

The Inhibitory Effect of Pyrophosphate on Calcium Oxalate Precipitation and its Relation to Urolithiasis

That urine should hold such large quantities of calcium, phosphate and oxalate in solution without precipitation has been a puzzle for a long time. Such supersaturation is best explained by the presence of some sort of crystallization inhibitors. Recently, urine was shown to contain indeed such inhibitory compounds of unknown nature^{1,2}. We have been able to isolate one of them and identify it as inorganic pyrophosphate³. Pyrophosphate has the property to raise several fold the minimal concentration of calcium and phosphate necessary to form *in vitro* calcium phosphate crystals³, and is therefore able to stabilize solutions with high concentrations of this salt. This is true even at pyrophosphate concentrations much lower than the 10^{-5} – $10^{-4}M$ normally present in urine⁴. It was therefore tempting to assume that pyrophosphate had a similar effect on calcium oxalate precipitation, in order to explain the urinary supersaturation with respect to this salt.

Methods. To test this hypothesis a model system was developed. Three stock solutions of the following compositions were prepared: (a) KCl 0.27M, barbituric acid 0.005M, acetic acid 0.005M, potassium oxalate 0.01M; (b) KCl 0.26M, barbituric acid 0.005M, acetic acid 0.005M, CaCl₂ 0.01M; (c) KCl 0.29M, barbituric acid 0.005M, acetic acid 0.005M. All solutions were brought to a pH of 6.10 by means of the dropwise addition of KOH. They were then mixed in such proportions that the calcium concentration remained constant at 1.7mM and the oxalate concentration varied progressively between 0.1 and 0.6mM. The mixtures, added with different amounts of sodium pyrophosphate, were incubated on a shaker for 20 h at 37°C. In these conditions the various factors – pH, temperature, ionic strength, calcium and oxalate concentrations – showed values similar to those in urine. After incubation the solutions were filtered through a millipore filter retaining any likely crystals. Calcium and oxalate were determined in the filtrate: calcium by titrating with EDTA in the presence of calcein, oxalate by titrating with KMnO₄. By plotting the arithmetical product of the calcium multiplied by the oxalate

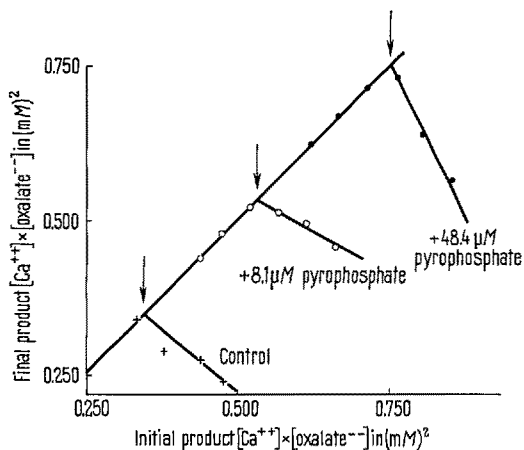


Fig. 1. Typical experiment showing the influence of pyrophosphate on the minimum ion concentration calcium⁺⁺ × oxalate⁻⁻ in (mM)² (represented by the inflection point) required for crystal formation. Ionic strength = 0.3, pH = 6.1, temp. = 37°C.

concentrations before the experiment against the product after incubation and filtration, it was each time possible to determine the minimum product necessary for crystal formation (Figure 1).

Results. The results are summarized in Figure 2. Without pyrophosphate, crystals start forming already from an ion concentration Ca⁺⁺ × oxalate⁻⁻ of about 0.35 (mM)², hence at values significantly lower than normal in urine. Pyrophosphate raises this minimum ion product necessary for crystal formation, at a concentration as low as 15 μM. The range of its maximum activity corresponds actually just to its concentration in normal urines. Figure 3 shows that the inhibitory effect is proportional to the logarithm of the amount of pyrophosphate present in the solution.

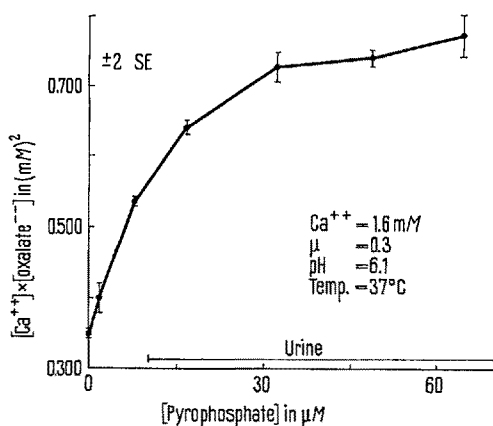


Fig. 2. Influence of pyrophosphate on the minimum ion concentration calcium⁺⁺ × oxalate⁻⁻ in (mM)² required for crystal formation.

