J. Clin. Chem. Clin. Biochem.
Vol. 19, 1981, pp. 295–299

Wachstum von Calciumoxalatkristallen in vitro: Einfache Methode zur Messung der Hemmwirkung menschlichen Urins

Von B. Hess und U. Binswanger

Departement für Innere Medizin, Nephrologische Station, Universitätsspital Zürich

(Eingegangen am 24. Juni 1980/3. Februar 1981)

Zusammenfassung: Es wird eine technisch einfache und reproduzierbare Methode zur Erfassung des Calciumoxalat-Monohydrat-Kristallwachstums in vitro vorgestellt. In einem bezüglich Calcium- und Oxalat-Ionenkonzentrationen metastabilen System wird nach Zugabe einer konstanten Menge von Calciumoxalat-“seed-crystals” das Kristallwachstum anhand der Abnahme freier Calciumionen im Zeitverlauf verfolgt. Die Untersuchungen beschränken sich auf die Bestimmung der globalen Hemmkraft im Versuchsansatz nach Zugabe von verschiedenen Inhibitoren sowie Spontanurinen, während das Problem der Übersättigung an kristallbildenden Ionen durch Verwendung niedriger Konzentrationen ausgeschlossen wird. Von den bekannten getesteten Inhibitoren Ethan-1-hydroxy-1,1-bisphosphonat, Heparin und Chondroitinsulfat C wirkt Ethan-1-hydroxy-1,1-bisphosphonat am stärksten kristallwachstumshemmend. Die Hemmkraft menschlichen Urins wird durch Zugabe von Spontanurin (30 ml/l) nüchterner und stark hydrierter Probanden geprüft.

Growth of calcium oxalate crystals in vitro:

A simple method for measurement of the inhibitory action of human urine

Summary: A technically simple and reproducible method is described for the determination of the growth of crystals of calcium oxalate monohydrate in vitro. In a system made metastable with respect to calcium and oxalate ion concentrations, the time course of crystal growth was measured by the decrease of free calcium ions, following the addition of a fixed quantity of calcium oxalate seed crystals. Inhibition of crystal growth caused by the addition of various inhibitors or urine was determined, and the possibility of supersaturation of crystal-forming ions was excluded by using low concentrations. The known inhibitors, ethane 1-hydroxy-1,1-bisphosphonate, heparin and chondroitin sulphate C were tested, and ethane 1-hydroxy-1,1-bisphosphonate showed the strongest inhibition of crystal growth. The inhibitory action of human urine was tested by addition of urine (30 ml/l) from resting and strongly hydrated probands.

Einführung

Nach Williams (1) enthalten 2/3 aller in den USA vorkommenden Nierensteine Calciumoxalat, sei es als alleinige Komponente oder gemischt mit Calciumphosphat (Hydroxylapatit). Wie beim Ausfallen anderer Konkreme aus dem Harn spielen auch bei der Entstehung von Calciumoxalatsteinen die initiale Nukleation (Kristallbildung) sowie Wachstum und Aggregation der entstandenen Mikrokristalle eine entscheidende Rolle (2, 3).

Die spontane Nukleation erfolgt bei starker Übersättigung des Urins an kristallbildenden Ionen. In nur schwach übersättigten Lösungen erfolgt eine Kristallbildung jedoch nur in Anwesenheit des auszufällenden Salzes oder eines in seiner kristallinen Struktur ähnlichen Nukleators (homogene und heterogene Nukleation). Der

früher ebenfalls diskutierten Nukleation um eine organische Matrix wird heute nur noch geringe Bedeutung beigemessen (2, 3).

Kristallwachstum und Kristallaggregation sollen hauptsächlich von 2 Faktoren abhängig sein (4): Erstens wiederum vom Grad der Urinübersättigung, zweitens aber vom Gehalt des Urins an Inhibitoren. Die Suche nach solchen Substanzen im menschlichen Urin gewann zusehends an Bedeutung, seit Thomas & Howard 1959 entdeckten (5), daß Urin normaler Probanden den Knorpel rachitischer Ratten nicht zu mineralisieren vermag, wohl aber Urin ausgewählter Nierensteinpatienten. Robertson & Peacock (6) gelang der Nachweis, daß menschlicher Urin in vitro Wachstum und Aggregation von Calciumoxalatkristallen zu hemmen vermag.

