

Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego

mgr inż. Alicja Helena Pakiet

**OCENA WPŁYWU LAPAROSKOPOWEJ OPERACJI
PĘTLOWEGO WYŁĄCZENIA ŻOŁĄDKOWO-JELITOWEGO NA
POZIOM BIOAKTYWNYCH LIPIDÓW W PRZEBIEGU
OTYŁOŚCI OLBRZYMIJ**

Promotor:

dr hab. Adriana Maria Mika, prof. GUMed, prof. UG

*Praca doktorska wykonana w **Katedrze Analizy Środowiska***

Gdańsk, 2023

PODZIĘKOWANIA

Dr hab. Adrianie Mika, prof. GUMed, prof. UG
za nieocenioną pomoc, wsparcie naukowe i całą przekazaną mi wiedzę


Mamie
za słuchanie mnie

Tacie i Siostram
za bycie dla mnie zawsze

Kucykom
za spotkania i rozmowy

Śp. Babci Stasi
za bezwarunkową miłość

FINANSOWANIE

 NARODOWE CENTRUM NAUKI **SONATA** 11 nr 2016/21/D/NZ5/00219
pt. „Ewaluacja wpływu Omega Loop Gastric Bypass na poziom bioaktywnych lipidów w przebiegu otyłości olbrzymiej”, 2017-2020, kierownik: dr hab. Adriana Maria Mika

Badania Młodych Naukowców na Uniwersytecie Gdańskim, nr BMN 538-8610-B296-18 pt. „Opracowanie metody oznaczania oksylipin z surowicy krwi techniką tandemowej spektrometrii mas, wyposażonej w mikro ESI, sprzężoną z ultrawysokosprawną chromatografią cieczową (UHPLC-MS/MS)”, 2019, kierownik: mgr. inż. Alicja Pakiet

Badania Młodych Naukowców na Uniwersytecie Gdańskim, nr BMN 538-8610-B772-17/18 pt. „Opracowanie metody ekstrakcji do fazy stałej (SPE) oksylipin z surowicy krwi”, 2018, kierownik: mgr. inż. Alicja Pakiet

OPINIE KOMISJI BIOETYCZNYCH

Badania z wykorzystaniem ludzkiego materiału biologicznego przeprowadzone w ramach niniejszej rozprawy były zgodne z zasadami ujętymi w Deklaracji helsińskiej Światowego Towarzystwa Medycznego, a protokół badawczy został zaakceptowany przez **Niezależną Komisję Bioetyczną ds. Badań Naukowych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (uchwały NKBBN/493/2016, NKEBN/614/2013-2014, NKBBN/297/2017)**. Postępowanie w badaniach na myszach eksperymentalnych zostało zaakceptowane przez **Lokalną Komisję Etyczną ds. doświadczeń na zwierzętach w Bydgoszczy, nr zgody 27/2016**

STRESZCZENIE

Otyłość jest jednym z najpoważniejszych problemów cywilizacyjnych XXI wieku, dotykającym ludzi na całym świecie. Choroba ta rozwija się, gdy równowaga pomiędzy spożywanymi kaloriami a wydatkiem energetycznym organizmu jest zachwiana, co prowadzi do gromadzenia nadmiaru składników odżywczych i przyrostu masy ciała. Rozrost tkanki tłuszczowej wiąże się z licznymi niekorzystnymi skutkami zdrowotnymi, wśród których można wymienić przewlekły stan zapalny, zaburzenie sygnalizacji insulinowej i homeostazy glukozy, ekotopową akumulację lipidów i lipotoksyczność. Wraz z otyłością nierzadko występuje zespół metaboliczny, cukrzyca typu II, choroby układu krążenia, problemy z oddychaniem, zaburzenie funkcji poznawczych oraz różne typy nowotworów. Jeżeli otyłości, w której wskaźnik masy ciała (BMI, ang. *body mass index*) przekracza 35 kg/m^2 , towarzyszą choroby współistniejące, nazywa się ją otyłością olbrzymią (MO, ang. *morbid obesity*) i należy ją leczyć. Chirurgia bariatryczna jest najskuteczniejszą formą leczenia otyłości, która jednocześnie niweluje niekorzystne skutki zdrowotne otyłości np. prowadząc do remisji cukrzycy. Nieodłączną cechą MO są zaburzenia lipidowe, jednak mimo postępów w analityce, wiele badań wciąż ogranicza się do zmian w lipidogramie (podstawowym profilu lipidów we krwi), pomijając biologicznie istotne zaburzenia profili kwasów tłuszczowych (FA, ang. *fatty acid*). Celem prezentowanej rozprawy doktorskiej jest opisanie zmian w profilach FA, a w szczególności bioaktywnych grup rozgałęzionych FA (BCFA, ang. *branched chain fatty acids*), nieparzystych FA (OCFA, ang. *odd-chain fatty acids*) oraz wielonienasyconych FA (PUFA, ang. *polyunsaturated fatty acids*) jakie wywołuje leczenie MO za pomocą laparoskopowej operacji pętlowego wyłączenia żołądkowo-jelitowego (OAGB, ang. *one anastomosis gastric bypass*).

Całkowite profile FA w surowicy i tkankach pacjentów bariatrycznych analizowano techniką chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC-MS, ang. *gas chromatography-mass spectrometry*). Pacjenci z MO charakteryzowali się znacznie niższą zawartością BCFA, która wzrastała po OAGB. Według najnowszych badań, w organizmie ludzkim zachodzi synteza BCFA z rozgałęzionych aminokwasów (BCAA, ang. *branched chain amino acids*), co sugeruje możliwy udział tego procesu w obniżeniu zawartości BCFA u pacjentów z MO. Wyniki przeprowadzonych we współpracy z Gdańskim Uniwersytetem Medycznym oznaczeń stężeń BCAA i ekspresji enzymów katalizujących ich przemiany były zgodne z tą wyjściową hipotezą.

Analiza krążących FA po OAGB pozwoliła na wykrycie wielu zmian o potencjalnym znaczeniu klinicznym. Dwa tygodnie po OAGB poziom BCFA, OCFA i niezbędnych PUFA uległ znacznemu obniżeniu. Te grupy FA są związane z szeregiem efektów pożądaných w leczeniu MO tj. ustąpieniem stanu zapalnego (PUFA), poprawą wrażliwości na insulinę (BCFA) czy niższym ryzykiem sercowo-naczyniowym (OCFA). Uzyskane wyniki sugerują zatem, że interwencje zwiększające poziom tych FA w organizmie, suplementacja lub modyfikacje diety, mogą być korzystne dla pacjentów leczonych OAGB. Stosując analizę głównych składowych (PCA, ang. *principal component analysis*) wykazano, że po 6-9 miesiącach od OAGB profile FA, w przeciwieństwie do profili aminokwasów, nie normalizują się. Pomimo poprawy w zawartości OCFA i BCFA, nadal obserwowano obniżone poziomy PUFA. Niektóre ze zidentyfikowanych zmian mogą być korzystne np. niska zawartość silnie prozapalnego kwasu arachidonowego.

Zagadnienie udziału PUFA w regulację stanu zapalnego po OAGB zostało rozwinięte o analizę ich metabolitów – oksylipin. W tym celu zoptymalizowano metodę analityczną tandemowej spektrometrii mas sprzężonej z chromatografią ciecząową i przygotowaniem próbki metodą ekstrakcji do fazy stałej (SPE-LC-MS/MS, ang. *solid phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry*). W surowicy pacjentów z MO oznaczono ilościowo panel oksylipin i określono różnice w ich stężeniach przed i po operacji OAGB.

Ostatnim aspektem pracy było zastosowanie mysiego modelu otyłości do uzyskania wglądu w zmiany FA w tkance serca i mózgu. Badania umotywowane były związkiem MO z większym ryzykiem, odpowiednio, chorób sercowo naczyniowych i zaburzeń funkcji kognitywnych. Zastosowano technikę SPE w celu uzyskania oddzielnych frakcji związanych z błonami komórkowymi lipidów polarnych i obojętnych lipidów, których główną funkcją jest magazynowanie energii. W mózgu zidentyfikowano znacznie niższy poziom, ważnego w utrzymaniu jego prawidłowej funkcji, kwasu eikozapentaenowego. Z kolei zaburzeniom funkcji serca towarzyszyła akumulacja PUFA w lipidach błonowych.

Wyniki prezentowanych badań dostarczają cennych informacji na temat zmian biologicznie aktywnej grupy metabolitów – FA, zachodzących w MO i po OAGB. Umożliwiają zrozumienie zmian fizjologicznych zachodzących w wyniku niedostatecznie poznanego zabiegu bariatrycznego jakim jest OAGB. Uzyskane wyniki mogą mieć również znaczenie kliniczne, bowiem zidentyfikowane zmiany FA w dużej części dotyczą niezbędnych, pochodzących z diety grup, których uzupełnienie może usprawnić leczenie bariatryczne.

SUMMARY

Obesity is one of the most pressing issues the civilization faces in the 21st century, affecting millions of people worldwide. The condition develops primarily due to imbalance of caloric intake and energy spending, which results in accumulation of excess nutrients in tissues and subsequent weight gain. This abnormal increase in body fat is associated with numerous adverse health effects, among which are chronic low-grade inflammation, disturbances in insulin signalling and glucose homeostasis or ectopic lipid accumulation and lipotoxicity. The conditions comorbid with obesity include metabolic syndrome, type II diabetes, cardiovascular disease, breathing issues, cognitive impairments, and various types of cancer. When obesity of over 35 kg/m² BMI is accompanied by comorbidities, it is termed morbid obesity (MO) and should be treated. Bariatric surgery is the most effective method for sustained weight loss with a remarkable benefit of reversing the related adverse health effects e.g., remission of diabetes. Disturbed lipid metabolism is an intrinsic quality of MO. However, despite advances in analytical methods, many studies assessing the changes in lipidome frequently analyse only serum lipid profiles, missing the biologically relevant fatty acid (FA) disturbances. This dissertation intends to demonstrate how one anastomosis gastric bypass (OAGB), a relatively frequently performed but understudied in terms of its effects at the lipidome level bariatric surgery, affects the levels of FAs and in particular bioactive groups of FAs i.e., branched chain FAs (BCFAs), odd-chain FAs (OCFAs) and polyunsaturated FAs (PUFAs).

Total FA profiles were analysed with gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) in serum and adipose tissue of bariatric patients. At baseline patients presented with significantly lower levels of BCFA in serum and visceral adipose tissue and the OAGB treatment led to restoration of appropriate BCFA levels. Recent evidence of BCFA synthesis from branched chain amino acids (BCAA) precursors in human adipose tissue suggested possible involvement of this process in attenuated BCFA content with MO subjects. In collaboration with the Medical University of Gdansk, the analysis of serum BCAA concentrations and expression of enzymes catalysing their transformation was performed and results were in line with the initial hypothesis.

Analysis of circulating FAs at two time points after the surgery revealed profound changes that may be of clinical relevance. Two weeks after the surgery the levels of BCFAs, OCFAs and essential PUFAs were significantly lower. These results suggest that MO patients undergoing OAGB could benefit from interventions that improve levels of these FAs, be it in a form of supplementation

or dietary adjustments, due to these FAs having effects aligning with the goals of bariatric treatment i.e., resolution of inflammation (PUFAs) and improved insulin sensitivity (BCFAs), lower cardiovascular risk (OCFAs). Principal component analysis (PCA) has shown that, unlike amino acids concentrations, which normalize in serum at 6-9 months after OAGB, profiles of FA remain altered at this point in time. Despite improvements in BCFA and OCFA content, reduced levels of some PUFAs persisted, although some identified changes may be beneficial e.g. low level of potent proinflammatory FA – arachidonic acid.

The subject of possible PUFA involvement in regulation of inflammation after OAGB was expanded with analysis of their downstream metabolites – oxylipins. To this end, tandem mass spectrometry coupled with liquid chromatography and sample preparation by solid phase extraction (SPE-LC-MS/MS) method was developed. This allowed for successful quantification of the number of oxylipins in serum and enabled the detection of differences in their concentrations before and after OAGB surgery.

Finally, a mouse model of obesity was implemented to gain insight into FA alterations in heart and brain tissue, in order to shed some light on the possible role that FAs have in MO-associated cardiovascular risk and cognitive impairment respectively. SPE was employed during sample preparation in order to obtain separate fractions of polar lipids which are components of membranes and neutral lipids that mainly store energy. In the brain, eicosapentaenoic acid, FA involved in maintaining healthy brain function, was depleted. In turn, the disturbances of heart function were accompanied by PUFA accumulation in membrane lipids.

Results of presented studies provide valuable insight into changes in a biologically important group of metabolites, FAs, occurring in MO and after OAGB procedure. This not only allows for better understanding of physiological changes that come with understudied bariatric surgery but may also be of clinical relevance since many of identified changes concern essential and diet-derived FAs, which could be supplemented in order to facilitate bariatric treatment.

SPIS TREŚCI

1 WYKAZ SKRÓTÓW	1
2 WPROWADZENIE	7
2.1 OTYŁOŚĆ - PROBLEM XXI WIEKU	7
2.1.1 KLASYFIKACJA OTYŁOŚCI	7
2.1.2 EPIDEMIA OTYŁOŚCI W POLSCE I NA ŚWIECIE	8
2.1.3 PRZYCZYNY OTYŁOŚCI	10
2.1.4 KONSEKWENCJE OTYŁOŚCI	12
2.1.5 PODSTAWY PATOFIZJOLOGII OTYŁOŚCI	13
2.1.5.1 TKANKA TŁUSZCZOWA	13
2.1.5.2 ZMIANY W TKANCE TŁUSZCZOWEJ ZWIĄZANE Z OTYŁOŚCIĄ	15
2.1.6 METODY LECZENIA OTYŁOŚCI	17
2.1.6.1 LAPAROSKOPOWA OPERACJA PĘTLOWEGO WYŁĄCZENIA ŻOŁĄDKOWO-JELITOWEGO NA PĘTLI OMEGA	19
2.2 LIPIDOMIKA W BADANIACH NAD OTYŁOŚCIĄ	20
2.2.1 PODSTAWOWE INFORMACJE O LIPIDACH	20
2.2.1.1 BIOLOGICZNE FUNKCJE LIPIDÓW	23
2.2.2 KWASY TŁUSZCZOWE	26
2.2.2.1 NASYCONY KWASY TŁUSZCZOWE	27
2.2.2.1.1 ROZGAŁĘZIONE I NIEPARZYSTE KWASY TŁUSZCZOWE	28
2.2.2.2 JEDNONIENASYCONY KWASY TŁUSZCZOWE	30
2.2.2.3 WIELONIENASYCONY KWASY TŁUSZCZOWE	31
2.2.2.3.1 OKSYLIPINY	33
2.2.3 KWASY TŁUSZCZOWE W OTYŁOŚCI	37
2.2.3.1 WPŁYW ZABIEGU BARIATRYCZNEGO NA PROFIL KWASÓW TŁUSZCZOWYCH	38
3 CELE PRACY	44
4 MATERIAŁY I METODY	45
4.1 APARATURA I ODCZYNNIKI	45
4.1.1 ODCZYNNIKI CHEMICZNE I BIOCHEMICZNE	45
4.1.2 APARATURA	47
4.1.3 AKCESORIA	48
4.2 CHARAKTERYSTYKA MATERIAŁU BIOLOGICZNEGO	50
4.2.1 LUDZKI MATERIAŁ BIOLOGICZNY	50

4.2.1.1 KRYTERIA REKRUTACYJNE	50
4.2.1.2 ZALECENIA DIETETYCZNE	51
4.2.1.3 POZYSKIWANIE TKANKI TŁUSZCZOWEJ	52
4.2.1.4 POZYSKIWANIE SUROWICY KRWI	52
4.2.1.5 PODSTAWOWE PARAMETRY KLINICZNE I BIOCHEMICZNE	53
4.2.1.6 STĘŻENIA AMINOKWASÓW W SUROWICY KRWI	53
4.2.1.7 POZIOM EKSPRESJI mRNA ENZYMÓW ŚCIEŻKI KATABOLIZMU ROZGAŁĘZIONYCH AMINOKWASÓW	55
4.2.2 MYSI MODEL OTYŁOŚCI	56
4.2.2.1 POMIARY FUNKCJI SERCA	57
4.2.2.2 OZNACZANE PARAMETRY BIOCHEMICZNE	58
4.2.2.2.1 OZNACZANIE POZIOMU KARBONYLACJI BIAŁEK	58
4.2.2.2.2 OZNACZANIE POZIOMU PEROKSYDACJI LIPIDÓW	59
4.2.2.2.3 OZNACZANIE WOLNEGO CHOLESTEROLU	59
4.2.2.2.4 OZNACZANIE STĘŻENIA WOLNYCH KWASÓW TŁUSZCZOWYCH	60
4.3 ANALIZA KWASÓW TŁUSZCZOWYCH	60
4.3.1 EKSTRAKCJA LIPIDÓW CAŁKOWITYCH Z MATERIAŁU BIOLOGICZNEGO	61
4.3.2 ROZDZIAŁ LIPIDÓW TECHNIKĄ EKSTRAKCJI DO FAZY STAŁEJ	62
4.3.2.1 ROZDZIAŁ LIPIDÓW - METODA I	62
4.3.2.2 ROZDZIAŁ LIPIDÓW - METODA II	64
4.3.3 DERYWATYZACJA KWASÓW TŁUSZCZOWYCH	65
4.3.4 ANALIZA PROFILU KWASÓW TŁUSZCZOWYCH ZA POMOCĄ GC-MS	66
4.4 ANALIZA OKSYLIPIN	68
4.4.1 EKSTRAKCJA OKSYLIPIN Z SUROWICY KRWII	68
4.4.1.1 ANALITY	68
4.4.1.2 PRZYGOTOWANIE PRÓBEK RZECZYWISTYCH	76
4.4.1.3 PRZYGOTOWANIE PRÓBEK DO WALIDACJI	77
4.4.2 OZNACZANIE STĘŻENIA OKSYLIPIN W SUROWICY TECHNIKĄ LC-MS/MS	77
4.5 STATYSTYCZNA ANALIZA WYNIKÓW	81
4.5.1 JEDNOZMIENNOWE ANALIZY STATYSTYCZNE	81
4.5.2 WIELOWYMIAROWA ANALIZA DANYCH	83

5 WYNIKI _____ 84**5.1 OZNACZANIE PROFILU KWASÓW TŁUSZCZOWYCH W LUDZKIM MATERIALE BIOLOGICZNYM _____ 84**

5.1.1 WYNIKI BADAŃ PACJENTÓW Z OTYŁOŚCIĄ OLBRZYMIĄ LECZONYCH OAGB _____	85
5.1.2 ZMIANY PROFILU KWASÓW TŁUSZCZOWYCH U PACJENTÓW Z OTYŁOŚCIĄ _____	88
5.1.2.1 ZMIANY W PROFILU KWASÓW TŁUSZCZOWYCH W TKANCE TŁUSZCZOWEJ PACJENTÓW Z OTYŁOŚCIĄ OLBRZYMIĄ _____	88
5.1.2.2 WPŁYW DIETY PRZYGOTOWUJĄCEJ DO ZABIEGU OAGB NA PROFIL KWASÓW TŁUSZCZOWYCH W SUROWICY _____	92
5.1.3 WPŁYW OAGB NA PROFIL I METABOLIZM KWASÓW TŁUSZCZOWYCH U PACJENTÓW Z OTYŁOŚCIĄ _____	93
5.1.3.1 KRÓTKOTERMINOWY WPŁYW OAGB NA PROFIL KWASÓW TŁUSZCZOWYCH W SUROWICY PACJENTÓW Z OTYŁOŚCIĄ OLBRZYMIĄ _____	93
5.1.3.2 DŁUGOTERMINOWY WPŁYW LECZENIA BARIATRYCZNEGO NA PROFIL KWASÓW TŁUSZCZOWYCH _____	97
5.1.3.3 TRENDY ZMIAN W PROFILACH KWASÓW TŁUSZCZOWYCH PO OPERACJI BARIATRYCZNEJ _____	103
5.1.3.4 WPŁYW LECZENIA OAGB NA POZIOM ROZGAŁĘZIONYCH KWASÓW TŁUSZCZOWYCH _____	105

5.2 OZNACZANIE STĘŻENIA OKSYLIPIN TECHNIKĄ SPE-LC-MS/MS _____ 109

5.2.1 CHARAKTERYSTYKA METODY OZNACZANIA OKSYLIPIN W SUROWICY KRWI TECHNIKĄ SPE-LC-MS/MS _____	109
5.2.2 OZNACZANIE STĘŻENIA OKSYLIPIN W SUROWICY PACJENTÓW LECZONYCH OAGB _____	116

5.3 ZMIANY PROFILU KWASÓW TŁUSZCZOWYCH W MYSIM MODELU OTYŁOŚCI WYWOŁANEJ DIETĄ WYSOKOTŁUSZCZOWĄ _____ 119

5.3.1 PROFIL KWASÓW TŁUSZCZOWYCH W EKSTRAKTACH LIPIDOWYCH MÓZGÓW MYSZY Z OTYŁOŚCIĄ _____	122
5.3.1.1 ANALIZA KWASÓW TŁUSZCZOWYCH WE FRAKCJACH LIPIDOWYCH UZYSKANYCH W ROZDZIALE SPE Z MÓZGÓW MYSZY _____	123
5.3.2 PROFIL KWASÓW TŁUSZCZOWYCH W EKSTRAKTACH LIPIDOWYCH Z SERC MYSZY Z OTYŁOŚCIĄ _____	127
5.3.2.1 PROFIL KWASÓW TŁUSZCZOWYCH W EKSTRAKTACH CAŁKOWITYCH LIPIDÓW Z SERC W MODELU MYSIM _____	128
5.3.2.2 ANALIZA KWASÓW TŁUSZCZOWYCH WE FRAKCJACH LIPIDOWYCH UZYSKANYCH W ROZDZIALE SPE Z SERC MYSZY _____	129

6 DYSKUSJA	132
6.1 WPŁYW ZABIEGU OAGB NA PROFIL KWASÓW TŁUSZCZOWYCH	132
6.1.1 KRÓTKOTERMINOWY WPŁYW OAGB NA PROFIL KWASÓW TŁUSZCZOWYCH W SUROWICY	134
6.1.2 BRAK NORMALIZACJI PROFILU KWASÓW TŁUSZCZOWYCH 6-9 MIESIĘCY PO OAGB	137
6.1.3 METABOLIZM ROZGAŁĘZIONYCH KWASÓW TŁUSZCZOWYCH	139
6.2 WPŁYW LECZENIA BARIATRYCZNEGO NA STĘŻENIA KRAŻĄCYCH OKSYLIPIN	141
6.3 WGLĄD W POTENCJALNĄ ROLE KWASÓW TŁUSZCZOWYCH W ROZWIJANIU SIĘ POWIKŁAŃ OTYŁOŚCI UZYSKANY W MODELU ZWIERZĘCYM	147
6.3.1 IMPLIKACJE OBNIŻENIA ZAWARTOŚCI KWASU EIKOZAPENTAENOWEGO W POLARNYCH LIPIDACH MÓZGU WSKUTEK OTYŁOŚCI WYWOŁANEJ DIETĄ WYSOKOTŁUSZCZOWĄ	148
6.3.2 WPŁYW DIETY WYSOKOTŁUSZCZOWEJ NA ZMIANY PROFILU KWASÓW TŁUSZCZOWYCH W SERCU	151
7 PODSUMOWANIE	155
8 WNIOSKI	156
9 LITERATURA	157
10 SPIS TABEL	188
11 SPIS ILUSTRACJI	190
12 MATERIAŁY UZUPEŁNIAJĄCE	I
12.1 OPIS ZALECEŃ DIETETYCZNYCH DLA PACJENTÓW LECZONYCH OAGB	I
12.1.1 DIETA REDUKCYJNA PRZED ZABIEGIEM OAGB	I
12.1.2 DIETA BEZPOŚRENIO PO OPERACJI OAGB	II
12.2 TABELLE	IV
12.3 RYSUNKI	XXIII
12.4 DOROBEK NAUKOWY	XXVI
12.4.1 WYKAZ PRAC ZWIĄZANYCH Z TEMATEM ROZPRAWY DOKTORSKIEJ	XXVI
12.4.2 POZOSTAŁY DOROBEK	XXIX
12.4.3 NAGRODY I WYRÓŻNIENIA	XXIXI

1 WYKAZ SKRÓTÓW

Skrót	Rozwinięcie w języku polskim	Rozwinięcie w języku angielskim
AG	acyloglicerole	<i>acylglycerols</i>
AGB	regulowana opaska żołądkowa	<i>adjustable gastric band</i>
ANOVA	analiza wariancji	<i>analysis of variance</i>
AVA	pole powierzchni ujścia zastawkowego	<i>aortic valve area</i>
BAT	brunatna tkanka tłuszczowa	<i>brown adipose tissue</i>
BCAA	rozgałęzione aminokwasy	<i>branched-chain amino acids</i>
BCAT	aminotransferaza aminokwasów o rozgałęzionych łańcuchach	<i>branched-chain aminotransferase</i>
BCFA	rozgałęzione kwasy tłuszczowe	<i>branched-chain fatty acids</i>
BCKDH(A/B)	kompleks dehydrogenazy rozgałęzionych α -ketokwasów (podjednostka α/β)	<i>branched-chain α-ketoacid dehydrogenase (subunit α/β)</i>
BMI	wskaźnik masy ciała	<i>body mass index</i>
BPDDS	wyłączenie żółciowo-trzustkowe z przełączeniem dwunastniczym	<i>biliopancreatic diversion with duodenal switch</i>
Cer	ceramid	<i>ceramide</i>
CPOA2H	kwasy cis-9,10-metylenoheksadekanowy	<i>cyclopropaneoctanoic acid 2-hexyl</i>
CO	pojemność minutowa serca/rzut serca	<i>cardiac output</i>
COX	cyklooksygenaza	<i>cyclooxygenase</i>
CRP	białko C-reaktywne	<i>C-reactive protein</i>
CVD	choroby naczyniowo-wieńcowe	<i>cardiovascular disease</i>
CYP450	cytochrom P450	<i>cytochrome P450</i>
DAG	diacyloglicerole	<i>diacylglycerol</i>
EAT	tkanka tłuszczowa okołojądrowa	<i>epididymal adipose tissue</i>
ECFA	parzystowęglowe kwasy tłuszczowe	<i>even-chain fatty acids</i>
EI	jonizacja strumieniem elektronów	<i>electron ionization</i>
ELOVL	elongaza bardzo długołańcuchowych kwasów tłuszczowych	<i>elongation of very long chain fatty acids protein</i>
ESI	jonizacja poprzez elektrorozpylanie	<i>electrospray ionization</i>
FADS1	$\Delta 5$ -desaturaza kwasów tłuszczowych (gen)	<i>fatty acid desaturase 1 ($\Delta 5$-)</i>
FADS2	$\Delta 6$ -desaturaza kwasów tłuszczowych (gen)	<i>fatty acid desaturase 2 ($\Delta 6$-)</i>
FAME	estry metylowe kwasów tłuszczowych	<i>fatty acid methyl esters</i>
FA	kwasy tłuszczowe	<i>fatty acid</i>
FAS	syntaza kwasów tłuszczowych	<i>fatty acid synthase</i>
FFA	wolne kwasy tłuszczowe	<i>free fatty acids</i>
FU1	grupa pacjentów 2 tygodnie po OAGB	<i>1st follow up - patients 2 weeks after OAGB</i>
FU2	grupa pacjentów 6-9 miesięcy po OAGB	<i>2nd follow up - patients 6-9 months after OAGB</i>
GC-MS	chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas	<i>gas chromatography-mass spectrometry</i>
GSPL	glikosfingolipidy	<i>glycosphingolipids</i>

Skrót	Rozwinięcie w języku polskim	Rozwinięcie w języku angielskim
HDL / HDL-C	frakcja lipoprotein o wysokiej gęstości / cholesterol związany z frakcją lipoprotein o niskiej gęstości	<i>high density lipoprotein / high density lipoprotein cholesterol</i>
HFD	dieta wysokotłuszczowa	<i>high-fat diet</i>
HOMA-IR	wskaźnik oceny modelu homeostazy oporności na insulinę	<i>homeostatic model assessment of insulin resistance</i>
IL	interleukina	<i>interleukin</i>
INI	grupa pacjentów z otyłością olbrzymią przed rozpoczęciem diety redukcyjnej kwalifikującej do zabiegu bariatrycznego	<i>patients at baseline, before starting diet that qualifies them for bariatric treatment</i>
LC	grupa kontrolna	<i>lean control group</i>
LC-MS / LC-MS/MS	spektrometria mas sprzężona z chromatografią cieczową / tandemowa spektrometria mas sprzężona z chromatografią cieczową	<i>liquid chromatography-mass spectrometry / liquid chromatography tandem mass spectrometry</i>
LDL / LDL-C	frakcja lipoprotein o niskiej gęstości / cholesterol związany z frakcją lipoprotein o niskiej gęstości	<i>low density lipoprotein / low density lipoprotein cholesterol</i>
LOX	lipooksygenaza	<i>lipoxygenase</i>
(L)SG	(laparoskopowa) resekcja żołądka	<i>(laparoscopic) sleeve gastrectomy</i>
LT	leukotrien	<i>leukotriene</i>
LVEDV	objętość końcoworozkurczowa lewej komory serca	<i>left ventricular end-diastolic volume</i>
LVEF	frakcja wyrzutowa lewej komory serca	<i>left ventricular ejection fraction</i>
LVESV	objętość końcowoskurczowa lewej komory serca	<i>left ventricular end-systolic volume</i>
LX	lipoksyna	<i>lipoxin</i>
MAG	monoacyloglicerole	<i>monoacylglycerol</i>
Mar	marezyna	<i>maresin</i>
MO	otyłość olbrzymia	<i>morbid obesity</i>
MRM	tryb monitorowania wielu reakcji fragmentacji	<i>multiple reaction monitoring</i>
MUFA	jednonienasycone kwasy tłuszczowe	<i>monounsaturated fatty acids</i>
NAFLD	niealkoholowa stłuszczeniowa choroba wątroby	<i>non-alcoholic fatty liver disease</i>
NL	lipidy neutralne	<i>neutral lipids</i>
OAGB	pętlowe wyłączenie żołądkowo-jelitowe/wyłączenie żołądkowe z zespoleniem pętlowym	<i>one anastomosis gastric bypass</i>
PCA	analiza głównych składowych	<i>principal component analysis</i>
PCR	reakcja łańcuchowej polimerazy	<i>polymerase chain reaction</i>
PG	prostaglandyna	<i>prostaglandin</i>
PHL	fosfolipidy	<i>phospholipids</i>
PPAR	receptor aktywowany przez proliferatory peroksysomów	<i>peroxisome proliferator-activated receptor</i>
PUFA	wielonienasycone kwasy tłuszczowe	<i>polyunsaturated fatty acids</i>

Skrót	Rozwinięcie w języku polskim	Rozwinięcie w języku angielskim
RM-ANOVA	analiza wariancji z powtarzanymi pomiarami	<i>repeated measures analysis of variance</i>
ROS	reaktywne formy tlenu	<i>reactive oxygen species</i>
Rv	rezolwina	<i>resolvin</i>
RYGB	laparoskopowe ominięcie żołądkowo-jelitowe na pętli Roux-en-Y	<i>Roux-en-Y gastric bypass</i>
SAT	podskórna tkanka tłuszczowa	<i>subcutaneous adipose tissue</i>
SCD-1	desaturaza stearoilokoenzymu A izoforma 1	<i>stearoyl-CoA desaturase 1</i>
SD	standardowa dieta	<i>standard diet</i>
SFA	nasycone kwasy tłuszczowe	<i>saturated fatty acids</i>
SM	sfgangomieliny	<i>sphingomyelin</i>
SPE	ekstrakcja do fazy stałej	<i>solid phase extraction</i>
SPM	wyspecjalizowany mediator lipidowy wygaszający stan zapalny	<i>specialized pro-resolving mediator</i>
SV	objętość wyrzutowa	<i>stroke volume</i>
T2DM	cukrzyca typu II	<i>type II diabetes mellitus</i>
TAG	triacyloglicerole	<i>triacylglycerols</i>
TNF	czynnik martwicy nowotworów	<i>tumour necrosis factor</i>
TX	tromboksan	<i>thromboxane</i>
VAT	otrzewnowa tkanka tłuszczowa	<i>visceral adipose tissue</i>
VLCFA	bardzo długołańcuchowe kwasy tłuszczowe	<i>very long-chain fatty acids</i>
VLDL	lipoproteina bardzo niskiej gęstości	<i>very low-density lipoprotein</i>
V_{max}	prędkość przepływu przez zastawkę aorty	<i>aortic valve flow velocity</i>
WAT	biała tkanka tłuszczowa	<i>white adipose tissue</i>
Δ5D	Δ5-desaturaza kwasów tłuszczowych	<i>fatty acid Δ5-desaturase</i>
Δ6D	Δ6-desaturaza kwasów tłuszczowych	<i>fatty acid Δ6-desaturase</i>

Tabela 1.1 Stosowane skróty nazw wielonienasyconych kwasów tłuszczowych

Skrót	Liczba atomów węgla:liczba wiązań podwójnych	Nazwa zwyczajowa	Nazwa systematyczna
Kwasy wielonienasycone serii n-3			
ALA	18:3 n-3	kwas α -linolenowy	kwas (9Z,12Z,15Z)-oktadekatrienowy
EPA	20:5 n-3	kwas eikozapentaenowy	kwas (5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-eikozapentaenowy
ETA	20:4 n-3	kwas eikozatetraenowy n-3	kwas (8Z,11Z,14Z,17Z)-eikozatetraenowy
DHA	22:6 n-3	kwas dokozaheksaenowy	kwas (4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-dokozaheksaenowy
n-3 DPA	22:5 n-3	kwas dokozapentaenowy n-3	kwas (7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-dokozapentaenowy
Kwasy wielonienasycone serii n-6			
LA	18:2 n-6	kwas linolowy	kwas (9Z,12Z)-oktadekadienowy
GLA	18:3 n-6	kwas γ -linolenowy	kwas (Z,Z,Z)-6,9,12-oktadekatrienowy
ARA	20:4 n-6	kwas arachidonowy	kwas (5Z,8Z,11Z,14Z)-eikozatetraenowy
DGLA	20:3 n-6	kwas dihomo- γ -linolenowy	kwas (8E,11E,14E)-eikozatrienowy
EDA	20:2 n-6	kwas eikozadienowy	kwas (11Z,14Z)-eikozadienowy
n-6 DPA	22:5 n-6	kwas dokozapentaenowy n-6	kwas (4Z,7Z,10Z,13Z,16Z)-dokozapentaenowy
AdA	22:4 n-6	kwas adrenowy	kwas (7Z,10Z,13Z,16Z)-dokozaatetraenowy

Tabela 1.2 Stosowane skróty nazw oksylipin

Skrót	Synonim (ang. IUPAC name)
12-HETE	kwask 12-hydroksyarachidonowy, (\pm)12-HETE (ang. (5Z,8Z,10E,12S,14Z)-12-hydroxy-5,8,10,14-icosatetraenoic acid)
12-HHT	12-HHTrE, 12(S)-HHT (ang. (5Z,8E,10E,12S)-12-hydroxy-5,8,10-heptadecatrienoic acid)
13-HODE	kwask 13-hydroksyoktadienowy, (\pm)13-HODE (ang. (9E,11E)-13-hydroxy-9,11-octadecadienoic acid)
15d-PGJ2	15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandyna J2 (ang. (5Z,12E,14E)-11-oxoprostano-5,9,12,14-tetraen-1-oic acid)
15-HETE	kwask 15-hydroksyarachidonowy, (\pm)15-HETE (ang. (5Z,8Z,11Z,13E)-15-hydroxy-5,8,11,13-icosatetraenoic acid)
15-HETrE	15(S)-HETrE (ang. (8Z,11Z,13E,15S)-15-hydroxy-8,11,13-icosatrienoic acid)
18-HEPE	kwask 18-hydroksyeikozapentaenowy, (\pm)18-HEPE (ang. (5Z,8Z,11Z,14Z,16E)-18-hydroxy-5,8,11,14,16-icosapentaenoic acid)
2,3-dinor-8-izo-PGF2α	2,3-dinor-iPF _{2α} -III, 2,3-dinor-8-izo-prostaglandyna F _{2α} (ang. (3Z)-5-((1S,2R,3R,5S)-3,5-dihydroxy-2-[(1E,3R)-3-hydroxy-1-octen-1-yl]cyclopentyl)-3-pentenoic acid)
20-HETE	kwask 20-hydroksyarachidonowy, 20-HETE (ang. (5Z,8Z,11Z,14Z)-20-hydroxy-5,8,11,14-icosatetraenoic acid)
5-HETE	kwask 5-hydroksyarachidonowy, (\pm)5-HETE (ang. (6E,8Z,11Z,14Z)-5-hydroxy-6,8,11,14-icosatetraenoic acid)
7S-Mar1	7S-marezyzna 1, 7-epi-Mar1 (ang. (4Z,7S,8E,10E,12Z,14S,16Z,19Z)-7,14-dihydroxy-4,8,10,12,16,19-docosahexaenoic acid)
8-epi-PGF2α	8-epi-prostaglandyna F _{2α} , 8-izo-PGF _{2α} (ang. (5Z,8 β ,9 α ,11 α ,13E,15S)-9,11,15-trihydroxyprosta-5,13-dien-1-oic acid)
9(10)-EpOME	leukotoksyna, (\pm)9(10)-EpOME (ang. 8-{3-[(2Z)-2-octen-1-yl]-2-oxiranyl}octanoic acid)
9-HODE	kwask 9-hydroksyoktadienowy, (\pm)9-HODE (ang. (10E,12Z)-9-hydroxy-10,12-octadecadienoic acid)
LTB4	leukotrien B ₄ (ang. (5S,6Z,8E,10E,12R,14Z)-5,12-dihydroxy-6,8,10,14-icosatetraenoic acid)
LXA4	5(S),6(R)-lipoksyna A ₄ , 5(S),6(R),15(S)-TriHETE (ang. (5S,6R,7E,9E,11Z,13E,15S)-5,6,15-trihydroxy-7,9,11,13-icosatetraenoic acid)
LXB4	5(S),14(R)-lipoksyna B ₄ (ang. (5S,6E,8Z,10E,12E,14R,15S)-5,14,15-trihydroxy-6,8,10,12-icosatetraenoic acid)
Mar1	marezyzna 1, 7R-Mar1 (ang. (4Z,7R,8E,10E,12Z,14S,16Z,19Z)-7,14-dihydroxy-4,8,10,12,16,19-docosahexaenoic acid)
Mar2	marezyzna 2, 13R,14S-diHDHA (ang. (4Z,7Z,9E,11E,13R,14S,16Z,19Z)-13,14-dihydroxy-4,7,9,11,16,19-docosahexaenoic acid)
PDX	protektyna DX, 10(S),17(S)-DiHDoHE, 10(S),17(S)-DiHDHA (ang. (4Z,7Z,10S,11E,13Z,15E,17S,19Z)-10,17-dihydroxy-4,7,11,13,15,19-docosahexaenoic acid)
PGD2	prostaglandyna D ₂ (ang. (5Z,9 α ,13E,15S)-9,15-dihydroxy-11-oxoprostano-5,13-dien-1-oic acid)
PGD3	prostaglandyna D ₃ (ang. 9 α ,15S-dihydroxy-11-oxo-prosta-5Z,13E,17Z-trien-1-oic acid)
PGE2	prostaglandyna E ₂ (ang. (5Z,9 α ,13E,15S,17Z)-9,15-dihydroxy-11-oxoprostano-5,13,17-trien-1-oic acid)
PGF2α	prostaglandyna F _{2α} (ang. (5Z,8 β ,9 θ ,11 θ ,12 α ,13E,15S)-9,11,15-trihydroxyprosta-5,13-dien-1-oic acid)
RvD1	rezolwina D ₁ (ang. (4Z,7S,8R,9E,11E,13Z,15E,17S,19Z)-7,8,17-trihydroxy-4,9,11,13,15,19-docosahexaenoic acid)

Tabela 1.2 (c.d.) Stosowane skróty nazw oksylipin

Skrót	Synonim (ang. IUPAC name)
RvD2	rezolwina D ₂ (ang. (4Z,7S,8E,10Z,12E,14E,16R,17S,19Z)-7,16,17-trihydroxy-4,8,10,12,14,19-docosahexaenoic acid)
RvE1	rezolwina E ₁ (ang. (5S,6Z,8E,10E,12R,14Z,16E,18R)-5,12,18-trihydroxy-6,8,10,14,16-icosapentaenoic acid)
TXB2	tromboksan B ₂ (ang. (5Z,9E,13E,15S)-9,11,15-trihydroxythromboxa-5,13-dien-1-oic acid)
Deuterowane wzorce wewnętrzne oksylipin	
12-HETE-d8	12(S)-HETE-d ₈ (ang. (5Z,8Z,10E,12S,14Z)-12-hydroxy-5,8,10,14-icosatetraenoic-5,6,8,9,11,12,14,15-d ₈ acid)
14(15)-DiHET-d11	(±)14(15)-DiHET-d ₁₁ (ang.(5Z,8Z,11Z)-14,15-dihydroxy-5,8,11-icosatrienoic-16,16,17,17,18,18,19,19,20,20,20-d ₁₁ acid)
5-HETE-d8	5(S)-HETE-d ₈ (ang. (6Z,8Z,11Z,14Z)-5S-hydroxy-6,8,11,14-icosatetraenoic-5,6,8,9,11,12,14,15-d ₈ acid)
8-izo-PGF2α-d4	8-izo-prostaglandyna F _{2α} -d ₄ (ang. (5Z,8E,9α,11α,13E,15S)-9,11,15-trihydroxyprosta-5,13-dien-1-oic-3,3,4,4-d ₄ acid)
9-HODE-d4	9(S)-HODE-d ₄ (ang. (10E,12Z)-9S-hydroxy-10,12-octadecadienoic-9,10,12,13-d ₄ acid)
LTB4-d4	leukotrien B ₄ -d ₄ (ang. (5S,6Z,8E,10E,12R,14Z)-5,12-dihydroxy-6,8,10,14-icosatetraenoic-6,7,14,15-d ₄ acid)
RvE1-d4	rezolwina E ₁ -d ₄ (ang. (5S,6Z,8E,10E,12R,14Z,16E,18R)-5,12,18-trihydroxy-6,8,10,14,16-icosapentaenoic-6,7,14,15-d ₄ acid)

IUPAC - Międzynarodowa Unia Chemii Czystej i Stosowanej (ang. *International Union of Pure and Applied Chemistry*)

2 WPROWADZENIE

2.1 OTYŁOŚĆ – PROBLEM XXI WIEKU

2.1.1 KLASYFIKACJA OTYŁOŚCI

Światowa Organizacja Zdrowia (**WHO**, ang. *World Health Organization*) definiuje otyłość jako stan, w którym wskaźnik masy ciała (**BMI**, ang. *body mass index*) przekracza 30 kg/m^2 [1]. BMI, stosunek masy ciała do wzrostu, jest najczęściej stosowanym wskaźnikiem oceny masy ciała w badaniach epidemiologicznych [2]. Warto jednak zaznaczyć, że nie uwzględnia on typu budowy ciała, czyli np. zawartości masy mięśniowej lub tkanki tłuszczowej, wobec czego nie zawsze jest dokładnym odzwierciedleniem stanu zdrowia osoby [1]. Funkcjonują także inne wskaźniki, takie jak stosunek obwodu talii do obwodu bioder (**WHR**, ang. *waist-to-hip ratio*) lub obwód talii (**WC**, ang. *waist circumference*), pozwalające na określenie występującego typu otyłości: pośladkowo-udowego (gynoidalnego) bądź brzuszego (centralnego) [2]. Przy otyłości dziecięcej wykorzystywane są dodatkowo siatki centylowe dla wzrostu i masy ciała [1,3]. Niemniej, większość światowych organizacji zajmujących się zdrowiem klasyfikuje otyłość u dorosłych zgodnie z definicją WHO [4,5].

Tabela 2.1 Klasyfikacja masy ciała dorosłych osób według wskaźnika BMI

Klasyfikacja	BMI [kg/m^2]	Masa ciała [kg]*	Ryzyko wystąpienia chorób współistniejących
niedowaga	< 18,5	≤ 56	niskie
waga prawidłowa	18,5 - 24,9	57 - 76	umiarkowane
nadwaga	25,0 - 29,9	77 - 91	średnie
I stopień otyłości	30,0 - 34,9	92 - 107	podwyższone
II stopień otyłości	35,0 - 39,9	108 - 122	wysokie
III stopień otyłości	≥ 40	≥ 123	ekstremalnie wysokie

* Masa ciała dla osoby o wzroście 175 cm. Na podstawie raportu WHO [6].

Wyróżniane są także podkategorie otyłości (**Tabela 2.1**), wprowadzone w celu odzwierciedlenia niejednorodnego charakteru populacji osób z otyłością. W zależności od stopnia otyłości pacjenci narażeni są bowiem w różnym stopniu na powikłania zdrowotne, a ich leczenie prezentuje różny poziom wyzwania dla systemu opieki zdrowotnej. Najbardziej ekstremalne przypadki otyłości, gdy wskaźnik BMI przekracza 45 kg/m^2 , co odpowiada w przybliżeniu 45 kg nadwagi, kategoryzowane są jako tzw. „super otyłość” (ang. *super*

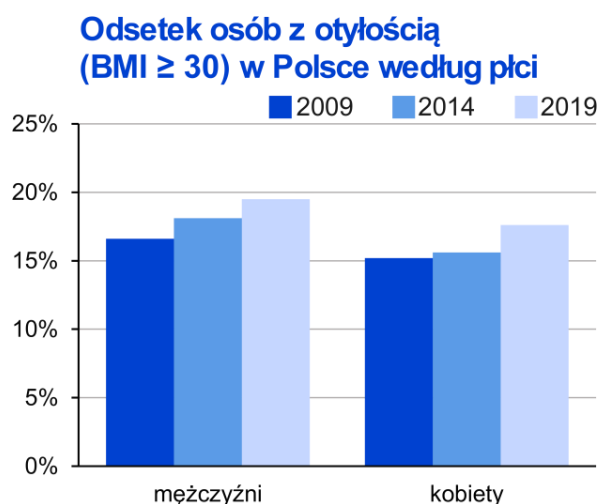
obesity), natomiast, gdy wskaźnik BMI przekracza 40 kg/m² lub przekracza 35 kg/m² i występują choroby współistniejące z otyłością, mówi się o otyłości olbrzymiej (**MO**, ang. *morbid obesity*) [7].

2.1.2 EPIDEMIA OTYŁOŚCI W POLSCE I NA ŚWIECIE

Najnowsze oszacowania WHO za 2016 r. przewidywały, że prawie 40% dorosłych światowej populacji będzie miało nadwagę, a liczba osób otyłych szacowana była na 650 mln (13% dorosłych), niemal trzykrotnie więcej niż w połowie lat 70-tych [1].

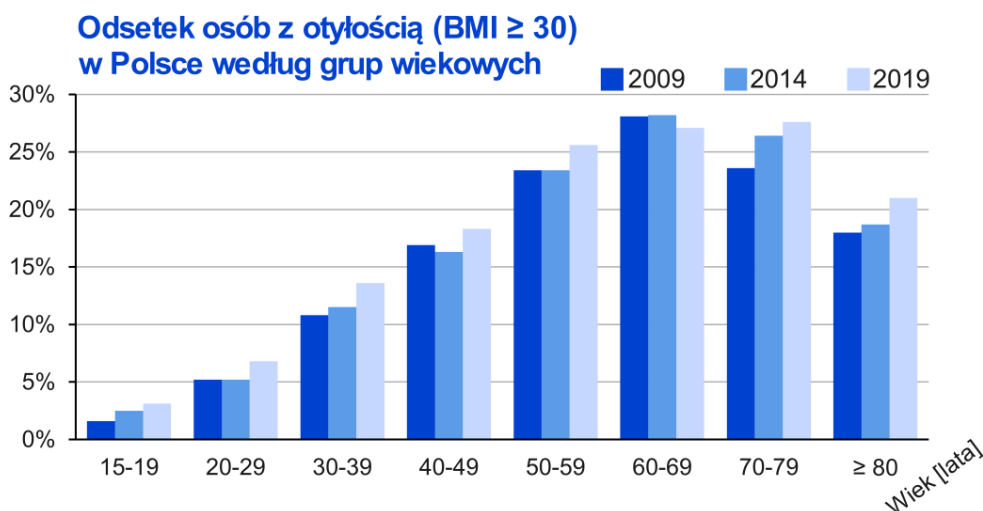
Opublikowane w 2019 r. wyniki badania globalnego obciążenia chorobami (**GBD**, ang. *Global Burden of Disease*) 87 czynników ryzyka w ponad 200 krajach jednoznacznie wykazały, że nadwaga i otyłość stanowią obecnie jeden z najpoważniejszych, rosnących problemów zdrowotnych [8]. Do oceny stanu zdrowia społeczeństwa stosuje się wskaźnik utraconej długości życia skorygowanej o niepełnosprawność (**DALY**, ang. *disability adjusted life years*), który jest sumą liczby utraconych lat życia (**YLL**, ang. *years of life lost*) z powodu przedwczesnej śmierci oraz liczby lat przeżytych z niepełnosprawnością (**YLD**, ang. *years of life with disability*). Wysoki wskaźnik BMI (> 25 kg/m²) w 2019 r. był na piątym miejscu czynników ryzyka odpowiadających za utratę zdrowia (6,3% całkowitych DALY) we wszystkich grupach wiekowych, co stanowi alarmujący wzrost w porównaniu z 1990 r., kiedy wysoki wskaźnik BMI był na 16 miejscu (2,6% całkowitych DALY) [8]. Jest to również jeden z trzech czynników, obok podwyższonego stężenia glukozy we krwi na czczo oraz zanieczyszczenia powietrza cząstkami stałymi, których ryzyko narażenia rośnie o ponad 1% z roku na rok [8]. W kontekście umieralności BMI powyżej 25 kg/m² było jednym z głównych czynników ryzyka zarówno u kobiet (5 miejsce) jak i u mężczyzn (6 miejsce). Raport WHO podkreślił ponadto, że 65% światowej populacji żyje obecnie w krajach, gdzie otyłość i nadwaga odpowiadają za większy odsetek zgonów na świecie niż niedożywienie [9]. Warto podkreślić, że otyłość, niedożywienie oraz globalne ocieplenie, które będzie się przyczyniało do pogłębiania negatywnych skutków zdrowotnych, zostały wskazane przez komisję powołaną przez The Lancet jako najpoważniejsze czynniki ryzyka dla zdrowia i przetrwania ludzkości [10]. Nadając im miano globalnej „syndemii”, czyli epidemii działających w sposób synergistyczny, współwystępujących w czasie i miejscu, i oddziaływujących na siebie wzajemnie, komisja The Lancet zwróciła szczególną uwagę na te trzy zjawiska w kontekście socjoekonomicznym i podkreśliła problem niewystarczających lub nieskutecznych rozwiązań systemowych [10].

Najnowszych danych na temat rozpowszechnienia problemu nadmiernej masy ciała w Polsce dostarczają wyniki telefonicznego badania ankietowego prowadzonego przez Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny (NIZP-PZH). Na podstawie danych zebranych od losowej próby 2 tys. osób powyżej 20 lat, oszacowano rozpowszechnienie otyłości na 10% (12% wśród mężczyzn i 8% wśród kobiet) [11]. W raporcie NIZP-PZH, na podstawie danych GBD dla Polski, wysoka masa ciała ($BMI \geq 25 \text{ kg/m}^2$) odpowiada za 14% zgonów (13% mężczyzn, 15% kobiet) [11]. Pogłębiający się problem zbyt wysokiej masy ciała w społeczeństwie polskim ilustrują również dane uzyskane podczas Europejskiego Ankietowego Badania Zdrowia (EHIS, ang. *European Health Interview Survey*). W latach 2009-2019 odsetek osób z otyłością wzrósł zarówno wśród kobiet jak i mężczyzn (**Rysunek 2.1**), oraz w prawie wszystkich grupach wiekowych (**Rysunek 2.2**).



Rysunek 2.1 Odsetek osób z otyłością w Polsce według płci

Na podstawie danych zebranych w trakcie EHIS udostępnianych przez GUS [5,12].



Rysunek 2.2 Odsetek osób z otyłością w Polsce według grup wiekowych

Na podstawie danych zebranych w trakcie EHIS udostępnianych przez GUS [5,12].

W przyjętym na lata 2016-2020 Narodowym Programie Zdrowia (Dz. U. z 2016 r. poz. 1492 [13]) istotnym celem była poprawa sposobu i stanu odżywienia oraz aktywności fizycznej społeczeństwa. Brak widocznego zahamowania przyrostu liczby osób z otyłością świadczy o skali i kompleksowości problemu jakim jest otyłość na poziomie rozwiązań systemowych. Opierając się o prognozy światowej sieci ekspertów NCD Risk Factor Collaboration, Narodowy Fundusz Zdrowia prognozuje, że w 2025 r. w Polsce na otyłość cierpiało będzie 6 – 12 mln dorosłych, a problem ten dotyczył będzie ponad 30% mężczyzn i prawie 26% kobiet [14]. Alarmująca jest również rosnąca skala problemu otyłości wśród dzieci i młodzieży. Instytut Żywności i Żywienia podaje, że polskie dzieci od kilku lat zaliczane są do najszybciej tyjących w Europie, a według analizy przeprowadzonej przez Najwyższą Izbę Kontroli, działania w zakresie profilaktyki i leczenia są obecnie niewystarczające [15].

2.1.3 PRZYCZYNY OTYŁOŚCI

Na poziomie osobniczym rozwinięcie nadwagi, a później otyłości może być spowodowane wieloma przyczynami, których przykłady zebrane zostały w **Tabeli 2.2**. Warto pamiętać, że otyłość może być wywołana czynnikami genetycznymi mono- i poligenowymi, zmianami hormonalnymi wywołanymi endokrynopatiami, uszkodzeniem ośrodków w mózgu odpowiedzialnych za kontrolę apetytu lub może pojawić się w efekcie przyjmowania leków sprzyjających przyrostowi masy ciała [16]. Spowodowana przez wymienione czynniki otyłość określana jest mianem otyłości wtórnej [16,17]. Jednakże, przeważająca część przypadków otyłości przyczyniających się do globalnej epidemii, to otyłość pierwotna, u której podstaw leży długotrwałe, nadmierne spożycie kalorii w stosunku do wydatków energetycznych [17,18].

Tabela 2.2 Przykładowe czynniki powodujące wystąpienie otyłości

Czynniki genetyczne i epigenetyczne	Czynniki endokrynologiczne	Zaburzenia czynności podwzgórza
zespół Pradera-Williego*	menopauza	guz okolicy podwzgórza
zespół Bardeta-Biedla*	hipogonadyzm	radioterapia
mutacje MC4R, POMC**	POCS	uszkodzenie podwzgórza
delecja 16p11.2*	Zespół Cushinga	
Skutki uboczne leków	Zaburzenia psychiczne	Styl życia
leki antydepresyjne	zespół z napadami objadania się	nadmierne spożycie kalorii
leki neuroleptyczne	bulimia	niska aktywność fizyczna
kortykosteroidy, β-blokery	depresja	nadużywanie alkoholu

MC4R - receptor melanokortyny 4, **POCS** - zespół policystycznych jajników, **POMC** - proopiomelanokortyna. * czynniki warunkujące otyłość monogenowo, ** otyłość wchodząca w skład zespołu genetycznego. Na podstawie van der Valk i wsp. [16].

Okazuje się, że nawet niewielki nadmiar konsumowanej energii ponad optymalny bilans energetyczny, może spowodować z biegiem czasu znaczący przyrost masy ciała. W modelu stworzonym przez Halla i wsp. [19] wzrost spożywanej energii o jedynie 30 kJ (7,17 kcal) dziennie był wystarczający, aby wyjaśnić wzrastanie masy ciała populacji Stanów Zjednoczonych obserwowane od 1975 r. Kluczowymi czynnikami, które wpływają na bilans energetyczny są jakość i ilość spożywanych pokarmów oraz poziom aktywności fizycznej. Natomiast rozmiary efektów, jakie wywołują dieta i aktywność są z kolei modulowane poprzez czynniki osobnicze (genetyczne predyspozycje, zmiany epigenetyczne, działanie mikrobioty jelitowej) oraz środowiskowe (dostępność i cena zdrowej żywności, nawyki wykształcone w domu rodzinnym, ekspozycja na reklamy niezdrowych produktów etc.) [18,20]. Zmiany w stylu życia społeczeństwa w ostatnich dekadach, szczególnie w krajach rozwiniętych, przyczyniły się do powstania środowiska sprzyjającego otyłości. Ważną rolę odegrały tutaj przemiany technologiczne, przez które coraz powszechniejszy stał się siedzący tryb życia w pracy, w dojazdach do pracy i w czasie wolnym [19,20]. Najistotniejszym czynnikiem jest jednak duża dostępność wysokokalorycznej diety. We wspomnianym modelu Hall i wsp. wskazują, że przeciętny Amerykanin spożywał w 2005 r. około 200 kcal dziennie więcej niż w latach 70-tych. [19]. Za wzrost ten odpowiada m.in. powszechniejszy dostęp do jedzenia typu „*fast food*” i powiększenie porcji posiłków [21], a także ilość spożywanych napojów słodzonych cukrem [14,18].

Dieta bogata w tłuszcze i cukry, a uboga w błonnik, owoce i warzywa, zawierająca duże ilości wysoko przetworzonych produktów, to tak zwana dieta zachodnia (ang. *Western diet*), wywierająca bardzo negatywny wpływ na zdrowie człowieka [22,23]. Prowadzone w latach 2013-2014 II Wieloośrodkowe Ogólnopolskie Badanie Stanu Zdrowia Ludności (**WOBASZ II**) umożliwiło ocenę jakości diety w Polsce. Jego wyniki wskazują jednoznacznie na nieprawidłowości w diecie Polaków w porównaniu do norm żywienia opracowanych przez NIZP-PZH [24]. Spożycie energii z tłuszczów przekraczało referencyjny poziom 20-35% dla dorosłych wśród mężczyzn (37,5%) i kobiet (35,1%), wysoki był też odsetek energii pochodzącej z nasyconych kwasów tłuszczowych (odpowiednio 14% i 13%), natomiast zbyt niskie spożycie dotyczyło między innymi błonnika i niektórych mikroelementów [11].

2.1.4 KONSEKWENCJE OTYŁOŚCI

Stale rosnąca liczba osób cierpiących na otyłość stanowi poważne obciążenie dla systemu ochrony zdrowia z powodu występowania licznych chorób współistniejących, wymagających dodatkowych interwencji zdrowotnych i pogarszających jakość życia pacjentów. Już w 2009 r. WHO alarmowało, że 44% globalnego obciążenia cukrzycą, 23% obciążania niedokrwienną chorobą serca i 7-41% obciążenia niektórymi nowotworami, głównie raka piersi, prostaty i jelita grubego, ma związek z otyłością i nadwagą [9]. Przeprowadzane w ostatnich latach meta-analizy wskazują na podwyższone ryzyko wystąpienia wielu dodatkowych schorzeń wśród osób cierpiących na otyłość [25–28]. Wśród chorób współistniejących w otyłości najpowszechniejszą jest cukrzyca typu II (**T2DM**, ang. *type II diabetes mellitus*) [26]. Klasycznym powikłaniem otyłości jest zaburzenie gospodarki lipidowej – dyslipidemia, czyli nieprawidłowe stężenie lipidów i lipoprotein we krwi. W surowicy pacjentów z otyłością występuje zazwyczaj hipercholesterolemia, podwyższony poziom triacylogliceroli (**TAG**, ang. *triacylglycerols*), wolnych kwasów tłuszczowych (**FFA**, ang. *free fatty acids*) i apolipoproteiny B, obniżone jest natomiast stężenie tzw. „dobrego cholesterolu”, czyli cholesterolu frakcji lipoprotein o wysokiej gęstości (**HDL-C**, ang. *high density lipoprotein cholesterol*) [29]. Wywołana otyłością insulinooporność, w kombinacji z dyslipidemią, początkują „kaskadę etiologiczną” szeregu dolegliwości, jak nadciśnienie, zmiany miażdżycowe, które kumulują się w zespół metaboliczny [30].

Warto również zwrócić uwagę na fakt, że otyłość zwiększa ryzyko występowania (**Tabela 2.3**) lub jest związana z większą agresywnością nowotworów z powodu działania w podścielisku komórek nowotworowych czynników uwalnianych przez nadmiar tkanki tłuszczowej [31]. W Polsce wysoki jest odsetek nowotworów złośliwych, w których otyłość jest ważnym czynnikiem ryzyka. Wśród kobiet rak piersi, jelita grubego, jajnika i endometrium składają się na niemal połowę zachorowań, natomiast rak jelita grubego i prostaty to 36% zachorowań wśród mężczyzn w 2017 r. [11]. Przy ogólnym trendzie zwiększonej zachorowalności na nowotwory [11] wyraźny staje się problem otyłości w kontekście wyzwań systemu opieki zdrowia. Niepokojące są także wyniki badań nad związkiem otyłości i ryzykiem wystąpienia zaburzeń poznawczych oraz otępienia, szczególnie przy starzejącej się światowej populacji [28,32].

Tabela 2.3 Ryzyko względne wystąpienia choroby współistniejącej wśród osób z otyłością

Choroba/schorzenie	Mężczyźni	Kobiety	Źródło
Cukrzyca typu II	6,47 (5,55-4,97)	12,41 (9,03-17,06)	[26]
Zespół metaboliczny	3,70 (2,96-4,44)*		[25]
Nowotwory			
piersi	-	1,13 (1,05-1,22)	[26]
jelita grubego	1,95 (1,59-2,39)	1,66 (1,52-1,81)	[26]
endometrium	-	3,22 (2,91-3,56)	[26]
przełyku	1,21 (0,97-1,52)	1,2 (0,95-1,53)	[26]
nerek	1,82 (1,61-2,05)	2,64 (2,39-2,90)	[26]
jajników	-	1,28 (1,20-1,36)	[26]
trzustki	2,29 (1,65-3,19)	1,60 (1,17-2,20)	[26]
prostaty	1,05 (0,85-1,30)	-	[26]
Choroby układu krążenia			
nadciśnienie	1,84 (1,51-2,24)	2,42 (1,59-3,67)	[26]
choroba niedokrwienna serca	1,72 (1,51-1,96)	3,10 (2,81-3,43)	[26]
niewydolność serca	1,79 (1,24-2,59)	1,78 (1,07-2,95)	[26]
zatorowość płucna	3,51 (2,61-4,73)	3,51 (2,61-4,73)	[26]
zawał	1,51 (1,33-1,72)	1,49 (1,27-1,74)	[26]
Inne			
astma	1,43 (1,14-1,79)	1,78 (1,36-2,32)	[26]
zespół bezdechu sennego	12,11 (4,35-19,85)**		[27]
choroby pęcherzyka żółciowego	1,43 (1,04-1,96)	2,32 (1,17-4,57)	[26]
choroba zwyrodnieniowa stawów	4,20 (2,76-6,41)	1,96 (1,88-2,04)	[26]
zespoły bólowe kręgosłupa	2,81 (2,27-3,48)	2,81 (2,27-3,48)	[26]
demencja	1,31 (1,02-1,68)***		[28]

Wartości, jeśli nie wskazano inaczej to wskaźnik ryzyka względnego RR (95% przedział ufności) zapadalności. RR > 1 oznacza, że prawdopodobieństwo zachorowania osoby z otyłością jest wyższe niż w grupie kontrolnej. * RR chorobowości wśród dzieci (95% przedział ufności); ** różnica średnich zapadalności (95% przedział ufności), *** RR dla wysokiego BMI w średnim wieku (95% przedział ufności). Opracowanie własne na podstawie źródeł [25-28].

2.1.5 PODSTAWY PATOFIZJOLOGII OTYŁOŚCI

2.1.5.1 TKANKA TŁUSZCZOWA

U podstaw otyłości leży nadmierny przyrost tkanki tłuszczowej wywołany zachwianym bilansem energetycznym. Tkanka tłuszczowa jest luźną tkanką łączną stanowiącą, w zależności od budowy osobniczej, 5-60% masy ciała [33], przy czym kobiety mają średnio 10% więcej tkanki tłuszczowej niż mężczyźni [34]. W zależności od umiejscowienia wyróżniane są dwa główne skupiska tkanki tłuszczowej. Podskórna tkanka tłuszczowa (**SAT**, ang. *subcutaneous adipose tissue*), zlokalizowana głównie w okolicy udowo-pośladkowej i na ścianie jamy

brzuszej, gromadzi około 80% całkowitej tkanki tłuszczowej organizmu [35]. Tkanka tłuszczowa akumulująca się wokół narządów w jamie brzusznej oraz w klatce piersiowej nazywana jest natomiast trzewną/otrzewnową tkanką tłuszczową (**VAT**, ang. *visceral adipose tissue*) [34].

Najważniejszym składnikiem tkanki tłuszczowej są komórki tłuszczowe – adipocyty, których główną rolą jest magazynowanie i synteza tłuszczów prostych. Wyróżniane są dwa główne rodzaje adipocytów różniące się morfologicznie, budujące dwa typy tkanki tłuszczowej różniące się funkcją. Adipocyty białe, budują białą tkankę tłuszczową (**WAT**, ang. *white adipose tissue*) i zawierają jedną, dużą kroplę lipidową, stanowiącą 60-85% masy komórki [33]. Przeważająca większość tłuszczu jest w nich magazynowana w postaci TAG (90-99%), a na pozostałą część składają się mono- i diacyloglicerole (odpowiednio **MAG**, ang. *monoacylglycerols* i **DAG**, ang. *diacylglycerols*), cholesterol oraz fosfolipidy (**PHL**, ang. *phospholipids*) [34]. W adipocytach brunatnej tkanki tłuszczowej (**BAT**, ang. *brown adipose tissue*) lipidy gromadzone są w wielu pęcherzykach, a zamiast produkcji ATP, oddychanie komórkowe prowadzi w tych komórkach do uwalniania energii w postaci ciepła [36]. Skupiska BAT u dorosłych występują w mocno ukrwionych okolicach - przy tętnicach szyjnych, podobojczykowych, w dole pachowym, pomiędzy łopatkami i w śródpiersiu, a także w okolicy nadnerczy i wzdłuż rdzenia kręgowego, a jej ilość zanika z wiekiem [34]. Badania nad otyłością skupiają się głównie na roli WAT [33,37]. Warto jednak nadmienić, że plastyczność tkanki tłuszczowej, odkrycie wysepek brunatnych adipocytów w WAT oraz zaobserwowanie, że pacjenci z otyłością i cukrzycą charakteryzują się mniejszą ilością BAT, przyczynił się do wzrostu zainteresowania BAT w otyłości szczególnie w kontekście wykorzystania termogenicznego potencjału BAT do stymulacji zmniejszania masy ciała [36].

Poza adipocytami w skład tkanki tłuszczowej wchodzi komórki nabłonka, budujące ściany naczyń krwionośnych, które przerastają tkankę tłuszczową i fibroblasty, zapewniające wsparcie strukturalne [38]. Adipocyty różnicują się z perycytów - mezenchymatycznych komórek macierzystych posiadających potencjał do różnicowania w mioblasty, osteoblasty, chondrocyty i adipocyty. Perycyty, które utraciły zdolność różnicowania w pozostałe typy komórek nazywane są preadipocytami [38]. Ponadto, w skład tkanki tłuszczowej wchodzi komórki układu odpornościowego (mastocyty, makrofagi, limfocyty T). Liczebność, fenotyp i rozmieszczenie w tkance tłuszczowej poszczególnych komórek zależy od rodzaju tkanki tłuszczowej oraz od nasilenia otyłości [39]. Przykładowo, biopsje osób z otyłością wykazały,

że liczebność makrofagów w VAT jest dwa razy wyższa niż w SAT [40]. Z kolei u ludzi o prawidłowej masie ciała makrofagi charakteryzują się alternatywnym fenotypem M2 i wydzielają przeciwzapalne interleukiny (**IL**, ang. *interleukin*) IL-4, IL-10 and IL-13 [33].

Wraz z odkryciem leptyny, hormonu wydzielanego przez tkankę tłuszczową, regulującego poczucie sytości, nastąpiła zmiana paradygmatu w sposobie postrzegania tkanki tłuszczowej [40]. Historycznie uważana była ona za nieaktywny metabolicznie rezerwuar energii, jednak odkrycia kolejnych wydzielanych przez adipocyty aktywnych biologicznie substancji m.in. adiponektyny, rezystyny, wisfatyny, omentyny czy klasycznych cytokin (np. czynnik martwicy nowotworów α , **TNF- α** , ang. *tumour necrosis factor*) lub interleukin, łącznie określanych mianem adipokin lub adipocytokin, sprawiły, że obecnie tkanka tłuszczowa traktowana jest jako aktywny metabolicznie organ [30,31,33,39,41]. Szczególnie dotyczy to VAT, który rozmieszczony jest w bezpośrednim pobliżu narządów wewnętrznych. Syntezowane w tkance tłuszczowej substancje działają w sposób auto-, para- i endokryny, wpływając na szereg procesów w całym organizmie poprzez regulację zapalenia, wrażliwości na insulinę, hemostazy, ciśnienia tętniczego czy angiogenezy [41].

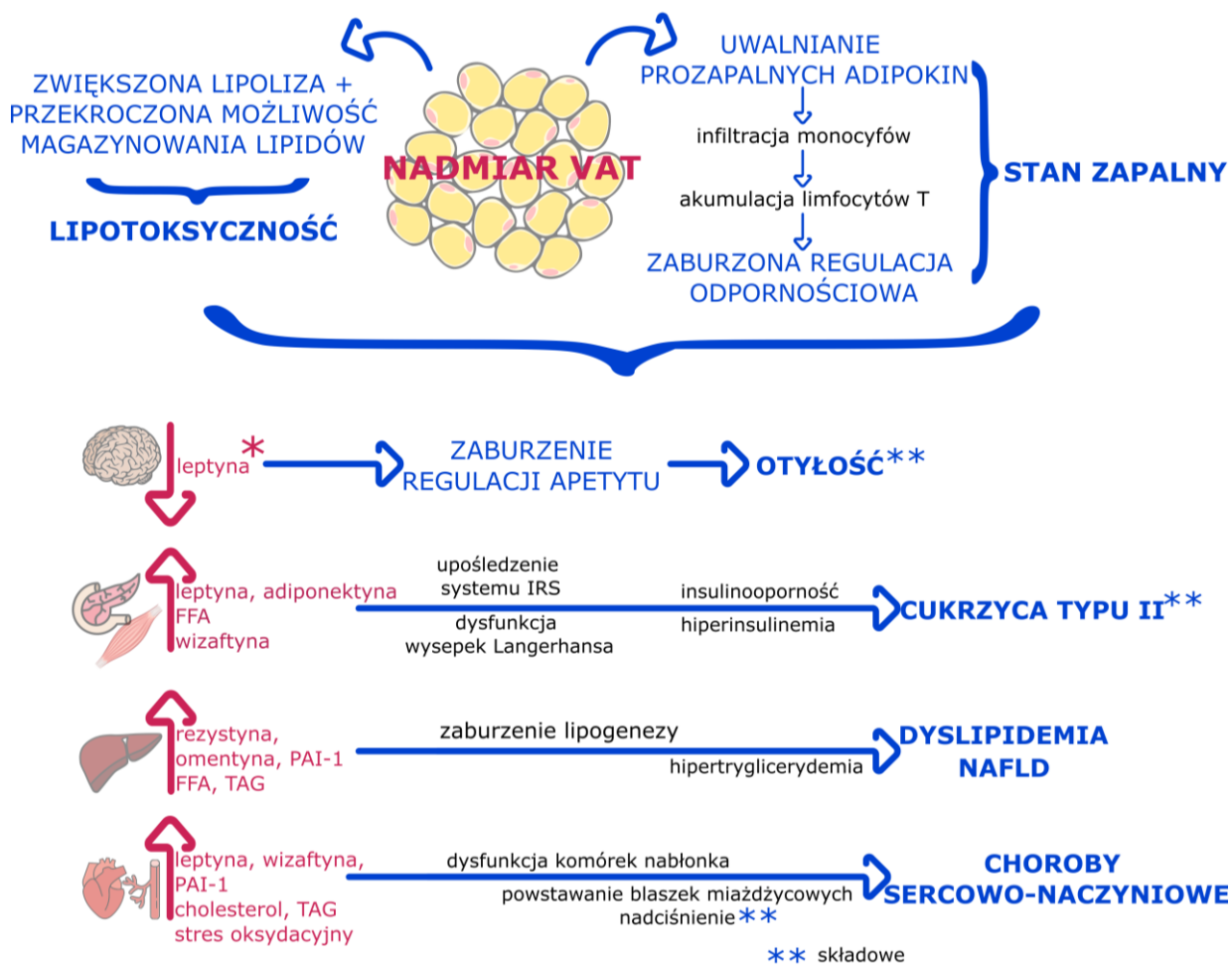
Wydzielnicza aktywność tkanki tłuszczowej i wpływ jaki adipokiny wywierają na sąsiadujące organy, stała się obiektem zainteresowania w badaniach nad otyłością i towarzyszącymi jej powikłaniami metabolicznymi [31,36,39,40]. Badania te skupiają się głównie na WAT, której metabolizm i funkcje wydzielnicze są do tej pory lepiej scharakteryzowane niż BAT [33]. Dodatkowo lokalizacja ma istotne znaczenie, gdyż obserwuje się różnice w aktywności wydzielniczej pomiędzy SAT i VAT [39].

2.1.5.2 ZMIANY W TKANCE TŁUSZCZOWEJ ZWIĄZANE Z OTYŁOŚCIĄ

U osób z prawidłową masą ciała tkanka tłuszczowa skutecznie magazynuje FA pod postacią TAG, chroniąc organizm przed lipotoksycznymi efektami wywoływanymi przez nadmierne stężenia FFA we krwi. Nadmierny rozrost tkanki tłuszczowej w otyłości prowadzi natomiast do przekroczenia możliwości magazynowania FA. Prowadzi to do uwalniania FA z tkanki tłuszczowej i ektopowego gromadzenia nadmiaru FA w innych tkankach i narządach. Hipertroficzny rozrost VAT, czyli zwiększenie rozmiaru adipocytów, prowadzi do zmniejszenia ich potencjału do absorpcji FFA, a także do zmniejszenia wrażliwości na insulinę i intensywniejszej lipolizy [35]. FFA przyczyniają się do powstawania stresu oksydacyjnego, powodując uszkodzenia nie tylko lokalnie, ale również w retikulum endoplazmatycznym i mitochondriach innych organów. Lipotoksyczne działanie FA powoduje

poważne zmiany w funkcjonowaniu komórek w sercu przyczyniając się m.in. do rozwoju chorób sercowo-naczyniowych (**CVD**, ang. *cardiovascular disease*) [26,42]. Zwiększona ilość lipidów we krwi działa również negatywnie na tkanki obwodowe, przyczyniając się do rozwoju wrażliwości na insulinę oraz na zaburzenia stymulowanego przez glukozę wydzielania insuliny z trzustki, czego efektem jest T2DM [43]. Nadmierna akumulacja FFA w wątrobie przyczynia się z kolei do rozwoju niealkoholowej stłuszczeniowej choroby wątroby (**NAFLD**, ang. *nonalcoholic fatty liver disease*) [44]. Charakterystyczną cechą otyłości jest również zwiększona lipoliza w tkance tłuszczowej, powodująca napływ FFA do wątroby oraz zaburzenia aktywności i poziomu ekspresji lipazy lipoproteinowej (**LPL**, ang. *lipoprotein lipase*), w efekcie czego upośledzona jest eliminacja TAG z surowicy, co skutkuje hiperglicydemią [29]. Osoby z otyłością charakteryzują się także podwyższonymi poziomami innych lipidów we krwi np. sfingomieliny (**SM**, ang. *sphingomyelin*), lizofosfatydylocholine (**LysoPC**, ang. *lysophosphatidylcholine*), ceramidów (**Cer**, ang. *ceramides*) lub DAG, które mogą wywoływać lipotoksyczne efekty [45].

Istotną rolę w patogenezie zaburzeń metabolicznych związanych z otyłością odgrywiają procesy zapalne. W hipertroficznej tkance tłuszczowej następuje naciek komórek odpornościowych i polaryzacja makrofagów do formy zaktywowanej M1, które produkują szereg prozapalnych substancji - TNF- α , IL-6, IL-1 β and IL-12, mediatory lipidowe (eikozanoidy, prostanoidy) czy endokannabinoidy [33]. Infiltracja komórek układu immunologicznego wywołuje w tkance tłuszczowej przewlekły stan zapalny, wpływając na poziom wydzielanych prozapalnych adipokin, co skutkuje zmianami metabolicznymi, które z biegiem czasu obejmują coraz więcej narządów [41]. Skutki związanego z otyłością wydzielania przez przerośniętą tkankę tłuszczową lipotoksycznych i prozapalnych substancji podsumowane zostały na **Rysunku 2.3**.



Rysunek 2.3 Wpływ nadmiaru tkanki tłuszczowej na ogólnoustrojowe zmiany metaboliczne i ich konsekwencje zdrowotne

Na czerwono - przykładowe czynniki produkowane przez otrzewnową tkankę tłuszczową - **VAT** oddziałujące para- i endokrynnie na mózg, trzustkę, mięśnie szkieletowe, wątrobę, serce i naczynia krwionośne. * W mózgu, pomimo podwyższonego poziomu we krwi, hamujące apetyt działanie leptyny jest mniej efektywne z powodu upośledzonego przekraczania bariery krew-mózg oraz indukowania leptynooporności. **IRS** - substrat receptora insuliny, **FFA** - wolne kwasy tłuszczowe, **IRS** - substrat receptora insuliny, **NAFLD** - niealkoholowa stłuszczeniowa choroba wątroby, **PAI-1** - inhibitor aktywatora plazminogenu 1, **TAG** - triacyloglicerole. Opracowano na podstawie źródeł [30,41].

2.1.6 METODY LECZENIA OTYŁOŚCI

W 2013 r. Amerykańskie Towarzystwo Medyczne (**AMA**, ang. *American Medical Association*), motywowane postępującym kryzysem otyłości na świecie, przyjęło rezolucję, w której uznano otyłość za chorobę [46]. AMA, a za nią kolejne stowarzyszenia i organizacje zajmujące się zdrowiem publicznym, uzasadniły tę decyzję między innymi koniecznością zmiany sposobu postrzegania otyłości jako chronicznego schorzenia, które należy leczyć, a nie tylko problemu kosmetycznego; zarówno w świadomości pacjentów jak i lekarzy [47].

Leczenie otyłości jest skomplikowanym wyzwaniem klinicznym. Zarówno rozwój otyłości jak i sukces jej leczenia jest zależny od wielu czynników osobniczych i środowiskowych [16,48]. Należy również nadmienić, że leczenie otyłości stanowi metodę prewencji i leczenia chorób współistniejących z otyłością, co umożliwia wydłużenie i poprawienie jakości życia pacjenta. Przykładowo, bariatryczne leczenie otyłości prowadzi do remisji T2DM [49]. Wśród stosowanych interwencji znajdują się:

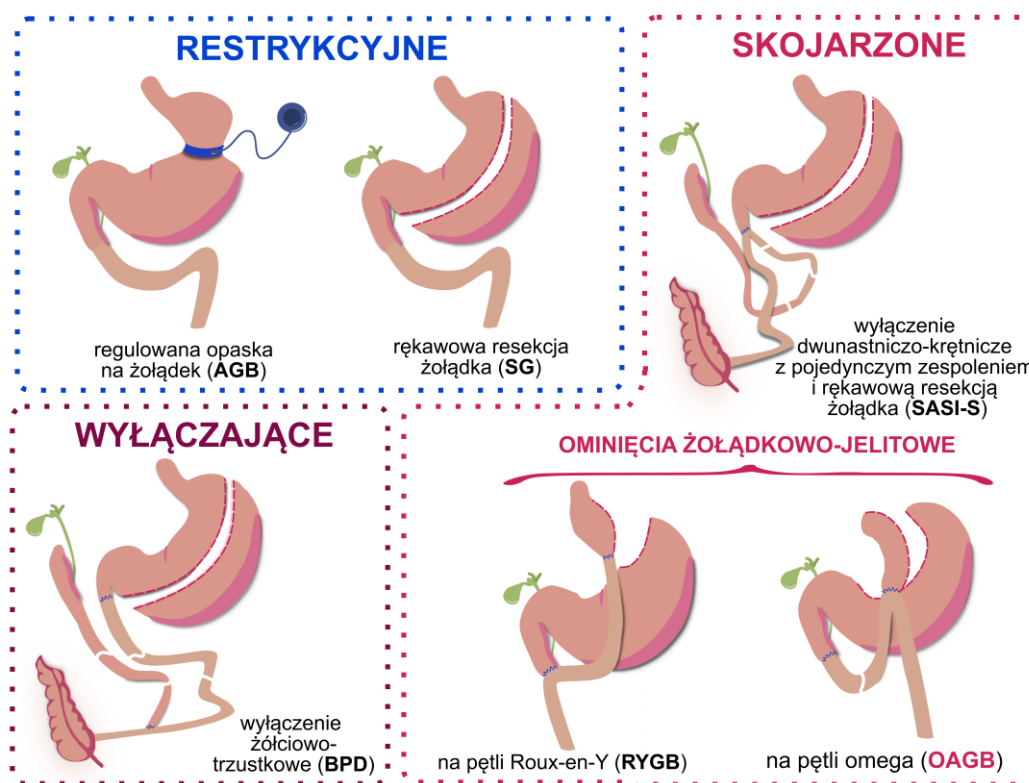
- ➔ zmiana stylu życia poprzez kombinację:
 - ➔ leczenia dietetycznego (restrykcja tłuszczu, restrykcja węglowodanów lub obu),
 - ➔ leczenia aktywnością fizyczną,
 - ➔ terapii behawioralnej;
- ➔ leczenie farmakologiczne wspomagające (np. orlistat, liraglutyd, chlorowodorek naltreksonu z chlorowodorkiem bupropionu),
- ➔ chirurgia bariatryczna (wskazana przy otyłości olbrzymiej) [47,50].

Analizy programów modyfikacji stylu życia wśród pacjentów z otyłością II i III stopnia wskazują, że umożliwiają one utratę wagi (średnio ~10 kg mniej) w tej grupie pacjentów, szczególnie, gdy postępowanie terapeutyczne zawiera komponent aktywności fizycznej [7,51]. Jednakże osiągnięcie znaczących, długotrwałych rezultatów tylko poprzez zmiany stylu życia jest trudne, wymaga dużego stopnia samodyscypliny. Niestety, problemem wielu planów treningowych i dietetycznych jest niski stopień przestrzegania zaleceń [48].

Porównanie planów modyfikacji stylu życia z interwencją chirurgiczną jednoznacznie wskazuje na lepszą skuteczność chirurgii bariatrycznej w leczeniu otyłości. Zabiegi bariatryczne przyczyniają się do średnio o 40% większego ubytku nadmierowej masy ciała (**EWL**, ang. *excess weight loss*) niż metody zachowawcze ($p < 0.00001$) oraz poprawy wielu parametrów związanych z homeostazą glukozy, dyslipidemią i ryzykiem sercowo-naczyniowym [52].

Wykonywane w ramach chirurgicznego leczenia otyłości operacje można podzielić na trzy grupy, co zaprezentowane zostało na **Rysunku 2.4**. Zabiegi restrykcyjne, do których należy najczęściej przeprowadzana w Polsce laparoskopowa resekcja żołądka (**LSG**, ang. *laparoscopic sleeve gastrectomy*) [53], polegają na zmniejszeniu objętości żołądka, czego konsekwencją jest ograniczenie ilości spożywanych pokarmów. Celem zabiegów wyłączeniowych (malabsorpcyjnych) jest ograniczenie wchłaniania składników odżywczych, poprzez ominięcie części jelita cienkiego, natomiast techniki skojarzone łączą w sobie obie

strategie. Operacje bariatryczne wiążą się w trwałą ingerencję w anatomie przewodu pokarmowego, co niesie ze sobą ryzyko potencjalnych komplikacji. Monitorowanie mikro- i makroskładników odżywczych jest szczególnie istotne w przypadku zabiegów wyłączeniowych, gdzie pacjenci narażeni są na niedobory białka, żelaza, niektórych witamin oraz kwasu foliowego [54].



Rysunek 2.4 Typy operacji bariatrycznych z przykładami

Skróty **AGB** - regulowana opaska żołądkowa (ang. *adjustable gastric band*), **BPD** - wyłączenie żółciowo trzustkowe (ang. *biliopancreatic diversion*), **OAGB** - ominięcie żołądkowo jelitowe na pętli omega (ang. *one anastomosis gastric bypass*), **RYGB** - ominięcie żołądkowo jelitowe na pętli Roux-en-Y (ang. *Roux-en-Y gastric bypass*), **SASI-S** - wyłączenie dwunastniczo-krętnicze z pojedynczym zespoleniem i rękawową resekcją żołądka (ang. *single anastomosis stomach-ileal bypass with sleeve gastrectomy*), **SG** - rękawowa resekcja żołądka (ang. *sleeve gastrectomy*). **Na zielono** - woreczek żółciowy. Opracowano na podstawie źródeł [53,54].

2.1.6.1 LAPAROSKOPOWA OPERACJA PĘTLOWEGO WYŁĄCZENIA ŻOŁĄDKOWO-JELITOWEGO NA PĘTLI OMEGA

Zabieg laparoskopowej operacji pętlowego wyłączenia żołądkowo jelitowego na pętli omega (**OAGB**, ang. *one anastomosis gastric bypass*), znany wcześniej pod nazwą **OLGB** (ang. *omega loop gastric bypass*) jest stosunkowo nowym typem operacji bariatrycznej. Niemniej, dane za rok 2016 podają, że około 10% zabiegów chirurgicznego leczenia otyłości wykonuje się w Polsce tą metodą [53]. OAGB jest modyfikacją opisaną na początku

XXI wieku metody *mini-gastric bypass* (**MGB**). W porównaniu z podstawową metodą, OAGB cechuje się mniejszą częstością występowania refluksu zawartości dwunastniczej – powikłania obserwowanego stosunkowo często przy MGB [55]. OAGB polega na zmniejszeniu żołądka i zespoleniu go z jelitem czczym, czego efektem jest wyłączenie większości żołądka, dwunastnicy i około 150 cm fragmentu jelita cienkiego [49,55]. W porównaniu do LSG oraz ominięcia żołądkowo-jelitowego na pętli Roux-en-Y (**RYGB**, ang. *Roux-en-Y gastric bypass*), który jest drugim najczęstszym zabiegiem w Polsce [53], OAGB jest zabiegiem łatwiejszym do przeprowadzenia, o mniejszej ilości komplikacji [49]. Długoterminowa obserwacja pacjentów z otyłością wykazała, że nawet 12 lat po OAGB, EWL wynosi aż 70% [55]. Skutkiem zabiegu OAGB jest również remisja T2DM u około 90% pacjentów, poprawa wyników lipidogramu i zmniejszenie ryzyka sercowo-naczyniowego [49]. Jednakże z uwagi na fakt, że OAGB jest relatywnie nową operacją, wciąż istnieje potrzeba badania jej efektywności, skutków metabolicznych i potencjalnych powikłań [49].

2.2 LIPIDOMIKA W BADANIACH NAD OTYŁOŚCIĄ

2.2.1 PODSTAWOWE INFORMACJE O LIPIDACH

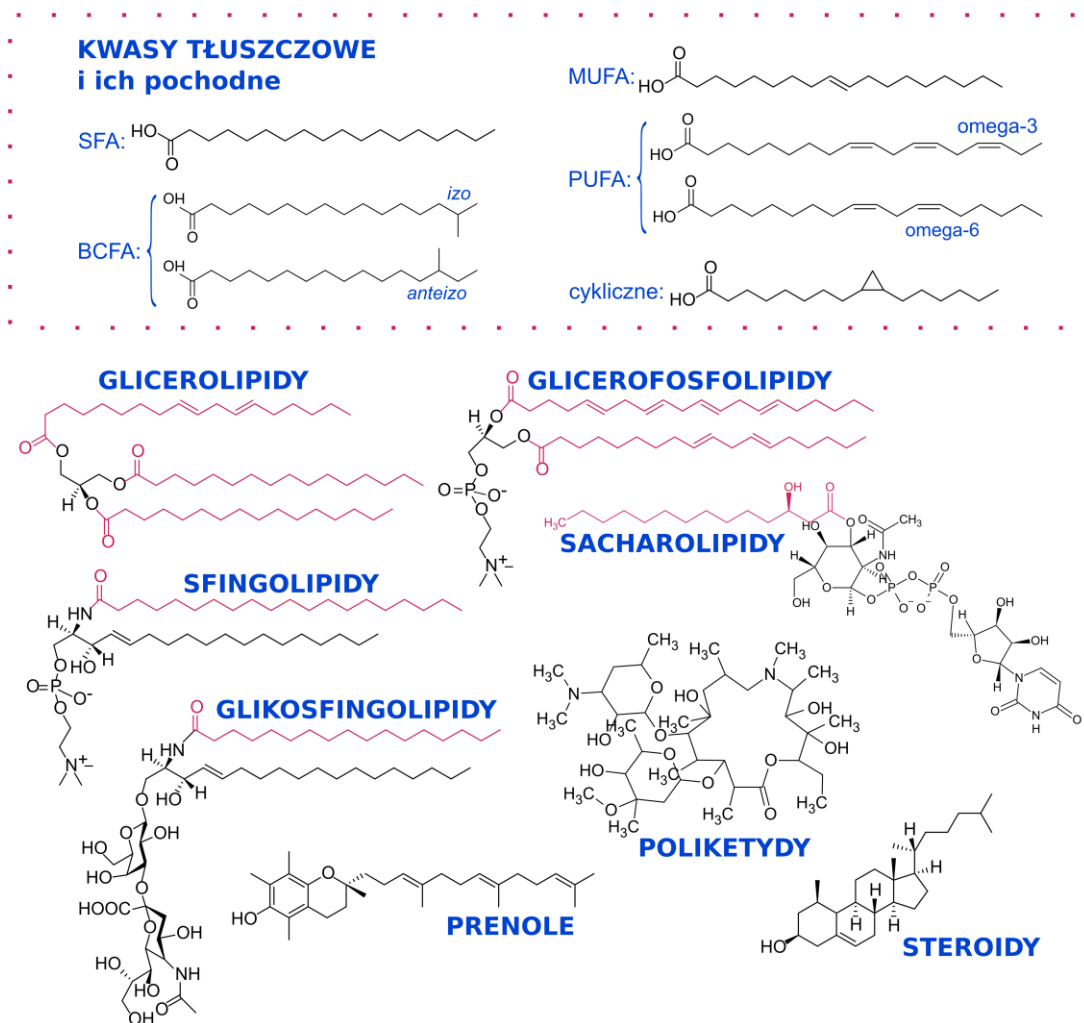
Nowoczesne metody analityczne oraz postępy technologiczne, które ułatwiają analizę dużej ilości danych eksperymentalnych sprawiły, że możliwe jest podejmowanie skomplikowanych, wieloaspektowych problemów badawczych. Zwiększenie możliwości badawczych przyczyniło się do rozwoju tzw. „biologii systemowej”, której celem jest kompleksowe badanie i integracja informacji uzyskanych na temat genotypu i fenotypu komórek, tkanek, a w końcu - organizmów. Uzyskiwany jest w ten sposób holistyczny obraz procesów zachodzących w systemach biologicznych, co w kontekście badań medycznych pozwala na lepsze zrozumienie procesów patologicznych leżących u podstaw chorób, wyznaczanie nowych ścieżek diagnostycznych i podejścia terapeutycznego. Podejście biologii systemów to połączenie danych uzyskanych w badaniach „omicznych” – genomicznych, transkryptomicznych, proteomicznych i metabolomicznych. Udoskonalenie technik analitycznych, szczególnie technik łączonych z detekcją spektrometryczną, w ostatnich dekadach pozwoliło na wyodrębnienie z metabolomiki nowej, szybko rozwijającej się kategorii badań – lipidomiki, skupiającej się na jakościowej i ilościowej analizie lipidów [56,57].

