

mgr inż. Izabela Grabowska

Białka angiopoetynopodobne 3, 4 i 8 a metabolizm
lipidów podczas długotrwałego wysiłku w zależności od
rodzaju diety

Rozprawa na stopień naukowy doktora nauk medycznych
w dyscyplinie: biologii medycznej

Promotor: prof. dr hab. n med. Andrzej Ziemba



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Naukową
Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej
im. Mirosława Mossakowskiego PAN

Warszawa 2018

Badania przedstawione w rozprawie były finansowane z projektu KNOW
„The search for new biomarkers of civilization diseases using high-throughput
techniques and modern diagnostic imaging”

*Panu Profesorowi
dr hab. n med. Andrzejowi Ziembie
pragnę podziękować za opiekę naukową,
cierpliwość i okazane wsparcie.*

*Pracownikom Zakładu Fizjologii Stosowanej
serdecznie dziękuję za pomoc i wsparcie
w realizacji niniejszej pracy.*

*W szczególności pragnę podziękować
dr n. med. Ewie Żernickiej oraz
dr n. med. Tomaszowi Mikulskiemu za udzieloną pomoc,
życzliwość i cenne wskazówki.*

*Serdecznie dziękuję Paniom
dr n. med. Monice Góreckiej, Bożenie Kurek oraz
Lidii Wiśnik za udzielone rady i współpracę.*

*Składam serdeczne podziękowania
prof. dr hab. Aleksandrze Misickiej-Kęsik oraz
dr inż. Beacie Wileńskiej
za udzieloną pomoc i współpracę.*

*Wyrazy wdzięczności kieruję do wszystkich uczestników badań,
bez których praca nigdy by nie powstała.*

SPIS TREŚCI

Wykaz ważniejszych skrótów:	8
1. WSTĘP	10
1.1. Regulacja metabolizmu energetycznego podczas wysiłku fizycznego.....	10
1.2. Rodzaje diet	13
1.3. Rola białek angiopoetynopodobnych w regulacji metabolizmu	14
1.4. Białka angiopoetynopodobne 3, 4 i 8	15
2. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY	20
3. MATERIAŁ I METODY BADAŃ.....	21
3.1. Zasady kwalifikacji do badań	21
3.2. Metody badań.....	22
3.2.1. Wywiad lekarski i pomiar spoczynkowej wielkości ciśnienia tętniczego krwi oraz częstości skurczów serca	22
3.2.2. Test wysiłkowy do odmowy na cykloergometrze	23
3.2.3. Badanie ankietowe aktywności fizycznej	23
3.2.4. Pomiary antropometryczne	24
3.2.5. Długotrwały wysiłek fizyczny na cykloergometrze	24
3.2.6. Badania biochemiczne	26
3.2.7. Ocena sposobu żywienia.....	28
3.3. Zastosowane oznaczenia i metody statystyczne	28
4. WYNIKI.....	30
4.1. Porównanie wieku, wskaźników antropometrycznych oraz maksymalnego pobierania tlenu pomiędzy badanymi grupami	30
4.2. Ocena aktywności fizycznej na podstawie Międzynarodowego Kwestionariusza Aktywności Fizycznej (IPAQ) w wersji długiej.....	31
4.3. Ocena sposobu żywienia na podstawie dzienniczka żywieniowego	31
4.4. Porównanie wartości współczynnika oddechowego pomiędzy grupami w spoczynku i w czasie długotrwałego wysiłku fizycznego	34
4.5. Porównanie stężenia kwasów: palmitynowego, stearynowego, palmitooleinowego, oleinowego oraz linolowego w osoczu pomiędzy grupami w spoczynku i 45. minucie wysiłku fizycznego	35
4.6. Porównanie stężenia wolnych kwasów tłuszczowych w osoczu pomiędzy grupami w spoczynku i w czasie długotrwałego wysiłku fizycznego.....	40
4.7. Porównanie stężenia glicerolu w osoczu pomiędzy grupami w spoczynku i w czasie długotrwałego wysiłku fizycznego	41
4.8. Porównanie stężenia glukozy w osoczu pomiędzy grupami w spoczynku i w czasie długotrwałego wysiłku fizycznego	42

4.9.	Porównanie stężenia insuliny w osoczu pomiędzy grupami w spoczynku i w czasie długotrwałego wysiłku fizycznego	43
4.10.	Porównanie stężenia białek angiopoetynopodobnych 3 w osoczu pomiędzy grupami w spoczynku i w czasie długotrwałego wysiłku fizycznego	44
4.11.	Porównanie stężenia białek angiopoetynopodobnych 4 w osoczu pomiędzy grupami w spoczynku i w czasie długotrwałego wysiłku fizycznego	45
4.12.	Porównanie stężenia białek angiopoetynopodobnych 8 w osoczu pomiędzy grupami w spoczynku i w czasie długotrwałego wysiłku fizycznego	46
4.13.	Porównanie stężenia lipazy lipoproteinowej w osoczu pomiędzy grupami w spoczynku i w czasie długotrwałego wysiłku fizycznego	47
4.14.	Porównanie stężeń cholesterolu całkowitego, cholesterolu frakcji lipoprotein o małej i dużej gęstości, a także triglicerydów w osoczu pomiędzy grupami w spoczynku i w czasie długotrwałego wysiłku fizycznego	48
4.15.	Ocena korelacji między stężeniami białek angiopoetynopodobnych 3 i 4, a stężeniem wolnych kwasów tłuszczowych w osoczu w spoczynku, 45. i 90. minucie wysiłku fizycznego	54
4.16.	Ocena korelacji między stężeniami białek angiopoetynopodobnych 3 i 4 a stężeniem kwasów palmitynowego, stearynowego, palmitooleinowego, oleinowego oraz linolowego w osoczu w spoczynku i 45. minucie wysiłku fizycznego	55
4.17.	Ocena korelacji między stężeniami białek angiopoetynopodobnych 3 i 4 a wskaźnikami lipidowymi w osoczu	57
5.	DYSKUSJA	59
6.	WNIOSKI	70
7.	INNOWACYJNOŚĆ ROZPRAWY	71
8.	STRESZCZENIE	72
9.	ABSTRACT	74
10.	PIŚMIENNICTWO	76
11.	WYKAZ RYCIN	85
12.	WYKAZ TABEL	87
13.	ANEKS nr 1	88
14.	ANEKS nr 2	89

Wykaz ważniejszych skrótów:

- ANGPTL3** (ang. *angiopoietin-like protein 3*) – białko angiopoetynopodobne 3
- ANGPTL4** (ang. *angiopoietin-like protein 4*) – białko angiopoetynopodobne 4
- ANGPTL8** (ang. *angiopoietin-like protein 8*) – białko angiopoetynopodobne 8
- ATP** (ang. *adenosine triphosphate*) – adenozynotrifosforan
- BMI** (ang. *body mass index*) – wskaźnik masy ciała
- ELISA** (ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*) – test immunoenzymatyczny
- HDL-C** (ang. *high density lipoprotein cholesterol*) – cholesterol frakcji lipoprotein o dużej gęstości
- HR** (ang. *heart rate*) – częstość skurczów serca
- HR_{max}** (ang. *maximum heart rate*) – maksymalna częstość skurczów serca
- nie-HDL-C** (ang. *non-HDL*) – cholesterol nie-HDL
- IPAQ** (ang. *International Physical Activity Questionnaire*) – Międzynarodowy Kwestionariusz Aktywności Fizycznej
- LDL-C** (ang. *low density lipoprotein cholesterol*) – cholesterol frakcji lipoprotein o małej gęstości
- LPL** (ang. *lipoprotein lipase*) – lipaza lipoproteinowa
- PPAR** (ang. *peroxisome proliferator-activated receptor*) – receptor aktywowany przez proliferatory peroksysomów
- RQ** (ang. *respiratory quotient*) – współczynnik oddechowy (ilość wyprodukowanego CO₂/pobranego O₂)
- SE** (ang. *standard error*) – błąd standardowy
- TC** (ang. *total cholesterol*) – cholesterol całkowity
- TG** (ang. *triacylglycerol*) – triglicerydy
- WHR** (ang. *waist-hip ratio*) – wskaźnik talia/biodra
- WKT** (ang. *free fatty acids*) – wolne kwasy tłuszczowe
- VLDL** (ang. *very low density lipoproteins*) – lipoproteiny osocza o bardzo małej gęstości
- VO₂** (ang. *oxygen uptake*) – pobór tlenu
- VO_{2max}** (ang. *maximal oxygen uptake*) – maksymalne pobieranie tlenu

1. WSTĘP

1.1. Regulacja metabolizmu energetycznego podczas wysiłku fizycznego

Odpowiednia regulacja wykorzystania zasobów energetycznych organizmu jest jednym z ważniejszych czynników determinujących możliwości podejmowania wysiłku fizycznego, definiowanego jako powtarzająca się aktywność fizyczna lub skurcze mięśniowe mające na celu utrzymanie sprawności fizycznej lub zdrowia (Caspersen i wsp., 1985).

Głównym nośnikiem energii chemicznej w komórkach jest wysokoenergetyczny związek adenozynotrifosforan (ATP). Jego ilość w mięśniach szkieletowych jest niewielka i wystarcza na zaledwie kilka sekund wysiłku o maksymalnej intensywności. Z tego względu w celu pokrycia zapotrzebowania organizmu na energię, ATP musi być na bieżąco odtwarzane (Noakes i wsp., 2004). Podstawowym substratem energetycznym służącym do resyntezy ATP są węglowodany i tłuszcze, których metabolizm jest ze sobą powiązany. W warunkach fizjologicznych białka mogą dostarczyć nie więcej niż 5-10% całkowitej energii. Powyższe związki występują w postaci wewnątrzkomórkowej, jako: glikogen - magazynowany w wątrobie (6-8% masy tego narządu) i mięśniach (1-2% masy mięśni), oraz triglicerydy (TG) - magazynowane w tkance tłuszczowej i wewnątrz mięśni; jak również w postaci krwiopochodnej: krążącej we krwi glukozy, wolnych kwasów tłuszczowych i lipoprotein osocza, a także ciał ketonowych i niektórych aminokwasów, takich jak: leucyna, izoleucyna, walina oraz glutaminian i asparaginian (Górski, 2012).

Wysiłek fizyczny zwiększa zapotrzebowanie organizmu na energię oraz tlen i, aby sprostać temu zadaniu, szczególnie w mięśniach szkieletowych dochodzi do wielu procesów umożliwiających pokrycie zwiększonego zapotrzebowania metabolicznego. Na dzień dzisiejszy nadal nie są znane wszystkie czynniki, które mogą regulować szlaki metabolizmu węglowodanów i tłuszczów podczas wysiłku fizycznego. Wśród nich wymienia się: dostępność zewnątrz- jak i wewnątrzmięśniowych substratów energetycznych – która jest regulowana, m.in. przez dietę, na co w serii czterech klasycznych już doświadczeń zwrócili uwagę August Krogh i Johannes Lindhard na początku XX wieku (Krogh i Lindhard, 1920); dostępność białek transportowych, a także aktywność kluczowych enzymów i hormonów biorących udział w regulacji metabolizmu energetycznego (Hearris i wsp., 2018).

Intensywność i czas trwania ćwiczeń fizycznych są jednym z najważniejszych czynników wpływających na udział poszczególnych substratów energetycznych w pokryciu zapotrzebowania na energię. Tłuszcze są głównym substratem energetycznym podczas wysiłków o niskiej i umiarkowanej intensywności. U osób wytrenowanych maksymalne utlenianie kwasów tłuszczowych obserwuje się przy wysiłku o intensywności 59-64% maksymalnego poboru tlenu (VO_2max), u osób zaś o siedzącym trybie życia przy 47-52% VO_2max (Achten i Jeukendrup, 2004). Z kolei podczas wysiłku o dużej intensywności (>85% VO_2max) głównym substratem energetycznym dla pracujących mięśni są węglowodany, pochodzące z hydrolizy glikogenu mięśniowego i wątrobowego oraz wzmożonego wychwyty glukozy z krwi (Hargeaves, 2015). Poza intensywnością i czasem trwania wysiłku fizycznego wpływ na udział poszczególnych szlaków metabolicznych w pozyskiwaniu energii ma także częstość sesji wysiłkowych i rodzaj treningu, poziom wytrenowania, płeć, a także sposób żywienia (Thomas i wsp., 2016). Zasoby glikogenu mięśniowego nie ulegają zmniejszeniu z powodu nocnej, 8-12 - godzinnej przerwy w przyjmowaniu posiłków. Zawartość glikogenu wątrobowego zaś jest nieco niższa, natomiast zwiększa się dostępność wolnych kwasów tłuszczowych jako źródła energii w porównaniu z przystąpieniem do wysiłku fizycznego po posiłku (Horowitz i wsp., 1997). Glikogen jest odkładany w wątrobie i tkance mięśniowej m.in. dzięki insulinie, wydzielanej przez komórki β trzustki, która zwiększa wychwyt glukozy przez te tkanki (Matulewicz i Karczewska-Kupczewska, 2016). Dieta bogatowęglowodanowa (powyżej 65% wartości energetycznej pochodzi z węglowodanów) powoduje zwiększenie udziału węglowodanów w pokrywaniu zapotrzebowania na energię. Powiększają się także zasoby węglowodanów w organizmie, wpływając korzystnie na zdolność do wysiłków o umiarkowanej i wysokiej intensywności. Z drugiej strony, dieta bogatotłuszczowa zmniejsza udział węglowodanów w metabolizmie wysiłkowym, poprzez zwiększony udział wolnych kwasów tłuszczowych w pokrywaniu zapotrzebowania energetycznego. Niemniej jednak dla uzyskania tej samej ilości energii przy utlenianiu wolnych kwasów tłuszczowych potrzebna jest większa ilość tlenu. Wykorzystanie jednego litra tlenu przy produkcji energii z węglowodanów prowadzi do wytworzenia 21,0 kJ (5,01 kcal) energii, podczas gdy utlenienie tłuszczów daje jedynie 19,6 kJ (4,68 kcal) (Maughan i Gleeson, 2004). W licznych badaniach wykazano znacząco większe korzyści ze stosowania diety wysokowęglowodanowej niż bogatotłuszczowej dla osób uprawiających wzmożoną aktywność fizyczną rekreacyjnie, jak i zawodowo. Zdolność wykorzystania wolnych

kwasów tłuszczowych w procesach energetycznych zwiększa się pod wpływem treningu wytrzymałościowego (Burke i wsp., 2017; Close i wsp., 2016).

W celu oszacowania udziału poszczególnych substratów energetycznych w pozyskiwaniu energii, wykorzystuje się współczynnik oddechowy, który jest stosunkiem objętości wydalanego dwutlenku węgla do zużytego tlenu. Jego wartość waha się między 0,7 a 1,0, przy czym podczas bardzo ciężkiego wysiłku fizycznego może przekroczyć tę wartość (Robinson i wsp., 2015).

Wolne kwasy tłuszczowe utleniane podczas wysiłku fizycznego pochodzą z trzech źródeł: w przeważającej części z triglicerydów tkanki tłuszczowej, a także z triglicerydów zawartych w lipoproteinach osocza oraz z triglicerydów zawartych w komórkach mięśniowych (Bosma, 2014). Stężenie WKT w osoczu i ich dostępność dla mięśni stopniowo zwiększają się w czasie trwania wysiłku fizycznego. W tkance tłuszczowej i mięśniowej rozkład TG katalizuje lipaza hormonowrażliwa, lipaza triglicerydowa adipocytów oraz monoacyloglicerolowa, natomiast rozkład TG lipoprotein osocza zachodzi za pośrednictwem lipazy lipoproteinowej (LPL) działającej na śródbłonku w świetle naczyń włosowatych. Czynniki stymulujące aktywność lipazy hormonowrażliwej, jak i lipazy lipoproteinowej nie zostały dotychczas w pełni poznane (van Hall, 2015).

Lipoproteiny osocza bogate w triglicerydy krążące w naczyniach krwionośnych mięśni szkieletowych są źródłem wolnych kwasów tłuszczowych, które mogą stanowić źródło energii dla pracujących mięśni, bądź też zostać ponownie zestryfikowane w aktywnym mięśniu. Głównymi lipoproteinami bogatymi w TG są lipoproteiny o bardzo małej gęstości (VLDL) wytwarzane w wątrobie w stanie na czczo. Drugą lipoproteiną bogatą w TG są chylomikrony syntetyzowane w jelicie cienkim i pojawiające się we krwi około godziny po posiłku zawierającym tłuszcze (Julve i wsp., 2016).

1.2. Rodzaje diet

Rodzaj spożywanej diety można klasyfikować w zależności od zawartości w niej makroskładników, w tym węglowodanów. W zwyczajowej diecie węglowodany powinny stanowić 45-65% całodziennego zapotrzebowania na energię. Zaleca się, aby tłuszcz ogółem w diecie dorosłej osoby pokrywał 20-35% zapotrzebowania energetycznego na dobę, białko zaś 10-20% (Jarosz, 2017). Wysokowęglowodanową dietą są określane modele żywienia, w których węglowodany stanowią ponad 65% zapotrzebowania energetycznego. Natomiast dieta niskowęglowodanowa zawiera mniej niż 26% energii z węglowodanów (Liebman, 2014).

Tłuszcze w diecie pochodzenia zwierzęcego i roślinnego zawierają kwasy tłuszczowe o różnej długości łańcucha i różnym stopniu nasycenia. Najczęściej spotykane są długołańcuchowe kwasy nasycone, takie jak: kwas stearynowy (C18:0) i palmitynowy (C16:0) oraz kwasy nienasycone: palmitooleinowy (C16:1), oleinowy (C18:1) i linolowy (C18:2). Krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe występują w mniejszych ilościach i rzadziej, głównie w mleku i maśle. Średniołańcuchowe kwasy tłuszczowe (C-10 do C-14) prawie nie występują w prawidłowej diecie. Kwasy nasycone w przeważającej ilości znajdują się w produktach pochodzenia zwierzęcego, kwasy nienasycone zaś w produktach pochodzenia roślinnego. Dla prawidłowego funkcjonowania organizmu człowieka ma znaczenie nie tylko całkowita zawartość tłuszczu w diecie, ale również rodzaj kwasów tłuszczowych. Podaż nasyconych kwasów tłuszczowych powinna być jak najniższa na ile jest to możliwe. Kwas linolowy - należący do grupy niezbędnych nienasyconych kwasów tłuszczowych - powinien dostarczać 4% całodzienną energię (Jarosz, 2017).

Coraz większą popularnością cieszą się diety wegetariańskie. Wyróżnia się kilka odmian wegetarianizmu w zależności od rodzaju wykluczonych produktów pochodzenia zwierzęcego. Jednym z bardziej restrykcyjnych odmian jest weganizm. Ten sposób żywienia opiera się tylko na produktach pochodzenia roślinnego, takich jak: warzywa, owoce, zboża, nasiona roślin strączkowych, grzyby i ewentualnie także glony (Pilis i wsp., 2014). W dostępnej literaturze nie brakuje badań, które wskazują na prozdrowotny efekt diet wegetariańskich, w tym wegańskich, m.in. w prewencji chorób układu sercowo-naczyniowego czy nowotworów (Dinu i wsp., 2017).

1.3. Rola białek angiopoetynopodobnych w regulacji metabolizmu

Na przełomie XX i XXI wieku opisano nową rodzinę białek podobnych strukturalnie do angiopoetyn – białka angiopoetynopodobne (ANGPTL). Obecnie znanych jest osiem białek angiopoetynopodobnych, nazwanych kolejno od ANGPTL1 do ANGPTL8 (Santulli, 2014). Białka angiopoetynopodobne zawierają w swojej cząsteczce dwie domeny funkcjonalne, tzw. N-koniec (resztę aminokwasową), który wykazuje działanie metaboliczne oraz C-koniec (resztę karboksylową), podobny do fibrynogenu, mający zdolność modyfikacji procesów angiogenezy. Wyjątkiem jest białko ANGPTL8, które nie posiada domeny C-końcowej (Kersten, 2014). Białka angiopoetynopodobne mimo strukturalnego podobieństwa do czynników angiogennych nie wiążą się z receptorami angiopoetyn (Tie1 i Tie2 – receptory kinazy tyrozyny), co wskazuje, iż pełnią inną funkcję niż angiopoetyny (Kim i wsp., 2000). Jednocześnie liczne badania pokazują, że ANGPTL mogą także regulować proces angiogenezy (Hato i wsp., 2008).

Literatura przedmiotu wskazuje na kluczową rolę białek angiopoetynopodobnych w regulacji wielu procesów fizjologicznych i patofizjologicznych, takich jak: metabolizm lipidów (Kersten, 2005), metabolizm węglowodanów (Cinkajzlová i wsp., 2018), stany zapalne (Tabata i wsp., 2009) oraz rozwój nowotworów (Kuo i wsp., 2013) czy nadmiernej masy ciała (Robciuc, 2011). Opisaną w piśmiennictwie rolę ANGPTL zmienia dotychczasowy pogląd dotyczący czynników regulujących gospodarkę lipidową. Prawdopodobnie wpływają one na ryzyko wystąpienia dyslipidemii i tym samym na rozwój chorób sercowo-naczyniowych (Kersten, 2014).

Spośród ośmiu białek tej rodziny, trzy, to jest ANGPTL3, ANGPTL4 i ANGPTL8 posiadają domenę umożliwiającą wiązanie się z lipazą lipoproteinową (LPL), enzymem hydrolizującym TG zawarte w chylomikronach i lipoproteinach o bardzo małej gęstości (VLDL) (Kersten, 2014). Stężenie TG we krwi jest zależne właśnie od stężenia tych dwóch lipoprotein (Mattijssen i Kersten, 2012). Tym samym ANGPTL3, ANGPTL4 i ANGPTL8 zostały uznane za ważny regulator metabolizmu lipidów. Jednocześnie nie jest jasny związek stężenia tych białek we krwi u ludzi z ich wpływem na hamowanie aktywności LPL.

1.4. Białka angiopoetynopodobne 3, 4 i 8

Białko angiopoetynopodobne 3 zostało odkryte w 1999 roku (Conklin i wsp., 1999). Jest produkowane wyłącznie w wątrobie, a jego ekspresja jest aktywowana za pośrednictwem receptora wątrobowego X (LXR). Poza hamowaniem aktywności lipazy lipoproteinowej, hamuje również aktywność lipazy śródbłonkowej, która hydrolizuje fosfolipidy zawarte w cholesterolu frakcji lipoprotein o wysokiej gęstości (HDL-C) (Shimamura, 2007). Mutacje genu *ANGPTL3* powodujące obniżenie jego aktywności, wydają się być powiązane z występowaniem hipobetalipoproteinemii rodzinnej, rzadkiej genetycznej choroby charakteryzującej się znacznym obniżeniem stężenia w osoczu lipoprotein zawierających apolipoproteinę B, w tym cholesterolu frakcji lipoprotein o małej gęstości (LDL-C). Można by to uznać za pozytywny aspekt, gdyby nie fakt, że objawem klinicznym choroby jest stłuszczenie wątroby (Musunuru i wsp., 2010). Mimo prowadzonych badań genetycznych, które wskazują na związek pewnych wariantów genu *ANGPTL3* z TG, LDL-C, a także HDL-C, związek stężenia tego białka w osoczu a profilem lipidowym nadal zostaje niewyjaśniony. Do tej pory jest niewiele badań prowadzonych u ludzi w tym zakresie, a dodatkowo należy podkreślić, iż uzyskiwane są odmienne wyniki (Mehta i wsp., 2014). Również wpływ *ANGPTL3* na metabolizm glukozy nie jest jasny. Nieliczne badania na modelu zwierzęcym pokazują możliwość potencjalnego pośredniego lub bezpośredniego wpływu na metabolizm glukozy i wrażliwość tkanek na działanie insuliny (Kersten, 2017). I tak badania przeprowadzone na myszach sugerują możliwy wpływ *ANGPTL3* na lipolizę w tkance tłuszczowej i tym samym uwolnienie wolnych kwasów tłuszczowych do krwiobiegu. Jednak mechanizmy tego działania nie zostały wyjaśnione, jak i to, czy białko to wykazuje takie same działanie u ludzi (Shimamura i wsp., 2003). Najprawdopodobniej wpływ na hamowanie aktywności lipazy lipoproteinowej *ANGPTL3* wywiera za pośrednictwem *ANGPTL8*. Jednak obecnie nie jest znany mechanizm oddziaływania między tymi dwoma białkami (Kersten, 2017).

W roku 2000 trzy niezależne grupy badawcze zidentyfikowały jednocześnie kolejne białko należące do rodziny białek angiopoetynopodobnych - *ANGPTL4* (Ali i Ranneh, 2013). Zostało ono odkryte jako białko wydzielane przez tkankę tłuszczową (Kersten i wsp., 2000) oraz wątrobę (Kim i wsp., 2000). Dzisiaj wiadomo, że w przeciwieństwie do *ANGPTL3*, *ANGPTL4* jest syntetyzowane w wielu tkankach i narządach, takich jak: tkanka tłuszczowa (Robciuc i wsp. 2012), jelito cienkie (Alex

i wsp., 2014), tkanka mięśniowa (Norheim i wsp., 2014], ale - przede wszystkim – w wątrobie (Kersten i wsp., 2009).

Odkryte białko znane jest pod następującymi nazwami: białko o strukturze podobnej do angiopoetyny 4, czynnik tkanki tłuszczowej/czynnik adipocytarny indukowany głodem (FIAF, *fasting-induced adipose factor*), białko związane z angiopoetyną PPAR γ oraz białko związane z fibrynogenem wątrobowym/angiopoetyną (HFARP, *hepatic fibrinogen/ angiopoietin-related protein*) (Mandard i wsp., 2004).

Badania nad rolą ANGPTL4 u ludzi są wielokierunkowe i związane, m.in. z takimi obszarami badawczymi, jak: diabetologia, onkologia, choroby układu sercowo-naczyniowego. Wiadomo już, że ANGPTL3 i ANGPTL4 są ze sobą blisko spokrewnione - składają się w 31% z identycznej sekwencji aminokwasów (Mandard i wsp. 2004), a stężenie we krwi obu tych białek jest znacznie zróżnicowane osobniczo (Kersten i wsp., 2009; Robciouc i wsp., 2010).

Białko ANGPTL8, nazywane również betotropiną, jest jak dotąd najnowszym, odkrytym w roku 2012, białkiem angiopoetynopodobnym (Kersten, 2017). Tak jak ANGPTL3 i ANGPTL4, również posiada domenę w łańcuchu peptydowym mogącą wiązać się z lipazą lipoproteinową. Nie mniej jednak rola tego białka w regulacji metabolizmu lipidowego jest jeszcze mniej poznana niż powyższych dwóch białek. Dotychczasowe badania wskazują na powiązanie działania ANGPTL8 z ANGPTL3 przy hamowaniu aktywności lipazy lipoproteinowej (Quagliarini i wsp., 2012; Ren i wsp., 2012). Również jego ekspresja u ludzi występuje prawdopodobnie tylko w wątrobie (Zhang, 2012). Badania nad tym białkiem prowadzone są głównie w kierunku jego potencjalnego znaczenia w rozwoju cukrzycy, otyłości czy zespołu metabolicznego (Abu-Farha i wsp., 2017).

Mechanizm doprowadzający do wzrostu stężenia ANGPTL3, ANGPTL4 i ANGPTL8 we krwi nie jest poznany. Postuluje się wpływ czynników prozapalnych, m.in. interleukiny 1, prostaglandyny, interferonu gamma, czy czynnika martwicy nowotworu typu alfa na wzmożoną syntezę ANGPTL3 i ANGPTL4 u gryzoni (Lu i wsp., 2010). Istnieje kilka potencjalnych czynników mogących zwiększyć ekspresję *ANGPTL4* u ludzi, takich jak: wolne kwasy tłuszczowe (WKT) poprzez aktywację receptorów aktywowanych proliferatorami peroksysomów (PPAR) (Staiger i wsp., 2009), glikokortykoidy (Koliwad i wsp., 2009), czy hipoksja (Xin i wsp., 2013).

Ekspresja genu *ANGPTL4* jest aktywowana za pośrednictwem receptorów aktywowanych przez proliferatory peroksysomów (PPAR) alfa, beta i gamma, których

główną rolą jest kontrola metabolizmu kwasów tłuszczowych i utrzymanie homeostazy glukozy (Hongfei i wsp., 2005). Ekspresja genu receptora PPAR- α jest największa w tkankach i narządach, które charakteryzują się wysokim poziomem przemiany kwasów tłuszczowych, takich jak: tkanka tłuszczowa, mięśnie szkieletowe, serce i wątroba (Górski, 2012). Prawdopodobnie ANGPTL4 jest wytwarzane w tkance mięśniowej za pośrednictwem PPAR- δ w odpowiedzi na obecność długołańcuchowych nasyconych kwasów tłuszczowych we krwi, do których należą, m.in. kwas palmitynowy (16:0) i stearynowy (18:0) (Staiger i wsp., 2009). Agoniści zarówno PPAR α , PPAR γ , PPAR- δ mogą zwiększać ekspresję genu *ANGPTL4*, jak i podwyższać jego stężenie we krwi u ludzi i gryzoni (Mandard i wsp., 2004).

