienzentrum gewogen und die Ergebnisse dokumentiert, um anhand der Differenz zu überprüfen, ob die Einnahme laut Anweisungen erfolgt war. Eventuelle Restbestände wurden durch die herstellende Apotheke entsorgt. Die Injektionslösung wurde bewusst gewählt, um eine exakte Dosierung gewährleisten zu können, die mit den handelsüblichen Tabletten nicht durchführbar gewesen wäre. Die Medikation und die entsprechenden sterilen Adapter für die folgenden 42 Behandlungstage wurden jeweils bei den Visiterterminen in der Nierenambulanz ausgegeben und die Eltern und Patienten erhielten Instruktionen zu Einnahme. Morgens und abends, jeweils nach dem Frühstück bzw. nach dem Abendessen mit einem zeitlichen Abstand von ca. zwölf Stunden sollte die Hälfte der errechneten Tagesdosis geschluckt werden. Die folgenden 30 Minuten nach der Einnahme sollte eine Beobachtung auf mögliche Unverträglichkeiten erfolgen. Die Anfangsdosis wurde auf 5 mg/kg KG/24h festgesetzt und in Abständen von sechs Wochen jeweils nach dem regulären Visitertermin in der Nierenambulanz und entsprechenden Blutabnahme sowie der Untersuchungen des Sammelurins auf Vollständigkeit (Kreatininausscheidung pro kg KG/24h) um 5 mg/kg KG/24h erhöht. Bei unerwartet auftretenden Nebenwirkungen wurde der Patient/die Patientin auf die niedrigere noch nebenwirkungsfreie Dosis

zurückgestuft und die Dosis wurde nicht erhöht. Die Entscheidung die Startdosis auf 5 mg/kg KG/24h und die maximale Dosis auf 20 mg/kg KG/24h festzusetzen, basiert lediglich auf klinischen Erfahrungswerten, da es noch keine systematischen Studien zum Dosis-Wirkungsprinzip bzw. zur Überlegenheit einer bestimmten Dosis gegenüber einer anderen gibt. Wir legten die Dauer der Studie auf sechs Monate mit vier Dosissteigerungen in Intervallen von sechs Wochen aus. Nach Beendigung der Medikamentengabe in Woche 24 und einer erneuten Auswaschphase von vier Wochen und Wertekontrolle zur Woche 28 wurde den Patienten, bei denen ein Ansprechen auf Vitamin B6 zu sehen war, geraten die Medikation in der individuell niedrigsten Dosis mit dem größten Nutzen fortzuführen. Patienten, die kein Ansprechen auf die Studienmedikation zeigten, d. h. keine Reduktion der Urinoxalatkonzentration zu verzeichnen war, wurde empfohlen die Medikation mit Vitamin B6 nicht weiterzuführen. Auf eine schrittweise Reduktion des Pyridoxalphosphats kann in einem solchen Fall verzichtet werden.

## **2.4 Datenerhebung**

Die Datenerhebung zur Sicherheit der Studienmedikation erfolgte während der sechswöchentlichen Visiten der Patienten durch den Prüfarzt oder in die Studie involviertes ärztliches Personal in der Nierenambulanz der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Köln. Außerdem wurden die zweiwöchentlich geführten Telefonate zwischen den Visiten durch die Studienassistentin schriftlich dokumentiert und etwaige adverse Events (AE) bzw. serious adverse Events (SAE) durch den Prüfarzt validiert. Die Analyse der Blut- und Urinproben wurde im Falle der Sicherheitsparameter, d.h. dem Differentialblutbild, der Blutchemie und den Basisparametern des Urins (pH-Wert, Calcium, Kreatinin und Citrat), vom Zentrallabor der Uniklinik Köln durchgeführt. Mit der Bestimmung des Pyridoxalphosphatspiegels im Serum wurde das Labor Eberhard und Partner in Dortmund beauftragt. Die Analyse von Oxalat im Plasma und im 24h-Sammelurin erfolgte im eigenen Labor der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Köln. Um vorzeitige Beeinflussung und Schlussfolgerung durch das Studien- und Laborpersonal

zu vermeiden, wurden die Ergebnisse der Oxalatbestimmung in Urin und Plasma und des Serumpyridoxalphosphats verblindet und mit einem Pseudonym versehen bis die Studie für alle Patienten beendet war. Alle erhobenen Daten wurden in der elektronischen Datenbank des Studienzentrums der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Köln dokumentiert. Die hohe Qualität der Studie und die Validität der Daten wurden regelmäßig durch Überprüfung durch einen Monitor sichergestellt. Die Compliance der Studienteilnehmer wurde einerseits in zweiwöchigen Abständen telefonisch erfragt (siehe 3.1. Ablauf der Studie) und andererseits wurden die Behälter mit Studienmedikation vor der Ausgabe an die Patienten und nach dem Ende der Einnahme gewogen und die Differenz mit der verordneten Menge an Studienmedikation verglichen, um anhand von möglichen Diskrepanzen auf die Compliance der Patienten schließen zu können (siehe 3.3. Studienmedikation).

## **2.5 Statistik und Datenanalyse**

Die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde mit Unterstützung des Instituts für Medizinische Statistik, Informatik und Epidemiologie (IMSIE) der Universität Köln durchgeführt. Initial wurde das Patientenkollektiv in Subgruppen unterteilt, abhängig von der Compliance während der Studie. Die erste Gruppe beinhaltete alle Studienteilnehmer mit mindestens einem gemessenen Urinoxalatwert nach Studienstart. Die zweite Gruppe umfasst alle Patienten, die die Studie korrekt und mit allen erforderlichen Messwerten beendet haben, also komplett compliant waren. Analysen zur Sicherheit der Einnahme der Studienmedikation wurden gruppenübergreifend durchgeführt. Unterscheidungen wurden hier lediglich im Hinblick auf das Geschlecht vorgenommen.

Die Kategorien zur genaueren Beschreibung und Einteilung innerhalb dieser Gruppen werden unter den folgenden Aspekten dargestellt:

- Alter bei Studienstart
- Alter bei Diagnosestellung
- Alter bei Auftreten der ersten Symptome

- Geschlecht
- Körpergewicht
- Diagnosekriterium für PH I
- Typ der Genmutation
- Nierenfunktion bei Studienbeginn
- Bisherige Therapie der PH I
- Urinoxalatkonzentration, Pyridoxalphosphatkonzentration im Serum und Höhe des Plasmaoxalats bei Studienbeginn

Die Ergebnisse zur Bewertung des primären Endpunktes d.h. die Urinoxalatausscheidung zwischen Studienbeginn und Woche 24 (unter Medikation mit 20 mg/kg KG/24h) wurden pro Patient in einer Serie graphisch dargestellt und der Mittelwert und die 95% Konfidenzintervalle wurden errechnet. Um die Abhängigkeit der Urinoxalatekretion zur Pyridoxalphosphatdosis beurteilen zu können wurden gepaarte t-Tests durchgeführt. Im Sinne des sekundären Endpunktes wurden die gleichen statistischen Mittel herangezogen um die individuellen Veränderungen der Urinoxalatwerte zwischen Studienbeginn und den Wochen 6, 12 und 18 zu beschreiben. Die individuelle Kurve des Pyridoxalphosphatspiegels im Serum und des Plasmaoxalatspiegels werden im zeitlichen Verlauf beschrieben und statistisch zusammengefasst. Die Beziehung zwischen dem Bereich unter der Serumpyridoxalphosphatkurve und der Gesamtreduktion des Urinoxalatlevels wurden in einem Streudiagramm grafisch dargestellt. Analysen zur Sicherheit der Studienmedikation wurden anhand der Quantifizierung der adverse Events und serious adverse Events und unter Berücksichtigung des Follow-ups vorgenommen. Für die statistischen Berechnungen wurden R 2.15.0, 2012 und IBM SPSS statistics version 20, 2011 verwendet.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Baseline

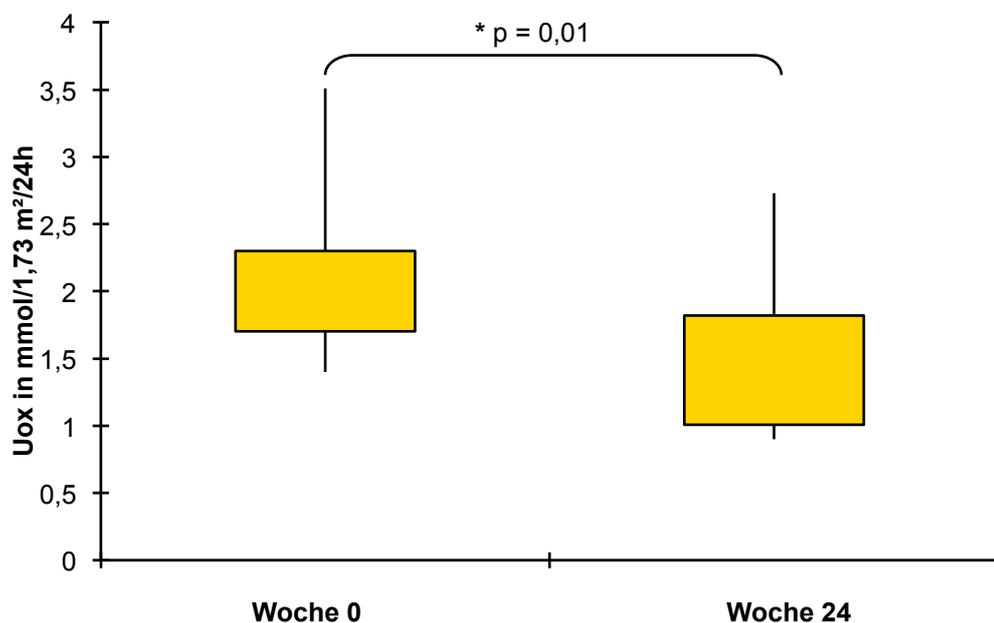
Insgesamt konnten wie geplant zwölf Patienten nach Berücksichtigung der Ein- und Ausschlusskriterien in die vorliegende Pilotstudie eingeschlossen werden. Sieben dieser Patienten (58,3 %) waren männlich, fünf weiblich (41,7 %). Der erste Patient wurde im Januar 2011 eingeschlossen und die letzte Patientin im Januar 2012. Der jüngste Studienteilnehmer war bei Studieneinschluss sieben und der älteste Patient 18 Jahre alt. Das durchschnittliche Alter der Patienten betrug 13,08 Jahre. 67 % der Patienten wurden schon vor Beginn der Studie mit Vitamin B6 behandelt. Die Dosis variierte dabei zwischen 4 und 8 mg/kg KG/24h. Alle Patienten wiesen bei Studienbeginn eine kompensierte Nierenfunktion ( $GFR > 60 \text{ ml/min} \cdot 1,73 \text{ m}^2$ ) auf, mit einem Mittelwert der GFR nach Schwartz von  $139 \text{ ml/min} \cdot 1,73 \text{ m}^2$ . Alle Teilnehmer waren kaukasischer Herkunft. Drei Patienten waren homozygot für die c.508G>A Mutation (Gly170Arg), fünf heterozygot für die Mutationen c.508G>A (Gly170Arg) und/oder c.454T>A (Phe152Ile) und weitere vier Studienteilnehmer wiesen eine andere krankheitsverursachende Mutation auf.