Lipidy, w najprostszej definicji, to hydrofobowe bądź amfifilowe związki rozpuszczalne w rozpuszczalnikach organicznych tj. w chloroformie, eterach, alkoholach etc.

Jest to wysoce różnorodna grupa związków, której szacowana liczba struktur przekracza 1,5 miliona [58], z czego ocenia się, że naturalnie występuje około 200 tysięcy unikalnych związków lipidowych [57]. Wychodząc naprzeciw rosnącemu zainteresowaniu badaniami lipidomicznymi, LIPID MAPS oraz Międzynarodowy Komitet Klasyfikacji i Nazewnictwa Lipidów (**ILCNC**, *ang. International Lipid Classification and Nomenclature Committee*), stworzył system klasyfikacji lipidowej pozwalający na usystematyzowanie danych lipidomicznych [59]. W klasyfikacji LIPID MAPS lipidy zdefiniowano jako związki hydrofobowe lub amfifilowe, które powstają w wyniku kondensacji podjednostek ketoacylowych lub izoprenowych, przykładowe struktury zaprezentowano na **Rysunku 2.5**.

Klasyfikacja LIPID MAPS wyróżnia osiem kategorii lipidów [59]:

- 1.** Kwasy tłuszczowe (**FA**, *ang. fatty acid*) i ich pochodne, które obejmują m.in. produkty ich utleniania – okta-, eikoza- i dokozanoidy, nazywane oksylipinami.
- 2.** Glicerolipidy, w których łańcuchy acylowe FA są związane z resztą cukrową glicerolu, obejmujące TAG, DAG i MAG.
- 3.** Glicerofosfolipidy, czyli glicerolipidy z jedną z grup hydroksylowych glicerolu zestryfikowanych kwasem fosforowym z przyłączoną grupą polarną m.in.:
 - ◆ fosfatydylocholiny (**PC**, *ang. phosphatidylcholine*),
 - ◆ fosfatydyloseryny (**PS**, *ang. phosphatidylserine*),
 - ◆ fosfatydyloetanolaminy (**PE**, *ang. phosphatidylethanolamine*),
 - ◆ fosfatydyloinozytolu (**PI** *ang. phosphatidylinositol*).
- 4.** Sfingolipidy (**SPL**, *ang. sphingolipids*), ze szkieletem zawierającym długołańcuchową zasadę sfingoidową, np. SM, Cer.
- 5.** Sacharolipidy, w których FA są związane bezpośrednio ze szkieletem cukrowym.
- 6.** Steroidy, czyli lipidy zawierające w swojej strukturze wielopierścieniowy szkielet steranu, przykładowo cholesterol i jego pochodne.
- 7.** Prenole, czyli produkty kondensacji podjednostek izoprenoidowych.
- 8.** Poliketydy, zróżnicowana kategoria metabolitów wtórnych głównie roślin, grzybów i bakterii, będących produktami enzymatycznej polimeryzacji.



Rysunek 2.5 Przykładowe struktury przedstawicieli głównych kategorii lipidowych według klasyfikacji LIPID MAPS

W ramce przykładowe struktury grup kwasów tłuszczowych: **BCFA** - rozgałęzionych, **MUFA** - jednonienasyconych, **PUFA** - wielonienasyconych, **SFA** - nasyconych.

Na czerwono zaznaczono grupy acylowe w lipidach prostych i złożonych. Rysunek własny.

Dodatkowym podziałem lipidów, który może zostać zastosowany jest wyróżnienie grup lipidów prostych i złożonych [59]. Lipidy proste w wyniku hydrolizy rozpadają się na dwa główne typy produktów, przykładem mogą być tutaj MAG, w których hydrolizie powstanie cząsteczka glicerolu oraz niezestryfikowany FA. Hydroliza lipidów złożonych powoduje powstanie więcej niż dwóch różnych typów produktów, jak w przypadku PC, której produktami całkowitej hydrolizy są FA, glicerol, kwas ortofosforowy oraz cholina. Wspólną cechą większości kategorii lipidowych jest obecność alifatycznych łańcuchów FA. Długość łańcucha acylowego, obecność i położenie wiązań wielokrotnych lub rozgałęzień w łańcuchu acylowym ma kluczowy wpływ na właściwości hydrofobowe FA, a co za tym idzie, na funkcjonalne właściwości lipidów zawierających łańcuchy FA w swojej budowie [45,60,61].

W kolejnej sekcji pracy krótko opisane zostały funkcje lipidów, które posiadają w swojej budowie podjednostki FA. Lipidy należące do steroli, prenoli i poliketydów nie były przedmiotem rozważań niniejszej pracy.

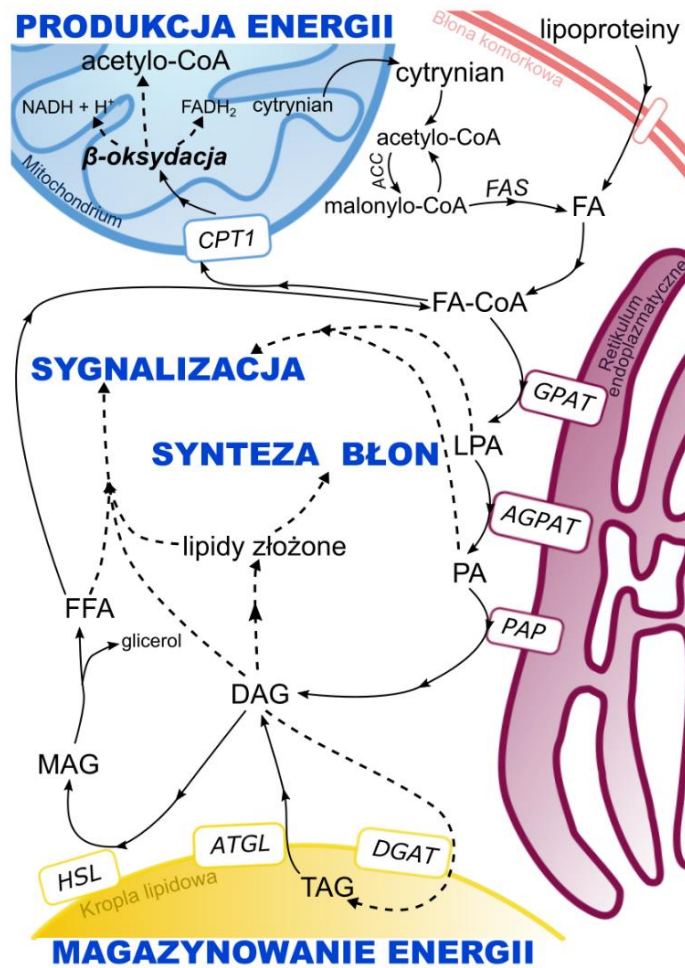
2.2.1.1 BIOLOGICZNE FUNKCJE LIPIDÓW

Glicerolipidy, szczególnie w postaci TAG są głównym rezerwuarem energii w organizmie. Po spożyciu posiłku zawierającego tłuszcze, główne ich składniki, czyli TAG, cholesterole i PHL, są pakowane w chylomikrony i trafiają do krwioobiegu, a następnie do tkanek i narządów. W wątrobie z dostarczonych lipidów, a także z endogennych lipidów, zachodzi synteza bogatych w TAG lipoprotein bardzo niskiej gęstości (**VLDL**, ang. *very low density lipoprotein*) [29,62,63]. Chylomikrony i VLDL są transportowane do różnych tkanek, np. tkanki tłuszczowej, serca i mięśni szkieletowych, gdzie ulegają procesowi lipolizy, którego wydajność zależna jest od poziomu insuliny [44]. Uwolnione FA mogą zostać reestryfikowane w TAG i być przechowywane np. w kroplach lipidowych tkanki tłuszczowej lub zostać wykorzystywane do produkcji energii (ATP) w tkankach o dużym zapotrzebowaniu energetycznym lub zostać spożytkowane w produkcji ciepła w BAT [62,63]. Lipoliza VLDL prowadzi zmniejszenia zawartości TAG i powstania frakcji lipoproteiny niskiej gęstości (**LDL**, ang. *low density lipoprotein*), wychwytywanej później z krwi przez wątrobę i inne tkanki. W wątrobie zachodzi również recykling HDL, których zadaniem jest transport cholesterolu i jego estrów z tkanek obwodowych [29,62,63]. Glicerolipidy pełnią również rolę cząsteczek sygnałowych. Przykładowo DAG jest zaangażowany w regulację egzocytozy i uczestniczy w aktywacji rodziny kinaz białkowych C regulujących wiele kaskad sygnałowych w organizmie; metabolizm DAG jest też ściśle związany z regulacją czynników indukowanych hipoksją (**HIFs**, ang. *hypoxia-inducible factors*) [62,63].

Amfifilowe właściwości glicerofosfolipidów, zwanych również PHL, wynikające z obecności w ich budowie hydrofobowych długołańcuchowych FA i hydrofilowej głowy, powodują, że w środowisku wodnym aglomerują się w dwuwarstwy lipidowe, które następnie tworzą błony komórek i organelli. Reszta fosforanowa w PHL jest modyfikowana poprzez przyłączenie grupy polarnej (m.in. cholina, seryna, etanoloamina, inozytol), której rodzaj wpływa na ich funkcjonalne właściwości [59]. Stosuje się również przedrostek „lizo-”, np. lizofosfatydylocholina (LysoPC lub LPC) do określenia PHL, w których jeden z łańcuchów acylowych został zhydrolizowany. Podobne do PHL właściwości amfifilowe wykazują również SPL i sacharolipidy. Budowa tychże lipidów ma zatem fundamentalne znaczenie w modulacji

właściwości błon komórkowych, z jednej strony poprzez rodzaj polarnego ugrupowania, a z drugiej poprzez długość i stopień nasycenia łańcucha FA [64–66]. Stopień nasycenia łańcuchów FA wpływa również na organizację tratw lipidowych, rejonów błony bogatych w cholesterol i SPL, co jest kluczowe dla szeregu procesów zależnych od tych mikrodomen jak np. aktywacja limfocytów T, transport błonowy, transdukcja sygnałów, procesy migracji i adhezji komórek [66]. Warto również zwrócić uwagę na szczególną rolę jaką lipidy budujące błony komórkowe pełnią w funkcjonowaniu mózgu. Mózg jest, poza tkanką tłuszczową, organem najbardziej bogatym w lipidy [67], gdzie znaczna ich część tworzy otoczki mielinowe i odgrywa istotną rolę w przekaźnictwie synaptycznym oraz wzroście i różnicowaniu neuronów [68]. Zarówno sfingo- jak i glicerofosfolipidy pełnią również rolę cząsteczek sygnałowych, gdzie rodzaj podstawionej reszty FA również ma ogromny wpływ na ich funkcje. Przykładowo, Cer wykazują właściwości pro- lub antyapoptotyczne w zależności od długości łańcucha alifatycznego [69].

Główne funkcje jakie pełnią lipidy i centralna rola FA w procesach zależnych od metabolizmu lipidów na poziomie komórkowym zostały podsumowana na **Rysunku 2.6**. Wpływ budowy FA na właściwości wielu typów lipidów jest niewątpliwy, następane podrozdziały zostały poświęcone krótkiej charakterystyce typów FA występujących w organizmie, których struktury uwzględnione zostały na **Rysunku 2.5**.



Rysunek 2.6 Podstawy metabolizmu lipidów i ich rola w komórce

Kwasy tłuszczowe (**FA**) dostarczane z lipoprotein oraz endogennie syntezowane przez syntazę kwasów tłuszczowych (**FAS**) są aktywowane poprzez dołączenie koenzymu A (**CoA**). Syntezę rozpoczyna wytworzenie jednostek acetylo-CoA z transportowanego z mitochondriów cytrynianu i karboksylację do malonylo-CoA przez karboksylazę acetylo-CoA (**ACC**). FA-CoA mogą być transportowane do mitochondriów przez palmitoilo-transferazę karnitynową 1 (**CPT1**), gdzie w β -oksydacji powstają z nich substraty energetyczne: zredukowane dinukleotydy flawinoade-ninowy (**FADH₂**), nikotynoamido-adeninowy (**NADH**) oraz acetylo-CoA używane w cyklu Krebsa. FA-CoA są też estryfikowane do glicerolipidów: mono-, di-, triacylogliceroli (**MAG**, **DAG**, **TAG**). Proces katalizują błonowe acylo-transferazy glicerolo-3-fosforanowa (**GPAT**), 1-acylo-3-fosfoglicerolu (**AGPAT**) i diacyloglicerolu (**DGAT**) oraz fosfataza kwasu fosfatydowego (**PAP**). Produkty pośrednie tego procesu, kwas lizofosfatydowy (**LPA**) i fosfatydowy (**PA**) są cząstkami sygnałowymi. Hydroliza glicero-lipidów zachodzi poprzez działanie lipaz: hormonowrażliwej (**HSL**), triacylogliceroli (**ATGL**), lub monoacylogliceroli. Modyfikacja DAG prowadzi do syntezy lipidów złożonych budujących błony oraz uczestniczących w sygnalizacji wewnątrz- oraz pozakomórkowej.

Zmodyfikowano na podstawie źródła [61].

2.2.2 KWASY TŁUSZCZOWE

FA są monokarboksyłowymi kwasami organicznymi o ogólnym wzorze R-COOH, w którym R oznacza łańcuch węglowodorowy o różnej długości i stopniu nasycenia, zwykle alifatyczny, chociaż możliwe jest również występowanie pierścieni [59,70]. Zamiast systematycznych lub zwyczajowych nazw, w literaturze stosowany jest często zapis informujący o budowie danej cząsteczki FA. Przykładowo kwas arachidonowy (**ARA**, ang. *arachidonic acid*) można zapisać jako 20:4 n-6, gdzie 20 oznacza liczbę atomów węgla w cząsteczce, 4 oznacza liczbę wiązań podwójnych, natomiast n-6 wskazuje pozycję pierwszego wiązania podwójnego, licząc od metylowego końca cząsteczki [71]. FA można podzielić ze względu na długość łańcucha alifatycznego. Krótkołańcuchowe FA (do 6 atomów węgla) są głównie produktami syntezy przez mikroflorę jelitową; natomiast źródłem w organizmie średniołańcuchowych FA (o 6 do 12 atomów węgla) są głównie TAG z mleka i nabiału [72]. Większość lipidów w organizmach zwierząt stanowią długołańcuchowe FA (od powyżej 12 do 20 atomów węgla), najczęściej o 16 i 18 węglowych łańcuchach [62]. Można również wyróżnić grupę bardzo długołańcuchowych FA (**VLCFA**, ang. *very long chain fatty acids*) o powyżej 22 atomach węgla [73]. Drugi powszechny podział FA uwzględnia ilość wiązań podwójnych w cząsteczce. Wyróżnia się FA nasycone (**SFA**, ang. *saturated fatty acid*), monoenowe, jednonienasycone FA (**MUFA**, ang. *monounsaturated fatty acids*) i wielonienasycone FA (**PUFA**, ang. *polyunsaturated fatty acids*). W organizmach wyższych wiązania nienasycone PUFA są zazwyczaj oddzielone grupą metylenową i wyróżnia się PUFA serii n-6 (nazywane również omega-6) i serii n-3 (omega-3), w zależności od położenia pierwszego, od metylowego końca łańcucha, wiązania podwójnego. Do rzadziej spotykanych FA można zaliczyć te z ugrupowaniami cyklicznymi – pierścieniami cyklopropanu lub cykloheksanu. Pierwotnie zidentyfikowane i scharakteryzowane zostały one w organizmach niższych, okazuje się jednak, że można je wykryć również w tkankach ludzkich [60,74].

Najczęściej stosowanym podejściem w analityce FA jest oznaczanie ich lotnych pochodnych FA za pomocą chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (**GC-MS**, ang. *gas chromatography-mass spectrometry*) [56,57,75]. Wykorzystanie techniki GC-MS wiąże się z kilkoma niedogodnościami tj. koniecznością metylacji bądź silylowania FA, aby zwiększyć ich lotność oraz koniecznością hydrolizy złożonych lipidów [56]. Mimo to, w analityce FA, GC-MS ma przewagę nad innymi technikami wykorzystywanymi w lipidomice, w szczególności nad spektrometrią mas sprzężoną z chromatografią cieczą (LC-MS, ang. *liquid chromatography-mass spectrometry*), ponieważ może dostarczyć bardziej

szczególonych informacji na temat budowy FA [75]. Ponadto, w badaniach opartych na metodach LC-MS, dużą trudność stanowi prawidłowa identyfikacja łańcuchów acylowych [76].

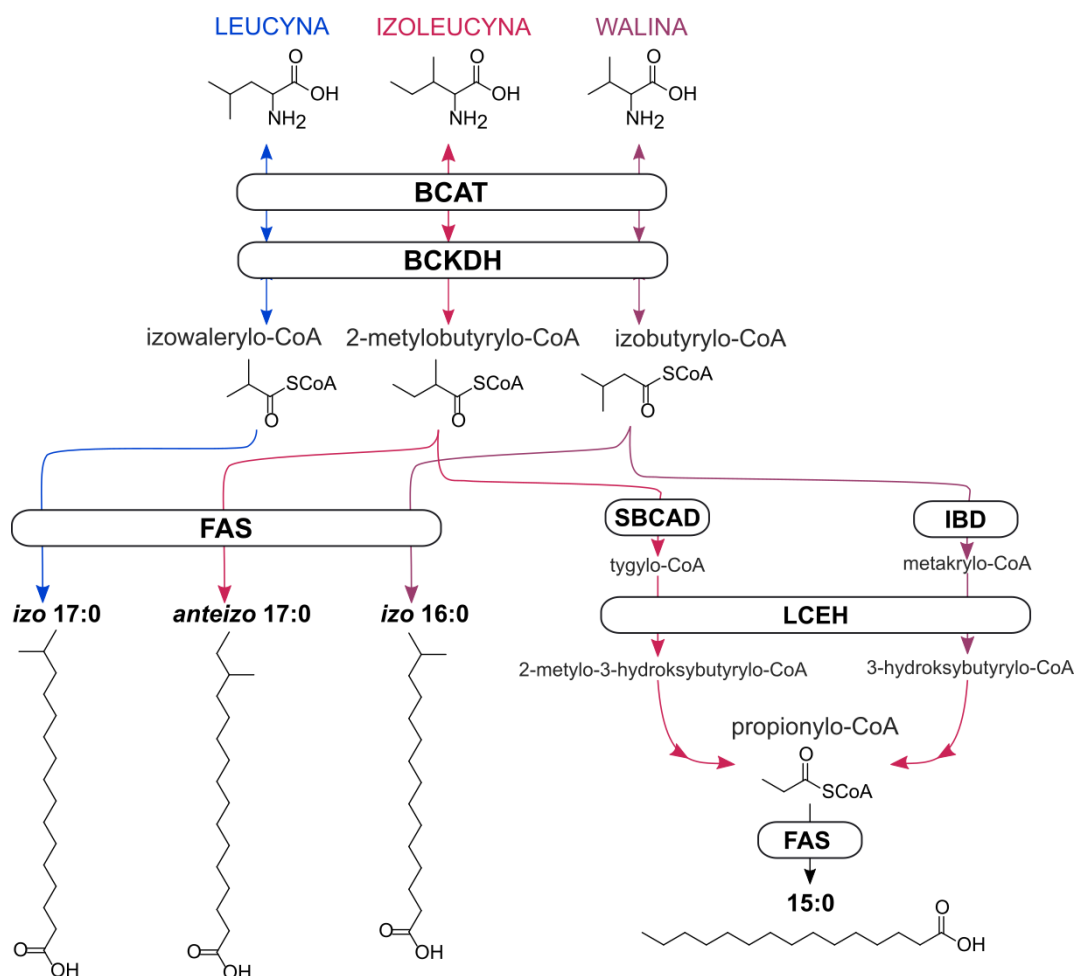
2.2.2.1 NASYCONE KWASY TŁUSZCZOWE

Większość FA budujących lipidy błonowe oraz magazynowanych w TAG w tkankach zwierzęcych jest nasycona, sam kwas palmitynowy 16:0 stanowi 20-30% całkowitych FA tych grup lipidów [77]. Źródłem SFA w organizmie jest zarówno dieta, jak i endogenna produkcja SFA. Dieta zachodnia charakteryzuje się najwyższą procentową zawartością SFA, których źródłem są tłuszcze zwierzęce głównie tłuste mięso, sery, mleko, masło czy margaryna [22,23] oraz oleje roślinne: kokosowy, palmowy [71]. Wysoka zawartość SFA w diecie od dawna była łączona z negatywnymi skutkami zdrowotnymi [23,24,71,78,79]. SFA indukują insulinooporność w komórkach mięśni szkieletowych i mają udział w indukowaniu zaburzeń funkcji mitochondriów [79]. Przyczyniają się one do podwyższenia stężenia frakcji LDL-C, przez co wykazują potencjał aterogeny i są związane z podwyższonym ryzykiem CVD [80]. Negatywne działanie SFA związane jest przede wszystkim ze skutkami ich obecności w błonowych PHL. Brak wiązań podwójnych powoduje usztywnianie dwuwarstwy fosfolipidowej, a dodatkowo, duża zawartość SFA w błonie promuje inkorporację cholesterolu, co dodatkowo ogranicza jej płynność, powodując zmniejszenie przepuszczalności błon i wpływając na procesy sygnalizacji zachodzące z jej udziałem [77]. Aczkolwiek sugeruje się, że ważniejszym czynnikiem niż zawartość SFA w diecie jest stosunek SFA do PUFA [77]. Okazuje się, że wpływ SFA na zdrowie zależy także od długości ich łańcucha węglowego. Spożywanie kwasu laurynowego 12:0 w najwyższym stopniu podwyższa poziom cholesterolu całkowitego i LDL-C w surowicy w porównaniu z kwasami o dłuższych łańcuchach [80]. Badania epidemiologiczne wykazują również, że spożywanie 16:0 lub 18:0 w różny sposób wpływa na ryzyko zachorowania na CVD [81]. Zwiększone spożycie kwasu 16:0 powoduje podwyższenie stężenia TAG i proapoptycznych Cer, co wpływa na zwiększenie ryzyka CVD, z kolei większe spożycie 18:0 koreluje odwrotnie z ryzykiem CVD [81,82]. Senyilmaz-Tiebe i wsp. [82] postulują, że spożycie 18:0 promuje nasilenie intensywności β -oksydacji w mitochondriach i prowadzi do zmniejszenia ilości długołańcuchowych lipidów we krwi, co może tłumaczyć różnicę w efekcie działania 16:0 i 18:0 zaobserwowaną w badaniach epidemiologicznych.

Jak wspomniano, SFA są głównymi produktami endogennej produkcji FA w organizmie. Produkcja FA *de novo* zachodzi głównie w wątrobie i tkance tłuszczowej, czyli w tkankach lipogennych [45,83]. Proces ten rozpoczyna się w mitochondriach, gdy powstające z pirogronianu lub w wyniku katabolizmu aminokwasów, acetylo-CoA zostają skondensowane ze szczawiooctanem i tworzą cytrynian [83]. Następnie cytrynian transportowany jest do cytozolu, gdzie zostaje rozłożony do szczawiooctanu i acetylo-CoA, który ulega karboksylacji do malonylo-CoA ([83], **Rysunek 2.6**). Podjednostki malonylo-CoA są później wykorzystywane przez wielofunkcyjny enzym syntazę kwasów tłuszczowych (**FAS**, ang. *fatty acid synthase*, kodowana przez gen FASN) do produkcji 16:0, który może ulegać dalszej desaturacji do MUFA i elongacji [83]. Proces liponeogenezy pozwala na magazynowanie nadmiaru energii z węglowodanów – powstające FA mogą zostać zestryfikowane do TAG i składowane w tkance tłuszczowej, do chwili pojawienia się zapotrzebowania. FA są wtedy uwalniane z tkanki tłuszczowej i w komórkach różnych tkanek kierowane do mitochondrium, gdzie w procesie β -oksydacji powstają substraty energetyczne (**Rysunek 2.6**) [83]. Zaburzenia regulacji liponeogenezy w wątrobie i tkance tłuszczowej przyczyniają się do zaburzeń metabolicznych jak T2DM, NAFLD i CVD. Warto również zauważyć, że podwyższona aktywność FAS jest ważnym elementem fenotypu nowotworów [61].

2.2.2.1.1 ROZGAŁĘZIONE I NIEPARZYZYSTE KWASY TŁUSZCZOWE

Większość FA w organizmie posiada alifatyczny łańcuch o parzystej liczbie atomów węgla, co wynika z wykorzystania przez FAS oraz elongazy, malonylo-CoA, substratu będącego dawcą dwuwęglowych podjednostek do syntezy FA. Okazuje się jednak, że FAS jest zdolna do przyłączania również podjednostek rozgałęzionych oraz nieparzysto-węglowych, czego efektem jest endogenna synteza rozgałęzionych FA (**BCFA**, ang. *branched-chain fatty acids*) oraz nieparzystych FA (**OCFA**, ang. *odd-chain fatty acids*) [84]. Substratami do produkcji BCFA i OCFA są produkty katabolizmu rozgałęzionych aminokwasów (**BCAA**, ang. *branched-chain amino acids*), schemat tego procesu został zaprezentowany na **Rysunku 2.7**.



Rysunek 2.7 Synteza rozgałęzionych i nieparzystych kwasów tłuszczowych

Rozgałęzione grupy acylowe związane z koenzymem A (**CoA**) są syntezowane z rozgałęzionych aminokwasów, w ścieżce katalizowanej przez aminotransferazy (**BCAT**) i kompleks dehydrogenazy (**BCKDH**) rozgałęzionych α -ketokwasów. Dodatkowo, w ścieżce, w której uczestniczą m.in. enzymy dehydrogenaza izobutyrylokoenzymu A (**IBD**), hydrataza enoilkoenzymu A (**LCEH**), dehydrogenaza 3-hydroksyacylokoenzymu A typ 2 (**SBCAD**) powstaje propionyl-CoA, czyli podjednostka niosąca nieparzystą liczbę węgli, wykorzystywana przez syntazę kwasów tłuszczowych (**FAS**). Zmodyfikowano ze źródła [60].

OCFA mogą również powstawać z SFA w reakcjach α -oksydacji [85]. Źródłem BCFA i OCFA u ludzi jest przede wszystkim dieta, pochodzą one głównie ze spożycia nabiału i mięsa przeżuwaczy [86,87].

Wśród BCFA wyróżnia się izomery *izo*, w których rozgałęzienie znajduje się na przedostatnim węglu licząc od końca metylowego łańcucha lub *anteizo* z rozgałęzieniem na trzecim węglu (**Tabela 2.4**). Pozycja rozgałęzienia ma wpływ na właściwości BCFA, przykładowo, *izo* BCFA hamują wzrost komórek nowotworowych [88] i wykazują odwrotną korelację ze stanem zapalnym [89], natomiast tego efektu nie zaobserwowano dla *anteizo* BCFA. W przypadku OCFA również długość łańcucha acylowego różnicuje ich właściwości

biologiczne, biosynteza 17:0 koreluje z nietolerancją glukozy, natomiast tego efektu nie zaobserwowano dla 15:0 [85].

Tabela 2.4 Stosowane skróty dla rozgałęzionych kwasów tłuszczowych

Skrót	Pozycja grupy metylowej-liczba atomów węgla	Nazwa
Izomery izo		
<i>izo</i> 14:0	12-M-13:0	kwas 12-metylotridekanowy
<i>izo</i> 15:0	13-M-14:0	kwas 13-metylotetradekanowy
<i>izo</i> 16:0	14-M-15:0	kwas 14-metylopentadekanowy
<i>izo</i> 17:0	15-M-16:0	kwas 15-metyloheksadekanowy
<i>izo</i> 22:0	20-M-21:0	kwas 20-metyloheneikozanowy
Izomery anteizo		
<i>anteizo</i> 15:0	12-M-14:0	kwas 12-metylotetradekanowy
<i>anteizo</i> 17:0	14-M-16:0	kwas 14-metyloheksadekanowy
<i>anteizo</i> 19:0	16-M-18:0	kwas 16-metylooktadekanowy
<i>anteizo</i> 23:0	20-M-22:0	kwas 20-metylodokozanowy
Liczba rozgałęzień > 1	4,8,12-M-13:0	kwas 4,8,12-trimetylotridekanowy

Opracowanie własne.

Do niedawna, z uwagi na niską zawartość OCFA i BCFA w surowicy i tkankach, były one często pomijane podczas analizy [87] lub traktowane głównie jako marker spożycia nabiału [86,90]. Jednakże, dostępne dane na temat działania BCFA i OCFA w organizmie oraz potencjalnej roli endogennej syntezy w regulacji ich poziomu, czynią te kwasy interesującym obiektem badawczym. Oprócz wspomnianych już antynowotworowych właściwości, te grupy FA są zaangażowane w regulację homeostazy glukozy, insulinooporności, magazynowania tłuszczu [86,87], a w badaniach epidemiologicznych ich poziom w biofluidach koreluje negatywnie z m.in. T2DM, chorobą niedokrwienną serca i miażdżycą [87]. Obecnie w literaturze niewiele jest informacji na temat mechanizmów działania OCFA i BCFA. Eksperymenty w modelach zwierzęcych wskazują na ich rolę w regulacji aktywności enzymów lipogennych w wątrobie [91]. Podkreślany jest również ich istotny wpływ na zwiększenie dynamiki błon komórkowych [92] lub zachowanie jej płynności w warunkach niedoborów PUFA w diecie [93].

2.2.2.2 JEDNONIENASYCONE KWASY TŁUSZCZOWE

Dominującym MUFA w organizmach zwierzęcych jest kwas oleinowy 18:1 n-9 [71]. W porównaniu z SFA, MUFA mają lepszy wpływ na zdrowie, przykładowo, zastąpienie

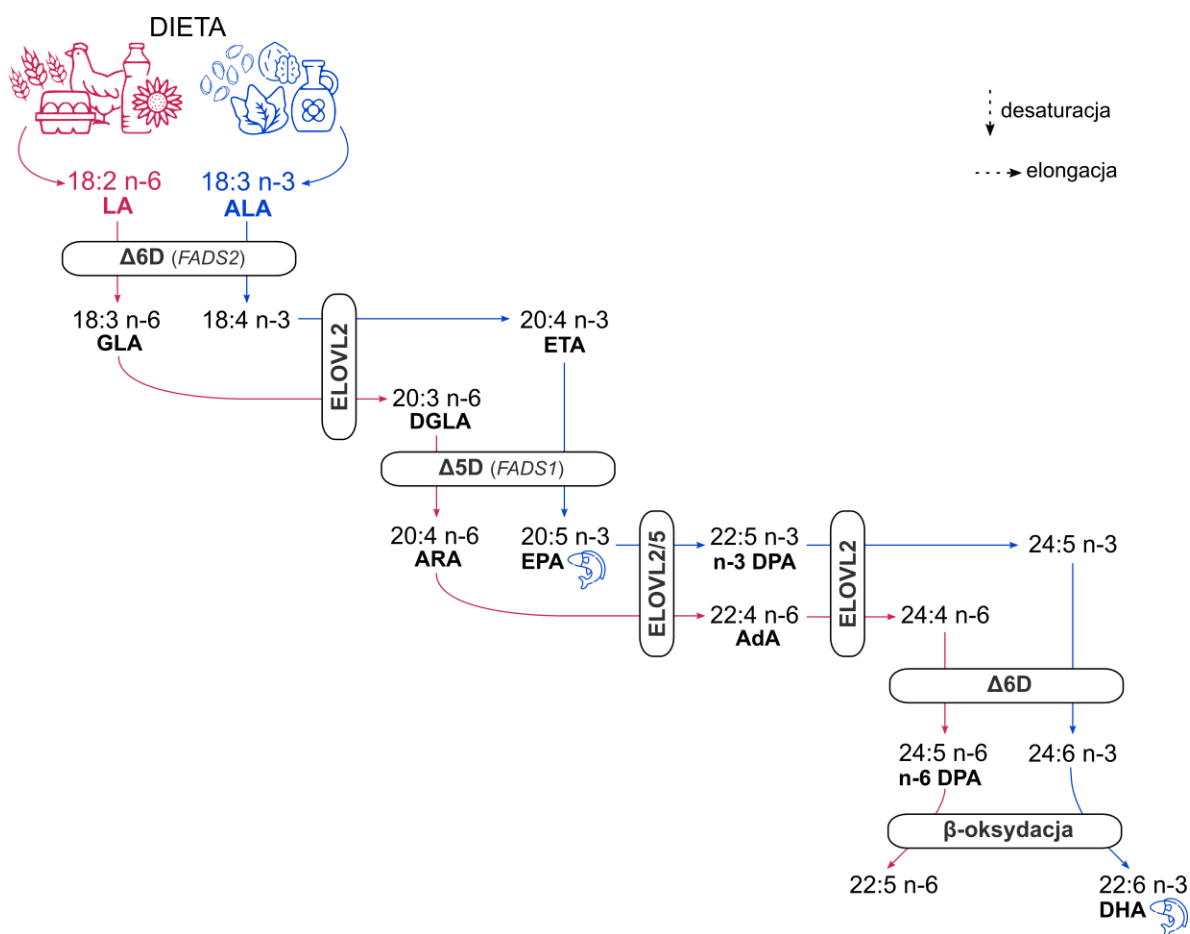
dietetycznych SFA przez MUFA powoduje obniżenie stężenia cholesterolu całkowitego, LDL-C oraz TAG we krwi [78]. Bogatym źródłem MUFA w diecie są oleje roślinne takie jak oliwa z oliwek czy olej rzepakowy [71]. Do niedawna, obserwowane przy diecie śródziemnomorskiej zmniejszone ryzyko występowania choroby niedokrwiennej serca było przypisywane dużej zawartości MUFA w oliwie z oliwek [94]. Okazuje się jednak, że mimo pozytywnego wpływu na stężenia lipoprotein we krwi, dietetyczne MUFA nie wykazują istotnych właściwości kardioprotekcyjnych, a pozytywne efekty zwiększenia ich proporcji w diecie wynika raczej ze zmniejszenia relatywnych ilości SFA i węglowodanów [78,94,95]. Kluczowa dla określenia właściwości MUFA w organizmie jest rola ich endogennej syntezy, która zachodzi w wątrobie i tkance tłuszczowej w reakcji katalizowanej głównie przez izoformę 1 desaturazy stearylkoenzymu A (**SCD-1**, ang. *stearoyl-CoA desaturase 1*), inaczej $\Delta 9$ -desaturazę. Okazuje się bowiem, że akumulacja tłuszczu w organizmie jest napędzana preferencyjną inkorporacją endogennych MUFA do TAG [96]. Czynność SCD-1 ma zatem istotne konsekwencje, przykładowo: jej nasiloną aktywność jest korelowana z podniesionym poziomem ryzyka CVD np. u pacjentów z przewlekłą chorobą nerek [97], a inhibicja SCD-1 jest rozpatrywana jako potencjalna ścieżka terapeutyczną w leczeniu raka [98,99].

2.2.2.3 WIELONIENASYCONE KWASY TŁUSZCZOWE

Brak desaturaz $\Delta 12$ i $\Delta 15$ u ludzi uniemożliwia endogenną syntezę długołańcuchowych PUFA n-3 i n-6, co czyni kwasy linolowy 18:2 n-6 (**LA**, ang. *linoleic acid*) i kwas linolenowy 18:3 n-3 (**ALA**, ang. *α -linolenic acid*) składnikami niezbędnymi w diecie [71]. Źródłami pokarmowych PUFA n-6 są głównie oleje roślinne np. olej słonecznikowy i kukurydziany, orzechy i nasiona, jaja i drób, w ALA obfitują m.in. nasiona lnu, olej rzepakowy, orzechy włoskie i zielone warzywa liściaste, a kwasy eikozapentaenowy 20:5 n-3 (**EPA**, ang. *eicosapentaenoic acid*) i dokozaheksaenowy 22:6 n-3 (**DHA**, ang. *docosahexaenoic acid*) w diecie pochodzą głównie ze spożycia ryb [71,100,101].

Inkorporacja PUFA w lipidy błonowe ma wpływ na strukturalne właściwości błon komórkowych. Obecność wielu wiązań podwójnych umożliwia wygięcie łańcuchów acylowych PUFA, co wpływa na grubość i sztywność błon. W porównaniu z SFA i MUFA dwuwarstwę lipidową zawierającą dużo PUFA są bardziej plastyczne, co ma znaczenie dla konformacji białek błonowych [102]. Pozytywne efekty zwiększenia ogólnej zawartości PUFA w diecie są udowodnione w wielu badaniach i obejmują zmniejszenie ryzyka CVD [94],

ochronę przed zaburzeniami funkcjonowania mózgu [103,104], zmniejszenie dyslipidemii [78], poprawę wskaźników związanych z insulinoopornością i homeostazą glukozy [105], zmniejszenie wystąpienia zespołu metabolicznego [106]. Jednakże specyficzny wpływ na zdrowie konkretnych PUFA jest zróżnicowany [105,107]. PUFA n-3 wykazują najczęściej działanie przeciwzapalne, natomiast PUFA n-6 mają właściwości prozapalne, co oznacza, że nie tylko ich całkowita zawartość, ale również stosunek PUFA n-6 do n-3, jest istotny [100,101,107]. Egzogenne PUFA w organizmie mogą być metabolizowane do PUFA o dłuższych łańcuchach i większym stopniu nienasycenia w szlaku, w którym ALA i LA konkurują o te same enzymy, co zaprezentowano na **Rysunku 2.8**.



Rysunek 2.8 Wydłużanie i desaturacja niezbędnych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w organizmie

Niezbędne kwasy tłuszczowe (18:2 n-6 i 18:3 n-3) pochodzące z diety ulegają desaturacji, w reakcjach katalizowanych przez $\Delta 6$ -desaturazę (**$\Delta 6D$** , kodowaną przez gen FADS2) oraz $\Delta 5$ -desaturazę (**$\Delta 5D$** , kodowaną przez gen FADS1), oraz elongacji w wyniku działania elongaz bardzo długołańcuchowych kwasów tłuszczowych (**ELOVL**). Skróty nazw kwasów tłuszczowych są zgodne z Tabelą 1.1. Opracowane za źródłem [71,101].

Enzymy katalizujące reakcje tworzenia wiązań podwójnych $\Delta 5$ -desaturaza (**$\Delta 5D$** , ang. *$\Delta 5$ -desaturase*) i $\Delta 6$ -desaturaza (**$\Delta 6D$** , ang. *$\Delta 6$ -desaturase*) wykazują większe

powinowactwo do PUFA n-3, jeżeli stosunek n-6/n-3 w organizmie jest pomiędzy ok. 1:1 a 4:1 [100]. Wysoka konsumpcja PUFA n-6, charakterystyczna dla diety typu zachodniego, zaburza tę proporcję i przyczynia się do zaostrzania negatywnych skutków zdrowotnych PUFA n-6 [23,100]. Różnice w działaniu PUFA n-3 i n-6 spowodowane są właściwościami ich metabolitów – oksylipin, którym poświęcona została kolejna sekcja w pracy.

2.2.2.3.1 OKSYLIPINY

Obecność wielu wiązań podwójnych PUFA czyni je, w porównaniu z SFA i MUFA, wyjątkowo podatnymi na działanie czynników oksydacyjnych [102]. Metabolizm PUFA w organizmie prowadzi do powstania grupy produktów nazwanych oksylipinami, które są ważnymi cząsteczkami sygnałowymi i regulatorowymi [33]. Oksylipiny powstają w reakcjach katalizowanych enzymatycznie lub w wyniku działania reaktywnych form tlenu (**ROS**, ang. *reactive oxygen species*) w warunkach stresu oksydacyjnego. Produkcja oksylipin z lipidów błonowych w komórce rozpoczyna się od hydrolizy wiązania sn-2-acylowego w PHL przez cytozolowy enzym fosfolipazę A2 (**PLA2**, ang. *phospholipase A2*). Uwolnione PUFA mogą następnie ulegać utlenianiu poprzez działanie dioksygenaz – lipooksygenaz 5, 12 i 15 (**LOX-5/12/15**, ang. *lipoxygenase*) lub cytochromu P450, który wykazuje aktywność mooksygenazy (**CYP450**, ang. *cytochrome P450*) [33,108]. Cząsteczki prostanoidów z pięciowęglowym pierścieniem powstają w wyniku aktywności cyklooksygenazy (**COX**, ang. *cyclooxygenase*), enzymu występującego w izoformach 1 i 3 – konstytutywnych, lub izoformie 2 – aktywowanej w odpowiedzi na reakcję zapalną [33,108]. Produktami reakcji katalizowanych przez wymienione enzymy oraz nieenzymatycznych, zależnych od ROS, jest liczna, zróżnicowana grupa związków obejmująca: mono-, di- oraz tri-hydroksykwasy, epoksykwasy, tromboksany (**TX**, ang. *thromboxanes*), prostaglandyny (**PG** ang. *prostaglandins*), leukotrieny (**LT**, ang. *leukotrienes*), hepoksyliny (**HX**, *hepoksyliny*), lipoksyliny (**LX**, ang. *lipoxins*) protektyny (ang. *protectins*), marezyny (**Mar**, ang. *maresin*), rezolwiny (**Rv**, ang. *resolvins*). Produkty te mogą ulegać kolejnym przekształceniom w ścieżkach z udziałem enzymów oraz nieenzymatycznych reakcjach indukowanych przez ROS. Najlepiej scharakteryzowaną grupą oksylipin są eikozanoidy będące produktami przemian 20-węglowych PUFA, głównie ARA [108]. Ścieżki syntezy i reprezentatywne struktury wybranych oksylipin zostały przedstawione na **Rysunku 2.9**.

Oksylipiny są ważnymi mediatorami lipidowymi odgrywającymi istotne funkcje w wielu różnych typach komórek. Przykładowe funkcje oksylipin, których zmiany stężeń zostały wykryte u ludzi w różnych chorobach, zebrane zostały w **Tabeli 2.5**. Produkty COX i CYP450 uczestniczą w regulacji skurczu naczyń krwionośnych, co ma związek z regulacją ciśnienia krwi oraz w regulacji agregacji trombocytów [108,109]. W różnych nowotworach oksylipiny przyczyniają się w istotny sposób do proliferacji oraz inwazyjności komórek rakowych [33,61,107,108,110]. W tkance tłuszczowej prostanoidy są zaangażowane w para- i endokrynną regulację procesu różnicowania adipocytów i lipolizy, a produkty działania LOX biorą udział w adipogenezie [33]. Oksylipiny są również cząsteczkami regulującymi stan zapalny, który jak wspomniano, jest niezwykle istotnym elementem patofizjologii otyłości. Produkcja oksylipin przebiega zarówno w komórkach układu odpornościowego, jak i w adipocytach, które mogą komunikować się poprzez ekspresję receptorów prostaglandyn [33]. Z uwagi na liczebność i różnorodność struktur oksylipin, możliwość niespecyficznych interakcji z receptorami, oraz fakt, że PUFA konkurują o te same enzymy w reakcjach utleniania, udział oksylipin w regulacji zapalenia jest złożony. Oksylipiny wywodzące się z PUFA n-6 mają zazwyczaj właściwości silnie prozapalne, natomiast PUFA n-3 wykazują działanie przeciwzapalne i wygaszające stan zapalny, aczkolwiek istnieją wyjątki [108]. Okazuje się na przykład, że metabolit ARA – PGD₂, wykazujący najczęściej działanie prozapalne, może w leukocytach uczestniczyć w procesie wygaszania zapalenia [111]. Właściwości przeciwzapalne i antytrombotyczne wykazują również metabolity innego PUFA n-6, kwasu dihomog- γ -linolenowego (20:3 n-6, **DGLA**, ang. *dihomo- γ -linolenic acid*) [112,113]. Wymienione przyczyny sprawiają, że, ocena poziomu oksylipin na podstawie wyłącznie spożycia PUFA jest niewystarczająca.

W analityce oksylipin stosowane są głównie metody oparte o tandemową spektrometrię mas sprzężoną z chromatografią cieczową (**LC-MS/MS**, ang. *liquid chromatography tandem mass spectrometry*), aby osiągnąć rozdzielczość i specyficzność umożliwiającą oznaczenie oksylipin występujących w biofluidach w niskich, nano- i pikomolowych stężeniach [110,114,115]. Technika ta ma przewagę nad GC-MS, która wymaga stosowania bardzo wysokich temperatur i derywatywacji, co może powodować utratę analitów z powodu nieenzymatycznych reakcji oksydacji, oraz nad metodami immunologicznymi, których czułość i specyficzność często jest niedostateczna [114].

Tabela 2.5 Przykładowe oksylipiny i ich rola w stanach chorobowych u ludzi

Poziom w schorzeniu	Grupa oksylipin	Prekursor	Działanie/funkcja
Otyłość			
↑ 5-, 8-, 11-, 12-, 20-HETE	hydroksykwas	ARA	propagowanie stanu zapalnego, regulacja ciśnienia krwi
↓ 12,13-DiHOME	dihydroksykwas	LA	aktywacja wychwytu lipidów przez BAT
↑ 15-HETrE	hydroksykwas	DGLA	antyproliferacyjny
↑ PGD2	prostaglandyny	ARA	stymulacja polaryzacji makrofagów do prozapalnego fenotypu M2
Zespół metaboliczny			
↑ 20-HETE	hydroksykwas	ARA	regulacja angiogenezy i stanu zapalnego w żyłach
↓ LXA4	lipoksyny	ARA	redukcja stanu zapalnego
Cukrzyca typu II			
↑ 8-izo-PGF2α	prostaglandyny	ARA	marker stresu oksydacyjnego
↑ 13-oxo-ODE	oksykwas	LA	inhibicja stanu zapalnego
↑ 11(12)-EpETrE, 14(15)-EpETrE	epoksykwas	ARA	rozszerzanie naczyń krwionośnych
↑ 9(10)-EpOME, 12(13)-EpOME	epoksykwas	LA	leukotoksyczny
↑ 9(10)-EpODE	epoksykwas	ALA	marker lipolizy w tkance tłuszczowej
Niedoczynność tarczycy			
↑ PGI2	prostaglandyny	ARA	inhibicja aktywacji płytek krwi
↓ PGE2	prostaglandyny	ARA	promowanie krzepnięcia w tętnicach
↓ 12-HETE	hydroksykwas	ARA	regulacja ciśnienia krwi
Choroba niedokrwienna serca			
↑ 9-HETE	hydroksykwas	ARA	markery stresu oksydacyjnego
Miażdżyca			
↑ 9-HODE	oksykwas	LA	marker peroksydacji lipidów
↑ 9(10)-EpOME	epoksykwas	LA	leukotoksyna
Astma			
↑ PGE2, PGI2, TXB2	prostaglandyny, tromboksany	ARA	promowanie stanu zapalnego
↓ 6-keto-PGF1α	prostaglandyny	ARA	marker stresu oksydacyjnego
Rak piersi			
↑ 9-, 13-HODE	oksykwas	LA	ligand receptora PPAR-γ
↑ 12-HHTrE	hydroksykwas	ARA	wzmacnianie chemotaksji granulocytów
Rak jelita grubego			
↓ 13-HODE	oksykwas	LA	promowanie apoptozy
↑ PGE2	prostaglandyny	ARA	promowanie stanu zapalnego
↓ PGI2	prostaglandyny	ARA	inhibicja krzepnięcia krwi
Rak niedrobnokomórkowy płuc			
↓ 15-HETE	hydroksykwas	ARA	indukcja apoptozy
↓ 13-HODE	oksykwas	LA	indukcja apoptozy
Rak prostaty			
↑ LTB4	leukotrieny	ARA	zwiększenie proliferacji nowotworu

↑ podwyższony poziom, ↓ obniżony poziom w badanym biofluidzie lub tkance. **PPAR-γ** - receptor aktywowany przez proliferatory peroksydomów γ. Nazwy kwasów tłuszczowych i oksylipin zgodnie z Tabelami 1.1 i 1.2. Zmodyfikowane za źródłami [108,110].

2.2.3 KWASY TŁUSZCZOWE W OTYŁOŚCI

Mimo ogromnej złożoności i różnorodności lipidów, znaczna część badań nad otyłością, skupia się na frakcjach lipoprotein w krwi, które często służą jako wskaźniki oceny ryzyka wystąpienia schorzeń towarzyszących – CVD, T2DM etc. [45,116–123]. W literaturze można również znaleźć informacje na temat podwyższonego poziomu FFA we krwi pacjentów z MO, który jest pozytywnie skorelowany z BMI [124]. Poziomy FFA o nienasyconych łańcuchach pozwalają również przewidzieć ryzyko wystąpienia powikłań metabolicznych u pacjentów z MO, takich jak zespół metaboliczny [125], hiperinsulinemia i niewrażliwość na insulinę [126–128]. Przyjmuje się, że podwyższone stężenie FFA w surowicy odzwierciedla dużą intensywność lipolizy w tkance tłuszczowej, a profil FA w surowicy dobrze reprezentuje skład FA tkanki tłuszczowej [90,126], chociaż niektórzy autorzy sugerują, że lepszym wyznacznikiem jest profil FA w błonach erytrocytów [129]. FFA z krwioobiegu są substratami do lipogenezy *de novo*, która dla chorujących na MO jest zintensyfikowana nie tylko w wątrobie [130], ale też w VAT, co potwierdza obserwacja podwyższonej aktywności desaturazy SCD-1, stężenia TAG oraz poziomu MUFA [131].

Nie tylko całkowite stężenia, ale również zaburzenia profilu FA mają istotne znaczenie, ponieważ jak wspomniano w poprzednich podrozdziałach, FA konkurują ze sobą o działanie tych samych enzymów. Podniesiony poziom SFA [132], szczególnie o 12 – 16 atomach węgla w surowicy pacjentek z MO został pozytywnie skorelowany z markerami stanu zapalnego [133,134]. Inni autorzy wykazali z kolei wysoki poziom bardzo długołańcuchowych MUFA lub SFA w PHL we krwi pacjentów z otyłością [135–137]. Z kolei OCFA, 15:0 i 17:0, wykazują odwrotną zależność [89,134,138]. Badania prowadzone w naszej katedrze nad zmianami profilu FA pacjentów z MO po raz pierwszy uwzględniły analizę BCFA i wykazały ich obniżony poziom w surowicy pacjentów z MO oraz wskazały na istotną korelację *izo* BCFA z markerami stanu zapalnego, insulinooporności i TAG [89]. We krwi pacjentów z MO obserwuje się również niższy poziom PUFA [89,124,137] oraz zwiększony stosunek PUFA n-6 do n-3 [137,139]. Przyczynia się to do podniesienia poziomu prozapalnych oksylipin we krwi, co zaobserwowane zostało u pacjentów cierpiących na otyłość [110,140].

Trudności z dostępem do materiału badawczego sprawiają, że w literaturze jest znacznie mniej dostępnych informacji o poziomie FA w tkance tłuszczowej pacjentów z MO [45]. Aby przezwyciężyć tę trudność, w badaniach nad rolą metabolizmu lipidów często wykorzystywane są zwierzęce modele otyłości, zarówno indukowanej genetycznie [141–145]

oraz wywołanej dietą [141,145–149]. Badania u ludzi zazwyczaj skupiają się na porównaniu różnych skupisk tkanki tłuszczowej, co pozwoliło na stwierdzenie, że VAT odgrywa ważniejszą rolę w patofizjologii otyłości [90,137,145,150]. Często brakuje jednak informacji pozwalającej odnieść wyniki uzyskane dla osób cierpiących na otyłość, do profilu FA tkanki tłuszczowej zdrowej populacji o prawidłowej masie ciała.

Najliczniej reprezentowaną grupą FA w tkance tłuszczowej są MUFA, a zawartość 18:1, głównego produktu desaturacji katalizowanej przez SCD-1, stanowi około połowę zawartości wszystkich FA [60,90,145]. Intensywna synteza FA *de novo* w wątrobie przez długi czas była uważana za najważniejsze źródło nadmiarowych lipidów w otyłości [83], a wątrobowa aktywność SCD-1 za potencjalny cel molekularny w leczeniu otyłości i jej powikłań metabolicznych [151]. Jednakże ocena aktywności SCD-1 w VAT, na podstawie zarówno indeksów desaturacji (DI, ang. *desaturation index*), czyli stosunku produktów reakcji: 16:1 i 18:1 do substratów reakcji (odpowiednio 16:0 i 18:0) [145], jak i poziomów mRNA [151], świadczą o istotnej roli VAT w produkcji FA *de novo* u osób z otyłością [83]. Według dostępnych danych poziomy PUFA w tkance tłuszczowej pacjentów z MO są nieznacznie podniesione w porównaniu z osobami, których wskaźnik BMI jest w normie [37,60]. Mimo to, obserwuje się niewielką korelację poziomu PUFA w tkance tłuszczowej z wolnymi PUFA we krwi [90]. Na tej podstawie można wnioskować, że PUFA kierowane są głównie do produkcji oksylipin [37,152]. Warensjö i wsp. [153] wskazali również na pozytywną korelację podwyższonych indeksów aktywności desaturaz PUFA z zawartością TAG w tkance tłuszczowej. Może to przekładać się na zintensyfikowaną produkcję bardzo długołańcuchowych PUFA z niezbędnych ALA i LA, a, zważywszy na fakt, że LA jest dominującym PUFA [145], w konsekwencji prowadzić do większej ilości prozapalnych eikozanoidów. Hipotezę tę potwierdzają badania Pickensa i wsp. [140], którzy zaobserwowali pozytywne korelacje BMI i obwodu talii z prozapalnymi metabolitami ARA – 5-HETE i 11-HETE. W tych samych badaniach epoksy- i dihydroksykwasy powstające z LA były odwrotnie skorelowane z BMI i obwodem talii.

2.2.3.1 WPŁYW ZABIEGU BARIATRYCZNEGO NA PROFIL KWASÓW TŁUSZCZOWYCH

Efektom operacji bariatrycznych nie jest jedynie znacząca redukcja masy ciała, ale również łagodzenie lub całkowite ustąpienie chorób współistniejących, a także zmniejszenie śmiertelności. Liczne badania wykazały, że leczenie bariatryczne zmniejsza

częstość występowania CVD, w tym niewydolności serca, zawału czy udaru [154]; przyczynia się do remisji T2DM i wspomaga leczenie zespołu metabolicznego i NAFLD [49,52,154–156]. Te obserwacje spowodowały, że chirurgię bariatryczną zaczęto określać mianem „chirurgii metabolicznej” i jest ona coraz częściej wykorzystywana w terapii chorób metabolicznych. W opinii specjalistów, powinna być ona stosowana do leczenia pacjentów ze źle kontrolowaną cukrzycą już od BMI > 30 kg/m², czyli niższego niż obecnie rekomendowana granica BMI > 35 kg/m² [50,157]. Jednakże natura zmian przyczyniających się do polepszenia statusu metabolicznego pacjentów po zabiegu bariatrycznym pozostaje kontrowersyjna. Część badaczy jako najbardziej istotne wskazuje następstwa modyfikacji anatomii przewodu pokarmowego na wydzielane hormony, natomiast inni autorzy postulują, że kluczową rolę ogrywa autonomiczny układ nerwowy [158].

W następstwie operacji bariatrycznych zaobserwowano zmiany mikrobioty jelitowej, lipidomu i metabolomu, które skorelowane są ze zmniejszonym ryzykiem chorób metabolicznych [49,52,156]. Okazuje się jednak, że różne typy operacji bariatrycznych powodują zróżnicowany stopień zmian metabolicznych. Przykładowo, po OAGB i RYGB wzrasta we krwi, w sposób zależny od długości wytworzonej chirurgicznie pętli, stężenie kwasów żółciowych, czego nie zaobserwowano po LSG [159]. Charakteryzowanie molekularnych zmian związanych z operacjami bariatrycznym jest zatem potrzebne, aby lepiej zrozumieć ich wpływ na zdrowie metaboliczne, co może z kolei przyczynić się do polepszenia wyników leczenia np. poprzez wprowadzenie modyfikacji technik operacyjnych lub lepszą opiekę pooperacyjną.

Zabiegi bariatryczne modulują poziomy FA w krwi i tkankach (**Tabela 2.6**). Większość przeprowadzanych dotychczas analiz wpływu operacji bariatrycznej na lipidom, dotyczyła zmian w surowicy bądź osoczu [160–173], a najczęściej badanym typem zabiegu był RYGB [160–168,174]. Profilowanie FA nie było uprzednio przeprowadzane w próbkach pochodzących od pacjentów leczonych za pomocą OAGB. Trudno jednoznacznie określić kierunek zmian FA po operacji bariatrycznej, z uwagi na niewielkie grupy badawcze i różny czas pobierania materiału badawczego pooperacyjnie (**Tabela 2.6**). W przypadku, gdy badano jednocześnie dwa typy zabiegów [163,166,169], wydaje się, że bardziej znaczący wpływ na profil FA mają operacje malabsorpcyjne i łączone, niż operacje restrykcyjne. Różnice w zaobserwowanych zmianach mogą również wynikać z różnic w odżywianiu pacjentów badanych kohort; sprzeczne wyniki często dotyczą bowiem FA w dużej mierze pochodzących z diety, czyli PUFA lub krótkołańcuchowych FA. Pacjenci po RYGB charakteryzowali

się często podwyższonymi poziomami PUFA w różnych frakcjach lipidowych – TAG [161], FFA [162], PHL i SPL [162,163], natomiast trend ten był odwrotny w przypadku innych zabiegów (**Tabela 2.6**). Wykorzystanie modelu mysiej otyłości wskazuje, że operacja bariatryczna może odwrócić negatywne zmiany w poziomach pro- i przeciwzapalnych mediatorów lipidowych obserwowane w otyłości [175]. Wśród badań uwzględniających wpływ operacji na poziomy oksylipin również nie ma zgodności. Przykładowo, Sarosiek i wsp. [173] odnotowali podwyższenie poziomu prozapalnego 12-HETE 28 dni po LSG u pacjentów z T2DM. Trend odwrotny zaobserwowany został ponad pół roku po operacji w badaniach Modesitt i wsp. [172] w zbiorczej grupie pacjentów bariatrycznych, u których wykonywane były zabiegi RYGB, LSG i AGB.

Podsumowując, badanie profilu FA u pacjentów leczonych OAGB może przynieść wiele cennych informacji na temat wpływu tego relatywnie nowatorskiego, lecz słabo scharakteryzowanego zabiegu, na zdrowie metaboliczne. Zaobserwowany do tej pory wpływ różnych zabiegów bariatrycznych na lipidom, pozwala przypuszczać, że utrata masy ciała po OAGB będzie niosła ze sobą szereg zmian w profilach FA, które mogą być skorelowane ze wskaźnikami zapalnymi, homeostazy glukozy lub insulinooporności. Interesujące będzie również rozważenie wpływu OAGB na poziom FA pochodzących z diety. Jak wspomniano, operacje bariatryczne niosą ze sobą ryzyko niedoborów składników odżywczych [54], porównanie dwóch technik operacyjnych wskazuje, że w przypadku OAGB zaburzenia absorpcji są poważniejsze niż w technice restrykcyjnej - LSG [176]. Według meta-analzy ryzyka niedożywienia po OAGB i RYGB, przeprowadzonej przez Tourky'ego i wsp. [177], ryzyko wystąpienia niedoborów białek we krwi (hipoalbuminemia i hipoproteinemia), ryzyko anemii oraz niedoborów wapnia, jest wyższe po OAGB.

Tabela 2.6 Zmiany w profilach kwasów tłuszczowych odnotowane po operacjach bariatrycznych

Typ zabiegu	Liczba pacjentów	Czas po operacji	Matryca biologiczna	Znaczące zmiany w stężeniach lub procentowej zawartości kwasów tłuszczowych/lipidów	Komentarz	Źródło
RYGB	8	6 miesięcy	surowica	↑ całkowite FFA frakcja FFA: 10:0, 13:0, 14:0, 15:0, 18:0		[160]
RYGB	5 z T2DM	3 miesiące	osocze	↓ frakcja TAG: jedno- i wielonienasycone TAG: 48:1, 50:1, 46:1, 49:1, 51:1, 48:3, 49:2, 48:2, 50:2, 50:3, 50:4, 52:4 frakcja cholesterolowa: całkowite estry cholesterolu oraz cholesterol zestryfikowany kwasami: 14:0, 18:0, 18:2, 18:3 i 20:3 frakcja PHL: całkowite LysoPC, całkowite PC, PC eterowe: 34:2, 36:3 and 36:4, całkowite eterowe PE, całkowite PI frakcja SPL: jednonienasycone SM, całkowite Cer		[161]
RYGB	16	4 dni i 42 dni	osocze	↑ frakcja FFA: 5:0, 8:0, 10:0, LA, ALA SM: d18:1/21:0, d18:1/23:3 ↓ frakcja FFA: 16:0, 18:0		[162]
RYGB	13	1 i 6 miesięcy	osocze	↑ frakcja PHL: 6 miesięcy: 18:1; 1 miesiąc: DHA, ARA, 16:0 ↓ frakcja PHL: 1 i 6 miesięcy: LA, EPA; 1 miesiąc: LA 18:0	Więcej zmian odnotowano po RYGB niż po ABG.	[163]
RYGB	9	12 miesięcy	tkanka tłuszczowa	↑ całkowite BCFA, izo 15:0, anteizo 15:0		[174]
RYGB	24	12 miesięcy	surowica	↑ frakcja CE: 14:0, całkowite MUFA, 18:1, ALA frakcja PHL: 14:0, 15:0, 22:0, 24:0, całkowite MUFA, 18:1, 20:1, 24:1, ALA frakcja TAG: całkowite PUFA n-3 i n-6, EPA, n-3 DPA, LA, 18:3 n-3, DGLA, ARA ↓ frakcja CE: 16:1, całkowite PUFA n-3 i n-6, DHA, DGLA, ARA frakcja PHL: całkowite SFA, 16:0, całkowite PUFA n-3 i n-6, DHA, DGLA, ARA, AdA frakcja TAG: całkowite SFA, 16:0, 16:1, 18:1, 20:1	Pacjentom rekomendowano suplementację PUFA pooperacyjnie.	[164]
			tkanka tłuszczowa	↑ frakcja TAG: całkowite MUFA, 18:1, 20:1, n-3 DPA, AdA ↓ frakcja TAG: całkowite SFA, 16:0, EPA		

Tabela 2.6 (c.d) Zmiany w profilach kwasów tłuszczowych odnotowane po operacjach bariatrycznych

Typ zabiegu	Liczba pacjentów	Czas po operacji	Matryca biologiczna	Znaczące zmiany w stężeniach lub procentowej zawartości kwasów tłuszczowych/lipidów	Komentarz	Źródło
RYGB	23 z remisją T2DM	6 i 12 miesięcy	surowica	↓ obniżenie stężenia większości FFA w porównaniu ze stężeniami przedoperacyjnymi	Mniej zmian zaobserwowanych dla grupy bez remisji T2DM.	[165]
RYGB	przed: 37 1 miesiąc: 21 3 miesiące: 19	1 i 3 miesiące	surowica	↑ wielonienasycone SM: SM(42:3), SM(42:4), SM(36:2) Cer(d18:1/26:1) ↓ jednonienasycone SM PC ≤ 36 węgli Cer(d18:1) i Cer(d18:2) z 22-24 węglowymi łańcuchami	Więcej zaobserwowanych zmian niż w przypadku AGB.	[166]
RYGB	26 z remisją T2DM 12 bez remisji T2DM	1 rok	surowica	↑ DGLA/EDA, ARA/DGLA, n-6 DPA/AdA, DGLA/18:3 n-6 ↓ ALA/LA, 18:3 n-6/LA, 16:0/14:0, 24:1/22:1 ↑ DGLA/EDA, DGLA/18:3 n-6 ↓ LA/18:1, ALA/LA, 18:3 n-6/LA, 24:1/22:1	Podano aktywności enzymów na podstawie stężenia FFA.	[167]
RYGB	11	3 dni	osocze	↓ FFA: 16:1, LA, 16:0, 18:0		[168]
AGB	przed: 22 po: 12	1 i 3 miesiące	surowica	↑ wielonienasycone SM: SM(42:3), SM(42:4), SM(36:2) jednonienasycone SM (1 miesiąc) PC ≤ 36 węgli (1 miesiąc) ↓ Cer(d18:1) i Cer(d18:2) z 22-24 węglowymi łańcuchami (1 miesiąc)	Podniesienie poziomu wielonienasyconych SM mniejsze niż w porównaniu z RYGB.	[166]
AGB	5	1 i 6 miesięcy	osocze	↑ frakcja PHL: 1 miesiąc: 16:0 ↓ frakcja PHL: 1 miesiąc: LA		[163]
BPDDS	9	3 dni - 12 miesięcy	surowica	↓ FFA: 16:0,18:0, LA, ALA, DGLA, ARA, 22:0, EPA, 24:0, DHA		[169]
LSG	63	36 miesięcy	osocze	↑ całkowite FA: 8:0, 10:0, 12:0, kwas fitanowy, 20:1, 24:0, 26:1 ↓ całkowite FA: 14:2 n-6, 16:1, ALA, EPA, ARA, DHA, 26:0	Porównanie z pacjentami z otyłością.	[170]

Tabela 2.6 (c.d) Zmiany w profilach kwasów tłuszczowych odnotowane po operacjach bariatrycznych

Typ zabiegu	Liczba pacjentów	Czas po operacji	Matryca biologiczna	Znaczące zmiany w stężeniach lub procentowej zawartości kwasów tłuszczowych/lipidów	Komentarz	Źródło
LSG	18	3 dni - 12 miesięcy	surowica	↓ 3 miesiące: FFA: 14:0, ALA, DGLA, EPA	Brak znaczących różnic pomiędzy 12 miesiącami i wynikami przedoperacyjnymi.	[169]
LSG	6 dzieci	6 miesięcy	surowica	↑ PC 38:5 ↓ SM 26:0, 26:1 ↓ PC 40:2, 42:1		[171]
LSG	5 z T2DM 5 bez T2DM	28 dni	surowica	↑ FFA: 7:0, 15:0 ↓ FFA: 9:0, EPA, DHA, AdA ↑ FFA: 12:0, 14:1, 15:0, 17:1, <i>izo</i> 17:0, <i>izo</i> 19:0 ↓ FFA: 9:0, 11:0, EPA	Dieta przed operacją.	[173]
LSG	14	3 dni	osocze	↓ FFA: 16:0		[168]
GB*	5 z T2DM	28 dni	surowica	↑ FFA: 12:0, 14:0, 14:1, 15:0, 16:1, 17:0, 17:1, 18:1, 19:0, 19:1, 18:4 n-3, LA, 22:2 n-6, DGLA, n-3 DPA, <i>izo</i> 17:0, <i>izo</i> 19:0 ↓ FFA: AdA	Dieta przed operacją.	[173]
AGB lub LSG lub RYGB**	20 kobiet	6 lub 12 miesięcy	surowica	↓ FFA: 16:0, 18:0, 18:1		[172]

* - niesprecyzowany typ operacji ominięcia żołądkowego, ** - połączona grupa pacjentów; RYGB wykonywane laparoskopowo i metodą klasyczną. Skróty: **AGB** - regulowana opaska żołądkowa, **BPDDS** - wyłączenie żółciowo-trzustkowe z przełączeniem dwunastniczym, **Cer** - ceramidy, **FA** - kwasy tłuszczowe, **LSG** - laparoskopowa resekcja żołądka, **PC** - fosfatydylocholina, **PE** - fosfatydyloetanolamina, **PI** - fosfatydyloinozytyle, **PHL** - fosfolipidy, **RYGB** - ominięcie żołądkowo-jelitowe na pętli Roux-en-Y, **SM** - sfingomieliny, **SPL** - sfingolipidy, **TAG** - triacyloglicerole, **T2DM** - cukrzyca typu 2, skróty wielonienasyconych i rozgałęzionych kwasów tłuszczowych zgodnie z Tabelami 1.1 i 2.4). Opracowanie własne na podstawie źródeł [163,165-173].

3 CELE PRACY

Nadrzędnymi celami niniejszej pracy doktorskiej były **I.** ustalenie czy i w jaki sposób nowoczesna metoda leczenia otyłości, jaką jest zabieg OAGB, wpływa na profil FA i ich bioaktywnych metabolitów, oraz **II.** poszerzenie wiedzy na temat wpływu otyłości na zmiany profilu i metabolizmu ważnej grupy jaką są FA. Celami szczegółowymi były:

W odniesieniu do zmian w profilu FA wywołanych otyłością u ludzi i wpływu OAGB na te zmiany:

- Zbadanie składu FA w surowicy i tkance tłuszczowej pacjentów cierpiących na otyłość przed zabiegiem OAGB oraz po zabiegu w dwóch punktach czasowych. Określenie krótkoterminowego (2 tygodnie po operacji OAGB) oraz długoterminowego (6-9 miesięcy po operacji) wpływu leczenia bariatrycznego za pomocą OAGB na profil FA w surowicy (**I.I**).
- Przeprowadzenie porównania profilu FA pomiędzy pacjentami po zabiegu i grupą kontrolną w celu weryfikacji, czy po OAGB poziom FA we krwi ulega normalizacji (**I.II**).
- Opracowanie metody oznaczania wybranych oksylipin w surowicy techniką LC-MS/MS wraz z metodą ekstrakcji analitów z matrycy biologicznej i zastosowanie jej do określenia wpływu OAGB na poziom tych metabolitów PUFA (**I.III**).
- Zbadanie szczegółowego składu FA w surowicy i skupiskach tkanki tłuszczowej VAT i SAT osób cierpiących na otyłość olbrzymią i porównanie do osób o prawidłowej masie ciała. Badanie obejmowało grupy FA rzadko opisywane w literaturze (OCFA i BCFA) oraz szczególnie istotne ze względu na regulatorową rolę w chronicznym stanie zapalnym w otyłości (PUFA), a następnie zbadanie metabolizmu BCFA w tkance tłuszczowej pacjentów z otyłością i jego wpływu na zawartość tej grupy FA we krwi (**II.I**).

W ramach badania wpływu otyłości na profil FA w modelu mysim:

- Zbadanie zmian profilu FA, w tym z podziałem na FA wchodzące w skład różnych grup lipidów, w materiale biologicznym z mysiego modelu otyłości wywołanej dietą wysokotłuszczową (**II.II**).

4 MATERIAŁY I METODY

4.1 APARATURA I ODCZYNNIKI

4.1.1 ODCZYNNIKI CHEMICZNE I BIOCHEMICZNE

Rozpuszczalniki / odczynniki	
Nazwa (producent/dystrybutor)	Numer CAS
Aceton do HPLC cz.d.a, J.T. Baker® (VWR International, Radnor, PA, USA)	75-05-8
Acetonitryl do HPLC, HiPerSolv (VWR International, Radnor, PA, USA)	75-05-8
Butylowany hydroksytoluen (BHT, ang. <i>butylated hydroxytoluene</i>) / 2,6-di-tert-butyl-4-metylofenol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)	128-37-0
Chlorek sodu (P.P.H. "STANLAB" Sp. z o.o., Lublin, Polska)	7647-14-5
Chloroform do HPLC stabilizowany amylenem (Avantor Performance Materials Poland S.A., Gliwice, Polska)	67-66-3
Dichlorometan do HPLC stabilizowany amylenem (Avantor Performance Materials Poland S.A., Gliwice, Polska)	75-09-2
Eter dietylowy cz.d.a. stabilizowany BHT (Avantor Performance Materials Poland S.A., Gliwice, Polska)	60-29-7
Eter diizopropylowy cz.d.a. (Avantor Performance Materials Poland S.A., Gliwice, Polska)	108-20-3
Izopropanol do HPLC (Avantor Performance Materials Poland S.A., Gliwice, Polska)	67-63-0
Kwas mrówkowy do LC-MS LiChropur™ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)	64-18-6
Kwas octowy do HPLC LiChropur™ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)	64-19-7
Kwas solny 35-38%, cz.d.a (Avantor Performance Materials Poland S.A., Gliwice, Polska)	7467-01-0
Metanol do HPLC (Avantor Performance Materials Poland S.A., Gliwice, Polska); LiChrosolv® do LC-MS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)	67-56-1
<i>n</i> -Heksan do HPLC (Avantor Performance Materials Poland S.A., Gliwice, Polska)	110-54-3
Octan etylu cz.d.a. (Avantor Performance Materials Poland S.A., Gliwice, Polska)	141-78-6
Odczynnik derywatywacyjny Supelco® ~10% BF ₃ w metanolu (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)	373-57-9
Wodorotlenek potasu cz.d.a. (Avantor Performance Materials Poland S.A., Gliwice, Polska)	1310-58-3
Wzorce analityczne do analizy FA techniką GC-MS	
Nazwa (producent)	Numer CAS
Metylowany kwas arachidowy (ang. <i>19-methylarachidic acid</i>) - wzorzec wewnętrzny (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)	59708-73-5
Mieszanka wzorców analitycznych kwasów tłuszczowych <i>Supelco 37 Component FAME Mix</i> (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)	-

Wzorce analityczne do analizy oksylipin techniką LC-MS†

Skrót (producent)	Numer CAS
12-HETE (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA)	71030-37-0
12-HHT (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA)	54397-84-1
13-HODE (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA)	73804-64-5
15d-PGJ2 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA)	87893-55-8
15-HETE (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA)	73836-87-0
15-HETrE (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA)	92693-02-2
18-HEPE (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA)	141110-17-0
2,3-dinor-8-izo-PGF2 α (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA)	221664-05-7
20-HETE (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA)	79551-86-3
5-HETE (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA)	73307-52-5
7S-Mar1 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA)	1268720-66-6
8-izo-PGF2 α (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA)	27415-26-5
9(10)-EpOME (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA)	6814-52-4
9-HODE (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA)	98524-19-7
LTB4 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA)	71160-24-2
LXA4 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA)	89663-86-5
LXB4 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA)	98049-69-5
Mar1 (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA)	1268720-28-0
Mar2 (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA)	1639809-46-3
PDX (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA)	871826-47-0
PGD2 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA)	41598-07-6
PGD3 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA)	71902-47-1
PGE2 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA)	363-24-6
PGF2 α (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA)	38562-01-5
RvD1 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA)	872993-05-0
RvD2 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA)	810668-37-2
RvE1 (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA)	552830-51-0
TXB2 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA)	71030-37-0

Deuterowane wzorce wewnętrzne do analizy oksylipin techniką LC-MS†

Skrót (producent)	Numer CAS
12-HETE-d8 (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA)	84807-90-9
14(15)-DiHET-d11 (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA)	-
5-HETE-d8 (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA)	330796-62-8
8-izo-PGF2 α -d4 (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA)	211105-40-7
9-HODE-d4 (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA)	890955-25-6
LTB4-d4 (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA)	124629-74-9
RvE1-d4 (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA)	-

† - skróty oksylipin za Tabelą 1.2

Powyżej zebrano odczynniki chemiczne, rozpuszczalniki i wzorce analityczne stosowane podczas przeprowadzania analiz lipidomicznych tj. ekstrakcji lipidów, rozdziałów

techniką SPE, oznaczania profilu FA za pomocą GC-MS oraz oznaczania oksylipin techniką LC-MS/MS. Odczynniki, które były niezbędne do uzyskania wyników analiz wykonywanych we współpracy z Katedrą i Zakładem Biochemii Farmaceutycznej oraz Katedrą i Zakładem Biochemii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego – oznaczanie stężenia aminokwasów techniką LC-MS/MS w surowicy ludzi, oznaczanie poziomu ekspresji mRNA enzymów w ludzkiej tkance tłuszczowej, oznaczanie parametrów biochemicznych w surowicy myszy doświadczalnych (poziom karboksylacji białek, poziom peroksydacji lipidów, stężenie wolnego cholesterolu oraz stężenie FFA). Podczas określania funkcji serca i eutanazji myszy doświadczalnych stosowane były ketamina, ksylazyna i izofluran.

Odczynnik/reagent/zestaw	Producent
2-chloroadenozyna cz.d.a.†	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Kwas nonafluoropentanowy ‡	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Pasze dla myszy laboratoryjnych Altromin standardowa: C 1090-10 i wysokotłuszczowa: C 1090-60	Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage, Niemcy
Reagent do ilościowego oznaczania wolnego cholesterolu metodą enzymatyczno- kolorymetryczną CHOD-PAP	Greiner Diagnostic GmbH, Baden- Württemberg, Niemcy
Zestaw do izolacji RNA z tkanek <i>RNeasy Lipid Tissue Mini Kit</i>	Qiagen, Hilden, Niemcy
Zestaw do oceny poziomu peroksydacji lipidów <i>TBARS Assay Kit</i>	Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA
Zestaw do oznaczania poziomu karbonylacji białek <i>Protein Carbonyl Content Assay Kit</i>	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Zestaw do oznaczania stężenia FFA <i>Free Fatty Acid Assay Kit</i>	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

† - wzorzec wewnętrzny do oznaczania aminokwasów techniką LC-MS/MS, ‡ - składnik fazy ruchomej podczas oznaczania aminokwasów techniką LC-MS/MS

4.1.2 APARATURA

Aparatura
Chromatograf gazowy sprzężony z kwadropolowym spektrometrem mas GCMS-QP 2010 SE (Shimadzu, Kyoto, Japonia),
Wysokosprawny chromatograf ciekłowy sprzężony ze spektrometrem mas z analizatorem w postaci potrójnego kwadropola LCMS-8050 (Shimadzu, Kyoto, Japonia)

Drobny sprzęt laboratoryjny

Blok grzejny ze stanowiskami na 2 oraz 4 ml naczynka AccuBlock™ Digital Dry Bath (Labnet International, Edison, NJ, USA)

Demineralizator HLP 5S oczyszczający wodę do wymogów PN-EN ISO 3696: 1999 dla wód pierwszego, drugiego i trzeciego stopnia czystości (Hydrolab, Gdańsk, Polska)

Komora próżniowa do SPE 12-stanowiskowa (Phenomenex®, Torrance, CA, USA)

Waga analityczna (RADWAG wagi elektroniczne, Radom, Polska)

Wirówka laboratoryjna z kontrolą temperatury MIKRO 220R (Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Niemcy)

Wyparka obrotowa (IKA® Poland Sp. z o.o., Warszawa, Polska)

Wytrząsarka typu vortex (IKA® Poland Sp. z o.o., Warszawa, Polska)

Ponadto w badaniach wykonywanych we współpracy z Katedrą Biochemii Farmaceutycznej oraz Katedrą Biochemii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego używano następującej aparatury/sprzętu laboratoryjnego:

Analizator biochemiczny Erba XL-100 (Erba Diagnostics Mannheim GmbH, Mannheim, Niemcy)

Automatyczny termocykler *CFX Connect Real-Time System* i akcesoria (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)

Chromatograf cieczowy *Surveyor HPLC system* (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA)

Koncentrator próżniowy SpeedVac™ (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA)

Spektrofotometr mikroplótkowy *Synergy HT multi-plate microplate reader* (BioTek, Winooski, VT, USA)

Spektrometr mas z analizatorem w postaci potrójnego kwadrupola *TSQ Vantage Triple-Stage Quadrupole Mass Spectrometer* mas z jonizacją poprzez termoelektrozpraszanie HESI-II (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA)

Termomikser laboratoryjny (Eppendorf Poland Sp. z o.o., Warszawa, Polska)

Ultrasonograf Vevo 1100 (VisualSonics Inc, Toronto, Kanada)

Zestaw do automatycznej elektroforezy żelowej Experion wraz z akcesoriami (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)

4.1.3 AKCESORIA

Dozowanie

Mikrolitrowe strzykawki do autosamplera do chromatografu gazowego 10 µl (Shimadzu, Kyoto, Japonia); gazoszczelne strzykawki mikrolitrowe 50 µl, 100 µl, 250 µl (Hamilton Company, Reno, NV, USA)

Pipety jednokanałowe Eppendorf Research® plus, regulowana pojemność 20-200 µl, 100-1000 µl i końcówki do pipet (Bionovo, Legnica, Polska)

Szklane pipety miarowe o pojemności 1 ml, 5 ml, 10 ml (Bionovo, Legnica, Polska)

SPE

Kolumnienki do SPE ze złożem aminopropylowym 3 ml Strata® NH₂, 500 mg i ze złożem oktadecylowym 3 ml Strata® C18-E, 200 mg (Phenomenex®, Torrance, CA, USA)

Kolumny chromatograficzne

Kapilarna kolumna do chromatografii gazowej ZB-5MSi 30 m × 0,25 mm, 0,25 mm grubość warstwy fazy stacjonarnej (Phenomenex®, Torrance, CA, USA)

Kolumna do chromatografii ciekłowej Hypersil GOLD™ (100 × 2,1 mm, uziarnienie 3 μm) z dedykowaną przedkolumną (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA)

Kolumna do chromatografii ciekłowej Synergi Hydro-RP (50 mm × 2,0 mm, uziarnienie 2,5 μm) z przedkolumną (Phenomenex, Torrance, CA) †

† Stosowana podczas oznaczania aminokwasów techniką LC-MS/MS w Katedrze Biochemii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

Szkło / plastiki / pozostałe materiały zużywalne

Kolby ze szpicem ze szkła Duran, NS 14/23, 50 ml (Lenz Laborglas GmbH & Co. KG, Wertheim, Niemcy)

Krioprobówki z polipropylenu, 2 ml (GenoPlast Biochemicals, Rokocin, Polska)

Lejki ze szkła borokrzemowego 15 ml (Bionovo, Legnica, Polska)

Mikrowłody do fiolek z szerokim otworem ND9 stożkowe, końcówka 15 mm (Anchem Sp. z o.o., Warszawa, Polska)

Probówki ze szkła sodowo-wapniowego o wysokości 18 mm oraz 12 mm (Hecht Assistent, Sondheim vor der Rhön, Niemcy)

Szklane pipety Pasteura 100 mm i 150 mm (VWR International, Radnor, PA, USA)

Zakręcane naczynka chromatograficzne 2 mL z gwintem ND8 z septą silikon/poli(tetrafluoroetylen) (PFTE, *polytetrafluoroethylene*), przezroczyste (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA); zakręcane naczynka chromatograficzne bursztynowe 4 mL z gwintem ND13, 2 ml z gwintem ND8 i ND9 (Anchem Sp. z o.o., Warszawa, Polska)

Moździerze porcelanowe o pojemności 50 ml z tłuczkiem (Bionovo, Legnica, Polska)

Probówki typu Eppendorf, 2 ml (Bionovo, Legnica, Polska), krioprobówki z polipropylenu, 2 ml (GenoPlast Biochemicals, Rokocin, Polska)

Sączki miękkie ilościowe z bibuły (EUROCHEM BGD Sp. z o.o., Tarnów, Polska)

Taśma uszczelniająca z PFTE (Bionovo, Legnica, Polska)

4.2 CHARAKTERYSTYKA MATERIAŁU BIOLOGICZNEGO

4.2.1 LUDZKI MATERIAŁ BIOLOGICZNY

Materiał biologiczny w postaci tkanki tłuszczowej i krwi wykorzystywany w badaniach był pobierany od pacjentów z otyłością leczonych poprzez wykonanie OAGB w Katedrze i Klinice Chirurgii Ogólnej, Endokrynologicznej i Transplantacyjnej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Protokół badania został zaakceptowany przez Niezależną Komisję Bioetyczną ds. Badań Naukowych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, nr uchwały NKBBN/493/2016. Projekt finansowany był ze środków Narodowego Centrum Nauki SONATA 11 nr 2016/21/D/NZ5/00219, którego kierownikiem jest dr hab. Adriana Mika, prof. GUMed. Krew od grupy kontrolnej uzyskano dzięki uprzejmości prof. dr hab. Michała Chmielewskiego, z Katedry i Kliniki Nefrologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych, materiał zbierany był w ramach projektu Narodowego Centrum Nauki OPUS 6 nr 2013/11/B/NZ5/00118 na podstawie zgody wydanej przez Niezależną Komisję Bioetyczną ds. Badań Naukowych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego nr NKEBN/614/2013-2014 z 28 maja 2014 r. Tkanke tłuszczową stanowiącą kontrolę pobierano od pacjentów rekrutowanych w Katedrze i Klinice Chirurgii Ogólnej, Endokrynologicznej i Transplantacyjnej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego oraz na Oddziale Chirurgicznym Ogólnym, Szpitalu Pomorskie Sp. z o.o. w Gdyni na podstawie zgody Niezależnej Komisji Bioetycznej ds. Gadań Naukowych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego nr NKBBN/297/2017. Badania przeprowadzone zostały zgodnie ze standardami określonymi w Deklaracji Helsińskiej Światowego Stowarzyszenia Lekarzy. Od wszystkich osób otrzymano świadomą, pisemną zgodę na udział w badaniach.

4.2.1.1 KRYTERIA REKRUTACYJNE

Pacjenci w wieku 18–65 lat, cierpiący na otyłość byli włączani do grupy badawczej, w przypadku, gdy wskaźnik BMI przekraczał 40 kg/m² lub wskaźnik BMI mieścił się w przedziale 35–40 kg/m² i występowały choroby towarzyszące. U pacjentów z BMI > 35 kg/m² wskazaniem do przeprowadzenia OAGB były zaburzenia metaboliczne, choroby układu sercowo-naczyniowego, zaburzenia snu wywołane otyłością lub czynniki psychologiczne. Połowa włączonych do badania pacjentów cierpiała na T2DM. Kryteria kwalifikacji pacjentów do leczenia bariatrycznego były zgodne z wytycznymi stworzonymi

przez wielospecjalistyczny zespół ekspertów, w którego skład wchodzi przedstawiciele Międzynarodowego Towarzystwa Chirurgicznego Leczenia Otyłości (**IFSO**, ang. *International Federation for the Surgery of Obesity*), Oddziału Europejskiego Międzynarodowego Towarzystwa Chirurgicznego Leczenia Otyłości (**IFSO-EC**, ang. *International Federation for the Surgery of Obesity – European Chapter*) oraz Europejskiego Towarzystwa Badań nad Otyłością (**EASO**, ang. *European Association for the Study of Obesity*) [50]. Kryteriami wykluczającymi były **i**) wiek poniżej 18 lat, **ii**) brak odpowiedniej opieki medycznej, **iii**) brak możliwości uczestnictwa w wieloletniej opiece pooperacyjnej, **iv**) niestabilizowane zaburzenia psychiczne, ciężka depresja, zaburzenia osobowości i zaburzenia odżywiania, oprócz przypadków, gdy operacja bariatryczna została zalecona przez lekarza psychiatrę z doświadczeniem w leczeniu otyłości, **v**) nadużywanie alkoholu lub uzależnienie od leków, **vi**) choroby bezpośrednio zagrażające życiu, **vii**) niezdolność do sprawowania opieki nad sobą lub brak długookresowego wsparcia rodziny lub otoczenia, **viii**) brak świadomej zgody pacjenta na udział w badaniu. Grupę kontrolną stanowili pacjenci skierowani na planowe, chirurgiczne leczenie niezwiązane z chorobą nowotworową. Kryteriami wykluczenia był **i**) wiek poniżej 18 lat, **ii**) brak świadomej zgody na udział w badaniu, **iii**) stwierdzona otyłość, cukrzyca lub zespół metaboliczny, **iv**) terapia lekami steroidowymi, przewlekłe stosowanie niesteroidowych leków przeciwzapalnych, stan zapalny lub choroby o podłożu zapalnym/wirusowym, **v**) choroby nowotworowe, **vi**) choroby nerek.

4.2.1.2 ZALECENIA DIETETYCZNE

Okolo 3-6 miesięcy przed przystąpieniem do operacji bariatrycznej pacjenci stosowali niskokaloryczną dietę redukcyjną [178], w której rekomendowane były posiłki bogate w białko, niskotłuszczowe i ograniczone było spożywanie węglowodanów, ponadto nie były stosowane leki. Po operacji OAGB przez pierwsze 2-5 doby, gdy żołądek się regeneruje, pacjenci przyjmowali pojedyncze łyżki/łyżeczki wody, czystego bulionu, herbaty, lejącego kisielu. Przez pierwsze dwa tygodnie po operacji pacjenci musieli ograniczyć dzienne spożycie kalorii do nawet ≤ 500 kcal (dzienny deficyt 500-1000 kcal). Minimalna zawartość białka w diecie wynosiła 60 g/dzień. Rekomendowanymi posiłkami były produkty o niskiej zawartości tłuszczu i cukrów, wysokobiałkowe w postaci płynów lub przecierów np. zmiksowane zupy z mięsem, jajkami lub rybą, naturalny, niesłodzony nabiał wysokobiałkowy (kefir, maślanka, jogurty), soki warzywne i musy owocowe, odżywki białkowe w proszku oraz witaminy w płynie. W kolejnym etapie rekonwalescencji pacjenci byli instruowani do przestrzegania niskokalorycznej diety (maksymalnie 1200 kcal dla kobiet i maksymalnie 1500 kcal

dla mężczyzn), w której rozkład makroskładników był następujący: 25-35% białka, do 30% tłuszczu i pozostałe 35-40% węglowodany. Zalecanymi źródłami tłuszczu były ryby i drób, chudy nabiał np. jogurt naturalny, mozzarella, serek wiejski, oleje roślinne np. oliwa z oliwek, olej rzepakowy, orzechy i nasiona np. sezam, siemię lniane, pestki dyni. Spożywanie słodczy było zabronione. Na żadnym z etapów leczenia pacjentom nie zalecano stosowania suplementów PUFA, pacjenci nie przyjmowali również leków zmniejszających stężenia lipidów. Dokładny opis zaleceń dietetycznych umieszczono w Materiałach Uzupełniających, (sekcja 12.1).

4.2.1.3 POZYSKIWANIE TKANKI TŁUSZCZOWEJ

Tkanka tłuszczowa od obu grup badawczych pobrana została śródoperacyjnie, w przypadku pacjentów otyłych, pod koniec wykonywanej laparoskopowo OAGB, podczas której długość wytworzonej pętli wyłączzonego odcinka jelita cienkiego wynosiła 150-250 cm w zależności od wieku i BMI, zgodnie z wytycznymi [179]. VAT (n = 89) pobrany został z sieci większej, po skontrolowaniu szczelności wytworzonego zespolenia, natomiast SAT (n = 89) pobierany był przy zamykaniu centralnego trokara. W przypadku grupy kontrolnej tkankę otrzewnową (n = 32) i podskórną (n = 13) pobierano, z miejsc odpowiadających tym u pacjentów z otyłością, podczas zabiegu laparoskopowej cholecystektomii lub podczas usuwania przepukliny. Uzyskano ok. 1 g VAT i 1 g SAT od jednej osoby, tkanka była natychmiast zamrażana w ciekłym azocie, a następnie próbki były przechowywane w -80°C do czasu analizy.

4.2.1.4 POZYSKIWANIE SUROWICY KRWI

Krew żylna (5 ml) pobierana była na czczo do próbek bez antykoagulantów, odwirowywana po utworzeniu skrzepu (ok. 30-60 min) przez 15 min przy obrotach 3000 × g w temperaturze 4°C, a następnie otrzymana surowica była przenoszona do nowej próbki i przechowywana w temperaturze -80°C do czasu wykonywania analiz. Krew od pacjentów pobierana była w następujących punktach leczenia: 1) przed operacją bariatryczną (**MO/pre-OAGB**), 2) dwa tygodnie po operacji (w celu ustalenia krótkoterminowego wpływu OAGB na poziom bioaktywnych lipidów – **FU1**, ang. *follow up 1*), 3) sześć do dziewięciu miesięcy po operacji (do badania długoterminowego wpływu OAGB na poziom bioaktywnych lipidów – **FU2**, ang. *follow up 2*). Krew od osób z grupy kontrolnej (**LC**, ang. *lean controls*) pobierana była jednorazowo przed zabiegiem chirurgicznym. Dodatkowo, od 34 pacjentów

z MO krew została pobrana przed rozpoczęciem diety redukcyjnej przygotowującej do zabiegu OAGB (punkt **INI**).

