

Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

ZUZANNA GOLUCH-KONIUSZY

**Badania modelowe nad oceną możliwości
prozapalnego wpływu zmiany składu diety
i różnych sposobów jej uzupełniania
wybranymi witaminami z grupy B**

Szczecin 2015

Recenzenci

JADWIGA BIERNAT

JOLANTA CZARNOCIŃSKA

Opracowanie redakcyjne

KATARZYNA MITAN

WYDANO ZA ZGODĄ

REKTORA ZACHODNIOPOMORSKIEGO UNIWERSYTETU TECHNOLOGICZNEGO W SZCZECINIE

Praca naukowa sfinansowana ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego jako
projekt badawczy N N 312 124839

ISBN 978-83-7663-202-5

Wydawnictwo Uczelniane Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie

70-311 Szczecin, al. Piastów 48, tel. 91 449-47-60, e-mail: wydawnictwo@zut.edu.pl

Druk Zapol, Sobczyk Sp.j., 71-062 Szczecin, al. Piastów 42, tel. 91 434-10-21

e-mail: zarzad@zapol.com.pl

Spis treści

Wykaz skrótów używanych w tekście	5
1. Wstęp	9
1.1. Procesy zapalne w ustroju oraz czynniki je implikujące ze szczególnym uwzględnieniem wpływu węglowodanów prostych	9
1.2. Spożycie węglowodanów prostych przez różne grupy populacji polskiej i rola wybranych witamin z grupy B w ich metabolizmie	14
1.3. Spożycie wybranych witamin z grupy B przez różne grupy populacji polskiej	15
1.4. Sposoby uzupełniania diety w witaminy z grupy B	16
1.5. Częstość spożycia żywności wzbogacanej i/lub suplementów diety zawierających wybrane witaminy z grupy B oraz czynniki ją warunkujące	18
1.6. Aktualny stan wiedzy o sumarycznym wpływie obecnej w diecie sacharozy i wybranych witamin z grupy B na wybrane torę metaboliczne ustroju	22
2. Cel pracy	25
3. Materiał i metody badań	27
3.1. Skład pasz użytych w doświadczeniu	27
3.2. Materiał badawczy i warunki doświadczenia	30
3.3. Żywnienie i pojenie zwierząt	30
3.4. Metody badań	31
3.4.1. Analizy wybranych składników pełnej krwi i surowicy	31
3.4.2. Analizy składu tkanki mięśniowej i wątrobowej	33
3.4.3. Badanie histopatologiczne wątroby	33
3.4.4. Oznaczenia dodatkowych parametrów w wątrobach i w moczu	34
3.5. Wskaźniki i współczynniki wyliczone na podstawie uzyskanych wyników	34
3.6. Analiza statystyczna	35
4. Wyniki	37
4.1. Spożycie paszy i przyrosty masy ciała	37
4.2. Spożycie kwasów tłuszczowych z badanymi dietami	38
4.3. Bilans płynów	40
4.4. Masa serca i wątroby oraz nasierdziowa i okołonarządowa tkanka tłuszczowa	40
4.5. Skład chemiczny tkanki mięśniowej i wątrobowej	41
4.6. Analiza morfologiczna krwi	42
4.7. Wybrane wskaźniki przemian węglowodanowych	43
4.8. Wybrane wskaźniki przemian białkowych	44
4.9. Wybrane wskaźniki przemian lipidowych	45
4.10. Badanie histopatologiczne wątroby	46
4.11. Wybrane markery stresu oksydacyjnego	49
4.12. Cytokiny i chemokiny	50
5. Dyskusja	51
6. Podsumowanie	67
7. Wnioski	69
Literatura	71
Summary	87
Zusammenfassung	89

Wykaz skrótów używanych w tekście

AAS	– absorpcyjna spektrometria atomowa (ang. <i>Atomic Absorption Spectrometry</i>)
ACTH	– hormon adrenokortykotropowy (ang. <i>adrenocorticotropic hormone</i>)
A/G	– stosunek albumin do globulin (ang. <i>albumin/globulin ratio</i>)
ALT	– aminotransferaza alaninowa (ang. <i>alanine aminotransferase</i>)
AOAC	– Association of Official Analytical and Chemists
apo A-I	– apolipoproteina A-I (ang. <i>apolipoprotein A-I</i>)
apoB	– apolipoproteina B (ang. <i>apolipoprotein B</i>)
AST	– aminotransferaza asparaginianowa (ang. <i>aspartate transaminase</i>)
BMI	– wskaźnik masy ciała (ang. <i>Body Mass Index</i>)
BOF	– białka ostrej fazy
CAT	– katalaza (ang. <i>catalase</i>)
CRP	– białko C-reaktywne (ang. <i>C-Reactive Protein</i>)
CuZn-SOD-1	– dysmutaza ponadtlenkowa (ang. <i>superoxide dismutase</i>)
E 101	– ryboflawina (ang. <i>riboflavin</i>)
E 375	– kwas nikotynowy (ang. <i>nicotinum acid</i>)
ECM	– macierz pozakomórkowa (ang. <i>extracellular matrix</i>)
EDTA	– kwas wersenowy (ang. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
EFSA	– Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (European Food Safety Authority)
FAO	– Organizacja Narodów Zjednoczonych ds. Wyżywienia i Rolnictwa (Food and Agriculture Organization)
FCE	– współczynnik efektywności wykorzystania paszy (ang. <i>Feed Conversion Efficiency</i>)
FCR	– współczynnik wykorzystania paszy (ang. <i>Feed Conversion Ratio</i>)
FIRI	– wskaźnik insulinooporności (ang. <i>Fasting Insulin Resistance Index</i>)
GAS	– ogólny zespół adaptacji (ang. <i>General Adaptation Syndrome</i>)
GGTP	– γ -glutamylotranspeptydaza (ang. <i>gamma-glutamyl transferase</i>)
GI	– indeks glikemiczny (ang. <i>Glycemic Index</i>)
GL	– ładunek glikemiczny (ang. <i>Glycemic Load</i>)
GPx	– peroksydaza glutationowa (ang. <i>glutathione peroxidase</i>)
GR	– reduktaza glutationu (ang. <i>glutathione reductase</i>)
GSH	– zredukowana forma glutationu (ang. <i>reduced glutathione</i>)
GSH-Px	– peroksydaza glutationowa (ang. <i>glutathione peroxidase</i>)
HCT	– hematokryt (ang. <i>hematocrit</i>)
HDL-C	– lipoproteiny o dużej gęstości (ang. <i>high density lipoprotein</i>)
HGB	– hemoglobina (ang. <i>hemoglobin</i>)

HOMA-IR	– wskaźnik insulinooporności (ang. <i>homeostasis model assessment of insulin resistance</i>)
HPLC	– wysokosprawna chromatografia cieczowa (ang. <i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
HSC	– komórki gwiaździste (ang. <i>hepatic stellate cells</i>)
ICAM-1	– cząstka adhezji międzykomórkowej-1 (ang. <i>intercellular adhesion molecule-1</i>)
ICP-AES	– spektrometria atomowa emisyjna ze wzbudzeniem w plazmie sprzężonej indukcyjnie (ang. <i>Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry</i>)
IDL	– lipoproteiny o pośredniej gęstości (ang. <i>intermediate density lipoprotein</i>)
IL-1	– interleukina 1 (ang. <i>interleukine-1</i>)
IL-6	– interleukina 6 (ang. <i>interleukine-6</i>)
IL-8	– interleukina 8 (ang. <i>interleukine-8</i>)
IL-10	– interleukina 10 (ang. <i>interleukine-10</i>)
iNOS	– indukowana syntaza tlenku azotu (ang. <i>inducible nitric oxide synthase</i>)
IŻŻ	– Instytut Żywności i Żywienia
LAS	– miejscowy zespół przystosowania (ang. <i>Local Adaptation Syndrom</i>)
LDL-C	– lipoproteiny o małej gęstości (ang. <i>low density lipoprotein</i>)
Liz-PC	– lizofosfatydylocholina (ang. <i>lysophosphatidylcholine</i>)
MCH	– średnia zawartość hemoglobin (ang. <i>mean corpuscular hemoglobin</i>)
MCHC	– średnia koncentracja hemoglobin w erytrocycie (ang. <i>mean corpuscular hemoglobin concentration</i>)
MCP-1	– białko chemotaktyczne dla monocytów (ang. <i>monocyte chemoattractant protein-1</i>)
MCV	– średnia objętość erytrocytu (ang. <i>mean corpuscular volume</i>)
MDA	– malonyldialdehyd (ang. <i>malondialdehyde</i>)
MMP	– metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej (ang. <i>matrix metalloproteinase</i>)
MPO	– mieloperoksydaza (ang. <i>myeloperoxidase</i>)
NADPH	– zredukowany fosforan dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (ang. <i>reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>)
NF-κB	– jądrowy czynnik transkrypcyjny kappa B (ang. <i>nuclear factor kappa B</i>)
NHANES	– Narodowy Program Badania Zdrowia i Żywienia (National Health and Nutrition Examination Survey)
OTC	– leki dostępne bez recepty (ang. <i>Over the Counter Drug</i>)
oxLDL-C	– utlenione lipoproteiny o małej gęstości (ang. <i>oxidized low density lipoprotein</i>)
PAF-AH	– acetylohydrolaza czynnika aktywującego płytki (ang. <i>platelet-activating factor acetylhydrolase</i>)
PER	– wskaźnik wydajności wzrostowej białka (ang. <i>Protein Efficiency Ratio</i>)
PLT	– płytki krwi (ang. <i>platelets</i>)

PPAR- α	– proliferator peroksyosomów α (ang. <i>peroxisome proliferator-activated receptors α</i>)
PPAR- γ	– proliferator peroksyosomów γ (ang. <i>peroxisome proliferator-activated receptors γ</i>)
RBC	– krwinki czerwone (ang. <i>red blood cell</i>)
RDA	– zalecane spożycie (ang. <i>recommended dietary allowances</i>)
RFT	– reaktywne formy tlenu (ang. <i>free radicals</i>)
SECs	– komórki endotelium zatok (ang. <i>sinusoida endothelial eells</i>)
sICAM-1	– rozpuszczalna forma ICAM-1 (ang. <i>soluble intercellular adhesion molecule-1</i>)
SMC	– komórki mięśni gładkich (ang. <i>smooth muscle cells</i>)
SOD	– dysmutaza ponadtlenkowa (ang. <i>superoxide dismutase</i>)
TAS	– całkowity potencjał antyoksydacyjny osocza (ang. <i>Total Antioxidant Status</i>)
TBARS	– wskaźnik peroksydacji lipidów (ang. <i>thiobarbituric acid reactive substances</i>)
TC	– cholesterol całkowity (ang. <i>total cholesterol</i>)
TG	– triacyloglicerole (ang. <i>triacylglycerols</i>)
TGF- β 1	– transformujący czynnik wzrostu beta 1 (ang. <i>transforming growth factor β1</i>)
TIMP-1	– tkankowy inhibitor proteaz (ang. <i>tissue inhibitors of matrix metalloproteinases</i>)
TNF- α	– czynnik martwicy nowotworów α (ang. <i>tumor necrosis factor α</i>)
TNS OBOP	– Transglobal Ośrodek Badania Opinii Publicznej
UL	– tolerowany górny poziom spożycia (ang. <i>upper level</i>)
VCAM-1	– cząstka adhezji komórek naczyń-1 (ang. <i>vascular cell adhesion molecule-1</i>)
VLDL-C	– lipoproteiny o bardzo małej gęstości (ang. <i>very low density lipoprotein</i>)
WBC	– krwinki białe (ang. <i>white blood cell</i>)
WED	– wartość energetyczna diety
WHO	– Światowa Organizacja Zdrowia (World Health Organization)
W-LCC	– liczba neutrofilii (ang. <i>number of large white blood cells, neutrophile</i>)
W-LCR	– udział neutrofilii (ang. <i>percent ratio of large white blood cell, neutrophile</i>)
W-SCC	– liczba limfocytów (ang. <i>number of small white blood cells, lymphocyte</i>)
W-SCR	– udział limfocytów (ang. <i>percent ratio of small white blood cell, lymphocyte</i>)

1. Wstęp

1.1. Procesy zapalne w ustroju oraz czynniki je implikujące ze szczególnym uwzględnieniem wpływu węglowodanów prostych

W świetle aktualnej wiedzy zapalenie definiowane jest jako złożona, dynamiczna i uporządkowana odpowiedź na czynnik ingerujący w naturalną homeostazę ustroju. Narządy układu immunologicznego: szpik, grasica, migdałki, wątroba, śledziona oraz rozsiane w całym organizmie grudki chłonne produkują komórki immunologiczne, które drogą krwi docierają wszędzie tam, gdzie występuje potrzeba obrony przed szkodliwym dla ustroju czynnikiem. Monocyty/makrofagi, limfocyty B, T, NK i cytotoksyczne oraz granulocyty stanowią podstawowe elementy komórkowej odpowiedzi immunologicznej na czynnik zapalny (Chaplin 2010).

Intensywność odczynu zapalnego toczącego się w strukturze tkankowej lub narządowej jest zależna od sprawności mechanizmów odpornościowych organizmu, które ograniczają rozległość tego procesu. Znaczący wpływ na dynamikę procesu zapalnego ma rodzaj czynnika wywołującego, który może być zewnątrz- lub wewnątrzpochodny. Ze względu na rodzaj energii indukującej odczyn zapalny struktur tkankowych wyróżnia się czynniki natury: fizycznej (mechaniczne, promieniowanie jonizujące, pole magnetyczne, fale ultradźwiękowe), chemicznej (np.: terpentyna, karagenina, kwasy, zasady) oraz biologicznej (bakterie, wirusy, grzyby, pierwotniaki, egzotoksyny, endotoksyny). Istotna jest również siła działania czynnika (niższa od nocyreceptywnej) i czas działania (odczyn ostry lub przewlekły). Szybka eliminacja czynnika zapalnego i jego biologicznych następstw świadczy o sprawnych mechanizmach adaptacyjnych organizmu, które wykazują zdolność do neutralizacji czynnika uszkodzającego, będącego zarazem bodźcem stresowym dla organizmu i czynnikiem agresji środowiskowej.

Reakcja organizmu na pojawiający się czynnik uszkodzający struktury tkankowe lub narządowe przejawia się odczynem zapalnym na poziomie lokalnym lub ogólnoustrojowym. Odczyn ten ma na celu neutralizację czynnika uszkodzającego oraz pobudzenie procesów umożliwiających przywrócenie pierwotnego stanu. Szczególną cechą charakterystyczną procesu zapalnego jest występowanie zjawisk sobie przeciwstawnych, np.: krzepnięcia i fibrynolizy, sekrecji aktywatorów i inhibitorów plazminogenu przez makrofagi, pro- i przeciwzapalnego działania tych samych mediatorów (histamina, prostaglandyny).

W reakcjach ogólnoustrojowych związanych z odczynem zapalnym może dochodzić do zmian w stężeniu wydzielanych hormonów (m.in. ACTH, glikokortykoidów, hormonów tarczycy), które aktywizują przemiany metaboliczne. Można zaobserwować również zmiany w stężeniu metali we krwi i w wątrobie (Fe, Cu, Zn). Istotną rolę w odczynach zapalnych odgrywa również wątroba, w której syntetyzowane są m.in. białka ostrej fazy (BOF), ograniczające rozprzestrzenianie się procesu zapalnego i usuwające jego skutki. Ich priorytetowym działaniem jest przywracanie homeostazy organizmu przez aktywację układu dopełniacza, reakcję nieswoistą związaną z opsonizacją i aglutynacją, ograniczaniem uszkodzeń tkanek

powodowanych m.in. przez enzymy lizosomalne z komórek fagocytyujących oraz wzmożoną aktywność chemotaktyczną. Białka ostrej fazy klasyfikuje się jako białka: pozytywne (których stężenie wzrasta co najmniej o 25% i do tej grupy należy większość BOF), negatywne (których stężenie maleje o około 30%, m.in. transferyna, prealbumina, albumina i inter- α -antytrypsyna, α_1 -lipoproteina) oraz obojętne (których stężenie zmienia się jedynie nieznacznie, m.in. α_2 -makroglobulina, protrombina, surowiczy amyloid P).

Odpowiedź zapalna ustroju ma charakter wieloetapowy, rozłożony w czasie, charakteryzujący się dynamiką określającą przebieg ostry lub przewlekły. W odczynie zapalnym występują reakcje dotyczące mobilności komórek (migracja, adhezja, diapedeza, chemotaksja), odpowiedź typu humoralnego, w której pojawiają się kolejno mediatory zapalne występujące lokalnie oraz w płynach ustrojowych (histamina, białko CRP, białka dopełniacza, interleukiny, prostacykliny, prostaglandyny i tromboksan), a także odpowiedź typu hemostatycznego (agregacja płytek, skrzep, wykrzepianie wewnątrznaczyniowe). Czas od zadziałania bodźca przy ostrym procesie zapalnym do wystąpienia pierwszych mierzalnych zmian pojawienia się wskaźników diagnostycznych (różnorodnych mediatorów zapalenia) jest stosunkowo krótki i liczy się go w minutach. Przewlekły odczyn zapalny może natomiast trwać tygodniami, miesiącami, latami, a nawet całe życie (Pham 2008, Chaplin 2010).

Przewlekłe zapalenie jest stanem patologicznym, który rozwija się, gdy czynnik sprawczy nie zostanie wyeliminowany, a w jego usuwanie zaangażowane zostają oprócz makrofagów (dominujących w drugiej fazie zapalenia ostrego) także limfocyty – komórki odpowiedzi nabytej. Makrofagi są źródłem mediatorów procesu zapalnego, m.in. enzymów (aktywator plazminogenu, elastazy, kolagenazy), cytokin (IL-1, TNF- α) oraz α_2 -makroglobuliny. Aktywność limfocytów i makrofagów wymaga utrzymania równowagi pomiędzy pro- i antyoksydantami w ustroju, a intensywność odpowiedzi układu odpornościowego wynika z proporcji pomiędzy zakresem stymulacji (cytokiny, antygeny) a aktywnością endogennego układu antyoksydacyjnego (Sherwood i Toliver-Kinsky 2004).

W warunkach prawidłowych mitochondria produkują jedynie niewielkie ilości wolnych rodników (RFT), ale są one bardzo wrażliwe na uszkodzenie wynikające z ich działania. Wolne rodniki w warunkach fizjologicznych pośredniczą w istotnych dla komórki funkcjach, takich jak: wzrost, proliferacja, różnicowanie czy apoptoza (Duchen 2004, Gałęcka i in. 2008). Organizm w warunkach fizjologicznych ma sprawny system antyoksydacyjny – enzymatyczny (GSH-Px SOD, CAT) i nieenzymatyczny (witaminy A, E, C, glutation, selen, bilirubina, kwas moczowy, ceruloplazmina) kontrolujący ilość RFT. Oba systemy łącznie stanowią całkowity potencjał antyoksydacyjny organizmu. Systemy te mogą hamować powstawanie RFT i przeprowadzać ich konwersję do nieaktywnych związków. Niewydolność bariery antyoksydacyjnej ustroju prowadzi do niekontrolowanych reakcji wolnorodnikowych, w wyniku których następuje uszkodzenie wielu struktur makrocząsteczkowych (DNA, jądra komórkowego, lipidów błon komórkowych, białek strukturalnych i enzymatycznych) (Rahman i in. 2006, Valko i in. 2007).

Obecnie powszechnie akceptowany jest pogląd, że komórkowy stres oksydacyjny, wywołany przez RFT, działając uszkadzająco na tkanki, generuje proces zapalny, który jest zaangażowany

żowany m.in. w patogenezę miażdżycy oraz cukrzycy typu 2 i odwrotnie – w tych jednostkach chorobowych może dochodzić do rozwoju procesów zapalnych.

W przebiegu miażdżycy wykazano występowanie komórek zapalnych na wszystkich etapach powstawania blaszki miażdżycowej, począwszy od nacieczenia tłuszczowego po pęknięcie blaszki i powstanie zakrzepu (Ross 1999).

Znany jest fakt, że w wyniku dostarczania organizmowi nadmiaru tłuszczów w diecie dochodzi do stresu oksydacyjnego. Oksydacja kwasów tłuszczowych prowadzi do powstawania nadtlenków lipidowych, agregacji lipidów i ich fragmentów oraz zmian aktywności składników błonowych. Najbardziej znanym biologicznie łańcuchowym procesem wolnorodnikowym jest peroksydacja wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, szczególnie we frakcji LDL-C. W wyniku oksydacji frakcji LDL-C powstaje aterogenna frakcja oxLDL-C (Tsimikas 2006). Hipoteza oksydatywnej modyfikacji lipoprotein o niskiej gęstości (LDL-C) oraz „odpowiedzi na uszkodzenie” to dwa fundamentalne mechanizmy inicjacji aterogenezy.

Frakcja oxLDL-C wykazuje działanie cytotoksyczne na komórki śródbłonna, uszkodzając funkcje i integralność wyściółki śródbłonna. Ułatwia to penetrację monocytów lub przemieszczanie LDL-C do subendotelium, co przyspiesza powstawanie nacieku tłuszczowego. Utlenione LDL-C, zmieniając stan oksydoredukcyjny komórki, stymulują dalsze wytwarzanie RFT i stanowią ważny prooksydacyjny sygnał, wpływając bezpośrednio na aktywację jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF- κ B. Czynniki te wpływają na ekspresję prozapalnych genów i syntezę ich produktów, takich jak: cytokiny (IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α), oraz molekuł adhezyjnych (ICAM-1, VCAM-1, MCP-1). Związki te promują infiltrację monocytów do ściany naczyń krwionośnych, co prowadzi do rozwoju lokalnego stanu zapalnego i dysfunkcji śródbłonna (Tsimikas 2006). Jednocześnie stymulacja receptorów aktywowanych przez proliferatory peroksydomów PPAR- γ i PPAR- α hamuje ekspresję prozapalnych genów kodujących cytokiny, metaloproteinazy macierzy (MMP) oraz białka ostrej fazy przez regulację aktywności NF- κ B. Aktywowane zapaleniem leukocyty obecne we krwi powodują ponadto sekrecję mieloperoksydazy (MPO), która zarówno na powierzchni komórek śródbłonna naczyniowego, jak i w przestrzeni subendotelialnej, powoduje chlorowanie i nitrowanie reszt tyrozyny w apoB (składowej LDL-C), przyczyniając się dodatkowo do oksydacyjnej modyfikacji do oxLDL-C prowadzącej do powstawania blaszki miażdżycowej.

Wytworzone oxLDL-C hamują również indukcję genu iNOS, zmniejszając dostępność NO, jednego z głównych związków hamujących agregację płytek, aktywującego płytki i ich aktywność sekrecyjną, działającego rozkurczowo na ścianę naczyń. Proces ten prowadzi do nasilenia lokalnego stanu zapalnego i w konsekwencji do dysfunkcji śródbłonna naczyniowego.

Procesy oksydacji w ustroju wywołane stresem oksydacyjnym prowadzą również do modyfikacji apolipoprotein. Szczególne znaczenie ma hydroliza fosfatydylocholiny do lizofosfatydylocholiny pod wpływem aktywowanej fosfolipazy A2. Wytworzone podczas peroksydacji lipidów krótkołańcuchowe aldehydy (MDA) mogą tworzyć kowalentne wiązania z apoB lub jej polipeptydowymi fragmentami, powstałymi w wyniku degradacji apoB100, maskując grupy ϵ -aminowe lizyny. Zmodyfikowane reszty lizynowe są rozpoznawane przez receptory zmiatające zlokalizowane na makrofagach. Syntetyzowana lokalnie w obrębie powstałej blaszki miażdżycowej fosfolipaza A2 (Lp-PLA₂), niezależna od jonów wapnia i niewykazują-

ca w stosunku do innych lipaz aktywności do naturalnych fosfolipidów błonowych, a wyłącznie do oxLDL-C, powoduje ponadto ich hydrolizę do utlenionych kwasów tłuszczowych i lizofosfatydylocholiny (liz-PC). Związki te są wyzwalaczami uruchamiającymi kaskadę zapalną, gdyż stymulują ekspresję cytokin i cząsteczek adhezyjnych przez komórki śródbłonna, a także zawartych w blaszkach miażdżycowych makrofagów i leukocytów. Rezultatem tych procesów jest wzmożony transport monocytów do przestrzeni subintymalnej, w której są one aktywowane i różnicowane do makrofagów. Makrofagi, wnikając do śródbłonna naczyń wieńcowych, stają się komórkami piankowatymi (*foam cells*). W ten sposób, w następstwie patofizjologicznych zmian, błona wewnętrzna naczyń staje się coraz grubsza, a proces ten jest szczególnie intensywny w miejscach rozgałęzień tętnic. Następnie z pasm tłuszczowych (*fatty streaks*), w wyniku gromadzenia się i działania komórek układu odpornościowego, w tym komórek zapalnych oraz lipidów, rozwijają się dojrzałe płytki miażdżycowe, które otoczone są przez komórki mięśni gładkich SMC oraz macierz bogatą w kolagen. Znajdujące się w płytkach miażdżycowych komórki układu odpornościowego, wydzielając cytokiny i czynniki wzrostu, aktywują rozwój tych płytek, co w konsekwencji doprowadza do zwężenia światła tętnic (Theuma i Fonseca 2003, Hansson 2005).

Przedstawione powyżej mechanizmy implikowania miażdżycy, przez procesy wolnorodnikowe i prozapalne, indukowane składem diety, można badać z udziałem zwierząt modelowych. Stosowane od wielu lat w naukach żywieniowych modele zwierzęce pozwalają m.in. na badanie skutków długoterminowego spożycia różnych składników diety, np.: cukrów prostych, na metabolizm ustroju, umożliwiając ścisłą kontrolę wpływu innych czynników zewnętrznych, które mogą modyfikować to spożycie. Wykazano już, że u gryzoni jako zwierząt modelowych przewlekłe spożycie sacharozy powoduje zaburzenia metaboliczne, podobne do obserwowanych u ludzi, tzn. cukrzycę typu 2, dyslipidemię, nadciśnienie tętnicze i/lub zmniejszenie wrażliwości na insulinę (Kawasaki i in. 2005, Fortino i in. 2007, Lindqvist i in. 2008, Chen i in. 2011). Pomimo tego, że u szczurów cholesterol jest transportowany we krwi głównie przez frakcję HDL-C oraz że wrażliwość na indukowanie miażdżycy składnikami diety jest u nich czterokrotnie mniejsza niż u małp, drobiu i królików i dwukrotnie mniejsza niż u świń, to jednak miażdżycę u szczurów można indukować dietą łącznie ze środkami farmakologicznymi. Miażdżycę wywołano u szczurów dietą o wysokiej zawartości tłuszczu lub cholesterolu oraz witaminy D₃ (Leong i in. 2008, Adam i in. 2009, Pang i in. 2010, Kapourchali i in. 2014).

W przypadku nadmiernego spożycia węglowodanów prostych dochodzi do zaburzeń w gospodarce węglowodanowej, do których zalicza się nietolerancję glukozy, nieprawidłową glikemię na czczo i cukrzycę typu 2, będące istotnymi czynnikami ryzyka powstawania stresu oksydacyjnego.

Powszechnie wiadomo, że stężenie glukozy we krwi (glikemia) stanowi jeden z najściślej regulowanych parametrów metabolicznych, decydujący o właściwym przebiegu procesów energetycznych w organizmie, a tym samym będący warunkiem zachowania homeostazy. Poziom glikemii podlega złożonej regulacji nerwowo-hormonalnej, ale także wpływom licznych czynników zewnętrznych oddziałujących na organizm. Są to m.in. rodzaj i wielkość dostarczanych z dietą węglowodanów, ich budowa, dostępność trawienna, tempo wchłaniania

itd. Największy udział w dostarczanych w diecie węglowodanach ma glukoza (około 80%), a następnie fruktoza (około 10%). Wchłanianie i metabolizm zarówno glukozy, jak i fruktozy w organizmie, są już dobrze poznane i opisane (Bechmann i in. 2012).

Glukoza, której cząsteczka zawiera grupę aldehydową, reaguje z grupami aminowymi białek, w wyniku czego długo żyjące białka ulegają postępującej nieenzymatycznej glikacji. Po odpowiednim przekształceniu przy udziale tlenu, które jest katalizowane przez jony metali przejściowych, a hamowane przez antyoksydanty, powstają stabilne końcowe produkty glikacji. Proces ten jest nasilany proporcjonalnie do stężenia glukozy w płynach ustrojowych. Zarówno glukoza, jak i wiele innych produktów przemian węglowodanów (np. fosfodihydroksyaceton i aldehyd 3-fosfoglicerynowy), a zwłaszcza końcowe produkty glikacji ulegają utlenieniu, którego produktami są odpowiednie rodniki 1-hydroksyalkilowe oraz RFT. Hiperglikemii towarzyszy hiperinsulinemia i zmniejszenie wrażliwości tkanek na insulinę, których następstwem jest zarówno wzrost RFT, zmniejszona aktywność osoczowych drobnocząsteczkowych antyutleniaczy nieenzymatycznych (witamina A, tokoferol, askorbinian, glutation, karoteny, flawonoidy, bilirubina, kwas moczowy, koenzym Q), jak i zmiana aktywności antyutleniaczy enzymatycznych (wzrost aktywność CAT, obniżenie aktywności CuZn-SOD i GPx (Kesavulu i in. 2000, Evans i in. 2003). Ponadto hiperinsulinemii towarzyszy wzrost stężenia katecholamin, które też mogą wpływać na dodatkowe generowanie RFT.

Hiperglikemia jest czynnikiem indukującym przewlekły proces zapalny, powoduje aktywację komórek śródbłonna naczyń, granulocytów obojętnochłonnych, monocytów, limfocytów i płytek krwi, co inicjuje miejscowy stan zapalny. Hiperglikemia jest również silnym bodźcem stymulującym komórki fagocytujące, których aktywacja prowadzi do uwolnienia znacznych ilości RFT i cytokin prozapalnych (Alba-Loureiro i in. 2007, de Carvalho Vidigal i in. 2012).

W badaniach przeprowadzonych na szczurach żywionych dietą zawierającą 65% sacharozy, w stosunku do zwierząt żywionych dietą zawierającą 65% skrobi, wykazano zmiany w statusie antyoksydacyjnym polegające na spadku stężenia tokoferolu w osoczu i wzroście TBARS, co wskazuje na nasiloną peroksydację lipidów (Busserolles i in. 2002a, b, c). Również w badaniach przeprowadzonych u młodych zdrowych mężczyzn, z prawidłowym stanem odżywienia po trzytygodniowym spożywaniu napojów słodzonych sacharozą wykazano zaburzenia tolerancji glukozy, dyslipidemię oraz podwyższone wartości markerów zapalnych (Aeberli i in. 2011).

Należy również zwrócić uwagę, że istnieje coraz więcej badań sugerujących silny związek pomiędzy toczącym się subklinicznym przewlekłym zapaleniem a insulinoopornością i cukrzycą typu 2 (Freeman i in. 2002). Dlatego też istotne jest monitorowanie ilości spożywanych węglowodanów i ich rodzajów.

1.2. Spożycie węglowodanów prostych przez różne grupy populacji polskiej i rola wybranych witamin z grupy B w ich metabolizmie

Węglowodany są nie tylko głównym źródłem energii w diecie, ale również nośnikiem smaku oraz wpływają na wiele czynności mózgu, w tym regulację pobierania pokarmu (Anderson i in. 2002). Dla ustroju ważna jest zarówno ilość, jak i rodzaj dostarczanych z dietą węglowodanów. Wykazano, że spożywanie cukrów prostych (pieczywa cukierniczego, słodyczy, napojów kolorowych, napojów energetyzujących) ubogich w witaminy i składniki mineralne, pełniących funkcje regulatorowe w metabolizmie węglowodanów i całego ustroju, może implikować zaburzenia metaboliczne. W żywieniowej profilaktyce otyłości, cukrzycy typu 2 oraz dietoterapii tych chorób zwraca się uwagę na glikemię poposiłkową, na którą wpływają: ilość i wzajemne proporcje węglowodanów (glukozy, fruktozy, sacharozy, laktozy i skrobi), ich struktura (proporcja w skrobi amylozy do amylopektyny), procesy technologiczne (wielkość cząsteczek, forma i struktura produktu, stopień żelifikacji skrobi), zawartość innych składników w produkcie (tłuszczu, białku, błonnika pokarmowego, kwasów organicznych, składników antyodżywczych), ich przyswajalność oraz indeks glikemiczny (GI) i ładunek glikemiczny (GL) (Willet i in. 2002).

Produkty przetworzone i oczyszczone zawierają w swoim składzie dodane technologicznie cukry proste, m.in. w postaci sacharozy jako substancji słodzącej i/lub konserwującej. Sacharoza w formie białego cukru, pozyskiwana z buraków cukrowych, jest dodawana do dań, potraw i napojów w indywidualnych gospodarstwach domowych. Cukier ten występuje również w naturalnych produktach, tj. w świeżych owocach, owocach suszonych, warzywach, mące, ziarnach zbóż, płatkach zbożowych, mleku, orzechach oraz w miodzie (Kunachowicz i in. 2005). Sacharoza, zarówno jako naturalny składnik produktów spożywczych, jak i ten dodawany do żywności, ma taką samą budowę molekularną oraz specyficzne przemiany metaboliczne, odmienne od polisacharydów. Produkty zawierające sacharozę charakteryzują się wysokim GI i GL, dlatego sprzyjają zaburzeniom metabolizmu węglowodanowo-lipidowego (hiperinsulinemii, insulinooporności, dyslipidemii).

Z przeglądu piśmiennictwa wynika, że spożycie sacharozy wzrosło w ostatnich latach na całym świecie. Badania National Health and Nutrition Survey (NHANES) przeprowadzone w USA wykazały, że pomiędzy rokiem 1971 a 2000 spożycie węglowodanów wzrosło o około 62 g/dobę u kobiet i około 69 g/dobę u mężczyzn (CDC 2004), a spożycie sacharozy dodanej do żywności wzrosło z 64 kg w roku 1970 do 80 kg w roku 2000 (Elliott i in. 2002). Obserwuje się również zwiększone spożycie sacharozy przez dzieci i młodzież (Kranz i in. 2005), co sprzyja zwiększeniu wartości wskaźnika BMI (Herbst i in. 2011).

W Stanach Zjednoczonych do ponad 70% produktów spożywczych dodawany jest cukier, a dodatkowo od 1950 roku spożycie słodzonych napojów gazowanych zwiększyło się wielokrotnie, co przyczyniło się do rozwoju epidemii otyłości, zespołu metabolicznego oraz niealkoholowego stłuszczenia wątroby (Bray i Popkin 2013). W Polsce w 2013 roku spożycie cukru na 1 mieszkańca na rok wynosiło 41,9 kg, a spożycie owoców wynosiło zaledwie 46 kg (GUS 2014). Głównymi produktami dostarczającymi sacharozę w diecie, zarówno u dorosłych, jak i dzieci oraz młodzieży, są cukier z cukiernicy, słodycze, pieczywo cukiernicze,

dania typu fast food, soki, napoje owocowe oraz słodzone napoje gazowane i niegazowane (Jarosz i Rychlik 2007, Bilek i in. 2014). Szczególnie niepokojące jest wysokie spożycie słodzonych napojów, gdyż wykazano częstsze występowanie otyłości u dzieci już w 5. r.ż. spożywających między posiłkami te napoje (Dubois i in. 2007), co predestynuje do zaburzeń metabolicznych, takich jak: zaburzenia tolerancji glukozy, insulinooporność, dyslipidemia i nadciśnienie tętnicze (Drewnowski i Bellisle 2007, Malik i in. 2010).