Variable	Studienkollektiv
Männlich/Weiblich	7/5
Alter in Jahren (Mittelwert $\pm$ SD)	13,08 $\pm$ 3,14
GFR nach Schwartz ( $\text{ml/min} \cdot 1,73 \text{ m}^2$ ) (Mittelwert $\pm$ SD)	139 $\pm$ 37
c.508G>A homozygot (n)	3
c.508G>A heterozygot (n)	5
c.508G>A negativ (n)	4
Pyridoxalphosphattherapie vor Studienstart (n)	8
Nephrokalzinose (n)	5
Grad 1 (n)	3
Grad 2 (n)	2
Urolithiasis (n)	8

**Tabelle 2:** Patientenkollektiv zum Zeitpunkt der Baseline

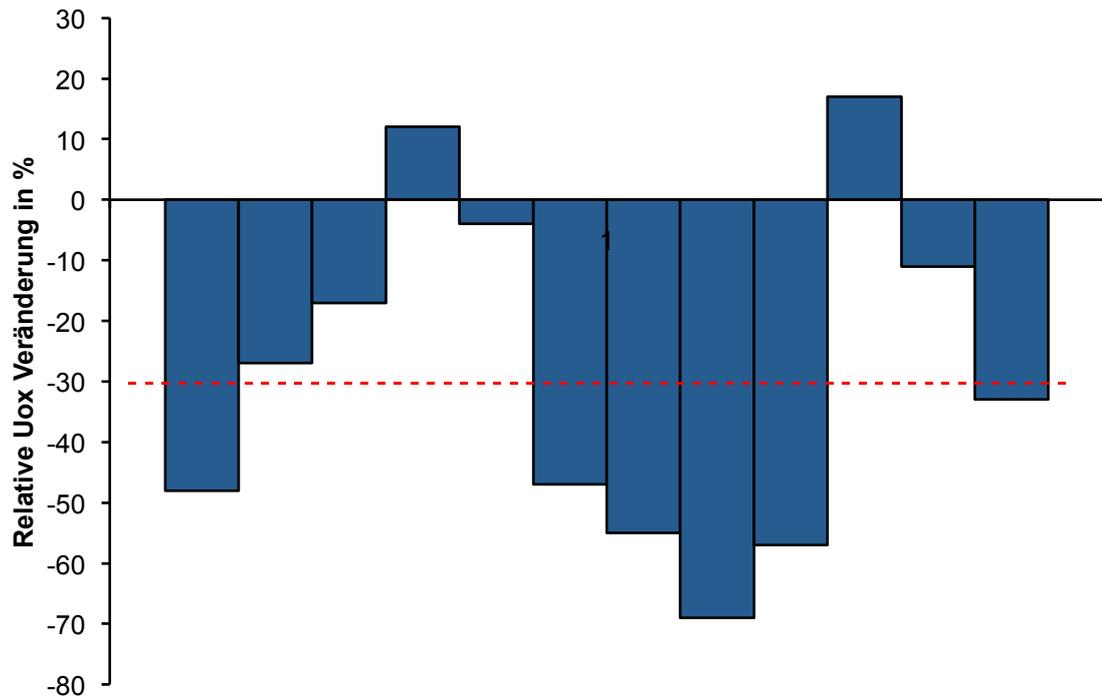
### 3.2 Urinoxalatausscheidung

Die Urinoxalatausscheidung wurde im Laufe der Studie bei jedem in die Studie eingeschlossenen Patienten fünf Mal im Abstand von sechs Wochen erfasst. So war es möglich den Verlauf über 24 Wochen zu verfolgen und Schwankungen zu registrieren. Bis auf einen Patienten, der aufgrund von Übelkeit die Dosissteigerung von 15 auf 20 mg/kg KG/24h um vier Wochen verzögerte und so eine Studiendauer von 30 Wochen absolvierte, beendeten alle eingeschlossenen Patienten die Studie laut Zeitplan nach 24 Wochen und mit den vorhergesehenen Dosissteigerungen. Nach Auswertung aller Daten konnte im Mittel eine signifikante Senkung ( $p = 0,01$ ) des Oxalatgehalts im Urin nach 24 bzw. 30 Wochen gezeigt werden (siehe Diagramm Nr. 1).



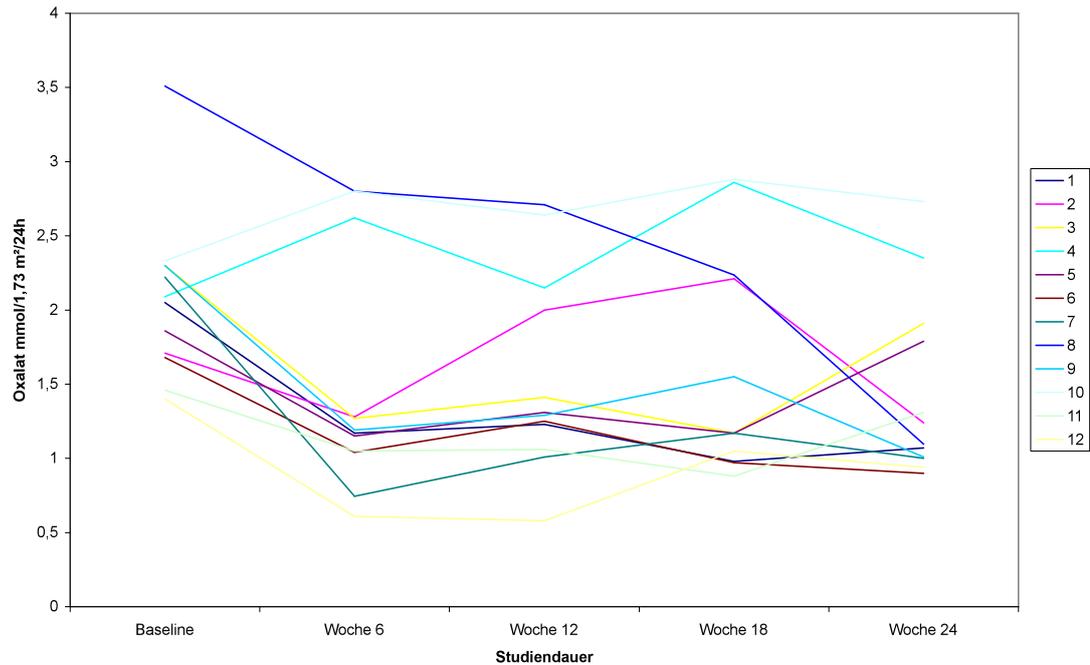
**Diagramm 1:** Absolute Uox Exkretion Woche 0 vs. Woche 24 (Mittelwert Pat. 1-12)

Ebenso ergab die Betrachtung der individuellen Ergebnisse der sechswöchigen Messung nach 6, 12 und 18 Wochen bei acht von zwölf Patienten eine Reduktion der Urinoxalatausscheidung von  $\geq 30\%$ , d.h. diese Patienten sprechen definitionsgemäß auf Pyridoxalphosphat an. Nach 24 Wochen, d.h. unter einer Dosis von 20mg/kg KG/24h zeigten sich nur noch sechs der zwölf Patienten als Responder.



**Diagramm 2:** Relative Entwicklung der Uox Exkretion Woche 0 vs. Woche 24  
(individuelle Veränderung der Pat. 1-12)

Bei sieben Patienten konnte die Maßgabe einer mindestens 30%igen Reduktion des Urinoxalats schon nach sechs Wochen, sprich mit einer Dosis von 5 mg/kg KG/24h erfüllt werden. Zwei der zwölf Patienten zeigten im Verlauf eine Erhöhung des Oxalatgehalts im Urin und können folglich als non-responder bezeichnet werden. Im Mittel reduzierte sich die Urinoxalatausscheidung (mmol/1,73 m<sup>2</sup>/24h) bei Betrachtung aller Patienten nach 24 Wochen um 25,5% (SD = 26,1%). Absolut gesehen reduzierte sich die Urinoxalatausscheidung aller Patienten im Mittel nach 24 Wochen von  $2,09 \pm 0,55$  auf  $1,53 \pm 0,6$  mmol/1,73 m<sup>2</sup>/24h ( $p = 0,01$ ). Anhand von Diagramm Nr. 3 wird der individuelle Verlauf der Urinoxalatausscheidung deutlich.



**Diagramm 3:** Individueller Uox Verlauf vom Zeitpunkt der Baseline bis Woche 24 (Pat. 1-12)

Nach sechs Wochen reduzierte sich der Urinoxalatgehalt im Mittel um 30,58% (Durchschnittswert absolut: 1,48 mmol/1,73 m<sup>2</sup>/24h), nach zwölf Wochen um 26,17% (Durchschnittswert absolut: 1,55 mmol/1,73 m<sup>2</sup>/24h) und nach 18 Wochen konnte der mittlere Gehalt an Oxalat im Urin um 23,25% gesenkt werden (Durchschnittswert absolut: 1,59 mmol/1,73 m<sup>2</sup>/24h), jeweils bezogen auf den Ausgangswert zum Zeitpunkt der Baseline. Die Urinausscheidung betrug im Durchschnitt 2886 ml/24h.

