

**AKADEMIA WYCHOWANIA FIZYCZNEGO
IM. EUGENIUSZA PIASECKIEGO
W POZNANIU**

**Ocena wpływu wysiłku fizycznego, diety i sauny na profil
mikrobioty jelitowej i wskaźniki bariery jelitowej
u mężczyzn w wieku 20-44 lat**

Konspekt pracy doktorskiej

Doktorant:

Mgr Joanna Szurkowska

Nr albumu 370

Opiekun naukowy:

dr hab. prof. AWF

Joanna Karolkiewicz

Zakład Żywności i Żywienia

AWF w Poznaniu

Poznań, 2019

Spis treści

1. WSTĘP	2
2. CEL PRACY	9
3. HIPOTEZY BADAWCZE	10
4. PROJEKTY	11
4.1 Projekt I	11
4.1.1 Materiały i metody	11
4.1.2. Analiza statystyczna	19
4.1.3. Wyniki badań	19
4.2. PROJEKT II	26
4.2.1. Materiały i metody	26
4.2.2. Analiza statystyczna	28
4.2.3. Wyniki badań	28
4.3. PROJEKT III	31
4.3.1. Materiały i metody	31
4.3.2. Analiza statystyczna	34
4.3.3. Wyniki badań	34
5. OGRANICZENIA PRACY	41
6. PIŚMIENNICTWO	42

1. WSTĘP

Bariera jelitowa stanowi złożoną strukturę i składa się z 4 warstw, w skład których wchodzi mikroorganizmy jelitowe, ochronna warstwa śluzu i mucyny, nabłonka jelitowego oraz komórek układu krwionośnego, immunologicznego, chłonnego, nerwowego. W pierwszej warstwie - najbardziej wewnętrznej, zgromadzona jest mikrobiota jelitowa, w skład której wchodzi bakterie beztlenowe, tlenowe, drożdże, wirusy, archeony [Takiishi et al. 2017]. Mikrobiota jelitowa spełnia wiele istotnych funkcji dla życia i zdrowia człowieka. Najważniejsze funkcje to aktywizacja układu odpornościowego, modulacja ekspresji genów odpowiadających za wspomaganie bariery jelitowej i angiogenezy, procesów trawienia i wchłaniania, rozkładu znajdujących się w pokarmie toksyn i innych substancji kancerogennych, wchłanianie mikroelementów [Blaut 2015]. Ponadto, mikrobiota jelitowa odpowiada za produkcję substancji przeciwbakteryjnych zwanych bakteriocynami oraz pobudzenie organizmu gospodarza do syntezy czynników przeciwbakteryjnych AMPs (ang. *Antimicrobial peptides*), tj. defensyn czy lektyn typu C [Wehkamp et al. 2009]. Mikrobiota jelitowa uczestniczy w utrzymaniu homeostazy energetycznej organizmu, ponieważ enzymy bakteryjne umożliwiają przekształcanie błonnika i mucyny jelitowej w inne łatwo przyswajalne substancje, np. cukry proste czy krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe (SFCA, ang. *short chain fatty acid*), dzięki którym dostarczane jest około 5-15% energii z pożywienia oraz dostarczane są substraty odżywcze dla nabłonka jelitowego, przyczyniając się do jego wzrostu i usprawnienia funkcji ochronnej bariery jelitowej. Dodatkowo bakterie jelitowe, wytwarzające hydrolazy, wpływają na metabolizm tłuszczów w wątrobie, przez co pośrednio oddziałują na przemiany cholesterolu i kwasów tłuszczowych [den Besten et al. 2013]. Krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe wytworzone przez mikrobiotę jelitową posiadają również właściwości immunomodulujące, co sprawia że wiele nieprawidłowych reakcji zapalnych inhibowanych jest na poziomie bariery jelitowej. Mikrobiota jelitowa wpływa również na dojrzewanie i różnicowanie się limfocytów naiwnych w limfocyty regulatorowe (Treg), utrzymywanie równowagi cytokinowej, procesy immunotolerancji oraz tolerancji pokarmowej [Qian et al. 2017; Chassaing et al. 2017; Ojeda et al. 2016]. Mikroorganizmy bytujące w przewodzie pokarmowym w drodze fermentacji uczestniczą w rozkładzie niestrawionych resztek pokarmowych, a produkty tych przemian odżywiają komórki nabłonka jelitowego i determinują jego parametry morfologiczne, tj. liczbę komórek wyściełających kosmki i w kryptach. Szczególną rolę odgrywa w tym aspekcie produkcja maślanu przez bakterie *Faecalibacterium prausnitzii*, z rodzaju *Clostridium* oraz *Butyrivibrio* i *Eubacterium* [Ferreira-Halder 2017]. Ponadto mikrobiota jelitowa wspomaga perystaltykę jelit oraz uczestniczy w biosyntezie witaminy K, B1, B6, B12, kwasu foliowego [Rowland et al. 2017]

