

Der Einfluß langfristig überhöhter Proteinzufuhr auf den Mineralstoffwechsel und die Nierenfunktion der Ratte II. Nierenfunktion und Knochenmineralisation

W. Schneider und E. Menden

Institut für Ernährungswissenschaft der Justus-Liebig-Universität Gießen

Zusammenfassung: Während die durchschnittliche tägliche Proteinzufuhr in der Bundesrepublik Deutschland um nahezu 100 % über der wünschenswerten Zufuhr liegt (0,8 g Protein/kg Körpergewicht), unterschreitet die Calciumversorgung in verschiedenen Altersgruppen die Empfehlungen. Eine durch überhöhte Proteinzufuhr ausgelöste Hyperkalziurie birgt insbesondere für ältere Menschen die Gefahr einer *Calciumauslagerung aus den Knochen* in sich, zumal altersbedingt die Resorptionsfähigkeit für das mit der Nahrung zugeführte Calcium nachläßt.

Die Ergebnisse des vorliegenden 2. Teils unserer Studie zeigen, daß als auslösender Faktor der Hyperkalziurie eine *veränderte Nierenfunktion* in Betracht zu ziehen ist. Eine Erhöhung des Proteinanteils in den Versuchsdieten von 13 über 26 auf 40 J% führte zu einer Steigerung der *Harnstoffausscheidung* im Urin und der Serum-Harnstoff-Konzentration, während die glomeruläre Filtrationsrate relativ unbeeinflusst blieb. Mit steigender Proteinzufuhr von 13 auf 40 J% und der daraus resultierenden vermehrten Säureproduktion und renalen Ausscheidung von Protonen (1. Teil der Studie) war die *tubuläre Rückresorptionsrate von Calcium signifikant um etwa 3 % erniedrigt*. Höhere Phosphorgehalte in der Nahrung verbesserten die Rückresorption sowohl von Calcium als auch von Magnesium.

Die Nieren protein- und phosphorreicher ernährter Tiere waren am Versuchsende *hypertrophisch vergrößert*; im histologischen Präparat zeigte sich bei diesen Tieren das Erscheinungsbild einer *Glomerulonephrose*. Während die *Calciumgehalte der Femora* bei Anhebung der Proteinzufuhr von 13 auf 40 J% geringfügig *abnahmen*, stiegen die *Magnesiumgehalte an* (nach 61 Wochen: Calcium von 261,4 auf 257,1 mg/g ffr. TS [$p \leq 0,05$]; Magnesium von 3,2 auf 3,5 mg/g ffr. TS [$p \leq 0,001$]).

Der Calcium- und Magnesiumstoffwechsel ist nicht nur abhängig von der Höhe der Proteinzufuhr, sondern auch von Wechselwirkungen mit dem Phosphorgehalt der Nahrung. Bei erhöhter Proteinzufuhr sollte insbesondere *im Alter ein gesteigerter Bedarf für Calcium, Phosphor und Magnesium* in Betracht gezogen werden.

Summary: In the Federal Republic of Germany the average daily protein intake exceeds the Recommended Dietary Allowances for adults (0.8 g protein/kg body weight) by about 100 %. On the other hand calcium intake is below the recommendations for certain age groups. Protein-induced hypercalciuria involves the risk of *depletion of skeletal calcium stores*, especially for older people who have a decreased absorption capacity for calcium.

As a result of our study we postulate, that an *altered renal function* probably is one inducing factor of hypercalciuria. While *urea excretion* and serum urea concentration increased with an elevated dietary protein content from 13 to 26 or 40 J%, glomerular filtration rate remained unchanged. *Fractional tubular reabsorption of calcium was significantly reduced by about 3 %* with increased endogenous acid

production and renal excretion of hydrogen ions (first part of the study), which were accompanying a higher protein intake of 40 J% compared to 13 J% protein in the control group. Increasing the phosphorus content of the diet improved the reabsorption of calcium and magnesium.

The kidneys of rats fed diets high in protein and phosphorus were hypertrophied. Histology of the kidneys showed signs of glomerulonephrosis. While the calcium content of the femora was slightly reduced with a higher protein intake of 40 compared to 13 J%, the magnesium content was increased (after 61 weeks: calcium from 261.4 to 257.1 mg/g dry fat-free wt [$p \leq 0.05$]; magnesium from 3.2 to 3.5 mg/g dry fat-free wt [$p \leq 0.001$]).

Calcium and magnesium metabolism depends not only on the level of protein intake, but also on its interrelation with the dietary phosphorus content. With continuous high protein intake higher intakes for calcium, phosphorus and magnesium should be recommended, especially for older people.

Schlüsselwörter: Proteinzufuhr, Calciumstoffwechsel, Magnesiumstoffwechsel, Knochenmineralisation, Nierenfunktion, tubuläre Rückresorption

Key words: protein intake, calcium metabolism, magnesium metabolism, bone mineralization, renal function, tubular reabsorption

Einleitung

Im I. Teil der Untersuchung über den Einfluß langfristig überhöhter Proteinzufuhr auf den Mineralstoffwechsel im Langzeittierversuch an Ratten wurde auf die Beteiligung der proteinabhängigen endogenen Säureproduktion und der renalen Ausscheidung von Protonen und Sulfat an der Entstehung einer Hyperkalziurie und auch -magnesiurie eingegangen (45).

Hierbei ist eine veränderte Nierenfunktion zumindest als ein auslösender Faktor in Betracht zu ziehen. Die Niere hat als Hauptaufgaben im Organismus neben der Ausscheidung von im Blut zirkulierenden, harnpflichtigen Stoffwechselendprodukten, insbesondere des aus dem Proteinkatabolismus stammenden Harnstoffs, die Regulation von Volumen und Osmolalität der Körperflüssigkeiten und des Säure-Basen-Gleichgewichts sowie die Biosynthese und Sekretion von Hormonen zu erfüllen. Änderungen der glomerulären Filtrationsrate und der tubulären Rückresorption können zu einer vermehrten Mineralstoffausscheidung im Urin führen.

Da der Organismus bemüht ist, die Calciumhomöostase aufrechtzuerhalten, birgt eine proteininduzierte Hyperkalziurie bzw. ein Calciumbilanzdefizit größeren Ausmaßes die Gefahr einer Calciumauslagerung aus den Knochen in sich (5, 6, 28, 32). Dies gilt insbesondere für ältere Menschen, für die die Proteinzufuhr andererseits an der oberen Grenze der wünschenswerten Zufuhr liegen sollte (21). Das Skelett kann als Mineralstoffreservoir zur Kompensation proteininduzierter Mineralstoffwechselstörungen beitragen und bei erhöhter endogener Säureproduktion Pufferkapazitäten (Karbonate und Phosphate) bereitstellen (34).