Unter den drei Patienten, die homozygot für die häufigste krankheitsverursachende Mutation bei der PH I (c.508G>A) getestet wurden, gab es zwei Responder und einen intermittierend ansprechenden Patienten. Die Urinoxalatausscheidung reduzierte sich bei den genannten Patienten signifikant ( $p < 0,05$ ) im Mittel von  $1,8 \pm 0,4$  mmol/1,73 m<sup>2</sup>/24h zum Zeitpunkt der Baseline auf  $0,93 \pm 0,06$  mmol/1,73 m<sup>2</sup>/24h nach Woche 24 (entspricht - 47 ± 47,89%). Unter den fünf Patienten, die einen heterozygoten Mutationsstatus aufweisen, gab es einen Responder, einen non-responder und drei intermittierende Responder. Die Urinoxalatausscheidung reduzierte sich bei diesen Patienten im Mittel von  $1,89 \pm 0,34$  mmol/1,73 m<sup>2</sup>/24h zum Zeitpunkt der Baseline auf  $1,48 \pm 0,38$  mmol/1,73 m<sup>2</sup>/24h nach Woche 24 ( $p$

= 0,07). Dies entspricht im Durchschnitt einer Reduktion des Oxalatgehalts im Urin um  $-20,89 \pm 17,78\%$ . Zwei dieser Patienten sind Brüder (Pa. 1 und 2), von denen einer auf die Medikation ansprach und der andere nicht.

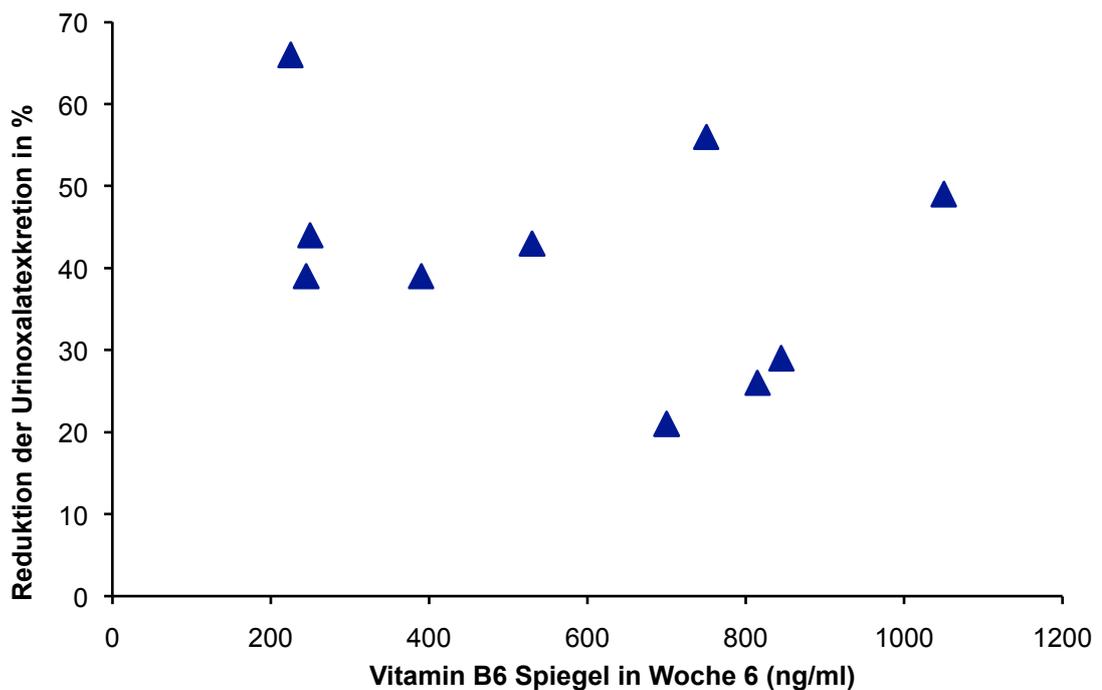
Negativ für die c.508G>A Mutation wurden in dieser Studie vier Patienten getestet. In dieser Gruppe gab es einen Responder, zwei non-responder und einen Studienteilnehmer, der nur intermittierend auf die Medikation ansprach. Die Urinoxalatausscheidung reduzierte sich bei diesen vier Patienten im Mittel von  $2,55 \pm 0,64 \text{ mmol}/1,73 \text{ m}^2/24\text{h}$  zum Zeitpunkt der Baseline auf  $2,03 \pm 0,65 \text{ mmol}/1,73 \text{ m}^2/24\text{h}$  nach Woche 24 (entspricht  $-15,1 \pm 37,35\%$ ).

Patient	5mg/kg	10mg/kg	15mg/kg	20mg/kg	Genotyp
12	+	+	-	+	c.508G>A <b>homoz.</b>
6	+	+	+	+	c.508G>A <b>homoz.</b>
7	+	+	+	+	c.508G>A <b>homoz.</b>
3	+	+	+	-	c.508G>A <b>heteroz.</b>
11	-	+	+	-	c.508G>A <b>heteroz.</b>
1	+	+	+	+	c.508G>A <b>heteroz.</b>
2	-	-	-	-	c.508G>A <b>heteroz.</b>
5	+	-	-	-	c.508G>A <b>heteroz.</b>
8	-	-	+	+	c.508G>A <b>negativ</b>
10	-	-	-	-	c.508G>A <b>negativ</b>
9	+	+	+	+	c.508G>A <b>negativ</b>
4	-	-	-	-	c.508G>A <b>negativ</b>

**Tabelle 3:** Ansprechen auf die Studienmedikation in Relation zum Genotyp

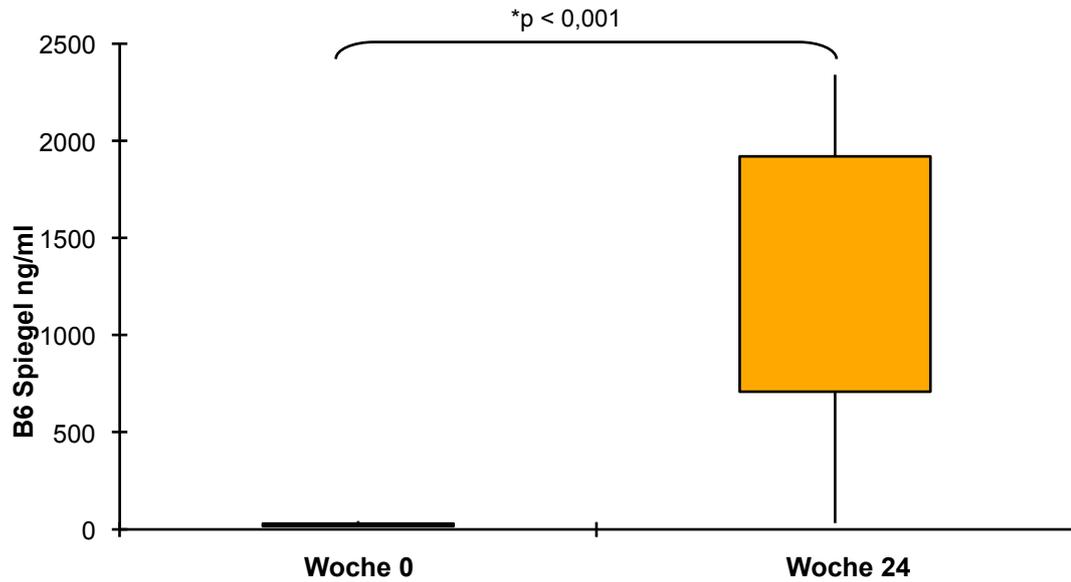
### 3.3 Pyridoxalphosphatspiegel

Einen weiteren wichtigen Endpunkt dieser Studie stellte die Relation zwischen dem Pyridoxalphosphatspiegel im Serum und der Urinoxalatausscheidung dar. Insofern wurden bei der vorliegenden Pilotstudie der Zusammenhang der Fläche unter der Serumpyridoxalphosphatkurve mit der Gesamtreduktion der Urinoxalatausscheidung in einem Streudiagramm (Nr. 4) bildlich dargestellt und der Korrelationskoeffizient  $r = 0,27$  errechnet.



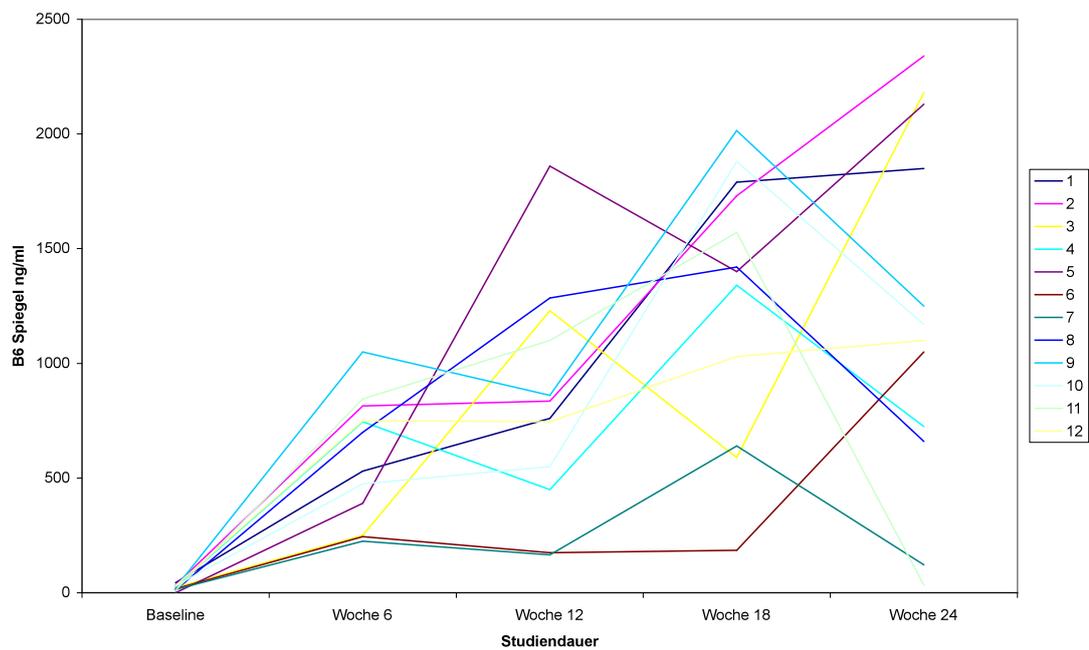
**Diagramm 4:** Korrelation zwischen dem mittleren B6-Spiegel und der prozentualen Reduktion der Urinoxalatekretion der Patienten 1-12 ;  $r = 0,27$  (exemplarisch Woche 6)

Des Weiteren ist im Diagramm Nr. 5 der mittlere Pyridoxalphosphatspiegel zum Zeitpunkt der Baseline und nach 24 Wochen dargestellt ( $22,47 \pm 8,69$  ng/ml (Baseline) vs.  $1217,42 \pm 775,95$  ng/ml (Woche 24)).



**Diagramm 5:** Vitamin B6-Spiegel Woche 0 vs. Woche 24 (Mittelwert der Pat. 1-12)

Interindividuelle Unterschiede sind im Verlauf über die gesamte Studiendauer im Diagramm Nr. 6 zu sehen.



