

Suplementacja doustna z użyciem siary bydlęcej, w przypadku sportowców zmniejsza przepuszczalność jelitową i stężenie zonuliny w stolcu

Hałasa Maciej^{1*}, Maciejewska Dominika¹, Baśkiewicz-Hałasa Magdalena², Machaliński Bogusław², Safranow Krzysztof³, Stachowska Ewa¹

¹Zakład Biochemii i Żywienia Człowieka, Pomorski Uniwersytet Medyczny, Szczecin, Polska; maciupam@op.pl

²Zakład Patologii Ogólnej, Pomorski Uniwersytet Medyczny, Szczecin, Polska; poziomka@pum.edu.pl

³Katedra Biochemii i Chemii Medycznej, Pomorski Uniwersytet Medyczny, Szczecin, Polska; chrissaf@mp.pl

*Adres do korespondencji: maciupam@op.pl;

Telefon: +48 601 567 339 14

Otrzymano:..... Zaakceptowano:..... Opublikowano:.....

Streszczenie: zwiększona przepuszczalność jelitowa, uznana za element rozmaitych patologii, ma różne przyczyny i może występować w trakcie energicznego treningu sportowego. Siara bydlęca to naturalny suplement, mający szeroki zakres przypuszczalnie pozytywnych skutków dla zdrowia, w tym zmniejszenie przepuszczalności jelitowej. Oceniliśmy wpływ suplementacji z użyciem siary, na parametry związane z przepuszczalnością jelitową w grupie 16 sportowców. Badanie odbywało się w trakcie najbardziej intensywnego treningu, związanego z zawodami. Badanie oparte na podwójnie ślepej próbie, z zastosowaniem placebo, porównywało wyniki suplementacji przez okres 20 dni z użyciem 500 mg siary bydlęcej w porównaniu do placebo (serwatki). Stan przepuszczalności jelitowej był analizowany w teście różnicowego wchłaniania laktulozy i mannitolu (tzw. test LM) oraz stężenia zonuliny w stolcu. Testy bazowe LM wykryły, że 6 (75%) z uczestników w grupie, która otrzymywała siarę, miało zwiększoną przepuszczalność jelitową. Po suplementacji, wartości z testów utrzymywały się w normalnym zakresie, a więc były znacząco niższe, niż wartości z testów bazowych. Wartości Δ w grupie, która otrzymywała siarę, uzyskane przez porównanie wyników po-interwencyjnych i bazowych także były znacząco niższe, niż te w grupie z placebo. Różnice w stężeniach zonuliny w stolcu były mniejsze, aniżeli w teście LM, ale okazywały się znaczące, kiedy wartości Δ w związku z interwencją były porównywane w grupie otrzymującej siarę i w grupie otrzymującej placebo. Suplementacja z użyciem siary bydlęcej okazała się bezpieczna i skuteczna w zakresie zmniejszania przepuszczalności jelitowej w przypadku tej grupy sportowców, u których ryzyko wystąpienia wyższej przepuszczalności jest zwiększone.

1. Wprowadzenie

Uznanie wpływu stanu jelita na rozmaite aspekty funkcjonowania organizmu człowieka, było bodźcem dla badań roli homeostazy jelitowej [1]. Wpływ fizjologii jelita na układ odpornościowy jest uznanym faktem [2]. Może to pomóc wyjaśnić jego zaangażowanie w powstawanie alergii i w bliższej przeszłości, autoagresywnej reakcji immunologicznej [3]. Proponowano liczne mechanizmy szukające związku złego funkcjonowania jelit z rozregulowaniem systemu odpornościowego [4,5,6], a najbardziej przekonującym z nich jest udział stanu przepuszczalności jelitowej [7,8,9,10]. Związek zonuliny, która jest fizjologicznym regulatorem przepuszczalności i rozwoju celiakii, opisany przez Fasano *et al.*, był pierwszą ustaloną osią patogeniczną w przypadku choroby autoagresywnej [11]. Odkrycie to zachęciło do dodatkowych badań, jakie pokazały, że zgłaszana przez badaczy zwiększona przepuszczalność jelitowa może sprzyjać rozwojowi cukrzycy, zapalenia tarczycy Hashimoto, żółtaczk autoimmunologicznej i chorób autoimmunologicznych tkanki łącznej [12]. Inne patologie, w tym rozmaite zaburzenia polegające na nadwrażliwości, mogą rozwijać się w powiązaniu ze zwiększoną przepuszczalnością jelitową, ale nie ma obecnie mocnych dowodów potwierdzających to twierdzenie. Pomimo tego, dostępny materiał wskazuje, że zwiększona przepuszczalność bariery jelitowej jest potencjalnie szkodliwa dla zdrowia. Znane są dwa podejścia do zachowania bariery przepuszczalności jelitowej w obrębie limitów fizjologicznych. Jedno, bardzo skuteczne, chociaż niepraktyczne, polega na unikaniu takich czynników jak gluten, niesterydowe leki przeciwzapalne oraz intensywna aktywność fizyczna, które mogą uszkodzić strukturę bariery lub nadmiernie zwiększyć przepuszczalność [11, 13, 14]. Inne podejście polega na odtworzeniu i zachowaniu przepuszczalności fizjologicznej w drodze zmiany diety lub interwencji farmakologicznej. Blokowanie receptora zonuliny było badane przez Fasano [15], a metoda ta wydaje się obiecująca w przypadkach zwiększonej przepuszczalności rozwijającej się z powodu patologicznej regulacji zonuliny [16]. Badano także inne możliwości wykorzystujące suplementację z użyciem glutaminy i probiotyków [17-19]. Jest bardzo prawdopodobne, jednakże, że niezależne od zonuliny, przyczyny zwiększonej przepuszczalności, są także związane w takimi patologiami człowieka, jak zapalne uszkodzenie struktury nabłonka jelitowego [13]. Będzie to wymagać innego podejścia do odtworzenia integralności bariery jelitowej. Jak poinformowano, siara bydlęca ma pozytywny wpływ na stan jelita – co wynika z badań na ludziach i na zwierzętach [20]. Mające solidne potwierdzenie przyczyny tych wpływów obejmują udział siary w odtwarzaniu składu mikrobiomu jelita i wspieraniu gojenia się uszkodzonej błony śluzowej [21-23]. Sugerowano także, że siara może wpływać na zmniejszenie nadwrażliwości, kojarzonej z alergiami i autoagresją [24]. Te ostatnie twierdzenia, chociaż przeważnie pozbawione poparcia dowodowego, generalnie wskazują na korzyści