W Polsce rekomendowane jest spożycie sacharozy, zarówno przez dzieci, jak i osoby dorosłe, poniżej 10% wartości energetycznej diety (WED) (Jarosz 2012, Dobrzańska i in. 2013). Liczne badania prowadzone w kraju w różnych grupach ludności obojga płci (w wieku 4–74 lat) wykazały jednak, że udział energii z sacharozy wynosi 11–18% (Charkiewicz i in. 2009, Bolesławska i in. 2011, Goluch-Koniuszy i Bonczek 2011, Charzewska i in. 2013, Przeor i Goluch-Koniuszy 2013, Włodarek i Głąbska 2014).

Ze wzrostem spożycia żywności przetworzonej i oczyszczonej, zawierającej m.in. nadmierne ilości cukrów prostych, przez różne grupy ludności w Polsce związane jest mniejsze spożycie witamin z grupy B, kontrolujących w formie koenzymów przemiany metaboliczne m.in. węglowodanów. Pierwszy etap glikolizy zachodzi w cytoplazmie, wymagając utlenienia NADH do NAD. Równoległe mogą zostać uruchomione zapasy glikogenu przez jego fosforylację do glukozo-1-fosforanu z udziałem specyficznej fosforylasy glikogenowej (zawierającej witaminę B₆). Przemiany kwasu pirogronowego w cyklu Crebsa wymagają przeniesienia do wnętrza mitochondrium przy udziale kompleksu enzymów, dehydrogenazy pirogronianowej (z koenzymem tiaminą podobnie jak w dehydrogenazie alfa-ketoglutaranowej) i tam następuje dekarboksylacja oksydacyjna pirogronianu do acetylo-CoA. W łańcuchu oddechowym, w którym zachodzą procesy utleniania i redukcji z udziałem enzymów, koenzymami są amid kwasu nikotynowego (NAD) i ryboflawina (FAD).

1.3. Spożycie wybranych witamin z grupy B przez różne grupy populacji polskiej

Wraz ze znacznym spożyciem żywności przetworzonej i oczyszczonej zawierającej cukry proste obserwuje się niewystarczające spożycie m.in. witamin z grupy B, biorących udział w metabolizmie białek, tłuszczów i węglowodanów, co często przyczynia się do występowania klinicznych objawów niedoborów tych witamin.

Badania z ostatnich lat różnych grup populacji polskiej (po odniesieniu do norm żywienia z 2012 roku) wykazały niewystarczające spożycie z dietą witamin B₁, B₂ i niacyny przez dzieci w wieku szkolnym, młodzież szkolną i akademicką, osoby dorosłe oraz starsze (Czarnocińska i Wądołowska 2004, Król i Krejpcio 2008, Całyniuk i in. 2009, Figurska-Ciura i in. 2009, Galiński i Czarnocińska 2009, Kołmaga i in. 2009, Stawarska i in. 2009, Sygnowska i Waśkiewicz 2011, Gil i in. 2012, Iłow i in. 2012, Sitko i in. 2012). W przypadku witaminy B₆ niewystarczające spożycie z dietą obserwuje się głównie wśród osób starszych (Całyniuk i in. 2009, Stawarska i in. 2009, Sygnowska i Waśkiewicz 2011). Należy zauważyć, że problem

niewystarczającego spożycia witamin B₁, B₆ i niacyny częściej występował u dziewcząt i kobiet, natomiast w przypadku witaminy B₂ częściej u chłopców i mężczyzn.

Przyczyną niedostatecznego spożycia wybranych witamin z grupy B mogła być zarówno intensyfikacja produkcji rolnej, znaczny stopień przetworzenia żywności, nieodpowiednia obróbka kulinarna, złe nawyki żywieniowe, jak i celowe obniżanie wartości energetycznej diety podczas stosowania diet odchudzających (Rickman i in. 2007, Biernat i Wyka 2011).

1.4. Sposoby uzupełniania diety w witaminy z grupy B

Biorąc pod uwagę zwiększenie spożycia żywności przetworzonej i oczyszczonej oraz niewystarczające zbilansowanie współczesnej diety pod względem wartości odżywczej, jak i możliwości występowania subklinicznych i klinicznych objawów niedoborów, FAO i WHO w *Codex Alimentarius* (1994) wśród metod interwencji żywieniowej wymieniły przede wszystkim: zwiększenie podaży i asortymentu środków spożywczych będących naturalnym źródłem deficytowych składników, edukację żywieniową społeczeństwa, wzbogacanie żywności w brakujące składniki odżywcze oraz, tylko w niektórych przypadkach, okresowo suplementację.

Zgodnie z definicją zawartą w *Codex Alimentarius* (1994) wzbogacanie (ang. *food enrichment, food fortification*) polega na dodatku jednego bądź kilku składników odżywczych do środków spożywczych, bez względu na to, czy normalnie występują one w tym środku, czy nie, w celu zapobiegania i korygowania niedoborów jednego lub więcej składników odżywczych w całych populacjach lub określonych grupach ludności. Celem wzbogacania żywności jest uzupełnianie racji pokarmowych w niedoborowe składniki, m.in. w witaminy z grupy B, których brak lub niedostateczna zawartość w środkach spożywczych zostały spowodowane procesami technologicznymi, zamianą produktów tradycyjnie spożywanych na produkty podobne pod względem cech organoleptycznych, lecz różniące się wartością odżywczą, koniecznością zastosowania specjalnych diet czy też zmianą sposobu żywienia (Kunachowicz i Troszczyńska 2005, Kunachowicz i Przygoda 2008).

Warunki wzbogacania żywności w witaminy, m.in. z grupy B, są regulowane Rozporządzeniem (WE) nr 1925/2006 Parlamentu Europejskiego i Rady (*DzUrz. UE L 404/26 z 30.12.2006 r.*: 26). Wprowadzenie do diety żywności wzbogacanej wpływa pozytywnie na zwiększenie spożycia deficytowych składników (np.: tiaminy) i pozwala na znacznie łatwiejsze pokrycie zapotrzebowania niż zwyczajowa dieta. W połączeniu jednak ze stosowaną jednocześnie suplementacją może doprowadzić do przekroczenia wartości górnego tolerowanego spożycia UL, przyjętej przez Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności EFSA, która jest biologicznie tolerowana i w dłuższym czasie nie niesie ryzyka niekorzystnego efektu zdrowotnego u wszystkich osobników należących do danej grupy ludności (Kunachowicz i in. 2004.) Wartości UL wyznaczone dla osób dorosłych są wyższe niż dla dzieci. Wartości te dla młodzieży określono z podziałem na podgrupy, w zależności od wieku. Wyznaczono wartość UL dla osób dorosłych, w tym 25 mg/dobę/osobę B₆ oraz 10 mg/dobę/osobę kwasu nikotynowego lub 900 mg/dobę/osobę amidu kwasu nikotynowego dla niacyny (EFSA 2006).

W Polsce dodawanie witamin B₁ B₂ B₆ i niacyny jest możliwe w zakresie 15–50% zalecanego dziennego spożycia w formie: chlorowodoru tiaminy, monoazotanu tiaminy, ryboflawiny, 5-fosforanu sodowego ryboflawiny, chlorowodoru pirydoksyny, 5-fosforanu pirydoksyny, dwupalmitynianu pirydoksyny, kwas nikotynowy, amidu kwasu nikotynowego (Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 16 września 2010 r. w sprawie substancji wzbogacających dodawanych do żywności. *DzU* z 2010 r., nr 174, poz. 1184).

Tiaminą, ryboflawiną i niacyną producenci wzbogacają głównie produkty zbożowe, środki specjalnego żywienia przeznaczone dla dzieci i sportowców, koncentraty obiadowe, soki owocowe i owocowo-warzywne, napoje owocowe, napoje mleczne oraz jogurty, słodycze i koncentraty napojów. Witaminą B₆ natomiast wzbogacane są dodatkowo produkty mięsne, środki spożywcze medycznego przeznaczenia i żywność dla sportowców (Kunachowicz i in. 2004, Nowak i Żmudzińska-Żurek 2009). Wykazano jednak, że deklarowane przez producentów na etykietach produktów ilości witamin z grupy B nie zawsze są zgodne z ilościami rzeczywistymi oznaczonymi analitycznie (Jantarska in. 2007, Sicińska i in. 2013), a fakt ten może stwarzać ryzyko nadmiernego spożycia ww. witamin.

Innym sposobem uzupełniania niedoborowej diety w witaminy z grupy B dozwolonym przez *Codex Alimentarius* (1994) jest suplementacja. Suplementy diety są to środki spożywcze, uzupełniające normalną dietę, będące skoncentrowanym źródłem witamin lub składników mineralnych, lub innych substancji wykazujących efekt odżywczy lub inny fizjologiczny, pojedynczych lub złożonych, wprowadzanych do obrotu w formie umożliwiającej dawkowanie, w postaci: kapsułek, tabletek, drażetek i itp., saszetek z proszkiem, ampułek z płynem, butelek z kroplomierzem i w innych podobnych postaciach płynów i proszków przeznaczonych do spożywania w małych, odmierzonych ilościach jednostkowych, z wyłączeniem produktów mających właściwości produktu leczniczego w rozumieniu przepisów prawa farmaceutycznego (Ustawa z 25 sierpnia 2006 r. o bezpieczeństwie żywności i żywienia. *DzU* z 2006 r., nr 171, poz. 1225 ze zm.).

Suplementy diety mogą być stosowane w sytuacjach zwiększonego zapotrzebowania na składniki odżywcze u osób z: zaburzeniami łaknienia i/lub wchłaniania (u ludzi starszych, z chorobami przewodu pokarmowego), spożywających poniżej 1500–1600 kcal dziennie, stosujących diety ograniczające (np. odchudzające) lub eliminacyjne (np. weganie), kobiet ciężarnych, kobiet karmiących, kobiet po menopauzie (Kunachowicz i Troszczyńska 2005, Kubik i in. 2006, Jarosz i in. 2008) czy też osób ze zwiększonym wysiłkiem fizycznym.

Lekiem, a więc produktem leczniczym w rozumieniu prawa farmaceutycznego jest natomiast substancja lub mieszanina substancji przedstawiana jako mająca właściwości zapobiegania lub leczenia chorób występujących u ludzi lub zwierząt lub podawana w celu postawienia diagnozy, lub w celu przywrócenia, poprawienia lub modyfikacji fizjologicznych funkcji organizmu przez działanie farmakologiczne, immunologiczne lub metaboliczne. Produkt leczniczy musi wykazywać ściśle określoną moc, która wyrażana jest zawartością substancji czynnych w jednej dawce lub w przeliczeniu na jednostkę objętości lub masy, zależnie od farmaceutycznej postaci produktu. Produkt leczniczy musi także wykazywać odpowiednią aktywność biologiczną, tzn. siłę działania zawartej w nim substancji czynnej lub kilku substancji czynnych, wyrażoną w odpowiednich jednostkach międzynarodowych lub biologicz-

nych (Ustawa z 6 września 2001 r. – Prawo farmaceutyczne. *DzU* z 2004 r., nr 53, poz. 533, ze zm.).

Obecnie obserwuje się coraz częstsze stosowanie suplementacji diety, w tym m.in. witaminami z grupy B. Witaminy te są dostępne w sprzedaży zarówno w formie suplementów diety (Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 9 października 2007 r. *DzU* z 2007 r., nr 196, poz. 1425 ze zm.; Rozporządzenie Komisji (WE) nr 1170/2009 z dnia 30 listopada 2009 r. *DzU* z 2009 r. L 314/36 z 1.12.2009 r.: 36), jak i leków, które poza niacyną są dostępne bez recepty, jako tzw. leki OTC w aptekach oraz punktach obrotu pozaaptecznego (np. w sklepach wielkopowierzchniowych, na stacjach benzynowych). Niacyna jest sprzedawana tylko jako lek na receptę, ale wchodzi w skład ogólnie dostępnych preparatów wielowitaminowych lub/i preparatów mineralno-witaminowych, m.in. Vitaminum B-compex, Biovital, Centrum Komplete A-Z, Falvit, Bodymax Plus, Bodymax Senior, Geriavit Pharmaton, Maxivit, Vitaral, Vigor Complex, Vita-Miner itp.

Zarówno suplementy diety, jak i leki mają na celu utrzymanie zdrowia człowieka, jednak zadaniem suplementów jest utrzymanie stanu homeostazy w organizmie, a tym samym wzmacnianie organizmu do walki z potencjalną chorobą (Pietruszka i Brzozowska 2002). Pośrednio suplementy zapobiegają chorobom, ale nie jest to efekt bezpośredni, gdyż taki mogą wywoływać jedynie leki, które aplikowane są wówczas, gdy dochodzi do zaburzenia stanu homeostazy, czyli stanu choroby.

Pomimo że suplementacja diety jest najszybszą formą likwidowania niedoborów witaminowych, gdyż w krótkim czasie przywraca stan wysycenia organizmu i ustąpienie objawów hipowitaminozy, to jednak niekontrolowana nadkonsumpcja suplementów diety może stać się przyczyną pogorszenia zdrowia.

1.5. Częstość spożycia żywności wzbogacanej i/lub suplementów diety zawierających wybrane witaminy z grupy B oraz czynniki ją warunkujące

W ostatnich latach w krajach pozaeuropejskich i europejskich obserwuje się dynamiczny wzrost spożycia suplementów diety zawierających witaminy B₁, B₂, B₆ i niacynę, zarówno w formie preparatów witaminowych (jedno- i wielowitaminowych), jak i mineralno-witaminowych (Harrison i in. 2004, Lukaski 2004, Sebastian i in. 2007). Na częstość stosowania suplementów diety wpływają ich dostępność i cena, pora roku oraz wiek i styl życia osób zażywających te preparaty.

Z badań epidemiologicznych przeprowadzonych w USA w latach 1987–2000 wynika, że 33,9% osób powyżej 18. r.ż. stosowało suplementację diety (Millen i in. 2004), a już w 2010 roku aż 47% mężczyzn i 59% kobiet (Soni i in. 2010). W krajach azjatyckich suplementy diety stosuje ponad 52% kobiet i 42% mężczyzn powyżej 55. r.ż. (Chen i in. 2011). W krajach europejskich wśród osób dorosłych suplementy stosuje 6,7–60% kobiet i 0,5–54% mężczyzn (Flynn i in. 2009).

W Polsce suplementacja diety pod koniec lat 90. dotyczyła 25–75% społeczeństwa (Pietruszka i Brzozowska 1999), ale od tamtego czasu odsetek osób stosujących suplementację zwiększył się nawet do 89%, w zależności od okresu objętego badaniem oraz grupy populacyjnej (Szponar i in. 2004, Broda i Rywik 2005, Sygnowska i Waśkiewicz 2008, Tyrakowska i in. 2009).

W zakresie suplementacji diety witaminami B₁, B₂, B₆ i niacyną wykazano, że były one podawane przez rodziców 22–62,2% dzieci w wieku 3–15 lat (Cieślik i in. 2007, Szponar i in. 2007, Kolmaga i in. 2009, Kozioł-Kozakowska i in. 2009, Bylinowska i in. 2012). Samodzielnie suplementację stosowało natomiast 9–76% osób powyżej 16. r.ż. (Pietruszka i in. 2003, Charkiewicz i in. 2007, Babicz-Zielińska i Dąbrowska 2008, Michota-Kotulska i in. 2009, Rypina i in. 2009, Saran i Duda 2009, Sigłowa i in. 2009, Sygnowska i Waśkiewicz 2009, Biezanowska-Kopeć i in. 2010, Janieszewska i in. 2011, Cizek i Duma 2013, Gil i in. 2013). Z przytoczonego powyżej przeglądu piśmiennictwa wynika, że do osiągnięcia dojrzałości suplementy częściej stosowały dziewczęta niż chłopcy, natomiast w późniejszych latach życia częściej chłopcy i mężczyźni. Biorąc pod uwagę stan fizjologiczny, wykazano natomiast, że suplementację diety ww. witaminami stosowało 55% kobiet przed ciążą, 48% w czasie jej trwania oraz 48% kobiet karmiących (Wawrzyniak i in. 2009a, Hamułka i in. 2010). Suplementację diety witaminami z grupy B stosowały również osoby o zwiększonej aktywności fizycznej, tj. 18–29% tancerzy w wieku 16–20 lat, 87% gimnastyczek artystycznych i gimnastyków sportowych w wieku 15–22 lat, 65% osób trenujących sztuki walki oraz 70,2% lekkoatletów (Czaja i in. 2008, Wróblewska i Smoleń 2009, Żyngiel i in. 2013).

Z przeglądu literatury przedmiotu wynika, że powody stosowania suplementacji witaminami z grupy B mogą być różne w zależności do wieku respondentów. Około 41–43% dzieci w wieku 7–12 lat otrzymywało od rodziców ww. witaminy z powodu przekonania o ich korzystnym wpływie na zdrowie, a także przeświadczenia o niepełnowartościowej diecie dziecka (Kozyska i in. 2010). W okresie licealnym powodami stosowania suplementacji diety było głównie uzupełnienie ich niedoboru w organizmie, poprawa stanu włosów, skóry i paznokci oraz uprawianie aktywności fizycznej (Gil i in. 2013). U osób dorosłych powodami stosowania suplementów były: osłabienie fizyczne, wspomaganie organizmu w walce z chorobą, niedobory witaminowe, zmęczenie, poprawa wyglądu i stanu powłoki skórnej, poprawa koncentracji i sprawności umysłowej oraz redukcja masy ciała (TNS OBOP, www.tns-global.pl, dostęp 20.06.2006, Babicz-Zielińska i Dąbrowska 2008). Osoby starsze (>60. r.ż.) natomiast zadeklarowały stosowanie suplementacji diety ze względu na: poprawę stanu zdrowia i samopoczucia, poprawę kondycji fizycznej, wspomaganie terapii farmakologicznej, uzupełnienie niedoborów w diecie (Rypina i in. 2009, Saran i Duda 2009).

Suplementacja diety powinna odbywać się ze wskazań medycznych wówczas, gdy występują kliniczne objawy niedoboru lub zaistnieje realne zagrożenie takim niedoborem. Jak wykazały jednak badania, takim zaleceniem stosowanie suplementacji diety witaminami B₁, B₂, B₆ i niacyną uzasadnia: 3–31,3% rodziców dzieci w wieku 6–12 lat, 10–93,5% osób powyżej 15. r.ż., 90% kobiet ciężarnych oraz 72% kobiet karmiących (Babicz-Zielińska i Dąbrowska 2008, Rypina i in. 2009, Saran i Duda 2009, Wawrzyniak i in. 2009b, Hamułka i in. 2010,

Kozyrska i in. 2010, Janieszewska i in. 2011, Kościółek i in. 2011, Bylinowska i in. 2012, Ciszek i Duma 2013).

Na własną odpowiedzialność decyzję o stosowaniu suplementów u dzieci w wieku 6–12 lat podejmowało 61–66,9% rodziców oraz 59,7% studentów (Kozyrska i in. 2010, Bylinowska i in. 2012, Ciszek i Duma 2013). Suplementację diety stosowało pod wpływem: reklamy (18,1–46,1% dorosłych osób); sugestii farmaceuty (1,9% rodziców dzieci w wieku 6–12 lat i 11,5% studentów) lub znajomych (2,8% studentów). Składem i ceną suplementów natomiast kierowali jedynie uczniowie szkół policealnych, co związane było z ich statusem materialnym (Ulatowska-Szostak 2008, Kościółek i in. 2011, Bylinowska i in. 2012, Ciszek i Duma 2013).

Niepokojące jest, że wielkość dawki stosowanej suplementacji często przekracza (od kilku do kilkudziesięciu razy) zalecane ilości dziennego zapotrzebowania na witaminy z grupy B. Wynika to z zawartości tych witamin w suplementach. W roku 2009 IŻŻ opiniowało 100 suplementów diety, w których zawartość tiaminy stanowiła 255% RDA; ryboflawiny 214% RDA; pirydoksyny 707% RDA oraz niacyny 1250% RDA, co przekraczało wartość UL (Stoś i in. 2011).

Tak znaczna zawartość witamin w suplementach może powodować u osób je zażywających bez wyraźnych wskazań medycznych niepotrzebnie zjawisko hiperalimentacji i wywoływać niekorzystne objawy spowodowane ich nadmiarem. Jak wykazały badania, tylko 36–66% osób stosujących suplementy diety znało zagrożenia wynikające z ich nadmiernego stosowania (częściej kobiety niż mężczyźni) (Schlegel-Zawadzka i Barteczko 2009, Krasnowska i Sikora 2011). Być może wynika to z chęci czerpania przez osoby zażywające suplementy diety informacji ze specjalistycznych źródeł o rodzaju, formie, działaniu suplementów i skutkach ich nadmiernego stosowania.

Badania wykazały, że głównymi źródłami informacji dotyczących suplementów diety dla osób je stosujących, w zależności od wieku, byli: znajomi i rodzina, internet, reklama, prasa i telewizja, lekarze, farmaceuci, książki medyczne oraz dietetyk (Rypina i in. 2009, Schlegel-Zawadzka i Barteczko 2009, Janieszewska i in. 2011, Kościółek i in. 2011, Ciszek i Duma 2013, Gil i in. 2013). Kobiety ciężarne i karmiące informacje uzyskiwały: od lekarza, z prasy kobiecej i specjalistycznej dla matek oraz z mediów (Wawrzyniak i in. 2009a, Hamułka i in. 2010). Zawodnicy sportów walki informacje na temat suplementów czerpali natomiast: z internetu, od znajomych, trenerów oraz książek i zaleceń żywieniowych (Wróblewska i Smoleń 2009).

Z pozyskiwaniem rzetelnej informacji o suplementach diety wiąże się miejsce ich zakupu. Zarówno studenci, jak i osoby starsze dokonywały zakupu witamin głównie w: aptece stacjonarnej lub internetowej, sklepie zielarskim, internecie oraz hipermarketach (Janieszewska i in. 2011, Spiótek i in. 2011, Ciszek i Duma 2013), co potwierdza wyniki raportu opracowanego przez firmę PMR *Rynek suplementów diety w Polsce 2014. Prognozy rozwoju na lata 2014–2018*. Wynika z niego również, że wartość sprzedaży suplementów diety w Polsce w 2013 roku wzrosła o 9%, biorąc pod uwagę sprzedaż apteczną, pozaapteczną i przez internet, w stosunku do roku 2012. Według szacunków ww. firmy w 2013 roku motorem rynku był ponownie kanał pozaapteczny, w którym sprzedaż wzrosła o około 16%, co jednak nie sprzyja uzyskiwaniu rzetelnej informacji o suplementach.

Istotna, z punktu widzenia zachowania homeostazy ustroju, jest ilość spożytych witamin z grupy B, szczególnie u osób, które poza suplementacją diety spożywają (świadomie lub nieświadomie) również produkty żywnościowe wzbogacane nimi. Na fakt ten zwrócili uwagę Kozyrska i in. (2010), którzy stwierdzili, że około 18% dzieci (w wieku 7–12 lat) otrzymywało od rodziców suplementy diety równocześnie z produktami wzbogacanymi w witaminy. Podobne zjawisko wykazali Wierzejska i in. (2012) u kobiet ciężarnych. W takich sytuacjach istnieje największe ryzyko hiperalimentacji, przekroczenia dawek bezpiecznych dla organizmu człowieka i w konsekwencji istnieje możliwość wystąpienia niekorzystnych objawów zdrowotnych (Bylinowska i in. 2012).

Niekontrolowana, nadmierna suplementacja diety może również niekorzystnie wpływać na wchłanianie i metabolizm innych składników odżywczych, zarówno znajdujących się w diecie, jak i suplementach, powodując rozregulowanie homeostazy ustroju. Składniki suplementów diety mogą być przyczyną powikłań farmakologicznych u osób przyjmujących leki z powodu możliwych interakcji pomiędzy składnikami a lekami. Istotne jest również współdziałanie synergistyczne lub antagonistyczne występujące pomiędzy witaminami z grupy B a innymi witaminami i/lub składnikami mineralnymi, co jest szczególnie istotne przy korzystaniu z preparatów wielowitaminowych lub mineralno-witaminowych. Udowodnione jest synergistyczne współdziałanie samych witamin: tiaminy z witaminami E, C, B₆, B₁₂, niacyną, B₅, A, B₁₀ i B₂; ryboflawiny z witaminami A, niacyną i B₁₀; pirydoksyny z witaminami E, A, B₁, niacyną, B₅, B₁₂, B₁₀ oraz niacyny z witaminami B₁, B₂, B₆, A, B₅, E, B₁₀. Synergistyczne współdziałanie występuje również pomiędzy wybranymi witaminami z grupy B a składnikami mineralnymi: tiaminy z Se, Co, Na, K, Fe, Mn, Mg, Cu, Zn, P; ryboflawiny z Fe, P, Mg, Zn, K, Cr; pirydoksyny z Zn, Cr, Mg, Na, K, P, Fe, Mn, Se; niacyny z Zn, K, Fe, P, Mg, Mn, Na, Cr oraz Se (Watts 1990).

Zarówno przekroczenie górnych bezpiecznych poziomów witamin, jak i brak rzetelnej informacji na etykiecie preparatu dotyczącej przeciwwskazań do jego stosowania, możliwości interakcji z innymi składnikami żywności lub lekami, stosowania dwóch lub większej liczby suplementów diety jednocześnie może wiązać się z ryzykiem wystąpienia niekorzystnych działań na organizm (Krasnowska i Sikora 2011). W przypadku potrzeby suplementacji diety dawką terapeutyczną zaleca się stosowanie preparatu jednoskładnikowego, ustalając wielkość dawki i czas jej stosowania z lekarzem. Badania Kozyrskiej i in. (2010) wykazały jednak, że 3–21% dzieci w wieku 7–12 lat otrzymywało po 2–3 różne suplementy od rodziców. W badaniach przeprowadzonych wśród osób powyżej 50. r.ż. wykazano, że suplementację jednoczesną więcej niż jednym preparatem przyjmowało ponad dwie trzecie osób, natomiast ponad 57% badanych zażywało suplementy razem z lekami (Kałuża i in. 2004, Sebastian i in. 2007, Janieszewska i in. 2011). Podobnie 4,7–22% ciężarnych kobiet stosowało kilka preparatów jednocześnie, dostarczając zbyt dużych ilości witamin B₂ i B₆, aż do 1050% dziennego zapotrzebowania (Hamułka i in. 2010, Wierzejska i in. 2012).

Suplementacja diety powinna być prowadzona zarówno ze wskazań medycznych, jak i tylko do czasu wyrównania stwierdzonych wcześniej laboratoryjnie niedoborów. Nie znajduje to jednak odzwierciedlenia w licznych danych literaturowych. Jak wykazano, codziennie przez okres roku suplementy zawierające witaminy z grupy B spożywały dzieci, młodzież szkolna

oraz akademicka (Babicz-Zielińska i Dąbrowska 2008, Koziół-Kozakowska i in. 2009, Siągłowa i in. 2009, Ciszek i Duma 2013, Gil i in. 2013). Rzadziej, przez okres 3–4 miesięcy, suplementy spożywały dzieci w wieku 6–12 lat, a przez okres 1–6 miesięcy lub powyżej roku osoby powyżej 60. r.ż. (Kozyrska i in. 2010, Janieszewska i in. 2011).

Na podstawie przytoczonych danych literaturowych można stwierdzić, że zwiększająca się na rynku liczba dostępnych produktów wzbogacanych w witaminy z grupy B oraz suplementów diety, jak również rosnący odsetek osób spożywających te produkty wskazuje na celowość uwzględnienia tego zjawiska w badaniach żywieniowych.

1.6. Aktualny stan wiedzy o sumarycznym wpływie obecnej w diecie sacharozy i wybranych witamin z grupy B na wybrane tory metaboliczne ustroju

Witaminom z grupy B w badaniach naukowych poświęcano uwagę przede wszystkim ze względu na możliwe ich niedobory i negatywne skutki zdrowotne, tak u ludzi w różnych stanach fizjologicznych, jak i u różnych gatunków zwierząt. W badaniach określano głównie ich wpływ na parametry biochemiczne krwi i tkanek, przemiany metaboliczne i tolerowane górne poziomy spożycia.

Badania mające na celu ocenę wpływu zwiększonego spożycia syntetycznych form witamin z grupy B, w tym również w postaci suplementów diety, dotyczyły natomiast najczęściej wpływu pojedynczych witamin lub ich kompleksów, a uzyskiwane wyniki często wskazywały na niekorzystne efekty takiego spożycia (Earnest i in. 2003). Wykazano m.in., że zwiększone dawki witaminy B₆ są cytotoksyczne, a jej stosowanie razem tiaminą wykazuje działanie prooksydacyjne (Hu i in. 1995, Perry i in. 2004). Stosowanie natomiast niefizjologicznych dawek niacyny prowadzi do hiperhomocysteinemii (Basu i in. 2002).

Nie prowadzono jednak dotychczas badań, w których uwzględniano zarówno ponadnormatywne spożycie z dietą cukrów prostych (sacharozy), jak i jednoczesną suplementacją diety witaminami B₁, B₂, B₆ i niacyną. W Zakładzie Fizjologii Żywienia Człowieka Wydziału Nauk o Żywności i Rybactwa Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie opracowano taki układ doświadczenia z udziałem zwierząt modelowych, który do pewnego stopnia imituje zachowania żywieniowe współczesnego społeczeństwa. Z prowadzonych w zakładzie od wielu lat badań na modelu zwierzęcym wynika, że przy zmodyfikowaniu składu diety, polegającym na izokalorycznym zastąpieniu składników całościowych (pełnych ziaren pszenicy i kukurydzy) białą mąką i sacharozą, suplementacja tak zmienionej diety witaminami B₁, B₂, B₆ i niacyną nie tylko nie niweluje niekorzystnych zmian w ustroju, ale często je nasila. W badaniach tych stwierdzono m.in.: zwiększone przyrosty masy ciała szczurów na jednostkę spożytej paszy, gromadzenie wisceralnej tkanki tłuszczowej i zmianę składu jej kwasów tłuszczowych oraz zmiany w: profilu kwasów tłuszczowych w wątrobie, profilu lipidowym krwi, stężeniu białka całkowitego i jego frakcjach oraz zawartości selenu w wątrobie i mięśniach. Obserwowano ponadto we krwi i w wątrobie szczurów istotne zmiany aktywności enzymów antyoksydacyjnych (CuZn-SOD, CAT, GPx i GR) oraz stężeń nieenzymatycznych

składników antyoksydacyjnych (GSH i grup sulfhydrylowych-SH), którym towarzyszył istotny wzrost stężenia produktów peroksydacji lipidów we krwi (MDA), a także istotne obniżenie wartości wskaźnika całkowitego statusu antyoksydacyjnego (TAS) (Friedrich i in. 2005, Friedrich i Dolot 2009, 2010, Friedrich i Goluch-Koniuszy 2009, Friedrich i in. 2009, Friedrich in. 2011, Goluch-Koniuszy i in. 2011, Goluch-Koniuszy i Wierzbicka 2011, Goluch-Koniuszy 2012).

Obserwowane w powyżej przytoczonych badaniach zmiany w ustroju zwierząt modelowych pod wpływem zastosowanych czynników doświadczalnych wskazywały na wzrost natężenia reakcji wolnorodnikowych i stały się przyczynkiem do podjęcia prezentowanych w tej pracy badań, gdyż wykazano już, że spożycie cukrów prostych już w ilości 10% WED diety przyczynia się do powstawania hiperglikemii generującej produkcję RFT, a tym samym rozwoju stresu oksydacyjnego, który może implikować procesy prozapalne (Zhang i in. 2003, Delbosc i in. 2005).

Reasumując, najnowsze wyniki badań dostarczają danych do postawienia hipotezy, że wisceralna i nasierdziowa tkanka tłuszczowa mogą być źródłem procesu zapalnego (Mazurek i in. 2008, Fox i in. 2009), a wzrost natężenia procesów wolnorodnikowych wywołany m.in. spożyciem cukrów prostych (Evans i in. 2002) uznawany jest za jeden z niezależnych czynników uszkodzających i implikujących powstawanie procesów zapalnych, z tego względu interesujące było zbadanie, czy zmiana składu diety i jej suplementacja wybranymi witaminami z grupy B (o działaniu pro- lub antyoksydacyjnym) mogą się przyczyniać do powstawania ogólnych i miejscowych procesów zapalnych indukujących miażdżycę.

2. Cel pracy

Celem pracy była ocena wpływu zmodyfikowania składu diety (polegającego na izokalorycznym zastąpieniu pełnych ziaren pszenicy i kukurydzy białą mąką typ 500 i sacharozą) oraz różnych sposobów uzupełniania tak zmienionej diety wybranymi witaminami, których została pozbawiona (B₁, B₂, B₆, niacyna), na ryzyko powstawania miejscowych i ogólnych procesów zapalnych. Badania przeprowadzono na modelu zwierzęcym.

Hipoteza: uzupełnianie przetworzonej i oczyszczonej diety wybranymi witaminami z grupy B, o które została ona zubożona, może – przez implikowanie stresu oksydacyjnego oraz stymulowanie gromadzenia nasierdziowej i wisceralnej tkanki tłuszczowej – prowadzić do miejscowego i ogólnego procesu zapalnego.

Cel główny postanowiono osiągnąć, realizując cele cząstkowe polegające na ocenie:

- wielkości spożycia paszy, witamin z grupy B, wybranych składników mineralnych oraz kwasów tłuszczowych,
- przyrostów masy ciała,
- bilansu płynów,
- zawartości nasierdziowej i okołonarządowej tkanki tłuszczowej,
- masy serca i wątroby oraz podstawowego składu chemicznego tkanki mięśniowej i wątrobowej,
- parametrów morfologicznych krwi,
- wybranych parametrów gospodarki węglowodanowej,
- wybranych parametrów gospodarki białkowej,
- wybranych parametrów gospodarki lipidowej,
- obrazu histopatologicznego wątroby,
- wybranych markerów stresu oksydacyjnego,
- stężenia wybranych cytokin prozapalnych oraz chemokin.

Potwierdzenie hipotezy może dać podstawę do weryfikacji: decyzji podejmowanych przez producentów żywności o wzbogacaniu swoich produktów w te witaminy; zalecanego obecnie dawkowania tych witamin (wielokrotnie przekraczającego dzienne zapotrzebowanie); stosowania nieuzasadnionej i niekontrolowanej suplementacji diety oraz przemawiać za promowaniem spożywania produktów spożywczych naturalnie bogatych w te witaminy.

3. Materiał i metody badań

3.1. Skład pasz użytych w doświadczeniu

Granulowane pasze o średnicy 12 mm zostały przygotowane i wyprodukowane z tych samych, poza różnicującymi, komponentów po wdrożeniu procedury 5.14.5. „Czyszczenie maszyn i urządzeń” (zabezpieczającej przed zanieczyszczeniami różnych partii wyprodukowanych mieszanek) przez Wytwórnę Pasz i Koncentratów „Morawski” w Kcyni. Pasza podstawowa (PP), przeznaczona dla grupy kontrolnej (pierwszej) zwierząt (Labofed B), odpowiadała wymaganiom stawianym diecie AIN-93 (Reeves i in. 1993) i zawierała m.in. pełne ziarna pszenicy i kukurydzy. W paszy zmodyfikowanej (PZ), przeznaczonej dla grup: drugiej, trzeciej i czwartej, 83,5% pszenicy obecnej w PP zastąpiono mąką pszenną (typ 500), a 50% kukurydzy – sacharozą, co stanowiło rekomendowane przez WHO (2015) dopuszczalne spożycie 10% WED. Skład zastosowanych w doświadczeniu pasz przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Skład surowcowy pasz zastosowanych w doświadczeniu (g/100 g)

Nazwa komponentu	Pasza podstawowa (PP)	Pasza zmodyfikowana (PZ)
Pszenica	36,4	6,0
Kukurydza	20,0	10,0
Otręby pszenne	20,0	20,0
Serwatka suszona	3,0	3,0
Śruta sojowa 48% ¹⁾	17,0	17,0
Fosforan 1-Ca ²⁾	0,27	0,27
Kreda pastewna ³⁾	2,0	2,0
Sól pastewna ⁴⁾	0,27	0,27
Premiks LRM ⁵⁾	0,8	0,8
Mąka pszenna typ 500	–	30,4
Sacharoza	–	10,0

¹⁾ Śruta sojowa 48% – poekstrakcyjna, zawierająca 48% białka i 7% błonnika.
²⁾ Fosforan 1-CA – dodatek paszowy, zawiera minimum 22% P i 15% Ca.
³⁾ Kreda pastewna – zawiera w kg: 350 g Ca, 3,20 g Mg; 10,00 mg Na, 15,00 mg P.
⁴⁾ Sól pastewna – NaCl.
⁵⁾ Premiks LRM zawiera w kg (IU): 1 500 000 A, 100 000 wit. D₃; (mg): 8000 wit. E; 300 wit. K, 1200 wit. B₁, 1200 wit. B₂, 1000 wit. B₆, 8 wit. B₁₂, 100 Se, 16 000 Fe, 4500 Mn, 6000 Zn, 1300 Cu, 100 J, 200 Co.

