

## **Der Einfluß langfristig überhöhter Proteinzufuhr auf den Mineralstoffwechsel und die Nierenfunktion der Ratte**

### **I. Die renale und enterale Ausscheidung von Calcium, Magnesium, Phosphor, Sulfat und Säure**

**W. Schneider und E. Menden**

Institut für Ernährungswissenschaft der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Zusammenfassung:** In einem Langzeitterversuch an Ratten wurde der Einfluß eines ständig weit über dem Bedarf liegenden erhöhten Proteinverzehrs auf den Mineralstoffwechsel (Calcium, Magnesium, Phosphor) und die Nierenfunktion überprüft. Der 1. Teil der Arbeit befaßt sich insbesondere mit der Beteiligung der proteinabhängigen endogenen Säureproduktion und der renalen Ausscheidung von Protonen und Sulfat an der Entstehung einer Hyperkalziurie.

Hierzu wurden über einen Zeitraum von 61 Wochen in acht Gruppen isokalorische, fettreiche Diäten (40 J%) mit einem Proteinanteil von 13, 26 und 40 J%, der auf Kosten des Kohlenhydratanteils variiert wurde, an 200 männliche Wistaratten verfüttert.

Ferner wurde bei Proteinanteilen von 13 und 26 J% der Einfluß der Qualität des zugeführten Proteins überprüft, indem anstelle von Casein in zwei weiteren Gruppen Fleisch als Hauptproteinträger (3% tierisches Protein) eingesetzt wurde. Die Mineralstoffgehalte der Diäten wurden hierbei konstant gehalten. Bei einem Proteinanteil von 40 J% wurde in drei Gruppen zusätzlich der Calcium- und Phosphorgehalt der Diät sowohl alternativ als auch gemeinsam von 0,6 auf 1,2 % angehoben, um speziell bei hoher Proteinzufuhr Aussagen über die Ausscheidungsmechanismen von Calcium und Phosphor treffen zu können.

Die Steigerung des Proteinanteils von 13 über 26 hin zu 40 J% erzeugte unabhängig von der Art des Nahrungsproteins eine *andauernde Hyperkalziurie* und *Hypermagnesiurie* (nach 58 Wochen: 3,3, 5,9 und 6,8 mg Calcium/Tag; 2,2, 3,3 und 3,4 mg Magnesium/Tag;  $p \leq 0,05$ ). Eine *Adaptation* des Organismus an eine ständig hohe Proteinzufuhr war selbst nach über 400 Tagen *nicht festzustellen*. Die bisher in diesem Maße noch nicht beschriebene *Steigerung der renalen Magnesiumausscheidung* erfolgte *zu Lasten der enteralen Ausscheidung*.

Mit steigender Proteinzufuhr (in Form von Casein und Fleisch) *korrelierte die Exkretion von Calcium und Magnesium im Harn signifikant positiv mit der aus dem Proteinkatabolismus resultierenden erhöhten Bildung und renalen Ausscheidung von Säure und Sulfat*.

Die *Qualität des Nahrungsproteins* beeinflusst offenbar das Ausmaß der Hyperkalziurie. Fleisch als Hauptproteinbestandteil führte zwar zu adäquaten Steigerungen der Sulfat- und Säureausscheidung, aber im Vergleich zu Casein – trotz konstanter Phosphorzufuhr – zu einer geringeren Kalziurie.

Eine erhöhte *Phosphoraufnahme* mit der Diät führte trotz der gleichzeitig beobachteten höchsten Urin-Gesamtazidität aller Gruppen zu einer *Einschränkung der renalen Calcium- und Magnesiumexkretion* und wirkte somit dem Einfluß einer gesteigerten *Proteinzufuhr entgegen*.

**Summary:** The influence of continuous imbalanced high protein intake on the metabolism of minerals (calcium, magnesium, phosphorus) and renal function was the subject of a long-term experiment with rats. In the first part of the study particular attention was directed to the contribution of protein-induced endogenous acid production and renal excretion of hydrogen ions and sulphate to the development of hypercalciuria.

For 61 weeks 200 male Wistar rats in eight groups were fed isocaloric diets, whose protein contents were increased from 13 to 26 and 40 J% at the expense of carbohydrate intake. The fat content of the diets was 40 J%.

In two groups with 13 and 26 J% protein the effect of different kinds of animal protein was also studied, replacing casein by beef. Mineral contents were kept constant in these diets. To examine the excretion mechanisms of calcium and phosphorus especially under conditions of excessive protein intake, the ratio of calcium to phosphorus was varied in three diets with 40 J% protein by increasing both minerals alternatively or together from 0.6 to 1.2 %.

An increase in dietary protein content from 13 to 26 or 40 J% produced a *sustained hypercalciuria* and also *hypermagnesiuria* over a period of more than 400 days (after 58 weeks: 3.3, 5.9, and 6.8 mg calcium/day; 2.2, 3.3, and 3.4 mg magnesium/day;  $p \leq 0.05$ ). *No adaptation* to high protein intake occurred. *Hypermagnesiuria*, which equally hasn't been described before as a result of high protein intake, was accompanied by a *reduced fecal excretion of magnesium*.

With increased protein intake (casein and beef) *hypercalciuria* and also *hypermagnesiuria* were *positively correlated* with an increased formation and *renal excretion of hydrogen ions and sulphate*, which resulted from protein catabolism.

The *dietary protein source* influenced the extent of hypercalciuria, irrespective of a constant phosphorus intake. Although leading to equal increases in renal total acid and sulphate excretion, beef as the main protein source caused a lower calciuria than casein.

High *phosphorus intake* caused the highest total acid excretion of all groups, but resulted in a *reduced hypercalciuria* and *hypermagnesiuria* and *counteracted* the influence of an *increased protein intake*.

**Schlüsselwörter:** Proteinzufuhr, Calciumstoffwechsel, Magnesiumstoffwechsel, Phosphorstoffwechsel, endogene Säureproduktion

**Key words:** protein intake, calcium metabolism, magnesium metabolism, phosphorus metabolism, endogenous acid production

## Einleitung

In der Bundesrepublik Deutschland liegt die tägliche Proteinzufuhr mit der Nahrung zur Zeit durchschnittlich um nahezu 100 % über der Empfehlung von 0,8 g/kg Körpergewicht für den Erwachsenen, wobei der Anteil tierischer Proteinträger zwei Drittel beträgt (11). Damit verbunden ist gleichzeitig eine deutliche Verschiebung des Calcium-Phosphor-Verhältnisses in der Ernährung zugunsten der Phosphoraufnahme.

In verschiedenen Untersuchungen am Menschen und am Versuchstier wurde eine positive Korrelation zwischen der Höhe der Proteinzufuhr und der renalen Calciumausscheidung beobachtet (4, 6, 15, 16, 33, 37, 43). Eine mögliche Rolle in der Ätiologie der proteininduzierten Hyperkalziurie wird der aus einer steigenden Proteinzufuhr resultierenden Belastung des Organismus mit schwefelhaltigen Aminosäuren zugesprochen, bei deren

Abbau anorganisches Sulfat und Protonen entstehen, die über die Niere ausgeschieden werden müssen.

Kontrovers sind die Meinungen darüber, ob der zumeist unmittelbar nach Verabreichung einer proteinreichen Diät auftretende hyperkalziurische Effekt langfristig bestehenbleibt oder ob eine Normalisierung der renalen Calciumausscheidung im Sinne einer Adaptation des Organismus an die höhere Proteinaufnahme erfolgt, möglicherweise in Abhängigkeit vom Lebensalter. Offen ist auch die Frage, ob zur Kompensation des vermehrt im Urin ausgeschiedenen Calciums neben einer gesteigerten Calciumresorption im Darm auch ein stimulierter Abbau des im Skelett gespeicherten Calciums erfolgt.

