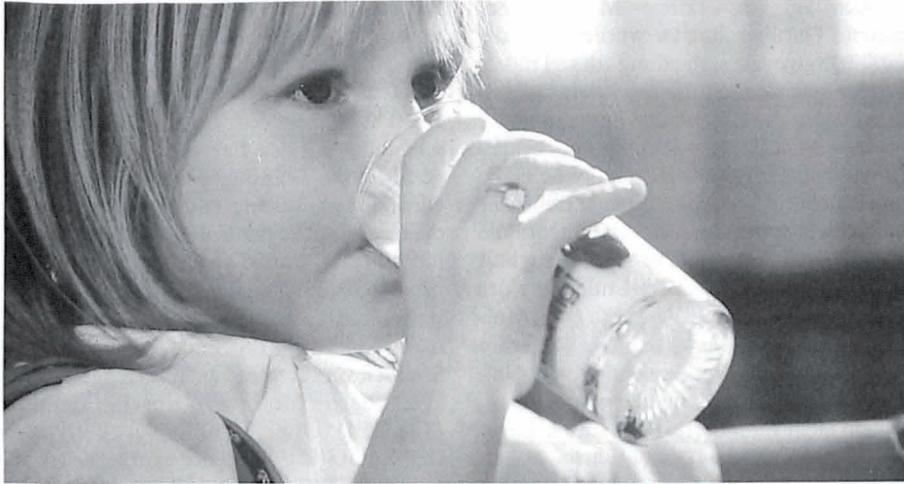


Opiate aus Milch zur Behandlung von Diarrhoen

Natürliche Heilstoffe in der Milch / Von Hannelore Daniel



Diarrhoen können besonders für Säuglinge und Kleinkinder auch heute noch gefährlich werden.

Foto: Institut für Milchwirtschaft

Diarrhoen sind für Säuglinge und Kleinkinder, insbesondere in Ländern der dritten Welt, auch heute noch lebensbedrohliche Erkrankungen. Die Ursachen dieser Durchfälle liegen überwiegend in bakteriellen und viralen Infektionen des Gastrointestinaltrakts. Dabei wirken zum Beispiel die Toxine pathogener Keime direkt auf den intestinalen Ionen-transport und damit auf die Wasserresorption.

Unter physiologischen Bedingungen reguliert der Dünndarm wechselnd große Flüssigkeitsvolumina, die auch hinsichtlich des osmotischen und des pH-Wertes unterschiedlich sein können. Neben exogen zugeführter Flüssigkeit von täglich etwa 2–4 Litern sind es ca. 8 Liter Flüssigkeit pro Tag aus körpereigenen Quellen, die fast vollständig von der Darmschleimhaut resorbiert werden. Die Wasserresorption hängt osmotisch von der Resorption der Elektrolyte, insbesondere von Natriumchlorid, ab. Durch die Aufnahme von Natriumchlorid erhöht sich der osmotische Wert (Osmolarität) im Gewebe, wodurch Wasser verstärkt aufgenommen wird. Das Natriumchlorid wird an der luminalen Membran der Epithelzellen durch zwei gekoppelte sog. elektroneutrale Antiportsysteme (= Gegen-transport-Systeme) aufgenommen: den Na^+/H^+ -Antiporter und den $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Antiporter (Abb. 1). Neben Natriumchlorid

sind es auch die Nichtelektrolyte der Nahrung, wie Glucose und Aminosäuren, deren Resorption eine osmotisch bedingte Aufnahme von Wasser herbeiführt.