**Diagramm 6:** Individueller B6-Spiegel Verlauf vom Zeitpunkt der Baseline bis Woche 24 (Pat. 1-12)

Nach sechswöchiger Einnahme der Studienmedikation lag der mittlere Pyridoxalphosphat Spiegel im Serum der zwölf Patienten bei 585 ng/ml, nach zwölf Wochen betrug dieser 835,4 ng/ml und nach 18 Wochen 1292,8 ng/ml.

Insgesamt konnte vom Zeitpunkt der Baseline bis Woche 24 eine Erhöhung des Serumspiegels an Pyridoxalphosphat von  $22,47 \pm 8,69$  auf  $1217,42 \pm 775,95$  ng/ml ( $p < 0,001$ ) festgestellt werden.

Die eingenommene Dosis an Vitamin B6 und der gemessene Pyridoxalphosphatspiegel bei den Patienten korrelierten statistisch nicht miteinander ( $r = 0,66$ ).

### **3.4 Nephrokalzinose und Urolithiasis**

Um auch den klinischen Verlauf der Erkrankung während der Studie zu dokumentieren wurden zum Zeitpunkt der Baseline sowie nach 24 Wochen jeweils Ultraschalluntersuchungen der Nieren und ableitenden Harnwege bei allen Patienten durchgeführt. Da Urolithiasis (Sonografischer Nachweis von Konkrementen im Bereich des Nierenbeckens bis zur Harnblase) und Nephrokalzinose (57% bzw. 45%) typische Erstsymptome bei PH I Patienten sind (40) und auch im Stadium der kompensierten Nierenfunktion zum Tragen kommen, wurde auch bei diesem Patientenkollektiv das Augenmerk u.a. auf die Bildgebung gelegt. Bei Einschluss in die Studie konnte bei fünf von zwölf Patienten eine Nephrokalzinose (41,67%) nachgewiesen werden. Vier dieser Patienten wiesen ein Stadium 1 und ein Patient ein Stadium 2 nach Hofmann auf (30). Nach Ablauf der Studie und der 24-wöchigen Einnahme von Pyridoxalphosphat präsentierten sich ebenfalls fünf von zwölf Patienten mit Zeichen einer Nephrokalzinose in der Bildgebung. Allerdings erfüllten nur noch zwei Patienten die Kriterien des Stadium 1 und die anderen drei Patienten wurden als Stadium 2 klassifiziert. Eine Urolithiasis wurde zum Zeitpunkt der Baseline bei acht von zwölf Patienten (66,67%) diagnostiziert und nach 24 Wochen bei zehn von zwölf Patienten (83,33%). In der Gesamtschau waren bei Einschluss in die Studie vier Patienten sowohl von Nephrokalzinose und Urolithiasis betroffen, ebenfalls vier Patienten zeigten Symptome der Urolithiasis und ein Patient fiel mit dem isolierten Krankheitsbild der Nephrokalzinose auf. Bei Beendigung der Studie präsentierten sich vier von zwölf Patienten mit Nephrokalzinose und Urolithiasis, ein Patient erfüllte die Kriterien der Nephrokalzinose und sechs Patienten zeigten nur die Symptome einer Urolithiasis. Bei einem Patienten

kam es zu einem komplikationslosen Steinabgang während der Studiendauer.

### **3.5 Sicherheitsaspekte**

Ein weiterer sekundärer Endpunkt dieser Pilotstudie war die Untersuchung der Sicherheit der oralen Einnahme einer intravenösen Pyridoxalphosphatlösung. Nach Beendigung der Studie und unter Berücksichtigung aller aufgetretenen Nebenwirkungen ist zu sagen, dass die orale Form der Verabreichung und diese Zusammensetzung der Medikation (siehe Kap. 3.3 Studienmedikation) als sicher erachtet werden kann und von den Patienten gut toleriert wurde. Der überwiegende Teil der dokumentierten Adverse Events (70 bei 83,3% der Patienten) waren zu erwartende Krankheiten und Symptome, die im Kindes- und Jugendalter regelhaft auftreten, wie z. B. virale Infekte, Entzündungen des Nasen-Rachenraumes und Cephalgien. Relevante Nebenwirkungen des Pyridoxalphosphats wie Lichtempfindlichkeit, Akne und Übelkeit als bekannte Nebenwirkungen von Vitamin B6 in erhöhter Dosierung, traten jeweils bei einem der zwölf Patienten auf. Letzteres hatte zur Folge, dass der betroffene Patient statt laut Protokoll in Woche zwölf die Dosis auf 15 mg/kg KG/24h zu erhöhen, weitere sechs Wochen 10 mg/kg KG/24h einnahm und erst dann die Dosis nebenwirkungsfrei gesteigert werden konnte. Dies führte zu einer verlängerten Studiendauer von insgesamt 30 Wochen. Insgesamt kam es bei keinem der Patienten zu Unregelmäßigkeiten oder Unterbrechungen bezüglich der Einnahme der Studienmedikation. Als Serious Adverse Event ist eine Episode der infektiösen Gastroenteritis bei einer Studienteilnehmerin zu erwähnen, die zwei Tage andauerte, zunächst eine stationäre Beobachtung erforderte und schließlich ohne Folgen ausheilte. Bei zwei Patienten kam es während der Studie einmalig zu komplikationslosen Steinabgängen.

#### 4. Diskussion

Die Ergebnisse dieser Pilotstudie zeigen, dass im Mittel die Urinoxalatkonzentration bezogen auf alle Patienten durch die Therapie mit Pyridoxalphosphat um 25,5 % gesenkt werden konnte und 50% der Patienten positiv auf Vitamin B6 ansprachen. Dennoch konnte weder eine Korrelation zwischen der eingenommenen Dosis und dem B6-Spiegel im Serum noch zwischen dem B6-Spiegel und der Senkung der Urinoxalatexkretion festgestellt werden. Weiterhin war ein Zusammenhang zwischen dem Ansprechen auf Pyridoxalphosphat und dem vorliegenden Genotyp erkennbar.

Bei sechs von zwölf Patienten wurde in der vorliegenden Studie mit Vitamin B6 das Kriterium der Reduktion der Oxalatexkretion im Urin von  $\geq 30\%$  zum Ausgangswert erfüllt und folglich sind diese Patienten als Responder zu bewerten. Die übrigen sechs der zwölf Patienten sprachen nicht auf die Therapie mit Vitamin B6 an. Im Vergleich dazu konnte bei anderen Studien ein Ansprechen auf die Therapie mit Pyridoxalphosphat ebenfalls bei ca. 30-50% des Patientenkollektivs beobachtet werden (84, 89).

Im Verlauf der vorliegenden Studie war zu erkennen, dass die Responder auch schon bei 5 bzw. 10 mg/kg KG/24h adäquat ansprachen und eine weitere Dosissteigerung keine weitere nennenswerte Senkung der Urinoxalatausscheidung zur Folge hatte. Die Gründe für diese Beobachtungen sind noch unklar, allerdings legt dies die Vermutung nahe, dass folglich eine Dosis über 15 mg/kg KG/24h keinen weiteren positiven Effekt auf die Oxalatkonzentration im Urin hat und somit eine Therapie mit noch höheren Dosen nicht sinnvoll erscheint. Dies ist auch die Auffassung anderer Autoren, die teilweise eine Dosis von 5 mg/kg KG oder weniger für ausreichend halten (64, 67, 89). Auffällig war, dass nicht alle Patienten dauerhaft auf die Medikation ansprachen, d.h. bei einem Patienten zeigte sich erst ab einer Dosis von 15 mg/kg KG/24h ein statistisch signifikanter Effekt und bei einem anderen Patienten führte die Dosiserhöhung auf 20 mg/kg KG/24h dazu, dass die Konzentration an Oxalat im Urin wieder erheblich anstieg, trotz signifikanter Senkung in den Wochen zuvor. Die

Gründe für dieses intermittierende Ansprechen sind noch unklar, wenn auch nicht überraschend. Denn dass in diesem Fall eine sehr heterogene und multifaktoriell beeinflusste Erkrankung vorliegt ist bereits bekannt und in vielen Studien und Fallbeispielen beschrieben worden (20, 33, 55). Ein möglicher Erklärungsansatz für das intermittierende Ansprechen könnten die Pyridoxalphosphatspiegel im Blut sein, die laut den Ergebnissen dieser Studie nicht linear zur eingenommenen Dosis ansteigen. Der Korrelationskoeffizient von  $r = 0,66$  zeigt, dass kein statistischer Zusammenhang zwischen der eingenommenen Vitamin B6-Dosis und den Pyridoxalphosphatspiegeln im Blut besteht. Dabei scheinen individuelle Absorptionsmechanismen im Intestinaltrakt, mögliche Wechselwirkungen mit anderen Medikamenten, der Einnahmezeitpunkt und eventuell auch die Compliance eine große Rolle zu spielen.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass auch nachgewiesene hohe Pyridoxalphosphatspiegel im Blut sowohl bei Respondern als auch non-respondern nicht immer dazu führen, dass die Urinoxalatkonzentration im gleichen Verhältnis sinkt (Korrelationskoeffizient  $r = 0,27$ ). Gründe hierfür könnten die individuelle Lokalisation des Enzyms in der Zelle (Mitochondrium vs. Peroxisom) und die dortige Wirkungsmöglichkeit von Vitamin B6, eine unterschiedliche Restfunktion des Enzyms (1) oder aber auch die Stabilität des defekten Enzym sein (21), welches ab einer bestimmten Dosis gesättigt zu sein scheint bzw. möglicherweise seine Konformation dahingehend ändert, dass Pyridoxalphosphat nicht mehr als Kofaktor wirken kann (Abstract 10th International PH Workshop 2012). Vier der Patienten, die durchgängig auf die Therapie mit Vitamin B6 ansprachen, fielen durch eine verhältnismäßig hohe Urinoxalatausscheidung von  $> 2,2 \text{ mmol}/1,73 \text{ m}^2/24\text{h}$  zum Zeitpunkt der Baseline auf. Diese Patienten wiesen unerwartet nach 6 Wochen Therapie mit  $5 \text{ mg/kg KG}/24\text{h}$  Pyridoxalphosphat mit bis zu 66% vom Ausgangswert die größte Reduktion der Urinoxalatekretion auf.

