

D(-)Milchsäure – ein Stoffwechselproblem

D. Giesecke, M. Stangassinger und K. Henle

Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und
Ernährungsphysiologie der Universität München

Zusammenfassung

Die Metabolisierung von D(-)Milchsäure wurde an freiwilligen Versuchspersonen nach Aufnahme von DL-Lactat anhand der renalen Ausscheidung sowie an Ratten und an Rattenleber in vitro mittels der Oxydationsrate von ^{14}C -D-Lactat zu $^{14}\text{CO}_2$ untersucht.

Bei 5 Probanden wurden nach Aufnahme von 1,6–6,5 mmol D-Lactat pro $\text{kg}^{0,75}$ (entspr. 50–200 mg/kg) im Mittel 1,2–2,2 % der Dosis mit dem Harn ausgeschieden. Die exponentielle Abnahme der renalen Elimination in den ersten 15 h nach Aufnahme und die Ausscheidungsdauer bis zu 24 h (und ggf. darüber) ließen auf eine recht langsame Metabolisierung schließen.

Bei Ratten war die Oxydationsrate von D-Lactat gegenüber L-Lactat nach intraperitonealer Dosis von 2,0 und 4,2 mmol pro $\text{kg}^{0,75}$ (entspr. ca. 62 bzw. 131 mg/kg Mensch) deutlich bzw. stark herabgesetzt. Nach intragastraler Gabe von 4,2–12,8 mmol D-Lactat pro $\text{kg}^{0,75}$ (als DL) wurden im Mittel 0,9 % als D-Lactat und 2,4 % als Metaboliten im Harn ausgeschieden. Die Oxydation von D-Lactat zu CO_2 erstreckte sich schon nach der niedrigsten Dosis weit über 8 h und wurde bei höheren Gaben unterdrückt.

In Gewebeschritten von Rattenleber in vitro hemmten Oxalat, L-Lactat und Pyruvat die Oxydation von D-Lactat. Der Hemmeffekt von L-Lactat betrug schon bei physiologischer Konzentration 20 %. Eine signifikante Zunahme der D-Lactat-Oxydation mit dem Körpergewicht und eine signifikant höhere D-Lactat-Oxydation in der Leber von konventionellen gegenüber keimfreien Tieren machten Einflüsse der Alters und der Darmflora auf den D-Milchsäure-Stoffwechsel deutlich.

Aus den Ergebnissen wird gefolgt, daß D-Milchsäure nur langsam metabolisiert werden kann, wenn erhöhte Konzentrationen des einen oder anderen Lactatisomers vorliegen.

Summary

The metabolism of D-lactate was examined in volunteers by means of renal excretion after intake of DL-lactate, and in rats as well as in rat liver in vitro by the oxidation rate of ^{14}C -D-lactate to $^{14}\text{CO}_2$.

In five volunteers after intake of DL-lactate containing 1.60 to 6.5 mmol D-lactate per $\text{kg}^{0,75}$ (equiv. to 50–200 mg/kg) an average of 1.2–2.2 percent of the dose was eliminated in urine. The exponential decline of renal elimination during the first 15 hours after intake and the total excretion time up to 24 hours (and possibly more) suggested a quite slow rate of metabolism.

Following intraperitoneal injection of 2.0 and 4.2 mmol per $\text{kg}^{0,75}$ in rats (equiv. to 62 and 131 mg per kg in man) the oxidation rate of D-lactate vs. L-lactate was significantly and strongly reduced. After intragastral dosage of DL-lactate containing 4.2 to 12.8 mmol D-lactate per $\text{kg}^{0,75}$ an average of 0.9 and 2.4 percent were excreted in urine as D-lactate and as metabolites. Even after the lowest dose D-

lactate oxidation to CO_2 extended far beyond 8 hours. Higher doses decreased the rate of D-lactate oxidation.

In tissue samples of rat liver in vitro oxalate, L-lactate and pyruvate inhibited the oxidation of D-lactate. L-lactate in a physiological concentration was sufficient to effect an inhibition of 20 percent. A significant increase of D-lactate oxidation with increasing body weight and a significantly higher oxidation of D-lactate in conventional vs. germ-free rats indicated the influences of age and gastro-intestinal flora on D-lactate metabolism.

From these results it is concluded that D-lactic acid is only slowly metabolized if the concentration of one or other of the lactate isomers is elevated.

Schlüsselwörter: D-Lactat, Exkretion Mensch, ^{14}C -Oxydation Ratte, Inhibitoren, Darmflora

Einleitung

Die beiden Isomeren D(-)- und L(+)-Milchsäure sind ihrer Entstehung nach als „biologisch“ zu bezeichnen. Dieser weitgehende Begriff sagt grundsätzlich nichts über ihre Verträglichkeit und Wirkung im Organismus aus. Darum muß man weiter differenzieren und untersuchen, ob beide Formen auch „physiologisch“ sind. Für L-Milchsäure fällt das Resultat eindeutig aus: Seit Cori & Cori (1929) an der Ratte bewiesen haben, daß nur dieses Isomer in der Glykolyse entsteht und für die Resynthese von Glukose und Glykogen verwertet wird, gilt L-Lactat als „das physiologische Isomer“.

D-Milchsäure ist schwieriger zu beurteilen. Wegen ihrer erheblichen Ausscheidung im Harn von Ratten nach peroraler Gabe (Cori & Cori, 1929; Medzihradsky & Lamprecht, 1966) wird sie als „unphysiologisch“ angesehen. Die bei Wiederkäuern beschriebene D-Milchsäure-Azidose (Dunlop & Hammond, 1965) vervollständigte das Bild einer allgemeinen Unverträglichkeit. Diese und weitere Befunde haben auch gezeigt, daß D-Milchsäure für bestimmte Bakterienarten der Gastrointestinalflora ein „biologisches“ Produkt, aber für den Wirtsorganismus eine „pathologisch“ wirkende Verbindung sein kann.