Sekretions- und Resorptionsprozesse werden u. a. durch die Konzentration zyklischer Nucleotide (c-AMP, c-GMP) in den Epithelzellen des Darmes reguliert. Bei einer Vergiftung zum Beispiel mit Cholera-Toxin oder mit E.coli-Toxinen kommt es zu einer Veränderung des intrazellulären Spiegels dieser zyklischen Nucleotide: c-AMP bei Cholera-Toxin und c-GMP bei einem gereinigten Toxin von E.coli, dem sog. STa-Toxin. Ein erhöhter Nucleotidspiegel führt zu einer Sekretion von Chloridionen in den Darm, wodurch sich die elektrochemische Potentialdifferenz (Abb. 1) verändert und damit die Aufnahme insbesondere von Natriumchlorid stark vermindert wird. Dies bewirkt, daß aus osmotischen Gründen Wasser in den Darm abgegeben und der Darminhalt mehr oder weniger stark verdünnt wird. Als weitere Folge kommt es zu einer starken Steigerung der Bewegung von Magen und Darm, der sog. Motilität, die ihrerseits das Ausmaß der Diarrhoe erhöht.

Zur Therapie von Diarrhoen werden häufig synthetische opiatähnliche Verbindungen, wie zum Beispiel das Pharmakon Loperamid verwendet. Opiate binden an spezifi-

sche Rezeptoren des Nervengewebes der Darmschleimhaut. Sie hemmen damit die Motorik des Darmes und fördern die Elektrolyt- und Wasserresorption. Dieses therapeutische Prinzip wurde bereits sehr früh, durch Verabreichung der Tinctura Opii, zur Behandlung von Diarrhoen ausgenutzt.

Von Victor Brantl und Hansjörg Teschemacher, jetzt Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie der Universität Gießen, wurden 1979 erstmals opioidaktive Peptide beschrieben, die aus β -Casein, einer Eiweißfraktion der Milch, freigesetzt werden können. Sie wurden als β -Casomorphine bezeichnet. Noch im selben Jahr wurde die Struktur dieser Opiode publiziert. Beispielsweise befindet sich das β -Casomorphin 8 in der Sequenz des bovinen β -Casein an den Positionen 61–67.

Ein Charakteristikum der β -Casomorphine ist die wechselnde Anordnung der Prolinreste im Molekül, die dem Peptid eine hohe Resistenz gegenüber eiweißabbauenden Enzymen verleiht. Die Aufspaltung der Prolin enthaltenden Dipeptidbindungen wird durch spezifische Enzyme, wie das sog. „post-prolin-cleaving enzyme“ oder die Dipeptidyl-Peptidase 4, katalysiert. Die Abspaltung einzelner Aminosäuren vom C-terminalen Ende der Sequenz führt zu Peptiden mit unterschiedlicher Opiatwirksamkeit.

Die β -Casomorphine binden überwiegend an die μ -Opiatreceptoren verschiedener Zelltypen und rufen charakteristische Wirkungen hervor. Zu den klassischen Opiatwirkungen, u. a. auch des Morphins, zählen neben der Analgesie (Schmerzstillung) insbesondere auch die bereits erwähnten Effekte auf die gastrointestinale Motilität und den Elektrolyttransport der Dünndarmschleimhaut.

Wir prüften in tierexperimentellen Untersuchungen inwieweit oral aufgenommenes Casein bzw. synthetische β -Casomorphine in der Lage sind, klassische Opiatwirkungen im Gastrointestinaltrakt zu entfalten. Dazu wurde an Säuglingsratten zum einen die Wirkung dieser Substanzen auf die gastrointestinale Motilität und zum anderen auf die intestinale Wasserresorption untersucht.

Wirkung von β -Casein und β -Casomorphinen auf die Darmmotorik

Als Testnahrungen verwendeten wir entweder isoliertes Kuhmilch- β -Casein (CasN) oder Molkenprotein (MpN) in Form von Suspensionen mit jeweils 20 mg Protein pro Milliliter. Diesen Suspensionen wurde radioaktives Cerium (^{141}Ce) zugesetzt, das im Gastrointestinaltrakt nicht resorbiert wird. Durch Messen der vom ^{141}Ce ausgesandten Gammastrahlung läßt sich auf diese Weise der Weg des Speisebreis leicht verfolgen und damit die Kinetik der Magenentleerung und die Dauer der Darmpassage bestimmen. Wurde die Wirkung der synthetischen β -Casomorphine untersucht, so wurden sie stets dem Molkenprotein zugesetzt und die Kontrolltiere erhielten die entsprechende Menge an Molkenprotein.