4.2.1.5 PODSTAWOWE PARAMETRY KLINICZNE I BIOCHEMICZNE

Dane antropometryczne osób biorących udział w badaniu zbierane były Katedrze i Klinice Chirurgii Ogólnej, Endokrynologicznej i Transplantacyjnej oraz Katedrze i Klinice Nefrologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego i na Oddziale Chirurgicznym Ogólnym, Szpitala Pomorskie Sp. z o.o. w Gdyni. Parametry biochemiczne w krwi oznaczane były w Centralnym Laboratorium Klinicznym Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego w Gdańsku oraz we współpracy z Katedrą i Zakładem Biochemii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, przy użyciu analizatora biochemicznego Erba XL-100 (Erba Diagnostics Mannheim GmbH, Mannheim, Niemcy). Panel oznaczonych parametrów obejmował stężenia markerów wystąpienia ryzyka chorób sercowo-naczyniowych: badanie lipidogram obejmujące TAG, cholesterol całkowity, LDL-C, HDL-C; markerów zapalnych: białko C-reaktywne (**CRP**, ang. *C-reactive protein*); markerów związanych ze zmianami cukrzycowymi i wrażliwością na insulinę: glukoza, insulina, wskaźnik oceny modelu homeostazy oporności na insulinę (**HOMA-IR**, ang. *Homeostatic Model Assessment of Insulin Resistance*), hemoglobina glikowana (**HbA1c**, ang. *glycated haemoglobin*); albumina, kreatynina.

4.2.1.6 STĘŻENIA AMINOKWASÓW W SUROWICY KRWI

We współpracy z Katedrą i Zakładem Biochemii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego uzyskano wyniki analizy aminokwasów w surowicy krwi pacjentów z otyłością oraz grupy kontrolnej techniką LC-MS/MS zgodnie z metodą opracowaną przez Olkowicz i wsp. [180]. 25 µl surowicy było przenoszone do 2 ml probówki typu Eppendorf, dodawano 60 µl acetonitrylu oraz 5 µl wzorca wewnętrznego, którym był 25 µM roztwór 2-chloroadenozyny w 0,1% kwasie mrówkowym. Aminokwasy ekstrahowano poprzez wytrząsanie w termomikserze laboratoryjnym (Eppendorf Poland Sp. z o.o., Warszawa, Polska) przez 5 min przy 1400 rpm. Następnie probówki inkubowano na lodzie przez 20 min i osad był odwirowywany przez 15 min przy $14\ 000 \times g$ w temperaturze 4°C. Roztwór z nad osadu pobierano do czystej probówki i odparowywano do sucha w koncentratorze próżniowym (SpeedVac™, Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA). Suche ekstrakty były rozpuszczane w 50 µl H₂O i wirowane przez 15 min przy $14\ 000 \times g$ w temperaturze 4°C i nanoszone na 96-dółkową płytkę.

Rozdział chromatograficzny prowadzono na kolumnie wypełnionej złożem oktadecylowym ze związanymi reszkowymi grupami silanowymi – Synergi Hydro-RP (50 mm × 2.0 mm średnicy wewnętrznej, 2.5 µm grubości uziarnienia, (Phenomenex, Torrance, CA), z dedykowaną przedkolumną chroniącą złożę przed zanieczyszczeniami. Chromatograf cieczowy Surveyor HPLC system (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) był wyposażony w chłodzony automatyczny podajnik próbek mieszczący płytki wielodołkowe, urządzenie do odgazowywania faz ruchomych oraz piec chromatograficzny. W celu zwiększenia wydajności jonizacji, za kolumną zastosowano przepływ 0,2 ml/min 0,05% roztworu kwasu mrówkowego w metanolu (v/v). Chromatograf sprzężony był ze spektrometrem mas z analizatorem w postaci potrójnego kwadrupola TSQ Vantage Triple-Stage Quadrupole mass spectrometer z jonizacją poprzez termoelektrozpraszanie HESI-II (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) w trybie dodatnim (ESI+). Charakterystyka metody chromatograficznej oraz parametry pracy spektrometru mas zostały zebrane w Tabeli 4.1.

Tabela 4.1 Warunki analizy aminokwasów za pomocą LC-MS

Element systemu	Chromatograf cieczowy
Temperatura pieca:	25°C
Objętość dozowanej próbki:	2 µl
Natężenie przepływu fazy ruchomej:	0,2 ml/min
Skład fazy A:	5 mM kwas nonafluoropentanowy
Skład fazy B:	0,1% kwas mrówkowy w acetonitrylu (v/v)
Zastosowany gradient:	0 - 1 min: 0% B 1 - 3 min: 0% - 30% B 3 - 5,5 min: 30% - 45% B 5,5 - 5,6 min: 45% - 0% B
Czas kondycjonowania kolumny	4,5 min
Płukanie kolumny	98% acetonitryl przez 30 min, co 30 próbek
Element systemu	Spektrometr mas
Ustawienia źródła ESI:	napięcie kapilary: 4,5 kV temperatura kapilary: 250°C
Gaz kolizyjny:	99,999% argon, 1,5 mTorr
Tryb pracy analizatora:	SRM

Skróty: **ESI** - elektrozpylanie, **SRM** - tryb monitorowania reakcji fragmentacji. Tabela własna na podstawie źródeł [180,181].

4.2.1.7 POZIOM EKSPRESJI mRNA ENZYMÓW ŚCIEŻKI KATABOLIZMU ROZGAŁĘZIONYCH AMINOKWASÓW

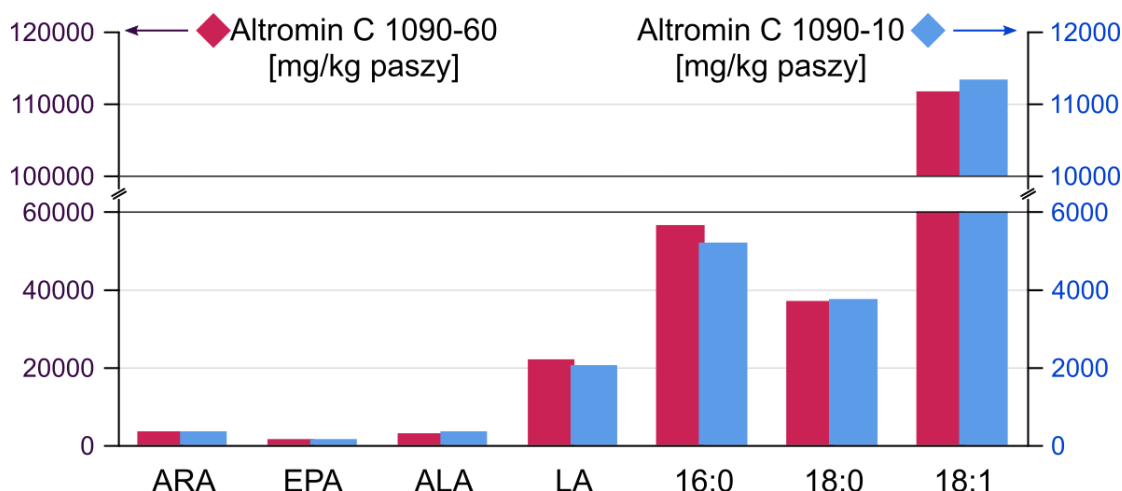
Badanie ekspresji mRNA dla enzymów katalizujących reakcje prowadzące do katabolizmu BCAA – izoleucyny, leucyny oraz waliny, przeprowadzone zostały we współpracy z Katedrą i Zakładem Biochemii Farmaceutycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Oznaczanie wykonane zostało w skupiskach tkanki tłuszczowej: SAT oraz VAT pacjentów z otyłością. Enzymami, których poziom mRNA analizowano były dwie izoformy (cytozolowa – 1 i mitochondrialna – 2) aminotransferazy aminokwasów o rozgałęzionych łańcuchach (BCAT, ang. *branched-chain aminotransferase*), która katalizuje syntezę rozgałęzionych α -ketokwasów z BCAA i α -ketoglutaranu. Drugim oznaczanym enzymem były łańcuchy α i β podjednostki E1 (tetramer E1 α 2E1 β 2) kompleksu dehydrogenazy rozgałęzionych α -ketokwasów (BCKDH, ang. *branched-chain α -ketoacid dehydrogenase*). Kompleks BCKDH katalizuje nieodwracalną reakcję karboksylacji α -ketokwasów (**Rysunek 2.7**), a E1 jest jedną z jej trzech jednostek katalitycznych i ma aktywność dehydrogenazy. Do izolacji całkowitego RNA z ~30 mg badanych tkanek stosowane były zestawy RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen, Hilden, Niemcy) dedykowane do tkanek z wysoką zawartością tłuszczu. Procedura izolacji była prowadzona zgodnie z instrukcją załączoną przez producenta zestawu. Stężenie i czystość uzyskanego RNA określone zostało za pomocą elektroforezy żelowej automatycznym aparatem do analizy jakościowej i ilościowej (Experion, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Po ekstrakcji próbki RNA były traktowane roztworem DNAzy I wolnej od RNazy (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), aby zdegradować śladowe ilości DNA w próbkach. Otrzymana matryca RNA posłużyła do syntezy cDNA w odwrotnej transkrypcji (**RT**, ang. *reverse transcription*) za pomocą zestawu RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), zgodnie z instrukcją załączoną przez producenta. Amplifikację genów kodujących BCKDH i BCAT w reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR, ang. *polymerase chain reaction*) prowadzono na aparacie CFX Connect Real-Time System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Sekwencje starterów zamieszone zostały w Materiałach Uzupełniających. (**Tabela uzupełniająca 12.1**). Specyficzność reakcji była potwierdzana na podstawie wykresów topnienia oraz elektroforezy na żelu agarozowym produktów PCR. Względne poziomy mRNA obliczono wobec genów referencyjnych cyklofiliny oraz β -aktyny.

4.2.2 MYSI MODEL OTYŁOŚCI

W trakcie eksperymentów na zwierzętach charakteryzowano materiał badawczy pochodzący od myszy, u których otyłość indukowano dietą wysokotłuszczową. Ten typ modelu jest dobrym odpowiednikiem ludzkiej otyłości [182] i pozwala lepiej odzwierciedlić główną przyczynę epidemii otyłości, czyli zaburzony bilans energetyczny, niż modele otyłości wywołanej genetycznie [18].

Hodowla myszy eksperymentalnych prowadzona była w Trójmiejskiej Akademickiej Zwierzętarni Doświadczalnej - Centrum Badawczo-Usługowym Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Badania zostały zaakceptowane przez Lokalną Komisję Etyczną ds. doświadczeń na zwierzętach w Bydgoszczy, nr zgody 27/2016.

W badaniach wykorzystywane były samce myszy szczepu C57BL/6J. Znakowane sześciotygodniowe samce o średniej masie ciała $21,8 \pm 1,1$ g, podzielone zostały na dwie grupy. Grupa pierwsza (20 osobników), do badań zmian FA w tkankach, druga grupa (20 osobników), do pomiarów funkcji serca. W obu grupach 10 osobników karmione było standardową dietą (**SD**, *standard diet*), paszą bytową Altromin C 1090-10 (Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage, Niemcy), dostarczającą 3514 kcal/kg energii metabolizowanej o rozkładzie: 10% z tłuszczu, 24% z białek, 66% z węglowodanów. Pozostałe 10 osobników, w celu indukcji otyłości, karmione było dietą wysokotłuszczową (**HFD**, ang. *high-fat diet*), paszą Altromin C 1090-60 (Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage, Niemcy), dostarczającą 3514 kcal/kg energii metabolizowanej o rozkładzie: 60% z tłuszczu, 16% z białek, 24% z węglowodanów. Zgodnie z danymi producenta, proporcje głównych FA były podobne w obu rodzajach paszy (**Rysunek 2.1**), pasza SD zawierała 19 mg/kg cholesterolu, a HFD 139 mg/kg.



Rysunek 4.1 Skład kwasów tłuszczowych w paszach

Altromin C 1090-60 – pasza wysokotłuszczowa, Altromin C 1090-10 – pasza standardowa. Wykres na podstawie ulotki producenta. Nazwy kwasów wielonienasyconych zgodne z Tabelą 1.1.

Myszy hodowane były w klatkach polisulfonowych w pomieszczeniach z kontrolą temperatury (22 ± 2 °C), wilgotności względnej ($55 \pm 10\%$) i regulacją oświetlenia (cykl dzień/noc 12 godzin/12 godzin), system wentylacji zapewniał ≥ 12 wymian powietrza na godzinę. Dostęp do wody i karmy był nieograniczony (*ad libitum*). Cotygodniowo odbywał się pomiar masy ciała osobników (**Rysunek uzupełniający 12.1**) i odnotowywane było spożycie paszy.

Po 18 tygodniach myszy przeznaczone do poboru tkanek zostały uśmiercone poprzez podanie izofluranu (stężenie wprowadzające w znieczulenie: 5%, kontynuacja znieczulenia: 2,0–2,5%) i wykrwawienie. Surowica została otrzymana poprzez wirowanie krwi przez 15 min przy obrotach $3000 \times g$ w temperaturze 4°C i przechowywana w temperaturze -80°C do czasu wykonywania analiz. Od każdego osobnika zostały pobrane następujące tkanki/narządy: mózg, wątroba, fragmenty mięśni szkieletowych, serce, SAT, VAT i tkanka tłuszczowa okołojądrowa (**EAT**, ang. *epididymal adipose tissue*). Masy pobranych tkanek i narządów zebrano w **Tabeli uzupełniającej 12.2**. Pobrany materiał badawczy został natychmiast zamrożony w ciekłym azocie, a następnie był przechowywany w temperaturze -80°C do momentu wykonywania dalszych czynności.

4.2.2.1 POMIARY FUNKCJI SERCA

We współpracy z Katedrą i Zakładem Biochemii Farmaceutycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego dwudziestoczytygodniowe myszy zostały poddane echokardiograficznym pomiarom funkcji serca aparatem Vevo 1100 (VisualSonics Inc,

Toronto, Kanada). Przed rozpoczęciem pomiarów myszy były znieczulane poprzez podanie ketaminy (100 mg/kg masy ciała) i ksylazyny (10 mg/kg masy ciała), sierść z klatki piersiowej została usunięta. W trakcie badania myszy umieszczone były na podgrzewanej platformie, pozwalającej na utrzymanie 37°C temperatury ciała. Echokardiografia wykonywana była przezklatkowo, głowica przykładana była do klatki piersiowej i skierowana w stronę aorty wstępującej. Serce obrazowane było najpierw w trybie dwuwymiarowym, umożliwiającym pomiary powierzchni i objętości, a następnie w badaniu dopplerowskim, umożliwiającym ocenę przepływu krwi przez serce. Uzyskane zostały następujące parametry: objętość końcoworozkurczowa lewej komory (**LVEDV**, ang. *left ventricular end-diastolic volume*), objętość końcowoskurczowa lewej komory (**LVESV**, ang. *left ventricular end-systolic volume*), frakcja wyrzutowa lewej komory (**LVEF**, ang. *left ventricular ejection fraction*), objętość wyrzutowa (**SV**, ang. *stroke volume*), pojemność minutowa/rzut serca (**CO**, ang. *cardiac output*) oraz pole powierzchni ujścia zastawkowego (**AVA**, ang. *aortic valve area*) wyznaczone za pomocą równania ciągłości na podstawie pomiaru pola przekroju poprzecznego drogi odpływu lewej komory, prędkości przepływu przez drogę odpływu lewej komory i prędkości przepływu przez zastawkę aorty (**V_{max}**).

4.2.2.2 OZNACZANE PARAMETRY BIOCHEMICZNE

We współpracy z Katedrą i Zakładem Biochemii Farmaceutycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, w tkance mięśnia sercowego oznaczone zostały parametry biochemiczne przy użyciu analizatora biochemicznego Erba XL-100 – TAG, białko całkowite (parametr konieczny do oznaczenia poziomu karbonylacji białek) oraz, metodami enzymatyczno-kolorymetrycznymi, markery stresu oksydacyjnego – poziom karbonylacji białek, poziom peroksydacji lipidów; a także wolny cholesterol. Ponadto w surowicy myszy oznaczone zostało stężenie FFA.

4.2.2.2.1 OZNACZANIE POZIOMU KARBONYLACJI BIAŁEK

Pomiar poziomu karbonylacji białek w tkance mięśnia sercowego przeprowadzono przy użyciu zestawu Protein Carbonyl Content Assay Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), zgodnie z instrukcją załączoną przez producenta. Pomiar ilości stabilnych grup karbonylowych, które powstają w wyniku utleniania białek w rezultacie działania ROS, umożliwia ocenę uszkodzeń wywołanych stresem oksydacyjnym. Stosowana metoda polega na spektrofotometrycznym pomiarze stabilnych adduktów 2,4-dinitrofenylu, powstających w wyniku reakcji pochodnych karbonylowych z 2,4-dinitrofenylohydrazyną. Do 100 µl

homogenatu tkankowego o zawartości białka ~ 10 mg/ml dodano 100 μ l roztworu 2,4-dinitrofenylohydrazyny, wytrząsnięto. Po 10 min inkubacji w temperaturze pokojowej dodano 30 μ l 87% kwasu trichlorooctowego, wytrząsnięto i inkubowano na lodzie przez 5 min. Następnie próbki były wirowane przez 2 minuty przy $13000 \times g$, po czym usunięto supernatant. Osad był przemywany dwukrotnie 500 μ l zimnego acetonu, sonifikowany, następnie inkubowany w -20°C przez 5 min i odwirowywany przez 2 minuty przy $13000 \times g$. Otrzymany osad sonifikowano z 200 μ l 6 M chlorowodoru guanidyny. Po 100 μ l otrzymanego roztworu przeniesiono do 96-dołkowych płytek w duplikacie i zmierzona została absorbancja przy długości fali 375 nm spektrofotometrem mikropłytkowym Synergy HT multi-plate microplate reader (BioTek, Winooski, VT, USA). Wyniki poziomu karbonylacji białek obliczone na podstawie krzywej kalibracyjnej wyrażono w postaci nmol/mg całkowitego białka, zmierzonego przy użyciu analizatora biochemicznego Erba XL-100.

4.2.2.2.2 OZNACZANIE POZIOMU PEROKSYDACJI LIPIDÓW

Ocena poziomu peroksydacji lipidów w tkance mięśnia sercowego przeprowadzona została przy użyciu zestawu do pomiaru substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS, ang. *thiobarbituric acid reactive substances*) Assay Kit (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA), w którym wykrywany jest głównie hydroksyaldehyd dwumalonowy będący produktem wolnorodnikowej peroksydacji lipidów. Do 25 mg tkanki dodawano 250 μ l buforu lizującego RIPA i homogenizowano na lodzie. Próbki odwirowywano przez 10 min przy obrotach $13000 \times g$ w temperaturze 4°C i 100 μ l przenoszono do 5 ml fiolek. Po dodaniu i wymieszaniu z supernatantem 100 μ l roztworu laurylosiarczanu sodu, próbki były inkubowane przez 60 min w gotującej się wodzie z barwnym odczynnikiem, zawierającym kwas tiobarbiturowy, kwas octowy oraz wodorotlenek sodu, przygotowanym zgodnie z instrukcją producenta. Reakcja została przerwana poprzez umieszczenie fiolek w łaźni lodowej. Po 10 min inkubacji na lodzie fiolki wirowano przez 10 min przy obrotach $13000 \times g$ w temperaturze 4°C , po 150 μ l (w duplikacie) przenoszone było do 96-dołkowych płytek. Absorbancja została zmierzona przy długości fali 532 nm spektrofotometrem mikropłytkowym Synergy HT. Stężenie TBARS obliczone zostało na podstawie krzywej kalibracyjnej przygotowanej zgodnie z instrukcją dostarczoną przez producenta zestawu.

4.2.2.2.3 OZNACZANIE WOLNEGO CHOLESTEROLU

Do pomiaru wolnego cholesterolu w tkance mięśnia sercowego wykorzystany został reagent do ilościowego oznaczania metodą enzymatyczno-kolorymetryczną (Greiner Diagnostic GmbH, Baden-Württemberg, Niemcy). Wskaźnikiem jest chinoimina, powstająca

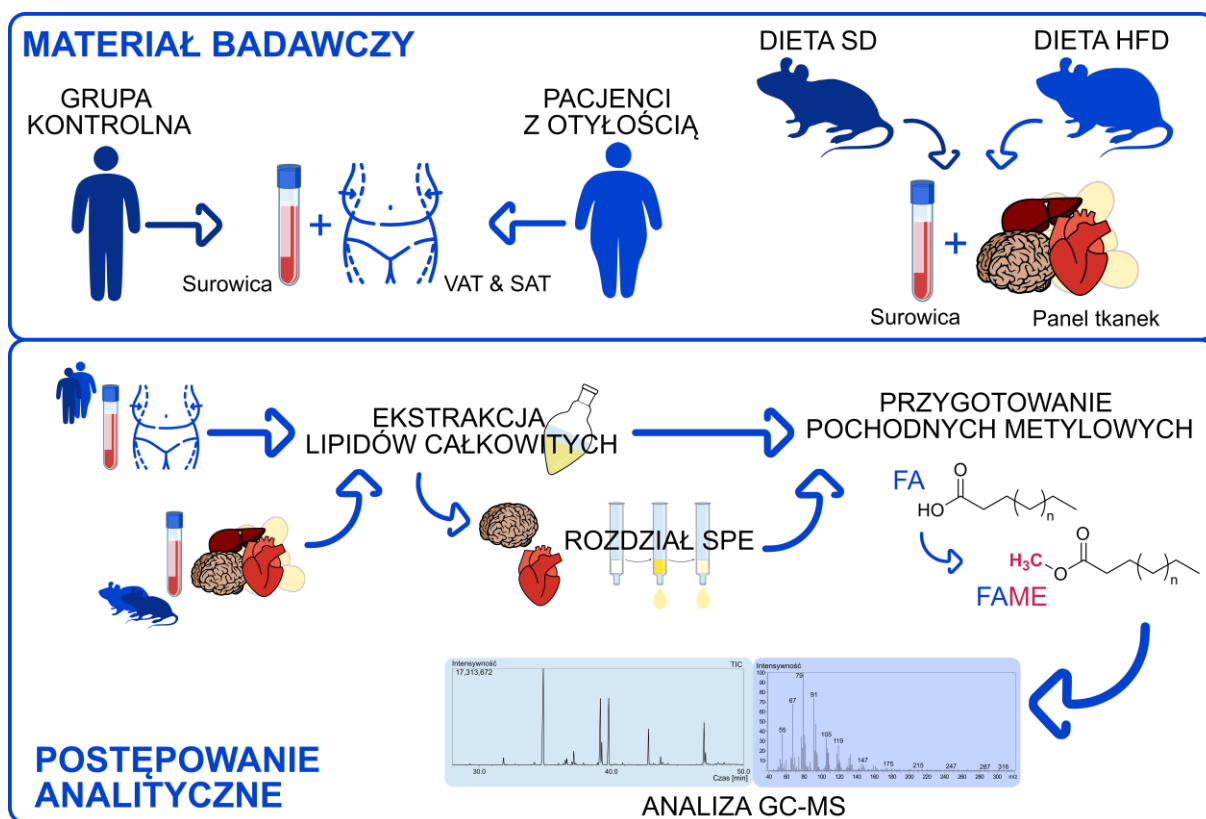
w reakcji katalizowanej przez peroksydazę z 4-aminoantypiryny i 4-chlorofenolu i nadtlenu wodoru, obecnego w mieszaninie reakcyjnej poprzez działanie oksydazy cholesterolowej. Pomiar został wykonany zgodnie z instrukcją dostarczoną przez producenta. Do 10 μ l supernatantu uzyskanego po homogenizacji tkanki dodano 1 ml reagenta, inkubowano przez 20 min w temperaturze 37°C i absorbancja została zmierzona przy długości fali 546 nm spektrofotometrem mikropłytkowym Synergy HT. Stężenie wolnego cholesterolu obliczone zostało na podstawie krzywej kalibracyjnej przygotowanej zgodnie z instrukcją dostarczoną przez producenta zestawu.

4.2.2.2.4 OZNACZANIE STĘŻENIA WOLNYCH KWASÓW TŁUSZCZOWYCH

Stężenie FFA w surowicy oznaczano wykorzystując zestaw Free Fatty Acid Assay Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), pozwalający na oznaczenie stężenia FFA o łańcuchach acylowych dłuższych niż siedmiowęglowe, postępując zgodnie z instrukcją dostarczoną przez producenta. Po 50 μ l surowicy naniesiono na 96-dołkową płytkę i dodano 2 μ l roztworu syntetazy acetylo-CoA i inkubowano w ciemności przez 30 min w temperaturze 37°C. Do każdego dołka dodano 50 μ l mieszaniny reakcyjnej zawierającej mieszaninę enzymatyczną (2 μ l), bufor (44 μ l), sondę molekularną (2 μ l) i wzmacniacz sygnału (2 μ l). Stężenie FFA wyznaczone zostało wobec krzywej kalibracyjnej kwasu 16:0, na podstawie pomiaru absorbancji, zmierzonej przy długości fali 570 nm spektrofotometrem mikropłytkowym Synergy HT.

4.3 ANALIZA KWASÓW TŁUSZCZOWYCH

Ogólny schemat postępowania z materiałem biologicznym pochodzącym od ludzi oraz od myszy eksperymentalnych został zaprezentowany na schemacie (**Rysunek 4.2**). Z ludzkiej i mysiej surowicy oraz z dwóch skupisk tkanki tłuszczowej pochodzących od pacjentów i tkanek/narządów uzyskanych od myszy, przygotowano ekstrakty lipidów całkowitych, w których przeprowadzono oznaczanie FA techniką GC-MS. Ekstrakty lipidów całkowitych poddawano hydrolizie i derywatywacji, zatem profile FA otrzymane w wyniku tych analiz odzwierciedlają profil FA całej puli lipidów, łącznie z FA związanymi w lipidach złożonych. Organy pobrane od myszy eksperymentalnych – mózgi i serca zostały dodatkowo poddane rozdzielaniu techniką SPE, w celu oddzielnej analizy składu FA w różnych grupach lipidów.



Rysunek 4.2 Ogólny schemat postępowania analitycznego

FA - kwasy tłuszczowe, **FAME** - pochodne metylole kwasów tłuszczowych, **HFD** - dieta wysokotłuszczowa, **GC-MS** - chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas, **SAT** - tkanka tłuszczowa podskórna, **SD** - dieta standardowa, **SPE** - ekstrakcja do fazy stałej, **VAT** - tkanka tłuszczowa otrzewnowa. Schemat własny.

4.3.1 EKSTRAKCYJA LIPIDÓW CAŁKOWITYCH Z MATERIAŁU BIOLOGICZNEGO

Całkowite lipidy ekstrahowano z materiału biologicznego wykorzystując mieszaninę rozpuszczalników $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (2:1, v/v) zgodnie z metodą opracowaną przez Folcha [183]. Zamrożone fragmenty tkanek lub organów zostały umieszczone w porcelanowym moździercu i homogenizowane z 15 ml mieszaniny $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (2:1, v/v). Do ekstrakcji wykorzystano 20 – 30 mg tkanki tłuszczowej, 150 – 250 mg mięśni szkieletowych, 50 – 150 mg wątroby, 300 – 400 mg mózgu oraz serca w całości. Całkowite lipidy z surowicy (po 300 μl) ekstrahowano z użyciem 15 ml mieszaniny $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (2:1, v/v) w szklanych probówkach poprzez wytrząsanie na wytrząsarce typu vortex (IKA® Poland Sp. z o.o., Warszawa, Polska) przez 1 min. Na początku ekstrakcji, przed dodaniem rozpuszczalników, do surowicy i tkanek

dodawany był wzorzec wewnętrzny (**IS**, ang. *internal standard*) – 50 µl roztworu rozgałęzionego kwasu arachidowego (19-M-20:0, *19-methylarachidic acid*, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) w dichlorometanie o stężeniu 1 mg/ml.

Homogenizat tkankowy oraz ekstrakty z surowicy były filtrowane przez sączki celulozowe do kolb sercowych. W celu zwiększenia efektywności przemywania do odfiltrowanych ekstraktów dodawano 4 ml roztworu soli fizjologicznej, przygotowanym poprzez rozpuszczenie naważki 9 g chlorku sodu w H₂O dejonizowanej. Kolby wytrząsano przez 1 min i pozostawiano, aby rozdzielić fazę wodną i organiczną. Dolna faza organiczna, zawierająca wyekstrahowane lipidy, była przenoszona do czystej kolby sercowej za pomocą szklanej pipety Pasteura. Rozpuszczalnik odparowywano na wyparce rotacyjnej (IKA® Poland Sp. z o.o., Warszawa, Polska) do objętości ~ 1,5 ml, następnie zatężony ekstrakt był przenoszony do czystej 2 ml fiolki i wysuszony do sucha pod strumieniem ciepłego azotu. W przypadku tkanek mysich otrzymany ekstrakt lipidowy był rozdzielany do dwóch fiolek – pierwsza, do analizy FA w lipidach całkowitych (~1 mg lipidów), druga, do rozdziełań za pomocą SPE (~ 3 mg lipidów). Wysuszone ekstrakty lipidowe były przechowywane w temperaturze -80°C do czasu wykonywania dalszych czynności.

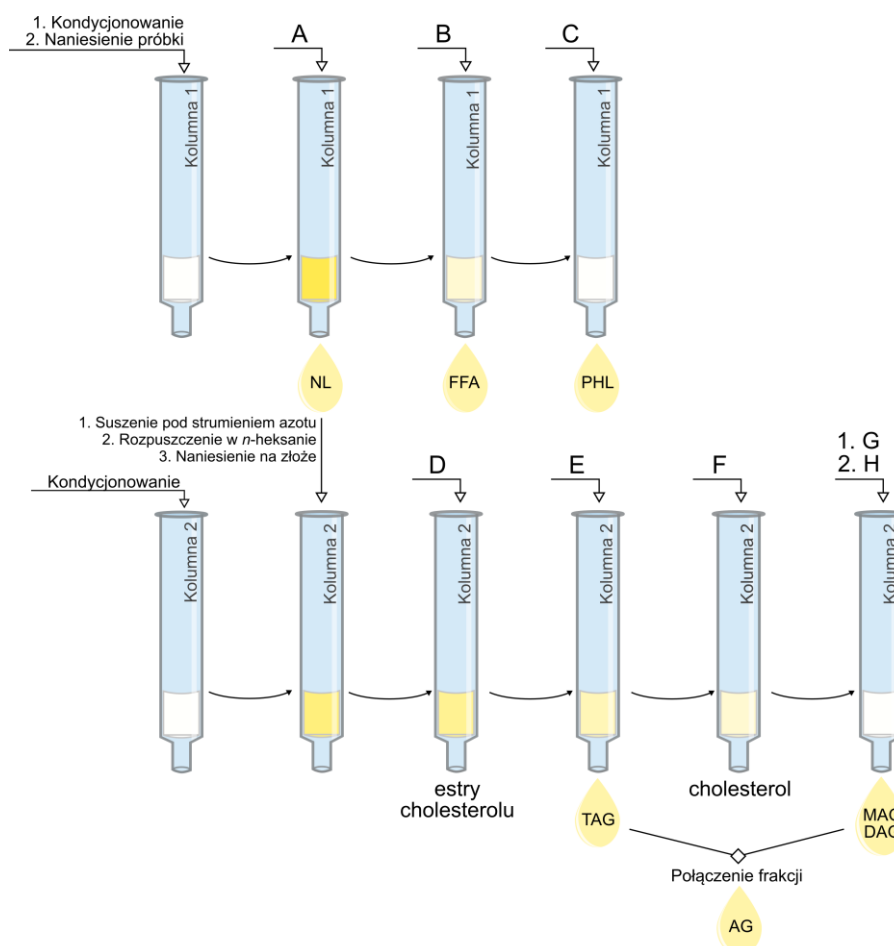
4.3.2 ROZDZIAŁ LIPIDÓW TECHNIKĄ EKSTRAKCJI DO FAZY STAŁEJ

Do frakcjonowania lipidów całkowitych wyekstrahowanych z mysich mózgow i serc zastosowano dwie metody rozdzieła SPE na kolumnkach ze złożem aminopropylowym (Strata® NH2 500 mg, Phenomenex®, Torrance, CA, USA). Metoda I bazowała na protokole opisanym przez Kaluzny'ego i wsp. [184] i pozwoliła na uzyskanie frakcji wolnych KT, PHL oraz acylogliceroli (**AG**, ang. *acylglycerols*). Metoda II opierała się na protokole opublikowanym przez Bodenneca i wsp. [185] i pozwala na uzyskanie **i**) frakcji neutralnych lipidów (**NL**, ang. *neutral lipids*), niezawierającej ceramidów i wolnych FA, **ii**) frakcji Cer, **iii**) frakcji glikosfingolipidów (**GSPL**, ang. *glycosphingolipids*) oraz **iv**) frakcję neutralnych fosfolipidów – **SM**. Podczas prowadzenia rozdziełań kolumnki SPE umieszone były na 12-stanowiskowej komorze próżniowej do SPE (Phenomenex®, Torrance, CA, USA).

4.3.2.1 ROZDZIAŁ LIPIDÓW - METODA I

Lipidy całkowite otrzymane w wyniku ekstrakcji Folcha (ok. ~ 3 mg) zostały rozpuszczone w ~ 1 ml chloroformu w 2 ml szklanych fiolkach i wytrząśnięte, a następnie

za pomocą szklanej pipety Pasteura naniesione na złoże adsorbentu, które uprzednio kondycjonowano dwukrotną objętością 2 ml *n*-heksanu. Schemat postępowania zaprezentowano poniżej (**Rysunek 4.3**). Otrzymana w pierwszym etapie ekstrakcji frakcja NL, zawierająca AG oraz cholesterol i jego estry, była suszona pod strumieniem azotu, rozpuszczana w *n*-heksanie i nakładana na drugą kolumnę do SPE, prekondycjonowaną *n*-heksanem, w celu usunięcia z próbki cholesterolu i jego estrów – frakcje wmywane odpowiednio roztworami D i F. Skład i objętość rozpuszczalników zastosowanych do odmywania matrycy i elucji analitów przedstawiony został w **Tabeli 4.2**. Każda z zebranych frakcji była suszona pod strumieniem azotu do objętości ~ 1 ml i przenoszona do czystej, szklanej fiolki o objętości 2 ml, za pomocą szklanej pipety Pasteura. Po odparowaniu do sucha pod strumieniem azotu próbki były przechowywane w temperaturze -80°C do czasu przeprowadzania derywatywacji.



Rysunek 4.3 Schemat frakcjonowania lipidów - metoda I

Frakcje zaznaczone **na żółto** były zbierane. **AG** - połączona frakcja acylogliceroli, **DAG** - diacyloglicerole, **FFA** - wolne kwasy tłuszczowe, **MAG** - monoacyloglicerole, **NL** - neutralne lipidy, **PHL** - fosfolipidy, **TAG** - triacyloglicerole. Oznaczenia literowe roztworów zgodnie z Tabelą 4.2. Rysunek własny na podstawie Kaluznego i wsp. [184].

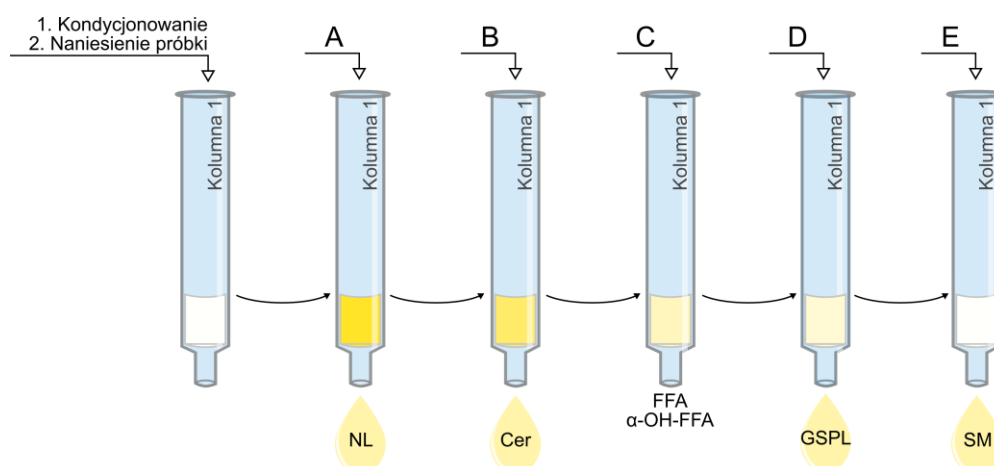
Tabela 4.2 Roztwory zastosowane podczas frakcjonowania lipidów metodą I

Roztwór	Eluowana frakcja lipidowa	Skład roztworu	Objętość [ml]
A	NL	chloroform:izopropanol (1:1, v/v)	2 x 3 ml
B	FFA	2% kwas octowy w eterze dietylowym	2 x 3 ml
C	PHL	metanol	2 x 3 ml
D	estry cholesterolu	<i>n</i> -heksan	2 x 3 ml
E	TAG	1% eter dietylowy, 10% dichlorometan w <i>n</i> -heksanie	3 x 3 ml
F	cholesterol	5% octan etylu w <i>n</i> -heksanie	9 x 3 ml
G	DAG	15% octan etylu w <i>n</i> -heksanie	2 x 3 ml
H	MAG	chloroform:metanol (2:1, v/v)	2 x 3 ml

DAG - diacyloglicerole, **FFA** - wolne kwasy tłuszczowe, **MAG** - monoacyloglicerole, **NL** - neutralne lipidy, **PHL** - fosfolipidy, **TAG** - triacyloglicerole. Na podstawie Kaluznego i wsp. [184].

4.3.2.2 ROZDZIAŁ LIPIDÓW - METODA II

Ekstrakty lipidów całkowitych otrzymane w wyniku czynności opisanych w **sekcji 4.3.1** zostały rozpuszczone w ~ 1 ml chloroformu i naniesione na kolumnkę do SPE, w której złożę adsorbentu zostało wcześniej kondycjonowane dwukrotnie 2,5 ml *n*-heksanu. Schemat postępowania i kolejno eluowane frakcje został zaprezentowany na **Rysunku 4.4**, skład i objętość zastosowanych roztworów zebrano w **Tabeli 4.3**. Frakcja wmywana roztworem C, zawierająca FFA i α -hydroksylowane FFA była odrzucana. W przypadku ekstraktów mózgowych nie zbierano również frakcji NL, skupiając się głównie na frakcjach fosfo- oraz sfingolipidowych, które dominują [186]. Każda ze zbieranych frakcji była suszona pod strumieniem azotu i przechowywana w -80°C do czasu przeprowadzania derywatywacji.



Rysunek 4.4 Schemat frakcjonowania lipidów - metoda II

α -OH-FFA - α -hydroksylowane wolne kwasy tłuszczowe, **Cer** - ceramidy, **FFA** - wolne kwasy tłuszczowe, **GSPL** - glikosfingolipidy, **NL** - neutralne lipidy, **SM** - sfingomieliny. Frakcje zaznaczone na żółto były zbierane. Oznaczenia literowe roztworów zgodnie z Tabelą 4.3. Schemat własny na podstawie Bodenneca i wsp. [185].

Tabela 4.3 Roztwory zastosowane podczas frakcjonowania lipidów metodą II

Roztwór	Eluowana frakcja lipidowa	Skład roztworu	Objętość [ml]
A	NL	octan etylu: <i>n</i> -heksan (15:85, v/v)	2 x 2,5 ml
B	Cer	chloroform:metanol (23:1, v/v)	2 x 2 ml
C	FFA i α -OH-FFA	eter diizopropylow:kwas octowy (98:5, v/v)	3 ml
D	GSPL	aceton:metanol (9:1,35, v/v)	3 x 3 ml + 2 ml
E	SM	chloroform:metanol (2:1, v/v)	2 x 2 ml

α -OH-FFA - α -hydroksylowane wolne kwasy tłuszczowe, **Cer** - ceramidy, **FFA**, wolne kwasy tłuszczowe, **GSPL** - glikosfingolipidy, **NL** - neutralne lipidy, **SM** - sfingomieliny. Na podstawie Bodenneca i wsp. [185].

4.3.3 DERYWATYZACJA KWASÓW TŁUSZCZOWYCH

Ekstrakty lipidów całkowitych otrzymane zgodnie z opisem w **sekcji 4.3.1** oraz frakcje lipidowe uzyskane w wyniku rozdziału z wykorzystaniem SPE, opisanym w **sekcji 4.3.2**, poddawano derywatywacji w celu uzyskania lotnych estrów metylowych FA (**FAME**, ang. *fatty acid methyl esters*), które są powszechnie stosowane w analizie FA za pomocą GC-MS [75]. Zastosowana procedura polegała na przeprowadzeniu w pierwszym kroku zasadowej hydrolizy (saponifikacji), co pozwoliło przerwanie wiązania estrowego i uwolnienie FA ze wszystkich lipidów złożonych. Do hydrolizy zastosowany został KOH w metanolu. W drugim kroku metylację FA prowadzono w obecności kwasowego katalizatora BF_3 w 10% metanolu (boron-

trifluoride-methanol solution, Supelco®, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Zastosowanie saponifikacji, po której następuje estryfikacja umożliwia otrzymanie FAME zarówno z FA związanych w lipidach złożonych, jak i FFA [187].

Do wysuszonych ekstraktów lipidów całkowitych dodawano 1 ml 0,5 M roztworu KOH w metanolu i prowadzono hydrolizę w bloczku grzejmym (Labnet International, Edison, NJ, USA) przez 180 min w temperaturze 90°C. Zakrętki naczynek, w których przeprowadzano reakcję zabezpieczano dodatkowo taśmą PTFE, aby zapobiec wyparowaniu rozpuszczalnika i zateżeniu odczynnika do derywatywacji, co może prowadzić do rozkładu PUFA [188]. Po zakończeniu ogrzewania mieszaniny były pozostawiane do ostygnięcia do temperatury pokojowej i reakcja była zatrzymywana poprzez dodanie 0,5 ml 6 M HCl. Zakwaszone mieszaniny były przenoszone do fiolek o objętości 4 ml, do których następnie dodano 1 ml H₂O dejonizowanej oraz 1 ml *n*-heksanu. Próbki były wytrząsane przez 1 min, a następnie górna faza organiczna, zawierająca FA była przenoszona do czystej fiolki o pojemności 4 ml za pomocą szklanej pipety Pasteura. Do dolnej fazy wodnej dodawano *n*-heksan i ekstrakcja FA była powtarzana. Ostatecznie FA ekstrahowane były trzema porcjami po 1 ml *n*-heksanu, a następnie połączone fazy organiczne były suszone pod strumieniem azotu. Do fiolek dodawano 0,5 ml odczynnika derywatywacyjnego i prowadzono reakcję estryfikacji przez 90 min w temperaturze 55°C w bloczku grzejmym. Podczas ogrzewania próbki były mieszane przez inwersję. Po zakończeniu derywatywacji do fiolek dodawano 1 ml wody dejonizowanej i FAME ekstrahowano trzykrotnie 1 ml *n*-heksanu jak opisano powyżej. Faza organiczna, zawierająca FAME była przenoszona do 2 ml naczynek chromatograficznych i odparowywana do sucha po każdej porcji *n*-heksanu. Przygotowane FAME przechowywane były w temperaturze -20°C do czasu analizy GC-MS.

4.3.4 ANALIZA PROFILU KWASÓW TŁUSZCZOWYCH ZA POMOCĄ GC-MS

Profil FA w materiale biologicznym uzyskiwano w wyniku analizy FAME za pomocą techniki GC-MS. Chromatograf gazowy GC-2010 Plus sprzężony był z kwadropolowym detektorem mas QP-2010 SE (GCMS-QP 2010 SE, Shimadzu, Kyoto, Japonia), gdzie próbka była jonizowana strumieniem elektronów (EI, ang. *electron ionization*). Rozdział chromatograficzny prowadzony był na kolumnie kapilarnej ZB-5MSi (30 m × 0,25 mm średnicy, 0,25 mm grubość warstwy fazy stacjonarnej, Phenomenex®, Torrance, CA, USA), w której związaną fazą stacjonarną jest 95% dimetylo-5% difenylopolisiloksan. Użyteczność

tej fazy w analizie FA w materiale pochodzenia biologicznego została uprzednio zweryfikowana w Katedrze Analizy Środowiska Uniwersytetu Gdańskiego [189] dla ZB-5, faza ZB-5Msi jest ulepszeniem tej fazy z niewielkim wpływem z kolumny. Warunki prowadzenia analizy GC-MS zebrane zostały w **Tabeli 4.4**, czas analizy wynosił 60 min. Przed analizą GC-MS próbki były rozmrażane i pozostawiane do osiągnięcia temperatury pokojowej, a następnie rozpuszczane w dichlorometanie, w ilości 100 µl na 1 mg FAME.

Identyfikacja związków była możliwa na podstawie porównania uzyskanych widm mas z widmami mas zgromadzonymi w bazie danych NIST 11 przeszukiwaną za pomocą algorytmu wbudowanego w oprogramowanie LabSolutions GCMSsolution Ver. 4.2 (Shimadzu, Kyoto, Japonia) oraz porównanie widm mas i czasów retencji z mieszaniną wzorców analitycznych (Supelco 37 Component FAME Mix, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Tabela 4.4 Warunki analizy GC-MS kwasów tłuszczowych

Element systemu	Chromatograf gazowy
Temperatura dozownika	300°C
Tryb pracy dozownika	z podziałem strumienia gazu nośnego (ang. <i>split ratio</i>) 20:1
Gaz nośny	hel, ciśnienie na wlocie kolumny 100 kPa, natężenie przepływu przez kolumnę 1,61 ml/min
Objętość dozowanej próbki	1 µl
Temperatura pieca	60-300°C, narost 4°C/min
Element systemu	Spektrometr mas
Temperatura źródła jonów	200°C
Temperatura interfejsu	300°C
Odcięcie rozpuszczalnika	8 min
Tryb zbierania danych	pełen skan (ang. <i>full scan</i>) w zakresie 45 - 700 m/z

Tabela własna.

4.4 ANALIZA OKSYLIPIN

4.4.1 EKSTRAKCJA OKSYLIPIN Z SUROWICY KRWII

4.4.1.1 ANALITY

W rozprawie wprowadzono skróty nazw oksylipin, natomiast synonimy nazw po polsku oraz nazwy zgodnie z angielską nomenklaturą IUPAC zawarto w **Tabeli 1.2**. Wybrana do oznaczenia w surowicy pacjentów bariatrycznych grupa oksylipin obejmowała zarówno metabolity ARA, najczęściej charakteryzowane w materiale biologicznym [108], jak i mniej często oznaczane metabolity LA, ważnego egzogenego PUFA, którego zawartość w tkance tłuszczowej jest najwyższa (zgodnie z wynikami zamieszczonymi w Materiałach uzupełniających w **Tabeli uzupełniającej 12.3**). Do analizy włączono również oksylipiny powstające z EPA i DHA, wiele z których stanowi ważne, przeciwzapalne wyspecjalizowane mediatory lipidowe (**SPM**, ang. *specialized pro-resolving mediator*) [115,190,191]. Wybór poszczególnych analitów był dodatkowo umotywowany różnymi ścieżkami syntezy, w jakich powstają oraz istnieniem doniesień literaturowych o funkcjach w otyłości, w chorobach towarzyszących otyłości, lub w których otyłość jest czynnikiem ryzyka wśród ludzi, w modelach zwierzęcych lub komórkowych, co zostało podsumowane w **Tabeli 4.5**.

Tabela 4.5 Charakterystyka analitów

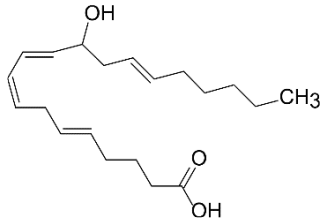
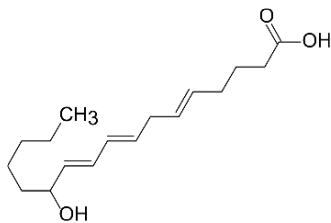
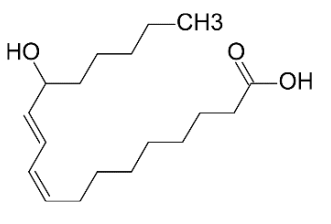
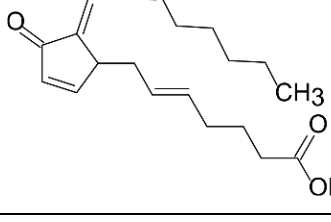
Skrót	Wzór strukturalny †	Prekursor	Główna ścieżka syntezy	Działanie
12-HETE		ARA	12-LOX	prozapalny, indukuje stres retikulum endoplazmatycznego, reguluje w górę IL-6, TNF- α , zaburza sygnalizację insuliny
12-HHT		ARA	COX	prozapalny, wzmaga chemotaksję granulocytów
13-HODE		LA	15-LOX lub COX lub nieenzymatyczna oksydacja	aktywator PPAR- γ
15d-PGJ2		ARA	COX oraz nieenzymatyczna oksydacja	przeciwzapalny, indukuje katabolizm lipidów, stymuluje adipogenezę, powoduje zmniejszenie produkcji leptyny

Tabela 4.5 (c.d.) Charakterystyka analitów

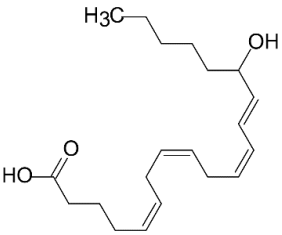
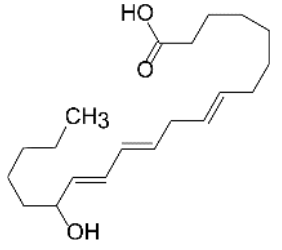
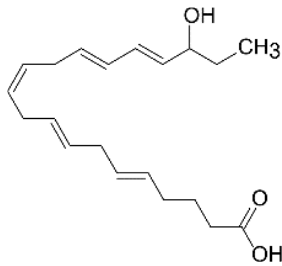
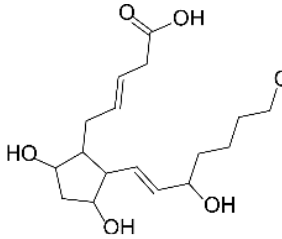
Skrót	Wzór strukturalny †	Prekursor	Główna ścieżka syntezy	Działanie
15-HETE		ARA	15-LOX / COX	reguluje w górę IL-6, TNF- α , prekursor do syntezy LX serii 4, aktywuje PPAR- γ
15-HETrE		DGLA	15-LOX	powoduje inhibicję produkcji LTB4 i oksydacji ARA antyproliferacyjny
18-HEPE		EPA	aktywność ω -hydroksylazy CYP450	indukuje adipogenezę, aktywuje PPAR- γ , prekursor RvE1
2,3-dinor-8-izo-PGF2α		ARA	nieenzymatycznie	marker stresu oksydacyjnego

Tabela 4.5 (c.d.) Charakterystyka analitów

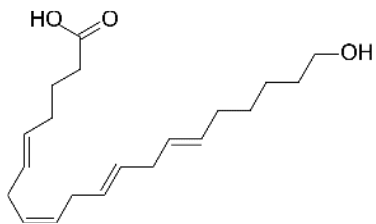
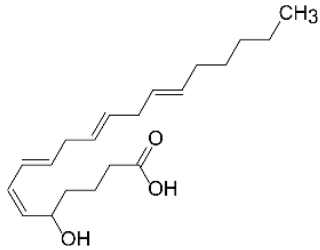
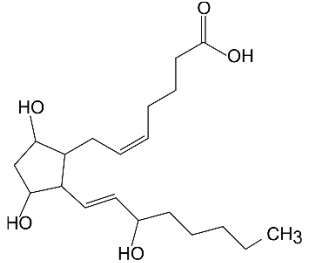
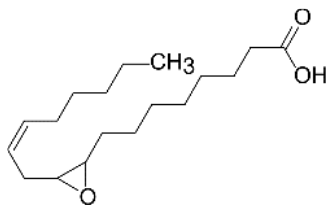
Skrót	Wzór strukturalny †	Prekursor	Główna ścieżka syntezy	Działanie
20-HETE		ARA	aktywność ω -hydroksylazy CYP450	stymuluje produkcję prozapalnych cytokin, promuje powstawanie stanu zapalnego w naczyniach krwionośnych, indukuje zwężanie naczyń krwionośnych
5-HETE		ARA	5-LOX	prozapalny stymuluje proliferację komórek rakowych,
8-epi-PGF2α		ARA	nieenzymatyczna oksydacja	promuje zwężanie naczyń krwionośnych, marker stresu oksydacyjnego
9(10)-EpOME		LA	aktywność epoksygenazy CYP450	leukotoksyczny

Tabela 4.5 (c.d.) Charakterystyka analitów

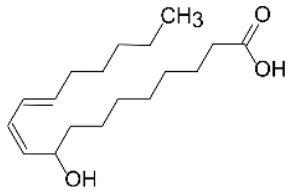
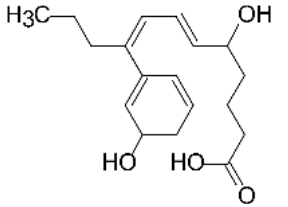
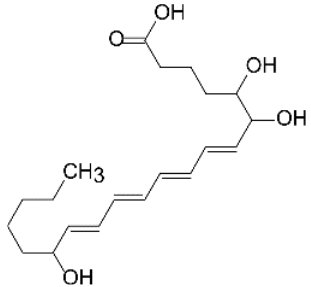
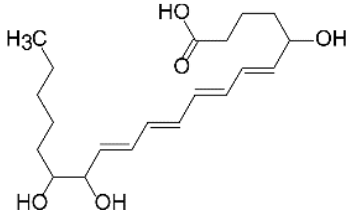
Skrót	Wzór strukturalny †	Prekursor	Główna ścieżka syntezy	Działanie
9-HODE		LA	COX lub nieenzymatyczna oksydacja	prozapalny ligand PPAR-γ, indukuje stres retikulum endoplazmatycznego w makrofagach
LTB4		ARA	5-LOX i hydrolaza LTA4	stymuluje wydzielanie IL-6, TNF-α, chemoatraktant makrofagów, promuje proliferację komórek rakowych
LXA4		ARA	15-LOX	SPM, stymuluje ekspresję IL-10 - przeciwzapalnej cytokiny, zwiększa wrażliwość na insulinę, powoduje niższą ekspresję prozapalnej IL-6
LXB4		ARA	15-LOX	przeciwzapalny SPM

Tabela 4.5 (c.d.) Charakterystyka analitów

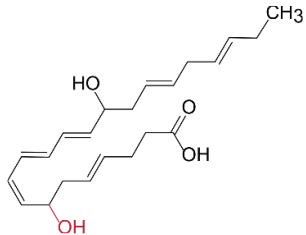
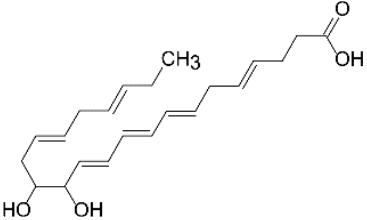
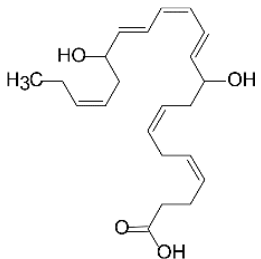
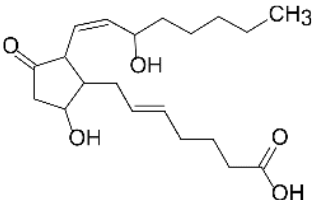
Skrót	Wzór strukturalny †	Prekursor	Główna ścieżka syntezy	Działanie
Mar1 / 7S-Mar1		DHA	12-LOX	przeciwzapalny SPM / izomer SPM
Mar2		DHA	12-LOX	przeciwzapalny SPM
PDX		DHA	15-LOX	przeciwzapalny SPM, indukuje katabolizm lipidów, powoduje obniżenie produkcji ROS i aktywność COX w neutrofilach, poprawia wrażliwość na insulinę
PGD2		ARA	COX + specyficzna syntaza PG	moduluje lipolizę, prozapalny w nanomolowych stężeniach, przeciwzapalny w mikromolowych stężeniach

Tabela 4.5 (c.d.) Charakterystyka analitów

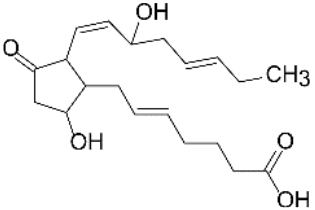
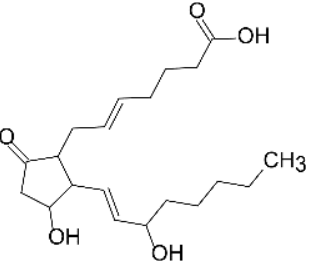
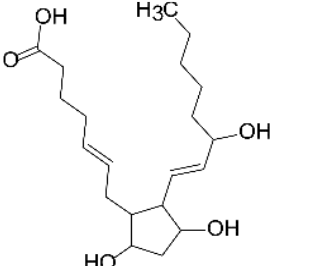
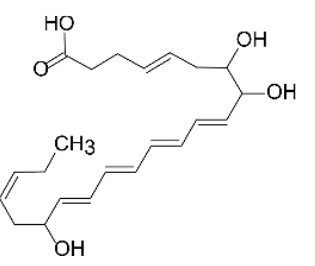
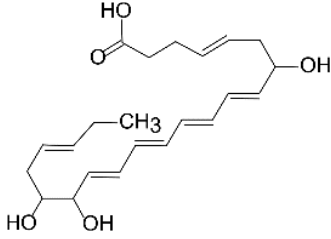
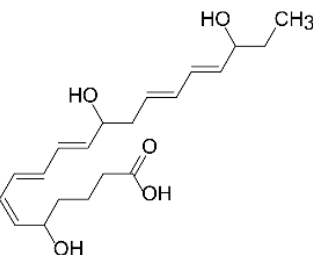
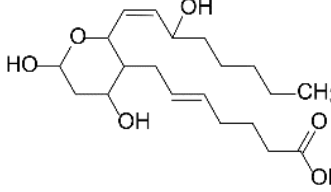
Skrót	Wzór strukturalny †	Prekursor	Główna ścieżka syntezy	Działanie
PGD3		EPA	COX	przeciwzapalny
PGE2		ARA	COX + specyficzna syntaza PG	prozapalny lub przeciwzapalny, moduluje adipogenezę i lipolizę, stymuluje uwalnianie leptyny, stymuluje wzrost komórek raka jelita grubego
PGF2α		ARA	COX + specyficzna syntaza PG	związany ze zwiększonym stanem zapalnym, wpływa na zwiększenie transportu glukozy, promuje zwężanie naczyń krwionośnych
RvD1		DHA	15-LOX	przeciwzapalny SPM, poprawia wrażliwość na insulinę, reguluje w dół: IL-6, TNF-α, ROS, w górę: adiponektynę, inicjuje przejście makrofagów do fenotypu M2

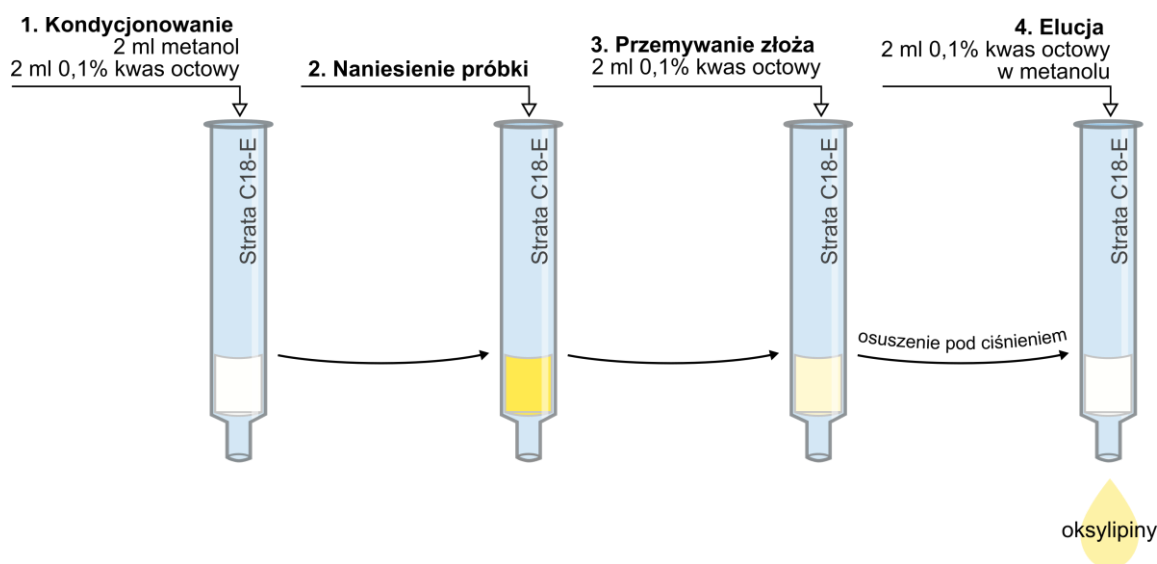
Tabela 4.5 (c.d.) Charakterystyka analitów

Skrót	Wzór strukturalny †	Prekursor	Główna ścieżka syntezy	Działanie
RvD2		DHA	15-LOX	przeciwzapalny SPM, poprawia wrażliwość na insulinę; reguluje w dół: IL-6, TNF- α , ROS, w górę: adiponektynę inicjuje przejście makrofagów do fenotypu 2
RvE1		EPA	COX lub CYP450	przeciwzapalny SPM
TXB2		ARA	COX oraz syntaza TX	stabilny produkt TXA2, mediatora aktywującego krzepnięcie krwi i zwężanie naczyń krwionośnych m.in. w odpowiedzi na stan zapalny

† Stereochemia pominięta dla uproszczenia, **na czerwono** zaznaczono ugrupowanie różniące Mar1 i 7S-Mar 1. **COX** - cyklooksygenaza, **CYP450** - cytochrom P450, **IL** - interleukina, **LOX** - lipooksygenaza, **PG** - prostaglandyna, **PPAR- γ** - receptor aktywowany przez proliferatory peroksyosomów γ , **ROS** - reaktywne formy tlenu, **SPM** - wyspecjalizowany mediator lipidowy wygaszający stan zapalny (ang. *specialized pro-resolving mediator*), **TNF- α** - czynnik martwicy nowotworów, **TX** - tromboksan, nazwy kwasów tłuszczowych i oksylipin zgodne z tabelami (odpowiednio Tabela 1.1 i Tabela 1.2). **Oksylipiny** o działaniu prozapalnym/pronowotworowym/powodujące zwężenie naczyń krwionośnych/związane ze stresem oksydacyjnym, **oksylipiny** o działaniu przeciwzapalnym/zwiększające wrażliwość na insulinę/antyproliferacyjne. Opracowanie własne na podstawie źródeł [33,108,110,192].

4.4.1.2 PRZYGOTOWANIE PRÓBEK RZECZYWISTYCH

Ekstrakcję oksylipin z surowicy wykonywano techniką SPE na podstawie metody Galvão i wsp. [193]. Do 300 μ l surowicy dodawano najpierw 10 μ l roztworu butylohydroksytoluenu (**BHT**) (0,2 mg/ml w metanolu), w celu ograniczenia szybkości procesów utleniania lipidów w próbce, oraz 10 μ l mieszaniny deuterowanych IS (1 μ g/ml w metanolu). Próbkę wortexowano, a następnie dodawano 1,5 ml zimnej mieszaniny ekstrakcyjnej acetonitryl:metanol (1:1, v/v) i ponownie mieszano. Wytrącone białka były odwirowywane (20 min, 4°C, 1800 rpm, MIKRO 220R Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Niemcy), podczas testowania metody sprawdzono wpływ czasu inkubacji z mieszaniną ekstrakcyjną na efektywność ekstrakcji, porównane zostały próbki inkubowane temperaturze 4°C przez noc, z próbkami inkubowanymi przez 30 min. Nie zaobserwowane zostały istotne różnice w efektywności ekstrakcji, ostatecznie próbki inkubowano z mieszaniną ekstrakcyjną przez 30 min. Po wirowaniu supernatant był przenoszony do szklanej probówki i rozcieńczany 17 ml ultraczystej wody, w celu zmniejszenia stężenia mieszaniny ekstrakcyjnej do < 10%. Przygotowane próbki były nanoszone na prekondukcjonowane kolumny SPE ze złożem oktadecylowym (3 ml Strata® C18-E, 200 mg, Phenomenex®, Torrance, CA, USA), ekstrakcję oksylipin prowadzono zgodnie ze schematem (**Rysunek 4.5**).



Rysunek 4.5 Schemat ekstrakcji oksylipin z surowicy techniką SPE

Metoda na podstawie [193], rysunek własny.

Eluenty po SPE odparowywano do sucha pod strumieniem azotu, rozpuszczano w 50 μ l mieszaniny metanolu i 0,1% kwasu octowego (3:1, v/v), przenoszono do fiolek z insertami i umieszczano w autosamplerze utrzymywanym w temperaturze 4°C. Podczas opracowywania metody testowano wpływ filtrowania próbek przez filtry strzykawkowe z membraną PET

(średnica filtra: 15 mm, średnica porów: 0,20 μm , Chromafil®, Marchery-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Niemcy), jednak ze względu na duże straty wzorców, nie zastosowano filtrowania w ostatecznej metodzie. Przygotowane próbki były analizowane tego samego dnia.

4.4.1.3 PRZYGOTOWANIE PRÓBEK DO WALIDACJI

Wszystkie próbki do walidacji przygotowywane były z wykorzystaniem mieszaniny surowicy pochodzącej od > 100 pacjentów, w celu wyeliminowania zmienności osobniczych w zawartości analitów i interferentów.

Roztwór wyjściowy wzorców analitycznych oksylipin o stężeniu 1 $\mu\text{g/ml}$ (z wyjątkiem 15-HETrE – 250 ng/ml oraz PGD3 i 18-HEPE – 500 ng/ml) został przygotowany w metanolu. Roztwory robocze wykorzystywane do wyznaczenia krzywej kalibracyjnej przygotowywano metodą seryjnych rozcieńczeń. Wszystkie roztwory przechowywano w temperaturze -80°C . Zakres liniowości metody wyznaczono przygotowując siedmiopunktową krzywą kalibracyjną, poprzez dodanie do 300 μl mieszaniny surowicy kolejno: 0,01, 0,025, 0,1, 0,5, 1, 5, 10 i 25 ng wzorców analitów (dla 15-HETrE: 0,0025, 0,00625, 0,025, 0,125, 0,25, 1,25, 2,5 i 6,25 ng, dla PGD3 i 18-HEPE: 0,005, 0,0125, 0,05, 0,25, 0,5, 2,5, 5, 12,5 ng). Zakres krzywej kalibracyjnej wybrano na podstawie spodziewanych stężeń analitów w surowicy [110,140,193]. Próbki do walidacji dla każdego punktu krzywej kalibracyjnej zostały przygotowane w trzech powtórzeniach, zgodnie z metodyką opisaną powyżej. Efektywność ekstrakcji na dwóch poziomach, poziom I – 0,5 ng mieszaniny wzorców analitycznych (0,125 ng 15-HETrE; 0,25 ng PGD3 i 18-HEPE); poziom II – 5 ng mieszaniny wzorców analitycznych (1,25 ng 15-HETrE; 2,5 ng PGD3 i 18-HEPE), oceniano dodając wzorce analityczne do eluentu zebranego po ekstrakcji SPE (trzy powtórzenia). Do każdego analizowanego zestawu próbek przygotowywane były również próbki do kontroli jakości (QC), w których do 300 μl mieszaniny surowic dodawano wyłącznie deuterowane IS.

4.4.2 OZNACZANIE STĘŻENIA OKSYLIPIN W SUROWICY TECHNIKĄ LC-MS/MS

Rozdział chromatograficzny prowadzono na kolumnie Hypersil GOLD™ (100 \times 2,1 mm, uziarnienie 3 μm) z dedykowaną przedkolumną (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA). Hypersil GOLD™ jest kolumną z wypełnieniem oktadecylowym, które jest powszechnie stosowane do rozdziału chromatograficznego oksylipin [114]. Dodatek kwasu mrówkowego do fazy A pozwala na poprawę jonizacji oksylipin [194]. W trakcie

opracowywania metody analitycznej testowano następujące parametry: skład fazy B (acetonitryl lub metanol); temperaturę pieca chromatograficznego (30, 35 lub 40°C); natężenie przepływu fazy ruchomej (0,2, 0,3 i 0,4 ml/min). Sprawdzono również wpływ składu rozpuszczalnika, w którym dozowano próbkę (roztwór metanolu i 0,1% kwasu mrówkowego w proporcji 4:0, 3:1, 1:1 i 1:3), ponieważ zastosowanie dodatku wody, zgodnie z eksperymentami Kolmerta i wsp. [195], wpływa pozytywnie na kształt sygnałów polarnych analitów. Ostateczne warunki rozdziału chromatograficznego znajdują się w **Tabeli 4.6**.

Tabela 4.6 Warunki rozdziału chromatograficznego oksylipin.

Element systemu	Chromatograf cieczowy
Temperatura pieca:	35°C
Objętość dozowanej próbki:	10 µl w metanol:0,1% kwas mrówkowy (3:1, v/v)
Natężenie przepływu fazy ruchomej:	0,3 ml/min
Skład fazy A:	0,1% kwas mrówkowy
Skład fazy B:	metanol
Zastosowany gradient:	0 - 2 min: 50% B 2 - 12 min: 50% - 60% B 12 - 13 min: 60% - 70% B 13 - 16 min: 70% - 80% B 16 - 24 min: 80% - 85% B 24 - 25 min: 85% - 50% B
Czas kondycjonowania kolumny	5 min

Tabela własna.

Wysokosprawny chromatograf cieczowy sprzężony był ze spektrometrem mas z analizatorem w postaci potrójnego kwadrupola (LCMS-8050 Shimadzu, Kyoto, Japonia). Parametry pracy spektrometru mas (**Tabela 4.7**) były optymalizowane w eksperymentach bezpośredniej infuzji roztworów pojedynczych wzorców analitycznych i deuterowanych IS (100 ng/ml w metanolu) z jonizacją ESI(-). Podczas oznaczania parametrów walidacyjnych metody analitycznej i stężenia oksylipin w próbkach rzeczywistych spektrometr mas operował w trybie monitorowania wielu reakcji fragmentacji (**MRM**, ang. *multiple reaction monitoring*), a każda próbka analizowana była trzykrotnie. Oksylipiny identyfikowano na podstawie czasu retencji określonego podczas analizy roztworów pojedynczych wzorców oraz obecności jonów fragmentacyjnych (**Tabela 4.7**). We wszystkich obliczeniach pole powierzchni pod sygnałem analitu było dzielone przez pola powierzchni pod sygnałem deuterowanego IS dobranego na podstawie podobieństwa strukturalnego/zbliżonego czasu retencji (**Tabela 4.7**), a następnie pomniejszane o pole powierzchni analitu/pole powierzchni IS w próbkach QC. Zabieg ten stosowano ze względu na brak matrycy (surowicy) wolnej od analitów, ponieważ oksylipiny

są syntezowane endogennie [196]. Integrację sygnałów chromatograficznych wykonano w programie LabSolutions Ver. 5.99 SP2 (Shimadzu, Kyoto, Japonia).

Tabela 4.7 Parametry spektrometru mas w trybie pracy MRM

Oksylipina	Rt* [min]	Przejścia MRM† [m/z]	Dt [ms]	Q1 [V]	CE [eV]	Q3 [V]	IS‡
12-HETE	17,89	319,20 > 179,50 319,20 > 257,50	22 22	20 16	14 15	11 11	1
12-HHT	16,13	279,40 > 179,40 279,40 > 217,50	22 22	18 19	14 15	12 21	5
13-HODE	17,41	295,20 > 195,45 295,20 > 277,40	22 22	18 18	18 19	18 12	5
15d-PGJ2	16,08	315,30 > 271,50 315,30 > 203,45	22 22	20 20	14 21	12 12	4
15-HETE	17,61	319,20 > 301,50 319,20 > 219,45	22 22	30 16	13 13	18 21	3
15-HETrE	18,14	321,50 > 221,30 321,50 > 303,40	22 22	12 12	15 16	10 14	5
18-HEPE	16,92	317,20 > 299,35 317,20 > 215,40	22 22	15 15	12 13	14 13	7
2,3-dinor-8-izo-PGF2α	5,09	325,30 > 237,50 325,30 > 137,40	122 122	22 21	14 19	24 29	4
20-HETE	17,39	319,20 > 289,45 319,20 > 301,45	22 22	15 16	16 18	20 13	1
5-HETE	18,31	319,20 > 301,50 319,20 > 115,25	22 22	12 12	15 16	10 14	3
7S-Mar1	14,78	359,10 > 177,45 359,10 > 246,35	13 13	10 30	17 16	11 20	7
8-epi-PGF2α	8,61	353,20 > 193,40 353,20 > 309,45	42 42	17 17	26 21	12 10	4
9(10)-EpOME	18,12	295,20 > 171,40 295,20 > 277,40	22 22	15 16	14 16	12 16	5
9-HODE	17,43	295,20 > 171,30 295,20 > 277,40	22 22	18 29	20 18	10 26	5
LTB4	15,58	335,20 > 195,40 335,20 > 317,50	22 22	21 21	16 15	12 21	6
LXA4	11,39	351,30 > 115,30 351,30 > 217,50	42 42	23 23	20 22	22 14	3
LXB4	10,08	351,30 > 221,40 351,30 > 233,45	27 27	22 22	17 15	14 15	3
Mar1	15,44	359,10 > 177,45 359,10 > 250,30	22 22	10 10	17 15	11 17	7
Mar2	15,99	359,40 > 221,40 359,40 > 232,30	22 22	12 14	12 15	10 23	7
PDX	15,17	359,40 > 153,45 359,40 > 206,45	22 22	23 24	17 17	14 13	2

Tabela 4.7 (c.d.) Parametry spektrometru mas w trybie pracy MRM

Oksylipina	Rt* [min]	Przejścia MRM† [m/z]	Dt [ms]	Q1 [V]	CE [eV]	Q3 [V]	IS‡
PGD2	9,88	351,30 > 271,45 351,30 > 189,40	27 27	23 23	18 21	25 12	4
PGD3	7,49	349,30 > 269,50 349,30 > 233,40	34 34	23 23	16 13	12 10	4
PGE2	9,65	351,30 > 271,50 351,30 > 315,40	27 27	23 22	18 13	18 10	4
PGF2α	10,54	353,30 > 309,45 353,30 > 193,40	42 42	23 17	19 26	14 12	4
RvD1	11,31	375,30 > 141,35 375,30 > 215,50	42 42	24 24	16 19	13 13	2
RvD2	10,36	375,20 > 175,40 375,20 > 141,40	42 42	18 18	24 17	11 28	2
RvE1	5,70	349,20 > 195,30 349,20 > 107,25	97 97	10 17	17 22	12 15	7
TXB2	9,59	369,30 > 169,45 369,30 > 195,40	42 42	24 24	18 15	17 12	4
Deuterowane IS							CV [%]◇
(1) 12-HETE-d8	17,82	327,10 > 184,50 327,10 > 264,50	22 22	15 28	15 18	12 20	10%
(2) 14(15)-DiHET-d11	16,22	348,40 > 207,45 348,40 > 140,45	22 22	22 23	20 21	20 14	13%
(3) 5-HETE-d8	18,26	327,20 > 309,50 327,20 > 116,35	22 22	15 19	13 16	14 18	14%
(4) 8-izo-PGF2α-d4	8,59	357,20 > 313,40 357,20 > 197,35	42 42	17 17	21 26	14 12	10%
(5) 9-HODE-d4	17,40	299,20 > 281,50 299,20 > 172,40	22 22	19 19	19 20	12 11	13%
(6) LTB4-d4	15,55	339,30 > 197,45 339,30 > 321,50	22 22	22 12	17 14	12 15	8%
(7) RvE1-d4	5,63	353,20 > 197,30 353,20 > 109,30	122 122	11 17	17 22	12 10	5%

† Monitorowane przejścia: jon pseudomolekularny [M-H]⁻ > jon fragmentacyjny, **wytluszczone** - do analizy ilościowej, *kursywą* - do analizy jakościowej; ‡ przyporządkowany analitowi deuterowany wzorzec wewnętrzny zgodny z numeracją (1-7) w dolnej części tabeli; ◇ współczynnik zmienności obliczony na podstawie pól powierzchni sygnałów ośmiu niezależnych powtórzeń. Skrót: **CE** - energia kolizji, **CV** - współczynnik zmienności, **Dt** (ang. *dwell time*) - czas obserwowania danego przejścia, **IS** - wzorzec wewnętrzny, **MRM** - tryb monitorowania wielu reakcji fragmentacji, **Rt*** - czas retencji, różnica **Rt** pomiędzy seriami < 0,05 min dla wszystkich deuterowanych IS i analitów z wyjątkiem 18-HEPE, 7S-Mar1 i 15d-PGJ2, **Q1** - napięcie na kwadrupolu 1 promujące jonizację jonu pseudomolekularnego, **Q3** - napięcie na kwadrupolu 1 promujące jonizację jonu fragmentacyjnego. Tabela własna. Nazwy oksylipin za Tabelą 1.2.

Liniowość metody w założonych zakresach krzywej kalibracyjnej oceniano poprzez wykreślenie obliczonych na podstawie krzywej wartości stężenia oksylipin do nominalnego stężenia. Dopasowanie modelu oceniano na podstawie współczynnika determinacji R^2 oraz współczynnika zmienności losowej $RSD = \frac{\text{odchylenie standardowe reszt}}{\text{średnia zmiennej objaśnianej } y} \times 100\%$, co pozwala

na lepszą ocenę poprawności modelu niż zastosowanie samego R^2 [197]. Za stężenie, w którym można dokonać wiarygodnego ilościowego oznaczenia analitu (dolna granica oznaczalności, LOQ, ang. *limit of quantification*) przyjęto punkt, dla którego stosunek sygnału do szumu (S/N) wynosił ≥ 10 [196]. Granica wykrywalności (LOD, ang. *limit of detection*) została wyznaczona z równania krzywej kalibracyjnej jako: $\frac{3,3 \times \text{błąd standardowy krzywej kalibracyjnej}}{\text{współczynnik nachylenia krzywej kalibracyjnej}}$ [196].

4.5 STATYSTYCZNA ANALIZA WYNIKÓW

Analiza danych otrzymanych w wyniku przeprowadzonych badań obejmowała weryfikację hipotez z wykorzystaniem zarówno jednozmiennowych (ang. *univariate analysis*) jak i wielozmiennowych (ang. *multivariate analysis*) testów statystycznych. Zmiennymi w analizie statystycznej były wartości uzyskane w wyniku oznaczenia markerów klinicznych i biochemicznych w materiale biologicznym (**sekcja 4.2.1.5**), stężenia aminokwasów (**sekcja 4.2.1.6**), relatywne poziomy mRNA genów amplifikowanych podczas RT-PCR (**sekcja 4.2.1.7**), procentowa zawartość FA w badanym materiale biologicznym (**sekcja 4.3.4**) i stężenia oksylipin w krwi pacjentów bariatrycznych (**sekcja 4.4.2**). Jeżeli nie zaznaczono inaczej, dane zostały wyrażone jako średnia \pm odchylenie standardowe. Jednozmienną analizę danych przeprowadzano w programach Microsoft Excel dla Microsoft 365 wersja 2202 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA), w przypadku porównań pomiędzy dwoma grupami badawczymi, oraz SigmaPlot wersja 11.0 lub 14.5 (Systat, Software Inc., San Jose, CA, USA), w przypadku jednoczesnych porównań trzech grup badawczych. Wielozmiennowa analiza danych została przeprowadzona w programie SIMCA wersja 16 (Sartorius Stedim Data Analytics AB, Umeå, Szwecja) oraz z wykorzystaniem platformy MetaboAnalyst 4.0 (dostępnej online na <https://www.metaboanalyst.ca/>) i pakietu FactoMineR [198] w środowisku obliczeniowym R [199].

4.5.1 JEDNOZMIENNOWE ANALIZY STATYSTYCZNE

Przeprowadzona w programach Microsoft Excel oraz SigmaPlot jednozmiennowa analiza statystyczna polegała na porównaniach poziomów zmiennych pomiędzy grupami badawczymi. Normalność rozkładu analizowanych zmiennych (stężenia, relatywne stężenia lub zawartość procentowa) była oceniana z wykorzystaniem testu W Shapiro-Wilka w celu doboru odpowiednich testów. Do porównania zmiennych w przypadku sparowanych prób (przykładowo zawartość procentowa FA w surowicy pacjentów z otyłością przed oraz po

OAGB) wykorzystywano dla zmiennych o rozkładzie normalnym - test t-Studenta, w którym sprawdzana jest hipoteza zerowa o równości średnich arytmetycznych; dla zmiennych niespełniających założeń testu parametrycznego – test Wilcoxon dla par obserwacji, weryfikujący równość median. Porównania niesparowanych prób (przykładowo zawartość procentowa FA w surowicy grupy kontrolnej oraz pacjentów z otyłością) w przypadku zmiennych nieparametrycznych wykonano wykorzystując test U Manna-Whitney’a, a w przypadku zmiennych spełniających warunek normalności rozkładu – testy t-Studenta dla prób niesparowanych o równej bądź nierównej wariancji, w zależności od wyniku testu F Fishera.

Do jednoczesnych porównań zmiennych w więcej niż dwóch grupach (przykładowo jednoczesne porównanie zmiennych pomiędzy grupą kontrolną, pacjentami z otyłością przed zabiegiem OAGB i po zabiegu OAGB) zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA, ang. *analysis of variance*) lub Test Kruskala-Wallisa. Jednoczynnikowa ANOVA zastosowana została dla danych spełniających kryterium normalności rozkładu oraz równości wariancji, a gdy hipoteza zerowa zakładająca równość średnich w populacjach była odrzucana, w celu identyfikacji średnich różniących się w sposób istotny statystycznie, stosowany był test *post hoc* Tukeya, który umożliwia wielokrotne porównania w grupach o różnej liczebności. W przypadku danych nieparametrycznych zastosowano rangowy test Kruskala-Wallisa oraz test *post hoc* Dunn.

Dla podgrupy pacjentów, dla których profil FA w surowicy oznaczono w każdym punkcie czasowym po operacji OAGB, czyli FU1 i FU2 wykonano analizę **RM ANOVA** z powtarzanimi pomiarami (ang. *repeated measures ANOVA*). Zmienne niespełniające założenia o normalności rozkładu i równości wariancji poddano testowi rang Friedmana. Statystyczną istotność porównań wielokrotnych oceniano na podstawie p-wartości otrzymanej w teście *post hoc* Tukeya. Analizy RM ANOVA wykonano dla oznaczonych w punktach pre-OAGB, FU1 i FU2 stężeń oksylipin w surowicy pacjentów. Podczas analizy statystycznej wartości < LOQ oraz punkty, w których nie wykryto związku zastąpiono stałymi ekstrapolowanymi z równania krzywej kalibracyjnej. Porównanie par przeprowadzono metodą Holm-Sidak.

Dla wszystkich wykonywanych testów statystycznych przyjętym krytycznym poziomem istotności była wartość p (ang. *p-value*) < 0,05. Wyniki testów statystycznych nie były uznawane za istotne, gdy moc testu obliczona *post hoc* dla p = 0,05 była niższa niż 0,800.

Wartości na wykresach i w tabelach, jeżeli nie zaznaczono inaczej, przedstawione zostały jako średnia \pm odchylenie standardowe.

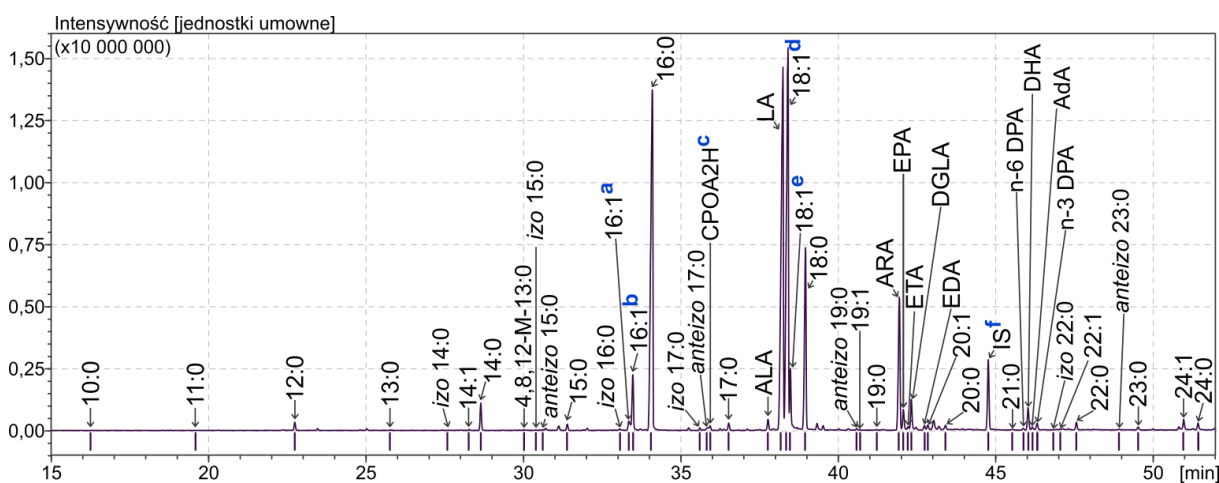
4.5.2 WIELOWYMIAROWA ANALIZA DANYCH

Wyniki analiz technikami GC-MS oraz LC-MS charakteryzują się dużą ilością zmiennych opisujących jedną próbkę, przykładowo w surowicy jednego pacjenta z otyłością identyfikowano i oznaczano nawet 44 FA. W analizowaniu danych o dużym stopniu złożoności użyteczne jest zastosowanie metod analizy wielowymiarowej, umożliwiających redukcję liczby zmiennych. Zastosowaną metodą była nienadzorowana analiza głównych składowych (**PCA**, ang. *principal component analysis*) umożliwiająca wizualizację różnic pomiędzy próbkami oraz ich klasyfikację. Przed budowaniem modeli PCA uzyskane dane (stężenia, zawartości procentowe) były wstępnie przekształcane poprzez skalowanie Pareto oraz zastosowanie transformacji logarytmicznej dla zmiennych skośnych. Ilość składowych modelu dobierano zgodnie z zasadami opisanymi przez Bro & Smilde [200], w każdym przypadku procent skumulowanej wariancji wyjaśnianej przez model był $> 50\%$. Przedział ufności wyznaczany poprzez obliczenie statystyki T^2 Hotellinga był na poziomie 95%.

5 WYNIKI

5.1 OZNACZANIE PROFILU KWASÓW TŁUSZCZOWYCH W LUDZKIM MATERIALE BIOLOGICZNYM

Zastosowanie opracowanej w Katedrze Analizy Środowiska Uniwersytetu Gdańskiego metody opartej o technikę GC-MS, zgodnie z opisem zawartym w części metodycznej (**sekcja 4.3.4**), umożliwia oznaczenie w ekstraktach tkankowych oraz płynach biologicznych ponad 40 metylowych pochodnych FA podczas jednej analizy (**Rysunek 5.1**). Podjęta tematyka badawcza jest kontynuacją zapoczątkowanych przez dr hab. Adrianę Mika, prof. GUMed, prof. UG, badań nad zaburzeniami profilu kwasów tłuszczowych u pacjentów cierpiących na MO [89].



Rysunek 5.1 Przykładowy chromatogram FAME przygotowanych z ekstraktów lipidowych surowicy pacjentów z MO uzyskany z wykorzystaniem GC-MS
a - 16:1 n-7, **b** - 16:1 n-9, **c** - kwas cis-9,10-metylenohexadekanowy, **d** - 18:1 n-9 (cis-9), **e** - 18:1 n-9 (trans-9), **f** - wzorzec wewnętrzny. Nazwy kwasów wielonienasyconych i rozgałęzionych zgodnie z tabelami (odpowiednio Tabela 1.1 oraz Tabela 2.4). Rysunek własny.

Oznaczanie FA za pomocą GC-MS umożliwiło identyfikację w ekstraktach lipidowych pochodzących od uczestników badania oraz od myszy eksperymentalnych, średnio- i długołańcuchowych FA (od 10 do 24 atomów węgla w łańcuchu) o łańcuchach nasyconych, jedno- i wielonienasyconych. Wśród zidentyfikowanych kwasów znalazły się również BCFA, wykryte uprzednio w surowicy pacjentów z MO [89]. Oznaczono także

zawartość FA z ugrupowaniem cyklicznym – kwas cis-9,10-metylenoheksadekanowy (**CPOA2H**, ang. *cyclopropaneoctanoic acid 2-hexyl*), którego obecność w tkance tłuszczowej i surowicy pacjentów z otyłością po raz pierwszy opisał Śledziński i wsp. [70]. Profil FA w surowicy i tkance tłuszczowej ludzi przedstawiony w niniejszej części rozprawy odzwierciedlają zawartość FA we wszystkich lipidach wyekstrahowanych z materiału biologicznego, zarówno prostych jak i złożonych, z uwagi na zastosowanie hydrolizy przed przygotowaniem FAME do analizy za pomocą GC-MS (opisane w **sekcji 4.3.3**).

5.1.1 WYNIKI BADAŃ PACJENTÓW Z OTYŁOŚCIĄ OLBRZYMIĄ LECZONYCH OAGB

Otyłości towarzyszą liczne zaburzenia metaboliczne [25–28]. Mając na uwadze powiązania obserwowane pomiędzy wywołanymi otyłością nieprawidłowościami w gospodarce lipidowej, w tym zaburzeniami metabolizmu FA, a mechanizmami chorobowymi [33,43,44,79,83] we wnioskowaniu na temat konsekwencji OAGB, konieczne było rozpatrzenie podstawowych parametrów biochemicznych i antropometrycznych pacjentów z otyłością leczonych OAGB. Badania przedstawione w tej rozprawie były realizowane w ramach pracy w interdyscyplinarnym zespole, a doktorantka wykonywała badania z zakresu chemii analitycznej oraz analizy statystyczne. W przedstawionej pracy dokonano analizy danych uzyskanych w Centralnym Laboratorium Klinicznym Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego w Gdańsku oraz we współpracy z Katedrą i Zakładem Biochemii oraz Katedrą i Zakładem Biochemii Farmaceutycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, których krótkie omówienie w niniejszej sekcji pomoże w interpretacji wyników zmian w profilach FA w kontekście wpływu leczenia za pomocą OAGB na zaburzenia metaboliczne towarzyszące otyłości. Oznaczenia, które nie zostały wykonane osobiście przez autorkę niniejszej rozprawy zostały opatrzone odpowiednią adnotacją przy tabelach i rycinach.