Zwar wurde aus Leber, Niere und anderen Organen verschiedener Spezies ein unspezifisches, mitochondriales Flavinenzym isoliert (Tubbs & Greville, 1961) und als D-2-Hydroxy-Säuren-Dehydrogenase (EC 1.1.99.6) charakterisiert (Cammack, 1969), das u. a. D-Lactat zu Pyruvat umsetzt. Doch scheint seine Kapazität sehr begrenzt zu sein und die Metabolisierung der D-Milchsäure von weiteren Faktoren abzuhängen. So setzen Ratte und Kaninchen, die das Enzym beide in hoher Aktivität aufweisen, D-Lactat in sehr unterschiedlichem Maße um (Giesecke et al., 1981). Große Bedeutung kommt dabei sicherlich dem Transport von D-Lactat durch Membranen (Dünndarm, Leber, Niere u. a.) zu, der zwischen Tierarten und Organen auffällig differiert (Hildmann et al. 1980; Storelli et al. 1980; Deuticke et al. 1982; Schwab et al. 1982; Ulrich et al. 1982). Die relativ hohe Stoffwechselkapazität für D-Milchsäure bei der Ratte, die physiologischerweise eine mikrobielle Produktion von D- und L-Lactat im Proventriculus aufweist (Giesecke & Fabritius, 1974; Giesecke et al. 1980), kann grundsätzlich nicht auf andere Spezies übertragen werden.

Der Stoffwechsel von D-Milchsäure beim Menschen ist weitgehend unbekannt. Erste Beobachtungen über die renale Ausscheidung nach peroraler Aufnahme ließen auf eine sehr langsame Metabolisierung schließen (Giesecke & Stangassinger, 1977). Nach intravenöser Infusion von DL-Na-Lactat verlief die Elimination zwar rascher, aber bei D-Lactat signifikant langsamer als beim L-Isomer (Connor et al., 1983). Diese Resultate mögen allerdings grundsätzlich in Zweifel zu ziehen sein, weil in 20 min eine Natriumdosierung i.v. verabreicht wurde, die dem Doppelten der mit der Nahrung in 24 Stunden aufzunehmenden Menge entsprach und demzufolge eine starke Natriurese ausgelöst haben muß. Auf sonstige Stellungnahmen, die keine neuen Kenntnisse beizutragen haben, kann hier nicht eingegangen werden.

Inzwischen sind Fälle von D-Milchsäure-Azidose beim Menschen bekanntgeworden (Duran et al. 1977; Oh et al. 1979; Schoorel et al. 1980; Carr et al. 1984; Satoh et al. 1982; Stolberg et al. 1982; Perlmutter et al. 1983; Traube et al. 1983), die größtenteils – aber nicht ausschließlich – nach Dünndarmoperationen auftraten und auf Störungen der Darmflora zurückgeführt werden konnten.

Diese Erkenntnis, daß Störungen der Darmflora beim Menschen unter Umständen zur D-Milchsäure-Azidose führen, ist ernährungsphysiologisch von großer Bedeutung, denn schon die oft beträchtlichen Gehalte von D-Milchsäure in verschiedenen Lebensmitteln können eine kumulative Aufnahme verursachen (Giesecke, 1978). Darüber hinaus muß davon ausgegangen werden, daß Monosaccharid-Malabsorption, die Verwendung von nicht (oder schwer) absorbierbaren zuckerartigen Stoffen in Lebensmitteln oder der Einsatz von α -Glucosidase-Inhibitoren, eine potentielle Steigerung der mikrobiellen Lactatproduktion im Darm bewirken. Ein gründliches Studium des D-Milchsäure-Stoffwechsels ist darum dringend geboten. Die vorliegende Arbeit soll anhand von Ausscheidungsversuchen mit freiwilligen Versuchspersonen, von ^{14}C -Experimenten an Ratten und von Messungen in vitro an Gewebsproben von Ratten die Problematik verdeutlichen.

Material und Methoden

Enzyme, Chemikalien, Radiochemikalien

D(-)-Lactat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.28), L(+)-Lactat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.27) und β -NAD stammten von Boehringer (Mannheim), D(-) und L(+)-Milchsäure von Serva (Heidelberg) und DL-Milchsäure zur peroralen Verabreichung – eine Sonderanfertigung mit 45 % D(-) und 55 % L(+) in 2,38molarer Lösung – von Boehringer (Ingelheim). Zur Radionuklid-Markierung dienten (U14-C)-D(-)- bzw. (U ^{14}C)-L(+)-Lactat (Amersham-Buchler, Braunschweig). Für die Inkubation von Gewebsproben in vitro kamen Li-D(-)-Lactat (Boehringer Mannheim), Li-L(+)-Lactat und Na-Oxalat (Sigma, München) sowie Na-Pyruvat (Merck, Darmstadt) zur Anwendung. Chemikalien für Pufferlösungen u. a. Zwecke stammten von Merck (Darmstadt).

Versuche an Probanden

Für die Ausscheidungsversuche stellten sich 5 stoffwechselgesunde Erwachsene (2 ♂, 3 ♀, 29–44 J.) mit 61–74 kg Körpergewicht zur Verfügung. Die Versuche mit peroraler Aufnahme von verschiedenen Dosierungen von DL-Milchsäure entsprechend 50, 100, 150 (200) mg D-Isomer/kg Körpergewicht erfolgten in ca. 1wöchigen

Abständen. Das verdünnte, auf pH 4,5 teilneutralisierte, etwas gesüßte, mit Fruchtaroma geschmacklich verbesserte Präparat wurde in einem Volumen von 500 ml um 8 Uhr (nach einem leichten Frühstück) innerhalb von 30 min getrunken. Von den über 24 h gesammelten Harnproben wurde nach der Volumenbestimmung ein Aliquot mit Perchlorsäure fixiert und bis zur Analyse bei 4–5 °C aufbewahrt.

Versuche an Ratten

Die verwendeten Ratten (Sprague-Dawley) beiderlei Geschlechts wogen, wenn nicht anders vermerkt, 170–230 g. Sie erhielten eine pelletierte Diät (1324 Altromin-Spezialfutterwerk, Lage) und Wasser zur freien Aufnahme. ^{14}C -markierte reine Isomere wurden neutralisiert, sterilisiert und intraperitoneal injiziert. DL-Milchsäure zur Eingabe mit der Magensonde wurde mit ^{14}C -D-Lactat markiert, teilneutralisiert und in Dosierungen von 4,06–13,47 mmol pro kg^{0,75} verabreicht.

Die keimfreien Ratten (Stamm BD-9) wurden von der zentralen Versuchstieranlage der Universität Ulm bezogen und bis zur Tötung und Gewinnung von Organproben unter keimfreien Bedingungen in Stahlisolatoren bei Fütterung mit steriles Altromin Fortified-Futter und sterilem Wasser ad libitum gehalten.