Badania molekularne mikrobioty pokazują, że większość bakterii jelitowych nadal pozostaje niezidentyfikowanych. W skład mikrobioty jelitowej zasiedlającej przewód pokarmowy człowieka wchodzi komórki bakterii typu *Bacteroides*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* i *Actinobacteria* (stanowią około 99%) oraz grzyby najczęściej *Candida albicans*, wirusy i archeony [Lopez – Legarrea et. al 2014]. Łączna liczba bakterii tworzących mikrobiotę jelitową człowieka stanowi około 10^{14} komórek [Cukrowska , Klewicka 2014]. Zróżnicowanie bakterii zasiedlających przewód pokarmowy zarówno na poziomie gatunku, jak i pomiędzy gatunkami, jest obecnie oceniane za pomocą nowoczesnych metod molekularnych stosowanych w metagenomice (nauka zajmująca się badaniem genów zawartych w ludzkim i bakteryjnym genomie) [Eckburg et. al 2005]. Mikrobiota jelitowa posiada zdolność do odbierania zarówno sygnałów fizjochemicznych, jak np. pH, obecności składników pokarmowych, ciśnienia osmotycznego, jak również rozpuszczalnych i strukturalnych składników organizmu, jak np. składowych powierzchni jego komórki, stanu mikrośrodowiska, obecności komórek i związków układu immunologicznego, produktów uszkodzenia tkanek. Sygnały środowiskowe zbierane są na powierzchni komórki bakteryjnej, transportowane są do cytoplazmy i przetwarzane przez system, znany jako *quorum sensing*. Bakterie wykorzystują ten sposób komunikacji nie tylko do kontrolowania swojej populacji, ale również do odpowiedzi na czynniki gospodarza uwolnione np. w następstwie uszkodzenia jego tkanek, elementy układu odpornościowego, końcowe produkty niedotlenienia tkanek. Sygnały wysyłane do komórek gospodarza wpływają na ekspresję określonych jego genów i wytwarzania struktur i czynników korzystnych dla stabilizacji bakteryjnej wspólnoty. Zatem, odpowiedź ze strony gospodarza nie zależy tylko od potencjalnych cech kodowanych w bakteryjnym genomie, ale również od procesów na poziomie molekularnym towarzyszącym relacjom bakterie-gospodarz, ich dynamiki i przestrzeni, w której mają miejsce, jak również czasu ich trwania [Lutgendorff et al. 2008].

Mikrobiota jelitowa u człowieka, kształtuje się w pierwszych 1000 dni od narodzin. O różnorodności osobniczej mikrobiomu zasiedlającego organizm noworodka decydują czynniki środowiskowe takie, jak rodzaj porodu, karmienie piersią, przebyte infekcje, dieta, ilość rodzeństwa, higienizacja otoczenia, przynależność do grupy etnicznej. Po tym okresie utrwalony skład ekosystemu mikrobioty jelitowej nie ulega już zasadniczym zmianom i staje się podstawowym rdzeniem mikrobiomu danego organizmu [Lopez – Legarr et. al 2014].