Niezbyt wiele wiadomo na temat czynników wpływających na stężenie ANGPTL we krwi u ludzi. Większość dotychczas przeprowadzonych badań zostało wykonanych na modelu zwierzęcym. Uważa się, że ekspresja *ANGPTL4* może być aktywowana także przez stan na czczo (głód), podczas gdy ekspresja *ANGPTL3* prawdopodobnie nie zależy od stanu odżywienia (Mandard i wsp., 2004). Dotychczas ukazało się jedno badanie pokazujące, że być może interwencja żywieniowa, a zwłaszcza udział białka zwierzęcego w diecie, ma wpływ na stężenie ANGPTL8 we krwi u ludzi (Crujeiras i wsp., 2016).

Badania Kersten i wsp. (2009) wykazały, że osoczowe stężenie ANGPTL4 wzrasta w wyniku krótkotrwałej głodówki, długotrwałego ograniczenia dostarczonych kalorii oraz pod wpływem wysiłku wytrzymałościowego. Autorzy wskazują, że za długoterminowe zmiany osoczowego stężenia ANGPTL4 prawdopodobnie odpowiadają zmiany w osoczu WKT, które istotnie zwiększają ekspresję genu *ANGPTL4*. Dane te sugerują również, że ANGPTL4 może stanowić sygnał hormonalny zaangażowany w regulację metabolizmu, zwłaszcza w stanie na czczo (Kersten i wsp., 2009). Co ciekawe, niektóre badania pokazują wyższe stężenia ANGPTL3, ANGPTL4 i ANGPTL8 w osoczu u osób chorych na cukrzycę typu 2 (Abu-Farha i wsp., 2016).

W badaniach przeprowadzonych przez Brands i wsp. (2013) postawiono hipotezę, iż na stężenie ANGPTL4 we krwi ma wpływ nie tylko stężenie WKT ogółem, ale także to, jaki jest dostępny rodzaj kwasów tłuszczowych. Wielonienasycone kwasy tłuszczowe powinny spowodować największy wzrost stężenia ANGPTL4 we krwi, ponieważ one właśnie bezpośrednio działają na czynnik PPAR prowadząc do zwiększenia jego aktywności. Uzyskane wyniki pokazują, że największy wpływ na stężenie ANGPTL4 mogą mieć rzeczywiście wielonienasycone kwasy tłuszczowe, w tym - przede wszystkim - z rodziny omega-3 (Brands i wsp., 2013).

Tak jak wspomniano powyżej, ANGPTL3, ANGPTL4 i ANGPTL8 regulują proces metabolizmu lipidów poprzez hamowanie aktywności LPL, enzymu należącego do rodziny lipaz, do której wlicza się także lipazę wątrobową i trzustkową. LPL jest kluczowym enzymem biorącym udział w transporcie i metabolizmie lipidów. Jest odpowiedzialna za homeostazę lipidową oraz równowagę energetyczną organizmu. Syntetyzowana jest głównie w komórkach serca, mięśni szkieletowych i tkanki tłuszczowej (Li i wsp., 2014). Z powodu kluczowej roli w metabolizmie lipidów, poznanie mechanizmu kontroli ekspresji LPL staje się istotną kwestią. Zmiana ekspresji i aktywności LPL jest regulowana przez hormony, takie jak: insulinę, glikokortykoidy i adrenalinę oraz szereg różnych czynników, do których należą czynniki transkrypcyjne, białka, czy stan odżywienia organizmu (Yuan i wsp., 2014; Ramasamy, 2014). LPL łączy się z powierzchnią komórek śródbłónka naczyń krwionośnych, a jedynie około 3-6% LPL występuje w osoczu w formie niezwiązanej z powierzchnią śródbłónka (Di Filippo i wsp., 2014).

Publikacje dotyczące kontroli aktywności LPL wskazują na znaczną złożoność tego procesu. LPL zawiaduje wykorzystaniem kwasów tłuszczowych z lipoprotein osocza w zależności od potrzeb metabolicznych w poszczególnych tkankach, kierując kwasy tłuszczowe do mięśni szkieletowych w celu wykorzystania ich jako źródła energii lub do tkanki tłuszczowej, gdzie są odkładane w formie TG (Dijk i Kersten, 2014). Zatem hamowanie aktywności lipazy lipoproteinowej w tkankach przez ANGPTL3, ANGPTL4 i ANGPTL8 w spoczynku oraz podczas wysiłku fizycznego, teoretycznie może dostosować ilość uwalnianych WKT do potrzeb energetycznych organizmu. Hipoteza ta sugeruje również, że podczas deficytu energetycznego, wywołanego głodem lub długim wysiłkiem fizycznym, przedmiotowe białka mogą powodować ograniczenie lipogenezy, z drugiej zaś strony umożliwiać wykorzystanie WKT w takich tkankach jak mięśnie. Głód obniża aktywność LPL w tkance tłuszczowej, ale podwyższa w tkance mięśniowej. Dotychczas zidentyfikowano kilka efektorów, które modulują funkcję LPL *in vivo*. ApoCII jest zasadniczym kofaktorem aktywności LPL, tak jak ANGPTL3, ANGPTL4 i ANGPTL8, które hamują aktywność LPL. Interakcja między ANGPTL4 a LPL powoduje konwersję enzymu z katalitycznie aktywnego dimeru do nieaktywnego monomeru (Sukonina i wsp., 2006). ANGPTL3 jest syntetyzowane prawie wyłącznie w wątrobie, w której LPL u dorosłych ludzi występuje w niewielkiej ilości albo w ogóle nie występuje. Ekspresja genu *ANGPTL4* w tkance tłuszczowej jest indukowana przez głód, co sugeruje, że białko ANGPTL4 hamuje działanie LPL

w tkance tłuszczowej i tym samym dochodzi do przekierowania triglicerydów z tkanki tłuszczowej do innych tkanek, w tym do mięśni (Romeo i wsp., 2009). Czynniki wpływające na aktywność lipazy lipoproteinowej nie zostały jeszcze w pełni poznane, także rola ANGPTL3, ANGPTL4 i ANGPTL8 w regulacji aktywności tego enzymu nie jest wystarczająco jasna.

Biorąc pod uwagę opisane dotąd znaczenie ANGPTL w regulacji szlaków metabolicznych kwasów tłuszczowych, potencjalna rola ANGPTL3, ANGPTL4 i ANGPTL8 w gospodarce zasobami energetycznymi podczas wysiłku fizycznego wydaje się być istotna.

Jak już zaznaczono, stężenie we krwi tych białek jest znacznie zróżnicowane osobniczo. Niewiele wiadomo na temat czynników wpływających na stężenie ANGPTL we krwi u ludzi. Prawdopodobnie białka ANGPTL3, ANGPTL4 i ANGPTL8 pełnią różną funkcję i mają różny mechanizm działania na procesy fizjologiczne (Zhang, 2016). Nieznany jest także wpływ rodzaju spożywanej diety na stężenie ANGPTL w spoczynku, jak i podczas wysiłku fizycznego. Być może właśnie sposób żywienia może wywierać wpływ na stężenie ANGPTL we krwi.

Również regulacja metabolizmu lipidowego przez przedmiotowe białka podczas wysiłku fizycznego nie została dostatecznie przebadana. Stężenie we krwi, jak i wzajemne powiązania między ANGPTL3, ANGPTL4 i ANGPTL8 nie są dobrze poznane u ludzi i dlatego też jednoznaczna odpowiedź na pytanie o istotę ich stężenia we krwi aktualnie nie jest możliwa.

2. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY

Biorąc pod uwagę opisane dotąd znaczenie ANGPTL w regulacji szlaków metabolicznych tłuszczów, białka te mogą mieć potencjalny wpływ na regulację gospodarki energetycznej organizmu człowieka. Jednocześnie nie są dobrze poznane związki pomiędzy metabolizmem lipidów a stężeniem ANGPTL3, ANGPTL4 i ANGPTL8 we krwi u ludzi. Celowe byłoby zbadanie czynników mogących decydować o takich współzależnościach.

W obecnej pracy postawiono hipotezę, że być może podwyższone stężenie kwasów tłuszczowych we krwi spowodowane stanem na czczo, jak i dodatkowo długotrwałym wysiłkiem fizycznym, ale także i jakością diety - którą determinuje ilość i rodzaj spożywanych kwasów tłuszczowych - mają wpływ na stężenie ANGPTL3, ANGPTL4 i ANGPTL8 we krwi.

Przeprowadzone badania miały na celu:

- 1) ocenę wpływu diety mieszanej, bogatotłuszczowej oraz wegańskiej na stężenie białek angiopoetynopodobnych 3, 4 i 8 we krwi,
- 2) ocenę wpływu długotrwałego wysiłku fizycznego na stężenie białek angiopoetynopodobnych 3, 4 i 8 we krwi,
- 3) określenie korelacji między stężeniem białek angiopoetynopodobnych 3 i 4 a wybranymi wskaźnikami lipidowymi we krwi, takimi jak: cholesterol całkowity, lipoproteiny o małej gęstości, lipoproteiny o dużej gęstości oraz triglicerydy, a także między wolnymi kwasami tłuszczowymi oraz palmitynowym, stearynowym, palmitooleinowym, oleinowym oraz linolowym kwasem tłuszczowym.

3. MATERIAŁ I METODY BADAŃ

3.1. Zasady kwalifikacji do badań

Badaniami objęto 62 ochotników, którzy - w zależności od stosowanej diety - zostali przydzieleni do jednej z trzech grup:

- dieta mieszana – osoby stosujące dietę mieszaną, nie wykluczającą żadnych produktów spożywczych (n=23),
- dieta bogatotłuszczowa – osoby stosujące dietę bogatotłuszczową, w której zawartość tłuszczu stanowiła minimum 50% pokrycia zapotrzebowania na energię (n=17),
- dieta wegańska – osoby będące na diecie wegańskiej, opierającej się wyłącznie na produktach pochodzenia roślinnego (n=22).

Kryteria włączenia do badań obejmowały:

- dobrowolne zgłoszenie uczestnictwa i podpisanie formularza zgody na uczestnictwo w badaniach,
- płeć męską,
- wiek od 25. do 35. roku życia,
- wskaźnik masy ciała (BMI) $<30 \text{ kg/m}^2$,
- pozytywną ocenę kwalifikacyjną, opartą na ocenie stanu zdrowia i wydolności fizycznej (na podstawie wywiadu lekarskiego i testu wydolności fizycznej),
- aktywny tryb życia - określony jako podejmowanie aktywności fizycznej minimum 3 razy w tygodniu o umiarkowanej intensywności przez minimum 45 minut dziennie,
- w wypadku osób będących na diecie bogatotłuszczowej lub wegańskiej - stosowanie diety przez minimum jeden rok,
- niespożywanie kawy i alkoholu na dobę przed badaniem,
- wstrzymanie się od treningu na dobę przed badaniem oraz zachowanie nocnego wypoczynku,
- przynajmniej miesięczna przerwa w stosowaniu odżywek białkowych i węglowodanowych, jeśli były wcześniej stosowane.

Wszystkich badanych poinformowano o celu i protokole badań, a oni wyrazili pisemną zgodę na uczestnictwo. Program badań został zaakceptowany przez Komisję Bioetyczną na Uniwersytecie Medycznym w Warszawie (nr zezwolenia KB/73/A/2014 z dnia 7.10.2014 roku).

3.2. Metody badań

Badania przeprowadzone były w Zakładzie Fizjologii Stosowanej Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk w Warszawie. Protokół badania obejmował dwa spotkania z ochotnikami, między którymi była minimum doba przerwy.

Podczas pierwszej wizyty przeprowadzono:

1. Wywiad lekarski, dokonano pomiaru spoczynkowej wielkości ciśnienia tętniczego krwi oraz częstości skurczów serca;
2. Test wysiłkowy do odmowy na cykloergometrze w celu oceny wydolności tlenowej;
3. Badania ankietowe aktywności fizycznej;
4. Pomiary antropometryczne.

Podczas drugiej wizyty zrobiono badanie właściwe obejmujące:

5. Umiarkowany, 90-minutowy wysiłek fizyczny na cykloergometrze z obciążeniem dobranym na podstawie testu wysiłkowego do odmowy; podczas wysiłku pobierano próbki krwi oraz mierzono ilości pobranego tlenu i wydychanego dwutlenku węgla;

W dalszej kolejności wykonano:

6. Oznaczenia biochemiczne;
7. Ocenę sposobu żywienia.

3.2.1. Wywiad lekarski i pomiar spoczynkowej wielkości ciśnienia tętniczego krwi oraz częstości skurczów serca

Wywiad lekarski przeprowadzono na podstawie autorskiego kwestionariusza medycznego, przygotowanego we współpracy z lekarzem Zakładu Fizjologii Stosowanej (aneks nr 1).

Pomiary spoczynkowych wielkości ciśnienia tętniczego krwi i częstości skurczów serca zostały wykonane w pozycji siedzącej, po 5-minutowym odpoczynku. Ciśnienie tętnicze krwi oraz częstość skurczów serca mierzono za pomocą ciśnieniomierza Beurer medical BM 40.

3.2.2. Test wysiłkowy do odmowy na cykloergometrze

Wydolność fizyczną badanych osób oceniono metodą bezpośrednią w pracowni badań czynnościowych zakładu. Badani wykonywali stopniowany wysiłek na cykloergometrze firmy Simens. Podczas wysiłku rejestrowano częstość skurczów serca za pomocą Sport-Testera Forerunner 310XT firmy Garmin oraz prowadzono ciągłą rejestrację ilości tlenu pobieranego z powietrza i wydychanego dwutlenku węgla przy użyciu analizatora gazów Sensor Medics (USA). W celu oznaczenia maksymalnego pobierania tlenu ($VO_2\max$) obciążenie było zwiększane od 50 W co trzy minuty o kolejne 50 W do momentu odmowy przez badanego. Określona wartość $VO_2\max$ posłużyła do wyznaczenia obciążenia zadanego w trakcie długotrwałego wysiłku fizycznego podczas drugiej wizyty.

3.2.3. Badanie ankietowe aktywności fizycznej

Poziom aktywności fizycznej oceniono za pomocą Międzynarodowego Kwestionariusza Aktywności Fizycznej (IPAQ) w wersji długiej. Kwestionariusz został wypełniony przez badacza podczas pierwszej wizyty ochotnika (aneks nr 2).

Określono liczbę dni w ciągu ostatniego tygodnia oraz czas przeznaczony na aktywność fizyczną intensywną, umiarkowaną, a także na chodzenie. Kwestionariusz pozwala również na określenie łącznego czasu przeznaczonego na siedzenie w dni powszednie oraz w dni wolne od pracy.

Aktywność fizyczną, wyrażoną jako ekwiwalent metaboliczny (MET – metabolic equivalent of task), obliczono mnożąc liczbę dni wykonywania określonego wysiłku przez wartość MET dla danego wysiłku i przez średnią liczbę minut wykonywania danego wysiłku w ciągu dnia.

Obliczono również tygodniową objętość aktywności fizycznej, na podstawie której określono poziom aktywności fizycznej poszczególnych osób w grupach.

Wyniki badań klasyfikowano wg zaleceń IPAQ:

- aktywność wysoka – gdy jest spełnione jedno z poniższych kryteriów:
 - 3 lub więcej dni intensywnych wysiłków fizycznych, łącznie co najmniej 1500 MET-min/tydzień,
 - 7 lub więcej dni którejkolwiek kombinacji wysiłków (chodzenia, umiarkowanych lub intensywnych wysiłków) przekraczającej 3000 MET-min/tydzień;
- aktywność wystarczająca – gdy jest spełnione jedno z kryteriów:

- 3 lub więcej dni intensywnych wysiłków fizycznych, nie mniej niż 20 minut dziennie,
- 5 lub więcej dni umiarkowanych wysiłków lub chodzenia, nie mniej niż 30 minut dziennie,
- 5 lub więcej dni którejkolwiek kombinacji aktywności fizycznej (chodzenia, umiarkowanej lub intensywnej aktywności fizycznej) przekraczającej 600 MET-min/tydzień;
- aktywność niewystarczająca – przy braku aktywności fizycznej lub przy braku spełniania warunków dla poziomu wystarczającego i wysokiego (Biernat, 2017).

3.2.4. Pomiary antropometryczne

Podczas badań zmierzono masę ciała (kg), wysokość ciała (m), obwód talii i obwód bioder (cm). Na podstawie uzyskanych wyników pomiarów cech antropometrycznych obliczono następujące wskaźniki:

BMI (*body mass index*) – wskaźnik masy ciała, obliczony wg wzoru:

$$\text{BMI} = \frac{\text{masa ciała [kg]}}{(\text{wysokość ciała [m]})^2}$$

WHR (*waist-hip ratio*) – wskaźnik stosunku obwodu talii do obwodu bioder, obliczony wg wzoru:

$$\text{WHR} = \frac{\text{obwód talii [cm]}}{\text{obwód bioder [cm]}}$$

3.2.5. Długotrwały wysiłek fizyczny na cykloergometrze

Badani zgłaszali się do pracowni badań czynnościowych o godzinie 8.00 rano na czczo (10-12 godzin po posiłku). Wykonywali 90-minutowy wysiłek fizyczny na cykloergometrze ze stałą intensywnością na poziomie 60% VO_2max (Ryc.1), obliczonego na podstawie wyników testu wysiłkowego przeprowadzonego w czasie pierwszego spotkania. Podczas wysiłku monitorowano częstość skurczów serca oraz pobór tlenu (VO_2) w celu kontroli intensywności wysiłku. Przed wysiłkiem, a także w 45. i 90. minucie wysiłku zostały pobrane próbki krwi. Krew do badań pobrano z żyły odłokciowej do próbki zawierającej EDTA. W celu uzyskania osocza, krew odwirowywano przez 15 minut, przy obrotach 1872 x g w temperaturze 4°C, następnie uzyskane osocze przechowywano w zamrażarce w temperaturze -80°C, aż do wykonania oznaczeń. W próbkach osocza pobranych w spoczynku, 45. i 90. minucie wysiłku

3.2.6. Badania biochemiczne

Stężenie **ANGPTL3**, **ANGPTL4** i **ANGPTL8** oznaczono testem immunoabsorpcji enzymatycznej ELISA. Stężenie ANGPTL3 oznaczono przy użyciu zestawu odczynników firmy BioVendor (Czechy) o numerze katalogowym RD191092200R, stężenie ANGPTL4 - przy użyciu zestawu odczynników DuoSet firmy R&D Systems (USA) o numerze katalogowym DY008, a do oznaczenia stężenia ANGPTL8 użyto zestawu odczynników firmy Cloud-Clone Corp. (Wuhan, Hubei) o numerze katalogowym SEW803Hu.

Stężenie **lipazy lipoproteinowej** bez podawania heparyny oznaczono testem immunoenzymatycznym ELISA za pomocą odczynników firmy Elabscience o numerze katalogowym E-E:-H2287.

Absorbancję wszystkich próbek badanych i wzorcowych odczytano przy użyciu czytnika ELISA Spark 10M firmy Tecan (Szwajcaria).

Stężenie wolnych kwasów tłuszczowych, glicerolu oraz glukozy oznaczono enzymatyczną metodą kolorymetryczną.

Stężenie **wolnych kwasów tłuszczowych** oznaczono metodą wykorzystującą oksydazę Acylo-CoA przy użyciu odczynników NEFA-HR2 firmy Wako Chemicals GmbH (Niemcy) o numerze katalogowym 434-91795 i 436-91995.

Stężenie **glicerolu** oznaczono przy użyciu odczynników firmy Randox Laboratories Ltd. (Wielka Brytania) o numerze katalogowym GY105, a stężenie **glukozy** zaś oznaczono metodą z heksokinazą przy użyciu odczynników Glukoza-Hexo firmy Pointe Scientific (USA) o numerze katalogowym G7517-500.

Pomiaru fotometrycznego wszystkich próbek dokonano przy użyciu fotometru EPOLL-20 (POLL ltd, Polska).

Stężenia **kwasu palmitynowego, stearynowego, palmitooleinowego, oleinowego oraz linolowego** oznaczono za pomocą spektrometru mas sprzężonego z chromatografem gazowym GCMS-AP2010UltraEI firmy Shimadzu w Laboratorium Centrum Nauk Biologiczno-Chemicznych Uniwersytetu Warszawskiego. Do rejestracji widm i analizy użyto programu GCMSsolution LabSolution firmy Shimadzu.

Przygotowanie próbek osocza do oznaczeń:

- do szklanej fiolki wirówkowej o pojemności 8 ml pobierano 300 µl osocza i dodawano 2 ml zmrożonego metanolu. Następnie dodawano 4 ml chloroformu (CHCl₃), wytrząsano przez 1 minutę i umieszczano fiolkę w wirówce, następnie wirowano przez

10 minut przy prędkości 6000 obrotów/min. Po zakończonym procesie wirowania pobierano 5 ml supernatantu i przenoszono go do nowej szklanej fiolki. Następnie ekstrakt pozostawiono do odparowania rozpuszczalników w temperaturze pokojowej. Po odparowaniu rozpuszczalnika do fiolki dodawano 1 ml BF₃ w metanolu (odczynnik derywatyzujący) i inkubowano próbki w temperaturze 60°C przez okres 1 godziny. Po ostygnięciu próbek w temperaturze pokojowej dodawano do nich 1 ml heksanu oraz 1 ml wody, wytrząsano i pobierano 900 µl warstwy heksanowej, którą następnie przenoszono do fiolek i wykonywano analizę metodą chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas.

Przygotowanie próbek wzorcowych:

- do szklanej fiolki odważono odpowiednie naważki wszystkich kwasów i rozpuszczono je w 1 ml BF₃ w metanolu. Następnie w wyniku rozcieńczeń otrzymano serię punktów kalibracyjnych, w których każdy z kwasów był w stężeniu: 0,25; 0,50; 1,00; 2,5 oraz 5,00 µg/ml. Przygotowane w ten sposób punkty kalibracyjne były następnie inkubowane w temperaturze 60°C przez okres 1 godziny. Po zakończeniu inkubacji i po ostygnięciu próbek dodawano 1 ml heksanu oraz 1 ml wody i wytrząsano. Następnie pobierano 900 µl warstwy heksanowej, przenoszono ją do fiolki GCMS, rozcieńczano 20- lub 50-krotnie i wykonywano pomiar GCMS w celu wygenerowania krzywych kalibracyjnych.

Prawidłowość wykonywanych pomiarów potwierdzona była analizą próbek kontrolnych (mieszanina oznaczanych kwasów wzorcowych) o stężeniu 0,5 i 2,5 µg/ml.

Stężenie **cholesterolu całkowitego, lipoprotein o małej gęstości, lipoprotein o dużej gęstości oraz triglicerydów** oznaczono w Laboratorium Centralnym Samodzielnego Publicznego Szpitala Centralnego w Warszawie w systemie Roche/Hitachi cobas c. Stężenie cholesterolu całkowitego i triglicerydów oznaczono metodą enzymatyczno-kolorymetryczną. Stężenie HDL-C metodą enzymatyczną, LDL-C zaś obliczono wg wzoru Friedewald'a:

- $LDL-C = TC - HDL-C - TG/5$ (mg/dl).

Wyliczono także stężenia :

cholesterolu nie-HDL wg wzoru:

- $nie-HDL = TC - HDL-C$ (mg/dl)

oraz lipoprotein o bardzo małej gęstości wg wzoru:

- $VLDL = TG/5$ (mg/dl).

Stężenie **insuliny** oznaczono metodą immunoradiometryczną, opartą na separacji w opłaszczonych probówkach przy użyciu zestawu odczynników INS-Irma firmy DIASource ImmunoAssay S.A. (Belgia) o numerze katalogowym KIP1251. Wyniki odczytano na liczniku promieniowania gamma WIZARD 1470 firmy Perkin Elmer Wallac Oy (Finlandia).

Pomiary **hematokrytu** oraz stężenia **hemoglobiny** wykonano przy użyciu hemoglobinometru Mission PlusHb firmy ACON Laboratories (USA). Uzyskane wartości wskaźnika hematokrytowego i stężenia hemoglobiny zostały wykorzystane wyłącznie do korekty stężeń wskaźników oznaczonych w osoczu podczas wysiłku fizycznego, wg wzoru van Beaumonta (Dill i Costill, 1974).

3.2.7. Ocena sposobu żywienia

Ocenę ilościową sposobu żywienia, to jest wartość energetyczną diety oraz podaży białka, węglowodanów (w tym błonnika pokarmowego), tłuszczów (w tym kwasów tłuszczowych nasyconych, jednonienasyconych i wielonienasyconych) przeprowadzono wykorzystując metodę bieżącego siedmiodniowego notowania wszystkich spożytych produktów i potraw. Analizę dzienników żywieniowych przeprowadzono za pomocą programu komputerowego Dieta5.0. (opracowanego w Instytucie Żywności i Żywienia w Warszawie).

3.3. Zastosowane oznaczenia i metody statystyczne

Analizę statystyczną wykonano za pomocą programu statystycznego Statistica Pl. wersja 13 (StatSoft.Inc). Poziom istotności (p) uznano za statystycznie znamienne, gdy jego wartość była niższa niż 0,05. Wykresy zrobiono w programie GraphPad Prims 5.03.

Do opisu statystycznego materiału zastosowano średnie arytmetyczne i błąd standardowy (średnia±SE) oraz minimum i maksimum (min-max). Na wykresach podano wartości średnie±SE.

Do oceny współzależności między badanymi parametrami wykorzystano współczynnik korelacji rang Spearmana (r). Różnice pomiędzy zmiennymi niezależnymi analizowano testem Kruskala-Wallisa oraz testem post-hoc Dunna, różnice zaś pomiędzy zmiennymi zależnymi testem Friedmana oraz testem post-hoc Dunna. W wypadku dwóch zmiennych zastosowano test kolejności par Wilcoxon. Różnice pomiędzy średnimi

wartościami współczynnika oddechowego analizowano za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji z poprawką Bonferroniego.

4. WYNIKI

4.1. Porównanie wieku, wskaźników antropometrycznych oraz maksymalnego pobierania tlenu pomiędzy badanymi grupami

Badane grupy ochotników nie różniły się istotnie wiekiem, masą ciała, wysokością ciała, wskaźnikiem masy ciała oraz wskaźnikiem talia/biodra, ani również wskaźnikiem wydolności fizycznej. Charakterystykę uczestników badań przedstawiono w Tabeli I.

Tabela I. Charakterystyka badanej grupy

		Dieta mieszana	Dieta bogato-tłuszczowa	Dieta wegańska
Liczba osób badanych		23	17	22
Wiek [lata]	<i>średnia±SE</i>	29,3±2,8	30,4±3,8	31,3±2,9
	<i>min-max</i>	25-35	25-35	25-35
Masa ciała [kg]	<i>średnia±SE</i>	82,3±7,3	78,0±11,8	74,2±8,4
	<i>min-max</i>	70-100	61-97	57-94
Wysokość ciała [cm]	<i>średnia±SE</i>	183,6±5,3	180,6±6,6	179,2±5,9
	<i>min-max</i>	174-193	170-191	168-192
BMI [kg/m²]	<i>średnia±SE</i>	24,4±1,9	23,8±2,5	23,1±2,1
	<i>min-max</i>	20,8-29,8	20,1-29,9	19,4-26,8
WHR [cm/cm]	<i>średnia±SE</i>	0,84±0,04	0,86±0,03	0,85±0,04
	<i>min-max</i>	0,72-0,9	0,79-0,9	0,72-0,90
VO₂max [ml/kg/min]	<i>średnia±SE</i>	48,3±7,2	46,2±8,2	50,7±7,3
	<i>min-max</i>	36,8-63	40,9-51,1	44,4-57,5

BMI – wskaźnik masy ciała [kg/m²], WHR – wskaźnik talia/biodro [cm/cm], VO₂max – maksymalne pobieranie tlenu, wskaźnik wydolności fizycznej [ml/kg/min]

4.2. Ocena aktywności fizycznej na podstawie Międzynarodowego Kwestionariusza Aktywności Fizycznej (IPAQ) w wersji długiej

Badani mężczyźni byli aktywni fizycznie i na podstawie testu IPAQ zostali zakwalifikowani jako osoby o wysokim (85%) lub wystarczającym (15%) poziomie aktywności fizycznej. Rozkład poziomu aktywności fizycznej badanych w zależności od stosowanej diety przedstawiono w Tabeli II.