Verschiedene Inhibitoren wurden identifiziert und in vitro getestet. Pyrophosphat hemmt neben dem Calciumphosphat-Kristallwachstum (7) sehr stark Wachstum und Aggregation von Calciumoxalatkrystallen (8, 9). Citrat hemmt wohl das Wachstum von Calciumphosphatkrystallen, hat aber auf das Calciumoxalat-Kristallwachstum nur einen geringen inhibitorischen Effekt (7, 8). Magnesiumionen schließlich vermögen in physiologischen Konzentrationen ausschließlich das Calciumphosphat-Kristallwachstum zu hemmen (7, 8). Ethan-hydroxy-1,1-bisphosphonat¹⁾ wurde sowohl in vitro als auch in vivo als potenter Inhibitor der Calciumoxalat-Aggregation beschrieben (2, 10, 11).

Immer wieder werden auch Makromoleküle wie die sauren Mucopolysaccharide als wesentlichste Hemmer der Calciumoxalat-Aggregation diskutiert. In vitro erwiesen sich Heparin und Chondroitinsulfat als wirksame Inhibitoren (9). Die Isolation saurer Mucopolysaccharide im Urin ist methodisch problematisch.

Die vorliegende Arbeit hat zum Zweck, eine einfache und reproduzierbare Methode zur Durchführung von Calciumoxalat-Monohydrat-Kristallwachstumsexperimenten in vitro darzulegen. Dabei interessiert ausschließlich die Hemmung des Kristallwachstums, währenddem das Problem der Übersättigung an kristallbildenden Ionen durch Verwendung niedriger Ionenkonzentrationen ausgeschlossen wird. Die Hemmkraft bekannter Inhibitoren und verdünnter Spontanurine von Normalpersonen wird gemessen.

Material und Methodik

Die Calciumoxalat-Anlagerung an "seed crystals" (Calciumoxalat-Monohydrat) in einer bezüglich Ca^{++} - und Oxalat-Ionen metastabilen Lösung (1:1-Relation von $[\text{Ca}^{++}]$ und $[(\text{COO})_2^{2-}]$) wird nach Zusatz verdünnten Urins (30 ml/l) und Calciumoxalat-Kristallsuspension (5 ml/l) anhand der Abnahme freier Calciumionen, welche fortwährend als Calciumoxalat-Kristalle aus der Lösung ausfallen, quantitativ erfaßt. Als Vergleich dienen das Kristallwachstum, welches bei Verwendung einer inhibitorfreien, calciumhaltigen Standardlösung anstelle von Urin erfolgt, sowie das maximale Wachstum bei Erreichen des Löslichkeitsproduktes $[\text{Ca}^{++}] \times [(\text{COO})_2^{2-}]$. Nach Meyer & Smith (17) enthält die metastabile Lösung je 0,44 mmol/l an Ca^{++} and Oxalat. Sie wird nach Robertson (7) mit Na-Cacodylat gepuffert und mittels HCl auf pH 6,0 eingestellt.

Da nach Zugabe einer Ca-haltigen Urinprobe bzw. von inhibitorfreier Standardlösung der metastabile Bereich verlassen würde, geht man primär von einer Ca-freien Stammlösung aus. Nach Zugabe einer Urinprobe bestimmt man den Ca^{++} -Gehalt des Ansatzes und ergänzt durch eine geringe Menge einer an Ca^{++} hochkonzentrierten NaCl-Lösung auf den Sollwert von 0,44 mmol/l. Somit wird das Kristallwachstumsexperiment unabhängig vom Ca-Gehalt des zugesetzten Urins, und der metastabile Konzentrationsbereich im Versuchsansatz – bei konstant gehaltener Calcium-Konzentration und nur minimalen Schwankungen des Oxalats – gar nie verlassen.

Material

Chemische Substanzen Grade p.a.

NaCl (Fabrikat Rheinsalinen)
 CaCl_2 geschmolzen granuliert (Merck Art. 2083)
 $\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (Merck Art. 5073)
 Natrium-Cacodylat: $\text{C}_2\text{H}_6\text{As}_5\text{NaO}_2 \times 3\text{H}_2\text{O}$ (Dres. Bender & Hobein AG Nr. 78–335)
 Ethane-1-hydroxy-1,1-bisphosphonat (EHDP, Procter and Gamble)
 Chondroitinsulfat C sodium salt (from Shark Cartilage) (Calbiochem, Lot 700039)

Versuchslösungen

Alle Lösungen werden mit bidest. Wasser hergestellt. Die $[\text{NaCl}]$ beträgt 0,15 mol/l. Chemische Substanzen werden mit der Mettler Analysenwaage H 54 eingewogen.

a) Calciumfreie Stammlösung: In nachstehender Reihenfolge eingewogen und sogleich in bidest. Wasser gelöst.