Tabela 1. Dominująca mikrobiota jelitowa u człowieka

Typ	Gromada [phyla]	Rodzaj [genus]	Gatunek
BEZTLENOWE		<i>Bacteroides</i>	<i>Bacteroides spp.</i>
		<i>Bifidobacterium</i>	<i>Bifidobacterium spp.</i>
		<i>Clostridium</i>	<i>Clostridium sp.</i>
		<i>Eubacterium</i>	<i>Eubacterium sp.</i>
		<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus spp.</i>
		<i>Lactobacillus</i>	<i>H202 - Lactobacillus</i>
		<i>Peptostreptococcus</i>	<i>Peptostreptococcus sp.</i>
		<i>Peptococcus</i>	<i>Peptococcus sp.</i>
		<i>Ruminococcus</i>	<i>Ruminococcus sp.</i>
		<i>Faecalibacterium</i>	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>
	<i>Akkermansia</i>	<i>Akkermansia muciniphila</i>	
TLENOWE	Firmicutes	<i>Enterococcus</i>	<i>Enterococcus sp.</i>
		<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus sp.</i>
	Proteobacteria	<i>Escherichia</i>	<i>Escherichia coli</i>
		<i>Escherichia</i>	<i>Escherichia coli Biovare</i>
		<i>Proteus</i>	<i>Proteus spp.</i>
		<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas spp.</i>
		<i>Enterococcus</i>	<i>Enterococcus spp.</i>
	<i>Inne proteolityczne bakterie</i>		

Sprawnie funkcjonujący ekosystem jelitowy wpływa nie tylko na zachowanie zdrowia, ale również zdolności wysiłkowe sportowca [Cerdá et al. 2016]. Wykazano bowiem, że występujące podczas wysiłku fizycznego niedokrwienie jelit z pojawiającym się odwodnieniem i zaburzoną osmolalnością płynów ustrojowych i motoryką jelit, znacząco wpływa na zmianę przepuszczalności bariery jelitowej sportowca [Wang et al. 2012]. Powyższe zmiany w obrębie bariery jelitowej związane są z redystrybucją krwi z jelit do krążenia obwodowego w celu jej schłodzenia, za co odpowiedzialny jest, przynajmniej częściowo, zachodzący w czasie wysiłku fizycznego wzrost temperatury wewnętrznej organizmu sportowca [Pyne et al. 2014]. Z czasem podrażniona bariera jelitowa może tracić swoją zdolność do selektywnego przepuszczania substancji do układu krwionośnego, głównie z powodu uszkodzenia połączeń ścisłych pomiędzy enterocytami - tight junction (TJ) [Ulluwishewa et al. 2011]. Dodatkowo uogólniony stan zapalny

występujący u sportowców wysokiego wyczynu, może nasilać przepuszczalność jelita związaną z osłabieniem (TJ) [Fasano 2011]. Osłabiona funkcja bariery jelitowej powoduje przedostawanie się ze światła jelita do krwioobiegu, nie tylko całych bakterii czy lipopolisacharydów występujących w błonie komórkowej bakterii Gram-ujemnych (LPS), ale także większych molekuł i niestrawionych składników pokarmowych. W takim przypadku organizm traktuje je jako szkodliwe, aktywując odpowiedź immunologiczną. Antygeny lub kompleksy immunologiczne, kumulują się w tkankach obwodowych, powodując miejscowe stany zapalne, czego konsekwencją może być wzrost produkcji cytokin prozapalnych (IL-1, IL-6, TNF- α) oraz rozwój alergii IgG – zależnej (opóźnionej) [Cenit et al. 2015; Jeukendrup et al. 2000]. Wystąpienie dolegliwości wynikających ze zmienionej przepuszczalności jelit, może nie tylko utrudniać, ale nawet uniemożliwić rozwój kariery sportowej zawodnika [Clark et al. 2016].