Das Ziel der vorliegenden Studie war es, die langfristigen Auswirkungen eines auf nahezu Lebenszeit ständig weit über dem Bedarf liegenden erhöhten Proteinverzehrs auf den Mineralstoffwechsel und die Nierenfunktion zu untersuchen. Da Versuche am Menschen auf Lebenszeit mit dieser Fragestellung nicht durchführbar sind, wurde ein Langzeittierversuch an alternden Ratten als Modell für Stoffwechselumsetzungen und -veränderungen beim Menschen entwickelt. Der I. Teil der Arbeit befaßt sich insbesondere mit der Beteiligung der proteinabhängigen endogenen Säureproduktion und der renalen Ausscheidung von Protonen und Sulfat an der Entstehung einer Hyperkalziurie.

## Material und Methoden

### *Versuchstiere und Versuchsdiäten*

Als Versuchstiere wurden 200 männliche Wistarratten einzeln in Drahtkäfigen unter Standardbedingungen, d.h. bei einer Raumtemperatur von 22–24°C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50–60% sowie einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 12 Stunden, gehalten. Nach einer Eingewöhnungszeit von 14 Tagen, in der die Tiere mit dem Standardfutter Altromin 1321N gefüttert wurden, erfolgte eine Einteilung in acht Versuchsgruppen à 25 Tiere derart, daß jede Gruppe ein vergleichbares durchschnittliches Anfangskörpergewicht von 120 g aufwies. Jede Versuchsgruppe erhielt dann über einen Zeitraum von 61 Wochen konstant eine der in Abbildung 1 gezeigten Versuchsdiäten, die ebenso wie destilliertes Wasser ad libitum zur Verfügung gestellt wurden. In Vorversuchen wurde sichergestellt, daß die angebotenen Futtermischungen keine Unterschiede in der Akzeptanz aufwiesen. Futterverzehr und Körpergewichtsentwicklung wurden zweimal wöchentlich kontrolliert.

Die halbsynthetischen, isoenergetischen Versuchsdiäten orientierten sich im Anteil der energieliefernden Nährstoffe an der durchschnittlichen Ernährung in der Bundesrepublik Deutschland laut den Ernährungsberichten 1980 und 1984 (11). Bei einem Fettgehalt von 40 J% wurde der Proteinanteil – je zu einem Drittel pflanzlicher und zu zwei Dritteln tierischer Herkunft – von 13 über 26 auf 40 J% auf Kosten des Kohlenhydratanteils variiert (Gruppen IA, IIA, IIIA). Darüber hinaus wurden bei Proteinanteilen von 13 und 26 J% die Auswirkungen unterschiedlicher Proteinträger tierischen Ursprungs überprüft, indem anstelle von Casein in zwei weiteren Gruppen Fleisch (getrocknetes und gemahlenes mageres Rindfleisch) als Hauptprotein Komponente eingesetzt wurde (Gruppen IB, IIB). Der Gehalt der Diäten an Calcium und Phosphor wurde auf 0,6%, an Magnesium auf 0,05%, an Natrium und Kalium auf 0,5% im Futter eingestellt. Bei einer Proteinzufuhr von 40 J% (Gruppen IIIA–D) wurde der Calcium- bzw. Phosphorgehalt sowohl alternativ als auch gemeinsam auf 1,2% im Futter erhöht, um speziell bei hoher Proteinzufuhr Aussagen über die Wechselwirkung und die Ausscheidungsmechanismen von

Abb. 1. Versuchsdiäten (Hauptnährstoffanteile in Energie %).

| 47 J% KH<br>40 J% Fett<br>13 J% Protein |               | 34 J% KH<br>40 J% Fett<br>26 J% Protein |                | 20 J% KH<br>40 J% Fett<br>40 J% Protein |                             |                              |                                           |
|-----------------------------------------|---------------|-----------------------------------------|----------------|-----------------------------------------|-----------------------------|------------------------------|-------------------------------------------|
| IA<br>Casein                            | IB<br>Fleisch | IIA<br>Casein                           | IIB<br>Fleisch | IIIA<br>Casein                          | IIIB<br>Casein<br>+ 0,6 % P | IIIC<br>Casein<br>+ 0,6 % Ca | IIID<br>Casein<br>+ 0,6 % Ca<br>+ 0,6 % P |

Energie: 19 kJ/g Naßfutter

Protein:  $\frac{2}{3}$  tierisch,  $\frac{1}{3}$  pflanzlichGruppe IA, IIA, IIIA-D:  $\frac{2}{3}$  Casein,  $\frac{1}{6}$  Gluten,  $\frac{1}{6}$  KartoffelproteinGruppe IB, IIB:  $\frac{2}{3}$  Fleisch,  $\frac{1}{6}$  Gluten,  $\frac{1}{6}$  Kartoffelprotein

Fett: 28 % Maiskeimöl, 72 % Olivenöl (6,9 J% Linolsäure; P/S-Quotient 1,4)

Kohlenhydrate: 50 % Stärke, 50 % Saccharose

Mineralstoffe: 0,6 % Calcium, 0,6 % Phosphor, 0,05 % Magnesium, 0,5 % Natrium, 0,5 % Kalium

Calcium und Phosphor treffen zu können. Die genaue Zusammensetzung der Versuchsdiäten ist Tabelle 1 zu entnehmen. Während sich die prozentualen Cysteinanteile der eingesetzten Proteinmischungen entsprachen, wurde die Methioninzufuhr in allen Diäten auf 2,0 g/16 g Stickstoff eingestellt.

#### Versuchsdurchführung und Bestimmungsmethoden

Die Tiere wurden für regelmäßige *Stoffwechseluntersuchungen* – dreimal während der ersten 15 Wochen, zwei weitere Male bis zur 32. Woche und am Versuchsende – jeweils für sechs Tage in Plexiglas-Stoffwechselkäfige gesetzt. Nach dreitägiger Eingewöhnungszeit wurden über weitere drei Tage Harn (72-h-Harn) und Faeces gesammelt. Nach Bedarf wurden daran anschließend für die Bestimmung der Säure-Basen-Parameter, von Creatinin und Harnstoff 24-h-Harn-Sammlungen durchgeführt. Als Konservierungsmittel wurden dem frisch ausgeschiedenen Urin täglich 100  $\mu$ l Thymol (10 %) in Isopropanol zugesetzt. Der gesamte Drei-Tage-Kot wurde getrocknet und ein aliquoter Teil mittels eines Gemisches aus 70%iger Perchlorsäure und 65%iger Salpetersäure (1:3) bei 120 °C über zwei Stunden im Thermoblock aufgeschlossen.

Ein Teil der Tiere (6 bzw. 7 Tiere pro Gruppe) wurde jeweils nach 15 bzw. 32 Wochen, die verbleibenden ca. 12 Tiere pro Gruppe jedoch erst am Versuchsende getötet. Zwischenzeitlich benötigte Blutproben wurden den Tieren durch retroorbitale Punktion entnommen.

*Serum-Ultrafiltrat* wurde durch Zentrifugation des Serums in einem geschlossenen Mikrotrennsystem gewonnen (Centrifree, Fa. Amicon; 30 min in einem Winkelkopfroter bei 1800  $\times$  g). Hierbei wird die proteinfreie Fraktion durch eine semipermeable Membran filtriert, während die proteingebundenen Liganden retiniert werden (10).

*Calcium und Magnesium* in Serum, Ultrafiltrat, 72-h-Urin und Säureaufschlüssen (Kot) wurden atomabsorptionsspektrometrisch bestimmt (Atomabsorptionsspektrophotometer 1248, Fa. Beckman). Der *anorganische Phosphor* in Serum, Urin und Veraschungslösungen wurde photometrisch durch die Molybdat-Vanadat-Reaktion erfaßt (7, 44).