zdrowotne, związane ze zmianami w jelicie, kojarzonymi z suplementacją z użyciem siary. Wyszliśmy hipotezę, że problemy zdrowotne mające związek z nadwrażliwością, można zmniejszyć w drodze suplementacji z użyciem siary i że ten skutek zostanie przypisany normalizacji (zmniejszeniu) przepuszczalności jelitowej. Aby to przetestować, zbadaliśmy modyfikacje w przepuszczalności jelita w odpowiedzi na użycie siary bydłowej w grupie aktywnie trenujących sportowców. Wybraliśmy sportowców, ponieważ wiadomo, iż mają zwiększoną przepuszczalność jelitową [25,26], która została także stwierdzona w naszych poprzednich, niepublikowanych wynikach (badań). Poddaliśmy testom przepuszczalność jelitową przed i po stosunkowo krótkiej, 20-dniowej, suplementacji z użyciem typowej dawki 500 mg siary bydłowej dwa razy dziennie.

2. Materiały i metody

Rekrutacja

Grupa 16 zdrowych ochotników płci męskiej, w wieku: 20 – 43 lat (mediana = 26 lat, średnia = 27,5 roku) została zrekrutowana losowo z 40 profesjonalnych zawodników MMA, aktywnie trenujących, w trakcie sezonu konkurencji. Od każdego uczestnika uzyskano pisemną zgodę, wyrażoną po otrzymaniu przezeń informacji o badaniu. Uczestnicy nie cierpieli na żadne ostre objawy chorobowe i byli fizycznie zdolni do udziału w szeroko zakrojonym treningu sportowym. W momencie naboru przeszli badanie przedmiotowe, które obejmowało pomiar masy ciała bez tłuszczu (MC(b)T), zawartości wody (ZW(w)C) i tłuszczu obwodowego (TO). Ich cechy pod tym względem zaprezentowano w Tabeli 1.

Tabela 1. Cechy antropometryczne sportowców uczestniczących w próbie. Nie stwierdzono znaczących różnic w tych cechach między grupą otrzymującą placebo i grupą suplementowaną.

Zmienna	Średnia	SD
Masa ciała [kg]	89,59	17,85
Obwód w talii	80,32	27,35
Obwód w biodrach	95,00	30,93
(MC(B)T) (l)	71,79	12,31
ZW(W)C (l)	51,71	8,89
TO [%] (l)	19,38	5,63
BMI (indeks masy ciała)	27,47	4,10

Podwójnie ślepe badanie

Zapewnianie ślepego charakteru badania w aspekcie uczestników i ich początkowa ocena

W momencie rozpoczęcia próby (dzień 0), 16 uczestników przydzielono losowo, z użyciem tabeli przypadkowych numerów, do dwóch równych liczebnie grup, które miały otrzymywać placebo lub siarę.

Administrator nie uczestniczył w ocenie uczestników ani w testach laboratoryjnych, a badacze nie znali zasad selekcji uczestników. Uczestników poddano badaniu (pobierając stolec i mocz) w dniu 0 pod kątem bazowej przepuszczalności jelitowej z użyciem testu różnicowego wchłaniania cukru i przeprowadzono u nich analizę stężenia zonuliny w stolcu. W dniu 0 zastosowano kwestionariusz wypełniany przez samych uczestników, dotyczący ich zdrowia, stylu życia, zwyczajów żywieniowych i aktywności sportowej. Uczestnicy odpowiadali także na pytania odnośnie dyskomfortu trawiennego lub symptomów, charakteru i częstości stolców oraz stosowania w ostatnim czasie leków, w tym niesterydowych leków przeciwzapalnych i antybiotyków.

Suplementacja: dni 1-20

Liofilizowana siara bydlęca, pobrana w ciągu 2 godzin od porodu cielęcia (Genactiv Sp. z o.o.), została zapakowana w nieopisane torebki (500 mg siary bydlęcej i 500 mg suchego banana). Dawka siary w proszku w zakresie typowej pojedynczej dawki suplementacji, sugerowanej przez rozmaitych dostawców. Identyczne porcje w torebkach (500 mg odwodnionej serwatki i 500 mg suchego banana) użyto jako placebo. Różnica między siarą i serwatką zastosowanymi w próbie, polegała na spodziewanej aktywności biologicznej bioaktywnych komponentów w nich zawartych. O ile ok. 250 rozmaitych bioaktywnych komponentów (przeważnie protein) obecnych w siarze, zostało zachowanych i nieuszkodzonych przez wysokie temperatury dzięki procesowi liofilizacji, w którym temperatury sięgają maksimum 40 stopni Celsjusza, o tyle serwatkę, która jest wielokrotnie mniej aktywna biologicznie, poddano suszeniu rozpyłowemu w temperaturze sięgającej 160 stopni Celsjusza. Ten ostatni proces, jak się oczekuje, upośledza funkcjonowanie większości z początkowo bioaktywnych protein. Administrator próby rozprowadził pakiety 40 torebek siary lub placebo wśród uczestników w grupach interwencyjnej i kontrolnej. Uczestników poproszono o rozpoczęcie używania dostarczonych im substancji testowych w dniu 1 próby. Terminarz zakładał doustne spożycie jednej torebki dziennie rano i jednej wieczorem (obu 30 minut przed posiłkiem) przez 20 dni (wg planu). Polecono im zapisywanie obserwacji w trakcie okresu suplementacji, jakich sami dokonywali i notowanie niecodziennych lub negatywnych reakcji, jeżeli jakiegokolwiek nastąpiły. Dostarczono specjalnie dla tego celu przygotowany kwestionariusz, który miał skupić uwagę uczestników na symptomach w zakresie układu trawiennego oraz ogólnego stanu zdrowia.

