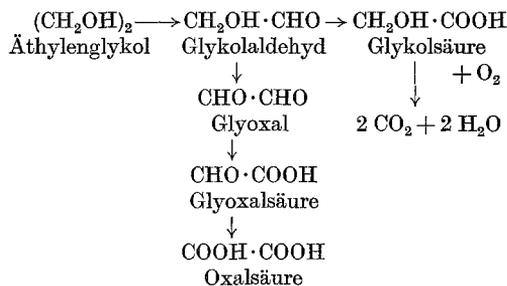


Calciumoxalatbestimmung der Nieren bei Äthylenglykolvergiftung*

L. HANSSON, R. LINDFORS und K. LAIHO
Gerichtsmedizinisches Institut der Universität Helsinki
(Vorstand: Prof. Dr. med. U. UOTILA)

Eingegangen am 6. April 1966

In der gerichtlichen Medizin werden dann und wann Vergiftungsfälle angetroffen, von denen man weiß, daß das Opfer Äthylenglykol, meistens in Form von Frostschutzmitteln, zu sich genommen hat. Es ist aber nicht immer möglich, das Äthylenglykol oder seine Derivate im Organismus nachzuweisen, weshalb die Todesursache unklar bleibt. Es ist jedoch bekannt, daß nach Genuß von Äthylenglykol in den Nieren Calciumoxalat abgelagert wird (DOERR, 1944; MULINOS, 1943). Ursache und Mechanismus dieser Ablagerungen sind noch nicht völlig bekannt, es wird jedoch angenommen, daß folgende Reaktionen stattfinden:



Die Bedeutung der verschiedenen Reaktionswege scheint von der Größe der Äthylenglykoldosen und von der Species des Versuchstieres abhängig zu sein (DEICHMANN et al., 1959). Bei Versuchen mit Ratten hat MULINOS (1943) festgestellt, daß subletale Dosen zu Oxalatablagerungen führen, letale Dosen dagegen nicht.

In der vorliegenden Arbeit haben wir eine Methode zur Bestimmung des Calciumoxalatgehalts in den Nieren entwickelt, und zwar teils als Calcium- und teils als Oxalsäurebestimmung (Oxalat), um weiteres Beweismaterial für die Diagnostizierung von Äthylenglykolvergiftung zu erhalten.

Wenn bei der Obduktion noch kein Verdacht auf eine derartige Vergiftung vorliegt, kommt es öfters vor, daß diesbezüglicher Verdacht

* Die vorliegende Untersuchung ist mit Mitteln aus dem Sigrid Juselius-Fond finanziert worden.

erst gefaßt wird, wenn mikroskopische Präparate von den Nieren des Verstorbenen untersucht werden. Man sieht dann oft doppelbrechende Kristalle in den Tubuli, und diese Kristalle werden als Calciumoxalat angesehen. Um ferner in derartigen Fällen, in denen für die Analyse kein anderes Material als Paraffinblöcke zur Verfügung steht, sich davon überzeugen zu können, daß die Kristalle Calciumoxalat sind und um auch gewisse quantitative Eindrücke zu gewinnen, haben wir auch die Bestimmungsmethoden für Calcium und Oxalat auf derartiges Material angepaßt.

Material

Unser Material bestand aus Nieren, die bei gerichtsmedizinischen Obduktionen entnommen worden waren, und zwar teilweise von Fällen, in denen es bekannt war, daß der Verstorbene Äthylenglykol zu sich genommen hatte, und zum anderen Teil aus Kontrollmaterial mit unterschiedlichen Todesursachen.

Außerdem verwendeten wir Paraffinblöcke von bei gerichtsmedizinischen Obduktionen genommenen Nieren. Die Diagnose lautete in allen den Fällen, in denen Paraffinblöcke untersucht wurden, Nephrose, und zwar in einem Teil der Fälle aufgrund von Oxalatablagerungen, die als große Mengen von doppelbrechenden Kristallen zu sehen waren und sich als positiven Johnsonschen Test geltend machten.

Methoden

Oxalsäurebestimmung

Prinzip. Nierengewebe wird homogenisiert und cytolysiert. Das Oxalat wird mit Salzsäure extrahiert. Aus der salzsauren Lösung wird das Calciumoxalat ausgefällt, und der Niederschlag wird in Verwahrung genommen. Hieraus wird die Oxalatsmenge in üblicher Weise mit Kaliumpermanganat-Titrierung bestimmt.