Jednym z istotnych czynników wpływających na zmianę mikrobioty jelitowej u sportowców jest modyfikacja diety, determinującą dostępność makroskładników pokarmowych [Marlicz et al. 2015]. Zmieniony określoną dietą profil i aktywność metaboliczna mikrobioty jelitowej, w szczególności wysoką podażą białka czy węglowodanów wpływa na funkcjonowanie enzymów trawiennych, pH treści pokarmowej oraz zmiany funkcji bariery jelitowej, a tym samym produkcję mediatorów zapalnych i przeciwzapalnych zaburzających istotnie nie tylko metabolizm, ale i zdrowie sportowca. Według *Amerykańskiego Stowarzyszenia Dietetycznego (ADA)* zlecane jest sportowcom wysokie spożycie cukrów prostych w posiłkach i przekąskach, w ilości od 6 do 10 g/kilogram masy ciała na dobę, w celu utrzymania wysokiego poziomu glukozy we krwi i glikogenu przy jednocześnie niskiej podaży błonnika, aby przyspieszyć opróżnianie żołądka i zminimalizować ryzyko zaburzeń gastrycznych. Taka modyfikacja diety sportowców może redukować syntezę krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych, zmieniać pH treści jelit, i tym samym zaburzać absorpcję związków mineralnych poprzez zmianę ich rozpuszczalności [Conlon et al. 2015].

Również zwiększona podaż białka w diecie zawodników uprawiających dyscypliny szybkościowo-siłowe może decydować o zmianie profilu mikrobioty jelitowej, produkcji cytokin pro- i przeciwzapalnych i w konsekwencji funkcji bariery jelitowej [Mach et al. 2017]. W dostępnej literaturze przedmiotu, wyniki badań wskazują, że wśród zawodników dyscyplin siłowych najczęściej przekraczane są rekomendacje dotyczące podaży białka dla sportowców [Rankin, et al. 2004]. Odnotowano, że u sportowców dyscyplin siłowych podaż białka w diecie wynosi od 1.9 do 4.3 g/kg m.c. /dzień [Spendlove et al. 2015]. Wykorzystywanie białek jako źródła energii na drodze fermentacji białkowej przez bakterie proteolityczne zachodzi tylko,

przy niskiej podaży węglowodanów [Scott et al. 2014]. Produktami fermentacji białkowej są: SCFA, kwasy tłuszczowe o rozgałęzionych łańcuchach (BCFA; *branched chain fatty acids*), wodór oraz CO₂, jednak przemianom tym towarzyszy zwiększona związków toksycznych, takie jak: amoniak, aminy, związki fenolowe i indolowe, które najczęściej podlegają reakcji sprzęgania z siarczanami albo glukuronidami w wątrobie, a następnie wydzielane są wraz z żółcią i wydalane z organizmu z moczem. Jednak część z tych związków może podlegać hydrolizie w jelicie grubym przez mikroorganizmy jelitowe, co powoduje ich uwolnienie. Proces ten jednak zależy, nie tylko od stosowanej diety, ale także od aktywności sekrecyjnej przewodu pokarmowego, wydzielania gruczołów dokrewnych oraz składu ilościowego i jakościowego mikrobioty jelitowej [Clark et al. 2016]. Metabolity bakteryjne, pochodzące z aminokwasów, zostały tylko częściowo scharakteryzowane, jednak wyniki badań wskazują, że stosowanie diety wysokobiałkowej (HPD), może być niebezpieczne ze względu na zmianę ekspresji genów komórek okrężnicy, bakterii fermentujących białka oraz powstających metabolitów [Chunlong et al. 2016]. Ponadto, nasilenie procesów fermentacyjnych w jelicie sportowca powoduje wzdęcia, zaparcia, klucia w boku, parcie na stolec, biegunki, krwawienie jelitowe, przewlekłe zapalenie błony śluzowej o niewielkim nasileniu, zaburzenie bariery jelitowej oraz może mieć znaczenie w często spotykanym u sportowców dyscyplin siłowych rozwojem trądzika [Veith et al. 2010]. Wyniki badań wskazują, że zmiana diety u sportowców, z nisko- na wysokotłuszczową, może również niekorzystnie wpływać na zmianę profilu mikrobioty jelitowej [Kubeck et al. 2016].