Przed rozpoczęciem doświadczenia wykonano analizy podstawowego składu chemicznego pasz zastosowanych w doświadczeniu (tabela 2); obejmowały oznaczenie zawartości według AOAC (2012):

- azotu ogólnego metodą Kjeldahla w aparacie Kjeltex 2100 firmy Foss Tecator (PN-A-04018:1975), otrzymane wartości przeliczono na ilość białka, stosując współczynnik 6,25;
- tłuszczu surowego metodą Soxhleta w aparacie Soxtec HT6 Foss Tecator (PN-ISO 1444-2000);

- suchej masy metodą wagową po wysuszeniu próbki w temperaturze 100–105°C przez 12 h w suszarce laboratoryjnej WTS E16-6/500 (PN-ISO 1442:2000);
- popiołu metodą wagową po spaleniu próbki w piecu muflowym CZYŁOK SM 946 w temperaturze 550°C przez 10 h (PN-ISO 936:2000);
- włókna surowego metodą wagową (PB-02/PS), z wykorzystaniem aparatu ANKOM 220.

Zawartość węglowodanów w paszach PP i PZ wyliczono z różnicy pomiędzy suchą masą a sumą pozostałych składników stałych. Ilość dostarczonej energii brutto i energii metabolicznej wyliczono z wykorzystaniem powszechnie stosowanych równoważników energetycznych (FAO 2003). Wartość energetyczną brutto obliczono, wykorzystując równoważniki fizyczne: dla białka ogólnego – 23,6 kJ/g, dla tłuszczu – 39,6 kJ/g oraz dla węglowodanów – 17,4 kJ/g, natomiast energię metaboliczną obliczono, przyjmując równoważniki Atwatera netto: dla białka – 16,76 kJ/g, dla tłuszczu – 37,71 kJ/g i dla węglowodanów – 16,76 kJ/g.

Tabela 2. Skład chemiczny pasz zastosowanych w doświadczeniu oraz ich wartość energetyczną

Składnik	PP	PZ
Białko ogółem (g/100 g)	19,7	18,6
Tłuszcz surowy (g/100 g)	2,8	2,3
Węglowodany (g/100 g)	61,5	64,3
Włókno surowe (g/100 g)	2,91	2,73
Sucha masa (g/100 g)	90,6	91,4
Popiół ogółem (g/100 g)	6,61	6,17
Energia brutto (kJ/g)	16,4	16,4
Energia metaboliczna (kJ/g)	14,64	14,71

W paszach oznaczono również zawartość:

1. Witamin B₁, B₂, B₆ i niacyny metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej HPLC; próbki ekstrahowano amoniakiem w roztworze dimetylosulfotlenku i kwasu octowego. Analizę wykonywano za pomocą aparatu Agilent 1200SL z DAD (detektorem diodowym), z użyciem kolumny LUNA C18 (2), 5 µm, 250 × 4,6 mm w następujących warunkach chromatograficznych: faza ruchoma: gradient B – acetonitril + A – octan potasu; szybkość przepływu 1,5 ml/min, długość fali 273 nm.
2. Wapnia, magnezu, cynku, sodu, potasu i żelaza (PN-EN ISO 6869:2002 bez pkt. 8.1–8.4, PN-EN 14084:2004, pkt. 6.2) metodą absorpcyjnej spektrometrii atomowej AAS.
3. Chromu metodą spektrometrii atomowej emisyjnej ze wzbudzeniem w plazmie sprężonej indukcyjnie ICP-AES po spalaniu prób w piecu mikrofalowym (MDS 2000) w stężonym kwasie azotowym w bombach teflonowych, a oznaczenia dokonano w aparacie ICP-AES Jobin Yvan JY-24.
4. Kwasów tłuszczowych zmodyfikowaną metodą Folcha (ekstrakcja mieszaniną chloroform-metanol (2 : 1), hydroliza wodorotlenkiem sodu w metanolu, metylacja fluorkiem boru w metanolu), a otrzymane estry kwasów tłuszczowych przeprowadzono do warstwy heptanowej. Do rozdziału użyto chromatografu gazowego 450-GC firmy Varian z detektorem FID, wyposażonego w kolumnę CP-SIL 88 (100 m × 0,25 mm). Warunki pracy chromatografu: gaz nośny – hel, temperatura dozownika 200°C, temperatura detektora 240°C, temperatura kolumny – programowana (60–220°C).

Wyżej wymienione oznaczenia wykonano w akredytowanym Krajowym Laboratorium Pasz, Państwowy Instytut Badawczy, Instytutu Zootechniki w Szczecinie oraz w Katedrze Żywienia Zwierząt i Paszoznawstwa Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie. Uzyskane wyniki przedstawiono w tabelach 3 i 4.

Tabela 3. Zawartość wybranych witamin z grupy B oraz składników mineralnych w paszach zastosowanych w doświadczeniu (mg/100 g)

Składnik	PP	PZ	Różnica w zawartości składników	
			mg	%
Tiamina (B ₁)	2,5	0,62	1,88	75,2
Ryboflawina (B ₂)	2,1	1,14	0,96	45,7
Pirydoksyna (B ₆)	2,35	1,35	1	42,5
Niacyna	8,6	4,8	3,8	44,2
Na	1130	1060	70	6,2
K	9760	8960	800	8,2
Ca	1370	1280	90	6,6
Mg	200	180	20	10,0
Zn	10,3	8,98	1,32	12,8
Fe	25,2	21,3	3,9	15,5
Cr	0,451	0,209	0,242	53,7

Tabela 4. Zawartość kwasów tłuszczowych w paszach zastosowanych w doświadczeniu (% w sumie kwasów)

Kwas tłuszczowy	PP	PZ	Różnica w zawartości kwasów
Nasycone kwasy tłuszczowe			
Mirystynowy C14	0,39	0,25	0,14
Palmitynowy C16	21,7	16,2	5,5
Stearynowy C18	3,69	2,23	1,46
Jednonienasycone kwasy tłuszczowe			
Palmitooleinowy C16:1, n-7	0,82	0,57	0,25
Oleinowy C18:1, n-9	35,56	24,33	11,23
Eikozanowy C20:1, n-9	0,32	0,24	0,08
Erukowy C22:1, n-9	0,09	0,04	0,05
Wielonienasycone kwasy tłuszczowe			
α-Linolenowy C18:3, n-3	4,64	4,20	0,44
Eikozapentaenowy C20:5, n-3	0	0	0
Dokozaapentaenowy C22:5, n-3	0	0	0
Dokozaheksaenowy C22:6, n-3	0,05	0	0,05
Ogółem n-3	4,69	4,20	0,49
Linolowy C18:2, n-6	42,47	38,95	3,52
Eikozadienowy C20:2, n-6	0	0	0
Dihomo-γ-linolenowy C20:3, n-6	0	0	0
Arachidonowy C20:4, n-6	0,28	0,09	0,19
Ogółem n-6	42,75	39,04	3,71
Niezidentyfikowane	1,75	1,09	0,66
Nasycone	25,78	18,68	7,1
Jednonienasycone	36,79	25,18	11,61
Wielonienasycone	47,44	43,24	4,2
n-6/n-3	9,12	9,30	0,18

3.2. Materiał badawczy i warunki doświadczenia

Badania, po uzyskaniu zgody Lokalnej Komisji Etycznej (nr zgody 2/2010), przeprowadzono na 40 zdrowych samcach szczura szczepu WISTAR w wieku pięciu miesięcy, o wyjściowej masie ciała $428,7 \pm 50,9$ g, pochodzących z hodowli Zwierzętarńi Katedry i Zakładu Toksykologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Zwierzęta przebywały w indywidualnych klatkach, w wiwarium Zakładu Fizjologii Żywnienia Człowieka (temperatura 21–22°C, wilgotność względna powietrza 55–60%, cykl jasność/ciemność 12/12 h).

Masę ciała zwierząt kontrolowano raz na tydzień z wykorzystaniem wagi WLC 6/AD firmy Radwag. W piątym tygodniu doświadczenia zwierzęta umieszczano w klatkach semimetabolicznych firmy Tecniplast. Po 48-godzinnym kondycjonowaniu w klatkach metabolicznych przeprowadzano dobową zbiórkę moczu zwierząt celem wyliczenia bilansu wodnego.

Całkowity przyrost masy ciała w ciągu sześciu tygodni doświadczenia wyliczono z różnicy pomiędzy masą ciała końcową a masą początkową.

Na 12 h przed zakończeniem doświadczenia zwierzętom odstawiono paszę. Zwierzęta usypiano anestetykiem Ketanest (Pfizer International Pharmaceuticals) podawanym domięśniowo, w dawce 10 mg/kg masy ciała, a następnie pobierano krew z serca. Na bieżąco, zaraz po uśmierceniu zwierząt, wypreparowywano narządy oraz tłuszcz nasierdziowy i okołonarządowy, które ważono z dokładnością do 0,001 g na wadze WPS 360 firmy Radwag.

3.3. Żywnienie i pojenie zwierząt

Po tygodniowym okresie kondycjonowania w warunkach wiwarium (woda do picia oraz pasza podstawowa) zwierzęta podzielono na cztery równoliczne grupy żywieniowe (po dziesięć osobników), które żywiono przez sześć tygodni doświadczenia *ad libitum* paszami: pierwsza grupa otrzymywała paszę podstawową (PP), a grupy: druga, trzecia i czwarta – paszę zmodyfikowaną (PZ). W trakcie doświadczenia (codziennie o tej samej porze pomiędzy godz. 8:00 a 9:00) monitorowano ilość spożytej paszy. Całkowitą ilość paszy spożytej przez zwierzęta obliczano przez odjęcie od masy paszy zadanej do karmników masy niewyjadów (paszy, która została w karmniku, oraz tej, która spadła na dno klatki).

Zwierzęta z pierwszej grupy (PP) i drugiej (PZ) otrzymywały do picia odstanną wodę wodociągową, a zwierzęta z trzeciej grupy (PZ + suplementacja uzupełniająca SU) oraz czwartej (PZ + suplementacja nadmiarowa SN) w porze wzmożonej aktywności otrzymywały 25 ml wodnego roztworu witamin: B₁ (*Thiamini hydrochloridum*), B₂ (*Riboflavinum*), B₆ (*Pyridoxinum hydrochloricum*), niacyny (*Nicotinamidum*), które pochodziły z ogólnie dostępnych preparatów farmaceutycznych. Zwierzęta z trzeciej grupy (PZ + SU) otrzymywały w roztworze wodnym następujące ilości witamin: 0,94 mg B₁, 0,48 mg B₂, 0,5 mg B₆, 1,9 mg niacyny, a zwierzęta z czwartej grupy (PZ + SN) otrzymywały: 3,1 mg B₁, 2,3 mg B₂, 2,4 mg B₆ oraz 6,65 mg niacyny. Witaminy podawano w ilościach wyliczonych dla sposobu suplementacji, tak aby w trzeciej grupie (PZ + SU) uzupełnić różnice powstałe po zamianie składników diety (imitujące wzbogacanie żywności). W czwartej grupie (PZ + SN) uwzględniono zarówno

różnice w zawartości witamin pomiędzy PP i PZ, jak i ilość 2–4-krotnie przekraczającą normy RDA dla ludzi w przeliczeniu na zapotrzebowanie dla szczura, co imitowało suplementowanie diety przez ludzi dawką profilaktyczną tych witamin zawartą w preparatach farmaceutycznych typu B-compositum lub B-complex. Sumarycznie podawana ilość witamin w tej grupie przekraczała 2–4-krotnie (w zależności od rodzaju witaminy: B₁ – 2,3 razy, B₂ – 3,8 razy, B₆ – 3,8 razy, niacyny – 2,5 razy) zalecane dzienne spożycie. Po wypiciu roztworu z witaminami zwierzęta dopajano czystą, odstanną wodą wodociągową.

W trakcie sześciu tygodni doświadczenia codziennie o tej samej porze (8:00–9:00) na bieżąco mierzono ilość wypijanych płynów.

3.4. Metody badań

3.4.1. Analizy wybranych składników pełnej krwi i surowicy

Przed wirowaniem w pełnej krwi obwodowej pobranej do polipropylenowych probówek na EDTA oznaczono liczbę wybranych parametrów morfologicznych krwi, które mogą być wskaźnikami zachodzących procesów prozapalnych. Oznaczenie wykonano metodą konduktometryczną za pomocą analizatora hematologicznego Sysmex F-800 (ICN-Instruments-Polska).

Po odwirowaniu skrzepu (w temperaturze 4°C, przy prędkości 3500 U*min⁻¹ przez 20 minut) w wirówce MPW-350R w uzyskanej surowicy oznaczono:

1. Stężenie żelaza, które jest markerem procesu zapalnego zachodzącego z udziałem wolnych rodników tlenowych, metodą spektrofotometryczną z ferene, z wykorzystaniem biotestu firmy BioMaxima (nr kat. 1-418-0150), w spektrofotometrze Metertech SP-8001.
2. Stężenie wybranych parametrów gospodarki węglowodanowej w celu zaobserwowania możliwych zmian metabolizmu glukozy, jak i czynności glukostatycznej wątroby:
 - stężenie glukozy metodą spektrofotometryczną, przy użyciu biotestu firmy BioSystems (nr kat. 11803), w spektrofotometrze Metertech SP-8001 firmy Medson;
 - stężenie insuliny metodą ELISA, z wykorzystaniem zestawu Insulin rat ELISA DE2048, na czytniku płytek EnVision firmy PerkinElmer Inc;
 - stężenie kortykosteronu, stymulującego wzrost stężenia glukozy przez udział w procesie glikogenezy i glukoneogenezy, hamowanie uwalniania insuliny i możliwość powodowania insulinooporności; stężenie kortykosteronu oznaczono metodą ELISA, z wykorzystaniem zestawu Corticosterone rat/mouse DEV9922 firmy Demeditec, na czytniku płytek EnVision firmy PerkinElmer Inc.
3. Stężenie wybranych parametrów gospodarki białkowej jako pośrednich markerów przewlekłych i ostrych procesów zapalnych oraz wskaźników czynności metabolicznej wątroby:
 - stężenie białka całkowitego metodą biuretową, z wykorzystaniem biotestu firmy BioSystems (nr kat. 115720), w spektrofotometrze Metertech SP-8001 firmy Medson;
 - stężenie frakcji białkowych (albumin, α₁-, α₂-, β- i γ-globulin) metodą rozdziału elektroforetycznego, w komorach i na żelu agarozowym firmy Cormay (Cormay Gel Protein 100, nr kat. 6-048), a odczytu dokonano z wykorzystaniem densytometru DT-93;

- stężenie apolipoproteiny A-I (apoA-I) i apolipoproteiny B (apoB) metodą immunowytrącania w fazie ciekłej z wykrywaniem nefelometrycznego punktu końcowego, z wykorzystaniem zestawów Turbox Apolipoprotein A-I (nr kat. 67561) i Turbox Apolipoprotein B (nr kat. 67562), w analizatorze Turbox Plus firmy Orion Diagnostica;
 - aktywność aminotransferazy asparaginowej (AST EC 2.6.1.2.) i alaninowej (ALT EC 2.6.1.1) metodą kinetyczną, z wykorzystaniem biotestu BioSystem (nr kat. 11830 i 11832), w spektrofotometrze Media Bio firmy Marcel;
4. Stężenie wybranych parametrów gospodarki lipidowej jako pośrednich markerów procesów prozapalnych oraz jako odzwierciedlenie stanu czynnościowego wątroby:
- stężenie triacylogliceroli (TG) metodą enzymatyczną, z wykorzystaniem biotestu firmy BioSystems (nr kat. 11828), w spektrofotometrze Metertech SP-8001 firmy Medson;
 - stężenie cholesterolu całkowitego (TC) metodą enzymatyczną, z wykorzystaniem biotestu firmy BioSystems (nr kat. 11805), w spektrofotometrze Metertech SP-8001 firmy Medson;
 - stężenie frakcji HDL-cholesterolu (HDL-C) metodą strąceniową, z wykorzystaniem biotestu firmy BioSystems (nr kat. 11648), w spektrofotometrze Metertech SP-8001 firmy Medson;
 - stężenie frakcji LDL-cholesterolu metodą bezpośrednią (LDL-C), z wykorzystaniem biotestu firmy BioSystems (nr kat. 11579), w spektrofotometrze Metertech SP-8001 firmy Medson;
 - procentową zawartość frakcji lipoprotein: chylomikronów, α -lipoprotein (HDL-C), pre- β -lipoprotein (VLDL-C) i β -lipoprotein (LDL-C) metodą rozdziału elektroforetycznego surowicy na żelu Paragon Electrophoresis System Lipo firmy Beckman Coulter, a odczytu dokonano przy użyciu densytometru DT-93.
5. Wybrane markery stresu oksydacyjnego:
- stężenie oxLDL-C metodą ELISA, zestawem Rat Oxidized Low Density Lipoprotein (OxLDL) (nr kat. E90527Ra) firmy USCN Life Science Inc., z wykorzystaniem płuczki i czytnika płytek ELx-50 i ELx-800 firmy BioTek Instruments;
 - stężenie grup karbonylowych białek metodą ELISA, zestawem OxiSelect™ Protein Carbonyl (nr kat. STA310), z wykorzystaniem płuczki i czytnika płytek ELx-50 i ELx-800 firmy BioTek Instruments;
6. Stężenie wybranych cytokin prozapalnych i chemokin:
- interleukiny 1 (IL-1 α) metodą ELISA, zestawem firmy R&D Systems (Rat IL-1 α nr kat. RRA00), z wykorzystaniem płuczki i czytnika płytek ELx-50 i ELx-800 firmy BioTek Instruments;
 - interleukiny 6 (IL-6) metodą ELISA, zestawem firmy Ray Bio® (Rat IL-6, nr kat. ELR-IL6-001), z wykorzystaniem płuczki i czytnika płytek ELx-50 i ELx-800 BioTek Instruments;
 - TNF- α metodą ELISA, zestawem firmy Ray Bio® (Rat TNF-alpha, nr kat. ELR-TNFalpha-001), z wykorzystaniem płuczki i czytnika płytek ELx-50 i ELx-800 firmy BioTek Instruments;

- białka C-reaktywnego (CRP) metodą ELISA, zestawem firmy BioVendor (Rat CRP ELISA, nr kat. RH951CRP01R), z wykorzystaniem płuczki i czytnika płytek ELx-50 i ELx-800 firmy BioTek Instruments;
- sICAM-1 metodą ELISA, zestawem firmy R&D Systems (Rat sICAM-1 CD54, nr kat. RIC100), z wykorzystaniem płuczki i czytnika płytek ELx-50 i ELx-800 firmy BioTek Instruments;
- VCAM-1 CD106 metodą ELISA, zestawem Rat Vascular Cell Adhesion Molecule 1(VCAM1) (nr kat. E90547Ra – 1) USCN Life Science Inc., z wykorzystaniem płuczki i czytnika płytek ELx-50 i ELx-800 firmy BioTek Instruments.

3.4.2. Analizy składu tkanki mięśniowej i wątrobowej

Przeprowadzono również ocenę wpływu zmiany składu diety i jej suplementacji na skład tkanki mięśniowej i wątrobowej badanych zwierząt. W wypreparowanych mięśniach (*m. quadriceps femoris*, *m. semimembranosus*, *m. adduktor femoris*, *m. superficialis gluteus*) oraz w wątrobach zwierząt oznaczono (AOAC 2012) zawartość:

- azotu ogólnego metodą Kjeldahla na aparacie Kjeltex 2100 firmy Foss Tecator (PN-A-04018:1975), wartość tę przeliczono na ilość białka;
- tłuszczu surowego metodą Soxhleta na aparacie Soxtec HT6 Foss Tecator (PN-ISO 1444:2000);
- suchej masy metodą wagową, przez suszenie próbki w temperaturze 100–105°C przez 12 h w suszarce laboratoryjnej WTS E16-6/500 (PN-ISO 1442:2000);
- popiołu metodą wagową, przez spalanie w piecu muflowym CZYŁOK SM 946 w temperaturze 550°C przez 10 h (PN-ISO 936:2000).

3.4.3. Badanie histopatologiczne wątroby

W przeprowadzonym doświadczeniu dokonano oceny histopatologicznej wątroób badanych zwierząt w celu określenia wpływu zmiany składu diety i jej suplementacji witaminami z grupy B na zmiany w strukturze tego narządu.

Skrawki z lewego płata wątroby szczurów utrwalano w 10-procentowym roztworze formaliny zbuforowanej przez 5 h w temperaturze pokojowej. Utrwalone skrawki płukano, odwadniano w rosnącym szeregu alkoholi (alkohol etylowy 96% przez 1 h, następnie trzykrotnie w każdorazowo świeżym alkoholu etylowym bezwodnym po 1 h), usuwano alkohol w płynie pośrednim (benzen), zatapiano w bloczki parafinowe i skrawano na mikrotomie rotacyjnym MPS-2 na skrawki o grubości 5 µm (Burck 1975). Skrawki naklejano następnie na szkiełka, barwiono kontrastowo hematoksyliną i eozyną i zamykano w balsamie kanadyjskim (Litwin 1999).

Ocenę histopatologiczną preparatów wątroby wykonano w Zakładzie Patomorfologii Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie. W preparatach oceniano odsetek hepatocytów z cechami: stłuszczenia (*steatosis*), określonego jako gromadzenie się kropelek tłuszczu; zwyrodnienia balonowatego (*ballooning*) jako wyrazu uszkodzenia i zaburzeń gospodar-

ki wodno-mineralnej; obecności nacieków zapalnych w obrębie zrazika (*lobular inflammation*) i w przestrzeni bramno-żółciowej (*portal inflammation*) oraz włóknienia (*fibrosis*), tworzenia włókien kolagenowych według klasyfikacji, którą opisali Brunt i Tiniakos (2010).

3.4.4. Oznaczenia dodatkowych parametrów w wątrobach i w moczu

Oznaczono również profil kwasów tłuszczowych w wątrobach szczurów zmodyfikowaną metodą Folcha (ekstrakcja mieszaniną chloroform-metanol (2 : 1), hydroliza wodorotlenkiem sodu w metanolu, metylacja fluorkiem boru w metanolu), a otrzymane estry kwasów tłuszczowych przeprowadzono do warstwy heptanowej. Do rozdziału kwasów tłuszczowych użyto chromatografu gazowego 450-GC firmy Varian z detektorem FID. Stosowano kolumnę CP-SIL 88 (100 m × 0,25 mm). Warunki pracy chromatografu: gaz nośny – hel, temperatura dozownika 200°C, temperatura detektora 240°C, temperatura kolumny – programowana (60–220°C). Wyniki tych badań zostały już opublikowane (Goluch-Koniuszy 2012).

W moczu uzyskanym od zwierząt z klatek metabolicznych *in vivo* oznaczano stężenie izoprostanu 8-iPF2 α -III metodą ELISA, z wykorzystaniem zestawu 8-isoprostan EIA KIT firmy Cayman (nr kat. 516351) oraz stężenie kreatyniny przy użyciu biotestu Aqua-Med. Uzyskane wyniki zostały już wcześniej opublikowane (Goluch-Koniuszy i Sadowska 2012).

3.5. Wskaźniki i współczynniki wyliczone na podstawie uzyskanych wyników

Współczynniki:

1. Wykorzystania paszy FCR ze wzoru:

$$\text{FCR} = \text{całkowite spożycie paszy (g)/końcową masę ciała (g)}$$

2. Efektywności wykorzystania paszy FCE ze wzoru (Johnsona i Gee 1986):

$$\text{FCE (\%)} = \text{przyrost masy ciała (g)/spożycie paszy (g)} \times 100$$

3. Wydajności wzrostowej białka PER ze wzoru (Sarwar i Peace 1994):

$$\text{PER} = \text{przyrost masy ciała (g)/ilość spożytego białka (g)}$$

Wskaźniki:

1. Insulinooporności HOMA-IR > 2,5 (Matthews i in. 1985) ze wzoru:

$$\text{HOMA-IR} = \text{insulina na czczo (mU/ml)} \times \text{glukoza na czczo (mmol/l)}/22,5$$

2. Insulinooporności FIRI (Duncan i in. 1995) ze wzoru:

$$\text{FIRI} = \text{glukoza na czczo (mmol/l)} \times \text{insulina na czczo (mU/ml)}/25.$$

3. Aterogenności profilu lipidowego surowicy (Contois i in. 2009, Atanasova 2012, Samant i in. 2014):

- TC/HDL-C,
- LDL-C/HDL-C,
- TG/HDL-C,
- (TC – HDL-C)/HDL-C,
- (TC – HDL-C)/LDL-C,
- apoB/apoA-I,
- apoB/HDL-C,
- HDL-C/apoA-I.

3.6. Analiza statystyczna

Uzyskane wyniki, po sprawdzeniu normalności rozkładu testem Shapiro-Wilka i jednorodności wariancji testem Lavena, poddano obliczeniom statystycznym (na poziomie istotności $p \leq 0,05$; $p \leq 0,01$) przy użyciu komputerowego programu statystycznego Statistica 9.0®, z zastosowaniem jednoczynnikowej analizy wariancji i testu Tukeya. W przypadkach parametrów, dla których nie stwierdzono rozkładu normalnego, wyniki weryfikowano testem nieparametrycznym Kruskala-Wallisa i testem mediany (Me).

4. Wyniki

4.1. Spożycie paszy i przyrosty masy ciała

Analizując uzyskane wyniki, stwierdzono, że zarówno zmiana składu diety, jak i zastosowana suplementacja nie wpłynęły istotnie na ilość spożytej paszy – tabela 5. Zwierzęta ze wszystkich grup doświadczalnych w sposób zbliżony wykorzystywały spożytą paszę, pomimo jej odmiennego składu, na co również wskazuje brak istotnych różnic wartości współczynnika wykorzystania paszy (FCR) pomiędzy badanymi grupami zwierząt.

Tabela 5. Wpływ składu diety i różnych sposobów jej uzupełniania wybranymi witaminami z grupy B na wielkość spożycia paszy i białka, ich wykorzystanie oraz przyrosty masy ciała u samców szczura ($\bar{x} \pm SD$, Me, n = 40)

Badana cecha	Grupa zwierząt			
	PP	PZ	PZ + SU	PZ + SN
Spożycie paszy (g)	872,6 \pm 78,9 (850,1)	881,3 \pm 64,8 (860,0)	863,7 \pm 67,3 (881,1)	830,7 \pm 32,8 (821,6)
FCR (spożycie paszy/masa ciała)	1,92 \pm 0,2 (1,91)	1,87 \pm 0,2 (1,95)	1,83 \pm 0,1 (1,83)	1,81 \pm 0,1 (1,81)
Spożycie energii brutto (spożycie paszy \times kJ)	14310,3 \pm 1293 (13941,6)	14453,2 \pm 1062 (14103,2)	14164,2 \pm 1105 (14450,0)	13623,8 \pm 537 (13473,6)
Spożycie energii brutto (kJ/100 g masy ciała)	3163,1 \pm 279 (3149,7)	3076,9 \pm 298 (3202,1)	3013,7 \pm 175 (3035,4)	2979,7 \pm 147 (2977,2)
Przyrost masy ciała (g)	29,0 ^b \pm 12,4 (26,5)	42,1 \pm 9,5 (40,5)	47,2 ^a \pm 17,3 (46,0)	33,1 \pm 17,8 (36,5)
Przyrost masy ciała (g/100 g paszy)	3,39 ^b \pm 1,5 (3,13)	4,76 \pm 0,9 (4,59)	5,47 ^a \pm 2,0 (5,57)	4,02 \pm 2,2 (4,39)
FCE (%) (przyrost masy ciała/spożycie paszy \times 100)	0,78 ^b \pm 0,4 (0,71)	1,21 \pm 2,0 (1,12)	1,39 ^a \pm 0,5 (1,35)	0,98 \pm 0,5 (1,11)
Spożycie białka (g)	171,9 ^a \pm 15,5 (167,5)	163,9 \pm 12,0 (160,0)	160,6 \pm 12,5 (163,9)	154,5 ^b \pm 6,1 (152,8)
Spożycie białka (g/100 g masy ciała)	37,9 ^a \pm 3,3 (37,7)	34,8 \pm 3,4 (36,2)	34,0 \pm 1,4 (34,0)	33,7 ^b \pm 1,7 (33,7)
PER (przyrost masy ciała /ilość spożytego białka)	0,78 ^b \pm 0,4 (0,71)	1,21 \pm 2,0 (1,12)	1,39 ^a \pm 0,5 (1,35)	0,98 \pm 0,5 (1,11)

Średnie zaznaczone w wierszach różnymi małymi literami różnią się na poziomie $p \leq 0,05$.

Wartość energetyczna diet spożytej paszy, zarówno bezwzględnie, jak i w przeliczeniu na 100 g masy ciała, nie różniła się istotnie pomiędzy grupami badanych zwierząt, czego rezultatem był brak istotnych różnic w przyrostach masy ciała pod wpływem zastosowanych czynników doświadczalnych. Należy jednak zwrócić uwagę, że największymi przyrostami masy ciała, tak bezwzględnie, jak i w przeliczeniu na 100 g spożytej paszy, charakteryzowały się zwierzęta żywione PZ suplementowaną witaminami w sposób uzupełniający. Chociaż w grupie zwierząt żywionych PP stwierdzono największe spożycie białka, tak bezwzględnie, jak i w przeliczeniu na 100 g masy ciała, to jednak zwierzęta żywione PZ suplementowaną wita-

minami w sposób uzupełniający najlepiej wykorzystywały paszę, jak i obecne w niej białko ogółem, na co wskazują wartości współczynników FCE i PER tej grupy i potwierdza brak różnic statystycznie istotnych w zawartości białka w tkance mięśniowej i wątrobowej – tabela 10.

Zmiana składu diety istotnie zmniejszyła spożycie oznaczonych składników mineralnych (Mg, Zn, Ca, Cr) przez grupę zwierząt żywionych PZ w stosunku do żywionych PP (tabela 5a). Wielkość spożywanych składników mineralnych w grupach z zastosowaną suplementacją była natomiast porównywalna do ilości spożywanych przez zwierzęta z grupy żywionej PZ, co wynikało z braku różnic w ilości spożycia pasz przez zwierzęta z tych grup.

Tabela 5a. Wpływ składu diety i różnych sposobów jej uzupełniania wybranymi witaminami z grupy B na wielkość spożycia paszy i białka, ich wykorzystanie oraz przyrosty masy ciała u samców szczura ($\bar{x} \pm SD$, Me, n = 40)

Badana cecha	Grupa zwierząt			
	PP	PZ	PZ + SU	PZ + SN
Spożycie Mg (mg/100 g masy ciała)	384,5 ^A ±33,9 (382,8)	336,6 ^B ±32,6 (350,3)	329,2 ^B ±18,9 (329,5)	326,0 ^B ±16,1 (309,0)
Spożycie Zn (mg/100 g masy ciała)	19,3 ^A ±1,7 (19,2)	16,8 ^B ±1,8 (17,5)	16,4 ^B ±0,9 (16,4)	16,3 ^B ±0,8 (16,2)
Spożycie Ca (mg/100 g masy ciała)	65,8 ^A ±5,8 (65,6)	14,8 ^B ±1,4 (15,4)	14,5 ^B ±0,8 (14,5)	14,4 ^B ±0,8 (14,4)
Spożycie Cr (µg/100 g masy ciała)	18,0 ^A ±2,0 (18,0)	4,0 ^B ±1,0 (5,0)	4,0 ^B ±4,0 (5,0)	4,0 ^B ±1,0 (4,0)
Spożycie witaminy B ₁ (mg/100 g masy ciała)	4,8 ^{BC} ±0,4 (4,8)	1,2 ^C ±0,1 (1,2)	5,9 ^{AB} ±0,6 (5,9)	17,4 ^A ±1,3 (17,0)
Spożycie witaminy B ₂ (mg/100 g masy ciała)	4,0 ^{BC} ±0,4 (4,0)	2,1 ^C ±0,2 (2,2)	4,5 ^{AB} ±0,4 (4,5)	14,1 ^A ±1,0 (13,1)
Spożycie witaminy B ₆ (mg/100 g masy ciała)	4,5 ^{BC} ±0,4 (4,5)	2,5 ^C ±0,2 (2,6)	5,0 ^{AB} ±0,4 (5,0)	15,0 ^A ±1,1 (14,7)
Spożycie niacyny (mg/100 g masy ciała)	16,5 ^{BC} ±1,5 (16,5)	9,0 ^C ±0,9 (9,3)	18,5 ^{AB} ±1,4 (18,4)	43,6 ^A ±6,1 (42,5)
Średnie zaznaczone w wierszach różnymi wielkimi literami różnią się na poziomie p ≤ 0,01.				

4.2. Spożycie kwasów tłuszczowych z badanymi dietami

Zastosowana suplementacja nie wpływała na ilość spożytej paszy i nie zmieniała też ilości i struktury spożycia kwasów tłuszczowych przez badane zwierzęta w stosunku do zwierząt żywionych PZ. Uzyskane wyniki spożycia poszczególnych kwasów tłuszczowych we wszystkich trzech grupach były porównywalne – tabela 6.

Stwierdzono natomiast, że zwierzęta z grupy żywionej PZ spożywały z paszą istotnie mniej kwasów tłuszczowych nasyconych, jednonienasyconych, wielonienasyconych i niezidentyfikowanych w porównaniu ze zwierzętami z grupy żywionej PP, co wynikało ze zmiany składników diety i zamiany części pełnych ziaren w PP na mąkę i sacharozę w PZ.

