

Interventionsstudie zur Wirksamkeit der Stutenmilch als Diätetikum für Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen

R. Schubert¹, C. Kahle¹, E. Kauf², I. Hobert², J. Hofmann², B. Gruhn², R. Häfer², H. Vogelsang³

Friedrich-Schiller-Universität Jena, ¹Lehrstuhl für Ernährungsphysiologie, ²Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, ³Institut für klinische Immunologie

Vortrag zum 39. DGE-Kongress 14.-15.03.2002 in Jena

Einleitung

Über diätetische Wirkungen der SM wird seit mehr als 3000 Jahren berichtet, zuerst in China, später in Eurasien und Europa, in den letzten 50 Jahren auch in Deutschland.

Verschiedene Inhaltsstoffe und immunologisch wirksame Komponenten (Lysozym, Lactoferrin, sekretorischem IgA) legen bakterizide Eigenschaften und diätetische Wirkungen nahe:

Lysozym löst Bakterienzellwände auf

Lactoferrin (proteasestabil) behindert die Eisenversorgung der Mikroorganismen

slgA (proteasestabil) bewirkt Agglutination von Mikroorganismen

In Europa wird die Stutenmilch zur Therapieunterstützung nur vereinzelt verwendet:

- geringe Anzahl an gesicherten Studien (Placebo-kontrolliert, doppelblind)
- hoher Preis (> 8 € je Liter).

Es gibt bislang nahezu keine Publikationen über den Einfluß der Stutenmilch auf die Stoffwechsellage und intestinale Bedingungen oder über eine therapieunterstützende Wirkung bei speziellen Erkrankungen (z.B. Magen- und Darmerkrankungen).

Ziele

In Voruntersuchungen wurde der Gehalt an inflammatorisch aktiven Fettsäuren im Jahresverlauf und die bakterizide Wirkung der Stutenmilch untersucht.

Hauptziel der Arbeit war es, anhand einer placebokontrollierten Interventionsstudie die diätetische Wirkung der Stutenmilch bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen nachzuweisen.

Die chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (Morbus Crohn, Colitis ulcerosa) erschienen für eine klinische Überprüfung der Wirksamkeit besonders geeignet. Einerseits nimmt bei einer Trinkkur (Intervention) die geschädigte Darmmukosa mit der Stutenmilch direkten Kontakt und kann so funktionell gefördert werden. Andererseits können die bakteriziden Eigenschaften und immunologisch wirksamen Komponenten sowohl den intestinalen als auch den intermediären Immunschutz verstärken.

Als Ursachen für entzündliche Veränderungen der Darmschleimhaut kommen eine Vielzahl von Möglichkeiten in Betracht:

- Infektion durch obligat enteropathogene Bakterien und Parasiten
- entzündliche Vorgänge (Histamin-Ausschüttungen, Nahrungsmittelallergie)
- chronisch entzündliche Darmerkrankungen (Colitis ulcerosa, Morbus Crohn), ausgelöst u.a. durch
 - bakterielle (Mykobakterien, Listerien) und virale Infektionen
 - genetische Disposition.

Bei vielen dieser Störungen im Darm könnten bakterizide und immunschutzverstärkende Eigenschaften der SM zur Wirkung gelangen.

Methode

Eigenschaften der Stutenmilch

Fettsäuren:

Zur Extraktion des Rohfettes aus dem gefriergetrockneten Stutenmilchpulver diente die Methode nach SOXHLET. Die Extraktion erfolgte am SOXTHERM mittels Petrolether.

Um die einzelnen Fettsäuren bestimmen zu können erfolgte eine Umesterung:

- 100 mg des Rohfettes wurden eingewogen und mit 5 ml n-Hexan und 500 µl Natriummethylat versetzt
- nach der stattgefundenen Umesterung diente NaHSO₄ zur Neutralisation
- anschließend wurden die Proben bei 5000 U/min für 5 min zentrifugiert.

Aus dem Überstand wurden, unter Verwendung der Gaschromatographie (GC) und eines Flammenionisationsdetektors die Fettsäuren bestimmt.

Parameter der GC:

- Säule: DB 225 / 30 m
- Trägergas: Wasserstoff
- Ofentemperatur: 70°C
- Säulentemperatur: 180-230°C
- Flow-Rate: 1,5 ml/min.