Tabela II. Liczba badanych osób z danym poziomem aktywności fizycznej ocenionej na podstawie długiej wersji Międzynarodowego Kwestionariusza Aktywności Fizycznej (IPAQ) w poszczególnych grupach

	Poziom aktywności fizycznej		
	Wysoki (n)	Wystarczający (n)	Niewystarczający (n)
Dieta mieszana (n=23)	19	4	0
Dieta bogatotłuszczowa (n=17)	15	2	0
Dieta wegańska (n=22)	19	3	0

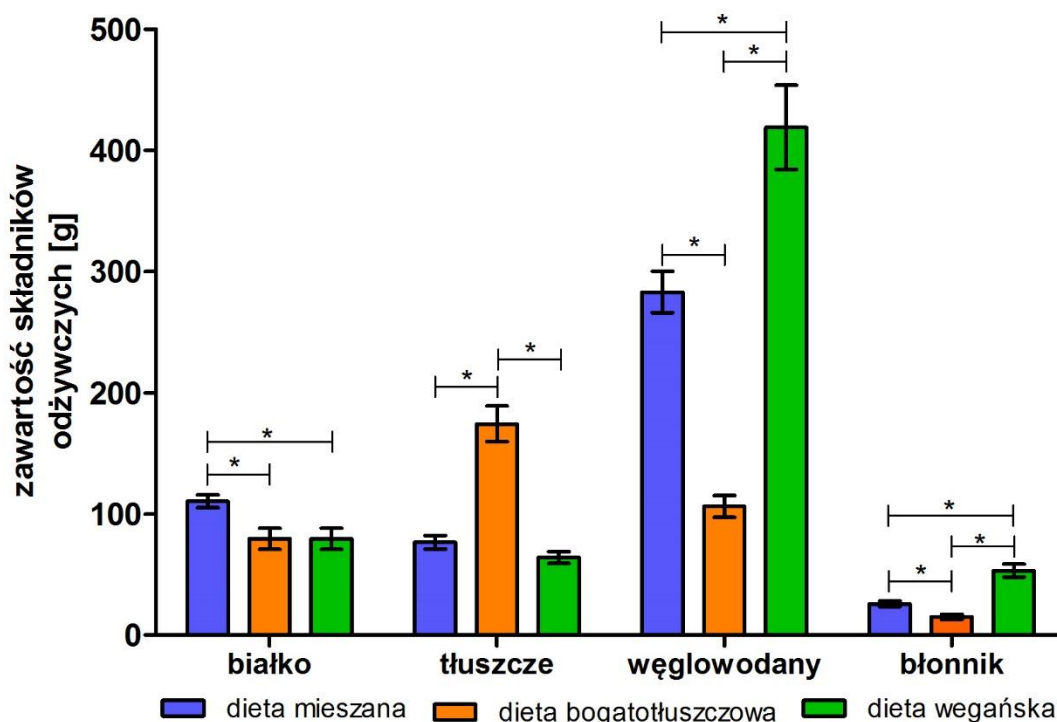
4.3. Ocena sposobu żywienia na podstawie dzienniczka żywieniowego

Kaloryczność diety była podobna we wszystkich grupach (Tab. III).

Tabela III. Kaloryczność diety badanych osób

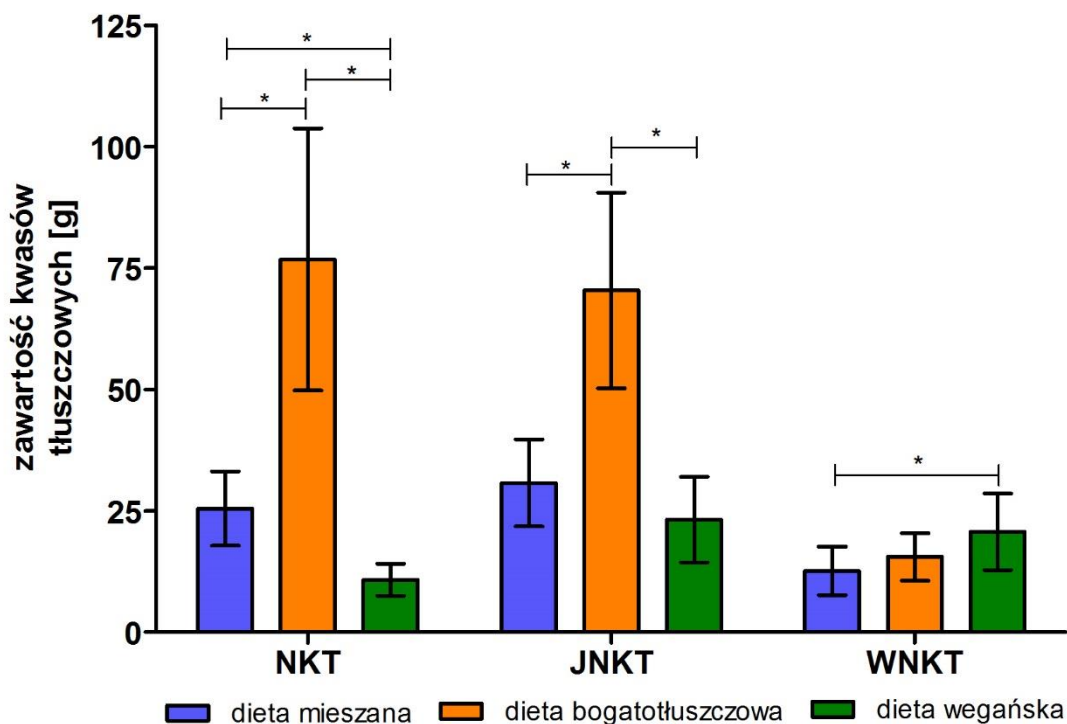
		Dieta mieszana	Dieta bogatotłuszczowa	Dieta wegańska
Liczba osób badanych		23	17	22
Kaloryczność diety [kcal]	<i>średnia±SE</i>	2191±106	2240±159	2378±166
	<i>min-max</i>	1537-2846	1495-3453	1598-3187

Stwierdzono istotne różnice w zawartości makroskładników w diecie. Istotnie większe spożycie białka ogółem widoczne jest u osób na diecie mieszanej ($110,5 \pm 5,2$ g; $20,9 \pm 3,4\%$ energii), w porównaniu z grupą na diecie bogatotłuszczowej ($79,6 \pm 8,7$ g, $p=0,01$; $14,6 \pm 4,2\%$ energii) i wegańskiej ($79,3 \pm 7,7$ g, $p=0,02$; $12,9 \pm 2,5\%$ energii). Tłuszcze były dominującym składnikiem u osób na diecie bogatotłuszczowej ($174,7 \pm 14,6$ g) i pokrywały $68 \pm 3,4\%$ spożytej energii. Odnotowano również istotnie wyższe ich spożycie w porównaniu z badanymi stosującymi dietę mieszaną ($76,6 \pm 5,5$ g, $p=0,0004$; $30,5 \pm 3,0\%$ energii) i wegańską ($64,1 \pm 4,9$ g, $p<0,0000$; $23,7 \pm 4,2\%$ energii). U osób na diecie wegańskiej $62,8 \pm 3,4\%$ energii pochodziło z węglowodanów. Mężczyźni z tej grupy znacznie więcej spożywali węglowodanów ogółem ($419,0 \pm 34,8$ g) oraz błonnika pokarmowego ($53,3 \pm 5,2$ g) niż mężczyźni na diecie mieszanej (odpowiednio: $283,2 \pm 17,0$ g, $p=0,03$; $25,9 \pm 2,3$ g, $p=0,003$) i bogatotłuszczowej (odpowiednio: $106,4 \pm 9,0$ g, $p<0,0000$; $15,1 \pm 2,3$ g, $p<0,0000$) (Ryc. 2).



Rycina 2. Zawartość białka, tłuszczu, węglowodanów i błonnika w diecie. * istotne różnice między zmiennymi niezależnymi, $p<0,05$.

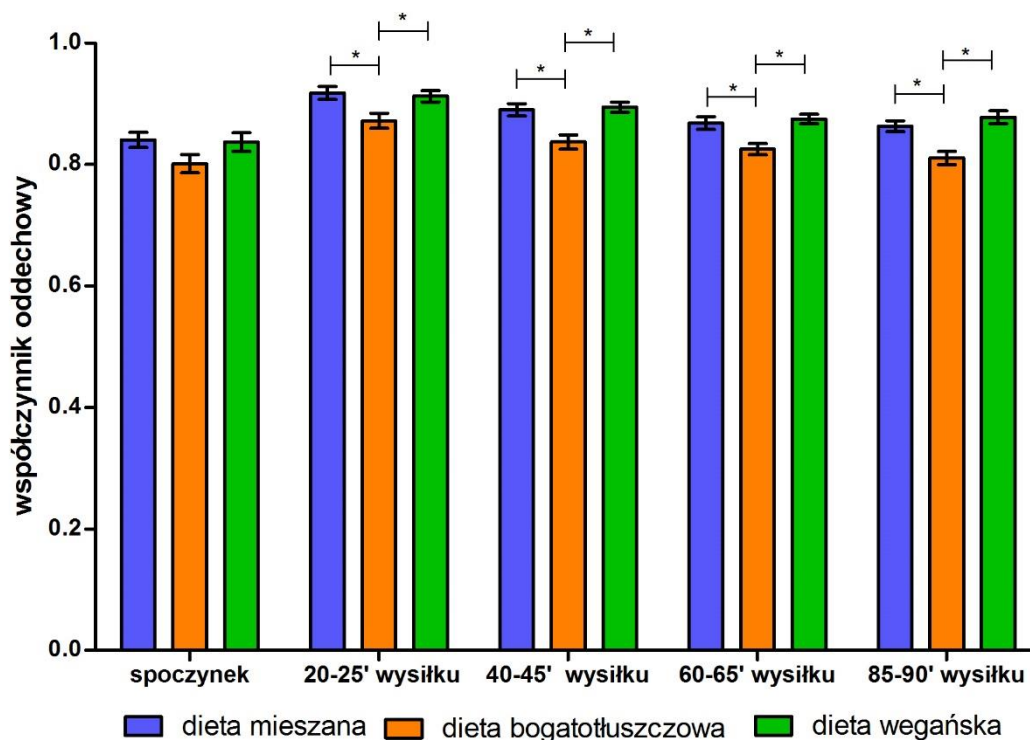
Badane grupy różniły się nie tylko zawartością tłuszczu ogółem w diecie, ale także strukturą spożycia poszczególnych kwasów tłuszczowych (Ryc. 3). Zaobserwowano istotne różnice w spożyciu kwasów tłuszczowych nasyconych między trzema grupami. Osoby na diecie bogatotłuszczowej spożywały największe ilości kwasów nasyconych ($76,8 \pm 7,8$ g,) i jednonienasyconych ($70,4 \pm 5,8$ g) w porównaniu z grupą osób na diecie mieszanej (odpowiednio: $25,8 \pm 2,1$ g, $p=0,004$; $31,6 \pm 2,4$ g, $p=0,0007$) i wegańskiej (odpowiednio: $11,4 \pm 1,1$ g, $p<0,0000$; $25,5 \pm 2,4$ g, $p<0,0000$). Wielonienasycone kwasy tłuszczowe zostały spożyte znamiennie w większej ilości przez wegan ($20,9 \pm 2,0$ g) w porównaniu z grupą spożywającą dietę mieszaną ($13,3 \pm 1,3$ g, $p=0,009$), w grupie zaś osób na diecie bogatotłuszczowej, spożycie tych kwasów kształtowało się na średnim poziomie ($15,5 \pm 1,4$ g).



Rycina 3. Zawartość kwasów tłuszczowych nasyconych (NKT), jednonienasyconych (JNKT) i wielonienasyconych (WNKT) w diecie. * istotne różnice między zmiennymi niezależnymi, $p<0,05$.

4.4. Porównanie wartości współczynnika oddechowego pomiędzy grupami w spoczynku i w czasie długotrwałego wysiłku fizycznego

Porównano wartość RQ u badanych osób w spoczynku, a także podczas trwania wysiłku fizycznego w czasie między 20. a 25., 40. a 45., 60. a 65. oraz 85. a 90. minutą wysiłku fizycznego (Ryc. 4). W spoczynku wartość RQ pomiędzy grupami nie różniła się. Istotne różnice odnotowano podczas wysiłku, gdzie grupa osób na diecie bogatotłuszczowej miała niższe jego wartości (odpowiednio: $0,87 \pm 0,01$; $0,84 \pm 0,01$; $0,83 \pm 0,01$; $0,81 \pm 0,01$) niż grupa osób na diecie mieszanej (odpowiednio: $0,92 \pm 0,01$, $p=0,011$; $0,89 \pm 0,01$, $p=0,0014$; $0,87 \pm 0,01$, $p=0,003$; $0,86 \pm 0,01$, $p<0,0000$) i osób stosujących dietę wegańską (odpowiednio: $0,91 \pm 0,01$, $p=0,011$; $0,89 \pm 0,01$, $p=0,0014$; $0,88 \pm 0,01$, $p=0,003$; $0,88 \pm 0,01$, $p<0,0000$).

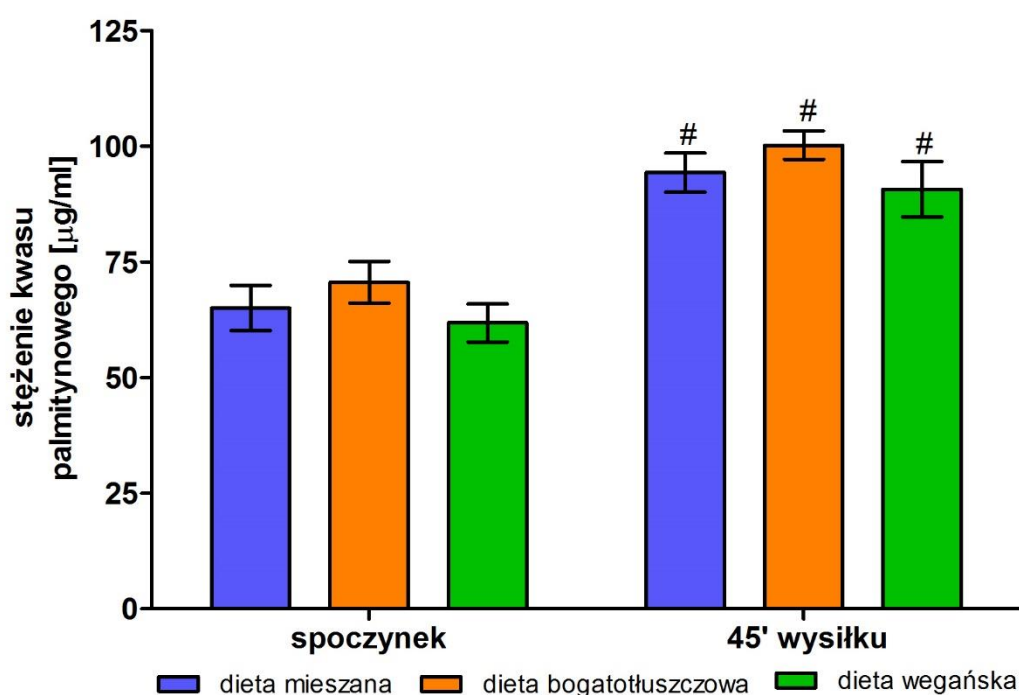


Rycina 4. Wartość współczynnika oddechowego w spoczynku, między 20-25., 40-45., 60-65. i 85-90. minutą wysiłku. * istotne różnice między zmiennymi niezależnymi, $p<0,05$.

4.5. Porównanie stężenia kwasów: palmitynowego, stearynowego, palmitooleinowego, oleinowego oraz linolowego w osoczu pomiędzy grupami w spoczynku i 45. minucie wysiłku fizycznego

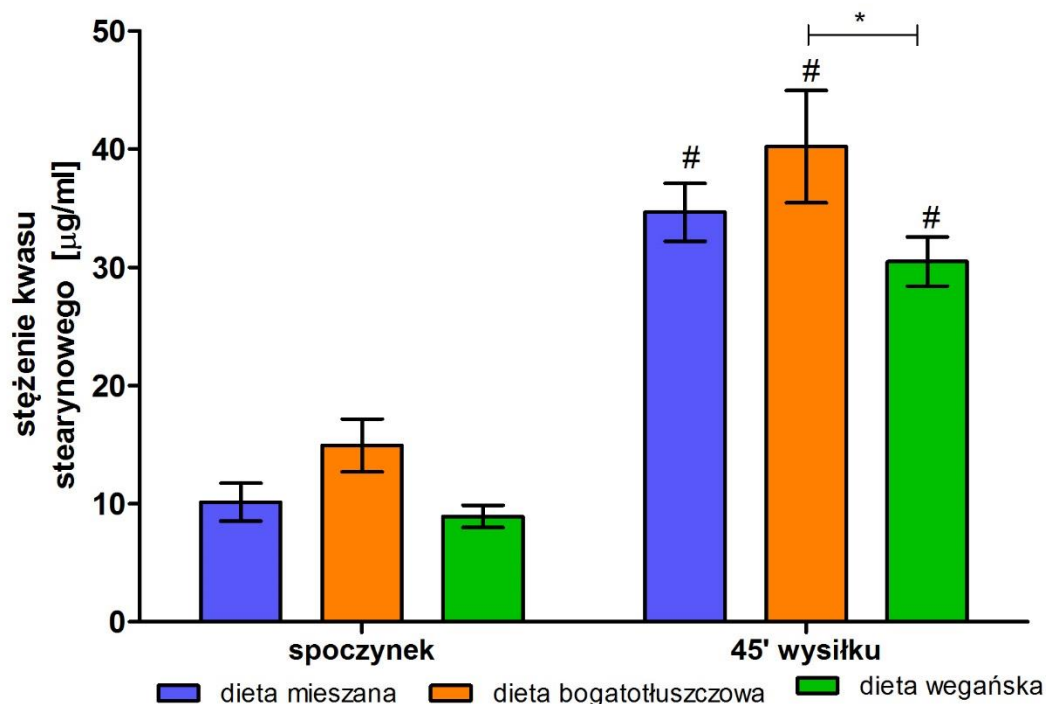
Stężenia kwasów: palmitynowego, stearynowego, palmitooleinowego, oleinowego oraz linolowego oznaczono w próbkach krwi pobranych w spoczynku oraz w 45. minucie trwania umiarkowanego wysiłku na cykloergometrze.

Stężenie w osoczu kwasu palmitynowego w spoczynku, jak i w 45. minucie wysiłku nie różniło się między grupami. We wszystkich badanych grupach zaobserwowano wzrost stężenia tego kwasu podczas wysiłku, gdzie w grupie osób na diecie mieszanej stężenie w spoczynku wynosiło $65,0 \pm 4,9$ $\mu\text{g/ml}$, a w 45. minucie wysiłku $94,3 \pm 4,2$ $\mu\text{g/ml}$ ($p=0,0005$), natomiast w grupie osób na diecie bogatotłuszczowej stężenie spoczynkowe wynosiło $70,6 \pm 4,5$ $\mu\text{g/ml}$ i wzrosło do wartości $100,2 \pm 3,1$ $\mu\text{g/ml}$ ($p=0,003$), w grupie zaś osób na diecie wegańskiej stężenie początkowe było równe $61,8 \pm 4,1$ $\mu\text{g/ml}$ i wzrosło do $90,7 \pm 6,0$ $\mu\text{g/ml}$ ($p=0,0006$) (Ryc. 5).



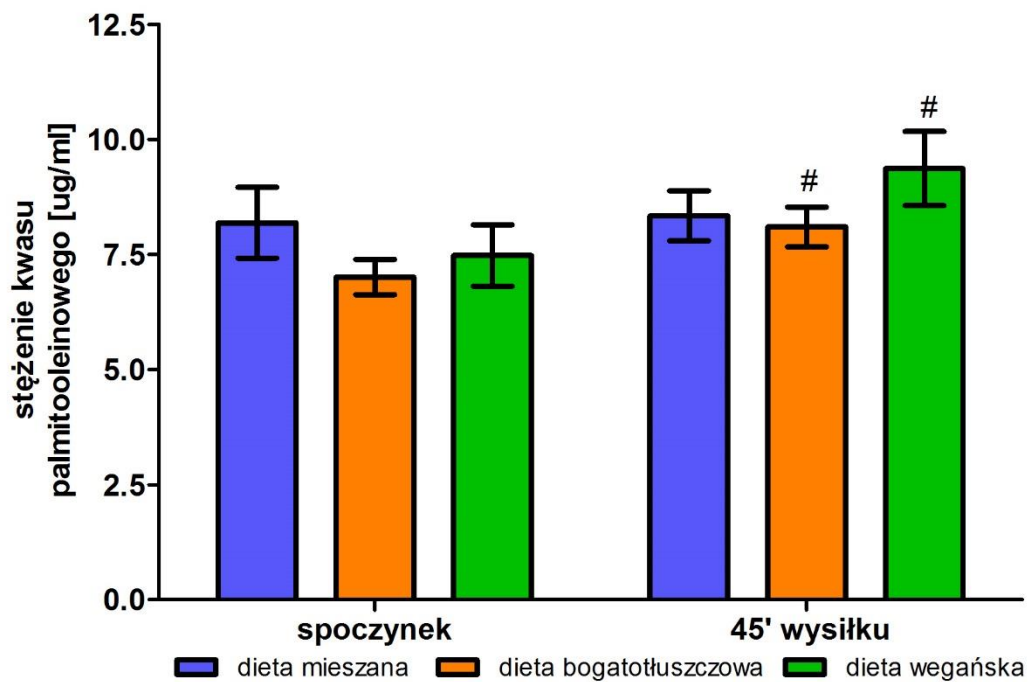
Rycina 5. Stężenie kwasu palmitynowego (16:0) w osoczu podczas spoczynku i w 45. minucie wysiłku fizycznego. # istotne różnice między zmiennymi zależnymi w stosunku do spoczynku, $p < 0,05$.

Stężenie kwasu stearynowego w osoczu w trakcie spoczynku także nie różniło się między grupami oraz istotnie wzrosło w 45. minucie wysiłku. Dodatkowo podczas wysiłku zaobserwowano różnicę między grupą badanych stosujących dietę bogatotłuszczową ($40,2 \pm 2,2 \mu\text{g/ml}$), a osobami pozostającymi na diecie wegańskiej ($30,5 \pm 2,1 \mu\text{g/ml}$, $p=0,015$) (Ryc. 6).



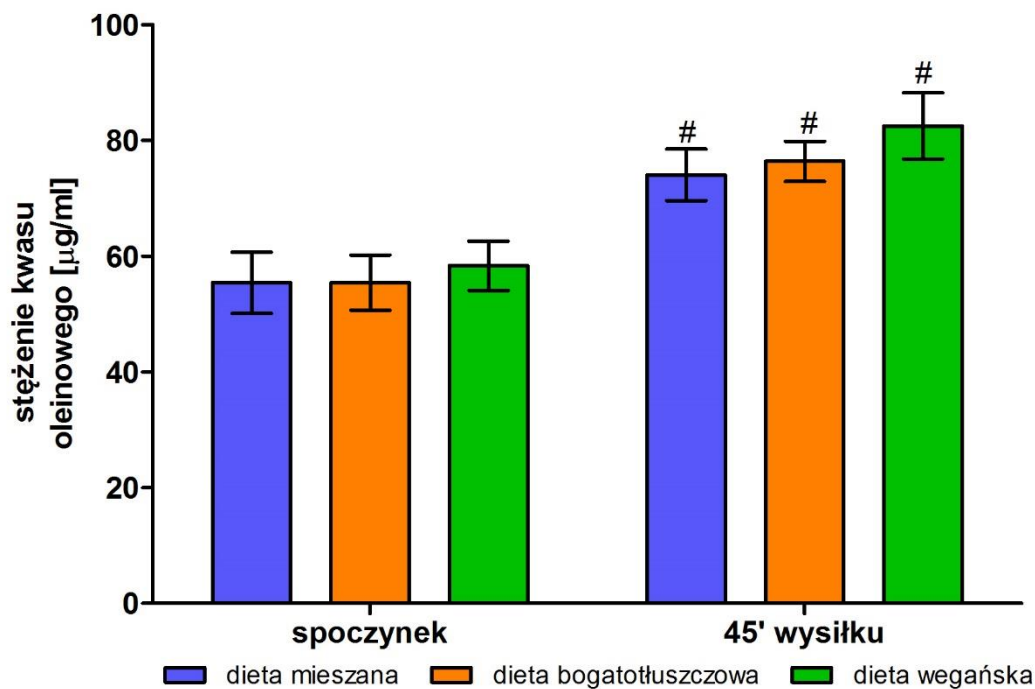
Rycina 6. Stężenie kwasu stearynowego (18:0) w osoczu podczas spoczynku i w 45. minucie wysiłku fizycznego. * istotne różnice między zmiennymi niezależnymi, $p < 0,05$; # istotne różnice między zmiennymi zależnymi w stosunku do spoczynku, $p < 0,05$.

Nie zaobserwowano istotnej różnicy między grupami w stężeniu kwasu palmitooleinowego w osoczu. W grupie osób na diecie bogatotłuszczowej stężenie tego kwasu wzrosło z wartości $7,01 \pm 0,4 \mu\text{g/ml}$ w spoczynku do wartości $8,1 \pm 0,4 \mu\text{g/ml}$ ($p=0,015$) w 45. minucie wysiłku. Podobnie u osób na diecie wegańskiej zaobserwowano istotny wzrost stężenia kwasu palmitooleinowego z wartości $7,5 \pm 0,7 \mu\text{g/ml}$ w spoczynku do wartości $9,4 \pm 0,8 \mu\text{g/ml}$ ($p=0,002$) w trakcie wysiłku fizycznego (Ryc. 7).



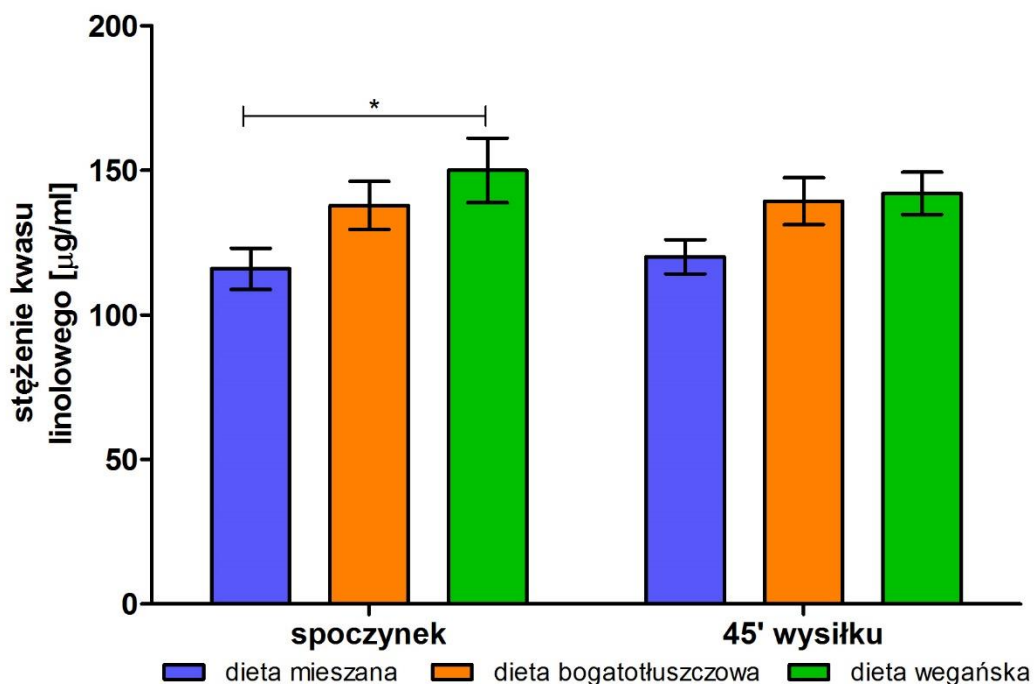
Rycina 7. Stężenie kwasu palmitooleinowego (16:1, n-7) osoczu podczas spoczynku i w 45. minucie wysiłku fizycznego. # istotne różnice między zmiennymi zależnymi w stosunku do spoczynku, $p < 0,05$.

Badane grupy nie różniły się stężeniami kwasu oleinowego w osoczu zarówno podczas spoczynku, jak i w trakcie wysiłku fizycznego. Stężenie tego kwasu wzrosło istotnie w 45. minucie wysiłku w grupie osób na diecie mieszanej z wartości od $55,4 \pm 5,3$ $\mu\text{g/ml}$ do $74,1 \pm 4,5$ $\mu\text{g/ml}$ ($p=0,0013$), natomiast u mężczyzn na diecie bogatotłuszczowej z wartości od $55,4 \pm 4,8$ $\mu\text{g/ml}$ do $76,4 \pm 3,5$ $\mu\text{g/ml}$ ($p=0,018$). W grupie stosującej dietę wegańską, stężenie kwasu oleinowego wzrosło z $58,3 \pm 4,3$ $\mu\text{g/ml}$ w spoczynku do $82,5 \pm 5,7$ $\mu\text{g/ml}$ w 45. minucie wysiłku fizycznego ($p=0,0008$) (Ryc. 8).



Rycina 8. Stężenie kwasu oleinowego (18:1, n-9) w osoczu podczas spoczynku i w 45. minucie wysiłku fizycznego. # istotne różnice między zmiennymi zależnymi w stosunku do spoczynku, $p < 0,05$.