Im II. Teil der vorliegenden Langzeituntersuchung an alternden Ratten werden die Auswirkungen einer ständig überhöhten Proteinzufuhr auf die Nierenfunktion (einschließlich organischer Veränderungen) und die Knochenmineralisation dargestellt.

Material und Methoden

Grundlegende Einzelheiten zu den Versuchsdiäten, zur Versuchsdurchführung und zu den Bestimmungsmethoden wurden im I. Teil der Studie beschrieben (45), so daß hier nur die für diesen Teil spezifischen Verfahren angegeben werden. *Creatinin* im Serum und Urin wurde photometrisch nach der Methode von Jaffé, modifiziert nach Bartels und Böhmer (9), ohne Enteiweißung bestimmt. *Harnstoff* im Serum und Urin wird mit Urease zu Kohlendioxid und Ammoniak gespalten (Berthelot-Reaktion), das mit Phenol und Hypochlorit unter Bildung eines Farbstoffes reagiert (20).

Als *Nierenfunktionsparameter* wurden die *Glomeruläre Filtrationsrate* sowie die *Clearances* und die *renale tubuläre Rückresorption von Calcium und Magnesium* erfaßt. Unter der Glomerulären Filtrationsrate (GFR) versteht man das pro Zeiteinheit von den Nieren gebildete Filtratvolumen. Gebräuchlicherweise wird sie als die Clearance des im Organismus gebildeten und in konstanter Plasmakonzentration vorliegenden Creatinins ermittelt: $GFR = C_{Cr} = U_{Cr} \cdot V / S_{Cr}^1$.

Der Betrag der Calcium- bzw. Magnesium-Clearance gibt an, welches Serumvolumen pro Minute durch die Nieren von dem ultrafiltrierbaren Anteil des Elektrolyts vollständig befreit wird:

$$C_{Ca} = U_{Ca} \cdot V / UF_{Ca} \text{ und } C_{Mg} = U_{Mg} \cdot V / UF_{Mg}^1.$$

Eine Differenz zwischen Creatinin- und Calcium- bzw. Magnesium-Clearance muß der Clearance-Definition entsprechend auf die renale tubuläre Rückresorption des Elektrolyts zurückgeführt werden:

$$FTR_{Ca} = 100 \cdot (1 - C_{Ca} / C_{Cr}) \text{ und}$$

$$FTR_{Mg} = 100 \cdot (1 - C_{Mg} / C_{Cr})^1$$

Nach der Tötung wurden beide *Nieren* herauspräpariert, gewogen sowie makroskopisch und histologisch untersucht (Formaldehyd-Fixierung, aufsteigende Alkoholreihe, Paraffin-Einbettung, Hämalaun-Eosin-Übersichtsfärbung, Schnittstärke ca. 3 µm). Der *linke Femur* wurde allen am Versuchsende getöteten Tieren entnommen, von anhaftendem Binde- und Muskelgewebe gereinigt, gewogen, nach Erfassung von Dichte und Länge getrocknet, über 72 h einer Fettextraktion unter Rückfluß mit Petroläther (Siedebereich 40–60 °C) unterzogen und naß verascht, wie zuvor beschrieben (Teil I). Die Phosphor- und Magnesiumbestimmung entsprach dem für die übrigen Proben angewendeten Verfahren (Teil I). Calcium wurde als Calciumoxalat gefällt und dieses oxydimetrisch mit n/10 KMnO₄ umgesetzt.

Abweichend von den im I. Teil aufgeführten statistischen Methoden wurde für die Prüfung auf signifikante Unterschiede bei den Nierengewichten und der Analyse der Femora zusätzlich der t-Test nach Student angewendet. Signifikanzn werden angegeben mit $p \leq 0,05$ (*); $p \leq 0,01$ (**) und $p \leq 0,001$ (***).

Ergebnisse

Nierenfunktionsparameter

Ein quantitativer Einfluß der Proteinzufuhr auf die *Creatinin-Clearance*, die im Versuchverlauf parallel zur Creatinin-Ausscheidung im Harn anstieg, war nicht festzustellen. Allerdings war mit steigender Proteinzufuhr sowohl die *renale Calcium-Clearance erhöht* als auch die *tubuläre*

¹⁾ C_{Cr} = Creatinin-Clearance (ml/Minute); U_{Cr} = Creatinin im Urin (mg/ml); S_{Cr} = Creatinin im Serum (mg/ml); V = Urinvolumen (ml/Minute); C_{Ca} = Calcium-Clearance (ml/Minute); U_{Ca} = Calcium im Urin (mg/ml); UF_{Ca} = Ultrafiltrierbares (nicht proteingebundenes) Calcium im Serum (mg/ml); FTR_{Ca} = renale tubuläre Rückresorption von Calcium (%); für Magnesium gelten dem Calcium entsprechende Abkürzungen.

Calcium-Reabsorption herabgesetzt (IA–IIIA; Abb. 1). Ein erhöhter Phosphoranteil der Versuchsdiäten führte bei unseren Tieren zu einer deutlichen Verbesserung der Rückresorptionsraten sowohl für Calcium als auch für Magnesium (IIIB). Die höchste Magnesium-Rückresorption wurde bei einer gemeinsamen Erhöhung des Calcium- und Phosphoranteils beobachtet (IIID).

Die renale Harnstoffausscheidung, die parallel mit dem Lebensalter zunahm, sowie die Serum-Harnstoff-Konzentration stiegen bei Erhöhung der Proteinzufuhr signifikant an (Tab. 1).

Organbefunde

An den Nieren der Tiere, die nach 59–61 Wochen getötet wurden, war in wenigen Fällen, allerdings nur aus proteinreich ernährten Gruppen, Nephrolithiasis zu diagnostizieren (Mikrokalkablagerungen in den Sammelrohren und größere Ansammlungen von abgelagerten Calciumgriesen im Nierenbecken). Die relativen Nierengewichte zeigten mit steigender Proteinzufuhr eine Zunahme, die bei gleichzeitig hohem Phosphoranteil