Tabela 6. Wpływ składu diety i różnych sposobów jej uzupełniania wybranymi witaminami z grupy B na spożycie kwasów tłuszczowych przez samce szczurów ($\bar{x} \pm SD$, Me, n = 40)

Spożyte kwasy tłuszczowe (g/100 g paszy)	Grupa zwierząt			
	PP	PZ	PZ + SU	PZ + SN
Nasycone kwasy tłuszczowe				
Mirystynowy C14	0,75 ^A ±0,07 (0,75)	0,47 ^B ±0,05 (0,49)	0,46 ^B ±0,03 (0,46)	0,45 ^B ±0,02 (0,45)
Palmitynowy C16	41,7 ^A ±3,7 (41,5)	30,3 ^B ±2,9 (31,5)	29,6 ^B ±1,7 (29,7)	29,3 ^B ±1,4 (29,3)
Stearynowy C18	7,1 ^A ±0,6 (7,1)	4,4 ^B ±0,4 (4,5)	4,3 ^B ±0,2 (4,3)	4,2 ^B ±0,2 (4,2)
Jednonienasycone kwasy tłuszczowe				
Palmitooleinowy C16:1, n-7	1,6 ^A ±0,1 (1,6)	1,1 ^B ±0,1 (1,1)	1,0 ^B ±0,1 (1,0)	1,0 ^B ±0,1 (1,0)
Oleinowy C18:1, n-9	68,4 ^A ±6,0 (68,1)	45,5 ^B ±4,4 (47,3)	44,5 ^B ±2,5 (44,5)	44,1 ^B ±2,2 (44,0)
Eikozanowy C20:1, n-9	0,62 ^A ±0,05 (0,61)	0,45 ^B ±0,04 (0,47)	0,44 ^B ±0,03 (0,44)	0,43 ^B ±0,03 (0,44)
Erukowy C22:1, n-9	0,17 ^A ±0,02 (0,17)	0,07 ^B ±0,01 (0,08)	0,07 ^B ±0,01 (0,07)	0,07 ^B ±0,01 (0,07)
Wielonienasycone kwasy tłuszczowe				
α-Linolenowy C18:3, n-3	8,9 ^A ±0,8 (8,9)	7,9 ±0,8 (8,2)	7,7 ^B ±0,4 (7,7)	7,6 ^B ±0,4 (7,6)
Eikozapentaenowy C20:5, n-3	0	0	0	0
Dokozapentaenowy C22:5, n-3	0	0	0	0
Dokozaheksaenowy C22:6, n-3	0,10 ^A ±0,01	0 ^B	0 ^B	0 ^B
Ogółem n-3	9,0 ^{Aa} ±0,7 (9,0)	7,9 ^b ±0,8 (8,2)	7,7 ^B ±0,4 (7,7)	7,6 ^B ±0,4 (7,6)
Linolowy C18:2, n-6	81,6 ^A ±7,2 (81,3)	77,8 ±7,0 (75,8)	71,2 ^B ±4,1 (71,3)	70,5 ^B ±3,5 (70,5)
Eikozadienowy C20:2, n-6	0	0	0	0
Dihomo-γ-linolenowy C20:3, n-6	0	0	0	0
Arachidonowy C20:4, n-6	0,54 ^A ±0,05 (0,54)	0,17 ^B ±0,02 (0,18)	0,16 ^B ±0,01 (0,16)	0,16 ^B ±0,01 (0,16)
Ogółem n-6	82,2 ^A ±7,3 (81,8)	73,0 ±7,1 (76,0)	71,4 ^B ±4,1 (71,5)	70,7 ^B ±3,5 (70,6)
Niezidentyfikowane	3,4 ^A ±0,3 (3,3)	2,0 ^B ±0,2 (2,1)	2,0 ^B ±0,1 (2,0)	2,0 ^B ±0,1 (2,0)
Nasycone	49,6 ^A ±4,4 (49,3)	31,2 ^B ±3,0 (32,5)	30,5 ^B ±1,8 (30,5)	30,2 ^B ±1,5 (30,2)
Jednonienasycone	70,7 ^A ±6,2 (70,4)	47,1 ^B ±4,6 (49,0)	46,0 ^B ±2,6 (46,1)	45,6 ^B ±2,2 (45,6)
Wielonienascone	91,2 ^A ±8,0 (90,8)	80,9 ±7,8 (87,5)	79,1 ^B ±4,5 (79,2)	78,2 ^B ±3,9 (78,2)
Nienasycone razem	161,9 ^A ±14,3 (161,2)	127,9 ^B ±12,4 (133,1)	125,1 ^B ±7,2 (125,2)	123,9 ^B ±6,1 (123,8)
n-6/n-3	17,5 ±1,6 (17,5)	17,9 ±1,6 (17,8)	17,4 ±1,7 (18,1)	17,0 ±1,0 (17,0)

Średnie zaznaczone w wierszach różnymi małymi literami różnią się na poziomie $p \leq 0,05$, a wielkimi literami na poziomie $p \leq 0,01$.

4.3. Bilans płynów

Stwierdzono, że spożycie płynów przez badane zwierzęta w ciągu sześciu tygodni doświadczenia nie różniło się statystycznie istotnie pomiędzy grupami – tabela 7.

Tabela 7. Wpływ składu diety i różnych sposobów jej uzupełniania wybranymi witaminami z grupy B na pobieranie płynów i wydalanie moczu przez samce szczurów ($\bar{x} \pm SD$, Me, n = 40)

Badana cecha	Grupa zwierząt			
	PP	PZ	PZ + SU	PZ + SN
Spożycie płynów (cm ³ /100 g masy ciała)	276,3 ±45,8 (269,0)	265,1 ±33,3 (261,2)	249,7 ±21,4 (243,1)	260,5 ±40,1 (243,1)
Ilość pobranych płynów (cm ³ /24 h)	26,2 ^b ±4,3 (25,0)	31,9 ±6,4 (30,0)	32,2 ^a ±6,8 (32,5)	28,9 ±2,2 (29,0)
Wydalenie moczu (cm ³ /24 h)	6,6 ^{Bb} ±1,9 (6,7)	12,5 ^A ±5,1 (11,4)	11,1 ^a ±5,1 (9,4)	8,4 ±3,6 (7,3)
Różnica pomiędzy pobraniem a wydalaniem (cm ³ /24 h)	19,6 ±3,6 (18,8)	19,4 ±2,8 (19,7)	21,1 ±5,5 (20,9)	20,5 ±4,1 (21,7)

Średnie zaznaczone w wierszach różnymi małymi literami różnią się na poziomie p ≤ 0,05, a wielkimi literami na poziomie p ≤ 0,01.

Biorąc jednak pod uwagę dobowe pobranie płynów, stwierdzono, że najwięcej płynów pobierały zwierzęta z grupy z zastosowaną suplementacją uzupełniającą, przy czym ilość ta była statystycznie istotnie większa od ilości pobieranej przez zwierzęta z grupy żywionej PP. Znalazło to też swoje odbicie w ilości moczu wydalanego na dobę przez zwierzęta tej grupy, porównywalnej z ilością wydalaną przez zwierzęta żywione PZ, a w obu grupach statystycznie istotnie większe od ilości moczu wydalonego przez grupę zwierząt żywionych PP.

Nie stwierdzono jednak wpływu zastosowanych czynników doświadczalnych na różnicę pomiędzy ilością pobranych płynów przez zwierzęta z wszystkich grup a ilością wydalanego moczu, co znalazło też odzwierciedlenie w braku różnic w zawartości suchej masy w tkankach mięśniowej i wątrobowej – tabela 9.

4.4. Masa serca i wątroby oraz nasierdziowa i okołonarządowa tkanka tłuszczowa

W przeprowadzonym doświadczeniu nie stwierdzono istotnego wpływu zmiany składu diety oraz rodzaju jej suplementacji na masę serca i wątroby, a także gromadzenie nasierdziowej i okołonarządowej tkanki tłuszczowej u badanych zwierząt, zarówno w przeliczeniu na 100 g spożytej paszy, jak i na 100 g masy ciała – tabela 8. Można jednak zauważyć wzrost zawartości obu rodzajów tłuszczów w grupach zwierząt z zastosowaną suplementacją, szczególnie w grupie żywionej PZ + SU. Największym udziałem tkanki nasierdziowej, w stosunku do masy serca, charakteryzowały się zwierzęta żywione PZ + SU.

Tabela 8. Wpływ składu diety i różnych sposobów jej uzupełniania wybranymi witaminami z grupy B na zawartość tkanki tłuszczowej u samców szczura ($\bar{x} \pm SD$, Me, n = 40)

Badana cecha	Grupa zwierząt			
	PP	PZ	PZ + SU	PZ + SN
Masa serca (g/100 g masy ciała)	0,28 ±0,02 (0,27)	0,25 ±0,03 (0,24)	0,25 ±0,02 (0,25)	0,28 ±0,05 (0,29)
Masa wątroby (g/100 g masy ciała)	2,62 ±0,3 (2,60)	2,53 ±0,6 (2,46)	2,66 ±0,4 (2,63)	2,65 ±0,6 (2,83)
Tłuszcz nasierdziowy (g)	0,38 ±0,12 (0,39)	0,41 ±0,08 (0,40)	0,43 ±0,08 (0,43)	0,41 ±0,12 (0,38)
Tłuszcz nasierdziowy (g/100 g paszy)	0,04 ±0,01 (0,04)	0,05 ±0,09 (0,05)	0,05 ±0,07 (0,05)	0,05 ±0,01 (0,05)
Tłuszcz nasierdziowy (g/100 g masy ciała)	0,08 ±0,02 (0,08)	0,09 ±0,02 (0,08)	0,09 ±0,01 (0,09)	0,09 ±0,03 (0,08)
Tłuszcz nasierdziowy (%) (g/masa serca g × 100)	29,8 ±6,4 (28,4)	35,1 ±6,9 (34,6)	36,0 ±6,7 (37,1)	32,5 ±6,5 (30,7)
Tłuszcz okołonarządowy (g)	3,94 ±1,33 (4,01)	3,92 ±1,2 (3,80)	4,84 ±1,32 (4,54)	4,16 ±1,26 (3,83)
Tłuszcz okołonarządowy (g/100 g paszy)	0,45 ±0,12 (0,47)	0,45 ±0,15 (0,42)	0,53 ±0,10 (0,56)	0,50 ±0,15 (0,48)
Tłuszcz okołonarządowy (g/100 g masy ciała)	0,84 ±0,19 (0,86)	0,84 ±0,30 (0,82)	0,97 ±0,17 (0,99)	0,90 ±0,26 (0,89)

4.5. Skład chemiczny tkanki mięśniowej i wątrobowej

Przeprowadzona analiza podstawowego składu chemicznego mięśni i wątroby u badanych zwierząt nie wykazała istotnego wpływu zastosowanych diet na zawartość suchej masy, białka i tłuszczu – tabela 9. Stwierdzono jednak, że zmiana składu diety spowodowała istotne zmniejszenie ilości popiołu uzyskanego z tkanki mięśniowej zwierząt żywionych PZ w stosunku do zwierząt żywionych PP, a suplementacja diet witaminami z grupy B (PZ + SU i PN + SN) nie zmieniała istotnie zawartości popiołu w tkance mięśniowej.

Tabela 9. Wpływ składu diety i różnych sposobów jej uzupełniania witaminami z grupy B na podstawowy skład chemiczny mięśni i wątroby u samców szczura ($\bar{x} \pm SD$, Me, n = 40)

Badana cecha	Grupa zwierząt			
	PP	PZ	PZ + SU	PZ + SN
Białko (%)				
Mięśnie	22,9 ±0,4 (23,0)	22,7 ±0,5 (22,7)	22,6 ±0,6 (22,6)	22,7 ±0,2 (22,7)
Wątroba	23,5 ±0,6 (23,6)	23,5 ±0,8 (23,3)	23,4 ±0,3 (23,4)	23,4 ±0,4 (23,4)
Tłuszcz (%)				
Mięśnie	2,27 ±0,8 (2,18)	2,72 ±1,2 (2,25)	2,83 ±1,3 (2,68)	2,36 ±0,6 (2,25)
Wątroba	2,76 ±0,2 (2,77)	2,61 ±0,2 (2,61)	2,85 ±0,4 (2,85)	2,58 ±0,2 (2,58)

Tabela 9. Wpływ składu diety i różnych sposobów jej uzupełniania witaminami z grupy B na podstawowy skład chemiczny mięśni i wątroby u samców szczura ($\bar{x} \pm SD$, Me, n = 40) (cd.)

Badana cecha	Grupa zwierząt			
	PP	PZ	PZ + SU	PZ + SN
Sucha masa (%)				
Mięśnie	27,8 ±0,7 (27,8)	27,7 ±0,9 (27,0)	27,6 ±1,0 (27,4)	27,3 ±0,5 (27,3)
Wątroba	32,1 ±1,0 (31,9)	31,8 ±1,0 (31,7)	32,0 ±0,4 (32,3)	31,8 ±0,8 (31,9)
Popiół (%)				
Mięśnie	1,39 ^A ±0,02 (1,39)	1,28 ^B ±0,06 (1,27)	1,29 ^B ±0,04 (1,28)	1,20 ^{BC} ±0,02 (1,21)
Wątroba	1,61 ±0,2 (1,56)	1,64 ±0,1 (1,63)	1,65 ±0,09 (1,63)	1,63 ±0,04 (1,64)

Średnie zaznaczone w wierszach różnymi wielkimi literami różnią się na poziomie $p \leq 0,01$.

4.6. Analiza morfologiczna krwi

Analiza morfologiczna krwi, przeprowadzona w celu uchwycenia zmian będących wskaźnikami procesów prozapalnych, wykazała, że zmiana składu diety PP na PZ nie wpłynęła istotnie na stężenie żelaza w surowicy krwi badanych zwierząt – tabela 10. Zastosowana natomiast suplementacja uzupełniająca (PZ + SU) spowodowała istotny wzrost stężenia żelaza w surowicy krwi badanych zwierząt w stosunku do zwierząt z pozostałych grup.

W grupie zwierząt żywionych PZ + SU stwierdzono najmniejszy udział limfocytów (W-SCR%) w krwi obwodowej przy jednocześnie największym udziale neutrofilii (W-LCR %).

W pozostałych oznaczonych parametrach morfologicznych krwi badanych zwierząt nie stwierdzono zmian istotnych pod wpływem zastosowanych czynników doświadczalnych.

Tabela 10. Wpływ składu diety i różnych sposobów jej uzupełniania wybranymi witaminami z grupy B na parametry morfologiczne u samców szczura ($\bar{x} \pm SD$, Me, n = 40)

Badana cecha	Grupa zwierząt			
	PP	PZ	PZ + SU	PZ + SN
Fe ($\mu\text{mol}/\text{dm}^3$)	16,7 ^B ±1,5 (16,8)	16,5 ^B ±4,4 (16,0)	23,9 ^A ±5,7 (26,8)	15,4 ^B ±2,2 (15,1)
WBC $\times 10^3/\text{mm}^3$	6,11 ±2,4 (5,25)	6,53 ±1,7 (6,0)	6,91 ±7,2 (4,75)	5,40 ±1,7 (5,85)
RBC $\times 10^6/\text{mm}^3$	11,35 ±2,8 (10,9)	10,9 ±2,3 (10,6)	11,2 ±1,4 (11,8)	10,1 ±2,0 (9,6)
HGB (mmol/dm^3)	9,8 ±0,8 (9,6)	9,6 ±0,8 (9,7)	6,5 ±0,4 (9,4)	9,6 ±0,6 (6,4)
HCT (%)	56,2 ±11,9 (56,3)	52,8 ±11,1 (50,3)	53,9 ±6,9 (56,5)	50,7 ±11,4 (45,8)
MCV (fl)	50,0 ±2,9 (50,2)	48,4 ±2,4 (48,1)	48,2 ±2,4 (47,7)	50,1 ±3,6 (48,2)
MCH (fmol)	0,9 ±0,2 (0,9)	0,9 ±0,2 (0,9)	0,8 ±0,1 (0,8)	1,0 ±0,1 (1,0)

Tabela 10. Wpływ składu diety i różnych sposobów jej uzupełniania wybranymi witaminami z grupy B na parametry morfologiczne u samców szczura ($\bar{x} \pm SD$, Me, n = 40) (cd.)

Badana cecha	Grupa zwierząt			
	PP	PZ	PZ + SU	PZ + SN
MCHC (mmol/dm ³)	18,0 ±3,3 (17,4)	19,0 ±4,2 (19,5)	17,9 ±2,6 (16,9)	19,5 ±3,0 (20,1)
PLT × 10 ³ /mm ³	1708,8 ±324,4 (1668,0)	1577,2 ±347,6 (1455,0)	1747,0 ±301,32 (1842,5)	1612,9 ±376,3 (1669)
W-SCR (%)	83,3 ^a ±4,2 (89,9)	86,0 ±3,6 (84,8)	81,6 ^b ±7,2 (82,5)	84,1 ±7,2 (87,0)
W-LCR (%)	10,7 ^b ±4,2 (10,2)	14,0 ±3,6 (15,2)	18,4 ^a ±7,2 (17,5)	15,9 ±7,2 (13,1)
W-SCC × 10 ³ /mm ³	5,45 ±2,2 (4,70)	5,63 ±1,5 (5,30)	5,76 ±6,4 (3,85)	4,57 ±1,6 (5,0)
W-LCC × 10 ³ /mm ³	0,660 ±0,36 (0,550)	0,900 ±0,31 (0,900)	1,150 ±0,91 (0,900)	0,830 ±0,34 (0,800)

Średnie zaznaczone w wierszach różnymi małymi literami różnią się na poziomie $p \leq 0,05$, a wielkimi literami na poziomie $p \leq 0,01$.

4.7. Wybrane wskaźniki przemian węglowodanowych

Analizując wartości wybranych wskaźników przemian węglowodanowych, stwierdzono, że ani zmiana składu diety, ani jej suplementacja uzupełniająca nie wpłynęły istotnie na stężenie glukozy we krwi badanych zwierząt – tabela 11. Statystycznie istotny wzrost stężenia glukozy obserwowano natomiast w grupie zwierząt z zastosowaną suplementacją nadmiarową (PZ + SN), i to tylko w stosunku do grupy zwierząt żywionej PP. Mogło to być wynikiem wzrostu stężenia glukozy we krwi zwierząt karmionych dietą PZ w stosunku do PP. Obserwowanym zmianom stężenia glukozy we krwi odpowiadają adekwatne, ale statystycznie nieistotne zmiany stężenia insuliny.

Tabela 11. Wpływ składu diety i różnych sposobów jej uzupełniania wybranymi witaminami z grupy B na stężenie glukozy i hormonów w surowicy u samców szczura ($\bar{x} \pm SD$, Me, n = 40)

Badana cecha	Grupa zwierząt			
	PP	PZ	PZ + SU	PZ + SN
Glukoza (mmol/dm ³)	6,0 ^b ±0,9 (5,9)	6,9 ±1,1 (6,8)	6,9 ±2,1 (6,5)	7,6 ^a ±1,5 (8,2)
Insulina (µg/dm ³)	0,291 ±0,16 (0,259)	0,274 ±0,07 (0,244)	0,305 ±0,14 (0,300)	0,349 ±0,22 (0,281)
HOMA-IR	1,93 ±1,18 (1,61)	2,01 ±0,71 (1,66)	2,28 ±1,21 (2,28)	2,98 ±2,35 (2,24)
FIRI	2,16 ±1,3 (1,85)	1,72 ±0,7 (1,77)	1,85 ±0,8 (1,91)	2,57 ±1,8 (1,91)
Kortykosteron (nmol/dm ³)	63,8 ±58,9 (34,3)	50,8 ±55,7 (37,2)	29,4 ±32,3 (20,5)	53,1 ±31,5 (46,2)

Średnie zaznaczone w wierszach różnymi małymi literami różnią się na poziomie $p \leq 0,05$.

Nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy wartościami wyliczonych wskaźników H-MA-IR oraz FIRI, jednak wartość wskaźnika HOMA-IR dla zwierząt żywionych dietą PZ + SN przekraczająca wartość 2,5 wskazuje na możliwość wystąpienia insulinooporności.

Nie wykazano wpływu zastosowanych diet na stężenie kortykosteronu, co znalazło również odbicie w braku różnic pomiędzy ilością pobranej wody i wydalanego moczu (tabela 7) oraz w zawartości suchej masy w tkance mięśniowej i wątrobowej – tabela 9.

4.8. Wybrane wskaźniki przemian białkowych

Stwierdzono, że zarówno zmiana składu diety, jak i jej suplementacja nie wpłynęły istotnie na stężenie białka całkowitego, jego frakcji albuminowej oraz wartości stosunku albumin do globulin (A/G) w surowicy krwi badanych zwierząt – tabela 12.

Wykazano natomiast istotny wpływ suplementacji nadmiarowej (PZ + SN) na wzrost stężenia frakcji α_2 -globulin w stosunku do zwierząt karmionych dietą PZ oraz istotny spadek stężenia frakcji β -globulin w surowicy krwi badanych zwierząt karmionych dietami PZ + SU i PZ + SN.

Nie stwierdzono istotnych zmian w aktywności ALT i AST w surowicy krwi badanych zwierząt oraz wartości wskaźnika de Ritisa pod wpływem zastosowanych diet doświadczalnych.

Tabela 12. Wpływ składu diety i różnych sposobów jej uzupełniania wybranymi witaminami z grupy B na zawartość białka i jego frakcji w surowicy u samców szczura ($\bar{x} \pm SD$, Me, n = 40)

Badana cecha	Grupa zwierząt			
	PP	PZ	PZ + SU	PZ + SN
Białko ogólne (g/dm ³)	5,53 ±0,27 (5,46)	5,63 ±1,15 (5,63)	5,65 ±1,19 (5,67)	5,69 ±1,2 (5,66)
Albuminy (g/dm ³) (%)	2,53 ±0,13 (2,54) 44,9 ±2,2 (45,6)	2,51 ±0,53 (2,51) 44,6 ±9,4 (44,4)	2,6 ±0,55 (2,59) 46,0 ±9,7 (45,9)	2,56 ±0,56 (2,61) 45,1 ±9,8 (45,3)
α_1 -globuliny (g/dm ³) (%)	1,5 ^b ±0,14 (1,5) 27,1 ^B ±1,4 (27,1)	1,6 ±0,33 (1,6) 28,4 ±5,9 (28,3)	1,63 ±0,34 (1,6) 28,8 ±6,0 (28,6)	1,71 ^a ±0,36 (1,7) 30,0 ^A ±6,3 (29,1)
α_2 -globuliny (g/dm ³) (%)	0,31 ±0,05 (0,31) 5,59 ±0,9 (5,61)	0,29 ^b ±0,07 (0,29) 5,23 ±1,2 (5,20)	0,32 ±0,07 (0,32) 5,73 ±1,3 (5,68)	0,36 ^a ±0,08 (0,37) 6,4 ±1,5 (6,30)
β -globuliny (g/dm ³) (%)	0,83 ±0,07 (0,84) 15,0 ^{AB} ±0,8 (14,9)	0,88 ^{Aa} ±0,18 (0,89) 15,7 ^A ±3,2 (15,8)	0,80 ^b ±0,18 (0,82) 14,0 ^{BC} ±3,3 (13,9)	0,76 ^B ±0,18 (0,76) 13,4 ^C ±3,3 (13,6)
γ -globuliny (g/dm ³) (%)	0,35 ±0,05 (0,34) 6,5 ±0,8 (6,2)	0,34 ±0,08 (0,33) 6,1 ±1,4 (6,0)	0,31 ±0,08 (0,30) 5,4 ±1,5 (5,1)	0,30 ±0,09 (0,31) 5,3 ±1,5 (5,4)

Tabela 12. Wpływ składu diety i różnych sposobów jej uzupełniania wybranymi witaminami z grupy B na zawartość białka i jego frakcji w surowicy u samców szczura ($\bar{x} \pm SD$, Me, n = 40) (cd.)

Badana cecha	Grupa zwierząt			
	PP	PZ	PZ + SU	PZ + SN
A/G	0,85 \pm 0,08 (0,84)	0,81 \pm 0,18 (0,80)	0,86 \pm 0,18 (0,85)	0,82 \pm 0,18 (0,83)
AST (U/dm ³)	48,2 \pm 9,3 (47,7)	49,7 \pm 9,3 (48,9)	49,3 \pm 11,5 (47,0)	49,2 \pm 7,0 (49,5)
ALT (U/dm ³)	22,7 \pm 2,1 (22,7)	20,8 \pm 5,0 (19,5)	20,5 \pm 4,9 (19,5)	24,1 \pm 8,4 (22,1)
ASP/ALT wskaźnik de Ritisa	2,13 \pm 0,4 (2,19)	2,43 \pm 0,4 (2,39)	2,44 \pm 0,4 (2,38)	2,22 \pm 0,7 (2,13)

Średnie zaznaczone w wierszach różnymi małymi literami różnią się na poziomie $p \leq 0,05$, a wielkimi literami na poziomie $p \leq 0,01$.

4.9. Wybrane wskaźniki przemian lipidowych

Uzyskane wyniki nie wykazały istotnego wpływu diety o zmienionym składzie PZ w porównaniu z PP na badane parametry – tabela 13. Istotny wpływ wywarła natomiast zastosowana suplementacja diety witaminami z grupy B. W przypadku suplementacji uzupełniającej (PZ + SU) stwierdzono istotny wzrost stężenia frakcji LDL-C i wartości wskaźnika Castelliego, a w przypadku suplementacji nadmiarowej (PZ + SN) istotny spadek stężenia frakcji VLDL-C i wartości wskaźnika Castelliego.

Nie stwierdzono istotnego wpływu zastosowanych diet doświadczalnych na zróżnicowanie stężenia apoA-I i apoB w surowicy badanych zwierząt. Po wyliczeniu wskaźników aterogenności profilu lipidowego wykazano jednak, że były one najwyższe i istotnie wyższe w grupie zwierząt z zastosowaną suplementacją uzupełniającą (PZ + SU).

Tabela 13. Wpływ składu diety i różnych sposobów jej uzupełniania witaminami z grupy B na zawartość lipidów, lipoprotein i apolipoprotein w surowicy u samców szczura ($\bar{x} \pm SD$, Me, n = 40)

Badana cecha	Grupa zwierząt			
	PP	PZ	PZ + SU	PZ + SN
TG (mmol/dm ³)	0,61 \pm 0,2 (0,56)	0,62 \pm 0,2 (0,62)	0,65 \pm 0,2 (0,58)	0,67 \pm 0,2 (0,67)
TC (mmol/dm ³)	2,28 \pm 0,4 (2,28)	2,65 \pm 0,5 (2,51)	2,54 \pm 0,5 (2,41)	2,52 \pm 0,3 (2,39)
HDL-C (mmol/dm ³)	1,86 \pm 0,5 (1,78)	2,28 \pm 0,5 (2,18)	2,04 \pm 0,4 (1,92)	2,0 \pm 0,3 (1,93)
(%)	46,4 ^B \pm 9,9 (48,4)	57,8 ^b \pm 10,2 (60,0)	75,2 ^A \pm 10,7 (78,5)	79,5 ^{Aa} \pm 6,4 (78,8)
LDL-C (mmol/dm ³)	0,32 ^B \pm 0,04 (0,33)	0,33 ^B \pm 0,06 (0,30)	0,43 ^{Aa} \pm 0,06 (0,41)	0,35 ^b \pm 0,03 (0,35)
(%)	18,3 ^{Aa} \pm 5,1 (18,3)	16,3 \pm 6,0 (17,5)	9,0 ^B \pm 2,2 (9,7)	11,5 ^b \pm 6,3 (8,5)
VLDL-C (%)	35,3 ^A \pm 8,2 (36,4)	25,9 ^{AB} \pm 7,7 (24,9)	15,8 ^{BC} \pm 9,8 (12,3)	9,0 ^C \pm 4,0 (8,5)

Tabela 13. Wpływ składu diety i różnych sposobów jej uzupełniania witaminami z grupy B na zawartość lipidów, lipoprotein i apolipoprotein w surowicy u samców szczura ($\bar{x} \pm SD$, Me, n = 40) (cd.)

Badana cecha	Grupa zwierząt			
	PP	PZ	PZ + SU	PZ + SN
TC/HDL-C wskaźnik Castelliego	1,25 ^{ab} ± 0,17 (1,25)	1,16 ^b ± 0,04 (1,17)	1,26 ^a ± 0,05 (1,26)	1,26 ^a ± 0,09 (1,23)
(TC – HDL-C)/HDL-C	0,254 ± 0,17 (0,241)	0,164 ^b ± 0,04 (0,172)	0,249 ^a ± 0,05 (0,252)	0,261 ^a ± 0,09 (0,234)
LDL-C/HDL-C	0,182 ± 0,05 (0,167)	0,147 ^B ± 0,04 (0,142)	0,217 ^A ± 0,05 (0,223)	0,180 ± 0,03 (0,180)
TG/HDL-C	0,777 ± 0,21 (0,799)	0,618 ± 0,15 (0,587)	0,723 ± 0,08 (0,712)	0,756 ± 0,14 (0,739)
apoA-I (g/dm ³)	0,88 ± 0,59 (0,65)	0,70 ± 0,29 (0,62)	0,50 ± 0,23 (0,44)	0,64 ± 0,44 (0,51)
apoB (g/dm ³)	0,46 ± 0,09 (0,43)	0,44 ± 0,08 (0,43)	0,41 ± 0,06 (0,40)	0,49 ± 0,13 (0,47)
apoB/apoA-I	0,65 ± 0,26 (0,65)	0,69 ± 0,21 (0,71)	0,96 ± 0,36 (0,91)	0,94 ± 0,37 (0,89)
LDL-C/apoB	28,3 ^b ± 6,4 (30,5)	29,6 ^b ± 8,2 (28,8)	40,7 ^a ± 6,9 (39,7)	29,1 ^b ± 6,9 (27,9)
apoB/HDL-C	0,66 ^a ± 0,15 (0,66)	0,51 ^b ± 0,06 (0,51)	0,53 ± 0,07 (0,53)	0,64 ± 0,13 (0,62)
HDL-C/apoA-I	1,06 ^b ± 0,49 (1,16)	1,37 ± 0,33 (1,33)	1,83 ^a ± 0,81 (1,58)	1,46 ± 0,48 (1,48)

Średnie zaznaczone w wierszach różnymi małymi literami różnią się na poziomie $p \leq 0,05$, a wielkimi literami na poziomie $p \leq 0,01$.

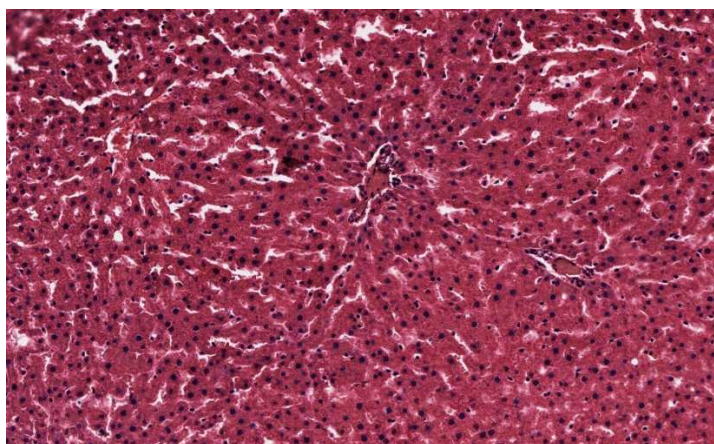
4.10. Badanie histopatologiczne wątroby

Histopatologiczna ocena tkanki wątrobowej szczurów żywionych PP nie wykazała żadnych patologicznych zmian – tabela 14 i rys. 1.

Tabela 14. Wpływ składu diety i różnych sposobów jej uzupełniania witaminami z grupy B na występowanie zmian histopatologicznych w wątrobach u samców szczura (n = 40)

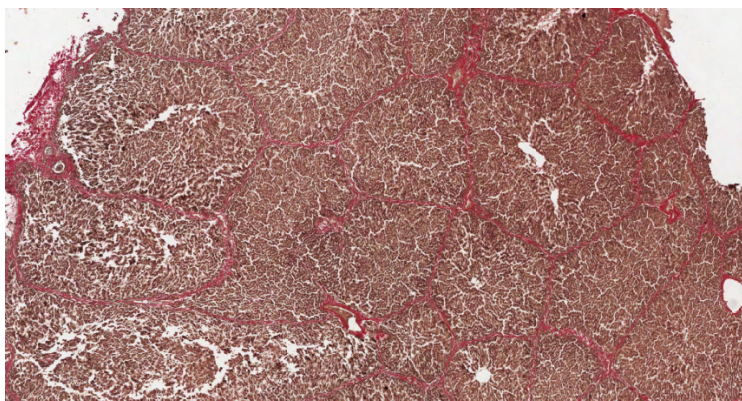
Badana cecha	Grupa zwierząt			
	PP	PZ	PZ + SU	PZ + SN
Stłuszczenie (<i>steatosis</i>) (%)	0	0	0	0
Zwyrodnienie balonowate (<i>balloning</i>) (%)	0	0	0	0
Nacieki zapalne w obrębie zrazika (<i>lobular inflammation</i>) ¹⁾ (%)	0	0	40	20
Nacieki zapalne w PBŻ (<i>portal inflammation</i>) ¹⁾ (%)	0	0	0	0
Włóknienie (<i>fibrosis</i>) ¹⁾ (%)	0	10	30	0

¹⁾ Według klasyfikacji, którą opisali Brunt i Tiniakos (2010).



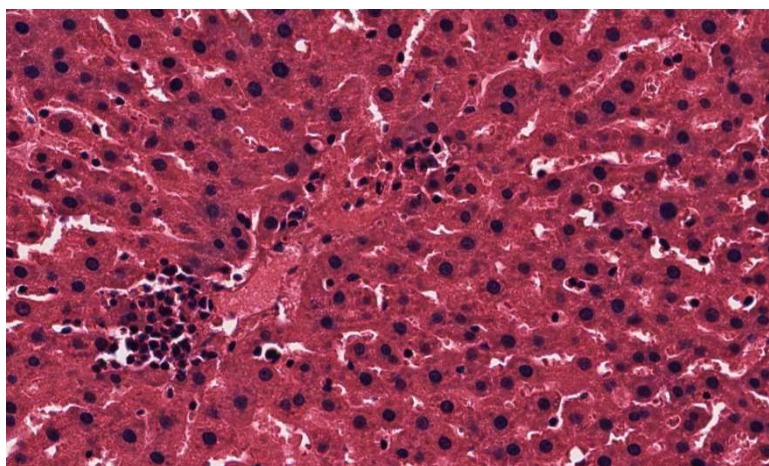
Rys. 1. Prawidłowa struktura wątroby szczurów z grupy żywionej PP

Również w skrawkach wątrób zwierząt żywionych PZ nie stwierdzono stłuszczenia, zwyrodnień balonowatych hepatocytów, nacieków zapalnych w przestrzeni bramno-żółciowej. U jednego szczura stwierdzono jednak czwarte stadium zwłóknienia – marskość według klasyfikacji, którą opisali Brunt i Taniakos (2010) (rys. 2).

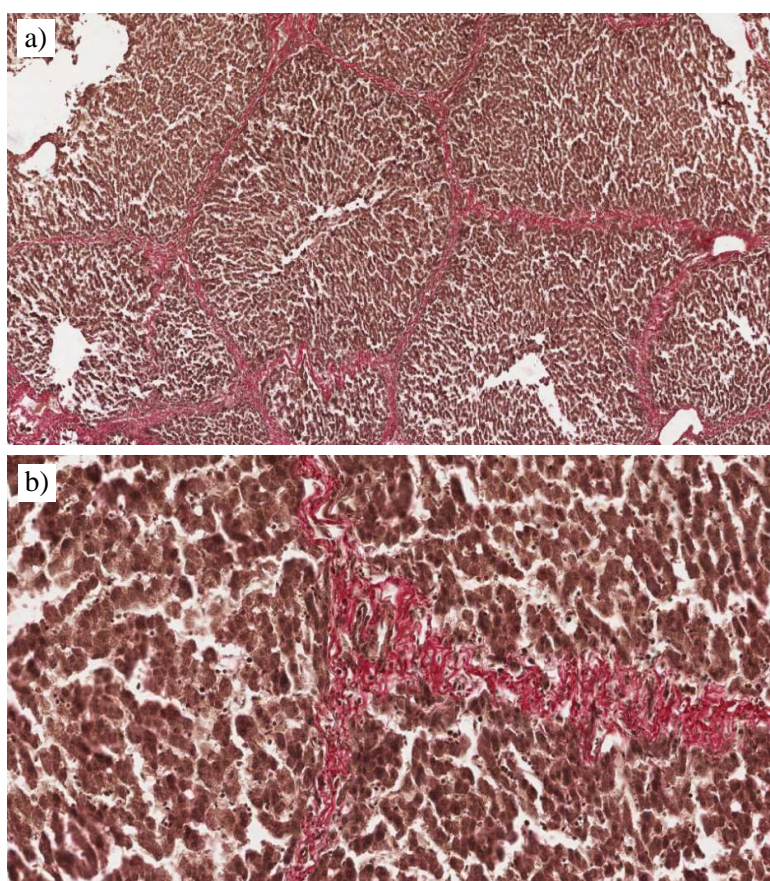


Rys. 2. Przebudowa architektury wątroby u szczura żywionego PZ (czwarte stadium *fibrosis – cirrhosis*)

W skrawkach wątrób zwierząt żywionych dietą PZ + SU nie stwierdzono stłuszczenia, zwyrodnień balonowatych hepatocytów, nacieków zapalnych w przestrzeni bramno-żółciowej, natomiast u 70% badanych zwierząt wykazano zmiany w strukturze: u 40% drobne ogniska komórek zapalnych w obrębie zrazika (rys. 3), a u 20% przebudowę wątroby z tworzeniem guzków otoczonych tkanką łączną – czwarte stadium zwłóknienia – marskość (rys. 4 a i b).