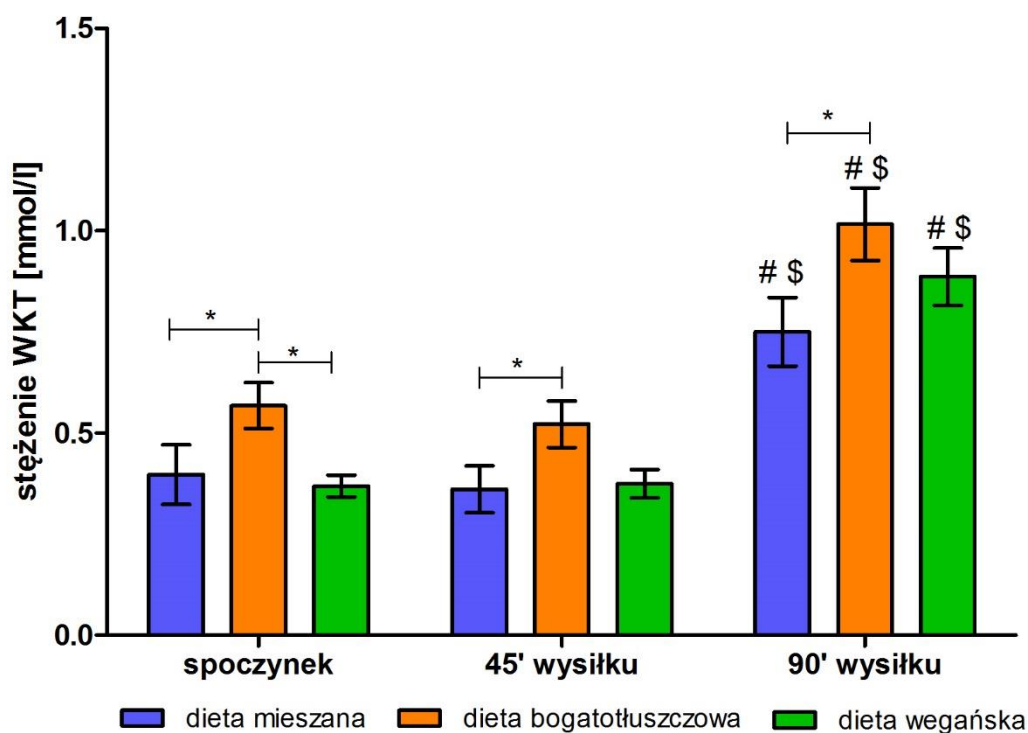
Stężenie kwasu linolowego w osoczu w spoczynku w grupie osób na diecie wegańskiej było istotnie wyższe ($150,0 \pm 11,1 \mu\text{g/ml}$) w porównaniu z grupą na diecie mieszanej ($116,0 \pm 7,1 \mu\text{g/ml}$, $p=0,03$) (ryc. 9). Nie stwierdzono istotnych różnic w stężeniu kwasu linolowego, w którejkolwiek z grup podczas trwania wysiłku fizycznego.



Rycina 9. Stężenie kwasu linolowego (18:2, n-6) w osoczu podczas spoczynku i w 45. i minucie wysiłku fizycznego. * istotne różnice między zmiennymi niezależnymi, $p < 0,05$.

4.6. Porównanie stężenia wolnych kwasów tłuszczowych w osoczu pomiędzy grupami w spoczynku i w czasie długotrwałego wysiłku fizycznego

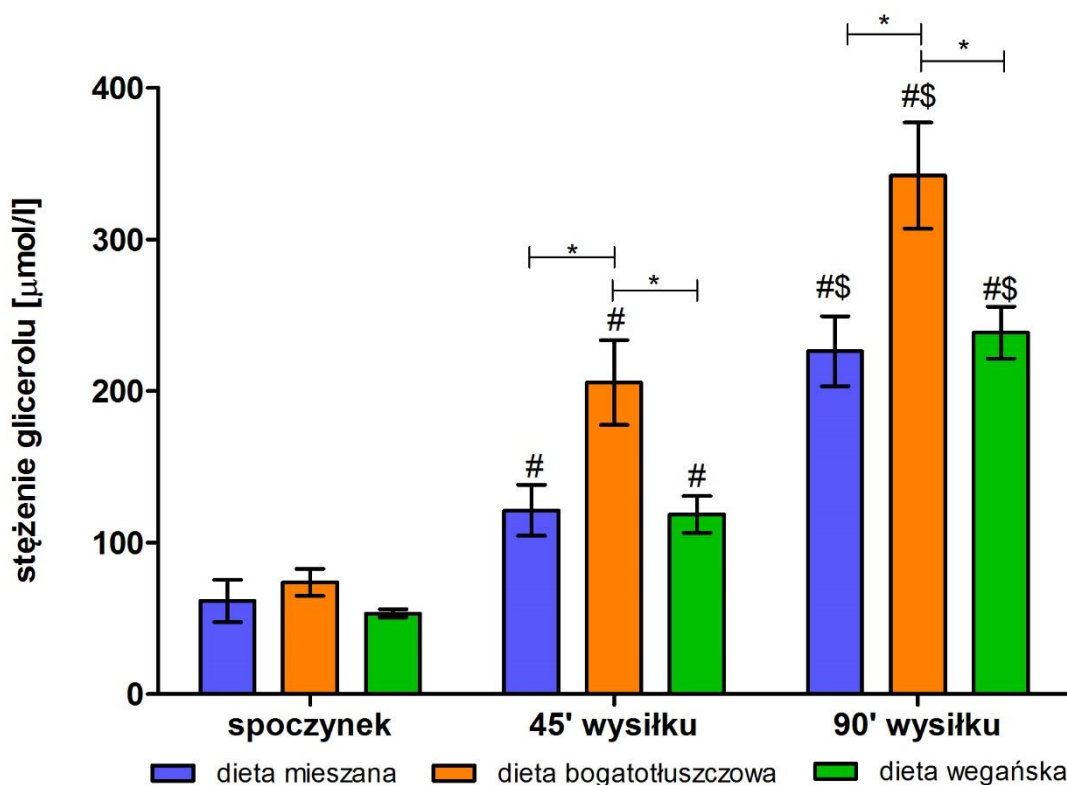
Stężenie WKT wzrosło istotnie w 90. minucie wysiłku w porównaniu ze spoczynkiem oraz 45. minutą wysiłku w każdej grupie badanych. Osoby stosujące dietę bogatotłuszczową charakteryzowały się istotnie wyższym stężeniem WKT w spoczynku ($0,57 \pm 0,06$ mmol/l), w 45. ($0,52 \pm 0,06$ mmol/l) i 90. ($1,02 \pm 0,09$ mmol/l) minucie wysiłku w porównaniu z osobami stosującymi dietę mieszaną (odpowiednio: $0,4 \pm 0,07$ mmol/l, $p=0,004$; $0,36 \pm 0,06$ mmol/l, $p=0,007$; $0,75 \pm 0,09$ mmol/l, $p=0,02$) oraz wegańską w spoczynku ($0,37 \pm 0,03$ mmol/l, $p=0,03$) (Ryc. 10).



Rycina 10. Stężenie wolnych kwasów tłuszczowych w osoczu podczas spoczynku, w 45. i 90. minucie wysiłku fizycznego. * istotne różnice między zmiennymi niezależnymi, $p < 0,05$; # istotne różnice między zmiennymi zależnymi w stosunku do spoczynku, $p < 0,05$; \$ istotne różnice między zmiennymi w stosunku do 45. minuty wysiłku, $p < 0,05$.

4.7. Porównanie stężenia glicerolu w osoczu pomiędzy grupami w spoczynku i w czasie długotrwałego wysiłku fizycznego

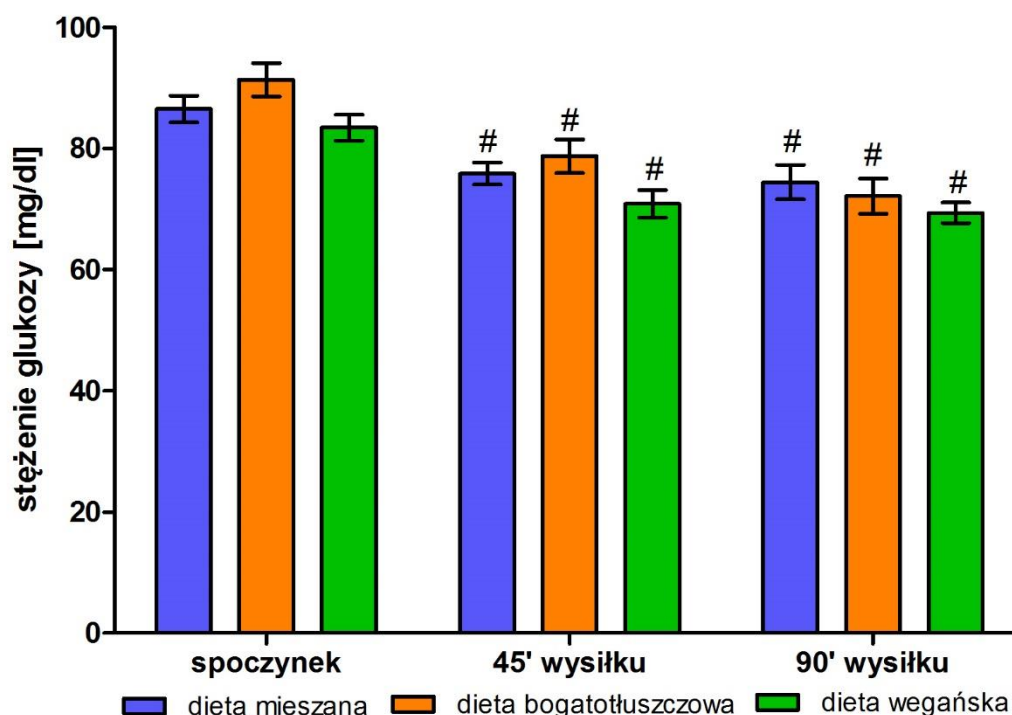
Średnie stężenie glicerolu w spoczynku było takie same we wszystkich badanych grupach. Zarówno w 45., jak i 90. minucie wysiłku stwierdzono wzrost stężenia glicerolu we wszystkich grupach w porównaniu z wartościami w spoczynku. Także wzrost w 90. minucie wysiłku był istotnie większy niż w 45. minucie umiarkowanego wysiłku fizycznego. Grupa osób na diecie bogatotłuszczowej charakteryzowała się najwyższym stężeniem glicerolu w 45. ($205,5 \pm 28,0 \mu\text{mol/l}$) i 90. ($342,1 \pm 35,0 \mu\text{mol/l}$) minucie wysiłku w porównaniu z grupą na diecie mieszanej ($121,3 \pm 16,8 \mu\text{mol/l}$, $p=0,004$; $226,3 \pm 23,0 \mu\text{mol/l}$, $p=0,003$) oraz na diecie wegańskiej ($118,6 \pm 12,2 \mu\text{mol/l}$, $p=0,03$; $238,6 \pm 17,1 \mu\text{mol/l}$, $p=0,03$) (Ryc. 11).



Rycina 11. Stężenie glicerolu w osoczu podczas spoczynku, w 45. i 90. minucie wysiłku fizycznego. * istotne różnice między zmiennymi niezależnymi, $p < 0,05$; # istotne różnice między zmiennymi zależnymi w stosunku do spoczynku, $p < 0,05$; \$ istotne różnice między zmiennymi w stosunku do 45. minuty wysiłku, $p < 0,05$.

4.8. Porównanie stężenia glukozy w osoczu pomiędzy grupami w spoczynku i w czasie długotrwałego wysiłku fizycznego

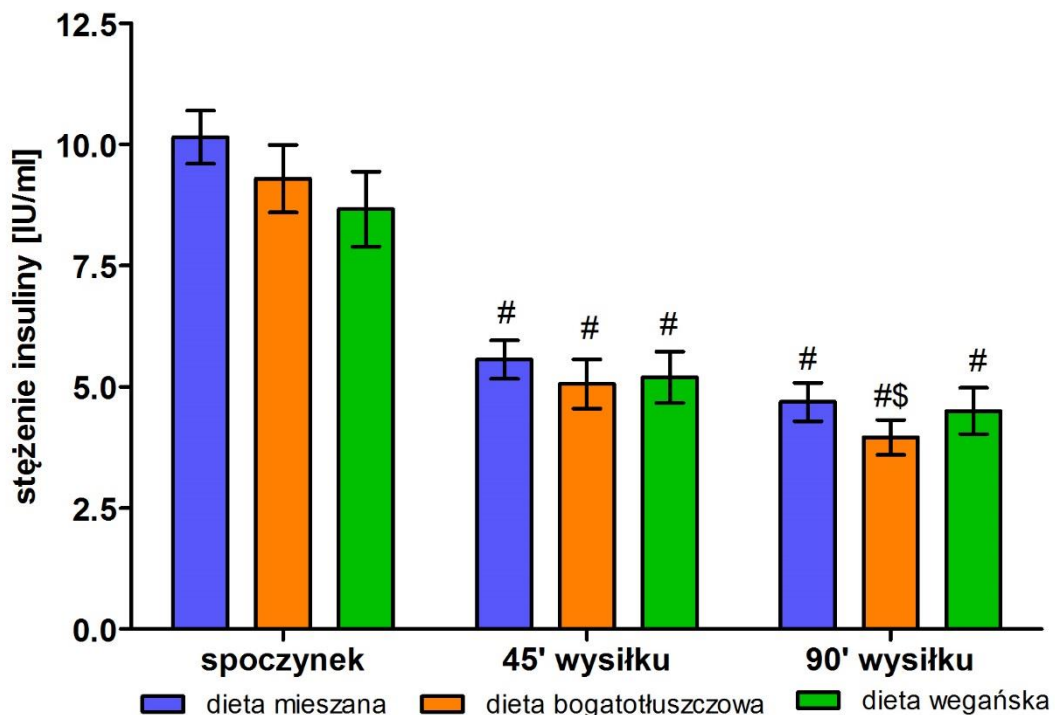
Stężenie glukozy w osoczu było istotnie niższe w 45. i 90. minucie wysiłku fizycznego w stosunku do stężenia w spoczynku we wszystkich badanych grupach (Ryc. 12). Średnie stężenie spoczynkowe u osób na diecie mieszanej wynosiło $86,5 \pm 2,2$ mg/dl, a następnie podczas wysiłku fizycznego obniżyło się w 45. minucie do wartości $75,8 \pm 1,8$ mg/dl ($p < 0,0000$), oraz w 90. minucie do $74,4 \pm 2,8$ mg/dl ($p < 0,0000$). U osób na diecie bogatotłuszczowej stężenie glukozy wynosiło w spoczynku $91,3 \pm 2,7$ mg/dl, w 45. minucie wysiłku $78,7 \pm 2,7$ mg/dl ($p < 0,0000$) oraz $72,1 \pm 2,9$ mg/dl ($p < 0,0000$) w chwili jego zakończenia, u osób zaś na diecie wegańskiej wartości te wynosiły odpowiednio: $83,4 \pm 2,1$ mg/dl; $70,8 \pm 2,2$ mg/dl ($p < 0,0000$); $69,4 \pm 1,7$ mg/dl ($p < 0,0000$).



Rycina 12. Stężenie glukozy w osoczu podczas spoczynku, w 45. i 90. minucie wysiłku fizycznego. # istotne różnice między zmiennymi zależnymi w stosunku do spoczynku, $p < 0,05$.

4.9. Porównanie stężenia insuliny w osoczu pomiędzy grupami w spoczynku i w czasie długotrwałego wysiłku fizycznego

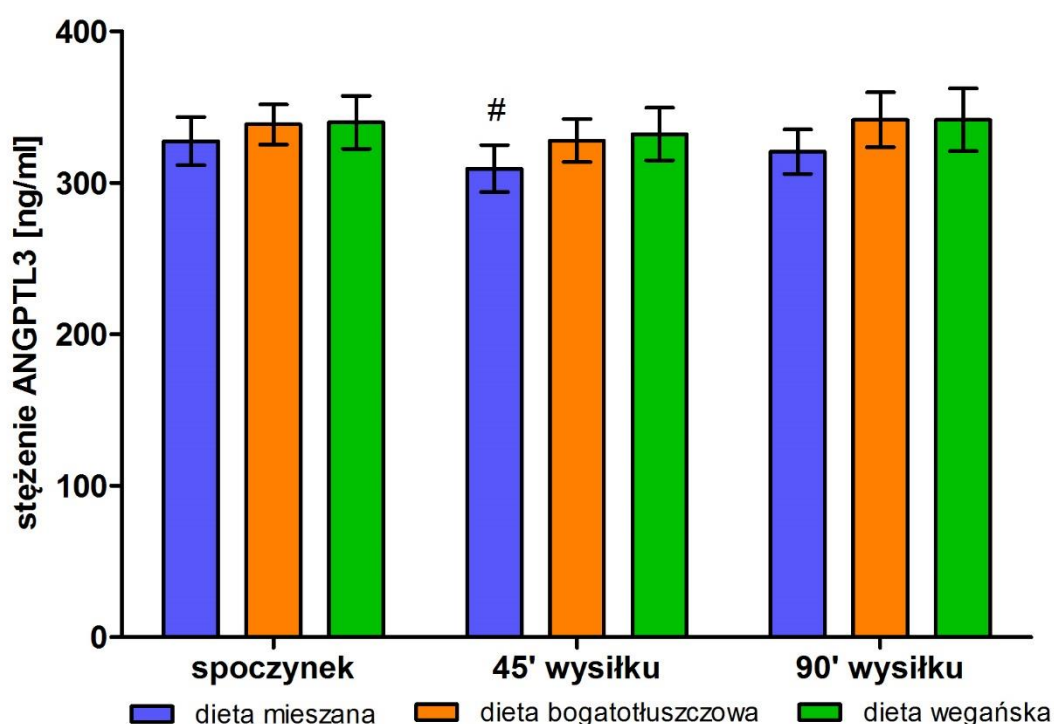
We wszystkich badanych grupach odnotowano istotne obniżenie stężenia insuliny podczas wysiłku fizycznego. Spoczynkowe stężenie insuliny u osób na diecie mieszanej wynosiło $10,1 \pm 0,5$ IU/ml, u osób na diecie bogatotłuszczowej $9,3 \pm 0,7$ IU/ml u wegan zaś $8,7 \pm 0,8$ IU/ml. W 45. minucie wysiłku stężenie obniżyło się istotnie w stosunku do spoczynku do wartości odpowiednio: $5,6 \pm 0,4$ IU/ml ($p < 0,0000$); $5,0 \pm 0,5$ IU/ml ($p < 0,0000$); $5,2 \pm 0,5$ IU/ml ($p = 0,0002$). W grupie osób na diecie bogatotłuszczowej dodatkowo zaobserwowano dalszy spadek w 90. minucie ($4,0 \pm 0,4$ IU/ml) w porównaniu do 45. minuty wysiłku fizycznego ($5,0 \pm 0,5$ IU/ml, $p < 0,0000$). U osób na diecie mieszanej ($4,7 \pm 0,4$ IU/ml) i wegańskiej ($4,5 \pm 0,5$ IU/ml) nie stwierdzono dalszych zmian w stężeniu insuliny w czasie trwania wysiłku fizycznego (Ryc. 13).



Rycina 13. Stężenie insuliny w osoczu podczas spoczynku, w 45. i 90. minucie wysiłku fizycznego. # istotne różnice między zmiennymi zależnymi w stosunku do spoczynku, $p < 0,05$; \$ istotne różnice między zmiennymi w stosunku do 45. minuty wysiłku, $p < 0,05$.

4.10. Porównanie stężenia białek angiopoetynopodobnych 3 w osoczu pomiędzy grupami w spoczynku i w czasie długotrwałego wysiłku fizycznego

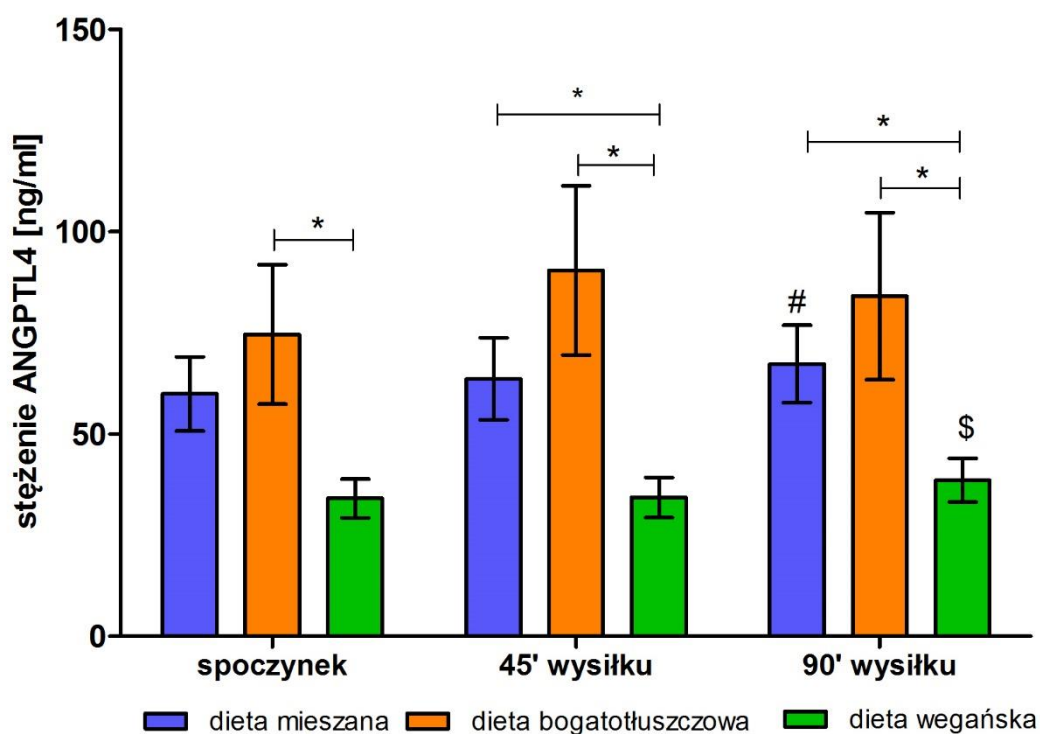
Porównano wartości stężenia ANGPTL3 w osoczu badanych osób. Stwierdzono, że stężenie ANGPTL3 między grupami nie różniło się. Jedynie w grupie osób stosujących dietę mieszaną zaobserwowano niewielki, ale istotny spadek stężenia tego białka między spoczynkiem ($327,5 \pm 15,9$ ng/ml) a 45. minutą wysiłku fizycznego ($309,3 \pm 15,5$ ng/ml, $p=0,013$) (Ryc. 14).



Rycina 14. Stężenie białka ANGPTL3 w osoczu podczas spoczynku, w 45. i 90. minucie wysiłku fizycznego. # istotne różnice między zmiennymi zależnymi w stosunku do spoczynku, $p < 0,05$.

4.11. Porównanie stężenia białek angiopoetynopodobnych 4 w osoczu pomiędzy grupami w spoczynku i w czasie długotrwałego wysiłku fizycznego

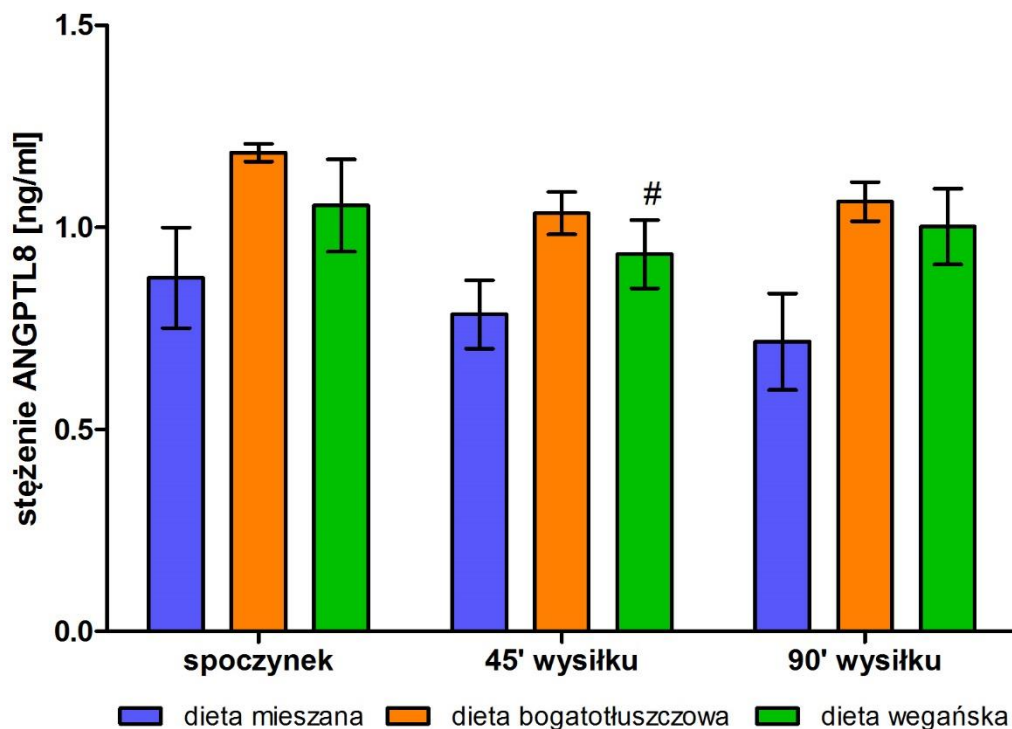
Stężenie ANGPTL4 było istotnie niższe w grupie osób na diecie wegańskiej w spoczynku ($34,1 \pm 4,8$ ng/ml), w 45. ($34,3 \pm 4,9$ ng/ml), jak i w 90. ($38,6 \pm 5,4$ ng/ml) minucie wysiłku w porównaniu do grupy stosującej dietę bogatotłuszczową (odpowiednio: $74,6 \pm 17,2$ ng/ml, $p=0,01$; $90,5 \pm 21,0$ ng/ml, $p=0,001$; $84,0 \pm 20,6$ ng/ml, $p=0,01$) oraz w grupie osób pozostających na diecie mieszanej w 45. ($63,6 \pm 10,2$ ng/ml, $p=0,03$) i 90. ($67,3 \pm 9,6$ ng/ml, $p=0,03$) minucie wysiłku fizycznego. Podczas wysiłku fizycznego odnotowano istotny wzrost stężenia ANGPTL4 w grupie osób stosujących dietę mieszaną w 90. minucie trwania wysiłku w porównaniu do stężenia w spoczynku ($59,9 \pm 9,1$ ng/ml, $p=0,014$), a w wypadku osób na diecie wegańskiej stwierdzono istotny wzrost stężenia ANGPTL4 między 45. a 90. minutą wysiłku (Ryc. 15).



Rycina 15. Stężenie białka ANGPTL4 w osoczu podczas spoczynku, w 45. i 90. minucie wysiłku fizycznego. * istotne różnice między zmiennymi niezależnymi, $p < 0,05$; # istotne różnice między zmiennymi zależnymi w stosunku do spoczynku, $p < 0,05$; \$ istotne różnice między zmiennymi w stosunku do 45. minuty wysiłku, $p < 0,05$.

4.12. Porównanie stężenia białek angiopoetynopodobnych 8 w osoczu pomiędzy grupami w spoczynku i w czasie długotrwałego wysiłku fizycznego

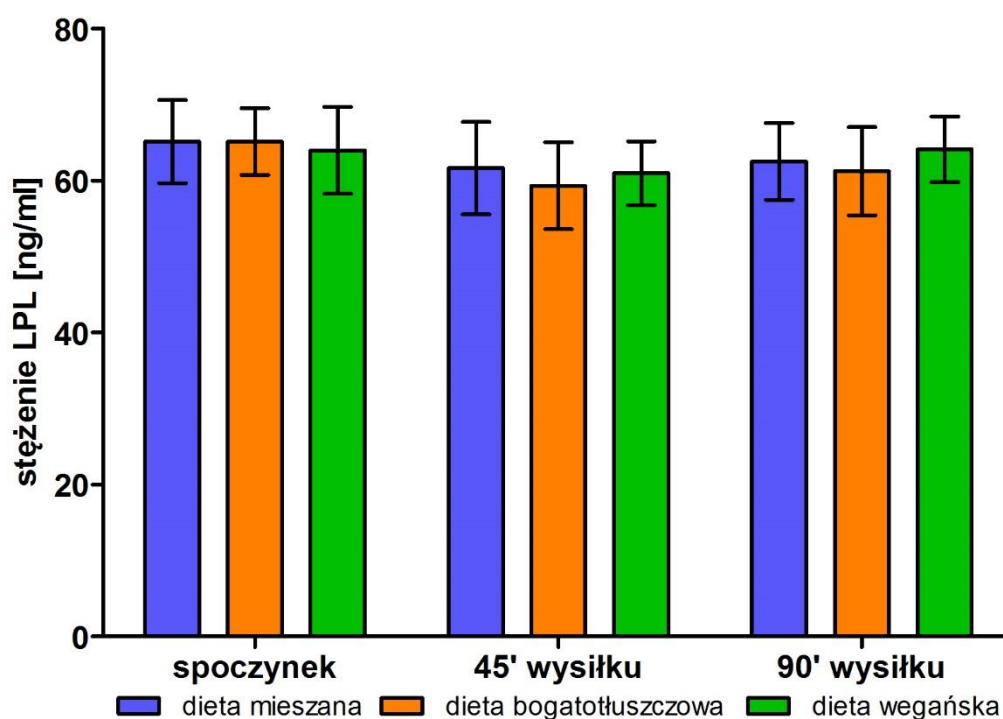
Oznaczono stężenie ANGPT8 u 7 mężczyzn z grupy na diecie mieszanej i wegańskiej oraz u 5 osób z grupy będących na diecie bogatotłuszczowej. Stężenie ANGPT8 nie różniło się między badanymi grupami. Jedynie w grupie osób na diecie wegańskiej zaobserwowano istotny spadek ANGPT8 w 45. (0,93±0,08 ng/ml) minucie wysiłku fizycznego w porównaniu z wartością uzyskaną w spoczynku (1,05±0,11 ng/ml, $p=0,018$) (Ryc. 16).



Rycina 16. Stężenie białka ANGPT8 w osoczu podczas spoczynku, w 45. i 90. minucie wysiłku fizycznego. # istotne różnice między zmiennymi zależnymi w stosunku do spoczynku, $p<0,05$.