Ocena końcowa: dzień 22.

W dniu 22, uczestników poddano testom w zakresie różnicowego wchłaniania cukru analizowanego w próbkach moczu i stężenia zonuliny w stolcu (ng/ml). Kwestionariusze, w tym raporty uczestników o tym, co miało miejsce przez poprzednie 22 dni, ujęto w ocenie końcowej.

Badanie otwarte

Ponieważ dostępność uczestników została ograniczona przez ich terminarze treningu i zawodów, czas usuwania pozostałości innych produktów, adekwatny dla ślepego badania skrzyżowanego, nie mógł być osiągnięty. Zamiast tego, zdecydowaliśmy się wykonać fazę otwartą próby tylko dla uczestników początkowo otrzymujących placebo. Jeden z uczestników odpadł z pierwotnego składu grupy, jaka otrzymywała placebo, przed fazą badania skrzyżowanego, z powodu niemożności pogodzenia udziału w badaniu z terminarzem zawodów. Pozostałych siedmiu członków grupy otrzymującej placebo, było suplementowanych z użyciem siary przez 20 dni, począwszy od dnia 23 i poddano ich testom na przepuszczalność jelitową oraz stężenie zonuliny w stolcu w dniu 44. Rezultaty porównano z uprzednio uzyskanymi od tych samych pacjentów, kiedy należeli oni do grupy stosującej placebo w fazie podwójnie ślepej.

Test absorpcji różnicowej cukru (laktulozy/mannitolu)

Zasada rządząca testem, wykorzystuje różne drogi wchłaniania jelitowego wykorzystywanego w przypadku laktulozy i mannitolu [27]. Jeśli ścisłe połączenia międzykomórkowe są uszkodzone lub rozluźnione, wydalanie laktulozy z moczem (laktuloza ta jest absorbowana zwłaszcza przez transport parakomórkowy), zwiększa się w stosunku do wydalania mannitolu, który jest absorbowany międzykomórkowo. Test absorpcji różnicowej cukru może być uważany za bezpośredni marker przepuszczalności jelitowej.

Spożycie cukru i zbiórka moczu

Test spożycia cukru i zbiórki moczu zaczął się rano po 8 godzinach postu. Każdy z uczestników opróżnił pęcherz, zebrał 100 ml moczu jako ślepa próbkę (kontrola negatywna), a następnie wypił 500 ml roztworu wodnego, zawierającego 7,5 g laktulozy i 2 g mannitolu. Przez następne 6 h, uczestnikom wolno było jeść, z wyjątkiem konkretnych pokarmów (mleka i nabiału, cukrów prostych, dużych dawek witaminy C i mannitolu). Poproszono ich o zbieranie całości wydalanego moczu do jednego pojemnika. Wreszcie, poddano analizie 400 µl alikwotu moczu z pojemnika do jej gromadzenia i z ślepej próbki.

Derywatywacja cukru

400 µl alikwotów moczu zmieszano z 40 µl standardu wewnętrznego (mio-inozytolu, 20 146 mg/ml) i odparowano do suchości z użyciem liofilizacji. Następnie dodano 200 µl roztworu pirydyny bezwodnej w hydroksylaminie (25 mg/ml), zmieszano i podgrzano do temperatury 70 C^o przez 1 h. Próbkę poddano wirowaniu (800 x g przez 5 minut) i pobrano 200 µl supernatantu. Cukry poddano silylacji (z użyciem 100 µl silylimidazolu trójmetylowego) przez 30 minut w temperaturze 70 C^o i przeanalizowano z użyciem chromatografii gazowej.

Chromatografia gazowa została wykonana z użyciem Agilent Technologies 7890A GC System i kolumny kapilarnej (15 m × 0,530 mm, 1.50 μm), (Supelco, Bellefonte, PA, USA). Warunki chromatograficzne obejmowały początkową temperaturę 220 C^o przez 5 minut, zwiększaną w tempie 10°C/minutę przez 2 minuty, 5°C/minutę przez 4 minuty, i 3,5°C/minutę przez 4 minuty aż do końcowej temperatury 274°C, którą utrzymano przez 7 minut. Objęło to czas w przybliżeniu 22 minut, a gazem nośnym był wodór. Laktulozę, mannitol i myo-inozitol zidentyfikowano w drodze porównania ich czasów retencji z tymi, które są dostępnym w handlu standardem.

Analiza zonuliny w stolcu

Stężenie zonuliny w stolcu zostało określone z użyciem konkurencyjnego, opartego na enzymach, zestawu do analizy immunosorbentu (ELISA) (Immundiagnostik AG, Bensheim, Niemcy), wg procedury producenta. Próbkę stolca zebrano na 1 dzień przed testem mannitolu/laktulozy. Analizowane płytki wells były pokryte przeciwciałami poliklonalnymi anty-zonuliny; zonulina w próbkach została sprzężona ze znacznikiem biotylinowanej zonuliny, a następnie unieruchomiona na płytce. Absorbancję zmierzono fotometrem dla 450 nm [18]. 1

Limity referencyjne

Ustaliliśmy wewnętrzne górne limity referencyjne L/M < 0,035 i zonuliny < 30 ng/ml, odnosząc się do poprzednich badań [18], naszego własnego doświadczenia i analizy statystycznej.