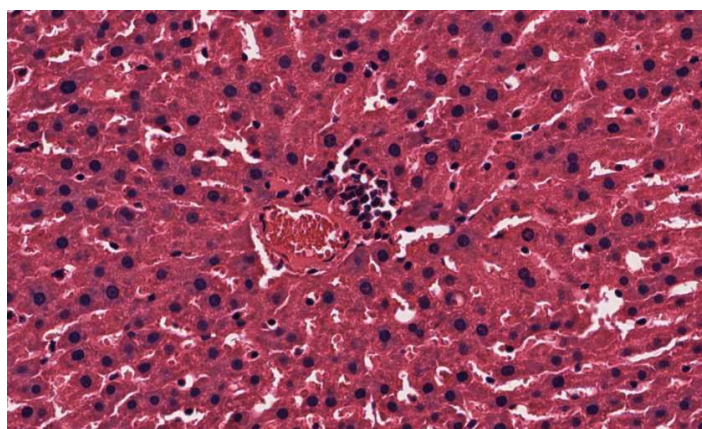
Rys. 3. Drobne ogniska komórek zapalnych (*lobular inflammation*) w wątrobach zwierząt żywionych PZ, suplementowaną witaminami z grupy B w sposób uzupełniający



Rys. 4. Wątroby zwierząt żywionych paszą zmodyfikowaną, suplementowaną witaminami z grupy B w sposób uzupełniający: a) przebudowa architektury z tworzeniem guzków otoczonych tkanką łączną; b) zwłóknienia (*fibrosis*) w czwartym stadium – marskość (*cirrhosis*). Preparaty zabarwione metodą van Gieson, włókna kolagenowe barwią się na czerwono

W skrawkach wątroby zwierząt żywionych PZ + SN nie stwierdzono ani stłuszczenia, ani zwyrodnień balonowatych hepatocytów, ani nacieków zapalnych w obrębie przestrzeni bra-

mno-żółciowej, natomiast u 20% badanych zwierząt obserwowano drobne ogniska komórek zapalnych (rys. 5).



Rys. 5. Drobne ogniska komórek zapalnych (*lobular inflammation*) w wątrobach zwierząt żywionych PZ, suplementowaną witaminami z grupy B w sposób nadmiarowy

4.11. Wybrane markery stresu oksydacyjnego

Analizując stężenie grup karbonylowych białek w surowicy krwi, nie stwierdzono istotnego wpływu zmiany składu diety PP i PZ na ten parametr – tabela 15. Zastosowana suplementacja diety PZ natomiast istotnie zmniejszała stężenia tego wskaźnika w obu grupach zwierząt, przy czym w grupie suplementowanej w sposób nadmiarowy (PZ + SN) była to różnica statystycznie istotna w porównaniu z grupą zwierząt żywioną PZ.

Zmiana składu diety (PP i PZ) nie miała wpływu na stężenie oxLDL-C w surowicy krwi badanych zwierząt, natomiast zastosowana suplementacja diety witaminami stymulowała wzrost stężenia tego wskaźnika. W surowicy zwierząt z zastosowaną suplementacją nadmiarową (PZ + SN) był on już statystycznie istotny.

Tabela 15. Wpływ składu diety i różnych sposobów jej uzupełniania wybranymi witaminami z grupy B na stężenie wybranych markerów stresu oksydacyjnego w surowicy u samców szczura ($\bar{x} \pm SD$, Me, n = 40)

Badana cecha	Grupy zwierząt			
	PP	PZ	PZ + SU	PZ + SN
Grupy karbonylowe (nmol/mg białka)	1,15 ^{Aa} ±0,42 (1,08)	1,16 ^A ±0,99 (0,79)	0,54 ^b ±0,55 (0,34)	0,46 ^B ±0,43 (0,28)
OxLDL-C (ng/cm ³)	9,3 ^C ±1,5 (9,5)	12,0 ^{BC} ±1,2 (11,9)	17,9 ^{AB} ±3,8 (17,2)	22,6 ^A ±3,6 (22,3)

Średnie zaznaczone w wierszach różnymi małymi literami różnią się na poziomie $p \leq 0,05$, a wielkimi literami na poziomie $p \leq 0,01$.

4.12. Cytokiny i chemokiny

W przeprowadzonym doświadczeniu, pomimo obserwowanych wyraźnych tendencji wzrostowych lub spadkowych wartości oznaczonych cytokin i chemokin, nie stwierdzono istotnego wpływu zmiany składu diety i zastosowanej suplementacji – tabela 16. Wyjątkiem był wpływ diety PZ + SU w stosunku do diety PP na istotny spadek stężenia IL-1 α .

Tabela 16. Wpływ składu diety i różnych sposobów jej uzupełniania wybranymi witaminami z grupy B na stężenie cytokin i chemokin w surowicy u samców szczura ($\bar{x} \pm SD$, Me, n = 40)

Badana cecha	Grupa zwierząt			
	PP	PZ	PZ + SU	PZ + SN
IL-1 α (pg/cm ³)	27,0 ^a \pm 9,5 (25,7)	19,3 \pm 9,0 (19,8)	15,5 ^b \pm 8,0 (14,3)	22,3 \pm 13,3 (21,9)
CRP (ng/cm ³)	20,3 \pm 10,0 (24,7)	13,9 \pm 9,1 (13,6)	11,9 \pm 13,3 (2,6)	12,3 \pm 10,8 (13,6)
IL-6 (pg/cm ³)	1605,1 \pm 200,0 (1609,7)	1410,4 \pm 294,7 (1421,5)	1497,7 \pm 351,7 (1431,2)	1428,2 \pm 160,3 (1410,7)
TNF α (pg/cm ³)	2,54 \pm 2,05 (2,3)	1,48 \pm 0,93 (1,18)	1,28 \pm 0,87 (0,79)	1,24 \pm 0,65 (1,32)
sICAM-1 (pg/cm ³)	356,3 \pm 282,3 (349,4)	328,5 \pm 213,9 (281,3)	220,6 \pm 186,1 (154,8)	247,8 \pm 133,1 (255,6)
VCAM-1 (pg/cm ³)	133,5 \pm 62,1 (135,4)	148,2 \pm 58,9 (142,3)	155,3 \pm 30,1 (162,0)	149,9 \pm 19,8 (154,0)

Średnie zaznaczone w wierszach różnymi małymi literami różnią się na poziomie $p \leq 0,05$.

5. Dyskusja

W przeprowadzonym doświadczeniu, pomimo znanego już wpływu diety zawierającej sacharozę na wielkość spożycia paszy (de Castro i in. 2008, Chepulis 2007), nie stwierdzono istotnego wpływu izokalorycznej zamiany obecnych w diecie pełnych ziaren pszenicy i kukurydzy na mąkę pszenną i sacharozę na wielkość spożycia paszy przez badane zwierzęta.

Można to tłumaczyć sumarycznym wpływem działania kilku czynników. Wykazano już (Eckel i Moore 2004), że samce szczura charakteryzują się mniejszym od samic powinowactwem do smaku słodkiego i smak ten preferują w granicach 0,23–32% stężenia sacharozy (Tordoff i in. 2008). Jednak w przeprowadzonych badaniach własnych zwierzęta, mając wolny dostęp do paszy zawierającej 10% sacharozy, zmniejszyły ilość jej spożycia już od momentu zaspokojenia potrzeb energetycznych.

Innym z czynników wpływających na ilość paszy pobieranej przez zwierzęta jest jej wartość energetyczna. W przeprowadzonym doświadczeniu zwierzęta otrzymywały pasze izokaloryczne, a dodawane do wody pitnej witaminy z grupy B nie zmieniały jej wartości energetycznej i z uwagi na to wpływ tego czynnika można uznać za wyeliminowany. Obserwowane natomiast nieco większe pobranie paszy przez zwierzęta z grupy kontrolnej, żywionej paszą podstawową, można tłumaczyć zdolnością szczurów do kompensowania mniejszej gęstości odżywczej diety jej ilością (Roy i in. 2003).

Wykazano już również, że o wyborze diety przez szczury decyduje przede wszystkim zawartość w niej węglowodanów, tłuszczów i białek, które wpływają na fizjologiczną regulację pobierania pokarmu. Większe spożycie paszy z sacharozą obserwuje się u szczurów tylko wtedy, gdy składnik ten był podawany w formie roztworu wodnego, co tłumaczono mniejszą wartością sycącą płynów niż spożywanych pasz i stymulacją dodatkowego pobierania energii (Sheludiakova i in. 2012).

Brak istotnych różnic w wielkości spożycia paszy oraz w wartości energetycznej, w przeliczeniu na 100 g masy ciała, przełożył się na wyrównaną końcową masę ciała badanych zwierząt. Podobny rezultat braku istotnych różnic w końcowej masie ciała po 4–12 tygodniach żywienia samców szczura szczepu Wistar dietą zawierającą 10–70% sacharozy, w stosunku do zwierząt z grupy kontrolnej, obserwowali również inni badacze (de Castro i in. 2008, Martínez i in. 2010, Zago i in. 2010, Sheludiakova i in. 2012). Również zastosowana suplementacja zmodyfikowanej diety, tak uzupełniająca, jak i nadmiarowa, nie wpłynęła na końcową masę ciała. Podobny wynik uzyskali França i Vianna (2010) przy suplementacji diety samców szczura szczepu Wistar witaminą B₂ w ilości 10 mg/kg masy ciała.

Obserwowany brak istotnych różnic w końcowej masie ciała badanych zwierząt pod wpływem zmiany składu diety, jak i zastosowanej suplementacji znalazł też swoje odbicie w braku istotnych różnic w bezwzględnej masie wybranych narządów badanych zwierząt.

Pomimo znanego już wpływu diety zawierającej sacharozę na przyrosty masy ciała (Friedrich i Mateńczuk 2001, Kendig i in. 2014) w przeprowadzonych badaniach własnych takiego wpływu nie stwierdzono u zwierząt żywionych paszą zmodyfikowaną w porównaniu z grupą

żywioną paszą podstawową. Brak istotnych różnic w przyrostach masy ciała pod wpływem zmiany składu diety mógł wynikać z faktu, że do syntezy kwasów tłuszczowych z glukozy i fruktozy, które to składniki dostarczają atomów węgla i NADPH, niezbędne są odpowiednie ilości witamin z grupy B, będących kofaktorami w tych przemianach (Clayton 2006, Mooney i in. 2009). W witaminy te pasza zmodyfikowana była zubożona w zakresie 42–75%.

Wpływ zastosowanej suplementacji na przyrosty masy ciała, także w przeliczeniu na 100 g spożytej paszy, obserwowano w grupie z zastosowaną suplementacją uzupełniającą (PZ + SU), pomimo tego, że spożycie wybranych witamin z grupy B było zbliżone do ich spożycia przez zwierzęta żywione paszą podstawową (PP). Najwyższy przyrost masy ciała u szczurów z tej grupy mógł wynikać nie tylko z faktu uzupełniania diety w witaminy, ale też lepszego wykorzystania spożytej paszy i zawartego w niej białka, o czym informują istotnie większe wartości wskaźników FCE i PER. Porównywalne do zwierząt żywionych paszą podstawową przyrosty masy ciała i wartości wskaźników FCE i PER w grupie zwierząt z zastosowaną suplementacją nadmiarową (PZ + SN) mogą wskazywać na normalizowanie się tych procesów pod wpływem tak dużej ilości spożywanych witamin.

Pomimo tego, że szczury żywione PZ spożywały większe ilości płynów, co wymuszone było prawdopodobnie wzrostem osmolalności osocza przez spożywaną sacharozę, jednak przy równocześnie zwiększonej diurezie bilans płynów pobranych i wydalonych z moczem w tej grupie zwierząt był prawidłowy. Stwierdzono również, że zastosowana suplementacja paszy zmodyfikowanej nie spowodowała istotnych zmian w pobieraniu i wydalaniu płynów. França i Vianna (2010) również nie obserwowali wpływu suplementacji diety witaminą B₂ na wielkość spożycia płynów i ilość moczu wydalonego przez samce szczura. Stwierdzenie, czy zwiększone wydalanie moczu u zwierząt żywionych paszą zmodyfikowaną i suplementowaną w sposób uzupełniający (PZ + SU) wiązało się ze zwiększonym wydalaniem witamin, wymaga dalszych badań. Wielu autorów w badaniach na szczurach wykazało, że wydalanie witamin z grupy B z moczem odzwierciedla ich niedawne (1–2 dni) pobranie i w przypadku większej podaży i zwiększonego wydalania przekłada się na zmniejszone na nie zapotrzebowanie (Fukuwatari i Shibata 2008, Shibata i in. 2009, Tsuji i in. 2010, Shibata i in. 2013).

W ostatnich latach jednoznacznie wykazano, że rolą tkanki tłuszczowej w ustroju jest nie tylko magazynowanie energii w postaci triacylogliceroli, ale również pełnienie licznych funkcji lokalnych i systemowych. Tkanka ta oddziałuje m.in. na system immunologiczny, układ renina–angiotensyna–aldosteron, ścianę naczyń krwionośnych oraz współpracuje z autonomicznym układem nerwowym (Mathieu i in. 2009). Adipocyty uwalniają adipokiny, a zmiany w ich wydzielaniu kojarzone są z rozwojem chorób sercowo-naczyniowych, insulinoopornością i nadciśnieniem tętniczym (Trayhurn i Wood 2004, Ferris i Crowther 2011).

Nasierdziowa tkanka tłuszczowa, wychwytyjąc z krwi znaczne ilości wolnych kwasów tłuszczowych, uczestniczy w procesie lipogenezy i stanowi lokalne źródło energii dla mięśnia sercowego. Tkanka ta, wyróżniając się wysokim tempem lipolizy, chroni również mięsień sercowy przed ekspozycją na zbyt wysokie stężenia kwasów tłuszczowych, jednak tylko do określonego minimum fizjologicznego, co potwierdziły badania autopsyjne, przeprowadzone u pacjentów wyniszczonych przewlekłą chorobą, u których doszło do daleko posuniętej redukcji masy tkanki tłuszczowej w różnych miejscach ciała (Rabkin 2007).

Tkanka nasierdziowa, otaczająca tętnice wieńcowe, uwalnia jednak istotnie więcej cytokin prozapalnych (IL-6, IL-1 β , TNF- α , MCP-1) niż tkanka podskórna i tym samym wpływa na zmiany zachodzące w naczyniach krwionośnych. Aktywne uwalnianie substancji prozapalnych przez nasierdziową tkankę tłuszczową jest podobne do aktywności obserwowanej w otyłości trzewnej (Mazurek i in. 2003, de Vos i in. 2008).

W przeprowadzonym doświadczeniu nie stwierdzono wpływu zmiany składu diety na ilość nasierdziowej tkanki tłuszczowej u badanych zwierząt. Można to tłumaczyć jej fizjologiczną rolą zabezpieczającą przez nadmierną lipogenezę. Również zastosowana suplementacja witaminami, szczególnie zaangażowanymi w proces lipogenezy i lipolizy, nie wpłynęła istotnie na zmiany ilości nasierdziowej tkanki tłuszczowej.

Wykazano, że przeciętnie masa nasierdziowej tkanki tłuszczowej stanowi 20% masy serca (Silaghi i in. 2008). W przeprowadzonym doświadczeniu, chociaż nie stwierdzono istotnego wpływu zastosowanych czynników doświadczalnych na masę nasierdziowej tkanki tłuszczowej u badanych zwierząt, to jednak najwyższą masą tej tkanki w stosunku do masy serca (36%) charakteryzowały się szczury żywione paszą zmodyfikowaną i suplementowaną w sposób uzupełniający (PZ + SU). Ponieważ tkanka ta jest ważnym źródłem licznych cząsteczek aktywnych biologicznie (Iacobellis i in. 2008), nie można zatem wykluczyć, że mogła wpłynąć na uwalnianie kwasów tłuszczowych i zwiększoną syntezę frakcji LDL-C.

Wykazano już, że gromadzenie lub redukcja nasierdziowej tkanki tłuszczowej w organizmie są związane z gromadzeniem lub redukcją wisceralnej tkanki tłuszczowej (Iacobellis i in. 2008, Silaghi i in. 2008, Kim i in. 2009). Obserwowany w niniejszych badaniach brak wpływu zmiany składu diety i zastosowanej suplementacji na gromadzenie okołonarządowej tkanki tłuszczowej u szczurów wpisuje się w ten mechanizm. Należy jednak zauważyć, że wzrost ilości okołonarządowej tkanki tłuszczowej w grupach zwierząt karmionych z zastosowaną suplementacją, w przeliczeniu na 100 g masy ciała zwierząt, był wyższy nie tylko w porównaniu z grupą zwierząt żywionych paszą zmodyfikowaną (PZ), ale też w porównaniu z grupą zwierząt żywionych paszą podstawową (PP).

W przeprowadzonym doświadczeniu nie stwierdzono istotnego wpływu zmiany składu diety i jej suplementacji na zawartość białka, tłuszczu i suchej masy w tkankach mięśniowej i wątrobowej badanych zwierząt. Można to tłumaczyć wynikami badań Blaxtera (1989), który wykazał, że u szczura w wieku siedmiu miesięcy skład badanych tkanek jest już na względnie stałym poziomie. Należy jednak zwrócić uwagę na fakt, że zarówno modyfikacja diety, jak i zastosowana suplementacja spowodowały istotne zmniejszenie ilości popiołu w mięśniach badanych zwierząt, co może wskazywać na obniżenie zawartości składników mineralnych w tej tkance.

Biorąc po uwagę skład zastosowanej w doświadczeniu diety zmodyfikowanej, zawierającej sacharozę i łatwo strawną skrobię, oczekiwano, że ze względu na przemiany metaboliczne zarówno glukozy (przez cykl kwasu cytrynowego i szlak pentozofosforanowy dostarczających atomów węgla i NADPH do syntezy kwasów tłuszczowych), jak i fruktozy (fosforylowanej pod wpływem heksokinazy do fruktozo-6-fosforanu, który w przemianach powinien być przekształcany do acetylo-CoA, możliwego prekursora syntezy kwasów tłuszczowych), będzie ona stymulować procesy lipogenezy.

W przeprowadzonym doświadczeniu zastosowana pasza zmodyfikowana nie wpłynęła jednak istotnie na wzrost syntezy tłuszczu w badanych tkankach, a zastosowana suplementacja także nie spowodowała istotnych zmian.

Pomimo braku różnic w ogólnej zawartości tłuszczu, tak w mięśniach, jak i w wątrobach badanych zwierząt, interesujące było, czy istotna zmiana rodzaju spożytych kwasów tłuszczowych, wynikająca z modyfikacji składu diety (istotne mniejsze spożycie nasyconych i jednonienasyconych kwasów tłuszczowych) i zastosowana suplementacja witaminami wpłynęła na profil kwasów tłuszczowych w wątrobach. Stwierdzono, że dieta zmodyfikowana istotnie zmniejszyła zawartość monoenowych kwasów tłuszczowych, a istotnie zwiększyła polienowych w tkance wątrobowej. Zastosowana suplementacja uzupełniająca nie korygowała tej zmiany, pomimo roli, jaką pełnią witaminy wybrane do eksperymentu w metabolizmie lipidów. Dopiero zastosowanie suplementacji nadmiarowej zmieniło zawartość wymienionych grup kwasów tłuszczowych do wartości obserwowanych u zwierząt żywionych paszą podstawową. Obserwowane zmiany sugerują zwiększone zapotrzebowanie na witaminy zastosowane w eksperymencie, niezbędne w syntezie kwasów tłuszczowych wtedy, gdy nie pochodzą one ze źródeł naturalnych (Goluch-Koniuszy 2012).

Stwierdzona mniejsza ilość popiołu uzyskana z mięśni zwierząt żywionych paszą zmodyfikowaną oraz paszami suplementowanymi mogła być wynikiem mniejszej zawartości składników mineralnych (Ca, Mg, Zn, Cr) w paszy zmodyfikowanej i tym samym mniejszego ich spożycia przez zwierzęta z tych grup. Istotnie mniejsza, w stosunku do pozostałych grup, ilość popiołu uzyskanego ze spopielenia mięśni zwierząt karmionych dietą suplementowaną nadmiarowo mogła wynikać i ze zmniejszonego spożycia składników mineralnych, i z większego zapotrzebowania ustroju na nie. Szczególnie na Zn, Fe, Cu i Se, zaangażowane w antyoksydacyjny system enzymatyczny (CuZn-SOD, GSH-Px) biorący udział w neutralizacji RFT wytwarzanych pod wpływem obserwowanego w tej grupie wzrostu stężenia glukozy we krwi. To zaangażowanie składników mineralnych w obronę antyoksydacyjną organizmu w tej grupie zwierząt może również potwierdzać stwierdzone zmniejszone stężenie wolnego Fe w surowicy krwi.

Wykazano, że istnieje wiele czynników agresji środowiskowej, które mogą, nawet przy małej intensywności, ale wystarczająco długim okresie trwania, powodować zachwianie homeostazy ustrojowej. Jednym z takich niespecyficznych czynników (stresorów) może być zmiana składu diety oraz jej suplementacja syntetycznymi witaminami z grupy B, które przyczyniając się do wzrostu glikemii i stresu oksydacyjnego, powodują zachwianie homeostazy ustroju.

Zgodnie z teorią Selyego (1974) organizm reaguje na działający stresor ogólnym zespołem adaptacji GAS, który przebiega przez fazę reakcji alarmowej, przystosowania, aż do fazy wyczerpania. Zachodzące w organizmie w tym czasie reakcje mają na celu wyeliminowanie stresora lub wypracowanie nowego działania adaptacyjnego, które wzbogaca repertuar zachowań osobniczych (*eustres*), jednak, gdy stresor działa nadal, mechanizmy adaptacyjne stają się szkodliwe i rozwija się stres przewlekły (*dystres*). W tkankach bezpośrednio dotkniętych stresem rozwija się wtedy miejscowy zespół przystosowania LAS, który charakteryzuje się obumieraniem tkanki i odczynem zapalnym. Autor ten wykazał, że wywołane stresem zmiany

metaboliczne również podlegają takim adaptacyjnym modyfikacjom. Wyraźną reakcję adaptacyjną wykazują lipidy we krwi, natomiast glukoza i wolne kwasy tłuszczowe słabo adaptują się do powtórnych stresów.

W badaniach własnych przyjęto założenie, że zastosowana zmiana składu diety i jej suplementacja mogą działać na organizm szczura jako czynniki agresji środowiskowej, powodując zachwianie homeostazy ustrojowej. Dodatkowo, w zależności od rodzaju zastosowanej suplementacji, organizm badanych zwierząt może zareagować ostrym lub przewlekłym procesem zapalnym, zachodzącym zarówno w naczyniach krwionośnych, jak i w głównym narządzie metabolicznym – w wątrobie. Jak podaje Dancygier (2010), od wydolności wątroby zależy sprawne przywracanie homeostazy ustroju oraz regulowanie procesów generowania i neutralizowania mediatorów stanu zapalenia.

Do oceny stanu wątroby, w tym procesu zapalnego i włóknienia, stosowane są bezpośrednie i pośrednie markery diagnostyczne. Bezpośrednimi markerami włóknienia wątroby są niektóre składniki ECM lub produkty ich degradacji oraz enzymy i cytokiny związane z tymi procesami. Należą do nich: kwas hialuronowy, laminina, N-końcowy peptyd prokolagenu typu III (PIIIP), kolagen IV, kolagen VI, TGF- β , tkankowy inhibitor metaloproteiny-1 (TIMP-1), metaloproteinaza matrix-2 (MMP-2). Pośrednimi markerami w postaci algorytmów są: PGA index obejmujący czas protrombinowy, γ -glutamylotranspeptydazę (GGTP) oraz apoA-I; index PGAA dodatkowo zawierający α_2 -makroglobulinę; Fibrotest zawierający α_2 -makroglobulinę, haptoglobinę, γ -globulinę, apoA-I, GGTP oraz bilirubinę; index Forms Fibrosis obejmujący wiek, płytki krwi, GGTP i cholesterol. Markerem procesu zapalnego zachodzącego z udziałem RFT może być też podwyższone stężenie jonów żelaza we krwi, które w szczególności na drugim stopniu utleniania, jest katalizatorem reakcji Fentona, w wyniku której powstaje najbardziej toksyczny z RFT – rodnik wodorotlenowy. Opisane powyżej algorytmy pozwalają odróżnić chorych z zaawansowanym włóknieniem od tych z włóknieniem łagodnym. Nie można jednak na ich podstawie różnicować stadiów pośrednich tych zmian (Forns i in. 2002). Markery te są stosowane u ludzi, by uniknąć wielokrotnej, nieoptymalnej dla zdrowia biopsji wątroby. U zwierząt modelowych można jednak dokonać najbardziej dokładniejszego z badań, czyli pośmiertnej oceny histopatologicznej wątroby, zmniejszając przy tym koszty generowane przez ww. analizy diagnostyczne (Rockey i Bissell 2006).

Badania histopatologiczne i markery serologiczne przedstawiają różne aspekty włóknienia. Parametry biochemiczne odzwierciedlają aktywność przemian ECM jako procesu dynamicznego, natomiast biopsja lub badanie histopatologiczne opisuje statyczne zmiany dokonane już w tkance wątroby (Sebastiani i Alberti 2006, Baranova i in. 2011). Należy jednak podkreślić, że nawet w przypadku stosowania biopsji ryzyko niedoszacowania choroby wątroby, z powodu występujących często losowo zmian, wynosi około 20–50% wszystkich przypadków (Sørensen i in. 2003).

W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono opisu badań histopatologicznych wątroby, które uwzględniałyby przyjęty w niniejszej pracy model doświadczenia. Oceniając wpływ zmiany składu diety na stan wątroby, nie stwierdzono, aby był on istotny poza jednym przypadkiem. Prawdopodobnie przy indywidualnej wrażliwości osobniczej, nawet przy nieistotnie statystycznym wzroście stężenia glukozy we krwi, może dochodzić do zmian w strukturze

wątroby. Podobny wpływ dodatku do diety 10% sacharozy obserwowali u szczurów Martínez i in. (2010). Cao i in. (2012) oraz Hussien i Shoman (2013) wykazali natomiast, że dieta zawierająca powyżej 35% sacharozy może mieć znacząco negatywny wpływ na morfologiczne i histologiczne cechy wątroby, a Zago i in. (2010), u samców szczura Wistar żywionych przez okres 12 tygodni dietą z udziałem 30% sacharozy, obserwowali umiarkowane stłuszczenie wątroby.

Zastosowanie paszy zmodyfikowanej i suplementacji uzupełniającej, a także powstałe po zamianie składników diety niedobry witamin z grupy B spowodowały zmiany w strukturze wątroby aż u 70% osobników badanej grupy. Były to zmiany zarówno o charakterze zapalnym, zwłóknieniowym, jak i marskim. Sumaryczny wpływ zastosowanej modyfikacji diety oraz uzupełniającej suplementacji można więc zaliczyć do grupy czynników kryptogennych, istotnie wpływających na strukturę i czynność wątroby. Zmiany tego typu w wątrobie najczęściej obserwuje się pod wpływem takich czynników jak: wirus wątroby typu B i C, alkohol, polekowe uszkodzenie wątroby lub zatrucia metalami ciężkimi (Bataller i Brenner 2005).

Obecność w tej grupie (PZ + SU) zwierząt z różnymi zmianami w architektonice wątroby wskazuje na stan przewlekłego (trwającego ponad kilka tygodni) zapalenia wątroby. Proces ten charakteryzuje się zmiennym nasileniem przebiegu klinicznego, a jego łagodniejsze postaci nie rozwijają się lub postępują wolno. Cięższe postaci zapalenia wątroby mogą prowadzić do bliznowacenia i przebudowy struktury wątroby, co w zaawansowanej fazie powoduje zwłóknienie, a następnie marskość (Friedman 2008).

Czynnikiem predestynującym do rozwoju przewlekłego zapalenia wątroby i jej zaawansowanych zmian (zwłóknienie i marskość) może być długotrwałe toczący się w ustroju stres oksydacyjny (Sánchez-Valle i in. 2012). Na powstanie stresu oksydacyjnego w ustroju zwierząt żywionych paszą zmodyfikowaną, suplementowaną w sposób uzupełniający (PZ + SU), mogła wpłynąć obecna w diecie sacharoza, pomimo tego, że nie stwierdzono istotnego wzrostu stężenia glukozy. Petrides i in. (1994) wykazali, że upośledzenie funkcji wątroby w 50% przypadków, a marskość w 80% prowadzi do nietolerancji glukozy, które to zaburzenie w formie jawnej cukrzycy pojawia się zaledwie u 10% chorych. Można również przypuszczać, że uwalniania z sacharozy fruktoza, na skutek wytwarzania RFT, przyczyniła się do istotnie większego uwalniania ze szpiku do krwi neutrofilii, które uznawane są (Alba-Loureiro i in. 2007, Valko i in. 2007) za fizjologicznie najistotniejsze źródło RFT, wywierające bezpośredni, stymulujący wpływ na komórki gwiazdziste wątroby i syntezę kolagenu, co prowadzi do zapalenia i ostatecznie neutrofilowego zwłóknienia wątroby. Podobny wpływ podawania szczurom 7,9% sacharozy w diecie na zwiększenie w ich krwi zawartości neutrofilii był już obserwowany (Chepulis 2007).

Obecna w paszy sacharoza mogła przyczynić się do rozwoju stresu oksydacyjnego również przez zwiększoną syntezę frakcji LDL-C z nasilonego katabolizmu frakcji VLDL-C. Frakcja LDL-C zawiera w swoim składzie wielonienasycone kwasy tłuszczowe i cechuje się długim czasem przebywania w krążeniu, przez co ma większą podatność na działanie RFT i możliwość oksydacji do prozapalnej frakcji oxLDL-C, której wzrost stężenia, choć nieistotny statystycznie, zaobserwowano w przeprowadzonym doświadczeniu. Jak podają Boullier i in.

(2000), w wyniku gromadzenia frakcji oxLDL-C dochodzi do uszkodzenia komórek śródbłonna EC, co zapoczątkowuje kaskadę reakcji zapalnej.

Wykazano, że wiele RFT tworzy się również podczas metabolizmu ksenobiotyków, jako efekt naturalnych procesów detoksykacyjnych w ustroju. Na generację RFT w ustroju badanej grupy zwierząt mogły więc mieć wpływ również formy chemiczne suplementowanych syntetycznych witamin, które organizm mógł potraktować jako ksenobiotyki. W żywności naturalnej witaminy B₁ i B₆ nie występują w postaci chlorowodorków, czyli związków, jakie zastosowano w tym doświadczeniu. Także podawane witamina B₂ i niacyna, które są stosowane jako syntetyczne dodatki do żywności (B₂ – E 102, niacyna – E 375) mogły się przyczynić do wystąpienia stanu zapalenia wątroby.

Obserwowany w tej grupie zwierząt wzrost zawartości neutrofilii (W-LCR) we krwi i wytwarzanych przez nie RFT powinien uruchomić aktywność wewnątrzkomórkowego enzymatycznego układu antyoksydacyjnego (dysmutazę ponadtlenkową, katalazę lub peroksydazę glutationową), który ogranicza ich toksyczne działanie. Również w warunkach fizjologicznych powstałe oxLDL-C powinny być szybko usunięte z krążenia przez sinusoidalne komórki śródbłonna w wątrobie, wyposażone w receptory zmiatające. Proces eliminacji w ustroju neutrofilii, RFT i oxLDL-C jest wydajny w zależności od obecności i sprawności działania zawartych w osoczu i w tkankach związków antyoksydacyjnych, do których należą m.in.: witamina E, witamina C, karoten i ubichinon. W wątrobie, w porównaniu z innymi tkankami, stwierdza się najwyższą aktywność antyoksydacyjną. Również zastosowane w doświadczeniu witaminy z grupy B wykazują działanie antyoksydacyjne, a jednak pomimo tego system obronny organizmu nie był na tyle sprawny, aby zapobiec generacji i/lub unieszkodliwianiu powstałych RFT, co utrzymało stres oksydacyjny, a obecna w diecie fruktoza dodatkowo mogła osłabiać enzymatyczny układ antyoksydacyjny. Ramesh i Saralakumari (2012) wykazali, że fruktoza zawarta w diecie w nadmiernych ilościach (60%) istotnie osłabiała enzymatyczny układ antyoksydacyjny u szczurów szczepu Wistar.

Przyczyną niedostatecznie silnej obrony antyoksydacyjnej organizmu zwierząt mogła być także mniejsza zawartość w paszy zmodyfikowanej cynku i magnezu oraz ich mniejsze spożycie, na co wskazuje mniejsza zawartość popiołu w tkance mięśniowej badanej grupy zwierząt. Zjawisko to może sugerować mobilizację składników mineralnych wchodzących w skład enzymów antyoksydacyjnych. Potwierdziły to m.in. badania własne (Friedrich i in. 2011), w których przy podobnym układzie doświadczenia, obserwowano istotny spadek zawartości selenu (składnika GSH-Px) w mięśniach i wątrobie badanych zwierząt. Obserwowany spadek zawartości selenu wynikał nie tylko ze zmniejszonego spożycia badanego pierwiastka, ale też ze zwiększonego jego zużycia, wymuszonego przemianami zachodzącymi pod wpływem składu diety i jej suplementacji. Osłabienie enzymatycznej linii obrony ustroju, pod wpływem zmiany składu diety oraz jej suplementacji witaminami z grupy B, wykazały również w badaniach o podobnym układzie doświadczenia Friedrich i Dolot (2009, 2010).

W różnych badaniach wykazano, że obecne w wątrobie komórki endotelium zatok SECs, które stanowią pierwotną barierę pomiędzy krwią a hepatocytom, są szczególnie wrażliwe na stres oksydacyjny, pełniący główną rolę w uszkodzeniu wątroby (McCuskey 2006). W inicjowaniu i rozwoju uszkodzenia wątroby biorą również udział komórki gwiaździste Kupffera

HSC, które aktywowane przez stres oksydacyjny, mają zdolność do produkcji cytokin (takich jak TNF- α) oraz generacji RFT, nasilając (przez syntezę składników macierzy pozakomórkowej ECM) odpowiedź zapalną i włóknienie (Alison i in. 2009). Fizjologicznie aktywacja HSC jest częścią procesu „gojenia” uszkodzeń wątroby, lecz przedłużająca się aktywność tych komórek, przez zaburzenie równowagi między fibrogenazą a fibrylizacją ECM, prowadzi w konsekwencji do przerostu, twardnienia i bliznowacenia tkanek, a tym samym do zaburzeń metabolizmu wątroby (Bataller i Brenner 2005, Baranova 2011).

W wątrobie szczura fizjologicznie proces regeneracji zachodzi bardzo szybko (Monga i in. 2001, Taub 2004). W przywracaniu naruszonej homeostazy w wątrobie niezwykle ważna jest eliminacja uszkodzonych komórek (autoapoptoza), substancji indukujących stan zapalny i produktów rozpadu własnych tkanek (przez fagocytozę) i częściowe odtwarzanie własnych tkanek po apoptozie (przez komórki macierzyste) (Taub 2004).