150 mmol NaCl
 0,46 mmol $\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4 \times \text{H}_2\text{O}$
 40 mmol $\text{C}_2\text{H}_6\text{As}_5\text{NaO}_2 \times 3\text{H}_2\text{O}$
 ca. 30 Tropfen 12 mol/l HCl (bis pH = 6,0)

ad 1000 ml

Diese Lösung kann bei 37 °C maximal 3 Wochen aufbewahrt werden.

b) Inhibitorfreie Standardlösung:

150 mmol NaCl

2 mmol CaCl_2

ad 1000 ml

Bei 37 °C unbeschränkt haltbar.

c) Ca^{++} -hochkonzentrierte Lösung:

150 mmol NaCl

15 mmol CaCl_2

ad 1000 ml

Bei 37 °C etwa 4 Monate haltbar.

d) Ethan-1-hydroxy-1,1-bisphosphonat-Lösung:

0,8 mmol

ad 10 ml

e) Heparin-Lösung:

Liquemine® Roche, 1 ml = 5000 IE Heparin

f) Chondroitinsulfat-Lösung:

0,002 mmol Chondroitinsulfat C

ad 100 ml

Calciumoxalat-Kristallsuspension („seed-crystals“)

Die Kristalle werden nach Meyer & Smith (12) hergestellt und jeweils 24 Stunden im Vakuum-Exsikkator über Kieselgel getrocknet, bevor je 6,0 mg mit 0,5 ml bidest. Wasser in Milian-Mikroröhrchen mit Deckel abgewogen, kurz auf dem Vortex geschüttelt und danach mindestens 2 Wochen bei 37 °C gelagert werden.

Geräte

Wasserbad und Magnetrührer:

Alle Experimente werden im 37 °C-Wasserbad, welches auf 4 Magnetrührern mit konstanter Rührgeschwindigkeit von etwa 200/min steht, durchgeführt.

Marius-Titrator und Zentrifuge:

In den in der Heraeus-Minifuge zentrifugierten Proben wird $[\text{Ca}^{++}]$ mit dem Marius-Titrator bestimmt (Titration mit Ethylen-glycol-tetraessigsäure (EGTA), Calcein als fluoreszierender Indikator-Farbstoff).

pH-Meter:

Instrumentation Laboratory 228.

Osmometer:

Knauer.

Automatische Pipetten:

micro/pettor (smi) à 10, 20, 50, 100 und 200 µl

Gilson „pipetman“

Papierfilter:

Schleicher & Schüll Nr. 589² (Porengröße etwa 7 µm)

¹⁾ Ethan-1-hydroxy-1,1-diphosphonat, EHDP, Procter & Gamble.

Methodik

In einem 100 ml-Erlenmeyer, der im 37 °C-Wasserbad steht und in dem dauernd mit etwa 200 U/min gerührt wird, stellt man einen *Versuchsansatz* für ein Calciumoxalat-Wachstumsexperiment wie folgt zusammen:

95,0 ml Stammlösung (Calcium-frei)

3,0 ml inhibitorfreie Standardlösung bzw. Spontanurin
x ml hochkonzentrierte Ca⁺⁺-Lösung

Dabei ist x abhängig von der [Ca⁺⁺] sowohl der Standardlösung bzw. Urinprobe als auch der hochkonzentrierten Ca⁺⁺-Lösung selbst. Beide Konzentrationen werden vor Beginn eines Experimentes bestimmt, worauf im Versuchsansatz durch entsprechende Zugabe hochkonzentrierter Ca⁺⁺-Lösung der [Ca⁺⁺]-Sollwert von 0,44 mmol/l eingestellt wird. Anschließend gibt man 0,5 ml Calciumoxalat-Kristallsuspension zu, was den Beginn der Wachstumsphase (t = 0) darstellt. Nach 3, 10 und 60 Minuten entnimmt man dem Ansatz 3,0 ml Suspension und zentrifugiert diese während 4 Minuten mit 5000 U/min bis zur Sedimentation der Kristallaggregate (Raumtemperatur). Aus dem Überstand werden 2 mal (Doppelwerte) je 200 µl entnommen, in denen [Ca⁺⁺] mittels Titration mit Ethylenglycol-tetracessigsäure (Calcein als fluoreszierender Indikator-Farbstoff) gemessen wird.