Bei sechs von zwölf Patienten konnte im Verlauf der Studie zu keinem Zeitpunkt eine Reduktion der Oxalatkonzentration im Urin von  $\geq 30\%$  registriert werden, das heißt dieser Teil der Patienten spricht definitionsgemäß nicht auf Pyridoxalphosphat an (non-responder). Ein

wichtiger Grund dafür, der auch in der Literatur immer wieder diskutiert wird, ist der spezifische Effekt des Genotyps, bzw. der Mutation, auf die Ausprägung der AGT Restaktivität, bzw. AGT Lokalisation, also ein Genotyp/Phänotyp Effekt. Beschrieben ist, dass die häufigste Mutation im AGXT-Gen bei der PH I (c.508G>A) in Europa und den USA mit einem besseren Ansprechen auf Pyridoxalphosphat einhergeht (11, 27). Vor allem homozygote aber auch heterozygote Anlageträger dieser Mutation sprechen laut vielen klinischen Fallberichten und retrospektiven Studien besser auf eine Vitamin B6-Therapie an als Patienten mit anderen krankheitsverursachenden Mutationen (27, 67). Da der Genotyp ein wichtiges Kriterium für eine in Zukunft individuell auf den einzelnen Patienten abgestimmte Therapie darstellen wird, wurde auch in der vorliegenden Pilotstudie im Zuge der Auswertung der Daten eine Unterteilung der Patienten in homozygote und heterozygote Anlageträger für die Mutation c.508G>A sowie Patienten mit anderen PH I spezifischen Genotypen vorgenommen. Bei acht von zwölf Patienten konnte die genannte Mutation nachgewiesen werden (drei davon sind homozygot und fünf Patienten sind heterozygot) und sieben dieser Patienten zeigten eine signifikante Reduktion der Oxalatkonzentration im Urin nach Einnahme von Vitamin B6 (Responder). Bei Betrachtung der Urinoxalatkonzentration zum Zeitpunkt der Baseline und in Woche 24 sind signifikante Unterschiede bei den homo- und heterozygoten Anlageträgern für die Mutation c.508G>A zu verzeichnen. Die Patienten mit einem homozygoten Mutationsstatus in dieser Studie zeigten den größten Abfall der Urinoxalatkonzentration von der Baseline bis zu Woche 24 (- 47%). Bei den heterozygoten Patienten sprachen lediglich drei Patienten intermittierend und ein Patient dauerhaft auf Pyridoxalphosphat an. Im Gegensatz dazu gibt es keine statistische Signifikanz bei den Patienten, die negativ auf diese Mutation getestet wurden. Aussagen zum unterschiedlichen Ansprechen von homozygoten und heterozygoten Patienten für die c.508G>A Mutation können aufgrund der fehlenden statistischen Signifikanz durch die geringe Fallzahl in dieser Studie nicht getroffen werden. Auffällig war, dass der achte Patient trotz heterozygotem Mutationsstatus und identischem Genotyp wie sein Bruder (Responder) zu keinem Zeitpunkt der Studie eine Reduktion der Urinoxalatkonzentration von

≥ 30% aufwies. Da er dennoch hohe Vitamin B6 Spiegel im Blut aufwies, kann eine mangelnde Compliance als Erklärung für diese Diskrepanz ausgeschlossen werden. Ein anderes Geschwisterpaar in dieser Studie mit homozygotem Mutationsstatus zeigte im Vergleich dazu hingegen ein ähnlich gutes Ansprechen auf Pyridoxalphosphat. Die Gründe für diese häufig beschriebene intrafamiliäre Diskrepanz bei PH I wie sie bei den zuerst genannten Brüdern zu beobachten ist, sind unklar und werfen erneut die Frage auf, welche weiteren Determinanten es abseits des Genotyps gibt, die dieses unterschiedliche Ansprechen auf die Therapie mit Pyridoxalphosphat bedingen (24, 33, 43). In dieser Hinsicht wird weitere Forschung notwendig sein, um Erklärungsansätze dafür zu finden und den Vitamin B6 Metabolismus, dessen Absorption und auch die Enzymkonformation der AGT besser zu verstehen.

Unter den vier Patienten, die negativ für die c.508G>A Mutation getestet wurden, waren ein Responder, zwei non-responder und ein Patient, die nur intermittierend auf Vitamin B6 ansprach (siehe oben). Diese Ergebnisse bestätigen insgesamt die Vermutungen, dass das Ansprechen auf eine Vitamin B6-Therapie zu einem Teil an die Genmutation geknüpft ist und Patienten ohne die AGXT-Mutation c.508G>A im Mittel wesentlich schlechter bis gar nicht auf Pyridoxalphosphat ansprechen (67), ohne aber außer Acht zu lassen, dass es weiterhin unklare Phänomene bezüglich der Heterogenität des Phänotyps gibt, die sich nicht allein durch den Mutationsstatus erklären lassen (43).

Ein möglicher Ansatz, um die Heterogenität bezüglich des Ansprechens zu erklären, ist das Vitamin B6 selbst, bzw. dessen Metabolite. Meist wird nur das veresterte Pyridoxalphosphat (die aktive Komponente) und Pyridoxin im Blut standardmäßig im Labor erfasst (so auch in dieser Studie). Die anderen vier Metabolite werden meist nicht mitbestimmt (Pyridoxamin, Pyridoxal, Pyridoxol und Pyridoxat). Eine weitere laborchemische Aufschlüsselung und Detektion der anderen Metabolite wäre interessant und könnte evtl. helfen die individuelle Verstoffwechslung von Vitamin B6 zu verstehen und ggf. Genotyp-Phänotyp Diskrepanzen zu erklären.

Als primärer Endpunkt dieser Pilotstudie wurde die Messung der Urinoxalatexkretion in 24h-Sammelurinen an zwei aufeinander folgenden

Tagen gewählt, da dies momentan den Goldstandard in der Diagnostik und zur Therapiekontrolle der PH I darstellt (26, 44). Hier gab es teilweise große Unterschiede hinsichtlich der Trinkmenge der Patienten und folglich der Urinausscheidung und der Menge des darin enthaltenen Oxalats. Durch die Validierung der Urinsammlung mit Hilfe der Kreatininkonzentration sowie das zweitägige Sammelschema wurde versucht die Tagesvariabilität hinsichtlich der Oxalatausscheidung zu minimieren, doch Ungenauigkeiten sind gerade bei Kindern und Jugendlichen nicht auszuschließen. Im Rahmen der oben bereits zitierten Studie mit Oxalobacter formigenes konnten Hoppe und Kollegen zeigen, dass die Variabilität der Oxalatmessungen eines Patienten in 24h-Sammelurinen teilweise > 40% beträgt (35). Dieser Umstand sowie die adäquate Lagerung des Urins und der Transport ins Labor sind nur schwer zu eliminierende Probleme die Störfaktoren darstellen und die Genauigkeit der Messergebnisse limitieren. Auch die individuelle Compliance der Patienten kann erfahrungsgemäß variieren und Ergebnisse beeinflussen. Deswegen wurden im Verlauf der Studie in zweiwöchigem Abstand Telefonate mit den Erziehungsberechtigten der Patienten geführt und so die regelmäßige Einnahme der Studienmedikation erfragt und dokumentiert. Bis auf eine Patientin waren laut eigener Aussage alle Patienten compliant.

Die Frage nach der Sicherheit der oralen Einnahme einer Pyridoxalphosphat-Injektionslösung kann nach dieser Studie dahingehend beantwortet werden, dass neben den bereits bekannten Nebenwirkungen von Vitamin B6, wie Lichtempfindlichkeit und Übelkeit keine unerwünschten Effekte zu beobachten waren. Aufgrund dessen ist davon auszugehen, dass diese Art der Therapie mit Vitamin B6 eine sichere und sinnvolle Alternative zur herkömmlichen Applikationsform, sprich den Tabletten darstellt.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass im Rahmen dieser Pilotstudie mit Pyridoxalphosphat prospektiv 1. die Wirksamkeit von Vitamin B6 bei der Hälfte der Patienten nachgewiesen werden konnte. 2. konnte durchschnittlich eine Senkung der Urinoxalatekretion von 25,5 % bei allen zwölf eingeschlossenen Patienten erreicht werden. Im Vergleich dazu erreichten Hoppe und Kollegen 2011 mit einem anderen konservativen

Therapieversuch mit *Oxalobacter formigenes* bei PH I Patienten eine Senkung der Urinoxalatkonzentration von 19% (35). 3. erscheint nach Auswertung der beschriebenen Ergebnisse eine therapeutische Dosis von 10 mg/kg KG/24h in zwei Einzeldosen im Abstand von zwölf Stunden primär bei allen PH I Patienten sinnvoll. 4. zeigte sich keine statistische Korrelation zwischen der oral eingenommenen Vitamin B6-Dosis und den gemessenen Pyridoxalphosphatspiegeln im Blut. 5. gab es keine Korrelation zwischen den Pyridoxalphosphatspiegeln und der Urinoxalatekretion und 6. erscheint auch im prospektiven Studiendesign eine Assoziation des Ansprechens auf Vitamin B6 zum vorliegenden Genotyp plausibel.

Bislang basiert die Wahl der therapeutischen Dosis an Pyridoxalphosphat auf subjektiver Expertenmeinung. Nichtsdestotrotz sollte bei jedem PH I Patienten ein mindestens 3-monatiger Therapieversuch beginnend mit 5 mg/kg KG/24h unternommen und eine Enddosis von 20 mg/kg KG/24h nicht überschritten werden. Das allgemeine Therapieziel ist eine Reduktion der Urinoxalatekretion von  $\geq 30\%$ , bzw. eine maximale Wirkung bei der niedrigsten noch wirksamen Dosis. Die Therapie mit Vitamin B6 sollte bis zu einer möglichen Lebertransplantation fortgeführt werden, auch während einer eventuell notwendigen Dialysebehandlung (13). Patienten, die nicht auf Pyridoxalphosphat ansprechen, sollten die Einnahme von Vitamin B6 nicht fortführen zugunsten der Compliance anderer Therapiemaßnahmen (42). Messungen des Vitamin B6-Serumspiegels können zukünftig hilfreich sein, um die regelmäßige Einnahme zu überwachen und um individuelle Absorptions- und Stoffwechselforgänge zu verstehen, auch wenn das Ursache-Wirkungsprinzip zwischen B6-Spiegel und Urinoxalatausscheidung noch nicht abschließend geklärt ist. In der Zukunft werden weitere Studien mit größeren Fallzahlen nötig sein, um die genannten (intrafamiliären) Genotyp-Phänotyp Diskrepanzen zu untersuchen und zu erklären. Dabei ist es wichtig auch Patienten mit dekompensierter Nierenfunktion im Stadium der CN1 mit einzubeziehen, um die Pharmakokinetik und – dynamik in allen Stadien der Erkrankung zu verstehen und individuell auf den Genotyp abgestimmte Therapiekonzepte entwickeln zu können.