W przypadku już istniejącego w wątrobie zwłóknienia zachodzą również mechanizmy usuwające nadmiar ECM przez metaloproteiny macierzy zewnątrzkomórkowej MMP (zależne od jonów cynku i aktywowane przez jony wapnia), które po wydzieleniu do przestrzeni międzykomórkowej ulegają aktywacji proteolitycznej przez inne proteazy. Jednak aby zachować równowagę pomiędzy syntezą a degradacją ECM, komórki wydzielają jednocześnie substancje hamujące już aktywne MMP, tzw. tkankowe inhibitory proteaz TIMP. Stosunek MMP do TIMP określa przewagę procesów degradacji ECM nad jego hamowaniem (Knittel i in. 1999). Gdy procesy naprawcze, tj. zastępowanie uszkodzonych hepatocytów zdrowymi i odtwarzanie tkanki łącznej, przestają być podatne na mechanizmy je regulujące, dochodzi do tworzenia przegród łącznotkankowych, zaburzenia prawidłowej architektury narządu oraz powstawania nieprawidłowych strukturalnie tzw. guzków regeneracyjnych, co powoduje niewłaściwy przepływ krwi w obrębie wątroby i zaburzenia czynnościowe tego narządu. W ostatnim stadium rozwija się marskość wątroby, a brak możliwości regeneracji w tym stadium zaburza jej prawidłowe funkcjonowanie, w tym m.in. aktywność detoksykacyjną (Malato i in. 2008, Błazik i Durlik 2010). Można zatem przypuszczać, że niższe spożycie przez zwierzęta tej grupy (PZ + SU) wapnia i cynku mogły być przyczyną niedostatecznej syntezy MMP, utrzymywania się zwłóknienia i w efekcie stwierdzonej marskości. Obecność przegród łącznotkankowych dookoła hepatocytów powoduje ograniczony napływ krwi do wątroby objętej zmianami, co mogło utrudniać wzrost prawidłowych elementów tkankowych.

Stwierdzone zmiany w strukturze wątrób badanych zwierząt zachodzące pod wpływem zmiany składu diety i jej suplementacji uzupełniającej (PZ + SU) wpłynęły na czynność wątroby, co znalazło odbicie w zmianach istotnych wartości pośrednich markerów diagnostycznych (w stężeniu we krwi Fe, zawartości limfocytów i neutrofilii, stężeniu β -globulin, wartościach wskaźników aterogenności profilu lipidowego, IL-1). Na nieprawidłowy stan wątroby może wskazywać również (pomimo mniejszej zawartości tego pierwiastka w paszy i zmniejszonego jego spożycia) istotne zwiększone stężenie Fe w surowicy krwi zwierząt tej grupy, co sugeruje upośledzenie jego wychwytywania i zatrzymywania przez zmienioną czynnościowo wątrobę. Na taki mechanizm zjawiska może wskazywać również istotny spadek stężenia frakcji β -globulin, zawierającej m.in. transferynę. Na zaburzenie czynności wątroby w tej grupie zwierząt wskazuje także istotny spadek liczby limfocytów we krwi, który jak podają Carey

i Carey (2010), jest charakterystyczny nie tylko dla istniejącego w ustroju stresu oksydacyjnego, ale również dla procesu włóknienia wątroby lub jej marskości. Obserwowany u zwierząt z grupy PZ + SU istotny spadek zawartości limfocytów we krwi mógł wynikać zarówno z ich migracji do ogniska zapalnego, aktywującej roli mechanizmów obronnych przed stresem oksydacyjnym, jak i zaburzeń ich wytwarzania na skutek niedoborów cynku, co opisali wcześniej Sułek i Sawicki (2010).

Obserwowany natomiast wzrost zawartości neutrofilii we krwi zwierząt tej grupy, odpowiedzialnych za komórkowe mechanizmy odporności nieswoistej, wskazuje na toczący się w ustroju proces zapalny. Zdaniem wielu autorów (Fialkow i in. 2007, Pham 2008, Chakravarti i in. 2009), to właśnie one jako pierwsze zjawiają się w miejscach objętych procesem zapalnym, wykazują zdolność do fagocytozy i pobudzają wydzielanie cytokin, ale generują też RFT.

Pomimo obserwowanych patologicznych zmian w architektonice wątroby badanych zwierząt nie stwierdzono u nich istotnego wzrostu aktywności AST i ALT. Nie jest to jednak warunkiem koniecznym do potwierdzenia tych zmian. Zdaniem Juszczyk (2001), w przypadku przewlekłego zapalenia wątroby, włóknienia i jej marskości aktywność tych enzymów może być tylko nieznacznie podwyższona lub mieścić się w zakresie wartości referencyjnych.

Pośrednim markerem, ujemnie skorelowanym ze zwłóknieniem wątroby, jest stężenie apoA-I we krwi (Imbert-Bismut i in. 2001). W przeprowadzonym doświadczeniu nie stwierdzono istotnego wpływu zastosowanej modyfikacji diety i jej suplementacji (PZ + SU) na zmiany stężenia tego parametru. Biorąc jednak pod uwagę istotny wzrost w tej grupie zwierząt stężenia HDL-C, wydaje się, że apoA-I została wbudowana w tę frakcję, przez co jej stężenie w surowicy było niższe. Również obniżenie stężenia apoA-I we krwi tej grupy zwierząt może sugerować zmiany ekspresji jej genu w wątrobie na skutek niższego spożycia nienasyconych kwasów tłuszczowych i/lub zmniejszonego spożycia cynku. Wykazano bowiem (Reaves i in. 2000, Velez-Carrasco i in. 1999), że niedobór cynku w diecie samców szczura może powodować zmniejszenie stężenia apoA-I w osoczu (o 13%) przez zmniejszenie wątrobowej ekspresji genu mRNA apoA-I (o 38%).

Nie wykazano istotnego wpływu zastosowanych czynników na stężenie we krwi apoB. Stwierdzono jednak, że również w grupie zwierząt żywionych PZ + SU było ono najniższe. Można przypuszczać, że apoB została wbudowana w LDL-C oraz oxLDL-C, których istotny wzrost stężenia wskazuje na taki mechanizm zjawiska. Natomiast biorąc dodatkowo pod uwagę najmniejsze spożycie przez badane zwierzęta kwasów tłuszczowych z rodziny n-3, które jak podają Pan i in. (2004), u szczurów zmniejszają sekrecję cząsteczki apoB, szczególnie podczas stresu oksydacyjnego, wydaje się, że tę drogę wpływu można wykluczyć.

Brak istotnych zmian w stężeniu apoA-I i apoB we krwi zwierząt karmionych dietą suplementowaną w sposób uzupełniający przełożył się na brak istotnych różnic w wartości wskaźnika aterogenności krwi apoB/apo-AI. Istotny wzrost stężenia frakcji LDL-C we krwi w tej grupie zwierząt przełożył się natomiast na wzrost wartości wskaźników aterogenności profilu lipidowego krwi, czyli LDL-C/apoB i LDL-C/HD-C. Pozostałe parametry, oznaczane zarówno we krwi, jak i w tkankach, zależne od stanu czynnościowego wątroby i zmiany w jej strukturze, nie zmieniły się istotnie pod wpływem modyfikacji składu diety.

Analizując stężenie kortykosteronu, głównego hormonu stresu, stwierdzono, że w grupie zwierząt żywionych PZ + SU było ono najniższe. Biorąc jednak po uwagę czas trwania doświadczenia wydaje się, że wynik ten związany był z tzw. fazą wyczerpania. Wskazuje na to brak zmian w zawartości wody w tkankach i w bilansie pobranych i wydalanych płynów, jak i istotny spadek stężenia IL-1 i brak zmian stężenia IL-6 wskaźników, których wzrost, według Bethin i in. (2000) oraz Bornstein i in. (2008), mógłby modulować stężenie kortykosteronu.

Oceniając niektóre niekorzystne zmiany w zawartości oznaczonych wskaźników w grupie żywionej PZ + SU spodziewano się równie istotnych, a może nawet bardziej nasilonych zmian przy zastosowanej w eksperymencie suplementacji nadmiarowej (PZ + SN). W wielu badaniach innych autorów (Busserolles i in. 2002a, b, c) wykazano, że przewlekłe podwyższona glikemia, przez takie mechanizmy jak: autooksydacja glukozy, nieenzymatyczna glikacja, aktywacja przemian szlaku polioloowego i sorbitolu oraz stymulacja neutrofilii, indukuje wytwarzanie RFT i powstanie stresu oksydacyjnego, kluczowego elementu kaskady reakcji ostrej fazy.

W niniejszych badaniach stwierdzono jednak, że ten sposób wzbogacania diety tylko u 20% badanych zwierząt spowodował zmiany w architektonice wątroby i były to nacieki zapalne w obrębie zrazika. Przyczyną tych zmian prawdopodobnie mogły być generowane, przez podwyższoną glikemię wolne rodniki tlenowe, co obserwowali Nomura i Yamanouchi (2012) oraz Vos i Lavine (2013).

Odnotowany wzrost stężenia glukozy we krwi zwierząt w tej grupie (PZ + SN) wynikał z obecności wśród suplementowanych witamin ponadfizjologicznej ilości niacyny, która wywołuje taki efekt wtórnie, przez zmniejszenie wrażliwości komórek na insulinę i zmiany metabolizmu wolnych kwasów tłuszczowych. Obserwowano to w badaniach Chang i in. (2006). Wpływ ten musiał być jednak tak silny, że wykazano go, pomimo zastosowanej jednocześnie suplementacji diety tiaminą, znaną z normalizującego w tym zakresie działania (Babaei-Jadidi i in. 2004, Thornalley 2005).

W badaniach własnych wzrostowi stężenia glukozy towarzyszył wzrost stężenia insuliny. Nie na tyle jednak proporcjonalny, by wartość wskaźnika inuslinooporności HOMA-IR tej grupy zwierząt mieściła się w granicach referencyjnych. Wzrost tego wskaźnika do wartości 2,98 wskazuje na zmniejszenie wrażliwości tkanek docelowych na insulinę i potwierdza wcześniejszą sugestię o możliwości takiego współoddziaływania.

Za toczącą się w ustroju badanych zwierząt z zastosowaną suplementacją nadmiarową (PZ + SN) reakcją ostrej fazy przemawia wzrost stężenia we krwi frakcji α_1 -globulin zawierającej m.in. transkortynę i α_1 -antytrypsynę. Według wielu autorów (Dabbagh i in. 2001, O'Connell i in. 2005) zawarta w tej frakcji α_1 -antytrypsyna ma naturalną zdolność do hamowania aktywności komórek cytotoksycznych takich jak neutrofile. W niniejszym doświadczeniu potwierdza to obserwowany istotny spadek ich zawartości we krwi w tej grupie zwierząt.

Na toczący się proces ostrej fazy może wskazywać również stwierdzony we krwi badanej grupy zwierząt istotny wzrost zawartości frakcji α_2 -globulin, zawierającej szczególnie ważną u szczura haptoglobinę i α_2 -makroglobulinę. Wykazano w badaniach innych autorów (Imbert-Bismut i in. 2001, Giffen i in. 2003), że u szczurów α_2 -makroglobulina, która hamuje aktywność większości proteinaz przed degradacją białek osocza oraz uszkodzeniem tkanki, jest sil-

niej działającym białkiem ostrej fazy niż białko C-reaktywne. Potwierdzeniem toczącej się reakcji ostrej fazy w tej grupie zwierząt (PZ + SN) jest również obserwowane istotne obniżenie stężenia frakcji β -globulin (zwierającej m.in. transferynę, ALT, β -lipoproteiny). Odnotowany równocześnie wzrost stężenia frakcji α_1 -globulin, frakcji α_2 -globulin oraz spadek stężenia β -globulin we krwi jednoznacznie wskazuje na reakcję ostrej fazy, która powoduje wzmożoną obronę organizmu przed rozwojem procesu zapalnego w naczyniach i w wątrobie.

Stwierdzony natomiast brak istotnych zmian w aktywności ALT i AST we krwi w tej grupie zwierząt (PZ + SN) mógł wynikać m.in. z prawidłowej ilości nasierdziowej tkanki tłuszczowej. Inubushi i in. (2005) oraz Iacoleblis i in. (2008) wykazali, że jej ilość jest skorelowana m.in. ze wzrostem aktywności tych enzymów oraz z obecnością dodawanej do diety pirydoksyny, przekształcanej w ustroju do pirydoksalu-5'-fosforanu (PLP) biorącego udział w szlaku transaminacji aminokwasów.

Biorąc pod uwagę toczący się w organizmie badanych zwierząt proces, spodziewano się u nich wzrostu stężenia kortykosteronu we krwi. Takiego efektu jednak nie obserwowano. Pomimo że kortykosteron jest najsilniej wydzielany podczas fazy alarmowej stresu, to na jego stężenie mogła wpłynąć ponadfizjologiczna ilość pirydoksyny. Iacobelis (2008) wykazał, że pirydoksyna jest antagonistą glukokortykoidów i hamuje ich wiązanie z receptorami.

Wykazano w ostatnich latach (Rahal i in. 2014), że reakcja ostrej fazy stymuluje w organizmie procesy obrony antyoksydacyjnej. W przeprowadzonym doświadczeniu odnotowano istotny wzrost stężenia we krwi frakcji HDL-C, która wykazuje silne działanie antyoksydacyjne. Zdaniem Han i in. (2002), mechanizm tego wpływu polega na zmniejszaniu ekspresji receptora CD36, który wiąże oxLDL-C. Frakcja ta ponadto hamuje oksydacyjną modyfikację LDL-C przez detoksykację oksydowanych fosfolipidów, wytwarzanych podczas peroksydacji lipidów. Ten antyoksydacyjny efekt możliwy jest dzięki antyoksydacyjnym właściwościom apoA-I oraz obecności takich enzymów jak paraoksonaza 1 (PON-1) i acetylohydrołaza czynnika aktywującego płytki (PAF-AH) (Robbesyn i in. 2005).

W przeprowadzonym doświadczeniu do wzrostu syntezy HDL-C mogła przyczynić się też zawarta w mieszance witaminowej pirydoksyna. Taki wpływ przy długotrwałym jej aplikowaniu u szczurów wykazali Acar i in. (2006). Ponadfizjologiczne ilości dodawanej niacyny mogły się również przyczyniać nie tylko do obniżenia tempa katabolizmu frakcji HDL-C, ale również do zwiększenia jej syntezy. Zhang i in. (2008) wykazali, że suplementacja diety tą witaminą wzmacnia syntezę HDL-C o 25–30%. W przeprowadzonym eksperymencie własnym wzrost stężenia tego wskaźnika wynosił aż 37,5%.

Stwierdzone we krwi tej grupy zwierząt mniejsze ilości frakcji LDL-C wynikają z odnotowanej równocześnie niskiej zawartości frakcji VLDL-C. Frakcja ta w ustroju ulega hydrolizie (przez remnanty IDL będące substratem dla lipazy wątrobowej) do składowych triacylogliceroli, cholesterolu, fosfolipidów i apoB-100 wbudowanych we frakcję LDL-C. Taki szlak przemian potwierdza również brak istotnych różnic w stężeniu apoB w surowicy krwi badanych zwierząt (PZ + SN), pomimo istotnego zmniejszenia zawartości frakcji VLDL-C i zastosowanej suplementacji niacyną. Jak wykazały badania Wang i in. (2001), niacyna podawana przełknię w formie leku obniżała stężenie frakcji VLDL-C w surowicy badanych normolipemicznych kobiet. Ponadto badania Jin i in. (1999) wykazały, że niacyna przyczynia się do

wewnątrzkomórkowej degradacji apoB. Dlatego odzyskane z delipidacji frakcji VLDL-C cząsteczki apoB musiały zostać wbudowane we frakcję LDL-C oraz oxLDL-C.

Celem określenia wpływu zastosowanych diet na aktywność systemu antyoksydacyjnego ustroju zwierząt w przeprowadzonym doświadczeniu zbadano stężenie izoprostanu 8-iPF 2α -III w ich moczu, a uzyskane wyniki już opublikowano (Goluch-Koniuszy i Sadowska 2012). Izoprostany 8-iPF 2α -III powstają w ustroju pod wpływem nieenzymatycznego wolnorodnikowego mechanizmu peroksydacji kwasu arachidonowego wbudowanego w fosfolipidy błonowe oraz *in vivo* we frakcjach LDL-C modyfikowanych przez działanie wolnych rodników. U szczurów wielkość stężenia izoprostanu 8-iPF 2α -III w moczu jest bezdyskusyjnym markerem nasilenia reakcji wolnorodnikowych przebiegających w ustroju pod wpływem różnych czynników. Wynika to z faktu, że mocz zawiera niewielkie ilości lipidów, co ogranicza syntezę izoprostanów w wyniku autooksydacji kwasu arachidonowego *ex vivo* (Montuschi i in. 2004).

W przeprowadzonych badaniach własnych (Goluch-Koniuszy i Sadowska 2012) stwierdzono, że modyfikacja diety (PZ), polegająca na częściowym i izokalorycznym zastąpieniu pełnych ziaren zbóż mąką pszenną i sacharozą, spowodowała u zwierząt nasilenie reakcji wolnorodnikowych, wyrażone istotnym wzrostem stężenia 8-iPF 2α -III w moczu. Zastosowana natomiast suplementacja diety nadmiarowa (PZ + SN) istotnie obniżała wartość tego parametru. Uzyskane wyniki jednoznacznie wskazywały na wzmożoną aktywność systemu antyoksydacyjnego w ustroju zwierząt żywionych dietą suplementowaną (PZ + SN), co mogło wynikać z faktu, że zastosowane witaminy mają udokumentowane właściwości pro- lub antyoksydacyjne, zależnie od zastosowanych ilości i czasu ich stosowania. Takie działanie witamin B₁, B₂, B₆ i niacyny udowodnili Mahfouz i Kummerow (2004), Anand (2005), Voziyan i Aduson (2005) oraz Ullegaddi i in. (2006).

Higashi-Okai i in. (2006) wykazali, że ponadfizjologiczne dawki tiaminy, ryboflawiny i niacyny stosowane krótkoterminowo mogą działać prooksydacyjnie, ale stosowane długoterminowo (podobnie jak w przeprowadzonym sześciotygodniowym eksperymencie) działają antyoksydacyjnie. Mechanizm antyoksydacyjnego działania tiaminy polega na: ochronie lipidów wątroby szczura przed mikrosomalną peroksydacją, zapobieganiu cytotoksyczności w hepatocytach, hamowaniu apoptozy komórek ssaków podczas hiperglikemii i zapobieganiu dyslipidemii, miażdżycy lub nefropatii w modelach gryzoni (Lukienko i in. 2000, Babaei-Jadidi i in. 2004, Beltramo i in. 2004, Stepuro i in. 2005).

Antyoksydacyjne działanie wykazuje również suplementacja diety pojedynczo ryboflawiną. Obserwowano, że podjęta w ciągu 12 h po udarze lub zawale 14-dniowa suplementacja diety tą witaminą działała przeciwutleniająco i przeciwzapalnie (Mack i in. 1995, Ullegaddi i in. 2004). Podobnie silnie hamujący wpływ na peroksydację lipidów, silniejszy nawet niż suplementacja witaminą C, wykazywała pirydoksyna (Jain i Lim 2001, Ananad 2005, Chumnantana i in. 2005, Higashi-Okai i in. 2006). Suplementacja diety w nadmiarze niacyną wykazywała silniejsze właściwości przeciwutleniające niż tokoferol. Hamowała zarówno mitochondrialne wytwarzanie RFT (w mózgu szczura), jak i oksydacyjne uszkodzenia białek, peroksydację lipidów oraz toksyczny wpływ na wątrobę (de Ferreyra i in. 1994, Kamat i Devasagayam 1999, Perumal i in. 2005).

Obserwowane w niniejszym doświadczeniu zmiany stężeń składowych układu antyoksydacyjnego wskazują na mobilizację ustroju zwierząt karmionych dietą suplementowaną nadmiarowo w kierunku hamownia procesu zapalnego w wątrobie.

Dubuisson i in. (2002) w swoich badaniach na zwierzętach wykazali, że do hamowania rozwoju procesu zapalnego w wątrobie może przyczyniać się również regulacja przez nerw błędny (X), określana jako „odrzuch zapalny” (ang. *inflammatory reflex*). Nerw ten unerwia narządy zawierające jednojądrowe fagocyty, m.in. wątrobę, i aktywuje tzw. cholinergiczną ścieżkę przeciwzapalną. Acetylocholina, wydzielana na zakończeniach neuronów przywspółczulnych, łączy się z receptorami cholinergicznymi na makrofagach, hamując produkcję w nich TNF- α , IL-1 α , ale nie hamując przeciwzapalnych cytokin (IL-10), w rezultacie aktywacja układu przywspółczulnego hamuje odpowiedź zapalną. Stymulacja nerwu błędnego hamuje syntezę TNF- α nie tylko w komórkach biorących udział w zapaleniu, ale także w wątrobie i wówczas obserwuje się spadek osoczowego stężenia TNF- α . W niniejszym doświadczeniu na taki wpływ może wskazywać najniższe stężenie TNF- α obserwowane w tej grupie zwierząt (PZ + SN).

W tej grupie zwierząt (PZ + SN) uwagę zwrócił istotny wzrost stężenia frakcji oxLDL-C w stosunku do pozostałych grup. Soccio i in. (2005) wykazali, że podczas oksydacyjnej modyfikacji LDL-C znaczącą rolę odgrywa rodnik ponadlenkowy generowany przez oksydazę NAD(P)H w komórkach śródbłonna. Przebieg utleniania LDL-C do oxLDL-C został szczegółowo poznany w doświadczeniach *in vitro* przy zastosowaniu jako katalizatorów jonów metali ciężkich, m.in. Fe³⁺ (Esterbauer i in. 1992), pierwiastka, którego spadek stężenia we krwi obserwowano w przeprowadzonym doświadczeniu u zwierząt suplementowanych nadmiarowo.

Zmodyfikowane LDL-C zmniejszają ruchliwość makrofagów tkankowych nie tylko w ścianach naczyń, ale także we krwi w odpowiedzi na bodźce chemokinetyczne. OxLDL-C wykazują również działanie cytotoksyczne na komórki śródbłonna, uszkadzając funkcje i integralność wyściółki śródbłonna. Ułatwia to penetrację monocytów lub przemieszczanie LDL-C do subendotelium, co przyspiesza powstawanie nacieku tłuszczowego. Utlenione LDL-C, zmieniając stan oksydoredukcyjny komórki, mogą stymulować dodatkowo wytwarzanie RFT, stanowiąc prooksydacyjny sygnał wpływający bezpośrednio na aktywację jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF- κ B. Czynniki te wpływają na ekspresję prozapalnych genów i syntezę ich produktów, takich jak: cytokiny (IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α), oraz molekuł adhezyjnych (ICAM, VCAM, MCP-1). Związki te, przez promowanie infiltracji monocytów do ściany naczyń krwionośnych, prowadzą do rozwoju lokalnego stanu zapalnego i dysfunkcji śródbłonna (Tsimikas 2006). Stymulacja receptorów aktywowanych przez proliferatory peroksydomów PPAR- γ i PPAR- α może jednocześnie hamować ekspresję prozapalnych genów kodujących cytokiny, metaloproteinazy macierzy (MMP) oraz białka ostrej fazy przez regulację aktywności NF- κ B. Dodatkowo aktywowane zapaleniem leukocyty obecne we krwi powodują sekrecję mieloperoksydazy (MPO), która zarówno na powierzchni komórek śródbłonna naczyniowego, jak i w przestrzeni subendotelialnej powoduje chlorowanie i nitrowanie reszt tyrozyny w apoB (składowej LDL-C), przyczyniając się do oksydacyjnej modyfikacji do oxLDL-C (Peluffo i Radi 2007).

Hipoteza oksydacyjnej modyfikacji lipoprotein o niskiej gęstości (LDL-C) oraz „odpowiedzi na uszkodzenie” to dwa podstawowe mechanizmy inicjacji aterogenezy. Utlenione LDL-C hamują indukcję genu iNOS, zmniejszając dostępność tlenku azotu (NO), jednego z głównych związków hamujących agregację płytek, aktywującego płytki i ich aktywność sekrecyjną, działającego rozkurczowo na ścianę naczyń. Proces ten prowadzi do nasilenia lokalnego stanu zapalnego i w konsekwencji do dysfunkcji śródbłonna naczyniowego. Dodatkowym ważnym czynnikiem ryzyka rozwoju aterogenezy jest wysoka wartość wskaźnika HOMA-IR wskazującego na insulinooporność (Haffner i in. 2000).

Biorąc pod uwagę stwierdzony w przeprowadzonym eksperymencie istotny wzrost stężenia oxLDL-C i wartości wskaźnika HOMA-IR u szczurów karmionych dietą PZ + SN, można przypuszczać, że suplementacja nadmiarowa, nie wywołując istotnie negatywnego wpływu na wątrobę, może inicjować proces aterogenezy.

Generowane w stresie oksydacyjnym RFT mogą oprócz peroksydacji lipidów powodować również zmiany oksydacyjne białek ustrojowych. Jednym z markerów diagnostycznych określających ten wpływ jest stężenie grup karbonylowych białek osocza (Kohen i Nyska 2002). Do najbardziej podatnych na utlenianie (modyfikację kowalencyjną) pod wpływem RFT należą grupy karbonylowe białek zawierających w swojej budowie takie aminokwasy jak: prolina, arginina, lizyna i treonina. Pochodne karbonylowe ww. aminokwasów są trwałe chemicznie, przez co białka te tracą swoją biologiczną aktywność.

W przeprowadzonym doświadczeniu oczekiwano, że u zwierząt żywionych paszą zmodyfikowaną i suplementowaną witaminami w sposób nadmiarowy, u których obserwowano podwyższoną glikemię generującą RFT, wpływ ten zaznaczy się wzrostem stężenia grup karbonylowych. Uzyskane wyniki nie potwierdziły jednak tego założenia. Wprost przeciwnie: stwierdzono istotny (o 40%) spadek stężenia tych grup w surowicy krwi badanych zwierząt. Wydaje się, że mogło wynikać to z silnego działania aktywowanych proteaz (katepsyny C, kalpajny i proteasomów), które na bieżąco degradowały oksydacyjnie zmienione białka.

Działanie proteaz odbywa się pod kontrolą metaboliczną różnych czynników regulacyjnych, w tym stężenia substratów enzymatycznych i ubikwitynacji, szczególnie przy wzmożonej glikemii (Stadtman i Levine 2000, Adams 2003). Powstałe drogą degradacji aminokwasy zasilają pulę aminokwasów i mogą być użyte m.in. w procesie wątrobowej glukoneogenezy, przyczyniając się dodatkowo do podwyższonej glikemii.

W przeprowadzonym doświadczeniu, przy stwierdzonym niższym spożyciu białka, nie obserwowano zmian w zawartości białka w tkance wątrobowej i mięśniowej oraz w stężeniu białka całkowitego w surowicy krwi tej grupy zwierząt (PZ + SN), można więc uznać, że fakt ten potwierdza wcześniejszą sugestię o insulinooporności.

W odpowiedzi na bodźce zewnętrzne, uszkodzenia i/lub działanie innych czynników, w organizmie wytwarzane są przez wszystkie komórki jądrzaste – cytokiny, które mogą modulować odpowiedź immunologiczną, reakcje zapalne i naprawcze. Pośrednicząc pomiędzy lokalnym miejscem uszkodzenia a hepatocytami, pełnią rolę regulatora genów białek ostrej fazy i stymulują hepatocyty do ich syntezy (Yoshioka i in. 2002). Cytokiny działają wspólnie przez wiele nakładających się ścieżek i mają, drogą krwi, lokalny wpływ na komórki otaczające miejsca uszkodzone. Wpływają ponadto na sekrecję białek ostrej fazy w wątrobie, co

prowadzi do uogólnienia procesu zapalnego i nasilenia zmian miejscowej reakcji zapalnej (Sacks i in. 2003).

W przeprowadzonym doświadczeniu nie stwierdzono wpływu zmiany składu diety (PZ) oraz jej uzupełniania witaminami (PZ + SU i PZ + SN) na stężenie oznaczonych cytokin prozapalnych. Jedynie w grupie zwierząt, w której zastosowano suplementację uzupełniającą (PZ + SU) obserwowano istotny spadek stężenia IL-1 α we krwi. Mogło to być wynikiem stwierdzonego w tej grupie zwierząt istotnego spadku zawartości limfocytów we krwi, gdyż jak podają Sims i Smith (2010), IL-1 α jest przez nie syntetyzowana.

Brak istotnych zmian w stężeniach pozostałych cytokin prozapalnych mógł wynikać z kilku przyczyn. Ich stężenie w surowicy krwi wzrasta w ciągu kilku godzin po stymulacji przez czynnik inicjujący, po czym są one zazwyczaj usuwane z obiegu w ciągu kilku następnych godzin (Webel i in. 1997). Odpowiedź ostrej fazy jest natomiast wykrywana przez kilka dni po działaniu czynnika stymulującego, ale kinetyka reakcji zależy od gatunku zwierząt oraz od stopnia uszkodzenia tkanki wątrobowej. Maksymalne stężenie białek ostrej fazy obserwuje się w okresie 24–48 h po zadziałaniu bodźca, a spadek ich stężenia jest wynikiem zadziałania procesu zwrotnego ograniczania ich syntezy, co zwykle 4–6 dni, jeżeli nie dochodzi do ponownego pobudzenia. W przeprowadzonym doświadczeniu bodziec w postaci zmiany składu diety i jej suplementacji był aplikowany codziennie przez okres sześciu tygodni. Spowodował on wystąpienie przewlekłego procesu zapalnego, w którym stwierdza się obecność białek ostrej fazy (zawartych we frakcjach białkowych krwi), ale już w niższych stężeniach niż w epizodzie ostrym, na co zwrócili uwagę w swoich badaniach Horadagoda i in. (1999). W przeprowadzonym doświadczeniu wskazują na to wcześniej opisane zmiany w stężeniach α - i β -globulin we krwi zwierząt karmionych dietą PZ + SN.

Cytokiną i równocześnie białkiem ostrej fazy produkowanym w wątrobie, m.in. pod wpływem cytokin TNF- α i IL-6, jest białko C-reaktywne. Jednak u szczurów białko to jest obecne w osoczu stale i nie odgrywa istotnej roli jako białko ostrej fazy, stąd też jego ilość przy odczynie zapalnym może ulegać tylko niewielkim zmianom (Al Ghumlas i in. 2005).

W przeprowadzonym doświadczeniu brak różnic w stężeniu CRP w surowicy zwierząt żywionych dietą PZ + SN korespondował z brakiem zmian stężenia TNF- α i IL-6. Również brak zmian w ilości wisceralnej tkanki tłuszczowej mógł mieć w tym swój udział. Wykazano bowiem (Lemieux i in. 2001) dodatnią korelację pomiędzy ilością wisceralnej tkanki tłuszczowej a stężeniem CRP. Brak zmian stężenia CRP mógł również wynikać ze stwierdzonego wzrostu stężenia antyoksydacyjnej frakcji HDL-C w tej grupie zwierząt.

Brak wpływu zastosowanych czynników doświadczalnych na stężenie IL-6 w surowicy krwi zwierząt mógł natomiast wynikać z faktu, że około 35% obecnej we krwi cytokiny jest wydzielane przez tkanki tłuszczowe: podskórną, nasierdziową i wisceralną, których wzrostu ilości w przeprowadzonym doświadczeniu nie obserwowano.

Brak zmian stężenia TNF- α w przeprowadzonym doświadczeniu mógł być konsekwencją faktu, że jak wynika to z innych badań (Zahorska-Markiewicz i in. 2000), oznaczenie zawartości krążących cytokin takich jak TNF- α , jest utrudnione z uwagi na ich względną niestabilność w płynach fizjologicznych. Cytokina ta jest szybko usuwana z krążenia, co powoduje, że jej stężenie w surowicy bywa niskie lub nieoznaczalne.

W przeprowadzonym doświadczeniu nie stwierdzono u badanych zwierząt istotnego wpływu zmiany składu diety ani jej suplementacji na stężenie we krwi badanych chemokin ICAM-1 i VCAM-1, chociaż według Heydtmann i in. (2001) oraz Zhang i in. (2004) przy przewlekłym stanie zapalnym prowadzącym do włóknienia wątroby można obserwować wzrost ich stężeń.

Brak istotnych różnic w stężeniu molekuł adhezyjnych ICAM-1 i VCAM-1 we krwi badanych zwierząt mógł wynikać z faktu, że największą ich biosyntezę obserwuje się według Zapolskiej-Downar (2000) w początkowych fazach procesu zapalnego. W grupach zwierząt suplementowanych (PZ + SU i PZ + SN) do braku zmian stężenia chemokin we krwi mogło przyczynić się również stwierdzone wysokie stężenie frakcji HDL-C, która zdaniem Xia i in. (1999), obniża ich syntezę przez hamowanie aktywności kinazy sfingozynowej, enzymu komórek śródbłonna. Można również przypuszczać, że w przeprowadzonym doświadczeniu zastosowane witaminy, wykazując działanie antyoksydacyjne, mogły wpłynąć na zmniejszenie ekspresji cząsteczek chemokin. Taki wpływ innych witamin o właściwościach antyoksydacyjnych wykazano i opisano w literaturze przedmiotu (Brown i Frank 2001).

6. Podsumowanie

W przeprowadzonym doświadczeniu zastosowana zmiana składu diety, polegająca na zamianie pełnych ziaren zbóż na mąkę pszenną i sacharozę, nie wpłynęła istotnie na ilość spożytej paszy i przyrosty masy ciała badanych zwierząt. W dietach o zmienionym składzie była niższa zawartość składników mineralnych i to miało wpływ na mniejszą zawartość popiołu w tkance mięśniowej w tych grupach zwierząt. Efekt ten mógł być także nasilany zwiększonym wydalaniem moczu. Nie stwierdzono istotnego wpływu zmian w składzie diet na masę narządów, gromadzenie nasierdziowej i okołonarządowej tkanki tłuszczowej, wybrane parametry morfologiczne krwi, parametry metabolizmu białkowego, węglowodanowego oraz na stężenie wybranych parametrów stresu oksydacyjnego, cytokin i chemokin. Można zatem stwierdzić, że dieta, w której pełne ziarna zbóż izokalorycznie zastąpiono mąką i sacharozą, nie implikowała procesów prozapalnych.

W grupie zwierząt żywionych paszą zmodyfikowaną i suplementowaną w sposób uzupełniający wybranymi witaminami z grupy B (PZ + SU) ilość spożytej paszy i przyrosty masy ciała były porównywalne do zwierząt żywionych paszą zmodyfikowaną (PZ). Zwierzęta z grupy PZ + SU charakteryzowały się najlepszym wykorzystaniem paszy i obecnego w niej białka, jednak nie wpływało to na masę narządów, gromadzenie nasierdziowej i okołonarządowej tkanki tłuszczowej. Obserwowane natomiast u badanych zwierząt (PZ + SU) zmiany parametrów morfologicznych krwi (wzrost stężenia Fe, spadek liczby limfocytów, wzrost liczby neutrofilii), zmiany wybranych parametrów metabolizmu białkowego (spadek zawartości frakcji β -globulin) i lipidowego (wzrost zawartości LDL-C) oraz markerów stresu oksydacyjnego (wzrost stężenia oxLDL-C) przemawiają za wystąpieniem przewlekłego procesu zapalnego, który manifestował się u 70% zwierząt naciekami zapalnymi i włóknieniem w wątrobach.

Zastosowana suplementacja nadmiarowa zmodyfikowanej diety (PZ + SN) nie wpłynęła istotnie na ilość spożytej paszy, przyrosty masy ciała, masy narządów i gromadzenie nasierdziowej oraz okołonarządowej tkanki tłuszczowej. Wpływ suplementacji nadmiarowej zaznaczył się u badanych zwierząt największym spadkiem zawartości popiołu w tkance mięśniowej. Stwierdzone zmiany zachodzące w badanych parametrach krwi w tej grupie zwierząt przemawiają za rozwojem ostrego odczynu zapalnego, który spełnia rolę mechanizmu obronnego ustroju, powodującego przywracanie homeostazy zakłóconej stwierdzoną podwyższoną glikemią oraz wzrostem stężenia frakcji oxLDL-C generujących RFT. Ostry odczyn zapalny u badanych zwierząt manifestował się zmianami stężenia frakcji białkowych zawierających białka ostrej fazy: wzrostem stężenia α_1 , α_2 -globulin i spadkiem β -globulin oraz spadkiem stężenia żelaza. Za wzmożeniem obrony oksydacyjnej ustroju przemawia również stwierdzone w tej grupie zwierząt wzrost zawartości antyoksydacyjnej frakcji HDL-C w surowicy. Do działania antyoksydacyjnego w ustroju badanych zwierząt przyczyniły się ponadfizjologiczne ilości witamin, którymi dieta była suplementowana.