Analiza statystyczna

Wykonaliśmy analizę statystyczną z użyciem Microsoft Excel 2010 i STATISTICA 12. Test Shapiro-Wilka został użyty dla określenia normalnego poziomu dystrybucji zmiennych eksperymentalnych, a znaczenie różnic w odmiennych porach określono przez test t-Studenta (sparowanych próbek). Test t niesparowanych próbek użyto do porównania wartości zmiennych niezależnych. Dla zmiennych z dystrybucjami, normalnie niepoddawanymi dystrybucji, nieparametryczny test Wilcoxon dla par obserwacji i test U Mann-Whitney były użyte dla sparowanych i niesparowanych porównań (odpowiednio). Międzygrupowe różnice w częstotliwościach kojarzonych z leczeniem skutków ubocznych i nienormalnych wartości testowych, były analizowane z użyciem dokładnego testu Fishera. Różnice p<0,05 uważano za statystycznie znaczące i są pokazane na ilustracjach. Analiza mocy statystycznej została wykonana w oparciu o standardowe rezultaty laboratoryjnych testów dewiacji bazowej. Siła naszego badania na 8 obiektach w każdej grupie, była wystarczająca dla wykrycia z 80% prawdopodobieństwem faktycznych

różnic między grupami otrzymującymi placebo i siarę, równych 0,029 dla stosunku L/M i 17 ng/ml dla stężenia zonuliny w stolcu.

Akceptacja w zakresie bioetyki

Próba została wykonana w zgodności z warunkami procedury zaakceptowanymi przez Komisję Bioetyczną Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego (KB-0012/05/16).

3. Rezultaty

Dane z wywiadu i kwestionariusza ujawniły, że żaden z uczestników w grupie otrzymującej siarę nie informował o jakichkolwiek, powiązanych z leczeniem, skutkach ubocznych dla układu trawiennego. Czterech uczestników w grupie dostającej placebo (50%), powiadomiło o negatywnych symptomach trawiennych (rzadkie stolce, wzdęcia, nudności i/lub brak apetytu), ale różnica w relacji do grupy otrzymującej siarę, nie osiągnęła statystycznej istotności ($p=0,08$). W obu grupach uczestnicy zgłosili, że ich ogólny stan był dobry/bardzo dobry i pozostawał taki sam, jak przed próbą lub lepszy po suplementacji. Dwóch uczestników otrzymujących siarę (25%) i pięciu w grupie z placebo (62,5%), doświadczyło infekcji górnych dróg oddechowych w trakcie okresu suplementacji podwójnie ślepej fazy próby. Różnica między grupami była nieznacząca ($p=0,31$).

Nie wykazano istotnych korelacji rezultatów testów laboratoryjnych i danych z wywiadu, w przypadku uczestników (w tym zmiennych dietetycznych i powiązanych ze zdrowiem), zebranych w drodze bezpośrednich wywiadów lub kwestionariuszy. Prawdopodobnie stało się tak z powodu niewielkiej liczby uczestników. Jednakże mała próba w badaniu nie uniemożliwiła uzyskania statystycznie znaczących, międzygrupowych różnic we wchłanianiu cukru i stężeniu zonuliny.

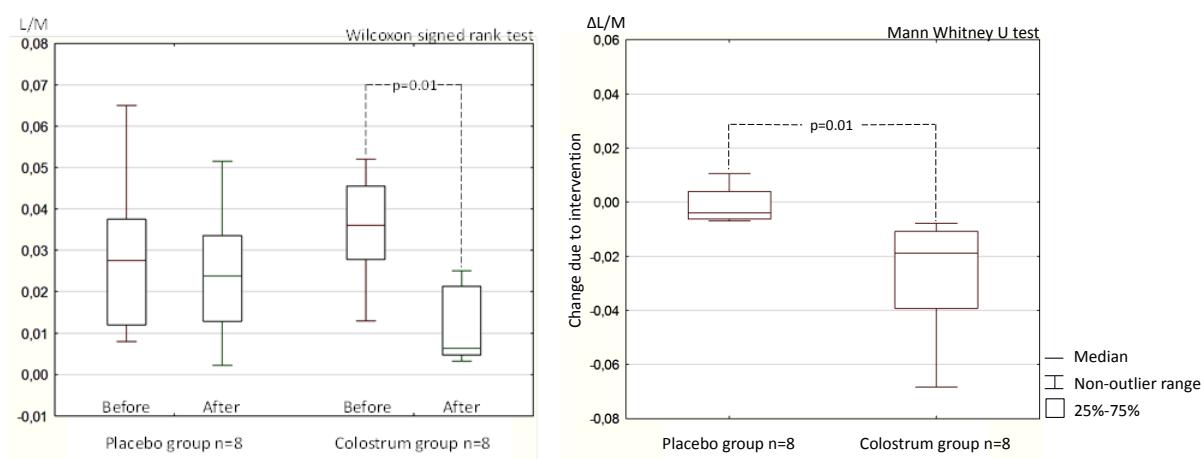
Procent osób wykazujących wyższy, niż normalny, stosunek bazowy L/M ($L/M \geq 0,035$), nie był znacząco różny między grupą otrzymującą placebo i siarę (50% w kontraście do 75%, odpowiednio, $p=0,61$). Proporcja obiektów badań mających bazowy poziom zonuliny w stosunku do poziomu limitu referencyjnego (30 ng/ml), była podobnie wysoka w grupie przyjmującej placebo i w grupie przyjmującej siarę (87,5% w kontraście do 100%, odpowiednio, $p=1$). Wszyscy uczestnicy, poza dwoma w każdej z dwóch grup, poinformowali o pełnym przestrzeganiu terminarza przyjmowania. Ci, którzy nie zastosowali się do harmonogramu twierdzili, że opuścili 2-4 dawek z dostarczonych 40. Poza jednym uczestnikiem w grupie otrzymującej suplementację z użyciem siary, mającym zwiększony poziom zonuliny w stolcu, wartości obu parametrów testowych wskazywały zmniejszoną przepuszczalność jelitową pod koniec etapu ślepej próby w porównaniu z wartością bazową. Test absorpcji różnicowej cukru przyniósł wynik zmniejszony we wszystkich przypadkach w obrębie uprzednio określonego normalnego zakresu referencyjnego ($L/M <$

0,035) po suplementacji z użyciem siary (Rycina 1a). Poziom zonuliny uległ zmniejszeniu po suplementacji z użyciem siary, ale większość uczestników (5 – 62,5%) nadal miała jej poziom powyżej limitu referencyjnego > 30 ng/ml.