Ausführung. Von dem Nierengewebe werden ca. 10 g abgewogen und im Bühler-Homogenisator mit 10 ml dest. Wasser homogenisiert. Das Homogenat wird sorgfältig in Verwahrung genommen, wonach es zweimal eingefroren und wieder aufgetaut wird. Danach werden dem Homogenat 5 ml konz. Salzsäure zugesetzt, $\frac{1}{2}$ Std lang stehengelassen, wonach die Mischung 10 min lang mit 10000 U/min zentrifugiert wird. Die Supernatantlösung wird in Verwahrung genommen. Der Niederschlag wird zweimal mit 10 ml dest. Wasser und einmal mit 5 ml 1 n Salzsäure gewaschen, wonach die Supernatantlösungen vereinigt werden.

Den vereinigten Supernatantlösungen wird nun Ammoniumchlorid zugesetzt, bis die Lösung gesättigt ist, wonach die letztere 1 Std lang mit 10000 U/min zentrifugiert wird.

Dieser Supernatantlösung wird 1 ml 10%ige Calciumchloridlösung zugesetzt, dann wird sie erhitzt, wonach ein paar Tropfen Methylrot und konz. Ammoniak hinzugefügt werden, bis die Farbe umschlägt.

Die Lösung wird über Nacht stehengelassen, wonach der Niederschlag durch 10 min langes Zentrifugieren mit 10000 U/min gewonnen wird. Der Niederschlag wird in 7 ml 3 n Salzsäure aufgelöst. Die so erhaltene Lösung wird abermals zentrifugiert, und zwar 30 min lang bei 10000 U/min.

Aus der klaren Lösung wird nun die Oxalatmenge bestimmt, indem man die warme Lösung mit 0,05 n Kaliumpermanganatlösung bis zu beständiger hellroter Farbe titriert (mit einer Agla-Syringe). Um die Beobachtung der Farbveränderung zu erleichtern, kann man einen Tropfen Ferrolinlösung hinzufügen.

Ausbeute. Dem Nierenpräparat wurde vor der Homogenisierung Natriumoxalatlösung zugesetzt. Die Oxalatbestimmungen wurden in üblicher Weise ausgeführt; die Resultate sind aus der folgenden Tabelle 1 ersichtlich.

Tabelle 1. *Wiederauffindung von zugesetztem Oxalat*

Niere Gewicht in g	Zugesetzt (COOH) ₂ mg	Erhalten (COOH) ₂ mg	% vom Zusatz
10,698	34	24	71
10,455	34	24	71
10,730	20	15,4	77
10,719	20	15,4	77
10,420	13,6	9,8	72
10,739	13,6	10,5	75
10,365	3,4	2,0	59
10,383	3,4	2,0	59

Wenn das Quantum der zugesetzten Oxalsäure mehr als 1 mg pro 1 g Nierengewebe ausmacht, beträgt die Ausbeute durchschnittlich 75%. Ist das zugesetzte Quantum geringer, so werden ca. 60% zurückgewonnen.

Calciumbestimmung

Prinzip. Das Nierengewebe wird zu weißer Asche verascht. Aus dieser Asche wird die Calciummenge nach der titrimetrischen Methode von SARIS (1963) mit Calred als Indicator bestimmt.

Ausführung. 0,5—1,0 g Niere wird abgewogen und bei 500—600°C in einem Porzellantiegel zu weißer Asche verascht. Der Asche werden 0,5 ml 0,67 n Schwefelsäure und 4,5 ml dest. Wasser zugesetzt. Aus 1,0 ml von dieser Lösung wird die Calciummenge dann titrimetrisch bestimmt. Von jeder Veraschung wird eine Doppelprobe gemacht und von dieser Doppeltitrationen.