Dane antropometryczne i wyniki oznaczania parametrów biochemicznych pacjentów z MO i grupy kontrolnej przedstawiono w tabelach poniżej, dane prezentowane są dla osobno dla 38 pacjentów, od których uzyskano surowicę przed OAGB i 2 tygodnie po OAGB – punkt FU1 oraz dla 46 pacjentów, od których uzyskano surowicę przed OAGB i 6-9 miesięcy po OAGB – punkt FU2. Krew do badań zawartości FA we wszystkich trzech punktach czasowych po operacji udało się uzyskać jedynie od 13 pacjentów, zatem, aby zredukować wpływ różnic osobniczych, jednocześnie nie zmniejszając liczebności grup badawczych,

OZNACZANIE PROFILU KWASÓW TŁUSZCZOWYCH W LUDZKIM MATERIALE BIOLOGICZNYM

porównania wyników oznaczania parametrów biochemicznych (a w dalszych częściach rozprawy profili FA w surowicy) prowadzono osobno dla sparowanych danych pre-OAGB vs FU1 i pre-OAGB vs FU2. Bariatryczne leczenie pacjentów z MO za pomocą OAGB prowadziło do znaczącego obniżenia wskaźnika BMI już po dwóch tygodniach (FU1) od momentu przeprowadzenia operacji (z $37,1 \pm 2,73$ do $33,8 \pm 2,33$ kg/m², $p < 0,001$). Utracie masy ciała, zgodnie z oczekiwaniami, towarzyszyło obniżenie stężenia glukozy we krwi na czczo (z $132 \pm 35,8$ do $111 \pm 20,7$ mg/dl, $p = 0,001$) – **Tabela 5.1**. W punkcie FU2 (**Tabela 5.2**), czyli 6-9 miesięcy po wykonanym zabiegu OAGB, średnie BMI pacjentów wynosiło już $29,6 \pm 3,85$ kg/m² [6]. Zaobserwowano również znaczącą poprawę parametrów biochemicznych związanych z homeostazą glukozy: stężenie glukozy na czczo (-17,6%, $p < 0,001$) i insuliny na czczo (-48,2%, $p < 0,001$) oraz wskaźnika insulinooporności HOMA-IR (-53,3%, $p < 0,001$), które osiągały wartości zbliżone do grupy LC (**Tabela 5.2**). Ocena stanu zapalnego na podstawie oznaczonego stężenia CRP w surowicy pacjentów, pozwoliła stwierdzić, że po OAGB w punkcie FU2 następuje zmniejszenie stanu zapalnego ($p = 0,011$) (**Tabela 5.2**). Wyniki badania lipidogramu nie różniły się pomiędzy pacjentami z otyłością przed OAGB a LC (**Tabele 5.1 i 5.2**), co przypuszczalnie jest wynikiem diety redukcyjnej, która jest wprowadzana przed przystąpieniem do operacji OAGB (sekcja 4.2.1.2). W punkcie FU1 nie odnotowano znaczących zmian w porównaniu z wynikami przedoperacyjnymi, pacjenci nadal charakteryzowali się wysokim stężeniem TAG i cholesterolu we krwi (**Tabela 5.1**). Z kolei w punkcie FU2 zaobserwowano znaczącą poprawę parametrów lipidogramu, czyli obniżenie stężeń TAG ($p = 0,006$), cholesterolu całkowitego ($p = 0,018$) oraz LDL-C ($p = 0,027$) we krwi w porównaniu z wartościami sprzed operacji, a w przypadku cholesterolu całkowitego i LDL-C pacjenci charakteryzowali się stężeniami niższymi niż grupa LC (odpowiednio $p = 0,039$ i $p < 0,001$) (**Tabela 5.2**). Nie wykryto natomiast żadnego związku pomiędzy OAGB a poziomem HDL-C.

Tabela 5.1 Dane antropometryczne i parametry biochemiczne grupy kontrolnej (LC) pacjentów z otyłością przed operacją OAGB (pre-OAGB) i pacjentów 2 tygodnie po operacji OAGB (FU1)

Parametr	LC n = 30	pre-OAGB n = 38	FU1 n = 38	Istotność porównania pomiędzy grupami [p-wartość]		
				pre-OAGB vs LC	pre-OAGB vs FU1	FU1 vs LC
kobiety/mężczyźni	15/15	32/6		-	-	-
z T2DM/bez T2DM	0/30	13/25		-	-	-
Wiek [lata]	50,0 ± 10,9	48,09 ± 9,57		0,461	-	0,461
BMI [kg/m ²]	24,9 ± 2,68	37,1 ± 2,73	33,8 ± 2,33	<0,001	<0,001	<0,001
TAG [mg/dl]	100 ± 53,4	114 ± 38,5	120 ± 32,7	0,231	0,406	0,086
cholesterol [mg/dl]	218 ± 44,0	206 ± 34,4	212 ± 37,5	0,251	0,487	0,566
glukoza [mg/dl]	94,6 ± 24,6	132 ± 35,8	111 ± 20,7	<0,001	0,001	0,004
albumina [g/l]	45,7 ± 2,99	42,8 ± 3,60	49,9 ± 4,45	<0,001	<0,001	<0,001
białko całkowite [g/l]	72,6 ± 5,55	69,6 ± 6,11	78,4 ± 7,48	0,043	<0,001	<0,001

Na czerwono - p < 0,05. Skrót: **BMI** - indeks masy ciała, **TAG** - triacyloglicerole. Dane uzyskane z Centralnego Laboratorium Klinicznego Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego w Gdańsku oraz dzięki uprzejmości Katedry i Zakładu Biochemii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. **Dane opublikowane** [178].

Tabela 5.2 Dane antropometryczne i parametry biochemiczne grupy kontrolnej (LC) pacjentów z otyłością przed operacją OAGB (pre-OAGB) i pacjentów 6-9 miesięcy po operacji OAGB (FU2)

Parametr	LC n = 29	pre-OAGB n = 46	FU2 n = 46	Istotność porównania pomiędzy grupami [p-wartość]		
				pre-OAGB vs LC	pre-OAGB vs FU2	FU2 vs LC
kobiety/mężczyźni	12/17	39/7		-	-	-
z T2DM/bez T2DM	0/29	23/23		-	-	-
Wiek [lata]	49,7 ± 11,3	48,6 ± 10,6		0,685	-	0,685
BMI [kg/m ²]	24,9 ± 2,57	38,5 ± 4,31	29,6 ± 3,85	<0,001	<0,001	<0,001
HbA1C [%]	brak danych	5,79 ± 0,88	5,24 ± 0,47	-	0,003	-
TAG [mg/dl]	109 ± 47,7	113 ± 37,3	87,8 ± 26,7	0,772	0,006	0,080
HDL-C [mg/dl]	55,3 ± 13,2	50,1 ± 9,33	50,9 ± 11,79	0,125	0,653	0,273
LDL-C [mg/dl]	128 ± 41,7	114 ± 33,8	88,3 ± 25,3	0,241	0,027	<0,001
cholesterol [mg/dl]	208 ± 44,5	201 ± 40,9	180 ± 49,9	0,486	0,018	0,039
CRP [mg/l]	1,57 ± 1,22	1,65 ± 0,53	1,02 ± 0,55	0,769	0,011	0,075
albumina [g/l]	40,0 ± 2,34	37,4 ± 7,60	37,1 ± 2,45	0,135	0,832	<0,001
kreatynina [mg/dl]	0,86 ± 0,16	0,80 ± 0,22	0,71 ± 0,17	0,246	<0,001	<0,001
glukoza [mg/dl]	93,1 ± 9,36	111 ± 32,1	91,5 ± 11,2	0,004	<0,001	0,468
insulina [μU/ml]	9,11 ± 3,97	14,9 ± 7,85	7,72 ± 6,49	0,002	<0,001	0,335
HOMA-IR	2,13 ± 1,02	4,37 ± 3,04	2,04 ± 1,96	0,001	<0,001	0,804

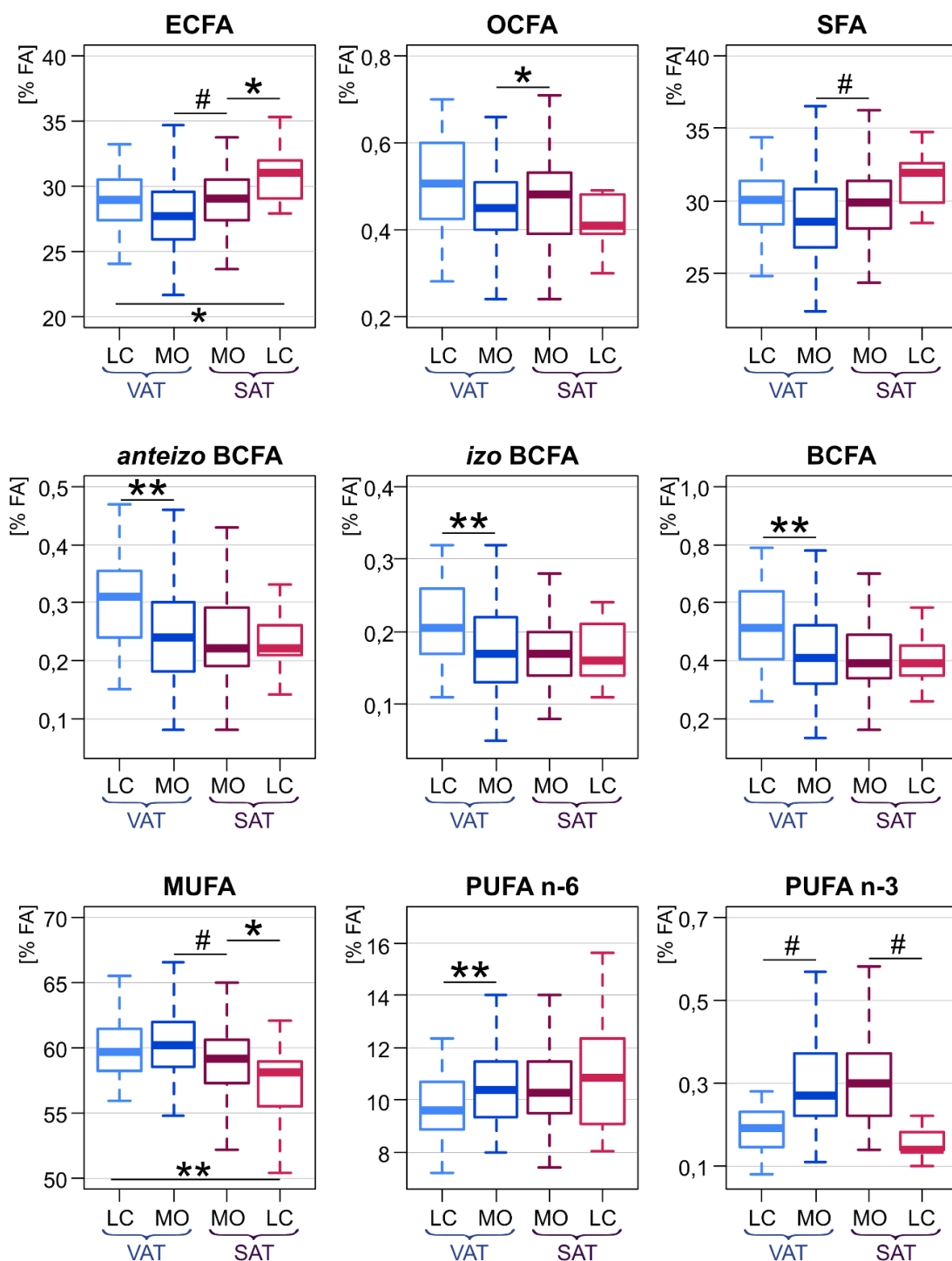
Na czerwono - p < 0,05. Skrót: **BMI** - indeks masy ciała, **CRP** - białko C reaktywne, **HbA1C** - hemoglobina glikowana, **HDL-C** - cholesterol frakcji lipoprotein wysokiej gęstości, **HOMA-IR** - wskaźnik insulinooporności, **LDL-C** - cholesterol frakcji lipoprotein niskiej gęstości, **T2DM** - cukrzyca typu 2, **TAG** - triacyloglicerole. Dane uzyskane z Centralnego Laboratorium Klinicznego Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego w Gdańsku oraz dzięki uprzejmości Katedry i Zakładu Biochemii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. **Dane opublikowane** [181,201].

5.1.2 ZMIANY PROFILU KWASÓW TŁUSZCZOWYCH U PACJENTÓW Z OTYŁOŚCIĄ

5.1.2.1 ZMIANY W PROFILU KWASÓW TŁUSZCZOWYCH W TKANCE TŁUSZCZOWEJ PACJENTÓW Z OTYŁOŚCIĄ OLBRZYMIĄ

Podczas operacji OAGB od pacjentów z MO pobrane zostały wycinki dwóch skupisk tkanki tłuszczowej – VAT i SAT. Profil FA oznaczony techniką GC-MS porównywano pomiędzy tymi dwoma rodzajami tkanki tłuszczowej, w celu stwierdzenia jakie FA różnicują te tkanki. Ponadto, przeprowadzono porównanie profilu FA w VAT oraz w SAT pacjentów z MO z VAT i SAT pobranymi od zdrowej, szczupłej grupy kontrolnej, aby wskazać czy i jak zawartość FA w tkance tłuszczowej zmienia się w MO. Szczegółowy profil FA oznaczony w dwóch skupiskach tkanki tłuszczowej uczestników badania znajduje się w tabeli umieszczonej w Materiałach Uzupełniających (**Tabela uzupełniająca 12.3**), natomiast zawartość głównych grup FA w SAT i VAT pacjentów z MO i grupy LC została podsumowana na **Rysunku 5.2**.

OZNACZANIE PROFILU KWASÓW TŁUSZCZOWYCH W LUDZKIM MATERIALE BIOLOGICZNYM



Rysunek 5.2 Zawartość [%] głównych grup kwasów tłuszczowych w badanych skupiskach tkanki tłuszczowej

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, # $p < 0,001$. **LC** - grupa kontrolna, **MO** - pacjenci z otyłością olbrzymią. Sumy procentowej zawartości FA w całkowitej puli lipidów w tkance tłuszczowej podskórnej (**SAT**) i otrzewnowej (**VAT**) FA nasyconych (**SFA**): o parzystej liczbie węgli w łańcuchu alifatycznym (**ECFA**), nieparzystych (**OCFA**) i rozgałęzionych (**BCFA**), oraz FA jedno- (**MUFA**) i wielonienasyconych (**PUFA**), szczegółowy profil FA i n próbek zawarto w Tabeli uzupełniającej 12.3 **Dane opublikowane** [60,202].

OZNACZANIE PROFILU KWASÓW TŁUSZCZOWYCH W LUDZKIM MATERIALE BIOLOGICZNYM

Zgodnie z oczekiwaniami [90,131], w obu analizowanych skupiskach tkanki tłuszczowej MUFA były grupą kwasów, których zawartość w ekstraktach lipidowych była największa i stanowiła ok. 60% całkowitej zawartości FA (**Rysunek 5.2**), a ponad 50% zawartości stanowił kwas 18:1, którego proporcja w VAT u osób z MO była wyższa niż w SAT (**Tabela uzupełniająca 12.3**). Podobną zależność zaobserwowano dla kwasu 16:1, którego zawartość w VAT była istotnie wyższa niż w SAT zarówno u pacjentów z MO jak i w grupie LC (**Tabela uzupełniająca 12.3**). Obok diety, źródłem kwasów 16:1 i 18:1 w organizmie jest również endogenna synteza przez SCD-1. Aktywność tego enzymu oceniano na podstawie obliczonych indeksów desaturacji (**DI**, ang. *desaturation index*). DI 16:1/16:0 był istotnie wyższy w VAT w porównaniu z SAT w obu badanych grupach (**Tabela 5.3**). DI 18:1/18:0 był podobny w VAT i SAT osób z MO i dla obu skupisk wyższy w grupie pacjentów z MO niż w grupie LC (**Tabela 5.3**). Potencjalnie wyższą aktywność metaboliczną VAT w porównaniu z SAT u pacjentów z MO sugerowała również wyższa zawartością długołańcuchowych i bardzo długołańcuchowych MUFA i SFA (**Tabela uzupełniająca 12.3**). Ocena aktywności elongaz ELOVL 1, 3 i 6, których substratami są MUFA i SFA [203] na podstawie stosunku zawartości odpowiednich produktów do prekursorów (**Tabela 5.3**), wskazała na istotnie podniesioną aktywność tychże enzymów w VAT pacjentów z MO.

Wśród SFA, oprócz wspomnianych długołańcuchowych FA, istotną obserwacją była niższa zawartość BCFA w VAT pacjentów z MO w porównaniu z VAT osób o prawidłowym BMI (**Rysunek 5.2** oraz **Tabela uzupełniająca 12.3**). W połączeniu z zaobserwowanym wyższym stężeniem BCAA w surowicy pacjentów z MO (**Tabela 5.6**), sugerowało to niższą intensywność katabolizmu BCAA w VAT pacjentów z MO. Hipoteza ta została rozwinięta w **sekcji 5.1.3.4**.

Analiza profilu FA w badanej tkance ujawniła również istotne zaburzenia w profilach PUFA (**Tabela uzupełniająca 12.3**). W porównaniu z LC, pacjenci z MO charakteryzowali się wyższą zawartością PUFA n-3 i n-6 w VAT oraz PUFA n-3 w SAT (**Rysunek 5.2**). Ponadto, porównanie pomiędzy dwoma skupiskami tkanki tłuszczowej wykazało istotne różnice w zawartości poszczególnych PUFA pomiędzy VAT i SAT pacjentów z MO, czego nie zaobserwowano pomiędzy VAT i SAT pobranych od grupy LC (**Tabela uzupełniająca 12.3**). Ocena aktywności enzymów metabolizujących PUFA sugerowała, że u pacjentów z MO zachodzi intensywniejsza elongacja PUFA (wyższe indeksy aktywności ELOVL 2 i 5; **Tabela 5.3**) w VAT. Natomiast SAT charakteryzował się wyższymi indeksami aktywności desaturaz PUFA (**Tabela 5.3**). Niższa zawartość w VAT niż w SAT pacjentów z MO kwasów

ARA, DGLA i EPA (Tabela uzupełniająca 12.3) może również wskazywać na zużywanie tychże kwasów do produkcji oksylipin. Ta ścieżka badawcza została rozwinięta w sekcji 5.2.

Tabela 5.3 Indeksy wydłużania i desaturacji kwasów tłuszczowych obliczone na podstawie zawartości procentowej kwasów tłuszczowych w tkance tłuszczowej pacjentów z otyłością olbrzymią (MO) i zdrowej grupy kontrolnej

	Pacjenci z MO				Pacjenci z MO vs LC			
	VAT		VAT		VAT		VAT	
	SAT	vs SAT	SAT	vs SAT	SAT	vs SAT	SAT	vs SAT
	n = 89	p-wartość	n = 89	p-wartość	n = 32	p-wartość	n = 13	p-wartość
Elongacja SFA i MUFA								
18:0/16:0 (ELOVL6)	0,156 ± 0,039	0,002	0,148 ± 0,035	0,002	0,184 ± 0,037	0,010	0,216 ± 0,032	0,001 < 0,001
20:0/18:0 (ELOVL3/1)	0,039 ± 0,014	< 0,001	0,022 ± 0,007	< 0,001	0,036 ± 0,010	0,038	0,029 ± 0,009	0,195 0,001
22:0/20:0 (ELOVL3/1)	0,150 ± 0,084	0,082	0,168 ± 0,090	0,082	0,114 ± 0,044	0,061	0,161 ± 0,078	0,003 0,783
24:0/22:0 (ELOVL3/1)	0,518 ± 0,372	0,128	0,629 ± 0,537	0,128	0,676 ± 0,346	0,083	0,486 ± 0,259	0,039 0,130
20:1/18:1 (ELOVL3/1)	0,016 ± 0,006	< 0,001	0,014 ± 0,004	< 0,001	0,015 ± 0,003	0,746	0,015 ± 0,003	0,080 0,170
22:1/20:1 (ELOVL1/3)	0,105 ± 0,044	< 0,001	0,075 ± 0,034	< 0,001	0,112 ± 0,055	0,897	0,110 ± 0,032	0,496 0,001
24:1/22:1 (ELOVL1/3)	0,124 ± 0,083	0,003	0,183 ± 0,174	0,003	0,144 ± 0,118	0,388	0,123 ± 0,045	0,374 0,009
Elongacja PUFA								
n-3 DPA/EPA (ELOVL2/5)	2,48 ± 1,26	< 0,001	2,02 ± 0,855	< 0,001	2,08 ± 1,17	0,030	1,49 ± 0,584	0,117 0,033
ARA/ARA (ELOVL2/5)	0,521 ± 0,170	< 0,001	0,405 ± 0,125	< 0,001	0,405 ± 0,149	0,537	0,373 ± 0,176	0,001 0,417
Desaturacja								
16:1/16:0 (SCD-1)	0,287 ± 0,077	< 0,001	0,255 ± 0,079	< 0,001	0,279 ± 0,066	0,001	0,200 ± 0,079	0,602 0,022
18:1/18:0 (SCD-1)	16,9 ± 5,05	0,565	16,6 ± 5,01	0,565	14,1 ± 3,49	< 0,001	10,9 ± 1,80	0,001 < 0,001
DGLA/LA (Δ6D)	0,018 ± 0,010	< 0,001	0,022 ± 0,008	< 0,001	0,009 ± 0,003	0,208	0,008 ± 0,004	< 0,001 < 0,001
ARA/DGLA (Δ5D)	1,43 ± 0,478	0,032	1,54 ± 0,496	0,032	1,72 ± 0,428	0,886	1,69 ± 0,493	0,004 0,292

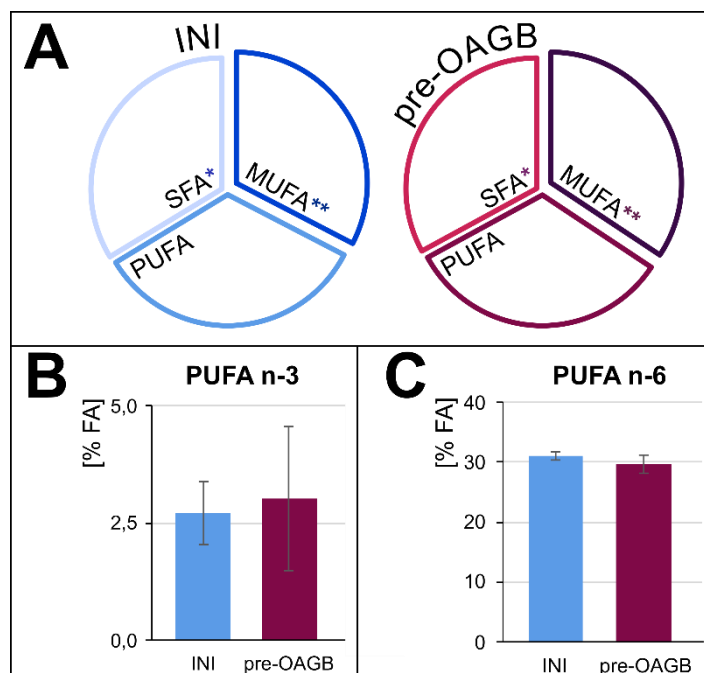
Na czerwono - p < 0,05. **SAT** - podskórna tkanka tłuszczowa, **VAT** - otrzewnowa tkanka tłuszczowa. Tabela własna, indeksy desaturacji 16:1/16:0 oraz 18:1/18:0 **były wcześniej opublikowane** [60].

5.1.2.2 WPŁYW DIETY PRZYGOTOWUJĄCEJ DO ZABIEGU OAGB NA PROFIL KWASÓW TŁUSZCZOWYCH W SUROWICY

Przed przystąpieniem do zabiegu OAGB, pacjentom z MO zalecane jest przestrzeganie diety redukcyjnej, która przygotowuje do zabiegu bariatrycznego (opis zaleceń zawarty został w rozdziale Materiały i Metody, **sekcja 4.2.1.2**). Dlatego, aby określić wpływ diety redukcyjnej na efekty leczenia za pomocą OAGB na profil FA, analizę FA techniką GC-MS wykonano w surowicy pacjentów przed rozpoczęciem diety redukcyjnej przygotowującej do OAGB (punkt badania INI). Szczegółowy profil FA został umieszczone w Materiałach Uzupełniających (**Tabela uzupełniająca 12.4**), wyniki porównane zostały z profilami FA w sparowanych próbkach pre-OAGB, czyli w surowicy pobieranej od tej samej grupy pacjentów w dniu wykonywania zabiegu OAGB (**Tabela uzupełniająca 12.4** oraz podsumowanie głównych grup FA – **Rysunek 5.3**).

Pacjenci w punkcie INI charakteryzowali się wyższą procentową zawartością SFA (**Rysunek 5.3**) w surowicy w porównaniu z punktem pre-OAGB, różnice te były istotne statystycznie dla prawie wszystkich oznaczonych parzystowęglowych SFA (**ECFA**, ang. *even-chain fatty acids*), z wyjątkiem kwasu 12:0 oraz 16:0, którego zawartość w surowicy INI była nieznacznie wyższa (**Tabela uzupełniająca 12.4**). Nie zaobserwowano natomiast żadnej zależności pomiędzy dietą redukcyjną a zawartością OCFA (**Tabela uzupełniająca 12.4**). Dieta redukcyjna nie miała również znaczącego wpływu na poziom BCFA w surowicy pacjentów. Jedynym kwasem z tej grupy, dla którego wykryto istotne różnice był *izo* 15:0, którego poziom obniżał się w surowicy pacjentów po wdrożeniu diety przygotowującej do OAGB (**Tabela uzupełniająca 12.4**). Całkowity poziom MUFA w surowicy po diecie redukcyjnej (punkt pre-OAGB) był obniżony w porównaniu z zawartością wyjściową (punkt INI) (**Rysunek 5.3**). Obniżenie zawartości całkowitych MUFA związane było z istotnie niższą zawartością kwasu 18:1 ($p < 0,001$, **Tabela uzupełniająca 12.4**), który stanowił ~ 88% całkowitych MUFA w surowicy. Po diecie redukcyjnej w surowicy pacjentów z MO zmniejszył się stosunek SFA/MUFA (z $1,04 \pm 0,11$ do $0,97 \pm 0,10$, $p < 0,001$), co odzwierciedla rekomendowane zmniejszenie proporcji SFA w diecie [204]. W surowicy pacjentów w punkcie INI zawartość niezbędnych PUFA - ALA i LA była wyższa niż w dniu zabiegu (pre-OAGB) (**Tabela uzupełniająca 12.4**). Po zastosowaniu diety redukcyjnej trend zawartości PUFA n-6 był malejący ($p > 0,05$), natomiast poziom PUFA n-3 wykazywał

nieznaczną tendencję wzrastającą ($p > 0,05$). Dieta nie miała również wpływu na stosunek PUFA n-6 do PUFA n-3 w surowicy (INI – $12,0 \pm 3,15$, pre-OAGB $11,9 \pm 5,52$, $p = 0,893$).



Rysunek 5.3 Zawartość [%] głównych grup kwasów tłuszczowych w surowicy pacjentów z otyłością olbrzymią

A - zawartość procentowa nasyconych (**SFA***), jednonienasyconych (**MUFA****) i wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (**PUFA**) w surowicy; **B** - zawartość procentowa PUFA serii n-3; **C** - zawartość procentowa PUFA serii n-6. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. **INI** - surowica pacjentów przed rozpoczęciem diety redukcyjnej przygotowującej do zabiegu OAGB, **pre-OAGB** - surowica pacjentów tuż przed operacją OAGB. N = 34, próbki sparowane. Pełny profil FA i n próbek zawarto w Tabeli uzupełniającej 12.4. Rysunek własny, dane nieopublikowane.

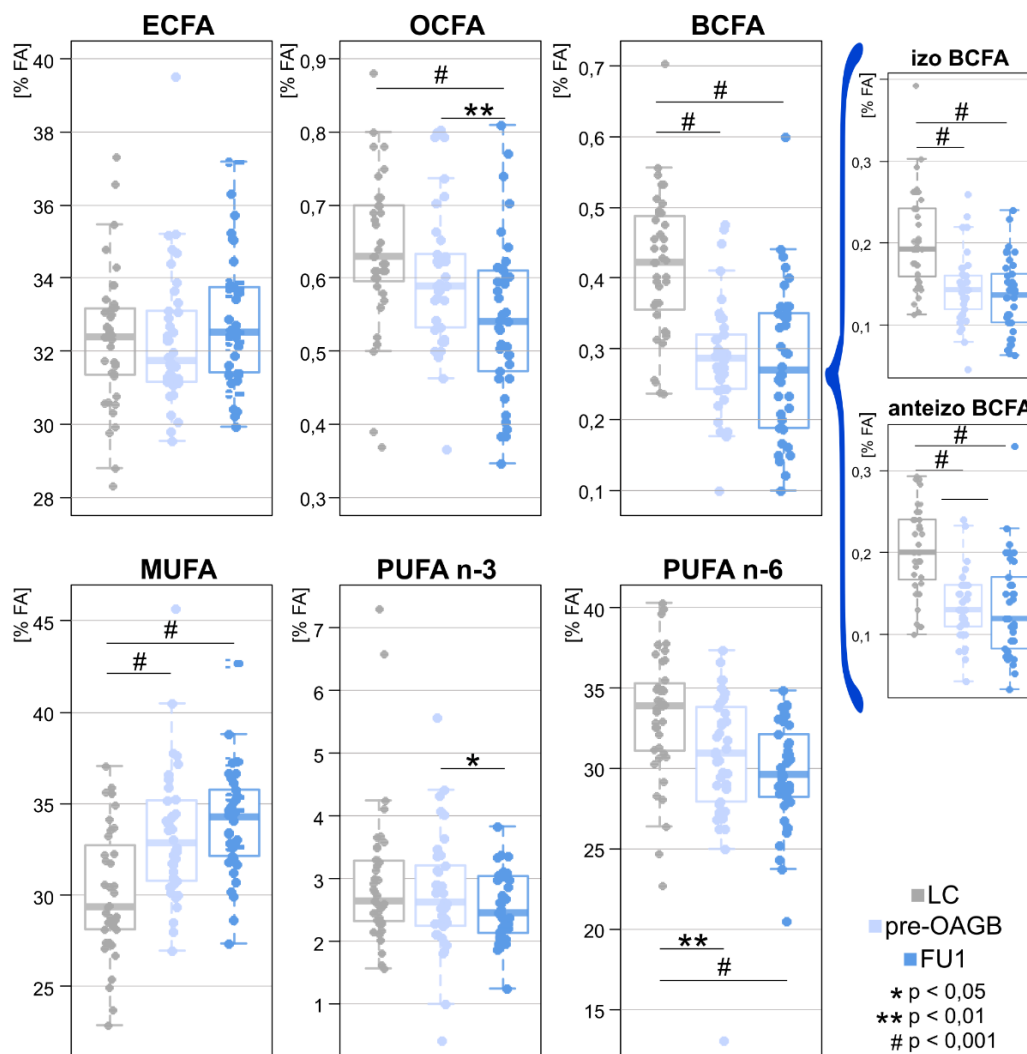
5.1.3 WPŁYW OAGB NA PROFIL I METABOLIZM KWASÓW TŁUSZCZOWYCH U PACJENTÓW Z OTYŁOŚCIĄ

5.1.3.1 KRÓTKOTERMINOWY WPŁYW OAGB NA PROFIL KWASÓW TŁUSZCZOWYCH W SUROWICY PACJENTÓW Z OTYŁOŚCIĄ OLBRZYMIĄ

FA oznaczono w surowicy krwi pacjentów, która była pobrana 2 tygodnie po przeprowadzeniu operacji OAGB – FU1, podczas wizyty kontrolnej. W tym punkcie czasowym trwa gojenie się ran operacyjnych, a pacjenci przestrzegają diety z dużą restrykcją kaloryczną (sekcja 4.2.1.2). W Tabeli 5.4 zaprezentowano szczegółowy profil FA całkowitych w surowicy pacjentów punkcie FU1 oraz jego porównanie profilami FA w surowicy pacjentów

OZNACZANIE PROFILU KWASÓW TŁUSZCZOWYCH W LUDZKIM MATERIALE BIOLOGICZNYM

z MO pre-OAGB oraz zdrowej grupy kontrolnej; natomiast zsumowana procentowa zawartość FA należących do różnych grup, przedstawiona została w postaci wykresów ramka-wąsy (**Rysunek 5.4**). Profil FA w surowicy pacjentów w punkcie FU1 charakteryzował się licznymi różnicami w porównaniu zarówno z grupą kontrolną, jak i poziomem FA przed operacją OAGB (**Tabela 5.4**). Nie odnotowano jednak żadnego wpływu leczenia na ogólny poziom SFA w surowicy porównując pacjentów pre-OAGB i w punkcie FU1 (odpowiednio $33,2 \pm 1,93$ i $33,7 \pm 1,77$, $p = 0,211$) oraz MUFA (**Rysunek 5.4**).



Rysunek 5.4 Zawartość [%] głównych grup kwasów tłuszczowych w surowicy grupy kontrolnej (LC) pacjentów z otyłością przed operacją OAGB (pre-OAGB) i pacjentów 2 tygodnie po operacji OAGB (FU1).

Sumy procentowej zawartości FA w całkowitej puli lipidów. FA nasycone: o parzystej liczbie węgla w łańcuchu alifatycznym (**ECFA**), nieparzyste (**OCFA**) i rozgałęzione (**BCFA**), oraz FA jedno- (**MUFA**) i wielonienasyconych (**PUFA**), szczegółowy profil FA i n próbek zawarto w Tabeli 5.4. **Dane opublikowane** [178].

Tabela 5.4 Profil kwasów tłuszczowych [% zawartości] oznaczony za pomocą GC-MS w surowicy grupy kontrolnej (LC) pacjentów z otyłością przed operacją OAGB (pre-OAGB) i pacjentów 2 tygodnie po operacji OAGB (FU1)

FA	LC n = 30	pre-OAGB n = 38	FU1 n = 38	Istotność porównania pomiędzy grupami [p-wartość]		
				pre-OAGB vs LC	pre-OAGB vs FU1	LC vs FU1
ECFA:						
10:0	0,020 ± 0,008	0,069 ± 0,132	0,008 ± 0,006	0,029	0,007	<0,001
12:0	0,243 ± 0,110	0,137 ± 0,092	0,098 ± 0,056	<0,001	0,030	<0,001
14:0	1,18 ± 0,302	0,997 ± 0,304	0,801 ± 0,265	0,010	0,005	<0,001
16:0	23,2 ± 1,77	24,6 ± 1,75	26,1 ± 1,46	0,001	<0,001	<0,001
18:0	7,30 ± 0,719	6,19 ± 0,604	5,52 ± 0,799	<0,001	<0,001	<0,001
20:0	0,078 ± 0,022	0,093 ± 0,024	0,093 ± 0,025	0,006	0,960	0,006
22:0	0,153 ± 0,056	0,158 ± 0,041	0,139 ± 0,029	0,668	0,017	0,186
24:0	0,142 ± 0,042	0,139 ± 0,035	0,122 ± 0,031	0,726	0,008	0,018
OCFA:						
11:0	0,014 ± 0,006	0,006 ± 0,003	0,005 ± 0,003	<0,001	0,254	<0,001
13:0	0,028 ± 0,012	0,015 ± 0,007	0,013 ± 0,006	<0,001	0,132	<0,001
15:0	0,233 ± 0,051	0,256 ± 0,057	0,244 ± 0,065	0,073	0,334	0,417
17:0	0,254 ± 0,041	0,242 ± 0,041	0,218 ± 0,038	0,226	<0,001	<0,001
19:0	0,033 ± 0,013	0,015 ± 0,006	0,014 ± 0,006	<0,001	0,361	<0,001
21:0	0,015 ± 0,011	0,014 ± 0,008	0,011 ± 0,006	0,424	0,041	0,019
23:0	0,059 ± 0,022	0,055 ± 0,021	0,042 ± 0,014	0,423	<0,001	<0,001
BCFA:						
4,8,12-M-13:0	0,011 ± 0,007	0,011 ± 0,004	0,012 ± 0,008	0,632	0,456	0,778
anteizo 15:0	0,046 ± 0,014	0,026 ± 0,011	0,029 ± 0,013	<0,001	0,275	<0,001
anteizo 17:0	0,118 ± 0,044	0,067 ± 0,028	0,054 ± 0,027	<0,001	0,023	<0,001
anteizo 19:0	0,029 ± 0,009	0,027 ± 0,009	0,037 ± 0,018	0,220	0,003	0,030
anteizo 23:0	0,009 ± 0,005	0,013 ± 0,009	0,013 ± 0,015	0,027	0,857	0,105
izo 14:0	0,009 ± 0,004	0,008 ± 0,003	0,010 ± 0,006	0,187	0,146	0,633
izo 15:0	0,033 ± 0,014	0,020 ± 0,009	0,017 ± 0,007	<0,001	0,183	<0,001

Tabela 5.4 (c.d) Profil kwasów tłuszczowych [% zawartości] oznaczony za pomocą GC-MS w surowicy grupy kontrolnej (LC) pacjentów z otyłością przed operacją OAGB (pre-OAGB) i pacjentów 2 tygodnie po operacji OAGB (FU1)

FA	LC	pre-OAGB	FU1	pre-OAGB vs LC	pre-OAGB vs FU1	LC vs FU1
izo 16:0	0,074 ± 0,018	0,042 ± 0,015	0,036 ± 0,016	<0,001	0,049	<0,001
izo 17:0	0,086 ± 0,032	0,067 ± 0,022	0,061 ± 0,020	0,004	0,055	<0,001
izo 22:0	0,003 ± 0,000	0,009 ± 0,006	0,012 ± 0,014	<0,001	0,258	0,001
CPOA2H	0,167 ± 0,034	0,146 ± 0,041	0,137 ± 0,041	0,016	0,267	0,001
MUFA:						
14:1	0,072 ± 0,031	0,057 ± 0,035	0,046 ± 0,027	0,051	0,063	<0,001
16:1	3,02 ± 0,968	3,50 ± 1,00	3,43 ± 1,14	0,035	0,623	0,092
18:1	26,6 ± 3,09	29,2 ± 3,14	29,9 ± 2,47	<0,001	0,184	<0,001
19:1	0,027 ± 0,011	0,019 ± 0,008	0,021 ± 0,007	<0,001	0,233	0,003
20:1	0,174 ± 0,038	0,150 ± 0,051	0,118 ± 0,027	0,024	0,001	<0,001
22:1	0,034 ± 0,023	0,019 ± 0,009	0,018 ± 0,009	<0,001	0,537	<0,001
24:1	0,228 ± 0,098	0,289 ± 0,098	0,408 ± 0,102	0,008	<0,001	<0,001
PUFA n-6:						
18:2 n-6 (LA)	26,2 ± 3,85	23,0 ± 3,21	20,6 ± 2,79	<0,001	<0,001	<0,001
20:4 n-6 (ARA)	5,61 ± 1,15	6,20 ± 2,00	7,85 ± 2,12	0,118	<0,001	<0,001
20:3 n-6 (DGLA)	1,16 ± 0,231	1,13 ± 0,320	0,903 ± 0,265	0,639	<0,001	<0,001
20:2 n-6 (EDA)	0,163 ± 0,033	0,108 ± 0,032	0,095 ± 0,031	<0,001	0,019	<0,001
22:5 n-6 (n-6 DPA)	0,059 ± 0,026	0,068 ± 0,036	0,058 ± 0,061	0,201	0,339	0,978
22:4 n-6 (AdA)	0,100 ± 0,027	0,116 ± 0,028	0,140 ± 0,040	0,013	<0,001	<0,001
PUFA n-3:						
18:3 n-3 (ALA)	0,344 ± 0,106	0,239 ± 0,115	0,152 ± 0,101	<0,001	<0,001	<0,001
20:5 n-3 (EPA)	1,09 ± 0,717	0,760 ± 0,451	0,541 ± 0,183	0,018	0,001	<0,001
20:4 n-3 (ETA)	0,102 ± 0,028	0,058 ± 0,021	0,043 ± 0,022	<0,001	<0,001	<0,001
22:6 n-3 (DHA)	1,14 ± 0,436	1,36 ± 0,535	1,42 ± 0,387	0,053	0,445	0,004
22:5 n-3 (n-3 DPA)	0,288 ± 0,051	0,339 ± 0,088	0,390 ± 0,093	0,003	<0,001	<0,001
PUFA n-6 / PUFA n-3	12,3 ± 3,74	12,6 ± 5,13	12,2 ± 3,18	0,795	0,648	0,892

Na czerwono - p < 0,05. **CPOA2H** - kwas cis-9,10-metylenohexadekanowy. Nazwy kwasów wielonienasyconych i rozgałęzionych zgodnie z tabelami (odpowiednio Tabela 1.1 oraz Tabela 2.4). **Dane opublikowane** [178].

Krótko po OAGB u pacjentów z MO następowało obniżenie całkowitej procentowej zawartości OCFA i PUFA n-3 (**Rysunek 5.4**). Pacjenci w punkcie FU1 charakteryzowali się najniższym poziomem wszystkich oznaczonych OCFA (o długości łańcucha 11-23 atomów węgla) z wyjątkiem kwasu 15:0, natomiast zmniejszenie ich zawartości w surowicy pacjentów bariatrycznych po operacji było istotne statystycznie dla kwasów 17:0, 21:0 i 23:0 (**Tabela 5.4**). Nie zaobserwowano znaczącej różnicy pomiędzy poziomem BCFA pomiędzy pacjentami przed i po operacji. Jednakże poziom tych grup FA w surowicy, był niższy w porównaniu z LC u pacjentów z MO, zarówno pre-OAGB jak i w punkcie FU1 (**Rysunek 5.4**).

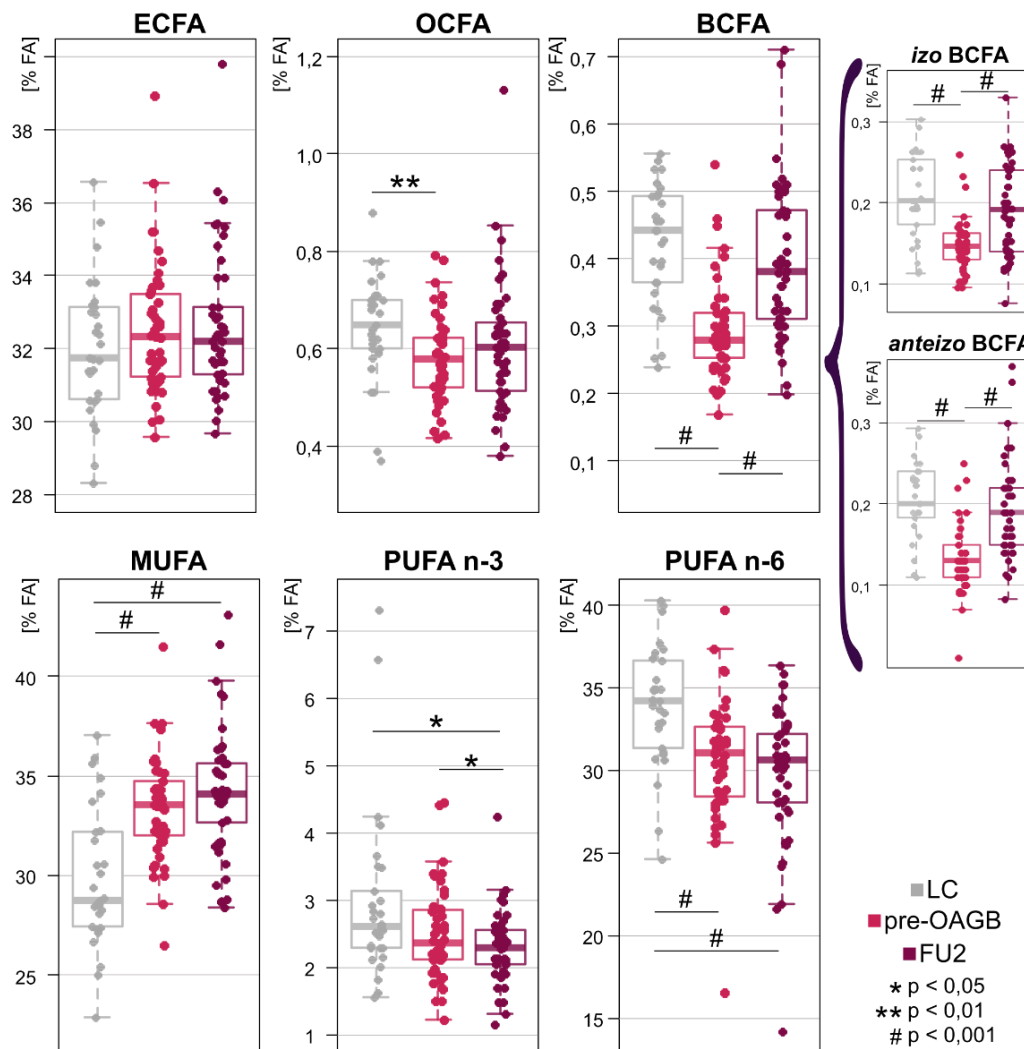
Procentowa zawartość niezbędnych PUFA – ALA i LA w punkcie FU1 była znacznie niższa zarówno w porównaniu z wartościami przedoperacyjnymi (obniżenie o odpowiednio 36,4% i 10,4%), a także w porównaniu z LC (niższa o odpowiednio (55,8% i 21,4%). Dwa tygodnie po OAGB pacjenci charakteryzowali się również najniższą zawartością dwudziestowęglowych PUFA n-3: EPA i kwasu eikozatetraenowego (**ETA**, ang. *eicosatetraenoic acid*) w surowicy i relatywnie wyższymi poziomami dwudziestodwuwęglowych PUFA n-3 (DHA i kwasu dokozapentaenowego n-3: 22:5 n-3; **n-3 DPA**, ang. *docosapentaenoic acid n-3*), zarówno w porównaniu z pre-OAGB, oraz z LC (**Tabela 5.4**). Zależność ta sugeruje możliwą większą aktywność enzymów wydłużających długołańcuchowe PUFA, potencjalnie ELOVL5, którego preferencyjnym substratem jest PUFA n-3 [205]. Pacjenci z MO w punktach pre-OAGB i w FU1, charakteryzowali się niższą zawartością całkowitych PUFA n-6 w surowicy niż LC. W punkcie FU1 zawartość ta była jeszcze niższa niż przed operacją, jednak różnica ta nie była istotna statystycznie (**Rysunek 5.4**). Oprócz wspomnianej niskiej zawartości niezbędnego LA, zaobserwowano również znacząco (w porównaniach vs LC i vs pre-OAGB) niższe poziomy substratów do syntezy ARA, czyli DGLA i kwasu eikozadienowego 20:2 n-6 (**EDA**, ang. *eicosadienoic acid*) [206]. Zawartość ARA w surowicy pacjentów z MO była istotnie wyższa niż w surowicy LC, przy czym po operacji rosła ona znacząco, nie zaobserwowano jednak różnicy w stosunku PUFA n-6 do PUFA n-3 pomiędzy badanymi grupami (**Tabela 5.4**).

5.1.3.2 DŁUGOTERMINOWY WPŁYW LECZENIA BARIATRYCZNEGO NA PROFIL KWASÓW TŁUSZCZOWYCH

Szczegółowy profil FA całkowitych lipidów w surowicy pacjentów został następnie oznaczony 6-9 miesięcy po operacji OAGB (FU2), czyli po czasie, w którym przewód pokarmowy zagoił się i zaadaptował do wprowadzonych operacyjnie zmian anatomicznych,

OZNACZANIE PROFILU KWASÓW TŁUSZCZOWYCH W LUDZKIM MATERIALE BIOLOGICZNYM

a pacjenci mogą spożywać wszystkie rodzaje produktów pokarmowych. [55]. W **Tabeli 5.5** przedstawiono szczegółowy profil FA w punkcie FU2, a całkowita zawartość procentowa głównych grup FA została przedstawiona na **Rysunku 5.5**.



Rysunek 5.5 Zawartość [%] głównych grup kwasów tłuszczowych w surowicy grupy kontrolnej (LC) pacjentów z otyłością przed operacją OAGB (pre-OAGB) i pacjentów 6-9 miesięcy po operacji OAGB (FU2)

Sumy procentowej zawartości FA w całkowitej puli lipidów. FA nasycone: o parzystej liczbie węgla w łańcuchu alifatycznym (**ECFA**), nieparzyste (**OCFA**) i rozgałęzione (**BCFA**), oraz FA jedno- (**MUFA**) i wielonienasyconych (**PUFA**). Szczegółowy profil FA i n próbek zawarto w Tabeli 5.5. **Dane opublikowane** [201,202].

Tabela 5.5 Profil kwasów tłuszczowych [% zawartości] oznaczony za pomocą GC-MS w surowicy grupy kontrolnej (LC) pacjentów z otyłością przed operacją OAGB (pre-OAGB) i pacjentów 6-9 miesięcy po operacji OAGB (FU2)

FA	LC n = 29	pre-OAGB n = 46	FU2 n = 46	Istotność porównania pomiędzy grupami [p-wartość]		
				pre-OAGB vs LC	pre-OAGB vs FU2	LC vs FU2
ECFA:						
10:0	0,021 ± 0,001	0,027 ± 0,006	0,009 ± 0,001	0,278	0,003	< 0,001
12:0	0,223 ± 0,018	0,090 ± 0,006	0,157 ± 0,018	< 0,001	< 0,001	0,009
14:0	1,16 ± 0,057	0,78 ± 0,044	1,13 ± 0,067	< 0,001	< 0,001	0,678
16:0	23,0 ± 0,347	25,0 ± 0,255	24,6 ± 0,272	< 0,001	0,084	0,001
18:0	7,20 ± 0,137	6,26 ± 0,087	6,45 ± 0,097	< 0,001	0,016	< 0,001
20:0	0,078 ± 0,004	0,092 ± 0,003	0,090 ± 0,004	0,013	0,762	0,029
22:0	0,151 ± 0,010	0,158 ± 0,006	0,125 ± 0,004	0,574	< 0,001	0,019
24:0	0,142 ± 0,008	0,120 ± 0,005	0,096 ± 0,005	0,017	< 0,001	< 0,001
OCFA:						
11:0	0,014 ± 0,001	0,006 ± 0,001	0,005 ± < 0,001	< 0,001	0,085	< 0,001
13:0	0,028 ± 0,002	0,015 ± 0,001	0,015 ± 0,001	< 0,001	0,679	< 0,001
15:0	0,237 ± 0,010	0,228 ± 0,008	0,268 ± 0,012	0,493	< 0,001	0,060
17:0	0,259 ± 0,007	0,239 ± 0,006	0,247 ± 0,008	0,034	0,201	0,278
19:0	0,034 ± 0,003	0,019 ± 0,001	0,021 ± 0,001	< 0,001	0,473	< 0,001
21:0	0,015 ± 0,002	0,013 ± 0,001	0,011 ± 0,001	0,274	0,307	0,081
23:0	0,057 ± 0,004	0,057 ± 0,003	0,038 ± 0,002	0,968	< 0,001	< 0,001
BCFA:						
4,8,12-M-13:0	0,011 ± 0,001	0,010 ± 0,001	0,014 ± 0,002	0,680	0,050	0,162
anteizo 15:0	0,045 ± 0,003	0,027 ± 0,002	0,043 ± 0,003	< 0,001	< 0,001	0,562
anteizo 17:0	0,120 ± 0,007	0,065 ± 0,004	0,093 ± 0,006	< 0,001	< 0,001	0,005
anteizo 19:0	0,030 ± 0,002	0,030 ± 0,002	0,040 ± 0,002	0,749	< 0,001	< 0,001
anteizo 23:0	0,008 ± 0,001	0,013 ± 0,001	0,015 ± 0,001	< 0,001	0,063	< 0,001
izo 14:0	0,009 ± 0,001	0,008 ± 0,001	0,008 ± 0,001	0,497	0,575	0,191
izo 15:0	0,032 ± 0,002	0,022 ± 0,002	0,027 ± 0,002	0,001	0,018	0,070
izo 16:0	0,075 ± 0,003	0,040 ± 0,002	0,056 ± 0,003	< 0,001	< 0,001	< 0,001

Tabela 5.5 (c.d.) Profil kwasów tłuszczowych [% zawartości] oznaczony za pomocą GC-MS w surowicy grupy kontrolnej (LC) pacjentów z otyłością przed operacją OAGB (pre-OAGB) i pacjentów 6-9 miesięcy po operacji OAGB (FU2)

FA	LC	pre-OAGB	FU2	Istotność porównania pomiędzy grupami [p-wartość]		
	n = 29	n = 46	n = 46	pre-OAGB vs LC	pre-OAGB vs FU2	LC vs FU2
izo 17:0	0,089 ± 0,006	0,072 ± 0,004	0,090 ± 0,005	0,015	< 0,001	0,885
izo 22:0	0,003 ± < 0,001	0,009 ± 0,001	0,010 ± 0,001	< 0,001	0,032	< 0,001
CPOA2H	0,164 ± 0,006	0,155 ± 0,005	0,163 ± 0,009	0,213	0,307	0,862
MUFA:						
14:1	0,072 ± 0,006	0,042 ± 0,003	0,065 ± 0,007	< 0,001	< 0,001	0,498
16:1	2,84 ± 0,146	2,99 ± 0,112	3,34 ± 0,137	0,400	0,002	0,013
18:1	26,5 ± 0,576	29,8 ± 0,369	30,2 ± 0,398	< 0,001	0,290	< 0,001
19:1	0,027 ± 0,002	0,023 ± 0,001	0,025 ± 0,002	0,149	0,329	0,496
20:1	0,175 ± 0,006	0,158 ± 0,006	0,139 ± 0,004	0,046	0,002	< 0,001
22:1	0,035 ± 0,005	0,016 ± 0,001	0,017 ± 0,001	< 0,001	0,645	0,001
24:1	0,232 ± 0,020	0,257 ± 0,015	0,332 ± 0,014	0,317	< 0,001	< 0,001
PUFA n-6:						
18:2 n-6 (LA)	26,9 ± 0,668	23,2 ± 0,525	22,7 ± 0,548	< 0,001	0,284	< 0,001
20:4 n-6 (ARA)	5,53 ± 0,219	6,17 ± 0,268	5,62 ± 0,188	0,069	0,008	0,745
20:3 n-6 (DGLA)	1,13 ± 0,046	1,03 ± 0,035	1,13 ± 0,037	0,067	0,008	0,923
20:2 n-6 (EDA)	0,167 ± 0,006	0,123 ± 0,005	0,148 ± 0,004	< 0,001	< 0,001	0,016
22:5 n-6 (n-6 DPA)	0,061 ± 0,005	0,056 ± 0,007	0,060 ± 0,005	0,570	0,367	0,948
22:4 n-6 (AdA)	0,099 ± 0,006	0,103 ± 0,004	0,134 ± 0,023	0,582	0,192	0,143
PUFA n-3:						
18:3 n-3 (ALA)	0,323 ± 0,016	0,201 ± 0,014	0,218 ± 0,012	< 0,001	0,203	< 0,001
20:5 n-3 (EPA)	1,09 ± 0,152	0,69 ± 0,049	0,62 ± 0,035	0,017	0,190	0,005
20:4 n-3 (ETA)	0,100 ± 0,006	0,050 ± 0,003	0,042 ± 0,003	< 0,001	0,002	< 0,001
22:6 n-3 (DHA)	1,17 ± 0,087	1,25 ± 0,058	1,09 ± 0,047	0,466	0,001	0,399
22:5 n-3 (n-3 DPA)	0,286 ± 0,010	0,296 ± 0,011	0,329 ± 0,013	0,537	0,001	0,013
PUFA n-6 / PUFA n-3	12,8 ± 3,98	13,3 ± 4,08	13,6 ± 3,72	0,609	0,520	0,374

Na czerwono - p < 0,05. **CPOA2H** - kwas cis-9,10-metylenohexadekanowy. Nazwy kwasów wielonienasyconych i rozgałęzionych zgodne z tabelami (odpowiednio Tabela 1.2 oraz Tabela 2.4). **Dane opublikowane** [201].

OZNACZANIE PROFILU KWASÓW TŁUSZCZOWYCH W LUDZKIM MATERIALE BIOLOGICZNYM

Nie odnotowano istotnych różnic w zawartości ECFA w surowicy pomiędzy wszystkimi porównywanymi grupami (LC, pre-OAGB i FU2). Zaobserwowane różnice całkowitej zawartości MUFA były analogiczne do wyników uzyskanych dla FU1 (**Rysunek 5.4**), tj. pacjenci przed i po operacji charakteryzowali się wyższą zawartością MUFA w surowicy niż LC (**Rysunek 5.5**).

Zawartość całkowitych OCFA w surowicy pacjentów FU2 wykazywała nieznaczną tendencję do wzrostu w porównaniu z pre-OAGB (brak istotności statystycznej, **Rysunek 5.5**). W przeciwieństwie do punktu FU1 (**Tabela 5.4**), porównanie sparowanych próbek pacjentów w FU2 wykazało istotnie podwyższony poziom kwasu 15:0, zachowany został natomiast obniżony poziom 23:0 (**Tabela 5.5**). Wiele wykrytych różnic pomiędzy surowicą pre-OAGB a FU2 dotyczyło kwasów rozgałęzionych – *anteizo* BCFA o 15-19 węglowych łańcuchach oraz *izo* BCFA o 15-22 węglowych łańcuchach (**Tabela 5.5**). Całkowita zawartość BCFA, *izo* BCFA i *anteizo* BCFA w surowicy w punkcie FU2 była wyższa niż u pacjentów pre-OAGB i zbliżona do osób o prawidłowej masie ciała.

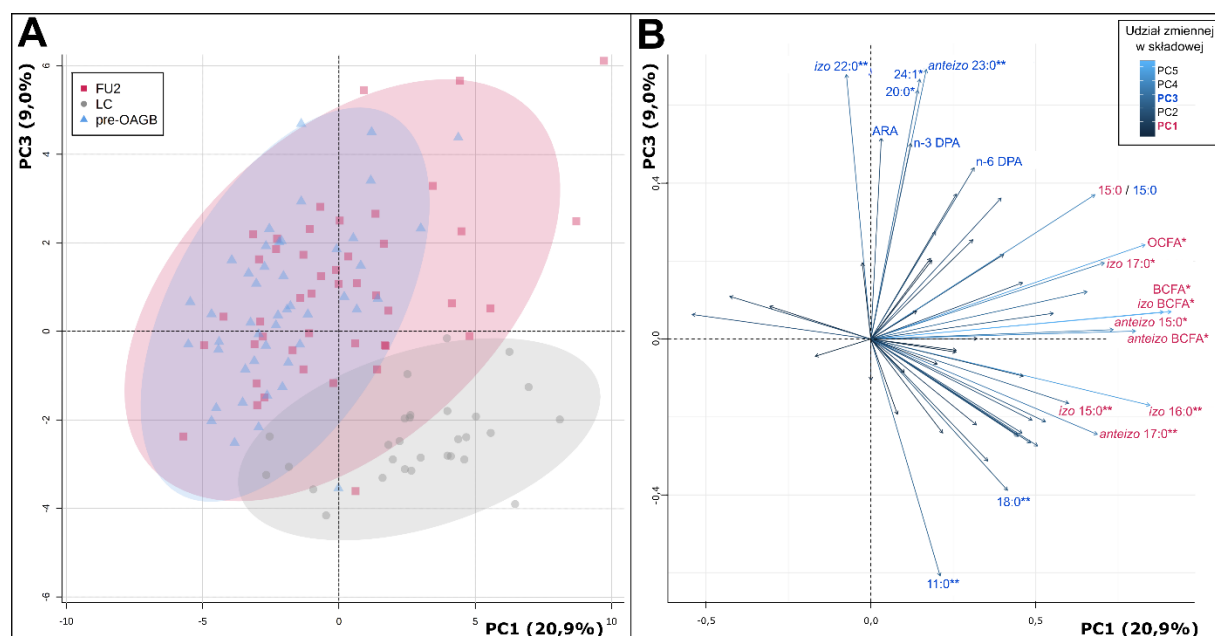
Surowica pacjentów w punkcie FU2 charakteryzowała się wyższą zawartością ARA niż pre-OAGB (**Tabela 5.5**). Nie wykryto natomiast różnic w przed i pooperacyjnej zawartości niezbędnych PUFA, co zaobserwowano wcześniej dla punktu FU1 (**Tabela 5.4**). Zawartość PUFA n-3 w surowicy pacjentów w punkcie FU2 była niższa niż przed OAGB (**Rysunek 5.5**). Pacjenci w punkcie FU2 charakteryzowali się niższym poziomem DHA niż przed operacją (**Tabela 5.5**). W przeciwieństwie do FU1 (**Tabela 5.4**), nie zaobserwowano różnic pomiędzy zawartością EPA u pacjentów, jednakże poziom tego kwasu nadal był niższy niż zawartość oznaczona w surowicy LC. Nie zaobserwowano również istotnych różnic pomiędzy stosunkiem zawartości PUFA n-6 do PUFA n-3 w surowicy LC, pre-OAGB i FU2 (**Tabela 5.5**, do analizy użyto nieparametrycznej ANOVA Kruskal-Wallis $H = 0,63$, $df = 2$, $p = 0,730$).

W surowicy pacjentów w punkcie FU2 zaobserwowano mniej różnic w zawartości poszczególnych FA w surowicy w stosunku do grupy LC (**Tabela 5.5**), niż porównując punkt FU1 vs LC (**Tabela 5.5**). Pojawiło się pytanie: czy profil FA oznaczone w surowicach pacjentów w punkcie FU2 normalizuje się do profilu oznaczonych w surowicy grupy LC? Aby na nie odpowiedzieć, przeprowadzono analizę PCA, która umożliwiła kompresję zbioru danych z wieloma zmiennymi (pełny profil FA), i zwizualizowanie wzajemnego podobieństwa badanych grup. W modelu PCA (**Rysunek 5.6A**) grupy LC była częściowo odseparowana od pacjentów z MO na płaszczyźnie PC1 (20,9% całkowitej wariancji) i PC3 (9,0% całkowitej

OZNACZANIE PROFILU KWASÓW TŁUSZCZOWYCH W LUDZKIM MATERIALE BIOLOGICZNYM

wariancji), udział tych składowych w wyjaśnionej zmienności pomiędzy grupami został podsumowany w tabeli zawartej w Materiałach Uzupełniających (**Tabela uzupełniająca 12.5**). Zawartość w surowicy FA *izo* 22:0, *anteizo* 23:0, 20:0 i 24:1 oraz 11:0 i 18:0 były najważniejszymi zmiennymi przyczyniającymi się istotnie do oddzielenia grupy LC od pacjentów z MO, co zilustrowano na wykresie zmiennych (**Rysunek 5.6B**). Zmienne są reprezentowane w postaci wektora ładunków, którego kierunek i długość określa wpływ poszczególnych zmiennych na główne składowe. Przykładowo: wektor dla *izo* 22:0 skierowany w górę wskazuje duży udział zawartości tego FA w składową PC3.

Na podstawie pełnego profilu FA w surowicy nie udało się oddzielić pacjentów pre-OAGB oraz FU2. Analiza PCA uwidoczniała także wysoką wariację pełnego profilu całkowitych FA w grupie FU2 (**Rysunek 5.6A**).

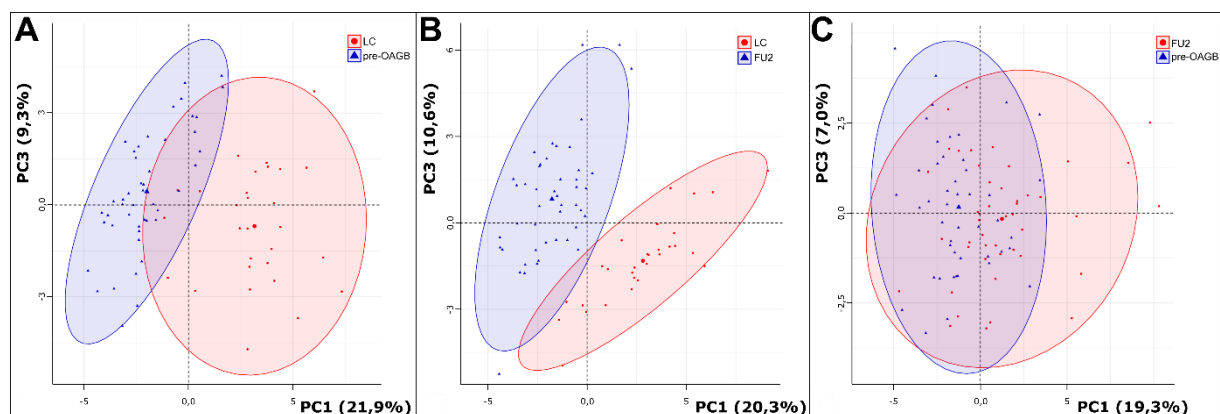


Rysunek 5.6 Wyniki analizy PCA na podstawie pełnego profilu kwasów tłuszczowych w surowicy grupy kontrolnej (LC) pacjentów z otyłością przed operacją OAGB (pre-OAGB) i pacjentów 6-9 miesięcy po operacji OAGB (FU2)

A - wykres obserwacji, **B**- wykres zmiennych. * - zmienne różniące się istotnie ($p < 0,01$) w porównaniu LC ($n = 29$) vs pre-OAGB ($n = 46$) lub LC vs FU2 ($n = 46$); ** - zmienne różniące się istotnie ($p < 0,01$) pomiędzy pre-OAGB i FU2; **na czerwono** - zmienne o największym udziale w składowej 1 (PC1), **na niebiesko** - zmienne o największym udziale w składowej 3 (PC3) **Dane opublikowane** [201].

Brak różnicowania się grup pacjentów pre-OAGB i FU2 na podstawie pełnego profilu FA w surowicy potwierdzono wykonując analizę PCA osobno dla par grup badawczych (**Rysunek 5.7**). Projekcja zmiennych na płaszczyznę czynników dla PC1 i PC3 dla grup: LC i pre-OAGB (**Rysunek 5.7A**, 44,7% skumulowanej wyjaśnionej wariancji) oraz LC i FU2

(**Rysunek 5.7B** 48,6% skumulowanej wyjaśnionej wariancji), wskazała, jak uprzednio, tendencję do odseparowywania się LC od pacjentów z MO, mimo dużej wariancji w zbiorze danych. W modelu PCA dla sparowanych próbek pre-OAGB i FU2 (**Rysunek 5.7C**) pełny profil FA w surowicy nie pozwalał na odseparowanie grup. Różnicowania grup nie zaobserwowano również w analizie uwzględniającej punkty pobrania krwi od pacjentów – pre-OAGB, FU1 i FU2 (**Rysunek uzupełniający 12.2**).



Rysunek 5.7 Wyniki analizy PCA na podstawie pełnego profilu kwasów tłuszczowych w surowicy dla par grup badawczych

A – grupa kontrolna (LC, n = 29) vs. Pacjenci z otyłością przed operacją OAGB (pre-OAGB, n = 46); **B** – LC vs. Pacjenci 6-9 miesięcy po operacji OAGB (FU2, n = 46); **C** – pre-OAGB vs. FU2. **Dane opublikowane** [201].

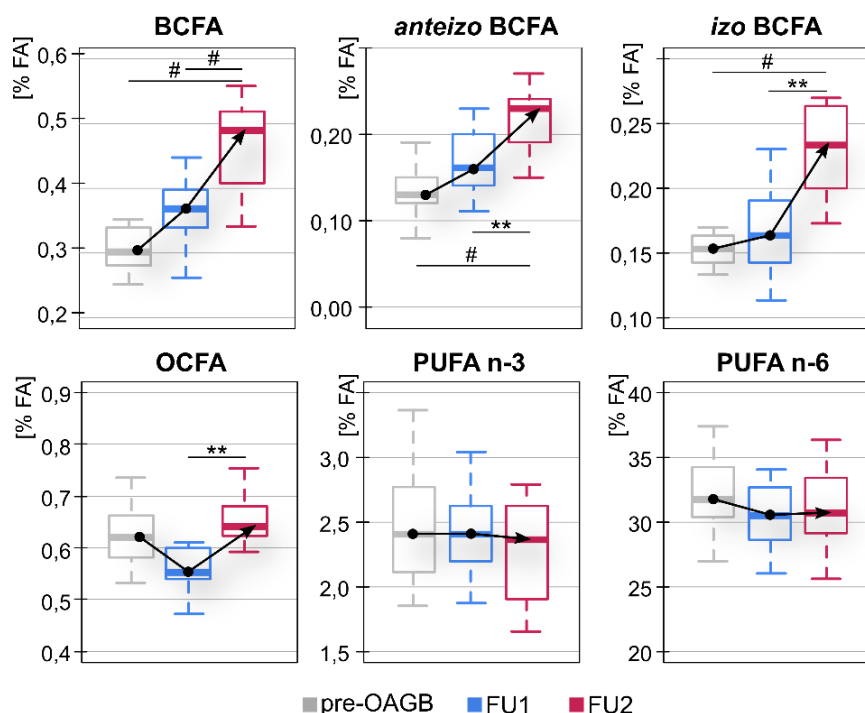
5.1.3.3 TRENDY ZMIAN W PROFILACH KWASÓW TŁUSZCZOWYCH PO OPERACJI BARIATRYCZNEJ

Zmiany w profilach FA w surowicy pacjentów zaobserwowane w porównaniach punktów pre-OAGB vs FU1 oraz pre-OAGB vs FU2, sugerowały, że zawartość niektórych bioaktywnych, potencjalnie dobroczynnych grup FA tzn. OCFA i BCFA obniża się w okresie rekonwalescencji po operacji (FU1) i podnosi się po dłuższym czasie od przeprowadzonego zabiegu (FU2). Ponadto, zmiany zapoczątkowane leczeniem bariatrycznym wydawały się nie wpływać na zawartość PUFA w surowicy krwi pacjentów z MO. Aby potwierdzić te obserwacje w grupie 13 pacjentów, od których surowicę udało uzyskać się przed operacją oraz w obu punktach czasowych po operacji, przeprowadzono analizę wariancji RM ANOVA z powtarzanymi pomiarami, co umożliwiła zobrazowanie efektu czasu niwelując wariancje osobnicze pomiędzy poszczególnymi pacjentami.

Różnice w średnich wartościach oznaczonych w surowicy FA występowały dla grup *anteizo* BCFA ($F(2, 12) = 12,939, p < 0,001$), całkowitych BCFA ($F(2,12) = 16,494, p < 0,001$).

OZNACZANIE PROFILU KWASÓW TŁUSZCZOWYCH W LUDZKIM MATERIALE BIOLOGICZNYM

Różnice w medianach wykazano również w grupie *izo* BCFA, poddanej nieparametrycznej analizie Friedmana ($\chi^2 = 18,84$, $df = 2$, $p < 0,001$). Nie wykryto różnic w zawartości PUFA n-3 i n-6 oraz w indeksie PUFA n-6 do PUFA n-3. Wyniki porównań *post hoc*, przedstawione na **Rysunku 5.8**, potwierdziły, że w krótkim okresie po operacji (punkt FU1) nie zachodzą istotne zmiany w poziomie BCFA (całkowitych, *izo* i *anteizo*). Wzrost zawartości w surowicy grup tych FA po 2 tygodniach od operacji, w analizie sparowanych próbek pacjentów nie był istotny statystycznie, a procentowa zawartość całkowitych, *izo* i *anteizo* BCFA w surowicach pacjentów w punkcie FU1 była wciąż istotnie niższa niż w surowicy zdrowych osób o prawidłowej masie ciała (p-wartość odpowiednio 0,020, 0,026 i 0,023). Analiza RM ANOVA potwierdziła natomiast podwyższenie zawartości całkowitych, *izo* i *anteizo* BCFA (**Rysunek 5.8**) w punkcie FU2, czyli w dłuższym czasie po przeprowadzonej operacji OAGB. Zawartość OCFA w surowicy krwi analizowanych pacjentów również była istotnym statystycznie czynnikiem w RM ANOVA (nieparametryczna analiza Friedmana $\chi^2 = 10,31$, $df = 2$, $p = 0,006$), a test *post hoc* wykazały, że różnica median dotyczy porównania punktów FU1 vs FU2 ($p = 0,005$). W punkcie FU1 dla sparowanych próbek zaobserwowano obniżenie zawartości OCFA w stosunku do wartości pre-OAGB o 6.45%, nie było ono jednak istotne statystycznie, w przeciwieństwie do analizy dla całej grupy pacjentów w punkcie FU1 (**Rysunek 5.4**). W punkcie FU2 zawartość OCFA w surowicy pacjentów wzrastała i nie różniła się już istotnie do wartości obserwowanych pre-OAGB (**Rysunek 5.8**) oraz w stosunku do LC ($p = 0,303$).

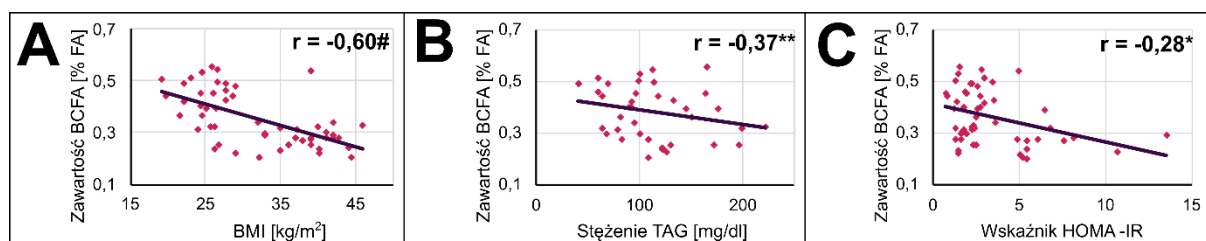


Rysunek 5.8 Zmiany w zawartości [%] grup kwasów tłuszczowych w surowicy pacjentów z otyłością przed operacją OAGB (pre-OAGB) i pacjentów 2 tygodnie (FU1) i 6-9 miesięcy po operacji OAGB (FU2)

** p < 0,01, # p < 0,001 Testy *post hoc* po analizie wariancji RM ANOVA z powtarzanymi pomiarami, n=13. Opracowanie własne, dane niepublikowane.

5.1.3.4 WPŁYW LECZENIA OAGB NA POZIOM ROZGAŁĘZIONYCH KWASÓW TŁUSZCZOWYCH

Wyniki oznaczania FA za pomocą GC-MS w surowicy oraz skupiskach tkanki tłuszczowej uczestników badania, wskazały na zaburzenia w zawartości BCFA w grupie pacjentów z MO. Niższa zawartość BCFA w materiale biologicznym pacjentów z MO, w porównaniu z LC, oraz podniesienie poziomu BCFA w surowicy pacjentów po OAGB w punkcie FU2, gdy średnie BMI pacjentów było obniżone już poniżej progu klasyfikacji otyłości (**Tabela 5.2**), wskazywały na potencjalny związek pomiędzy BMI a zawartością BCFA w surowicy. Analiza zależności pomiędzy zawartością BCFA w surowicy uczestników badania, a parametrami biochemicznymi i antropometrycznymi wykazała wysoką, wg. skali Stanisza, odwrotną korelację pomiędzy zawartością BCFA w surowicy, a wskaźnikiem BMI (**Rysunek 5.9A**). Poza BMI, zawartość BCFA była w sposób istotnie statystyczny negatywnie skorelowana również ze stężeniem TAG (**Rysunek 5.9B**), a także z parametrem związanym z insulinoopornością – indeksem HOMA-IR (**Rysunek 5.9C**). W modelu regresji wielorakiej zmienną objaśniającą zawartość BCFA we krwi był wskaźnik BMI (p < 0,001), natomiast stężenie TAG i indeks HOMA-IR nie miały zdolności predykcyjnej.



Rysunek 5.9 Istotne korelacje pomiędzy zawartością rozgałęzionych kwasów tłuszczowych (BCFA) w surowicy krwi uczestników badania a parametrami biochemicznymi i antropometrycznymi

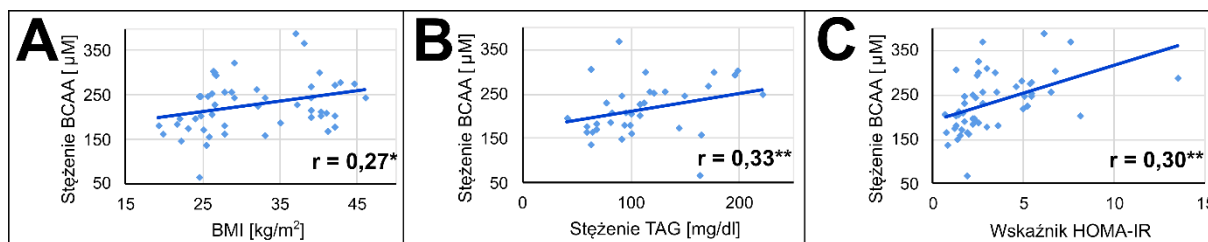
A - ze wskaźnikiem BMI, **B** - ze stężeniem triacylogliceroli (TAG), **C** - ze wskaźnikiem insulinooporności HOMA-IR. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, # $p < 0,001$. $N = 46$. Obliczenia korelacji wykonane na podstawie parametrów biochemicznych i antropometrycznych z Centralnego Laboratorium Klinicznego oraz stężeń aminokwasów, oznaczonych dzięki uprzejmości Katedry Biochemii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. **Wyniki opublikowane** [202].

Zważywszy na możliwość endogennej syntezy BCFA z acylo-CoA powstających w wyniku katabolizmu BCAA (**Rysunek 2.7**), a także na obserwowany związek BCAA z rozwijaniem się insulinooporności i T2DM [43,84], we współpracy z Katedrą Biochemii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, w surowicy pacjentów został oznaczony techniką LC-MS profil AA. Stężenia BCAA – waliny, izoleucyny i leucyny w surowicy pacjentów z MO w punktach pre-OAGB i FU2, oraz w surowicy zdrowych osób o prawidłowej masie ciała przedstawiono w **Tabeli 5.6**. Całkowite stężenie BCAA w surowicy pacjentów z MO przed leczeniem OAGB było wyższe niż w grupie LC, a w punkcie FU2 stężenie BCAA obniżało się do poziomu niższego niż to obserwowane wśród zdrowych uczestników badania (**Rysunek 5.11A**). Analiza korelacji stężenia BCAA w surowicy z parametrami biochemicznymi i antropometrycznymi wykazała, że BCAA są dodatnio skorelowane ze wskaźnikami BMI i HOMA-IR, i stężeniem TAG (**Rysunek 5.10**).

Tabela 5.6 Stężenie rozgałęzionych aminokwasów w surowicy pacjentów z otyłością przed operacją OAGB (pre-OAGB) i pacjentów 6-9 miesięcy po operacji OAGB (FU2), w porównaniu z grupą kontrolną (LC)

Stężenie [μM]	LC n = 29	pre-OAGB n = 46	FU2 n = 46	Istotność porównania pomiędzy grupami [p-wartość]		
				pre-OAGB vs LC	pre-OAGB vs FU2	FU2 vs LC
Walina	128 \pm 35,8	123 \pm 25,9	97,7 \pm 24,5	0,420	< 0,001	< 0,001
Leucyna	57,6 \pm 19,2	77,1 \pm 20,0	47,4 \pm 18,3	< 0,001	< 0,001	0,020
Izoleucyna	32,0 \pm 12,7	45,9 \pm 14,5	28,4 \pm 10,5	< 0,001	< 0,001	0,190

Na czerwono - $p < 0,05$. Dane uzyskane dzięki uprzejmości Katedry Biochemii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. **Dane opublikowane** [202].

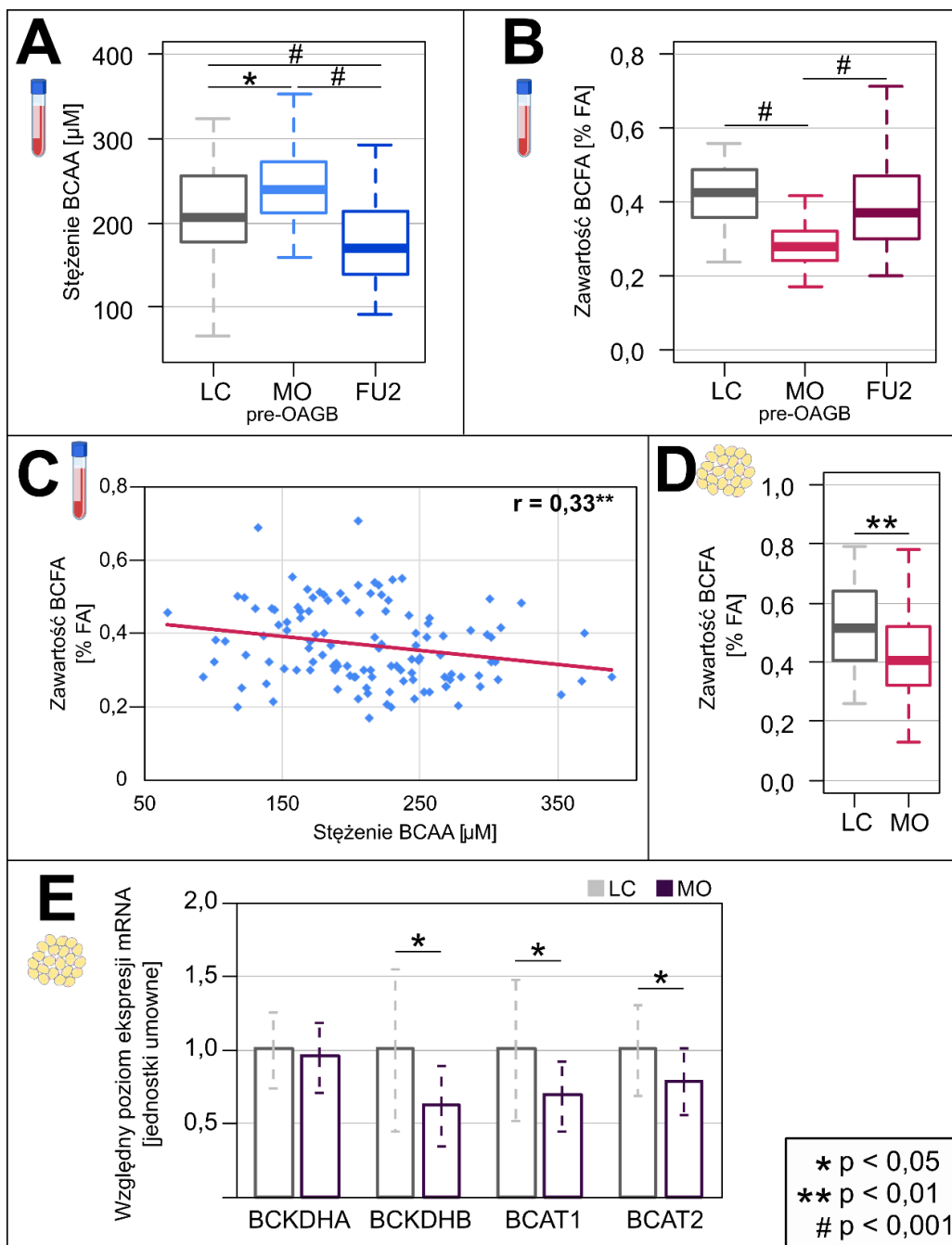


Rysunek 5.10 Istotne korelacje pomiędzy stężeniem rozgałęzionych aminokwasów (BCAA) w surowicy krwi uczestników badania a parametrami biochemicznymi i antropometrycznymi

A - ze wskaźnikiem BMI, **B** - ze stężeniem triacylogliceroli (TAG), **C** - ze wskaźnikiem insulinooporności HOMA-IR; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. $N = 46$. Obliczenia korelacji wykonane na podstawie parametrów biochemicznych i antropometrycznych z Centralnego Laboratorium Klinicznego oraz stężeń aminokwasów, oznaczonych dzięki uprzejmości Katedry Biochemii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. **Wyniki opublikowane** [202].

Wyniki oznaczania stężeń BCAA i zawartości BCFA rozpatrywano w kontekście diagnozy T2DM. Przed leczeniem bariatrycznym stężenie BCAA w surowicy pacjentów z MO ze stwierdzoną T2DM było istotnie wyższe niż w przypadku pacjentów bez T2DM (**Rysunek uzupełniający 12.3A**), czego nie zaobserwowano w przypadku zawartości BCFA (**Rysunek uzupełniający 12.3B**). Po leczeniu bariatrycznym OAGB, w punkcie FU2 stężenie BCAA i zawartość BCFA w surowicy pacjentów nie różniły się pomiędzy pacjentami z uprzednio stwierdzoną T2DM i pacjentami nieobciążonymi tą chorobą (**Rysunek uzupełniający 12.3**). W modelu regresji wielorakiej uwzględniającym pacjentów pre-OAGB, FU2 i LC zmienną objaśniającą zawartość BCAA we krwi był wskaźnik HOMA-IR ($p < 0,038$), jednakże współczynnik determinacji wielorakiej był niski $R^2 = 0,197$. Rozpatrując wyjściowe (przed OAGB) stężenia BCAA we krwi, zmienną o największej wartości predykcyjnej było stężenie TAG ($p = 0,007$).

OZNACZANIE PROFILU KWASÓW TŁUSZCZOWYCH W LUDZKIM MATERIALE BIOLOGICZNYM



Rysunek 5.11 Metabolizm rozgałęzionych kwasów tłuszczowych i rozgałęzionych aminokwasów u pacjentów z otyłością przed zabiegiem OAGB (MO) i 6-9 miesięcy po zabiegu (FU2) w porównaniu do grupy kontrolnej (LC)

A - stężenie rozgałęzionych aminokwasów (BCAA) w surowicy (dane uzyskane dzięki uprzejmości Katedry Biochemii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego); **B** - zawartość [%] rozgałęzionych kwasów tłuszczowych (BCFA) w surowicy; **C** - zawartość [%] BCFA w otrzewnej tkance tłuszczowej; **D** - korelacja pomiędzy stężeniem BCAA i zawartością BCFA w surowicy wszystkich uczestników badania; **E** - względny poziom ekspresji mRNA enzymów zaangażowanych w katabolizm BCAA w otrzewnej tkance tłuszczowej (wyniki analizy poziomu mRNA zostały uzyskane dzięki uprzejmości Katedry i Zakładu Biochemii Farmaceutycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego); **BCKDHA/B** - kompleks dehydrogenazy rozgałęzionych α -ketokwasów podjednostka E1 α/β , **BCAT** - aminotransferaza aminokwasów o rozgałęzionych łańcuchach izoforma 1/2. **Dane opublikowane** [202].

Zawartość BCFA w surowicy była odwrotnie skorelowana ze stężeniem BCAA (**Rysunek 5.11C**). W celu zbadania potencjalnego wpływu katabolizmu BCAA na obserwowaną u pacjentów z MO obniżoną zawartość BCFA w porównaniu z LC, we współpracy z Katedrą i Zakładem Biochemii Farmaceutycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, zbadano poziomy ekspresji enzymów zaangażowanych w katabolizm BCAA. Względny poziom ekspresji mRNA BCAT izoformy 1 (cytozolowej) i izoformy 2 (mitochondrialnej) oraz enzymu BCKDH – łańcuchów α i β podjednostki E1, w SAT nie różnił się pomiędzy LC a pacjentami z MO pre-OAGB (**Tabela uzupełniająca 12.6**). W tej tkance nie wykryto również różnic w zawartości BCFA pomiędzy LC a pacjentami z MO (**Tabela uzupełniająca 12.3**). W VAT, w której zawartość BCFA była niższa u pacjentów z MO w porównaniu z LC (**Rysunek 5.11D**), względny poziom ekspresji BCKDHB, BCAT1 i BCAT2 był znacząco niższy, jednak nie wykryto różnic w poziomie ekspresji BCKDHA (**Rysunek 5.11E**).

5.2 OZNACZANIE STĘŻENIA OKSYLIPIN TECHNIKĄ SPE-LC-MS/MS

5.2.1 CHARAKTERYSTYKA METODY OZNACZANIA OKSYLIPIN W SUROWICY KRWI TECHNIKĄ SPE-LC-MS/MS

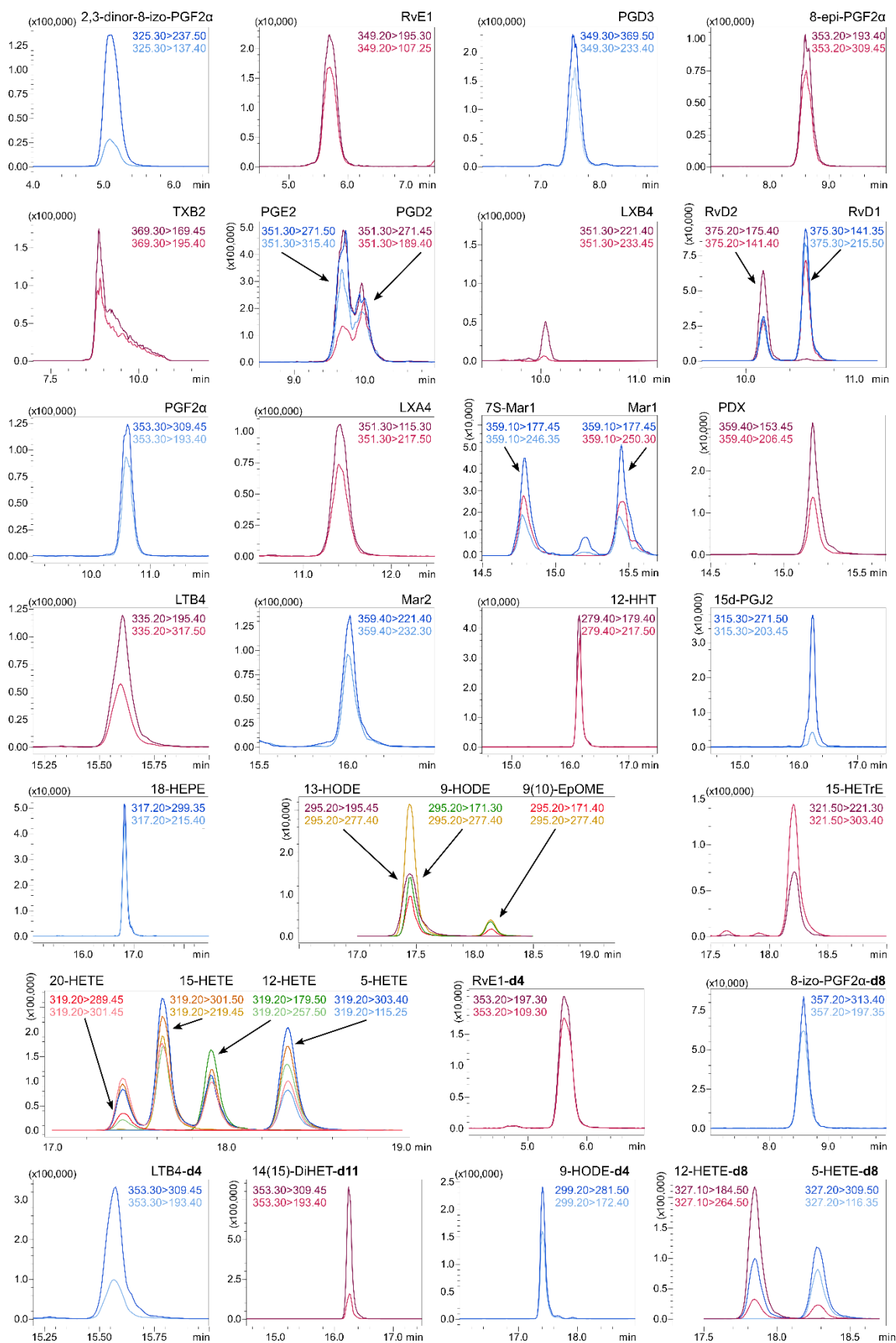
Oznaczenie stężenia oksylipin w surowicy pacjentów z MO przed i po zabiegu OAGB wymagało opracowania metody analitycznej. W oparciu o przegląd literatury dotyczącej metod ekstrakcji [110] i oznaczania [114] oksylipin w materiale biologicznym, wybraną metodą ekstrakcji było SPE, natomiast metodą analityczną było LC-MS/MS. Zastosowanie ekstrakcji SPE umożliwia oczyszczenie próbki ze związków powodujących efekty matrycowe oraz wzbogacenie analitów, co umożliwia poprawienie granic wykrywalności, istotne w przypadku oznaczania związków występujących w niskich stężeniach w skomplikowanej matrycy jaką jest surowica krwi [114].

W literaturze opisywane są metody ekstrakcji SPE oksylipin oparte o oddziaływania alifatycznych łańcuchów oksylipin z niepolarną fazą stałą (złoża oktadecylowe i oktylowe), oddziaływania jonowe (żel krzemionkowy modyfikowany grupami aminopropylowymi)

lub oba rodzaje oddziaływań (sorbenty polimerowe) [110]. Walidację ostatecznej metody analitycznej poprzedzone zostały testami dostępnych w literaturze [193,207,208] metod ekstrakcji oksylipin z materiału biologicznego na kolumnkach SPE z różnymi wypełnieniami (opisane w **Tabela uzupełniająca 12.7**). Wydajność ekstrakcji oceniano na podstawie porównania powierzchni sygnałów chromatograficznych próbek surowicy, do których dodano mieszaninę deuterowanych IS: 12-HETE-d8, 8-izo-PGF2 α -d4 oraz RvE1-d4, reprezentatywnych dla wybranej grupy analitów (**Tabela uzupełniająca 12.8**). W wyniku porównania procedur ekstrakcji SPE wybrano ostateczną metodę ekstrakcji, opisaną w części Materiały i Metody (**sekcja 4**).