Exhalationsradiometrie

Jeweils 3 Ratten wurden binnen 0,5 min nach der Dosierung von ^{14}C -Lactat in eine Ganzglaskammer mit geringem Totraum verbracht, welche die getrennte Sammlung von Harn und Kot erlaubte. Die durch die Kammer gesaugte Luft (0,2 m³/h) gelangte in einem Exhalationsmeßgerät (FHT 50B, Friesecke & Hoepfner, Erlangen) zur kontinuierlichen Messung des CO₂-Gehalts und der ^{14}C -Radioaktivität, die fortlaufend integriert wurden. Eine Beurteilung der intermediären Oxydation des jeweils verabreichten Isomers erfolgte anhand des zeitlichen Verlaufs der standardisierten spezifischen Radioaktivität (SSA = auf die ^{14}C -Dosis pro kg Lebendmasse bezogene spezifische Radioaktivität) des exhalierten CO₂.

Harnsammlung

Die Sammelperioden erstreckten sich bis zu 24 h. Die in 0,6molarer Perchlorsäure fixierten bzw. aufgefangenen (Rattenversuche) Harnproben wurden 30 min bei 15 000 G zentrifugiert, mit KOH neutralisiert und nach Ausfällung von KClO₄ zur Bestimmung des D-Lactat-Gehalts und ggf. zur Messung der ^{14}C -Radioaktivität verwendet.

Gewebsproben in vitro

Zur Inkubation von Leber-, Herz- und Nierenschnitten in vitro wurden 50-ml-Erlenmeyerkolben mit innerem CO₂-Absorptionsgefäß und Gummistopfen (Rubber Septum, Janssen, Düsseldorf) verwendet. Schnitte von $345 \pm 84 \mu\text{m}$ Dicke wurden in Krebs-Ringer-Bicarbonatpuffer pH 7,4 mit (U ^{14}C)D-Lactat unter Carbo-Gen (Linde, München) 90 min im Schüttelwasserbad inkubiert, mit Perchlorsäure sistiert und das in gesättigter KOH-Lösung über 60 min absorbierte $^{14}\text{CO}_2$ gemessen (genauere Angaben bei Henle, 1985). Die Substratkonzentration betrug (falls nicht anders vermerkt) 10 mmol D-Lactat pro l.

Bestimmung von Milchsäure-Isomeren

Die Bestimmung der in Perchlorsäure fixierten Proben erfolgte nach den von Gawehn & Bergmeyer (1976) angegebenen enzymatischen Methoden.

^{14}C -Messung in flüssigen Proben

Die ^{14}C -Aktivität in Lösungen wurde in einem Flüssigkeitsszintillations-Spektrometer (Modelle 3557-3385, Packard, Frankfurt) unter Verwendung von Bray-Scintil-

lator (Bray, 1960) und eines ^{14}C -Toluol-Standards gemessen. Zur Messung von in KOH absorbiertem $^{14}\text{CO}_2$ diente Insta-Scint-Gel (Packard).

Statistische Methoden

Streuungen sind als Standardabweichungen (SD) angegeben. Für den Vergleich von Gruppen diente der U-Test (Sachs, 1972).

Ergebnisse

Renale Exkretion von D-Milchsäure bei Probanden

Bei fünf Probanden wurde die D-Lactat-Ausscheidung im Harn nach 3 (in einem Fall 4) Dosierungen gemessen, die 50, 100 und 150 (200) mg/kg Körpergewicht entsprachen. Nach der mittleren und hohen Dosierung machte sich bei den Probanden eine gewisse Benommenheit von ca. 30–60 min Dauer aber sonst keine Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens bemerkbar. Um eine möglichst weitgehende Vergleichbarkeit mit Stoffwechseldaten zu gewährleisten, wurden Dosierungen und Ausscheidungswerte auf die Stoffwechselgröße ($\text{kg}^{0,75}$) bezogen.

Die Ausscheidung von D-Lactat im 24-Stunden-Harn der einzelnen Probanden ist in Tabelle 1 verzeichnet, wegen der annähernd doppelt so hohen Werte bei den weiblichen Probanden in getrennter Darstellung. Im Mittel aller Versuche wurden nur 1,2 bzw. 2,2 % der verabreichten D-Lactat-Dosis über die Nieren eliminiert. Zwischen Dosis und Ausscheidung bestand dabei keine gesicherte Beziehung, eher wird eine Tendenz zu geringerer prozentualer Ausscheidung nach höherer Aufnahme erkennbar. Das mittlere Harnvolumen lag bei 1414–1741 ml/d mit etwas höheren Werten nach Verabreichung der Maximaldosis.

Der mittlere Ausscheidungsverlauf ist in Abbildung 1 für alle Probanden nach einer Dosis von $1,60 \text{ mmol kg}^{-0,75}$ (entspr. 50 mg/kg) wiedergegeben. Das Maximum war etwa 3 h nach der Aufnahme erreicht mit deutli-

Tab. 1. D(-)Lactat im 24-Stunden-Harn von Probanden nach Aufnahme von DL-Lactat.

Männ- liche Pro- banden	Dosis D-Lactat $\text{mmol} \cdot \text{kg}^{-0,75}$	Ausscheidung von D-Lactat $\mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-0,75}$	Weib- liche Pro- banden	Dosis D-Lactat $\text{mmol} \cdot \text{kg}^{-0,75}$	Ausscheidung von D-Lactat $\mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-0,75}$	% der Dosis
A	1,63	34	2,08	D	1,56	48
C	1,63	14	0,86	B	1,56	36
A	3,26	41	1,25	E	1,59	34
C	3,26	25	0,76	D	3,11	67
A	4,89	72	1,47	B	3,12	74
C	4,89	60	1,23	E	3,18	91
A	6,52	43	0,66	D	4,66	90
				E	4,77	53
<hr/>				<hr/>		
\bar{x}		1,19	\bar{x}			2,23
$\pm \text{SD}$		0,46	$\pm \text{SD}$			0,59