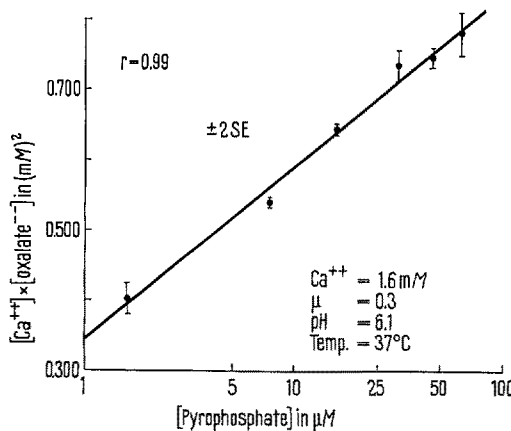


Fig. 3. Influence of pyrophosphate on the minimum ion concentration calcium⁺⁺ × oxalate⁻⁻ in (mM)² required for crystal formation.

1 J. E. HOWARD and W. C. THOMAS, *Trans. Amer. clin. climat. Ass.* 70, 94 (1958).
 2 C. W. VERMEULEN, E. S. LYON, and G. H. MILLER, *J. Urol. (Baltimore)* 79, 596 (1958).
 3 H. FLEISCH and S. BISAZ, *Amer. J. Physiol.* 203, 671 (1962).
 4 H. FLEISCH and S. BISAZ, *Helv. physiol. Acta* 21, 88 (1963).

Discussion. The mode of action of pyrophosphate is not yet clear. At such low concentrations, the inhibition cannot be explained by a lowering of ionized calcium due to a complex; it is more likely to block crystal growth by adsorbing on to the crystallization nuclei and the growing surface. A similar action of condensed phosphates has been known for a long time for calcium carbonate^{5,6}, and is used currently in industry to prevent scaling of water containers. It has also been described recently for strontium sulphate^{7,8} and for calcium phosphate⁹, so that the action is not specific for one type of crystal.

We think that urinary pyrophosphate is one of the factors responsible in this fluid for the maintenance of the supersaturation with respect to calcium phosphate and calcium oxalate. It is likely to play a role in the mechanism of urolithiasis¹⁰, which is supported by the fact that the oral administration of orthophosphate, a therapy shown drastically to prevent stone formation in animals¹¹ and in humans^{12,13}, actually induces a significant rise in urinary pyrophosphate^{14,15}.

Zusammenfassung. Pyrophosphat in so kleinen Mengen wie $10^{-6} M$ erhöht wesentlich die minimale Konzentration von Calcium und Oxalat, welche zur Kristallbildung von Calciumoxalat nötig ist. Man kann daraus schliessen, dass das im Harn vorhandene Pyrophosphat durch seine kristallisationshemmende Eigenschaft zur Erklärung der urinären Übersättigung an Calcium und Oxalat beiträgt. Da es auch die Bildung von Calciumphosphat hemmt,

vermuten wir, dass ihm eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie der Urolithiasis zukommt.

H. FLEISCH und S. BISAZ

Laboratorium für experimentelle Chirurgie, Schweizerisches Forschungsinstitut, Davos (Switzerland), January 28, 1964.

- ⁵ R. REITEMEYER and T. BÜHRER, *J. physiol. Chem.* **44**, 535 (1940).
- ⁶ T. BÜHRER and R. REITEMEYER, *J. physiol. Chem.* **44**, 552 (1940).
- ⁷ S. OTANI, *Bull. chem. Soc. Japan* **33**, 1543 and 1549 (1960).
- ⁸ M. MIURA, S. OTANI, M. KODAMA, and K. SHINAGAWA, *J. physiol. Chem.* **66**, 252 (1962).
- ⁹ H. FLEISCH and W. F. NEUMAN, *Amer. J. Physiol.* **200**, 1296 (1961).
- ¹⁰ H. FLEISCH, *Schweiz. med. Wschr.* **92**, 1197 (1962).
- ¹¹ C. W. VERMEULEN, E. S. LYON, W. B. GILL, and W. H. CHAPMAN, *J. Urol.* (Baltimore) **82**, 249 (1959).
- ¹² J. E. HOWARD, *Canad. med. Ass. J.* **86**, 1001 (1962).
- ¹³ J. E. HOWARD, W. C. THOMAS, T. MUKAI, R. A. JOHNSTON, and B. J. PASCOE, *Trans. Ass. Amer. Physns.* **75**, 301 (1962).
- ¹⁴ H. FLEISCH, S. BISAZ, and A. D. CARE, *Lancet*, submitted.
- ¹⁵ This work was supported by the Schweizerischer Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung, by the U.S. Public Health Service Grant AM 07266-01 of the National Institute of Arthritis and Metabolic Diseases, and by the Sandoz-Stiftung zur Förderung der medizinisch-biologischen Wissenschaften. We should like to thank Professor H. PFAENDLER, interpreter W.H.O., for correcting the manuscript.