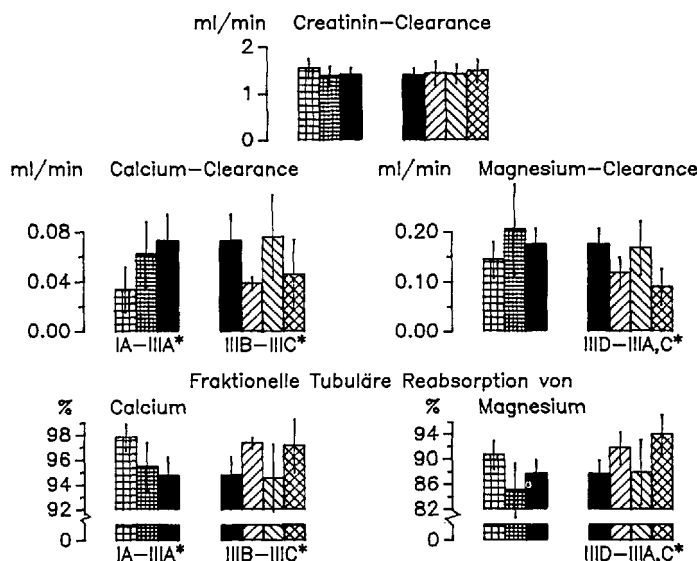


Abb. 1. Nierenfunktionsparameter männlicher Wistarratten (57.–61. Woche). Oben: Creatinin-Clearance (in ml/min). Mitte: Calcium- und Magnesium-Clearance (in ml/min). Unten: Fraktionelle tubuläre Rückresorption von Calcium und Magnesium (in %). Variation der Höhe des Proteinanteils der Diäten (Hauptproteinträger Casein) (jeweils links) und Variation des Calcium-Phosphor-Verhältnisses der Diäten bei hohem Proteinanteil von 40 J% (jeweils rechts).

- IA: 13 J% Prot.; Cas.
- IIA: 26 J% Prot.; Cas.
- IIIA: 40 J% Prot.; 0,6% Ca; 0,6% P; Cas.
- IIIB: 40 J% Prot.; 0,6% Ca; 1,2% P
- IIIC: 40 J% Prot.; 1,2% Ca; 0,6% P
- IIID: 40 J% Prot.; 1,2% Ca; 1,2% P

Tab. 1. Renale Harnstoffausscheidung (in mg/Tag) und Harnstoff im Serum (in mg/dl) männlicher Wistarratten in der 15.–17. und 57.–61. Woche der Aufnahme von Diäten mit unterschiedlichen Proteinzufuhrhöhen, Hauptproteinträgern und Calcium-Phosphor-Gehalten (Mittelwert \pm Standardabweichung).

Gruppe	Renale Harnstoffausscheidung		Serum-Harnstoff	
	15. Woche	57./58. Woche	16./17. Woche	59.–61. Woche
IA	384,1 \pm 63,5	655,4 \pm 68,1	25,5 \pm 2,7	22,9 \pm 4,0
IB	421,5 \pm 91,4	529,5 \pm 94,4	21,9 \pm 1,7	22,8 \pm 3,9
IIA	977,3 \pm 228,8	1348,8 \pm 235,5	26,3 \pm 2,3	26,5 \pm 2,1
IIB	913,3 \pm 49,9	1230,6 \pm 138,2	28,2 \pm 4,6	25,6 \pm 2,3
IIIA	1534,6 \pm 330,7	1771,5 \pm 334,4	35,2 \pm 4,6	29,7 \pm 4,0
IIIB	1611,8 \pm 159,4	1640,6 \pm 267,4	33,1 \pm 5,7	29,4 \pm 2,4
IIIC	1650,9 \pm 271,1	1578,9 \pm 419,2	33,2 \pm 5,8	32,3 \pm 4,7
IIID	1596,8 \pm 151,1	1632,8 \pm 336,5	33,1 \pm 4,0	29,7 \pm 5,8
$p \leq 0,001$	IA–IIIA	IA–IIA, IIIA IB–IIB		
$p \leq 0,01$	IIA–IA, IIIA			
$p \leq 0,05$	IB–IIB		IA–IIIA	IA–IIIA

in der Diät noch deutlicher ausfiel (IA–IIIA und IB–IIB; IIIA–IIIB; Tab. 2).

Die *histologischen Präparate der Nieren* wiesen zwar in geringer absoluter Häufigkeit – dafür aber durchweg in den Gruppen mit 26 und 40 J% Proteinanteil auftretend – neben Hypertrophien degenerative Veränderungen auf, die in der Literatur als Glomerulonephrose („progressive renal disease in rats“) beschrieben werden (17, 40) (Abb. 2 u. 3). Als qualitative Veränderungen waren hierbei hauptsächlich zu beobachten: *zystische Erweiterungen mit eosinophilen, proteinhaltigen (zylindrischen bzw.*

Tab. 2. Relative Nierengewichte männlicher Wistarratten in g/100 g Körpergewicht nach 59–61 Wochen der Aufnahme von Diäten mit unterschiedlichen Proteinzufuhrhöhen, Hauptproteinträgern und Calcium-Phosphor-Gehalten (Mittelwert \pm Standardabweichung; t-Test).

Gruppe	Nierengewicht
IA	0,45 \pm 0,03
IB	0,45 \pm 0,01
IIA	0,51 \pm 0,10
IIB	0,49 \pm 0,03
IIIA	0,54 \pm 0,06
IIIB	0,61 \pm 0,06
IIIC	0,57 \pm 0,07
IIID	0,58 \pm 0,06
$p \leq 0,001$	IA–IIIA IB–IIB
$p \leq 0,01$	IIIA–IIIB

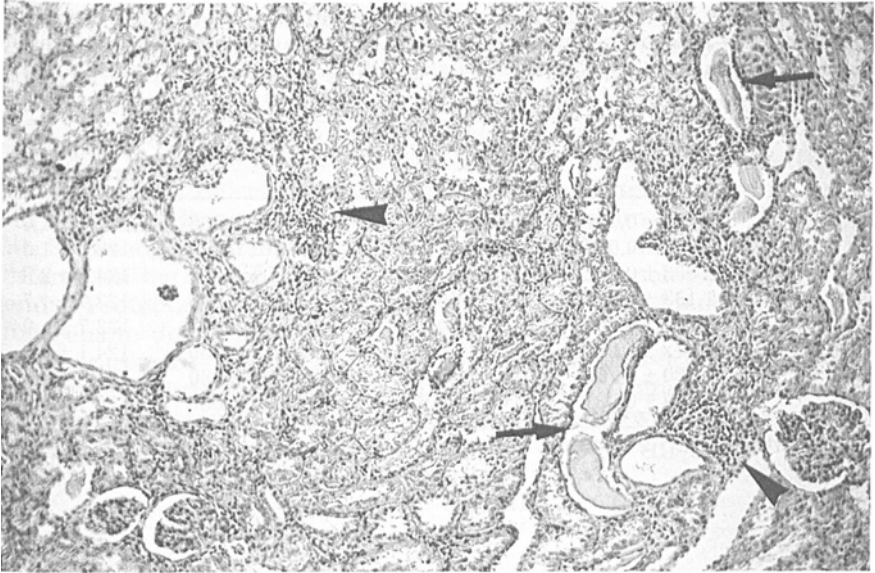


Abb. 2. Erweiterungen der Tubuli mit eosinophilen, zylindrischen Anordnungen (↗) und lymphozytäre Infiltrationen im Interstitium (▲); H & E; $\times 100$ (ohne Berücksichtigung der Photovergrößerung).