Zur Bestimmung der *Sulfatkonzentration im Urin* wird Sulfat mit Bariumchlorid gefällt und das unlösliche Bariumsulfat durch Verwendung einer speziell aufbereiteten Dextranlösung (MG ca. 70 000, Fa. Fluka) in Suspension gehalten. Die Extink-

Tab. 1. Zusammensetzung der Versuchsdiäten (in g/kg Futter).

| Gruppe                                                                                                                                                          | IA    | IB                  | IIA   | IIB                 | IIIA  | IIIB  | IIIC  | IIID  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|---------------------|-------|---------------------|-------|-------|-------|-------|
| Casein                                                                                                                                                          | 118,3 | —                   | 229,4 | —                   | 341,6 | 341,6 | 341,6 | 341,6 |
| Fleisch                                                                                                                                                         | —     | 135,9               | —     | 266,4               | —     | —     | —     | —     |
| Gluten                                                                                                                                                          | 34,2  | 34,6                | 66,3  | 67,8                | 99,2  | 99,2  | 99,2  | 99,2  |
| Kartoffelprotein                                                                                                                                                | 35,6  | 36,1                | 69,2  | 70,7                | 102,9 | 102,9 | 102,9 | 102,9 |
| Olivöl                                                                                                                                                          | 156,4 | 131,4 <sup>1)</sup> | 151,6 | 102,6 <sup>1)</sup> | 147,0 | 147,0 | 147,0 | 147,0 |
| Maiskeimöl                                                                                                                                                      | 60,6  | 61,2                | 58,8  | 60,0                | 57,0  | 57,0  | 57,0  | 57,0  |
| Maisstänke                                                                                                                                                      | 286,9 | 290,1               | 201,3 | 205,7               | 114,6 | 114,6 | 114,6 | 114,6 |
| Puderzucker                                                                                                                                                     | 286,9 | 290,1               | 201,3 | 205,7               | 114,6 | 114,6 | 114,6 | 114,6 |
| Vitaminmischung <sup>3)</sup>                                                                                                                                   | 10,0  | 10,0                | 10,0  | 10,0                | 10,0  | 10,0  | 10,0  | 10,0  |
| Cellulose                                                                                                                                                       | 10,0  | 10,0                | 10,0  | 10,0                | 10,0  | 10,0  | 10,0  | 10,0  |
| Methionin <sup>2)</sup>                                                                                                                                         | 1,1   | 0,6                 | 2,1   | 1,1                 | 3,1   | 3,1   | 3,1   | 3,1   |
| Mineralstoffzusatz zur Erreichung der erwünschten Zufuhr von je 6,0 g (12,0 g) Calcium und Phosphor, je 5,0 g Natrium und Kalium und 0,5 g Magnesium/kg Futter: |       |                     |       |                     |       |       |       |       |
| NaCl                                                                                                                                                            | 12,66 | 12,15               | 12,61 | 11,67               | 12,58 | 12,58 | 12,58 | 12,58 |
| MgSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O                                                                                                                          | 4,56  | 3,75                | 4,16  | 2,64                | 3,75  | 3,75  | 3,75  | 3,75  |
| CaCO <sub>3</sub>                                                                                                                                               | 11,08 | 10,34               | 12,69 | 11,32               | 14,33 | 5,27  | 29,32 | 20,26 |
| Ca(H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> × H <sub>2</sub> O                                                                                             | 10,00 | 11,62               | 5,13  | 8,10                | —     | 24,80 | —     | 24,80 |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                                                                                                                                 | 7,21  | 7,21                | 7,21  | 7,21                | 7,21  | 7,21  | 7,21  | 7,21  |
| K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>                                                                                                                                  | 4,58  | 3,09                | 4,01  | 1,06                | 3,45  | 3,45  | 3,45  | 3,45  |
| Spurenelemente <sup>3)</sup>                                                                                                                                    | 0,46  | 0,46                | 0,46  | 0,46                | 0,46  | 0,46  | 0,46  | 0,46  |

<sup>1)</sup> Der analytisch ermittelte Fettgehalt des Fleisches (nach Soxhlet) wurde vom Olivenölanteil in Abzug gebracht.

<sup>2)</sup> Zur Erzielung eines Methioningehaltes von 2,0 g/16g N.

<sup>3)</sup> *Vitaminmischung (mg/kg Futter):* Thiamin-HCl 10,0; Riboflavin 10,0; Pyridoxin-HCl 10,0; Calcium-Pantothenat 50,0; Niacin 50,0; Folsäure 2,0; Biotin 0,4; Ascorbinsäure 50,0; Menadion (Na-bisulfit) 5,0; Inosit 100,0; Para-Aminobenzoesäure 100,0 (Premix ad 10,0 g Maisstärke). — *Zusätzlich (pro kg Futter) Vitamin-A-palmitat* 6,0 mg, Vit. D<sub>2</sub> 2,5 mg, Vit. E (DL- $\alpha$ -Tocopherolacetat) 90,0 mg (in Maisstärke). — *Spurenelementmischung (mg/kg Futter):* Fe-(III)-Citrat 310,0; MnSO<sub>4</sub> × H<sub>2</sub>O 91,0; ZnO 25,0; CuSO<sub>4</sub> × 5 H<sub>2</sub>O 31,3; KJ 0,26; NaF 0,22; (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>MoO<sub>24</sub> × 4 H<sub>2</sub>O 0,18; Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> 0,022.

tion der Suspension wird photonephelometrisch anhand einer mitgeführten  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ -Eichkurve ausgewertet (28). Bei der quantitativen Bestimmung der *Säure-Basen-Parameter im Urin* werden an verschiedene Harnkomponenten gebundene Wasserstoffionen stufenweise freigesetzt und die titrierbare Azidität (TA), die Bicarbonat- ( $\text{HCO}_3^-$ ) und Ammoniumausscheidung ( $\text{NH}_4^+$ ) hintereinander in drei Titrationsschritten erfaßt (27). Die Ausscheidung von Gesamtsäure ergibt sich aus der Summe der titrierbaren Azidität und des Ammoniums:  $\text{H}^+_{\text{gesamt}} = \text{TA} + \text{NH}_4^+$ . Unter Abzug der Bicarbonatausscheidung ergibt sich die Netto-Protonenausscheidung.

### Statistische Methoden

Die Untersuchungsergebnisse wurden mit Hilfe des *Statistik*-Programmsystems SPSS-X (30) ausgewertet. Für alle Parameter wurden die arithmetischen Mittelwerte und deren Standardabweichungen ( $\bar{x} \pm s$ ) errechnet. Sämtliche Daten wurden auf Normalverteilung geprüft (Kolmogoroff-Smirnoff-Test). Zur Prüfung auf signifikante Unterschiede wurde die einfache Varianzanalyse mit angeschlossenen multiplem Mittelwertvergleich nach Scheffée angewendet, wobei Signifikanzbeziehungen hinsichtlich der Proteinquantität (IA-IIA-IIIA bzw. IB-IIB), hinsichtlich der Proteinqualität (IA-IB bzw. IIA-IIB) und hinsichtlich des Calcium-Phosphor-Verhältnisses der Versuchsdiäten (IIIA-IIIB-IIIC-IIID untereinander) berücksichtigt wurden:  $p \leq 0,05$  (\*);  $p \leq 0,01$  (\*\*) und  $p \leq 0,001$  (\*\*\*). Zur Beurteilung von Zusammenhängen zwischen den verschiedenen Variablen und Parametern wurden deren Korrelationskoeffizienten ( $r$ ) nach Pearson und Spearman berechnet.