4.2.4. Hemmtest

Der Nachweis von Hemmstoffen in der Stutenmilch wurde mittels Agardiffusionstest durchgeführt. Hierfür wurden ausgewählte Bakterienstämme in spezifischen Agar-Lösungen suspendiert und in Platten gegossen (**Tab. 1**).

Die erstarrten Platten erhielten gestanzte Löcher mit einem Durchmesser von 0,8 cm. Als Doppelbestimmung wurden 100 µl der jeweiligen Stutenmilchprobe in die Vertiefungen einpipettiert.

Die gefrorenen Milchproben wurde kurz vor dem Einpipettieren im Wasserbad aufgetaut. Das Stutenmilchpulver wurde im Verhältnis 1:10 mit aqua dest. verdünnt, um die ursprüngliche Konzentration an Trockensubstanz in der Milch wiederherzustellen.

Tabelle 1: Parameter des Hemmtests

Bakterienstamm ¹⁾	Nährboden	Bebrütung
Bacillus subtilis	Agar (ph 6,0)	30°C für 12 Stunden
Bacillus subtilis	Agar (ph 7,2)	30°C für 12 Stunden
Bacillus subtilis	Agar (ph 8,0)	30°C für 12 Stunden
Bacillus stearothermophilus	Brillant-Schwarz-Agar	65°C für 3 Stunden
Escherichia coli	Agar	37°C für 12 Stunden
Staphylococcus epiderm- etes	Blut-Agar (5% Hammel- blut)	30°C für 48 Stunden
Proteus vulgaris	Blut-Agar (5% Hammel- blut)	30°C für 48 Stunden
Shigella flexneri	Blut-Agar (5% Hammel- blut)	30°C für 48 Stunden

1) Charakteristik der Keime

<i>Bacillus subtilis</i>	<i>vorgeschrieben für Hemmtest (Milch), verbreitet, spricht auf viele Antibiotika an</i>
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	<i>hitze liebend, 64 °C, in Milch, potentiell pathogen</i>
<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Schmutzkeim, auch im Darm, potentiell pathogen</i>
<i>Shigella flexneri</i>	<i>Darmkeim, bei LM-Vergiftungen (Ruhr-Auslöser)</i>
<i>Staphylococcus epidermetes</i>	<i>Darmkeim, potentiell pathogen</i>
<i>E.coli</i>	<i>vorgeschrieben für Hemmtest, potentiell pathogen</i>

Zum Vergleich kamen Kuhmilchproben zum Einsatz:

- Rohmilch (Kuhmilch 1)
- pasteurisierte Frischmilch 3,8 % Fett (Kuhmilch 2 +3)

Als Positivkontrolle dienen die Antibiotika Penicillin und Streptomycin.

Die Ausprägung der Hemmhöfe wurde vom äußeren Rand des gestanzten Loches bis zum äußeren Rand der Hemmzone gemessen.