Die Nahrungssuspensionen wurden noch

nicht entwöhnten Ratten mit einem Körpergewicht von 25–30 g mittels einer Schlundsonde verabreicht. Danach wurde die Entleerung des ^{141}Ce aus dem Magen zu verschiedenen Zeiten durch eine für das Versuchstier schmerzfreie Methode bestimmt. Darüber hinaus wurde auch die zeitabhängige Ausscheidung des Tracers (^{141}Ce) mit dem Stuhl registriert. Abbildung 2 zeigt die Kinetik der Entleerung des Tracers nach Verabreichung der beiden Testnahrungen, jeweils mit und ohne Gabe von Naloxon. Naloxon ist ein spezifischer Opiatrezeptor-Antagonist und hebt die Opiatwirksamkeit auf. Die Abbildung läßt eine signifikant langsamere Entleerung der Caseinsuspension im Vergleich zur Molkenproteinsuspension erkennen. Weiterhin zeigt sie, daß die Verabreichung von Naloxon die Entleerungskinetik beim Molkenprotein nicht veränderte. Beim Casein dagegen

führte es ab etwa der 40. Minute zu einer signifikant beschleunigten Ent-

leerung. Aufgrund dieses Befundes kann angenommen werden, daß aus dem Casein nicht aber dem Molkenprotein – nach der Entleerung aus dem Magen opiataktive Substanzen freigesetzt wurden. Diese durch die Proteinverdauung im Darm entstandenen Peptide wirkten rückkoppelnd hemmend auf die weitere Entleerung des Speisebreis aus dem Magen.

Die Passagezeit des Tracers bis zur Ausscheidung mit den Faeces, die wir als Magen-Rektum-Transitzeit bezeichnen, war ebenfalls signifikant länger bei Verabreichung der Caseinnahrung (Abb. 3). Auch hier führte Naloxon nur beim Casein zu einer Beschleunigung der Passage. Die Halbwertszeit der Entleerung wurde durch Naloxon von $10,8 \pm 1,8$ Stunden auf $5,9 \pm 1,0$ Stunden verkürzt und entsprach damit dem Wert nach Molkenproteinverabreichung (Tabelle 1).

Der Zusatz verschiedener synthetischer β -Casomorphine deren Struktur in Tabelle 2 dargestellt ist, führte bei β -Casomorphin-4-Amid zu einer leichten Beschleunigung der