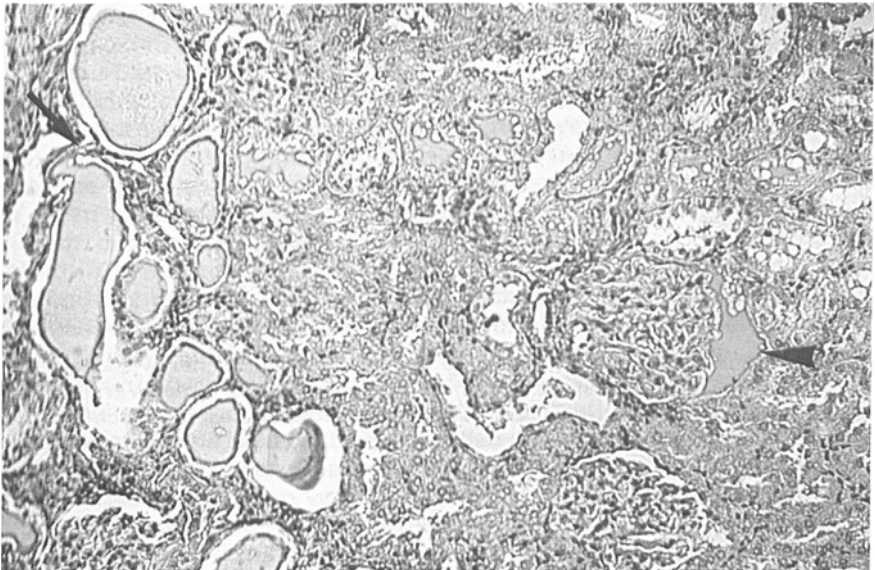


Abb. 3. Eosinophile Anordnungen in Tubuli (↗) und Glomeruli (▲); H & E; $\times 160$ (ohne Berücksichtigung der Photovergrößerung).

Tab. 3. Analyse der Femora männlicher Wistarratten nach 59–61 Wochen der Aufnahme von Diäten mit unterschiedlichen Proteinzufuhrhöhen, Hauptproteinträgern und Calcium-Phosphor-Gehalten (Mittelwert \pm Standardabweichung; t-Test).

Gruppe	Naßgewicht (g)	Trockengewicht (g)	Fettfreies TG (g)	Phosphor mg/g ffr. TS
IA	1,085 \pm 0,107	0,803 \pm 0,086	0,773 \pm 0,085	123,2 \pm 1,8
IB	1,040 \pm 0,076	0,775 \pm 0,045	0,740 \pm 0,048	123,8 \pm 1,5
IIA	1,083 \pm 0,092	0,787 \pm 0,048	0,767 \pm 0,061	124,0 \pm 2,3
IIB	1,133 \pm 0,082	0,842 \pm 0,064	0,801 \pm 0,056	123,7 \pm 1,7
IIIA	1,042 \pm 0,084	0,766 \pm 0,070	0,728 \pm 0,067	123,7 \pm 1,0
IIIB	1,012 \pm 0,062	0,728 \pm 0,057	0,703 \pm 0,056	124,1 \pm 1,7
IIIC	1,080 \pm 0,106	0,785 \pm 0,082	0,754 \pm 0,080	122,6 \pm 1,9
IIID	1,094 \pm 0,081	0,798 \pm 0,052	0,770 \pm 0,050	123,1 \pm 1,4
$p \leq 0,01$	IB–IIB	IB–IIB IIIB–IIID	IB–IIB IIIB–IIID	
$p \leq 0,05$	IIIB–IIID	IIA–IIB		

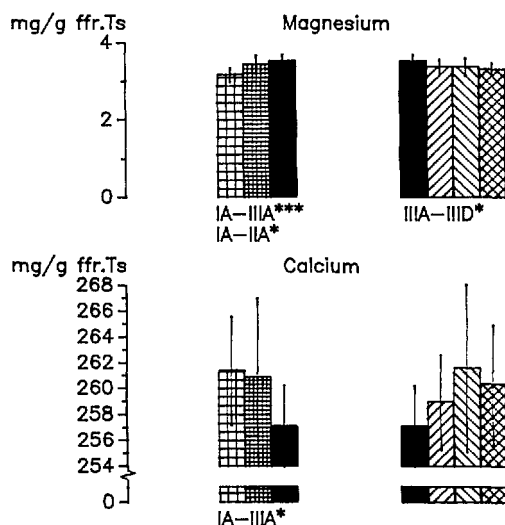


Abb. 4. Calcium- und Magnesiumgehalte der Femora männlicher Wistarratten in mg/g fettfreier Trockensubstanz nach 59–61 Wochen. Links: unter Variation der Höhe des Proteinanteils der Diäten (Hauptproteinträger Casein). Rechts: unter Variation des Calcium-Phosphor-Verhältnisses der Diäten bei hohem Proteinanteil von 40 J%.

- IA: 13 J% Prot.; Cas.
- IIA: 26 J% Prot.; Cas.
- IIIA: 40 J% Prot.; 0,6% Ca; 0,6% P; Cas.
- IIIB: 40 J% Prot.; 0,6% Ca; 1,2% P
- IIIC: 40 J% Prot.; 1,2% Ca; 0,6% P
- IIID: 40 J% Prot.; 1,2% Ca; 1,2% P

halbmondförmigen) Ablagerungen in den Tubuli bzw. Bowmanschen Kapseln; Veränderungen an den glomerulären Schlingen, die sich in proliferationsartigen Anlagerungen der Schlingen an die Kapselwand äußerten (sogenannte Schlingen-Kapsel-Synechien), und mononukleare, meist lymphozytäre Infiltrationen im Interstitium.

Bei den Femora ergaben sich Unterschiede im Naß- und (fettfreien) Trockengewicht zwischen den beiden fleischernährten Gruppen (IB–IIB) und denen mit Phosphor- und gleichzeitiger Calcium-Zulage (IIIB–IIID; Tab. 3). Bezogen auf ein relatives Körpergewicht von 100 g waren die Differenzen bei diesen Parametern allerdings nur noch gering. Mit steigender Proteinzufuhr war eine signifikante, geringe Abnahme der Calciumgehalte der Femora festzustellen, während die Magnesiumgehalte erhöht waren (IA–IIIA). Eine Steigerung des Calcium-/Phosphorgehaltes der Diäten führte zu einer Verminderung der Magnesiumgehalte der Femora. Bei diesen Veränderungen spielt möglicherweise der Austausch der zweiwertigen Kationen Calcium gegen Magnesium bei der Mineralisation des Knochens eine Rolle (Abb. 4).