Hatch und Kollegen veröffentlichten 2011 eine vielversprechende Studie an Mäusen mit PH I, bei denen durch Kolonisation mit *Oxalobacter formigenes*

die intestinale Sekretion von endogen produziertem Oxalat erhöht und somit die Urinoxalatekretion signifikant reduziert werden konnte (29). Geeignete und verbesserte Präparate für die Besiedelung des menschlichen Intestinaltrakts könnten basierend auf diesen Ergebnissen PH I und auch PH II Patienten bald eine Möglichkeit zur Reduktion der Oxalatlast bieten.

In näherer Zukunft könnten neben Pyridoxalphosphat und Oxalobacter formigenes auch andere pharmakologische Chaperone eine neue Therapieoption für alle Patienten darstellen, die unter monogenetischen Erkrankungen und somit den Folgen von missense Mutationen leiden und deren Enzymfunktion durch fehlgefaltete Proteine degradiert oder aufgehoben ist. Dazu gehört die Mehrheit der PH I Patienten mit der c.508G>A Mutation (homo- oder heterozygot), sowie Patienten, die unter Phenylketonurie oder Morbus Alzheimer leiden. Spezifische Chaperone unterstützen die regelrechte Konformationsfaltung und somit die Erkennung von Proteinen am Rezeptor. Eine aktuelle Studie von Fodor und Kollegen bestätigte diese Wirkungsweise bereits für Pyridoxalphosphat in der Hinsicht, dass es die physiologische Faltung der AGT katalysiert, deren vorzeitigen Abbau und die Aggregation verhindert und somit die Überführung des Enzyms in die Peroxisomen und folglich die katalytische Funktion möglich macht (23).

Auch die Gentherapie könnte in naher Zukunft eine potentiell wirksame Option zur Behandlung der PH I darstellen. Salido und Kollegen gelang im Tierversuch bei Mäusen mit PH I die vollständige Normalisierung der endogenen Überproduktion von Oxalat mit Hilfe von Adeno-assoziierten Viren als Vektoren für die humane AGXT-DNA (80). Diese Ergebnisse erscheinen vielversprechend und nebenwirkungsarm, aber es stellt sich die Frage, ob es möglich ist ausreichende Mengen an Lebergewebe auf diese Art zielgerichtet zu therapieren, um die anfallende Oxalatlast soweit zu reduzieren, dass die Niere und andere Gewebe nicht mehr geschädigt werden.

Ein weiterer Ansatz zur Therapie der PH I beschäftigt sich mit der Transplantation von isolierten Leberzellen. Diese Methode wird teilweise schon in Einzelfällen zur Überbrückung von Wochen oder Monaten bis zu einer kombinierten Leber-Nieren-Transplantation angewandt. Dies ist vor

allem dann sinnvoll, wenn bei der infantilen Oxalose kurzfristig die Oxalatlast reduziert werden muss und das Gewicht der Kinder für eine kombinierte Transplantation noch nicht ausreicht. Eine aktueller Einzelfallbericht gibt dahingehend Anlass zur Hoffnung, dass POx mit dieser Methode zeitweise gesenkt und eine spätere kombinierte Transplantation ermöglicht werden konnte. Dennoch ist der Vorgang noch nicht ausgereift, denn die Quantität der eingebrachten Leberzellen, die folglich die physiologische Funktion ausüben sowie deren Teilungsrate sind noch unzureichend und bedürfen weiterer Forschung, um eine bessere Effektivität zu gewährleisten (3).

Vergleichsweise vielversprechend ist die Forschung mit pluripotenten Stammzellen, die schon bei anderen metabolischen Defekten der Leber erfolgreich angewandt wird. Espejel und Kollegen gelang 2010 im Tierversuch eine vollständige Regeneration des Lebergewebes bei Mäusen. Diese Art der Behandlung könnte in Zukunft eine kausale Therapie der PH I darstellen, dazu beitragen die Pathogenese der PH I besser zu verstehen und neue Medikamente zu entwickeln.

## 5. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der seltenen autosomal rezessiven Erbkrankheit primäre Hyperoxalurie Typ I (PH I) mit dem Ziel der Dosisfindung von Vitamin B6 als konservativer Therapieoption.

Die PH I wird durch einen genetisch bedingten quantitativen (fehlende Aktivität des Enzyms) und/oder qualitativen Mangel (Mislokation in den Mitochondrien) des leberspezifischen peroxisomalen Enzyms Alanin-Glyoxylat-Aminotransferase (AGT) verursacht. Daraus resultiert ein gestörter Glyoxylatstoffwechsel mit hohen Serum- und Urinoxalatspiegeln, die zu Oxalatablagerungen in diversen Körpergeweben und im Verlauf der Erkrankung zu Nierenversagen führen. Die Therapieoptionen und vorliegende Ergebnisse aus wissenschaftlichen Studien sind begrenzt.

Wir untersuchten in dieser klinischen Pilotstudie die Wirksamkeit der konservativen Therapie mit Vitamin B6 als Kofaktor der AGT. Der primäre Endpunkt war die Reduktion der Urinoxalatekretion (Uox)  $\geq 30\%$  als Kriterium der Wirksamkeit. Es konnten zwölf PH I Patienten zwischen sieben und 18 Jahren in die Studie eingeschlossen werden.

Die Therapie begannen wir zum Zeitpunkt der Baseline mit 5 mg/kg KG/24h Pyridoxalphosphatlösung p.o. Nach jeweils sechs Wochen wurden alle Patienten körperlich untersucht und nach einer Messung der Uox und des Serum B6-Spiegels wurde die Dosis jeweils um 5 mg/kg KG/24h erhöht bis nach 24 Wochen eine Zieldosis von 20 mg/kg KG/24h erreicht war.

Im Mittel reduzierte sich die relative Uox um 25,5 %. Absolut sank die mittlere Uox von  $2,09 \pm 0,55$  auf  $1,53 \pm 0,60$  mmol/1,73 m<sup>2</sup>/24h nach 24 Wochen ( $p = 0,01$ ). Die Vitamin B6-Spiegel im Serum stiegen über die gesamte Studiendauer durchschnittlich von  $22,47 \pm 8,69$  auf  $1217,42 \pm 775,95$  ng/ml ( $p < 0,001$ ). Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass bei der Hälfte der Patienten eine relevante Reduktion der Uox ( $\geq 30\%$ ) erreicht werden konnte. Die Sicherheit der Einnahme hoher Dosen Pyridoxalphosphat ist gewährleistet. Dennoch ist die Fallzahl dieser Studie zu gering, um Aussagen z.B. zum Ansprechen auf Vitamin B6 in Bezug zum Genotyp machen zu können. Folglich sind in Zukunft größere Studien nötig, um die Therapie dieser Erkrankung zu individualisieren und zu verbessern.

---

## 6. Literaturverzeichnis

1. **Amoroso A, Pirulli D, Florian F, Puzzer D, Boniotto M, Crovella S, Zezlina S, Spanò A, Mazzola G, Savoldi S, Ferrettini C, Berutti S, Petrarulo M, Marangella M** (2001). AGXT gene mutations and their influence on clinical heterogeneity of type 1 primary hyperoxaluria. *J. Am. Soc. Nephrol.* 12: 2072–9
2. **Bastani B, Nahass G** (1999). Images in clinical medicine. Type I primary hyperoxaluria. *N. Engl. J. Med.* 341: 1979
3. **Beck BB, Habbig S, Dittrich K, Stippel D, Kaul I, Koerber F, Goebel H, Salido EC, Kemper M, Meyburg J, Hoppe B** (2012). Liver cell transplantation in severe infantile oxalosis--a potential bridging procedure to orthotopic liver transplantation? *Nephrol. Dial. Transplant.* 27: 2984-9
4. **Beloncle F, Sayegh J, Duvéau A, Besson V, Croue A, Subra J-F, Augusto J-F** (2013). An unexpected cause of progressive renal failure in a 66-year-old male after liver transplantation: secondary hyperoxaluria. *Int. Urol. Nephrol.* 45: 1209-13
5. **Belostotsky R, Seboun E, Idelson GH, Milliner DS, Becker-Cohen R, Rinat C, Monico CG, Feinstein S, Ben-Shalom E, Magen D, Weissman I, Charon C, Frishberg Y** (2010). Mutations in DHDPSL are responsible for primary hyperoxaluria type III. *Am. J. Hum. Genet.* 87: 392–9
6. **Benhaj Mbarek I, Abroug S, Omezzine A, Zellama D, Achour A, Harbi A, Bouslama A** (2011). Selected AGXT gene mutations analysis provides a genetic diagnosis in 28% of Tunisian patients with primary hyperoxaluria. *BMC Nephrol.* 12: 25
7. **Bergstralh EJ, Monico CG, Lieske JC, Herges RM, Langman CB, Hoppe B, Milliner DS.** (2010) Transplantation outcomes in primary hyperoxaluria. *Am. J. Transplant* 10: 2493–501

8. **Broyer M, Brunner FP, Brynger H, Dykes SR, Ehrich JH, Fassbinder W, Geerlings W, Rizzoni G, Selwood NH, Tufveson G** (1990). Kidney transplantation in primary oxalosis: data from the EDTA Registry. *Nephrol. Dial. Transplant* 5: 332–6
9. **Bunchman TE, Swartz RD** (1994). Oxalate removal in type I hyperoxaluria or acquired oxalosis using HD and equilibration PD. *Perit. Dial. Int.* 14: 81–4
10. **Cochat P, Deloraine A, Rotily M, Olive F, Liponski I, Deries N** (1995). Epidemiology of primary hyperoxaluria type 1. Société de Néphrologie and the Société de Néphrologie Pédiatrique. *Nephrol. Dial. Transplant* 10 Suppl 8: 3–7
11. **Cochat P, Fargue S, Bacchetta J, Bertholet-Thomas A, Sabot J-F, Harambat J** (2011). [Primary hyperoxaluria]. *Nephrol. Ther.* 7: 249–59
12. **Cochat P, Fargue S, Harambat J** (2010). Primary hyperoxaluria type 1: strategy for organ transplantation. *Curr. Opin. Organ Transplant.* 15: 590–3
13. **Cochat P, Hulton S-A, Acquaviva C, Danpure CJ, Daudon M, De Marchi M, Fargue S, Groothoff J, Harambat J, Hoppe B, Jamieson N V, Kemper MJ, Mandrile G, Marangella M, Picca S, Rumsby G, Salido E, Straub M, van Woerden CS** (2012). Primary hyperoxaluria Type 1: indications for screening and guidance for diagnosis and treatment. *Nephrol. Dial. Transplant* 27: 1729–36
14. **Cochat P, Koch Nogueira PC, Mahmoud M a, Jamieson N V, Scheinman JI, Rolland MO** (1999). Primary hyperoxaluria in infants: medical, ethical, and economic issues. *J. Pediatr.* 135: 746–50
15. **Cochat P, Liutkus A, Fargue S, Basmaison O, Ranchin B, Rolland M-O** (2006). Primary hyperoxaluria type 1: still challenging! *Pediatr. Nephrol.* 21: 1075–81
16. **Cochat P** (1999). Primary hyperoxaluria type 1. *Kidney Int.* 55: 2533–47