Besprechung der Ergebnisse

Bei der Durchsicht der Resultate (Tabelle 2) sieht man einen deutlichen Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der Äthylenglykolgruppe. Sowohl der Calcium- wie auch der Oxalatgehalt ist in den Nieren der letzteren Gruppe beträchtlich größer. Die Normalnieren hatten

Tabelle 2. Menge von Calcium und Oxalat in den Nieren

Nr.	mg Calcium/ g Nieren- gewebe	mg(COOH) ₂ / g Nieren- gewebe	Nr.	mg Calcium/ g Nieren- gewebe	mg(COOH) ₂ / g Nieren- gewebe
Kontrollmaterial					
1	0,34	0,07	15	0,30	0,07
2	0,20	0,08	16	0,25	0,07
3	0,29	0,07	17	0,22	0,35
4	0,25	0,28	18	0,19	0,16
5	0,19	0,10	19	0,21	0,13
6	0,10	0,20	20	0,23	0,14
7	0,30	0,12	21	0,16	0,07
8	0,24	0,07	22	0,15	0,05
9	0,19	0,07	23	0,19	0,11
10	0,19	0,07	24	0,07	0,05
11	0,43	0,21	25	0,11	0,09
12	0,29	0,13	26	0,32	0,11
13	0,30	0,14	27	0,14	0,08
14	0,22	0,07			
Äthylenglykolmaterial					
1	0,57	0,64	5	1,45	1,65
2	2,02	3,13	6	2,15	2,93
3	3,51	5,67	7	1,37	0,91
4	3,68	4,69			

durchschnittlich einen Calciumgehalt von 0,25 mg pro 1 g Gewebe, während in der Äthylenglykolgruppe der entsprechende Wert 2,61 mg betrug. Der Oxalatgehalt in den entsprechenden Gruppen war 0,12 mg und 3,15 mg pro 1 g Gewebe.

Ferner läßt sich ganz unverkennbar eine Korrelation zwischen den Calcium- und Oxalatsmengen in der Äthylenglykolgruppe feststellen. Wenn man berücksichtigt, daß die Ausbeute der Oxalatbestimmung ca. 75% beträgt, so entsprechen die Quantitäten von Calcium und Oxalat einander, und man darf daher annehmen, daß diejenige Menge Calcium, die über den normalen Wert hinausgeht, als Calciumoxalat auftritt.

Die überraschend hohen Oxalatswerte der Kontrollgruppe dürften wohl auf methodischen Fehlern beruhen. In manchen Fällen können andere oxydierende Stoffe als Oxalat im endgültigen Analysenmaterial zurückgeblieben sein. Weiter ist es möglich, daß in denjenigen Fällen, wo sich die Farbe der Titrationslösung sofort beim ersten Zusatz der kleinstmöglichen Menge Permanganat ändert, dieser Zusatz als Titrationswert angesehen wird, auch wenn er höchstwahrscheinlich etwas zu groß ist.

Es wäre eventuell denkbar, daß es sich um Oxalatkristalle handelt, wie BENNINGTON (1964) sowie FANGER und ESPERZA (1964) sie beschrie-

ben haben; da jedoch der Unterschied zwischen den Gruppen in allen Fällen so groß ist, kann man die Calcium- und Oxalatbestimmungen bei der Diagnostizierung von Äthylenglykolvergiftungen zu Hilfe nehmen. Da die Calciumbestimmung so viel einfacher ist, möchten wir empfehlen, die Oxalatbestimmung nur in denjenigen Fällen auszuführen, wo erhöhte Calciumwerte erhalten worden sind.

Bestimmung von Calcium und Oxalat aus Paraffinblöcken

Methoden

Calciumbestimmung. Von dem Paraffinblock werden 20—30 Schnitte von 20 μ Dicke in ein tariertes Reagensglas geschnitten. Die Schnitte werden dreimal mit 3 ml Xylol und zweimal mit 3 ml abs. Alkohol extrahiert, $\frac{1}{2}$ Std lang in jeder Lösung. Das Reagensglas mitsamt dem Inhalt bleibt zum Trocknen über Nacht bei ca. 40°C im Wärmeschrank stehen, wird dann im Exsiccator abgekühlt und erneut gewogen. Hierauf folgen zwei verschiedene Behandlungen:

1. Der Schnitt verascht, und aus der Asche wird der Calciumgehalt nach dem gleichen Verfahren bestimmt wie aus dem frischen Gewebe, nur daß die ganze Calciumlösung bei einer Titration verwendet wird.