Das Standardexperiment mit inhibitorfreier Standardlösung (30 ml/l) wurde über Monate hinweg regelmäßig wiederholt, um die Reproduzierbarkeit der Methode zu überprüfen.

Mit diesem Versuchsansatz wurden zunächst bekannte Inhibitoren in vitro getestet, indem unmittelbar vor Zugabe der Calciumoxalat-Kristallsuspension kleine Mengen hochkonzentrierter Inhibitorlösungen beigegeben wurden. Einerseits handelte es sich – wie bei Robertson et al. (9) sowie Pak et al. (10) ähnlich beschrieben – um Ethan-1-hydroxy-1,1-bisphosphonat (2, 4 und 8 µmol/l), andererseits um Heparin (0,23, 1,13 und 5,66 µmol/l) und Chondroitinsulfat C (10, 50 und 250 nmol/l).

Die Bestimmung der Hemmkraft von Urin erfolgt analog, indem statt inhibitorfreier Standardlösung Urin (30 ml/l) zugesetzt wird. Zur Untersuchung gelangen Spontanurine nüchterner und stark hydrierter Probanden. Die Spontanurine werden bis zur Verarbeitung unbehandelt in Plastikbehältern aufbewahrt und tiefgefroren. Vor der Verwendung in Calciumoxalat-Wachstumsexperimenten wird der Urin im 37 °C-Wärmeschrank aufgetaut und anschließend mittels Papierfilter filtriert. Im Filtrat wird die Osmolarität bestimmt. Beträgt sie über 300 mosmol/l, wird der Urin mit bidest. Wasser auf diesen Wert verdünnt. So erhält man vergleichbare Mengen gelöster Urinbestandteile und befindet sich zudem im Bereich der Osmolarität physiologischer NaCl-Lösung. Vorversuche ergaben, daß die Hemmkraft eines Urins unterhalb 500 mosmol/l mit zunehmender Verdünnung so wenig abnimmt, daß mit der Genauigkeit unserer Meßmethodik keine signifikanten Unterschiede mehr festgestellt werden können. Entscheidend ist noch, daß durch die Verwendung verdünnter Urine – bei konstant gehaltener Ca⁺⁺-Konzentration – die Schwankungen der Oxalatkonzentration im Versuchsansatz so minim bleiben, daß der metastabile Bereich bezüglich des Produktes [Ca⁺⁺] × [(COO)₂²⁻] nie verlassen werden kann, was sich auch anhand der Nomogramme von Marshall & Robertson (13) zeigen läßt.

24 Normalpersonen wurden untersucht. Es handelte sich um regelmäßige Blutspender aus dem Blutspendezentrum Limmattal SRK in Schlieren ZH (wir danken dem Leiter, Herrn Dr. M. Frey-Wettstein, für die Mithilfe) sowie um Mitarbeiter der Nephrologischen Station des Departementes für Innere Medizin am Universitätsspital Zürich. Sie hatten alle zum Zeitpunkt der Untersuchung bezüglich Nephrolithiasis eine stumme Anamnese und waren ohne manifesten Harnwegsinfekt.

Die verwendeten „seed-crystals“ wurden sowohl vor als auch nach der Verwendung in Kristallwachstumsexperimenten mehrmals mittels Röntgen-Diffraction untersucht (unter freundlicher Mithilfe von Herrn Dr. Asper, Med. Chem. Zentrallaboratorium des Universitätsspitals Zürich). Es handelte sich dabei um reine Calciumoxalat-Monohydrat-Kristalle.