Diskussion

In unserem Tierversuch bestand erwartungsgemäß eine positive Korrelation der Serumharnstoffkonzentration und der renalen Harnstoffausscheidung mit der Höhe der Proteinzufuhr. Bei fortwährender überhöhter Proteinzufuhr wird zur Lösung und Ausscheidung des überschüssig anfallenden Harnstoffs über die Niere eine größere Flüssigkeitsmenge benötigt, die durch eine gesteigerte Trinkwasseraufnahme ersetzt werden muß. Auch bei uneingeschränkter Trinkwasserversorgung hält der Anstieg der Harnstoffausscheidung nicht mit der Harnstoffbelastung Schritt, so daß eine permanente Erhöhung der Serumharnstoffkonzentration die Folge ist (15). Eine proteininduzierte Harnstoff-Diurese wird als wesentlicher Erklärungsfaktor für die Hyperkalziurie diskutiert (11, 53). Die mit der vermehrten Wasserausscheidung verbundene sinkende Konzentration von Calcium und auch Magnesium in der tubulären Flüssigkeit soll eine herabgesetzte Rückresorption dieser Elektrolyte bewirken und zu deren gesteigerter Ausscheidung im Urin führen (13, 36).

Nach der Hyperfiltrationstheorie von Brenner et al. (14) führt eine ständig überhöhte Proteinzufuhr zu einer länger anhaltenden höheren Nierendurchblutung, einer erhöhten glomerulären Filtrationsrate und einer Dauerbeanspruchung aller Glomeruli. Hierdurch soll ein intrarenaler Hochdruck entstehen, der über eine progressive glomeruläre Sklerose eine allmähliche Einschränkung der Nierenfunktion verursachen kann.

Parallel zu einer erhöhten glomerulären Filtrationsrate, mit der gleichzeitig die filtrierte Calciummenge zunimmt, wurde in einer Reihe von Untersuchungen zur proteininduzierten Hyperkalziurie eine verminderte tubuläre Rückresorption von Calcium beschrieben und als Hauptursache für die Hyperkalziurie verantwortlich gemacht (3, 5, 27, 28, 32, 48, 57). Die in diesen Studien durchschnittlich beobachteten Änderungen der Nierenfunktionsparameter – eine um 10 % gesteigerte glomeruläre Filtrationsrate und eine gleichzeitig um ca. 1 % verminderte tubuläre Rückresorptionsrate – könnten beim Menschen hochgerechnet zu einer Mehrausscheidung

von etwa 100 mg Calcium/Tag führen. In unserem Tierexperiment war ein Anstieg der glomerulären Filtrationsrate zwar nicht festzustellen, doch war bei Steigerung der Proteinzufuhr von 13 auf 40 J% (Caseingruppen) zu allen Meßzeitpunkten eine signifikante Abnahme der Calcium-Rückresorption um ca. 3 % nachweisbar. Auch die Rückresorption von Magnesium war um etwa 1 bis 3 % reduziert, wenn auch nicht signifikant.

Eine Beeinflussung der Nierenfunktion, insbesondere der renalen tubulären Rückresorption, kann durch einen proteininduzierten Anstieg der Sulfatausscheidung – möglicherweise über eine Komplexierung des Calciums bzw. Magnesiums im Urin – oder aber durch die aus der Verstoffwechselung des neutralen Nahrungsschwefels resultierende, ähnlich wie in einem Zustand der metabolischen Acidose erhöhte, Säurebelastung der Tubuluszellen hervorgerufen werden (16, 45, 48, 53).

Änderungen der glomerulären Filtrationsrate und/oder der tubulären Rückresorptionsrate von Calcium sind daher neben oder in Kombination mit den durch die renale Säure- und Sulfatausscheidung vermittelten Einflüssen als wesentliche, direkte Faktoren der Entstehung einer proteininduzierten Hyperkalziurie anzusehen. Für Magnesium als ebenfalls zweiwertigem Kation ist ein entsprechender Mechanismus anzunehmen. Hingegen wird die Miteinbeziehung hormoneller Regulationsmechanismen (von Parathormon und $1,25\text{-(OH)}_2\text{-Cholecalciferol}$) bislang noch widersprüchlich diskutiert (1, 27, 32, 35, 44, 47, 48).

Erhöhte Nierengewichte nach hoher Protein- (und/oder Phosphor-) Zufuhr wurden entsprechend den Befunden unseres Langzeittierversuchs bei Ratten und Mäusen verschiedentlich auch schon über kürzere Untersuchungszeiträume beobachtet und als Adaptation an eine gesteigerte Harnstoff- und Säureproduktion im Sinne einer Arbeitshypertrophie bzw. funktionellen Hypertrophie interpretiert (15, 29, 54, 56). Die erhöhten Nierengewichte sind in Verbindung zu sehen mit einer Änderung der glomerulären Filtrationsrate. Die durch einen steigenden glomerulären Filtrationsdruck und eine erhöhte Durchblutung der Glomeruli verursachte Hyperfiltration kann selbst die Ursache für eine veränderte glomeruläre Morphologie sein (30).

Die *Glomerulonephrose* stellt die bedeutendste Form einer Nierenerkrankung bei erwachsenen und alten Ratten dar (17, 40), bei der Schädigungen der Glomeruli und Tubuli auftreten, die von entzündlichen Infiltrationen im Interstitium begleitet sein können. (Glomerulo-)Nephrose bezeichnet eine zunächst degenerative Veränderung der Niere, bei der es in Verbindung mit chronischen Änderungen der Tubulifunktion (bsw. der Konzentrations- oder Resorptionskapazität bei Hyperkalziurie, renaler Tubulusacidose und/oder Harnstoff-Diurese) und der Glomerulipermeabilität (Hyperfiltration, Hypertension, Proteinakkumulation und Proteinurie) zu einer Obstruktion (Verstopfung) des Tubuluslumens durch hyperplastische bzw. abgestoßene Tubuli-Epithelzellen, Eiweißkolloide und/oder Kalkpräzipitate und zu zystischen Erweiterungen kommt. Mit zunehmendem Schweregrad können Tubuliatrophien und sklerotische Veränderungen der Glomeruli sowie sekundär durch ins Gewebe eindringenden Harn interstitielle Entzündungen verursacht werden (interstitielle Nephritis mit mononuklearen, lymphozytären Infiltrationen) (17, 22, 37, 46). Die Entwicklung der Glomerulonephrose bei der Ratte kann durch

proteinreiche Diäten, insbesondere bei Ad-libitum-Fütterung, beschleunigt werden und frühzeitiger auftreten. Hierbei spielt allerdings das Alter der Tiere eine Rolle, da schwere Fälle nur selten bei unter einem Jahr alten Ratten beschrieben wurden (17, 22).