## Ergebnisse

### Körpergewichtsentwicklung

Die Ratten erreichten am Ende des Langzeitversuchs relativ hohe Körpergewichte, die in erster Linie auf die große Energiedichte der Versuchs-

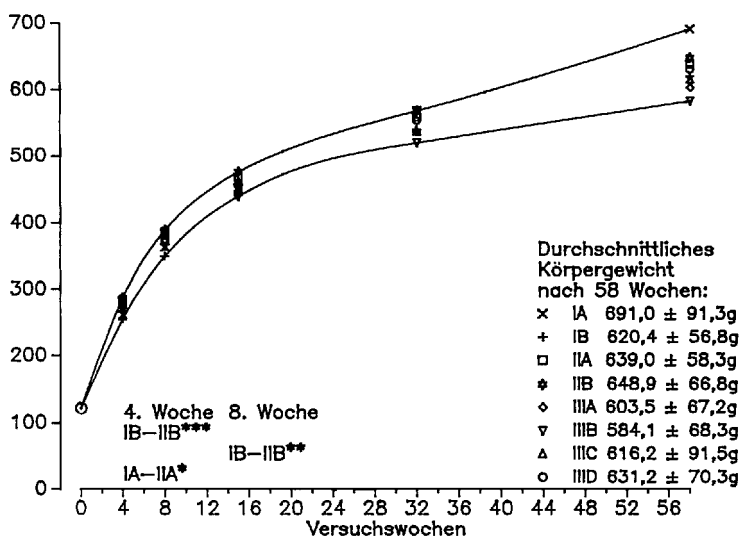


Abb. 2. Körpergewichte männlicher Wistarratten in g zu Versuchsbeginn, nach 4, 8, 15, 32, 56 Wochen der Aufnahme von Diäten mit unterschiedlichen Proteinzufuhrhöhen, Hauptproteinträgern und Calcium-Phosphor-Gehalten.

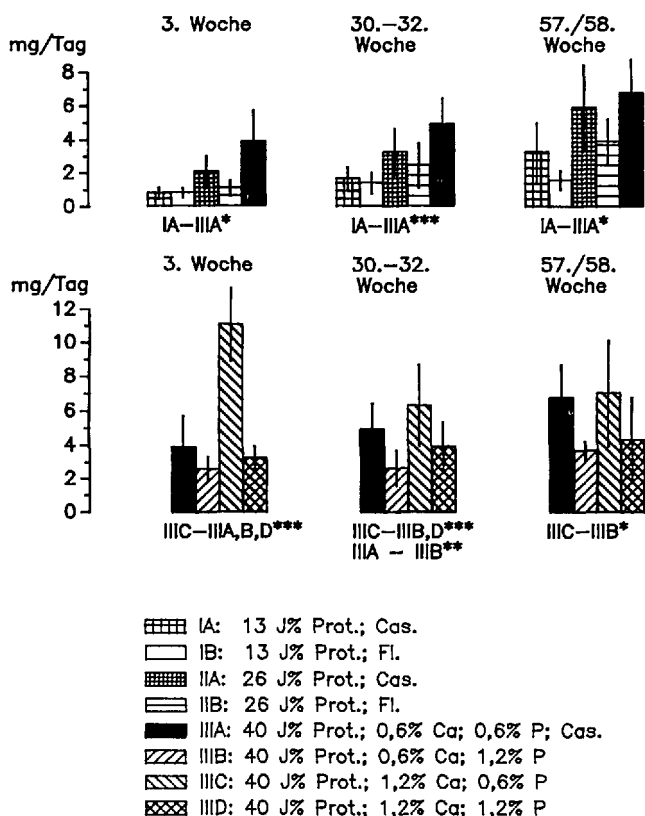


Abb. 3. Renale Calciumausscheidung männlicher Wistarratten in mg/Tag. Oben: Variation der Höhe und Art des Proteinanteils der Diäten. Unten: Variation des Calcium-Phosphor-Verhältnisses der Diäten bei hohem Proteinanteil von 40 J%.

Tab. 2. Enterale Calciumausscheidung männlicher Wistarratten in mg/Tag in der 3., 30.-32., 57./58. Woche der Aufnahme von Diäten mit unterschiedlichen Proteinzufuhrhöhen, Hauptproteinträgern und Calcium-Phosphor-Gehalten (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung).

| Gruppe | 3. Woche        | 30.-32. Woche    | 57./58. Woche    |
|--------|-----------------|------------------|------------------|
| IA     | 21,8 $\pm$ 3,2  | 74,9 $\pm$ 18,8  | 87,0 $\pm$ 12,1  |
| IB     | 22,4 $\pm$ 6,7  | 74,7 $\pm$ 17,7  | 82,4 $\pm$ 12,3  |
| IIA    | 16,7 $\pm$ 3,3  | 72,0 $\pm$ 14,5  | 89,8 $\pm$ 7,2   |
| IIB    | 14,0 $\pm$ 4,9  | 75,3 $\pm$ 22,6  | 81,4 $\pm$ 11,6  |
| IIIA   | 17,9 $\pm$ 2,5  | 66,5 $\pm$ 15,3  | 72,2 $\pm$ 8,0   |
| IIIB   | 19,3 $\pm$ 3,5  | 67,6 $\pm$ 13,7  | 70,8 $\pm$ 7,3   |
| IIIC   | 77,6 $\pm$ 11,4 | 130,8 $\pm$ 27,7 | 124,7 $\pm$ 25,7 |
| IIID   | 81,8 $\pm$ 8,6  | 157,0 $\pm$ 32,4 | 144,7 $\pm$ 16,7 |

$p \leq 0,001$

IIIA, B-IIIC, D

IIIA, B-IIIC, D

IIIA, B-IIIC, D

diäten zurückzuführen sind – etwa 19 MJ pro kg aufgrund des hohen Fettanteils von 40 J%. Im Verlauf der stark exponentiellen Wachstumsphase (Abb. 2) traten die höchsten Gewichtszunahmen bei den Gruppen mit mittlerer Proteinzufuhr von 26 J% sowohl mit Casein als auch mit Fleisch als Hauptproteinträger auf (IIA, IIB). Im späteren Versuchsverlauf waren mit steigendem Proteinanteil von 13 über 26 auf 40 J% und Casein als Komponente fallende Körpergewichte ( $IA > IIA > IIIA$ ), jedoch keine statistisch signifikanten Gruppenunterschiede zu beobachten. Der durchschnittliche tägliche Futterverzehr lag zu Versuchsbeginn in allen Gruppen zwischen 13 und 14 g, am Versuchsende zwischen 14 und 15 g; signifikante Gruppenunterschiede bestanden nicht. Eine Steigerung der Proteinzufuhr scheint nur bis zum Erreichen eines „Optimums“ in einer stärkeren Körpergewichtszunahme zu resultieren, darüber hinausgehende Erhöhungen verbessern die Gewichtszunahme nicht. Die Trinkwasseraufnahme und das Urinvolumen waren mit steigender Proteinzufuhr tendenziell erhöht.