Interventionsstudie

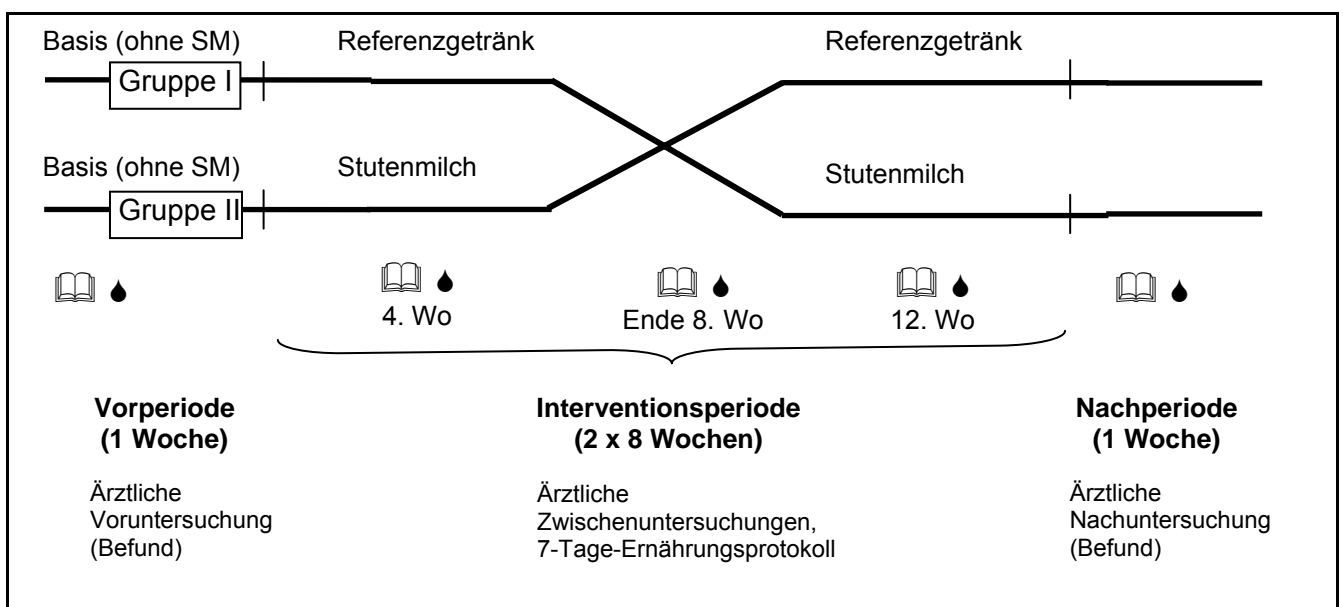
Design

An der placebokontrollierten Doppelblindstudie mit Cross-over-Design (**Abb. 1**) nahmen acht Morbus Crohn (3 männliche, 5 weibliche) und neun Colitis ulcerosa (4 männliche, 5 weibliche) Patienten teil. Das Alter der Probanden lag zwischen 12 und 21 Jahren. Lediglich eine Probandin mit Morbus Crohn war zum Zeitpunkt der Studie 50 Jahre alt. Probanden, die sich zu Beginn der Interventionsstudie in einem Rezidiv befanden oder eine Lactoseintoleranz hatten, durften an der Studie nicht teilnehmen.

Die Interventionsstudie wurde als placebokontrollierte Doppel-Blindstudie im Cross-Over-Design durchgeführt. Vor Beginn der Studie wurden die Patienten auf ihren Gesundheitsstatus untersucht. Danach folgte eine Interventionsperiode von 2 x 8 Wochen mit täglicher Einnahme von 250 ml Stutenmilch bzw. 250 ml Referenzgetränk (Placebo). Das Placebo war ein milchähnliches Getränk, das auf der Basis von hypoallergener Säuglingsnahrung in der institutseigenen Lehrküche hergestellt wurde.

Patienten mit Laktoseintoleranz oder mit Rezidiv unmittelbar vor Beginn der Studie waren ausgeschlossen

Die Interventionsstudie war von der Ethik-Kommission der Friedrich-Schiller-Universität Jena genehmigt.



📖 Befund, 🩸 Blutentnahme, SM Stutenmilch

Abbildung 1: Design der Interventionsstudie

Untersuchungen

Ernährung

Die Probanden führten ein 7-Tage-Ernährungsprotokoll. Eine Lebensmittelwaage wurde zur Verfügung gestellt.

Befindlichkeit

Während der gesamten Studie wurde von den Probanden ein Befindlichkeitsprotokoll geführt. Täglich wurden erfaßt: Anzahl und Konsistenz der Stühle, Blut im Stuhl, Bauch bzw. Unterleibsschmerzen, Gewichtsveränderungen, extraintestinale Beschwerden und allgemeines Wohlbefinden.

Labor- und klinische Parameter

Befund: Allgemein und krankheitsspezifisch, Exploration von Morbus Crohn bzw. Colitis ulcerosa (Score: Crohn-Aktivitätsindex nach Best, Colitis-ulcerosa-Aktivitätsindex nach RACHMILEWITZ 1989).

Blut: Fettsäurespektrum der Erythrozytenmembran, IgA, IgM (humoral), IgG, Chemo-gramm, Albumine, großes Blutbild, CRP (C-reaktives Protein), Blutsenkungsgeschwindigkeit, Phagozytose, Burst-Aktivität (neutrophile Granulozyten)

Harn: Status (Glucose, Ketonkörper, Protein, Nitrit, pH-Wert)

Stuhl: α_1 -AT (Antitrypsin; enteraler Proteinverlustmarker).