Die intestinale Elektrolyt- und Wasserresorption

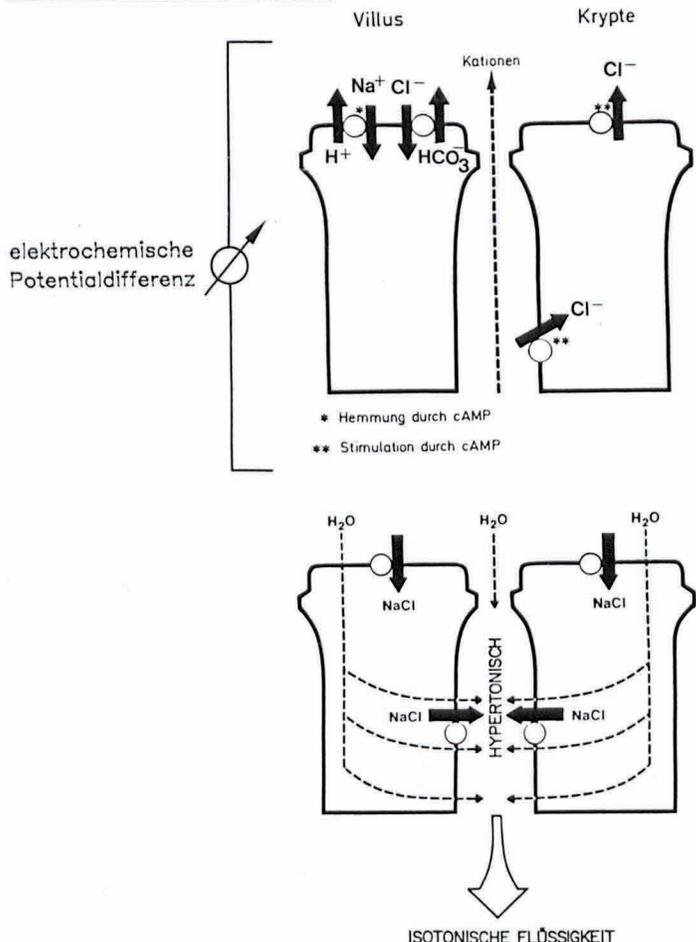


Abb. 1: Die Resorption von NaCl erfolgt an der luminalen Membran der Epithelzellen durch zwei Antiportsysteme. Nach der Abgabe des NaCl in den Interzellularraum bewirkt der angestiegene osmotische Wert die Aufnahme von Wasser. Zyklische Nucleotide (z. B. c-AMP) fördern die Chloridsekretion und verändern dadurch die elektrochemische Potentialdifferenz. Es kommt zu einer Hemmung der NaCl-Resorption, wodurch kein Wasser mehr resorbiert wird und eine Diarrhoe entsteht.

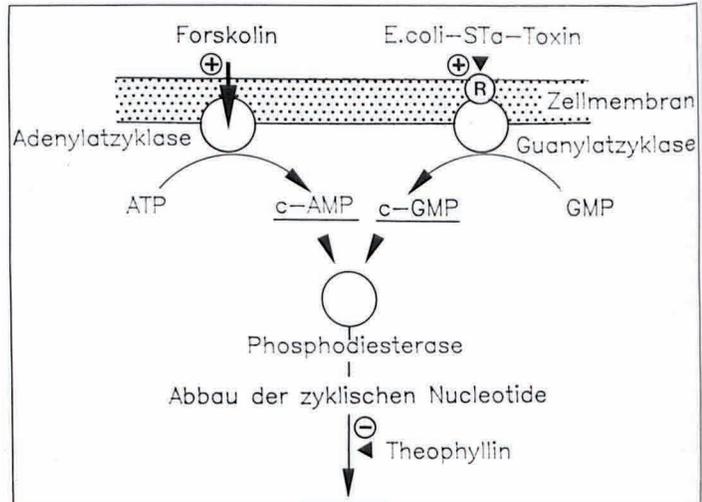


Abb. 4: Stoffwechsel der zyclischen Nucleotide unter der Wirkung positiver Effektoren (Forskolin, E. coli-Sta-Toxin) und negativer Effektoren (Theophyllin).

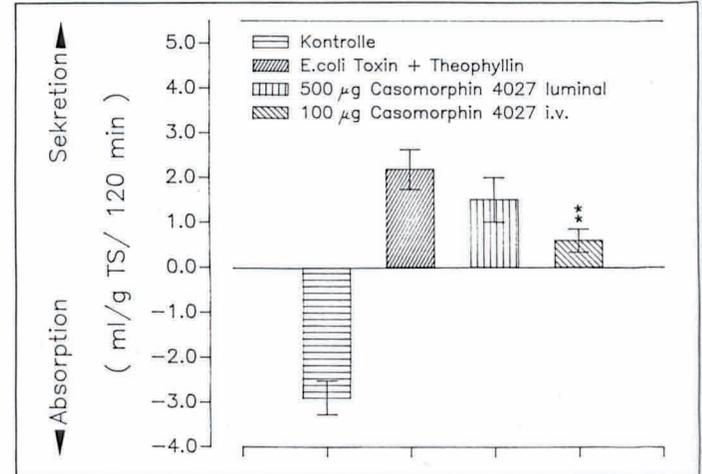


Abb. 5: Wirkung von β -Casomorphin 4027 auf eine c-GMP vermittelte Sekretion im Ileum $x \pm \text{sem}$, 20–24 Loops.