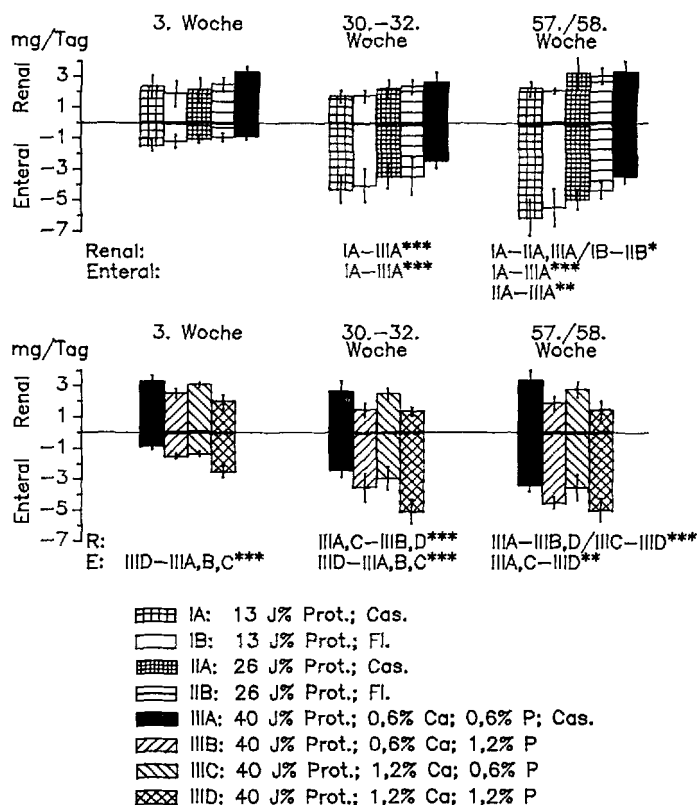


Abb. 4. Renale und enterale Magnesiumausscheidung männlicher Wistarrratten in mg/Tag. Oben: Variation der Höhe und Art des Proteinanteils der Diäten. Unten: Variation des Calcium-Phosphor-Verhältnisses der Diäten bei hohem Proteinanteil von 40 J%.



Tab. 3. Renale und enterale Phosphorausscheidung männlicher Wistarratten in mg/Tag in der 3. und 57./58. Woche der Aufnahme von Diäten mit unterschiedlichen Proteinzufuhrhöhen, Hauptproteinträgern und Calcium-Phosphor-Gehalten (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung).

| Gruppe         | renal                           |                                              | enteral                      |                 |
|----------------|---------------------------------|----------------------------------------------|------------------------------|-----------------|
|                | 3. Woche                        | 57./58. Woche                                | 3. Woche                     | 57./58. Woche   |
| IA             | 19,0 $\pm$ 1,8                  | 33,2 $\pm$ 6,2                               | 10,4 $\pm$ 2,2               | 48,7 $\pm$ 9,6  |
| IB             | 17,5 $\pm$ 3,8                  | 30,9 $\pm$ 3,3                               | 10,6 $\pm$ 3,4               | 43,6 $\pm$ 7,4  |
| IIA            | 17,3 $\pm$ 4,1                  | 34,0 $\pm$ 8,0                               | 7,5 $\pm$ 1,1                | 45,7 $\pm$ 7,1  |
| IIB            | 18,3 $\pm$ 2,2                  | 34,9 $\pm$ 6,1                               | 6,3 $\pm$ 2,2                | 41,4 $\pm$ 9,6  |
| IIIA           | 16,3 $\pm$ 4,1                  | 33,7 $\pm$ 8,3                               | 6,7 $\pm$ 1,0                | 29,9 $\pm$ 5,0  |
| IIIB           | 74,2 $\pm$ 9,1                  | 87,3 $\pm$ 10,7                              | 13,2 $\pm$ 2,1               | 43,5 $\pm$ 5,8  |
| IIIC           | 2,8 $\pm$ 1,7                   | 9,0 $\pm$ 4,5                                | 19,9 $\pm$ 2,6               | 44,8 $\pm$ 12,0 |
| IIID           | 46,1 $\pm$ 6,8                  | 53,2 $\pm$ 6,5                               | 44,0 $\pm$ 5,4               | 76,9 $\pm$ 11,4 |
| p $\leq$ 0,001 | IIIB-IIIA, C, D<br>IIID-IIIA, C | IIIB-IIIA, C, D<br>IIID-IIIA, C<br>IIIA-IIIC | IIID-IIIA, B, C<br>IIIC-IIIA | IIID-IIIA, B, C |
| p $\leq$ 0,01  | IIIA-IIIC                       |                                              | IIIC-IIIB                    | IA-IIIA         |
| p $\leq$ 0,05  |                                 |                                              |                              | IIIA-IIIC, IIA  |

### Renale und enterale Mineralstoffexkretion

Die Erhöhung des Proteinanteils von 13 über 26 hin zu 40 J% führte zu einer signifikanten *Erhöhung der renalen Calciumausscheidung* in den Gruppen, die Casein als Hauptprotein Komponente erhielten, die während des gesamten Beobachtungszeitraumes bestehen blieb (IA-IIIA). Im Vergleich hierzu war in den Gruppen, deren Proteinanteil zu zwei Dritteln aus Fleisch bestand (IB-IIB), sowohl die absolute Höhe als auch die proteininduzierte Steigerung der Kalziurie geringer. Eine Erhöhung des Phosphorgehaltes der Diät mit 40 J% Protein (Casein als Hauptprotein Komponente) ging einher mit einer Verringerung der proteininduzierten Hyperkalziurie (IIIA-IIIB; Abb. 3). Eine Anhebung der Calciumzufuhr bzw. der Calcium- und Phosphorzufuhr führte in erster Linie zu einem Anstieg der enteralen Calciumausscheidung (Tab. 2).

Die *renale Phosphorausscheidung* zeigte sich durch die Proteinzufuhr relativ unbeeinflusst. Eine Anhebung der Phosphorzufuhr erhöhte den renalen Anteil, eine alleinige oder in Kombination mit der Phosphorzufuhr erhöhte Calciumzufuhr führte zu einer Senkung der Phosphaturie (IIB > IIID > IIIA > IIIC; Tab. 3).

Mit steigender Proteinzufuhr war unabhängig von der Art des Hauptproteinträgers eine *Steigerung der renalen zu Lasten der enteralen Magnesiumausscheidung* zu beobachten (IA-IIIA; IB-IIB). Variationen des Calcium-Phosphor-Verhältnisses der Diät führten zu einer reduzierten renalen zugunsten der enteralen Magnesiumexkretion, wobei die Phosphorzufuhr den größeren Einfluß ausübte (IIIA, B, C, D; Abb. 4).

### Serumkonzentration der Elektrolyte

Weder beim Gesamt- bzw. ultrafiltrierbaren Calcium und Magnesium noch bei den Phosphorkonzentrationen im Serum traten statistisch signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen auf.

### Renale Sulfat- und Säureausscheidung

Signifikant – und erwartungsgemäß – erhöhten sich mit steigender Proteinzufuhr die Raten der *Sulfat- und Ammoniumausscheidung*, mit erhöhter Phosphoraufnahme die titrierbare Azidität und die *Ammoniumexkretion*. Da die renale Gesamtsäureexkretion aus der titrierbaren Azidi-