Sportowcy wysokiego wyczynu stanowią grupę szczególnie narażoną na zaburzenie mikrobioty jelitowej ze względu na zwiększone ryzyko doznania stresu spowodowanego nadmiernym wysiłkiem fizycznym i niewystarczającym odpoczynkiem [Purvis et al. 2010]. Wysoki poziom stresu fizycznego i psychicznego obserwuje się szczególnie w dyscyplinach o charakterze wytrzymałościowym, w których wysiłek fizyczny jest najczęściej wykonywany 2-6 godzin dziennie, przez 6 dni w tygodniu, przez kilka tygodni [Mackinnon 2000]. Już we wczesnym etapie przewlekłego stresu fizycznego i psychicznego u sportowców wykazano zwiększoną aktywność osi podwzgórze-przysadka – nadnercza (HPA), manifestującą się wzmożonym wydzielaniem hormonu adenokortykotropowego (ACTH) stymulowanym przez wydzielaną w podwzgórzu kortykoliberynę (CRF) [Clark 2016]. Wyniki badań wykazały, że wysokie stężenie uwalnianego neurotransmitera (CRF) istotnie wpływa na zwiększenie przepuszczalności bariery jelitowej [Collins et al. 2012]. Uwalniany pod wpływem stresu kortyzol przez (HPA) wpływa na komórki immunologiczne, które zmieniają profil wydzielanych cytokin oraz skład i funkcję mikrobioty jelitowej [Carabotti et al. 2015]. Stres u sportowców podwyższa również aktywność autonomicznego układu nerwowego (ANS), co powoduje neuronalne

uwalnianie noradrenaliny (NE) i innych neuroprzekaźników w tkankach obwodowych, między innymi, przewodzie pokarmowym [Ulrich-Lai et al. 2009]. Jelita wraz z mikrobiotą jelitową komunikują się z centralnym układem nerwowym (OUN) poprzez szlaki nerwowe, immunologiczne oraz hormonalne [Bienenstosk et al. 2015]. Istotną linię komunikacyjną pomiędzy mikrobiotą jelitową a OUN zapewnia nerw błędny (n.X), stanowiący przywspółczulne odgałęzienie AUN [Eisenstein M., 2016]. Poza połączeniem neurohormonalnym, odrębną formą komunikacji osi mózg – jelita stanowią hormony wydzielane przez jelita oraz metabolity produkowane przez mikrobiotę jelitową tj. kwas gamma aminomasłowy (GABA), neuropeptyd Y, dopamina oraz SCFA i tryptofan [Marchesi et al. 2016].

Ponadto u sportowców prócz nasilonego stresu spowodowanego intensywnym wysiłkiem fizycznym, obserwuje się zwiększoną ilość nawracających infekcji, mikrourazów czy kontuzji, które niejednokrotnie prowadzą do przyjmowania przez nich antybiotyków, niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NLPZ) i leków przeciwgrzybiczych mających wpływ na ilość i różnorodność mikrobioty jelitowej [Lamprecht et al. 2012].

W celu przyspieszenia procesu regeneracji, coraz częściej u sportowców wprowadza się nowe techniki i zabiegi odnowy biologicznej, których celem jest wzmocnienie efektów prowadzonych treningów. W celu wywołania u sportowców zmian adaptacyjnych do wysokiej temperatury i długotrwałej pracy fizycznej, wykorzystywane są obecnie, z dobrym skutkiem, ćwiczenia w komorze klimatycznej [Lorenzo et al. 2010]. Jednym z przejawów adaptacji organizmu sportowca do wysokiej temperatury wewnętrznej i otoczenia są zmiany zachodzące w obrębie bariery jelitowej, która aktywnie uczestniczy w aktywacji mechanizmów odpowiedzi immunologicznej poprzez zmianę przepuszczalności transbłonowej i przetwarzania sygnałów w obrębie samej mikrobioty jelitowej, jak również jej metabolitów. Przetwarzanie informacji pochodzących ze środowiska uzależnione jest od genetycznych możliwości mikroorganizmów i zachodzi poprzez włączanie lub wyłączenie określonych genów, ich wymianę lub wyciszenie, co w konsekwencji powoduje, że drobnoustroje uzyskują nowe właściwości pomagające przystosować się do określonego środowiska. Z drugiej strony, układ immunologiczny stale kontroluje i ocenia mikroorganizmy zasiedlające organizm i odpowiednio je reguluje za pomocą procesów odpowiedzi immunologicznej.