Skład faz w rozdziale chromatograficznym także poprzedzony został przeglądem dostępnych w literaturze metod rozdziału chromatograficznego [114]. Warunki ostatecznego rozdziału chromatograficznego zostały dobrane na podstawie wyników wstępnych testów, w których, na podstawie wyników analizy mieszaniny wzorców w metanolu, oceniano kształt uzyskanych sygnałów chromatograficznych i rozdzielenie analitów o identycznych masach cząsteczkowych. Ostatecznie zastosowane warunki rozdziału chromatograficznego (**Tabela 4.6**) pozwoliły na oznaczenie w surowicy 28 oksylipin oraz 7 deuterowanych IS w czasie 30 min (25 min gradient oraz 5 min kondycjonowania kolumny). Uzyskane chromatogramy MRM przedstawiono na **Rysunku 5.12**. Satysfakcjonującego rozdziału chromatograficznego nie udało się osiągnąć dla dwóch analitów 13-HODE i 9-HODE (**Rysunek 5.12**), zatem do analizy ilościowej tych związków brano były unikatowe przejścia MRM (odpowiednio: 295,20 > 195,45 i 295,20 > 171,30, potwierdzone poprzez wykonanie analizy roztworów pojedynczych 13-HODE i 9-HODE w metanolu). Różnice czasu retencji pomiędzy kolejnymi seriami pomiarowymi były mniejsze niż 0,05 min dla wszystkich deuterowanych IS i analitów.

OZNACZANIE STĘŻENIA OKSYLIPIN TECHNIKĄ SPE-LC-MS/MS



Rysunek 5.12 Chromatogramy MRM uzyskane podczas oznaczania oksylipin techniką LC-MS/MS w surowicy krwi z dodatkiem wzorców analitycznych
 Oś Y - intensywność sygnału [jednostki umowne], nazwy oksylipin zgodnie z Tabelą 1.2.

OZNACZANIE STĘŻENIA OKSYLIPIN TECHNIKĄ SPE-LC-MS/MS

W ramach walidacji metody analitycznej oznaczania oksylipin w surowicy krwi techniką SPE-LC-MS/MS wyznaczono następujące parametry: liniowość metody, powtarzalność, dokładność oraz odzysk.

Krzywe kalibracyjne dla każdej z analizowanych oksylipin wyznaczono na podstawie wartości pól powierzchni sygnału próbek mieszaniny surowic wzbogaconych o mieszaninę wzorców analitów o znanych stężeniach, zgodnie z opisem w **sekcji 4.4.1.3**. Zakresy stężeń analitów, w których odpowiedź detektora była liniowa, przedstawiono w **Tabeli 5.7**. Pierwszym kryterium oceny modelu był współczynnik determinacji R^2 , którego wartość dla metod analitycznych powinna być $> 0,999$ [196]. Jako drugie kryterium przyjęto niski ($< 15\%$) współczynnik zmienności losowej, na którego podstawie można określić zgodność modelu z danymi empirycznymi [197]. Zgodnie z tymi kryteriami, satysfakcjonującą liniowość metody osiągnięto dla 24 z 28 analitów, R^2 15d-PGJ2 oraz PGD3 był $> 0,998$, R^2 2,3-dinor-8-izo-PGF2 α i 7S-Mar1 $> 0,996$. Na podstawie krzywych kalibracyjnych analitów określona została granica wykrywalności i wynosiła ona od 2 pg (dla PDX) do 394 pg (dla 2,3-dinor-8-izo-PGF2 α).

Tabela 5.7 Zakresy liniowości i parametry modelu regresji liniowej dla oksylipin oznaczanych techniką SPE-LC-MS/MS w surowicy krwi

Oksylipina	Zakres ^a liniowości [ng wzbogacenia]	Równanie krzywej kalibracyjnej	RSD ^b	R^2 ^c	LOD ^d [ng]
12-HETE	0,1 - 25	0,1404x + 0,0063	2,01%	0,9997	0,005
12-HHT	0,1 - 25	0,0249x + 0,0001	1,68%	0,9995	0,045
13-HODE	0,025 - 25	0,0934x - 0,0080	1,14%	0,9999	0,016
15d-PGJ2	0,5 - 10	0,8459x - 0,0743	0,75%	0,9980	0,013
15-HETE	0,025 - 10	0,4121x - 0,0058	2,71%	0,9999	0,014
15-HETrE	0,00625 - 1,25	0,2085x - 0,0018	0,87%	0,9999	0,009
18-HEPE	0,05 - 2,5	0,2958x - 0,0091	3,77%	0,9995	0,020
2,3-dinor-8-izo-PGF2α	0,5 - 25	0,6476x + 0,1877	6,62%	0,9969	0,394
20-HETE	0,01 - 1	0,0297x - 0,0010	3,94%	0,9998	0,004
5-HETE	0,025 - 25	0,2906x + 0,0004	1,18%	0,9997	0,016
7S-Mar1	0,1 - 10	0,1090x - 0,0159	4,53%	0,9964	0,058
8-epi-PGF2α	0,1 - 25	0,2805x + 0,0120	1,56%	0,9999	0,045
9(10)-EpOME	0,025 - 10	0,0218x - 0,0002	2,96%	0,9997	0,013
9-HODE	0,1 - 10	0,0600x + 0,0006	2,13%	0,9998	0,036
LTB4	0,025 - 25	0,0734x - 0,0017	0,99%	0,9999	0,009
LXA4	0,01 - 1	0,6100x + 0,0015	4,25%	0,9998	0,004
LXB4	0,025 - 10	0,2999x + 0,0039	1,56%	0,9999	0,011
Mar1	0,025 - 5	0,1272x - 0,0029	0,88%	0,9999	0,014

Tabela 5.7 (c.d.) Zakresy liniowości i parametry modelu regresji liniowej dla oksylipin oznaczanych techniką SPE-LC-MS/MS w surowicy krwi

Oksylipina	Zakres ^a liniowości [ng wzbogacenia]	Równanie krzywej kalibracyjnej	RSD ^b	R ² ^c	LOD ^d [ng]
Mar2	0,01 - 5	0,3075x - 0,0097	1,75%	0,9999	0,017
PDX	0,01 - 0,5	0,0888x + 0,0002	1,68%	0,9999	0,002
PGD2	0,01 - 5	2,6990x + 0,0015	2,31%	0,9996	0,008
PGD3	0,05 - 12,5	1,3457x + 0,0129	6,12%	0,9984	0,036
PGE2	0,01 - 10	5,0227x - 0,2700	1,67%	0,9998	0,003
PGF2α	0,1 - 10	0,7936x - 0,0131	3,50%	0,9995	0,013
RvD1	0,025 - 10	0,0615x + 0,0039	3,44%	0,9992	0,015
RvD2	0,1 - 5	0,0295x + 0,0015	2,84%	0,9997	0,032
RvE1	0,025 - 5	0,2530x + 0,0012	1,03%	0,9998	0,012
TXB2	0,1 - 10	2,9828x - 0,0819	2,39%	0,9997	0,070

a Za najniższy punkt przyjęto ilość ng mieszaniny wzorcowej, dla którego S/N \geq 10 [196].

b Współczynnik zmienności losowej - miara dopasowania modelu regresji liniowej, za wartość minimalną przyjęto 15% [197].

c Współczynnik determinacji - miara dopasowania modelu regresji liniowej, za wartość minimalną przyjęto R² < 0,999 [196].

d Granica wykrywalności, wyznaczona z równania krzywej kalibracyjnej = (3,3* σ błęd standardowy krzywej kalibracyjnej)/współczynnik nachylenia krzywej kalibracyjnej [196].

Wszystkie wartości obliczone na podstawie trzykrotnego nastrzyku, trzech niezależnie przygotowanych powtórzeń każdego z punktów krzywej kalibracyjnej, przygotowanych w mieszaninie surowicy krwi (sekcja 4.4.1.3). **Na czerwono** - wartości poza przyjętymi akceptowalnymi zakresami. Nazwy oksylipin za **Tabelą 1.2**. Tabela własna, wyniki nieopublikowane.

Dokładność, powtarzalność oraz odzysk metody SPE-LC-MS/MS określono dla zestawu próbek w ciągu jednej sekwencji analitycznej (ang. *intraday*) oraz pomiędzy sekwencjami, (tzw. *interday*), uzyskane wyniki dla każdej oksylipin przedstawiono w **Tabeli 5.8**). Zgodność uzyskanych wyników z nominalnymi wartościami (dokładność) wyrażono jako iloraz średniej ilości ng analitu w próbce wyznaczony na podstawie krzywej kalibracyjnej do ilości ng wzbogacenia. Za dopuszczalny zakres przyjęto 80-120 [207], a średnio wynosił on 100 \pm 16,2% na poziomie I wzbogacenia i 101 \pm 8,5% na poziomie II. Powtarzalność wyników oceniano na podstawie wyznaczonego współczynnika zmienności CV < 20%, średnio CV na poziomie I wynosiło 12,5 \pm 7,3%, CV na poziomie II wynosiło 12,1 \pm 6,9%. Wydajność ekstrakcji określono poprzez obliczenie odzysku (zakres 80 - 120% uznano za dopuszczalny) na podstawie wyników próbek mieszaniny surowicy wzbogaconych przed oraz po ekstrakcji SPE [193,209,210], średnio wynosił on 97,2 \pm 12,6% na poziomie I, i 96,8 \pm 11,5% na poziomie II. Dla większości analizowanych oksylipin (18 z 28 analitów) dokładność, powtarzalność i odzysk mieściły się w przyjętych zakresach. 9-HODE wykazywał nieznacznie niższy niż 80% odzysk pomiędzy różnymi sekwencjami (78,8 \pm 1,8%).

OZNACZANIE STĘŻENIA OKSYLIPIN TECHNIKĄ SPE-LC-MS/MS

Zadowalającej dokładności nie udało się uzyskać dla 15d-PGJ2, 7S-Mar1, 8-epi-PGF2 α i RvD1, a powtarzalności dla prostaglandyn PGD3, PGD2 i PGF2 α . Najmniej satysfakcjonujące wyniki oznaczania dokładności, powtarzalności i odzysku uzyskano dla 2,3-dinor-8-izo-PGF2 α .

Tabela 5.8 Dokładność, powtarzalność i odzysk metody SPE-LC-MS/MS oznaczania stężenia oksylipin w surowicy krwi

Oksylipina	Poziom ^c	„Interday” ^a			„Intraday” ^b		
		Dokładność [%] ^d	Powtarzalność [%] ^e	Odzysk [%] ^f	Dokładność [%] ^d	Powtarzalność [%] ^e	Odzysk [%] ^f
12-HETE	I	106,7%	14,4%	85,8 ± 3,7%	101,3%	0,2%	98,5 ± 0,4%
	II	101,1%	10,0%	100,9 ± 12,2%	100,6%	5,9%	101,3 ± 4,9%
12-HHT	I	108,7%	11,6%	100,6 ± 3,6%	115,9%	4,2%	100,8 ± 11,9%
	II	102,0%	15,9%	100,2 ± 6,0%	109,3%	10,5%	106,8 ± 3,9%
13-HODE	I	105,1%	19,7%	97,0 ± 27,6%	104,8%	9,7%	105,1 ± 6,2%
	II	98,4%	4,4%	102,2 ± 8,3%	106,4%	3,6%	103,3 ± 4,4%
15d-PGJ2	I	138,7%	8,9%	119,9 ± 11,0%	169,3%	5,3%	109,5 ± 9,9%
	II	118,0%	13,1%	79,1 ± 27,3%	143,0%	3,8%	94,4 ± 12,9%
15-HETE	I	101,1%	5,6%	98,8 ± 12,4%	107,8%	2,8%	88,7 ± 2,7%
	II	100,2%	7,1%	99,0 ± 7,2%	108,0%	1,7%	95,0 ± 4,0%
15-HETrE	I	102,7%	6,2%	93,4 ± 3,8%	95,1%	1,3%	97,9 ± 6,5%
	II	99,2%	15,6%	100,9 ± 2,7%	102,4%	4,6%	98,2 ± 9,5%
18-HEPE	I	118,7%	4,2%	91,2 ± 8,3%	99,7%	12,9%	88,4 ± 12,5%
	II	103,5%	11,6%	96,8 ± 6,7%	97,3%	8,6%	85,2 ± 15,6%
2,3-dinor-8-izo-PGF2 α	I	42,6%	14,9%	60,6 ± 8,8%	63,8%	4,7%	72,9 ± 1,4%
	II	96,2%	11,2%	61,5 ± 10,1%	93,7%	4,2%	65,8 ± 1,7%
20-HETE	I	106,4%	13,5%	95,9 ± 12,2%	98,7%	5,8%	97,6 ± 1,4%
	II ^g	-	-	-	-	-	-
5-HETE	I	101,4%	9,8%	93,8 ± 3,0%	106,0%	5,8%	97,6 ± 7,6%
	II	104,2%	5,2%	97,9 ± 5,2%	98,8%	2,7%	105,1 ± 5,2%
7S-Mar1	I	121,5%	9,7%	95,1 ± 6,1%	111,3%	6,5%	105,2 ± 13,4%
	II	96,9%	6,9%	94,2 ± 6,4%	107,8%	6,6%	100,2 ± 2,4%
8-epi-PGF2 α	I	104,0%	10,6%	98,8 ± 2,9%	124,6%	6,9%	93,5 ± 5,0%
	II	102,5%	15,5%	99,9 ± 10,8%	104,2%	2,1%	89,7 ± 5,1%
9(10)-EpOME	I	99,6%	16,2%	77,2 ± 11,9%	104,4%	14,4%	88,5 ± 5,3%
	II	103,9%	11,6%	88,6 ± 11,3%	104,7%	1,3%	97,3 ± 7,4%
9-HODE	I	79,8%	17,4%	124,7 ± 35,8%	111,4%	1,0%	78,8 ± 1,8%
	II	93,3%	6,8%	107,1 ± 8,5%	97,0%	7,9%	103,3 ± 8,4%
LTB4	I	97,4%	10,4%	101,2 ± 11,0%	98,8%	6,1%	90,7 ± 3,1%
	II	100,9%	7,4%	97,1 ± 4,4%	105,3%	6,9%	92,5 ± 2,6%
LXA4	I	90,0%	13,3%	109,2 ± 13,1%	98,7%	4,5%	101,2 ± 9,3%
	II ^g	-	-	-	-	-	-

Tabela 5.8 (c.d.) Dokładność, powtarzalność i odzysk metody SPE-LC-MS/MS oznaczania stężenia oksylipin w surowicy krwi

Oksylipina	Poziom ^c	„Interday” ^a			„Intraday” ^b		
		Dokł. [%] ^d	Powt. [%] ^e	Odzysk [%] ^f	Dokł. [%] ^d	Powt. [%] ^e	Odzysk [%] ^f
LXB4	I	93,2%	12,7%	113,3 ± 16,6%	104,0%	4,9%	98,1 ± 7,7%
	II	97,6%	8,9%	100,7 ± 13,2%	104,9%	2,0%	94,7 ± 4,8%
Mar1	I	105,7%	15,4%	91,6 ± 8,5%	96,7%	8,8%	101,6 ± 7,7%
	II	103,3%	13,2%	96,9 ± 1,5%	104,5%	9,3%	96,0 ± 10,1%
Mar2	I	102,0%	6,5%	97,1 ± 6,1%	106,0%	5,2%	92,2 ± 4,0%
	II	102,5%	10,0%	97,7 ± 6,9%	102,6%	2,1%	97,9 ± 2,9%
PDX	I	97,8%	12,3%	102,1 ± 9,5%	104,4%	7,9%	96,0 ± 8,8%
	II ^g	-	-	-	-	-	-
PGD2	I	89,5%	16,3%	106,2 ± 7,5%	96,3%	8,2%	96,6 ± 9,0%
	II	84,4%	22,9%	118,2 ± 9,4%	97,2%	6,9%	114,6 ± 2,2%
PGD3	I	104,3%	42,3%	94,5 ± 9,2%	102,9%	1,0%	81,5 ± 1,8%
	II	111,2%	33,6%	82,4 ± 12,0%	106,6%	5,4%	94,9 ± 1,4%
PGE2	I	92,8%	11,7%	100,7 ± 5,1%	105,7%	6,2%	95,9 ± 6,9%
	II	86,2%	11,2%	114,2 ± 4,6%	86,2%	6,7%	112,0 ± 6,6%
PGF2 α	I	95,3%	17,5%	92,1 ± 2,0%	99,3%	0,2%	106,2 ± 6,3%
	II	94,0%	26,5%	102,7 ± 8,3%	86,8%	1,3%	114,1 ± 3,6%
RvD1	I	96,6%	8,8%	93,6 ± 7,3%	89,4%	9,2%	101,0 ± 3,6%
	II	113,2%	10,6%	92,0 ± 6,9%	107,4%	3,9%	97,9 ± 6,8%
RvD2	I	117,9%	14,4%	81,3 ± 0,1%	97,2%	2,8%	101,8 ± 6,9%
	II	120,8%	11,8%	82,7 ± 6,3%	100,4%	2,5%	100,4 ± 8,8%
RvE1	I	99,0%	2,9%	96,2 ± 4,6%	98,9%	3,7%	93,4 ± 4,1%
	II	98,6%	3,4%	99,9 ± 6,4%	98,7%	0,2%	98,2 ± 2,0%
TXB2	I	90,0%	4,2%	110,7 ± 0,2%	106,5%	5,3%	110,4 ± 2,5%
	II	91,1%	9,0%	107,2 ± 13,6%	96,2%	3,7%	94,8 ± 2,0%

a Powtórzenia próbek przygotowanych w 3 różnych dniach (n=9).

b Powtórzenia próbek przygotowanych jednego dnia (n=3).

c Poziom I - dodatek 0,5 ng mieszaniny wzorców analitycznych (0,125 ng 15-HETrE; 0,25 ng PGD3 i 18-HEPE); poziom II - dodatek 5 ng mieszaniny wzorców analitycznych (1,25 ng 15-HETrE; 2,5 ng PGD3 i 18-HEPE).

d Ilość ng wyznaczona z równania krzywej kalibracyjnej / ng wzbogacenia. Za dopuszczalny zakres dokładności (na podstawie literatury [210]) przyjęto 80-120%.

e Współczynnik zmienności CV wyznaczony z 3 niezależnych powtórzeń, CV < 20% uznano za dopuszczalne [210].

f Powierzchnia sygnału wzorców dodanych do surowicy przed ekstrakcją SPE do powierzchni sygnału wzorców dodanych do eluentów po SPE; z uwzględnieniem poprawki o powierzchnię sygnału odpowiedniego wzorca deuterowanego IS (Tabela 4.7), za dobre przyjęto odzyski w zakresie 80 - 120% [193,209,210].

g Poza zakresem liniowości.

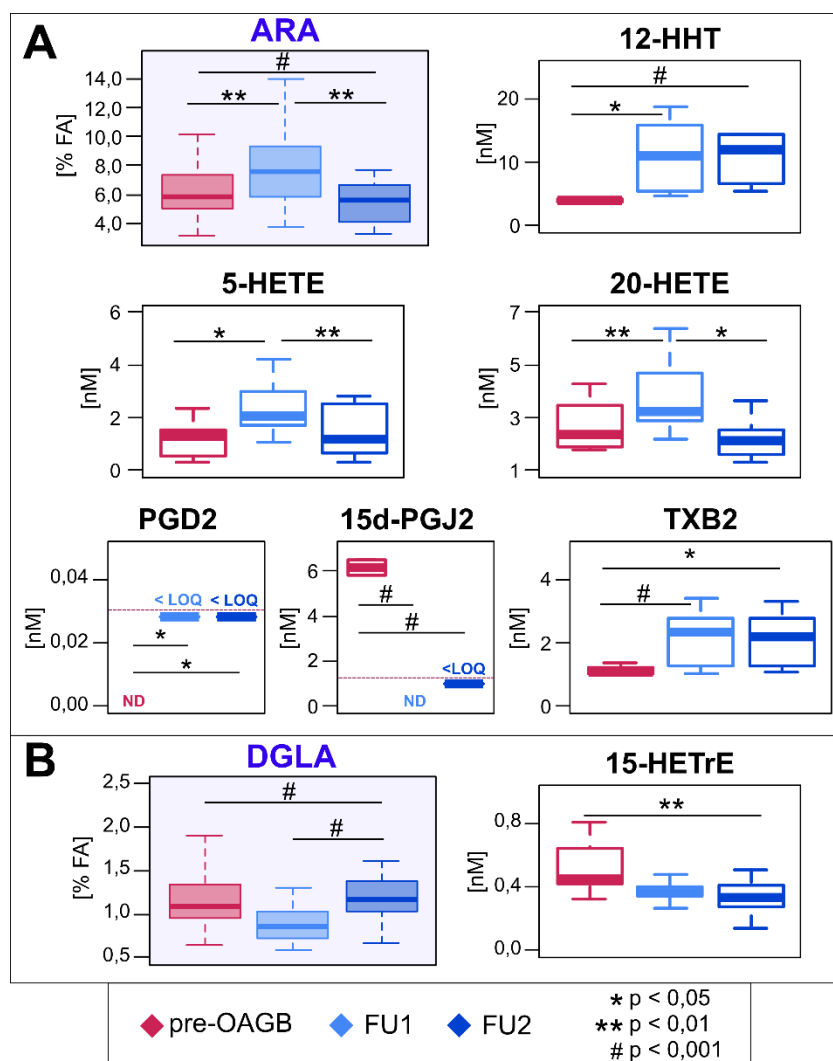
Na czerwono - wartości poza przyjętymi akceptowalnymi zakresami (**d**, **e**, **f**). Nazwy oksylipin za Tabelą 1.2. Wszystkie parametry obliczone na podstawie analizy próbek mieszaniny surowicy z dodatkiem wzorców analitycznych. Tabela własna, dane nieopublikowane.

5.2.2 OZNACZANIE STĘŻENIA OKSYLIPIN W SUROWICY PACJENTÓW LECZONYCH OAGB

Stężenia oksylipin oznaczano metodą SPE-LC-MS/MS w surowicy pacjentów z MO przed zabiegiem OAGB (pre-OAGB) oraz w surowicy zebranej podczas dwóch wizyt kontrolnych po zabiegu (FU1 i FU2). W badanej grupie 45 pacjentów, od 15 uzyskano surowicę w punkcie FU1, od 15 w FU2, a od 15 w FU1 i FU2, wyniki uzyskane dla wszystkich pacjentów wykorzystano w analizie korelacji z zawartością prekursora (**Tabela uzupełniająca 12.10**). Porównania pomiędzy poszczególnymi punktami wykonano dla 15 pacjentów, u których stężenie oksylipin możliwe było do oznaczenia w każdym z tych trzech punktów, których szczegółowe wyniki zaprezentowano w Materiałach Uzupełniających (**Tabela uzupełniająca 12.9**). Zastosowana metoda analityczna pozwoliła na wykrycie w surowicy 19 z 28 oksylipin uwzględnionych w analizie, z czego ilościowe oznaczenie możliwe było dla oksylipin pochodzących z PUFA n-6: 9 metabolitów ARA, 3 metabolitów LA, 1 metabolitu DGLA. Stężenia większości oksylipin PUFA n-3 nie przekraczały granic detekcji metody analitycznej, z wyjątkiem metabolitu EPA – 18-HODE. W żadnej z badanych próbek nie wykryto pochodnych prostaglandyny PGF2 α : 8-epi-PGF2 α i 2,3-dinor-8-izo-PGF2 α ; marezyn: Mar1, 7S-Mar1 i Mar2; metabolitów EPA: RvE1 i PGD3; oraz rezolwin syntezowanych z kwasu DHA: RvD1 i RvD2. Stężenia czterech kolejnych oksylipin: dwóch SPM: LXA4, PDX, oraz prostaglandyn PGE2, PGD2 i PGF2 α nie przekroczyły granic oznaczalności. Stężenia pozostałych analitów były zgodne z poziomami oksylipin we krwi uzyskanymi przez innych autorów [140,191,192,211–214]. Zakres stężeń wykrytych oksylipin był szeroki, od ~ 300 pM (15-HETrE) do ~ 36 nM (12-HETE) (**Tabela uzupełniająca 12.9**). Poza najliczniej występującym 12-HETE, stężenia pozostałych pochodnych ARA z grupą hydroksylową nie przekraczały 5 nM. Surowica pacjentów charakteryzowała się również wysokim stężeniem metabolitów LA, czyli 13-HODE i 9-HODE (**Tabela uzupełniająca 12.9**).

Przeprowadzona analiza RM ANOVA z testami *post hoc* (**Tabela uzupełniająca 12.9**), umożliwiła wykrycie różnic pomiędzy stężeniami oksylipin w surowicy pacjentów pre-OAGB w porównaniu z surowicą pobraną podczas wizyt kontrolnych po 2 tygodniach od operacji OAGB (FU1) i 6-9 miesięcy po operacji (FU2). Oksylipiny, których stężenia były istotnie różne w zależności od czasu pobrania krwi, wraz z prekursorami FA, przedstawiono na **Rysunku 5.13**. Dwa tygodnie po operacji OAGB surowica pacjentów charakteryzowała się istotnie wyższym niż przedoperacyjnie stężeniem niektórych oksylipin syntezowanych z ARA

(Rysunek 5.13A), tj. prozapalnych: TXB2 i hydroksykwasów: 5-HETE, 20-HETE, 12-HHT. W surowicy pobranej w punkcie FU2 stężenia oksylipin były istotnie różne od wartości przed operacją dla 15-PGJ2 (obniżone) i 12-HHT, PGD2, TXB2 (podwyższone) lub do nich zbliżone (5-HETE, 20-HETE). Pomimo nieznacznie obniżonego stężenia 12-HHT i TXB2 w punkcie FU2 w porównaniu z punktem FU1, było ono nadal wyższe niż stężenie w surowicy pre-OAGB. Stężenia 12-HHT, 20-HETE i 5-HETE w surowicy pacjentów z MO były słabo dodatnio skorelowane z zawartością ARA oznaczoną techniką GC-MS, a 15d-PGJ2 i 12-HETE wykazywały korelację odwrotną (Tabela uzupełniająca 12.10).



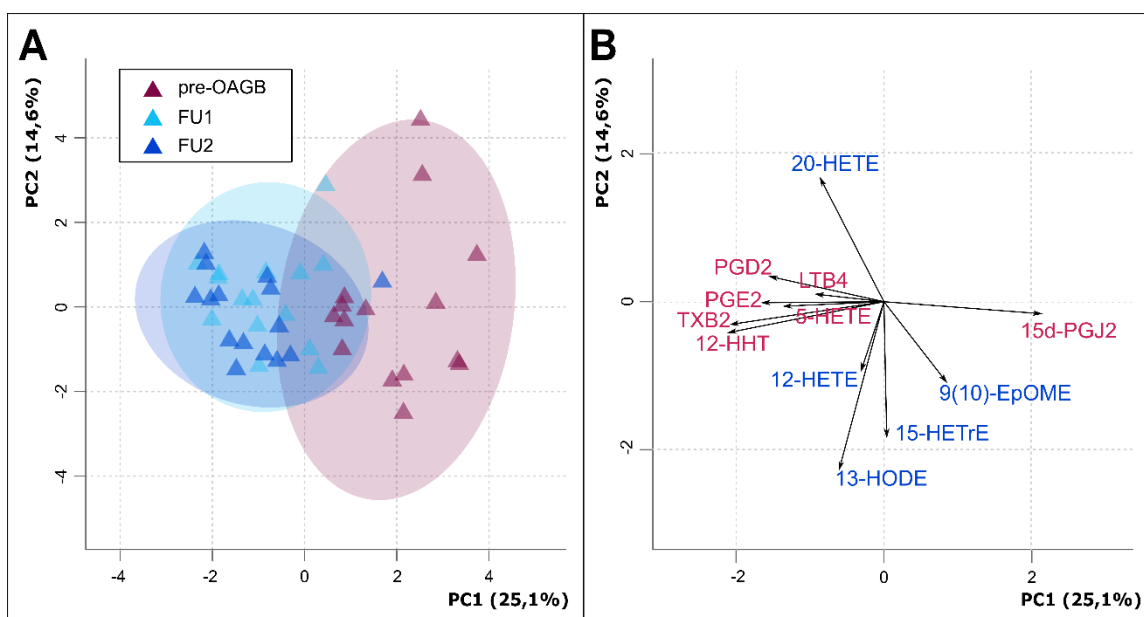
Rysunek 5.13 Stężenia oksylipin w surowicy pacjentów z otyłością olbrzymią leczonych zabiegiem OAGB przed (pre-OAGB) i po operacji (FU1 i FU2)

A - zawartość w surowicy i stężenia oksylipin syntezowanych z ARA; **B** - zawartość w surowicy i stężenia oksylipin syntezowanych z DGLA. N = 15. Uwzględnione zostały oksylipiny, których stężenie w analizie RM ANOVA było istotnie różne pomiędzy grupami badawczymi (Tabela uzupełniająca 12.9). **Kolorem** - kwas tłuszczowy będący prekursorem do syntezy oksylipin w danej ramce, zawartość oznaczona w surowicy techniką GC-MS wyrażona jako [%] całkowitych kwasów tłuszczowych. Nazwy FA i oksylipin za, odpowiednio, Tabelą 1.1 i 1.2 Rysunek własny, dane nieopublikowane.

Nie wykazano istotnych różnic stężeń oksylipin syntezowanych z LA w zależności od czasu od operacji. Oksylipinami syntezowanymi z LA, których stężenia we krwi pacjentów różniły się istotnie przed OAGB w stosunku do punktu FU1 były epoksyd 9(10)-EpOME i hydroksykwasy 9-HODE, 13-HODE oraz epoksydu 9(10)-EpOME wykazywało jedynie tendencję do obniżania się 2 tygodnie po operacji (**Tabela uzupełniająca 12.9**). Średnie stężenie 13-HODE w surowicy było jednak dodatnio skorelowane z zawartością LA (**Tabela uzupełniająca 12.10**), którego zawartość w surowicy pacjentów jest obniżona w punkcie FU1 i podwyższa się po dłuższym czasie od operacji (FU2 – **Tabela 5.4**). W surowicy pacjentów w punkcie FU2 wykryto również znaczne obniżenie stężenia metabolitu DGLA – 15-HETrE (**Rysunek 5.13B**), co silnie skorelowane było z BMI ($r = 0,526$, $p = 0,008$).

W poprzednich rozdziałach pracy (**sekcja 5.1.3.2**) wykorzystanie PCA pozwoliło na stwierdzenie, że w punkcie FU2 całkowity profil FA w surowicy pacjentów nie różnił się znacząco od profilu oznaczonego przed operacją OAGB (**Rysunek 5.7**). Wyniki analizy RM ANOVA stężeń oksylipin w surowicy pacjentów wskazywały na podobną zależność tzn. więcej różnic w stężeniach poszczególnych oksylipin pomiędzy punktami pre-OAGB i FU1, a większe podobieństwo pomiędzy pre-OAGB a FU2 (**Rysunek 5.13** i **Tabela uzupełniająca 12.10**). Celem potwierdzenia tej obserwacji zbudowano model PCA (**Rysunek 5.14**), w którym zmiennymi były stężenia oksylipin wykazujące istotne różnice pomiędzy grupami w analizie wariancji. Analiza PCA uwidoczniała wysoką niejednorodność stężeń oksylipin w surowicy pacjentów w obrębie poszczególnych grup (pre-OAGB, FU1, FU2). Wizualizacja wzajemnego podobieństwa grup nie potwierdziła przypuszczenia, że największe różnice w stężeniach oksylipin w surowicy występują jedynie pomiędzy wynikami pre-OAGB a FU1; w płaszczyźnie PC1/PC2 możliwe jest zaobserwowanie, że zarówno punkt FU1 jak i FU2 odseparowują się w dużym stopniu od punktu pre-OAGB (**Rysunek 5.14A**). W przeciwieństwie do obrazu uzyskanego w modelu PCA dla oznaczonego profilu FA (**Rysunek 5.7A** i **Rysunek uzupełniający 12.2**), na podstawie stężeń oksylipin możliwe było oddzielenie grupy FU2 od pre-OAGB, a całkowite oddzielenie uzyskano w płaszczyźnie PC1/PC3 (**Rysunek uzupełniający 12.4**). Największy wpływ na PC1 miały stężenia oksylipin ARA (TXB2, 12-HHT, 15d-PGJ2) (**Rysunek 5.14B**).

ZMIANY PROFILU KWASÓW TŁUSZCZOWYCH W MYSIM MODELU OTYŁOŚCI WYWOŁANEJ DIETĄ WYSOKOTŁUSZCZOWĄ



Rysunek 5.14 Wyniki analizy PCA stężenia oksylipin w surowicy pacjentów z otyłością przed operacją OAGB (pre-OAGB), pacjentów 2 tygodnie po operacji (FU1) i 6-9 miesięcy po operacji (FU2)

A - wykres obserwacji, **B** - wykres zmiennych; zmiennymi uwzględnionymi w macierzy PCA były stężenia oksylipin, których stężenie było powyżej granicy detekcji w > 50% próbek (Tabela uzupełniająca 12.9). **Na czerwono** - zmienne o największym wkładzie w PC1; **na niebiesko** zmienne o największym wkładzie w PC2. N = 15. Wykres własny, dane nieopublikowane.

5.3 ZMIANY PROFILU KWASÓW TŁUSZCZOWYCH W MYSIM MODELU OTYŁOŚCI WYWOŁANEJ DIETĄ WYSOKOTŁUSZCZOWĄ

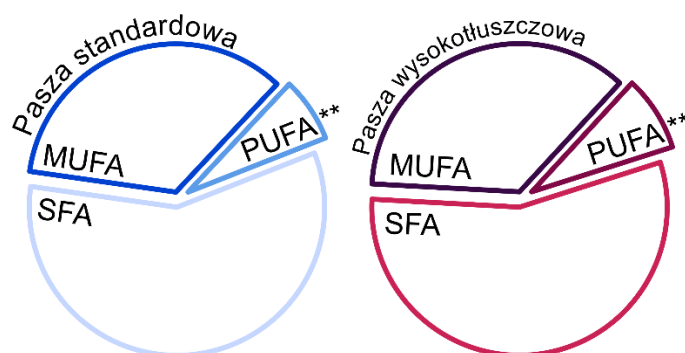
Oznaczanie profili FA w zwierzęcym modelu otyłości wywołanej dietą wysokotłuszczową wykonano (zgodnie z metodyką opisaną w **sekcji 4.3**) w całkowitych ekstraktach lipidowych otrzymanych z:

- ◆ surowicy (**Tabela uzupełniająca 12.11**),
- ◆ z mózgow (**Tabela uzupełniająca 12.12**);
- ◆ z serca, które zbudowane są z tkanki mięśniowej poprzecznie prążkowanej typu sercowego (**Tabela uzupełniająca 12.13**).

ZMIANY PROFILU KWASÓW TŁUSZCZOWYCH W MYSIM MODELU OTYŁOŚCI WYWOŁANEJ DIETĄ WYSOKOTŁUSZCZOWĄ

Analizując powyższe wyniki oznaczania FA szczególną uwagę poświęcono grupie PUFA, na których skład w tkankach i organach istotny wpływ ma dieta [215,216]. Ocena wartości energetycznej diet Polaków przeprowadzona na podstawie wyników badania WOBASZ II wykazała niższe niż rekomendowane 6-10% energii, średnie spożycie PUFA, wynosiło ono $5,9 \pm 2,5\%$ kalorii z PUFA wśród mężczyzn i $5,7 \pm 2,8\%$ wśród kobiet [217]. Dane te sugerują dużą zmienność w spożyciu PUFA w polskiej populacji, na co wskazuje również praca Zatońskiej i wsp. [218], gdzie analiza spożycia makroskładników w grupie mieszkańców jednego województwa, wykazała istotne różnice pomiędzy stosunkiem PUFA n-6/n-3 w diecie mieszkańców wsi a miast. Wykorzystanie modelu mysiego do indukcji otyłości za pomocą diety pozwala zatem na wyeliminowanie osobniczych różnic w spożywanych FA.

Skład FA w paszach został oznaczony techniką GC-MS (trzy powtórzenia, 100 mg paszy, zgodnie z procedurą opisaną w **sekcji 4.3**, aby zweryfikować, czy różnią się one w znaczący sposób proporcją poszczególnych grup FA, co mogłoby utrudnić interpretację wyników. Szczegółowy profil FA umieszczono w Materiałach Uzupełniających (**Tabela uzupełniająca 12.15**). Zawartość MUFA i SFA w obu rodzajach paszy nie różniła się istotnie, a pomimo wyższej ogólnej zawartości PUFA n-6 w paszy wysokotłuszczowej w porównaniu z paszą standardową (**Rysunek 5.15**), stosunek PUFA n-6 do PUFA n-3 nie różnił się (odpowiednio $60,1 \pm 10,3$ i $56,9 \pm 3,01$, $p = 0,640$). Jedynymi PUFA, których zawartość różniła obie pasze były LA i ARA, których procentowa zawartość była wyższa w paszy wysokotłuszczowej (**Tabela uzupełniająca 12.15**), co odzwierciedla duże spożycie PUFA n-6 w diecie typu zachodniego [22,101].

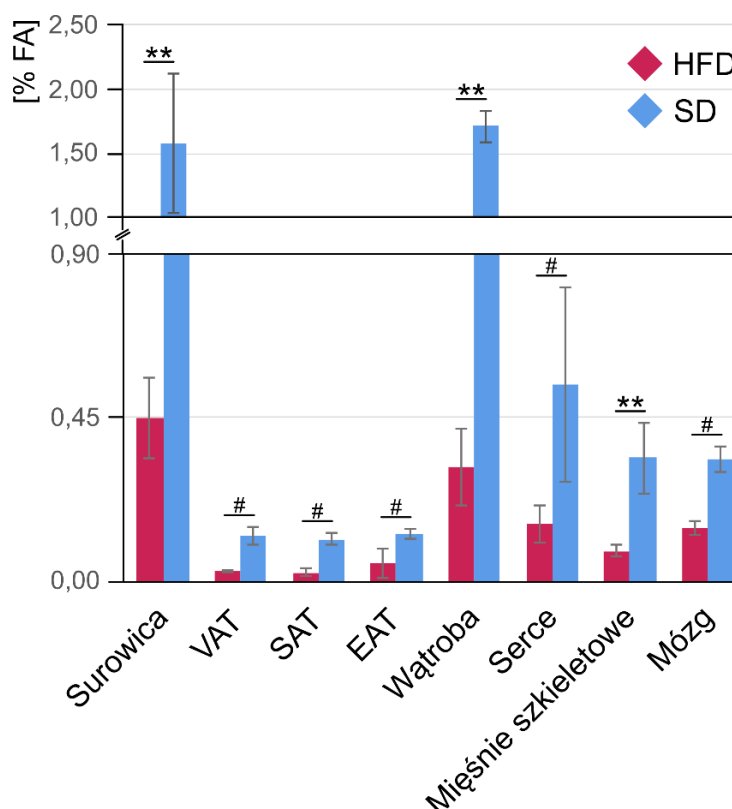


Rysunek 5.15 Zawartość [%] głównych grup kwasów tłuszczowych w paszach dla myszy eksperymentalnych

** $p < 0,01$. Skróty: **MUFA** - jednonienasycone kwasy tłuszczowe, **PUFA** - wielonienasycone kwasy tłuszczowe, **SFA** - nasycone kwasy tłuszczowe.

ZMIANY PROFILU KWASÓW TŁUSZCZOWYCH W MYSIM MODELU OTYŁOŚCI WYWOŁANEJ DIETĄ WYSOKOTŁUSZCZOWĄ

Surowice myszy HFD charakteryzowały się wyższym stężeniem PUFA n-6 oraz n-3 niż myszy SD (Tabela uzupełniająca 12.11). Wyższa zawartość PUFA n-6 zaobserwowana została również w skupiskach tkanki tłuszczowej oraz w wątrobie myszy HFD, co korespondowało z ich wyższą podażą w paszy wysokotłuszczowej (Tabela uzupełniająca 12.14). Z drugiej strony, mimo podobnej zawartości PUFA n-3 w paszy wysokotłuszczowej i standardowej, zawartość tej grupy FA w lipogennych tkankach myszy HFD była niższa. Akumulację PUFA n-6 stwierdzono również w dwóch badanych typów tkanki mięśniowej – mięśni szkieletowych i mięśnia sercowego, a w ekstraktach przygotowanych z serc w grupie HFD również zawartość PUFA n-3 była wyższa. W porównaniu z mięśniami szkieletowymi ekstrakty lipidów całkowitych przygotowane z serc charakteryzowały się również licznymi różnicami w profilach PUFA n-3 (Tabela uzupełniająca 12.13). Mając na uwadze, że pasza HFD zawierała znacznie więcej PUFA n-3 niż pasza SD (Tabela uzupełniająca 12.15), szczególnie interesującym wynikiem była także istotnie niższa zawartość EPA w ekstraktach lipidowych myszy HFD, w porównaniu do myszy SD, we wszystkich analizowanych tkankach/narządach (Rysunek 5.16).



Rysunek 5.16 Zawartość [%] kwasu eikozapentadienowego n-3 (EPA) w ekstraktach lipidów całkowitych z tkanek/narządów myszy eksperymentalnych

** $p < 0,01$, # $p < 0,001$. Skrót: **EAT** - okołojądrowa tkanka tłuszczowa, **HFD** - myszy na diecie wysokotłuszczowej, **SAT** - podskórna tkanka tłuszczowa, **SD** - myszy na diecie standardowej, **VAT** - otrzewnowa tkanka tłuszczowa. Rysunek własny na podstawie danych z Tabel uzupełniających 12.11 - 12.14.

ZMIANY PROFILU KWASÓW TŁUSZCZOWYCH W MYSIM MODELU OTYŁOŚCI WYWOŁANEJ DIETĄ WYSOKOTŁUSZCZOWĄ

Ekstrakty lipidów całkowitych przygotowane z dwóch narządów pochodzących myszy eksperymentalnych – serc i mózgow, poddawano dodatkowo rozdzielni techniką SPE. Pozwoliło to na uzyskanie szczegółowych informacji na temat zmian profilu FA, w różnych grupach lipidowych. Metodę I [184] wykorzystano do rozdzielenia lipidów na lipidy niepolarne – frakcja AG, frakcję PHL, które należą do lipidów polarnych oraz frakcję FFA. Metoda II [185] zastosowana została do zbadania profilu FA w różnych SPL – lipidach polarnych należących do PHL, obecnych w błonach komórkowych wszystkich komórek eukariotycznych, a szczególnie obficie w błonach komórek nerwowych [219,220]. Szczegółowa analiza profilu FA w wybranych narządach podyktowana była, w przypadku serc – obserwowanym w badaniach epidemiologicznych związkiem pomiędzy otyłością i dietą typu zachodniego, a zwiększonym ryzykiem wystąpienia CVD [26,42]. Analizę profilu FA w mózgach zdecydowano się przeprowadzić z uwagi na obserwowany w badaniach epidemiologicznych związek wysokiego wskaźnika BMI z ryzykiem pogorszenia funkcji mózgowych [28]. Wyniki oznaczania FA techniką GC-MS w uzyskanych w rozdzielni SPE frakcjach lipidowych zostały przedstawione w kolejnych **sekcjach: 5.3.1 i 5.3.2.**

5.3.1 PROFIL KWASÓW TŁUSZCZOWYCH W EKSTRAKTACH LIPIDOWYCH MÓZGÓW MYSZY Z OTYŁOŚCIĄ

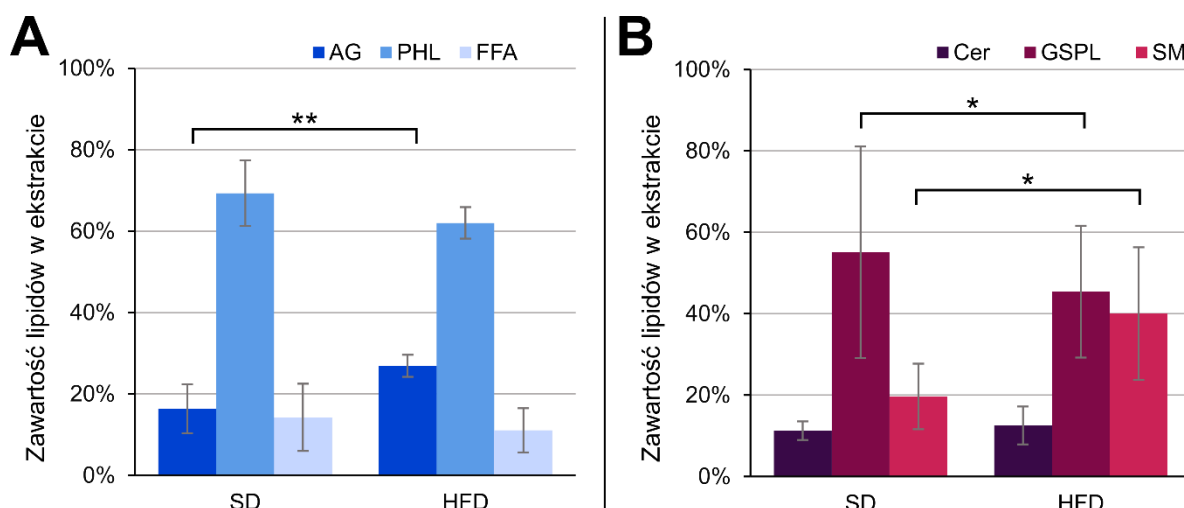
Analiza GC-MS ekstraktów otrzymanych z mózgow myszy eksperymentalnych wykazała duże podobieństwo profilu FA pomiędzy myszami grupy SD i myszami HFD, podsumowanie wyników oznaczeń zawarte zostało w Materiałach Uzupełniających (**Tabela uzupełniająca 12.12**). Nie zaobserwowane zostały żadne różnice zawartości całkowitych SFA i MUFA, oraz poszczególnych FA należących do tych grup. Również całkowita zawartość PUFA n-6 i n-3, jak i stosunek nie różniła się w sposób znaczący, jednakże w tych grupach FA, zaobserwowane zostały różnice pomiędzy zawartością FA w ekstraktach z mózgow HFD i SD. Wśród PUFA n-6 najliczniej występującym kwasem był ARA (ok. 8% całkowitej zawartości w ekstrakcie lipidowym), a jego zawartość wykazywała trend w kierunku wyższego poziomu w mózgach myszy HFD. Statystycznie istotna wyższa zawartość pomiędzy HFD a SD zaobserwowana została dla kwasów LA i EDA (dwukrotnie wyższa zawartość w mózgach HFD). Myszy HFD charakteryzowały się natomiast ponad dwukrotnie niższą zawartością kwasu dokozapentaenowego n-6: 22:5 n-6 (**n-6 DPA**, ang. *docosapentaenoic acid n-6*) oraz jedyne, znacząco różniące badane grupy, PUFA n-3 – EPA. Zawartość najliczniej występującego w ekstraktach mózgowych kwasu serii n-3 – DHA nie wykazywała istotnej

ZMIANY PROFILU KWASÓW TŁUSZCZOWYCH W MYSIM MODELU OTYŁOŚCI WYWOŁANEJ DIETĄ WYSOKOTŁUSZCZOWĄ

statystycznie różnicy ($p = 0,101$), aczkolwiek można było zaobserwować trend w kierunku wyższego poziomu DHA w grupie HFD. Bardzo duża zawartość ARA i DHA w ekstraktach lipidowych z mózgow (ponad 16% u myszy SD, ponad 17% u myszy HFD, **Tabela uzupełniająca 12.12**) w porównaniu z pozostałymi analizowanymi tkankami (**Tabele uzupełniające 12.13 i 12.14**) była zgodna z doniesieniami literaturowymi [219].

5.3.1.1 ANALIZA KWASÓW TŁUSZCZOWYCH WE FRAKCJACH LIPIDOWYCH UZYSKANYCH W ROZDZIALE SPE Z MÓZGÓW MYSZY

PHL mózgowe stanowią około 60% suchej masy tego organu [219]. Frakcjonowanie z wykorzystaniem SPE Metodą I prowadziło do uzyskania ekstraktów lipidowych, w których PHL stanowiły ponad 60% zawartości, w obu grupach eksperymentalnych (**Rysunek 5.17A**). Ekstrakty lipidowe otrzymane z mózgow grupy HFD charakteryzowały się nieznacznie niższą zawartością PHL i istotnie wyższą zawartością lipidów niepolarnych – AG, niż ekstrakty z mózgow myszy SD (**Rysunek 5.17A**). Zastosowanie Metody II SPE, pozwoliło na stwierdzenie, że głównymi składowymi SPL w ekstraktach lipidowych mózgu są, zgodnie z danymi literaturowymi, GSPL oraz SM [221]. W porównaniu z ekstraktami lipidowymi, otrzymanymi z mózgow myszy SD, zawartość GSPL w ekstraktach lipidowych z mózgow myszy HFD była niższa, a zaobserwowano wyższą zawartość frakcji SM (**Rysunek 5.17B**).



Rysunek 5.17 Zawartość [%] grup lipidowych uzyskanych podczas rozdziału ekstraktów lipidowych z mózgow myszy eksperymentalnych

Zawartość poszczególnych kategorii lipidów w ekstraktach z mózgow myszy eksperymentalnych wyrażona jako procent masowy. Grupy lipidowe uzyskane podczas ekstrakcji metodą I (**A**), oraz metodą II (**B**). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Skróty: **AG** – połączone frakcje acylogliceroli, **Cer** – ceramidy, **FFA** – wolne kwasy tłuszczowe, **GSPL** – glikosfingolipidy, **HFD** – myszy na diecie wysokotłuszczowej, **PHL** – fosfolipidy, **SD** – myszy na diecie standardowej, **SM** – sfingomieliny. **Dane opublikowane** [68].

ZMIANY PROFILU KWASÓW TŁUSZCZOWYCH W MYSIM MODELU OTYŁOŚCI WYWOŁANEJ DIETĄ WYSOKOTŁUSZCZOWĄ

W przeciwieństwie do wyników oznaczania profilu FA w ekstraktach lipidów całkowitych w mózgu, gdzie nie zaobserwowano różnic w zawartości PUFA pomiędzy dwoma grupami eksperymentalnymi (**Tabela uzupełniająca 12.12**), zastosowanie rozdzału techniką SPE pozwoliło na stwierdzenie, że mózgi myszy z otyłością wywołaną dietą HFD różnią się od myszy SD w odniesieniu do proporcji całkowitych PUFA w niektórych kategoriach lipidowych. Zaobserwowano znaczący wzrost zawartości PUFA n-3 w PHL frakcji lipidów polarnych uzyskanych Metodą I – PHL (**Tabela 5.9**) oraz Cer i GSPL, frakcjach wyizolowanych Metodą II (**Tabela 5.10**). Nie wykryto natomiast istotnych statystycznie zmian zawartości PUFA zarówno serii n-3 jak i n-6 w uzyskanych frakcjach NL, FFA i SM.

We wszystkich uzyskanych frakcjach złożonych lipidów polarnych dominującym PUFA n-6 był ARA, a PUFA n-3 był DHA (**Tabele 5.9 i 5.10**). Dodatkowo, każda z tych frakcji (PHL, Cer, GSPL i SM) w ekstraktach otrzymanych z mózgów myszy HFD charakteryzowała się istotnie niższą zawartością EPA, niż w ekstraktach z mózgów myszy SD, mimo wyższego stężenia tego kwasu w paszy HFD (**Tabela uzupełniająca 12.15**).

Tabela 5.9 Wielonienasycone kwasy tłuszczowe [% zawartości] we frakcjach lipidowych otrzymanych w wyniku rozdziału ekstraktów lipidów z mózgow myszy eksperymentalnych metodą I

	AG		PHL		FFA	
	SD	HFD	SD	HFD	SD	HFD
SFA	47,2 ± 5,59	45,1 ± 4,99	48,9 ± 0,998	48,8 ± 0,958	84,4 ± 1,46	83,7 ± 1,98
MUFA	33,7 ± 1,38	36,4 ± 1,60*	32,1 ± 1,89	30,0 ± 2,20	9,83 ± 1,39	9,79 ± 1,27
16:2 n-6	0,028 ± 0,017	0,086 ± 0,083	0,004 ± 0,005	0,002 ± 0,004	0,001 ± 0,001	0,002 ± 0,002
18:2 n-6 (LA)	15,0 ± 5,40	14,1 ± 5,68	0,256 ± 0,017	0,460 ± 0,042#	2,38 ± 0,125	1,95 ± 0,545
20:4 n-6 (ARA)	2,70 ± 0,986	2,72 ± 0,557	6,95 ± 0,862	7,44 ± 0,838	2,69 ± 0,270	3,36 ± 0,020
20:3 n-6 (DGLA)	0,126 ± 0,028	0,104 ± 0,048	0,302 ± 0,033	0,336 ± 0,039	0,015 ± 0,005	0,075 ± 0,035
20:2 n-6 (EDA)	0,098 ± 0,037	0,084 ± 0,029	0,078 ± 0,004	0,158 ± 0,028#	0,115 ± 0,075	0,022 ± 0,019
22:5 n-6 (n-6 DPA)	0,036 ± 0,014	0,058 ± 0,025	0,350 ± 0,101	0,122 ± 0,047**	0,037 ± 0,034	0,045 ± 0,025
22:4 n-6 (AdA)	0,152 ± 0,052	0,192 ± 0,048	2,18 ± 0,323	2,206 ± 0,185	0,09 ± 0,000	0,160 ± 0,000
PUFA n-6	18,1 ± 5,03	17,4 ± 5,14	10,1 ± 1,31	10,7 ± 0,955	5,32 ± 0,03	5,53 ± 0,528
18:3 n-3 (ALA)	0,072 ± 0,055	0,036 ± 0,008	0,018 ± 0,007	0,020 ± 0,006	0,010 ± 0,000	0,020 ± 0,020
20:5 n-3 (EPA)	0,184 ± 0,087	0,150 ± 0,079	0,308 ± 0,033	0,128 ± 0,010#	0,110 ± 0,020	0,290 ± 0,030*
22:6 n-3 (DHA)	0,520 ± 0,167	0,684 ± 0,060	7,99 ± 0,613	9,77 ± 0,662**	0,37 ± 0,055	0,60 ± 0,110
22:5 n-3 (n-3 DPA)	0,070 ± 0,015	0,056 ± 0,033	0,338 ± 0,052	0,354 ± 0,045	0,027 ± 0,024	0,030 ± 0,000
PUFA n-3	0,846 ± 0,249	0,926 ± 0,137	8,65 ± 0,660	10,3 ± 0,680#	0,512 ± 0,099	0,925 ± 0,085

* p < 0,05, ** p < 0,01, # p < 0,001. Skróty: **AG** - połączone frakcje acylogliceroli, **FFA** - wolne kwasy tłuszczowe, **HFD** - myszy na diecie wysokotłuszczowej, **PHL** - fosfolipidy, **SD** - myszy na diecie standardowej. Nazwy kwasów za Tabelą 1.1. **Przedstawione dane zostały opublikowane** [68].

Tabela 5.10 Wielonienasycone kwasy tłuszczowe [% zawartości] we frakcjach lipidowych otrzymanych w wyniku rozdzielenia ekstraktów lipidów z mózgów myszy eksperymentalnych metodą II

	Cer		GSPL		SM	
	SD	HFD	SD	HFD	SD	HFD
SFA	63,2 ± 3,16	57,5 ± 4,87	58,5 ± 1,68	57,0 ± 0,846	43,1 ± 2,55	44,5 ± 2,44
MUFA	27,4 ± 2,05	30,3 ± 2,11	32,1 ± 1,57	31,8 ± 1,26	25,2 ± 2,43	23,2 ± 2,91
16:2 n-6	0,036 ± 0,014	0,023 ± 0,021	0,006 ± 0,003	0,004 ± 0,003	0,006 ± 0,003	0,006 ± 0,003
18:2 n-6 (LA)	1,74 ± 0,532	1,34 ± 0,842	0,282 ± 0,022	0,588 ± 0,122**	0,234 ± 0,022	0,396 ± 0,090**
20:4 n-6 (ARA)	4,64 ± 1,08	5,54 ± 1,20	4,19 ± 0,527	4,90 ± 0,799	9,79 ± 0,789	9,66 ± 0,608
20:3 n-6 (DGLA)	0,194 ± 0,046	0,252 ± 0,070	0,190 ± 0,018	0,238 ± 0,028*	0,340 ± 0,020	0,358 ± 0,033
20:2 n-6 (EDA)	0,090 ± 0,024	0,090 ± 0,038	0,068 ± 0,030	0,146 ± 0,014**	0,068 ± 0,017	0,104 ± 0,027
22:5 n-6 (n-6 DPA)	0,044 ± 0,021	0,076 ± 0,067	0,134 ± 0,014	0,046 ± 0,022#	0,572 ± 0,076	0,186 ± 0,038#
22:4 n-6 (AdA)	0,344 ± 0,072	0,726 ± 0,575	0,554 ± 0,055	0,582 ± 0,065	4,17 ± 0,408	3,86 ± 0,461
PUFA n-6	7,09 ± 1,12	8,04 ± 2,08	5,43 ± 0,553	6,50 ± 0,905	15,2 ± 1,21	14,6 ± 0,850
18:3 n-3 (ALA)	0,064 ± 0,040	0,032 ± 0,012	0,024 ± 0,019	0,020 ± 0,015	0,009 ± 0,003	0,018 ± 0,004**
20:5 n-3 (EPA)	0,344 ± 0,081	0,182 ± 0,117*	0,126 ± 0,010	0,064 ± 0,021#	0,460 ± 0,033	0,218 ± 0,047#
22:6 n-3 (DHA)	1,58 ± 0,289	3,58 ± 1,50*	3,63 ± 0,415	4,41 ± 0,150**	15,4 ± 1,17	16,9 ± 0,916
22:5 n-3 (n-3 DPA)	0,094 ± 0,064	0,110 ± 0,030	0,102 ± 0,015	0,112 ± 0,029	0,536 ± 0,054	0,482 ± 0,066
PUFA n-3	2,08 ± 0,346	3,91 ± 1,54*	3,88 ± 0,438	4,61 ± 0,139*	16,4 ± 1,19	17,6 ± 0,971

* p < 0,05, ** p < 0,01, # p < 0,001. Skróty: **Cer** - ceramidy, **GSPL** - glikosfingolipidy, **HFD** - myszy na diecie wysokotłuszczowej, **SD** - myszy na diecie standardowej, **SM** - sfingomieliny. Nazwy kwasów za Tabelą 1.1. **Dane opublikowane** [68].

5.3.2 PROFIL KWASÓW TŁUSZCZOWYCH W EKSTRAKTACH LIPIDOWYCH Z SERC MYSZY Z OTYŁOŚCIĄ

Obrazowanie echokardiograficzne (**Tabela 5.11**) nie wykazało różnic pomiędzy myszami SD i HFD w rzucie serca, którego zmiany są obserwowane wraz z często towarzyszącymi otyłości CVD takimi jak nadciśnienie lub choroba wieńcowa [222]. Jednakże w grupie HFD zaobserwowano znacznie mniejsze AVA oraz wyższe (choć nieistotne statystycznie) V_{max} . Zmiany tych parametrów w grupie HFD sugerują początkowe stadia zwężenia (stenozy) zastawki aortalnej, często występującej wady serca, której leczenie może wymagać nawet interwencji chirurgicznej [223]. W dłuższych badaniach myszy C57BL/6J, dieta o zbliżonym rozkładzie energii (60% tłuszcze, 20% węglowodany, 20% białko) prowadziła nawet do kardiomiopatii, czyli patologii budowy i czynności mięśnia sercowego [224].

Tabela 5.11 Wyniki badania echokardiograficznego myszy karmionych różnymi dietami

Parametr	SD	HFD	p-wartość
LVESV [μ l]	8,80 \pm 2,00	10,8 \pm 2,40	0,144
LVEDV [μ l]	29,8 \pm 4,60	31,1 \pm 3,85	0,613
SV [μ l]	21,0 \pm 2,70	20,3 \pm 2,50	0,626
CO [ml/min]	6,15 \pm 0,99	6,10 \pm 0,67	0,922
LVEF [%]	70,8 \pm 4,32	65,4 \pm 5,50	0,090
AVA [mm ²]	1,62 \pm 0,45	1,34 \pm 0,44	0,049
V_{max} [m/s]	0,76 \pm 0,27	0,98 \pm 0,30	0,056

Na czerwono - $p < 0,05$. Skróty: **AVA** - pole powierzchni ujścia zastawkowego, **CO** - pojemność minutowa, **HFD** - myszy na diecie wysokotłuszczowej, **LVEDV** - objętość końcoworozkurczowa lewej komory, **LVEF** - frakcja wyrzutowa lewej komory, **LVESV** - objętość końcowoskurczowa lewej komory, **SD** - myszy na diecie standardowej, **SV** - objętość wyrzutowa, **V_{max}** - prędkości przepływu przez zastawkę aorty. Dane uzyskane dzięki uprzejmości Katedry i Zakładu Biochemii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. **Dane opublikowane** [225].

Wyniki badań biochemicznych wykonywanych na Katedrze i Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (**Tabela 5.12**) wykazały, że grupa myszy HFD charakteryzuje się podwyższoną zawartością TAG w tkance serca. Znacząco wyższe stężenie FFA tkance mięśnia sercowego grupy HFD jest kolejnym dowodem na akumulację lipidów w tkance serca w wyniku diety wysokotłuszczowej. Warto podkreślić również, że nadmierne gromadzenie lipidów jest jedną z możliwych przyczyn kardiomiopatii, chorób prowadzących do dysfunkcji mięśnia sercowego [226], a nadmiar FFA jest wczesnym

ZMIANY PROFILU KWASÓW TŁUSZCZOWYCH W MYSIM MODELU OTYŁOŚCI WYWOŁANEJ DIETĄ WYSOKOTŁUSZCZOWĄ

indykatorem ryzyka CVD [128]. Ocena poziomu stresu oksydacyjnego w tkance serca na podstawie poziomu peroksydacji lipidów i karbonylacji białek, nie wykazała znaczących różnic pomiędzy badanymi grupami.

Tabela 5.12 Wyniki oznaczania parametrów biochemicznych w tkance mięśnia sercowego i surowicy myszy

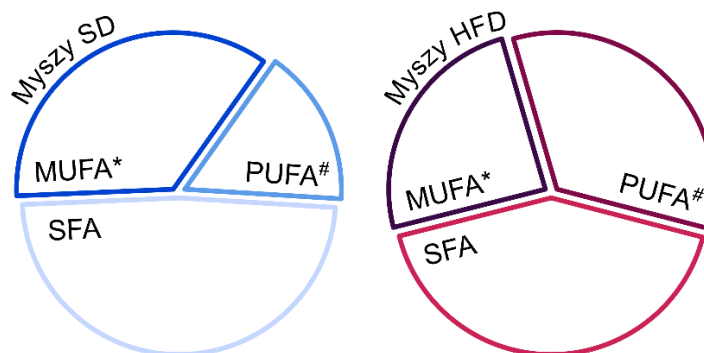
Parametr	SD	HFD
Białko całkowite [g/g tkanki]	157 ± 12	164 ± 31
Stężenie TAG [mg/g tkanki]	2,9 ± 0,5	5,0 ± 1,7**
Poziom karbonylacji białek [nmol/mg białka całkowitego]	1,59 ± 0,24	1,52 ± 0,28
Stężenie TBARS [µM/g białka całkowitego] †	8,41 ± 1,95	8,67 ± 1,29
Stężenie wolnego cholesterolu [mg/g tkanki]	3,79 ± 0,51	3,62 ± 0,34
Stężenie FFA w surowicy [mmol/l]	0,25 ± 0,12	0,68 ± 0,34#

** p < 0,01 # p < 0,001, † - parametr pozwalający na ocenę poziomu peroksydacji lipidów. Skróty: **FFA** - wolne kwasy tłuszczowe, **HFD** - myszy na diecie wysokotłuszczowej, **SD** - myszy na diecie standardowej, **SV** - objętość wyrzutowa, **TAG** - triacyloglicerole, **TBARS** - substancje reagujące z kwasem tiobarbiturowym. Wyniki uzyskane dzięki uprzejmości Katedry i Zakładu Biochemii Farmaceutycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. **Dane opublikowane** [225].

5.3.2.1 PROFIL KWASÓW TŁUSZCZOWYCH W EKSTRAKTACH CAŁKOWITYCH LIPIDÓW Z SERC W MODELU MYSIM

Profil FA oznaczony techniką GC-MS w ekstraktach lipidów całkowitych przygotowanych z serc myszy eksperymentalnych wskazywał na gromadzenie się PUFA w tym narządzie u myszy HFD w porównaniu z myszami SD (**Rysunek 5.18**). W ekstraktach lipidowych serc myszy HFD wykryto najwyższą zawartość całkowitych PUFA ze wszystkich analizowanych tkanek/narządów ($33,53 \pm 11,26\%$) i nawet 2,6-krotnie wyższą zawartość PUFA n-3 w porównaniu z sercami myszy SD (**Tabela uzupełniająca 12.13**). Znamienny był również stopień zaburzenia zawartości poszczególnych PUFA w ekstraktach lipidowych serc HFD, na tle zmian PUFA w ekstraktach mięśni szkieletowych. W przeciwieństwie do mięśni szkieletowych, gdzie znaczące różnice w zawartości zaobserwowano jedynie dla niektórych PUFA (LA, DGLA, EPA, DHA, n-6 DPA), ekstrakty lipidów całkowitych z serc myszy HFD wykazywały istotne różnice pomiędzy zawartością niemalże wszystkich PUFA (poza 16:2 n-6 oraz ETA; **Tabela uzupełniająca 12.13**). Kolejną istotną obserwacją był niższy poziom MUFA (~ 30%) w ekstraktach lipidowych serc myszy HFD w porównaniu z SD, czego nie wykazano w mięśniach szkieletowych (**Tabela uzupełniająca 12.13**). Zaskakujące, biorąc pod uwagę fakt, że nie odzwierciedla to trendu obserwowanego w surowicy (**Tabela uzupełniająca 12.11**), mimo że obie te tkanki (mięśnie szkieletowe i mięsień sercowy) mają ograniczony potencjał do syntezy lipidów *de novo* [227].

ZMIANY PROFILU KWASÓW TŁUSZCZOWYCH W MYSIM MODELU OTYŁOŚCI WYWOŁANEJ DIETĄ WYSOKOTŁUSZCZOWĄ



Rysunek 5.18 Zawartość [%] nasyconych, jednonienasyconych i wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w ekstraktach lipidów całkowitych z serc myszy eksperymentalnych

* $p < 0,05$, # $p < 0,001$. Skróty: **HFD** - myszy na diecie wysokotłuszczowej, **MUFA** - jednonienasycone kwasy tłuszczowe, **PUFA** - wielonienasycone kwasy tłuszczowe, **SD** - myszy na diecie standardowej, **SFA** - nasycone kwasy tłuszczowe. Przedstawione **Dane opublikowane** [183].

5.3.2.2 ANALIZA KWASÓW TŁUSZCZOWYCH WE FRAKCJACH LIPIDOWYCH UZYSKANYCH W ROZDZIALE SPE Z SERC MYSZY

W rozdziałach ekstraktów całkowitych lipidów z serc myszy techniką SPE wyodrębniono łącznie 7 grup lipidów, w których oznaczano FA za pomocą GC-MS. Analizując uzyskane profile FA największą uwagę poświęcono przedstawicielom PUFA oraz 16- i 18-węglowym SFA i MUFA, co podyktowane było wynikami otrzymanymi podczas oznaczania FA w całkowitych ekstraktach lipidowych, omówionych powyżej w **sekcji 5.3.2**. Stosując Metodę I SPE uzyskano FFA, AG, zawierające MAG, DAG i TAG, oraz PHL, natomiast metoda II pozwoliła na oddzielenie od frakcji NL, grup zawierających sfingolipidy: Cer, GSPL i SM. Zawartości procentowe najważniejszych kwasów w zebranych frakcjach przedstawiono odpowiednio w **Tabeli 5.13** i **5.14**.

W wyekstrahowanych frakcjach lipidów niepolarnych – AG oraz NL, zaobserwowano akumulację PUFA oraz zmniejszenie zawartości MUFA (odpowiednio **Tabela 5.13** i **5.14**). Akumulację PUFA zaobserwowano również we frakcjach lipidów polarnych – PHL (**Tabela 5.13**, trend do podwyższonych PUFA, brak istotności statystycznej) i Cer, GSPL, SM (**Tabela 5.14**, istotne statystycznie). W GSPL wykazano najwyższe zwiększenie ilości PUFA n-3, które było 3,7 razy wyższe u myszy HFD, w porównaniu z SD (**Tabela 5.14**). Natomiast Cer z PUFA n-6 w sercach HFD było aż 3,1 razy wyższe niż w SD. Ocena zawartości poszczególnych FA we frakcjach uwidoczniała, podobnie do ekstraktów lipidowych z mózgu, znaczne zmniejszenie ilości EPA pod wpływem diety HFD, które dotyczyło szczególnie grup PHL (**Tabela 5.13**), GSPL i SM (**Tabela 5.14**). Ponadto zawartość ARA, metabolitu

ZMIANY PROFILU KWASÓW TŁUSZCZOWYCH W MYSIM MODELU OTYŁOŚCI
WYWOŁANEJ DIETĄ WYSOKOTŁUSZCZOWĄ

do produkcji wielu prozapalnych metabolitów (Tabela 4.5), była znacząco wyższa w grupie HFD w lipidach otrzymanych Metodą II (Tabela 5.14).

Tabela 5.13 Najważniejsze kwasy tłuszczowe [% zawartości] we frakcjach lipidowych otrzymanych w wyniku rozdziału ekstraktów lipidów z serc myszy eksperymentalnych metodą I

	AG		PHL		FFA	
	SD	HFD	SD	HFD	SD	HFD
16:0	23,6 ± 1,66	22,5 ± 0,643	21,0 ± 5,57	19,6 ± 4,32	45,2 ± 4,24	41,4 ± 8,53
18:0	5,30 ± 0,736	9,57 ± 1,25#	27,4 ± 3,32	27,3 ± 3,95	28,4 ± 2,24	23,4 ± 3,01**
inne SFA	5,55 ± 0,710	6,57 ± 0,863	2,64 ± 0,825	1,92 ± 0,325	5,68 ± 1,08	6,19 ± 1,33
SFA	34,4 ± 1,92	38,7 ± 1,74**	51,1 ± 9,40	48,8 ± 8,44	79,3 ± 3,40	71,1 ± 11,4
16:1	7,36 ± 1,64	3,84 ± 0,978**	1,61 ± 0,729	0,654 ± 0,127*	3,22 ± 1,42	3,00 ± 0,702
18:1	45,7 ± 1,07	38,5 ± 3,90**	19,8 ± 4,75	13,0 ± 2,06*	13,1 ± 2,80	16,6 ± 6,23
inne MUFA	1,80 ± 0,170	1,61 ± 0,289	2,29 ± 0,874	1,10 ± 0,116*	0,489 ± 0,190	0,785 ± 0,417
MUFA	54,9 ± 2,20	43,9 ± 4,89**	22,2 ± 5,58	14,2 ± 2,17*	16,8 ± 2,53	20,4 ± 5,94
18:2 n-6 (LA)	9,61 ± 3,08	14,3 ± 3,39	4,47 ± 0,733	6,24 ± 1,40*	2,475 ± 0,926	5,24 ± 3,00
20:4 n-6 (ARA)	0,284 ± 0,244	1,05 ± 0,652*	9,75 ± 5,82	12,7 ± 3,62	0,530 ± 0,548	1,36 ± 1,08
22:4 n-6 (AdA)	0,076 ± 0,067	0,184 ± 0,117	0,404 ± 0,246	0,710 ± 0,212	0,112 ± 0,084	0,230 ± 0,189
inne PUFA n-6	0,372 ± 0,218	0,814 ± 0,339*	3,52 ± 2,22	2,29 ± 0,609	0,258 ± 0,159	0,523 ± 0,337
PUFA n-6	10,3 ± 3,41	16,3 ± 3,24*	18,1 ± 8,91	22,0 ± 5,46	3,38 ± 1,40	7,36 ± 4,58
18:3 n-3 (ALA)	0,020 ± 0,010	0,026 ± 0,005	0,026 ± 0,015	0,018 ± 0,008	0,034 ± 0,023	0,053 ± 0,023
20:5 n-3 (EPA)	0,106 ± 0,070	0,102 ± 0,022	1,09 ± 0,471	0,188 ± 0,043**	0,183 ± 0,099	0,143 ± 0,067
22:6 n-3 (DHA)	0,106 ± 0,070	0,598 ± 0,356*	6,51 ± 4,89	12,0 ± 4,20	0,170 ± 0,124	0,570 ± 0,509
22:5 n-3 (n-3 DPA)	0,112 ± 0,082	0,394 ± 0,242*	0,942 ± 0,682	2,84 ± 1,13*	0,122 ± 0,087	0,440 ± 0,429
inne PUFA n-3	0,009 ± 0,003	0,018 ± 0,013	0,078 ± 0,015	0,056 ± 0,017	0,001 ± 0,000	0,001 ± 0,000
PUFA n-3	0,347 ± 0,227	1,14 ± 0,580*	8,64 ± 6,00	15,1 ± 5,32	0,510 ± 0,312	1,21 ± 0,980

* p < 0,05, ** p < 0,01, # p < 0,001. Skróty: **AG** – połączone frakcje acylogliceroli, **FFA** – wolne kwasy tłuszczowe, **HFD** – myszy na diecie wysokotłuszczowej, **PHL** – fosfolipidy, **SD** – myszy na diecie standardowej. Nazwy kwasów za Tabelą 1.1. **Przedstawione dane były publikowane** [225].

Tabela 5.14 Najważniejsze kwasy tłuszczowe [% zawartości] we frakcjach lipidowych otrzymanych w wyniku rozdziału ekstraktów lipidów z serc myszy eksperymentalnych metodą II

	NL		Cer		GSPL		SM	
	SD	HFD	SD	HFD	SD	HFD	SD	HFD
16:0	26,2 ± 2,02	24,1 ± 2,08	29,6 ± 4,12	24,3 ± 0,544	43,0 ± 4,14	33,7 ± 0,791*	24,1 ± 2,13	22,3 ± 1,71
18:0	8,51 ± 1,38	8,59 ± 0,429	16,1 ± 2,74	11,9 ± 1,00*	34,5 ± 2,80	31,2 ± 1,85	24,6 ± 1,34	25,6 ± 1,29
inne SFA	6,38 ± 0,624	5,56 ± 0,421	12,9 ± 2,43	8,61 ± 1,81	6,02 ± 2,45	4,64 ± 0,249	2,11 ± 0,122	1,64 ± 0,157**
SFA	41,1 ± 1,26	38,3 ± 2,33	58,6 ± 8,77	44,8 ± 2,91*	83,5 ± 4,68	69,6 ± 1,43**	50,8 ± 3,13	49,6 ± 2,97
16:1	8,28 ± 0,987	3,99 ± 0,580**	4,98 ± 0,584	4,19 ± 0,690	1,55 ± 0,377	1,53 ± 0,736	1,34 ± 0,088	0,542 ± 0,048#
18:1	44,0 ± 1,14	42,7 ± 2,02	29,8 ± 7,31	35,5 ± 2,93	9,02 ± 1,70	10,6 ± 0,948	22,6 ± 1,85	14,4 ± 0,516#
inne MUFA	2,79 ± 0,633	1,59 ± 0,252	2,52 ± 0,518	1,53 ± 0,233*	0,314 ± 0,113	0,173 ± 0,012	0,473 ± 0,080	0,278 ± 0,025**
MUFA	55,1 ± 1,25	48,2 ± 2,00*	37,3 ± 7,89	41,2 ± 2,03	10,9 ± 1,32	12,3 ± 1,63	24,4 ± 1,90	15,2 ± 0,567#
18:2 n-6 (LA)	3,43 ± 1,26	9,70 ± 0,100**	2,71 ± 0,82	8,86 ± 1,27#	1,74 ± 0,676	4,20 ± 0,299**	6,00 ± 0,964	8,15 ± 1,55*
20:4 n-6 (ARA)	0,297 ± 0,271	1,20 ± 0,136*	0,748 ± 0,348	1,99 ± 0,293**	2,21 ± 1,34	6,63 ± 0,209**	9,07 ± 1,66	12,4 ± 1,09*
22:4 n-6 (AdA)	0,067 ± 0,052	0,470 ± 0,064**	0,050 ± 0,031	0,373 ± 0,020#	0,074 ± 0,045	0,357 ± 0,009#	0,330 ± 0,068	0,702 ± 0,074#
inne PUFA n-6	0,190 ± 0,116	0,900 ± 0,171**	0,235 ± 0,093	0,590 ± 0,108**	0,502 ± 0,398	0,903 ± 0,105	2,98 ± 0,706	2,34 ± 0,138
PUFA n-6	3,98 ± 1,68	12,3 ± 0,423**	3,75 ± 1,26	11,8 ± 1,14#	4,53 ± 2,44	12,1 ± 0,487**	18,4 ± 3,30	23,6 ± 2,675*
18:3 n-3 (ALA)	0,023 ± 0,012	0,020 ± 0,008	0,063 ± 0,024	0,038 ± 0,008	0,040 ± 0,017	0,023 ± 0,005	0,014 ± 0,005	0,016 ± 0,005
20:5 n-3 (EPA)	0,217 ± 0,153	0,163 ± 0,037	0,398 ± 0,226	0,178 ± 0,059	0,434 ± 0,166	0,093 ± 0,019*	1,39 ± 0,243	0,182 ± 0,020#
22:6 n-3 (DHA)	0,120 ± 0,079	0,837 ± 0,118**	0,315 ± 0,126	1,39 ± 0,072#	1,07 ± 0,858	4,81 ± 0,226#	4,75 ± 1,43	9,08 ± 0,643#
22:5 n-3 (n-3 DPA)	0,120 ± 0,099	1,01 ± 0,142**	0,080 ± 0,039	0,883 ± 0,072#	0,148 ± 0,122	1,35 ± 0,158#	0,724 ± 0,202	2,57 ± 0,395
inne PUFA n-3	0,013 ± 0,005	0,017 ± 0,009	0,010 ± 0,007	0,030 ± 0,010*	0,022 ± 0,012	0,037 ± 0,012	0,100 ± 0,017	0,086 ± 0,027#
PUFA n-3	0,493 ± 0,334	2,04 ± 0,293**	0,865 ± 0,370	2,52 ± 0,113#	1,71 ± 1,13	6,31 ± 0,277#	6,98 ± 1,78	11,93 ± 0,955**

* p < 0,05, ** p < 0,01, # p < 0,001. Skrót: **Cer** - ceramidy, **GSPL** - glikosfingolipidy, **HFD** - myszy na diecie wysokotłuszczowej, **NL** - neutralne lipidy, **SD** - myszy na diecie standardowej, **SM** - sfingomieliny. Nazwy kwasów za Tabelą 1.1. **Przedstawione dane były publikowane** [225].

6 DYSKUSJA

Przedmiotem przedłożonej rozprawy doktorskiej było określenie wpływu nowego, skutecznego zabiegu bariatrycznego – OAGB, na poziom bioaktywnych lipidów. Prowadzone badania rozwijały tematykę zapoczątkowaną przez dr hab. Adrianę Mika, prof. GUMed, prof. UG [89]. Obiektem badań była surowica i tkanka tłuszczowa pacjentów z MO leczonych bariatrycznie, w których, stosując technikę GC-MS, dokonano charakterystyki profili FA, z uwzględnieniem pierwszy raz opisanych u pacjentów z MO przez prof. Mika, grup BCFA i OCFA. Wyniki tych eksperymentów były również podstawą do oceny endogennej syntezy BCFA w tkance tłuszczowej we współpracy z Katedrą Biochemii i Katedrą Biochemii Farmaceutycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Opracowano metodę SPE-LC-MS/MS, która umożliwiła w surowicy pacjentów leczonych OAGB analizę oksylipin, czyli metabolitów PUFA, będących cząstkami regulatorowymi. Wreszcie, aby uzyskać wgląd w zmiany profili FA w tkankach, których nie można pozyskać od ludzi, wykorzystano myszy model otyłości. Zastosowanie techniki SPE umożliwiło uwidocznienie zmian profili FA zachodzących w otyłości w różnych grupach lipidowych. Ze względu na szeroki zakres podjętych problemów badawczych, dyskusja podzielona została na części dotyczące analizy FA w materiale biologicznym pacjentów (**sekcja 6.1**), analizy oksylipin (**sekcja 6.2**) i analizy FA w modelu mysim (**sekcja 6.3**).

6.1 WPŁYW ZABIEGU OAGB NA PROFIL KWASÓW TŁUSZCZOWYCH

Profile FA pacjentów z MO w surowicy znacząco odbiegają od profili zdrowych osób z grupy kontrolnej. Nieprawidłowa dieta, będąca główną przyczyną otyłości, może przyczynić się do zwiększenia zawartości TAG w surowicy (**Tabela 5.2**), a co za tym idzie, MUFA, grupy FA, której zawartość pozytywnie koreluje z BMI [131]. Wiadomo również, że endogenna synteza MUFA ma udział w przewlekłym stanie zapalnym w MO [228], której zintensyfikowanie w VAT oceniano na podstawie podwyższonych DI (**Tabela 5.3**). Pacjenci z MO leczeni OAGB wykazują w punkcie pre-OAGB podwyższoną zawartość FFA i wartość HOMA-IR w surowicy [229]. Jednak w niniejszej rozprawie szczególną uwagę zdecydowano poświęcić grupom BCFA i OCFA, z uwagi na ich potencjalne prozdrowotne właściwości. Przeprowadzone badania są jedynymi z pierwszych, w których profil FA uwzględniał

BCFA [84,89,174]. Istotne znaczenie stanu zapalnego w indukowaniu schorzeń współtowarzyszących otyłości było z kolei motywacją do analizy PUFA oraz ich metabolitów, diskutowanych szerzej w **sekcji 6.1.3**.

Polskie rekomendacje w zakresie opieki okołoperacyjnej dotyczące chirurgii bariatrycznej [230] są zgodne z zaleceniami stworzonymi dla poprawy wyników leczenia chirurgicznego (ERAS, ang. *enhanced recovery after surgery*) [231] i obejmują przygotowanie pacjenta do operacji poprzez wprowadzenie nisko- lub bardzo niskokalorycznej diety, prowadzącej do zmniejszenia masy ciała (**sekcja 4.2.1.2**). Zastosowanie takiej diety powoduje zmniejszenie objętości wątroby, co skutkuje mniejszym ryzykiem wystąpienia powikłań pooperacyjnych i może przyczyniać się do większej utraty masy ciała po operacji [231]. Wiedząc, że profil FA w surowicy ludzi jest wypadkową ich endogennej syntezy oraz diety [45], w wykonywanych badaniach pozyskiwano surowicę od pacjentów bariatrycznych w punkcie INI, aby ocenić jak silnie dieta stosowana przed operacją wpływa na profil FA, szczególnie w przypadku wyżej wymienionych grup aktywnych FA, których głównym źródłem jest dieta. Mimo że zastosowanie diety redukcyjnej przed operacją bariatryczną jest zalecane przez większość organizacji zajmujące się problemem otyłości i jest w wielu przypadkach wymogiem refundowania [232], wiele badań na temat zmian profilu FA nie uwzględnia momentu rozpoczęcia diety [162,233–236].

Na podstawie analizy GC-MS FA w surowicy krwi pacjentów w punkcie INI i w punkcie pre-OAGB (**Tabela uzupełniająca 12.4**), stwierdzono, że dieta redukcyjna nie wpływa na zawartość żadnego kwasu z grup OCFA i *anteizo* BCFA, a pośród *izo* BCFA jedynym kwasem, którego zawartość we krwi obniża się po diecie jest *izo* 15:0. Zmianę sposobu odżywiania pacjentów odzwierciedlało obniżenie zawartości SFA (14:0, 18:0, 20:0, 24:0) i podwyższenie zawartości 18:1 w surowicy w punkcie pre-OAGB, co jest wynikiem spożywania mniejszej ilości tłuszczów nasyconych. Pacjenci zmniejszyli również spożycie niezbędnych PUFA (LA i ALA), jednak nie powodowało to znaczących zmian w profilu pozostałych PUFA. W rezultacie przeprowadzonych analiz można stwierdzić, że omawiane później zmiany w profilach FA następujące po OAGB, są głównie skutkiem zabiegu i zmian pooperacyjnych. Podobne wnioski wyciągnęli Lin i wsp, którzy również nie wykryli istotnych zmian w profilu FA w surowicy po 3- miesięcznej diecie przygotowującej pacjentów do LSG lub wyłączenia żółciowo-trzustkowego z przełączeniem dwunastniczym (**BPDDS**, ang. *biliopancreatic diversion with duodenal switch*) [169].

6.1.1 KRÓTKOTERMINOWY WPŁYW OAGB NA PROFIL KWASÓW TŁUSZCZOWYCH W SUROWICY

Przedstawione w niniejszej pracy wyniki analizy FA w surowicy pacjentów 2 tygodnie po przeprowadzonym zabiegu OAGB (**sekcja 5.1.3.1**) wskazują na zmniejszenie poziomów większości OCFA i PUFA [178].

W aspekcie modyfikacji zawartości i metabolizmu OCFA w chorobach metabolicznych największą uwagę poświęcano dotychczas najobficiej występującym kwasom 15:0 i 17:0 [87], ze względu na wykazaną w badaniach epidemiologicznych, odwrotną korelację tych kwasów z ryzykiem T2DM [237]. W prezentowanych w niniejszej pracy badaniach zawartość 15:0 w surowicy nie różniła się istotnie po OAGB zarówno w punkcie FU1 (**Tabela 5.4**), jak i w FU2 (**Tabela 5.5**), natomiast zawartość 17:0 była istotnie obniżona w punkcie FU1. Kwasy 15:0 i 17:0 są bioaktywnymi molekułami, wykazują działanie agonistyczne wobec receptorów PPAR, przyczyniają się do obniżenia mitochondrialnych ROS i redukują stan zapalny [238]. Wprawdzie ochronne działanie w większym stopniu wykazuje 15:0 [238], jednakże warto nadmienić, że w modelu zwierzęcym 17:0, nie 15:0, był silnie skorelowany z obniżonym stężeniem glukozy i insuliny [85]. Wskazuje to na niejednakowy metabolizm 15:0 i 17:0, który może tłumaczyć zaobserwowane w niniejszej pracy różnice w zmianach zawartości tych FA. Pomimo występowania obu tych OCFA w produktach mleczarskich [239,240], okazuje się, że zawartość 17:0 w diecie nie odzwierciedla jego zawartości w organizmie [85]. Wśród proponowanych mechanizmów odpowiadających za utrzymanie prawidłowego poziomu 17:0 w organizmie są α -oksydacja 18:0 [87], elongacja 15:0 [238] oraz synteza *de novo* z priopionylo-CoA, który jest produkowany przez mikroflorę jelitową [241]. Według dostępnych informacji, dysbioza jelit jest jednym z powikłań operacji bariatrycznych [242], jednak brakuje danych o OAGB, które mogłyby potwierdzić lub wykluczyć udział tego mechanizmu w obserwowanych zmianach poziomów OCFA.

Niewiele wiadomo na temat mechanizmów działania pozostałych średnio i długołańcuchowych OCFA. Kwasy 15:0 i 17:0 występują w największej ilości [87], jednak, jak ilustrują m.in. wyniki niniejszej pracy, nie są jedynymi OCFA, które można zidentyfikować w surowicy i tkankach ludzkich [89,178] oraz zwierzęcych [68,225]. OCFA o długości od 11:0 do 23:0 są obecne również w mleku przeżuwaczy [239,240] i roślinach [243]. Dostępne dane sugerują, że także te OCFA są bioaktywne i wykazują właściwości przeciwgrzybiczne [244].

Większość badań nad metabolizmem FA i ich rolą w stanach chorobowych pomija OCFA i dotyczy głównie ECFA, ponieważ stanowią one zdecydowaną SFA w tkankach i biofluidach ludzkich [87]. Nie inaczej OCFA traktowane były dotychczas w kontekście otyłości. Pierwsze szczegółowe badania OCFA u pacjentów z MO zostały przeprowadzone w 2016 r. przez prof. Adrianę Mika [89], gdzie w surowicy pacjentów zidentyfikowane zostały OCFA o długości 11 – 23 węgli w łańcuchu acylowym. Jednak większość badań opisujących zmiany lipidomu krótko (do 3 miesięcy) po operacjach bariatrycznych pomija OCFA [168,169,173]. Zmiany w zawartości sfingolipidów zawierających nieparzysto-węglowe łańcuchy acylowe zaobserwował Kayser i wsp. [166]. Miesiąc po operacji założenia regulowanej opaski żołądka (AGB, ang. *adjustable gastric banding*) lub po operacji RYGB obserwowali oni niższą zawartość OCFA-Cer i niektórych OCFA-SM, a po RYGB obniżona zawartość tych lipidów trwała nawet do 3 miesięcy po zabiegu [166]. Przyczyna różnic pomiędzy trwałością obniżenia OCFA pomiędzy RYGB a AGB nie jest znana. Może to być związane zarówno z mocniej upośledzonym, w stosunku do AGB, pobieraniem składników odżywczych z diety, jak i większym stopniem zakłócenia bogactwa mikroflory jelitowej po RYGB [245]. Jednak już 6 miesięcy po RYGB zawartość niektórych OCFA w surowicy pacjentów – 13:0 i 15:0 wzrastała według Wijayatungi i wsp. [160].

Badania monitorujące zmiany profilu FA w wyniku leczenia bariatrycznego, znacznie powszechniej niż OCFA, opisują zmiany PUFA. Wyniki oznaczania zawartości PUFA w surowicy, uzyskane w ramach niniejszej rozprawy są jedynymi dotyczącymi OAGB. Analiza profilu FA (**Tabela 5.4**) wykazała znaczne obniżenie zawartości niezbędnych PUFA w punkcie FU1. Lin i wsp. [169] także zaobserwowali nieznaczne obniżenie zawartości LA krótko po BPDDS oraz po LSG, jednak niektórzy autorzy zauważyli wzrost stężenia tego kwasu po RYGB [164] i po AGB [246]. Niemniej, jak podsumowuje w systematycznym przeglądzie Middleton i wsp. [247], obniżenie zawartości LA w surowicy w pierwszych 6 miesiącach po zabiegu bariatrycznym jest powszechny. Niższa zawartość LA jest najprawdopodobniej wynikiem mniejszego spożycia tego kwasu. Analogicznie, większość dostępnych danych wskazuje na obniżenie zawartości ALA [247], szczególnie widoczne do 3 miesięcy po LSG [169], RYGB [235] lub po założeniu rękawa endoluminalnego [248]. Poza niezbędnymi ALA i LA, kwasem z grupy PUFA n-3, którego zawartość wydaje się konsekwentnie obniżać po większości interwencji bariatrycznych, jest EPA [247], co zostało również zaobserwowane w niniejszej pracy. Porównując dostępne badania ([247] i **Tabela 2.6**), mniej jednoznaczne zmiany zachodzą w zawartości pozostałych, długołańcuchowych PUFA, szczególnie

przedstawicieli PUFA n-6. Może być to związane z zachodzącą w odpowiedzi na redukcję ilości przyjmowanych w diecie FA; mobilizacją FA zmagazynowanych w AT, które są bogate w PUFA n-6 (**Tabela uzupełniająca 12.3**).

Do obniżenia poziomów niezbędnych PUFA w organizmie najprawdopodobniej przyczyniają się przede wszystkim zmiany w diecie po operacji bariatrycznej. Krótco po przeprowadzeniu OAGB pacjenci spożywają głównie lekkostrawne posiłki, w których wyklucza się tłuste mięso i ryby oraz ogranicza spożycie orzechów. Co więcej, zmiany anatomiczne w przewodzie pokarmowym mogą przyczyniać się do zmniejszenia wchłaniania ALA i LA z diety, przyczyniając się do ogólnoustrojowego zmniejszenia dostępności prekursorów do syntezy długołańcuchowych PUFA. Dopelniającym mechanizmem postulowanym przez Garłę i wsp. [235], w celu wytłumaczenia niedoboru EPA, jest zmniejszenie aktywności desaturaz PUFA w tkance jelit po zabiegu bariatrycznym. Jednakże, mając na uwadze, że wkład pozawątrobowej syntezy w utrzymanie prawidłowego poziomu PUFA jest znikomy [249], ścieżka ta ma najprawdopodobniej niewielki wpływ.