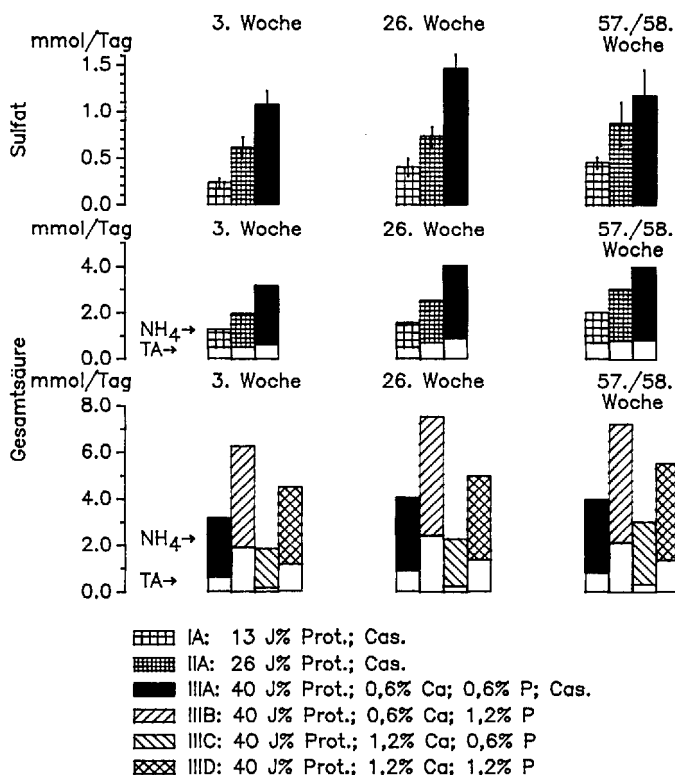


Abb. 5. Renale Sulfat- und Gesamtsäureausscheidung (Titrierb. Azidität [TA] und Ammonium [ $\text{NH}_4^+$ ]) männlicher Wistaratten in mmol/Tag. Oben: Sulfatausscheidung unter Variation der Höhe des Proteinanteils der Diäten (Hauptproteinträger Casein). Mitte: Gesamtsäureausscheidung unter Variation der Höhe des Proteinanteils der Diäten (Hauptproteinträger Casein). Unten: Gesamtsäureausscheidung unter Variation des Calcium-Phosphor-Verhältnisses der Diäten bei hohem Proteinanteil von 40 J%. (Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde bei der Gesamtsäureausscheidung auf die Einzeichnung von Standardabweichungen verzichtet. Signifikante Unterschiede bestehen zwischen folgenden Gruppen: IA < IIA < IIIA bei Sulfat,  $\text{NH}_4$ , Gessr. und IIIB > IIID > IIIA > IIIC bei TA,  $\text{NH}_4$ , Gessr.;  $p \leq 0,05$  bis  $p \leq 0,001$ ).

tät und der Ammoniumausscheidung resultiert, war sie abhängig von der Höhe sowohl der Protein- als auch der Phosphoraufnahme (Abb. 5). Die Gruppenunterschiede bei der titrierbaren Azidität stimmten erwartungsgemäß mit der Abstufung bei der renalen Phosphorausscheidung überein (IIIB > IIID > IIIA > IIIC).

Kein untersuchter Parameter der Säure- und Sulfatausscheidung korreliert linear über *sämtliche alimentären Maßnahmen hinweg* mit der Calcium- bzw. Magnesiumexkretion im Harn, wie es bei einer direkten Mittlerfunktion zu erwarten wäre. Eine Isolierung der in die Diäten integrierten Einflußfaktoren ergibt dagegen *unter dem alleinigen Aspekt einer Proteinsteigerung* bei Verabreichung von Casein und auch von Fleisch als Hauptproteinträger signifikant positive Korrelationen zwischen allen Parametern der Säure- und Sulfatausscheidung im Harn und der Kalziurie bzw. Magnesiurie (Calcium:  $r = 0,683$  bis  $0,732$  [Casein];  $r = 0,650$  bis  $0,886$  [Fleisch]; Magnesium:  $r = 0,701$  bis  $0,776$  [Casein];  $r = 0,688$  bis  $0,847$  [Fleisch];  $p \leq 0,001$ ).

## Diskussion

Der Anteil der endogenen Calciumausscheidung über den Urin beträgt physiologischerweise etwa 1 bis 2 % bei der Ratte gegenüber 20 bis 30 % oder mehr beim Menschen, bezogen auf die Calciumaufnahme (41). Auch in unserem Tierversuch wurde Calcium prozentual hauptsächlich enteral ausgeschieden und nur zu 1–10 % renal, je nach Höhe der Protein- und Calciumzufuhr.

Nichtsdestoweniger führte eine Erhöhung der Proteinzufuhr in unserer Untersuchung zu einer permanenten Steigerung der renalen Calciumausscheidung der Versuchstiere. Eine Normalisierung der renalen Calciumausscheidung im Sinne einer Adaptation des tierischen Organismus an die überhöhte Proteinzufuhr war unter den von uns gewählten Versuchsbedingungen selbst über einen Zeitraum von 401 Tagen nicht zu beobachten. Zu ähnlichen Ergebnissen gelangten Whiting und Draper (38) und Bell et al. (6), die bei Ratten eine aufrechterhaltene Hyperkalziurie nach 123 bzw. 100 Tagen bei Erhöhung der Proteinzufuhr von 13 auf 30 J% bzw. von 8 über 17 auf 33 J% beobachteten. Währenddessen verzeichneten Calvo et al. (8) und Allen und Hall (3) in ihren Untersuchungen nach einem Zeitraum von 56 bzw. von nur 28 Tagen ein Absinken der Kalziurie auf die Kontrollwerte.

Während in einigen Untersuchungen am Menschen in Abhängigkeit von der Höhe der Proteinzufuhr über unverändert hohe renale Calciumexkretionen über Zeiträume von 45 bis zu 60 Tagen berichtet wird (4, 16, 21), beobachteten Spencer et al. (34) bei unter erhöhter Fleischzufuhr getesteten Versuchspersonen keinen bzw. nur einen vorübergehenden geringen Anstieg der Kalziurie.

In Radioisotopenstudien an Ratten und Mäusen wurde unter dem Einfluß einer erhöhten Proteinzufuhr eine Kompensation der vermehrten renalen Calciumausscheidung durch eine verbesserte intestinale Calciumabsorption und gleichzeitig eine Verschiebung der endogenen Ausscheidung vom Kot zum Urin beobachtet (6, 8, 15, 38, 40). In unserer Untersuchung konnten wir eine kompensatorische Verbesserung der (scheinba-

ren) Absorption – erfaßt als Differenz der Calciumzufuhr und der fäkalen Ausscheidung – zumindest nicht eindeutig belegen.

Der von uns beobachtete *hypokalziuretische* Effekt des Nahrungsphosphors, der der *hyperkalziuretischen* Wirkung des Proteins offensichtlich entgegenwirkt, wurde auch in anderen Studien an Ratten bzw. Mäusen und am Menschen beschrieben (17, 19, 20, 32, 35, 40, 42).

Eine Erhöhung des Calciumgehaltes der Nahrung bei gleichzeitig niedrigem oder ebenfalls auf 1,2 % angehobenem Phosphorgehalt korrelierte in unserem Tierexperiment in erster Linie mit einem Anstieg der *enteralen* Calciumausscheidung. Zur Kompensation einer proteininduzierten Hyperkalziurie sind höhere Calciumgehalte der Nahrung nur begrenzt geeignet, da die Effizienz der intestinalen Calciumabsorption mit steigenden Calciumgehalten rasch abnimmt (39). Wie wir bei unseren Versuchstieren bestätigen können, kommt hinzu, daß bei Ratten und ebenso beim Menschen mit steigendem Lebensalter die Calciumresorptionsfähigkeit bei gleichbleibenden Protein- und Calciumzufuhren nachläßt, was zu einer Verschlechterung der Calciumbilanz führen kann (2, 5, 14, 33). Als Ursache hierfür wird ein verminderter Stimulus der Calciumabsorption durch die im Alter bei Mensch und Ratte absinkende Serum-1,25-(OH)<sub>2</sub>-Cholecalciferolkonzentration angesehen (13, 14, 18).

Die renale Magnesiumausscheidung war in unserer Studie bei Steigerung der Proteinzufuhr von 13 über 26 hin zu 40 J% ebenso wie die Calciumausscheidung erhöht. Allerdings wurde sie von einer verminderten enteralen Ausscheidung begleitet, so daß in diesem Falle von einer deutlich ausgeprägten Verschiebung der Gesamtausscheidung gesprochen werden kann.