Opisane procesy dynamicznych powiązań i wymiany informacji odbywają się w przygranicznej strefie na styku bakterii, komórek nabłonka jelitowego, komórek dendrytycznych, limfocytów, granulocytów. Zjawisko funkcjonowania wielokierunkowej sieci powiązań, poprzez którą możliwe jest przesyłanie sygnału i porozumiewanie się bakterii

z bakteriami, bakterii z gospodarzem i gospodarza z bakteriami zasadniczo zmienia dotychczasowe spojrzenie na mechanizmy kształtowania się i funkcjonowania składowych układu immunologicznego i produktów uszkodzeń komórkowych u sportowców [Tilg et al. 2006]. Zatem częściej występujące u sportowców wysokiego wyczynu stany zapalne i zwiększona przepuszczalność jelit, związana z osłabieniem połączeń ścisłych (tight junctions; TJ) pomiędzy enterocytami wywołana zarówno obciążeniami treningowymi, startowymi wraz ze zmodyfikowaną dietą czy zabiegami terapeutycznymi np. zabiegi w saunie, mogą zmieniać funkcje bariery jelitowej, co w następstwie może regulować układ immunologiczny sportowca.

2. CEL PRACY

1. Celem wykonanych badań była:

- ocena wpływu obciążeń treningowych i startowych na zmianę jakościową i ilościową bakterii wskaźnikowych mikrobioty jelitowej oraz stężenia wybranych cytokin IL-4, IL – 12 ,TNF – alfa u kolarzy w okresie startowym rocznego cyklu treningowego;
- ocena jakościowa i ilościowa bakterii wskaźnikowych mikrobioty jelitowej oraz stężenia wybranych cytokin IL-4, IL – 12, TNF – alfa u sportowców trenujących dyscyplinę o charakterze wytrzymałościowym (kolarze) i sportowców trenujących dyscyplinę o charakterze siłowym (kulturyści) oraz mężczyzn nietrenujących o zbliżonym wieku;
- ocena wpływ obciążenia termicznego na zmiany jakościowe i ilościowe wybranych bakterii wskaźnikowych mikrobioty jelitowej, wskaźnik szczelności bariery jelitowej - zonuliny w kale oraz stężenia wydzielniczej immunoglobuliny sIgA u zdrowych mężczyzn poddanym obciążeniom treningowym

3. HIPOTEZY BADAWCZE

1. Obciążenia treningowe i startowe oraz zmiana diety stosowana u kolarzy w okresie startowym mogą mieć wpływ na zmianę profilu mikrobioty jelitowej i uwalnianych cytokin.
2. Stosowany różny rodzaj treningu sportowego wraz ze zmienioną proporcją makroskładników w diecie może wpływać na profil mikrobioty jelitowej i cytokin u zawodników różnych dyscyplin.
3. Stosowane obciążenie termiczne w postaci sauny po wykonanym treningu fizycznym mogą zmieniać profil mikrobioty jelitowej oraz modyfikować funkcje bariery jelitowej mężczyzn nieuprawiających wyczynowo sportu.

4. PROJEKTY

4.1 Projekt I

Wpływ obciążeń treningowych i startowych na zmianę jakościową i ilościową bakterii wskaźnikowych mikrobioty jelitowej oraz stężenia wybranych cytokin IL-4, IL – 12, TNF – alfa u kolarzy w okresie startowym rocznego cyklu treningowego.

4.1.1 Materiały i metody

W badaniach uczestniczyło 30 mężczyzn w wieku 20 – 44 lat. Pierwszą grupę (n=15) stanowili mężczyźni uprawiający na poziomie amatorskim kolarstwo szosowe (staż treningowy 5 ± 2 lat), pochodzący z klubów sportowych *FTI Sports & Fitness Group* i *Fogt Bikes Team*. Grupę kontrolną (n=15) stanowili mężczyźni o zbliżonym wieku wykazujący niski poziom aktywności fizycznej. Przed przystąpieniem do badań wszyscy zawodnicy zostali poinformowani o celu i przebiegu badań oraz wyrazili zgodę na ich przeprowadzenie. Badania uzyskały zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu o numerze uchwały nr173/16 z dnia 04 lutego 2016 roku.