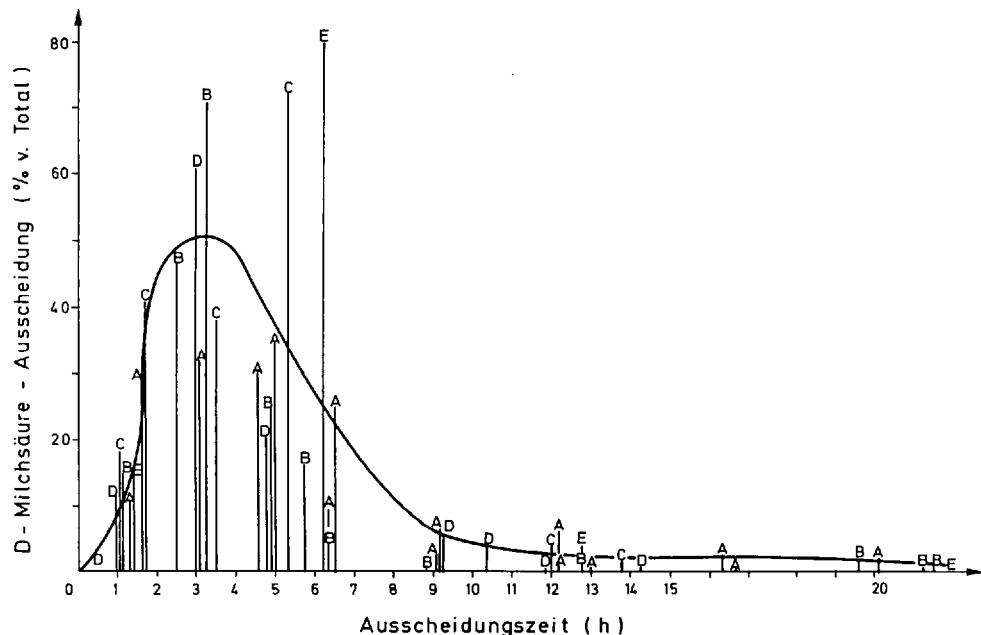


Abb. 1. Ausscheidungsverlauf von D-Milchsäure im Harn von fünf Probanden nach Aufnahme von DL-Lactat mit 1,60 mmol D-Isomer pro $\text{kg}^{0,75}$.

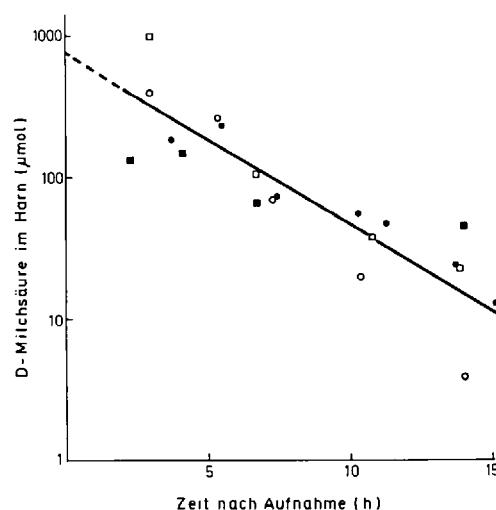


Abb. 2. Exponentieller Verlauf der renalen Ausscheidung von D-Milchsäure bei vier Probanden nach Aufnahme von DL-Lactat mit 3,20 mmol D-Isomer pro $\text{kg}^{0,75}$.
 $y = 753 e^{-0,27t}$; $r = -0,898$; $n = 20$; $p < 0,001$.

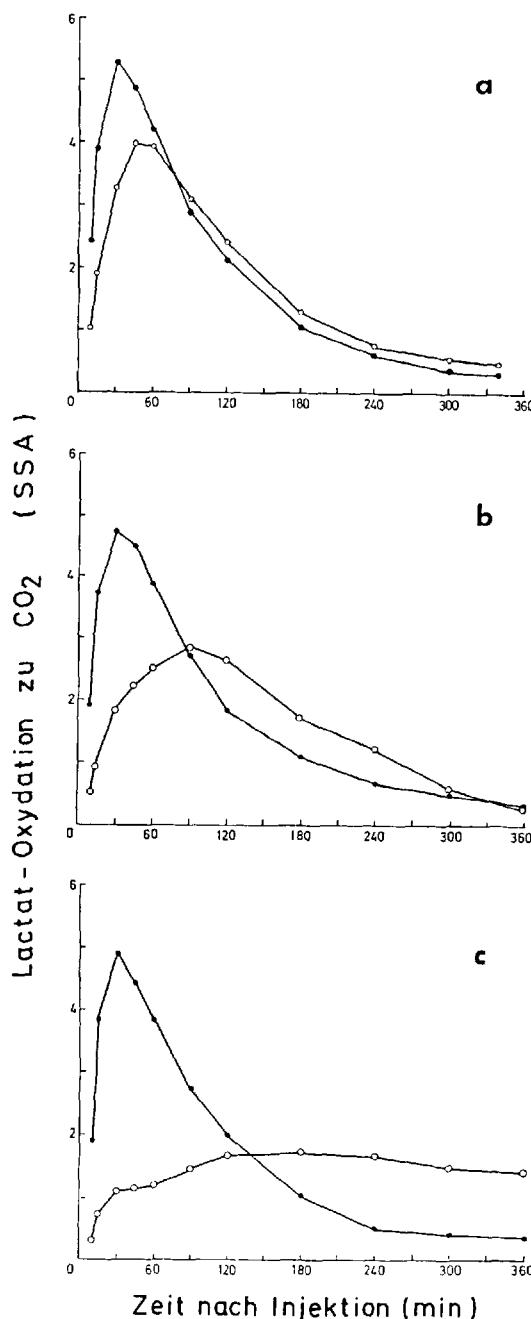


Abb. 3. Oxydation von ^{14}C -Lactat zu $^{14}\text{CO}_2$ (standardisierte spezifische Aktivität) bei Ratten nach intraperitonealer Injektion von U- ^{14}C -L-Lactat (●) bzw. U- ^{14}C -D-Lactat (○); Dosis a) 0,40, b) 2,00, c) 4,22 mmol pro $\text{kg}^{0,76}$.

chen individuellen Abweichungen. Erst nach 8 h sank die Ausscheidung auf rund 10 % der 24-h-Menge, während sich die Restelimination noch bis zu 24 h hinzog.

Nach höheren Gaben erstreckte sich die D-Lactat-Ausscheidung möglicherweise über diesen durch die Probenammlung erfaßten 24-h-Zeitraum hinaus. Der exponentielle Teil der D-Lactate-Elimination lag nach einer Dosis von $3,20 \text{ mmol kg}^{-0,75}$ (entspr. 100 mg/kg) in den ersten 15 h nach Aufnahme, wie Abbildung 2 zeigt. Bei einer Versuchsperson wurde keine signifikante Teilkorrelation erreicht, deshalb blieben die Werte unberücksichtigt. Die D-Lactat-Ausscheidung erniedrigte sich im Durchschnitt um 27 % pro h, im langsamsten Fall um 13 % pro h. Die Halbwertszeit betrug 2,56 h bzw. 5,3 h, d. h., die 2 h nach der Aufnahme ermittelte Anfangsrate war erst 7,12 h bzw. 12,6 h nach der Lactataufnahme um 75 % abgefallen. Demnach mußte sich auch die Abnahme des D-Milchsäure-Spiegels im Blut über viele Stunden hinziehen.