Die Resultate aller Experimente wurden graphisch dargestellt, indem die relative Abnahme [Ca⁺⁺] zur Zeit t (ΔCa_t) auf der Ordinate gegen die Zeit (t) aufgetragen wurde. Die entstehende hyperbolische Kurve kann nach Bijvoet et al. (14) durch 2 Para-

meter beschrieben werden: Einerseits durch eine Asymptote, welche der maximalen Abnahme an [Ca⁺⁺] zur Zeit t = ∞ entspricht (ΔCa_∞), andererseits durch die Zeit T_m, zu der die Abnahme an [Ca⁺⁺] halbmaximal ist:

$$\Delta Ca_t / \Delta Ca_\infty = t / (T_m + t) \quad (\text{Gl. 1})$$

Durch Umformung ergibt sich

$$t / \Delta Ca_t = T_m / \Delta Ca_\infty + (1 / \Delta Ca_\infty) t \quad (\text{Gl. 2})$$

und durch Auflösung nach T_m

$$T_m = (\Delta Ca_\infty / \Delta Ca_t) t - t \quad (\text{Gl. 3})$$

ΔCa_t, die prozentuale Abnahme der [Ca⁺⁺] zur Zeit t, ergibt sich aus der Formel

$$Ca_t = 100\% - ([Ca^{++}]_t / [Ca^{++}]_0) \times 100\%$$

und wird experimentell bestimmt. [Ca⁺⁺]₀ (Ausgangswert) beträgt 0,44 mmol/l, ΔCa_∞ wurde bestimmt, indem das Standardexperiment mehrmals über 24 Stunden verlängert wurde. Nach dieser Zeit wird ein Gleichgewichtszustand erreicht, bei dem pro Zeiteinheit gleichviele Calcium- und Oxalationen in Lösung gehen wie solche als Calciumoxalat-Kristalle aus der Lösung ausfallen. Der Mittelwert aus 5 solchen Standardexperimenten betrug 37,38%.

Es wurde nun für jeden einzelnen Versuchsansatz T_m basierend auf ΔCa₆₀ errechnet, d. h. die Zeit, in der in einem bestimmten Ansatz die Hälfte des maximal erreichbaren [Ca⁺⁺]-Abfalles erfolgt ist. T_m ist eine charakteristische Größe für die globale Hemmkraft eines einzelnen Versuchsansatzes, da sie die Geschwindigkeit, mit der sich der hyperbolische Kurvenverlauf des Kristallwachstums pro Zeiteinheit der Asymptoten ΔCa₆₀ nähert, ausdrückt.

Resultate

Die Reproduzierbarkeit der dargelegten Methode ist, wie Tabelle 1 zeigt, mit einem Variationskoeffizienten von 4,6% gut für die Messungen der relativen [Ca⁺⁺]-Abnahme nach 60 Minuten (ΔCa₆₀), hingegen ungenügend für Messungen nach bereits 3 Minuten, wo die [Ca⁺⁺]/Zeit-Kurve steiler verläuft.

In Abbildung 1 sind in semilogarithmischer Darstellung Hemmkraft (ausgedrückt durch die Größe T_m) gegen Konzentration dreier bekannter Inhibitoren im Versuchsansatz aufgetragen (Dosis-Wirkungs-Geraden). Ethan-1-hydroxy-1,1-bisphosphonat ist der stärkste Hemmer; es läßt sich mit der kleinsten Dosissteigerung der größte Zuwachs an Hemmkraft erzielen.

In einem Vorversuch wurde der Effekt der Verdünnung eines Spontanurins mit bidest. Wasser untersucht. Der unverdünnte Urin (1200 mosmol/l) ergab im Kristallwachstumsexperiment einen ΔCa₆₀-Wert von 20,1%. Die entsprechenden Werte für die Verdünnungen auf 700, 500 und 300 mosmol/l betrugen 23,5%, 24,2% und 24,7%. Der Unterschied zwischen den 2 letztgenannten Ergebnissen ist nicht mehr signifikant.

Da [Ca⁺⁺] im Versuchsansatz konstant gehalten wird, interessierten die Abweichungen der [(COO)₂²⁻] vom Ausgangswert im Standardansatz (0,440 mmol/l = 38,50 mg/l Kalium-Oxalat), nachdem Urin (30 ml/l) zugesetzt worden waren. Die mittlere Ausgangskonzentration an Oxalat in 7 Versuchsansätzen betrug nach dem

Abb. 1. Semilogarithmische Darstellung der Beziehung T_m /Konzentration des Inhibitors (Dosis-Wirkungs-Geraden) für Ethan-1-hydroxy-1,1-bisphosphonat (x—x), Heparin (o—o) und Chondroitinsulfat C (●—●) in je 3 verschiedenen Konzentrationen.