Phagozytose: Phagozytoseaktivität der Granulozyten ermittelt, die Escherichia coli phagozytierten. Der Normalwert liegt zwischen 90 und 100 %.

Burst-Aktivität (neutrophile Granulozyten): Prozentsatz oxidierender Granulozyten (burst), wobei die Umwandlung eines fluorogenen Substrates nach Stimulation mit unmarkierter Escherichia coli unter dem Einfluss freigesetzter Sauerstoffradikale gemessen wird. Der Normalwert liegt zwischen 90 - 100 %.

Harn-Status:

Glucose Normalwert liegt unter 0,84 mmol/l (<150 mg/l).

Ketonkörper Erfassung einer gesteigerten Lipolyse; Normal: keine

Protein Normalwert unter 100 mg pro Tag

Nitrit Auftreten nitritbildender Bakterien wie z.B. E. coli: Normal negativ.

pH-Wert normal 5,0-7,0. (Azidosen / Alkalosen verändern ihn)

Statistische Methoden

Die Signifikanzprüfung erfolgte mittels SPSS 10.0 (ANOVA, CHI-Quadrat, lineare Regression). Bei der Prüfung der Daten des Befindlichkeitsprotokolls mittels Chi-Quadrat-Test wurden die täglich aufgezeichneten Angaben verwendet (Basis Patiententage).

Ergebnisse - Eigenschaften der Stutenmilch

Der Fettgehalt der Frischmilchproben betrug im Mittel $0,63 \pm 0,17$ % und korrelierte nicht mit dem Laktationsstadium. In den Monaten Juli bis November enthielt das Stutenmilchfett von 25 auf 8 % sinkende Anteile an α -Linolensäure, das n6:n3-Verhältnis verminderte sich von 1:2,8 auf 1:0,9. Es bestand jeweils ein signifikanter saisonaler Einfluß (**Tab. 2**). Der Anteil an Linolsäure im Stutenmilchfett betrug im Untersuchungszeitraum weniger als 10 %, der an Arachidonsäure lag stets unter 0,1 %. Mit fortschreitendem Vegetationsstadium verminderte sich der Anteil an PUFA, was überwiegend durch die Linolensäure bewirkt wurde.

Die bakterizide Wirkung der Stutenmilch konnte gegen *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, *Proteus vulgaris*, *Shigella flexneri* und *Staphylococcus epidermetes* nachgewiesen werden (**Tab. 3**), nicht jedoch gegen *Escherichia coli*. Ein saisonaler Einfluß bestand nicht. Kuhmilch besaß im Vergleich dazu keine bakteriziden Eigenschaften.

Tabelle 2: Anteile an Linol-, Linolen- und Arachidonsäure in Stutenmilch

(% der FAME; je Monat 3 Proben aus Sammelgemelken von 16 Stuten)

	Jul	Aug	Sept	Okt	Nov
Linolsäure ($\omega 6$)	9,03	7,31	7,13	9,64	8,21
s \pm	0,18	0,02	0,03	0,06	0,02
Linolensäure ($\omega 3$)	25,31	17,72	23,01	11,51	7,62
s \pm	0,48	0,12	0,06	0,02	0,00
Arachidonsäure ($\omega 6$)	0,08	0,06	0,00	0,06	0,07
s \pm	0,01	0,01	0,00	0,01	0,00
$\omega 6 : \omega 3$	1 : 2,8	1 : 2,4	1 : 3,2	1 : 1,2	1 : 0,9
Kuhmilch	1 : 0,25				

Jul - Sept: Weide, Okt - Nov: Stallfütterung

Herkunft Stutenmilch: Haflinger Gestüt Meura

Fett: $0,7 \pm 0,2$ % - unabhängig vom Laktationsstadium

Der Anteil an Linolensäure korrelierte mit der Jahreszeit ($r = -0,89$; $p < 0,01$), nicht aber der Anteil an Linolsäure.