Oxydationsrate von D-Lactat bei Ratten

Die zuvor mitgeteilten Beobachtungen ließen keine direkten Rückschlüsse auf den quantitativen Verlauf der Metabolisierung von D-Milchsäure zu. Insbesondere war zu klären, ob Oxydationsrate und renale Exkretionsrate in einer definierbaren Beziehung zueinander stehen. Um zunächst die Oxydationsraten der beiden Isomere zu vergleichen, erhielten Ratten ^{14}C -markiertes D- oder L-Lactat intraperitoneal verabreicht. Die $^{14}\text{CO}_2$ -Exhalation wurde über 6 h gemessen und mittels der spezifischen Radioaktivität auf das gesamte aus D-Lactat gebildete CO_2 umgerechnet (Abb.).

Stoffwechselunterschiede zwischen den beiden Isomeren traten dabei deutlich zutage: Wie am zeitlichen Verlauf und der Höhe des erreichten Maximums nach den jeweiligen Dosierungen zu erkennen ist. Wie die

Tab. 2. Renale Ausscheidung von D-Lactat und ^{14}C -Metaboliten bei Ratten nach intragastraler Verabreichung von D(U ^{14}C)-markiertem DL-Lactat.

Versuch Nr.*	Dosis D-Lactat $\text{mmol} \cdot \text{kg}^{-0,75}$	D-Lactat-Ausscheidung im 24-h-Harn D-Lactat mmol	$\text{kg}^{-0,75}$	Metaboliten % der Dosis**
2	4,06	0,019	(0,48)	3,72
3	4,62	0,004	(0,09)	1,22
4	8,52	0,019	(0,23)	2,27
5	8,67	0,142	(1,65)	2,04
6	9,30	0,031	(0,33)	2,38
7	9,99	0,047	(0,47)	2,16
8	13,04	0,409	(3,14)	2,35
9	13,47	0,063	(0,47)	3,03
\bar{x}		0,092	(0,86)	2,40
$\pm \text{SD}$		0,135	(1,04)	0,73

* Je Versuch 3 Tiere simultan in der Exhalationskammer; in Versuch Nr. 1 keine Harnausscheidung.

** D-Lactat-freie ^{14}C -Ausscheidung bezogen auf die ^{14}C -Dosis.

Flächenauswertung der Kurven ergibt, erschienen nach Gabe von L-Lactat 54–57 % der SSA in den ersten 90 min, bei D-Lactat sank dieser Anteil von anfangs 46 % (Abb. 3a) bei mittlerer und hoher Dosis auf 31 bzw. 18 %, während die hauptsächliche SSA-Exhalation mit 69 % nach 90–360 min (Abb. 3b) bzw. 54 % nach 180–360 min (Abb. 3c) erfolgte. Diese Ergebnisse ließen auf eine zunehmende Hemmung der D-Milchsäure-Oxydation bei steigender Dosis schließen. Der Effekt machte sich bereits nach einer Gabe von $2,0 \text{ mmol/kg}^{0,75}$ in deutlicher Weise bemerkbar. Im übrigen trat bei den Tieren, welche die maximale Dosis D-Lactat erhalten hatten, eine auffällige Inkoordination mit Nachschleppen der hinteren Extremitäten auf, die über 60–90 min andauerte und nach der Gabe von L-Lactat nicht zu beobachten war.

Da die mit der Nahrung aufgenommene Form der D-Milchsäure in aller Regel als Razemat (DL) vorliegt, wurde in weiteren Experimenten D(U¹⁴C)-markiertes DL-Lactat mit der Magensonde verabreicht. Dosierung und renale Exkretion sind in Tabelle 2 zusammengefaßt, den Exhalationsverlauf gibt Abbildung 4 wieder. Wie aus Tabelle 2 hervorgeht, blieb die über den Harn eliminierte Menge D-Lactat weitgehend konstant, auch wenn die Dosis verdreifacht wurde, wobei sich Differenzen zwischen den jeweils verwendeten Dreiergruppen der Tiere abzeichneten. Im Mittel aller Versuche erschienen 0,9 % der D-Lactat-Dosis im Harn, ein ähnlicher Anteil wie in den Humanversuchen. Zusätzlich wurden im Mittel 2,4 % der Dosis in Form von Metaboliten der D-Milchsäure im Harn eliminiert, die nur über die ¹⁴C-Markierung erfaßt und nicht einzeln bestimmt wurden.

Die zugeordnete Exhalation von CO₂ aus D-Lactat (Abb. 4) ergab nach der niedrigsten Dosierung ein Maximum bei 240 min mit einem Abfall, der nach 8 h noch nicht beendet war. Bei höheren Gaben zeichnete sich eine verstärkte Depression der Oxydationsrate ab (reduzierter Maximalwert,

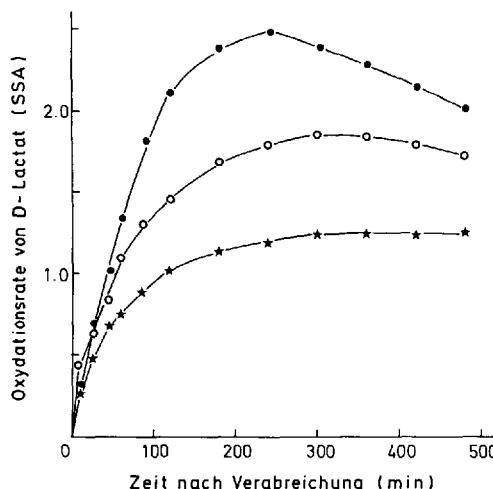


Abb. 4. Oxydation von U-¹⁴C-D-Lactat zu ¹⁴CO₂ (standardisierte spezifische Aktivität) bei Ratten nach intragastraler Injektion von D-markiertem DL-Lactat. Dosis D-Lactat (●) 4,17 (○) 8,81, (★) 12,78 mMol pro kg^{0,75} (n = 9 pro Versuch).

Tab. 3. Oxydationsrate von D(-)Lactat in Organen der Ratte*.