3.1. Faza podwójnie ślepa

3.1.1. Przepuszczalność jelitowa (test absorpcji różnicowej cukru)

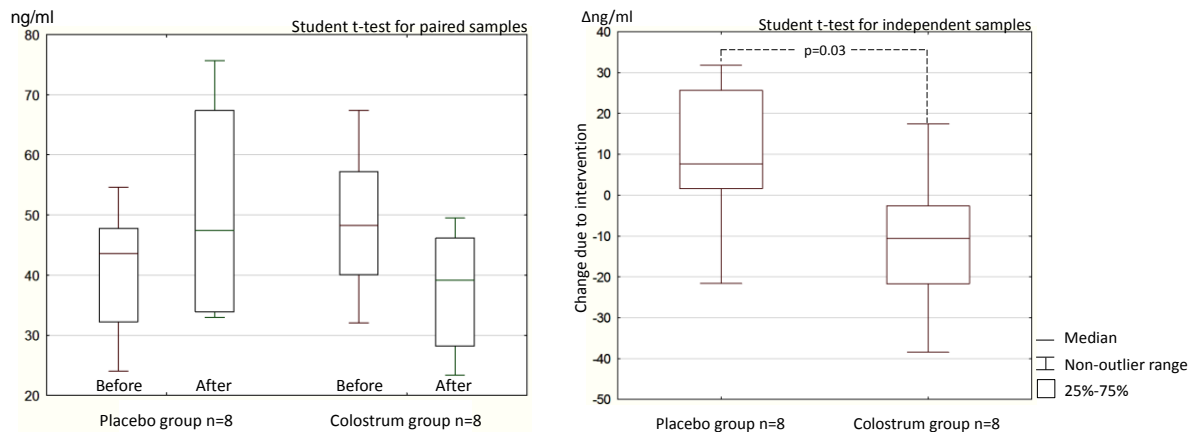
Spżycie placebo nie przyniosło znaczącej różnicy w teście różnicowego wchłaniania cukru w zakresie rezultatów uzyskanych przed okresem suplementacji i po nim. Suplementacja z użyciem siary przyniosła znaczące zmniejszenie przepuszczalności jelitowej ($p=0,01$, Rycina 1a). Zmiany po interwencji w stosunku do wartości bazowych przepuszczalności (Δ) w obrębie grupy otrzymującej placebo i grupy przyjmującej siarę, były znacząco różne (Rycina 1b).



Rycina 1. Przepuszczalność jelitowa analizowana z użyciem różnicowego wchłaniania cukru i wyrażona jako stosunek laktulozy do mannitolu (L/M) w moczu, po zastosowaniu placebo lub suplementacji z użyciem siary (a). Zmiana w przepuszczalności po interwencji w porównaniu do stanu sprzed niej (Δ) w obrębie grupy otrzymującej placebo i grupy przyjmującej siarę (b). Dane z fazy podwójnie ślepej grupy otrzymującej placebo (kontrolnej).

3.1.2. Stężenie zonuliny w stolcu

Ani placebo, ani suplementacja z użyciem siary nie przyniosły znaczącej różnicy w stężeniu zonuliny, w porównaniu z wartością bazową (Rycina 2a). Podczas gdy różnice nie osiągnęły poziomu istotności, stężenie zonuliny zwiększyło się w grupie otrzymującej placebo, a zmniejszyło w grupie przyjmującej siarę, co skutkowało w statystycznie znaczącym stopniu ($p=0,03$), kiedy post-interwencyjne zmiany w stosunku do wartości bazowych (Δ) porównano między grupą otrzymującą placebo, a grupą przyjmującą siarę (Rycina 2b).

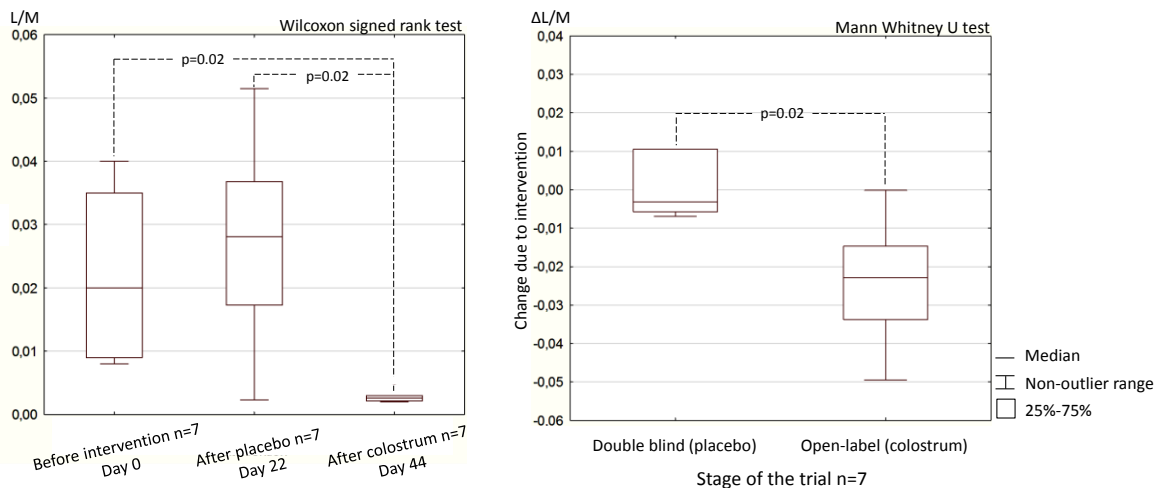


Rycina 2. Stężenie zonuliny w stolcu przed i po doustnym podaniu siary lub placebo (a). Zmiana w stężeniu zonuliny po kontraście. Przed interwencją (Δ) w obrębie grupy, otrzymującej siarę i grupy przyjmującej placebo (b). Dane z fazy podwójnie ślepej grupy otrzymującej placebo (kontrolnej).