Tabelle 1: Halbwertszeiten der gastrointestinalen Passage bei der Ratte

Molkenprotein	6,5 ± 1,1 h
Molkenprotein + Naloxon	7,2 ± 1,6 h
Casein	10,8 ± 1,8 h
Casein + Naloxon	5,9 ± 1,0 h
MP + β -CM-4-Amid	4,7 ± 0,8 h
MP + β -CM-(D-Ala ^{2,4})-4-Amid	7,9 ± 1,5 h
MP + β -CM-(D-Ala ^{2,4})-5-Amid	11,8 ± 2,0 h

Passage, bei β -Casomorphin (D-Ala²)-4-Amid und (D-Ala^{2,4})-5-Amid (Derivat 4027) zu einer dosisabhängigen Hemmung der Passage (siehe Tabelle 1). Diese synthetischen, mit D-Alanin substituierten β -Casomorphine, zeichnen sich durch eine noch höhere Proteasenstabilität aus, als die natürlichen β -Casomorphine, die aus dem Abbau des Caseins stammen. Durch Zusatz von 5 mg β -Casomorphin (D-Ala^{2,4})-5-Amid zur Molkenproteinsuspension wurde deren Passagezeit der einer Caseinnahrung angeglichen. Die Tabelle 1 zeigt die Halbwertszeiten der Entleerung des Tracers nach Verabreichung der verschiedenen Testsuspensionen. Es wird deutlich, daß das Naloxon die Entleerung des Caseins der des Molkenproteins angleicht. Umgekehrt dazu vermögen verschiedene synthetische β -Casomorphine, die Passage des Molkenproteins der des Caseins anzupassen. Die β -Casomorphine erwiesen damit die erwartete, für Opiate charakteristische motilitätshemmende Wirkung. Genauso vermochte auch oral verabreichtes Casein offenbar die Motilität des Gastrointestinaltraktes zu reduzieren. Dies könnte auf die Freisetzung von opioidaktiven Peptiden aus dem Casein, eben den β -Casomorphinen, zurückgeführt werden. Diese Annahme wird durch Gießener Untersuchungen von J. Svedberg bestätigt, mit denen diese Peptide im Dünndarminhalt von Menschen nach Caseinaufnahme nachgewiesen werden konnten.

Voraussetzung für die Wirksamkeit dieser opiataktiven Peptide ist ihre Aufnahme als intaktes Peptid oder aktives Fragment durch die Dünndarmschleimhaut. Hinweise auf die Resorption intakter Casomorphine, insbesondere beim jugendlichen Organismus, zeigen die Arbeiten einer französischen und australischen Arbeitsgruppe. Nach ihrer Resorption können die opioidaktiven Peptide mit den μ -Rezeptoren des subepithelialen Nervengewebes wechselwirken und damit ihre motilitätshemmende Wirkung entfalten.

Wirkung auf die intestinale Elektrolyt- und Wasserresorption

Die Untersuchungen über die antisekretorische Wirkung von β -Casomorphinen wurden an narkotisierten Ratten durchgeführt. Der Umfang der Wasserresorption bzw. -sekretion wurde gravimetrisch bestimmt. Zunächst wurde experimentell eine Diar-

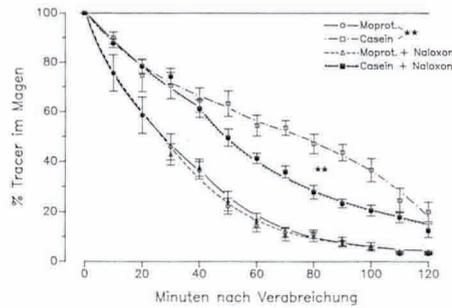


Abb. 2: Kinetik der Magenentleerung einer Molkenprotein- und einer Caseinsuspension mit und ohne Naloxon $\bar{x} \pm \text{sem}$, 9-11.