Organ	Gewicht (g)	Oxydationsrate D-Lactat-C ($\mu\text{mol h}^{-1}$)
Herz	$0,74 \pm 0,16$	$4,5 \pm 1,9$
Leber	$7,40 \pm 1,10$	$114,3 \pm 18,0$
Nieren	$1,80 \pm 0,22$	$114,5 \pm 22,0$

*n = 6 (166–284 g Lebendmasse).

plateau-ähnlicher Verlauf). Aus dem Verlauf der Kurven ist ersichtlich, daß die Oxydation von D-Milchsäure bei Beendung der Exhalationsmessung nach 8 h noch nicht abgeschlossen war. Nach diesen Befunden hemmen höhere perorale DL-Milchsäure-Gaben die Oxydation von D-Lactat, ohne die Ausscheidung im Harn signifikant zu steigern.

Einflüsse auf die Oxydation von D-Lactat in der Rattenleber

Die Frage nach dem für die Oxydation von D-Milchsäure maßgeblichen Organ kann nur nach Spezies differenziert beantwortet werden. Bei der Ratte besteht zwar eine besonders hohe Oxydationsrate im Nierengewebe, wenn auf die Gewichtseinheit Gewebetrockenmasse bezogen wird. Bei Bezug auf die Organgewichte (Tab. 3) tragen allerdings Leber und Nieren in gleichem Maße zum D-Lactat-Umsatz bei. Die Kenntnis dieser Lokalisation ist wichtig, weil Organerkrankungen die D-Lactat-Oxydation beeinträchtigen können.

Die D-Milchsäure-Oxydation in der Leber ($y, \mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1}$) stieg mit dem Körpergewicht der Tiere (x, g) im Gewichtsabschnitt von 150–250 g signifikant (1,94fach) an:

$$Y = 0,8014x - 35,13; r = 0,551; p < 0,0001; n = 39.$$

Diese Zunahme war deutlich höher als der Zuwachs des Lebergewichts (y, g) mit dem Körpergewicht (x, g) in demselben Gewichtsabschnitt (1,34fach):

$$y = 0,0225x + 2,552; r = 0,522; p < 0,005; n = 39.$$

Daraus ergibt sich eine Zunahme der Oxydationskapazität für D-Milchsäure mit der Körpermasse, die in diesem Gewichtsabschnitt wohl im wesentlichen dem Alter der Tiere zugeordnet werden kann.

Die Oxydation von D-Lactat in der Leber wird durch eine Anzahl verschiedener Substanzen gehemmt, von denen einige stoffwechseltypische

Tab. 4. Einfluß von Metaboliten auf die Oxydation von D-Milchsäure in der Rattenleber.

Zugesetzter Inhibitor	Tierzahl (n)	Hemmschwelle 20 %	50 %	Inhibitor-Konzentration ($\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$)
Oxalat	6	$0,67 \pm 0,16$	$4,19 \pm 1,02$	
L(+)-Lactat	9	$1,15 \pm 0,43$	$7,17 \pm 2,70$	
Pyruvat	8	$2,00 \pm 1,20$	$12,74 \pm 7,60$	

Tab. 5. Einfluß der Gastrointestinalflora auf die Oxydation von D-Milchsäure in der Rattenleber.

Spenderart	Tierzahl (n)	Gewicht (g)	Oxydation von D-Lactat-C ($\mu\text{mol} \cdot \text{g TM}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)*
Konventional	8	256 ± 23	79,9 ± 18,9
Keimfrei	6	258 ± 21	45,5 ± 8,6
Signifikanz:		n. s.	p < 0,001

* $\mu\text{mol D-Lactat-C pro g Lebertrockenmasse pro h}$.

Verbindungen in Tabelle 4 angeführt sind. Oxalat war zwar am wirksamsten, die Hemmkonzentration von L-Lactat dürfte aber im Organismus am häufigsten erreicht werden. So entsprach schon die für eine 20%ige Inhibition erforderliche L-Milchsäure-Konzentration annähernd dem physiologischen Normalwert im Blutplasma. Höhere L-Milchsäure-Spiegel, wie sie nach Aufnahme von DL-Lactat, nach Arbeitsbelastung oder aus anderen Gründen erreicht werden, müssen demnach eine starke Hemmung der D-Lactat-Oxydation bewirken. In ähnlicher Weise können sich lokale (intrazelluläre, intramitochondriale) Konzentrationen von Pyruvat bemerkbar machen, die dort aus L- und D-Lactat entstehen.

Schließlich hat sich gezeigt, daß die Besiedlung des Gastrointestinaltrakts mit Mikroorganismen einen Einfluß auf die Oxydationsrate von D-Lactat ausübt. Nach vergleichenden Messungen an Lebergewebsproben von normalen (konventionalen) und keimfreien Ratten (Tab. 5) ist die Oxydationsrate von D-Milchsäure bei ersteren 75 % höher. Dieser Effekt läßt darauf schließen, daß beteiligte Reaktionen (Transport von D-Lactat, Enzymaktivitäten) der Adaptation an das Substrat unterliegen, das je nach Beschaffenheit der Gastrointestinalflora mehr oder minder reichlich gebildet wird.

Diskussion

Unterschiede im Stoffwechsel von Milchsäure-Isomeren sind seit langem offensichtlich. Zwar ließen sich die früheren Beobachtungen über die hohe Ausscheidung von D-Lactat im Harn der Ratte (Cori & Cori, 1929; Medzihradsky & Lamprecht, 1966) in neueren Experimenten (Giesecke & Fabritius, 1974; Giesecke, v. Wallenberg & Fabritius, 1980; Giesecke & v. Wallenberg, 1985) wohl wegen besser definierter, polymerenfreier Präparate und wegen spezifischerer Bestimmungsverfahren nicht bestätigen. Indessen ist die geringe renale Exkretion (Tab. 1 u. 3) nicht mit einer raschen Metabolisierung gleichzusetzen, denn wie Abbildung 3 zeigt, ist die Kapazität für die Umsetzung von D-Lactat im Vergleich zu L-Lactat selbst bei einer physiologisch noch relativ gut adaptierten Spezies wie der Ratte sehr gering. Ferner konnte für die Ratte eine „Nierenschwelle“ für D-Lactat deutlich gemacht (Giesecke et al., 1984) und eine aktive Reabsorption aus dem Nierentubulus nachgewiesen werden (Ullrich et al. 1982 a-c). Von der Niere des Menschen fehlen bisher vergleichbare Kenntnisse.