Zusatz 7 verschiedener Urine 0,443 mmol/l. Bei diesen minimalen Schwankungen der Oxalat-Konzentrationen und konstant gehaltenem Calcium konnte somit anhand der von Marshall & Robertson übernommenen Nomo-gramme (13) gezeigt werden, daß der metastabile Bereich bezüglich des Produkts $[Ca^{++}] \times [(COO)_2^{2-}]$ nie verlassen wird, solange verdünnte Urine verwendet werden.

Die Reproduzierbarkeit der Methode nach wiederholter Zugabe des gleichen, gut hemmenden Urins war mit einem Variationskoeffizienten von 6,8% für die $[Ca^{++}]$ -Abnahme nach 60 Minuten ($n = 6$) annähernd gleich gut wie im Standardexperiment ohne Urin, hingegen für Messungen nach bereits 3 Minuten ($VK = 69,46\%$) noch viel unzuverlässiger als bereits im Standardversuch (vgl. Tab. 1).

Bei den 24 untersuchten Spontanurinen von Normalpersonen betragen die Mittelwerte für ΔCa_{60} $26,96 \pm 2,61\%$ ($\bar{x} \pm s$) und für T_m $23,82 \pm 8,99$ min ($\bar{x} \pm s$). Demzufolge resultiert durch die Verdünnung eine nicht sehr massive, aber gegenüber dem Standardexperiment ohne Urin noch signifikant bessere Hemmung des Kristallwachstums.

Tab. 1. Mittelwert ($\bar{x}$), Standardabweichung (S. D.), Standardfehler (S. E. M.) und Variationskoeffizient (VK) der relativen Abnahme der Calciumkonzentration (ΔCa_t) nach 3, 10 und 60 Minuten sowie der Zeit der halbmaximalen Calciumabnahme (T_m) in 23 Standardexperimenten, durchgeführt in einem Zeitraum von 10 Monaten.

n = 23	ΔCa_3 (%)	ΔCa_{10} (%)	ΔCa_{60} (%)	T_m (min)
$\bar{x}$	7,230	13,935	29,100	17,230
S. D.	1,106	0,885	1,348	3,548
S. E. M.	0,231	0,184	0,281	0,740
VK	15,3	6,4	4,6	20,8

Diskussion

Unsere nach Meyer & Smith (12) vereinfachte Methode, mit der wir unter Ausschluß der Probleme betreffend die Übersättigung an kristallbildenden Ionen ausschließlich die Hemmung des Calciumoxalat-Kristallwachstums in vitro untersuchten, erwies sich als technisch einfach und gut reproduzierbar, vor allem für Messungen der relativen $[Ca^{++}]$ -Abnahme (als Ausdruck der Hemmkraft) 60 Minuten nach Beginn eines Kristallwachstumsexperimentes. Dies gilt sowohl für Experimente mit inhibitorfreier Standardlösung als auch für solche mit Spontanurinproben. Zuverlässige Messungen im Bereich des sehr raschen Kristallwachstums zu Beginn des Experiments sind hingegen nicht möglich. Die Resultate aus 23 Standardversuchen lassen sich in etwa mit denjenigen vergleichen, die Meyer & Smith aus 3 solchen Experimenten graphisch darstellten (15). Es läßt sich dort ein Abfall der Ausgangskonzentration an Ca^{++} von etwa 16% nach 10 Minuten und von etwa 35% nach 60 Minuten extrapolieren. Vergleiche mit Resultaten aus den Arbeiten der Gruppe um Robertson sind nicht möglich, da dort das Calciumoxalat-Kristallwachstum anhand der Zunahme von Aggregaten einer bestimmten Größe im Lauf der Zeit gemessen wird. Direkte Vergleiche mit den Resultaten von Bijvoet, der den Einbau radioaktiv markierten Calciums in Calciumoxalat-Kristalle mißt (14), sind ebenfalls unmöglich; dagegen liefert die dort dargestellte mathematische Auswertung der Ergebnisse mit T_m eine Größe, welche auch in unseren Versuchen den ganzen hyperbolischen Verlauf der $[Ca^{++}]$ -Abnahme pro Zeiteinheit zu charakterisieren vermag.