4.13. Porównanie stężenia lipazy lipoproteinowej w osoczu pomiędzy grupami w spoczynku i w czasie długotrwałego wysiłku fizycznego

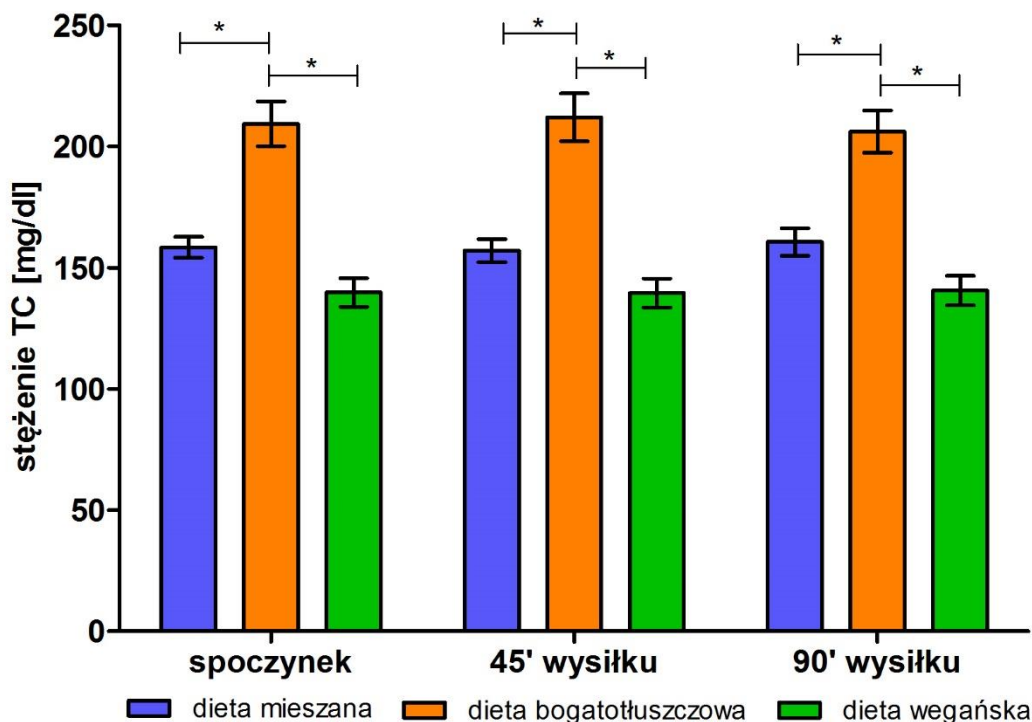
Badanym mężczyznom oznaczono stężenie lipazy lipoproteinowej bez podania heparyny. Oznaczenia zostały przeprowadzone u 7 osób z grupy na diecie mieszanej i wegańskiej oraz u 5 osób z grupy na diecie bogatotłuszczowej. Nie stwierdzono istotnych różnic między badanymi grupami oraz w czasie trwania wysiłku (Ryc. 17).



Rycina 17. Stężenie lipazy lipoproteinowej w osoczu podczas spoczynku, w 45. i 90. minucie wysiłku fizycznego.

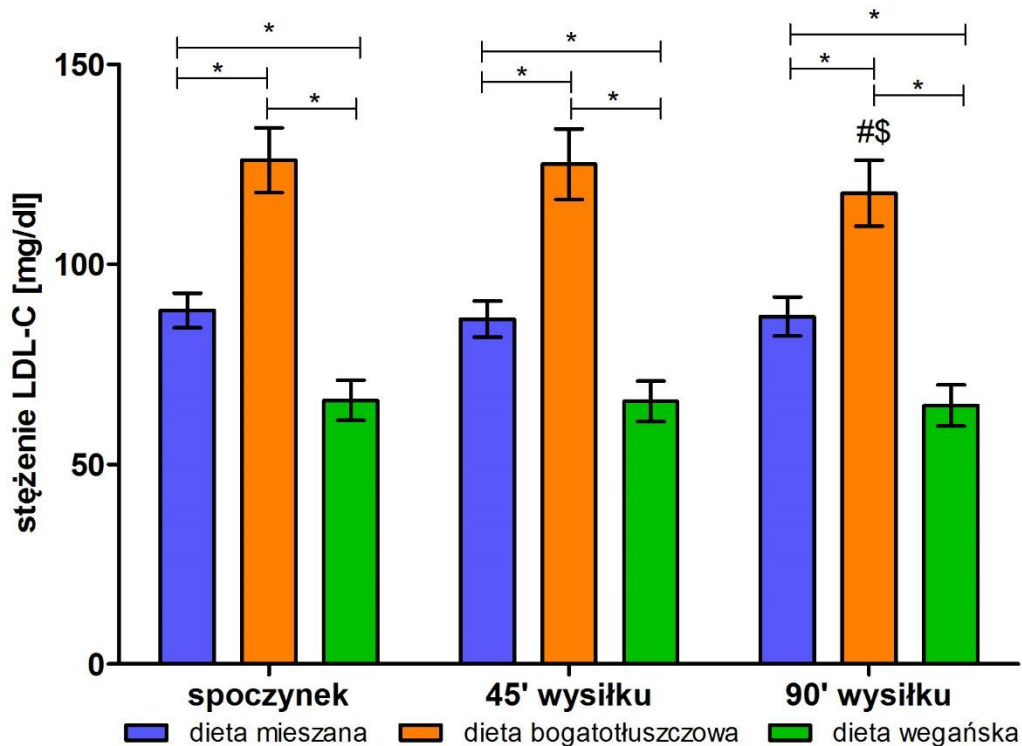
4.14. Porównanie stężeń cholesterolu całkowitego, cholesterolu frakcji lipoprotein o małej i dużej gęstości, a także triglicerydów w osoczu pomiędzy grupami w spoczynku i w czasie długotrwałego wysiłku fizycznego

Stwierdzono różnice w stężeniu TC, LDL-C, HDL-C i TG między badanymi grupami. W spoczynku, w 45. i 90. minucie wysiłku fizycznego osoby stosujące dietę bogatotłuszczową odznaczały się istotnie wyższym stężeniem TC ($209,0 \pm 9,2$ mg/dl) oraz LDL-C ($126,0 \pm 8,1$ mg/dl) i HDL-C ($68,0 \pm 3,3$ mg/dl) niż osoby w grupie na diecie mieszanej (odpowiednio: $158,0 \pm 4,3$ mg/dl, $p=0,001$; $88,5 \pm 4,3$ mg/dl, $p=0,018$; $51,0 \pm 2,2$ mg/dl, $p=0,0008$) i wegańskiej (odpowiednio: $140,0 \pm 5,9$ mg/dl, $p<0,0000$; $66,0 \pm 5,0$ mg/dl, $p<0,0000$; $54,0 \pm 2,9$ mg/dl, $p=0,0108$). Stężenie HDL-C w osoczu u mężczyzn pozostających na diecie mieszanej i wegańskiej nie różniło się istotnie, natomiast stężenie LDL-C było istotnie wyższe w grupie osób na diecie mieszanej ($p=0,0398$) (Ryc. 18, 19, 20).



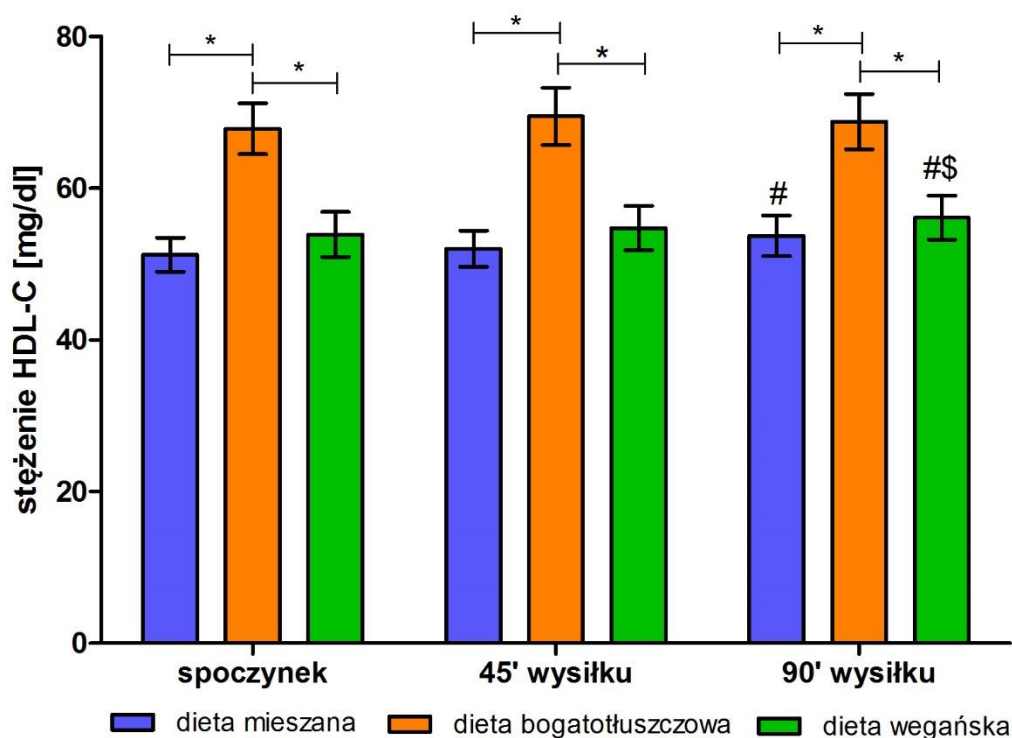
Rycina 18. Stężenie cholesterolu całkowitego w osoczu podczas spoczynku, w 45. i 90. minucie wysiłku fizycznego. * istotne różnice między zmiennymi niezależnymi, $p<0,05$.

W czasie wysiłku fizycznego obniżyło się stężenie LDL-C w osoczu osób na diecie bogatotłuszczowej w trakcie 90. minuty wysiłku ($118 \pm 8,2$ mg/dl) w stosunku do wartości w spoczynku ($126,0 \pm 8,1$ mg/dl, $p=0,0001$) i wartości w 45. minucie wysiłku fizycznego ($125,0 \pm 8,8$ mg/dl, $p=0,0001$) (Ryc. 19).



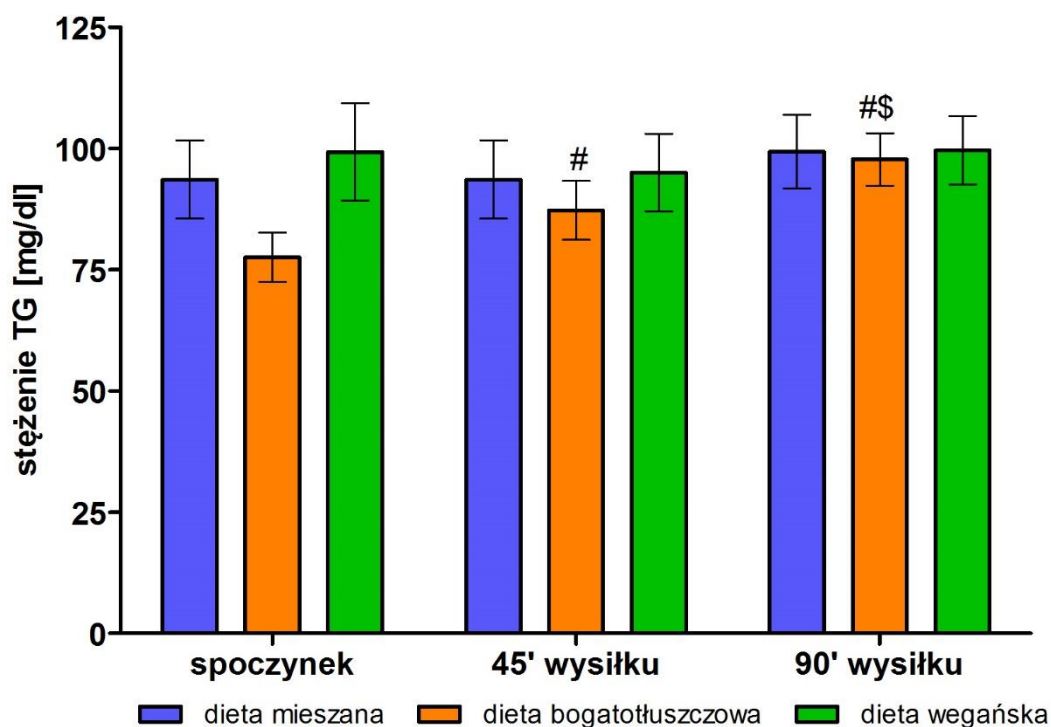
Rycina 19. Stężenie cholesterolu frakcji lipoprotein o małej gęstości w osoczu podczas spoczynku, w 45. i 90. minucie wysiłku fizycznego. * istotne różnice między zmiennymi niezależnymi, $p < 0,05$; # istotne różnice między zmiennymi zależnymi w stosunku do spoczynku, $p < 0,05$; \$ istotne różnice między zmiennymi w stosunku do 45. minuty wysiłku, $p < 0,05$.

W trakcie wysiłku fizycznego średnie stężenie HDL-C w osoczu wzrosło u osób na diecie mieszanej i w 90. minucie wysiłku fizycznego wynosiło $53,7 \pm 2,7$ mg/dl, w spoczynku zaś $51,2 \pm 2,2$ mg/dl ($p=0,005$). Również u mężczyzn na diecie wegańskiej stwierdzono wzrost stężenia HDL-C w 90. minucie wysiłku ($56,0 \pm 2,9$ mg/dl) w stosunku do wartości spoczynkowej ($53,9 \pm 2,9$ mg/dl, $p=0,007$) i 45. minuty wysiłku fizycznego ($54,7 \pm 2,9$ mg/dl, $p=0,0007$) (Ryc. 20).



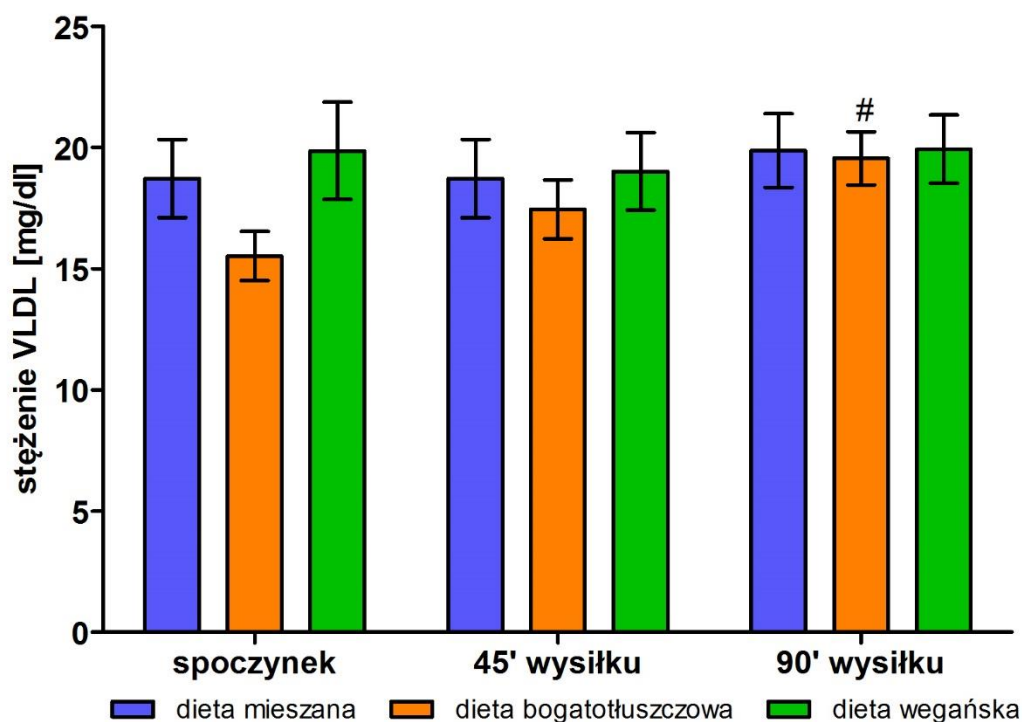
Rycina 20. Stężenie cholesterolu frakcji lipoprotein o dużej gęstości w osoczu podczas spoczynku, w 45. i 90. minucie wysiłku fizycznego. * istotne różnice między zmiennymi niezależnymi, $p < 0,05$; # istotne różnice między zmiennymi zależnymi w stosunku do spoczynku, $p < 0,05$; \$ istotne różnice między zmiennymi w stosunku do 45. minuty wysiłku, $p < 0,05$.

Jedynie u badanych w grupie stosującej dietę bogatotłuszczową zaobserwowano podczas wysiłku fizycznego wzrost stężenia TG w osoczu z $77,6 \pm 5,1$ mg/dl do $87,2 \pm 6,1$ mg/dl ($p=0,0002$) w 45. minucie wysiłku oraz do $97,8 \pm 5,5$ mg/dl w 90. minucie wysiłku fizycznego (Ryc. 21).



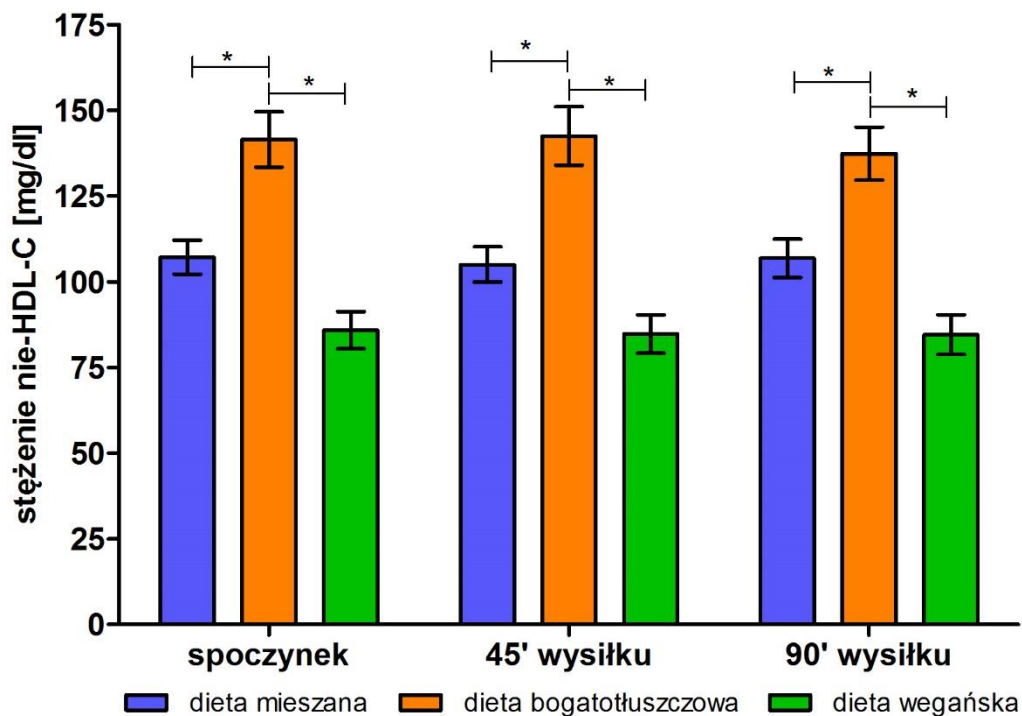
Rycina 21. Stężenie triglicerydów w osoczu podczas spoczynku, w 45. i 90. minucie wysiłku fizycznego. # istotne różnice między zmiennymi zależnymi w stosunku do spoczynku, $p<0,05$; \$ istotne różnice między zmiennymi w stosunku do 45. minuty wysiłku, $p<0,05$.

Wyliczone wartości stężenia lipoprotein o bardzo małej gęstości w osoczu były takie same we wszystkich grupach badanych osób. Jedynie w wypadku mężczyzn na diecie bogatotłuszczowej odnotowano istotny wzrost stężenia VLDL w 90. minucie wysiłku ($19,6 \pm 1,1$ mg/dl) w porównaniu ze stężeniem w spoczynku ($15,5 \pm 1,0$ mg/dl, $p=0,03$) (Ryc. 22).



Rycina 22. Stężenie lipoprotein o bardzo małej gęstości w osoczu podczas spoczynku, w 45. i 90. minucie wysiłku fizycznego. # istotne różnice między zmiennymi zależnymi w stosunku do spoczynku, $p<0,05$.

Stwierdzono także większe stężenie nie-HDL-C w grupie osób na diecie bogatotłuszczowej zarówno w spoczynku ($141,5 \pm 8,1$ mg/dl), jak i podczas wysiłku fizycznego w 45. ($142,5 \pm 8,5$ mg/dl) i 90. minucie ($137,4 \pm 7,7$ mg/dl) w porównaniu z grupą mężczyzn na diecie mieszanej (odpowiednio: $107,2 \pm 5,5$ mg/dl, $p=0,02$; $105,5 \pm 5,0$ mg/dl, $p=0,018$; $106,8 \pm 5,6$ mg/dl $p=0,04$) oraz osób na diecie wegańskiej (odpowiednio: $85,9 \pm 5,4$ mg/dl, $p<0,0000$; $84,8 \pm 5,6$ mg/dl, $p<0,0000$, $84,6 \pm 5,8$ mg/dl, $p<0,0000$) (Ryc. 23).



Rycina 23. Stężenie nie-HDL-C w osoczu podczas spoczynku, w 45. i 90. minucie wysiłku fizycznego. * istotne różnice między zmiennymi niezależnymi, $p<0,05$;

4.15. Ocena korelacji między stężeniami białek angiopoetynopodobnych 3 i 4, a stężeniem wolnych kwasów tłuszczowych w osoczu w spoczynku, 45. i 90. minucie wysiłku fizycznego

Oceniono korelację pomiędzy stężeniem ANGPTL3 i ANGPTL4 a stężeniem WKT w osoczu badanych osób (Tab. IV i Tab. V).

Tabela IV. Korelacje między stężeniem ANGPTL3 a stężeniem WKT w osoczu podczas spoczynku, w 45. i 90. minucie wysiłku fizycznego

		Dieta mieszana	Dieta bogatotłuszczowa	Dieta wegańska
Liczba osób badanych		23	17	22
Spoczynek	r	0,11	-0,1	0,3
	p	NS	NS	NS
45' wysiłku	r	0,01	-0,2	0,2
	p	NS	NS	NS
90' wysiłku	r	0,02	-0,1	0,2
	p	NS	NS	NS

r – współczynnik korelacji rang Spearmana; p<0,05

Tabela V. Korelacje między stężeniem ANGPTL4 a stężeniem WKT w osoczu podczas spoczynku, w 45. i 90. minucie wysiłku fizycznego

		Dieta mieszana	Dieta bogatotłuszczowa	Dieta wegańska
Liczba osób badanych		23	17	22
Spoczynek	r	0,3	0,04	-0,04
	p	NS	NS	NS
45' wysiłku	r	0,4	0,1	0,1
	p	NS	NS	NS
90' wysiłku	r	0,3	-0,05	0,01
	p	NS	NS	NS

r – współczynnik korelacji rang Spearmana; p<0,05

W badanych grupach mężczyzn na różnych dietach stwierdzono istotną korelację między stężeniami ANGPTL4 a WKT w grupie osób na diecie mieszanej w 45. minucie wysiłku (r=0,4, p=0,04).

4.16. Ocena korelacji między stężeniami białek angiopoetynopodobnych 3 i 4 a stężeniem kwasów palmitynowego, stearynowego, palmitooleinowego, oleinowego oraz linolowego w osoczu w spoczynku i 45. minucie wysiłku fizycznego

Oceniono korelację pomiędzy stężeniem ANGPTL3 i ANGPTL4 a stężeniem kwasów: palmitynowego, stearynowego, palmitooleinowego, oleinowego oraz linolowego w osoczu badanych osób (Tab. VI i Tab. VII).

Tabela VI. Korelacje między stężeniem ANGPTL3 a stężeniem kwasu palmitynowego, stearynowego, palmitooleinowego, oleinowego oraz linolowego w osoczu w spoczynku i 45. minucie wysiłku fizycznego

		Dieta mieszana	Dieta bogatotłuszczowa	Dieta wegańska
Liczba osób badanych		16	12	15
kwas palmitynowy				
Spoczynek	r	0,31	-0,71	-0,06
	p	NS	0,009	NS
45' wysiłku	r	-0,01	-0,45	-0,04
	p	NS	NS	NS
kwas stearynowy				
Spoczynek	r	0,29	-0,70	-0,46
	p	NS	0,016	NS
45' wysiłku	r	-0,02	-0,63	-0,26
	p	NS	0,026	NS
kwas palmitooleinowy				
Spoczynek	r	0,20	0,06	0,12
	p	NS	NS	NS
45' wysiłku	r	0,25	0,42	0,16
	p	NS	NS	NS
kwas oleinowy				
Spoczynek	r	0,41	-0,41	-0,62
	p	NS	NS	0,017
45' wysiłku	r	0,16	-0,42	-0,07
	p	NS	NS	NS
kwas linolowy				
Spoczynek	r	0,04	-0,68	-0,5
	p	NS	0,015	NS
45' wysiłku	r	-0,08	-0,61	-0,22
	p	NS	0,035	NS

r – współczynnik korelacji rang Spearmana; p<0,05 - oznaczone na kolor czerwony

Tabela VII. Korelacje między stężeniem ANGPTL4 a stężeniem kwasu palmitynowego, stearynowego, palmitooleinowego, oleinowego oraz linolowego w osoczu w spoczynku i 45. minucie wysiłku

		Dieta mieszana	Dieta bogatotłuszczowa	Dieta wegańska
Liczba osób badanych		16	12	15
kwas palmitynowy				
Spoczynek	r	0,2	0,38	-0,19
	p	NS	NS	NS
45' wysiłku	r	0,16	0,24	-0,07
	p	NS	NS	NS
kwas stearynowy				
Spoczynek	r	0,06	0,47	0,08
	p	NS	NS	NS
45' wysiłku	r	-0,09	0,26	0,08
	p	NS	NS	NS
kwas palmitooleinowy				
Spoczynek	r	0,03	-0,07	-0,43
	p	NS	NS	NS
45' wysiłku	r	0,40	-0,13	-0,28
	p	NS	NS	NS
kwas oleinowy				
Spoczynek	r	0,26	0,42	0,50
	p	NS	NS	NS
45' wysiłku	r	0,17	0,16	0,33
	p	NS	NS	NS
kwas linolowy				
Spoczynek	r	0,17	0,44	0,03
	p	NS	NS	NS
45' wysiłku	r	0,26	0,03	0,23
	p	NS	NS	NS

r – współczynnik korelacji rang Spearmana; p<0,05

U osób na diecie bogatotłuszczowej stwierdzono ujemną korelację między stężeniem ANGPTL3 a stężeniem kwasu palmitynowego w spoczynku. W tej samej grupie badanych mężczyzn odnotowano ujemną istotną korelację między stężeniem ANGPTL3 a stężeniem kwasu stearynowego oraz kwasu linolowego zarówno podczas spoczynku, jak i w 45. minucie wysiłku fizycznego.

W wypadku oceny korelacji między stężeniem oznaczonych kwasów tłuszczowych oraz stężeniem ANGPTL4 u badanych nie odnotowano żadnych istotnych korelacji.

4.17. Ocena korelacji między stężeniami białek angiopoetynopodobnych 3 i 4 a wskaźnikami lipidowymi w osoczu

Oceniono korelację pomiędzy stężeniem ANGPTL3 i ANGPTL4 a stężeniem cholesterolu całkowitego, cholesterolu frakcji LDL-C i HDL-C oraz triglicerydów w osoczu badanych osób (Tab. VIII i Tab. IX).