Unter physiologischen Verhältnissen werden beim Menschen etwa 35–40 % des mit der Nahrung aufgenommenen Magnesiums im Darm absorbiert (39). Die renale Magnesiumausscheidung stellt den primären Mechanismus zur Kontrolle des Gesamtkörperbestandes an Magnesium dar (29). Sowohl beim Menschen als auch bei Ratten wird vereinzelt in der Literatur eine proteinabhängige erhöhte renale Magnesiumexkretion bzw. intestinale Absorption bei unveränderter Bilanz als Begleiterscheinung der proteininduzierten Hyperkalziurie beschrieben (1, 8, 22, 26, 37).

Hohe Calcium- und insbesondere Phosphorgehalte der Nahrung führten in unserem Tierversuch zu einer Verminderung der scheinbaren Magnesiumabsorption und dadurch zu einer Verringerung der Magnesiumausscheidung im Urin. Als Ursache hierfür kann eine vermehrte fäkale Ausscheidung komplex an Phosphat gebundenen Magnesiums oder/und eine kompetitive Hemmung der Magnesium- durch die Calciumabsorption im Darm in Frage kommen (12).

In verschiedenen Untersuchungen am Menschen wurden ebenso wie bei unseren Versuchstieren unter erhöhter Proteinzufuhr gesteigerte renale Sulfat-, Ammonium- und Gesamtsäureausscheidungsraten gemessen, die gleichermaßen mit der renalen Calciumausscheidung sowie untereinander positiv korrelierten (16, 32, 33). Experimente an Ratten stellten lineare Beziehungen zwischen der Calcium- und der Sulfatausscheidung im Urin sowie der Zufuhr schwefelhaltiger Aminosäuren mit der Nahrung her (8, 37) in dem Sinne, daß die hyperkalziuretische Wirkung verschiedener Proteine bei gleichbleibender absoluter Höhe der

Proteinzufuhr mit höherem Gehalt an Methionin und Cyst(e)in anstieg. Allerdings konnten Zulagen schwefelhaltiger Aminosäuren zu Kontroll-diäten die hyperkalziuretische Wirkung nativer Proteine (mit entsprechendem Gehalt an schwefelhaltigen Aminosäuren) nicht vollständig reproduzieren.

Proteinreiche Ernährung produziert einen Anstieg der renalen Protonenausscheidung, wobei der Katabolismus der schwefelhaltigen Aminosäuren die Hauptquelle der endogenen Säureproduktion ist (9). Diese Säurebelastung wird als direkter Inhibitor der renalen tubulären Rückresorption von Calcium angesehen (24). Darüber hinaus beeinträchtigt das ausgeschiedene Sulfat die Reabsorption durch Komplexbildung des Calciums im Glomerulusfiltrat (36). Das Sulfat-Anion selbst wird kaum durch die Tubuluszellen reabsorbiert und soll – indem es die Elektronegativität des Tubuluslumens erhöht – den passiven, auf einem elektrochemischen Gradienten basierenden Influx des Calciums in die Tubuluszellen und den daran anschließenden aktiven Transport aus der Zelle ins Interstitium beeinträchtigen (33).

In unserem Tierversuch wurde bestätigt, daß neben der Quantität generell auch die Qualität des Proteins für das Ausmaß und die Dauer einer Hyperkalziurie mitverantwortlich ist. Im Versuchsverlauf bestand bei gleicher Höhe der Proteinzufuhr zwischen den beiden Hauptprotein-komponenten Casein und Fleisch in der renalen Sulfatausscheidung erwartungsgemäß nur ein geringer Unterschied, da sich die prozentualen Anteile an Methionin/Cystein in den eingesetzten Proteinmischungen entsprachen. Die renale Calciumausscheidung war aber bei Einsatz von Fleisch anstelle von Casein (insbesondere bei höherer Proteinzufuhr von 26 J%) deutlich geringer, trotz konstanter Phosphorzufuhr.

Der mit der Nahrung aufgenommene Phosphor kann im Organismus zur Protonenfreisetzung beitragen, abhängig von der Struktur der vorherrschenden Phosphorsäurebindung und dem pH-Wert des betreffenden Nahrungsmittels. Diese als *hyperkalziuretisch* geltende Aziditätssteigerung steht damit im Gegensatz zu der beschriebenen *hypokalziuretischen* Wirkung des Nahrungsphosphors.

Die Reaktion des Organismus auf gemeinsam in einem nativen Nahrungsmittel vorkommende hyper- und hypokalziuretische Komponenten wurde am Beispiel Fleisch untersucht, das neben der Protein- auch die Phosphoraufnahme steigert. Lennon et al. (25) wiesen nach, daß der mit Fleisch aufgenommene Phosphor im menschlichen Stoffwechsel nicht protonenfreisetzend ist, und schrieben die beobachtete Steigerung der Netto-Protonenausscheidung rechnerisch der Produktion von Sulfat und organischen Säuren zu. Schuette und Linkswiler (32) verglichen in ihren Untersuchungen am Menschen die Azidität einer erhöhten Fleischzufuhr mit einer isonitrogenen, aus isolierten Proteinen zusammengestellten und im Gehalt an schwefelhaltigen Aminosäuren identischen Diät, die mit saurem Phosphat an die Phosphatzufuhr aus Fleisch angepaßt wurde. Während das saure Phosphat zur Gesamtsäureausscheidung beitrug, rührte die Gesamtazidität nach Fleischverzehr hauptsächlich aus der Schwefeloxidation her.

Die Erhöhung des Phosphorgehaltes unserer Versuchsdiäten (mit 40 J% Protein) von 0,6 auf 1,2 % wurde ausschließlich durch Zusatz des sauren

Calciumbis-dihydrogenphosphats  $[\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \times \text{H}_2\text{O}]$  erreicht. Wir beobachteten bei erhöhter Phosphorzufuhr trotz eines gesteigerten Anteils der titrierbaren Azidität im Urin und demzufolge einer gleichzeitigen Erhöhung der Gesamtsäureausscheidung eine reduzierte Kalziurie. Schuette et al. (31) bestätigten in ihren Untersuchungen am Menschen, daß eine Supplementierung der Nahrung mit sauren Phosphaten (Kaliumdihydrogenphosphat) die renale Calciumausscheidung senkt, aber die titrierbare Azidität und Gesamtsäureausscheidung erhöht, während Protein und schwefelhaltige Aminosäuren eher die Ammoniumausscheidung und nur in geringem Maße die titrierbare Azidität beeinflussen. Die Azidität des supplementierten Phosphors hat dennoch einen Einfluß auf die renale Calciumausscheidung, da neutrale Phosphate eine etwa 30 % größere hypokalziuretische Wirkung als saure Phosphate entfalten sollen (23).

Die renale Magnesiumausscheidung stand in unserer Studie ebenso wie die Calciumausscheidung bei gesteigerter Proteinzufuhr in engem Zusammenhang mit allen Säure-Basen-Parametern im Urin. Eine erhöhte Phosphorzufuhr führte ebenfalls trotz eines Anstiegs der titrierbaren Azidität im Urin zu einer Senkung der renalen Magnesiumexkretion.