Ergebnisse - Interventionsstudie: allgemein

Die enteralen Beschwerden waren unter SM-Einnahme geringer (Prüfparameter für Signifikanz: Patiententage mit Schmerzen bzw. Blut im Stuhl):

• *Morbus Crohn*

- sehr starke abdominellen Schmerzen hatten bei SM nur 0,5 % der Patienten gegenüber 3 % bei Placebo ($p < 0,01$).

Tabelle 3: Hemmhofgrößen von Stuten- und Kuhmilch (mm)

Proben	Bacillus subtilis			Bacillus stearo-thermophilus	Proteus vulgaris	Shigella flexneri	Staphylococcus epi-dermetes
	ph 6,0	ph 7,2	ph 8,0				
SM gefroren	0,52	1,45	0,21	2,21	0,71	0,52	0,71
SM getrock-net	0,40	1,65	0,30	2,10	0,65	0,75	1,00
Kuhmilch frisch	0	0	0	0	0	0	0
<i>Kontrolle</i>							
Penicillin	8,25	.	.	.	7,75	.	3,25
Streptomycin	2,50	9,00	7,25

SM Stutenmilch

• **Colitis ulcerosa**

- die Beschwerden nahmen in den letzten vier Wochen der SM-Einnahme ab ($p < 0,05$)
- der sichtbare Blutanteil im Stuhl verminderte sich von 8 % auf 4 % ($p < 0,01$)
- der okkulte Blutanteil im Stuhl sank von 13 % auf 10 % ($p = 0,16$)

Die extraintestinalen Beschwerden (z.B: *Haut, Mundschleimhaut*) bei M. Crohn waren bei SM um 20 % geringer ($p < 0,001$; Prüfparameter für Signifikanz: Anzahl Patiententa-ge mit Beschwerden; **Abb. 2**). Deutliche Verbesserungen wurden insbesondere beim Hautbild sowie bei den Entzündungen der Mundschleimhaut erzielt. Letztere waren nach der Stutenmilchintervention völlig ausgeheilt.

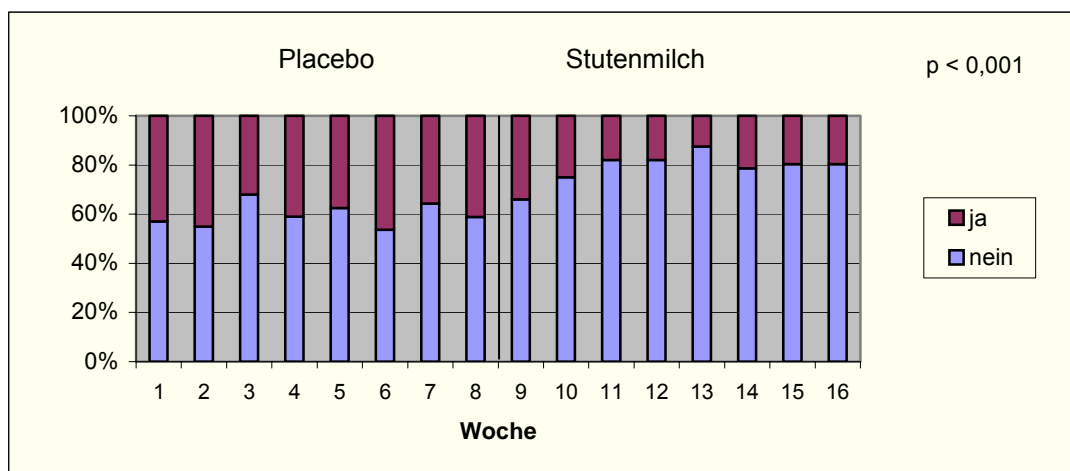


Abbildung 2: Extraintestinale Beschwerden bei Morbus Crohn Patienten (n=8)

Bei den **Colitis ulcerosa** Patienten zeigte sich, daß lediglich in den letzten vier Wochen der Stutenmilchperiode die extraintestinalen Beschwerden gegenüber den letzten vier Placebowochen signifikant abnahmen ($p < 0,001$; Prüfparameter für Signifikanz: Anzahl Patiententage mit Beschwerden; **Abb. 3**), was ein Hinweis auf eine erforderliche Adaptation an die Stutenmilch ist. Bei diesen Patienten wurden besonders Hauterscheinungen, Gelenkschmerzen und Anarisse positiv beeinflusst.