Tabela VIII. Korelacje między stężeniem ANGPTL3 a stężeniem cholesterolu całkowitego, cholesterolu frakcji lipoprotein o małej gęstości, cholesterolu frakcji lipoprotein o dużej gęstości oraz triglicerydów w osoczu podczas spoczynku, w 45. i 90. minucie wysiłku fizycznego

		Dieta mieszana	Dieta bogatotłuszczowa	Dieta wegańska
Liczba osób badanych		23	17	22
TC				
Spoczynek	r	-0,03	-0,15	0,36
	p	NS	NS	NS
45' wysiłku	r	0,03	-0,15	0,35
	p	NS	NS	NS
90' wysiłku	r	-0,001	-0,25	0,12
	p	NS	NS	NS
LDL-C				
Spoczynek	r	0,06	0,01	0,32
	p	NS	NS	NS
45' wysiłku	r	0,05	0,11	0,21
	p	NS	NS	NS
90' wysiłku	r	0,09	0,04	0,07
	p	NS	NS	NS
HDL-C				
Spoczynek	r	-0,01	-0,45	0,28
	p	NS	NS	NS
45' wysiłku	r	0,06	-0,49	0,37
	p	NS	NS	NS
90' wysiłku	r	-0,04	-0,63	0,17
	p	NS	0,006	NS
TG				
Spoczynek	r	0,01	0,46	-0,001
	p	NS	NS	NS
45' wysiłku	r	0,02	-0,01	0,12
	p	NS	NS	NS
90' wysiłku	r	0,21	0,04	0,04
	p	NS	NS	NS

TC – cholesterol całkowity; LDL-C – cholesterol frakcji lipoprotein o małej gęstości; HDL-C – cholesterol frakcji lipoprotein o dużej gęstości; TG – triglicerydy; r – współczynnik korelacji rang Spearmana; p<0,05 - oznaczone na kolor czerwony

Tabela IX. Korelacje między stężeniem ANGPTL4 a stężeniem cholesterolu całkowitego, cholesterolu frakcji lipoprotein o małej gęstości, cholesterolu frakcji lipoprotein o dużej gęstości oraz triglicerydów w osoczu podczas spoczynku, w 45. i 90. minucie wysiłku fizycznego

		Dieta mieszana	Dieta bogatotłuszczowa	Dieta wegańska
Liczba osób badanych		23	17	22
TC				
Spoczynek	r	-0,27	-0,05	0,29
	p	NS	NS	NS
45' wysiłku	r	-0,35	-0,16	0,38
	p	NS	NS	NS
90' wysiłku	r	-0,27	-0,16	0,49
	p	NS	NS	0,02
LDL-C				
Spoczynek	r	-0,38	-0,19	0,14
	p	NS	NS	NS
45' wysiłku	r	-0,39	-0,38	0,21
	p	NS	NS	NS
90' wysiłku	r	-0,41	-0,39	0,34
	p	NS	NS	NS
HDL-C				
Spoczynek	r	0,12	0,18	-0,02
	p	NS	NS	NS
45' wysiłku	r	0,07	0,18	0,003
	p	NS	NS	NS
90' wysiłku	r	0,11	0,14	0,15
	p	NS	NS	NS
TG				
Spoczynek	r	-0,11	0,06	0,04
	p	NS	NS	NS
45' wysiłku	r	-0,20	0,06	0,25
	p	NS	NS	NS
90' wysiłku	r	-0,20	0,07	0,26
	p	NS	NS	NS

TC – cholesterol całkowity; LDL-C – cholesterol frakcji lipoprotein o małej gęstości; HDL-C – cholesterol frakcji lipoprotein o dużej gęstości; TG – triglicerydy; r – współczynnik korelacji rang Spearmana; p – poziom istotności, p<0,05

Stwierdzono istotną ujemną korelację między stężeniem białka ANGPTL3 a stężeniem HDL-C w grupie osób na diecie bogatotłuszczowej w 90. minucie wysiłku fizycznego, a stężenie zaś białka ANGPTL4 istotnie dodatnio korelowało ze stężeniem TC w grupie na diecie wegańskiej, również w 90. minucie wysiłku fizycznego.

5. DYSKUSJA

W dotychczasowym piśmiennictwie brak jest badań, dotyczących zależności między stężeniem białek angiopoetynopodobnych 3, 4 i 8 we krwi a metabolizmem lipidów podczas długotrwałego wysiłku fizycznego przeprowadzonych na osobach stosujących zróżnicowany sposób żywienia, tzn. od zwyczajowej, mieszanej diety, poprzez popularny wegetarianizm, a skończywszy na dietach bogatotłuszczowych. Badania przedstawione w obecnej pracy zostały przeprowadzone na wyjątkowo jednorodnej grupie – aktywnych fizycznie mężczyznach o podobnych wskaźnikach antropometrycznych (masa i wysokość ciała oraz obwód tali i bioder), a także zbliżonych wiekiem i poziomem aktywności fizycznej, określonym zarówno metodą kwestionariuszową (IPAQ), jak i w bezpośrednim teście na cykloergometrze. To co różnicowało poszczególne grupy badanych, to sposób żywienia. Należy podkreślić, że pomimo różnego rodzaju stosowanych diet ich wartość kaloryczna była zbliżona. Badani byli także zaadaptowani do sposobu żywienia, ponieważ do badań kwalifikowano osoby stosujące daną dietę przez co najmniej rok. Najprawdopodobniej zróżnicowany sposób żywienia wpłynął na wartość lipidogramu w badanych grupach, mimo młodego wieku i podejmowania wzmożonej aktywności fizycznej.

Osoby na diecie bogatotłuszczowej dostarczały z dietą znacznych ilości energii wraz z tłuszczami, w tym, przede wszystkim, w postaci kwasów tłuszczowych nasyconych. Stosowana przez mężczyzn dietę wegańską była zaś dietą wysokowęglowodanową z wysoką zawartością błonnika, podczas gdy grupa na diecie mieszanej spożywała węglowodany w proporcjach zalecanych w najnowszych normach Instytutu Żywności i Żywienia z 2017 roku. Średnia kaloryczność diet w grupach jest niższa od zalecanej podaży energii dla mężczyzn w poszczególnych grupach wiekowych i przy wysokim poziomie aktywności fizycznej (Jarosz, 2017).

Monitorowany współczynnik oddechowy podczas długotrwałego wysiłku fizycznego był istotnie niższy u osób stosujących dietę bogatotłuszczową niż w grupie osób na diecie mieszanej i wegańskiej, a więc w większym stopniu osoby te wykorzystywały kwasy tłuszczowe jako substrat energetyczny dla pracujących mięśni. Większe wykorzystanie tłuszczów jako źródła energii przez osoby na diecie bogatotłuszczowej potwierdzono także w badaniach Helge i wsp. (2001). Jednocześnie, dieta bogatotłuszczowa, pomimo niskiej zawartości węglowodanów, stosowana

u badanych mężczyzn, nie była dietą tzw. ketogenną, gdyż współczynnik oddechowy nie był niższy od wartości 0,7 (Uber, 2018). Spożywanie diety bogatotłuszczowej, zgodnie z przewidywaniami (Matulewicz i Karczewska-Kupczewska, 2016) było związane ze zwiększonym stężeniem wolnych kwasów tłuszczowych w osoczu podczas spoczynku. Ponadto podczas wysiłku fizycznego również grupa osób na diecie bogatotłuszczowej charakteryzowała się najwyższym stężeniem WKT w osoczu. Także inni autorzy zgodnie udokumentowali wzrost stężenia WKT, które zostają wykorzystane przez pracujące mięśnie na cele energetyczne podczas wysiłku fizycznego, przy interwencji dietetycznej ograniczającej spożycie węglowodanów (Langford i wsp., 1996; Jeukendrup, 2003).

W niniejszej pracy oznaczono w osoczu osób badanych nie tylko ogólną pulę wolnych kwasów tłuszczowych, ale także pięć kwasów tłuszczowych występujących w największej ilości w diecie, takich jak: nasycony kwas palmitynowy i stearynowy, jednonienasycony kwas palmitooleinowy i oleinowy oraz wielonienasycony kwas linolowy. W dostępnej literaturze brak jest tego typu badań przeprowadzonych na polskiej populacji, jak również nie ma wartości referencyjnych stężeń we krwi poszczególnych kwasów tłuszczowych. Grupy badane różniły się spożywaną ilością tłuszczu ogółem jak i poszczególnych kwasów tłuszczowych. Kwas wielonienasycony linolowy należy do rodziny niezbędnych nienasyconych kwasów tłuszczowych omega-6 i musi być dostarczony do organizmu wraz z dietą. Jego źródłem są przede wszystkim produkty pochodzenia roślinnego, takie jak oleje, nasiona i orzechy (Jarosz, 2017). Osoby będące na diecie wegańskiej spożywały największe ilości kwasów wielonienasyconych. Jednocześnie stwierdzono najwyższe stężenie tego kwasu w osoczu u wegan. Oczywiście największe ilości tłuszczu ogółem spożywały osoby na diecie bogatotłuszczowej, w tym nasyconych kwasów tłuszczowych. Najniższym spożyciem kwasów tłuszczowych nasyconych charakteryzowały się osoby na diecie wegańskiej. Analiza poszczególnych kwasów tłuszczowych w osoczu wykazała brak różnic między poszczególnymi grupami z wyjątkiem kwasu linolowego, którego stężenie było wyższe w spoczynku u wegan w porównaniu z osobami na diecie bogatotłuszczowej. W wypadku oznaczonych kwasów nasyconych, takich jak kwas stearynowy i palmitynowy, wykazano tendencję do wyższych stężeń we krwi u osób spożywających największe ich ilości, a więc w grupie na diecie bogatotłuszczowej. Dotychczasowe badania innych autorów przeprowadzone były na małych grupach osób z ograniczoną liczbą rodzajów kwasów tłuszczowych, co uniemożliwia określenie referencyjnych zakresów.

Wartą uwagi pracą w tym zakresie, jest praca autorstwa Abdelmagid'a i wsp. (2015) przeprowadzona wśród dorosłych Kanadyjczyków. Zespół ten podkreśla istotność związku między stężeniem WKT we krwi a chorobami przewlekłymi, takimi jak choroby układu sercowo-naczyniowego, nowotwory, czy choroby autoimmunologiczne. Autorzy wspomnianej pracy postanowili oznaczyć stężenie aż 61 kwasów tłuszczowych w grupie ponad 800 osób obu płci. Kwasy tłuszczowe palmitynowy i stearynowy charakteryzowały się najwyższym stężeniem wśród kwasów nasyconych. Spośród kwasów jednonienasyconych, najwyższe stężenie odnotowano w wypadku kwasów palmitooleinowego oraz oleinowego. Kwas wielonienasycony występujący w najwyższym stężeniu to kwas linolowy (Abdelmagid i wsp., 2015). Potwierdza to wybór oznaczonych kwasów tłuszczowych w badaniach własnych. Wszystkie powyżej wymienione kwasy tłuszczowe mieściły się w szerokim zakresie stężeń. Otrzymane średnie stężenia kwasów tłuszczowych w niniejszej pracy były niższe niż w populacji Kanadyjczyków. Jedynie w wypadku kwasu palmitynowego średnie stężenie odnotowane we wszystkich trzech badanych grupach było wyższe niż średnie stężenie w populacji badanej przez Abdelmagid'a i wsp. (2015). Powyższe rozbieżności mogą wynikać, m.in. z dużej niejednorodności grupy badanej w przytaczanej pracy, podczas gdy w niniejszych badaniach uzyskane wyniki dotyczą jednolitej grupy zarówno pod względem płci, wieku, jak i przynależności etnicznej.

We wszystkich badanych grupach stężenie **glicerolu** we krwi w spoczynku było na tym samym poziomie, a następnie zarówno w 45., jak i 90. minucie wysiłku fizycznego odnotowano istotny jego wzrost, w przeciwieństwie do WKT, gdzie istotne podwyższenie zaobserwowano dopiero w 90. minucie trwania wysiłku fizycznego. Jednocześnie, stężenie glicerolu w 45. i 90. minucie wysiłku było najwyższe u osób na diecie bogatotłuszczowej. Świadczyć to może o nasileniu lipolizy w tej grupie badanych mężczyzn. Glicerol powstały na skutek hydrolizy TG podczas wysiłku fizycznego jest transportowany do wątroby, a następnie wykorzystywany jako substrat w procesie glukoneogenezy (Nazar, 1980).

Stężenie **insuliny** we wszystkich badanych grupach obniżyło się w 45. minucie wysiłku i było niższe w stosunku do wartości spoczynkowej również w 90. minucie wysiłku fizycznego. Jednocześnie, w grupie osób na diecie bogatotłuszczowej, odnotowano dalszy spadek stężenia insuliny w 90. minucie. Wysiłek fizyczny zarówno wytrzymałościowy o dużej i umiarkowanej intensywności, jak i wysiłek siłowy powodują spadek stężenia tego hormonu we krwi (Soria i wsp., 2016). Podczas umiarkowanego

wysiłku fizycznego, już na poziomie 40% VO₂max, po 10-15 minutach dochodzi do obniżenia stężenia insuliny we krwi. Kontynuowanie wysiłku fizycznego nie powoduje dalszego zmniejszenia wydzielania tego hormonu (Mędraś, 2010), jednakże stosowanie diety bogatotłuszczowej, jak i stan na czczo, mogą nasilać dalszy spadek stężenia insuliny podczas wysiłku fizycznego. Wiadomo także, że dieta o dużej zawartości tłuszczów jednonienasyconych istotnie zwiększa wrażliwość tkanek na insulinę w porównaniu z dietą o dużej zawartości tłuszczów nasyconych (Rivellese i wsp., 2008). Fizjologiczne znaczenie obniżenia tempa wydzielania insuliny wiąże się ze wzrostem stężenia WKT oraz zwiększeniem glukoneogenezy w wątrobie, co umożliwia zaspokojenie potrzeb energetycznych dla pracujących mięśni (Tuominen, 1997).

Z drugiej strony, tak jak oczekiwano (Bergouignan i wsp., 2016), również stężenie **glukozy** obniżyło się podczas wysiłku fizycznego we wszystkich badanych grupach.

U części badanych osób oznaczono także stężenie **lipazy lipoproteinowej** bez podania heparyny. Nie zaobserwowano istotnych różnic między grupą osób na diecie mieszanej (61,6±5,4 ng/ml), bogatotłuszczowej (59,3±4,4 ng/ml) czy wegańskiej (60,9±5,7 ng/ml), a także nie zaobserwowano zmian stężenia LPL podczas umiarkowanej, długotrwałej aktywności fizycznej. Shirakawa i wsp. (2015) wykazali, iż zarówno stężenie LPL oznaczane po podaniu heparyny, jak i bez jej podania istotnie koreluje z wielkością cząsteczek lipoprotein. Badania te sugerują możliwość oznaczania LPL bez podania heparyny w celu oceny gospodarki lipidowej. Rozbieżności w stężeniach LPL stwierdzono jedynie w grupach różniących się pochodzeniem etnicznym lub stanem zdrowia (Shirakawa i wsp., 2015). Także Miyashita i wsp. (2010) wykazał wyższe stężenia LPL bez podania heparyny u otyłych mężczyzn bez zaburzeń metabolicznych, których poddano interwencji zwiększającej ich aktywność fizyczną (60,1±4,3 ng/ml) w porównaniu do grupy kontrolnej, która nie zwiększyła swojej aktywności fizycznej (48,1±2,2 ng/ml, p=0,009) (Miyashita i wsp., 2010). W niniejszym doświadczeniu stężenie LPL było podobne jak u osób, które podjęły aktywność fizyczną w badaniach Miyashita i wsp. (2010).

W przeprowadzonych badaniach dokonano oceny wpływu diety mieszanej, bogatotłuszczowej i wegańskiej na stężenie białek angiopoetynopodobnych 3, 4 i 8 we krwi.

Stwierdzono, iż osoby na diecie wegańskiej charakteryzowały się istotnie niższym stężeniem ANGPTL4 niż osoby stosujące dietę mieszaną i bogatotłuszczową, zarówno w spoczynku, jak i podczas 90-minutowego wysiłku na cykloergometrze. W wypadku

ANGPTL3 i ANGPTL8 nie zaobserwowano różnicy między badanymi grupami. Nie wykazano także istotnej korelacji między stężeniem trzech badanych białek a WKT.

Co ciekawe, na podstawie niniejszych badań odnotowano pewne korelacje między stężeniem kwasów tłuszczowych a stężeniem ANGPTL3 w osoczu. U osób na diecie bogatotłuszczowej stwierdzono istotną ujemną korelację między kwasem palmitynowym a ANGPTL3 w spoczynku ($r=-0,71$, $p=0,009$). Kwas palmitynowy należy do grupy kwasów tłuszczowych, który powoduje wzrost stężenia LDL-C we krwi (Catapano i wsp., 2016). Stężenie LDL-C we krwi było najwyższe właśnie w grupie osób stosujących dietę bogatotłuszczową. Także stężenie kwasu stearynowego, który mimo swojej przynależności do grupy kwasów nasyconych, nie ma negatywnego wpływu na stężenie LDL-C, ale wykazuje działanie prozakrzepowe (Crupkin i Zambelli, 2008), jest ujemnie skorelowane ze stężeniem ANGPTL3 u osób na diecie bogatotłuszczowej zarówno podczas spoczynku ($r=-0,7$, $p=0,016$), jak i wysiłku fizycznego ($r=-0,63$, $p=0,026$). Odnotowano również ujemną korelację między stężeniem ANGPTL3 a stężeniem kwasu linolowego, natomiast znowu tylko w grupie mężczyzn stosujących dietę bogatotłuszczową (w spoczynku: $r=-0,68$, $p=0,015$; w 45. minucie wysiłku: $r=-0,61$, $p=0,035$). Osoby na diecie wegańskiej charakteryzowały się istotną ujemną korelacją między stężeniem kwasu oleinowego w osoczu a ANGPTL3 ($r=-0,62$, $p=0,017$). Jest on głównym kwasem jednonienasyconym występującym w żywności. Zastąpienie kwasów nasyconych kwasami jednonienasyconymi w diecie przynosi korzystne efekty zdrowotne w postaci obniżonego stężenia TC i LDL-C. Modyfikacja diety w tym kierunku nie wpływa jednak na stężenie HDL-C i TG (Catapano i wsp., 2016). W dostępnej literaturze brak jest badań, które oceniałyby stężenie ANGPTL3 i ANGPTL8 we krwi w zależności od stosowanej diety u ludzi. Również badania dotyczące ANGPTL4 są bardzo nieliczne.

Cullberg i wsp. (2013) ocenili stężenie czynników angiogennych, w tym ANGPTL4, w zależności od stosowania diety redukcyjnej i/lub ćwiczeń fizycznych. Badano osoby otyłe w wieku 18-45 lat, nieaktywne fizycznie, zarówno mężczyźni, jak i kobiety. Po dwunastotygodniowej interwencji w grupie stosującej samą dietę niskoenerygetyczną i w grupie stosującej tylko ćwiczenia fizyczne zanotowano istotny wzrost stężenia ANGPTL4 (kolejno o 15% i 9%). W grupie osób, które zarówno otrzymywały niskoenerygetyczną dietę, jak i wykonywały ćwiczenia fizyczne odnotowano tendencję do wzrostu stężenia tego białka, ale nieistotną statystycznie. Wszystkie interwencje spowodowały spadek masy ciała w badanych grupach. Nie jest jasne

dlaczego połączenie diety i ćwiczeń fizycznych spowodowało powyższe zmiany w stężeniu ANGPTL4 (Cullberg i wsp., 2013).

W niniejszej pracy u osób stosujących dietę bogatotłuszczową zaobserwowano wyższe stężenie ANGPTL4 w osoczu (istotnie wyższe niż u osób na diecie wegańskiej i nieistotnie wyższe w stosunku do osób na diecie mieszanej). Otrzymane wyniki pokrywają się z wynikami pracy Jonker i wsp. (2013). Badacze przeprowadzili ciekawy eksperyment, mający na celu właśnie ocenę stężenia ANGPTL4 po zastosowaniu różnych interwencji dietetycznych, które miały spowodować podwyższenie stężenia WKT u zdrowych osób, a także u osób chorujących na cukrzycę typu 2. Zdrowych mężczyzn podzielono na 3 grupy, w których przez 3 dni stosowano różne rodzaje diet: głodówkę (n=22), dietę bardzo niskokaloryczną (n=10) oraz bogatotłuszczową i jednocześnie wysokoenergetyczną (n=15). Stosowanie wszystkich modeli żywieniowych spowodowało wzrost stężenia ANGPTL4 w osoczu, oraz również wzrost stężenia WKT. Ujemny bilans energetyczny spowodowany głodem, niskoenergetyczną dietą lub wysiłkiem fizycznym powoduje wzrost hydrolizy TG magazynowanych w tkance tłuszczowej, tym samym uwalniając do krwiobiegu WKT i glicerol. Prawdopodobnie proces lipolizy w tkance tłuszczowej jest kluczowym czynnikiem modelującym stężenie ANGPTL4 w osoczu. Z drugiej strony dieta bogatotłuszczowa i wysokoenergetyczna, która podwyższa stężenie WKT we krwi, ale krwiopochodnych, również spowodowała wzrost stężenia ANGPTL4 u zdrowych ochotników. Badacze sugerują, że być może zwiększona podaż tłuszczu powoduje zwiększony wzrost stężenia WKT pochodzących z egzogennych TG z tkanki tłuszczowej jak i innych tkanek, takich jak wątroba czy mięśnie szkieletowe, co w konsekwencji doprowadza do wzrostu stężenia wewnątrzkomórkowych WKT. Podwyższone stężenie kwasów tłuszczowych miałyby aktywować ekspresję *ANGPTL4* poprzez czynnik transkrypcyjny PPAR w adipocytach i hepatocytach, co prawdopodobnie hamuje dalszy wzrost stężenia WKT pochodzących z TG (Jonker i wsp., 2013). Otrzymane wyniki są spójne z wcześniejszym badaniem Kersten i wsp. (2009), w którym zaobserwowano wzrost stężenia ANGPTL4 po 24. i 48. godzinach od ostatniego posiłku (n=4). Jednocześnie – tak jak w niniejszej pracy - widoczne są duże różnice międzypersonne w stężeniu tego białka od wartości rzędu kilkunastu ng/ml do stężenia powyżej 100 ng/ml (Kersten i wsp., 2009).

W przeprowadzonych badaniach dokonano oceny wpływu 90-minutowego wysiłku fizycznego na stężenie białek angiopoetynopodobnych 3, 4 i 8 we krwi.

Uważa się, że podczas aktywności fizycznej ANGPTL3, ANGPTL4 i ANGPTL8 hamują lokalnie aktywność LPL, mogąc tym samym zapewnić przepływ TG do pracujących mięśni. Być może białka te są istotnym czynnikiem regulującym hydrolizę TG w osoczu, a następnie wychwyt WKT w zależności od ich dostępności i zapotrzebowania w celach energetycznych (Dijk i Kersten, 2016).

W autorskiej pracy stwierdzono istotny spadek stężenia ANGPTL3 w 45. minucie wysiłku w stosunku do spoczynku u osób na diecie mieszanej oraz spadek stężenia ANGPTL8 również w 45. minucie wysiłku w stosunku do spoczynku, ale u osób na diecie wegańskiej. W dostępnej literaturze brak jest badań opisujących zmianę stężenia ANGPTL3 i ANGPTL8 podczas wysiłku fizycznego u ludzi.

W przeprowadzonych badaniach własnych zaobserwowano wzrost stężenia ANGPTL4 podczas wysiłku fizycznego w grupie osób na diecie mieszanej między spoczynkiem a 90. minutą wysiłku oraz u osób na diecie wegańskiej między 45. a 90. minutą wysiłku fizycznego. U osób na diecie bogatotłuszczowej nie odnotowano wzrostu stężenia tego białka.

Badania Catoire i wsp. (2014) wykazały, iż jednym z nielicznych genów indukowanych w mięśniu, który nie jest zaangażowany w pracę podczas wysiłku fizycznego, jest gen kodujący *ANGPTL4*. Prawdopodobnie *ANGPTL4* jest indukowany w niećwiczącym mięśniu poprzez wzrost stężenia wolnych kwasów tłuszczowych we krwi za pośrednictwem PPAR- δ , co być może powoduje zmniejszenie wychwyty WKT pochodzących z TG zawartych w VLDL i ich oszczędzanie w celu wykorzystania przez pracujące mięśnie. W pracującym zaś mięśniu, aktywacja *ANGPTL4* jest regulowana przez kinazę białkową aktywowaną przez AMP (AMPK), wspomagając tym samym zużycie WKT pochodzących z VLDL, zużywane jako substrat energetyczny dla pracujących mięśni. Badania tej grupy autorów sugerują, że mięśnie pozostające w spoczynku podczas ćwiczeń oraz lokalna regulacja syntezy *ANGPTL4* przez AMPK i WKT odgrywa kluczową rolę w regulacji homeostazy gospodarki lipidowej podczas wysiłku fizycznego. Wzrost poziomu mRNA *ANGPT4* w mięśniu szkieletowym pobranym z nogi niećwiczącej był silnie skorelowany ze wzrostem stężenia *ANGPTL4* w osoczu po zakończonym wysiłku fizycznym (Catoire i wsp., 2014). Jednocześnie należy podkreślić brak dowodów na uwalnianie *ANGPTL4* z mięśni podczas i po wysiłku fizycznym u ludzi (Ingerslev i wsp., 2017). Również badania Norheim i wsp. (2014)

sugerują, że syntetyzowane w mięśniu szkieletowym ANGPTL4 ma ograniczony wpływ na stężenie tego białka w osoczu (Norheim i wsp., 2014). Ingerslev i wsp. (2017) uważają, iż podczas długotrwałego wysiłku, kiedy pracuje tylko jedna noga, ANGPTL4 jest uwalnianie z wątroby, a nie mięśni pracującej dolnej kończyny. Jednocześnie nie wykluczają udziału mięśni szkieletowych w wydzielaniu ANGPTL4 w innych okolicznościach. Być może stosunek glukagonu do insuliny może być ważnym regulatorem stężenia ANGPTL4 we krwi u ludzi. Przywołane badania sugerują także, konieczność kontroli stanu sytości w badaniach, ponieważ wykazano podobny wzrost ekspresji *ANGPTL4* rano na czczo niezależnie od wykonywanego wysiłku fizycznego, czy też jego braku (Ingerslev, 2017). Dane dotyczące syntezy ANGPTL4 w mięśniach szkieletowych podczas wysiłku fizycznego nie są jednoznaczne. Obecnie dysponujemy niewielką liczbą badań o odmiennych protokołach i doborze grup. Należy zauważyć, iż badania Norheim i wsp. (2014) oraz zespołu Catoire i wsp. (2014) nie brały pod uwagę czynnika jakim jest stan na czczo przed podjętym wysiłkiem fizycznym.

W niniejszej pracy również oceniono zależności między stężeniem ANGPTL3 i ANGPTL4 a wybranymi wskaźnikami lipidowymi takimi jak TC, LDL-C, HDL-C, TG i nie-HDL.

Stężenie lipoprotein we krwi przekłada się na ryzyko wystąpienia chorób układu sercowo-naczyniowego. Według najnowszych zaleceń Europejskiego Towarzystwa Kardiologicznego oraz Europejskiego Towarzystwa Miażdżycowego z 2016 roku stężenie TG we krwi nie powinno przekraczać 150 mg/dl. Stężenie HDL-C zaś u mężczyzn ma być wyższe niż 40 mg/dl, a LDL-C u osób z niskim lub średnim ryzykiem chorób sercowo-naczyniowych powinno być niższe niż 115 mg/dl (Catapano i wsp., 2016). Badane osoby na diecie bogatotłuszczowej miały średnio zbyt wysokie stężenie LDL-C. Z kolei mężczyźni na diecie wegańskiej charakteryzowali się niższymi stężeniami tej lipoproteiny w osoczu. Podwyższone stężenia LDL-C we krwi wpływa na wzrost ryzyka zachorowania na choroby układu sercowo-naczyniowego. Przeprowadzona przez Yokoyama i wsp. (2017) metaanaliza wykazała także, że osoby stosujące dietę wegetariańską mają niższe stężenie TC, LDL-C i HDL-C w porównaniu do osób na diecie mieszanej, z czego osoby na diecie wegańskiej charakteryzowały się najniższym stężeniem LDL-C. W wypadku stężenia TG nie zaobserwowano różnicy między badanymi grupami. Jednocześnie autorzy pracy podkreślają potrzebę dalszych badań w celu opisanie mechanizmu regulującego wpływ diety opartej na produktach roślinnych na stężenie lipidów we krwi (Yokoyama i wsp., 2017). Stężenie nie-HDL-C

jest wykorzystywane jako wskaźnik łącznej ilości lipoprotein w osoczu o charakterze aterogennym (VLDL, resztkowe VLDL, lipoproteiny o pośredniej gęstości, LDL oraz Lp(a)) i jest silnym niezależnym czynnikiem ryzyka chorób sercowo-naczyniowych. W niniejszej pracy wykazano istotnie najwyższe stężenie nie-HDL-C u osób na diecie bogatotłuszczowej i wynosiło średnio $141,5 \pm 8,0$ mg/dl w spoczynku, podczas gdy jego wartość u osób z grupy małego i umiarkowanego ryzyka powinna być <145 mg/dl (Catapano i wsp., 2016).

Niektóre badania wskazują, iż mutacje występujące u ludzi, które powodują utratę aktywności ANGPTL3 i ANGPTL4 obniżają stężenie TG we krwi, podczas gdy utrata aktywności ANGPTL8 nie daje takiego efektu (Quagliarini i wsp., 2012). Osoby posiadające wariant genetyczny determinujący niskie stężenie ANGPTL3 we krwi, mają niższe stężenie cholesterolu całkowitego, cholesterolu frakcji lipoprotein o małej gęstości, a także stężenie triglicerydów. Stąd też ANGPTL3 i ANGPTL4 wydają się być interesującym markerem w kierunku badań nad dyslipidemią (Santulli, 2014; Hooper i Burnett, 2013).

W badaniu genetycznym DiscovEHR, Dewey i wsp. (2017) wykazali, że rzadka mutacja *ANGPTL3*, powodująca utratę aktywności tego białka u ludzi, wiązała się z niższym stężeniem LDL-C, HDL-C i TG, a także mniejszym ryzykiem zachorowania na choroby układu sercowo-naczyniowego (Dewey i wsp., 2017). Również w wypadku rzadkich wariantów genetycznych inaktywujących *ANGPTL4*, odnotowano mniejsze stężenie TG i jednocześnie mniejsze ryzyko choroby wieńcowej niż u osób bez tej mutacji (Dewey i wsp., 2016). Jednakże w literaturze przedmiotu często stwierdza się brak korelacji pomiędzy poziomem ekspresji genu danego białka a stężeniem tego białka w osoczu.