2. Der Schnitt wird 1 Std lang in 2 ml 2 n Schwefelsäure extrahiert. Von dem filtrierten Extrakt werden 1,0 ml für die Oxalatbestimmung und 0,5 ml für die Calciumtitration benutzt. Der Endpunkt der Calciumtitration ist bei dieser Methode schwerer zu beobachten.

Oxalatbestimmung

Das Paraffin wird entfernt, und der Schnitt wird auf die gleiche Weise extrahiert wie für die Calciumbestimmung 2. Aus dem Schwefelsäureextrakt wird die Oxalatsmenge sowohl durch Titration wie mit Hilfe der Farbreaktion bestimmt (FEIGL, 1960).

1. Die Permanganattitration wird in der gleichen Weise ausgeführt wie beim frischen Gewebe, wobei jedoch 0,005 m Kaliumpermanganatlösung benutzt werden.

2. Das Prinzip für die Farbreaktion ist folgendes: Das Oxalat wird mit Zink zu Glykolsäure reduziert. Durch Erhitzung im Wasserbad in konz. Schwefelsäure in Gegenwart von Chromotropsäure geht die Glykolsäure in Formaldehyd über, das mit der Chromotropsäure zu einem rot-violetten Komplex kondensiert wird. Die Farbintensität wird bei einer Wellenlänge von 570 μ gemessen.

Ausführung. 1,0 ml von dem obigen Schwefelsäureextrakt und 1,0 ml 2 n Schwefelsäure werden 2 Std lang mit 100 mg Zink reagieren gelassen. 0,2 ml von der klaren Lösung werden in ein Reagensglas pipettiert, wonach 5 ml konz. Schwefelsäure und 0,5 ml frisch zubereitete 10%ige Chromotropsäurelösung zugefügt werden. Dieses Gemisch wird 1 Std lang im Wasserbad erhitzt, dann abgekühlt und mit ca. 20 ml Wasser versetzt. Die Lösung wird in einen 50 ml-Meßkolben gegossen und aufgefüllt. Die Extinktion wird gegen die Blindprobe bei 570 μ abgelesen und die Oxalatsmenge aus der Standardkurve ermittelt.

Besprechung der Ergebnisse

Bei der Veraschungsmethode läßt sich ein deutlicher Unterschied zwischen den Calciumwerten der Kontrollgruppe und denjenigen der Äthylenglykolgruppe feststellen (Tabelle 3). Die Extraktionsmethode ist

Tabelle 3. *Menge von Calcium und Oxalat in den Paraffinblöcken*

Ca mg/10 mg		(COOH) ₂ mg/10 mg	
Extrahiert	Verascht	Farbreaktion	KMNO ₄ -Titration
Kontrollmaterial			
0,052	0,011	0,031	—
0,026	0,012	0,044	—
0,082	0,014	0,104	—
0,042	—	0,029	0,078
0,027	—	0,010	0,021
0,056	—	0,033	0,053
0,039	—	0,025	0,040
0,053	—	0,076	0,054
0,058	—	0,114	0,060
0,057	—	0,056	0,126
0,042	—	—	0,019
0,043	—	—	0,031
0,041	—	—	0,015
0,048	—	—	0,022
0,030	—	—	0,025
0,034	—	—	0,026
0,033	—	—	0,027
0,143	—	—	0,028
0,015	—	—	0,020
0,013	—	—	0,015
Äthylenglykolmaterial			
0,170	0,105	0,272	—
0,213	0,104	0,885	—
0,208	—	0,393	—
0,065	—	0,138	0,170
0,163	—	0,394	0,225
0,096	—	0,220	0,258
0,062	—	0,026	0,072
0,047	—	0,106	0,152

unseres Erachtens jedoch vorteilhafter, weil die Oxalatbestimmung am gleichen Material ausgeführt werden kann und da oft nur spärlich Analysenmaterial zur Verfügung steht. Die mit der Extraktionsmethode erhaltenen Calciumwerte sind höher als die mit dem Veraschungsverfahren erzielten, aber der Unterschied zwischen Kontroll- und Glykolgruppe ist in vielen Fällen so groß, daß auch diese Methode benutzt werden kann.