In unserem Versuch waren die Nieren proteinreich ernährter Tiere mit ausgeprägter Glomerulonephrose stark vergrößert und schwerer. Neben den aufgeführten histologischen Befunden konnten wir im Extremfall „strumöse Degenerationen“ („strumöse Tubulusveränderungen“, „Strumafeld-Kolloidbildungen“) beobachten, d. h. in Gruppen zusammengelegene, ausgeweitete Tubuli, angefüllt mit kolloidähnlichen, eosinophilen Massen, die ihren Namen aus ihrer morphologischen Ähnlichkeit mit Resorptionsvakuolen in Schilddrüsenfollikeln erhielten (24, 25, 46).

Kalkablagerungen in den Nieren sind keine außergewöhnliche Begleiterscheinung der Glomerulonephrose bei Ratten. Wir konnten nur bei wenigen Tieren aus proteinreich ernährten Gruppen Nephrolithiasis durch makroskopischen Befund bzw. im histologischen Bild (Mikro-) Kalkablagerungen in Nierenbecken und Sammelrohren beobachten. Kalkablagerungen im Lumen und den Epithelzellen der Sammelgefäße sowie im benachbarten Interstitium werden auch in Verbindung mit einer Phosphorretention, exzessiver Kalziurie und einem sekundären Hyperparathyreoidismus gebracht (17). Eine überhöhte Zufuhr an Calcium und Phosphor mit der Nahrung wird ebenfalls als Ursache dieser Ablagerungen angesehen. Die Tatsache, daß Calcium und Phosphor ausfallen, sobald ihr Löslichkeitsprodukt überschritten wird, ist ein bedeutender Faktor bei der Kalzifizierung weicher Gewebe (10, 19, 49). An Ratten und Mäusen wurde aber auch beobachtet, daß eine erhöhte Aufnahme von Protein oder schwefelhaltigen Aminosäuren vor einer Kalzifizierung der Nieren schützt, möglicherweise dadurch, daß die proteininduzierte, erhöhte renale Säureausscheidung über eine Senkung des Urin-pH-Wertes die Löslichkeit von Calciumphosphatkristallen erhöht bzw. überschüssig sezernierte Protonen an Phosphat gebunden werden und dadurch dessen Präzipitation mit Calcium verhindern (23, 56). Beim Menschen ist eine bestehende Hyperkalziurie aber oft ein Faktor bei der Entstehung einer Nephrolithiasis (43).

In unserer Untersuchung beobachteten wir mit steigender Proteinzufuhr signifikant geringere Calciumgehalte der Femora bei gleichzeitiger Erhöhung des Magnesiumgehaltes. Whiting und Draper (54) fanden hingegen keine Unterschiede in den Magnesiumgehalten der Femora, Tibiae und Mandibulae zweier Versuchstiergruppen, die 13 bzw. 30 J% Protein in der Diät erhielten. Im menschlichen Skelett befinden sich ca. 30 % des gesamten Magnesiums in einem begrenzten austauschbaren Pool an der Knochenoberfläche, die restlichen 70 % sind als Bestandteil kristalliner Strukturen oder von Proteinen in den Knochen integriert (26). Möglicherweise kommt es unter den Bedingungen einer überhöhten Proteinzufuhr zu einem Austausch der zweiwertigen Kationen Calcium gegen Magnesium im verfügbaren Mineralstoffpool der Knochenoberfläche (Hydrathülle) oder zu einer Substitution im Apatitkristall bereits bei der Mineralisation neugebildeter Knochensubstanz. Das Ca^{2+} -Ion kann den Knochen durch einen Austausch gegen Na^{+} -, H_3O^{+} - und Mg^{2+} -Ionen verlassen, ohne von Phosphor begleitet zu werden (41). In Erwägung zu ziehen ist auf-

grund seiner Verknüpfung als Kofaktor mit dem Proteinstoffwechsel allerdings auch eine Einlagerung des Magnesiums in neugebildete organische Knochensubstanz.

Nach Meinung verschiedener Autoren ist der Alterungsprozeß bei Ratten und Mäusen verknüpft mit der Entwicklung osteoporotischer Veränderungen am Skelett, die Analogien zur beim Menschen beobachteten Erkrankung aufweisen (7, 19, 49). Unter proteinreicher Ernährung wurden Knochendemineralisierungen bzw. abnehmende Calciumgehalte der Knochen beobachtet (8). Andere Arbeitsgruppen konnten unter Berücksichtigung verschiedener biochemischer und physiologischer Parameter keine eindeutige Beeinträchtigung des Knochencaiumstoffwechsels nachweisen (4, 11, 16, 51, 54). Möglicherweise wirkt sich eine erhöhte Proteinzufuhr bei Ratten nur bei gleichzeitig inadäquater (Phosphor- und) Calciumaufnahme negativ auf das Skelett aus, wenn trotz maximaler intestinaler Absorption und minimaler fäkaler Calciumausscheidung keine Kompensation einer proteininduzierten Hyperkalziurie möglich ist (11, 18, 55). Weiss et al. (52), die anhand von Knochengewebsimplantaten die Beeinflussung des Knochenwachstums bei jungen Ratten durch einen extrem hohen Proteinanteil von 80 verglichen mit 20 J% in der Diät untersuchten, führten Veränderungen am Skelett nicht auf eine erhöhte Knochenresorption, sondern auf eine mangelhafte Knochenbildung bzw. -umbildung zurück, die durch eine herabgesetzte Verfügbarkeit des Calciums für die Mineralisation verursacht wurde.

In Untersuchungen am Menschen konnte bezüglich eines negativen Einflusses überhöhter Proteinzufuhr auf den Knochenstoffwechsel keine Übereinstimmung erzielt werden, vor allem anhand des Parameters Hydroxyprolin, dessen vermehrte Ausscheidung im Urin als Anzeichen eines Kollagenabbaus im Sinne einer Knochenresorption zu werten ist (5, 32, 47). Eine gemeinsam mit der Proteinzufuhr erhöhte Phosphoraufnahme minderte aber neben der Hyperkalziurie ggf. auch die Hydroxyprolinausscheidung und führte zu einer Verbesserung negativer Calcicumbilanzen bzw. zu einer reduzierten Calciumauslagerung aus dem Skelett (47).