Auch von anderen Säugerspezies liegen Befunde über ein Schwellenverhalten von D-Lactat vor, das allerdings weniger ausgeprägt erscheint als beim L-Isomer (Giesecke u. Stangassinger, 1980). Sollte es sich hier ähnlich verhalten, dann wäre die Stoffwechselsituation der von Harnsäure vergleichbar: geringe renale Exkretion trotz hohen Blutspiegels.

Das für Lebensmitteladditive zuständige Expertenkomitee der FAO/WHO hat (1967) eine Höchstmengenbegrenzung für die tägliche D-Milchsäure-Aufnahme des Menschen von 100 mg/Körpergewicht empfohlen, später (1974) aber diese Empfehlung nicht wiederholt, sondern statt dessen Untersuchungen über die Metabolisierung von D-Lactat gefordert. Daraus und aus dem Fehlen jeglicher Hinweise auf die Bemessungsgrundlage für den empfohlenen Grenzwert muß geschlossen werden, daß dieser wissenschaftlich nicht eben gut begründet war.

Die eigenen Ergebnisse können die fehlende Begründung zwar nicht nachliefern, mögen aber eine ungefähre Orientierung gestatten. Bei einem Körpergewicht von 70 kg entsprechen 50, 100 und 150 mg/kg einer Tagesmenge von 39, 78 und 117 mmol bzw. 1,62, 3,25 und 4,87 mmol/kg^{0,75}. Die Ausscheidungsdauer im Harn nach Aufnahme der niederen und mittleren Dosis (vgl. Abb. 1 u. 2) spricht für sich. Ein Vergleich mit den Versuchen an Ratten (vgl. Abb. 3) läßt erkennen, daß schon eine (mittlere) Dosis von 2,0 mmol D-Lactat/kg^{0,75} deutlich langsamer zu CO₂ oxydiert wird als die gleiche Dosis L-Lactat. Bei der höchsten Dosis (4,2 mmol/kg^{0,75}) ist dieser Unterschied zwischen den Isomeren ausgesprochen drastisch.

Die bei der intragastralen Applikation (vgl. Abb. 4) verwendeten Dosierungen richteten sich nach den Angaben von Cori & Cori (1929) und Medzihradsky & Lamprecht (1966), die 10,6 bzw. 4,9 mmol/kg^{0,75} verabreicht hatten. Schon bei der niedrigsten in Abbildung 4 angegebenen Dosis (4,13 mmol/kg^{0,75}), die bei einer Person von 70 kg Gewicht 127 mg/kg entsprechen würde, dauerte es 4 h, bis die Oxydationsrate ihr Maximum erreicht hatte. Die Gesamtdauer muß sich nach dem Verlauf der SSA-Exhalation weit über 8 h erstreckt haben. Aus diesen Ergebnissen ist insgesamt zu folgern, daß D-Milchsäure nur sehr langsam oxydiert wird, wenn etwas erhöhte Konzentrationen gegeben sind. Eine der L-Milchsäure vergleichbare Oxydationsrate ist offenbar nur bei niedrigen DLactat-Gaben zu erreichen, die bei der Ratte unter 2,0 mmol pro kg^{0,75} liegen. Für Personen mit einem Körpergewicht von 60 bzw. 70 kg würde das bei direkter Übertragung der Versuchsergebnisse einer Aufnahme von 65 und 73 mg pro kg entsprechen. Da Ratten aber an die Metabolisierung von D-Lactat besonders gut adaptiert sind, muß für den Menschen ein oberer Grenzwert angenommen werden, der deutlich unter diesen Werten liegt.

Diese geringe Kapazität für die Metabolisierung von D-Milchsäure ist nicht nur eine Frage der Aktivität der D-2-Hydroxysäuren-Dehydrogenase: Nach Aufnahme von DL-Milchsäure, der in den meisten milchsauren Lebensmittel vorliegenden Form, dürfte die inhibierende Wirkung der L-Milchsäure auf die Aufnahme von D-Lactat in der Leber (Schwab et al., 1982), auf die Umsetzung von D-Lactat in der Leber (vgl. Tab. 4) und auf den D-Lactat-Transport in der Niere (Ullrich et al., 1982 a-c) gleichermaßen zum Tragen kommen.

Connor et al. (1983) haben sogar die interessante Beobachtung gemacht, daß bei Probanden nach intravenöser Infusion von Na-L-Lactat – d.h.

ohne exogene Zufuhr von D-Lactat – die renale Exkretion von D-Lactat auf das 7fache ansteigt. Möglicherweise führte die Hemmung der D-Lactat-Oxydation durch hohe L-Lactat-Spiegel zusammen mit dem geänderten Exkretionsverhalten der Niere (Na-Diurese) zu einem Anstieg der Ausscheidung des von der Darmflora erzeugten und absorbierten oder über den Amino-Aceton-Zyklus (Elliot, 1959; Haralambie & Mössinger, 1980) endogen produzierten D-Lactats. In Anbetracht solcher Gegebenheiten dürften der Aufnahme von D-Milchsäure mit der Nahrung besonders enge Grenzen zu setzen sein, weil schon andere Ursachen, die zur Belastung des Organismus mit L-Milchsäure führen, die metabolische Beseitigung von D-Lactat beeinträchtigen können, so z. B. erhöhte Muskelarbeit (Haralambie & Mössinger, 1980), Angstzustände (Pitts, 1969), spontane Hyperlaktämie (Huckabee, 1970) oder Diabetes (Debry & Laurent, 1970) – insgesamt Prozesse also, die ebenso wie die D-Milchsäure-Absorption aus dem Darm kaum kontrollierbar und schwer überschaubar sind.

Somit stellt sich die Elimination von D-Milchsäure vor allem als ein quantitatives Stoffwechselproblem dar, das maßgeblich vom L-Milchsäure-Spiegel abhängt. Die Frage, ob sehr kleine D-Milchsäure-Mengen, wie sie möglicherweise intermediär entstehen können, noch als „physiologisch“ anzusehen sind, wird damit relativ bedeutungslos und läßt sich zur Zeit auch nicht beantworten. Daß darüber hinaus auch das Alter des Individuums und die „Konditionierung“ durch die Darmflora (vgl. Tab. 5) auf die Oxydation von D-Milchsäure in der Leber Einfluß nehmen können, macht die komplexe Natur dieses Stoffwechselproblems in besonderem Maße deutlich.