- 
17. **Cramer SD, Ferree PM, Lin K, Milliner DS, Holmes RP** (1999). The gene encoding hydroxypyruvate reductase (GRHPR) is mutated in patients with primary hyperoxaluria type II. *Hum. Mol. Genet.* 8: 2063–9
  18. **Danpure CJ, Jennings PR, Watts RW** (1987). Enzymological diagnosis of primary hyperoxaluria type 1 by measurement of hepatic alanine: glyoxylate aminotransferase activity. *Lancet* 1: 289–91
  19. **Danpure CJ** (1986). Peroxisomal alanine:glyoxylate aminotransferase and prenatal diagnosis of primary hyperoxaluria type 1. *Lancet* 2: 1168
  20. **Danpure CJ** (1991). Molecular and clinical heterogeneity in primary hyperoxaluria type 1. *Am. J. Kidney Dis.* 17: 366–9
  21. **Danpure CJ** (2005). Molecular etiology of primary hyperoxaluria type 1: new directions for treatment. *Am. J. Nephrol.* 25: 303–10
  22. **Fargue S, Harambat J, Gagnadoux M-F, Tsimaratos M, Janssen F, Llanas B, Berthéléme J-P, Boudailliez B, Champion G, Guyot C, Macher M-A, Nivet H, Ranchin B, Salomon R, Taque S, Rolland M-O, Cochat P** (2009). Effect of conservative treatment on the renal outcome of children with primary hyperoxaluria type 1. *Kidney Int.* 76: 767–73
  23. **Fodor K, Wolf J, Erdmann R, Schliebs W, Wilmanns M** (2012). Molecular requirements for peroxisomal targeting of alanine-glyoxylate aminotransferase as an essential determinant in primary hyperoxaluria type 1. *PLoS Biol.* 10: e1001309
  24. **Frishberg Y, Rinat C, Shalata A, Khatib I, Feinstein S, Becker-Cohen R, Weismann I, Wanders RJA, Rumsby G, Roels F, Mandel H** (2005). Intra-familial clinical heterogeneity: absence of genotype-phenotype correlation in primary hyperoxaluria type 1 in Israel. *Am. J. Nephrol.* 25: 269–75
  25. **Goktas C, Coskun A, Bicik Z, Horuz R, Unsal I, Serteser M, Albayrak S, Sarica K** (2012). Evaluating ESWL-induced renal injury based on urinary TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , and IL-6 levels. *Urol. Res.* 40: 569-73
-

- 
26. **Habbig S, Beck BB, Hoppe B** (2011). Nephrocalcinosis and urolithiasis in children. *Kidney Int.* 80: 1278–91
  27. **Harambat J, Fargue S, Acquaviva C, Gagnadoux M-F, Janssen F, Liutkus A, Mourani C, Macher M-A, Abramowicz D, Legendre C, Durrbach A, Tsimaratos M, Nivet H, Girardin E, Schott A-M, Rolland M-O, Cochat P** (2010). Genotype-phenotype correlation in primary hyperoxaluria type 1: the p.Gly170Arg AGXT mutation is associated with a better outcome. *Kidney Int.* 77: 443–9
  28. **Hatch M, Cornelius J, Allison M, Sidhu H, Peck A, Freel RW** (2006). Oxalobacter sp. reduces urinary oxalate excretion by promoting enteric oxalate secretion. *Kidney Int.* 69: 691–8
  29. **Hatch M, Gjymishka A, Salido EC, Allison MJ, Freel RW** (2011). Enteric oxalate elimination is induced and oxalate is normalized in a mouse model of primary hyperoxaluria following intestinal colonization with Oxalobacter. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 300: G461–9
  30. **Hofmann V, Deeg K-H, Hoyer PF** (2005). Erkrankungen der ableitenden Harnwege. In *Ultraschalldiagnostik in Pädiatrie und Kinderchirurgie*. 3: 478-97 Georg Thieme Verlag
  31. **Hoppe B, Beck B, Gatter N, von Unruh G, Tischler A, Hesse A, Laube N, Kaul P, Sidhu H** (2006). Oxalobacter formigenes: a potential tool for the treatment of primary hyperoxaluria type 1. *Kidney Int.* 70: 1305–11
  32. **Hoppe B, Beck BB, Milliner DS** (2009). The primary hyperoxalurias. *Kidney Int.* 75: 1264–71
  33. **Hoppe B, Danpure CJ, Rumsby G, Fryer P, Jennings PR, Blau N, Schubiger G, Neuhaus T, Leumann E** (1997). A vertical (pseudodominant) pattern of inheritance in the autosomal recessive disease primary hyperoxaluria type 1: lack of relationship between genotype, enzymic phenotype, and disease severity. *Am. J. Kidney Dis.* 29: 36–44
-

- 
34. **Hoppe B, Graf D, Offner G, Latta K, Byrd DJ, Michalk D, Brodehl J** (1996). Oxalate elimination via hemodialysis or peritoneal dialysis in children with chronic renal failure. *Pediatr. Nephrol.* 10: 488–92
  35. **Hoppe B, Groothoff JW, Hulton S-A, Cochat P, Niaudet P, Kemper MJ, Deschênes G, Unwin R, Milliner D** (2011). Efficacy and safety of *Oxalobacter formigenes* to reduce urinary oxalate in primary hyperoxaluria. *Nephrol. Dial. Transplant* 26: 3609–15
  36. **Hoppe B, Kemper M, Hvizd M, Sailer D** (1998). Simultaneous determination of oxalate, citrate and sulfate in children's plasma with ion chromatography. *Kidney* 53: 1348–1352
  37. **Hoppe B, Kemper MJ, Bökenkamp A, Langman CB** (1998). Plasma calcium-oxalate saturation in children with renal insufficiency and in children with primary hyperoxaluria. *Kidney Int.* 54: 921–5
  38. **Hoppe B, Kemper MJ** (2010). Diagnostic examination of the child with urolithiasis or nephrocalcinosis. *Pediatr. Nephrol.* 25: 403–13
  39. **Hoppe B, Langman CB** (2003). A United States survey on diagnosis, treatment, and outcome of primary hyperoxaluria. *Pediatr. Nephrol.* 18: 986–91
  40. **Hoppe B, Latta K, von Schnakenburg C, Kemper MJ** (2005). Primary hyperoxaluria--the German experience. *Am. J. Nephrol.* 25: 276–81
  41. **Hoppe B, Leumann E, von Unruh G, Laube N, Hesse A.** (2003). Diagnostic and therapeutic approaches in patients with secondary hyperoxaluria. *Front. Biosci.* 8: e437–43
  42. **Hoppe B** (2005). Primäre und Sekundäre Hyperoxalurie. URL [http://www.ph-selbsthilfe.org/images/Hyperoxalurie\\_Deutsch.pdf](http://www.ph-selbsthilfe.org/images/Hyperoxalurie_Deutsch.pdf). (Stand: 21.06.2014)
  43. **Hoppe B** (2010). Evidence of true genotype-phenotype correlation in primary hyperoxaluria type 1. *Kidney Int.* 77: 383–5
-

44. **Hoppe, Bernd, Hoyer-Kuhn H** (2010). Prüfplan zur Pilotstudie zur Pyridoxalphosphattherapie bei Patienten mit primärer Hyperoxalurie Typ I (PHOX-B6-Pilot).
45. **Hopper ED, Pittman AMC, Fitzgerald MC, Tucker CL** (2008). In vivo and in vitro examination of stability of primary hyperoxaluria-associated human alanine:glyoxylate aminotransferase. *J. Biol. Chem.* 283: 30493–502
46. **Hueppelshaeuser R, von Unruh GE, Habbig S, Beck BB, Buderus S, Hesse A, Hoppe B** (2012). Enteric hyperoxaluria, recurrent urolithiasis, and systemic oxalosis in patients with Crohn's disease. *Pediatr. Nephrol.* 27: 1103–9
47. **Illies F, Bonzel K-E, Wingen A-M, Latta K, Hoyer PF** (2006). Clearance and removal of oxalate in children on intensified dialysis for primary hyperoxaluria type 1. *Kidney Int.* 70: 1642–8
48. **Kamoun A, Chebil M, Ben Hassine L, Ouagdi M, Ayed M, Lakhoua R** (1995). Value of extracorporeal shockwave lithotripsy in primary hyperoxaluria type I. *Arch. Pediatr.* 2: 747–9
49. **Karadag S, Gursu M, Aydin Z, Uzun S, Dogan O, Ozturk S, Kazancioglu R** (2011). Primary hyperoxaluria in an adult presenting with end-stage renal failure together with hypercalcemia and hypothyroidism. *Hemodial. Int.* 15: 573–6
50. **Khan SR, Byer KJ, Thamilselvan S, Hackett RL, McCormack WT, Benson NA, Vaughn KL, Erdos GW** (1999). Crystal-cell interaction and apoptosis in oxalate-associated injury of renal epithelial cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* 10 Suppl 1: 457–63
51. **Knoll G, Cockfield S, Blydt-Hansen T, Baran D, Kiberd B, Landsberg D, Rush D, Cole E** (2005). Canadian Society of Transplantation: consensus guidelines on eligibility for kidney transplantation. *CMAJ* 173: 1–25