3.2. Faza otwarta (badanie skrzyżowane)

3.2.1. Przepuszczalność jelitowa

W fazie otwartej, różnicowe wchłanianie cukru w dniu 44 po suplementacji z użyciem siary i w dniu 22 po suplementacji z użyciem placebo, były znacząco różne ($p=0,02$, Rycina 3a). Rezultaty uzyskane po suplementacji z użyciem siary w fazie otwartej, były także inne od bazowych, uzyskanych przed początkiem próby przy interwencji w dniu 0 ($p=0,02$, Rycina 3a).

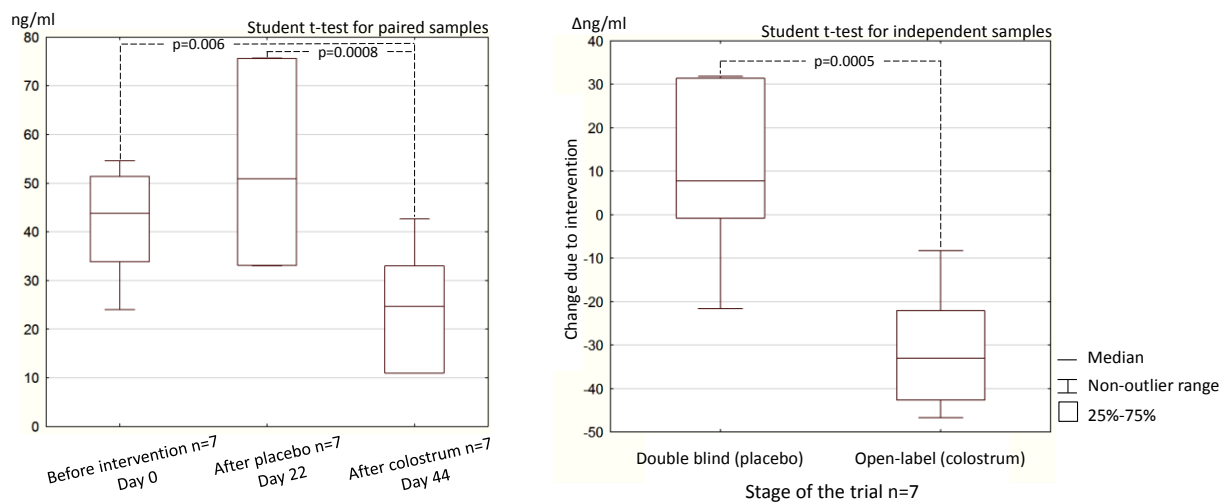


Rycina 3. Przepuszczalność jelitowa mierzona różnicowym wchłanianiem cukru i wyrażona jako stosunek laktulozy to mannitolu (L/M) w moczu, przy sekwencyjnym doustnym podaniu placebo i siary (a). Zmiana w przepuszczalności w związku z suplementacją (Δ) z placebo w podwójnie ślepej badaniu (dnia 22 w porównaniu do dnia 0) i z siarą w otwartej próbie (dnia 44 w porównaniu do dnia 22) (b). Dane z otwartej (siara)/podwójnie ślepej (placebo) fazy próby w tej samej grupie uczestników

Porównanie zmian (Δ) w różnicowym wchłanianiu cukru – rezultaty po suplementacji z użyciem siary w fazie otwartej (dnia 44 w porównaniu do dnia 22) oraz zmian obserwowanych w tej samej grupie uczestników po suplementacji z użyciem placebo w fazie podwójnie ślepej (dnia 22 w porównaniu do dnia 0), przyniosło statystycznie znaczący wynik ($p=0,02$, Rycina 3b).

3.2.2. Stężenie zonuliny w stolcu

W fazie krzyżowej (otwartej) próby, zmiana w stężeniu zonuliny w stolcu u siedmiu uczestników była równoczesna ze zmianą w różnicowym wchłanianiu cukru. Różnica w stężeniu zonuliny po suplementacji z użyciem siary w fazie otwartej (dnia 44) i po suplementacji z użyciem placebo w fazie podwójnie ślepej (dnia 22), była statystycznie znacząca ($p=0,0008$, Rycina 4a). W badaniu otwartym, różnica w stężeniu zonuliny po suplementacji z użyciem siary (dnia 44) i przed interwencją (dnia 0), była także znacząca ($p=0,006$, Ryc. 4a).



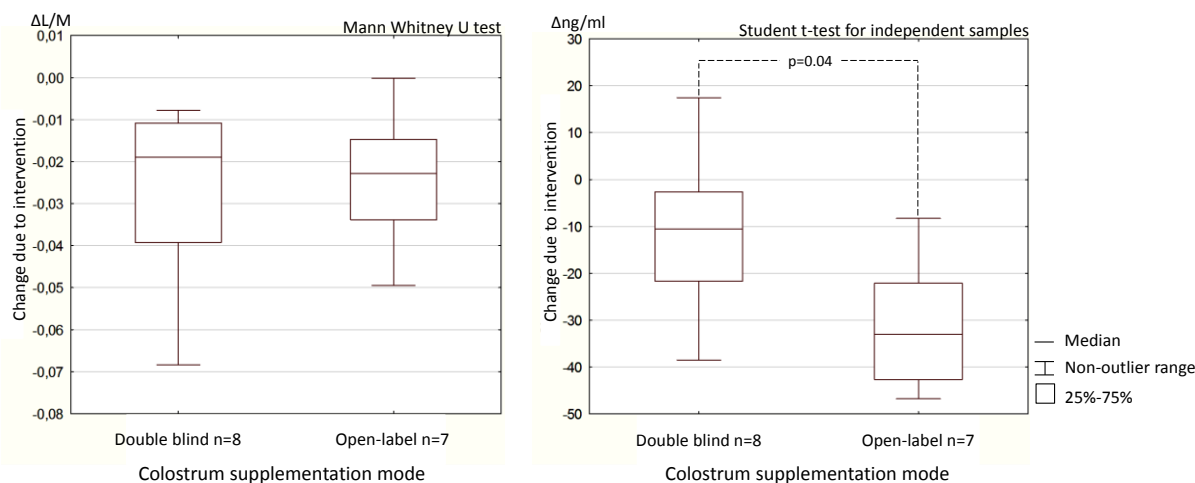
(b) Rycina 4. Jelitowe (w stolcu) stężenie zonuliny przy sekwencyjnym doustnym podaniu placebo i siary (a). Zmiana w stężeniu zonuliny w związku z suplementacją (Δ) z użyciem placebo w podwójnie ślepej próbie (dnia 22 w porównaniu do dnia 0) i z użyciem siary w próbie otwartej (dnia 44 w porównaniu do dnia 22) (b). Dane z otwartej (siara) i podwójnie ślepej (placebo) fazie próby uzyskano od tych samych siedmiu uczestników.