Porównując RYGB a interwencję dietetyczną, negatywny efekt tj. obniżenie poziomu PUFA n-3, zaobserwowano tylko u pacjentów po interwencji chirurgicznej [164]. Podobny wynik uzyskali Lin i wsp. [248], porównując pacjentów po LSG do pacjentów, u których redukcja masy indukowana była zmianami stylu życia. Implikacją powyższych obserwacji jest możliwość poprawienia stanu metabolicznego pacjentów bariatrycznych poprzez suplementację niezbędnych PUFA bądź modyfikację diety. Obecnie zalecenia żywieniowe po operacjach bariatrycznych nie obejmują suplementacji PUFA [50,250].

Wyniki uzyskane w ramach niniejszej rozprawy pokazują, że wskutek operacji OAGB w niedługim przedziale czasowym po zabiegu następuje obniżenie poziomów FA, których źródłem jest dieta. Wprawdzie nie wiadomo czy krótkotrwałe, przejściowe niedobory FA mogą negatywnie wpływać na zdrowie pacjentów długoterminowo, jednak postulowane efekty fizjologiczne OCFA oraz PUFA n-3 wydają się być zgodne z celami chirurgicznego leczenia otyłości tj. poprawienie homeostazy glukozy i insuliny [87,105], poprawa stanu zapalnego [251] lub poprawa lipidogramu [252]. Obecnie brak badań na temat skutków suplementacji i niedoborów OCFA. W randomizowanych badaniach klinicznych oceniano dotychczas konsekwencje suplementacji PUFA n-3 jako elementu przygotowania do zabiegu bariatrycznego, jednak niewielka liczba badań i zróżnicowanie długości suplementacji oraz składu suplementów, nie pozwala wyciągać jednoznacznych wniosków [253]. Pradelli

i wsp. [254] przeprowadzili metaanalizę wyników badań suplementacji PUFA n-3 wśród pacjentów chirurgicznych, w której korzystnym efektem było zmniejszenie częstości infekcji i pobytu długości w szpitalu, obniżenie stężenia markerów stanu zapalnego i poprawa funkcji wątroby. Pozwala to przypuszczać podobnie obiecujące efekty suplementacji PUFA n-3 wśród pacjentów bariatrycznych i wskazuje na potrzebę dalszego prowadzenia badań w tym zakresie.

6.1.2 BRAK NORMALIZACJI PROFILU KWASÓW TŁUSZCZOWYCH 6-9 MIESIĘCY PO OAGB

Homeostaza lipidów rozumiana jest jako równowaga pomiędzy procesami regulującymi stężenia lipidów, ich syntezą i degradacją, lokalizacją i transportem, a jej zachwianie skutkuje zaburzeniami metabolicznymi. Wielotorowa ocena efektów metabolicznych leczenia OAGB uwidoczniała wcześniej pozytywne zmiany zachodzące po operacji w stężeniach krążących kwasów żółciowych [159] i profilach aminokwasów [181]. Pytaniem badawczym, na które starano się odpowiedzieć w niniejszej pracy było, czy po 6-9 miesiącach od OAGB, przywrócona zostanie równowaga lipidowa i, czy podobnie jak profil aminokwasów, profil FA w surowicy będzie ulegał normalizacji.

Stworzony model PCA (**Rysunek 5.14**) pozwolił stwierdzić, że zaburzenia profilu krążących FA nie wracają do normy. Do podobnych wniosków doszli Sharma i wsp. [170], którzy zauważyli, że profil FA po 3 latach od LSG jest wciąż podobny do tego obserwowanego w surowicy pacjentów z MO. Luo i wsp. [165] w analizie PCA na podstawie profilu metabolitów we krwi nie osiągnęli rozdzielienia pacjentów przed i 6 miesięcy po RYGB. Nieprawidłowości w stężeniach krążących FA wykryto również w pierwszym roku po leczeniu LSG i BPDDS [169]. Jednocześnie, po leczeniu bariatrycznym OAGB obserwowano szereg potencjalnie pozytywnych dla zdrowia zmian w poziomach bioaktywnych FA. Oprócz wspomnianego w **sekcji 6.1.3** podniesienia poziomu BCFA, w punkcie FU2 obserwowano zwiększenie zawartości OCFA w surowicy (**Rysunek 5.8**). Umacnia to przypuszczenie, że deficyty OCFA w pierwszych tygodniach po OAGB są krótkotrwałe.

Leczenie OAGB nie zwiększało poziomu całkowitych PUFA w surowicy pacjentów. W punkcie FU2 zawartość PUFA n-6 była nadal obniżona w porównaniu z grupą kontrolną, natomiast zawartość PUFA n-3 była jeszcze niższa niż przed operacją (**Rysunek 5.5**). Więcej zmian dotyczących poszczególnych PUFA, zaobserwowano w punkcie FU1 (**Tabela 5.5**), co pozwoliło podejrzewać, że normalizacja poziomów PUFA jest procesem powolnym i może

nastąpić po dłuższym czasie niż 6-9 miesięcy [201]. W przeprowadzonym w 2022 r. przeglądzie systematycznym dotyczącym wpływu leczenia bariatrycznego na PUFA, Middleton i wsp. [247] również zwrócili uwagę na przejściowy charakter niedoborów PUFA. W pierwszym roku po operacji bariatrycznej najczęściej obserwowana jest obniżona zawartość niezbędnych LA [125,169,248,255] i ALA [125,169,235,248], oraz EPA [125,163,169,235]. Między 6-9 miesiącami po OAGB, zawartości wszystkich z wyżej wymienionych FA powracały do wartości przed operacyjnych (punkt pre-OAGB) (**Tabela 5.5**), mimo początkowo obserwowanego obniżenia ich zawartości w punkcie FU1 (**Tabela 5.4**), ale nie osiągały wartości obserwowanych w grupie zdrowych osób z prawidłowym BMI. Jednak poziom przeciwzapalnego DHA [256], pomimo normalizowania się poziomu jego prekursorów pozostawał obniżony, co może świadczyć o upośledzeniu konwersji w grupie PUFA n-3. Pozytywnym efektem obserwowanym w punkcie FU2 było obniżenie zawartości prekursora wielu prozapalnych oksylipin – ARA (**Tabela 5.5**), co w połączeniu z niższym stężeniem CRP (**Tabela 5.2**), sugeruje poprawę stanu zapalnego wśród pacjentów. Jak zauważają Middleton i wsp. [247], wpływ leczenia bariatrycznego na zawartość ARA jest różny w zależności od przeprowadzonego zabiegu, obserwowano dotychczas zarówno obniżenie (po LSG i BPDDS), jak i podniesienie zawartości ARA (po AGB i BPDDS). Możliwe jest, że obniżenie ARA po OAGB jest zaletą tego typu zabiegu w porównaniu z innymi operacjami bariatrycznym, np. RYGB [163,257]. Potwierdzenie tej hipotezy wymagałoby jednak bezpośredniego porównania różnych zabiegów wykonywanych na tej samej populacji, ze względu na globalną, heterogenność profilu FA [258].

Co ciekawe, kwasem, którego poziom był podwyższony w punkcie FU2 po OAGB był DGLA. Ni i wsp. [125] zauważyli, że wysokie stężenie DGLA było związane z nawrotami T2DM i rozwijaniem się zespołu metabolicznego u pacjentów bariatrycznych. Stężenie DGLA wykazuje pozytywną korelację z markerem insulinooporności – peptydu C [259] i markerem stanu zapalnego – IL-6 [260]. Wiadomo jednak, że DGLA jest prekursorem do syntezy przeciwzapalnych oksylipin [113], zatem możliwe, że korelacja DGLA z zapaleniem jest spowodowana upośledzeniem syntezy oksylipin z tego kwasu. Bez wątpienia, związek profilu FA i ryzyka pojawienia się chorób metabolicznych u pacjentów z MO leczonych OAGB jest interesującym tematem do podjęcia w przyszłości.

W leczeniu bariatrycznym otyłości, pacjentom rekomenduje się suplementację niektórych witamin i mikrośladników (witaminy A, B₁₂, kwas foliowy) w celu uzupełnienia niedoborów, które mogą pojawić się wskutek zmniejszonego wchłaniania tych substancji z diety

[54]. Pooperacyjnie monitorowane są również niedobory białka, jednak brak jest specyficznych wytycznych dotyczących PUFA [50,54]. Przedstawiane w niniejszej pracy wyniki oraz badania zebrane przez Middleton i wsp. [247] wskazują na zmiany w profilach PUFA przez pierwszy rok po operacji. Nie wiadomo czy i w jakim stopniu trwające przez ten czas niedobory takich kwasów jak DHA, EPA, LA i ALA mogą wpływać negatywnie na zdrowie pacjentów po OAGB. Istnieją jednak dowody na to, że suplementacja PUFA n-3 wywołuje efekty pożądane w kontekście operacji bariatrycznych np. DHA tłumi prozapalną sygnalizację [256], a PUFA n-3 pomagają w zapobieganiu i leczeniu utraty masy mięśniowej [261]. Powyższe informacje jasno wskazują na potrzebę dalszych badań nad możliwymi zaletami suplementacji PUFA w diecie osób po OAGB.

6.1.3 METABOLIZM ROZGAŁĘZIONYCH KWASÓW TŁUSZCZOWYCH

Po operacji OAGB ilość BCFA w surowicy pacjentów bariatrycznych wykazuje tendencję wzrostową w punkcie FU1, ulegając niemalże podwojeniu w punkcie FU2 (**Rysunek 5.8**). Zaobserwowane w tych oraz we wcześniejszych badaniach [89] badaniach, braki BCFA u pacjentów z MO korelowały odwrotnie z parametrami wskazującymi na zaburzenia metaboliczne – BMI, stężeniem TAG i wskaźnikiem insulinooporności HOMA-IR (**Rysunek 5.9**). Negatywne korelacje obserwowane były również pomiędzy zawartością całkowitych *izo* BCFA a stężeniem CRP i 18:1/18:0 DI w surowicy [89] oraz pomiędzy szacowanym spożyciem *izo* BCFA z nabiału i wskaźnikami ryzyka insulinooporności [262]. W opublikowanej w 2018 r. przełomowej pracy Wallace i wsp. [84] udowodnili, że BCFA w organizmie ludzkim pochodzą nie tylko z diety, ale powstają również w wyniku katabolizmu BCAA – waliny, leucyny i izoleucyny. Uważa się, że podwyższone stężenie BCAA w organizmie sprzyja rozwijaniu się insulinooporności poprzez mechanizm zależny od nadmiaru lipidów [43]. Dane płynące z badań metabolicznych wskazują, że operacje bariatryczne mają istotny wpływ na stężenia krążących aminokwasów [160,162,236,263], przy czym RYGB, zabieg najbardziej podobny do OAGB, powoduje zazwyczaj obniżenie stężenia BCAA w surowicy pacjentów [160,162,174,263,264]. Powyższe informacje stanowiły inspirację do podjęcia tematu katabolizmu BCAA w kontekście operacji OAGB.

Dzięki współpracy z Katedrą i Zakładem Biochemii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, określone zostały stężenia BCAA w surowicy osób o prawidłowej masie ciała oraz pacjentów z MO (pre-OAGB i FU2) – **Tabela 5.6**. Jak przypuszczano, stężenia BCAA

w surowicy pacjentów były znacznie wyższe niż u zdrowych osób z grupy kontrolnej i wykazywały dodatnią korelację z BMI, stężeniem TAG i HOMA-IR (**Rysunek 5.10**), co odzwierciedla dotychczasowy stan wiedzy [265]. Podobnie jak po RYGB, w surowicy pacjentów po OAGB następowało obniżenie stężenia BCAA (**Rysunek 5.11A**). Po leczeniu OAGB stężenia BCAA malały, a zawartość BCFA w surowicy pacjentów rosła. Przeciwny efekt jaki OAGB miało na te dwie grupy związków, pozwolił przypuszczać, że zaburzony katabolizm BCAA jest prawdopodobnie mechanizmem, który przyczynia się do obniżenia zawartości BCFA u pacjentów z MO. Także dieta przygotowująca do zabiegu OAGB nie miała wpływu na poprawę zawartości BCFA w surowicy (**Tabela uzupełniająca 12.4**). We współpracy z Katedrą i Zakładem Biochemii Farmaceutycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, przeprowadzono analizę poziomu ekspresji mRNA enzymów ścieżki katabolizmu BCAA w tkance tłuszczowej pacjentów z MO i zdrowej grupy kontrolnej. W VAT pacjentów z MO, poziom ekspresji enzymów uczestniczących w katabolizmie BCAA (przedstawionym schematycznie na **Rysunek 2.7**) tzn. BCKDHB, BCAT1 i BCAT2, był znacznie niższy niż u osób o prawidłowej masie ciała (**Rysunek 5.11E**). Nie zaobserwowano różnic w poziomie ekspresji wymienionych enzymów w SAT pacjentów i kontroli (**Tabela uzupełniająca 12.6**), podobnie jak w innych badaniach [266,267], jednak odwrotnie do badań Pietiläinen i wsp. [268], którzy stwierdzili, że również w SAT można zaobserwować zaburzenia ekspresji enzymów katabolizmu BCAA. Uzyskane w toku przedłożonej pracy wyniki sugerują, że to katabolizm BCAA VAT może przyczyniać się do obserwowanych pomiędzy pacjentami z MO a osobami o prawidłowej masie ciała różnic w zawartości BCFA. W badaniach wykonywanych w ramach pracy doktorskiej nie pobierano biopsji tkanek tłuszczowych od pacjentów po przeprowadzonym zabiegu bariatrycznym, co nie pozwala jednoznacznie stwierdzić, że efektem zabiegu OAGB jest wzrost syntezy BCFA z produktów katabolizmu BCAA. Niemniej jednak, w ostatnich badaniach dotyczących RYGB obserwowano zarówno wyższą ekspresję BCKDH oraz BCAT w tkance tłuszczowej pacjentów po ponad 1,5 roku po zabiegu bariatrycznym [269], jak i ekspresji FAS [174]. Z drugiej strony, dostępne informacje wskazują, że leczenie RYGB nie przyczynia się do podwyższenia zawartości BCFA po upływie 8 tygodni od zabiegu [125]. Uzyskane w toku przeprowadzonych badań wyniki pozwalają jednak przypuszczać, że leczenie bariatryczne OAGB może przyczyniać się do podwyższenia zawartości BCFA w organizmie, która przynajmniej częściowo zależy od zachodzącej w VAT syntezy BCFA z prekursorów powstających z BCAA.

Nierozstrzygnięta pozostaje na razie kwestia stopnia w jakim opisywany mechanizm produkcji BCFA reguluje ich homeostazę w organizmie. Eksperymenty w zwierzęcych modelach otyłości wskazują, że zarówno dieta jak i zabiegi bariatryczne wpływają na katabolizm BCAA nie tylko w tkance tłuszczowej, ale również w wątrobie czy jelicie cienkim [144,270]. Możliwe również, że to nie katabolizm, a niewystarczająca inhibicja proteolizy białek, procesu zależnego od insuliny, jest głównym źródłem podwyższonych BCAA w organizmie [271]. Yao i wsp. [236] wskazali na przewagę proteolizy na postawie testu przeprowadzonego u pacjentów po SG za pomocą hiperinsulinemicznej euglikemicznej klamry metabolicznej. Technika ta jest złotym standardem oceny insulinooporności, niemniej, w przedstawianych w niniejszej pracy badaniach, pomimo wyjściowego wyższego stężenia BCAA w podgrupie pacjentów ze zdiagnozowanym T2DM, trendy zmian zarówno BCAA jak i BCFA w punkcie FU2 były identyczne wśród pacjentów z T2DM i bez (**Rysunek uzupełniający 12.3**). Ostatnim, nieporuszonym podczas badań składających się na niniejszą rozprawę, tematem jest możliwy wkład bakterii jelitowych, które, w przeciwieństwie do ssaków, mogą syntezować BCAA *de novo* [271]. Powstające w tym procesie substraty pośrednie mogą być wykorzystywane do syntezy BCFA lub krótkołańcuchowych FA, a równowaga pomiędzy tymi produktami zależy od ilości i rodzajów bakterii, która ulega modyfikacji pod wpływem diety oraz wskutek zabiegów bariatrycznych [271]. W 2022 r. opublikowano pierwsze badania dotyczące wpływu OAGB na skład flory jelitowej, w których 6 miesięcy po operacji liczebność bakterii typu *Firmicutes* istotnie się zmniejszyła [272]. Obecność tych bakterii była negatywnie korelowana z poziomem syntezowanych BCFA w badaniach *in vitro* [271]. Niewątpliwie jest to zagadnienie zasługujące na dalsze badania. Cenniejsze informacje może dostarczyć rozszerzenie badań obserwacyjnych na większą grupę badawczą, w której, oprócz analizy w surowicy i tkankach pacjentów, przeprowadzana byłaby analiza BCAA i BCFA w próbkach kału.

6.2 WPŁYW LECZENIA BARIATRYCZNEGO NA STĘŻENIA KRAŻĄCYCH OKSYLIPIN

Oksylipiny są zaangażowane w regulację stanu zapalnego, funkcji nabłonka, kurczenia naczyń krwionośnych, krzepnięcia krwi, lipolizę, adipogenezę i wydzielanie insuliny [33,108,110], co czyni je interesującym obiektem badań w szeregu chorób związanych z upośledzeniem tychże funkcji. Wiadomo, że na stężenia oksylipin we krwi wpływają

interwencje dietetyczne, takie jak suplementacja PUFA n-3, która bezpośrednio zwiększa poziom prekursorów do syntezy n-3 oksylipin [273]. Okazuje się jednak, że modyfikacje profilu oksylipin obserwowane są również po wprowadzeniu diet, które nie są bezpośrednio ukierunkowane na zmianę poziomów PUFA np. dieta niskokaloryczna i niskotłuszczowa [211] lub dieta wegańska i wegetariańska [274]. Ponadto, mimo niewielkiej ilości przeprowadzonych dotychczas badań, zmiany w profilach oksylipin są obserwowane również po interwencji bariatrycznej RYGB i SG [191,212]. Biorąc pod uwagę regulatorową rolę oksylipin, możliwe jest, że ich działanie przyczynia się do pozytywnych efektów metabolicznych obserwowanych po zabiegach bariatrycznych [49,52,154–156]. Określenie profilu oksylipin przed i po operacji bariatrycznej może zatem pomóc w identyfikacji potencjalnych mechanizmów przyczyniających się do polepszenia stanu metabolicznego. W przeprowadzonych badaniach po raz pierwszy scharakteryzowano profil wybranych niezestryfikowanych oksylipin w surowicy pacjentów z otyłością po leczeniu bariatrycznym zabiegiem OAGB. Większość krążących we krwi oksylipin jest zestryfikowana [273], jednakże uważa się, że właśnie pula niezestryfikowanych oksylipin jest aktywna biologicznie [108], stąd decyzja o oznaczaniu tego typu oksylipin w przeprowadzanych badaniach.

Zastosowana metoda analityczna charakteryzowała się odpowiednią liniowością (**Tabela 5.7**) dokładnością, powtarzalnością i odzyskiem (**Tabela 5.8**) dla 20 z 28 oksylipin. Osiągnięte granice wykrywalności mieściły się w zakresie od 2 do 394 pg (**Tabela 5.7**), co jest zgodne z innymi badaniami, w których stężenia oksylipin oznaczano techniką LC-MS/MS, gdzie analizatorem był potrójny kwadrupol [114]. W badanych próbkach biologicznych wykryto 18 i oznaczono ilościowo 13 analitów (**Tabela uzupełniająca 12.9**). Profil oksylipin we krwi wykazuje dużą zmienność osobniczą, co w przeprowadzonych badaniach zostało uwidocznione podczas analizy PCA (**Rysunek 5.14**) i potwierdza obserwacje z innych źródeł [140,191,192,211–214]. Porównując kierunki zmian zachodzących w profilach oksylipin 6-9 miesięcy po OAGB (FU2) z dostępnymi wynikami na temat różnic w stężeniach krążących oksylipin u pacjentów z otyłością A) przed i po redukcji masy związanej z interwencją bariatryczną, dietetyczną lub dietetyczną z ćwiczeniami fizycznymi; B) w porównaniu do zdrowych osób z grupy kontrolnej (**Tabela 6.1**), można zaobserwować, że zarówno stężenia oksylipin, jak i trend zmiany zależny od BMI, odpowiadają w większości dostępnym danym literaturowym.

Tabela 6.1 Zestawienie stężeń oksylipin we krwi pacjentów z otyłością i kierunku zmiany ich stężenia w przeprowadzonych badaniach z dostępnymi w literaturze stężeniami krążących oksylipin - (A) różnice po redukcji masy; (B) różnice w porównaniu grupą kontrolną

Oksylipina*	Stężenie wyjściowe [nM] (pre-OAGB) i kierunek zmiany (↑↓↔) ^A długoterminowej (FU2)	Stężenie wyjściowe [nM] (przed redukcją masy) i kierunek zmiany (↑↓↔) ^A po redukcji masy				Stężenie [nM] u pacjentów z otyłością i porównanie (↑↓↔) ^B z kontrolami z prawidłowym BMI	
		Osocze pacjentów z otyłością przed i 1 rok po leczeniu bariatrycznym RYGB lub SG [212]	Osocze pacjentów z otyłością przed i 1 rok po RYGB [191]	Surowica pacjentów z otyłością przed i po 2 miesiącach interwencji dietą niskokaloryczną i niskotłuszczową [211]	Osocze insulinoopornych kobiet z otyłością przed i po ~4 miesiącach restrykcji kalorycznej i ćwiczeń fizycznych [213]	Osocze mężczyzn [140]	Osocze pacjentów starszych ** [214]
12-HETE	35,7 ↓ ^{NS}	12,97 ↑	NA	0,810 ↓	42,4 ↓ ^{NS}	11,9 ↓ ^{NS}	~ 0,62 ↑
12-HHT	4,07 ↑	NA	NA	NA	NA	NA	~ 1,7 ↑
13-HODE	17,5 ↔	29,5 ↔	NA	15,1 ↓	NA	10,8 ↑	~ 10 ↔
15d-PGJ2	5,88 ↓	NA	NA	NA	0,106 ↔	NA	NA
15-HETE	1,57 ↔	4,19 ↑	NA	0,800 ↓	2,55 ↔	1,0 ↔	~ 0,62 ↔
15-HETrE	0,455 ↓	NA	NA	NA	0,719 ↓ ^{NS}	0,5 ↓	NA
18-HEPE	1,56 ↓ ^{NS}	0,097 ↓	0,440 ↓ ^{NS}	0,300 ↓	NA	NA	~ 0,43 ↔
20-HETE	2,39 ↔	3,25 ↓	NA	0,520 ↔	NA	0,9 ↓	NA
5-HETE	1,85 ↔	1,1 ↓	NA	0,700 ↔	2,39 ↔	4,5 ↓	~ 1,1 ↔
9(10)-EpOME	2,21 ↔	4,18 ↓	NA	1,00 ↔	11 ↔	24,0 ↔	~ 0,004 ↔
9-HODE	9,29 ↔	40,1 ↔	NA	12,1 ↓	13,9 ↔	13,5 ↑	~ 10 ↔
LTB4	1,09 ↓	NA	0,290 ↓ ^{NS}	NA	NA	0,3 ↔	NA
TXB2	1,23 ↑	0,29 ↑	NA	0,24 ↔	2,05 ↑ ^{NS}	0,3 ↔	~ 0,26 ↑

^A - ↑ podwyższenie po redukcji masy, ↓ obniżenie po redukcji masy, ↔ brak zmiany; ^B - ↑ wyższe stężenie w grupie kontrolnej, ↓ niższe stężenie w grupie kontrolnej, ↔ brak różnic; * - uwzględniono oksylipiny, których stężenie pre-OAGB oznaczono ilościowo w wykonywanych badaniach i co najmniej jednym źródle; ** - wartości w nM na podstawie własnych obliczeń; **NA** - stężenie nie było analizowane; ^{NS} - brak istotności statystycznej; **RYGB** - ominięcie żołądkowo-jelitowe na pętli Roux-en-Y ; **SG** - resekcja żołądka; nazwy oksylipin za Tabelą 1.2; tabela własna na podstawie źródeł [140,191,211-214].

Wyjątkiem są 15d-PGJ2 i PGE2, których stężenia były wyższe niż obserwowane w przytaczanych badaniach. 15d-PGJ2 jest agonistą PPAR γ , obserwowanym *in vivo* w fazie wygaszania stanu zapalnego [275]. W obecnych badaniach, jego stężenie przekraczało granicę oznaczalności jedynie w surowicy kilku pacjentów w punkcie pre-OAGB (w przeciwieństwie do FU1 i FU2, gdzie 15d-PGJ2 nie przekraczał granicy oznaczalności), więc relatywnie wysokie średnie stężenie tej oksylipiny przypuszczalnie jest wynikiem stanu zapalnego u tychże pacjentów i może nie odzwierciedlać wartości populacyjnych. Podwyższone stężenie PGE2 było wcześniej obserwowane w otyłości, gdzie odgrywa ono ważną rolę jako mediator stanu zapalnego oraz jako czynnik stymulujący wydzielanie leptyny przez tkankę tłuszczową [276].

W przeprowadzonych badaniach stężenie 15-HETrE było silnie, pozytywnie skorelowane z BMI, co potwierdza wyniki poprzednich analiz zależności stężenia oksylipin we krwi i wskaźników otyłości (BMI, WHR, masa VAT) [140,277]. Jurado-Fasoli i wsp. [277] postulują, że panel oksylipin, w którego skład wchodzi 15-HETrE może być lepszym predyktorem otyłości niż tradycyjne markery chronicznego stanu zapalnego. Rzeczywiście, zaobserwowana korelacja stężenia 15-HETrE z BMI ($r = 0,526$, $p = 0,008$) jest silniejsza niż korelacja pomiędzy BMI i CRP [278], jednakże należałoby potwierdzić ten wynik w większej grupie badawczej.

Globalne spojrzenie na stężenia oksylipin sugeruje prozapalny profil w surowicy pacjentów z otyłością przed operacją bariatryczną. Oprócz wspomnianych prostaglandyn, pacjenci wykazują stosunkowo wysokie stężenia hydroksylowanych metabolitów ARA (**Tabela 6.1**: oksylipiny 5-, 12-, i 20-HETE). Podwyższony poziom tych oksylipin jest obserwowany w schorzeniach charakteryzujących się zapaleniem [110,124,140], a *in vitro* stymulują one degranulację i chemotaksję neutrofilii, promują proliferację komórek rakowych oraz wzmagają uwalnianie prozapalnych cytokin [108]. Rozważając wpływ leczenia OAGB na poziom analizowanych, krążących we krwi oksylipin zauważono, że zmiany stężeń większości oksylipin odzwierciedlały zmiany zawartości odpowiadających im prekursorów FA (**Rysunek 5.13**). Jednakże stężenie to niekoniecznie korelowało w sposób istotny statystycznie z zawartością prekursora (**Tabela uzupełniająca 12.10**), co zaobserwował również Schuchardt i wsp. [279]. Brak silnych korelacji pomiędzy poszczególnymi FA i ich metabolitami w surowicy wskazuje na potrzebę bezpośredniej analizy oksylipin w materiale biologicznym. W punkcie FU1 istotnie podwyższone, w porównaniu z pre-OAGB, było stężenie 5- oraz 20-HETE. Podwyższone stężenie 5-HETE było wcześniej odnotowane w surowicy pacjentów

bezpośrednio po operacjach resekcji jelita [280] i kardiochirurgicznych [281]. Oksylipina ta powstaje w wyniku aktywności 5-LOX, której wzmożona ekspresja była obserwowana w VAT pacjentów otyłych [152]. Aktywność tego enzymu jest istotna w stanach chronicznego oraz ostrego zapalenia [282], zatem wysokie stężenie 5-HETE może być objawem krótkoterminowej eskalacji zapalenia wywołanej interwencją chirurgiczną, które zanika po dłuższym czasie [283]. Wraz z podniesionym poziomem 5-HETE można było zaobserwować w punkcie FU1 tendencję do wyższego stężenia LTB₄, oksylipiny, w której syntezę również zaangażowany jest enzym 5-LOX. Pośredni produkt oksydacji ARA przez 5-LOX może ulegać przemianie do 5-HETE lub prekursora do produkcji leukotrienów - LTA₄ (**Rysunek 2.9**, [282]). Warto również zauważyć, że po OAGB następowało podwyższenie stężenia 12-HHT, silnego liganda receptora 2 LTB₄ (**BLTR2**, ang. *leukotriene B4 receptor 2*). Istnieją dowody na zaangażowanie osi 12-HHT/BLTR2 w procesy regeneracji i naprawy nabłonka jelit [284], stąd można przypuszczać, że wzrost stężenia 12-HHT po operacji ma efekt protekcyjny. Analogiczną przyczynę, tj. bezpośredni efekt operacji, może również mieć zaobserwowane w punkcie FU1 wysokie stężenie 20-HETE, które podobnie jak 5-HETE, powraca do wartości pre-OAGB. Zwiększona produkcja 20-HETE jest związana z dysfunkcją śródbłonna [285], którą, jak wskazuje Ekeloef i wsp. [286], mogą wywołać nawet drobne operacje jamy brzusznej. Niektóre HETE (5- i 12-) są również czynnikami aktywującymi chemotaksję neutrofilii, których aktywność jest zasadnicza w procesie gojenia ran [108]. Jednak w przeciwieństwie do 5-HETE, stężenie 12-HETE nie różniło się istotnie pomiędzy pre-OAGB a FU1. Wcześniej, wzrost zawartości 12-HETE we krwi obserwowano dzień [281] i 4 dni [280] po operacji, co może sugerować, że stężenie poszczególnych HETE zmienia się w zależności od upływu czasu od wykonanej operacji.

Kolejną grupą metabolitów FA, na której stężenie miało wpływ leczenie bariatryczne, były oksylipiny zaangażowane w procesy regulujące funkcję śródbłonna naczyń krwionośnych oraz krzepnięcia krwi tj. TXB₂, 15d-PGJ₂ i HODE. TXB₂ jest stabilnym produktem przemiany ważnego aktywatora agregacji trombocytów – TXA₂ [192], zatem zaobserwowany wzrost stężenia TXB₂ w punkcie FU1 jest najprawdopodobniej spowodowany zachodzącymi jeszcze procesami gojenia przewodu pokarmowego. W kontekście otyłości płytki krwi są istotne z uwagi na funkcję miażdżycogeną. Graziani i wsp. [287] zaobserwowała, że pacjenci z MO, u których nie wykształciła się insulinooporność, charakteryzują się paradoksalnie niskim, w porównaniu do pacjentów z prawidłowym BMI lub z otyłością niższego stopnia, stężeniem TXB₂ we krwi. 15d-PGJ₂ jest czynnikiem hamującym angiogenezę [109], więc

zaobserwowane obniżenie jego poziomu w punkcie FU1 było spodziewane. W przeprowadzanych badaniach w punkcie FU1 zaobserwowano tendencję do niższe niż przed operacją stężenia metabolitów LA – 9-HODE i 9(10)-EpOME i podobnego stężenia 13-HODE. Oksylipiny syntezowane z LA są zaangażowane w regulację wzrostu i zwężania naczyń krwionośnych [109]. Antytrombotyczne właściwości 13-HODE były wcześniej zademonstrowane w ludzkich komórkach śródbłonna [109], zaobserwowana tendencja do obniżonego stężenia tej oksylipiny w punkcie FU1 jest spójna z tą aktywnością i z wynikami otrzymanymi przez Wolfera i wsp. [280], którzy badali krótkoterminowe zmiany oksylipin po operacjach laparoskopowych jelit.

W przeprowadzonych badaniach, grupą oksylipin, których zmian nie udało się zaobserwować, ponieważ nie osiągnięto wystarczających granic wykrywalności, były SPM – rezolwiny, marezyny, protektyny. W porównaniu z innymi oksylipinami, zdolność komórek do produkcji SPM w organizmie jest niewielka, czego wynikiem są niskie, rzędu pikomoli, stężenia tych związków w tkankach i biofluidach [115]. Mając na uwadze, że niektóre SPM były wcześniej wykryte w surowicy osób otyłych [191], przed przystąpieniem do analizy stężeń SPM domniemywano, że mogą się one zmieniać w punkcie FU1 ze względu na zachodzące procesy gojenia i wygaszania zapalenia. Niestety, nie udało się potwierdzić tego przypuszczenia. W opublikowanym w 2022 r. podsumowaniu bieżącego stanu wiedzy na temat SPM, Shebb i wsp. [115] zwrócili uwagę, że nawet przy zastosowaniu bardzo czułych metod i optymalnych warunków (np. suplementacja PUFA n-3), niektóre grupy badawcze nie wykryły SPM w próbkach biologicznych. W obliczu tych niekompatybilnych wyników, Shebb i wsp. [115] krytykują stosowane metody analityczne. Jednakże należy wspomnieć, że na profil oksylipin wpływa bardzo wiele czynników, takich jak płeć, wiek, przyjmowane leki i dieta, czy nawet rytm dobowy [192], które mogą się przyczyniać do rozbieżności wyników analiz SPM.

Profil oksylipin, podobnie jak profil FA, został wykorzystany do skonstruowania modelu PCA, służącego do jakościowej oceny zmian zachodzących w wyniku leczenia bariatrycznego. W przeciwieństwie do profilu FA (**Rysunek uzupełniający 12.2**), profil oksylipin w surowicy pacjentów po OAGB pozwalały na różnicowanie poszczególnych punktów czasowych, szczególnie FU2 i w mniejszym stopniu FU1 (**Rysunek 5.14**). Możliwość odróżniania pacjentów przed i po operacją bariatryczną obserwowała również López [212], w której badaniach po roku od operacji, pacjenci bariatryczni wykazywali zmieniony profil oksylipin, niezależny od chorób towarzyszących. Porównanie wyników obecnych badań

WGLĄD W POTENCJALNĄ ROLE KWAŚÓW TŁUSZCZÓWYCH W ROZWIJANIU SIĘ POWIKŁAŃ OTYŁÓŚCI UZYSKANY W MODELU ZWIERZĘCYM

z wynikami López nie pozwala na wyciągnięcie wniosków na temat różnic pomiędzy efektami różnych typów zabiegu bariatrycznego, ze względu na inne badane punkty czasowe.

Podsumowując, celem tego badania było opracowanie metody oznaczania oksylipin w surowicy i wykorzystanie jej do określenia wpływu OAGB na ich stężenia. Zastosowana metoda analityczna charakteryzowała się satysfakcjonującymi parametrami walidacyjnymi i pozwoliła wskazać FU2, czyli powyżej pół roku po operacji OAGB, jako punkt czasowy, w którym profil pacjentów leczonych bariatrycznie był silniej zmieniony. Wskazano również jakich oksylipin dotyczą te zmiany. Były nimi w szczególności pochodne ARA – HETE oraz oksylipiny zaangażowane w regulację funkcji śródbłónka. W wykonanych badaniach, ze względu na niewielką grupę pacjentów zdecydowano się nie rozdzielać w analizie RM ANOVA pacjentów z i bez T2DM. Pomimo, że López [212] nie wykryła wpływu T2DM ani stłuszczenia wątroby na stężenie analizowanych przez siebie oksylipin, już Schulte i wsp. [191] wskazali, że różnice w poziomach niektórych przeciwzapalnych oksylipin mogą być związane z ustępowaniem T2DM w wyniku operacji RYGB. Zatem interesującą ścieżką byłoby rozszerzenie grupy badawczej o pacjentów bez i z chorobami towarzyszącymi, a także o grupę kontrolną zdrowych osób z prawidłową masą ciała. Wartościową informacją byłaby również jednoczesna ocena poziomu ekspresji lub aktywności enzymów metabolizujących FA do oksylipin. Niemniej, badania przeprowadzone w ramach doktoratu i pozostałe dostępne dane literaturowe wskazują na potencjał jaki analiza oksylipin może mieć w monitorowaniu skutków zabiegów operacyjnych [280,281] i leczenia bariatrycznego [191,212].

6.3 WGLĄD W POTENCJALNĄ ROLE KWAŚÓW TŁUSZCZÓWYCH W ROZWIJANIU SIĘ POWIKŁAŃ OTYŁÓŚCI UZYSKANY W MODELU ZWIERZĘCYM

Suleiman i wsp. [182] w swojej pracy przeglądowej dotyczącej badań nad otyłością w modelach zwierzęcych podkreślają problem jakim jest standaryzacja badań, których otyłość wywoływana jest dietą. Niestety, znaczna część opublikowanych badań, nie obejmuje analizy zawartości FA w stosowanych paszach [223,224,288–294], co utrudnia jednoznaczne określenie roli profilu FA w diecie. Warto podkreślić, że zastosowanie techniki GC-MS pozwoliło na dokładne określenie profilu FA pasz SD i HFD (**Tabela uzupełniająca 12.15**), podczas, gdy informacje od producentów często obejmują tylko niektóre FA, przykładowo dla

WGLĄD W POTENCJALNĄ ROLE KWAŚÓW TŁUSZCZÓWYCH W ROZWIJANIU SIĘ POWIKŁAŃ OTYŁOŚCI UZYSKANY W MODELU ZWIERZĘCYM

Altromin C 1090-60 ulotka określa jedynie stężenia 16:0, 18:0, 20:0, 18:1, 20:1, ALA i LA [295]. Toteż, uwzględnienie pełnego profilu FA, pozwala na potencjalnie bardziej przekonujące wnioski dotyczące relacji pomiędzy dietą, otyłością i konsekwencjami zdrowotnymi.

6.3.1 IMPLIKACJE OBNIŻENIA ZAWARTOŚCI KWASU EIKOZAPENTAENOWEGO W POLARNYCH LIPIDACH MÓZGU WSKUTEK OTYŁOŚCI WYWOŁANEJ DIETĄ WYSOKOTŁUSZCZOWĄ

Otyłość przyczynia się do pogorszenia kondycji intelektualnej oraz zaburzeń nastroju. Wysoki wskaźnik BMI jest czynnikiem predyktywnym pogorszenia się funkcji poznawczych i demencji [28], zaburzeń lękowych i depresji [227]. Mózgi osób cierpiących na otyłość różnią się od mózgów osób zdrowych pod względem anatomicznym oraz funkcjonalnym [32], a etiologia zaburzeń funkcjonowania mózgu jest wieloaspektowa. Pośród proponowanych mechanizmów uszkodzeń znajdują się konsekwencje współwystępujących z otyłością przypadłości takich jak cukrzyca, CVD, miażdżyca, zespół metaboliczny. Hiperglikemia i zaburzona sygnalizacja insuliny są wskazywane jako potencjalne przyczyny neurodegeneracji obserwowanej w demencji i chorobie Alzheimera [28,32]. Upośledzenie zaopatrzenia mózgu w składniki odżywcze wskutek uszkodzenia naczyń krwionośnych w mózgu, wywołane nadciśnieniem lub zatorowością, prowadzi z kolei do otępienia naczyniopochodnego [32]. Niemniej, ważnym elementem prowadzącym do pogorszenia funkcji mózgowych są podwyższone stężenia we krwi prozapalnych cytokin, uwalnianych przez przerośniętą tkankę tłuszczową. Długotrwała ekspozycja na czynniki zapalne uszkadza barierę krew-mózg, skutkując degeneracją i zaburzeniem sygnalizacji neuronowej. Niezaprzeczalna jest również zasadnicza rola prawidłowego metabolizmu lipidów w zachowaniu poprawnej fizjologii neuronów i komórek gleju [67,104,220,296]. Podjęta w niniejszej pracy eksploracja profilu FA w mózгах uzyskanych w mysim modelu otyłości była, w obliczu wspomnianych zależności pomiędzy otyłością a funkcjami kognitywnymi, próbą odpowiedzi na pytanie, czy i w jaki sposób otyłość wywołana dietą wysokotłuszczową wpływa na zmiany profilu FA w mózgu oraz jakie mogą być potencjalne implikacje tych zmian. Z kolei wykorzystanie techniki SPE

WGLĄD W POTENCJALNĄ ROLE Kwasów TŁUSZCZOWYCH W ROZWIJANIU SIĘ POWIKŁAŃ OTYŁOŚCI UZYSKANY W MODELU ZWIERZĘCYM

umożliwiło stwierdzenie jakie zmiany następują w profilach FA w wybranych grupach lipidowych.

Zawartość w ekstrakcie lipidowym mózgu poszczególnych grup lipidów (**Rysunek 5.17**) była zgodna z oczekiwaniami, ogólnie dominujące były PHL [219], natomiast wśród sfingolipidów największy udział miały SM i GSPL [220]. Proporcje poszczególnych frakcji różniły się również pomiędzy grupami HFD i SD, jednakże należy zauważyć, że udział poszczególnych grup lipidów jest niejednorodny, zależy od rejonu mózgu, typu komórki (glejowa czy nerwowa) [220,297–299]. W obecnych badaniach lipidy ekstrahowano z całego mózgowia, wobec czego wnioski jakie można wyciągnąć z proporcji poszczególnych frakcji są ograniczone.

Najbardziej znaczącym wynikiem uzyskanym w wyniku analizy profilu FA całkowitych ekstraktów lipidowych była istotnie niższa zawartość EPA w ekstraktach lipidowych z mózgowi myszy HFD (**Rysunek 5.16**). Obniżenie obserwowane było szczególnie we frakcjach lipidów polarnych (PHL – **Tabela 5.9**; Cer, GSPL, SM – **Tabela 5.10**), które zaangażowane są w budowę i funkcjonowanie błon komórkowych, oraz stanowią rezerwuar PUFA do produkcji oksylipin [67,102,220]. Losy poszczególnych PUFA w mózgu różnią się. O ile DHA i ARA są w dużej mierze estryfikowane, czego skutkiem jest ich bardzo wysoki udział w puli FA całkowitych lipidów (**Tabela uzupełniająca 12.12**), o tyle inne PUFA kierowane są głównie do szlaku β -oksydacji [300]. Przeznaczanie niezbędnych LA i ALA do procesów energetycznych i ograniczona zdolność do syntezy długołańcuchowych PUFA *in situ*, sprawia, że w celu utrzymania prawidłowej zawartości PUFA, mózg polega na PUFA pobieranych z krwi [300]. Oznacza to, że istotną rolę odgrywać mogą następujące procesy **i**) podaż poszczególnych PUFA w diecie oraz **ii**) przemiany PUFA w tkankach lipogennych. Pasza użyta do indukowania otyłości w przeprowadzonych badaniach zawierała większe stężenie EPA i DHA niż pasza SD (**Tabela uzupełniająca 12.15**), co sugerowało, że na mniejsze stężenie EPA w ekstraktach lipidowych myszy HFD wpływ ma głównie drugi ze wspomnianych mechanizmów.. Zwiększona wątrobowa aktywność $\Delta 6D$, katalizującej reakcje desaturacji 18-węglowych PUFA, została zaobserwowana u osób cierpiących na otyłość oraz myszy karmionych HFD [101]. Warto nadmienić, że podwyższona aktywność tej desaturazy koreluje pozytywnie z T2DM i CVD [101]. W prowadzonych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej badaniach, aktywność enzymów na szlaku przemian długołańcuchowych PUFA była oceniana tylko na podstawie indeksów aktywności – ilorazów zawartości FA będącego produktem do prekursora (DGLA/LA). W wątrobie, która jest główną

WGLĄD W POTENCJALNĄ ROLE KWAŚÓW TŁUSZCZÓWYCH W ROZWIJANIU SIĘ POWIKŁAŃ OTYŁOŚCI UZYSKANY W MODELU ZWIERZĘCYM

lipogenną tkanką myszy [83], indeks aktywności $\Delta 6D$ był istotnie podwyższony u myszy HFD (**Tabela uzupełniająca 12.11**). Możliwe, że do wyższych stężeń większości krążących PUFA w surowicy myszy HFD przyczynia się właśnie podwyższona aktywność $\Delta 6D$. Efekt tej aktywności, mimo większego powinowactwa enzymu do ALA [101], może nie powodować zwiększenia ilości EPA we krwi, ze względu na wielokrotnie większą zawartość LA w paszy, który konkuruje z ALA o miejsce aktywne $\Delta 6D$ [219]. Wiadomo również, że stężenie EPA w większym stopniu jest zależne od syntezy z ALA, natomiast na ilość DHA w organizmie silniej wpływa dieta [301], co może tłumaczyć brak, zauważonej w innych badaniach, obniżonej zawartości DHA w mózgu, gdy myszom podawana była dieta wzbogacona w LA [302], lub dieta HFD, w której skład nie wchodził DHA [303]. Nie można jednak wykluczyć innych mechanizmów zużywania EPA w organizmie.

Interesującym aspektem jest również zaobserwowana podwyższona zawartość EPA w niezestryfikowanej frakcji FFA ekstraktów mózgowych w grupie HFD (**Tabela 5.13**). Sugeruje to, że EPA w mózgu jest substratem łatwo dostępnym dla enzymów metabolizujących FA. Potencjalnymi szlakami metabolicznymi przemian EPA są β -oksydacja oraz synteza eikozanoidów, natomiast, jak wynika z serii eksperymentów prowadzonych w grupie R. Bazineta [300], EPA jest w nikłym stopniu reestryfikowany w PHL. Dotychczas w badaniach wykorzystujących modele gryzoni do oceny wpływu diety bogatej w LA na stężenie oksylipin w mózgu, obserwowano niższe stężenia oksylipin syntezowanych z EPA [302,304,305], co wskazywałoby na utylizację EPA w procesach energetycznych. Warto jednak nadmienić, że w wymienionych badaniach analizowana były wolne oksylipiny, natomiast zdecydowana większość oksylipin w mózgu jest zestryfikowana do PHL i NL [306], a poziom zestryfikowanych oksylipin powstających z EPA jest również negatywnie związany ze stężeniem LA w diecie [307]. Proces syntezy estryfikowanych oksylipin nie jest do końca wyjaśniony, mogą być one syntezowane z FFA, a następnie reestryfikowane lub syntezowane bezpośrednio z PUFA związanych w PHL i NL [308]. Jeżeli druga z tych ścieżek jest preferowana, obniżenie zawartości EPA, które zaobserwowano w lipidach błonowych (**Tabele 5.9 i 5.10**, tym silniej może przyczyniać się do zmniejszonego stężenia metabolitów EPA.

Dokładne mechanizmy przyczyniające się do neuroprotektoryjnych właściwości PUFA n-3 nie zostały jeszcze wyjaśnione. Kwasy te mogą modulować sygnalizację synaptyczną, wpływać na plastyczność neuronów i synaps, chronić mózg przed negatywnymi skutkami procesów zapalnych i stresu oksydacyjnego [297,298]. Istnieją również dowody na odmienne

WGLĄD W POTENCJALNĄ ROLE KWAŚÓW TŁUSZCZOWYCH W ROZWIJANIU SIĘ POWIKŁAŃ OTYŁOŚCI UZYSKANY W MODELU ZWIERZĘCYM

efekty działania EPA i DHA. Suplementacji EPA przypisywane jest polepszenie funkcji poznawczych [103] i pozytywne efekty w leczeniu depresji [309]. Bez wątplenia istotne znaczenie ma również proporcja EPA do DHA, efektywność olejów/suplementów stosowanych jako nutraceutyki zależy od dawki, a najlepsze wyniki przynoszą te z przewagą zawartości EPA [104,219,298]. Reasumując, w przeprowadzonych badaniach zaobserwowano znaczne obniżenie zawartości EPA w lipidach mózgowych pod wpływem HFD. Zważywszy na protekcyjne dla działania mózgu właściwości EPA oraz zaobserwowane w podobnym modelu mysiej otyłości, pogorszenie funkcji kognitywnych myszy [310], sugeruje to potencjalnie negatywny wpływ otyłości wywołanej HFD na zdrowie, aczkolwiek rozszerzenie opisywanych badań o eksperymenty oceniające funkcjonowanie poznawcze jest konieczne do definitywnego stwierdzenia ich deterioracji. Należy zaznaczyć, że podczas prowadzonych badań, FA analizowane były w ekstraktach lipidowych z całości mózgu, co nie pozwala określić precyzyjnie czy/jakie obszary mózgu wykazują niedobory EPA. Ponadto, obiektem zainteresowania w pracy nie były też różnice w profilach FA w zależności od płci, która może wpływać na interakcje pomiędzy dietą a stężeniami PUFA w mózgu lub sprawnością poznawczą [299,311]. Rozważna jest więc ostrożność w ekstrapolowaniu wniosków z opisywanych badań do poziomu populacji.

6.3.2 WPŁYW DIETY WYSOKOTŁUSZCZOWEJ NA ZMIANY PROFILU KWAŚÓW TŁUSZCZOWYCH W SERCU

Otyłość jest bezpośrednim czynnikiem ryzyka występowania CVD, w tym szczególnie nadciśnienia, choroby niedokrwiennej, niewydolności lub zawału serca oraz zatorowości płucnej [26,42,154]. Podobnie do mózgu, tkanka mięśnia poprzecznego serca jest zdolna do syntezy FA *de novo*, jednak aktywność enzymów lipogennych jest niewielka [227], co sprawia, że znaczna większość FA w narządzie jest pobierana z krążenia. Opublikowane badania dotyczące żywienia HFD są jednak niejednoznaczne w kwestii stopnia szkodliwości HFD na kondycję serca. Dane płynące z eksperymentów na gryzoniach, w większości wskazują na pogorszenie parametrów pracy serca pod wpływem HFD [223,224,288–291,312]. Aczkolwiek istnieją również doniesienia poddające w wątpliwość, że dieta HFD wywołuje dolegliwości sercowe [292–294], przypisując negatywne zdrowotne konsekwencje kaloryczności, a nie rozkładowi makroskładników [313]. Ocena funkcji serca wykonana dzięki uprzejmości pracowników Katedry i Zakładu Biochemii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, wykazała istotną patologiczną zmianę w sercu tj. zwężenie zastawki aortalnej

WGLĄD W POTENCJALNĄ ROLE KWAŚÓW TŁUSZCZOWYCH W ROZWIJANIU SIĘ POWIKŁAŃ OTYŁOŚCI UZYSKANY W MODELU ZWIERZĘCYM

(**Tabela 5.11**). Kształtowanie się tej wady serca było zaobserwowane w innych modelach otyłości wywołanej HFD [223,291,314], a uprzednio uważano, że była ona wynikiem biernej kalcyfikacji płatków zastawki [291]. Okazuje się jednak, że stenoza aortalna jest aktywnym procesem patologicznym, w którym znaczenie mają czynniki miażdżycorodne, jak otyłość i T2DM, w połączeniu z przewlekłym stanem zapalnym [223,291]. W tym kontekście udział metabolizmu lipidów w wywołane zmiany funkcji serca rozważano pod kątem **i**) nadmiernego gromadzenia tłuszczu w mięśniu sercowym, **ii**) stresu oksydacyjnego oraz **iii**) profilu FA w grupach lipidów pełniących różne role w organizmie.

Znaczenie nadmiaru lipidów w mięśniu sercowym w etiologii zaburzeń funkcji serca nie jest w pełni wyjaśnione [226], niemniej w badaniach u ludzi wysoki poziom krążących w surowicy FFA jest związany ze zwiększonym ryzykiem nagłego zatrzymania krążenia [315], niewydolności serca [316] oraz rosnącym z wiekiem ryzykiem CVD [128]. Podwyższone stężenie FFA zostało potwierdzone dzięki uprzejmości Katedry i Zakładu Biochemii Farmaceutycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (**Tabela 5.12**) i odzwierciedla wyniki uzyskane w modelach indukowanej otyłości u gryzoni [294,317,318]. Serce pobiera zarówno FFA jak i FA pochodzące z TAG w lipoproteinach [226]. Dowodem na akumulację lipidów neutralnych w sercach myszy HFD było podwyższone stężenie TAG w tkance mięśnia sercowego (**Tabela 5.12**), zaobserwowane również przez Tadinadę i wsp. [293]. Akumulacja TAG w tkance mięśnia sercowego jest obserwowana wśród pacjentów z niewydolnością serca i zależy od stopnia otyłości [319]. TAG uważany był niegdyś za bierną cząsteczkę, której zadaniem jest jedynie „przechowywanie” FA. Jednak badania nad mobilizacją TAG w sercu uwiaryściły obraz metabolizmu TAG jako dynamicznego procesu, wpływającego na pobieranie i oksydację FA oraz syntezę bioaktywnych, sygnałowych DAG i Cer, poprzez ciągłą syntezę i degradację TAG [226,320]. Wysokie stężenia TAG mogą być również mechanizmem chroniącym komórki przed toksycznym działaniem FFA [321].

Wykryte w przeprowadzonych badaniach wysokie stężenie FFA w surowicy i TAG w tkance mięśnia sercowego myszy HFD silnie sugeruje zwiększone pobieranie lipidów przez serca otyłych myszy. Zasadne jest zatem pytanie, czy przyczynia się to do zwiększenia intensywności utleniania FA? Badania Cole i wsp. [312] wykazały, że HFD zwiększa zdolność mitochondriów do utleniania FA, jednak Shao i wsp. [322] stwierdzili, że zaburzenia tego procesu nie są wystarczające do spowodowania dysfunkcji serca. W ostatnich latach zainteresowanie wzbudziła jednak rola rozpręgnięcia łańcucha oddechowego w regulacji metabolizmu glukozy w mitochondriach [320]. Sugerowanym mechanizmem, dzięki któremu

WGLĄD W POTENCJALNĄ ROLE KWAŚÓW TŁUSZCZÓWYCH W ROZWIJANIU SIĘ POWIKŁAŃ OTYŁOŚCI UZYSKANY W MODELU ZWIERZĘCYM

zintensyfikowany metabolizm mitochondrialny miałby się przyczyniać do procesów patologicznych w sercu, jest stres oksydacyjny. Transport elektronów w łańcuchu oddechowym jest dominującym źródłem ROS, a zastosowanie terapii przeciwutleniaczami ukierunkowanymi na mitochondria przynosi obiecujące efekty w zwierzęcych modelach niewydolności serca i zespołu poreperfuzyjnego [323]. Pośrednim dowodem na brak intensyfikacji mitochondrialnej produkcji ROS w przeprowadzonych badaniach jest niezaobserwowanie różnic w poziomie karboksylacji białek i peroksydacji lipidów (**Tabela 5.12**). Chen i wsp. [324] wykazali podwyższenie stężenia dialdehydu malonowego w sercach myszy po 3 i 6 miesiącach HFD, z drugiej strony, Leger i wsp. [325] stwierdzili zmniejszoną peroksydację lipidów po 11 tygodniach interwencji dietetycznej, co sugeruje dodatkowo wpływ czasu trwania diety na poziom stresu oksydacyjnego. Nie można zatem wykluczyć, że w przeprowadzonych w ramach rozprawy badaniach, niezmienione markery stresu oksydacyjnego – poziom karbonylacji białek, poziom peroksydacji lipidów, są efektem długości trwania eksperymentu.

Wreszcie, istotną rolę w funkcjonowaniu mięśnia sercowego mogą odgrywać zaobserwowane zmiany składu FA w tym narządzie. Częstą informacją dotyczącą wpływu HFD na profil FA w sercu jest zmniejszenie proporcji MUFA [65,318] do SFA w hipertroficznym sercu, której wynikiem jest zwiększenie sztywności błon komórkowych skutkujące zaburzeniami funkcjonowania białek błonowych. Zatem, zaskakującą obserwacją w wykonywanych badaniach była podwyższona zawartość większości PUFA, z wyjątkiem EPA i ALA, w ekstraktach całkowitych lipidów w sercach myszy HFD (**Tabela uzupełniająca 12.13**), a szczególnie w grupach lipidów polarnych (**Tabele 5.13 i 5.14**). ARA i DHA z diety są z łatwością estryfikowane w mitochondrialne PHL w sercu [324,326], co może tłumaczyć zaobserwowane zwiększenie ich zawartości. MUFA są preferowanym substratem do β -oksydacji w sercu [327]. Ponadto, Yamamoto i wsp. zaobserwowali zmniejszenie pod wpływem HFD aktywności SCD-1, enzymu limitującego szybkość syntezy MUFA [65]. Możliwe więc, że akumulacja PUFA w sercu jest wynikiem zmniejszenia zawartości MUFA pod wpływem HFD.

Konsekwencje zwiększonej ilości PUFA, szczególnie we frakcjach lipidów budujących błony, są dwojakie. Duża zawartość PUFA w błonach będzie przyczyniała się do zmian w ich płynności, przepuszczalności i wpłynie na procesy zachodzące z udziałem błon [102]. Z drugiej strony, PUFA związane z błonami są substratami do produkcji oksylipin. Zwiększona zawartość PUFA n-6 w sercu może potencjalnie przyczyniać się do zwiększonej produkcji prozapalnych metabolitów [108,277]. Jednakże nie wszystkie oksylipiny n-6 wykazują

WGLĄD W POTENCJALNĄ ROLE KWAŚÓW TŁUSZCZOWYCH W ROZWIJANIU SIĘ POWIKŁAŃ OTYŁOŚCI UZYSKANY W MODELU ZWIERZĘCYM

działanie prozapalne (**Tabela 4.5**), ponadto, w sercach myszy HFD wykryto również zwiększoną zawartość długołańcuchowych PUFA n-3, które są substratami do produkcji SPM [33,108]. Analiza oksylipin w tkance serca nie była przeprowadzona w ramach rozprawy, wiadomo jednak, że ich stężenie w tkance serca podlega modyfikacjom pod wpływem diety [328]. Kwasem PUFA n-3, którego zawartość w lipidach błonowych malała był EPA (w PHL – **Tabela 5.13**; w Cer i GSPL – **Tabela 5.14**). Efekt ten obserwowany był pomimo znacznie wyższego stężenia EPA w diecie HFD (**Tabela uzupełniająca 12.15**). W badaniach Hary i wsp. [329] ludzie charakteryzujący się zmniejszonym poziomem EPA mieli wyższe ryzyko hospitalizacji z powodu niewydolności serca. Dane z eksperymentów klinicznych wskazują na największy potencjał suplementacji EPA w zmniejszeniu ryzyka CVD [330]. W 2022 r. Murphy i wsp. [331] wskazali aktywność receptora FFA 4 (FFAR4, ang. *free fatty acid receptor 4*) jako potencjalny mechanizm, który tłumaczy kardioprotekcyjne właściwości EPA, mimo braku akumulacji tego kwasu w kardiomiocytach. W modelu zwierzęcym wykazali, że FFAR4 indukuje produkcję przeciwzapalnego 18-HEPE z EPA i tym samym chroni komórki przed negatywnymi skutkami stresu oksydacyjnego oraz zauważyli, że u ludzi z niewydolnością serca ekspresja FFAR4 jest obniżona [331]. Duże znaczenie EPA w modulacji ryzyka kardiometabolicznego podkreślają również eksperymenty Takashimy i wsp. [332], którzy wykazali, że właściwości antymiażdżycowe DHA są znacząco wzmagane przez dodatek EPA. Wyniki uzyskane w ramach niniejszej pracy sugerują, że mimo akumulacji PUFA w sercu, zawartość EPA ulega obniżeniu po wpływie HFD. Dane płynące z eksperymentów klinicznych suplementacji PUFA n-3 [330,333] wyniki wspomnianych eksperymentów w modelach zwierzęcych [331,332] sugerują, że ten niedobór może skutkować potencjalnymi dolegliwościami kardiometabolicznymi. Przypuszczenia te musiałyby być potwierdzone wydłużonymi eksperymentami indukowania otyłości HFD, w których analizowane byłyby stężenia sercowych oksylipin i aktywność FFAR4.

7 PODSUMOWANIE

Przedłożona praca doktorska miała na celu kompleksową charakterystykę profilu FA pacjentów cierpiących na MO leczonych OAGB, zabiegiem bariatrycznym słabo poznanym z punktu widzenia zmian metabolomicznych. Wśród ograniczeń przeprowadzonych badań należy wymienić brak kwestionariuszy żywieniowych, które umożliwiłyby jednoznaczne oddzielenie wpływu samego zabiegu OAGB od zmian diety po leczeniu bariatrycznym. Analizowana grupa pacjentów była stosunkowo niewielka, przez co z dużą ostrożnością należy przekładać uzyskane wyniki do poziomu większych populacji. Niemniej, dołożono wszelkich starań, aby wyniki uwiarygodnić poprzez obliczenie mocy stosowanych testów statystycznych oraz potwierdzenie obserwowanych trendów zmian głównych grup FA w analizie RM-ANOVA.

Pomimo powyższych ograniczeń, przeprowadzone badania dostarczają cennych informacji o zmianach profilu FA u osób otyłych i po leczeniu bariatrycznym, a najważniejsze uzyskane wyniki są następujące:

- ◆ Po raz pierwszy scharakteryzowano profil krążących FA w surowicy pacjentów z otyłością olbrzymią leczonych OAGB dwa tygodnie po OAGB [178] i po 6-9 miesiącach od zabiegu [201]. Uzyskane wyniki są szczególnie wartościowe jako podstawa do prowadzenia dalszych badań dążących do ustalenia zasadności suplementacji OCFA, BCFA lub PUFA n-3 w leczeniu bariatrycznym.
- ◆ Dokonano oznaczenia profilu FA w skupiskach tkanki tłuszczowej osób otyłych otyłością i we współpracy z Gdańskim Uniwersytetem Medycznym wykazano w niej zmiany w poziomach ekspresji enzymów ścieżki katabolizmu BCAA oraz wskazano potencjalną rolę tego procesu w regulowaniu zawartości BCFA [202].
- ◆ W oparciu o dostępne w literaturze doniesienia zaproponowano i dokonano częściowej walidacji metody oznaczania oksylipin w surowicy krwi przy pomocy SPE-LC-MS/MS, co umożliwiło wykazanie różnic pomiędzy stężeniami przed OAGB i w dwóch punktach czasowych po zabiegu OAGB.
- ◆ W mysim modelu otyłości indukowanym dietą wysokotłuszczową określono profil całkowitych FA oraz profile FA w wybranych grupach lipidów w tkankach/narządach niedostępnych od pacjentów i wskazano zaburzenia zawartości FA [68,225].

8 WNIOSKI

- ◆ W krótkim terminie po OAGB (2 tygodnie po zabiegu) w surowicy pacjentów występuje niedobór wykazujących właściwości korzystne dla zdrowia OCFA, BCFA i niezbędnych PUFA (**I.I**)
- ◆ Mimo szeregu pozytywnych zmian w profilu FA, całkowity profil FA nie normalizuje się nawet po 6-9 miesiącach od zabiegu OAGB (**I.II**).
- ◆ Do obniżonego poziomu BCFA we krwi osób z MO może przyczyniać się mniej intensywny katabolizm BCAA w VAT w porównaniu do zdrowych osób o prawidłowej masie ciała (**II.I**).
- ◆ Stężenia oksylipin w surowicy pacjentów po OAGB zmieniały się w różny sposób w zależności od czasu, który upłynął od operacji (**I.III**).
- ◆ Zmiany profilu FA w mózgu zaobserwowane w mysim modelu otyłości mogą być jedną z przyczyn rozwijania się problemów neurodegeneracyjnych związanych z otyłością, istotnych w kontekście starzejącej populacji, natomiast zmiany profilu FA w sercu mogą przyczyniać się do rozwoju chorób sercowo-naczyniowych, które są częstym powikłaniem otyłości (**II.II**).

9 LITERATURA

1. World Health Organisation Obesity and Overweight Online: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight> (dostęp z 1 10 2020).
2. Abdelaal, M.; le Roux, C.W.; Docherty, N.G. Morbidity and Mortality Associated with Obesity. *Ann Transl Med* **2017**, *5*, 1–12, doi:10.21037/atm.2017.03.107.
3. Matusik, P.; Małecka-Tendera, E.; Nowak, A. Metody Stosowane w Praktyce Pediatrycznej Do Oceny Stopnia Odżywienia Dzieci. *Endokrynologia, Otyłość i Zaburzenia Przemiany Materii* **2005**, *1*, 6–11.
4. Centers for Disease Control and Prevention Defining Adult Overweight & Obesity Online: <https://www.cdc.gov/obesity/adult/defining.html> (dostęp z 21 3 2022).
5. Główny Urząd Statystyczny Departament Badań Społecznych *Stan Zdrowia Ludności Polski w 2019 r.*; Wozniak, S., Wieczorkowski, R., Czekalska, A., Eds.; Główny Urząd Statystyczny: Warszawa, 2021;
6. World Health Organisation *Obesity. Preventing and Managing the Global Pandemic. Section A: Defining the Problem of Overweight and Obesity*; Geneva, 1997;
7. Hassan, Y.; Head, V.; Jacob, D.; Bachmann, M.O.; Diu, S.; Ford, J. Lifestyle Interventions for Weight Loss in Adults with Severe Obesity: A Systematic Review. *Clin Obes* **2016**, *6*, 395–403, doi:10.1111/cob.12161.
8. GBD 2019 Risk Factors Collaborators Global Burden of 87 Risk Factors in 204 Countries and Territories, 1990–2019: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet* **2020**, *396*, 1223–1249, doi:10.1016/S0140-6736(20)30752-2.
9. World Health Organisation *Global Health Risks: Mortality and Burden of Disease Attributable to Selected Major Risks*; World Health Organisation: Geneva, 2009;
10. Swinburn, B.A.; Kraak, V.I.; Allender, S.; Atkins, V.J.; Baker, P.I.; Bogard, J.R.; Brinsden, H.; Calvillo, A.; de Schutter, O.; Devarajan, R.; et al. The Global Syndemic of Obesity, Undernutrition, and Climate Change: The Lancet Commission Report. *The Lancet* **2019**, *393*, 791–846, doi:10.1016/S0140-6736(18)32822-8.
11. NIZP-PZH *Sytuacja Zdrowotna Ludności Polski i Jej Uwarunkowania 2020*; Wojtyniak, B., Goryński, P., Eds.; Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego Państwowy Zakład Higieny: Warszawa, 2020;
12. Główny Urząd Statystyczny Departament Badań Społecznych i Warunków Życia; Piekarzewska, M.; Wieczorkowski, R.; Zajenkowska-Kozłowska, A. *Stan Zdrowia Ludności Polski w 2014 r.*; Piekarzewska, M., Zajenkowska-Kozłowska, A., Eds.; Główny Urząd Statystyczny: Warszawa, 2016;

13. *Rozporządzenie Rady Ministrów z Dnia 4 Sierpnia 2016 r. w Sprawie Narodowego Programu Zdrowia Na Lata 2016–2020*; p. Dz. U. z 2016 r. poz. 1492;
14. Narodowy Fundusz Zdrowia Departament Analiz i Strategii *Cukier, Otyłość - Konsekwencje*; Warszawa, 2019;
15. Najwyższa Izba Kontroli Delegatura w Rzeszowie *Dostępność Profilaktyki i Leczenia Dla Dzieci i Młodzieży z Zaburzeniami Metabolicznymi Wynikającymi z Otyłości i Chorób Cywilizacyjnych*; Rzeszów, 2021;
16. van der Valk, E.S.; van den Akker, E.L.T.; Savas, M.; Kleinendorst, L.; Visser, J.A.; van Haelst, M.M.; Sharma, A.M.; van Rossum, E.F.C. A Comprehensive Diagnostic Approach to Detect Underlying Causes of Obesity in Adults. *Obesity Reviews* **2019**, *20*, 795–804, doi:10.1111/obr.12836.
17. Czerwińska, E.; Walicka, M.; Marcinowksa-Suchowierska, E. Otyłość - Czy Zawsze Prosta? *Postępy Nauk Medycznych* **2013**, *26*, 307–310.
18. Romieu, I.; Dossus, L.; Barquera, S.; Blotière, H.M.; Franks, P.W.; Gunter, M.; Hwalla, N.; Hursting, S.D.; Leitzmann, M.; Margetts, B.; et al. Energy Balance and Obesity: What Are the Main Drivers? *Cancer Causes & Control* **2017**, *28*, 247–258, doi:10.1007/s10552-017-0869-z.
19. Hall, K.D.; Sacks, G.; Chandramohan, D.; Chow, C.C.; Wang, Y.C.; Gortmaker, S.L.; Swinburn, B.A. Quantification of the Effect of Energy Imbalance on Bodyweight. *The Lancet* **2011**, *378*, 826–837, doi:10.1016/S0140-6736(11)60812-X.
20. Jackson, S.E.; Llewellyn, C.H.; Smith, L. The Obesity Epidemic – Nature via Nurture: A Narrative Review of High-Income Countries. *SAGE Open Med* **2020**, *8*, 1–11, doi:10.1177/2050312120918265.
21. Ledikwe, J.H.; Ello-Martin, J.A.; Rolls, B.J. Portion Sizes and the Obesity Epidemic. *J Nutr* **2005**, *135*, 905–909, doi:10.1093/jn/135.4.905.
22. Raits, E.; Kirse-Ozolina, A. Modern Dietary Patterns Based on Territorial Origin - a Review. *FOODBALT 2019* **2019**, 19–24, doi:10.22616/FoodBalt.2019.037.
23. Cordain, L.; Eaton, S.B.; Sebastian, A.; Mann, N.; Lindeberg, S.; Watkins, B.A.; O’Keefe, J.H.; Brand-Miller, J. Origins and Evolution of the Western Diet: Health Implications for the 21st Century. *Am J Clin Nutr* **2005**, *81*, 341–354, doi:10.1093/ajcn.81.2.341.
24. Jarosz, M.; Rychlik, E.; Stoś, K.; Charzewska, J.; Mojska, H.; Przygoda, B.; Wojtasik, A.; Woźniak, A.; Wajaszczyk, B.; Cybulska, B. *Normy Żywienia Dla Populacji Polski i Ich Zastosowanie*; Jarosz, M., Rychlik, E., Stoś, K., Charzewska, J., Eds.; Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny: Warszawa, 2020; ISBN 978-83-65870-28-5.
25. Bitew, Z.W.; Alemu, A.; Tenaw, Z.; Alebel, A.; Worku, T.; Ayele, E.G. Prevalence of Metabolic Syndrome among Children and Adolescents in High-Income Countries: A

- Systematic Review and Meta-Analysis of Observational Studies. *Biomed Res Int* **2021**, *2021*, 1–24, doi:10.1155/2021/6661457.
26. Guh, D.P.; Zhang, W.; Bansback, N.; Amarsi, Z.; Birmingham, C.L.; Anis, A.H. The Incidence of Co-Morbidities Related to Obesity and Overweight: A Systematic Review and Meta-Analysis. *BMC Public Health* **2009**, *9*, 1–20, doi:10.1186/1471-2458-9-88.
 27. Dong, Z.; Xu, X.; Wang, C.; Cartledge, S.; Maddison, R.; Shariful Islam, S.M. Association of Overweight and Obesity with Obstructive Sleep Apnoea: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Obes Med* **2020**, *17*, 100185, doi:10.1016/j.obmed.2020.100185.
 28. Qu, Y.; Hu, H.-Y.; Ou, Y.-N.; Shen, X.-N.; Xu, W.; Wang, Z.-T.; Dong, Q.; Tan, L.; Yu, J.-T. Association of Body Mass Index with Risk of Cognitive Impairment and Dementia: A Systematic Review and Meta-Analysis of Prospective Studies. *Neurosci Biobehav Rev* **2020**, *115*, 189–198, doi:10.1016/j.neubiorev.2020.05.012.
 29. Klop, B.; Elte, J.; Cabezas, M. Dyslipidemia in Obesity: Mechanisms and Potential Targets. *Nutrients* **2013**, *5*, 1218–1240, doi:10.3390/nu5041218.
 30. Kim, J.-E.; Kim, J.-S.; Jo, M.-J.; Cho, E.; Ahn, S.-Y.; Kwon, Y.-J.; Ko, G.-J. The Roles and Associated Mechanisms of Adipokines in Development of Metabolic Syndrome. *Molecules* **2022**, *27*, 334, doi:10.3390/molecules27020334.
 31. Himbert, C.; Delphan, M.; Scherer, D.; Bowers, L.W.; Hursting, S.; Ulrich, C.M. Signals from the Adipose Microenvironment and the Obesity-Cancer Link-A Systematic Review. *Cancer Prevention Research* **2017**, *10*, 494–506, doi:10.1158/1940-6207.CAPR-16-0322.
 32. Uranga, R.M.; Keller, J.N. The Complex Interactions Between Obesity, Metabolism and the Brain. *Front Neurosci* **2019**, *13*, 513, doi:10.3389/fnins.2019.00513.
 33. Masoodi, M.; Kuda, O.; Rossmesl, M.; Flachs, P.; Kopecky, J. Lipid Signaling in Adipose Tissue: Connecting Inflammation & Metabolism. *Biochim Biophys Acta* **2015**, *1851*, 503–518, doi:10.1016/J.BBALIP.2014.09.023.
 34. Murawska-Ciałowicz, E. Tkanka Tłuszczowa-Charakterystyka Morfologiczna i Biochemiczna Różnych Depozytów. *Postepy Higieny Medycyny Doświadczalnej* **2017**, *71*, 466–484.
 35. Ibrahim, M.M. Subcutaneous and Visceral Adipose Tissue: Structural and Functional Differences. *Obesity Reviews* **2010**, *11*, 11–18, doi:10.1111/j.1467-789X.2009.00623.x.
 36. Alcalá, M.; Calderon-Dominguez, M.; Serra, D.; Herrero, L.; Viana, M. Mechanisms of Impaired Brown Adipose Tissue Recruitment in Obesity. *Front Physiol* **2019**, *10*, 1–10, doi:10.3389/fphys.2019.00094.
 37. Fisk, H.L.; Childs, C.E.; Miles, E.A.; Ayres, R.; Noakes, P.S.; Paras-Chavez, C.; Kuda, O.; Kopecký, J.; Antoun, E.; Lillycrop, K.A.; et al. Modification of Subcutaneous White Adipose Tissue Inflammation by Omega-3 Fatty Acids Is Limited in Human Obesity-a

- Double Blind, Randomised Clinical Trial. *EBioMedicine* **2022**, *77*, 103909, doi:10.1016/j.ebiom.2022.103909.
38. Lee, M.-J.; Wu, Y.; Fried, S.K. Adipose Tissue Remodeling in Pathophysiology of Obesity. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **2010**, *13*, 371–376, doi:10.1097/MCO.0b013e32833aabef.
39. Górska, M.; Majewska-Szczepanik, M.; Szczepanik, M. Mechanizmy Immunologiczne Towarzyszące Otyłości i Ich Rola w Zaburzeniach Metabolizmu. *Postepy Hig Med Dosw* **2015**, *69*, 1384–1404.
40. Jacobi, D.; Stanya, K.; Lee, C.-H. Adipose Tissue Signaling by Nuclear Receptors in Metabolic Complications of Obesity. *Adipocyte* **2012**, *1*, 4–12, doi:10.4161/adip.19036.
41. Redinger, R.N. The Pathophysiology of Obesity and Its Clinical Manifestations. *Gastroenterol Hepatol (N Y)* **2007**, *3*, 856–863.
42. Powell-Wiley, T.M.; Poirier, P.; Burke, L.E.; Després, J.-P.; Gordon-Larsen, P.; Lavie, C.J.; Lear, S.A.; Ndumele, C.E.; Neeland, I.J.; Sanders, P.; et al. Obesity and Cardiovascular Disease: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation* **2021**, *143*, E984–E1010, doi:10.1161/CIR.0000000000000973.
43. Newgard, C.B. Interplay between Lipids and Branched-Chain Amino Acids in Development of Insulin Resistance. *Cell Metab* **2012**, *15*, 606–614, doi:10.1016/J.CMET.2012.01.024.
44. Leamy, A.K.; Egnatchik, R.A.; Young, J.D. Molecular Mechanisms and the Role of Saturated Fatty Acids in the Progression of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Prog Lipid Res* **2013**, *52*, 165–174, doi:10.1016/j.plipres.2012.10.004.
45. Mika, A.; Sledzinski, T. Alterations of Specific Lipid Groups in Serum of Obese Humans: A Review. *Obesity Reviews* **2017**, *18*, 247–272, doi:10.1111/obr.12475.
46. Rosen, H. Is Obesity A Disease or A Behavior Abnormality? Did the AMA Get It Right? *Mo Med* **2014**, *111*, 104–108.
47. Tomiak, E.; Koziarska-Rościszewska, M.; Mizgala, E.; Józwiak, J. Zasady Postępowania w Nadwadze i Otyłości w Praktyce Lekarza Rodzinnego. *Medycyna Praktyczna* **2017**, *Lekarz rod*, 1–82.
48. Leung, A.W.Y.; Chan, R.S.M.; Sea, M.M.M.; Woo, J. An Overview of Factors Associated with Adherence to Lifestyle Modification Programs for Weight Management in Adults. *Int J Environ Res Public Health* **2017**, *14*, 922, doi:10.3390/ijerph14080922.
49. Mika, A.; Sledzinski, T.; Proczko-Stepaniak, M.; Magkos, F. One Anastomosis Gastric Bypass in the Treatment of Obesity: Effects on Body Weight and the Metabolome. In *Obesity and Diabetes*; Faintuch, J., Faintuch, S., Eds.; Springer: Cham, 2020; pp. 777–790.

50. Fried, M.; Yumuk, V.; Oppert, J.M.; Scopinaro, N.; Torres, A.; Weiner, R.; Yashkov, Y.; Frühbeck, G. Interdisciplinary European Guidelines on Metabolic and Bariatric Surgery. *Obes Surg* **2014**, *24*, 42–55, doi:10.1007/s11695-013-1079-8.
51. Baillot, A.; Romain, A.J.; Boisvert-Vigneault, K.; Audet, M.; Baillargeon, J.P.; Dionne, I.J.; Valiquette, L.; Chakra, C.N.A.; Avignon, A.; Langlois, M.-F. Effects of Lifestyle Interventions That Include a Physical Activity Component in Class II and III Obese Individuals: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One* **2015**, *10*, e0119017, doi:10.1371/journal.pone.0119017.
52. Cheng, J.; Gao, J.; Shuai, X.; Wang, G.; Tao, K. The Comprehensive Summary of Surgical versus Non-Surgical Treatment for Obesity: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Oncotarget* **2016**, *7*, 39216–39230, doi:10.18632/oncotarget.9581.
53. Tarnowski, W.; Jaworski, P. Operacje Bariatryczne w Praktyce. *Gastroenterologia Kliniczna* **2018**, *10*, 93–101.
54. Lange, J.; Königsrainer, A. Malnutrition as a Complication of Bariatric Surgery - A Clear and Present Danger? *Visc Med* **2019**, *35*, 305–311, doi:10.1159/000503040.
55. Carbajo, M.A.; Luque-de-León, E.; Jiménez, J.M.; Ortiz-de-Solórzano, J.; Pérez-Miranda, M.; Castro-Alija, M.J. Laparoscopic One-Anastomosis Gastric Bypass: Technique, Results, and Long-Term Follow-Up in 1200 Patients. *Obes Surg* **2017**, *27*, 1153–1167, doi:10.1007/s11695-016-2428-1.
56. Mika, A.; Sledzinski, T.; Stepnowski, P. Current Progress of Lipid Analysis in Metabolic Diseases by Mass Spectrometry Methods. *Curr Med Chem* **2019**, *26*, 60–103, doi:10.2174/0929867324666171003121127.
57. Wu, Z.; Bagarolo, G.I.; Thoröe-Boveleth, S.; Jankowski, J. “Lipidomics”: Mass Spectrometric and Chemometric Analyses of Lipids. *Adv Drug Deliv Rev* **2020**, *159*, 294–307, doi:10.1016/j.addr.2020.06.009.
58. Li, L.; Han, J.; Wang, Z.; Liu, J.; Wei, J.; Xiong, S.; Zhao, Z. Mass Spectrometry Methodology in Lipid Analysis. *Int J Mol Sci* **2014**, *15*, 10492–10507, doi:10.3390/ijms150610492.
59. Fahy, E.; Subramaniam, S.; Brown, H.A.; Glass, C.K.; Merrill, A.H.; Murphy, R.C.; Raetz, C.R.H.; Russell, D.W.; Seyama, Y.; Shaw, W.; et al. A Comprehensive Classification System for Lipids. *J Lipid Res* **2005**, *46*, 839–861, doi:10.1194/jlr.E400004-JLR200.
60. Pakiet, A.; Stepnowski, P.; Adriana, M.; Mika, A. Lipidomika w Otyłości Olbrzymiej. In *Bioanalitka w nauce i życiu. T. 1. Nowe wyzwania w bioanalizie klinicznej i ocenie naturalnych surowców leczniczych*; Staneczko-Baranowska, I., Buszewski, B., Eds.; Wydawnictwo Naukowe PWN: Warsaw, 2020; pp. 113–128 ISBN 978-83-01-21281-0.

61. Pakiet, A.; Kobiela, J.; Stepnowski, P.; Sledzinski, T.; Mika, A. Changes in Lipids Composition and Metabolism in Colorectal Cancer: A Review. *Lipids Health Dis* **2019**, *18*, 29, doi:10.1186/s12944-019-0977-8.
62. Bruss, M.L. Lipids and Ketones. In *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*; Elsevier, 2008; pp. 81–115.
63. Prentki, M.; Madiraju, S.R.M. Glycerolipid Metabolism and Signaling in Health and Disease. *Endocr Rev* **2008**, *29*, 647–676, doi:10.1210/er.2008-0007.
64. Maula, T.; Artetxe, I.; Grandell, P.-M.; Slotte, J.P. Importance of the Sphingoid Base Length for the Membrane Properties of Ceramides. *Biophys J* **2012**, *103*, 1870–1879, doi:10.1016/j.bpj.2012.09.018.
65. Yamamoto, T.; Endo, J.; Kataoka, M.; Matsushashi, T.; Katsumata, Y.; Shirakawa, K.; Yoshida, N.; Isobe, S.; Moriyama, H.; Goto, S.; et al. Decrease in Membrane Phospholipids Unsaturation Correlates with Myocardial Diastolic Dysfunction. *PLoS One* **2018**, *13*, e0208396, doi:10.1371/journal.pone.0208396.
66. Turk, H.F.; Chapkin, R.S. Membrane Lipid Raft Organization Is Uniquely Modified by N-3 Polyunsaturated Fatty Acids. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **2013**, *88*, 43–47, doi:10.1016/j.plefa.2012.03.008.
67. Müller, C.P.; Reichel, M.; Mühle, C.; Rhein, C.; Gulbins, E.; Kornhuber, J. Brain Membrane Lipids in Major Depression and Anxiety Disorders. *Biochim Biophys Acta* **2015**, *1851*, 1052–1065, doi:10.1016/j.bbali.2014.12.014.
68. Pakiet, A.; Jakubiak, A.; Czumaj, A.; Sledzinski, T.; Mika, A. The Effect of Western Diet on Mice Brain Lipid Composition. *Nutr Metab (Lond)* **2019**, *16*, 81, doi:10.1186/s12986-019-0401-4.
69. Grösch, S.; Schiffmann, S.; Geisslinger, G. Chain Length-Specific Properties of Ceramides. *Prog Lipid Res* **2012**, *51*, 50–62, doi:10.1016/J.PLIPRES.2011.11.001.
70. Sledzinski, T.; Mika, A.; Stepnowski, P.; Proczko-Markuszczyńska, M.; Kaska, L.; Stefaniak, T.; Swierczynski, J. Identification of Cyclopropaneoctanoic Acid 2-Hexyl in Human Adipose Tissue and Serum. *Lipids* **2013**, *48*, 839–848, doi:10.1007/s11745-013-3806-2.
71. Tvrzicka, E.; Kremmyda, L.S.; Stankova, B.; Zak, A. Fatty Acids as Biocompounds: Their Role in Human Metabolism, Health and Disease - a Review. Part 1: Classification, Dietary Sources and Biological Functions. *Biomedical Papers* 2011, *155*, 117–130.
72. Schönfeld, P.; Wojtczak, L. Short- and Medium-Chain Fatty Acids in Energy Metabolism: The Cellular Perspective. *J Lipid Res* **2016**, *57*, 943–954, doi:10.1194/jlr.R067629.
73. Kihara, A. Very Long-Chain Fatty Acids: Elongation, Physiology and Related Disorders. *The Journal of Biochemistry* **2012**, *152*, 387–395, doi:10.1093/JB/MVS105.

74. Mika, A.; Stepnowski, P.; Chmielewski, M.; Malgorzewicz, S.; Kaska, L.; Proczko, M.; Ratnicki-Sklucki, K.; Sledzinski, M.; Sledzinski, T. Increased Serum Level of Cyclopropaneoctanoic Acid 2-Hexyl in Patients with Hypertriglyceridemia-Related Disorders. *Lipids* **2016**, *51*, 867–873, doi:10.1007/s11745-016-4141-1.
75. Chiu, H.-H.; Kuo, C.-H. Gas Chromatography-Mass Spectrometry-Based Analytical Strategies for Fatty Acid Analysis in Biological Samples. *J Food Drug Anal* **2020**, *28*, 60–73, doi:10.1016/j.jfda.2019.10.003.
76. Köfeler, H.C.; Ahrends, R.; Baker, E.S.; Ekroos, K.; Han, X.; Hoffmann, N.; Holčapek, M.; Wenk, M.R.; Liebisch, G. Recommendations for Good Practice in MS-Based Lipidomics. *J Lipid Res* **2021**, *62*, 100138, doi:10.1016/j.jlr.2021.100138.
77. Carta, G.; Murru, E.; Banni, S.; Manca, C. Palmitic Acid: Physiological Role, Metabolism and Nutritional Implications. *Front Physiol* **2017**, *8*, doi:10.3389/fphys.2017.00902.
78. Mensink, R.P. *Effects of Saturated Fatty Acids on Serum Lipids and Lipoproteins: A Systematic Review and Regression Analysis*; Geneva, 2016;
79. Hirabara, S.M.; Curi, R.; Maechler, P. Saturated Fatty Acid-Induced Insulin Resistance Is Associated with Mitochondrial Dysfunction in Skeletal Muscle Cells. *J Cell Physiol* **2010**, *222*, 187–194, doi:10.1002/jcp.21936.
80. Mensink, R.P.; Zock, P.L.; Kester, A.D.; Katan, M.B. Effects of Dietary Fatty Acids and Carbohydrates on the Ratio of Serum Total to HDL Cholesterol and on Serum Lipids and Apolipoproteins: A Meta-Analysis of 60 Controlled Trials. *Am J Clin Nutr* **2003**, *77*, 1146–1155, doi:10.1093/ajcn/77.5.1146.
81. Hickson-Bick, D.L.M.; Buja, M.L.; McMillin, J.B. Palmitate-Mediated Alterations in the Fatty Acid Metabolism of Rat Neonatal Cardiac Myocytes. *J Mol Cell Cardiol* **2000**, *32*, 511–519, doi:10.1006/jmcc.1999.1098.
82. Senyilmaz-Tiebe, D.; Pfaff, D.H.; Virtue, S.; Schwarz, K. v.; Fleming, T.; Altamura, S.; Muckenthaler, M.U.; Okun, J.G.; Vidal-Puig, A.; Nawroth, P.; et al. Dietary Stearic Acid Regulates Mitochondria in Vivo in Humans. *Nat Commun* **2018**, *9*, 3129, doi:10.1038/s41467-018-05614-6.
83. Song, Z.; Xiaoli, A.; Yang, F. Regulation and Metabolic Significance of De Novo Lipogenesis in Adipose Tissues. *Nutrients* **2018**, *10*, 1383, doi:10.3390/nu10101383.
84. Wallace, M.; Green, C.R.; Roberts, L.S.; Lee, Y.M.; McCarville, J.L.; Sanchez-Gurmaches, J.; Meurs, N.; Gengatharan, J.M.; Hover, J.D.; Phillips, S.A.; et al. Enzyme Promiscuity Drives Branched-Chain Fatty Acid Synthesis in Adipose Tissues. *Nat Chem Biol* **2018**, *14*, 1021–1031, doi:10.1038/s41589-018-0132-2.
85. Jenkins, B.J.; Seyssel, K.; Chiu, S.; Pan, P.-H.; Lin, S.-Y.; Stanley, E.; Ament, Z.; West, J.A.; Summerhill, K.; Griffin, J.L.; et al. Odd Chain Fatty Acids; New Insights of the

- Relationship Between the Gut Microbiota, Dietary Intake, Biosynthesis and Glucose Intolerance. *Sci Rep* **2017**, *7*, 44845, doi:10.1038/srep44845.
86. Taormina, V.M.; Unger, A.L.; Schiksnis, M.R.; Torres-Gonzalez, M.; Kraft, J. Branched-Chain Fatty Acids—An Underexplored Class of Dairy-Derived Fatty Acids. *Nutrients* **2020**, *12*, 2875, doi:10.3390/nu12092875.
87. Jenkins, B.; West, J.; Koulman, A. A Review of Odd-Chain Fatty Acid Metabolism and the Role of Pentadecanoic Acid (C15:0) and Heptadecanoic Acid (C17:0) in Health and Disease. *Molecules* **2015**, *20*, 2425–2444, doi:10.3390/molecules20022425.
88. Vahmani, P.; Salazar, V.; Rolland, D.C.; Gzyl, K.E.; Dugan, M.E.R. Iso- but Not Anteiso-Branched Chain Fatty Acids Exert Growth-Inhibiting and Apoptosis-Inducing Effects in MCF-7 Cells. *J Agric Food Chem* **2019**, *67*, 10042–10047, doi:10.1021/acs.jafc.9b03549.
89. Mika, A.; Stepnowski, P.; Kaska, L.; Proczko, M.; Wisniewski, P.; Sledzinski, M.; Sledzinski, T. A Comprehensive Study of Serum Odd- and Branched-Chain Fatty Acids in Patients with Excess Weight. *Obesity* **2016**, *24*, 1669–1676, doi:10.1002/oby.21560.
90. Hellmuth, C.; Demmelair, H.; Schmitt, I.; Peissner, W.; Blüher, M.; Koletzko, B. Association between Plasma Nonesterified Fatty Acids Species and Adipose Tissue Fatty Acid Composition. *PLoS One* **2013**, *8*, e74927, doi:10.1371/journal.pone.0074927.
91. Wahle KW, H.W. The Effect of Dietary Methyl Branched-Chain Fatty Acids on Aspects of Hepatic Lipid Metabolism in the Rat. **1982**, 61–67.
92. Vieira, A.F.C.; Xatse, M.A.; Tifeki, H.; Diot, C.; Walhout, A.J.M.; Olsen, C.P. Monomethyl Branched-Chain Fatty Acids Are Critical for *Caenorhabditis Elegans* Survival in Elevated Glucose Conditions. *Journal of Biological Chemistry* **2022**, *298*, 101444, doi:10.1016/J.JBC.2021.101444.
93. Holman, R.T.; Adams, C.E.; Nelson, R.A.; Grater, S.J.; Jaskiewicz, J.A.; Johnson, S.B.; Erdman, J.W. Patients with Anorexia Nervosa Demonstrate Deficiencies of Selected Essential Fatty Acids, Compensatory Changes in Nonessential Fatty Acids and Decreased Fluidity of Plasma Lipids. *J Nutr* **1995**, *125*, 901–907, doi:10.1093/jn/125.4.901.
94. Degirolamo, C.; Rudel, L.L. Dietary Monounsaturated Fatty Acids Appear Not to Provide Cardioprotection. *Curr Atheroscler Rep* **2010**, *12*, 391–396, doi:10.1007/s11883-010-0133-4.
95. Gaforio, J.J.; Visioli, F.; Alarcón-de-la-Lastra, C.; Castañer, O.; Delgado-Rodríguez, M.; Fitó, M.; Hernández, A.F.; Huertas, J.R.; Martínez-González, M.A.; Menendez, J.A.; et al. Virgin Olive Oil and Health: Summary of the III International Conference on Virgin Olive Oil and Health Consensus Report, JAEN (Spain) 2018. *Nutrients* **2019**, *11*, doi:10.3390/nu11092039.