Von den Oxalatmethoden geht die Kaliumpermanganattitration beträchtlich schneller, sie ist aber bezüglich der Oxalsäure etwas unspezifischer als die Farbreaktion nach Zinkbehandlung. Es dürfte daher am besten sein, daß man die Oxalatbestimmung mit beiden Methoden vom gleichen Gewebestück macht. Die Differenz zwischen den Resultaten der Oxalsäurebestimmung beruht darauf, daß keines der beiden Verfahren für Oxalsäure spezifisch ist. Die Calciumtitration wird deutlich durch die Gegenwart von anderen Stoffen in größeren Mengen beeinflusst, wie es der Fall ist, wenn das Calcium durch Extraktion gewonnen wird. Auch die Wägung des Schnitts kann eine Fehlerquelle sein.

Man kann also die Calcium- und Oxalatbestimmungen mit diesen Methoden auch vom Paraffinschnitt durchführen, aber die damit erzielten Werte sind nicht so zuverlässig wie die Bestimmungswerte von frischem Gewebe. Nur sechs von den acht bekannten Äthylenglykolfällen ergaben positiven Wert mit mindestens zwei Bestimmungsmethoden, und einer ergab einen positiven Wert mit der Permanganattitration, nicht aber mit den anderen Verfahren. Ein Vergiftungsfall mit Äthylenglykol ergab normale Werte mit drei Methoden. In keinem einzigen Fall wurden unzutreffende positive Werte mit mehr als einer Methode erhalten, und man darf somit die erhöhten Werte als signifikant ansehen.

Zusammenfassung

Es wird eine neue Methode zur Isolierung von Oxalsäure aus Nierengewebe beschrieben. Der Oxalsäure- und Calciumgehalt wurde in Nieren von Kontroll- und Äthylenglykolmaterial bestimmt, und zwar die Oxalsäure titrimetrisch mit Kaliumpermanganat und das Calcium mit Hilfe komplexometrischer Titration nach Veraschung des Gewebes. Es ergab sich ein sehr deutlicher Unterschied zwischen den Gruppen.

Die Bestimmungen von Calcium und Oxalat sind auch von Paraffinblöcken gemacht worden. Außer den obengenannten Verfahren wurde eine colorimetrische Oxalatbestimmungsmethode mit Chromotropsäure angewandt. Das vom Paraffin befreite Material wurde vor der Calciumbestimmung teils extrahiert und teils verascht. Auch in diesem Material ließ sich ein Unterschied zwischen den Kontroll- und den Äthylenglykolfällen beobachten, jedoch nicht so ausgeprägt wie bei der Bestimmung an frischem Gewebe.

Summary

A new method for isolation of oxalic acid from kidney tissue is described. The oxalic acid and calcium contents of the kidney were determined from control tissue and ethylene glycol material, the oxalic acid titrimetrically with potassium permanganate and the calcium by complexometric titration after ashing of the tissue. A very marked difference was observed between the groups.

Calcium and oxalate determinations were also carried out from paraffin blocks. In addition to the above techniques, a colorimetric method of determination of oxalate with chromotropic acid was used. Prior to the determination the deparaffinized material was in part ashed. This material also exhibited a difference between the control and the ethylene glycol cases, though it was not as clearly evident as in the determination made from fresh tissue.

Literatur

- BENNINGTON, J. L., S. L. HABER, J. V. SMITH, and N. E. WARNER: Amer. J. clin. Path. **41**, 8 (1964).
DEICHMANN, W. B., and H. W. GERARDE: Occup. Med. **1**, 465 (1959).
DOERR, W.: Virchows Arch. path. Anat. **313**, 137 (1944).
FANGER, H., and A. ESPERZA: Amer. J. clin. Path. **41**, 597 (1964).
FEIGL, F.: Spot tests in organic analysis, p. 383. Amsterdam-London-New York-Princeton: Elsevier Publ. Co. 1960.
MULINOS, M. G., L. POMERANTZ, and M. E. SOJKIN: Amer. J. Pharm. **115**, 51 (1943).
SARIS, N.-E.: Duodecim (Helsinki) **79**, 482 (1963).

Mag. phil. L. HANSSON
Institut für gerichtliche Medizin der Universität Helsinki
Snellmaninkatu 10, Helsinki