Rezultaty zmiany w jelitowym stężeniu zonuliny (Δ) spowodowane przez interwencję z użyciem siary (faza otwarta – dnia 44 w porównaniu do dnia 22) i zmiana w związku z zastosowaniem placebo (podwójnie ślepa faza – dnia 22 w porównaniu do dnia 0) w grupie tych samych uczestników, była znacząca różna ($p=0,0005$, Rycina 4b).

3.3. Skutek suplementacji z użyciem siary w fazach podwójnie ślepej i otwartej

Porównanie skutku podwójnie ślepej i otwartej suplementacji z użyciem siary, wyrażonej

wewnątrzgrupową różnicą (Δ) między okresem po suplementacji w porównaniu do bazowych rezultatów testu, ujawniło statystycznie znaczącą różnicę tylko dla stężenia zonuliny. Zmniejszyła się znacznie w otwartej, niż w podwójnie ślepej fazie ($p=0,04$, Rycina 5b), a nie w X L/M teście różnicowego wchłaniania (Rycina 5a). $p=0,0008$ $p=0,006$ Student t-test dla sparowanych próbek g/ml



Rycina 5. Zmiana w związku z suplementacją z użyciem siary (Δ) w fazie podwójnie ślepej w porównaniu do fazy otwartej, wyrażona jako stosunek laktulozy/mannitolu w moczu (a) i stężenia zonuliny w stolcu (b).

Dane z fazy otwartej (siara) i podwójnie ślepej (siara) próby

4. Dyskusja

Zgodnie z naszą najlepszą wiedzą, próba jako pierwsza wykazała, że suplementacja z użyciem siary bydłowej zmniejsza i przeważnie przywraca do poziomu normalnego wartości dwóch parametrów odzwierciedlających przepuszczalność jelitową: stosunek laktulozy/mannitolu w moczu i stężenia zonuliny w stolcu. Upřednie badania na ludziach udowodniły, że korzystny wpływ profilaktycznej suplementacji z użyciem siary na przepuszczalność, zwiększa się w związku z leczeniem NSAID (indometacyną) lub intensywnymi ćwiczeniami w przypadku sportowców [28-30]. Badania te korzystały z testu różnicowego wchłaniania cukru, lecz nie z testu stężenia zonuliny. Doświadczenia na gryzoniach, wykazały ważność siary jako profilaktycznego suplementu, zmniejszającego bezpośrednio uszkodzenie jelitowej błony śluzowej, wynikające z leczenia NSAID [22,23]. Rezultaty testu L/M bezpośrednio odzwierciedlają (a testu stężenia zonuliny pośrednio) przepuszczalność jelitową. Pomimo ograniczonej ilości uczestników badania [16], podwójnie ślepe badanie przyniosło statystycznie znaczące rezultaty (Ryciny 1 i 2). Rezultaty części otwartej potwierdziły wyniki uzyskane w części podwójnie ślepej, ale mogą być nieobiektywne, z racji oczekiwań uczestników co do pozytywnego efektu podania suplementu (Ryciny 3 i 4). Szczególnie interesujące były rezultaty testu różnicowego wchłaniania cukru, który ze swej natury bardziej bezpośrednio odzwierciedla stan przepuszczalności jelitowej, niż stężenie zonuliny w stolcu. W podwójnie