Mehta i wsp. (2014) przeprowadzili, jak do tej pory, badania na najliczniejszej grupie, oceniające stężenie ANGPTL3 i ANGPTL4 w osoczu u ludzi. Uczestniczyło w nich 1770 osób w wieku 46-61 lat, zarówno kobiet, jak i mężczyzn, z których 6% stanowiły osoby rasy czarnej. Prawie połowa badanych charakteryzowała się zespołem metabolicznym, a 44% chorowało na cukrzycę typu 2. Średnie stężenie ANGPTL3 w osoczu wszystkich badanych wyniosło 236 ± 87 ng/ml, co było wartością niższą niż u badanych w niniejszej pracy zdrowych, aktywnych fizycznie mężczyzn. Mężczyźni w pracy Mehta i wsp. (2014) odznaczali się istotnie niższym średnim stężeniem niż kobiety. W wypadku stężenia ANGPTL4 nie było istotnych różnic między mężczyznami a kobietami. Wyniki powyższej pracy obrazują szeroki zakres stężeń obu białek.

Najniższe odnotowane stężenie ANGPTL3 wynosiło kilkadziesiąt ng/ml, a najwyższe ponad 600 ng/ml, w wypadku ANGPTL4 zaś odnotowano minimalne stężenie - 85 ng/ml, a maksymalne - 198 ng/ml. Wraz z wiekiem u osób z badanej grupy zaobserwowano wyższe stężenie obu białek. Wykazano także dodatnią, ale niską korelację między stężeniem ANGPTL3 a LDL-C, HDL-C i TC. Istotnej korelacji nie stwierdzono w wypadku TG i VLDL. Natomiast, w wypadku ANGPTL4 zaobserwowano ujemną i również niską korelację z LDL-C, HDL-C i TC, a dodatnią z TG i VLDL. Co ciekawe, przeprowadzono analizę mającą na celu stwierdzenie, czy zachorowanie na cukrzycę ma wpływ na związek stężenia ANGPTL4 w osoczu z profilem lipidowym. Okazało się, że w wypadku HDL-C była istotna korelacja, która nie potwierdziła się przy LDL-C i TG. Tym samym postanowiono przeprowadzić analizę warstwową, która pozwoliła na stwierdzenie, iż u osób nie chorujących na cukrzycę typu 2 nie ma istotnego związku między stężeniem ANGPTL4 a stężeniem HDL-C, LDL-C, TC i TG. Dodatkowo osoby chore mają średnio dwukrotnie wyższe stężenie ANGPTL4 niż osoby zdrowe (Mehta i wsp., 2014). Także być może niskie stężenie u wegan w niniejszej pracy odzwierciedla prozdrowotny rodzaj diety roślinnej. Autorskie badania również nie wykazały istotnych korelacji między stężeniem ANGPTL3 i ANGPTL4 a profilem lipidowym. Tylko w wypadku osób na diecie bogatotłuszczowej, w 90. minucie wysiłku zaobserwowano ujemną korelację między ANGPTL3 a HDL-C ($r = -0,69$, $p = 0,006$) oraz u osób na diecie wegańskiej między ANGPTL4 a TC również w 90. minucie wysiłku odnotowano dodatnią korelację ($r = 0,49$, $p = 0,02$).

W fińskich badaniach zaś, w których wzięła udział grupa 250 kobiet i mężczyzn w wieku 30-94 lat, potwierdzono brak lub słabe zależności między przedmiotowymi białkami a wskaźnikami lipidowymi we krwi. Do badań były włączone zarówno osoby z nadwagą, jak i z podwyższonymi wskaźnikami gospodarki węglowodanowej i lipidowej. Nie wykazano różnic między płciami w stężeniu ANGPTL3 i ANGPTL4. Średnie stężenie ANGPTL3 u mężczyzn było równe 348 ± 159 ng/ml, ANGPTL4 zaś wynosiło 21 ± 26 ng/ml. W tej populacji również zaobserwowano duże różnice międzypersoniczne w stężeniu ANGPTL4 (od 2 ng/ml do 158 ng/ml). Stężenie obu białek były dodatnio skorelowane z wiekiem. Niską dodatnią korelację między badanymi białkami a wolnymi kwasami tłuszczowymi wykazano jedynie w wypadku ANGPTL4. Również słabe korelacje zaobserwowano między ANGPTL3 a TG oraz ANGPTL3 i HDL-C i brak korelacji między ANGPTL4 a wskaźnikami lipidowymi (Robciuc i wsp., 2010).

Jeszcze wyższe stężenie ANGPTL3 u 148 zdrowych osób odnotowano w badaniach Shoji i wsp. (2009) - w przedziale od 570-875 ng/ml (mediana równa 700 ng/ml). Istotnie niższe stężenia zauważono u pacjentów dializowanych. Badacze ci włączając do analizy osoby zdrowe i z chorobami nerek, otrzymali dodatnią korelację między ANGPTL3 a HDL-C i LDL-C (Shoji i wsp., 2009). Różnice w wykazywanych zależnościach między stężeniem we krwi badanych białek a wskaźników lipidowych nie są jasne.

Podsumowując należy stwierdzić, że pomimo udowodnionego wpływu na lipazę lipoproteinową i tym samym regulację metabolizmu lipidowego, związek między stężeniem w osoczu ANGPTL3, ANGPTL4 a profilem lipidowym u ludzi jest niejednoznaczny lub słaby.

Wydaje się, iż ograniczeniem badań własnych mogła być stosunkowo mała liczebność grupy (n=62). Należy jednak podkreślić, iż niniejsze badania wyróżniają się na tle dotychczasowych prac doбором dość jednorodnej grupy pod kątem płci, wąskiego przedziału wiekowego, wytrenowania osób badanych, a także stosowania przez nich - przez dłuższy, znaczący czas - różnych rodzajów diet, takich jak dieta bogata w tłuszcze, dieta wegańska oparta tylko o produkty pochodzenia roślinnego, oraz dieta tzw. tradycyjna, mieszana, nie wykluczająca żadnych produktów spożywczych.

Obecna wiedza na temat ANGPTL3, ANGPTL4 i ANGPTL8 jest niewystarczająca w kontekście ich wpływu na metabolizm lipidowy podczas długotrwałego wysiłku fizycznego. Potrzebne są dalsze badania, aby lepiej wyjaśnić potencjalną rolę - tak stosunkowo niedawno odkrytych - ANGPTL w metabolizmie lipidów, a także wpływ sposobu żywienia na stężenie tych białek we krwi u ludzi.

6. WNIOSKI

1. Zaobserwowane niższe stężenie ANGPTL4 w osoczu osób na diecie wegańskiej, oraz wyższe stężenie u osób stosujących dietę bogatotłuszczową świadczy o wpływie stosowanej diety na stężenie powyższego białka w osoczu u młodych, aktywnych fizycznie mężczyzn;
2. Sposób żywienia, taki jak dieta wegańska, bogatotłuszczowa czy tradycyjna, mieszana nie wpływa na stężenie ANGPTL3 i ANGPTL8 w osoczu;
3. Pomimo wzrostu stężenia wolnych kwasów tłuszczowych w osoczu podczas długotrwałego wysiłku fizycznego, wykazano niewielkie zmiany stężeń ANGPTL3, ANGPTL4 i ANGPTL8, co może świadczyć o tym, iż podczas tego typu wysiłku białka te nie odgrywają istotnej roli w metabolizmie lipidów;
4. Słabe korelacje lub ich brak między stężeniem ANGPTL3 i ANGPTL4 a wskaźnikami lipidowymi, sugeruje, że związek między tymi białkami a gospodarką lipidową może być złożony i zależny od wielu czynników.

7. INNOWACYJNOŚĆ ROZPRAWY

Ustalenia rozprawy wykraczające poza aktualną wiedzę literaturową:

- Kluczowe znaczenie właściwego doboru jednorodnej grupy badawczej, z uwzględnieniem sposobu żywienia, w badaniach dotyczących białek ANGPTL3, ANGPTL4, ANGPTL8;
- Potrzeba dalszych badań dotyczących metabolizmu lipidowego z uwzględnieniem roli poszczególnych rodzajów kwasów tłuszczowych, takich jak: kwas palmitynowy, stearynowy palmitooleinowy, oleinowy oraz linolowy;
- Potrzeba uwzględnienia jednoczesnego oznaczenie we krwi u ludzi stężenia ANGPTL3, ANGPTL4, ANGPTL8 oraz LPL w badaniach dotyczących regulacji metabolizmu lipidowego.

8. STRESZCZENIE

Podstawowymi substratami energetycznymi dla pracujących mięśni są węglowodany i tłuszcze. Intensywność i czas trwania ćwiczeń fizycznych oraz sposób żywienia są jednym z najważniejszych czynników wpływających na udział poszczególnych substratów energetycznych w pokryciu zapotrzebowania na energię. Tłuszcze są głównym substratem energetycznym podczas wysiłków o niskiej i umiarkowanej intensywności ($\leq 65\%$ VO_{2max}).

Na przełomie XX i XXI wieku odkryto nową rodzinę białek podobnych do angiopoetyn – białka angiopoetynopodobne (ANGPTL). Uważa się, że białka te pełnią ważną rolę w regulacji, takich procesów jak: metabolizm węglowodanów, stany zapalne, rozwój nowotworów czy zaburzenia tempa przemiany materii. Przypuszcza się również, że pełnią kluczową rolę w metabolizmie lipidów, szczególnie ANGPTL3, ANGPTL4 i ANGPTL8 poprzez hamowanie aktywności lipazy lipoproteinowej.

Niniejsza praca miała na celu ocenę wpływu długotrwałego wysiłku fizycznego oraz różnego rodzaju diet na stężenia ANGPTL3, ANGPTL4 i ANGPTL8 w osoczu. Oceniono także zależność między stężeniem tych białek, a stężeniem wybranych wskaźników lipidowych.

Badaniom poddano 62 mężczyzn w wieku 25-35 lat. Kryteria doboru ochotników pozwoliły na włączenie do badań grupy mężczyzn jednorodnej pod względem wieku, parametrów antropometrycznych i wytrenowania fizycznego. Badanych zaklasyfikowano do jednej z trzech grupy w zależności od stosowanej przez nich diety: mieszanej, bogatotłuszczowej i wegańskiej. Badane osoby wykonywały rano na czczo 90-minutowy umiarkowany (60% VO_{2max}) wysiłek fizyczny na cykloergometrze, gdzie w spoczynku, jak i w trakcie wysiłku fizycznego (w 45. i 90. minucie), pobrano próbkę krwi. W pobranych próbkach oznaczono stężenie: ANGPTL3, ANGPTL4, ANGPTL8 i lipazy lipoproteinowej metodą immunoenzymatyczną; wolnych kwasów tłuszczowych, glicerolu i glukozy metodą kolorymetryczną; kwasu palmitynowego, stearynowego, palmitooleinowego, oleinowego oraz linolowego za pomocą spektrometru mas sprzężonego z chromatografem gazowym; cholesterolu całkowitego, lipoprotein o wysokiej gęstości i triglicerydów metodą enzymatyczno-kolorymetryczną; insuliny metodą immunoradiometryczną oraz oznaczono za pomocą hemoglobinometru

hematokryt i stężenie hemoglobiny, a także wyliczono stężenie lipoprotein o niskiej gęstości, nie-HDL oraz lipoprotein o bardzo niskiej gęstości.

Analiza wyników przeprowadzonych badań wykazała, że stężenie ANGPTL4 w osoczu u młodych, wysportowanych mężczyzn jest zależne od stosowanej przez nich diety. Weganie charakteryzowali się najniższym jego stężeniem, w porównaniu do grupy osób na diecie bogato tłuszczowej i tradycyjnej, mieszanej. Jednocześnie podczas długotrwałego wysiłku fizycznego dochodzi do nieznacznych zmian w stężeniu białek ANGPTL3, ANGPTL4 i ANGPTL8, co może świadczyć o tym, iż podczas 90-minutowego wysiłku fizycznego o umiarkowanej intensywności na cykloergometrze białka te nie odgrywają istotnej roli w metabolizmie lipidów. Dodatkowo w niniejszej pracy wykazano brak lub słabą korelację między stężeniem ANGPTL3 i ANGPTL4 a wskaźnikami lipidowymi takimi jak: cholesterol całkowity, cholesterol frakcji lipoprotein o małej gęstości, cholesterol frakcji lipoprotein o dużej gęstości, triglicerydy i nie-HDL.

9. ABSTRACT

Carbohydrates and fats are the basic energy substrates for working muscles. Exercise duration and intensity as well as nutritional habits belong to the major factors that affect the specific energy substrate participation in satisfying the energy demand. Fats are the major energy substrates during the exercise of low and moderate intensity ($\leq 65\%$ VO₂max).

At the turn of the 20th and 21st centuries, a new family of proteins similar to angiopoietins was discovered: angiopoietin-like proteins (ANGPTL). These proteins are believed to play an important role in the regulation of such processes as: carbohydrate metabolism, inflammation, cancer development or metabolic rate disorders. It is also believed that these proteins, particularly ANGPTL3, ANGPTL4 and ANGPTL8, play a key role in the metabolism of lipids by inhibiting lipoprotein lipase activity.

The aim of this study was study to assess the effect of long-term physical exercise and various diets on plasma concentrations of ANGPTL3, ANGPTL4 and ANGPTL8. The relationship between the concentration of these proteins and the concentration of selected lipid indices was also evaluated.

The study involved 62 men aged 25-35. The selection criteria allowed for the inclusion of a study group which was homogeneous in terms of age, anthropometric parameters and physical fitness. The subjects were classified according to their diet and fell into three groups: mixed, fat rich and vegan diet. In the morning the study subjects fasting performed a 90-minute moderate (60% VO₂max) physical exercise on a cycle ergometer when blood samples were taken at rest and during physical exercise (in the 45th and 90th minutes). The concentrations of ANGPTL3, ANGPTL4, ANGPTL8 and lipoprotein lipase were determined by immuno-enzymatic technique; free fatty acids, glycerol and glucose were identified by the colorimetric method; palmitic, stearic, palmitoleic, oleic and linoleic acids were determined by gas chromatography-mass spectrometry; total cholesterol, high-density lipoprotein and triglycerides were determined by enzymatic-colorimetric method; insulin level was measured by immuno-radiometric method; hematocrit and hemoglobin concentration was determined with hemoglobin meter and the concentrations of low density, non-HDL lipoproteins and very low density lipoproteins were calculated.

The analysis of the results showed that the plasma concentration of ANGPTL4 in young and fit men is dependent on their diet. Its lowest concentration was found in vegans compared to the subjects on a high-fat and traditional, mixed diet. At the same time, during prolonged physical exercise only insignificant changes in ANGPTL3, ANGPTL4 and ANGPTL8 level were identified, which may indicate that during 90-minute physical exercise of moderate intensity on the cycle ergometer, these proteins do not play a significant role in lipid metabolism. In addition, this study demonstrated poor relationship or no relationship at all between ANGPTL3 and ANGPTL4 concentrations and lipid indicators such as total cholesterol, low density lipoprotein cholesterol, high density lipoprotein cholesterol, triglycerides and non-HDL.

10.PIŚMIENICTWO

1. Abdelmagid S.A., Clarke S.E., Nielsen D.E., Badawi A., El-Sohehy A., Mutch D.M., Ma D.W. Comprehensive profiling of plasma fatty acid concentrations in young healthy Canadian adults. *PloS One*, 2015, 10(2), 1-16,
2. Abu-Farha M., Abubaker J., Tuomilehto J. ANGPTL8 (betatrophin) role in diabetes and metabolic diseases. *Diabetes Metab Res Rev*, 2017, 33(8), 1-8,
3. Abu-Farha M., Al-Khairi I., Cherian P., Chandy B., Sriraman D., Alhubail A., Al-Refaei F., AlTerki A., Abubaker J. Increased ANGPTL3, 4 and ANGPTL8/betatrophin expression levels in obesity and T2D. *Lipids Health Dis*, 2016, 15(1), 181,
4. Achten J., Jeukendrup A.E. Optimizing fat oxidation through exercise and diet. *Nutrition*, 2004, 20(7-8), 716-727,
5. Ali F.H., Ranneh Y. Angiotensin-like protein 4 and the level of free fatty acids in human blood plasma: is there a link? *Med Chem.*, 2013, 3, 276-281,
6. Bergouignan A., Latouche C., Heywood S., Grace M.S., Reddy-Luthmoodoo M., Natoli A.K., Owen N., Dunstan D.W., Kingwell B.A. Frequent interruptions of sedentary time modulates contraction- and insulin-stimulated glucose uptake pathways in muscle: Ancillary analysis from randomized clinical trials. *Sci Rep*, 2016, 6, 32044,
7. Biernat E. Międzynarodowy Kwestionariusz Aktywności Fizycznej – polska długa wersja. *Med Sport*, 2013, 1(4), 29, 1-15.
8. Bosma M. Lipid homeostasis in exercise. *Drug Discov Today*, 2014, 19(7), 1019-1023.
9. Brands M., Sauerwein H.P., Ackermans M.T., Kersten S., Serlie M.J. Omega-3 long-chain fatty acids strongly induce angiotensin-like 4 in humans. *Journal of Lipid Research*, 2013, 54, 615-621,
10. Burke L.M. Re-Examining High-Fat Diets for Sports Performance: Did We Call the 'Nail in the Coffin' Too Soon? *Sports Med*, 2015, 45(1), 33-49,
11. Burke L.M., Ross M.L., Garvican-Lewis L.A., Welvaert M., Heikura I.A., Forbes S.G., Mirtschin J.G., Cato L.E., Strobe N., Sharma A.P., Hawley J.A. Low carbohydrate, high fat diet impairs exercise economy and negates the

- performance benefit from intensified training in elite race walkers. *J Physiol*, 2017, 595(9), 2785–2807,
12. Caspersen C.J., Powell K.E., Christenson G.M. Physical activity, exercise and physical fitness: definitions and distinctions for health-related research. *Public Health Rep*, 1985, 100(2), 126-131,
 13. Catapano A.L., Graham I., De Backer G., Wiklund O., Chapman M.J., Drexel H., Hoes A.W., Jennings C.S., Landmesser U., Pedersen T.R., Reiner Ž., Riccardi G., Taskinen M.R., Tokgozoglu L., Verschuren W.M., Vlachopoulos C., Wood D.A., Zamorano J.L. Wytyczne ESC/EAS dotyczące leczenia zaburzeń lipidowych w 2016 roku. *Kardiologia Pol*, 2016, 74(11), 1234-1318,
 14. Catoire M., Alex S., Paraskevopoulos N., Mattijssen F., Evers-van Gogh I., Schaart G., Jeppesen J., Kneppers A., Mensink M., Voshol P.J., Olivecrona G., Tan N.S., Hesselink M.K., Berbée J.F., Rensen P.C., Kalkhoven E., Schrauwen P., Kersten S. Fatty acid-inducible ANGPTL4 governs lipid metabolic response to exercise. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(11), E1043-E1052,
 15. Cinkajzlová A., Mráz M., Lacinová Z., Kloučková J., Kaválková P., Kratochvílová H., Trachta P., Křížová J., Haluzíková D., Škrha J., Papežová H., Haluzík M. Angiopoietin-like protein 3 and 4 in obesity, type 2 diabetes mellitus, and malnutrition: the effect of weight reduction and realimentation. *Nutr Diabetes*, 2018, 8, 21,
 16. Close G.L., Hamilton D.L., Philp A., Burke L.M., Morton J.P. New strategies in sport nutrition to increase exercise performance. *Free Radical Biology and Medicine*, 2016, 98, 144–158,
 17. Conklin D., Gilbertson D., Taft D.W., Maurer M.F., Whitmore T.E., Smith D.L., Walker K.M., Chen L.H., Wattler S., Nehls M., Lewis K.B. Identification of a mammalian angiopoietin-related protein expressed specifically in liver. *Genomics*, 1999, 62, 477–482,
 18. Crujeiras A.B., Zulet M.A., Abete I., Amil M., Carreira M.C., Martínez J.A., Casanueva F.F. Interplay of atherogenic factors, protein intake and betatrophin levels in obese-metabolic syndrome patients treated with hypocaloric diets. *Int J Obes*, 2016, 40(3), 403-410,
 19. Crupkin M., Zambelli A. Detrimental impact of trans fats on human health: stearic acid-rich fats as possible substitutes. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 2008, 7(3), 271-279,

20. Cullberg K.B., Christiansen T., Paulsen S.K., Bruun J.M., Pedersen S.B., Richelsen B. Effect of weight loss and exercise on angiogenic factors in the circulation and in adipose tissue in obese subjects. *Obesity (Silver Spring)*, 2013, 21(3), 454-460,
21. Dewey F.E., Gusarova V., Dunbar R.L., O'Dushlaine C., Schurmann C., Gottesman O. et. all. Genetic and pharmacologic inactivation of ANGPTL3 and cardiovascular disease. *N Engl J Med*, 2017, 377(3), 211–221,
22. Dewey F.E., Gusarova V., O'Dushlaine C., Gottesman O., Trejos J., Hunt C. et all. Inactivating variants in ANGPTL4 and risk of coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2016, 374(12), 1123–1133,
23. Di Filippo M., Marcais C., Charriere S., Marmontel O., Broyer M., Delay M., Merlin M., Nollace A., Valéro R., Lagarde M., Pruneta-Deloche V., Moulin P., Sassolas A. Post-heparin LPL activity measurement using VLDL as a substrate: a new robust method for routine assessment of plasma triglyceride lipolysis defects. *PLoS One*, 2014, 9(6), e99721,
24. Dijk W., Kersten S. Regulation of lipid metabolism by angiopoietinlike proteins. *Curr Opin Lipidol*, 2016, 27, 249–256 ,
25. Dijk W., Kersten S. Regulation of lipoprotein lipase by Angptl4. *Trends Endocrinol Metab*, 2014, 25(3), 146-155,
26. Dijk W., Schutte S., Aarts E.O., Janssen I.M., Afman L., Kersten S. Regulation of angiopoietin-like 4 and lipoprotein lipase in human adipose tissue. *J Clin Lipidol*, 2018, doi: 10.1016/j.jacl.2018.02.006,
27. Dill D.B, Costill D.L. Calculation of percentage changes in volumes of blood, plasma, and red cells in dehydration. *J Appl Physiol*, 1974, 37(2), 247-248,
28. Dinu M., Abbate R., Gensini G.F., Casini A., Sofi F. Vegetarian, vegan diets and multiple health outcomes: A systematic review with meta-analysis of observational studies. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2017, 57(17), 3640-3649,
29. Górski J. (red). *Fizjologia wysiłku i treningu fizycznego*. Wyd. PZWL, Warszawa, 2012,
30. Hargreaves M. Exercise, muscle, and CHO metabolism. *Scand J Med Sci Sports*, 2015, 25 (Suppl. 4), 29–33,
31. Hato T., Tabata M., Oike Y. The role of angiopoietin-like proteins in angiogenesis and metabolism. *Trends Cardiovasc Med*, 2008, 18, 6-14,

32. Hearnis M.A., Hammond K.M., Fell J.M., Morton J.P. Regulation of muscle glycogen metabolism during exercise: implications for endurance performance and training adaptations. *Nutrients*, 2018, 10, 298-318,
33. Helge J.W., Watt P.W., Richter E.A., Rennie M.J., Kiens B. Fat utilization during exercise: adaptation to a fat-rich diet increases utilization of plasma fatty acids and very low density lipoprotein-triacylglycerol in humans. *J Physiol*, 2001, 537(3), 1009-1020,
34. Hooper A.J., Burnett J.R. Recent developments in the genetics of LDL deficiency. *Curr Opin Lipidol*, 2013, 24, 111–115,
35. Horowitz J.F., Mora-Rodriguez R., Byerley L.O., Coyle E.F. Lipolytic suppression following carbohydrate ingestion limits fat oxidation during exercise. *Am J Physiol*, 1997, 273, 768–775,
36. Ingerslev B., Hansen J.S., Hoffmann C., Clemmesen J.O., Secher N.H., Scheler M., Angelis M.H., Häring H.U., Pedersen B.K, Weigert C., Plomgaard P. Angiopoietin-like protein 4 is an exercise-induced hepatokine in humans, regulated by glucagon and cAMP. *Mol Metab*, 2017, 6(10), 1286–1295,
37. Jarosz M. (red.). Normy żywienia dla populacji Polski (on-line). Instytut Żywności i Żywienia, Warszawa, 2017, Internet 9.04.2018, <https://ncez.pl/abc-zywienia/zasady-zdrowego-zywienia/normy-zywienia-2017>,
38. Jeukendrup A.E. Modulation of carbohydrate and fat utilization by diet, exercise and environment. *Biochem Soc Trans*, 2003, 31(6), 1270-1273,
39. Jonker J.T., Smit J.W.A., Hammer S, Snel M., van der Meer R.W., Lamb H.J., Mattijssen F., Mudde K., Jazet I.M., Dekkers O.M., de Roos A., Romijn J.A., Kersten S., Rensen P.C.N. Dietary modulation of plasma angiopoietin-like protein 4 concentrations in healthy volunteers and in patients with type 2 diabetes. *Am J Clin Nutr*, 2013, 97(2), 255-260,
40. Julve J., Martín-Campos J.M., Escolà-Gil J.C., Blanco-Vaca F. Chylomicrons: Advances in biology, pathology, laboratory testing, and therapeutics. *Clin Chim Acta*, 2016, 455, 134-148,
41. Kersten S. Angiopoietin-like 3 in lipoprotein metabolism. *Nat Rev Endocrinol*, 2017, 13(12), 731-739,
42. Kersten S. Physiological regulation of lipoprotein lipase. *Biochim Biophys Acta*. 2014, 1841(7), 919–933,

43. Kersten S. Regulation of lipid metabolism via angiotensin – like proteins. *Biochem Soc Trans*, 2005, 33, 1059-1062,
44. Kersten S., Lichtenstein L., Steenbergen E., Mudde K., Hendriks H.F.J., Hesselink M.K., Schrauwen P., Müller M. Caloric restriction and exercise increase plasma ANGPTL4 levels in humans via elevated free fatty acids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, 29, 969-974,
45. Kersten S., Mandard S., Tan N.S., Escher P., Metzger D., Chambon P. Characterization of the fasting-induced adipose factor FIAF, a novel peroxisome proliferator-activated receptor target gene. *J Biol Chem*, 2000, 275(37), 28488–28493,
46. Kim I., Kim H.G., Kim H., Kim H.H., Park S.K., Uhm C.S., Lee Z.H., Koh G.Y. Hepatic expression, synthesis and secretion of a novel fibrinogen/angiotensin-related protein that prevents endothelial-cell apoptosis. *Biochem. J*, 2000, 346, 603-610,
47. Krogh A., Lindhard J. The relative value of fat and carbohydrate as source of muscular energy. *Biochem. J*, 1920, 14, 290–363,
48. Kuo T.C., Tan C.T., Chang Y.W., Hong C.C., Lee W.J., Chen M.W., Jeng Y.M., Chiou J., Yu P., Chen P.S., Wang M.Y., Hsiao M., Su J.L., Kuo M.L. Angiotensin-like protein 1 suppresses SLUG to inhibit cancer cell motility. *J Clin Invest*, 2013, 123(3), 1082-1095,
49. Li Y., He P.P., Zhang D.W., Zheng X.L., Cayabyab F.S., Yin W.D, Tang C.K. Lipoprotein lipase: from gene to atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 2014, 237(2), 597-608,
50. Liebman M. When and why carbohydrate restriction can be a viable option. *Nutrition*, 2014, 30(7), 748-754,
51. Lu B., Moser A., Shigenaga J.K., Grunfeld C., Feingold K.R. The acute phase response stimulates the expression of angiotensin like protein 4. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 391, 1737-1741,
52. Mandard S., Zandbergen F., Nguan Soon Tan, Escher P., Patsouris D., Koenig W., Kleemann R., Bakker A., Veenman F., Wahli W., Muller M., Kersten S. The direct peroxisome proliferator-activated receptor target fasting-induced adipose factor (FIAF/PGAR/ANGPTL4) is present in blood plasma as a truncated protein that is increased by fenofibrate treatment. *J Biol Chem*, 2004, 279(33), 34411–34420,

53. Maser R.E., Lenhard M.J., Pohlig R.T., Balagopal P.B. Pre-heparin lipoprotein lipase mass as a potential mediator in the association between adiponectin and HDL-cholesterol in type 2 diabetes. *J Clin Transl Endocrinol*, 2016, 7, 7-11,
54. Mattijssen F., Kersten S. Regulation of triglyceride metabolism by Angiopoietin-like proteins. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1821, 782-789,
55. Matulewicz N., Karczewska-Kupczewska M. Insulinooporność a przewlekła reakcja zapalna. *Postepy Hig Med Dosw*, 2016, 70, 1245-1257,
56. Maughan R., Gleeson M. The biochemical basis of sport performance. Wyd. Oxford Univeristy Press, New York, 2004,
57. Mehta N., Qamar A., Qu L., Qasim A.N., Mehta N.N., Reilly M.P., Rader D.J. Differential association of plasma angiopoietin-like proteins 3 and 4 with lipid and metabolic traits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014, 34(5), 1057-1063,
58. Mędraś M. (red). Endokrynologia wysiłku fizycznego sportowców. Wyd. MedPharm Polska, Wrocław, 2010,
59. Miyashita M., Eto M., Sasai H., Tsujimoto T., So R., Nomata Y., Tanaka K. Pre-heparin serum lipoprotein lipase concentrations in obese men of contrasting physical activity status: a preliminary study. *J Atheroscler Thromb*, 2010, 17(10), 1110-1120,
60. Musunuru K., Pirruccello J.P., Do R., Peloso G.M., Guiducci C., Sougnez C., Garimella K.V., Fisher S., Abreu J., Barry A.J., Fennell T., Banks E., Ambrogio L., Cibulskis K., Kernytsky A., Gonzalez E., Rudzicz N., Engert J.C., DePristo M.A., Daly M.J., Cohen J.C., Hobbs H.H., Altshuler D., Schonfeld G., Gabriel S.B., Yue P., Kathiresan S. Exome sequencing, ANGPTL3 mutations, and familial combined hypolipidemia. *N Engl J Med*, 2010, 363(23), 2220-2227,
61. Nazar K., Zależność między wielkością zasobów węglowodanowych organizmu a reakcją neurohormonalną na wysiłek fizyczny u człowieka. Praca habilitacyjna, 1980,
62. Noakes T.D., St Clair Gibson A., Lambert E.V. From catastrophe to complexity: a novel model of integrative central neural regulation of effort and fatigue during exercise in humans. *Br J Sports Med.*, 2004, 38(4), 511-514,
63. Norheim F., Hjorth M., Langlete T.M., Lee S., Holen T., Bindesbøl C., Stadheim H.K., Gulseth H.L., Birkeland K.I., Kielland A., Jensen J., Dalen K.T., Drevon C.A. Regulation of angiopoietin-like protein 4 production during and after exercise. *Physiol Rep*, 2014, 2(8), 1-12,