Hinsichtlich der Auswirkungen auf den Knochenstoffwechsel kommt dem durch einen hohen Fleischverbrauch gekennzeichneten Proteinanteil in der menschlichen Ernährung insofern besondere Bedeutung zu, als hierbei neben dem säureproduzierenden Anteil insbesondere das Calcium-Phosphor-Verhältnis der zugeführten Nahrung eine Rolle spielt. Unabhängig von der Säurebildungskapazität der Nahrung kann es auch zu einem phosphorinduzierten Knochenkatabolismus kommen. Bei alternden Eskimos, bei denen der in der Hauptsache aus Fleisch bestehende Proteinverzehr punktuell – abhängig von der Verfügbarkeit – 200 bis 400 g/Tag betragen kann, wurden außergewöhnlich hohe Knochensubstanzverlusten festgestellt (38, 39, 42). Ein zugunsten des Phosphors verschobenes Calcium-Phosphor-Verhältnis der Nahrung kann im Sinne eines sekundären Hyperparathyreoidismus über ein (kurzfristiges) Absinken des ionisierten Serumcalciums parathormonvermittelt zu einer gesteigerten Osteolyse und einem Abbau von Knochensubstanz und damit verbunden zu einer beschleunigten Freisetzung von Calcium aus dem Skelett führen, um die Calciumhomöostase im Blut wiederherzustellen (7,

19, 31, 33, 49, 50). Allerdings sind neben dem Calcium-Phosphor-Verhältnis auch die absoluten Calcium- und Phosphoranteile der Diäten von entscheidender Bedeutung. Bei Ratten und Mäusen, die langfristig Calcium und Phosphor in verschiedenen Kombinationen und Anteilen im Futter erhielten, traten in Abhängigkeit vom Alter Knochensubstanzverluste auf bei Phosphorgehalten von 0,6 % und mehr in der Diät, unabhängig davon, ob das Calcium-Phosphor-Verhältnis 2:1 oder 1:1 lautete, d. h. also auch bei adäquater Calciumversorgung (7, 12, 19, 33, 49, 50). In einer Studie an alten Mäusen wurde die Knochenresorption insbesondere durch Diäten gefördert, die entweder wenig Calcium ($< 0,6\%$) oder viel Phosphor ($> 0,6\%$) enthielten. Allein ein Calciumgehalt von 1,2 % und ein Phosphoranteil von 0,6 % in der Diät wirkte sich begünstigend auf die Knochenmineralisierung aus (49). Dies spricht dafür, daß höhere Calciumzufuhr einen positiven, überhöhte Phosphorzufuhr einen negativen Einfluß auf den Knochen hat.

Derartige Einflüsse des Nahrungsphosphors auf den Knochenstoffwechsel konnten wir in unserem Langzeittierversuch nicht bestätigen. Hingegen waren mit steigender (Calcium- und/oder) Phosphorzufuhr abnehmende Magnesiumgehalte in den Femora unserer Versuchstiere zu beobachten. Die geringere Verfügbarkeit des Magnesiums für die Mineralisation des Knochens ist sicherlich aber schon in einer verringerten intestinalen Magnesiumabsorption begründet, die auf die Anwesenheit größerer Mengen an Calcium und Phosphat im Verdauungstrakt zurückgeführt werden kann.

Im Alter auftretende Knochensubstanzverluste und -demineralisationserscheinungen besitzen multifaktorielle Kausalität. Exzessive Protein- und/oder Phosphorzufuhr tragen hierzu bei, wenn auch die Art und Weise ihres Beitrags aufgrund differierender Befunde bei Mensch und Versuchstier noch nicht vollständig geklärt ist. Bei einer Calciumaufnahme mit der Nahrung, die ständig weniger als 50 % der wünschenswerten Zufuhr beträgt, verbunden mit einem ungünstigen Calcium-Phosphor-Verhältnis, ist auch beim Menschen mit negativen Auswirkungen auf den Knochenmetabolismus zu rechnen (2). Bei erhöhter Proteinzufuhr scheint, besonders im Alter, gleichzeitig der Bedarf für Calcium, aber auch für Phosphor gesteigert zu sein, da hierdurch günstige Mineralisierungsbedingungen für die Erhaltung einer Homöostase des Skelettstoffwechsels geschaffen werden. In diesem Zusammenhang muß zwangsläufig aber auch ein erhöhter Bedarf für Magnesium in Betracht gezogen werden.

Literatur

1. Adams ND, Gray RW, Lemann J jr (1979) The calciuria of increased fixed acid production in human: Evidence against a role for parathyroid hormone and $1,25(\text{OH})_2$ vitamin D. *Calcif Tiss Int* 28:233-238
2. Albanese AA (1983) Calcium nutrition throughout the life cycle. *Bibl Nutr Dieta* 33:80-99
3. Allen LH, Bartlett RS, Block GD (1979) Reduction of renal calcium reabsorption in man by consumption of dietary protein. *J Nutr* 109:1345-1350
4. 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

5. Allen LH, Oddoye EA, Margen S (1979) Protein-induced hypercalciuria: a longer term study. *Am J Clin Nutr* 32:741-749
6. Anand CR, Linkswiler HM (1974) Effect of protein intake on calcium balance of young men given 500 mg calcium daily. *J Nutr* 104:695-700
7. Anderson GH, Draper HH (1972) Effect of dietary phosphorus on calcium metabolism in intact and parathyroidectomized adult rats. *J Nutr* 102:1123-1132
8. Anderson JJB, Smith JC jr, Beecher GR (1980) Long-term loss of bone mineral in rats fed high protein diets. *Calc Tiss Int* 31:51
9. Bartels H, Böhmer M (1971) Eine Mikromethode zur Kreatininbestimmung. *Clin Chim Acta* 32:81-85
10. Bauer KD, Griminger P (1983) Long-term effects of activity and of calcium and phosphorus intake on bones and kidneys of female rats. *J Nutr* 113:2011-2021
11. 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
12. Bell RR, Tzeng DYM, Draper HH (1980) Long-term effects of calcium, phosphorus and forced exercise on the bones of mature mice. *J Nutr* 110:1161-1168
13. Better OS, Gonick HC, Chapman LC, Varrady PD, Kleeman CR (1966) Effect of urea-saline diuresis on renal clearance of calcium, magnesium and inorganic phosphate in man. *Proc Soc Exp Biol Med* 121:592-596
14. Brenner BM, Meyer TW, Hostetter TH (1982) Dietary protein intake and the progressive nature of kidney disease: the role of hemodynamically mediated glomerular injury in the pathogenesis of progressive glomerular sclerosis in aging, renal ablation, and intrinsic renal disease. *N Engl J Med* 307:652-659
15. Brod B (1979) Entwicklung verschiedener Parameter des Lipid- und Proteinstoffwechsels bei langfristiger Verabreichung von Kostformen mit unterschiedlicher Nährstoffrelation an Ratten. Inaugural-Dissertation, Fachbereich Ernährungswissenschaften der Justus-Liebig-Universität Gießen
16. 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
17. Casey HW, Ayers KM, Robinson FR (1978) The urinary system. In: Benirschke K, Garner FM, Jones TC (eds) *Pathology of laboratory animals*, Vol I + II. Springer Verlag, New York Heidelberg Berlin, S 115-173
18. Denis G, Kuczerpa A, Nikolaiczuk N (1973) Stimulation of bone resorption by increasing dietary protein intake in rats fed diets low in phosphorus and calcium. *Can J Physiol Pharmacol* 51:539-548
19. Draper HH, Sie T-L, Bergan JG (1972) Osteoporosis in aging rats induced by high phosphorus diets. *J Nutr* 102:1133-1141
20. Fawcett JK, Scott JE (1960) A rapid and precise method for the determination of urea. *J Clin Pathol* 13:156-159
21. Gersovitz M, Motil K, Munro HN, Scrimshaw NS, Young VR (1982) Human protein requirements: assessment of the adequacy of the current Recommended Dietary Allowances for dietary protein in elderly men and women. *Am J Clin Nutr* 35:6-14
22. Goldstein RS, Tarloff JB, Hook JB (1988) Age-related nephropathy in laboratory rats. *FASEB J* 2:2241-2251
23. Goulding A, Malthus RS (1970) Effects of the protein content of the diet on the development of nephrocalcinosis in rats. *Aust J Exp Biol Med Sci* 48:313-320
24. Hartig F, Hebold G (1977) The influence of diet on the growth of streptozotocin-induced renal tumours in Sprague-Dawley rats. *IRCS Medical Sci* 5:530
25. Hartig F, Hebold G, Czerwek H (1971) Die „strumöse Degeneration“ der Rattenniere (Häufigkeit und Lokalisation). *Berl Münch Tierärztl Wschr* 11:213-216
26. Heaton FW (1981) Magnesium relations with parathyroid hormone, calcitonin and bone. *Magnesium-Bull* 1a:67-72