Literatur

- Bray GA (1960) A simple efficient liquid scintillator for counting aqueous solutions in liquid scintillation. Counter Analyt Biochem 1:279–283
- Cammack R (1969) Assay, purification and properties of mammalian D-2-hydroxy-acid dehydrogenase. Biochem J 115:55–64
- Carr DB, Shih VE, Richter JM, Martin JB (1982) D(–)-lactic acidosis simulating a hypothalamic syndrome after bowel bypass. Ann. Neurol. 11:195–197
- Connor H, Woods HF, Ledingham JGG (1983) Comparison of the kinetics and utilization of D(–)- and L(+)-Sodium lactate in normal man. Ann. Nutr. Metab. 27:481–487
- Cori CF, Cori GT (1929) Glycogen formation in the liver from d- and l-lactic acid. J biol chem 81:389–403
- Debry G, Laurent J (1970) Acidose lactique et diabète sucre. Helvet Med Acta 35:433–447
- Deuticke B, Rickert I, Beyer E (1978) Stereoselective SH-dependent transfer of lactate in mammalian erythrocytes. Biochim Biophys Acta 507:137–155
- Dunlop RH, Hammond PB (1965) D-lactic acidosis of ruminants. Ann NY Acad Sci 119:1109–1152
- Duran M, Van Biervliet JPGM, Kamerling JP, Wadmann SK (1977) D(–)-lactic aciduria, an inborn error of metabolism? Clin Chim Acta 74:297–300
- Elliot WH (1959) Aminoacetone: its isolation and role in metabolism. Nature 183:1051–1052

- FAO/WHO, Joint Expert Committee on Food Additives (1967), Specifications for the identity and purity of food additives and their toxicological evaluation: Some emulsifiers and stabilizers and certain other substances. *Wld Hlth Org techn Rep Ser* 373:5–47
- FAO/WHO, Joint Expert Committee on Food Additives (1974) *Techn Bull* 5:461–465
- Gawehn K, Bergmeyer HU (1971) D(-)lactat. In: Bergmeyer HU (Hrsg) *Methoden der enzymatischen Analyse* Bd II, 1538–1541, 2. Aufl. Verl Chemie, Weinheim
- Giesecke D (1978) D-Milchsäure belastet den Organismus. *Ärztliche Praxis* 30:3–6
- Giesecke D, Fabritius A (1974) Oxidation and excretion of D(-)lactic acid by rats. *Experientia* 30:1124
- Giesecke D, Fabritius A, v Wallenberg P (1980) A quantitative study on the metabolism of D(-)lactic acid in the rat and the rabbit. *Comp Biochem Physiol* 69B:85–89
- Giesecke D, Stangassinger M (1977) ¹⁴C-Versuche über den Stoffwechsel von D(-)Milchsäure. *Ernährungs-Umschau* 11:363–364
- Giesecke D, Stangassinger M (1980) Lactic acid metabolism. In: Ruckebusch Y, Thivend P (eds) *Digestive physiology and metabolism of ruminants* 523–539. MTP-Press, Lancaster
- Giesecke D, v Wallenberg P, Fabritius A (1981) D(-)lactic acid – a physiological isomer in the rat. *Experientia* 36:571
- Giesecke D, v Wallenberg P (1985) Metabolism of D(-)lactic acid in rats given high intragastral doses. *Comp Biochem Physiol* (im Druck)
- Haralambie G, Mossinger M (1980) Metabolites of the aminoacetone pathway in blood after exercise. *Metabolism* 29:1258–1261
- Henle AK (1985) Über die Oxydation von D(-)Lactat in der Rattenleber. *Vet Med Dissertation Universität München*
- Hildmann B, Storelli C, Haase W, Barac-Nieto M, Murer H (1980) Sodium ion/lactate co-transport in rabbit small intestine brush-border-membrane vesicles. *Biochem J* 186:169–176
- Huckabee WE (1970) Hyperlactatemia. *Helvet Med Acta* 35:363–376
- Medzihradsky F, Lamprecht W (1966) Stoffwechseluntersuchungen mit Essig-, Milch- und Zitronensäure. *Z Lebensmitteluntersuchg* 130:171–180
- Oh MS, Phelps KR, Traube M, Barbosa-Saldivar JL, Boxhill C, Carroll HJ (1979) D(-)lactic acidosis in a man with short bowel syndrome. *N Engl J Med* 361:249–252
- Perlmutter DH, Boyle JD, Campos JM, Egler JM, Watkins JB (1983) D(-)lactic acidosis in children: an unusual metabolic complication of small bowel resection. *J Pediatr* 102:234–238
- Pitts FN (1969) The biochemistry of anxiety. *Scientific American* 220:69–75
- Sachs L (1972) *Statistische Auswertungsmethoden*. Springer Verl, Berlin Heidelberg New York
- Satoh T, Narisawa K, Konno T, Katoh T, Fujiyama J, Tomoi A, Metoki K, Hayasaka K, Taduk K, Ishibashi M, Yamane N, Nitsuoka T, Benno Y (1982) D(-)lactic acidosis in two patients with short bowel syndrome: bacteriological analysis of the fecal flora. *Eur J Pediatr* 138:324
- Schoorel EP, Giesberts MAH, Blohm W, van Geldern HH (1980) D(-)lactic acidosis in a boy with short bowel syndrome. *Arch Dis Childh* 55:810–812
- Schwab AJ, Bracht A, Scholz R (1980) Transport D(-)-lactate in the perfused rat liver. *Eur J Biochem* 102:537–547
- Stolby L, Rolfe R, Gictin N, Merritt J, Mann L, Linder L, Finegold S (1982) D(-)lactic acidosis due to abnormal gut flora. Diagnoses and treatment of two cases. *N Engl J Med* 306:1344–1348
- Storelli C, Corcelli A, Cassano G, Hildmann B, Murer H, Lippe G (1980) Polar distribution of sodium dependent transport system for L(+) lactate in the plasma membrane of rat enterocytes. *Pflügers Arch* 388:11–16

- Traube M, Bock JL, Boer JL (1983) D(-)lactic acidosis after jejunoileal bypass: Identification of organic anions by nuclear magnetic resonance spectroscopy. Ann Int Med 98:171-173
- Tubbs PK, Greville (1961) The oxidation of D-2-hydro-acids in animal tissue. Biochem J 81:104-144

Eingegangen 30. Mai 1985

Für die Verfasser:

Prof. Dr. D. Giesecke, Institut f. Tierphysiologie, Veterinärstr. 13, D-8000 München 22