Über den Einfluss von Alkylbenzolsulfonaten auf Froschlarven

Die aus der Beständigkeit von Tetrapropylbenzolsulfonat in Abwässern herrührenden gesundheitlichen und wirtschaftlichen Gefahren haben bekanntlich dazu geführt, dass dieser bisher meistgebrauchte Waschröhstoff trotz seiner hervorragenden anwendungstechnischen Eigenschaften durch biologisch besser abbaubare geradkettige Alkylbenzolsulfonate ersetzt werden soll. Als typischer Vertreter dieser neuen Klasse von Detergentien kann Dodecylbenzolsulfonat gelten, das von Säugetieren bei oraler Verabreichung ebenso gut vertragen wird wie Tetrapropylbenzolsulfonat - die mittleren akut tödlichen Dosen betragen 1260 bzw. 1220 mg/kg¹⁻³. Anders verhält es sich mit Fischen, deren zartes Kiemenepithel von den Alkylbenzolsulfonaten - insbesondere von denjenigen mit langer unverzweigter Alkylkette - schon in verhältnismässig niedrigen Konzentrationen zerstört wird^{4,5}. Dass die neuen Waschröhstoffe von Fischen noch schlechter vertragen werden als Tetrapropylbenzolsulfonat ist eine Tatsache⁶. Ob sie unter Hinweis auf die bessere Abbaubarkeit als praktisch bedeutungslos abgetan werden darf, wird die Zukunft zeigen.

Den verschiedenen Berichten über die Wirkung von Detergentien auf Fische und wirbellose Wassertiere soll im folgenden ein solcher über den Einfluss der beiden genannten Alkylbenzolsulfonate auf Froschlarven zur Seite gestellt werden. Tetrapropylbenzolsulfonat (TBS) und Dodecylbenzolsulfonat (DBS) wurden in Form der Produkte Marlon TP 42 und Marlon BW 2043 der Chemischen

Werke Hüls verwendet. Die nachstehenden Konzentrationsangaben beziehen sich stets auf den Gehalt an waschaktiver Substanz (WAS).

Als Versuchstiere dienten mehr als 1500 Kaulquappen (Larven von *Rana temporaria*) aus einem Laichballen, die zu je 50 in zylindrischen Glasgefässen in 1 l Wasser mit 130 bis 140 cm² Oberfläche gehalten und mit dem handelsüblichen Trockenfutter «TetraMin» ernährt wurden. Das Wasser stammte aus einem kleinen, aus der Trinkwasserleitung gespeisten Fischteich; die Wassertemperatur betrug 22 bis 23°C. Zu Beginn des eigentlichen, 24 h dauernden Versuchs wurden die Tiere in andere gleichartige Gefässe eingebracht, die jeweils 1 l einer Lösung von TBS bzw. DBS in Teichwasser enthielten. Je 100 Larven wurden ein und derselben Konzentration ausgesetzt. Die elektrische Messung der Wasserstoffionenkonzentrationen ergab pH-Werte von 7,24 bis 7,81 in den Detergenzlösungen und ein pH von 7,93 im Teichwasser.

- ¹ G. BORNMANN und A. LOESER, *Fette, Seifen, Anstrichmittel* **63**, 938 (1961).
- ² G. BORNMANN und A. LOESER, *Z. Lebensmittel-Untersuch.* **118**, 51 (1962).
- ³ G. BORNMANN, A. LOESER und M. STANIŠIĆ, *Fette, Seifen, Anstrichmittel* **65**, 818 (1963).
- ⁴ E. HIRSCH, *Fette, Seifen, Anstrichmittel* **65**, 814 (1963).
- ⁵ O. J. SCHMID und H. MANN, *Arch. Fischereiwiss.* **13**, 41 (1962).
- ⁶ R. KRÜGER, Vortrag, gehalten anlässlich der Tagung der Deutschen Gesellschaft für Fettwissenschaft. Karlsruhe (22. Oktober 1963).