64. Pilis W., Stec K., Zych M., Pilis A. Health benefits and risk associated with adopting a vegetarian diet. *Rocz Panstw Zakl Hig*, 2014, 65(1), 9-14,
65. Quagliarini F., Wang Y., Kozlitina J., Grishin N.V., Hyde R., Boerwinkle E., Valenzuela D.M., Murphy A.J., Cohen J.C., Hobbs H.H.. Atypical angiopoietin-like protein that regulates ANGPTL3. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(48), 19751–19756.
66. Ramasamy I. Recent advances in physiological lipoprotein metabolism. *Clin Chem Lab Med*, 2014, 52(12), 1695-1727,
67. Ren G., Kim J.Y., Smas C.M. Identification of RIFL, a novel adipocyte-enriched insulin target gene with a role in lipid metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2012, 303(3), 334-351,
68. Rivellese A.A., Giacco R., Annuzzi G., De Natale C., Patti L., Di Marino L., Minerva V., Costabile G., Santangelo C., Masella R., Riccardi G. Effects of monounsaturated vs. saturated fat on postprandial lipemia and adipose tissue lipases in type 2 diabetes. *Clin Nutr*, 2008, 27(1), 133-141,
69. Robciuc M.R., Naukkarinen J., Ortega-Alonso A., Tyynismaa H., Raivio T., Rissanen A., Jaakko Kaprio, Ehnholm C., Jauhiainen M., Pietiläinen K.H. Serum angiopoietin-like 4 protein levels and expression in adipose tissue are inversely correlated with obesity in monozygotic twins. *J Lipid Res*, 2011, 52(8), 1575-1582,
70. Robciuc M.R., Skrobuk P., Anisimov A., Olkkonen V.M., Alitalo K., Eckel R.H., Koistinen H.A., Jauhiainen M., Ehnholm C. Angiopoietin-like 4 mediates PPAR delta effect on lipoprotein lipase-dependent fatty acid uptake but not on beta-oxidation in myotubes. *PLoS One*, 2012, 7(10), 1-13,
71. Robciuc M.R., Tahvanainen E., Jauhiainen M., Ehnholm C. Quantitation of serum angiopoietin-like proteins 3 and 4 in a Finnish population sample. *J Lipid Res*, 2010, 51(4), 824-831,
72. Robinson S.L., Hattersley J., Frost G.S., Chambers E.S., Wallis G.A. Maximal fat oxidation during exercise is positively associated with 24-hour fat oxidation and insulin sensitivity in young, healthy men. *J Appl Physiol*, 2015, 118, 1415–1422,
73. Romeo S., Yin W., Kozlitina J., Pennacchio L.A., Boerwinkle E., Hobbs H.H., Cohen J.C. Rare loss-of-function mutations in ANGPTL family members

- contribute to plasma triglyceride levels in humans. *J Clin Invest*, 2009, 119(1), 70-79,
74. Santulli G. Angiopoietin-like proteins: a comprehensive look. *Front Endocrinol*, 2014, 5(4), 1-6,
 75. Shimamura M. Angiopoietin-Like Protein3 Regulates Plasma HDL Cholesterol Through Suppression of Endothelial Lipase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, 27, 366-372,
 76. Shimamura M., Matsuda M., Kobayashi S., Ando Y., Ono M., Koishi R., Furukawa H., Makishima M., Shimomura I. Angiopoietin-like protein 3, a hepatic secretory factor, activates lipolysis in adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 301(2), 604-609,
 77. Shirakawa T., Nakajima K., Shimomura Y., Kobayashi J., Stanhope K., Havel P., Machida T., Sumino H., Murakami M. Comparison of the effect of post-heparin and pre-heparin lipoprotein lipase and hepatic triglyceride lipase on remnant lipoprotein metabolism. *Clin Chim Acta*, 2015, 440, 193-200,
 78. Shoji T., Hatsuda S., Tsuchikura S., Kimoto E., Kakiya R., Tahara H., Koyama H., Emoto M., Tabata T., Nishizawa Y. Plasma angiopoietin-like protein 3 (ANGPTL3) concentration is associated with uremic dyslipidemia. *Atherosclerosis*, 2009, 207, 579–584,
 79. Soria M., Anson M., Escanero J.F. Correlation analysis of exercise-induced changes in plasma trace element and hormone levels during incremental exercise in well-trained athletes. *Biol Trace Elem Res*, 2016, 170(1), 55-64,
 80. Staiger H., Haas C., Machann J., Werner R., Weisser M., Schick F., Machicao F., Stefan N., Fritsche A., Häring H.U. Muscle-derived angiopoietin-like protein 4 is induced by fatty acids via peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- δ and is of metabolic relevance in humans. *Diabetes*, 2009, 58, 579-589,
 81. Sukonina V., Lookene A., Olivecrona T., Olivecrona G. Angiopoietin-like protein 4 converts lipoprotein lipase to inactive monomers and modulates lipase activity in adipose tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103, 17450-17455,
 82. Tabata M., Kadomatsu T., Fukuhara S., Miyata K., Ito Y., Endo M., Urano T., Zhu H.J., Tsukano H., Tazume H., Kaikita K., Miyashita K., Iwawaki T., Shimabukuro M., Sakaguchi K., Ito T., Nakagata N., Yamada T., Katagiri H., Kasuga M., Ando Y., Ogawa H., Mochizuki N., Itoh H., Suda T., Oike Y.

- Angiopietin-like protein 2 promotes chronic adipose tissue inflammation and obesity-related systemic insulin resistance. *Cell Metab*, 2009, 10(3), 178-188,
83. Thomas D.T., Erdman K.A., Burke L.M. Nutrition and athletic Performance. American College of Sports Medicine Joint position Statement. *Med Sci Sports Exerc*, 2016, 48(3), 543-568,
 84. Tuominen J.A., Ebeling P., Koivisto V.A. Exercise increase insulin clearance in healthy man and insulin-dependent diabetes mellitus patients. *Clinical Physiology*, 1997, 17, 19-30,
 85. Uber A., Grossestreuer A.V., Ross C.E., Patel P.V., Trehan A., Donnino M.W., Berg K.M. Preliminary observations in systemic oxygen consumption during targeted temperature management after cardiac arrest. *Resuscitation*, 2018, 127, 89-94,
 86. Van Hall G. The physiological regulation of skeletal muscle fatty acid supply and oxidation during moderate-intensity exercise. *Sports Med*, 2015, 45(1), S23-S32,
 87. Xin X., Rodrigues M., Umapathi M., Kashiwabuchi F., Ma T., Babapoor-Farrokhran S. Hypoxic retinal Muller cells promote vascular permeability by HIF-1-dependent up-regulation of angiopietin-like 4. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(36), 3425-3434,
 88. Yokoyama Y., Levin S.M., Barnard N.D. Association between plant-based diets and plasma lipids: a systematic review and meta-analysis. *Nutr Rev*, 2017, 75(9), 683-698,
 89. Zhang R. Lipasin, a novel nutritionally-regulated liver-enriched factor that regulates serum triglyceride levels. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 424(4), 786-792,
 90. Zhang R. The ANGPTL3-4-8 model, a molecular mechanism for triglyceride trafficking. *Open Biol*, 2016, 6, 150272.

11. WYKAZ RYCIN

Rycina 1. Schemat badania właściwego polegającego na wykonaniu 90-minutowego wysiłku fizycznego na cykloergometrze z intensywnością 60% VO ₂ max, podczas którego 3-krotnie pobrano próbki krwi w celu oznaczenia wybranych wskaźników.....	25
Rycina 2. Zawartość białka, tłuszczu, węglowodanów i błonnika w diecie.....	32
Rycina 3. Zawartość kwasów tłuszczowych nasyconych (NKT), jednonienasyconych (JNKT) i wielonienasyconych (WNKT) w diecie.	33
Rycina 4. Wartość współczynnika oddechowego w spoczynku, między 20-25., 40-45., 60-65. i 85-90. minutą wysiłku.	34
Rycina 5. Stężenie kwasu palmitynowego (16:0) w osoczu podczas spoczynku i w 45. minucie wysiłku fizycznego.	35
Rycina 6. Stężenie kwasu stearynowego (18:0) w osoczu podczas spoczynku i w 45. minucie wysiłku fizycznego..	36
Rycina 7. Stężenie kwasu palmitoleinowego (16:1, n-7) osoczu podczas spoczynku i w 45. minucie wysiłku fizycznego..	37
Rycina 8. Stężenie kwasu oleinowego (18:1, n-9) w osoczu podczas spoczynku i w 45. minucie wysiłku fizycznego.	38
Rycina 9. Stężenie kwasu linolowego (18:2, n-6) w osoczu podczas spoczynku i w 45. i minucie wysiłku fizycznego.	39
Rycina 10. Stężenie wolnych kwasów tłuszczowych w osoczu podczas spoczynku, w 45. i 90. minucie wysiłku fizycznego.	40
Rycina 11. Stężenie glicerolu w osoczu podczas spoczynku, w 45. i 90. minucie wysiłku fizycznego.	41
Rycina 12. Stężenie glukozy w osoczu podczas spoczynku, w 45. i 90. minucie wysiłku fizycznego.	42
Rycina 13. Stężenie insuliny w osoczu podczas spoczynku, w 45. i 90. minucie wysiłku fizycznego..	43
Rycina 14. Stężenie białka ANGPTL3 w osoczu podczas spoczynku, w 45. i 90. minucie wysiłku fizycznego..	44
Rycina 15. Stężenie białka ANGPTL4 w osoczu podczas spoczynku, w 45. i 90. minucie wysiłku fizycznego.	45

Rycina 16. Stężenie białka ANGPTL8 w osoczu podczas spoczynku, w 45. i 90. minucie wysiłku fizycznego.....	46
Rycina 17. Stężenie lipazy lipoproteinowej w osoczu podczas spoczynku, w 45. i 90. minucie wysiłku fizycznego.	47
Rycina 18. Stężenie cholesterolu całkowitego w osoczu podczas spoczynku, w 45. i 90. minucie wysiłku fizycznego.	48
Rycina 19. Stężenie cholesterolu frakcji lipoprotein o małej gęstości w osoczu podczas spoczynku, w 45. i 90. minucie wysiłku fizycznego.....	49
Rycina 20. Stężenie cholesterolu frakcji lipoprotein o dużej gęstości w osoczu podczas spoczynku, w 45. i 90. minucie wysiłku fizycznego.....	50
Rycina 21. Stężenie triglicerydów w osoczu podczas spoczynku, w 45. i 90. minucie wysiłku fizycznego.....	51
Rycina 22. Stężenie lipoprotein o bardzo małej gęstości w osoczu podczas spoczynku, w 45. i 90. minucie wysiłku fizycznego.....	52
Rycina 23. Stężenie nie-HDL-C w osoczu podczas spoczynku, w 45. i 90. minucie wysiłku fizycznego.	53

12. WYKAZ TABEL

Tabela I. Charakterystyka badanej grupy.....	30
Tabela II. Poziom aktywności fizycznej badanych osób na podstawie długiej wersji Międzynarodowego Kwestionariusza Aktywności Fizycznej (IPAQ)	31
Tabela III. Kaloryczność diety badanych osób.....	31
Tabela IV. Zależności między stężeniem ANGPTL3 a stężeniem WKT w osoczu podczas spoczynku, w 45. i 90. minucie wysiłku fizycznego	54
Tabela V. Zależności między stężeniem ANGPTL4 a stężeniem WKT w osoczu podczas spoczynku, w 45. i 90. minucie wysiłku fizycznego	54
Tabela VI. Zależności między stężeniem ANGPTL3 a stężeniem kwasu palmitynowego, stearynowego, palmitooleinowego, oleinowego oraz linolowego w osoczu w spoczynku i 45. minucie wysiłku fizycznego	55
Tabela VII. Zależności między stężeniem ANGPTL4 a stężeniem kwasu palmitynowego, stearynowego, palmitooleinowego, oleinowego oraz linolowego w osoczu w spoczynku i 45. minucie wysiłku	56
Tabela VIII. Zależności między stężeniem ANGPTL3 a stężeniem cholesterolu całkowitego, cholesterolu frakcji lipoprotein o małej gęstości, cholesterolu frakcji lipoprotein o dużej gęstości oraz triglicerydów w osoczu podczas spoczynku, w 45. i 90. minucie wysiłku fizycznego	57
Tabela IX. Zależności między stężeniem ANGPTL4 a stężeniem cholesterolu całkowitego, cholesterolu frakcji lipoprotein o małej gęstości, cholesterolu frakcji lipoprotein o dużej gęstości oraz triglicerydów w osoczu podczas spoczynku, w 45. i 90. minucie wysiłku fizycznego	58

13.ANEKS nr 1

WYWIAD LEKARSKI

Imię i nazwisko:

Wywiad zdrowotny

1) choroby przebyte, pobyty w szpitalu, zabiegi, operacje (data, rodzaj zabiegu):

--

2) choroby krwi (skazy krwiotoczne) NIE TAK (jakie?)

3) choroby przewlekłe:

• układ krążenia:

○ choroby serca NIE TAK (jakie?)

○ nadciśnienie tętnicze NIE TAK

○ inne (jakie?)

• układ oddechowy NIE TAK (jakie?)

• układ wydzielniczy:

○ cukrzyca NIE TAK (jaka?)

○ ch. tarczycy NIE TAK (jakie?)

○ inne NIE TAK (jakie?)

• układ nerwowy NIE TAK (jakie?)

• choroby psychiczne NIE TAK (jakie?)

• układ ruchu NIE TAK (jakie?)

• układ pokarmowy NIE TAK (jakie?)

○ choroba wrzodowa NIE TAK (jakie?)

• układ moczowy NIE TAK (jakie?)

• alergie, nietolerancje NIE TAK (na co?)

• utrata przytomności NIE TAK (kiedy?)

4) leki przyjmowane przewlekłe:

5) pobyty w szpitalu (data i powód):

data, podpis:

14.ANEKS nr 2

MIĘDZYNARODOWY KWESTIONARIUSZ AKTYWNOŚCI FIZYCZNEJ

DO WYPEŁNIANIA WE WŁASNYM ZAKRESIE WERSJA OBSZERNA, DOTYCZY OSTATNIEGO TYGODNIA (7 DNI)

PRZEZNACZONY DLA OSÓB MŁODYCH I DOROSŁYCH W WIEKU 18 - 69 LAT

UWAGA: PRZYKŁADY WYSIŁKU FIZYCZNEGO (AKTYWNOŚCI FIZYCZNEJ) MOGĄ BYĆ ZASTĄPIONE INNYMI, DOSTOSOWANYMI DO MIEJSCOWYCH WARUNKÓW, O TAKIM SAMYM POZIOMIE INTENSYWNOŚCI WYSIŁKU (W JEDNOSTKACH MET; POR. AINSWORTH et al., 2000).

MIĘDZYNARODOWY KWESTIONARIUSZ AKTYWNOŚCI FIZYCZNEJ

Interesują nas informacje o rodzajach ludzkiej aktywności fizycznej, będącej składnikiem codziennego życia. Stanowi to fragment badań prowadzonych jest w wielu krajach na całym świecie. Państwa odpowiedzi pomogą nam zdać sobie sprawę z poziomu naszej aktywności w porównywaniu z mieszkańcami innych krajów.

Kwestionariusze dotyczą czasu poświęconego na wysiłek fizyczny (aktywność fizyczną) w ciągu ostatniego tygodnia (7 dni). Zawierają one pytania o Państwa wysiłek fizyczny (aktywność) w ramach czynności wykonywanych w pracy zawodowej, w domu i w jego otoczeniu, w przemieszczaniu się z miejsca na miejsce oraz w czasie wolnym poświęconym rekreacji, ćwiczeniom lub sportowi.

Państwa odpowiedzi są bardzo cenne.

Proszę odpowiadać na każde pytanie nawet, jeśli nie uważa się Pan/Pani za osobę aktywną fizycznie.

DZIĘKUJEMY ZA UCZESTNICTWO W BADANIACH.

W pytaniach użyto niżej wymienionych określeń:

- **Intensywna** aktywność fizyczna oznacza ciężki wysiłek, zmuszający do silnie wzmożonego oddychania (i przyspieszonej akcji serca);
- **Umiarkowana** aktywność fizyczna oznacza wysiłek przeciętny z nieco wzmożonym oddychaniem (i nieco przyspieszoną akcją serca).

Część 1: WYSIŁEK FIZYCZNY (AKTYWNOŚĆ FIZYCZNA) ZWIĄZANY Z PRACĄ ZAWODOWĄ

Pierwsza część pytań dotyczy Państwa pracy zawodowej. Zawarte tu są pytania z zakresu wysiłku fizycznego (aktywności fizycznej) w Państwa pracy zawodowej, w rolnictwie, nauce, pracy społecznej i każdej innej niepłatnej pracy, którą wykonują Państwo poza domem. Proszę **nie brać** pod uwagę czynności, które wykonują Państwo wokół domu, np. prac domowych, pracy w ogródku, ogólnych prac porządkowych oraz opieki nad rodziną. Tematykę tę obejmuje część 3. Proszę wziąć pod uwagę **tylko** taki wysiłek, który jednorazowo trwał co najmniej 10 minut.

1a. Proszę podać czy aktualnie pracuje Pan/Pani zawodowo, uczy się lub wykonuje pracę bez wynagrodzenia poza domem?

Tak

Nie → **proszę przejść do części 2: WYSIŁEK FIZYCZNY (AKTYWNOŚĆ FIZYCZNA) ZWIĄZANY Z PRZEMIESZCZANIEM SIĘ**

Następne pytania dotyczą wszelkiego wysiłku fizycznego wykonywanego w ciągu **ostatniego tygodnia** (7 dni) w ramach pracy bez wynagrodzenia lub zawodowej. Tematyka tych zagadnień nie dotyczy chodzenia do pracy i z powrotem.

1b. Proszę podać liczbę dni w ciągu **ostatniego tygodnia** (7 dni), w których wykonywał Pan/Pani **intensywny** wysiłek fizyczny, taki jak podnoszenie ciężkich rzeczy, kopanie, prace budowlane, chodzenie po schodach – w ramach pracy zawodowej?

_____ dni w tygodniu;

Nie wykonywałam/em takiej czynności → **proszę przejść do pytania 1d**

1c. Proszę podać ile czasu łącznie w jednym z tych dni poświęca Pan/Pani zwykle, na **intensywny** wysiłek fizyczny w ramach pracy?

_____ godzin _____ minut

1d. Proszę podać liczbę dni w ciągu **ostatniego tygodnia** (7 dni), w których wykonywał Pan/Pani **umiarkowany** wysiłek fizyczny, np. przenoszenie lekkich rzeczy, jazda na rowerze w normalnym tempie, w ramach pracy zawodowej? Proszę **nie brać** pod uwagę chodzenia.

_____ dni w tygodniu;

Nie wykonywałam/em takiej czynności. → **proszę przejść do pytania 1f**

1e. Proszę podać ile czasu łącznie w jednym z takich dni poświęca Pan/Pani zwykle na **umiarkowany** wysiłek fizyczny wykonywany w ramach pracy zawodowej?

_____ godzin _____ minut

1f. Proszę podać liczbę dni w ciągu **ostatniego tygodnia** (7 dni), w których chodził Pan/Pani co najmniej 10 minut w czasie pracy zawodowej? Proszę nie wliczać do tego czasu dojścia do pracy i z powrotem.

_____ dni w tygodniu;

Nie wykonywałam/em takiej czynności → **proszę przejść do części 2: WYSIŁEK FIZYCZNY (AKTYWNOŚĆ) ZWIĄZANY Z PRZEMIESZCZANIEM SIĘ**

1g. Proszę podać ile czasu łącznie poświęca Pan/Pani na chodzenie w jednym z tych dni w ramach pracy zawodowej?

_____ godzin _____ minut

CZĘŚĆ 2: WYSIŁEK FIZYCZNY (AKTYWNOŚĆ FIZYCZNA) ZWIĄZANY Z PRZEMIESZCZANIEM SIĘ

Pytania te dotyczą sposobu przemieszczania się z miejsca na miejsce, włączając w to pracę, zakupy, rozrywki itp.

Proszę wziąć pod uwagę **tylko** taki wysiłek, który jednorazowo trwał co najmniej 10 minut.

2a. Proszę podać liczbę dni w ciągu **ostatniego tygodnia** (7 dni), w których jeździł Pan/Pani pojazdem takim jak samochód, autobus, pociąg, tramwaj lub inny pojazd?

_____ dni w tygodniu;

Nie wykonywałam/em takiej czynności. → **proszę przejść do pytania 2c**

2b. Proszę podać ile czasu łącznie spędza Pan/Pani podczas jednego z tych dni, jeżdżąc samochodem, autobusem, pociągiem, tramwajem lub innym pojazdem?

_____ godzin _____ minut

Teraz proszę wziąć pod uwagę **jedynie** jazdę na rowerze i chodzenie: do pracy i z powrotem, lub w innych celach.

2c. Proszę podać liczbę dni w ciągu **ostatniego tygodnia** (7 dni), w których jechał Pan/Pani rowerem przez co najmniej 10 minut?

_____ dni w tygodniu;

Nie wykonywałam/em takiej czynności. → **proszę przejść do pytania 2e**

2d. Proszę podać ile czasu łącznie jeździ Pan/Pani rowerem podczas jednego z tych dni?

_____ godzin _____ minut

2e. Proszę podać liczbę dni w ciągu **ostatniego tygodnia** (7 dni), w których chodził Pan/Pani co najmniej 10 minut jednorazowo?

_____ dni w tygodniu;

Nie wykonywałam/em takiej czynności. → **proszę przejść do części 3: PRACE DOMOWE, OGÓLNE PRACE PORZĄDKOWE I OPIEKA NAD RODZINĄ**

2f. Proszę podać ile czasu łącznie chodzi Pan/Pani w jednym z tych dni?

_____ godzin _____ minut

CZĘŚĆ 3: PRACE DOMOWE, OGÓLNE PRACE PORZĄDKOWE I OPIEKA NAD RODZINĄ

Ta część kwestionariusza dotyczy niektórych rodzajów wysiłku fizycznego (aktywności) w ciągu **ostatniego tygodnia** (7 dni), które wykonywał Pan/Pani w domu i wokół domu, np.: prace domowe, uprawa ogródka, ogólne prace porządkowe oraz opieka nad rodziną. Proszę wziąć pod uwagę **tylko** taki wysiłek fizycznej, który zajmuje jednorazowo co najmniej 10 minut.

3a. Proszę podać liczbę dni w ciągu **ostatniego tygodnia** (7 dni), w których wykonywał Pan/Pani **intensywny** wysiłek fizyczny, np. przenoszenie ciężkich rzeczy, rąbanie drzewa, odśnieżanie lub kopanie w ogródku?

_____ dni w tygodniu;

Nie wykonywałam/em takiej czynności. → **proszę przejść do pytania 3c**

3b. Proszę podać ile czasu łącznie poświęca Pan/Pani zwykle w jednym z tych dni na **intensywny** wysiłek fizyczny w ogródku lub wokół domu?

_____ godzin _____ minut

3c. Proszę podać liczbę dni, w ciągu **ostatniego tygodnia** (7 dni), w których wykonywał Pan/Pani **umiarkowany** wysiłek fizyczny, np. przenoszenie lekkich rzeczy, zamiatanie, mycie okien, lub grabienie ogródka i sprzątanie wokół domu?

_____ dni w tygodniu;

Nie wykonywałam/em takiej czynności. → **proszę przejść do pytania 3e**

3d. Proszę podać ile czasu łącznie poświęca Pan/Pani zwykle w jednym z tych dni na **umiarkowany** wysiłek fizyczny w przydomowym ogródku lub wokół domu?

_____ godzin _____ minut

3e. Proszę podać liczbę dni w ciągu **ostatniego tygodnia** (7 dni), w których wykonywał Pan/Pani **umiarkowany** wysiłek fizyczny np. przenoszenie lekkich rzeczy, mycie okien, mycie podłóg, oraz sprzątanie **w domu?**

_____ dni w tygodniu;

Nie wykonywałam/em takiej czynności. → **proszę przejść do części 4: REKREACJA, SPORTOWA I WYPOCZYNKOWA AKTYWNOŚĆ FIZYCZNA**

3f. Proszę podać ile czasu łącznie poświęca Pan/Pani w jednym z tych dni na **umiarkowany** wysiłek fizyczny **w domu?**

_____ godzin _____ minut

CZĘŚĆ 4: REKREACJA, SPORT I AKTYWNOŚĆ FIZYCZNA W CZASIE WOLNYM

Część ta jest poświęcona aktywności fizycznej w ciągu **ostatniego tygodnia** (7 dni) poświęconej wyłącznie na rekreację, sport, ćwiczenia lub rozrywkę i wypoczynek. Odpowiadając na pytania, proszę NIE BRAĆ pod uwagę, tych rodzajów aktywności fizycznej, o której Państwo już wspomnieli (wysiłku fizycznego w Państwa pracy zawodowej, związanego z przemieszczaniem się z miejsca na miejsce, z pracami domowymi, ogólnymi pracami porządkowymi i opieką nad rodziną). Tematykę tę obejmuje część 1,2 i 3.

Proszę wziąć pod uwagę **tylko** aktywność fizyczną, która trwała jednorazowo co najmniej 10 minut.

4a. Proszę podać liczbę dni w ciągu **ostatniego tygodnia** (7 dni), w których chodził Pan/Pani jednorazowo co najmniej 10 minut w czasie wolnym?

Nie należy brać pod uwagę żadnego chodzenia, o którym była mowa dotychczas.

_____ dni w tygodniu;

Nie wykonywałam/em takiej czynności. → **proszę przejść do pytania 4c**

4b. Proszę podać ile czasu łącznie przeznaczył Pan/Pani w jednym tym dniu na chodzenie w czasie wolnym?

_____ godzin _____ minut

4c. Proszę podać liczbę dni w ciągu **ostatniego tygodnia** (7 dni), w których uprawiał Pan/Pani **intensywną** aktywność fizyczną np. aerobik, biegi, szybka jazda rowerem, szybkie pływanie w czasie wolnym?

_____ dni w tygodniu;

Nie wykonywałam/em takiej czynności. → **proszę przejść do pytania 4e**

4d. Proszę podać ile czasu łącznie zwykle poświęca Pan/Pani w jednym z tych dni na **intensywną** aktywność fizyczną w czasie wolnym?

_____ godzin _____ minut

4e. Proszę podać liczbę dni w ciągu **ostatniego tygodnia** (7 dni), w których wykonywał Pan/Pani **umiarkowaną** aktywność fizyczną w czasie wolnym? (np. jazda rowerem w regularnym tempie, pływanie w regularnym tempie, gra w siatkówkę)

_____ dni w tygodniu;

Nie wykonywałam/em takiej czynności. → **proszę przejść do części 5: CZAS SPĘDZONY SIEDZĄC**

4f. Proszę podać ile czasu łącznie zwykle spędza Pan/Pani w jednym z takich dni na **umiarkowaną** aktywność fizyczną w czasie wolnym?

_____ godzin _____ minut

CZĘŚĆ 5: CZAS SPĘDZONY SIEDZĄC

Ostatnie pytania dotyczą czasu, który spędza Pan/Pani siedząc w pracy, w domu, podczas nauki i w czasie wolnym. Może to obejmować czas spędzony siedząc przy biurku, z wizytą u przyjaciół, podczas czytania, oglądania telewizji leżąc lub siedząc. Proszę nie brać pod uwagę czasu spędzonego siedząc w pojeździe mechanicznym, bo o tym już była mowa.

5a. Proszę podać ile czasu **DZIENNIE** spędził Pan/Pani siedząc, **w dniach powszednich ostatniego tygodnia** (7 dni)?

_____ godzin _____ minut **DZIENNIE!**

5b. Proszę podać ile czasu **DZIENNIE** spędził Pan/Pani siedząc, **w dniach wolnych od pracy ostatniego tygodnia** (7 dni)?

_____ godzin _____ minut **DZIENNIE!**

Dziękujemy za wypełnienie kwestionariusza.