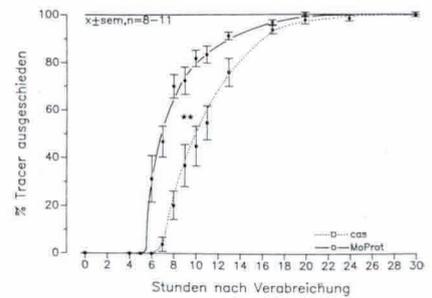


Abb. 3: Magen-Rektum Transitzeit des Tracers nach Verabreichung der Molkenprotein- bzw. Casein suspension.

rhoe erzeugt. Wie bereits einleitend ausgeführt wurde, führt eine Erhöhung sowohl des c-AMP, als auch des c-GMP-Spiegels in den Schleimhautzellen zu einer Sekretion von Wasser in das Darmlumen. Eine c-AMP abhängige Sekretion lösten wir durch Injektion von Theophyllin (10 mM) – in Verbindung mit Forskolin (20 µM) – in das Lumen eines terminalen Ileumsegmentes (Dünndarmende) aus. Forskolin wirkt als Aktivator der Adenylat-Zyklase, des Enzyms, das aus ATP c-AMP bildet (Abb. 4). Theophyllin hemmt die Phosphodiesterase, die den Abbau des c-AMP katalysiert. In der Folge stieg der c-AMP Spiegel der Schleimhaut auf etwa das Vierfache an. Eine c-GMP abhängige Sekretion wurde durch die intraluminale Gabe des E.coli-Sta-Toxins (16 µg/ml), in Verbindung mit Theophyllin hervorgerufen.

Anschließend prüften wir die Wirksamkeit der β-Casomorphine auf diese beiden Arten von intestinalen Sekretionsprozessen. Die getesteten β-Casomorphine wurden entweder direkt in das Darmlumen injiziert oder intravenös verabreicht.

Durch die sekretionsauslösenden Substanzen wurde die normale Resorption von Wasser, die etwa 3 ml/g Darmtrockensub-

Tabelle 2: Struktur der verwendeten β-Casomorphine

1. β-Casomorphin-4-Amid Tyr-Pro-Phe-Pro-NH ₂
2. (D-Ala ²)-β-Casomorphin-4-Amid Tyr-(D-Ala)-Phe-Pro-NH ₂
3. (D-Ala ^{2,4})-β-Casomorphin-5-Amid (4027) Tyr-(D-Ala)-Phe-(D-Ala)-Tyr-NH ₂

stanz betrug, zu einer Sekretion in das Darmlumen von etwa 2 ml/g umgekehrt. Die Abb. 5 vermittelt hierzu am Beispiel der c-GMP vermittelten Sekretion, daß das eingesetzte β-Casomorphin (D-Ala^{2,4})-5-Amid bei Verabreichung in das Darmlumen nur eine geringe, nach intravenöser Injektion eine signifikante Hemmung der Sekretion herbeiführte. Das ebenfalls untersuchte β-Casomorphin-4-Amid verursachte keine Hemmung der Wassersekretion. Der sekretionshemmende Effekt des proteasenstabileren β-Casomorphin (D-Ala^{2,4})-5-Amid wurde durch Naloxon wieder aufgehoben und muß damit als spezifische Opiatwirkung angesehen werden.