96. Weng, C.M.; Miyazaki, M.; Chu, K.; Ntambi, J. Colocalization of SCD1 and DGAT2: Implying Preference for Endogenous Monounsaturated Fatty Acids in Triglyceride Synthesis. *J Lipid Res* **2006**, *47*, 1928–1939, doi:10.1194/JLR.M600172-JLR200.
97. Mika, A.; Sikorska-Wiśniewska, M.; Małgorzewicz, S.; Stepnowski, P.; Dębska-Ślizień, A.; Śledziński, T.; Chmielewski, M. Potential Contribution of Monounsaturated Fatty Acids to Cardiovascular Risk in Chronic Kidney Disease. *Pol Arch Intern Med* **2018**, *128*, 755–763, doi:10.20452/pamw.4376.
98. Chen, L.; Ren, J.; Yang, L.; Li, Y.Y.Y.; Fu, J.; Li, Y.Y.Y.; Tian, Y.; Qiu, F.; Liu, Z.; Qiu, Y. Stearoyl-CoA Desaturase-1 Mediated Cell Apoptosis in Colorectal Cancer by Promoting Ceramide Synthesis. *Sci Rep* **2016**, *6*, 19665, doi:10.1038/srep19665.
99. Pisanu, M.E.; Noto, A.; de Vitis, C.; Morrone, S.; Scognamiglio, G.; Botti, G.; Venuta, F.; Diso, D.; Jakopin, Z.; Padula, F.; et al. Blockade of Stearoyl-CoA-Desaturase 1 Activity Reverts Resistance to Cisplatin in Lung Cancer Stem Cells. *Cancer Lett* **2017**, *406*, 93–104, doi:10.1016/j.canlet.2017.07.027.
100. Patterson, E.; Wall, R.; Fitzgerald, G.F.; Ross, R.P.; Stanton, C. Health Implications of High Dietary Omega-6 Polyunsaturated Fatty Acids. *J Nutr Metab* **2012**, *2012*, 539426, doi:10.1155/2012/539426.
101. Tosi, F.; Sartori, F.; Guarini, P.; Olivieri, O.; Martinelli, N. Delta-5 and Delta-6 Desaturases: Crucial Enzymes in Polyunsaturated Fatty Acid-Related Pathways with Pleiotropic Influences in Health and Disease. In *Oxidative Stress and Inflammation in Non-communicable Diseases - Molecular Mechanisms and Perspectives in Therapeutics. Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 824; Camps, J., Ed.; Springer, Cham, 2014; pp. 61–81.
102. Harayama, T.; Shimizu, T. Roles of Polyunsaturated Fatty Acids, from Mediators to Membranes. *J Lipid Res* **2020**, *61*, 1150–1160, doi:10.1194/jlr.R120000800.
103. Patan, M.J.; Kennedy, D.O.; Husberg, C.; Hustvedt, S.O.; Calder, P.C.; Khan, J.; Forster, J.; Jackson, P.A. Supplementation with Oil Rich in Eicosapentaenoic Acid, but Not in Docosahexaenoic Acid, Improves Global Cognitive Function in Healthy, Young Adults: Results from Randomized Controlled Trials. *Am J Clin Nutr* **2021**, *114*, 914–924, doi:10.1093/ajcn/nqab174.
104. Grosso, G.; Galvano, F.; Marventano, S.; Malaguarnera, M.; Bucolo, C.; Drago, F.; Caraci, F. Omega-3 Fatty Acids and Depression: Scientific Evidence and Biological Mechanisms. *Oxid Med Cell Longev* **2014**, *2014*, 313570, doi:10.1155/2014/313570.
105. Telle-Hansen, V.H.; Gaundal, L.; Myhrstad, M.C.W. Polyunsaturated Fatty Acids and Glycemic Control in Type 2 Diabetes. *Nutrients* **2019**, *11*, 1067, doi:10.3390/nu11051067.
106. Delavar, M.A.; Lye, M.-S.; Khor, G.L.; Hassan, S.T.B.S.; Hanachi, P. Dietary Patterns and the Metabolic Syndrome in Middle Aged Women, Babol, Iran. *Asia Pac J Clin Nutr* **2009**, *18*, 285–292.

107. Liu, J.; Ma, D. The Role of N-3 Polyunsaturated Fatty Acids in the Prevention and Treatment of Breast Cancer. *Nutrients* **2014**, *6*, 5184–5223, doi:10.3390/nu6115184.
108. Gabbs, M.; Leng, S.; Devassy, J.G.; Monirujjaman, M.M.; Aukema, H.M. Advances in Our Understanding of Oxylipins Derived from Dietary PUFAs. *Advances in Nutrition: An International Review Journal* **2015**, *6*, 513–540, doi:10.3945/an.114.007732.
109. Du, Y.; Taylor, C.G.; Aukema, H.M.; Zahradka, P. Role of Oxylipins Generated from Dietary PUFAs in the Modulation of Endothelial Cell Function. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **2020**, *160*, 102160, doi:10.1016/j.plefa.2020.102160.
110. Liakh; Pakiet; Sledzinski; Mika Modern Methods of Sample Preparation for the Analysis of Oxylipins in Biological Samples. *Molecules* **2019**, *24*, 1639, doi:10.3390/molecules24081639.
111. Sandig, H.; Pease, J.E.; Sabroe, I. Contrary Prostaglandins: The Opposing Roles of PGD2 and Its Metabolites in Leukocyte Function. *J Leukoc Biol* **2007**, *81*, 372–382, doi:10.1189/jlb.0706424.
112. Yeung, J.; Tourdot, B.E.; Adili, R.; Green, A.R.; Freedman, C.J.; Fernandez-Perez, P.; Yu, J.; Holman, T.R.; Holinstat, M. 12(S)-HETrE, a 12-Lipoxygenase Oxylipin of Dihomo- γ -Linolenic Acid, Inhibits Thrombosis via Gas Signaling in Platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2016**, *36*, 2068–2077, doi:10.1161/ATVBAHA.116.308050.
113. Novichkova, E.; Chumin, K.; Eretz-Kdosha, N.; Boussiba, S.; Gopas, J.; Cohen, G.; Khozin-Goldberg, I. DGLA from the Microalga *Lobosphaera Incsa P127* Modulates Inflammatory Response, Inhibits INOS Expression and Alleviates NO Secretion in RAW264.7 Murine Macrophages. *Nutrients* **2020**, *12*, 2892, doi:10.3390/nu12092892.
114. Liakh, I.; Pakiet, A.; Sledzinski, T.; Mika, A. Methods of the Analysis of Oxylipins in Biological Samples. *Molecules* **2020**, *25*, 349, doi:10.3390/molecules25020349.
115. Schebb, N.H.; Kühn, H.; Kahnt, A.S.; Rund, K.M.; O'Donnell, V.B.; Flamand, N.; Peters-Golden, M.; Jakobsson, P.-J.; Weylandt, K.H.; Rohwer, N.; et al. Formation, Signaling and Occurrence of Specialized Pro-Resolving Lipid Mediators—What Is the Evidence so Far? *Front Pharmacol* **2022**, *13*, 838782, doi:10.3389/fphar.2022.838782.
116. Shearer, G.C.; Borkowski, K.; Puumala, S.L.; Harris, W.S.; Pedersen, T.L.; Newman, J.W. Abnormal Lipoprotein Oxylipins in Metabolic Syndrome and Partial Correction by Omega-3 Fatty Acids. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **2018**, *128*, 1–10, doi:10.1016/j.plefa.2017.10.006.
117. Schwingshackl, L.; Hoffmann, G. Comparison of Effects of Long-Term Low-Fat vs High-Fat Diets on Blood Lipid Levels in Overweight or Obese Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Acad Nutr Diet* **2013**, *113*, 1640–1661, doi:10.1016/j.jand.2013.07.010.

118. Gjuladin-Hellon, T.; Davies, I.G.; Penson, P.; Amiri Baghbadorani, R. Effects of Carbohydrate-Restricted Diets on Low-Density Lipoprotein Cholesterol Levels in Overweight and Obese Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutr Rev* **2019**, *77*, 161–180, doi:10.1093/nutrit/nuy049.
119. Sahebkar, A.; Simental-Mendía, L.E.; Reiner, Ž.; Kovanen, P.T.; Simental-Mendía, M.; Bianconi, V.; Pirro, M. Effect of Orlistat on Plasma Lipids and Body Weight: A Systematic Review and Meta-Analysis of 33 Randomized Controlled Trials. *Pharmacol Res* **2017**, *122*, 53–65, doi:10.1016/j.phrs.2017.05.022.
120. Du, S.; Jin, J.; Fang, W.; Su, Q. Does Fish Oil Have an Anti-Obesity Effect in Overweight/Obese Adults? A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *PLoS One* **2015**, *10*, e0142652, doi:10.1371/journal.pone.0142652.
121. Hasan, B.; Nayfeh, T.; Alzuabi, M.; Wang, Z.; Kuchkuntla, A.R.; Prokop, L.J.; Newman, C.B.; Murad, M.H.; Rajjo, T.I. Weight Loss and Serum Lipids in Overweight and Obese Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Clin Endocrinol Metab* **2020**, *105*, 3695–3703, doi:10.1210/clinem/dgaa673.
122. Kelley, G.A.; Kelley, K.S.; Vu Tran, Z. Aerobic Exercise, Lipids and Lipoproteins in Overweight and Obese Adults: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Int J Obes* **2005**, *29*, 881–893, doi:10.1038/sj.ijo.0802959.
123. Melvin, J.C.; Holmberg, L.; Rohrmann, S.; Loda, M.; van Hemelrijck, M. Serum Lipid Profiles and Cancer Risk in the Context of Obesity: Four Meta-Analyses. *J Cancer Epidemiol* **2013**, *2013*, 18–20, doi:10.1155/2013/823849.
124. Pickens, C.A.; Sordillo, L.M.; Comstock, S.S.; Harris, W.S.; Hortos, K.; Kovan, B.; Fenton, J.I. Plasma Phospholipids, Non-Esterified Plasma Polyunsaturated Fatty Acids and Oxylipids Are Associated with BMI. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **2015**, *95*, 31–40, doi:10.1016/j.plefa.2014.12.001.
125. Ni, Y.; Zhao, L.; Yu, H.; Ma, X.; Bao, Y.; Rajani, C.; Loo, L.W.M.; Shvetsov, Y.B.; Yu, H.; Chen, T.; et al. Circulating Unsaturated Fatty Acids Delineate the Metabolic Status of Obese Individuals. *EBioMedicine* **2015**, *2*, 1513–1522, doi:10.1016/j.ebiom.2015.09.004.
126. Fryk, E.; Olausson, J.; Mossberg, K.; Strindberg, L.; Schmelz, M.; Brogren, H.; Gan, L.M.; Piazza, S.; Provenzani, A.; Becattini, B.; et al. Hyperinsulinemia and Insulin Resistance in the Obese May Develop as Part of a Homeostatic Response to Elevated Free Fatty Acids: A Mechanistic Case-Control and a Population-Based Cohort Study. *EBioMedicine* **2021**, *65*, doi:10.1016/j.ebiom.2021.103264.
127. Arner, P.; Rydén, M. Fatty Acids, Obesity and Insulin Resistance. *Obes Facts* **2015**, *8*, 147–155, doi:10.1159/000381224.
128. Frohnert, B.I.; Jacobs, D.R.; Steinberger, J.; Moran, A.; Steffen, L.M.; Sinaiko, A.R. Relation between Serum Free Fatty Acids and Adiposity, Insulin Resistance, and

- Cardiovascular Risk Factors from Adolescence to Adulthood. *Diabetes* **2013**, *62*, 3163–3169, doi:10.2337/db12-1122.
129. Zong, G.; Ye, X.; Sun, L.; Li, H.; Yu, Z.; Hu, F.B.; Sun, Q.; Lin, X. Associations of Erythrocyte Palmitoleic Acid with Adipokines, Inflammatory Markers, and the Metabolic Syndrome in Middle-Aged and Older Chinese. *American Journal of Clinical Nutrition* **2012**, *96*, 970–976, doi:10.3945/ajcn.112.040204.
 130. Diraison, F.; Dusserre, E.; Vidal, H.; Sothier, M.; Beylot, M. Increased Hepatic Lipogenesis but Decreased Expression of Lipogenic Gene in Adipose Tissue in Human Obesity. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **2002**, *282*, E46–E51, doi:10.1152/ajpendo.2002.282.1.E46.
 131. Mika, A.; Kaska, L.; Korczynska, J.; Mirowska, A.; Stepnowski, P.; Proczko, M.; Ratnicki-Sklucki, K.; Goyke, E.; Sledzinski, T. Visceral and Subcutaneous Adipose Tissue Stearoyl-CoA Desaturase-1 mRNA Levels and Fatty Acid Desaturation Index Positively Correlate with BMI in Morbidly Obese Women. *European Journal of Lipid Science and Technology* **2015**, *117*, 926–932, doi:10.1002/ejlt.201400372.
 132. Kaska, L.; Mika, A.; Stepnowski, P.; Proczko, M.; Ratnicki-Sklucki, K.; Sledzinski, T.; Goyke, E.; Swierczynski, J. The Relationship between Specific Fatty Acids of Serum Lipids and Serum High Sensitivity C- Reactive Protein Levels in Morbidly Obese Women. *Cell Physiol Biochem* **2014**, *34*, 1101–1108, doi:10.1159/000366324.
 133. Perreault, M.; Zulyniak, M.A.; Badoud, F.; Stephenson, S.; Badawi, A.; Buchholz, A.; Mutch, D.M. A Distinct Fatty Acid Profile Underlies the Reduced Inflammatory State of Metabolically Healthy Obese Individuals. *PLoS One* **2014**, *9*, e88539, doi:10.1371/journal.pone.0088539.
 134. Fernandes, R.; Beserra, B.T.S.; Cunha, R.S.G.; Hillesheim, E.; Camargo, C. de Q.; Pequito, D.C.T.; de Castro, I.C.; Fernandes, L.C.; Nunes, E.A.; Trindade, E.B.S. de M. Relationship between Acute Phase Proteins and Serum Fatty Acid Composition in Morbidly Obese Patients. *Dis Markers* **2013**, *35*, 105–112, doi:10.1155/2013/913715.
 135. Haus, J.M.; Kashyap, S.R.; Kasumov, T.; Zhang, R.; Kelly, K.R.; DeFronzo, R.A.; Kirwan, J.P. Plasma Ceramides Are Elevated in Obese Subjects With Type 2 Diabetes and Correlate With the Severity of Insulin Resistance. *Diabetes* **2009**, *58*, 337–343, doi:10.2337/db08-1228.
 136. Hanamatsu, H.; Ohnishi, S.; Sakai, S.; Yuyama, K.; Mitsutake, S.; Takeda, H.; Hashino, S.; Igarashi, Y. Altered Levels of Serum Sphingomyelin and Ceramide Containing Distinct Acyl Chains in Young Obese Adults. *Nutr Diabetes* **2014**, *4*, doi:10.1038/nutd.2014.38.
 137. Karlsson, M.; Mårild, S.; Brandberg, J.; Lönn, L.; Friberg, P.; Strandvik, B. Serum Phospholipid Fatty Acids, Adipose Tissue, and Metabolic Markers in Obese Adolescents*. *Obesity* **2006**, *14*, 1931–1939, doi:10.1038/oby.2006.225.

138. Wang, H.; Steffen, L.M.; Vessby, B.; Basu, S.; Steinberger, J.; Moran, A.; Jacobs, D.R.; Hong, C.-P.; Sinaiko, A.R. Obesity Modifies the Relations Between Serum Markers of Dairy Fats and Inflammation and Oxidative Stress Among Adolescents. *Obesity* **2011**, *19*, 2404–2410, doi:10.1038/oby.2011.234.
139. Guerendiain, M.; Montes, R.; López-Belmonte, G.; Martín-Matillas, M.; Castellote, A.I.; Martín-Bautista, E.; Martí, A.; Martínez, J.A.; Moreno, L.; Garagorri, J.M.; et al. Changes in Plasma Fatty Acid Composition Are Associated with Improvements in Obesity and Related Metabolic Disorders: A Therapeutic Approach to Overweight Adolescents. *Clinical Nutrition* **2018**, *37*, 149–156, doi:10.1016/j.clnu.2016.11.006.
140. Pickens, C.A.; Sordillo, L.M.; Zhang, C.; Fenton, J.I. Obesity Is Positively Associated with Arachidonic Acid-Derived 5- and 11-Hydroxyeicosatetraenoic Acid (HETE). *Metabolism* **2017**, *70*, 177–191, doi:10.1016/j.metabol.2017.01.034.
141. Laiglesia, L.M.; Lorente-Cebrián, S.; Martínez-Fernández, L.; Sáinz, N.; Prieto-Hontoria, P.L.; Burrell, M.A.; Rodríguez-Ortigosa, C.M.; Martínez, J.A.; Moreno-Aliaga, M.J. Maresin 1 Mitigates Liver Steatosis in Ob/Ob and Diet-Induced Obese Mice. *Int J Obes* **2018**, *42*, 572–579, doi:10.1038/ijo.2017.226.
142. Li, M.; Fu, W.; Li, X.-A. Differential Fatty Acid Profile in Adipose and Non-Adipose Tissues in Obese Mice. *Int J Clin Exp Med* **2010**, *3*, 303–307.
143. Sena, A.; Rebel, G.; Bieth, R.; Hubert, P.; Waksman, A. Lipid Composition in Liver and Brain of Genetically Obese (Ob/Ob), Heterozygote (Ob/+) and Normal (+/+) Mice. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* **1982**, *710*, 290–296, doi:10.1016/0005-2760(82)90111-4.
144. She, P.; Olson, K.C.; Kadota, Y.; Inukai, A.; Shimomura, Y.; Hoppel, C.L.; Adams, S.H.; Kawamata, Y.; Matsumoto, H.; Sakai, R.; et al. Leucine and Protein Metabolism in Obese Zucker Rats. *PLoS One* **2013**, *8*, e59443, doi:10.1371/journal.pone.0059443.
145. Yew Tan, C.; Virtue, S.; Murfitt, S.; Roberts, L.D.; Phua, Y.H.; Dale, M.; Griffin, J.L.; Tinahones, F.; Scherer, P.E.; Vidal-Puig, A. Adipose Tissue Fatty Acid Chain Length and Mono-Unsaturation Increases with Obesity and Insulin Resistance. *Sci Rep* **2015**, *5*, 18366, doi:10.1038/srep18366.
146. Ballal, K.; Wilson, C.R.; Harmancey, R.; Taegtmeier, H. Obesogenic High Fat Western Diet Induces Oxidative Stress and Apoptosis in Rat Heart. *Mol Cell Biochem* **2010**, *344*, 221–230, doi:10.1007/s11010-010-0546-y.
147. Neves, F.A.; Cortez, E.; Bernardo, A.F.; Mattos, A.B.M.; Vieira, A.K.; de O. Malafaia, T.; Thole, A.A.; de S. Rodrigues-Cunha, A.C.; Garcia-Souza, É.P.; Sichieri, R.; et al. Heart Energy Metabolism Impairment in Western-Diet Induced Obese Mice. *J Nutr Biochem* **2014**, *25*, 50–57, doi:10.1016/j.jnutbio.2013.08.014.
148. Eisinger, K.; Liebisch, G.; Schmitz, G.; Aslanidis, C.; Krautbauer, S.; Buechler, C. Lipidomic Analysis of Serum from High Fat Diet Induced Obese Mice. *Int J Mol Sci* **2014**, *15*, 2991–3002, doi:10.3390/ijms15022991.

149. Sighinolfi, G.; Clark, S.; Blanc, L.; Cota, D.; Rhourri-Frih, B. Mass Spectrometry Imaging of Mice Brain Lipid Profile Changes over Time under High Fat Diet. *Sci Rep* **2021**, *11*, doi:10.1038/s41598-021-97201-x.
150. Petrus, P.; Edholm, D.; Rosqvist, F.; Dahlman, I.; Sundbom, M.; Arner, P.; Rydén, M.; Risérus, U. Depot-Specific Differences in Fatty Acid Composition and Distinct Associations with Lipogenic Gene Expression in Abdominal Adipose Tissue of Obese Women. *Int J Obes* **2017**, *41*, 1295–1298, doi:10.1038/ijo.2017.106.
151. Brown, J.M.; Rudel, L.L. Stearoyl-Coenzyme A Desaturase 1 Inhibition and the Metabolic Syndrome: Considerations for Future Drug Discovery. *Curr Opin Lipidol* **2010**, *21*, 192–197, doi:10.1097/MOL.0b013e32833854ac.
152. Liakh, I.; Janczy, A.; Pakiet, A.; Korczynska, J.; Proczko-Stepaniak, M.; Kaska, L.; Sledzinski, T.; Mika, A. One-Anastomosis Gastric Bypass Modulates the Serum Levels of pro- and Anti-Inflammatory Oxylipins, Which May Contribute to the Resolution of Inflammation. *Int J Obes* **2022**, *46*, 408–416, doi:10.1038/s41366-021-01013-y.
153. Warensjö, E.; Rosell, M.; Hellenius, M.-L.; Vessby, B.; de Faire, U.; Risérus, U. Associations between Estimated Fatty Acid Desaturase Activities in Serum Lipids and Adipose Tissue in Humans: Links to Obesity and Insulin Resistance. *Lipids Health Dis* **2009**, *8*, 37, doi:10.1186/1476-511X-8-37.
154. van Veldhuisen, S.L.; Gorter, T.M.; van Woerden, G.; de Boer, R.A.; Rienstra, M.; Hazebroek, E.J.; van Veldhuisen, D.J. Bariatric Surgery and Cardiovascular Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Eur Heart J* **2022**, doi:10.1093/eurheartj/ehac071.
155. Vrakopoulou, G.Z.; Theodoropoulos, C.; Kalles, V.; Zografos, G.; Almpantopoulos, K. Type 2 Diabetes Mellitus Status in Obese Patients Following Sleeve Gastrectomy or One Anastomosis Gastric Bypass. *Sci Rep* **2021**, *11*, 1–9, doi:10.1038/s41598-021-83807-8.
156. Ji, Y.; Lee, H.; Kaura, S.; Yip, J.; Sun, H.; Guan, L.; Han, W.; Ding, Y. Effect of Bariatric Surgery on Metabolic Diseases and Underlying Mechanisms. *Biomolecules* **2021**, *11*, 1582, doi:10.3390/biom11111582.
157. Rubino, F. From Bariatric to Metabolic Surgery: Definition of a New Discipline and Implications for Clinical Practice. *Curr Atheroscler Rep* **2013**, *15*, doi:10.1007/s11883-013-0369-x.
158. Wang, L.; Hu, T.; Zhu, X. The Mechanism of Metabolic Surgery: Gastric Center Hypothesis: Letter to the Editor. *Obes Surg* **2017**, *27*, 1622–1623, doi:10.1007/s11695-017-2647-0.
159. Mika, A.; Kaska, L.; Proczko-Stepaniak, M.; Chomiczewska, A.; Swierczynski, J.; Smolenski, R.T.; Sledzinski, T. Evidence That the Length of Bile Loop Determines Serum Bile Acid Concentration and Glycemic Control After Bariatric Surgery. *Obes Surg* **2018**, *28*, 3405–3414, doi:10.1007/s11695-018-3314-9.

160. Wijayatunga, N.N.; Sams, V.G.; Dawson, J.A.; Mancini, M.L.; Mancini, G.J.; Moustaid-Moussa, N. Roux-En-Y Gastric Bypass Surgery Alters Serum Metabolites and Fatty Acids in Patients with Morbid Obesity. *Diabetes Metab Res Rev* **2018**, *34*, e3045, doi:10.1002/dmrr.3045.
161. Graessler, J.; Bornstein, T.D.; Goel, D.; Bhalla, V.P.; Lohmann, T.; Wolf, T.; Koch, M.; Qin, Y.; Licinio, J.; Wong, M.-L.; et al. Lipidomic Profiling before and after Roux-En-Y Gastric Bypass in Obese Patients with Diabetes. *Pharmacogenomics J* **2014**, *14*, 201–207, doi:10.1038/tpj.2013.42.
162. Arora, T.; Velagapudi, V.; Pournaras, D.J.; Welbourn, R.; le Roux, C.W.; Orešič, M.; Bäckhed, F. Roux-En-Y Gastric Bypass Surgery Induces Early Plasma Metabolomic and Lipidomic Alterations in Humans Associated with Diabetes Remission. *PLoS One* **2015**, *10*, e0126401, doi:10.1371/journal.pone.0126401.
163. Forbes, R.; Gasevic, D.; Watson, E.M.; Ziegler, T.R.; Lin, E.; Burgess, J.R.; Gletsu-Miller, N. Essential Fatty Acid Plasma Profiles Following Gastric Bypass and Adjusted Gastric Banding Bariatric Surgeries. *Obes Surg* **2016**, *26*, 1237–1246, doi:10.1007/s11695-015-1876-3.
164. Walle, P.; Takkunen, M.; Männistö, V.; Vaittinen, M.; Käkälä, P.; Ågren, J.; Schwab, U.; Lindström, J.; Tuomilehto, J.; Uusitupa, M.; et al. Alterations in Fatty Acid Metabolism in Response to Obesity Surgery Combined with Dietary Counseling. *Nutr Diabetes* **2017**, *7*, e285, doi:10.1038/nutd.2017.33.
165. Luo, P.; Yu, H.; Zhao, X.; Bao, Y.; Hong, C.S.; Zhang, P.; Tu, Y.; Yin, P.; Gao, P.; Wei, L.; et al. Metabolomics Study of Roux-En-Y Gastric Bypass Surgery (RYGB) to Treat Type 2 Diabetes Patients Based on Ultraperformance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *J Proteome Res* **2016**, *15*, 1288–1299, doi:10.1021/acs.jproteome.6b00022.
166. Kayser, B.D.; Lhomme, M.; Dao, M.C.; Ichou, F.; Bouillot, J.L.; Prifti, E.; Kontush, A.; Chevallier, J.M.; Aron-Wisnewsky, J.; Dugail, I.; et al. Serum Lipidomics Reveals Early Differential Effects of Gastric Bypass Compared with Banding on Phospholipids and Sphingolipids Independent of Differences in Weight Loss. *Int J Obes* **2017**, *41*, 917–925, doi:10.1038/ijo.2017.63.
167. Zhao, L.; Ni, Y.; Yu, H.; Zhang, P.; Zhao, A.; Bao, Y.; Liu, J.; Chen, T.; Xie, G.; Panee, J.; et al. Serum Stearic Acid/Palmitic Acid Ratio as a Potential Predictor of Diabetes Remission after Roux-en-Y Gastric Bypass in Obesity. *The FASEB Journal* **2017**, *31*, 1449–1460, doi:10.1096/fj.201600927R.
168. Nemati, R.; Lu, J.; Tura, A.; Smith, G.; Murphy, R. Acute Changes in Non-Esterified Fatty Acids in Patients with Type 2 Diabetes Receiving Bariatric Surgery. *Obes Surg* **2017**, *27*, 649–656, doi:10.1007/s11695-016-2323-9.

169. Lin, C.; Våge, V.; Mjøs, S.A.; Kvalheim, O.M. Changes in Serum Fatty Acid Levels During the First Year After Bariatric Surgery. *Obes Surg* **2016**, *26*, 1735–1742, doi:10.1007/s11695-015-1980-4.
170. Sharma, C.; Platat, C.; Gariballa, S.; Muhairi, S.J. al; Aidaros, A. al; Mannaerts, G.H.H.; al Afari, H.S.; Yasin, J.; Y. Al-Dirbashi, O.; Alkaabi, J. Metabolomic Profiling of Lipids and Fatty Acids: 3 Years Postoperative Laparoscopic Sleeve Gastrectomy. *Biology (Basel)* **2021**, *10*, 298, doi:10.3390/biology10040298.
171. Oberbach, A.; Bergen, M. von; Blüher, S.; Lehmann, S.; Till, H. Combined Serum Proteomic and Metabonomic Profiling After Laparoscopic Sleeve Gastrectomy in Children and Adolescents. *Journal of Laparoendoscopic & Advanced Surgical Techniques* **2012**, *22*, 184–188, doi:10.1089/lap.2011.0115.
172. Modesitt, S.C.; Hallowell, P.T.; Slack-Davis, J.K.; Michalek, R.D.; Atkins, K.A.; Kelley, S.L.; Arapovic, S.; Shupnik, M.A.; Hoehn, K. Women at Extreme Risk for Obesity-Related Carcinogenesis: Baseline Endometrial Pathology and Impact of Bariatric Surgery on Weight, Metabolic Profiles and Quality of Life. *Gynecol Oncol* **2015**, *138*, 238–245, doi:10.1016/j.ygyno.2015.05.015.
173. Sarosiek, K.; Pappan, K.L.; Gandhi, A. v.; Saxena, S.; Kang, C.Y.; McMahon, H.; Chipitsyna, G.I.; Tichansky, D.S.; Arafat, H.A. Conserved Metabolic Changes in Nondiabetic and Type 2 Diabetic Bariatric Surgery Patients: Global Metabolomic Pilot Study. *J Diabetes Res* **2016**, *2016*, 1–10, doi:10.1155/2016/3467403.
174. Su, X.; Magkos, F.; Zhou, D.; Eagon, J.C.; Fabbrini, E.; Okunade, A.L.; Klein, S. Adipose Tissue Monomethyl Branched-Chain Fatty Acids and Insulin Sensitivity: Effects of Obesity and Weight Loss. *Obesity* **2015**, *23*, 329–334, doi:10.1002/oby.20923.
175. Hernandez-Carretero, A.; Weber, N.; la Frano, M.R.; Ying, W.; Lantero Rodriguez, J.; Sears, D.D.; Wallenius, V.; Börgeson, E.; Newman, J.W.; Osborn, O. Obesity-Induced Changes in Lipid Mediators Persist after Weight Loss. *Int J Obes* **2018**, *42*, 728–736, doi:10.1038/ijo.2017.266.
176. Cavin, J.B.; Voitellier, E.; Cluzeaud, F.; Kapel, N.; Marmuse, J.P.; Chevallier, J.M.; Msika, S.; Bado, A.; le Gall, M. Malabsorption and Intestinal Adaptation after One Anastomosis Gastric Bypass Compared with Roux-En-y Gastric Bypass in Rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **2016**, *311*, G492–G500, doi:10.1152/AJPGI.00197.2016/SUPPL_FILE/MOVIE_S1.MPG.
177. Tourky, M.; Issa, M.; Salman, M.A.; Salman, A.; Shaaban, H.E.-D.; Safina, A.; Elias, A.A.-K.; Elewa, A.; Noureldin, K.; Mahmoud, A.A.; et al. Nutritional Complications After Laparoscopic Roux-En-Y Gastric Bypass and One-Anastomosis Gastric Bypass: A Comparative Systematic Review and Meta-Analysis. *Cureus* **2022**, doi:10.7759/cureus.21114.
178. Mika, A.; Wilczynski, M.; Pakiet, A.; Kaska, L.; Proczko-stepaniak, M.; Stankiewicz, M.; Stepnowski, P.; Sledzinski, T. Short-Term Effect of One-Anastomosis Gastric

- Bypass on Essential Fatty Acids in the Serum of Obese Patients. *Nutrients* **2020**, *12*, 187, doi:10.3390/nu12010187.
179. García-Caballero, M.; Carbajo, M. One Anastomosis Gastric Bypass: A Simple, Safe and Efficient Surgical Procedure for Treating Morbid Obesity. *Nutr Hosp* **2004**, *19*, 372–375.
180. Olkowicz, M.; Debski, J.; Jablonska, P.; Dadlez, M.; Smolenski, R.T. Application of a New Procedure for Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Profiling of Plasma Amino Acid-Related Metabolites and Untargeted Shotgun Proteomics to Identify Mechanisms and Biomarkers of Calcific Aortic Stenosis. *J Chromatogr A* **2017**, *1517*, 66–78, doi:10.1016/J.CHROMA.2017.08.024.
181. Halinski, L.P.; Pakiet, A.; Jablonska, P.; Kaska, L.; Proczko-Stepaniak, M.; Slominska, E.; Sledzinski, T.; Mika, A. One Anastomosis Gastric Bypass Reconstitutes the Appropriate Profile of Serum Amino Acids in Patients with Morbid Obesity. *J Clin Med* **2019**, *9*, 100, doi:10.3390/jcm9010100.
182. Suleiman, J.; Mohamed, M.; Bakar, A. A Systematic Review on Different Models of Inducing Obesity in Animals: Advantages and Limitations. *J Adv Vet Anim Res* **2020**, *7*, 103, doi:10.5455/javar.2020.g399.
183. Folch, J.; Lees, M.; Sloane Stanley, G.H. A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipides from Animal Tissues. *J Biol Chem* **1957**, *226*, 497–509.
184. Kaluzny, M.A.; Duncan, L.A.; Merritt, M. v; Epps, D.E. Rapid Separation of Lipid Classes in High Yield and Purity Using Bonded Phase Columns. *J Lipid Res* **1985**, *26*, 135–140.
185. Bodenec, J.; Koul, O.; Aguado, I.; Brichon, G.; Zwingelstein, G.; Portoukalian, J. A Procedure for Fractionation of Sphingolipid Classes by Solid-Phase Extraction on Aminopropyl Cartridges. *J Lipid Res* **2000**, *41*, 1524–1531.
186. Dawson, G. Measuring Brain Lipids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **2015**, *1851*, 1026–1039, doi:10.1016/j.bbalip.2015.02.007.
187. Seppänen-Laakso, T.; Laakso, I.; Hiltunen, R. Analysis of Fatty Acids by Gas Chromatography, and Its Relevance to Research on Health and Nutrition. *Anal Chim Acta* **2002**, *465*, 39–62, doi:10.1016/S0003-2670(02)00397-5.
188. Aldai, N.; Murray, B.E.; Nájera, A.I.; Troy, D.J.; Osoro, K. Derivatization of Fatty Acids and Its Application for Conjugated Linoleic Acid Studies in Ruminant Meat Lipids. *J Sci Food Agric* **2005**, *85*, 1073–1083, doi:10.1002/JSFA.2110.
189. Pazda, M.; Stepnowski, P.; Śledziński, T.; Chmielewski, M.; Mika, A.; Sledzinski, T.; Chmielewski, M.; Mika, A. Suitability of Selected Chromatographic Columns for Analysis of Fatty Acids in Dialyzed Patients. *Biomedical Chromatography* **2017**, *31*, e4006, doi:10.1002/bmc.4006.

190. Tang, S.; Wan, M.; Huang, W.; Stanton, R.C.; Xu, Y. Maresins: Specialized Proresolving Lipid Mediators and Their Potential Role in Inflammatory-Related Diseases. *Mediators Inflamm* **2018**, *2018*, 1–8, doi:10.1155/2018/2380319.
191. Schulte, F.; Asbeutah, A.A.; Benotti, P.N.; Wood, G.C.; Still, C.; Bistrrian, B.R.; Hardt, M.; Welty, F.K. The Relationship between Specialized Pro-Resolving Lipid Mediators, Morbid Obesity and Weight Loss after Bariatric Surgery. *Sci Rep* **2020**, *10*, 20128, doi:10.1038/s41598-020-75353-6.
192. Gladine, C.; Ostermann, A.I.; Newman, J.W.; Schebb, N.H. MS-Based Targeted Metabolomics of Eicosanoids and Other Oxylipins: Analytical and Inter-Individual Variabilities. *Free Radic Biol Med* **2019**, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2019.05.012.
193. Galvão, A.F.; Petta, T.; Flamand, N.; Bollela, V.R.; Silva, C.L.; Jarduli, L.R.; Malmegrim, K.C.R.; Simões, B.P.; de Moraes, L.A.B.; Faccioli, L.H. Plasma Eicosanoid Profiles Determined by High-Performance Liquid Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometry in Stimulated Peripheral Blood from Healthy Individuals and Sickle Cell Anemia Patients in Treatment. *Anal Bioanal Chem* **2016**, *408*, 3613–3623, doi:10.1007/s00216-016-9445-8.
194. Chen, G.; Zhang, Q. Comprehensive Analysis of Oxylipins in Human Plasma Using Reversed-Phase Liquid Chromatography-Triple Quadrupole Mass Spectrometry with Heatmap-Assisted Selection of Transitions. *Anal Bioanal Chem* **2019**, *411*, 367–385, doi:10.1007/s00216-018-1446-3.
195. Kolmert, J.; Fauland, A.; Fuchs, D.; Säfholm, J.; Gómez, C.; Adner, M.; Dahlén, S.-E.; Wheelock, C.E. Lipid Mediator Quantification in Isolated Human and Guinea Pig Airways: An Expanded Approach for Respiratory Research. *Anal Chem* **2018**, *90*, 10239–10248, doi:10.1021/acs.analchem.8b01651.
196. Shabir, G.A. Validation of High-Performance Liquid Chromatography Methods for Pharmaceutical Analysis. *J Chromatogr A* **2003**, *987*, 57–66, doi:10.1016/S0021-9673(02)01536-4.
197. Burrows, R.; Parr, J. Evaluating the Goodness of Instrument Calibration for Chromatography Procedures. *LCGC Supplements* **2020**, *38*, 35–38.
198. Lê, S.; Josse, J.; Husson, F. FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis. *J Stat Softw* **2008**, *25*, 1–18, doi:10.18637/jss.v025.i01.
199. R Core Team R: A Language and Environment for Statistical Computing Online: <https://www.r-project.org/>.
200. Bro, R.; Smilde, A.K. Principal Component Analysis. *Analytical Methods* **2014**, *6*, 2812–2831, doi:10.1039/C3AY41907J.
201. Pakiet, A.; Haliński, Ł.P.; Rostkowska, O.; Kaska, Ł.; Proczko-Stepaniak, M.; Śledziński, T.; Mika, A. The Effects of One-Anastomosis Gastric Bypass on Fatty Acids

- in the Serum of Patients with Morbid Obesity. *Obes Surg* **2021**, *31*, 4264–4271, doi:10.1007/s11695-021-05531-6.
202. Pakiet, A.; Wilczynski, M.; Rostkowska, O.; Korczynska, J.; Jabłonska, P.; Kaska, L.; Proczko-Stepaniak, M.; Sobczak, E.; Stepnowski, P.; Magkos, F.; et al. The Effect of One Anastomosis Gastric Bypass on Branched-Chain Fatty Acid and Branched-Chain Amino Acid Metabolism in Subjects with Morbid Obesity. *Obes Surg* **2020**, *30*, 304–312, doi:10.1007/s11695-019-04157-z.
203. Jakobsson, A.; Westerberg, R.; Jacobsson, A. Fatty Acid Elongases in Mammals: Their Regulation and Roles in Metabolism. *Prog Lipid Res* **2006**, *45*, 237–249, doi:10.1016/j.plipres.2006.01.004.
204. Schwingshackl, L.; Zähringer, J.; Beyersbach, J.; Werner, S.S.; Nagavci, B.; Hesecker, H.; Koletzko, B.; Meerpohl, J.J. A Scoping Review of Current Guidelines on Dietary Fat and Fat Quality. *Ann Nutr Metab* **2021**, *77*, 65–82.
205. Wang, Y.; Torres-Gonzalez, M.; Tripathy, S.; Botolin, D.; Christian, B.; Jump, D.B. Elevated Hepatic Fatty Acid Elongase-5 Activity Affects Multiple Pathways Controlling Hepatic Lipid and Carbohydrate Composition*. *J Lipid Res* **2008**, *49*, 1538–1552, doi:10.1194/jlr.M800123-JLR200.
206. Huang, Y.-S.; Huang, W.-C.; Li, C.-W.; Chuang, L.-T. Eicosadienoic Acid Differentially Modulates Production of Pro-Inflammatory Modulators in Murine Macrophages. *Mol Cell Biochem* **2011**, *358*, 85–94, doi:10.1007/s11010-011-0924-0.
207. Ostermann, A.I.; Willenberg, I.; Schebb, N.H. Comparison of Sample Preparation Methods for the Quantitative Analysis of Eicosanoids and Other Oxylipins in Plasma by Means of LC-MS/MS. *Anal Bioanal Chem* **2015**, *407*, 1403–1414, doi:10.1007/s00216-014-8377-4.
208. Strassburg, K.; Mallet, C.; Duesterloh, A.; Bendik, I.; Hankemeier, T.; Langridge, J.; Vreeken, R.J.; Astarita, G. Targeted Lipidomics of Oxylipins (Oxygenated Fatty Acids). *Waters Application Note* **2015**, 1–11, doi:10.13140/RG.2.1.3943.9207.
209. Yang, J.; Schmelzer, K.; Georgi, K.; Hammock, B.D. Quantitative Profiling Method for Oxylipin Metabolome by Liquid Chromatography Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Anal Chem* **2009**, *81*, 8085–8093, doi:10.1021/ac901282n.
210. Gouveia-Figueira, S.; Späth, J.; Zivkovic, A.M.; Nording, M.L. Profiling the Oxylipin and Endocannabinoid Metabolome by UPLC-ESI-MS/MS in Human Plasma to Monitor Postprandial Inflammation. *PLoS One* **2015**, *10*, e0132042, doi:10.1371/journal.pone.0132042.
211. Möller, K.; Ostermann, A.I.; Rund, K.; Thoms, S.; Blume, C.; Stahl, F.; Hahn, A.; Schebb, N.H.; Schuchardt, J.P. Influence of Weight Reduction on Blood Levels of C-Reactive Protein, Tumor Necrosis Factor- α , Interleukin-6, and Oxylipins in Obese Subjects. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **2016**, *106*, 39–49, doi:10.1016/j.plefa.2015.12.001.

212. López, M.M. Obesity and Bariatric Surgery Modify Plasma Bioactive Lipid Species. Bachelor's Degree Final Project Biochemistry and Molecular Biology, Universitat Rovira i Virgili: Tarragona, 2021.
213. Grapov, D.; Fiehn, O.; Campbell, C.; Chandler, C.J.; Burnett, D.J.; Souza, E.C.; Casazza, G.A.; Keim, N.L.; Hunter, G.R.; Fernandez, J.R.; et al. Impact of a Weight Loss and Fitness Intervention on Exercise-associated Plasma Oxylipin Patterns in Obese, Insulin-resistant, Sedentary Women. *Physiol Rep* **2020**, *8*, doi:10.14814/phy2.14547.
214. Pauls, S.D.; Du, Y.; Clair, L.; Winter, T.; Aukema, H.M.; Taylor, C.G.; Zahradka, P. Impact of Age, Menopause, and Obesity on Oxylipins Linked to Vascular Health. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2021**, *41*, 883–897, doi:10.1161/ATVBAHA.120.315133.
215. Walker, M.E.; Matthan, N.R.; Goldbaum, A.; Meng, H.; Lamon-Fava, S.; Lakshman, S.; Jang, S.; Molokin, A.; Solano-Aguilar, G.; Urban, J.F.; et al. Dietary Patterns Influence Epicardial Adipose Tissue Fatty Acid Composition and Inflammatory Gene Expression in the Ossabaw Pig. *Journal of Nutritional Biochemistry* **2019**, *70*, 138–146, doi:10.1016/j.jnutbio.2019.04.013.
216. Horman, T.; Fernandes, M.F.; Tache, M.C.; Hucik, B.; Mutch, D.M.; Leri, F. Dietary N-6/N-3 Ratio Influences Brain Fatty Acid Composition in Adult Rats. *Nutrients* **2020**, *12*, 1–10, doi:10.3390/nu12061847.
217. Waśkiewicz, A.; Szcześniewska, D.; Szostak-Węgierek, D.; Kwaśniewska, M.; Pajak, A.; Stepaniak, U.; Kozakiewicz, K.; Tykarski, A.; Zdrojewski, T.; Zujko, M.E.; et al. Are Dietary Habits of the Polish Population Consistent with the Recommendations for Prevention of Cardiovascular Disease? - WOBASZ II Project. *Kardiol Pol* **2014**, *74*, 969–977, doi:10.5603/KP.a2016.0003.
218. Zatońska, K.; Campos, H.; Iłow, R.; Janik-Koncewicz, K.; Różańska, D.; Regulska-Iłow, B.; Poltyn-Zaradna, K.; Szuba, A.; Zatoński, W.A. Dietary Intake and Adipose Tissue Level of Specific Fatty Acids in a Selected Group from the Lower Silesia Population. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* **2012**, *19*, 389–394.
219. Bentsen, H. Dietary Polyunsaturated Fatty Acids, Brain Function and Mental Health. *Microb Ecol Health Dis* **2017**, *28*, 1281916, doi:10.1080/16512235.2017.1281916.
220. Olsen, A.S.B.; Færgeman, N.J. Sphingolipids: Membrane Microdomains in Brain Development, Function and Neurological Diseases. *Open Biol* **2017**, *7*, 170069, doi:10.1098/rsob.170069.
221. Posse de Chaves, E.; Sipione, S. Sphingolipids and Gangliosides of the Nervous System in Membrane Function and Dysfunction. *FEBS Lett* **2010**, *584*, 1748–1759, doi:10.1016/j.febslet.2009.12.010.
222. King, J.; Lowery, D.R. *Physiology, Cardiac Output*; StatPearls Publishing: Treasure Island (FL), 2022;

223. Drolet, M.C.; Roussel, E.; Deshaies, Y.; Couet, J.; Arsenault, M. A High Fat/High Carbohydrate Diet Induces Aortic Valve Disease in C57BL/6J Mice. *J Am Coll Cardiol* **2006**, *47*, 850–855, doi:10.1016/j.jacc.2005.09.049.
224. Calligaris, S.D.; Lecanda, M.; Solis, F.; Ezquer, M.; Gutiérrez, J.; Brandan, E.; Leiva, A.; Sobrevia, L.; Conget, P. Mice Long-Term High-Fat Diet Feeding Recapitulates Human Cardiovascular Alterations: An Animal Model to Study the Early Phases of Diabetic Cardiomyopathy. *PLoS One* **2013**, *8*, e60931, doi:10.1371/journal.pone.0060931.
225. Pakiet, A.; Jakubiak, A.; Mierzejewska, P.; Zwara, A.; Liakh, I.; Sledzinski, T.; Mika, A. The Effect of a High-Fat Diet on the Fatty Acid Composition in the Hearts of Mice. *Nutrients* **2020**, *12*, 824, doi:10.3390/nu12030824.
226. Drosatos, K.; Schulze, P.C. Cardiac Lipotoxicity: Molecular Pathways and Therapeutic Implications. *Curr Heart Fail Rep* **2013**, *10*, 109–121, doi:10.1007/s11897-013-0133-0.
227. Karlstaedt, A.; Schiffer, W.; Taegtmeyer, H. Actionable Metabolic Pathways in Heart Failure and Cancer—Lessons From Cancer Cell Metabolism. *Front Cardiovasc Med* **2018**, *5*.
228. Ravaut, G.; Légiot, A.; Bergeron, K.F.; Mounier, C. Monounsaturated Fatty Acids in Obesity-related Inflammation. *Int J Mol Sci* **2021**, *22*, 1–22.
229. Liakh, I.; Proczko-Stepaniak, M.; Sledzinski, M.; Mika, A. Serum Free Fatty Acid Levels and Insulin Resistance in Patients Undergoing One-Anastomosis Gastric Bypass. *Videosurgery and Other Miniinvasive Techniques* **2022**, *17*, 194–198, doi:10.5114/wiitm.2021.107754.
230. Budzyński, A.; Major, P.; Głuszek, S.; Kaseja, K.; Koszutski, T.; Leśniak, S.; Lewandowski, T.; Lipka, M.; Lisik, W.; Makarewicz, W.; et al. Polskie Rekomendacje w Zakresie Chirurgii Bariatrycznej i Metabolicznej. *Medycyna Praktyczna. Chirurgia* **2016**, *6*, 13–26.
231. Stenberg, E.; dos Reis Falcão, L.F.; O’Kane, M.; Liem, R.; Pournaras, D.J.; Salminen, P.; Urman, R.D.; Wadhwa, A.; Gustafsson, U.O.; Thorell, A. Guidelines for Perioperative Care in Bariatric Surgery: Enhanced Recovery After Surgery (ERAS) Society Recommendations: A 2021 Update. *World J Surg* **2022**, *46*, 729–751, doi:10.1007/s00268-021-06394-9.
232. Carter, J.; Chang, J.; Birriel, T.J.; Moustarah, F.; Sogg, S.; Goodpaster, K.; Benson-Davies, S.; Chapmon, K.; Eisenberg, D. ASMBS Position Statement on Preoperative Patient Optimization before Metabolic and Bariatric Surgery. *Surgery for Obesity and Related Diseases* **2021**, *17*, 1956–1976, doi:10.1016/j.soard.2021.08.024.
233. Palleschi, S.; Guglielmi, V.; Nisticò, L.; Ferreri, C.; Tabolacci, C.; Facchiano, F.; Iorio, E.; Giuliani, A.; Brescianini, S.; Medda, E.; et al. A Multi-Marker Integrative Analysis Reveals Benefits and Risks of Bariatric Surgery. *Sci Rep* **2022**, *12*, doi:10.1038/s41598-022-23241-6.

234. Immonen, H.; Hannukainen, J.C.; Kudomi, N.; Pihlajamäki, J.; Saunavaara, V.; Laine, J.; Salminen, P.; Lehtimäki, T.; Pham, T.; Iozzo, P.; et al. Increased Liver Fatty Acid Uptake Is Partly Reversed and Liver Fat Content Normalized After Bariatric Surgery. *Diabetes Care* **2018**, *41*, 368–371, doi:10.2337/dc17-0738.
235. Garla, P.; Sala, P.; Torrinhas, R.S.M.; Machado, N.M.; Fonseca, D.C.; da Silva, M.M.; Ravacci, G.R.; Belarmino, G.; Ishida, R.K.; Guarda, I.F.M.S.; et al. Reduced Intestinal FADS1 Gene Expression and Plasma Omega-3 Fatty Acids Following Roux-En-Y Gastric Bypass. *Clin Nutr* **2019**, *38*, 1280–1288, doi:10.1016/j.clnu.2018.05.011.
236. Yao, J.; Kovalik, J.-P.; Lai, O.F.; Lee, P.C.; Eng, A.; Chan, W.H.; Tham, K.W.; Lim, E.; Bee, Y.M.; Tan, H.C. Comprehensive Assessment of the Effects of Sleeve Gastrectomy on Glucose, Lipid, and Amino Acid Metabolism in Asian Individuals with Morbid Obesity. *Obes Surg* **2019**, *29*, 149–158, doi:10.1007/s11695-018-3487-2.
237. Imamura, F.; Fretts, A.; Marklund, M.; Ardisson Korat, A. v.; Yang, W.S.; Lankinen, M.; Qureshi, W.; Helmer, C.; Chen, T.A.; Wong, K.; et al. Fatty Acid Biomarkers of Dairy Fat Consumption and Incidence of Type 2 Diabetes: A Pooled Analysis of Prospective Cohort Studies. *PLoS Med* **2018**, *15*, doi:10.1371/journal.pmed.1002670.
238. Venn-Watson, S.; Lumpkin, R.; Dennis, E.A. Efficacy of Dietary Odd-Chain Saturated Fatty Acid Pentadecanoic Acid Parallels Broad Associated Health Benefits in Humans: Could It Be Essential? *Sci Rep* **2020**, *10*, 8161, doi:10.1038/s41598-020-64960-y.
239. Barłowska, J.; Pastuszka, R.; Domaradzki, P.; Król, J.; Brodziak, A.; Teter, A.; Rysiak, A. Fat Dispersion and Fatty Acid Profile, Including Health Indicators in Goat Milk from Different Flora Composition of Grazing Sites. *Anim Sci Pap Rep* **2019**, *37*, 365–377.
240. Picklo, M.J.; Kalscheur, K.F.; Magnuson, A.; Bukowski, M.R.; Harnly, J.; Fukagawa, N.K.; Finley, J.W. Identification of High and Low Branched-Chain Fatty Acid–Producing Phenotypes in Holstein Cows Following High-Forage and Low-Forage Diets in a Crossover Designed Trial. *Curr Dev Nutr* **2022**, *6*, doi:10.1093/cdn/nzab154.
241. Weitkunat, K.; Bishop, C.A.; Wittmüss, M.; Machate, T.; Schifelbein, T.; Schulze, M.B.; Klaus, S. Effect of Microbial Status on Hepatic Odd-Chain Fatty Acids Is Diet-Dependent. *Nutrients* **2021**, *13*, doi:10.3390/nu13051546.
242. Mika, A.; Janczy, A.; Waleron, K.; Szymanski, M.; Kaska, L.; Sledzinski, T. The Impact of the Interplay of the Intestinal Microbiome and Diet on the Metabolomic and Health Outcomes of Bariatric Surgery. *Obesity Reviews* **2022**, *23*, doi:10.1111/obr.13455.
243. Senter, S.D.; Horvat, R.J. Minor Fatty Acids from Pecan Kernel Lipids. *J Food Sci* **1978**, *43*, 1414–1415, doi:10.1111/j.1365-2621.1978.tb02506.x.
244. Rossi, A.; Martins, M.P.; Bitencourt, T.A.; Peres, N.T.A.; Rocha, C.H.L.; Rocha, F.M.G.; Neves-da-Rocha, J.; Lopes, M.E.R.; Sanches, P.R.; Bortolossi, J.C.; et al. Reassessing the Use of Undecanoic Acid as a Therapeutic Strategy for Treating Fungal Infections. *Mycopathologia* **2021**, *186*, 327–340, doi:10.1007/s11046-021-00550-4.

245. Aron-Wisnewsky, J.; Prifti, E.; Belda, E.; Ichou, F.; Kayser, B.D.; Dao, M.C.; Verger, E.O.; Hedjazi, L.; Bouillot, J.L.; Chevallier, J.M.; et al. Major Microbiota Dysbiosis in Severe Obesity: Fate after Bariatric Surgery. *Gut* **2019**, *68*, 70–82, doi:10.1136/gutjnl-2018-316103.
246. Zambon, S.; Romanato, G.; Sartore, G.; Marin, R.; Busetto, L.; Zanoni, S.; Favretti, F.; Sergi, G.; Fioretto, P.; Manzato, E. Bariatric Surgery Improves Atherogenic LDL Profile by Triglyceride Reduction. *Obes Surg* **2009**, *19*, 190–195, doi:10.1007/s11695-008-9644-2.
247. Middleton, A.L.O.; Byrne, J.P.; Calder, P.C. The Influence of Bariatric (Metabolic) Surgery on Blood Polyunsaturated Fatty Acids: A Systematic Review. *Clin Nutr ESPEN* **2022**, *48*, 121–140, doi:10.1016/j.clnesp.2022.02.001.
248. Lin, C.; Andersen, J.R.; Våge, V.; Rajalahti, T.; Mjøs, S.A.; Kvalheim, O.M. Intensive Lifestyle Intervention Provides Rapid Reduction of Serum Fatty Acid Levels in Women with Severe Obesity without Lowering Omega-3 to Unhealthy Levels. *Clin Obes* **2016**, *6*, 259–267, doi:10.1111/cob.12151.
249. Burdge, G.C. Is Essential Fatty Acid Interconversion an Important Source of PUFA in Humans? *British Journal of Nutrition* **2019**, *121*, 615–624, doi:10.1017/S0007114518003707.
250. Jastrzębska, M.; Ostrowska, L. Zalecenia Dietetyczne Po Zabiegach Bariatrycznych. *Forum Zaburzeń Metabolicznych* **2010**, *1*, 201–209.
251. Calder, P.C.; Grimble, R.F. Polyunsaturated Fatty Acids, Inflammation and Immunity. *Eur J Clin Nutr* **2002**, *56*, S14–S19, doi:10.1038/sj.ejcn.1601478.
252. Zhang, Y.Y.; Liu, W.; Zhao, T.Y.; Tian, H.M. Efficacy of Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids Supplementation in Managing Overweight and Obesity: A Meta-Analysis of Randomized Clinical Trials. *J Nutr Health Aging* **2017**, *21*, 187–192, doi:10.1007/s12603-016-0755-5.
253. Wang, Y.; Zhao, R.; Wan, Q.-Y.; Shen, X.-D.; Wu, X.-T.; Chen, J. Effects of Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acid Supplementation in Patients with Obesity Awaiting Bariatric Surgery. *Surgery for Obesity and Related Diseases* **2021**, *17*, 1226–1228, doi:10.1016/j.soard.2021.01.037.
254. Pradelli, L.; Mayer, K.; Muscaritoli, M.; Heller, A.R. N-3 Fatty Acid-Enriched Parenteral Nutrition Regimens in Elective Surgical and ICU Patients: A Meta-Analysis. *Crit Care* **2012**, *16*, R184, doi:10.1186/cc11668.
255. Sarkar, S.; Anokye-Danso, F.; Tronieri, J.S.; Millar, J.S.; Alamuddin, N.; Wadden, T.A.; Ahima, R.S. Differential Effects of Roux-En-Y Gastric Bypass Surgery and Laparoscopic Sleeve Gastrectomy on Fatty Acid Levels. *Obes Surg* **2019**, *29*, 3941–3947, doi:10.1007/s11695-019-04062-5.

256. Mildenberger, J.; Johansson, I.; Sergin, I.; Kjøbli, E.; Damås, J.K.; Razani, B.; Flo, T.H.; Bjørkøy, G. N-3 PUFAs Induce Inflammatory Tolerance by Formation of KEAP1-Containing SQSTM1/P62-Bodies and Activation of NFE2L2. *Autophagy* **2017**, *13*, 1664–1678, doi:10.1080/15548627.2017.1345411.
257. Todorčević, M.; Hodson, L. The Effect of Marine Derived N-3 Fatty Acids on Adipose Tissue Metabolism and Function. *J Clin Med* **2015**, *5*, 3, doi:10.3390/jcm5010003.
258. Stark, K.D.; Van Elswyk, M.E.; Higgins, M.R.; Weatherford, C.A.; Salem, N. Global Survey of the Omega-3 Fatty Acids, Docosahexaenoic Acid and Eicosapentaenoic Acid in the Blood Stream of Healthy Adults. *Prog Lipid Res* **2016**, *63*, 132–152.
259. Kurotani, K.; Sato, M.; Ejima, Y.; Nanri, A.; Yi, S.; Pham, N.M.; Akter, S.; Poudel-Tandukar, K.; Kimura, Y.; Imaizumi, K.; et al. High Levels of Stearic Acid, Palmitoleic Acid, and Dihomo- γ -Linolenic Acid and Low Levels of Linoleic Acid in Serum Cholesterol Ester Are Associated with High Insulin Resistance. *Nutrition Research* **2012**, *32*, doi:10.1016/j.nutres.2012.07.004.
260. Steffen, B.T.; Steffen, L.M.; Tracy, R.; Siscovick, D.; Hanson, N.Q.; Nettleton, J.; Tsai, M.Y. Obesity Modifies the Association between Plasma Phospholipid Polyunsaturated Fatty Acids and Markers of Inflammation: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Int J Obes* **2012**, *36*, 797–804, doi:10.1038/ijo.2011.157.
261. Bird, J.K.; Troesch, B.; Warnke, I.; Calder, P.C. The Effect of Long Chain Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids on Muscle Mass and Function in Sarcopenia: A Scoping Systematic Review and Meta-Analysis. *Clin Nutr ESPEN* **2021**, *46*, 73–86, doi:10.1016/j.clnesp.2021.10.011.
262. Warensjö, E.; Jansson, J.-H.; Berglund, L.; Boman, K.; Åhrén, B.; Weinehall, L.; Lindahl, B.; Hallmans, G.; Vessby, B. Estimated Intake of Milk Fat Is Negatively Associated with Cardiovascular Risk Factors and Does Not Increase the Risk of a First Acute Myocardial Infarction. A Prospective Case–Control Study. *British Journal of Nutrition* **2004**, *91*, 635–642, doi:10.1079/BJN20041080.
263. Ferreira Nicoletti, C.; Morandi Junqueira-Franco, M.V.; dos Santos, J.E.; Sergio Marchini, J.; Junior, W.S.; Nonino, C.B. Protein and Amino Acid Status before and after Bariatric Surgery: A 12-Month Follow-up Study. *Surgery for Obesity and Related Diseases* **2013**, *9*, 1008–1012, doi:10.1016/j.soard.2013.07.004.
264. Palau-Rodriguez, M.; Tulipani, S.; Marco-Ramell, A.; Miñarro, A.; Jáuregui, O.; Sanchez-Pla, A.; Ramos-Molina, B.; Tinahones, F.J.; Andres-Lacueva, C. Metabotypes of Response to Bariatric Surgery Independent of the Magnitude of Weight Loss. *PLoS One* **2018**, *13*, doi:10.1371/journal.pone.0198214.
265. Siddik, M.A.B.; Shin, A.C. Recent Progress on Branched-Chain Amino Acids in Obesity, Diabetes, and Beyond. *Endocrinology and Metabolism* **2019**, *34*, 234, doi:10.3803/EnM.2019.34.3.234.

266. Lackey, D.E.; Lynch, C.J.; Olson, K.C.; Mostaedi, R.; Ali, M.; Smith, W.H.; Karpe, F.; Humphreys, S.; Bedinger, D.H.; Dunn, T.N.; et al. Regulation of Adipose Branched-Chain Amino Acid Catabolism Enzyme Expression and Cross-Adipose Amino Acid Flux in Human Obesity. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **2013**, *304*, E1175–E1187, doi:10.1152/ajpendo.00630.2012.
267. Boulet, M.M.; Chevrier, G.; Grenier-Larouche, T.; Pelletier, M.; Nadeau, M.; Scarpa, J.; Prehn, C.; Marette, A.; Adamski, J.; Tchernof, A. Alterations of Plasma Metabolite Profiles Related to Adipose Tissue Distribution and Cardiometabolic Risk. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **2015**, *309*, E736–E746, doi:10.1152/ajpendo.00231.2015.
268. Pietiläinen, K.H.; Naukkarinen, J.; Rissanen, A.; Saharinen, J.; Ellonen, P.; Keränen, H.; Suomalainen, A.; Götz, A.; Suortti, T.; Yki-Järvinen, H.; et al. Global Transcript Profiles of Fat in Monozygotic Twins Discordant for BMI: Pathways behind Acquired Obesity. *PLoS Med* **2008**, *5*, e51, doi:10.1371/journal.pmed.0050051.
269. She, P.; Van Horn, C.; Reid, T.; Hutson, S.M.; Cooney, R.N.; Lynch, C.J. Obesity-Related Elevations in Plasma Leucine Are Associated with Alterations in Enzymes Involved in Branched-Chain Amino Acid Metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **2007**, *293*, E1552-63, doi:10.1152/ajpendo.00134.2007.
270. Shin, A.C.; Fasshauer, M.; Filatova, N.; Grundell, L.A.; Zielinski, E.; Zhou, J.-Y.; Scherer, T.; Lindtner, C.; White, P.J.; Lapworth, A.L.; et al. Brain Insulin Lowers Circulating BCAA Levels by Inducing Hepatic BCAA Catabolism. *Cell Metab* **2014**, *20*, 898–909, doi:10.1016/j.cmet.2014.09.003.
271. Gojda, J.; Cahova, M. Gut Microbiota as the Link between Elevated BCAA Serum Levels and Insulin Resistance. *Biomolecules* **2021**, *11*, 1414, doi:10.3390/biom11101414.
272. Kaniel, O.; Sherf-Dagan, S.; Szold, A.; Langer, P.; Khalfin, B.; Kessler, Y.; Raziel, A.; Sakran, N.; Motro, Y.; Goitein, D.; et al. The Effects of One Anastomosis Gastric Bypass Surgery on the Gastrointestinal Tract. *Nutrients* **2022**, *14*, 304, doi:10.3390/nu14020304.
273. Shearer, G.C.; Walker, R.E. An Overview of the Biologic Effects of Omega-6 Oxylipins in Humans. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **2018**, *137*, 26–38, doi:10.1016/j.plefa.2018.06.005.
274. Späth, J. Oxylipins in Human Plasma – Method Development and Dietary Effects on Levels. Degree Thesis in Chemistry Master's Level, Umeå Universitet: Umeå, 2014.
275. Straus, D.S.; Pascual, G.; Li, M.; Welch, J.S.; Ricote, M.; Hsiang, C.-H.; Sengchanthalangsy, L.L.; Ghosh, G.; Glass, C.K. 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J₂ Inhibits Multiple Steps in the NF- κ B Signaling Pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2000**, *97*, 4844–4849, doi:10.1073/pnas.97.9.4844.

276. Osborn, O.; Gram, H.; Zorrilla, E.; Conti, B.; Bartfai, T. Insights into the Roles of the Inflammatory Mediators IL-1, IL-18 and PGE2 in Obesity and Insulin Resistance. *Swiss Med Wkly* **2008**, *008*, 665–673, doi:10.4414/smw.2008.12276.
277. Jurado-Fasoli, L.; Di, X.; Kohler, I.; Osuna-Prieto, F.J.; Hankemeier, T.; Krekels, E.; Harms, A.C.; Yang, W.; Garcia-Lario, J. v.; Fernández-Veledo, S.; et al. Omega-6 and Omega-3 Oxylipins as Potential Markers of Cardiometabolic Risk in Young Adults. *Obesity* **2022**, *30*, 50–61, doi:10.1002/oby.23282.
278. Choi, J.; Joseph, L.; Pilote, L. Obesity and C-Reactive Protein in Various Populations: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Obesity Reviews* **2013**, *14*, 232–244.
279. Schuchardt, J.P.; Schmidt, S.; Kressel, G.; Dong, H.; Willenberg, I.; Hammock, B.D.; Hahn, A.; Schebb, N.H. Comparison of Free Serum Oxylipin Concentrations in Hyper- vs. Normolipidemic Men. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **2013**, *89*, 19–29, doi:10.1016/j.plefa.2013.04.001.
280. Wolfer, A.M.; Scott, A.J.; Rueb, C.; Gaudin, M.; Darzi, A.; Nicholson, J.K.; Holmes, E.; Kinross, J.M. Longitudinal Analysis of Serum Oxylipin Profile as a Novel Descriptor of the Inflammatory Response to Surgery. *J Transl Med* **2017**, *15*, 83, doi:10.1186/s12967-017-1171-2.
281. Strassburg, K.; Huijbrechts, A.M.L.; Kortekaas, K.A.; Lindeman, J.H.; Pedersen, T.L.; Dane, A.; Berger, R.; Brenkman, A.; Hankemeier, T.; van Duynhoven, J.; et al. Quantitative Profiling of Oxylipins through Comprehensive LC-MS/MS Analysis: Application in Cardiac Surgery. *Anal Bioanal Chem* **2012**, *404*, 1413–1426, doi:10.1007/s00216-012-6226-x.
282. Kanaoka, Y.; Austen, K.F. Roles of Cysteinyl Leukotrienes and Their Receptors in Immune Cell-Related Functions. In *Advances in Immunology*; Alt, F., Ed.; Elsevier, 2019; Vol. 142, pp. 65–84.
283. Villarreal-Calderon, J.R.; Cuellar-Tamez, R.; Castillo, E.C.; Luna-Ceron, E.; García-Rivas, G.; Elizondo-Montemayor, L. Metabolic Shift Precedes the Resolution of Inflammation in a Cohort of Patients Undergoing Bariatric and Metabolic Surgery. *Sci Rep* **2021**, *11*, 12127, doi:10.1038/s41598-021-91393-y.
284. Storniolo, C.E.; Pequera, M.; Company, F.; Moreno, J.J. 12(S)-Hydroxyheptadeca-5Z,8E,10E-Trienoic Acid (12-HHT) Induces Cell Growth and Improves Barrier Function through BLT2 Interaction in Intestinal Epithelial Caco-2 Cell Cultures. *Biochem Pharmacol* **2021**, *190*, doi:10.1016/j.bcp.2021.114663.
285. Roman, R.J.; Fan, F. 20-HETE. *Hypertension* **2018**, *72*, 12–18, doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.10269.
286. Ekeloef, S.; Godthaab, C.; Schou-Pedersen, A.M. v.; Lykkesfeldt, J.; Gögenur, I. Peri-Operative Endothelial Dysfunction in Patients Undergoing Minor Abdominal Surgery. *Eur J Anaesthesiol* **2019**, *36*, 130–134, doi:10.1097/EJA.0000000000000935.

287. Graziani, F.; Biasucci, L.M.; Cialdella, P.; Liuzzo, G.; Giubilato, S.; della Bona, R.; Pulcinelli, F.M.; Iaconelli, A.; Mingrone, G.; Crea, F. Thromboxane Production in Morbidly Obese Subjects. *Am J Cardiol* **2011**, *107*, 1656–1661, doi:10.1016/j.amjcard.2011.01.053.
288. Finck, B.N.; Han, X.; Courtois, M.; Aimond, F.; Nerbonne, J.M.; Kovacs, A.; Gross, R.W.; Kelly, D.P. A Critical Role for PPAR α -Mediated Lipotoxicity in the Pathogenesis of Diabetic Cardiomyopathy: Modulation by Dietary Fat Content. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2003**, *100*, 1226–1231, doi:10.1073/pnas.0336724100.
289. Zeng, H.; Vaka, V.R.; He, X.; Booz, G.W.; Chen, J.X. High-Fat Diet Induces Cardiac Remodelling and Dysfunction: Assessment of the Role Played by SIRT3 Loss. *J Cell Mol Med* **2015**, *19*, 1847–1856, doi:10.1111/jcmm.12556.
290. Ternacle, J.; Wan, F.; Sawaki, D.; Surenaud, M.; Pini, M.; Mercedes, R.; Ernande, L.; Audureau, E.; Dubois-Rande, J.L.; Adnot, S.; et al. Short-Term High-Fat Diet Compromises Myocardial Function: A Radial Strain Rate Imaging Study. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging* **2017**, *18*, 1283–1291, doi:10.1093/ehjci/jew316.
291. Hofmann, B.; Yakobus, Y.; Indrasari, M.; Nass, N.; Santos, A.N.; Kraus, F.B.; Silber, R.E.; Simm, A. RAGE Influences the Development of Aortic Valve Stenosis in Mice on a High Fat Diet. *Exp Gerontol* **2014**, *59*, 13–20, doi:10.1016/j.exger.2014.05.001.
292. Brainard, R.E.; Watson, L.J.; DeMartino, A.M.; Brittan, K.R.; Readnower, R.D.; Boakye, A.A.; Zhang, D.; Hoetker, J.D.; Bhatnagar, A.; Baba, S.P.; et al. High Fat Feeding in Mice Is Insufficient to Induce Cardiac Dysfunction and Does Not Exacerbate Heart Failure. *PLoS One* **2013**, *8*, doi:10.1371/journal.pone.0083174.
293. Tadinada, S.M.; Weatherford, E.T.; Collins, G. v.; Bhardwaj, G.; Cochran, J.; Kutschke, W.; Zimmerman, K.; Bosko, A.; O'Neill, B.T.; Weiss, R.M.; et al. Functional Resilience of C57bl/6j Mouse Heart to Dietary Fat Overload. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **2021**, *321*, H850–H864, doi:10.1152/ajpheart.00419.2021.
294. Wilson, C.R.; Tran, M.K.; Salazar, K.L.; Young, M.E.; Taegtmeier, H. Western Diet, but Not High Fat Diet, Causes Derangements of Fatty Acid Metabolism and Contractile Dysfunction in the Heart of Wistar Rats. *Biochemical Journal* **2007**, *406*, 457–467, doi:10.1042/BJ20070392.
295. Altromin C 1090 - 60, Obesity-Inducing Diet with w/60% Energy from Fat (35%fat) Online: <https://altromin.com/products/specialdiets/highfatdiets/C1090-60> (dostęp z 12 12 2022).
296. Hussain, G.; Schmitt, F.; Loeffler, J.-P.; Aguilar, J.-L.G. de Fattening the Brain: A Brief of Recent Research. *Front Cell Neurosci* **2013**, *7*, 1–14, doi:10.3389/fncel.2013.00144.
297. Borsini, A.; Nicolaou, A.; Camacho-Muñoz, D.; Kendall, A.C.; di Benedetto, M.G.; Giacobbe, J.; Su, K.P.; Pariente, C.M. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids Protect against Inflammation through Production of LOX and CYP450 Lipid Mediators:

- Relevance for Major Depression and for Human Hippocampal Neurogenesis. *Mol Psychiatry* **2021**, *26*, 6773–6788, doi:10.1038/s41380-021-01160-8.
298. Bazinet, R.P.; Layé, S. Polyunsaturated Fatty Acids and Their Metabolites in Brain Function and Disease. *Nat Rev Neurosci* **2014**, *15*, 771–785, doi:10.1038/nrn3820.
299. Chen, C.T.; Haven, S.; Lecaj, L.; Borgstrom, M.; Torabi, M.; Sangiovanni, J.P.; Hibbeln, J.R. Brain PUFA Concentrations Are Differentially Affected by Interactions of Diet, Sex, Brain Regions, and Phospholipid Pools in Mice. *Journal of Nutrition* **2020**, *150*, 3123–3132, doi:10.1093/jn/nxaa307.
300. Chen, C.T.; Bazinet, R.P. β -Oxidation and Rapid Metabolism, but Not Uptake Regulate Brain Eicosapentaenoic Acid Levels. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **2015**, *92*, 33–40, doi:10.1016/j.plefa.2014.05.007.
301. Galli, C.; Risé, P. Origin of Fatty Acids in the Body: Endogenous Synthesis versus Dietary Intakes. *European Journal of Lipid Science and Technology* **2006**, *108*, 521–525, doi:10.1002/ejlt.200600056.
302. Ramsden, C.E.; Hennebelle, M.; Schuster, S.; Keyes, G.S.; Johnson, C.D.; Kirpich, I.A.; Dahlen, J.E.; Horowitz, M.S.; Zamora, D.; Feldstein, A.E.; et al. Effects of Diets Enriched in Linoleic Acid and Its Peroxidation Products on Brain Fatty Acids, Oxylipins, and Aldehydes in Mice. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **2018**, *1863*, 1206–1213, doi:10.1016/j.bbalip.2018.07.007.
303. Valenzuela, R.; Echeverria, F.; Ortiz, M.; Rincón-Cervera, M.Á.; Espinosa, A.; Hernandez-Rodas, M.C.; Illesca, P.; Valenzuela, A.; Videla, L.A. Hydroxytyrosol Prevents Reduction in Liver Activity of Δ -5 and Δ -6 Desaturases, Oxidative Stress, and Depletion in Long Chain Polyunsaturated Fatty Acid Content in Different Tissues of High-Fat Diet Fed Mice. *Lipids Health Dis* **2017**, *16*, doi:10.1186/s12944-017-0450-5.
304. Ferdouse, A.; Leng, S.; Winter, T.; Aukema, H.M. The Brain Oxylipin Profile Is Resistant to Modulation by Dietary n-6 and n-3 Polyunsaturated Fatty Acids in Male and Female Rats. *Lipids* **2019**, *54*, 67–80, doi:10.1002/lipd.12122.
305. Ostermann, A.I.; Waindok, P.; Schmidt, M.J.; Chiu, C.-Y.; Smyl, C.; Rohwer, N.; Weylandt, K.-H.; Schebb, N.H. Modulation of the Endogenous Omega-3 Fatty Acid and Oxylipin Profile in Vivo—A Comparison of the Fat-1 Transgenic Mouse with C57BL/6 Wildtype Mice on an Omega-3 Fatty Acid Enriched Diet. *PLoS One* **2017**, *12*, e0184470, doi:10.1371/journal.pone.0184470.
306. Shen, Q.; Liang, N.; Patten, K.T.; Otoki, Y.; Valenzuela, A.E.; Wallis, C.; Bein, K.J.; Wexler, A.S.; Lein, P.J.; Taha, A.Y. Pro-Resolving Lipid Mediators within Brain Esterified Lipid Pools Are Reduced in Female Rats. *preprint* **2021**, doi:https://doi.org/10.1101/2022.02.16.480656.
307. Taha, A.Y.; Hennebelle, M.; Yang, J.; Zamora, D.; Rapoport, S.I.; Hammock, B.D.; Ramsden, C.E. Regulation of Rat Plasma and Cerebral Cortex Oxylipin Concentrations

- with Increasing Levels of Dietary Linoleic Acid. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **2018**, *138*, 71–80, doi:10.1016/j.plefa.2016.05.004.
308. Hajeyah, A.A.; Griffiths, W.J.; Wang, Y.; Finch, A.J.; O'Donnell, V.B. The Biosynthesis of Enzymatically Oxidized Lipids. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2020, *11*.
309. Tu, C.-H.; Chen, C.-M.; Yang, C.-C.; Gałeczki, P.; Su, K.-P. Brain Responses to Emotional Stimuli after Eicosapentaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid Treatments in Major Depressive Disorder: Toward Personalized Medicine with Anti-Inflammatory Nutraceuticals. *J Pers Med* **2020**, *10*, 283, doi:10.3390/jpm10040283.
310. Rutkowsky, J.M.; Lee, L.L.; Puchowicz, M.; Golub, M.S.; Befroy, D.E.; Wilson, D.W.; Anderson, S.; Cline, G.; Bini, J.; Borkowski, K.; et al. Reduced Cognitive Function, Increased Blood-Brain-Barrier Transport and Inflammatory Responses, and Altered Brain Metabolites in LDLr ^{-/-} and C57BL/6 Mice Fed a Western Diet. *PLoS One* **2018**, *13*, e0191909, doi:10.1371/journal.pone.0191909.
311. Lassek, W.D.; Gaulin, S.J.C. Sex Differences in the Relationship of Dietary Fatty Acids to Cognitive Measures in American Children. *Front Evol Neurosci* **2011**, *3*, doi:10.3389/fnevo.2011.00005.
312. Cole, M.A.; Murray, A.J.; Cochlin, L.E.; Heather, L.C.; McAleese, S.; Knight, N.S.; Sutton, E.; Jamil, A.A.; Parassol, N.; Clarke, K. A High Fat Diet Increases Mitochondrial Fatty Acid Oxidation and Uncoupling to Decrease Efficiency in Rat Heart. *Basic Res Cardiol* **2011**, *106*, 447–457, doi:10.1007/s00395-011-0156-1.
313. Emelyanova, L.; Boukatina, A.; Myers, C.; Oyarzo, J.; Lustgarten, J.; Shi, Y.; Jahangir, A. High Calories but Not Fat Content of Lard-Based Diet Contribute to Impaired Mitochondrial Oxidative Phosphorylation in C57BL/6J Mice Heart. *PLoS One* **2019**, *14*, doi:10.1371/journal.pone.0217045.
314. Zukowska, P.; Kutryb-Zajac, B.; Jaształ, A.; Toczek, M.; Zabielska, M.; Borkowski, T.; Khalpey, Z.; Smolenski, R.T.; Slominska, E.M. Deletion of CD73 in Mice Leads to Aortic Valve Dysfunction. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **2017**, *1863*, 1464–1472, doi:10.1016/j.bbadis.2017.02.008.
315. Havmoeller, R.; Reinier, K.; Teodorescu, C.; Ahmadi, N.; Kwok, D.; Uy-Evanado, A.; Chen, Y.-D.I.; Rotter, J.I.; Gunson, K.; Jui, J.; et al. Elevated Plasma Free Fatty Acids Are Associated with Sudden Death: A Prospective Community-Based Evaluation at the Time of Cardiac Arrest. *Heart Rhythm* **2014**, *11*, 691–696, doi:10.1016/j.hrthm.2014.01.012.
316. Djoussé, L.; Benkeser, D.; Arnold, A.; Kizer, J.R.; Zieman, S.J.; Lemaitre, R.N.; Tracy, R.P.; Gottdiener, J.S.; Mozaffarian, D.; Siscovick, D.S.; et al. Plasma Free Fatty Acids and Risk of Heart Failure. *Circ Heart Fail* **2013**, *6*, 964–969, doi:10.1161/CIRCHEARTFAILURE.113.000521.
317. Kalaivanisailaja, J.; Manju, V.; Nalini, N. Lipid Profile in Mice Fed a High-Fat Diet after Exogenous Leptin Administration. *Pol J Pharmacol* **2003**, *55*, 763–769.

318. Harmancey, R.; Wilson, C.R.; Wright, N.R.; Taegtmeier, H. Western Diet Changes Cardiac Acyl-CoA Composition in Obese Rats: A Potential Role for Hepatic Lipogenesis. *J Lipid Res* **2010**, *51*, 1380–1393, doi:10.1194/jlr.M001230.
319. Peterson, L.R.; Herrero, P.; Schechtman, K.B.; Racette, S.B.; Waggoner, A.D.; Kisrieva-Ware, Z.; Dence, C.; Klein, S.; Marsala, J.; Meyer, T.; et al. Effect of Obesity and Insulin Resistance on Myocardial Substrate Metabolism and Efficiency in Young Women. *Circulation* **2004**, *109*, 2191–2196, doi:10.1161/01.CIR.0000127959.28627.F8.
320. Nguyen, T.D.; Schulze, P.C. Lipid in the Midst of Metabolic Remodeling – Therapeutic Implications for the Failing Heart. *Adv Drug Deliv Rev* **2020**, *159*, 120–132, doi:10.1016/j.addr.2020.08.004.
321. Listenberger, L.L.; Han, X.; Lewis, S.E.; Cases, S.; Farese, R. v.; Ory, D.S.; Schaffer, J.E. Triglyceride Accumulation Protects against Fatty Acid-Induced Lipotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2003**, *100*, 3077–3082, doi:10.1073/pnas.0630588100.
322. Shao, D.; Kolwicz, S.C.; Wang, P.; Roe, N.D.; Villet, O.; Nishi, K.; Hsu, Y.W.A.; Flint, G. v.; Caudal, A.; Wang, W.; et al. Increasing Fatty Acid Oxidation Prevents High-Fat Diet-Induced Cardiomyopathy Through Regulating Parkin-Mediated Mitophagy. *Circulation* **2020**, *142*, 983–997, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.119.043319.
323. Peoples, J.N.; Saraf, A.; Ghazal, N.; Pham, T.T.; Kwong, J.Q. Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in Heart Disease. *Exp Mol Med* 2019, *51*.
324. Chen, B.; Huang, Y.; Zheng, D.; Ni, R.; Bernards, M.A. Dietary Fatty Acids Alter Lipid Profiles and Induce Myocardial Dysfunction without Causing Metabolic Disorders in Mice. *Nutrients* **2018**, *10*, 106, doi:10.3390/nu10010106.
325. Leger, T.; Hininger-Favier, I.; Capel, F.; Geloën, A.; Rigaudière, J.-P.; Jouve, C.; Pitois, E.; Pineau, G.; Vaysse, C.; Chardigny, J.-M.; et al. Dietary Canolol Protects the Heart against the Deleterious Effects Induced by the Association of Rapeseed Oil, Vitamin E and Coenzyme Q10 in the Context of a High-Fat Diet. *Nutr Metab (Lond)* **2018**, *15*, 15, doi:10.1186/s12986-018-0252-4.
326. Watkins, S.M.; Lin, T.Y.; Davis, R.M.; Ching, J.R.; DePeters, E.J.; Halpern, G.M.; Walzem, R.L.; German, J.B. Unique Phospholipid Metabolism in Mouse Heart in Response to Dietary Docosahexaenoic or α -Linolenic Acids. *Lipids* **2001**, *36*, 247–254, doi:10.1007/s11745-001-0714-8.
327. Reubsæet, F.A.G.; Veerkamp, J.H.; Trijbels, J.M.F.; Monnens, L.A.H. Total and Peroxisomal Oxidation of Various Saturated and Unsaturated Fatty Acids in Rat Liver, Heart and m. Quadriceps. *Lipids* **1989**, *24*, 945–950.
328. Ferdouse, A.; Leng, S.; Winter, T.; Aukema, H.M. Dietary N-6 and n-3 PUFA Alter the Free Oxylin Profile Differently in Male and Female Rat Hearts. *British Journal of Nutrition* **2019**, *122*, 252–261, doi:10.1017/S0007114519001211.

329. Hara, M.; Sakata, Y.; Nakatani, D.; Suna, S.; Usami, M.; Matsumoto, S.; Hamasaki, T.; Doi, Y.; Nishino, M.; Sato, H.; et al. Low Levels of Serum N-3 Polyunsaturated Fatty Acids Are Associated with Worse Heart Failure-Free Survival in Patients after Acute Myocardial Infarction. *Circulation Journal* **2013**, *77*, 153–162, doi:10.1253/circj.CJ-12-0875.
330. Siniarski, A.; Gajos, G. Polyunsaturated Fatty Acids in Cardiovascular Diseases: Uncertainty Prevails. *Pol Arch Intern Med* 2021, *131*, 716–723.
331. Murphy, K.A.; Harsch, B.A.; Healy, C.L.; Joshi, S.S.; Huang, S.; Walker, R.E.; Wagner, B.M.; Ernste, K.M.; Huang, W.; Block, R.C.; et al. Free Fatty Acid Receptor 4 Responds to Endogenous Fatty Acids to Protect the Heart from Pressure Overload. *Cardiovasc Res* **2022**, *118*, 1061–1073, doi:10.1093/cvr/cvab111.
332. Takashima, A.; Fukuda, D.; Tanaka, K.; Higashikuni, Y.; Hirata, Y.; Nishimoto, S.; Yagi, S.; Yamada, H.; Soeki, T.; Wakatsuki, T.; et al. Combination of N-3 Polyunsaturated Fatty Acids Reduces Atherogenesis in Apolipoprotein E-Deficient Mice by Inhibiting Macrophage Activation. *Atherosclerosis* **2016**, *254*, 142–150, doi:10.1016/j.atherosclerosis.2016.10.002.
333. Drenjančević, I.; Pitha, J. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids—Vascular and Cardiac Effects on the Cellular and Molecular Level (Narrative Review). *Int J Mol Sci* 2022, *23*.