ślepej fazie próby, rezultaty były statystycznie znaczące tak dla różnic przed i po suplementacji z użyciem siary, jak i dla porównania zmiany, w związku z interwencją (Δ) między grupą przyjmującą placebo, i grupą otrzymującą siarę (Rycina 1). Wszystkie rezultaty po suplementacji z użyciem siary mieściły się w obrębie normalnego zakresu testu L/M, chociaż 75% rezultatów przed interwencją było powyżej zakresu referencyjnego, a niektóre przekraczały ten górny poziom dwukrotnie (dane niepokazane). Rezultaty testu stężenia zonuliny w stolcu w podwójnie ślepej fazie próby były statystycznie znaczące tylko wtedy, kiedy zmiana w związku z interwencją (Δ) w obrębie grupy otrzymującej placebo i grupy przyjmującej siarę, zostały porównane (Rycina 2). W tej fazie próby, stężenia zonuliny w stolcu wszystkich (oprócz jednego) uczestników (12,5%) zmniejszyły się po otrzymaniu siary, ale zostały przywrócone do normalnego zakresu tylko u trzech uczestników (37,5%). Jeden z celów naszego badania określono jako stwierdzenie, czy zgłaszany pozytywny wpływ siary na zdrowie jelita może być przypisany regulacji stężenia zonuliny, prowadzącej do zmniejszonej przepuszczalności [20]. Trudno wyciągnąć wnioski, co do efektu stosowania siary w zakresie przepuszczalności jelita w oparciu tylko o nasze rezultaty. Pomimo tego, rezultaty dla różnicowego wchłaniania jasno pokazały, że przepuszczalność zmniejsza się w odpowiedzi na suplementację z użyciem siary (Rycina 1), co było znacznie oczywistsze, niż wyniki odzwierciedlone przez zmianę w stężeniu zonuliny w stolcu (Rycina 2). Zmiana w zakresie różnicowego wchłaniania cukru wydaje się być do pewnego stopnia niezależna od regulacji zonuliny. U czterech uczestników podwójnie ślepego badania w grupie otrzymującej siarę (50%), poziom zonuliny pozostał powyżej 40 ng/ml, co przekraczało uprzednio określony górny poziom referencyjny, tj. 30 ng/ml. U tych uczestników stosunek L/M spadł do mniej niż 0,01, co było poniżej uprzednio określonego górnego poziomu referencyjnego 0,035. W podwójnie ślepych badaniach, zmiana w stosunku L/M po suplementacji z użyciem siary, osiągnęła wyższy poziom statystycznej istotności po zmianie w stężeniu zonuliny. Różnica w stężeniu zonuliny po (w kontraście do stanu przed) suplementacji z użyciem siary (Δ) była znacząco większa w porównaniu próby otwartej i podwójnie ślepej, podczas gdy nie zaobserwowano zbliżonego efektu dla przepuszczalności jelitowej (Rycina 5). Sugeruje to, że wpływ psychologiczny mógł być oddziaływać na uwalnianie zonuliny w jelicie. Testowanie tego rezultatu będzie wymagać dalszych prac. Dane uzyskane z kwestionariusza, dotyczące potencjalnych skutków ubocznych i innych okoliczności związanych ze zdrowiem, nie były znacząco różne między grupami. Ponadto wszystkie te okoliczności (symptomy układu trawiennego oraz infekcje górnych dróg oddechowych), jak stwierdzono, były zgłaszane z podobną częstotliwością i w bliskim stopniu zróżnicowania, przez tych samych uczestników także przed początkiem próby. Można więc wnioskować, że te okoliczności nie są związane z próbą interwencji. Nie ma obecnie obiektywnych laboratoryjnych testów demonstrujących, że suplementacja z użyciem siary wywiera jakiś skutek. W tej próbie, stosunek L/M w moczu zmniejszył się u wszystkich uczestników przy suplementacji z użyciem siary.

Sugeruje to, że zmniejszenie stosunku L/M może być uważane za pierwszy mierzalny wskaźnik suplementacji z użyciem siary. Podsumowując, nasza próba wykazała, że suplementacja z użyciem siary zmniejsza uprzednio podniesiony poziom przepuszczalności jelitowej i jest w stanie przywrócić ją do wcześniej określonego normalnego limitu w czasie krótszym niż 3 tygodnie, w którym następuje stosunkowo umiarkowana suplementacja. Suplementacja z użyciem siary także zmniejsza stężenie zonuliny w jelicie, ale nieznaczniej, niż jej wpływ na przepuszczalność. Trudno wyciągnąć wnioski dotyczące mechanizmu wiodącego do zmniejszonej przepuszczalności. Możliwe, że w dodatku do częściowego wpływu zmniejszonego stężenia zonuliny, normalizacja przepuszczalności może także wynikać z intensywnego potencjału leczniczego w stosunku do jelitowej błony śluzowej, jaki ma siara, co zostało zaobserwowane w poprzednich badaniach [22,23]. W odniesieniu do zgłaszanego potencjału probiotycznego pewnych komponentów siary (np. bifidogeniczne oddziaływanie laktoferyny) [31] jest także możliwe, że poprawa fizjologicznej flory jelitowej mogła wpłynąć na obserwowany efekt w stosunku do przepuszczalności jelitowej w naszej próbie (zgłaszany w przeszłości przez innych autorów) [32]. Nasze badanie dostarcza dowodów, które sugerują, że zwykła siara bydlęca, jaka jest naturalnym i stosunkowo niedrogim suplementem, może być odpowiedzialna za skuteczne odwracanie nieodpowiedniego zwiększenia przepuszczalności jelitowej. Jej użycie jest korzystne dla wielu pacjentów, u których zwiększona przepuszczalność jelitowa ostatecznie skutkowałaby różnymi patologiami [7-10]. Siara bydlęca może mieć także rolę zapobiegawczą u ludzi zdrowych i pomagać w odnowie stanu jelita po użyciu antybiotyków lub NSAID – i jedno, i drugie zwiększają przepuszczalność jelitową. Spośród osób, które mogą odnieść największą korzyść z suplementacji z użyciem siary, są sportowcy. Nie tylko wykazują oni tendencję do zwiększonej przepuszczalności jelitowej, ale także, jak wykryto, mają zwiększone ryzyko rozwinięcia się pewnych chorób wynikających z nadwrażliwości, w tym alergii [33].

Podziękowania: eksperyment w całości sfinansowany przez Pomorski Uniwersytet Medyczny, co obejmowało także koszty publikacji, jako materiału ogólnodostępnego.

Wkład pracy autorów jak poniżej: Maciej Hałasa, Ewa Stachowska i Magdalena Baśkiewicz-Hałasa opracowali koncepcję eksperymentów i zaprojektowali je; Dominika Maciejewska, Ewa Stachowska i Maciej Hałasa wykonali eksperymenty; Krzysztof Safranow, Maciej Hałasa i Magdalena Baśkiewicz-Hałasa analizowali dane; Bogusław Machaliński, Ewa Stachowska i Dominika Maciejewska dostarczyli reagenty/materiały/narzędzia analizy; Maciej Hałasa i Magdalena Baśkiewicz-Hałasa napisali artykuł.

Konflikty interesów: autorzy nie zgłaszają konfliktu interesów. Sponsor-inicjator badań nie uczestniczył w ich projektowaniu, zbieraniu, analizie ani interpretacji danych, pisaniu artykułu oraz decydowaniu o jego publikacji.

Literatura – znaczenie skrótów:

p. – strona

vol. – tom

issue – wydanie

ed. – pod redakcją

doi – identyfikator cyfrowy