Möglicherweise werden die β-Casomorphine durch die Peptidhydrolasen der Bürstensaummembran doch relativ schnell abge-

baut, wodurch ihre Wirksamkeit auf den Elektrolyt- und Wassertransport begrenzt ist. Einen Hinweis in diese Richtung bieten unsere elektrophysiologischen Messungen, bei denen wir die Potentialdifferenz zwischen Darmlumen und Blut bestimmt haben. Die Potentialdifferenz ist ein indirektes Maß für den Ionentransport. Wie bereits erwähnt wurde, verändern sekretionsauslösende Substanzen die Potentialdifferenz dadurch, daß sie eine Chloridsekretion in das Darmlumen bewirken, wodurch das Lumen elektrochemisch negativ geladen wird. Abbildung 6 zeigt, daß die Injektion beider Casomorphine in das Darmlumen zu einer sofortigen Änderung der Potentialdifferenz führte. Dies bedeutet, daß wieder vermehrt Ionen resorbiert werden. Diese Wirkung hält jedoch beim β-Casomorphin-4-Amid nur kurz an. Beim β-Casomorphin-(D-Ala^{2,4})-5-Amid war diese Periode mit etwa 25 Minuten deutlich länger. Diesen Effekt könnte man einem fortschreitenden Abbau der Peptide zuschreiben, wodurch die Wirkung der sekretionsauslösenden Substanzen wieder dominierend wird. Wie bereits erwähnt, wird das β-Casomorphin-4-Amid schneller abgebaut, als das β-Casomorphin-Derivat 4027 (Tabelle 2, Punkt 3).

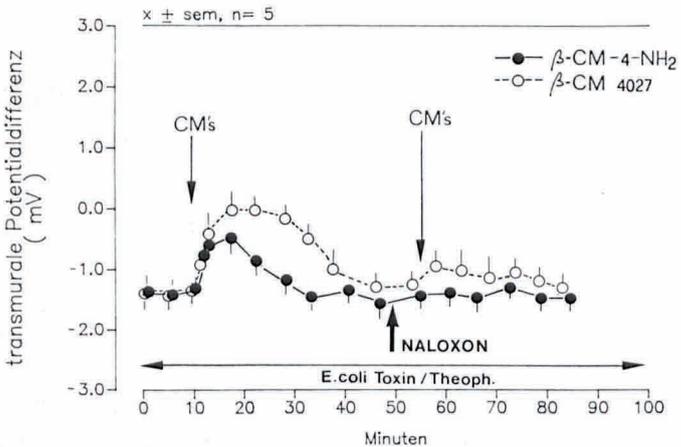


Abb. 6: Einfluß von β-Casomorphinen und Naloxonen auf die transmurale Potentialdifferenz bei einer c-GMP vermittelten Sekretion im Ileum der Ratte in vivo.

Die mögliche Wirkung von β-Casomorphinen auf die intestinale Elektrolyt- und Wasserresorption und die intestinale Motilität