52. **Kopp N, Leumann E** (1995). Changing pattern of primary hyperoxaluria in Switzerland. *Nephrol. Dial. Transplant* 10: 2224–7
53. **Latta K, Brodehl J** (1990). Primary hyperoxaluria type I. *Eur. J. Pediatr.* 149: 518–22
54. **Leumann E, Hoppe B, Neuhaus T** (1993). Management of primary hyperoxaluria: efficacy of oral citrate administration. *Pediatr. Nephrol.* 7: 207–11
55. **Leumann E, Hoppe B** (2001). The primary hyperoxalurias. *J. Am. Soc. Nephrol.* 12: 1986–93
56. **Lieske JC, Monico CG, Holmes WS, Bergstralh EJ, Slezak JM, Rohlinger AL, Olson JB, Milliner DS** (2005). International registry for primary hyperoxaluria. *Am. J. Nephrol.* 25: 290–6
57. **Lumb MJ, Danpure CJ** (2000). Functional synergism between the most common polymorphism in human alanine:glyoxylate aminotransferase and four of the most common disease-causing mutations. *J. Biol. Chem.* 275: 36415–22
58. **Malla I, Lysy PA, Godefroid N, Smets F, Malaise J, Reding R, Sokal EM** (2009). Two-step transplantation for primary hyperoxaluria: cadaveric liver followed by living donor related kidney transplantation. *Pediatr. Transplant.* 13: 782–4
59. **Mandrile G, Robbiano A, Giachino DF, Sebastiano R, Dondi E, Fenoglio R, Stratta P, Caruso MR, Petrarulo M, Marangella M, De Marchi M** (2008). Primary hyperoxaluria: report of an Italian family with clear sex conditioned penetrance. *Urol. Res.* 36: 309–12
60. **Marangella M, Petrarulo M, Cosseddu D** (1994). End-stage renal failure in primary hyperoxaluria type 2. *N. Engl. J. Med.* 330: 1690

- 
61. **Marangella M, Petrarulo M, Vitale C, Cosseddu D, Linari F** (1992). Plasma and urine glycolate assays for differentiating the hyperoxaluria syndromes. *J. Urol.* 148: 986–9
  62. **Marangella M, Vitale C, Petrarulo M, Tricerri A, Cerelli E, Cadario A, Barbos MP, Linari F** (1995). Bony content of oxalate in patients with primary hyperoxaluria or oxalosis-unrelated renal failure. *Kidney Int.* 48: 182–7
  63. **Massey LK, Liebman M, Kynast-Gales SA** (2005). Ascorbate increases human oxaluria and kidney stone risk. *J. Nutr.* 135: 1673–7
  64. **Milliner DS, Eickholt JT, Bergstralh EJ, Wilson DM, Smith LH** (1994). Results of long-term treatment with orthophosphate and pyridoxine in patients with primary hyperoxaluria. *N. Engl. J. Med.* 331: 1553–8
  65. **Milliner DS** (2005). The primary hyperoxalurias: an algorithm for diagnosis. *Am. J. Nephrol.* 25: 154–60
  66. **Monico CG, Rossetti S, Belostotsky R, Cogal AG, Herges RM, Seide BM, Olson JB, Bergstrahl EJ, Williams HJ, Haley WE, Frishberg Y, Milliner DS** (2011). Primary hyperoxaluria type III gene HOGA1 (formerly DHDPSL) as a possible risk factor for idiopathic calcium oxalate urolithiasis. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 6: 2289–95
  67. **Monico CG, Rossetti S, Olson JB, Milliner DS** (2005). Pyridoxine effect in type I primary hyperoxaluria is associated with the most common mutant allele. *Kidney Int.* 67: 1704–9
  68. **Monico CG, Rossetti S, Schwanz H a, Olson JB, Lundquist P a, Dawson DB, Harris PC, Milliner DS** (2007). Comprehensive mutation screening in 55 probands with type 1 primary hyperoxaluria shows feasibility of a gene-based diagnosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 18: 1905–14
  69. **Motley A, Lumb MJ, Oatey PB, Jennings PR, De Zoysa PA, Wanders RJ, Tabak HF, Danpure CJ** (1995). Mammalian alanine/glyoxylate aminotransferase 1 is imported into peroxisomes via the PTS1
-

---

translocation pathway. Increased degeneracy and context specificity of the mammalian PTS1 motif and implications for the peroxisome-to-mitochondrion mistargeting of AGT in primary hyperoxaluria type 1. *J. Cell Biol.* 131: 95–109

70. **Niaudet P** (2014). Primary hyperoxaluria. URL: <http://www.uptodate.com/contents/primary-hyperoxaluria> (Stand: 21.06.2014)
71. **Nolkemper D, Kemper MJ, Burdelski M, Vaismann I, Rogiers X, Broelsch CE, Ganschow R, Müller-Wiefel DE** (2000). Long-term results of pre-emptive liver transplantation in primary hyperoxaluria type 1. *Pediatr. Transplant.* 4: 177–81
72. **Petrarulo M, Vitale C, Facchini P, Marangella M** (1998). Biochemical approach to diagnosis and differentiation of primary hyperoxalurias: an update. *J. Nephrol.* 11 Suppl 1: 23–8
73. **Purdue P, Lumb M, Fox M, Griffo G** (1991). Characterization and chromosomal mapping of a genomic clone encoding human alanine: glyoxylate aminotransferase. *Genomics* 42: 34–42
74. **Robijn S, Hoppe B, Vervaet BA, D’Haese PC, Verhulst A** (2011). Hyperoxaluria: a gut-kidney axis? *Kidney Int.* 80: 1146–58
75. **Rule AD, Krambeck AE, Lieske JC** (2011). Chronic kidney disease in kidney stone formers. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 6: 2069–75
76. **Rumsby G, Cregeen DP** (1999). Identification and expression of a cDNA for human hydroxypyruvate/glyoxylate reductase. *Biochim. Biophys. Acta* 1446: 383–8
77. **Rumsby G, Williams E, Coulter-Mackie M** (2004). Evaluation of mutation screening as a first line test for the diagnosis of the primary hyperoxalurias. *Kidney Int.* 66: 959–63

78. **Rumsby G** (2005). An overview of the role of genotyping in the diagnosis of the primary hyperoxalurias. *Urol. Res.* 33: 318–20
79. **Rumsby G** (2008). Primary Hyperoxaluria Type 2. *Gene reviews*<sup>®</sup> [Internet]: Dec. 2, 2008
80. **Salido E, Rodriguez-Pena M, Santana A, Beattie SG, Petry H, Torres A** (2011). Phenotypic correction of a mouse model for primary hyperoxaluria with adeno-associated virus gene transfer. *Mol. Ther.* 19: 870–5
81. **Santana A, Salido E, Torres A, Shapiro LJ** (2003). Primary hyperoxaluria type 1 in the Canary Islands: a conformational disease due to I244T mutation in the P11L-containing alanine:glyoxylate aminotransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100: 7277–82
82. **Scheinman JI** (2010). Liver transplantation in oxalosis prior to advanced chronic kidney disease. *Pediatr. Nephrol.* 25: 2217–22
83. **Sikora P, von Unruh GE, Beck B, Feldkötter M, Zajackowska M, Hesse A, Hoppe B** (2008). [<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]oxalate absorption in children with idiopathic calcium oxalate urolithiasis or primary hyperoxaluria. *Kidney Int.* 73: 1181–6
84. **Watts RW, Veall N, Purkiss P, Mansell MA, Haywood EF** (1985). The effect of pyridoxine on oxalate dynamics in three cases of primary hyperoxaluria (with glycollic aciduria). *Clin. Sci. (Lond).* 69: 87–90
85. **Watts RW, Veall N, Purkiss P** (1984). Oxalate dynamics and removal rates during haemodialysis and peritoneal dialysis in patients with primary hyperoxaluria and severe renal failure. *Clin. Sci. (Lond).* 66: 591–7
86. **Williams EL, Acquaviva C, Amoroso A, Chevalier F, Coulter-Mackie M, Monico CG, Giachino D, Owen T, Robbiano A, Salido E, Waterham H, Rumsby G** (2009). Primary hyperoxaluria type 1: update

and additional mutation analysis of the AGXT gene. *Hum. Mutat.* 30: 910–7

87. **Van Woerden CS, Groothoff JW, Wanders RJ, Davin JC, Wijburg FA** (2003). Primary hyperoxaluria type 1 in The Netherlands: prevalence and outcome. *Nephrol. Dial. Transplant* 18: 273–9
88. **Van Woerden CS, Groothoff JW, Wijburg FA, Annink C, Wanders RJ, Waterham HR** (2004). Clinical implications of mutation analysis in primary hyperoxaluria type 1. *Kidney Int.* 66: 746–52
89. **Yendt ER, Cohanin M** (1985). Response to a physiologic dose of pyridoxine in type I primary hyperoxaluria. *N. Engl. J. Med.* 312: 953–7
90. Pyridoxalphosphat. URL: <http://de.academic.ru/dic.nsf/dewiki/1142841> (Stand: 21.06.2014)

## 7. Vorabveröffentlichung von Ergebnissen

Teile dieser Arbeit sind im Einvernehmen mit Prof. Bernd Hoppe im Rahmen folgender Publikationen bereits veröffentlicht worden:

**Hoyer-Kuhn H, Kohbrok S, Volland R, Franklin J, Hero B, Beck BB, Hoppe B** (2014). Vitamin b6 in primary hyperoxaluria I: first prospective trial after 40 years of practice. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 9: 468-77

## 8. Anhang

### 8.1 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Systemische Oxalose (2) .....	9
<b>Abbildung 2:</b> Der Glyoxylatstoffwechsel (16) .....	10
<b>Abbildung 3:</b> Pyridoxalphosphat (90) .....	24
<b>Abbildung 4:</b> Empfehlungen zur Transplantation bei PH I (12) .....	30
<b>Abbildung 5:</b> Studiendesign .....	36

### 8. Diagrammverzeichnis

<b>Diagramm 1:</b> Absolute Uox Exkretion Woche 0 vs. Woche 24 .....	44
<b>Diagramm 2:</b> Relative Entwicklung der Uox Exkretion Woche 0 vs. Woche 24 ....	45
<b>Diagramm 3:</b> Individueller Uox Verlauf vom Zeitpunkt der Baseline bis Woche 24	46
<b>Diagramm 4:</b> Korrelation zwischen dem mittleren B6-Spiegel und der prozentualen Reduktion der Urinoxalatexkretion aller Patienten .....	48
<b>Diagramm 5:</b> Vitamin B6-Spiegel Woche 0 vs. Woche 24 .....	49
<b>Diagramm 6:</b> Individueller B6-Spiegel Verlauf vom Zeitpunkt der Baseline bis Woche 24 .....	49

### 9. Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Studienablauf .....	37
<b>Tabelle 2:</b> Patientenkollektiv zum Zeitpunkt der Baseline .....	43
<b>Tabelle 3:</b> Ansprechen auf die Studienmedikation in Relation zum Genotyp .....	47

Mein Lebenslauf wird aus Gründen des Datenschutzes in der elektronischen Fassung meiner Arbeit nicht veröffentlicht.