7. Wnioski

1. Zmiana składu diety, polegająca na zamianie pełnych ziaren zbóż na mąkę pszenną i sacharozę, przy prawidłowej wielkości spożycia, nie wpływała istotnie na parametry będące wskaźnikami procesów prozapalnych.
2. Uzupełnianie zmodyfikowanej diety syntetycznymi witaminami B₁, B₂, B₆ i niacyną, w ilościach uzupełniających różnice powstałe po zamianie składników diety, stymulując wzrost liczby neutrofilii, glikemię, powstawanie stresu oksydacyjnego i oksydację frakcji LDL-C oraz powodując zmiany w metabolizmie białkowym i lipidowym, było przyczyną przewlekłego procesu zapalnego manifestującego się w wątrobach badanych zwierząt naciekami zapalnymi i włóknieniem przechodzącym w marskość.
3. Zastosowane uzupełnianie nadmiarowe diety ww. witaminami przyczyniło się do wystąpienia ostrego odczynu zapalnego u badanych zwierząt, co manifestowało się reakcją ostrej fazy mającej na celu przywrócenie homeostazy ustroju, jednak obserwowany istotny wzrost stężenia frakcji oxLDL-C mógł predestynować do powstawania w naczyniach zmian aterogennych.
4. W świetle uzyskanych wyników i w kontekście rosnącego spożycia przez społeczeństwo żywności przetworzonej zasadne wydaje się zwrócenie uwagi na coraz częstsze jej wzbogacanie w witaminy, których w procesach technologicznych zostaje ona pozbawiona.

Literatura

1. Acar G., Sati L., Agar A., Demir R. 2006. Effects of excess vitamin B6 intake on serum lipid profile and cerebral cortex in rats. *Turk. J. Med. Sci.* 36(6): 327–335.
2. Adam S.K., Das S., Jaarin K. 2009. A detailed microscopic study of the changes in the aorta of experimental model of postmenopausal rats fed with repeatedly heated palm oil. *Int. J. Exp. Pathol.* 90(3): 321–327.
3. Adams J. 2003. The proteasome: structure, function, and role in the cell. *Cancer Treat. Rev.* 29(suppl. 1): 3–9.
4. Aeberli I., Gerber P.A., Hochuli M., Kohler S., Haile S.R., Gouni-Berthold I., Berthold H.K., Spinass G.A., Berneis K. 2011. Low to moderate sugar-sweetened beverage consumption impairs glucose and lipid metabolism and promotes inflammation in healthy young men: a randomized controlled trial. *Am. J. Clin. Nutr.* 94(2): 479–485.
5. Al Ghumlas A.K., Abdel Gader A.G., Al Faleh F.Z. 2005. Haemostatic abnormalities in liver disease: could some haemostatic tests be useful as liver function tests? *Blood Coagul. Fibrinolysis.* 16(5): 329–335.
6. Alba-Loureiro T.C., Munhoz C.D., Martins J.O., Cerchiaro G.A., Scavone C., Curi R., Sannomiya P. 2007. Neutrophil function and metabolism in individuals with diabetes mellitus. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 40(8): 1037–1044.
7. Alison M.R., Islam S., Lim S. 2009. Stem cells in liver regeneration, fibrosis and cancer: the good, the bad and the ugly. *J. Pathol.* 217(2): 282–298.
8. Anand S.S. 2005. Protective effect of vitamin B6 in chromium-induced oxidative stress in liver. *J. Appl. Toxicol.* 25(5): 440–443.
9. Anderson G.H., Catherine N.L., Woodend D.M., Wolever T.M. 2002. Inverse association between the effect of carbohydrates on blood glucose and subsequent short-term food intake in young men. *Am. J. Clin. Nutr.* 76(5): 1023–1030.
10. AOAC. 2012. *Official methods of analysis of AOAC international (OMA)*, 19th ed. Gaithersburg, USA, ISBN 0-935584-83-8.
11. Atanasova G.N. 2013. Apolipoprotein B/Apolipoprotein A1 (APO B/APO A1) and LDL/HDL Cholesterol Ratios – indicators of metabolic syndrome. *J. Hypertens.* 2: 119, doi: 10.4172/2167-1095.1000119.
12. Babaei-Jadidi R., Karachalias N., Kupich C., Ahmed N., Thornalley P.J. 2004. High-dose thiamine therapy counters dyslipidaemia in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetologia* 47: 2235–2246.
13. Babicz-Zielińska E., Dąbrowska A. 2008. Suplementacja diety w wybranych grupach konsumentów. *Bromat. Chem. Toksykol.* 41(3): 893–899.
14. Baranova A., Lal P., Biredinc A., Younossi Z.M. 2011. Non-invasive markers for hepatic fibrosis. *BMC Gastroenterology* 11, 91, doi:10.1186/1471-230X-11-91.
15. Basu T.K., Makhani N., Sedgwick G. 2002. Niacin (nicotinic acid) in non-physiological doses causes hyperhomocysteinaemia in Sprague–Dawley rats. *Br. J. Nutr.* 87(2): 115–119.
16. Bataller R., Brenner D.A. 2005. Liver fibrosis. *J. Clin. Invest.* 115(2): 209–218.
17. Bechmann L.P., Hannivoort R.A., Guido Gerken G., Gökhan S., Hotamisligil G.S., Trauner M., Canbay A. 2012. The interaction of hepatic lipid and glucose metabolism in liver diseases. *J. Hepatol.* 56(4): 952–964.
18. Beltramo E., Berrone E., Buttiglieri S., Porta M. 2004. Thiamine and benfotiamine prevent increased apoptosis in endothelial cells and pericytes cultured in high glucose. *Diab. Metab. Res. Rev.* 20(4): 330–336.

19. Bethin K.E., Vogt S.K., Muglia L.J. 2000. Interleukin-6 is an essential corticotropin-releasing hormone-independent stimulator of the adrenal axis during immune system activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97(16): 9317–9322.
20. Biernat J., Wyka J. 2011. Stan odżywienia w aspekcie stanu zdrowia. *Nowiny Lek.* 80(3): 209–212.
21. Biezanowska-Kopeć R., Leszczyńska T., Kopeć A. 2010. Suplementacja diety studentów wyższych uczelni województwa małopolskiego witaminami i/lub składnikami mineralnymi. *Żyw. Nauka Technol. Jakość* 4(71): 132–140.
22. Bilek M., Stawarczyk K., Pasternakiewicz A. 2014. Zawartość glukozy, fruktozy i sacharozy w wybranych napojach typu soft drink. *Probl. Hig. Epidemiol.* 95(2): 438–444.
23. Blaxter K.L. 1989. *Energy metabolism in animals and man*. Cambridge, Cambridge University Press, ISBN 0521369312.
24. Błazik E., Durlík M. 2010. Mechanizmy włóknienia wątroby i metody ich oceny. *Med. Sci. Rev. Hepatol.* 10: 25–29.
25. Bolesławska I., Przystański J., Kaźmierczak A. 2011. Składniki podstawowe w całodziennych racjach pokarmowych studentów miasta Poznania. *Probl. Hig. Epidemiol.* 92(3): 553–556.
26. Bornstein S.R., Engeland W.C., Ehrhart-Bornstein M., Herman J.P. 2008. Dissociation of ACTH and glucocorticoids. *Trends Endocrinol. Metab.* 19(5): 175–180.
27. Boullier A., Gillotte K.L., Horkko S., Green S.R., Friedman P., Dennis E.A., Witztum J.L., Steinberg D., Quehenberger O. 2000. The binding of oxidized low density lipoprotein to mouse CD36 is mediated in part by oxidized phospholipids that are associated with both the lipid and protein moieties of the lipoprotein. *J. Biol. Chem.* 275(13): 9163–9169.
28. Bray G.A., Popkin B.M. 2013. Calorie – sweetened beverages and fructose: what have we learned 10 years later. *Pediatr. Obes.* 8: 242–248.
29. Broda G., Rywik S. 2005. Wielośrodkowe ogólnopolskie badanie stanu zdrowia ludności – projekt WOBASZ. Zdefiniowanie problemu oraz cele badania. *Kardiol. Pol.* 63(supl. 4): S1–S4.
30. Brown A.A., Frank B.H. 2011. Dietary modulation of endothelial function: implications for cardiovascular disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 73(4): 4673–4686.
31. Brunt E.M., Tiniakos D.G. 2010. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease. *World J. Gastroenterol.* 16(42): 5286–5296.
32. Burck H.Ch. 1975. *Technika histologiczna*. Warszawa, PZWL.
33. Busserolles J., Mazur A., Gueux E., Rock E., Rayssiguier Y. 2002a. Metabolic syndrome in the rats: females are protected against the pro-oxidant effect of a high sucrose diet. *Exp. Biol. Med.* 227(9): 837–842.
34. Busserolles J., Rock E., Gueux E., Mazur A., Grolier P., Rayssiguier Y. 2002b. Short-term consumption of a high sucrose diet has a pro-oxidant effect in rats. *Br. J. Nutr.* 87(4): 337–342.
35. Busserolles J., Zimowska W., Rock E., Rayssiguier Y., Mazur A. 2002c. Rats fed a high sucrose diet have altered heart antioxidant enzyme activity and gene expression. *Life Sci.* 71(11): 1303–1312.
36. Bylinowska J., Januszko O., Rolf K., Sicińska E., Kałuża J., Pietruszka B. 2012. Czynniki warunkujące stosowanie suplementów diety zawierających witaminy i/lub składniki mineralne w wybranej grupie dzieci w wieku 6–12 lat. *Roczn. PZH* 63(1): 59–66.
37. Całyniuk B., Muc-Wierzoń M., Niedworok E., Dul L., Bielaszka A., Kardas M., Kiciak A., Szczepańska E. 2009. Sposób żywienia osób po 65. roku życia zamieszkałych na terenie wybranych miast Śląska. Cz. 2. Zawartość wybranych witamin i składników mineralnych w diecie. *Żyw. Człow. Metab.* 34(3): 548–560.
38. Cao L., Liu X., Cao H., Lv Q., Tong N. 2012. Modified high-sucrose diet-induced abdominally obese and normal-weight rats developed high plasma free fatty acid and insulin resistance. *Oxid. Med. Cell. Longevity*, doi.org/10.1155/2012/374346, 9 pages.

39. Carey E., Carey W. 2010. Noninvasive tests for liver disease, fibrosis, and cirrhosis: Is liver biopsy obsolete? *Cleve. Clin. J. Med.* 77(8): 519–527.
40. de Carvalho Vidigal F., Guedes Cocate P., Gonçalves Pereira L., de Cássia Gonçalves Alfnas R. 2012. The role of hyperglycemia in the induction of oxidative stress and inflammatory process. *Nutr. Hosp.* 27(5): 1391–1398.
41. de Castro G.S.F., de Almeida L.P., Vannucchi H., Portari G.V., Jordão A.A. 2008. Effects of diets containing different types of carbohydrates on hepatic metabolism. *Scand. J. Lab. Anim. Sci.* 35(4): 321–328.
42. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Trends in intake of energy and macronutrients-United States 1971–2000. 2004. *Morb. Mortal. Weekly. Rep.* 53(04): 80–82.
43. Chakravarti A., Rusu D., Flamand N., Borgeat P., Poubelle P.E. 2009. Reprogramming of a subpopulation of human blood neutrophils by prolonged exposure to cytokines. *Lab. Invest.* 89(10): 1084–1099.
44. Chang A.M., Smith M.J., Galecki A.T., Bloem C.J., Halter J.B. 2006. Impaired beta-cell function in human aging: response to nicotinic acid-induced insulin resistance. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 91(9): 3303–3309.
45. Chaplin D. 2010. Overview of the immune response. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125(2): S3–S23.
46. Charkiewicz W.J., Charkiewicz A.E., Markiewicz R., Borawska M.H. 2007. Realizacja norm żywieniowych na wybrane składniki mineralne i witaminy studentów Akademii Medycznej w Białymstoku. *Żyw. Człow. Metab.* 34(1/2): 128–132.
47. Charkiewicz W.J., Markiewicz R., Borawska M.H. 2009. Ocena sposobu żywienia studentek Dietetyki Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. *Bromat. Chem. Toksykolog.* 42(3): 699–703.
48. Charzewska J., Wajszczyk B., Chwojnowska Z., Chabros E. 2013. Spożycie sacharozy i grup produktów głównych jej źródeł w dietach dzieci i młodzieży. *Żyw. Człow. Metab.* 40(3): 181–191.
49. Chen S.Y., Lin J.R., Chen T.H., Guo S.G., Kao M.D., Pan W.H. 2011. Dietary supplements usage among elderly Taiwanese during 2005–2008. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 20(2): 327–336.
50. Chepulis L. 2007. The effect of honey compared to sucrose, mixed sugars and a sugar free diet on weight gain in young rats. *J. Food Sci.* 72(3): 224–229.
51. Chumnantana R., Yokochi N., Yagi T. 2005. Vitamin B6 compounds prevent the death of yeast cells due to menadione, a reactive oxygen generator. *Biochim. Biophys. Acta* 1722(1): 84–91.
52. Cieślík E., Topolska K., Filipiak-Florkiewicz A. 2007. Suplementacja diety preparatami zawierającymi witaminy i/lub składniki mineralne przez młodzież w wieku 13–15 lat z terenu województwa małopolskiego. *Żyw. Człow. Metab.* 34(3/4): 1032–1035.
53. Ciszek P., Duma P. 2013. Analiza stosowania suplementów diety i świadomości zagrożeń wynikających z ich pobrania wśród studentów Uniwersytetu Rzeszowskiego. *Bromat. Chem. Toksykol.* 44(3): 404–4012.
54. Clayton P. 2006. B6-responsive disorders: A model of vitamin dependency. *J. Inherit. Metab. Dis.* 29(2–3): 317–326.
55. *Codex Alimentarius*. 1994. Foods for special dietary uses, food and Including Food for Infants and Children, Rome, Food & Agriculture Org., ISBN 9251035105.
56. Contois J.H., McConnell J.P., Sethi A.A., Csako G., Devaraj S., Hoefner D.M., Warnick G.R. 2009. Apolipoprotein B and cardiovascular disease risk: position statement from the AACC Lipoproteins and Vascular Diseases Division Working Group on Best Practices. *Clin. Chem.* 55 (3): 407–419.

57. Czaja J., Lebedzińska A., Szefer P. 2008. Sposób żywienia i suplementacji diety reprezentantów polski w biegach średnio- i długodystansowych w latach 2004–2005. *Roczn. PZH* 59(1): 67–74.
58. Czarnocińska J., Wądołowska J. 2004. Preferencje pokarmowe dziewcząt a zagrożenia zdrowotne. *Bromat. Chem. Toksykol.* 37(supl.): 87–92.
59. Dabbagh K., Laurent G.J., Shock A., Leoni P., Papakrivopoulou J., Chambers R.C. 2001. Alpha-1-antitrypsin stimulates fibroblast proliferation and procollagen production and activates classical MAP kinase signaling pathways. *J. Cell. Physiol.* 186(1): 73–81.
60. Danczygier H. 2010. The liver as an immune organ, in: *Clinical Hepatology*. Ed. H. Danczygier. Berlin, Springer: 141–152, ISBN 978-3-540-93841-5.
61. Delbosc S., Paizanis E., Magous R., Araiz C., Dimo T., Cristo J.P., Cros G., Azay Y. 2005. Involvement of oxidative stress and NADPH oxidase activation in the development of cardiovascular complications in a model of insulin resistance, the fructose-fed rat. *Atherosclerosis* 179(1): 43–49.
62. Dobrzańska A., Charzewska J., Weker H., Socha P., Mojska H., Książyk J., Gajewska D., Szajewska H., Stolarczyk A., Marć M., Czerwionka-Szaflarska M., Ryżko J., Wąsowska-Królikowska K., Chwojnowska Z., Chybicka A., Horvath A., Socha J. 2013. Normy żywienia zdrowych dzieci w 1–3. roku życia – stanowisko polskiej grupy ekspertów. Cz. 2. Omówienie poszczególnych składników odżywczych. *Dev. Period. Med.* 17(1): 94–100.
63. Drewnowski A., Bellisle F. 2007. Liquid calories, sugar, and body weight. *Am. J. Clin. Nutr.* 85(3): 651–661.
64. Dubois L., Farmer A., Girard M., Peterson K. 2007. Regular sugar-sweetened beverage consumption between meals increases risk of overweight among preschool-aged children. *J. Am. Diet. Assoc.* 107(6): 924–935.
65. Dubuisson L., Desmouliere A., Decourt B., Evade L., Bedin C., Boussarie L., Barrier L., Vidaud M., Rosenbaum J. 2002. Inhibition of rat liver fibrogenesis through noradrenergic antagonism. *Hepatology* 35(2): 325–331.
66. Duchon M.R. 2004. Mitochondria in health and disease: perspectives on a new mitochondrial biology. *Mol. Aspects Med.* 25(4): 365–451.
67. Duncan M.H., Singh B.M., Wise P.H., Carter G., Alagband-Zadeh J. 1995. A simple measure of insulin resistance. *Lancet* 346(8967): 120–121.
68. Earnest C.P., Wood K.A., Church T.S. 2003. Complex multivitamin supplementation improves homocysteine and resistance to LDL-C oxidation. *J. Am. Coll. Nutr.* 22(5): 400–407.
69. Eckel L.A., Moore S.R. 2004. Diet-induced hyperphagia in the rat is influenced by sex and exercise. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 287(5): R1080–R1085.
70. EFSA (European Food Safety Authority). 2006. *Tolerable upper intake levels for vitamins and minerals*, ISBN 92-9199-014-0.
71. Elliott S.S., Keim N.L., Stern J.S., Teff K., Havel P.J. 2002. Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome. *Am. J. Clin. Nutr.* 76(5): 911–922.
72. Esterbauer H., Gebicki J., Puhl H., Jurgens G. 1992. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic. Biol. Med.* 13(4): 341–390.
73. Evans J., Goldfine I., Maddux B., Grodsky G.M. 2002. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr. Rev.* 23(5): 599–622.
74. Evans J.L., Goldfine I.D., Maddux B.A., Grodsky G.M. 2003. Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and b-cell dysfunction? *Diabetes* 52(1): 1–8.
75. FAO. 2003. Methods of food. Analysis, in: *Food energy – methods of analysis and conversion factors. Food and Nutrition Paper 77*, Rome, ISBN 92-5-105014-7.

76. de Ferreyra E.C., Bernacchi A.S., San Martin M.F., Castro G.D., Castro J.A. 1994. Nicotinamide late protective effects against carbon tetrachloride-induced liver necrosis. *Exp. Mol. Pathol.* 60(3): 214–223.
77. Ferris W.F., Crowther N.J. 2011. Once fat was fat and that was that: our changing perspectives on adipose tissue. *Cardiovasc. J. Afr.* 22(3): 147–154.
78. Fialkow L., Wang Y., Downey G.P. 2007. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. *Free Radic. Biol. Med.* 42(2): 153–164.
79. Figurska-Ciura D., Wencel D., Łoźna K., Biernat J. 2009. Sposób żywienia 13-letniej młodzieży z małego miasta. *Roczn. PZH* 60(3): 235–239.
80. Flynn A., Hivonen T., Mensink G.B., Ocké M.C., Serra-Majem L., Stoś K., Szponar L., Tetens I., Turrini A., Fletcher R., Wildemann T. 2009. Intake of selected nutrients from foods, from fortification and from supplements in various European countries. *Food Nutr. Res.* 53(supl. 1): 1–51.
81. Forns X., Ampurdanes S., Llovet J.M., Aponte J., Quintó L., Martínez-Bauer E., Bruguera M., Sánchez-Tapias J.M., Rodés J. 2002. Identification of chronic hepatitis C patients without hepatic fibrosis by a simple predictive model. *Hepatology* 36 (4 Pt 1): 986–992.
82. Fortino M.A., Lombardo Y.B., Chicco A. 2007. The reduction of dietary sucrose improves dyslipidemia, adiposity, and insulin secretion in an insulin-resistant rat model. *Nutrition* 23(6): 489–497.
83. Fox C.S., Gona P., Hoffmann U., Porter S.A., Salton C.J., Massaro J.M., Levy D., Larson M.G., D'Agostino R.B. Sr., O'Donnell C.J., Manning W.J. 2009. Pericardial fat, intrathoracic fat, and measures of left ventricular structure and function. The Framingham Heart Study. *Circulation* 119(12): 1586–1591.
84. França C.F., Vianna L.M. 2010. The response of young and adult rats to the riboflavin supplementation. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 53(4): 855–860.
85. Freeman D.J., Norrie J., Caslake M.J., Gaw A., Ford I., Lowe G.D., O'Reilly D.S., Packard C.J., Sattar N. 2002. West of Scotland Coronary Prevention Study. C-reactive protein is an independent predictor of risk for the development of diabetes in the West of Scotland Coronary Prevention Study. *Diabetes* 51(5): 1596–1600.
86. Friedman S.L. 2008. Hepatic fibrosis – Overview. *Toxicology* 254(3): 120–129.
87. Friedrich M., Dolot A. 2009. Assessment of effects of diet composition and vitamin B supplementation of free radical related processes in the body. Contents of non-enzymatic components of antioxidation defence and lipid peroxidation products in rat tissues. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 59(3): 255–262.
88. Friedrich M., Dolot A. 2010. Assessment of effects of diet composition and vitamin B supplementation in free radical-related processes in the body. Activity of antioxidant enzymes and the total antioxidant status of rat blood. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 60(3): 281–287.
89. Friedrich M., Goluch-Koniuszy Z. 2009. Ocena wpływu składu diety i jej suplementacji wybranymi witaminami z grupy B na stężenie lipidów i lipoprotein we krwi samic szczura. *Roczn. PZH* 60(1): 91–95.
90. Friedrich M., Goluch-Koniuszy Z., Dolot A., Pilarczyk B. 2011. Ocena zmian stężenia selenu w krwi i tkankach samców szczura pod wpływem zmiany składu diety i jej suplementacji wybranymi witaminami z grupy B. *Roczn. PZH*, 62(1): 41–46.
91. Friedrich M., Mateńczuk C. 2001. Wpływ diety na ilość oraz skład kwasów tłuszczowych okołonarządowej tkanki tłuszczowej u szczura. *Żyw. Człow. Metab.* 28(2): 627–632.
92. Friedrich M., Sadowska J., Goluch-Koniuszy Z. 2009. Ocena wpływu składu diety i jej uzupełniania witaminami z grupy B na stężenie insuliny i wybranych wskaźników przemian białkowych u samic szczura. *Żyw. Nauka Technol. Jakość* 4(65): 361–367.

93. Friedrich M., Sadowska J., Sawicka A. 2005. Wpływ suplementacji diety witaminami z grupy B na skład kwasów tłuszczowych okołonarządowej tkanki tłuszczowej i procesy peroksydacji u szczura. *Żyw. Nauka Technol. Jakość* 4(45 supl.): 139–150.
94. Fukuwatari T., Shibata K. 2008. Urinary water-soluble vitamin and their metabolites contents as nutritional markers for evaluating vitamin intakes in young Japanese women. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 54(3): 223–229.
95. Galiński G., Czarnocińska J. 2009. Ocena sposobu żywienia wybranej grupy młodzieży akademickiej miasta Poznania. *Żyw. Człow. Metab.* 36(1): 201–204.
96. Gałęcka E., Mrowicka M., Malinowska K., Malinowski P. 2008. Wolne rodniki tlenu i azotu w fizjologii. *Pol. Merk. Lek.* 24(143): 446–448.
97. Giffen P.S., Turton J., Andrews C.M., Barrett P., Clarke C.J., Fung K.W., Munday M.R., Roman I.F., Smyth R., Walshe K., York M.J. 2003. Markers of experimental acute inflammation in the Wistar Han rat with particular reference to haptoglobin and C-reactive protein. *Arch. Toxicol.* 77(7): 392–402.
98. Gil M., Ciszek P., Głodek E. 2013. Ocena stosowania suplementów diety oraz stopnia wiedzy na temat suplementacji wśród licealistów z Dębicy. *Bromat. Chem. Tokykol.* 46(2): 194–199.
99. Gil M., Głodek E., Rudy M. 2012. Ocena spożycia witamin i składników mineralnych w całodziennych racjach pokarmowych studentów Uniwersytetu Rzeszowskiego. *Roczn. PZH* 63(4): 441–446.
100. Goluch-Koniuszy Z. 2012. Evaluation, in an animal model study, of the effect of diet composition change and diet supplementation with B-group vitamins on the liver fatty acid profile. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* 11(4): 389–399.
101. Goluch-Koniuszy Z., Bonczek M. 2011. Glycemic Index and Glycemic Load of thirteen year old children whose Waist Circumference (WC) \geq 90 Percentile dependent of BMI. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* 10(2): 251–265.
102. Goluch-Koniuszy Z., Sadowska J. 2012. Evaluation, in an animal model study, of the effect of diet composition change and diet supplementation with B-group vitamins on the concentration of 8-iPF2 α -III in urine. *JAFS* 21(4): 748–758.
103. Goluch-Koniuszy Z., Sadowska J., Wierzbicka A. 2011. An assessment of the influence of B group vitamins on the C-reactive protein concentration and chosen indicators of protein metabolism in male rats. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* 10(3): 387–397.
104. Goluch-Koniuszy Z., Wierzbicka A. 2011. Appreciation of concentration of lipoproteins and apolipoproteins in serum of male rats under the influence of diet change composition and its supplementation with group B vitamins. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* 10(1): 109–121.
105. GUS. 2014. *Rocznik Statystyczny Rzeczypospolitej Polskiej*. Warszawa.
106. Haffner S.M., Mykkanen L., Festa A., Burke J.P., Stern M.P. 2000. Insulin resistant prediabetic subjects have more atherogenic risk factors than insulin-sensitive prediabetic subjects: implications for preventing coronary heart disease during the prediabetic state. *Circulation* 101(9): 975–980.
107. Hamułka J., Wawrzyniak A., Pawłowska R. 2010. Ocena spożycia witamin i składników mineralnych z suplementami diety przez kobiety w ciąży. *Roczn. PZH* 61(3): 269–275.
108. Han J., Hajjar D.P., Zhou X., Gotto A.M. Jr., Nicholson A.C. 2002. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-mediated gene expression. A new mechanism of action for high density lipoprotein. *J. Biol. Chem.* 277(26): 23582–23586.
109. Hansson G.K. 2005. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *New. Engl. J. Med.* 352(16): 1685–1695.
110. Harrison R., Holt D., Pattison D., Elton P.J. 2004. Are those in need taking dietary supplements? A survey of 21923 adults. *Br. J. Nutr.* 91(4): 617–623.

111. Herbst A., Diethelm K., Cheng G., Alexy U., Icks A., Buyken A.E. 2011. Direction of associations between added sugar intake in early childhood and Body Mass Index at age 7 years may depend on intake levels. *J. Nutr.* 141(7): 1348–1354.
112. Heydtmann M., Shields P., McCaughan G., Adams D. 2001. Cytokines and chemokines in the immune response to hepatitis C infection. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 14(3): 279–287.
113. Higashi-Okai K., Nagino H., Yamada K., Okai Y. 2006. Antioxidant and prooxidant activities of B group vitamins in lipid peroxidation. *J. UOEH* 28(4): 359–368.
114. Horadagoda N.U., Knox K.M.G., Gibbs H.A., Reid S.W.J., Horagoda A., Edwards S.E.R., Eckersall P.D. 1999. Acute phase proteins in cattle: discrimination between acute and chronic inflammation. *Vet. Rec.* 144(16): 437–441.
115. Hu M.L., Chen Y.K., Lin Y.E. 1995. The antioxidant and prooxidant activity of some B vitamins and vitamin-like compounds. *Chem. Biol. Interact.* 97(1): 63–73.
116. Hussien N.I., Shoman A.A. 2013. Effect of obesity and passive smoking on biochemical and histopathological changes in rat liver and the protective effect of exercise. *J. Exerc. Physiol. Online* 16(4): 101–111.
117. Iacobellis G., Barbaro G., Gerstein H.C. 2008. Relationship of epicardial fat thickness and fasting glucose. *Int. J. Cardiol.* 128(3): 424–426.
118. Iłow R., Regulska-Iłow B., Róžańska D., Biernat J., Kowalisko A. 2012. Ocena sposobu żywienia 50-letnich mieszkańców Wrocławia w latach 2002–2007. *Bromat. Chem. Tokykol.* 45(4): 1210–1218.
119. Imbert-Bismut F., Ratziu V., Pieroni L., Charlotte F., Benhamou Y., Poynard T. MULTIVIRC Group. 2001. Biochemical markers of liver fibrosis in patients with hepatitis C virus infection: a prospective study. *Lancet* 357(9262): 1069–1075.
120. Inubushi T., Takasawa T., Tuboi Y., Watanabe N., Aki K., Katunuma N. 2005. Changes of glucose metabolism and skin-collagen neogenesis in vitamin B6 deficiency. *Biofactors* 23(2): 59–67.
121. Jain S.K., Lim G. 2001. Pyridoxine and piridozamine inhibits superoxide radicals and prevents lipid peroxidation, protein glycosylation and (Na⁺⁺ K⁺)-ATPase activity reduction in high glucose-treated human erythrocytes. *Free Radical Biol. Med.* 30(3): 232–237.
122. Janieszewska B., Zegan M., Michota-Katulska E. 2011. Postawy osób starszych wobec suplementów diety. *Żyw. Człow. Metab.* 38(5): 340–349.
123. Jantarska D., Ratkovska B., Kunachowicz H. 2007. Wzbogacanie żywności – wartości deklarowane a rzeczywiste. *Przem. Spoż.* 61(1): 24–27.
124. Jarosz M. 2012. *Normy żywienia dla populacji polskiej – nowelizacja*. Warszawa, IŻŻ.
125. Jarosz M., Rychlik E. 2007. Napoje słodzone gazowane i ich związek z powstawaniem chorób dietozależnych. *Stand. Med.* 4(23): 109–114.
126. Jarosz M., Stoś K., Respondek W., Wolnicka K. 2008. Suplementy diety – korzyści i zagrożenia. *Stand. Med.* 35(supl.), 10: 51–55.
127. Jin F.Y., Kamanna V., SKashyap M.L. 1999. Niacin accelerates intracellular apoB degradation by inhibiting triacylglycerol synthesis in human hepatoblastoma (Hep G2) cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 19(4): 1051–1059.
128. Johnson I.T., Gee J.M. 1986. Gastrointestinal adaptation in response to soluble non-available polysaccharides in the rat. *Br. J. Nutr.* 55(3): 497–505.
129. Juszczyk J. 2001. Marskość wątroby. *Przew. Lek.* 4(3): 12–17.
130. Kałuża J., Bagan A., Brzozowska A. 2004. Ocena udziału witamin i składników mineralnych z suplementów diety w diecie osób starszych. *Roczn. PZH* 55(1): 51–61.
131. Kamat J.P., Devasagayam T.P. 1999. Nicotinamide (Vitamin B3) as an effective antioxidant against oxidative damage in rat brain mitochondria. *Redox Rep.* 4(4): 179–184.

132. Kapourchali F.R., Surendiran G., Chen L., Uitz E., Bahadori B., Moghadasian M.H. 2014. *Animal models of atherosclerosis*. *WJCC* 2(5): 126–132.
133. Kawasaki T., Kashiwabara A., Sakai T., Igarashi K., Ogata N., Watanabe H., Ichiyanagi K., Yamanouchi T. 2005. Longterm sucrose-drinking causes increased body weight and glucose intolerance in normal male rats. *Br. J. Nutr.* 93(5): 613–618.
134. Kendig M.D., Rooney K.B., Corbit L.H., Boakes R.A. 2014. Persisting adiposity following chronic consumption of 10% sucrose solution: Strain differences and behavioural effects. *Physiol. Behav.* 130: 54–65.
135. Kesavulu M.M., Giri R., Kameswara Rao B., Apparao C. 2000. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme levels in type 2 diabetics with microvascular complications. *Diabetes Metab.* 26: 387–392.
136. Kim M.K., Tanaka K., Kim M.J., Matuso T., Endo T., Tomita T., Maeda S., Ajisaka R. 2009. Comparison of epicardial, abdominal and regional fat compartments in response to weight loss. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 19(11): 760–766.
137. Knittel T., Mehde M., Kobold D., Saile B., Dinter C., Ramadori G. 1999. Expression patterns of matrix metalloproteinases and their inhibitors in parenchymal and non-parenchymal cells of rat liver: regulation by TNF-alpha and TGF-beta1. *J. Hepatol.* 30(1): 48–60.
138. Kohen R., Nyska A. 2002. Invited review: Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol. Path.* 30(6): 620–650.
139. Kolmaga A., Godala M., Trafalska E. 2009. Ocena podaży witamin i składników mineralnych z dietą i suplementami diety w grupie dzieci 12–13-letnich z łódzkich szkół. *Żyw. Człow. Metab.* 36(1): 40–47.
140. Kościółek A., Hartman M., Spiołek K., Kania J., Pawłowska-Góral K. 2011. Ocena czynników wpływających na zakup i stosowanie preparatów witaminowo-mineralnych przez uczniów szkół policealnych. *Bromat. Chem. Toksykol.* 44(3): 987–992.
141. Kozioł-Kozakowska A., Piórecka B., Jagielski P., Schlegel-Zawadzka M. 2009. Suplementacja diety preparatami witaminowo-mineralnymi wśród dzieci w wieku przedszkolnym w Krakowie. *Żyw. Człow. Metab.* 36(1): 12–18.
142. Kozyrka J., Januszko O., Urbańska A., Pietruszka B. 2010. Charakterystyka stosowania suplementów i produktów wzbogaconych w witaminy i składniki mineralne u dzieci w wieku 7–12 lat. *Probl. Hig i Epidemiol.* 91(4): 549–555.
143. Kranz S., Smiciklas-Wright H., Siega-Riz A.M., Mitchell D. 2005. Adverse effect of high added sugar consumption on dietary intake in American preschoolers. *J. Pediatr.* 146(1): 105–111.
144. Krasnowska G., Sikora T. 2011. Suplementy diety a bezpieczeństwo konsumenta. *Żyw. Nauka. Technol. Jakość* 4(47): 5–23.
145. Król E., Krejpcio Z. 2008. Ocena sposobu żywienia wybranej grupy ludzi młodych. *Bromat. Chem. Toksykol.* 41(3): 911–915.
146. Kubik P., Niemiec T., Raczyński P. 2006. Zalecenia dotyczące suplementacji diety u kobiet podczas planowania ciąży, w ciąży i w czasie karmienia piersią. *Ginekol. Prakt.* 4: 2–7.
147. Kunachowicz H., Nadolna I., Przygoda B., Iwanow K. 2005. *Tabele składu i wartości odżywczych żywności*. Warszawa, PZWL, ISBN 83-200-3112-5.
148. Kunachowicz H., Nadolna I., Wojtasik A., Przygoda B. 2004. *Żywność wzbogacana a zdrowie*. Warszawa, IŻŻ, ISBN 838606062X.
149. Kunachowicz H., Przygoda B. 2008. Wzbogacać żywność czy nie wzbogacać. *Przem. Spoż.* 8: 86–89.
150. Kunachowicz H., Troszczyńska A. 2005. Żywność wzbogacana i suplementy witaminowo-mineralne a ich rola w prawidłowej diecie człowieka *Now. Lek.* 74(4): 533–538.