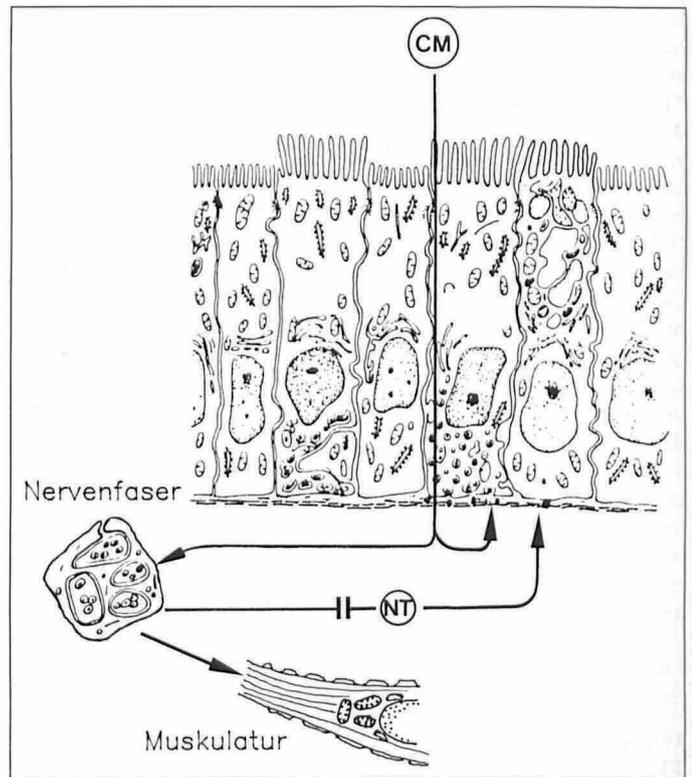


Abb. 7: Voraussetzung für die Wirkung ist die Aufnahme als intaktes Peptid oder biologisch aktives Fragment. Nach der Resorption können sie möglicherweise direkt auf den Elektrolyttransport der Epithelzellen einwirken. Über das subepitheliale Nervengewebe hemmen sie die Motilität und durch eine Blockade der Neurotransmitterfreisetzung die Sekretion.

Der beobachtete Effekt der Peptide auf die Potentialdifferenz kann als eine Opiatwirkung angesehen werden, da das Naloxon ihn aufheben konnte. Unsere Ergebnisse werden auch durch französische Befunde untermauert, die zeigen, daß die β -Casomorphine den Ionentransport, insbesondere die Chloridsekretion beeinflussen.

Unsere in vivo Untersuchungen zeigen, daß die β -Casomorphine prinzipiell, ähnlich wie das synthetische Opiat Loperamid, hemmend auf den Umfang einer Sekretion wirken können. Ihr Wirkungsgrad wird jedoch durch den hydrolytischen Abbau an der Darmschleimhaut begrenzt. Unter physiologischen Bedingungen dürfte dieser Abbau allerdings wesentlich langsamer erfolgen als unter unseren experimentellen Bedingungen, da dabei die β -Casomorphine bei der Proteolyse mit anderen Nahrungsproteinen in Konkurrenz treten. Es wäre daher anzunehmen, daß sie unter natürlichen Bedingungen noch wirksamer sind als im Experiment.

Ebenso wie für die motilitätshemmende Wirkung der β -Casomorphine ist auch für ihre antisekretorische Wirkung bei einer Diarrhoe die Resorption als intaktes Peptid eine *conditio sine qua non*. Die Opiatrezeptoren, die für diese Peptide als Signalempfänger dienen, sind nicht in der luminalen Membran lokalisiert, sondern subepithelial (Abb. 7). Die beobachteten Wirkungen wurden daher vermutlich über einen neuronalen Mechanismus vermittelt.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß synthetische β -Casomorphine, möglicherweise aber auch die β -Casomorphine aus oral aufgenommenem β -Casein, sowohl die Motilität des Gastrointestinaltraktes, als auch den intestinalen Elektrolyt- und Wassertransport modulieren. Möglicherweise erklärt sich die außerordentliche Wirksamkeit spezieller caseinreicher sogenannter Heilnahrungen in der Behandlung von Diarrhoen durch die Existenz der opioidaktiven β -Casomorphine. Dieses aus der Empirie abgeleitete therapeutische Prinzip dürfte durch unsere Untersuchungen experimentell begründet worden sein. Tatsächlich werden β -Casomorphine bereits erfolgreich bei der Behandlung von Diarrhoen von Nutztieren (Kälbern) angewendet.

Zur Autorin: *Dr. oec. troph. Hannelore Daniel, Hochschulassistentin am Institut für Ernährungswissenschaft, erhielt für Ihre Arbeiten über die Wirkung von β -Casomorphinen auf die Funktion des Gastrointestinaltraktes den mit 10000 DM dotierten „Milupa-Preis zur Förderung der Ernährungswissenschaften 1988“. Ihr Arbeitsgebiet umfaßt verschiedene Aspekte der Biochemie und Physiologie des Gastrointestinaltrakts.*