27. 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
28. 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
29. Hiller HH, Dietzel-Röhl L (1978) Einfluß der Proteinquantität im Futter auf die Körpergewichtsentwicklung und Nierengewichte bei Ratten. *Z Versuchstierkunde* 20:260-267
30. Hostetter TH, Olson JL, Rennke HG, Venkatachalam MA, Brenner BM (1981) Hyperfiltration in remnant nephrons: a potentially adverse response to renal ablation. *Am J Physiol* 241:F85-93
31. Jowsey J, Reiss E, Canterbury JM (1974) Long-term effects of high phosphate intake on parathyroid hormone levels and bone metabolism. *Acta Orthop Scand* 45:801-808
32. 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
33. Krishnarao GVG, Draper HH (1972) Influence of dietary phosphorus on bone resorption in senescent mice. *J Nutr* 102:1143-1145
34. Lemann J jr, Litzow JR, Lennon EJ (1966) The effects of chronic acid loads in normal man: further evidence for the participation of bone mineral in the defense against chronic metabolic acidosis. *J Clin Invest* 45:1608-1614
35. Licata AA (1981) Acute effects of increased meat protein on urinary electrolytes and cyclic adenosine monophosphate and serum parathyroid hormone. *Am J Clin Nutr* 34:1779-1784
36. Massry SG (1981) Role of hormonal and non-hormonal factors in the control of renal handling of magnesium. *Magnesium-Bull* 1a:277-281
37. Maxie MG (1985) The Urinary System. In: Jubb KVF, Kennedy PC, Palmer N (eds) *Pathology of Domestic Animals*, Vol 2. Academic Press, Orlando, S 343-411
38. Mazess RB, Mather W (1974) Bone mineral content of North Alaskan Eskimos. *Am J Clin Nutr* 27:916-925
39. Mazess RB, Mather W (1975) Bone mineral content in Canadian Eskimos. *Hum Biol* 47:45-53
40. Newberne PM (1978) Nutritional and metabolic diseases. In: Benirschke K, Garner FM, Jones TC (eds) *Pathology of Laboratory Animals*, Vol I + II. Springer Verlag, New York Heidelberg Berlin, S 2153-2154
41. Parfitt AM (1976) The actions of parathyroid hormone on bone: relation to bone remodeling and turnover, calcium homeostasis and metabolic bone diseases. Part II of IV parts: PTH and bone cells: Bone turnover and plasma calcium regulation. *Metabolism* 25:908-955
42. Pawson IC (1974) Radiographic determination of excessive bone loss in Alaskan Eskimos. *Hum Biol* 46:369-380
43. Robertson WG, Heyburn PJ, Peacock M, Hanes FA, Swaminathan R (1979) The effect of high animal protein intake on the risk of calcium stone-formation in the urinary tract. *Clin Sci* 57:285-288
44. Schneider W (1987) Über den Einfluß langfristig überhöhter Proteinzufuhr auf die Entwicklung verschiedener Parameter des Mineralstoffwechsels und der Nierenfunktion. Inaugural-Dissertation, Fachbereich Ernährungswissenschaften der Justus-Liebig-Universität Gießen
45. Schneider W, Menden E (1988) 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. *Z Ernährungswiss* 27:170-185

46. Schubert GE (1984) Niere und ableitende Harnwege. In: Remmele W (Hrsg) Pathologie, Band 3. Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York Tokyo, S 1-129
47. 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
48. 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
49. Shah BG, Krishnarao GVG, Draper HH (1967) The relationship of Ca and P nutrition during adult life and osteoporosis in aged mice. *J Nutr* 92:30-42
50. Sie T-L, Draper HH, Bell RR (1974) Hypocalcemia, hyperparathyroidism and bone resorption induced by dietary phosphate. *J Nutr* 104:1195-1201
51. van Beresteijn ECH, Visser RM (1983) Effect of type and amount of protein in the diet on bone metabolism. *Zuivelzicht* 75:279-281
52. Weiss RE, Gorn A, Dux S, Nimni ME (1981) Influence of high protein diets on cartilage and bone formation in rats. *J Nutr* 111:804-816
53. Whiting SJ, Draper HH (1980) The role of sulfate in the calciuria of high protein diets in adult rats. *J Nutr* 110:212-222
54. Whiting SJ, Draper HH (1981) Effect of chronic high protein feeding on bone composition in the adult rat. *J Nutr* 111:178-183
55. Widhe T (1981) Effects of dietary protein and calcium on the skeleton of undernourished young rats. *Z Ernährungswiss* 20:107-118
56. Yuen DE, Draper HH (1983) Long-term effects of excess protein and phosphorus on bone homeostasis in adult mice. *J Nutr* 113:1374-1380
57. 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

Eingegangen 19. August 1988

Für die Verfasser:

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

Die vorliegende Arbeit (Teil I und II) wurde mit Mitteln des Bundesministers für Forschung und Technologie unter dem Förderkennzeichen 0704729/0 gefördert.