151. Lemieux I., Pascot A., Prud'homme D., Almeras N., Bogaty P., Nadeau A., Bergeron J., Després J.P. 2001. Elevated C-reactive protein: Another component of the atherothrombotic profile of abdominal obesity. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21: 961–967.
152. Leong X.F., Aishah A., Nor Aini U., Das S., Jaarin K. 2008. Heated palm oil causes rise in blood pressure and cardiac changes in heart muscle in experimental rats. *Arch. Med. Res.* 39(6): 567–572.
153. Lindqvist A., Baelemans A., Erlanson-Albertsson C. 2008. Effects of sucrose, glucose and fructose on peripheral and central appetite signals. *Regul. Pept.* 150(1–3): 26–32.
154. Litwin J.A. 1999. *Podstawy technik mikroskopowych*. Kraków, UJ, ISBN 83-233-1215-X.
155. Lukaski H.C. 2004. Vitamins and mineral status: effects on physical performance. *Nutrition* 20(7–8): 632–644.
156. Lukienko P.I., Mel'nichenko N.G., Zverinskii I.V., Zabrodskaya S.V. 2000. Antioxidant properties of thiamine. *Bull. Exp. Biol. Med.* 130(9): 874–876.
157. Mack C.P., Hultquist D.E., Shlafer M. 1995. Myocardial flavin reductase and riboflavin: a potential role in decreasing reoxygenation injury. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 212(1): 35–40.
158. Mahfouz M.M., Kummerow F.A. 2004. Vitamin C or vitamin B6 supplementation prevent the oxidative stress and decrease of prostacyclin generation in homocysteinemic rats. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 36(10): 1919–1932.
159. Malato Y., Sander L.E., Liedtke C., Al-Masaoudi M., Tacke F., Trautwein C., Beraza N. 2008. Hepatocyte-specific inhibitor of kappaB- kinase deletion triggers the innate immune response and promotes earlier cell proliferation during liver regeneration. *Hepatology* 47(6): 2036–2050.
160. Malik V.S., Popkin B.M., Bray G.A., Despres J.P., Willett W.C., Hu F.B. 2010. Sugar-sweetened beverages and risk of metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Diabetes Care* 33(11): 2477–2483.
161. Martínez C., González E., García R.S., Salas G., Constantino-Casas F., Macías L., Gracia I., Tovar C., Durán-de-Bazúa C. 2010. Effects on body mass of laboratory rats after ingestion of drinking water with sucrose, fructose, aspartame, and sucralose additives. *Open Obes. J.* 2: 116–124.
162. Mathieu P., Poirier P., Pibarot P., Lemieux I., Després J.P. 2009. Visceral obesity: the link among inflammation, hypertension, and cardiovascular disease. *Hypertension* 53(4): 577–584.
163. Matthews D.R., Hosker J.P., Rudenski A.S., Naylor B.A., Treacher D.F., Turner R.C. 1985. Homeostasis model assessment: insulin resistance and B-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28(7): 412–429.
164. Mazurek T., Nijveldt R., Yudkin J.S., Hirsch A., Smulders Y., van Rossum A.C. 2008. Pericoronary epicardial adipose tissue affects coronary atherosclerosis in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 118: S580–581.
165. Mazurek T., Zhang L., Zalewski A., Mannion J.D., Diehl J.T., Arafat H., Sarov-Blat L., O'Brien S., Keiper E.A., Johnson A.G., Martin J., Goldstein B.J., Shi Y. 2003. Human epicardial adipose tissue is a source of inflammatory mediators. *Circulation* 108(20): 2460–2466.
166. McCuskey R.S. 2006. Sinusoidal endothelial cells as an early target for hepatic toxicants. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 34(1–2): 5–10.
167. Michota-Kotulska E., Zegan M., Sińska B., Mieszkowska M. 2009. Suplementy diety – popularność stosowania a świadomość młodych konsumentów. *Żyw. Człow. Metab.* 34(1): 85–89.
168. Millen A., Dodd K., Subar A. 2004. Use of vitamin, mineral, nonvitamin and nonmineral supplements in the United States: The 1987, 1992, and 2000 National Health Interview Survey Results. *J. Am. Diet. Assc.* 104(6): 942–950.
169. Monga S.P., Pediaditakis P., Mule K., Stolz D.B., Michalopoulos G.K. 2001. Changes in WNT/ β -catenin pathway during regulated growth in rat liver regeneration. *Hepatology* 33(5): 1098–1109.

170. Montuschi P., Barnes P.J., Roberts L.J. II. 2004. Isoprostanes: markers and mediators of oxidative stress. *FASEB J.* 18(15): 1791–1800.
171. Mooney S., Leuendorf J.E., Hendrickson C., Hellmann H. 2009. Vitamin B6: A long known compound of surprising complexity. *Molecules* 14(1): 329–351.
172. Nomura K., Yamanouchi T. 2012. The role of fructose-enriched diets in mechanisms of nonalcoholic fatty liver disease. *J. Nutr. Biochem.* 23(3): 203–208.
173. Nowak K., Żmudzińska-Żurek B. 2009. Wzbogacanie żywności w witaminy – za i przeciw. *Przem. Spoż.* 63(12): 25–29.
174. O'Connell T.X., Horita T.J., Kasravi B. 2005. Understanding and interpreting serum protein electrophoresis. *Am. Fam. Physician.* 71(1): 105–112.
175. Pan M., Cederbaum A.I., Zhang Y.L., Ginsberg H.N., Williams K.J., Fisher E.A. 2004. Lipid peroxidation and oxidant stress regulate hepatic apolipoprotein B degradation and VLDL production. *J. Clin. Invest.* 113(9): 1277–1287.
176. Pang J., Xu Q., Xu X., Yin H., Xu R., Guo S., Hao W., Wang L., Chen C., Cao J.M. 2010. Hexarelin suppresses high lipid diet and vitamin D3-induced atherosclerosis in the rat. *Peptides*, 31(4): 630–638.
177. Peluffo G., Radi R. 2007. Biochemistry of protein tyrosine nitration in cardiovascular pathology. *Cardiovasc. Res.* 75(2): 291–302.
178. Perry T.A., Weerasuriya A., Mouton P.R., Holloway H.W., Greig N.H. 2004. Pyridoxine-induced toxicity in rats: a stereological quantification of the sensory neuropathy. *Exp. Neurol.* 190(1): 133–144.
179. Perumal S.S., Shanthi P., Sachdanandam P. 2005. Augmented efficacy of tamoxifen in rat breast tumorigenesis when gavaged along with riboflavin, niacin, and CoQ₁₀: effects on lipid peroxidation and antioxidants in mitochondria. *Chem. Biol. Interact.* 152(1): 49–58.
180. Petrides A., Vogt C., Schulze-Berge D., Matthews D., Strohmeyer G. 1994. Pathogenesis of glucose intolerance and diabetes mellitus in cirrhosis. *Hepatol.* 19(3): 616–627.
181. Pham C.T. 2008. Neutrophil serine proteases fine tune the inflammatory response. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40(6–7): 1317–1333.
182. Pietruszka B., Brzozowska A. 1999. Vitamins and mineral supplement among adults in Central and Eastern Poland. *Nutr. Res.* 19(6): 817–826.
183. Pietruszka B., Brzozowska A. 2002. Uwarunkowania suplementacji diety witaminami i składnikami mineralnymi w Polsce. *Żyw. Człow. Metab.* 29(supl.): 215–219.
184. Pietruszka B., Kołtajtis-Dołowy A., Chmara-Pawlińska R. 2003. Suplementacja diety i spożycie produktów wzbogacanych w witaminy i/lub składniki mineralne przez młodzież w wieku 16–19 lat. *Żyw. Człow. Metab.* 30(1/2): 441–445.
185. PN-75/A-04018. *Produkty rolniczo-żywnościowe. Oznaczanie azotu metodą Kjeldahla i przeliczanie na białko.*
186. PN-EN 14084:2004P. *Artykuły żywnościowe. Oznaczanie pierwiastków śladowych. Oznaczanie zawartości ołowiu, kadmu, cynku, miedzi i żelaza metodą atomowej spektrometrii absorpcyjnej (AAS) po mineralizacji mikrofalowej.*
187. PN-EN ISO 6869:2002P. *Pasze. Oznaczanie zawartości wapnia, miedzi, żelaza, magnezu, manganu, potasu, sodu i cynku. Metoda absorpcyjnej spektrometrii atomowej.*
188. PN-ISO 936:2000. *Mięso i przetwory mięsne. Oznaczanie popiołu całkowitego.*
189. PN-ISO 1442:2000. *Mięso i przetwory mięsne. Oznaczanie zawartości wody (metoda odwoławcza).*
190. PN-ISO 1444:2000. *Mięso i przetwory mięsne – oznaczanie zawartości tłuszczu wolnego.*

191. Przeor M., Goluch-Koniuszy Z. 2013. Ocena stanu odżywienia oraz sposobu żywienia pielęgniarek będących w okresie okołomenopauzalnym pracujących w systemie zmianowym. *Probl. Hig. Epidemiol.* 94(4): 797–801.
192. Rabkin S.W. 2007. Epicardial fat: properties, function and relationship to obesity. *Obes. Rev.* 8(3): 253–261.
193. Rahal A., Kumar A., Singh V., Yadav B., Tiwari R., Chakraborty S., Dhama K. 2014. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. *BioMed Res. Inter.*, doi:10.1155/2014/761264, 19 pages.
194. Rahman I., Biswas S.K., Kode A. 2006. Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. *Eur. J. Pharmacol.* 533(1–3): 222–239.
195. Ramesh B., Saralakumari D. 2012. Antihyperglycemic, hypolipidemic and antioxidant activities of ethanolic extract of Commiphora mukul gum resin in fructose-fed male Wistar rats. *J. Physiol. Biochem.* 68(4): 573–582.
196. Reaves S.K., Wu J.Y., Wu Y., Fanzo J.C., Wang Y.R., Lei P.P., Lei K.Y. 2000. Regulation of intestinal apolipoprotein B mRNA editing levels by a zinc-deficient diet and cDNA cloning of editing protein in hamsters *J. Nutr.* 130(9): 2166–2173.
197. Reeves P.G., Nielsen F.H., Fahey G.C. 1993. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76 rodent diet. *J. Nutr.* 123(11): 1939–1951.
198. Rickman J.C., Barrett D.M., Bruhn C.M. 2007. Nutritional comparison of fresh, frozen and canned fruits and vegetables. Part 1. Vitamins C and B and phenolic compounds. *J. Sci. Food Agri.* 87(6): 930–944.
199. Robbesyn F., Auge N., Vindis C., Cantero A.V., Barbaras R., Negre-Salvayre A., Salvayre R. 2005. High-density lipoproteins prevent the oxidized low-density lipoprotein-induced endothelial growth factor receptor activation and subsequent matrix metalloproteinase-2 upregulation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25: 1206–1212.
200. Rockey D.C., Bissell D.M. 2006. Noninvasive measures of liver fibrosis. *Hepatology* 43(2 Suppl. 1): S113–S120.
201. Ross R. 1999. Artherosclerosis – an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.* 340(2): 115–126.
202. Roy H.J., Keenan M.J., Zablah-Pimentel E., Hegsted M., Bulot L., O'Neil C.E., Bunting L.D., Fernandez J.M. 2003. Adult female rats defend “appropriate” energy intake after adaptation to dietary energy. *Obes. Res.* 11(10): 1214–1222.
203. Rozporządzenie (WE) nr 1925/2006 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 20 grudnia 2006 r. w sprawie dodawania do żywności witamin i składników mineralnych oraz niektórych innych substancji. *DzUrz. UE* L 404/26 z 30.12.2006 r.: 26.
204. Rozporządzenie Komisji (WE) nr 1170/2009 z dnia 30 listopada 2009 r. zmieniające dyrektywę 2002/46/WE Parlamentu Europejskiego i Rady oraz rozporządzenie (WE) nr 1925/2006 Parlamentu Europejskiego i Rady w odniesieniu do wykazów witamin i składników mineralnych oraz ich form chemicznych, które można dodawać do żywności, w tym do suplementów żywnościowych. *DzUrz. UE* L 314/36 z 1.12.2009 r.: 36.
205. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 16 września 2010 r. w sprawie substancji wzbogacających dodawanych do żywności. *DzU* z 2010 r., nr 174, poz. 1184.
206. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 9 października 2007 r. w sprawie składu oraz znakowania suplementów diety. *DzU* z 2007 r., nr 196, poz. 1425 ze zm.
207. Rypina M., Lebedzińska A., Kowalska J., Szefer P. 2009. Ocena częstotliwości stosowania suplementów diety wśród ludzi starszych. *Żyw. Człow. Metab.* 36(1): 71–77.
208. Sacks S.H., Chowdhury P., Zhou W. 2003. Role of the complement system in rejection. *Curr. Opin. Immunol.* 15(5): 487–492.

209. Samant P., Chavan P., Rai S., Maheshwari U. 2014. Assessment of apo-B and TG/HDL-C ratio as indicators of insulin resistance in patients with metabolic syndrome. *Inter. J. Biochem. Res. Rev.* 4(3): 260–268.
210. Sánchez-Valle V., Chávez-Tapia N.C., Uribe M., Méndez-Sánchez N. 2012. Role of oxidative stress and molecular changes in liver fibrosis: a review. *Curr. Med. Chem.* 19(28): 4850–4860.
211. Saran A., Duda G. 2009. Wpływ wybranych czynników na zakup i stosowanie przez osoby starsze witaminowo-mineralnych suplementów diety. *Żyw. Nauka Technol. Jakość* 4(65): 271–277.
212. Sarwar G., Peace R.W. 1994. The protein quality of some enteral products is inferior to that of casein as assessed by rat growth methods and digestibility-corrected amino acid scores. *J. Nutr.* 124(11): 2223–2232.
213. Schlegel-Zawadzka M., Barteczko M. 2009. Ocena stosowania suplementów diety pochodzenia naturalnego w celach prozdrowotnych przez osoby dorosłe. *Żyw. Nauka Technol. Jakość* 4(65): 375–387.
214. Sebastian R.S., Cleveland L.E., Goldman J.D., Moshfegh A.J. 2007. Older adults who use vitamin/mineral supplements differ from nonusers in nutrient intake adequacy and dietary attitudes. *J. Am. Diet. Ass.* 107(8): 1322–1332.
215. Sebastiani G., Alberti A. 2006. Non invasive fibrosis biomarkers reduce but not substitute the need for liver biopsy. *World J. Gastroenterol.* 12(23): 3682–3694.
216. Selye H. 1974. *Stress without distress*. Philadelphia, J.B. Lippincott, ISBN 978-0397010264.
217. Sheludiakova A., Rooney K., Boakes R.A. 2012. Metabolic and behavioral effects of sucrose and fructose/glucose drinks in the rat. *Eur. J. Nutr.* 51(4): 445–454.
218. Sherwood E.R., Toliver-Kinsky T. 2004. Mechanisms of the inflammatory response. *Best Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.* 18(3): 385–405.
219. Shibata K., Fukuwatari T., Watanabe T., Nishimuta M. 2009. Intra- and inter-individual variations of blood and urinary water soluble vitamins in Japanese young adults consuming a semi-purified diet for 7 days. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 55(6): 459–470.
220. Shibata K., Sugita C., Sano M., Fukuwatari T. 2013. Urinary excretion of B-group vitamins reflects the nutritional status of B-group vitamins in rats. *J. Nutr. Sci.* 2: e12, doi: 10.1017/jns.2013.3.
221. Sicińska E., Jeruszka-Bielak M., Masalska K., Wronowski S. 2013. A survey of foodstuffs fortified with vitamins available on the market in Warsaw. *Roczn. PZH* 64(4): 293–298.
222. Sigłowa A., Bertrand B., Conder M., Bertrand K., Lisiecka A., Kubiak P., Urbańska A. 2009. Suplementacja diety wśród studentów. *Żyw. Nauka. Technol. Jakość* 4(65): 236–249.
223. Silaghi A., Piercecchi-Marti M.D., Grino M., Leonetti G., Alessi M.C., Clement K., Dadoun F., Dutour A. 2008. Epicardial adipose tissue extent: relationship with age, body fat distribution, and coronaropathy. *Obesity* 16(11): 2424–2430.
224. Sims J.E., Smith D.E. 2010. The IL-1 family: regulators of immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 10: 89–102.
225. Sitko D., Wojtaś M., Gronowska-Senger A. 2012. Sposób żywienia młodzieży gimnazjalnej i licealnej. *Roczn. PZH* 63(3): 319–327.
226. Soccio M., Toniato E., Evangelista V., Carluccio M., de Caterina R. 2005. Oxidative stress and cardiovascular risk: the role of vascular NAD(P)H oxidase and its genetic variants. *Eur. J. Clin. Invest.* 35(5): 305–314.
227. Soni G.M., Thurmond S., Miller E.R., Spriggs T., Bendich A., Omaye S.T. 2010. Safety of vitamins and minerals. Controversies and perspective. *Toxicol. Sci.* 118(2): 348–355.

228. Sørensen H.T., Thulstrup A.M., Mellekjær L., Jepsen P., Christensen E., Olsen J.H., Vilstrup H. 2003. Long-term survival and cause-specific mortality in patients with cirrhosis of the liver: a nationwide cohort study in Denmark. *J. Clin. Epidemiol.* 56(1): 88–93.
229. Spiótek K., Kościótek A., Kania J., Hartman M., Pawłowska-Góral K. 2011. Czynniki decydujące o zakupie suplementów diety zawierających witaminy i składniki mineralne przez studentów Śląskiego Uniwersytetu Medycznego. *Roczn. PZH* 62(1): 37–40.
230. Stadtman E.R., Levine R.L. 2000. Protein oxidation. *Ann. NY Acad. Sci.* 899: 191–208.
231. Stawarska A., Tokarz A., Kolczewska M. 2009. Ocena ilościowa składników mineralnych i witamin w dietach ludzi starszych zrzeszonych w wybranych warszawskich stowarzyszeniach społecznych. Cz. 3. *Bromat. Chem. Toksykol.* 42(2): 117–122.
232. Stepuro A.I., Piletskaya T.P., Stepuro I.I. 2005. Role of thiamine thiol form in nitric oxide metabolism. *Biochem. (Mosc)* 70(3): 339–349.
233. Stoś K., Krygier B., Głowala A., Jarosz M. 2011. Skład wybranych suplementów diety w świetle obowiązujących wymagań. *Bromat. Chem. Toksykol.* 44(3): 596–603.
234. Sułek K., Sawicki W. 2010. Podejście diagnostyczne do pacjenta z izolowaną leukopenią. *Acta Haematol. Pol.* 41(2): 141–149.
235. Sygnowska E., Waśkiewicz A. 2008. Rola suplementacji w uzupełnianiu niedoborów witamin i składników mineralnych w diecie Polaków objętych badaniem WOBASZ. *Bromat. Chem. Toksykol.* 41(3): 389–394.
236. Sygnowska E., Waśkiewicz A. 2009. Ocena rozpowszechnienia i wielkości suplementacji witaminami i składnikami mineralnymi w populacji polskiej. *Roczn. PZH* 60(2): 167–170.
237. Sygnowska E., Waśkiewicz A. 2011. Ocena sposobu żywienia osób w wieku 60–74 lat. Badanie WOBASZ. *Bromat. Chem. Toksykol.* 44(3): 240–244.
238. Szponar L., Stoś K., Ołtarzewski M. 2004. Suplementy diety – możliwości ich wykorzystania w prewencji wybranych niedoborów żywieniowych. *Żyw. Człow. Metab.* 31(supl. cz. 1): 441–446.
239. Szponar L., Stoś K., Ołtarzewski M. 2007. Suplementy diety w żywieniu dzieci i młodzieży. *Pediatr. Współcz. Gastroenterol. Hepatol. Żyw. Dziecka* 9(1): 41–44.
240. Taub R. 2004. Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5: 836–847.
241. Theuma P., Fonseca V.A. 2003. Inflammation and emerging risk factors in diabetes mellitus and atherosclerosis. *Curr. Diab. Rep.* 3(3): 248–254.
242. Thornalley P.J. 2005. The potential role of thiamine (vitamin B1) in diabetic complications. *Curr. Diabetes Rev.* 1(3): 287–298.
243. TNS OBOP: *Suplementy diety niedocenione*, www.tns-global.pl, dostęp 20.06.2006.
244. Tordoff M.G., Alarcon L.K., Lawler M.P. 2008. Preferences of 14 rat strains for 17 taste compounds. *Physiol. Behav.* 95(3): 308–332.
245. Trayhurn P., Wood I.S. 2004. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br. J. Nutr.* 92(3): 347–355.
246. Tsimikas S. 2006. Oxidized low-density lipoprotein biomarkers in atherosclerosis. *Curr. Atheroscler. Rep.* 8(1): 55–61.
247. Tsuji T., Fukuwatari T., Sasaki S., Shibata K. 2010. Urinary excretion of vitamin B1, B2, B6, niacin, pantothenic acid, folate, and vitamin C correlates with dietary intakes of free-living elderly, female Japanese. *Nutr. Res.* 30(3): 171–178.
248. Tyrakowska B., Świrska M., Ankiel-Homa M. 2009. Suplementy diety w decyzjach nabywczych konsumentów. *Żyw. Człow. Metab.* 36(1): 78–84.

249. Ulatowska-Szostak E. 2008. Wpływ reklamy na zakup leków, parafarmaceutyków i preparatów witaminowych w opiniach klientów aptek – porównanie lat 2002 i 2007. *Probl. Hig. Epidemiol.* 89(3): 441–444.
250. Ullegaddi R., Powers H.J., Gariballa S.E. 2004. B-group vitamin supplementation mitigates oxidative damage after acute ischaemic stroke. *Clin. Sci.* 107(5): 477–484.
251. Ullegaddi R., Powers H.J., Gariballa S.E. 2006. Antioxidant supplementation with or without B-group vitamins after acute ischemic stroke: a randomized controlled trial. *Am. J. Parenter. Enteral. Nutr.* 30(2): 108–114.
252. Ustawa z 25 sierpnia 2006 r. o bezpieczeństwie żywności i żywienia. *DzU* 2006 r., nr 171, poz. 1225 ze zm.
253. Ustawa z 6 września 2001 r. – Prawo farmaceutyczne. *DzU* z 2004 r., nr 53, poz. 533, ze zm.
254. Valko M., Leibfritz D., Moncol J.I., Cronin M.T., Mazur M., Telser J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39: 44–84.
255. Velez-Carrasco W., Lichtenstein A., Welhy F., Li Z., Lamon-Fava S., Dolnikowski G.G., Schaefer E.J. 1999. Dietary restriction of saturated fat and cholesterol decrease HDL apo-AI secretion. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19(4): 918–924.
256. de Vos A., Prokop M., Roos C., Meijs M.F., van der Schouw Y.T., Rutten A., Gorter P.M., Cramer M.J., Doevendans P.A., Rensing B.J., Bartelink M.L., Velthuis B.K., Mosterd A., Bots M.L. 2008. Peri-coronary epicardial adipose tissue is related to cardiovascular risk factors and coronary artery calcification in post-menopausal women. *Eur. Heart J.* 29(6): 777–783.
257. Vos M.B., Lavine J.E. 2013. Dietary fructose in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 57(6): 2525–2531.
258. Voziyan P.A., Hudson B.G. 2005. Pyridoxamine as a multifunctional pharmaceutical: targeting pathogenic glycation and oxidative damage. *Cell. Mol. Life Sci.* 62(15): 1671–1681.
259. Wang W., Basinger A., Neese R.A., Shane B., Myong S.A., Christiansen M., Hellerstein M.K. 2001. Effect of nicotinic acid administration on hepatic very low density lipoprotein-triglyceride production. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 280(3): E540–E547.
260. Watts D. 1990. Nutrient interrelationships minerals-vitamins-endocrines. *J. Orthomol. Med.* 5(1): 11–19.
261. Wawrzyniak A., Hamułka J., Gorzel K. 2009a. Ocena spożycia witamin i składników mineralnych z suplementami diety wśród kobiet karmiących. *Roczn. PZH* 60(4): 353–356.
262. Wawrzyniak A., Hamułka J., Michalczyk A. 2009b. Udział suplementów w spożyciu witamin przez dzieci w wieku szkolnym. *Żyw. Człow. Metab.* 36(1): 19–24.
263. Webel D.M., Finck B.N., Baker D.H., Johnson R.W. 1997. Time course of increased plasma cytokines, cortisol, and urea nitrogen in pigs following intraperitoneal injection of lipopolysaccharide. *J. Anim. Sci.* 75(6): 1514–1520.
264. WHO. 2015. *Sugars intake for adult and children Guideline*. Geneva, ISBN 978 92 4 154902.
265. Wierzejska R., Jarosz M., Siuba M. 2012. Suplementacja diet kobiet ciężarnych – zalecenia a praktyka. *Ginek. Położ. Medical Project* 23(1): 70–78.
266. Willet W., Manson J., Liu S. 2002. Glycemic index, glyceic load and risk of type 2 diabetes. *Am. J. Clin. Nutr.* 76(1): 274–280.
267. Włodarek W., Głabska D. 2014. Ocena realizacji potrzeb żywieniowych starszych kobiet w zależności od ryzyka wystąpienia niedożywienia. *Probl. Hig. Epidemiol.* 95(2): 331–338.
268. Wróblewska M., Smoleń A. 2009. Suplementy diety stosowane przez zawodników sportów walki. *Żyw. Człow. Metab.* 31(1): 107–111.

269. Xia P., Vadas M.A., Rye K.A., Barter P.J., Gamble J.R. 1999. High density lipoproteins (HDL) interrupt the sphingosine kinase signaling pathway. A possible mechanism for protection against atherosclerosis by HDL. *J. Biol. Chem.* 274: 33143–33147.
270. Yoshioka M., Watanabe A., Shimada N., Murata H., Yokomizo Y., Nakajima Y. 2002. Regulation of haptoglobin secretion by recombinant bovine cytokines in primary cultured bovine hepatocytes. *Domest. Anim. Endocrinol.* 23(3): 425–433.
271. Zago V., Lucero D., Macri E.V., Cacciagiú L., Gamba C.A., Miksztowicz V., Berg G., Wikinski R., Friedman S., Schreier L. 2010. Circulating Very-Low-Density Lipoprotein characteristics resulting from fatty liver in an insulin resistance rat model. *Ann. Nutr. Metab.* 56(3): 198–206.
272. Zahorska-Markiewicz B., Janowska J., Olszanecka-Glinianowicz M., Zurakowski A. 2000. Serum concentrations of TNF- α and soluble TNF- α receptors in obesity. *Int. J. Obes.* 24(11): 1392–1395.
273. Zapolska-Downar D. 2000. Dysfunkcja komórek śródbłonna jako jeden z czynników patogennych miażdżycy. Normalizujący wpływ niektórych leków. *Czynniki Ryzyka* 4: 5–15.
274. Zhang L., Zalewski A., Liu Y., Mazurek T., Cowan S., Martin J.L., Hofmann S.M., Vlassara H., Shi Y. 2003. Diabetes-induced oxidative stress and low-grade inflammation in porcine coronary arteries. *Circulation* 108(4): 427–428.
275. Zhang L.H., Kamanna V.S., Zhang M.C., Kashyap M.L. 2008. Niacin inhibits surface expression of ATP synthase beta chain in HepG2 cells: implications for raising HDL. *J. Lipid Res.* 49(6): 1195–1201.
276. Zhang L.J., Yu J.P., Li D., Huang Y.H., Chen Z.X., Wang X.Z. 2004. Effects of cytokines on carbon tetrachloride-induced hepatic fibrogenesis in rats. *World J. Gastroenterol.* 10(1): 77–81.
277. Żyngiel W., Platta A., Palmowski P. 2013. Ocena zachowań żywieniowych wśród uczniów Szkoły Tańca SMU w Gdyni. *Bromat. Chem. Toksykol.* 46(3): 384–392.

Model studies on the evaluation of pro-inflammatory effect, of changes in the diet composition and different ways to supplement it with selected B group vitamins

Summary

One of the factors that affect the risk of inflammation in the body is oxidative stress generated, among other things, by hyperglycaemia due to excessive eating of processed and purified foods containing simple sugars. The increased consumption of such foods observed in the population is also associated with insufficient intake of B vitamins which, among other things, take part in the metabolism of these dietary components.

The aim of the study was to evaluate the impact of modifying the diet composition (consisting in isocaloric replacement of whole grain wheat and maize by type 500 white flour and sucrose), and the different ways of supplementing such an altered diet with selected vitamins of which it was deprived of (B1, B2, B6, niacin) on the risk of local and general inflammatory processes.

The study was conducted on 40 male Wistar rats which were divided into four groups and fed for the six weeks of the experiment with varied feed: the first group with the basic diet (BD). The second, third and fourth groups with modified feed (MF) in which 83.5% of wheat present in BD was replaced with (type 500) wheat flour and 50% of maize with sucrose. Animals from the first group (BD) and the second group (MF) received water to drink. The third group rats (MF + Complementary Supplementation) received in a solution of water, the following amounts of vitamins B1 – 0.94 mg, B2 – 0.48 mg, B6 – 0.5 mg, niacin – 1.9 mg, so as to make up for differences created through the change in the diet elements, which imitated the enrichment of food. The fourth group animals (MF + Redundant Supplementation) received to drink the following amounts of vitamins B1 – 3.1 mg, B2 – 2.3 mg, B6 – 2.4 mg and niacin – 6.65 mg. In these amounts, both differences in the vitamin content between BD and MF and the amount of 2–4 times the standard RDA for humans converted into the demand for the rat were included which imitated supplementing the diet by human with the prophylactic dose of these vitamins contained in the pharmaceutical preparations of B-compositum or B-complex. The total amount of vitamins administered in this group exceeded 2–4 times the recommended daily consumption (depending on the type of vitamins B1 – 2.3 times, B2 – 3.8 times, B6 – 3.8 times, niacin – 2.5 times).

It has been shown that the change of diet composition consisting in a swap of the whole grain cereal for wheat flour and sucrose, with proper intake quantity, had no significant effect on the parameters which are indicators of proinflammatory processes. Complementary supplementing the modified diet with synthetic B1, B2, and B6 vitamins along with niacin in amounts to add to the differences which occurred, following the conversion of dietary components, stimulating the growth of neutrophils, glycaemia, the formation of oxidative stress

and the oxidation of LDL-C and inducing changes in the protein and lipid metabolism, was the reason of a chronic inflammatory process manifested in the livers of test animals by inflammatory infiltrate and fibrosis passing into cirrhosis. The redundant dietary supplement with the above vitamins contributed to the acute inflammatory reaction in tested animals, which manifested itself with acute phase response aimed at restoring the system homeostasis, however, a significant increase in the concentration of oxLDL-C fraction observed could contribute to Atero-genic changes, forming in the vessels. In the light of the results obtained and in the context of the population growing consumption of processed food, it seems reasonable to draw attention to its enrichment more and more frequently with vitamins removed in technological processes.

Modellstudie zur Beurteilung des möglichen proinflammatorischen Einflusses der Zusammensetzung der Ernährung und verschiedener Methoden der Nahrungsergänzung mit B-Vitaminen

Zusammenfassung

Zu Faktoren, die die Entwicklung inflammatorischer Prozesse im Organismus fördern, gehört der oxidative Stress, der u.a. durch Hyperglykämie generiert wird, die durch übermäßigen Konsum verarbeiteter und raffinierter, Monosaccharide enthaltender Lebensmittel verursacht wird. Der in der Gesellschaft beobachtete gesteigerte Verzehr solcher Lebensmittel ist mit der nicht ausreichenden Zufuhr von B-Vitaminen verbunden, die u.a. am Stoffwechsel solcher Nahrungsbestandteile beteiligt sind.

Den Zweck der vorliegenden Arbeit bildet die Beurteilung des Einflusses der modifizierten Zusammensetzung der Ernährung (isokalorischer Ersatz von Weizen- und Maisvollkornprodukten durch Mehl Typ 500 und Saccharose) und verschiedener Methoden der Ergänzung einer so modifizierten Ernährung mit ausgewählten, in der Ernährung fehlenden Vitaminen (B₁, B₂, B₆, Niacin) auf das Risiko der Entwicklung lokaler und generalisierter inflammatorischer Prozesse.

Die Studie wurde an 40 männlichen Wistar-Ratten durchgeführt, die in vier Gruppen unterteilt und sechs Wochen lang wie folgt gefüttert wurden: Die erste Gruppe erhielt das Grundfutter (GF) und die Gruppen zwei, drei und vier – ein modifiziertes Futter (MF), in dem 83,5% von im GF enthaltenem Weizen durch Weizenmehl Typ 500 und 50% Mais durch Saccharose ersetzt wurden. Die Tiere der ersten (GF) und der zweiten (MF) Gruppe erhielten zum Trinken Wasser. Die Tiere der dritten Gruppe (MF + Nahrungsergänzung NE) erhielten folgende Vitaminmengen in wässriger Lösung: 0,94 mg B₁, 0,48 mg B₂, 0,5 mg B₆, 1,9 mg Niacin, sodass sie die Unterschiede, die nach der Modifizierung der Ernährungszusammensetzung entstanden, ausgleichen konnten, was die Nahrungsanreicherung imitieren sollte. Die Tiere der vierten Gruppe (MF + übermäßige Nahrungsergänzung ÜNE) erhielten folgende Vitaminmengen in wässriger Lösung: 3,1 mg B₁, 2,3 mg B₂, 2,4 mg B₆ und 6,65 mg Niacin. In den Mengen wurden sowohl quantitative Unterschiede zwischen GF und MG als auch eine 2–4-fache Überschreitung der empfohlenen Tagesdosis für Menschen, umgerechnet in den Bedarf einer Ratte berücksichtigt, was die Nahrungsergänzung durch eine profilaktische Menge der Vitamine durch Menschen imitieren sollte, die in pharmazeutischen Zusammensetzungen wie B-Compositum oder B-Complex enthalten ist. Summarisch gesehen überschritten die Vitaminmengen in der Gruppe 2- bis 4-fach (je nach Vitamin: B₁ – 2,3-fach, B₂ – 3,8-fach, B₆ – 3,8-fach, Niacin – 2,5-fach) die empfohlene Tagesdosis.

Es konnte nachgewiesen werden, dass die Modifizierung der Ernährungszusammensetzung, die im Ersatz von Vollkornprodukten durch Weizenmehl und Saccharose bestand, bei

normaler Verzehrmenge de Parameter proinflammatorischer Prozesse nicht relevant beeinflusste. Die Ergänzung der modifizierten Ernährung durch synthetische Vitamine B₁, B₂, B₆ und Niacin in einer Menge, die den Unterschied durch die Modifizierung der Nahrungsbestandteile ausgleichen lies, verursachte durch Stimulation der Erhöhung der Anzahl der neutrophilen Granulozyten, Glykämie, Entstehung des oxidativen Stresses und Oxidation der LDL-Cholesterin-Fraktion sowie durch Änderung des Protein- und Lipidstoffwechsels einen chronischen inflammatorischen Prozess, der sich durch inflammatorische Infiltrate und Fibrose in Lebern der untersuchten Tiere manifestierte, die sich zur Zirrhose entwickelte. Die übermäßige Nahrungsergänzung durch o.g. Vitamine trug zur Entwicklung einer akuten inflammatorischen Reaktion bei den untersuchten Tieren bei, was sich in der Akute-Phase-Reaktion manifestierte, durch die die Homöostase des Organismus wiederhergestellt werden sollte; die beobachtete Steigerung der Konzentration der oxLDL-Cholesterin-Fraktion konnte jedoch die Entstehung atherogener Veränderungen in Gefäßen fördern. Vor dem Hintergrund der ermittelten Ergebnisse und des steigenden Konsums verarbeiteter Lebensmittel scheint es sinnvoll, auf die immer häufigere Anreicherung solcher Lebensmittel durch Vitamine hinzuweisen, die sie im Laufe der technologischen Prozesse verlieren.