Ethan-1-hydroxy-1,1-bisphosphonat und Heparin zeigten in unserem Standardversuch die bekannte, dosisabhängige Hemmwirkung auf das Calciumoxalat-Kristallwachstum in vitro. Bei ähnlichen Konzentrationen im Versuchsansatz hemmte Ethan-1-hydroxy-1,1-bisphosphonat stärker bzw. ließ sich durch eine vergleichsweise eher kleinere Dosissteigerung bei Ethan-1-hydroxy-1,1-bisphosphonat eine bedeutend stärkere Hemmungsverbesserung erzielen als mit Heparin. Chondroitinsulfat C erwies sich mit unserer Meßmethodik als schwacher Inhibitor des Calciumoxalat-Kristallwachstums, dies im Gegensatz zu Ligabue et al., welche mit ihrer ^{14}C -markiertes Oxalat messenden Technik zeigten, daß Chondroitinsulfat C in noch viel geringerer Konzentration als in unseren Versuchen ein sehr guter Hemmer des Calciumoxalat-Kristallwachstums ist (16).

Die Verwendung verdünnter Urine im Kristallwachstumsexperiment hat den großen Vorteil, daß eine Übersättigung an kristallbildenden Ionen praktisch ausgeschlossen ist. Dafür ist die Konzentration an Hemmstoffen geringer, so daß Unterschiede in der Hemmkraft einzelner Urine weniger deutlich werden. Es erscheint vorteilhaft, die Urine stark hydrierter Probanden zu untersuchen und sie nur nach Bedarf wenig nachzuverdünnen, da die Verdünnung auf diese Art „physiologischer“ ist: alleiniges Nachverdünnen gelöster Urine soll möglicherweise, wie

Leskovar in seiner Übersichtsarbeit ausführt (3), ein verändertes Verhalten der Inhibitoren nach sich ziehen. Das Einfrieren der frischen Urinproben ohne spezielle Vorbehandlung wurde von *Meyer & Smith* ebenfalls angewandt (17).

Verdankungen

Die technische Assistenz von Frau *U. Flueler*, Frau *A. Meier* und Frau *M. Stillhart-Huggler* wird bestens verdankt. Frau *B. Rutz* leistete zuverlässige und exakte Schreibarbeit.

Literatur

1. Williams, H. E. (1974), *New Engl. J. Med.* **290**, 33–38.
2. Fleisch, H. (1974), *Nieren- und Hochdruckkrankheiten* **3**, 112–115.
3. Leskovar, P. (1979), *Aktuelle Nephrologie*, Heft 1, Wissenschaftliche Information, Fresenius-Stiftung, 149–175.
4. Robertson, W. G., Peacock, M., Marshall, R. W., Marshall, D. H. & Nordin, B. E. C. (1976), *New Engl. J. Med.* **294**, 249–252.
5. Thomas, W. C. & Howard, J. E. (1959), *Trans. Ass. Am. Physicians* **72**, 181–187.
6. Robertson, W. G. & Peacock, M. (1972), *Clin. Sci.* **43**, 499–506.
7. Smith, L. H., Meyer, J. L. & McCall, J. T. (1973), *Int. Symp. Renal Stone Res. 1972*, Madrid (Cifuentes Delatte, ed.) pp. 318–327, Karger, Basel.
8. Meyer, J. L. & Smith, L. H. (1975), *Invest. Urol.* **13**, 36–39.
9. Robertson, W. G., Peacock, M. & Nordin, B. E. C. (1972), *Clin. Chim. Acta* **43**, 31–37.
10. Pak, C. Y. C., Ohata, M. & Holz, K. (1975), *Kidney Int.* **7**, 154–160.
11. Robertson, W. G., Peacock, M., Marshall, R. W. & Knowles, F. (1974), *Clin. Sci. Mol. Med.* **47**, 13–22.
12. Meyer, J. L. & Smith, L. H. (1975), *Invest. Urol.* **13**, 31–35.
13. Marshall, R. W. & Robertson, W. G. (1976), *Clin. Chim. Acta* **72**, 253–260.
14. Bijvoet, O. L. M., van der Linden, H. & Will, E. J. (1978), *Urol. Nephrol.* **11**, Pathogenese und Klinik der Harnsteine VI, 224–232. (Verlag Steinkopff, Darmstadt).
15. Smith, L. H., Werness, P. G., Bergert, J. J. & Lee, K. E. (1978), *Kidney Int.* **14**, 663.
16. Ligabue, E., Fini, M. & Robertson, W. G. (1979), *Clin. Chim. Acta* **98**, 39–46.

PD Dr. U. Binswanger
Medizinische Klinik
Nephrologische Station
Universitätsspital
Rämistrasse 100
CH-8091 Zürich