10 SPIS TABEL

Tabela 1.1 Stosowane skróty nazw wielonienasyconych kwasów tłuszczowych _____	I
Tabela 1.2 Stosowane skróty nazw oksylipin _____	5
Tabela 2.1 Klasyfikacja masy ciała dorosłych osób według wskaźnika BMI _____	7
Tabela 2.2 Przykładowe czynniki powodujące wystąpienie otyłości _____	10
Tabela 2.3 Ryzyko względne wystąpienia choroby współistniejącej wśród osób z otyłością _____	13
Tabela 2.4 Stosowane skróty dla rozgałęzionych kwasów tłuszczowych _____	30
Tabela 2.5 Przykładowe oksylipiny i ich rola w stanach chorobowych u ludzi _____	36
Tabela 2.6 Zmiany w profilach kwasów tłuszczowych odnotowane po operacjach bariatrycznych _____	41
Tabela 4.1 Warunki analizy aminokwasów za pomocą LC-MS _____	54
Tabela 4.2 Roztwory zastosowane podczas frakcjonowania lipidów metodą I _____	64
Tabela 4.3 Roztwory zastosowane podczas frakcjonowania lipidów metodą II _____	65
Tabela 4.4 Warunki analizy GC-MS kwasów tłuszczowych _____	67
Tabela 4.5 Charakterystyka analitów _____	69
Tabela 4.6 Warunki rozdziału chromatograficznego oksylipin. _____	78
Tabela 4.7 Parametry spektrometru mas w trybie pracy MRM. _____	79
Tabela 5.1 Dane antropometryczne i parametry biochemiczne grupy kontrolnej (LC) pacjentów z otyłością przed operacją OAGB (pre-OAGB) i pacjentów 2 tygodnie po operacji OAGB (FU1) _____	87
Tabela 5.2 Dane antropometryczne i parametry biochemiczne grupy kontrolnej (LC) pacjentów z otyłością przed operacją OAGB (pre-OAGB) i pacjentów 6-9 miesięcy po operacji OAGB (FU2) _____	87
Tabela 5.3 Indeksy wydłużania i desaturacji kwasów tłuszczowych obliczone na podstawie zawartości procentowej kwasów tłuszczowych w tkance tłuszczowej pacjentów z otyłością olbrzymią (MO) i zdrowej grupy kontrolnej _____	91
Tabela 5.4 Profil kwasów tłuszczowych [% zawartości] oznaczony za pomocą GC-MS w surowicy grupy kontrolnej (LC) pacjentów z otyłością przed operacją OAGB (pre-OAGB) i pacjentów 2 tygodnie po operacji OAGB (FU1) _____	95

Tabela 5.5 Profil kwasów tłuszczowych [% zawartości] oznaczony za pomocą GC-MS w surowicy grupy kontrolnej (LC) pacjentów z otyłością przed operacją OAGB (pre-OAGB) i pacjentów 6-9 miesięcy po operacji OAGB (FU2)	99
Tabela 5.6 Stężenie rozgałęzionych aminokwasów w surowicy pacjentów z otyłością przed operacją OAGB (pre-OAGB) i pacjentów 6-9 miesięcy po operacji OAGB (FU2), w porównaniu z grupą kontrolną (LC)	106
Tabela 5.7 Zakresy liniowości i parametry modelu regresji liniowej dla oksylipin oznaczanych techniką SPE-LC-MS/MS w surowicy krwi	112
Tabela 5.8 Dokładność, powtarzalność i odzysk metody SPE-LC-MS/MS oznaczania stężenia oksylipin w surowicy krwi	114
Tabela 5.9 Wielonienasycone kwasy tłuszczowe [% zawartości] we frakcjach lipidowych otrzymanych w wyniku rozdziału ekstraktów lipidów z mózgow myszy eksperymentalnych metodą I	125
Tabela 5.10 Wielonienasycone kwasy tłuszczowe [% zawartości] we frakcjach lipidowych otrzymanych w wyniku rozdziału ekstraktów lipidów z mózgow myszy eksperymentalnych metodą II	126
Tabela 5.11 Wyniki badania echokardiograficznego myszy karmionych różnymi dietami	127
Tabela 5.12 Wyniki oznaczania parametrów biochemicznych w tkance mięśnia sercowego i surowicy myszy	128
Tabela 5.13 Najważniejsze kwasy tłuszczowe [% zawartości] we frakcjach lipidowych otrzymanych w wyniku rozdziału ekstraktów lipidów z serc myszy eksperymentalnych metodą I	130
Tabela 5.14 Najważniejsze kwasy tłuszczowe [% zawartości] we frakcjach lipidowych otrzymanych w wyniku rozdziału ekstraktów lipidów z serc myszy eksperymentalnych metodą II	131
Tabela 6.1 Zestawienie stężeń oksylipin we krwi pacjentów z otyłością i kierunku zmiany ich stężenia w przeprowadzonych badaniach z dostępnymi w literaturze stężeniami krążących oksylipin – (A) różnice po redukcji masy; (B) różnice w porównaniu grupą kontrolną	143

11 SPIS ILUSTRACJI

Rysunek 2.1 Odsetek osób z otyłością w Polsce według płci _____	9
Rysunek 2.2 Odsetek osób z otyłością w Polsce według grup wiekowych _____	9
Rysunek 2.3 Wpływ nadmiaru tkanki tłuszczowej na ogólnoustrojowe zmiany metaboliczne i ich konsekwencje zdrowotne _____	17
Rysunek 2.4 Typy operacji bariatrycznych z przykładami _____	19
Rysunek 2.5 Przykładowe struktury przedstawicieli głównych kategorii lipidowych według klasyfikacji LIPID MAPS _____	22
Rysunek 2.6 Podstawy metabolizmu lipidów i ich rola w komórce _____	25
Rysunek 2.7 Synteza rozgałęzionych i nieparzystych kwasów tłuszczowych _____	29
Rysunek 2.8 Wydłużanie i desaturacja niezbędnych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w organizmie _____	32
Rysunek 2.9 Schemat ścieżek syntezy oksylipin _____	34
Rysunek 4.1 Skład kwasów tłuszczowych w paszach _____	57
Rysunek 4.2 Ogólny schemat postępowania analitycznego _____	61
Rysunek 4.3 Schemat frakcjonowania lipidów – metoda I _____	63
Rysunek 4.4 Schemat frakcjonowania lipidów – metoda II _____	65
Rysunek 4.5 Schemat ekstrakcji oksylipin z surowicy techniką SPE _____	76
Rysunek 5.1 Przykładowy chromatogram FAME przygotowanych z ekstraktów lipidowych surowicy pacjentów z MO uzyskany z wykorzystaniem GC-MS _____	84
Rysunek 5.2 Zawartość [%] głównych grup kwasów tłuszczowych w badanych skupiskach tkanki tłuszczowej _____	89
Rysunek 5.3 Zawartość [%] głównych grup kwasów tłuszczowych w surowicy pacjentów z otyłością olbrzymią _____	93
Rysunek 5.4 Zawartość [%] głównych grup kwasów tłuszczowych w surowicy grupy kontrolnej (LC) pacjentów z otyłością przed operacją OAGB (pre-OAGB) i pacjentów 2 tygodnie po operacji OAGB (FU1). _____	94
Rysunek 5.5 Zawartość [%] głównych grup kwasów tłuszczowych w surowicy grupy kontrolnej (LC) pacjentów z otyłością przed operacją OAGB (pre-OAGB) i pacjentów 6-9 miesięcy po operacji OAGB (FU2) _____	98

- Rysunek 5.6 Wyniki analizy PCA na podstawie pełnego profilu kwasów tłuszczowych w surowicy grupy kontrolnej (LC) pacjentów z otyłością przed operacją OAGB (pre-OAGB) i pacjentów 6-9 miesięcy po operacji OAGB (FU2) _____ 102
- Rysunek 5.7 Wyniki analizy PCA na podstawie pełnego profilu kwasów tłuszczowych w surowicy dla par grup badawczych _____ 103
- Rysunek 5.8 Zmiany w zawartości [%] grup kwasów tłuszczowych w surowicy pacjentów z otyłością przed operacją OAGB (pre-OAGB) i pacjentów 2 tygodnie (FU1) i 6-9 miesięcy po operacji OAGB (FU2) _____ 105
- Rysunek 5.9 Istotne korelacje pomiędzy zawartością rozgałęzionych kwasów tłuszczowych (BCFA) w surowicy krwi uczestników badania a parametrami biochemicznymi i antropometrycznymi _____ 106
- Rysunek 5.10 Istotne korelacje pomiędzy stężeniem rozgałęzionych aminokwasów (BCAA) w surowicy krwi uczestników badania a parametrami biochemicznymi i antropometrycznymi _____ 107
- Rysunek 5.11 Metabolizm rozgałęzionych kwasów tłuszczowych i rozgałęzionych aminokwasów u pacjentów z otyłością przed zabiegiem OAGB (MO) i 6-9 miesięcy po zabiegu (FU2) w porównaniu do grupy kontrolnej (LC) _____ 108
- Rysunek 5.12 Chromatogramy MRM uzyskane podczas oznaczania oksylipin techniką LC-MS/MS w surowicy krwi z dodatkiem wzorców analitycznych _____ 111
- Rysunek 5.13 Stężenia oksylipin w surowicy pacjentów z otyłością olbrzymią leczonych zabiegiem OAGB przed (pre-OAGB) i po operacji (FU1 i FU2) _____ 117
- Rysunek 5.14 Wyniki analizy PCA stężenia oksylipin w surowicy pacjentów z otyłością przed operacją OAGB (pre-OAGB), pacjentów 2 tygodnie po operacji (FU1) i 6-9 miesięcy po operacji (FU2) _____ 119
- Rysunek 5.15 Zawartość [%] głównych grup kwasów tłuszczowych w paszach dla myszy eksperymentalnych _____ 120
- Rysunek 5.16 Zawartość [%] kwasu eikozapentadienowego n-3 (EPA) w ekstraktach lipidów całkowitych z tkanek/narządów myszy eksperymentalnych _____ 121
- Rysunek 5.17 Zawartość [%] grup lipidowych uzyskanych podczas rodzenia ekstraktów lipidowych z mózgow myszy eksperymentalnych _____ 123
- Rysunek 5.18 Zawartość [%] nasyconych, jednonienasyconych i wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w ekstraktach lipidów całkowitych z serc myszy eksperymentalnych _____ 129

12 MATERIAŁY UZUPEŁNIAJĄCE

12.1 OPIS ZALECEŃ DIETETYCZNYCH DLA PACJENTÓW LECZONYCH OAGB

12.1.1 DIETA REDUKCYJNA PRZED ZABIEGIEM OAGB

W punkcie INI pacjentom zalecano przestrzeganie diety redukcyjnej, polegającej na spożywaniu 4-5 posiłków dziennie (pierwszego do godziny od obudzenia się, ostatniego na ok. 2-3 godzin przed snem) oraz 2-2,5 l niesłodzonych płynów. Posiłki składały się z garści produktu białkowego i warzyw/kielków (surowych, na parze, gotowanych *al dente*) w nieograniczonej ilości. Pacjenci co 3 godziny musieli wybrać jeden posiłek z listy poniżej, dozwolone było zmniejszenie porcji:

- ◆ jajka gotowane (na miękko lub na twardo) bez majonezu - 2-3 sztuki + warzywa,
- ◆ chuda wędlina (szynka, polędwica bez widocznego tłuszczu, chudy schab) – 5 grubszych plastrów + warzywa,
- ◆ galareta drobiowa lub rybna - 1 salaterka + warzywa,
- ◆ kefir, maślanka, jogurt (naturalne) - 300 ml + warzywa (nabiał może być bez laktozy),
- ◆ tatar z łososia lub wołowiny - garść duża + warzywa,
- ◆ twaróg chudy, półtłusty - pół kostki + jogurt naturalny - 150g (3% tłuszczu) + zioła + warzywa (nabiał może być bez laktozy),
- ◆ serek wiejski lekki 3% tłuszczu - 1 opakowanie + warzywa (nabiał może być bez laktozy),
- ◆ 3 łyżki płatków owsianych + jogurt naturalny 150 g (3% tłuszczu) lub kubek chudego mleka + 1 łyżka stołowa suszonych owoców lub kilka drobnych świeżych + kilka (6-7 sztuk) orzechów,
- ◆ 150 g humusu lub 150 g tofu + warzywa,
- ◆ 150 gram chudego mięsa białego lub ryby - nie wolno smażyć!!! (można gotować, parować, piec, grilować na patelni, dusić) + warzywa,
- ◆ 300 ml zupy chudej na udku bez skóry - bez mąki, bez śmietany - mogą być zupy krem, bez makaronu, bez ryżu, może być z ziemniakiem + warzywa,

- ◆ 1-2 owoce średnie lub garść drobnych owoców na dobę (unikać bananów i winogron) + warzywa,
- ◆ soki warzywne (marchewkowy, buraczany, pomidorowy) - 300 ml lub więcej + warzywa,
- ◆ 4 - 5 plastrów łososia wędzonego lub surowego + serek śmietankowy chudy + warzywa,
- ◆ 100 g makreli + warzywa,
- ◆ kilka kostek sera typu feta (chudego) + warzywa,
- ◆ 125 g sera mozzarella (większa kulka) + warzywa,
- ◆ 100 g tuńczyka w sosie własnym (niecała puszka) + warzywa,
- ◆ 2-3 większe płyty śledziowe lub 2-3 duże rolmopsy bez oleju, bez śmietany + warzywa,
- ◆ miseczka leczy z chudym mięsem lub bez mięsa,
- ◆ miseczka fasolki po bretońsku z chudym mięsem lub bez mięsa,
- ◆ miseczka bigosu na chudym mięsie lub na grzybach,
- ◆ pacjenci chorzy na cukrzycę: warzywa strączkowe (fasola typu Jaś, groch, bób, soja, soczewica) oraz gotowana marchew i burak - garść.

Mięso, ryby i tofu mogło być marynowane. Dozwolone było dodanie do posiłku 2-3 łyżek oliwy z oliwek lub oleju rzepakowego na dobę, soku z cytryny oraz ziół. Sól powinna być maksymalnie limitowana. Możliwe, ale niezalecane było stosowanie w diecie

- ◆ 2-3 kromki razowego lub żytniego lub graham chleba/dobę
- ◆ 2-3 razy w tygodniu do obiadu 3 łyżki ugotowanej grubej kaszy lub brązowego ryżu lub razowego makaronu
- ◆ 2 łyżeczki masła lub margaryny miękkiej lub serka śmietankowego/dobę

12.1.2 DIETA BEZPOŚRENIO PO OPERACJI OAGB

Przed pierwsze 2-5 doby po operacji pacjenci przyjmowali wyłącznie wodę, jogurt naturalny wysokobiałkowy, lejący kisiel niesłodzony, herbatę, czysty bulion - pojedyncze łyki, łyżeczki. Niezalecane było zmuszanie się do spożycia posiłku, a gdy spadał poziom cukru we krwi, pacjenci pili posłodzony płyn.

Powyżej 5 doby do 4 tygodni po zabiegu dieta składała się z płynnych posiłków – kilku łyżek z przerwami pomiędzy – zup (zmiksowanych, płynnych, odżywcze - z mięsem, z ugotowanym jajkiem, rybna), płynnego nabiał naturalny wysokobiałkowy (kefir, maślanka, jogurt, mleko), małych ilości delikatnych soków warzywnych (buraczkowy, marchewkowy, pomidorowy),

musów owocowych. W celu uniknięcia hipoproteinemii należało spożywać białko w proszku np. preparat *Protifar* 5-10 miarek/dobę albo białko dla sportowców (odżywki serwatkowe lub izolaty białek - 1-2 miarki/dobę). Zażywano witaminy w płynie typu *Biovital* lub *Floradix* (podwójną dawkę). Po 4 tygodniach odbywała się wizyta u dietetyka w celu ustalenia dalszego postępowania.

12.2 TABELE

- Tabela uzupełniająca 12.1 Sekwencje starterów do amplifikacji mRNA genów kodujących enzymy ze ścieżki katabolizmu aminokwasów _____ V
- Tabela uzupełniająca 12.2 Masa tkanek i narządów pobranych od myszy eksperymentalnych V
- Tabela uzupełniająca 12.3 Profil kwasów tłuszczowych [% zawartości] skupisk tkanki tłuszczowej pacjentów z otyłością olbrzymią (MO) i zdrowej grupy kontrolnej (LC) _____ VI
- Tabela uzupełniająca 12.4 Profil kwasów tłuszczowych [% zawartości] w surowicy pacjentów z MO przed rozpoczęciem diety przygotowującej do zabiegu bariatrycznego OAGB (INI)_ IX
- Tabela uzupełniająca 12.5 Wartości własne macierzy korelacji analizy PCA na podstawie pełnego profilu kwasów tłuszczowych w surowicy grupy kontrolnej (LC) pacjentów z otyłością przed operacją OAGB (pre-OAGB) i pacjentów 6-9 miesięcy po operacji OAGB (FU2) ____ X
- Tabela uzupełniająca 12.6 Względny poziom ekspresji mRNA enzymów zaangażowanych w katabolizm rozgałęzionych aminokwasów w tkance tłuszczowej oznaczony techniką RT-PCR _____ X
- Tabela uzupełniająca 12.7 Testowane procedury ekstrakcji SPE oksylipin z surowicy krwi XI
- Tabela uzupełniająca 12.8 Średnia powierzchnia sygnałów chromatograficznych deuterowanych wzorców oksylipin w surowicy krwi poddanej ekstrakcji SPE na różnych sorbentach _____ XIII
- Tabela uzupełniająca 12.9 Stężenia oksylipin w surowicy pacjentów z otyłością olbrzymią przed i po zabiegu OAGB _____ XIV
- Tabela uzupełniająca 12.10 Współczynniki korelacji Spearmana stężeń oksylipin z zawartością kwasów tłuszczowych, z których powstają, w surowicy pacjentów z otyłością olbrzymią_ XVI
- Tabela uzupełniająca 12.11 Najważniejsze kwasy tłuszczowe [stężenie] w surowicy myszy eksperymentalnych _____ XVII
- Tabela uzupełniająca 12.12 Zawartość [%] najważniejszych kwasów tłuszczowych w ekstraktach całkowitych lipidów z mózgów myszy eksperymentalnych oznaczona techniką GC-MS _____ XVIII
- Tabela uzupełniająca 12.13 Zawartość [%] najważniejszych kwasów tłuszczowych w ekstraktach serc i mięśni szkieletowych myszy eksperymentalnych oznaczona techniką GC-MS _____ XIX
- Tabela uzupełniająca 12.14 Zawartość [%] głównych kwasów tłuszczowych w ekstraktach tkanek lipogennych myszy eksperymentalnych oznaczona techniką GC-MS _____ XX
- Tabela uzupełniająca 12.15 Zawartość [mg/g] kwasów tłuszczowych w paszy dla myszy eksperymentalnych wyznaczona techniką GC-MS _____ XXII

Tabela uzupełniająca 12.1 Sekwencje starterów do amplifikacji mRNA genów kodujących enzymy ze ścieżki katabolizmu aminokwasów

Gen	Sekwencje starterów
BCKDHA:	5'-GATGACAAGCCCCAGTTCCCA-3' 3'-TGGGGTTGATGATCTGGCCTT-5'
BCKDHB:	5'- GCGGCAGGTGGCTCATTTTACT-3' 3'- CAGTAGGATCTTTGGCCAATGAGTTAT-5'
BCAT1:	5'- GGTCCCATATTCAACATCTGCTAGTCT-3' 3'- TCCCATCTTGCAGTCCCCAGT-5'
BCAT2:	5'- TTACGCGCCGCACGGATCAT-3' 3'- GGTCGGTAAATGTCTTCCCAAAC-5'

Skróty: **BCAT1** - aminotransferaza aminokwasów o rozgałęzionych łańcuchach izoforma 1, **BCAT2** - aminotransferaza aminokwasów o rozgałęzionych łańcuchach izoforma 1, **BCKDHA** - podjednostka E1 α kompleksu dehydrogenazy rozgałęzionych α -ketokwasów, **BCKDHB** - podjednostka E1 β kompleksu dehydrogenazy rozgałęzionych α -ketokwasów. Sekwencje udostępnione przez Katedrę i Zakład Biochemii Farmaceutycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. **Tabela opublikowana** [202].

Tabela uzupełniająca 12.2 Masa tkanek i narządów pobranych od myszy eksperymentalnych

Tkanka/narząd	SD [mg]	HFD [mg]
Mózg	372 \pm 43	378 \pm 38
Serce	218 \pm 15	214 \pm 26
Mięśnie szkieletowe	474 \pm 56	605 \pm 129
VAT	94 \pm 30	762 \pm 361*
SAT	246 \pm 30	1010 \pm 548*
EAT	308 \pm 70	1846 \pm 549#
Wątroba	1322 \pm 203	1394 \pm 447

* $p < 0,05$, # $p < 0.001$. Skróty: **EAT** - okołojądrowa tkanka tłuszczowa, **HFD** - myszy na diecie wysokotłuszczowej, **SAT** - podskórna tkanka tłuszczowa, **SD** - myszy na diecie standardowej, **VAT** - otrzewnowa tkanka tłuszczowa. Dane uzyskane dzięki uprzejmości Trójmiejskiej Akademickiej Zwierzętarńi Doświadczalnej. **Dane opublikowane** [68].

Tabela uzupełniająca 12.3 Profil kwasów tłuszczowych [% zawartości] skupisk tkanki tłuszczowej pacjentów z otyłością olbrzymią (MO) i zdrowej grupy kontrolnej (LC)

	Pacjenci z MO			LC			Pacjenci z MO vs LC	
	VAT n = 89	SAT n = 89	VAT vs SAT p-wartość	VAT n = 32	SAT n = 13	VAT vs SAT p-wartość	VAT p-wartość	SAT p-wartość
ECFA:								
10:0	0,013 ± 0,011	0,012 ± 0,008	0,380	0,025 ± 0,013	0,018 ± 0,009	0,057	< 0,001	0,018
12:0	0,319 ± 0,165	0,252 ± 0,117	< 0,001	0,413 ± 0,141	0,358 ± 0,099	0,207	0,005	0,003
14:0	2,47 ± 0,597	2,42 ± 0,538	0,191	2,91 ± 0,536	2,61 ± 0,617	0,111	< 0,001	0,248
16:0	21,6 ± 1,96	22,9 ± 1,80	< 0,001	21,4 ± 1,59	22,6 ± 2,12	0,052	0,682	0,616
18:0	3,37 ± 0,894	3,39 ± 0,859	0,858	3,94 ± 0,874	4,86 ± 0,761	0,002	0,002	< 0,001
20:0	0,132 ± 0,055	0,075 ± 0,031	< 0,001	0,142 ± 0,051	0,140 ± 0,045	0,909	0,386	< 0,001
22:0	0,018 ± 0,011	0,011 ± 0,005	< 0,001	0,016 ± 0,008	0,022 ± 0,011	0,048	0,134	0,005
24:0	0,008 ± 0,005	0,006 ± 0,003	< 0,001	0,009 ± 0,004	0,009 ± 0,003	0,898	0,422	0,003
OCFA:								
11:0	0,004 ± 0,002	0,004 ± 0,002	0,596	0,006 ± 0,003	0,006 ± 0,004	0,741	0,002	0,022
13:0	0,015 ± 0,007	0,014 ± 0,006	0,234	0,017 ± 0,007	0,019 ± 0,009	0,265	0,171	0,039
15:0	0,258 ± 0,071	0,265 ± 0,074	0,136	0,281 ± 0,073	0,237 ± 0,099	0,105	0,129	0,220
17:0	0,164 ± 0,047	0,179 ± 0,044	< 0,001	0,174 ± 0,038	0,181 ± 0,055	0,624	0,304	0,876
19:0	0,017 ± 0,008	0,014 ± 0,006	0,002	0,019 ± 0,008	0,019 ± 0,008	0,853	0,227	0,002
21:0	0,008 ± 0,004	0,007 ± 0,004	0,021	0,008 ± 0,005	0,009 ± 0,005	0,592	0,972	0,071
23:0	0,001 ± 0,001	0,001 ± 0,001	1,000	0,002 ± 0,002	0,001 ± 0,000	0,161	0,392	0,158

Tabela uzupełniająca 12.3 (c.d.) Profil kwasów tłuszczowych [% zawartości] skupisk tkanki tłuszczowej pacjentów z otyłością olbrzymią (MO) i zdrowej grupy kontrolnej (LC)

	Pacjenci z MO			LC			Pacjenci z MO vs LC	
	VAT	SAT	VAT vs SAT	VAT	SAT	VAT vs SAT	VAT	SAT
BCFA:								
<i>anteizo</i> 15:0	0,049 ± 0,022	0,049 ± 0,020	0,780	0,067 ± 0,020	0,054 ± 0,025	0,068	< 0,001	0,477
<i>anteizo</i> 17:0	0,122 ± 0,045	0,123 ± 0,045	0,710	0,155 ± 0,046	0,134 ± 0,049	0,171	< 0,001	0,407
<i>anteizo</i> 19:0	0,065 ± 0,020	0,057 ± 0,019	0,002	0,071 ± 0,024	0,053 ± 0,020	0,023	0,173	0,447
<i>anteizo</i> 23:0	0,009 ± 0,005	0,009 ± 0,005	0,470	0,007 ± 0,004	0,005 ± 0,003	0,127	0,025	0,010
<i>izo</i> 14:0	0,012 ± 0,005	0,014 ± 0,006	0,005	0,018 ± 0,008	0,015 ± 0,007	0,252	0,001	0,831
<i>izo</i> 15:0	0,031 ± 0,013	0,032 ± 0,014	0,383	0,040 ± 0,014	0,035 ± 0,009	0,318	0,002	0,389
<i>izo</i> 16:0	0,060 ± 0,020	0,057 ± 0,020	0,087	0,073 ± 0,023	0,060 ± 0,024	0,089	0,002	0,677
<i>izo</i> 17:0	0,068 ± 0,027	0,066 ± 0,024	0,339	0,077 ± 0,026	0,072 ± 0,034	0,604	0,098	0,398
<i>izo</i> 22:0	0,008 ± 0,004	0,008 ± 0,004	0,697	0,007 ± 0,004	0,005 ± 0,003	0,161	0,351	0,014
Cyklo FA:								
CPOA2H	0,216 ± 0,045	0,218 ± 0,050	0,650	0,225 ± 0,056	0,178 ± 0,054	0,015	0,403	0,010
MUFA:								
12:1	0,014 ± 0,008	0,011 ± 0,006	0,004	0,018 ± 0,009	0,013 ± 0,005	0,024	0,010	0,208
14:1	0,279 ± 0,116	0,247 ± 0,110	< 0,001	0,333 ± 0,112	0,204 ± 0,101	0,001	0,024	0,183
16:1	6,12 ± 1,44	5,77 ± 1,58	0,008	5,93 ± 1,28	4,42 ± 1,44	0,001	0,498	0,004
18:1	52,7 ± 2,34	52,3 ± 2,08	0,007	52,8 ± 1,82	51,7 ± 3,16	0,265	0,974	0,511
19:1	0,028 ± 0,010	0,029 ± 0,011	0,489	0,025 ± 0,009	0,032 ± 0,015	0,134	0,137	0,353
20:1	0,862 ± 0,296	0,714 ± 0,213	< 0,001	0,793 ± 0,137	0,788 ± 0,135	0,904	0,084	0,231
22:1	0,091 ± 0,049	0,054 ± 0,029	< 0,001	0,090 ± 0,052	0,086 ± 0,029	0,734	0,929	< 0,001
24:1	0,009 ± 0,005	0,007 ± 0,003	0,001	0,010 ± 0,005	0,009 ± 0,002	0,477	0,423	0,002

Tabela uzupełniająca 12.3 (c.d.) Profil kwasów tłuszczowych [% zawartości] skupisk tkanki tłuszczowej pacjentów z otyłością olbrzymią (MO) i zdrowej grupy kontrolnej (LC)

	Pacjenci z MO			LC			Pacjenci z MO vs LC	
	VAT	SAT	VAT vs SAT	VAT	SAT	VAT vs SAT	VAT	SAT
PUFA n-6:								
16:2 n-6	0,187 ± 0,187	0,008 ± 0,004	0,002	0,009 ± 0,005	0,013 ± 0,006	0,043	< 0,001	0,031
18:2 n-6 (LA)	9,76 ± 1,31	9,58 ± 1,31	0,004	9,24 ± 1,30	10,5 ± 2,17	0,073	0,053	0,170
20:4 n-6 (ARA)	0,229 ± 0,102	0,308 ± 0,109	< 0,001	0,144 ± 0,053	0,138 ± 0,086	0,830	< 0,001	< 0,001
20:3 n-6 (DGLA)	0,176 ± 0,094	0,211 ± 0,082	< 0,001	0,085 ± 0,028	0,087 ± 0,054	0,920	< 0,001	< 0,001
20:2 n-6 (EDA)	0,198 ± 0,083	0,187 ± 0,062	0,055	0,172 ± 0,045	0,138 ± 0,078	0,156	0,029	0,011
22:5 n-6 (n-6 DPA)	0,014 ± 0,007	0,012 ± 0,005	0,038	0,010 ± 0,004	0,009 ± 0,004	0,639	< 0,001	0,042
22:4 n-6 (AdA)	0,120 ± 0,070	0,123 ± 0,055	0,645	0,057 ± 0,025	0,045 ± 0,021	0,161	< 0,001	< 0,001
PUFA n-3:								
18:3 n-3 (ALA)	0,020 ± 0,009	0,023 ± 0,009	0,039	0,016 ± 0,007	0,022 ± 0,015	0,201	0,033	0,848
20:5 n-3 (EPA)	0,061 ± 0,027	0,073 ± 0,029	< 0,001	0,040 ± 0,014	0,042 ± 0,019	0,807	< 0,001	< 0,001
20:4 n-3 (ETA)	0,008 ± 0,004	0,009 ± 0,005	0,124	0,008 ± 0,003	0,008 ± 0,003	0,540	0,339	0,537
22:6 n-3 (DHA)	0,070 ± 0,039	0,067 ± 0,033	0,336	0,050 ± 0,021	0,038 ± 0,027	0,125	0,001	0,004
22:5 n-3 (n-3 DPA)	0,138 ± 0,069	0,134 ± 0,051	0,432	0,076 ± 0,035	0,059 ± 0,031	0,134	< 0,001	< 0,001

Na czerwono - p < 0,05, Skróty: **SAT** - podskórna tkanka tłuszczowa, **VAT** - otrzewnowa tkanka tłuszczowa. CPOA2H - kwas cis-9,10-metylenoheksadekanowy, nazwy kwasów wielonienasyconych i rozgałęzionych zgodnie z tabelami (odpowiednio Tabela 1.1 oraz Tabela 2.4).

Dane opublikowane [60,202].

Tabela uzupełniająca 12.4 Profil kwasów tłuszczowych [% zawartości] w surowicy pacjentów z MO przed rozpoczęciem diety przygotowującej do zabiegu bariatrycznego OAGB (INI)

FA	% zawartości	FA	% zawartości
10:0	↓ 0,009 ± 0,005*	<i>anteizo</i> 15:0	0,033 ± 0,022
12:0	0,137 ± 0,090	<i>anteizo</i> 17:0	0,076 ± 0,062
14:0	↑ 1,10 ± 0,324**	<i>anteizo</i> 19:0	0,034 ± 0,015
16:0	24,2 ± 1,82	<i>anteizo</i> 23:0	0,012 ± 0,011
18:0	↑ 6,75 ± 0,868#	anteizo BCFA	0,154 ± 0,096
20:0	↑ 0,113 ± 0,037**	<i>izo</i> 14:0	0,010 ± 0,006
22:0	0,185 ± 0,090	<i>izo</i> 15:0	↑ 0,021 ± 0,009*
24:0	↑ 0,160 ± 0,078*	<i>izo</i> 16:0	0,041 ± 0,015
ECFA	32,7 ± 2,11	<i>izo</i> 17:0	0,065 ± 0,023
11:0	0,005 ± 0,003	<i>izo</i> 22:0	0,008 ± 0,007
13:0	0,013 ± 0,009	izo BCFA	0,145 ± 0,047
15:0	0,242 ± 0,066	4,8,12-M-13:0	0,012 ± 0,010
17:0	0,246 ± 0,053	BCFA	0,312 ± 0,138
19:0	0,018 ± 0,009	SFA	↑ 33,6 ± 2,17*
21:0	0,022 ± 0,028	18:2 n-6 (LA)	↑ 23,6 ± 3,69*
23:0	0,063 ± 0,038	20:4 n-6 (ARA)	5,84 ± 1,40
OCFA	0,610 ± 0,145	20:3 n-6 (DGLA)	1,26 ± 0,278
14:1	0,059 ± 0,034	20:2 n-6 (EDA)	0,129 ± 0,031
16:1	3,51 ± 1,02	22:5 n-6 (n-6 DPA)	0,052 ± 0,026
18:1	↓ 28,5 ± 3,06 #	22:4 n-6 (AdA)	0,107 ± 0,027
19:1	0,021 ± 0,008	PUFA n-6	31,0 ± 4,48
20:1	0,153 ± 0,036	18:3 n-3 (ALA)	↑ 0,298 ± 0,144**
22:1	0,019 ± 0,011	20:5 n-3 (EPA)	0,777 ± 0,296
24:1	0,279 ± 0,108	20:4 n-3 (ETA)	0,057 ± 0,020
MUFA	↓ 32,6 ± 3,47 **	22:6 n-3 (DHA)	1,26 ± 0,353
CPOA2H	0,145 ± 0,037	22:5 n-3 (n-3 DPA)	0,327 ± 0,084
		PUFA n-3	2,72 ± 0,677

N = 34, Strzałki: wyższa (↑) / niższa (↓) zawartość w porównaniu do surowicy pobranej przed zabiegiem (pre-OAGB); * p < 0,05, ** p < 0,01, # p < 0,001. CPOA2H - kwas cis-9,10-metylenohexadekanowy, nazwy kwasów wielonienasyconych i rozgałęzionych zgodne z tabelami (odpowiednio Tabela 1.1 oraz Tabela 2.4). Tabela własna, dane niepublikowane.

Tabela uzupełniająca 12.5 Wartości własne macierzy korelacji analizy PCA na podstawie pełnego profilu kwasów tłuszczowych w surowicy grupy kontrolnej (LC) pacjentów z otyłością przed operacją OAGB (pre-OAGB) i pacjentów 6-9 miesięcy po operacji OAGB (FU2)

PC	LC n = 29	pre-OAGB n = 46	FU2 n = 46	Wyjaśniona zmiennność [%]	Skumulowana wyjaśniona zmiennność [%]
1	2,94 ± 2,71†	-1,98 ± 2,16‡	0,12 ± 3,26◊	20,9	20,9
2	-1,65 ± 2,80†	-0,39 ± 2,29†	1,44 ± 2,94‡	16,1	37,0
3	-2,34 ± 0,93†	0,60 ± 1,82‡	0,93 ± 1,95‡	9,0	46,0

PC - główna składowa; † ‡ ◊ - dla danej składowej w grupach oznaczonych różnymi symbolami wartości są istotnie różne ($p < 0,01$). **Dane opublikowane** [201].

Tabela uzupełniająca 12.6 Względny poziom ekspresji mRNA enzymów zaangażowanych w katabolizm rozgałęzionych aminokwasów w tkance tłuszczowej oznaczony techniką RT-PCR

Enzym	LC	MO pre-OAGB
Podskórna tkanka tłuszczowa (SAT):		
BCKDHA	1,00 ± 0,38	1,07 ± 0,38
BCKDHB	1,00 ± 0,26	1,03 ± 0,39
BCAT1	1,00 ± 0,54	1,18 ± 0,66
BCAT2	1,00 ± 0,35	0,86 ± 0,22
Otrzewnowa tkanka tłuszczowa (VAT)		
BCKDHA	1,00 ± 0,26	0,95 ± 0,24
BCKDHB	1,00 ± 0,55	0,62 ± 0,27*
BCAT1	1,00 ± 0,48	0,69 ± 0,24*
BCAT2	1,00 ± 0,31	0,79 ± 0,23*

* - $p < 0,05$. Skróty: **BCKDHA/B** - kompleks dehydrogenazy rozgałęzionych α -ketokwasów podjednostka E1 α/β , **BCAT1/2** - aminotransferaza aminokwasów o rozgałęzionych łańcuchach izoforma 1/2, **LC** - grupa kontrolna, **MO pre-OAGB**, pacjenci z otyłością olbrzymią przed zabiegiem bariatrycznym. Dane uzyskane dzięki uprzejmości Katedry i Zakładu Biochemii Farmaceutycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. **Dane opublikowane** [202].

Tabela uzupełniająca 122.7 Testowane procedury ekstrakcji SPE oksylipin z surowicy krwi

Kolumnienka SPE	Wstępna precypitacja białek	Prekondycjonowanie kolumnienki	Płukanie próbki	Elucja
Chromabond C18ec ^a (6 ml, 500 mg)	+ 300 µl metanol,	3 x 3 ml metanol,	10 ml H ₂ O	8 ml mrówczan metylu
Chromabond C18 hydra ^a (6 ml, 500 mg)	+ 1,2 ml H ₂ O, 10 min, 4°C, 6000 RPM, zebrany supernatant,	3 x 3 ml H ₂ O	6 ml heksan	
Phenomenex C18E ^a (3 ml, 200 mg); metoda I	+ 80 µl stężony kwas octowy	3 x 1,5 ml metanol, 3 x 1,5 ml H ₂ O	5 ml H ₂ O 3 ml heksan	4 ml mrówczan metylu
X Phenomenex C18E ^a (3 ml, 200 mg); metoda II	+ 1,5 ml acetonitryl: etanol (1:1, v/v)	3 ml metanol,	3 ml 0,1% kwas octowy	3 ml 0,1% kwas octowy w metanolu
	inkubacja 20 min, 4°C 20 min, 4°C, 1800 RPM zebrany supernatant + 17 ml H ₂ O	3 ml 0,1% kwas octowy w metanolu	3 ml 0,1% kwas octowy	3 ml 0,1% kwas octowy w metanolu
Phenomenex NH₂ ^b (6 ml, 200 mg)	+ 200 µl Xlethanol	2 x 3 ml metanol, 2 x 3 ml 0,1 M bufor octanowy, 5% metanol	2 x 3 ml metanol:H ₂ O (50:50, v/v)	2 x 2 ml kwas octowy w heksanie:octanie etylu (25:75, v/v)
Phenomenex X-AW ^c (3 ml, 200 mg)	+ 400 µl 1 M bufor octanowy, pH=6 10 min, 4°C, 6000 RPM zebrany supernatant	3 ml metanol, 3 ml 0,1 M bufor octanowy, 5% metanol	3 ml metanol:H ₂ O (50:50, v/v)	2 ml 1% kwas octowy w heksanie:octanie etylu (25:75, v/v)
Phenomenex Strata X-A ^c (3 ml, 100 mg); metoda I		3 ml metanol, 3 ml 0,1 M bufor octanowy, 5% metanol	3 ml metanol:H ₂ O (50:50, v/v)	2 ml kwas octowy w heksanie:octanie etylu (75:25, v/v)
Phenomenex Strata X-A ^c (3 ml, 100 mg); metoda II	+ 1,5 ml acetonitryl, + 4,5 ml H ₂ O, 10 min, 4°C, 6000 RPM, zebrany supernatant	2 x 3 ml acetonitryl, 2 x 3 ml acetonitryl:H ₂ O (25:75, v/v)	2 x 3 ml acetonitryl:H ₂ O (25:75, v/v) 2 x 3 ml acetonitryl	2 x 1,3 ml 1% kwas mrówkowy w acetonitrylu

Tabela uzupełniająca 12.7 (c.d.) Testowane procedury ekstrakcji SPE oksylipin z surowicy krwi

Kolumnienka SPE	Wstępna precypitacja białek	Prekondycjonowanie kolumnienki	Płukanie próbki	Elucja
Phenomenex Strata X^c (3 ml, 100 mg)	+ 200 µl metanol + 400 µl H ₂ O 10 min, 4°C, 6000 RPM, zebrany supernatant	3,5 ml metanol, 3,5 ml H ₂ O,	3,5 ml metanol:H ₂ O (10:90, v/v)	3 x 1 ml metanol
Oasis HLB^d (6 ml, 200 mg)	+ 200 µl metanol + 200 µl H ₂ O, 2% kwas mrówkowy 10 min, 4°C, 6000 RPM, zebrany supernatant	6 ml octan etylu, 6 ml metanol, 6 ml 20% metanol, 1% kwas mrówkowy	6 ml 20% metanol, 1% kwas mrówkowy	2 x 2 ml metanol

a Żel krzemionkowy modyfikowany grupami oktadecylowymi; **b** żel krzemionkowy modyfikowany grupami aminopropylowymi; sorbent polimerowy o właściwości **c** anionitu, **d** lipo/hydrofilowych. Tabela własna, metody na podstawie źródeł [193,207].

Tabela uzupełniająca 122.8 Średnia powierzchnia sygnałów chromatograficznych deuterowanych wzorców oksylipin w surowicy krwi poddanej ekstrakcji SPE na różnych sorbentach

Sorbent SPE	RvE1-d4	8-izo-PGF2 α -d4	12-HETE-d8
Chromabond C18ec	5303 \pm 496	3194 \pm 570	121947 \pm 16691
Chromabond C18 hydra	4639 \pm 1320	1525 \pm 313	75438 \pm 57322
Phenomenex C18E metoda I	5380 \pm 1114	3515 \pm 678	72738 \pm 27589
Phenomenex C18E metoda II	209532 \pm 10081	244917 \pm 24412	607005 \pm 63327
Phenomenex NH₂	69 \pm 45	9 \pm 9	2413 \pm 854
Phenomenex X-AW	511 \pm 141	37 \pm 37	58884 \pm 9422
Phenomenex Strata X-A metoda I	ND	112 \pm 109	27981 \pm 6265
Phenomenex Strata X-A metoda II	2279 \pm 816	1906 \pm 512	32324 \pm 3312
Phenomenex Strata X	567 \pm 459	693 \pm 693	32275 \pm 16458
Oasis HLB	6263 \pm 1195	1952 \pm 241	109228 \pm 37225

Średnia z 3 powtórzeń, jednostki umowne. **Wytłuszczone** – sorbent wykorzystany w ostatecznej metodzie oznaczania oksylipin. Metody ekstrakcji SPE zgodne z Tabelą uzupełniającą 11.7. Tabela własna, dane nieopublikowane.

Tabela uzupełniająca 12.9 Stężenia oksylipin w surowicy pacjentów z otyłością olbrzymią przed i po zabiegu OAGB

	pre-OAGB (n = 15)			FU1 (n = 15)			FU2 (n = 15)			p-wartość ^d		
	> LOD ^a	> LOQ ^b	Stężenie ^c [nM]	> LOD	> LOQ	Stężenie ^c [nM]	> LOD	> LOQ	Stężenie ^c [nM]	pre-OAGB vs FU1	pre-OAGB vs FU2	FU1 vs FU2
	12-HETE	10	10	32,4 ± 11,0	14	14	27,5 ± 6,90	12	12	20,0 ± 3,92	-	-
12-HHT	4	4	4,07 ± 0,107	12	12	10,9 ± 1,49	14	14	14,6 ± 2,90	0,015	< 0,001	0,144
13-HODE	13	13	18,6 ± 1,79	14	14	13,0 ± 1,14	15	15	18,4 ± 2,12	-	-	-
15d-PGJ2	13	2	6,12 ± 0,239	0	0	ND	7	0	< LOQ	< 0,001	< 0,001	0,530
15-HETE	12	11	1,46 ± 0,187	14	14	1,76 ± 0,214	13	13	1,25 ± 0,128	-	-	-
15-HETrE	13	13	0,513 ± 0,045	13	13	0,383 ± 0,024	14	14	0,329 ± 0,028	0,096	0,004	0,134
18-HEPE	8	6	1,55 ± 0,106	9	8	1,87 ± 0,289	10	10	1,25 ± 0,175	-	-	-
2,3-dinor-8-izo-PGF2α	0	0	ND	0	0	ND	0	0	ND	-	-	-
20-HETE	9	9	2,71 ± 0,300	12	12	3,79 ± 0,367	11	11	2,17 ± 0,213	0,019	0,375	0,003
5-HETE	15	11	1,32 ± 0,313	14	14	2,49 ± 0,318	14	13	1,45 ± 0,243	0,002	0,271	0,025
7S-Mar1	0	0	ND	0	0	ND	0	0	ND	-	-	-
8-epi-PGF2α	0	0	ND	0	0	ND	0	0	ND	-	-	-
9(10)-EpOME	11	11	1,54 ± 0,332	11	9	0,969 ± 0,121	10	9	1,26 ± 0,27	-	-	-
9-HODE	13	13	12,19 ± 0,831	14	14	10,22 ± 0,703	14	14	11,4 ± 1,18	-	-	-
LTB4	9	4	0,822 ± 0,151	10	10	1,11 ± 0,254	12	11	0,637 ± 0,071	-	-	-
LXA4	1	0	< LOQ	0	0	ND	0	0	ND	-	-	-
LXB4	0	0	ND	0	0	ND	0	0	ND	-	-	-
Mar2	0	0	ND	0	0	ND	0	0	ND	-	-	-
Mar1	0	0	ND	0	0	ND	0	0	ND	-	-	-
PDX	1	0	< LOQ	1	0	< LOQ	1	0	< LOQ	-	-	-
PGD2	0	0	ND	7	1	< LOQ	10	1	< LOQ	0,019	0,022	0,799
PGD3	0	0	ND	0	0	ND	0	0	ND	-	-	-

XIX

Tabela uzupełniająca 12.9 (c.d.) Stężenia oksylipin w surowicy pacjentów z otyłością olbrzymią przed i po zabiegu OAGB

	pre-OAGB (n = 15)			FU1 (n = 15)			FU2 (n = 15)			p-wartość ^d		
	> LOD ^a	> LOQ ^b	Stężenie ^c [nM]	> LOD	> LOQ	Stężenie ^c [nM]	> LOD	> LOQ	Stężenie ^c [nM]	pre-OAGB vs FU1	pre-OAGB vs FU2	FU1 vs FU2
PGE2	3	0	< LOQ	8	0	< LOQ	15	1	< LOQ	-	-	-
PGF2α	0	0	ND	0	0	ND	3	0	< LOQ	-	-	-
RvD1	0	0	ND	0	0	ND	0	0	ND	-	-	-
RvD2	0	0	ND	0	0	ND	0	0	ND	-	-	-
RvE1	0	0	ND	0	0	ND	0	0	ND	-	-	-
TXB2	5	3	< LOQ	14	13	2,55 \pm 0,488	13	13	2,44 \pm 0,398	< 0,001	0,001	0,822

a Liczba próbek, w których wykryto oksylipinę.

b Liczba próbek, w których stężenie oksylipiny mieściło się w granicy oznaczalności, za dolną granicę przyjęto najniższe stężenie z zakresu liniowości metody (Tabela 5.8).

c Średnia \pm błąd standardowy, z próbek, w których stężenie > LOQ.

d Test *post hoc* po jednoczynnikowej ANOVA z powtarzanymi pomiarami metodą Holm-Sidak.

LOQ - dolna granica oznaczalności, **ND** - poniżej limitu detekcji. **Na czerwono** - porównania różniące się istotnie. Nazwy oksylipin za Tabelą 1.2. Tabela własna, dane niepublikowane.

Tabela uzupełniająca 12.10 Współczynniki korelacji Spearmana stężeń oksylipin z zawartością kwasów tłuszczowych, z których powstają, w surowicy pacjentów z otyłością olbrzymią

	Współczynnik korelacji	p-wartość
Metabolity ARA:		
12-HETE	-0,230†	0,030
12-HHT	0,210†	0,041
15d-PGJ2	-0,276†	0,006
15-HETE	-0,043	0,683
20-HETE	0,213†	0,037
5-HETE	0,235†	0,024
LTB4	0,088	0,386
TXB2	0,076	0,464
Metabolity LA:		
13-HODE	0,265†	0,017
9-HODE	-0,029	0,792
9(10)-EpOME	0,040	0,716
Metabolity DGLA:		
15-HETrE	-0,201†	0,056
Metabolity EPA:		
18-HEPE	0,021	0,840

† - słabe korelacje wg. Skali Stanisza, **na czerwono** - $p < 0,05$. W analizie korelacji wzięto pod uwagę stężenia oksylipin, które oznaczono ilościowo (Tabela uzupełniająca 12.9). Nazwy oksylipin za Tabelą 1.2. Tabela własna, dane nieopublikowane.

Tabela uzupełniająca 12.11 Najważniejsze kwasy tłuszczowe [stężenie] w surowicy myszy eksperymentalnych

	Stężenie [mg/l]	
	SD	HFD
16:0	719 ± 210	1106 ± 244*
18:0	228 ± 26,3	548 ± 90,4#
pozostałe ECFA	55,5 ± 36,6	138 ± 58,1*
ECFA	1002 ± 271	1792 ± 384**
15:0	9,31 ± 5,84	15,64 ± 3,57*
17:0	6,82 ± 3,27	3,21 ± 1,24*
pozostałe OCFA	3,66 ± 0,776	6,94 ± 1,90**
OCFA	19,8 ± 9,77	36,62 ± 8,53*
BCFA	26,1 ± 7,01	26,4 ± 4,95
SFA	1049 ± 286	1855 ± 397**
16:1	222 ± 64,9	135 ± 23,7*
18:1	920 ± 313	1127 ± 256
pozostałe MUFA	21,9 ± 12,0	27,5 ± 8,83
MUFA	1164 ± 389	1289 ± 274
CPOA2H	10,0 ± 4,03	11,7 ± 1,52
16:2 n-6	0,040 ± 0,057	0,400 ± 0,172**
18:2 n-6 (LA)	356 ± 29,1	915 ± 114#
20:4 n-6 (ARA)	152 ± 37,4	330 ± 59,2#
20:3 n-6 (DGLA)	32,4 ± 6,83	36,0 ± 16,2
20:2 n-6 (EDA)	3,78 ± 0,63	9,22 ± 2,37**
22:5 n-6 (n-6 DPA)	5,76 ± 2,05	1,72 ± 0,975**
22:4 n-6 (AdA)	1,48 ± 0,35	2,81 ± 0,60#
PUFA n-6	552 ± 63,9	1295 ± 105#
18:3 n-3 (ALA)	5,74 ± 2,18	9,97 ± 2,55*
20:5 n-3 (EPA)	42,9 ± 11,7	20,1 ± 2,77**
20:4 n-3 (ETA)	2,87 ± 0,56	3,44 ± 0,89
22:6 n-3 (DHA)	30,9 ± 8,24	72,1 ± 8,81
22:5 n-3 (n-3 DPA)	2,81 ± 0,53	7,87 ± 2,28**
PUFA n-3	85,2 ± 21,7	114 ± 9,01*
PUFA n-6/n-3	6,77 ± 1,52	11,4 ± 0,443#

* p < 0,05, ** p < 0,01, # p < 0,001. Skróty: **HFD** - myszy na diecie wysokotłuszczowej, **SD** - myszy na diecie standardowej. **CPOA2H** - kwas cis-9,10-metylenohexadekanowy, nazwy kwasów wielonienasyconych zgodnie z Tabelą 1.1. **Dane opublikowane** [68,225].

Tabela uzupełniająca 12.12 Zawartość [%] najważniejszych kwasów tłuszczowych w ekstraktach całkowitych lipidów z mózgowi myszy eksperymentalnych oznaczona techniką GC-MS

	SD	HFD
16:0	21,3 ± 1,03	21,5 ± 1,69
18:0	20,5 ± 0,527	21,4 ± 1,14
pozostałe ECFA	2,73 ± 0,420	2,28 ± 0,544
ECFA	44,5 ± 1,05	45,1 ± 2,31
15:0	0,134 ± 0,027	0,162 ± 0,043
17:0	0,220 ± 0,080	0,270 ± 0,039
pozostałe OCFA	0,455 ± 0,054	0,437 ± 0,117
OCFA	0,809 ± 0,078	0,869 ± 0,114
BCFA	0,851 ± 0,480	0,807 ± 0,223
SFA	46,1 ± 1,06	46,8 ± 2,14
16:1	1,33 ± 0,140	1,30 ± 0,186
18:1	25,4 ± 1,65	24,7 ± 1,30
pozostałe MUFA	5,62 ± 1,18	5,01 ± 1,79
MUFA	32,3 ± 2,64	31,0 ± 2,75
CPOA2H	0,700 ± 0,754	0,498 ± 0,337
16:2 n-6	0,008 ± 0,004	0,008 ± 0,013
18:2 n-6 (LA)	0,378 ± 0,076	0,722 ± 0,083#
20:4 n-6 (ARA)	7,93 ± 0,614	8,11 ± 0,635
20:3 n-6 (DGLA)	0,346 ± 0,035	0,380 ± 0,010
20:2 n-6 (EDA)	0,084 ± 0,021	0,152 ± 0,034**
22:5 n-6 (n-6 DPA)	0,412 ± 0,100	0,138 ± 0,031#
22:4 n-6 (AdA)	2,06 ± 0,246	2,01 ± 0,246
PUFA n-6	11,2 ± 0,959	11,5 ± 0,638
18:3 n-3 (ALA)	0,022 ± 0,008	0,022 ± 0,013
20:5 n-3 (EPA)	0,334 ± 0,034	0,148 ± 0,019#
22:6 n-3 (DHA)	8,91 ± 0,566	9,71 ± 0,777
22:5 n-3 (n-3 DPA)	0,358 ± 0,045	0,314 ± 0,058
PUFA n-3	9,62 ± 0,602	10,2 ± 0,794
<i>PUFA n-6/PUFA n-3</i>	<i>1,17 ± 0,085</i>	<i>1,13 ± 0,066</i>

* p < 0,05, ** p < 0,01, # p < 0,001. Skróty: **HFD** - myszy na diecie wysokotłuszczowej (n=10), **SD** - myszy na diecie standardowej (n=10). **CPOA2H** - kwas cis-9,10-metylenoheksadekanowy, nazwy kwasów wielonienasyconych zgodnie z Tabelą 1.1. **Dane opublikowane zmodyfikowane za** [68].

Tabela uzupełniająca 12.13 Zawartość [%] najważniejszych kwasów tłuszczowych w ekstraktach serc i mięśni szkieletowych myszy eksperymentalnych oznaczona techniką GC-MS

	Serce		Mięsień szkieletowy	
	SD	HFD	SD	HFD
16:0	21,0 ± 2,82	17,6 ± 2,77*	23,2 ± 1,78	20,8 ± 1,15
18:0	23,9 ± 11,7	21,5 ± 6,64	6,07 ± 2,44	5,10 ± 0,683**
pozostałe ECFA	2,06 ± 0,877	1,89 ± 0,859	3,74 ± 0,578	3,594 ± 0,153
ECFA	47,0 ± 10,1	40,9 ± 6,93	33,0 ± 3,65	29,5 ± 1,68
15:0	0,276 ± 0,081	0,239 ± 0,053	0,314 ± 0,043	0,405 ± 0,019**
17:0	0,336 ± 0,082	0,301 ± 0,048	0,206 ± 0,017	0,253 ± 0,010**
pozostałe OCFA	0,217 ± 0,056	0,192 ± 0,045	0,151 ± 0,003	0,100 ± 0,004
OCFA	0,829 ± 0,173	0,732 ± 0,124	0,671 ± 0,062	0,757 ± 0,025*
BCFA	0,574 ± 0,172	0,380 ± 0,163*	1,13 ± 0,126	0,691 ± 0,062#
SFA	48,4 ± 10,1	42,1 ± 6,97	34,8 ± 3,50	31,0 ± 1,63
16:1	4,07 ± 2,21	1,74 ± 0,87**	10,8 ± 1,01	9,39 ± 1,02
18:1	30,3 ± 9,60	21,9 ± 7,69*	45,0 ± 3,03	45,6 ± 3,20
pozostałe MUFA	1,13 ± 0,48	0,77 ± 0,32	1,70 ± 0,281	1,03 ± 0,170**
MUFA	35,5 ± 12,1	24,4 ± 8,83*	57,5 ± 4,20	56,0 ± 2,65
CPOA2H	0,163 ± 0,100	0,110 ± 0,061	0,344 ± 0,059	0,445 ± 0,026
16:2 n-6	0,009 ± 0,008	0,013 ± 0,008	0,011 ± 0,006	0,025 ± 0,006
18:2 n-6 (LA)	6,32 ± 1,94	12,2 ± 3,11#	4,29 ± 0,342	8,78 ± 0,143#
20:4 n-6 (ARA)	4,14 ± 2,37	8,62 ± 3,24**	1,30 ± 0,654	1,46 ± 0,467
20:3 n-6 (DGLA)	0,596 ± 0,371	1,08 ± 0,441*	0,314 ± 0,104	0,263 ± 0,109#
20:2 n-6 (EDA)	0,117 ± 0,05	0,488 ± 0,118#	0,104 ± 0,026	0,238 ± 0,028
22:5 n-6 (n-6 DPA)	1,028 ± 0,657	0,608 ± 0,312	0,208 ± 0,119	0,110 ± 0,014
22:4 n-6 (AdA)	0,182 ± 0,099	0,568 ± 0,267#	0,12 ± 0,06	0,14 ± 0,03
PUFA n-6	12,4 ± 4,89	23,5 ± 7,17#	6,39 ± 1,02	11,0 ± 0,59#
18:3 n-3 (ALA)	0,018 ± 0,009	0,023 ± 0,008	0,018 ± 0,008	0,028 ± 0,005
20:5 n-3 (EPA)	0,54 ± 0,269	0,159 ± 0,051#	0,338 ± 0,099	0,083 ± 0,015**
20:4 n-3 (ETA)	0,045 ± 0,02	0,029 ± 0,012*	0,018 ± 0,008	0,015 ± 0,006
22:6 n-3 (DHA)	2,83 ± 1,934	7,91 ± 3,34#	0,508 ± 0,286	1,10 ± 0,396*
22:5 n-3 (n-3 DPA)	0,339 ± 0,226	1,87 ± 0,873#	0,164 ± 0,078	0,36 ± 0,12*
PUFA n-3	3,77 ± 2,36	9,99 ± 4,24#	1,05 ± 0,465	1,59 ± 0,512
PUFA n-6/n-3	4,97 ± 3,71	2,75 ± 1,24	6,76 ± 1,91	7,45 ± 2,08

* p < 0,05, ** p < 0,01, # p < 0,001. Skróty: **HFD** - myszy na diecie wysokotłuszczowej (n=10), **SD** - myszy na diecie standardowej (n=10). **CPOA2H** - kwas cis-9,10-metylenohexadekanowy, nazwy kwasów wielonienasyconych zgodne z Tabelą 1.1. **Dane opublikowane** [225].

Tabela uzupełniająca 12.14 Zawartość [%] głównych kwasów tłuszczowych w ekstraktach tkanek lipogennych myszy eksperymentalnych oznaczona techniką GC-MS

	VAT		SAT		EAT		Wątroba	
	SD	HFD	SD	HFD	SD	HFD	SD	HFD
16:0	25,8 ± 1,79	22,6 ± 1,52*	24,1 ± 1,03	21,7 ± 2,05*	22,6 ± 1,29	22,5 ± 1,08	25,4 ± 0,461	26,8 ± 1,80
18:0	3,25 ± 0,504	3,25 ± 0,255	3,27 ± 0,351	3,17 ± 0,319	2,19 ± 0,172	2,95 ± 0,294**	9,63 ± 0,655	8,80 ± 3,61
pozostałe ECFA	3,35 ± 0,311	2,90 ± 0,137*	3,30 ± 0,369	3,033 ± 0,435	3,00 ± 0,142	2,93 ± 0,462	1,12 ± 0,094	1,67 ± 0,243
ECFA	32,4 ± 2,58	28,7 ± 1,61*	30,7 ± 1,38	27,9 ± 2,26*	27,8 ± 1,57	28,4 ± 1,58	36,1 ± 0,878	37,1 ± 4,579
15:0	0,220 ± 0,033	0,326 ± 0,017#	0,224 ± 0,025	0,326 ± 0,037#	0,228 ± 0,019	0,320 ± 0,033#	0,152 ± 0,013	0,240 ± 0,035#
17:0	0,130 ± 0,012	0,196 ± 0,018#	0,128 ± 0,008	0,196 ± 0,017#	0,114 ± 0,015	0,182 ± 0,013#	0,182 ± 0,015	0,272 ± 0,067*
pozostałe OCFA	0,078 ± 0,014	0,054 ± 0,011*	0,069 ± 0,014	0,049 ± 0,006*	0,064 ± 0,012	0,042 ± 0,007*	0,092 ± 0,021	0,094 ± 0,017
OCFA	0,429 ± 0,047	0,569 ± 0,042**	0,419 ± 0,025	0,566 ± 0,050#	0,404 ± 0,048	0,549 ± 0,042#	0,423 ± 0,036	0,593 ± 0,128*
BCFA	0,899 ± 0,116	0,438 ± 0,028#	0,918 ± 0,029	0,372 ± 0,023#	0,921 ± 0,061	0,325 ± 0,035#	0,867 ± 0,085	0,296 ± 0,051#
SFA	33,8 ± 2,46	29,7 ± 1,64*	32,0 ± 1,38	28,8 ± 2,29*	29,1 ± 1,53	29,3 ± 1,63	37,4 ± 0,864	38,0 ± 4,72
16:1	9,66 ± 0,326	6,94 ± 1,02#	10,1 ± 0,315	7,35 ± 1,05#	11,1 ± 0,442	7,40 ± 0,705#	6,226 ± 0,696	3,69 ± 1,66*
18:1	51,2 ± 1,91	54,4 ± 2,58	52,7 ± 1,55	55,0 ± 2,70	54,5 ± 1,46	54,6 ± 1,83	34,2 ± 2,00	34,8 ± 9,44
pozostałe MUFA	1,64 ± 0,168	0,758 ± 0,119#	1,40 ± 0,090	0,657 ± 0,107#	1,28 ± 0,069	0,603 ± 0,099#	0,876 ± 0,073	0,565 ± 0,129**
MUFA	62,5 ± 2,16	62,1 ± 1,73	64,2 ± 1,44	63,0 ± 2,17	66,9 ± 1,29	62,6 ± 1,42**	41,3 ± 2,56	39,1 ± 11,2
CPOA2H	0,254 ± 0,018	0,354 ± 0,030#	0,258 ± 0,013	0,348 ± 0,029#	0,276 ± 0,021	0,340 ± 0,019#	0,266 ± 0,005	0,226 ± 0,046
16:2 n-6	0,007 ± 0,004	0,011 ± 0,006	0,003 ± 0,000	0,016 ± 0,005#	0,006 ± 0,004	0,010 ± 0,000*	0,003 ± 0,000	0,020 ± 0,010**
18:2 n-6 (LA)	3,02 ± 0,278	7,46 ± 0,097#	3,16 ± 0,167	7,51 ± 0,145#	3,43 ± 0,510	7,51 ± 0,307#	6,40 ± 0,462	11,6 ± 2,34**
20:4 n-6 (ARA)	0,096 ± 0,025	0,102 ± 0,016	0,112 ± 0,023	0,074 ± 0,021*	0,062 ± 0,018	0,042 ± 0,030	8,19 ± 0,836	6,28 ± 2,83
20:3 n-6 (DGLA)	0,082 ± 0,015	0,062 ± 0,004*	0,066 ± 0,009	0,038 ± 0,013**	0,048 ± 0,008	0,025 ± 0,017*	1,35 ± 0,107	0,652 ± 0,165#
20:2 n-6 (EDA)	0,066 ± 0,011	0,140 ± 0,025#	0,052 ± 0,008	0,110 ± 0,022#	0,046 ± 0,005	0,108 ± 0,016#	0,098 ± 0,013	0,170 ± 0,047*
22:5 n-6 (n-6 DPA)	0,014 ± 0,005	0,007 ± 0,004	0,010 ± 0,000	0,007 ± 0,004	0,009 ± 0,003	0,007 ± 0,004	0,432 ± 0,054	0,076 ± 0,061#
22:4 n-6 (AdA)	0,020 ± 0,007	0,009 ± 0,003*	0,014 ± 0,005	0,010 ± 0,000	0,012 ± 0,004	0,010 ± 0,000	0,144 ± 0,015	0,166 ± 0,050
PUFA n-6	3,30 ± 0,323	7,79 ± 0,085#	3,42 ± 0,177	7,77 ± 0,187#	3,61 ± 0,527	7,72 ± 0,287#	16,6 ± 1,38	18,9 ± 5,24

XX

Tabela uzupełniająca 12.14 (c.d.) Zawartość [%] głównych kwasów tłuszczowych w ekstraktach tkanek lipogennych myszy eksperymentalnych oznaczona techniką GC-MS

	VAT		SAT		EAT		Wątroba	
	SD	HFD	SD	HFD	SD	HFD	SD	HFD
18:3 n-3 (ALA)	0,013 ± 0,007	0,014 ± 0,005	0,010 ± 0,000	0,012 ± 0,004	0,007 ± 0,004	0,014 ± 0,005	0,100 ± 0,027	0,182 ± 0,061*
20:5 n-3 (EPA)	0,126 ± 0,026	0,028 ± 0,004#	0,116 ± 0,018	0,024 ± 0,011#	0,130 ± 0,016	0,048 ± 0,041**	1,710 ± 0,119	0,314 ± 0,107#
20:4 n-3 (ETA)	0,006 ± 0,004	0,006 ± 0,004	0,006 ± 0,004	0,007 ± 0,004	0,009 ± 0,003	0,012 ± 0,013	0,060 ± 0,012	0,026 ± 0,011**
22:6 n-3 (DHA)	0,026 ± 0,009	0,014 ± 0,005*	0,020 ± 0,000	0,010 ± 0,000	0,018 ± 0,004	0,014 ± 0,005	2,358 ± 0,287	2,85 ± 1,28
22:5 n-3 (n-3 DPA)	0,026 ± 0,009	0,016 ± 0,005	0,026 ± 0,005	0,010 ± 0,000#	0,024 ± 0,005	0,010 ± 0,000#	0,232 ± 0,038	0,312 ± 0,092
PUFA n-3	0,196 ± 0,036	0,078 ± 0,010#	0,178 ± 0,021	0,063 ± 0,015#	0,188 ± 0,014	0,098 ± 0,059*	4,46 ± 0,370	3,69 ± 1,50
PUFA n-6/n-3	17,1 ± 2,43	102 ± 15,4#	19,5 ± 2,99	129 ± 33,5#	19,2 ± 2,46	102 ± 49,8**	3,73 ± 0,103	5,75 ± 1,89*
DGLA/LA (Δ6D)	0,024 ± 0,004	0,008 ± 0,001#	0,018 ± 0,003	0,005 ± 0,002#	0,013 ± 0,002	0,051 ± 0,001#	0,187 ± 0,009	0,057 ± 0,014#
ARA/DGLA (Δ5D)	1,16 ± 0,209	1,65 ± 0,267*	1,71 ± 0,355	2,07 ± 0,787	1,33 ± 0,468	1,97 ± 0,420	6,09 ± 0,515	10,83 ± 1,79#

IXX

* p < 0,05, ** p < 0,01, # p < 0,001. Skróty: Δ6D/Δ5D - indeks aktywności desaturazy 6/5, EAT - okołojądrowa tkanka tłuszczowa, HFD - myszy na diecie wysokotłuszczowej (n = 10), SAT - podskórna tkanka tłuszczowa, SD - myszy na diecie standardowej (n = 10), VAT - otrzewnowa tkanka tłuszczowa. CPOA2H - kwas cis-9,10-metylenoheksadekanowy, nazwy kwasów wielonienasyconych zgodne z Tabelą 1.1. **Dane opublikowane** [68].

Tabela uzupełniająca 12.15 Zawartość [mg/g] kwasów tłuszczowych w paszy dla myszy eksperymentalnych wyznaczona techniką GC-MS

	SD	HFD		SD	HFD
ECFA:			Cyklo FA:		
10:0	0,090 ± 0,064	0,608 ± 0,212*	C2POAH	0,067 ± 0,003	0,507 ± 0,016#
12:0	0,556 ± 0,004	3,27 ± 0,250**	MUFA:		
14:0	2,20 ± 0,067	14,2 ± 0,857**	10:1	0,006 ± 0,005	0,057 ± 0,028*
16:0	9,73 ± 0,464	74,3 ± 4,89**	12:1	0,009 ± 0,000	0,058 ± 0,017*
18:0	4,59 ± 0,104	39,1 ± 1,92**	14:1	0,178 ± 0,012	1,10 ± 0,093**
20:0	0,050 ± 0,006	0,483 ± 0,037#	16:1	0,754 ± 0,014	5,928 ± 0,326**
22:0	0,012 ± 0,003	0,066 ± 0,017**	18:1	9,63 ± 0,137	79,7 ± 3,65#
24:0	0,008 ± 0,002	0,033 ± 0,014	19:1	0,007 ± 0,002	0,049 ± 0,002#
OCFA:			20:1	0,088 ± 0,006	0,975 ± 0,079**
11:0	0,005 ± 0,002	0,025 ± 0,001#	22:1	0,002 ± 0,001	0,025 ± 0,001#
13:0	0,016 ± 0,003	0,090 ± 0,015**	24:1	0,001 ± 0,000	0,019 ± 0,010
15:0	0,201 ± 0,007	1,24 ± 0,052#	PUFA n-6:		
17:0	0,136 ± 0,006	0,999 ± 0,052**	16:2 n-6	0,002 ± 0,001	0,013 ± 0,009
19:0	0,009 ± 0,000	0,074 ± 0,004**	LA	2,04 ± 0,038	18,6 ± 0,704#
21:0	0,001 ± 0,000	0,025 ± 0,001#	ARA	0,037 ± 0,004	0,360 ± 0,010#
23:0	0,004 ± 0,002	0,025 ± 0,001#	DGLA	0,012 ± 0,000	0,114 ± 0,010**
BCFA:			EDA	0,058 ± 0,009	0,570 ± 0,070**
4,8,12-M-13:0	0,003 ± 0,000	0,019 ± 0,010	AdA	0,008 ± 0,002	0,114 ± 0,023*
anteizo 13:0	0,004 ± 0,002	0,025 ± 0,001#	PUFA n-3:		
anteizo 15:0	0,064 ± 0,003	0,417 ± 0,024**	ALA	0,005 ± 0,002	0,049 ± 0,002#
anteizo 17:0	0,055 ± 0,007	0,402 ± 0,033	EPA	0,008 ± 0,002	0,074 ± 0,004#
izo 14:0	0,009 ± 0,000	0,074 ± 0,004**	ETA	0,002 ± 0,001	0,013 ± 0,010
izo 15:0	0,031 ± 0,003	0,180 ± 0,007#	DHA	0,006 ± 0,003	0,065 ± 0,025#
izo 16:0	0,034 ± 0,001	0,205 ± 0,024**	n-3 DPA	0,016 ± 0,003	0,147 ± 0,007#
izo 17:0	0,040 ± 0,006	0,253 ± 0,006#			
izo 18:0	0,006 ± 0,000	0,033 ± 0,014#			
izo 19:0	< 0,001	0,082 ± 0,018*			
izo 20:0	< 0,001	0,002 ± 0,000**			

* p < 0,05, ** p < 0,01, # p < 0,001. **HFD** - pasza wysokotłuszczowa Altromin C 1090-60 (n = 3), **SD** - pasza standardowa Altromin C 1090-10 (n = 3). **CPOA2H** - kwas cis-9,10-metyleno-heksadekanowy, nazwy kwasów wielonienasyconych i rozgałęzionych zgodne z tabelami (odpowiednio Tabela 1.1 oraz Tabela 2.4). **Dane opublikowane** [68,225].

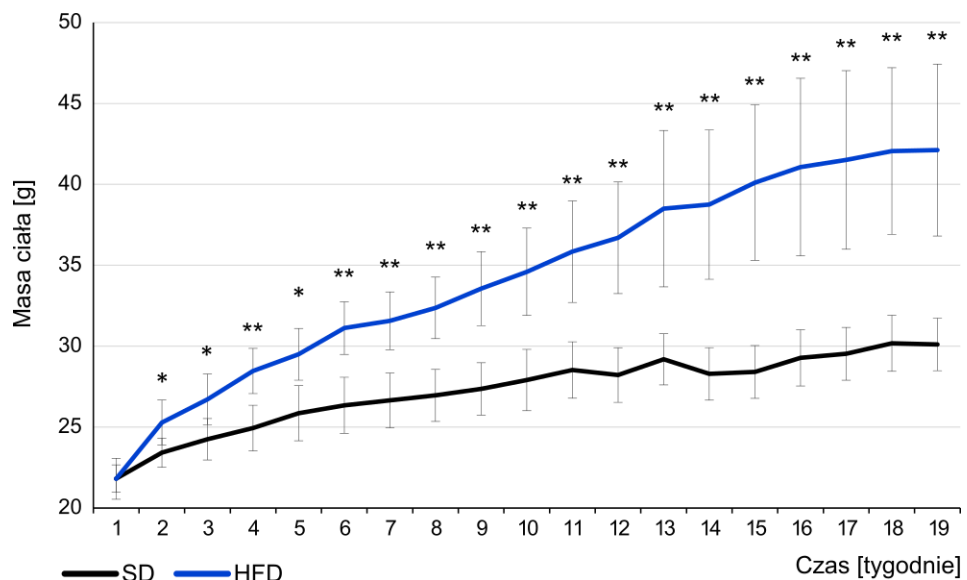
12.3 RYSUNKI

Rysunek uzupełniający 12.1 Wykres średniego przyrostu masy ciała myszy karmionych różnymi dietami w trakcie trwania eksperymentu _____ XXIII

Rysunek uzupełniający 12.2 Wyniki analizy PCA na podstawie pełnego profilu kwasów tłuszczowych w surowicy pacjentów z otyłością przed operacją OAGB (pre-OAGB), 2 tygodnie (FU1) i 6-9 miesięcy po operacji OAGB (FU2) _____ XXIV

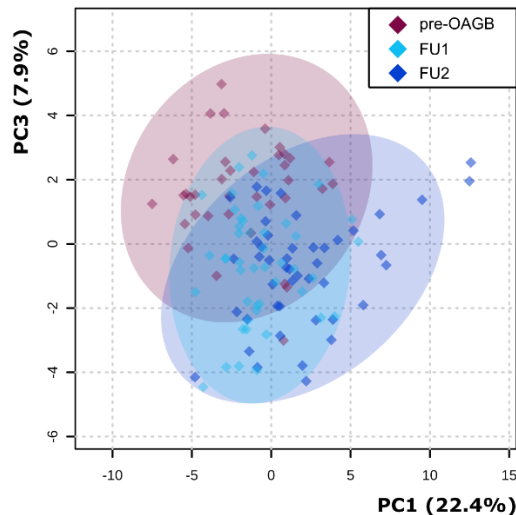
Rysunek uzupełniający 12.3 (A) Stężenie rozgałęzionych aminokwasów - BCAA i (B) zawartość rozgałęzionych kwasów tłuszczowych - BCFA w surowicy pacjentów z cukrzycą typu II i bez _____ XXIV

Rysunek uzupełniający 12.4 Wyniki analizy PCA stężenia oksylipin w surowicy pacjentów z otyłością przed operacją OAGB (pre-OAGB), pacjentów 2 tygodnie po operacji (FU1) i 6-9 miesięcy po operacji (FU2) – płaszczyzna PC1 vs PC3 _____ XXV



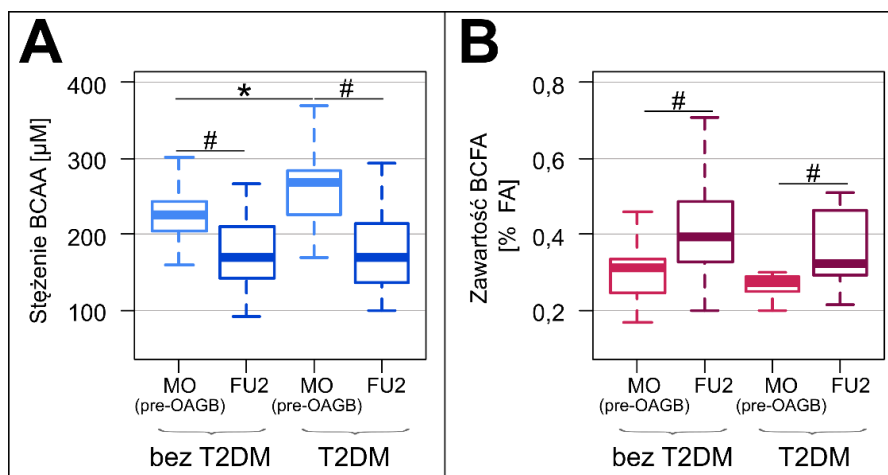
Rysunek uzupełniający 12.1 Wykres średniego przyrostu masy ciała myszy karmionych różnymi dietami w trakcie trwania eksperymentu

* $p < 0,01$, ** $p < 0,001$. Skróty: **HFD** - myszy na diecie wysokotłuszczowej ($n=10$), **SD** - myszy na diecie standardowej ($n=10$). Dane uzyskane dzięki uprzejmości Trójmiejskiej Akademickiej Zwierzętarńi Doświadczalnej. **Dane opublikowane** [68].



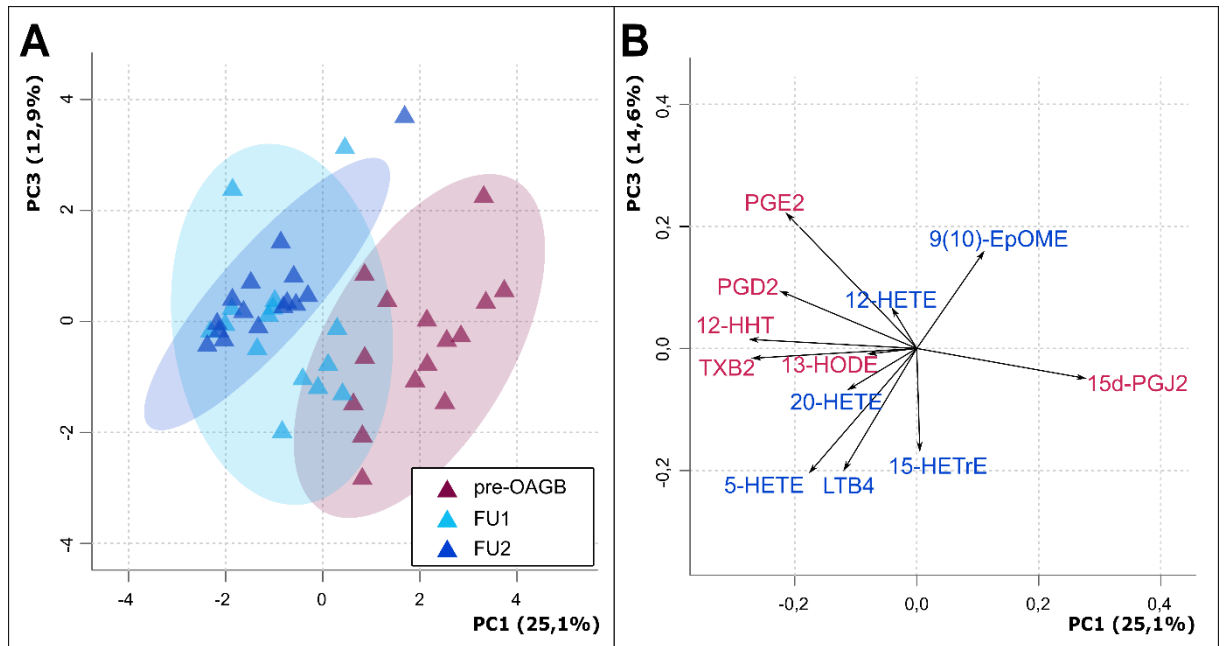
Rysunek uzupełniający 12.2 Wyniki analizy PCA na podstawie pełnego profilu kwasów tłuszczowych w surowicy pacjentów z otyłością przed operacją OAGB (pre-OAGB), 2 tygodnie (FU1) i 6-9 miesięcy po operacji OAGB (FU2)

Brak wyraźnej separacji pomiędzy grupami dla ilości składowych wybranej na podstawie wykresu osuwiska. N = 38. Rysunek własny na podstawie **opublikowanych danych** [201].



Rysunek uzupełniający 12.3 (A) Stężenie rozgałęzionych aminokwasów - BCAA i (B) zawartość rozgałęzionych kwasów tłuszczowych - BCFA w surowicy pacjentów z cukrzycą typu II i bez

* $p < 0,05$, # $p < 0,001$. Skróty: **FU2** - pacjenci z otyłością 6-9 miesięcy po leczeniu OAGB, **MO (pre-OAGB)** - pacjenci z otyłością przed operacją OAGB; **T2DM** - cukrzyca typu II. **Dane opublikowane** [202].



Rysunek uzupełniający 12.4 Wyniki analizy PCA stężenia oksylipin w surowicy pacjentów z otyłością przed operacją OAGB (pre-OAGB), pacjentów 2 tygodnie po operacji (FU1) i 6-9 miesięcy po operacji (FU2) - płaszczyzna PC1 vs PC3

A - wykres obserwacji, **B** - wykres zmiennych; zmiennymi uwzględnionymi w macierzy PCA były oksylipiny, które wykryto w > 50% próbek (Tabela uzupełniająca 12.9).

Na czerwono - zmienne o największym wkładzie w PC1; **na niebiesko** zmienne o największym wkładzie w PC3. N = 15. Wykres własny, dane nieopublikowane.

12.4 DOROBEK NAUKOWY

12.4.1 WYKAZ PRAC ZWIĄZANYCH Z TEMATEM ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

◆ PROJEKTY

1. NCN 2016/21/D/NZ5/00219 SONATA 11 Ewaluacja wpływu Omega Loop Gastric Bypass na poziom bioaktywnych lipidów w przebiegu otyłości olbrzymiej, 2017-2020, wykonawca
2. Badania Młodych Naukowców na Uniwersytecie Gdańskim BMN 538-8610-B296-18 Opracowanie metody oznaczania oksylipin z surowicy krwi techniką tandemowej spektrometrii mas, wyposażonej w mikro ESI, sprzężoną z ultrawysokosprawną chromatografią cieczową (UHPLC-MS/MS), 2019 kierownik
3. Badania Młodych Naukowców na Uniwersytecie Gdańskim BMN 538-8610-B772-17/18 Opracowanie metody ekstrakcji do fazy stałej (SPE) oksylipin z surowicy krwi, 2018, kierownik

◆ ARTYKUŁY Z CZASOPISM

1. Liakh, I., Janczy, A., **Pakiet, A.**, Korczyńska, J., Proczko-Stepaniak, M., Kaska, L., Sledzinski, T., & Mika, A. One-anastomosis gastric bypass modulates the serum levels of pro- and anti-inflammatory oxylipins, which may contribute to the resolution of inflammation. *Int J Obes* **2022**, 46(2), 408–416. <https://doi.org/10.1038/s41366-021-01013-y> (IF = 5,551; MNiSW = 100)
2. **Pakiet, A.**, Haliński, Ł. P., Rostkowska, O., Kaska, Ł., Proczko-Stepaniak, M., Śledziński, T., & Mika, A. The Effects of One-Anastomosis Gastric Bypass on Fatty Acids in the Serum of Patients with Morbid Obesity. *Obes Surg* **2021**, 31(10), 4264-4271. <https://doi.org/10.1007/s11695-021-05531-6> (IF = 3,479; MNiSW = 100)
3. Liakh, I., **Pakiet, A.**, Sledzinski, T., & Mika, A. Methods of the Analysis of Oxylipins in Biological Samples. *Molecules*, **2020**, 25(2), numer artykułu 349, 1-33. <https://doi.org/10.3390/molecules25020349> (IF = 4,412; MNiSW = 140)
4. Mika, A., Wilczynski, M., **Pakiet, A.**, Kaska, L., Proczko-Stepaniak, M., Stankiewicz, M., Stepnowski, P., & Sledzinski, T. Short-Term Effect of One-Anastomosis Gastric Bypass on Essential Fatty Acids in the Serum of Obese Patients. *Nutrients*, **2020**, 12(1),

numer artykułu 187, 1-6. <https://doi.org/10.3390/nu12010187> (IF = 5,719; MNiSW = 140)

- 5. Pakiet, A.,** Jakubiak, A., Mierzejewska, P., Zwara, A., Liakh, I., Sledzinski, T., & Mika, A. The Effect of a High-Fat Diet on the Fatty Acid Composition in the Hearts of Mice. *Nutrients*, **2020**, *12*(3), numer artykułu 824, 1-20. <https://doi.org/10.3390/nu12030824> (IF = 5,719; MNiSW = 140)
 - 6. Pakiet, A.,** Wilczynski, M., Rostkowska, O., Korczyńska, J., Jabłońska, P., Kaska, L., Proczko-Stepaniak, M., Sobczak, E., Stepnowski, P., Magkos, F., Sledzinski, T., & Mika, A. The Effect of One Anastomosis Gastric Bypass on Branched-Chain Fatty Acid and Branched-Chain Amino Acid Metabolism in Subjects with Morbid Obesity. *Obes Surg*, **2020**, *30*(1), 304–312. <https://doi.org/10.1007/s11695-019-04157-z> (IF = 4,129; MNiSW = 100)
 - 7. Halinski, L. P., Pakiet, A.,** Jabłońska, P., Kaska, L., Proczko-Stepaniak, M., Slominska, E., Sledzinski, T., & Mika, A. One Anastomosis Gastric Bypass Reconstitutes the Appropriate Profile of Serum Amino Acids in Patients with Morbid Obesity. *Journal of Clinical Medicine*, **2019**, *9*(1), numer artykułu: 100, 1-15. <https://doi.org/10.3390/jcm9010100> (IF = 4,242; MNiSW = 140)
 - 8. Liakh, I., Pakiet, A.,** Śledzinski, T., & Mika, A. Modern Methods of Sample Preparation for the Analysis of Oxylipins in Biological Samples. *Molecules*, **2019**, *24*(8), numer artykułu 1639, 1-38. <https://doi.org/10.3390/molecules24081639> (IF = 3,267; MNiSW = 140)
 - 9. Pakiet, A.,** Jakubiak, A., Czumaj, A., Śledzinski, T., & Mika, A. The effect of western diet on mice brain lipid composition. *Nutr Metab*, **2019**, *16*(1), numer artykułu 81, 1-10. <https://doi.org/10.1186/s12986-019-0401-4> (IF = 3,211; MNiSW = 100)
- ◆ ROZDZIAŁY Z MONOGRAFII
- 1. Pakiet, A.,** Stepnowski, P., Mika, A. Lipidomics in morbid obesity, W: Handbook of bioanalytics / Buszewski Bogusław, Baranowska Irena (red.), **2022**, Cham, Springer, 167-187, ISBN 978-3-030-95660-8. DOI:10.1007/978-3-030-95660-8_8 (MNiSW = 20)
 - 2. Pakiet, A.,** Stepnowski, P., Mika, A. Lipidomika w otyłości olbrzymiej, W: Bioanalitika w nauce i życiu, 1: nowe wyzwania w bioanalizie klinicznej i ocenie naturalnych surowców leczniczych / Baranowska Irena, Buszewski Bogusław (red.),

2020, Warszawa, Wydawnictwo Naukowe PWN, 113-128, ISBN 978-83-01-21281-0
(MNiSW = 20)

◆ WYSTĄPIENIA KONFERENCYJNE

1. Pakiet, A., Jakubiak, A. & Mika, A.: Wpływ diety wysokotłuszczowej na pracę i skład lipidowy serca w mysim modelu otyłości, XII Interdyscyplinarna Konferencja Naukowa TYGIEL 2020 "Interdyscyplinarność kluczem do rozwoju" 2020, referat wygłoszony
2. Pakiet, A. & Mika, A. Zmiany metabolizmu po operacji bariatrycznej, VI Ogólnopolska Konferencja Interdyscyplinarna "EUREKA" 2020, referat wygłoszony
3. Pakiet, A. & Mika, A. Metody ekstrakcji oksylipin z surowicy krwi, VI Ogólnopolska Konferencja Interdyscyplinarna "EUREKA" 2020, poster
4. Pakiet, A., Haliński, Ł., Rostkowska, O., Kaska, Ł., Proczko-Stepaniak, M., Śledziński, T. & Mika, A.: The effect of one anastomosis gastric bypass on serum fatty acid profile in patients with morbid obesity, 7th Scientific Conference of Polish Metabolomics Society "Metabolomics Circle" 2020, poster
5. Pakiet, A., Czumaj, A., Jabłońska, P., Śledziński, T. & Mika, A. Metabolizm rozgałęzionych kwasów tłuszczowych w mysim modelu otyłości, IV Ogólnopolska Konferencja Interdyscyplinarna "Eureka" 2019, referat wygłoszony
6. Pakiet, A., Czumaj, A., Jakubiak, A., Śledziński, T. & Mika, A.: Alteration of brain lipids in murine model of dietary obesity, 41st ESPEN Congress on Clinical Nutrition & Metabolism "Nutrition - a Highway to Health" 2019, poster
7. Pakiet, A., Wilczyński, M., Rostowska, O., Korczyńska, J., Jabłońska, P., Kaska, Ł., Proczko-Stepaniak, M., Stepnowski, P., Śledziński, T. & Mika A. Bariatric surgery impacts metabolism of branched chain amino acids and branched chain fatty acids, 15th Annual Conference of the Metabolomics Society 2019, poster
8. Pakiet, A., Haliński, Ł., Jabłońska, P., Korczyńska, J., Proczko-Stepaniak, M., Śledziński, T. & Mika A. Evaluating the effect of the one anastomosis gastric bypass on amino acid and fatty acid metabolism using mass spectrometry, 6th Scientific Conference "Metabolomics Circle 2019" 2019, poster
9. Pakiet, A., Haliński, Ł., Wilczyński, M., Kaska, Ł., Proczko-Stepaniak, M., Jabłońska, P. & Mika, A. The effect of omega-loop gastric bypass surgery on serum amino acids concentration, 16th International Interdisciplinary Meeting on Bioanalysis 2019, poster

12.4.2 POZOSTAŁY DOROBEK

◆ PROJEKTY

1. NCN 2020/37/N/NZ5/00726 PRELUDIUM 19 Zmiany w profilu kwasów tłuszczowych w różnych klasach lipidowych w raku piersi – ocena ich roli i wartości diagnostycznej, 2021-2023, kierownik
2. NCN 2016/22/E/NZ4/00665 SONATA BIS 6 Zmiany metabolizmu lipidów w raku jelita grubego - określenie ich roli w rozwoju nowotworu i ocena antyproliferacyjnych właściwości inhibitorów metabolizmu lipidów, 2017-2020, wykonawca
3. Badania Młodych Naukowców na Uniwersytecie Gdańskim BMN 539-T010-B456-20 Nietargetowa lipidomika tkanek pacjentów z rakiem jelita grubego za pomocą spektrometrii mas sprzężonej z chromatografią cieczową, 2020 kierownik

◆ ARTYKUŁY Z CZASOPISM

4. Mika, A., **Pakiet, A.**, Szczygielski, O., Woźniak, K., Osipowicz, K., Kowalewski, C., Krześniak, N., Noszczyk, B. H. & Wertheim-Tysarowska, K. Fatty acid profiles in various lipid fractions in the female epidermis. Does the body site and age matter?, *Acta Biochim Pol* **2022**, 69(3), 657-671. https://doi.org/10.18388/abp.2020_6131 (IF= 2,349; MNiSW = 70)
5. Mika, A., Duzowska, K., Haliński, L. P., **Pakiet, A.**, Czumaj, A., Rostkowska, O., Dobrzycka, M., Kobiela, J. & Sledzinski, T. Rearrangements of Blood and Tissue Fatty Acid Profile in Colorectal Cancer - Molecular Mechanism and Diagnostic Potential. *Frontiers in Oncology* **2021** 11, numer artykułu 689701, 1-12. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.689701> (IF = 5,738; MNiSW = 100)
6. Pakiet, A., Sikora, K., Kobiela, J., Rostkowska, O., Mika, A. & Sledzinski, T. Alterations in complex lipids in tumor tissue of patients with colorectal cancer. *Lipids Health Dis* **2021** 20(1), numer artykułu: 85, 1-11. <https://doi.org/10.1186/s12944-021-01512-x> (IF = 4,315; MNiSW = 70)
7. Mika, A., **Pakiet, A.**, Czumaj, A., Kaczyński, Z., Liakh, I., Kobiela, J., Perdyan, A., Adrych, K., Makarewicz, W. & Sledzinski, T. Decreased Triacylglycerol Content and Elevated Contents of Cell Membrane Lipids in Colorectal Cancer Tissue: A Lipidomic Study. *Journal of Clinical Medicine*, **2020** 9(4), numer artykułu 1095, 1-14. <https://doi.org/10.3390/jcm9041095> (IF = 4,242; MNiSW = 140)
8. Mika, A., Kobiela, J., **Pakiet, A.**, Czumaj, A., Sokołowska, E., Makarewicz, W., Chmielewski, M., Stepnowski, P., Marino-Gammazza, A. & Sledzinski, T. Preferential

uptake of polyunsaturated fatty acids by colorectal cancer cells. *Sci Rep*, **2020**, *10*(1), numer artykułu 1954, 1-8. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58895-7> (IF = 4,380; MNiSW = 140)

- 9.** Mozolewska, P., Duzowska, K., **Pakiet, A.**, Mika, A., & Śledziński, T. Inhibitors of Fatty Acid Synthesis and Oxidation as Potential Anticancer Agents in Colorectal Cancer Treatment. *Anticancer Res*, **2020** *40*(9), 4843–4856. <https://doi.org/10.21873/anticancerres.14487> (IF = 2,480; MNiSW = 70)
- 10.** Czumaj, A., Zabielska, J., **Pakiet, A.**, Mika, A., Rostkowska, O., Makarewicz, W., Kobiela, J., Śledziński, T. & Stelmanska, E. In Vivo Effectiveness of Orlistat in the Suppression of Human Colorectal Cancer Cell Proliferation. *Anticancer Res*, **2019**, *39*(7), 3815–3822. <https://doi.org/10.21873/anticancerres.13531> (IF = 1,994; MNiSW = 70)
- 11.** **Pakiet, A.**, Kobiela, J., Stepnowski, P., Śledziński, T. & Mika, A. Changes in lipids composition and metabolism in colorectal cancer: a review. *Lipids Health Dis*, **2019**, *18*(1), numer artykułu 29, 1-21. <https://doi.org/10.1186/s12944-019-0977-8> (IF = 2,906, MNiSW = 70)

◆ ROZDZIAŁY Z MONOGRAFII

- 1.** **Pakiet, A.**, Stepnowski, P., Mika, A. Rola ceramidów w patologii i diagnostyce wybranych nowotworów, W: Nauka, Badania i Doniesienia Naukowe **2019** Nauki przyrodnicze i medyczne / Wysoczański Tobiasz (red.), 2019, vol. 1, Świebodzice, Idea Knowledge Future, 354-363, ISBN 978-83-951445-6-1

◆ WYSTĄPIENIA KONFERENCYJNE

- 1.** **Pakiet, A.**, Lange, O., Czapiewska, M., Kabata, P. & Mika, A. Wykorzystanie techniki ekstrakcji do fazy stałej (SPE) do analizy profili kwasów tłuszczowych we frakcjach lipidowych tkanek pacjentek z rakiem piersi, XI Polska Konferencja Chemii Analitycznej "Quo vadis nauka, quo vadis analityka?" **2022**, referat wygłoszony
- 2.** Lange, O., **Pakiet, A.**, Czapiewska, M., Kabata, M., Ciosek, M. & Mika, A. Zmiany w profilach kwasów tłuszczowych w tkankach pacjentek z rakiem piersi, II Naukowa Konferencja Wydziału Nauk o Zdrowiu z IMMiT GUMed „Interdyscyplinarne spojrzenie na Nauki o Zdrowiu” **2022**, poster
- 3.** **Pakiet, A.** Polyunsaturated fatty acids in colorectal cancer cells, Virtual Congress on Clinical Nutrition & Metabolism **2021**, referat wygłoszony

4. Duzowska, K., Mika, A. **Pakiet, A.** & Śledziński, T. Zmiany w profilu kwasów tłuszczowych u pacjentów z rakiem jelita grubego, 26 Konferencja Naukowa Wydziału Farmaceutycznego **2021**, poster
5. **Pakiet, A.**, Czumaj, A., Zabielska, J., Kobiela, J., Śledziński, T., Stelmańska, E. & Mika A. Oznaczanie stężenia kwasu palmitynowego we frakcji wolnych kwasów tłuszczowych w surowicy pacjentów z rakiem jelita grubego, II Konferencja Naukowa "Chemia - Biznes - Środowisko" **2019**, poster
6. **Pakiet, A.**, Stepnowski, P. & Mika, A.: Rola ceramidów w patologii i diagnostyce wybranych nowotworów, IV Ogólnopolska Konferencja Interdyscyplinarna "Eureka" **2019**, poster
7. Czumaj, A., Kobiela, J., **Pakiet A.** Zmiany profilu wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w raku jelita grubego, V Ogólnopolskie Sympozjum Biomedyczne ESKULAP **2018**, referat wygłoszony
8. **Pakiet, A.**, Stepnowski, P., Śledziński, T. & Mika, A. Oxylipins associated with colorectal cancer, VII Ogólnopolska Konferencja Młodych Naukowców "Człowiek, Nauka, Środowisko" **2018**, poster
9. **Pakiet, A.**, Czumaj, A., Sokołowska, E., Kobiela, J., Makarewicz, W., Stepnowski, P., Śledziński, T. & Mika, A. Preferential polyunsaturated fatty acids uptake by colorectal cancer cells, 3rd Congress of Polish Biosciences "BIO 2018 - Through interdisciplinary approach into new solutions" **2018**, poster
10. **Pakiet, A.**, Śledziński, T., Stepnowski P. & Mika, A. Wielonienasycone kwasy tłuszczowe jako narzędzie do badania mechanizmów patologii i poszukiwania biomarkerów w raku jelita grubego, I Konferencja Naukowa "Chemia - Biznes - Środowisko" **2018**, poster

12.4.3 NAGRODY I WYRÓŻNIENIA

- ◆ Nagroda Rektora Uniwersytetu Gdańskiego za osiągnięcia naukowe w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w roku akademickim 2019/2020, 31.12.2020 r.
- ◆ Nagroda Rektora Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego za osiągnięcie zespołowe II stopnia za badania nad patofizjologiczną rolą zmian profilu kwasów tłuszczowych, 15.12.2020 r.
- ◆ Nagroda Rektora Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego za osiągnięcie zespołowe II stopnia za badania nad patofizjologiczną rolą kwasów tłuszczowych i aminokwasów, 15.12.2021 r.