Ergebnisse medikamentös

- Unter Placebo mußten fünf Patienten wegen schlechtem Befinden eine höhere Medikamentendosis erhalten.
- Während der SM-Periode betraf dies nur einen Patienten
- dieses Ergebnis war statistisch nicht gesichert ($p = 0,07$; Prüfparameter für Signifikanz: Patiententage mit höherer Medikamentendosis), konnte aber als deutlich positive Tendenz gewertet werden.

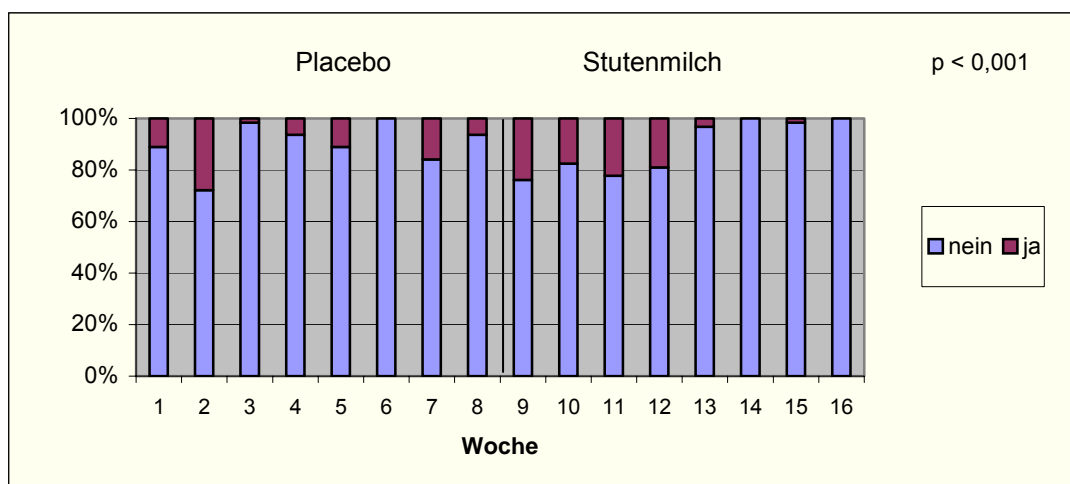


Abbildung 3: Extraintestinale Beschwerden bei Colitis ulcerosa Patienten (n=9)

Ergebnisse klinisch

- Die Parameter in Blut, Urin und Stuhl blieben nahezu unbeeinflusst,
- das traf auch zu auf
 - immunologische Parameter (z.B. Phagozytostest, Oxydativer Burst, Ig)
 - α 1-Antitrypsin (Entzündungsmarker).
- Grund: Patienten waren durch medikamentöse Therapie stabilisiert (?)

Resümee

- Stutenmilch verbesserte die Befindlichkeit der Patienten z.T. signifikant
- paraklinische Parameter blieben nahezu unbeeinflusst
- dies wird auf medikamentöse Stabilisierung zurückgeführt
- möglicherweise sind zur Beeinflussung paraklinischer Parameter höhere tägliche Dosen an Stutenmilch und/oder eine längere Anwendungsdauer erforderlich
- weitere Studien sind notwendig.

Die Autoren bedanken sich besonders bei:

- allen Patienten für ihre über 16wöchige Bereitwilligkeit und Ausdauer
- den Schwestern der gastroenterologischen Sprechstunde der Kinderklinik
- dem Laborpersonal der Kinderklinik, der Immunologie und des Thüringer Medizinal-, Lebensmittel- und Veterinäruntersuchungsamtes
- den Mitarbeitern des Haflinger Gestüt Meura für die Bereitstellung der Stutenmilch

Anschrift des Erstautors:

Friedrich-Schiller-Universität, Biologisch-Pharmazeutische Fakultät, Institut für Ernährungswissenschaften, LS Ernährungsphysiologie, Dornburger Straße 24, 07743 Jena; Tel.: 03641 949610, Fax: 03641 949612, e-mail: b6rasc@uni-jena.de, <http://www.uni-jena.de/biologie/ieu/ew/>

Gefördert durch: Thüringer Ministerium für Landwirtschaft, Naturschutz und Umwelt