### Literatur

1. Alcantara EN, Linkswiler HM (1969) Effect of protein and of magnesium intake on magnesium balance of older adolescent males. *Fed Proc* 28:562
2. Alevizaki CC, Ikkos DC, Singuelakis P (1973) Progressive decrease of true intestinal calcium absorption with age in normal man. *J Nucl Med* 14:760-762
3. Allen LH, Hall TE (1978) Calcium metabolism, intestinal calcium-binding protein, and bone growth of rats fed high protein diets. *J Nutr* 108:967-972
4. Allen LH, Oddoye EA, Margen S (1979) Protein-induced hypercalciuria: a longer term study. *Am J Clin Nutr* 32:741-749
5. Armbrrecht HJ, Zenser TV, Bruns MEH, Davis BB (1979) Effect of age on intestinal calcium absorption and adaptation to dietary calcium. *Am J Physiol* 236:E769-774
6. Bell RR, Engelmann DT, Sie T-L, Draper HH (1975) Effect of a high protein intake on calcium metabolism in the rat. *J Nutr* 105:475-483
7. Bogatzki G (1938) Verfahren zur photometrischen Bestimmung des Phosphors im Stahl. *Arch Eisenhüttenwesen* 12:195-198
8. Calvo MS, Bell RR, Forbes RM (1982) Effect of protein-induced calciuria on calcium metabolism and bone status in adult rats. *J Nutr* 112:1401-1413
9. Chan JCM (1981) Nutrition and acid-base metabolism. *Fed Proc* 40:2423-2428
10. D'Costa M, Cheng P-T (1983) Ultrafilterable calcium and magnesium in ultrafiltrates of serum prepared with the Amicon MPS-1 system. *Clin Chem* 29:519-522
11. Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE) e.V. (Hrsg) (1980 und 1984) Ernährungsbericht. Frankfurt am Main
12. Ebel H, Günther T (1980) Magnesium metabolism: a review. *J Clin Chem Clin Biochem* 18:257-270
13. Fujisawa Y, Kida K, Matsuda H (1984) Role of change in vitamin D metabolism with age in calcium and phosphorus metabolism in normal human subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 59:719-726
14. Gallagher JC, Riggs BL, Eisman J, Hamstra A, Arnaud SB, DeLuca HF (1979) Intestinal calcium absorption and serum vitamin D metabolites in normal subjects and osteoporotic patients: effect of age and dietary calcium. *J Clin Invest* 64:729-736

15. Graves KL, Wolinsky I (1980) Calcium and phosphorus metabolism in pregnant rats ingesting a high protein diet. *J Nutr* 110:2420-2432
16. Hegsted M, Linkswiler HM (1981) Long-term effects of level of protein intake on calcium metabolism in young adult women. *J Nutr* 111:244-251
17. Hegsted M, Schuette SA, Zemel MB, Linkswiler HM (1981) Urinary calcium and calcium balance in young men as affected by level of protein and phosphorus intake. *J Nutr* 111:553-562
18. Horst RL, DeLuca HF, Jorgensen NA (1978) The effect of age on calcium absorption and accumulation of 1,25-dihydroxy-vitamin-D<sub>3</sub> in intestinal mucosa of rats. *Metabolic Bone Dis Rel Res* 1:29-33
19. Howe JC, Beecher GR (1981) Effect of dietary protein and phosphorus levels on calcium and phosphorus metabolism of the young, fast growing rat. *J Nutr* 111:708-720
20. Howe JC, Beecher GR (1981) Effect of dietary protein and phosphorus levels on calcium and phosphorus metabolism of adult rats. *Nutr Rep Int* 24:919-931
21. Johnson NE, Alcantara EN, Linkswiler HM (1970) Effect of level of protein intake on urinary and fecal calcium and calcium retention of young adult males. *J Nutr* 100:1425-1430
22. Kim Y, Linkswiler HM (1979) Effect of level of protein intake on calcium metabolism and on parathyroid and renal function in the adult human male. *J Nutr* 109:1399-1404
23. Lau K, Wolf C, Nussbaum P, Weiner B, DeOreo P, Slatopolsky E, Agus Z, Goldfarb S (1979) Differing effects of acid versus neutral phosphate therapy of hypercalciuria. *Kidney Int* 16:736-742
24. Lemann J Jr., Litzow JR, Lennon EJ (1967) Studies on the mechanism by which chronic metabolic acidosis augments urinary calcium excretion in man. *J Clin Invest* 46:1318-1328
25. Lennon EJ, Lemann J Jr., Relman AS (1962) The effect of phosphoproteins on acid balance in normal subjects. *J Clin Invest* 41:637-645
26. Licata AA, Lantigua R, Amatruda J, Lockwood D (1981) Adverse effects of liquid protein fast on the handling of magnesium, calcium and phosphorus. *Am J Med* 71:767-772
27. Lüthy C, Moser C, Oetliker O (1977) Dreistufige Säure-Basen-Titration im Urin. *Med Laboratorium* 30:174-181
28. Ma RSW, Chan JCM (1973) Endogenous sulphuric acid production: A method of measurement by extrapolation. *Clin Biochem* 6:82-87
29. Robertson WG (1976) Urinary excretion. In: Nordin BEC (ed) *Calcium, Phosphate and Magnesium Metabolism. Clinical Physiology and Diagnostic Procedures*. Churchill Livingstone, Edinburgh London New York, S 113-161
30. Schubö W, Uehlinger H-M (1984) SPSS-X, Handbuch der Programmversion 2. Fischer-Verlag, Stuttgart
31. Schuette SA, Hegsted M, Zemel MB, Linkswiler HM (1981) Renal acid, urinary cyclic AMP, and hydroxyproline excretion as affected by level of protein, sulfur amino acid, and phosphorus intake. *J Nutr* 111:2106-2116
32. Schuette SA, Linkswiler HM (1982) Effects on Ca and P metabolism in humans by adding meat, meat plus milk, or purified proteins plus Ca and P to a low protein diet. *J Nutr* 112:338-349
33. Schuette SA, Zemel MB, Linkswiler HM (1980) Studies on the mechanism of protein-induced hypercalciuria in older men and women. *J Nutr* 110:305-315
34. Spencer H, Kramer L, DeBartolo M, Norris C, Osis D (1983) Further studies of the effect of a high protein diet as meat on calcium metabolism. *Am J Clin Nutr* 37:924-929
35. Spencer H, Kramer L, Osis D, Norris C (1978) Effect of phosphorus on the absorption of calcium and on the calcium balance in man. *J Nutr* 108:447-457

36. Walser M, Browder AA (1959) Ion association. III. The effect of sulfate infusion on calcium excretion. *J Clin Invest* 38:1404-1411
37. Whiting SJ, Draper HH (1980) The role of sulfate in the calciuria of high protein diets in adult rats. *J Nutr* 110:212-222
38. Whiting SJ, Draper HH (1981) Effect of chronic high protein feeding on bone composition in the adult rat. *J Nutr* 111:178-183
39. Wilkinson R (1976) Absorption of calcium, phosphorus and magnesium. In: Nordin BEC (ed) *Calcium, Phosphate and Magnesium Metabolism. Clinical Physiology and Diagnostic Procedures*. Churchill Livingstone, Edinburgh London New York, S 36-112
40. Yuen DE, Draper HH (1983) Long-term effects of excess protein and phosphorus on bone homeostasis in adult mice. *J Nutr* 113:1374-1380
41. Zemel MB (1985) Phosphates and calcium utilization in humans. In: Kies C (ed) *Nutritional Bioavailability of Calcium*. American Chemical Society (ACS), Symposium No. 275, S 29-39
42. Zemel MB, Linkswiler HM (1981) Calcium metabolism in the young adult male as affected by level and form of phosphorus intake and level of calcium intake. *J Nutr* 111:315-324
43. Zemel MB, Schuette SA, Hegsted M, Linkswiler HM (1981) Role of the sulfur-containing amino acids in protein-induced hypercalciuria in men. *J Nutr* 111:545-552
44. Zilversmit DB, Davis AK (1950) Microdetermination of plasma phospholipids by trichloroacetic acid precipitation. *J Lab Clin Med* 35:155-160

Eingegangen 19. August 1988

Für die Verfasser:

Dr. W. Schneider, Institut für Ernährungswissenschaft, Wilhelmstraße 20, 6300 Gießen, FRG