Kryterium włączenia uczestników do badań było udzielenie pisemnej zgody na udział w badaniu, wiek od 20 do 44 lat. Dodatkowymi kryteriami w grupie kolarzy był: staż treningowy (minimum 2 lata), częstość treningów w czasie tygodnia (5 x w tygodniu; łącznie 10h tygodniowo) oraz brak przebytych kontuzji w okresie ostatnich 4 tygodniach przed badaniem.

Kryteriami wykluczenia uczestników z badań było przyjmowanie środków steroidowych przyjmowanie środków doustnych przeciwgrzybiczych, przeciw pasożytniczych (nie dotyczyło środków przeciwgrzybiczych przyjmowanych miejscowo), przyjmowanie pre – i/lub probiotyków oraz odbycie podróży do krajów tropikalnych w czasie ostatnich 4 tygodni przed badaniem.

Badania u mężczyzn obu grup zostały przeprowadzone przed rozpoczęciem okresu startowego rocznego cyklu treningowego dla kolarzy szosowych (I termin). Po zakończeniu okresu startowego (II termin) dokonano badań tylko w grupie kolarzy.

Masę oraz skład ciała badanych mężczyzn oznaczono za pomocą metody bioimpedancji elektrycznej, analizatorem TANITA BC 418-MA (certyfikat MDD Approved, NAWI Class III; producent Tanita Corporation, Japonia).

Przed przystąpieniem do badań w obu grupach badanych oraz po ich zakończeniu ,

w grupie kolarzy dokonano oceny wydolności fizycznej.

W celu określenia pułapu tlenowego ($VO_2\max$) badanych, przeprowadzono test wysiłkowy o wzrastającej intensywności na cykloergometrze Kettler DX1 Pro, (Ense – Parsit, Germany) w laboratorium Zakładu Fizjologii, AWF w Poznaniu (certyfikat ISO 9001:2000 standard no.956-2007-AQ-GDA-rvA.) Badania przeprowadzone zostały w godzinach od 8:00 do 12:00, w klimatyzowanym pomieszczeniu o stałej wilgotności (ok. 60%) i temperaturze (ok. 22°C).

Po rozgrzewce z obciążeniem hamującym, zwiększano obciążenie hamujące od 50W (85 – 90 rpm) o 20W co 1 minutę (bez zmiany kadencji). Próbę zakończono w momencie odmowy przez badanego kontynuacji testu. Przy użyciu przenośnego ergospirometru Oxycon Mobile (Jaeger, Germany), rejestrowano parametry oddechowe (VE , VCO_2 , VO_2) i krążenie (HR) z wykorzystaniem pulsometru Polar (Poland, Finland).

Badani zostali przeszkoleni z zakresu prawidłowego zapisu spożycia pokarmów i napojów, których ilość i jakość monitorowana była w czasie 3 dni. Oceny ilości spożytych kilokalorii oraz proporcji makroskładników dokonano na podstawie trzydniowego dziennika żywieniowego wypełnianego przez każdego uczestnika badania. W celu obliczenia danych związanych ze spożytą ilością kilokalorii oraz makroskładników, wykorzystano program Dietetyk 2014.

Informacje dotyczące stanu zdrowia, poziomu aktywności fizycznej, przyjmowanej suplementacji, przebytych chorób, przyjmowanych leków, zostały poddane ocenie za pomocą metody kwestionariusza wypełnionego w dniu badania.

W celu dokonania analiz wskaźników biochemicznych pobrano od badanych będących na czczo 3 ml krwi z żyły odłokciowej. Materiał do oznaczeń biochemicznych, to jest osocze, frakcjonowano w Laboratorium Analitycznym Zakładu Higieny Akademii Wychowania Fizycznego w Poznaniu. Próby materiału biologicznego były przechowywane w temperaturze – 80°C do chwili oznaczeń biochemicznych. W osoczu krwi oznaczono stężenie interleukiny IL – 4, IL – 12, TNF – alfa, za pomocą testu immunoenzymatycznego ELISA (R & D System, Inc., Minneapolis, MN, USA). Minimalna czułość stosowanych testów diagnostycznych wynosiła dla IL-12 < 5,0 pg / mL , dla IL-4 < 10 pg / mL, dla TNF-alfa < 1,3 pg / mL. Pomiaru stężeń dokonano metody immunoenzymatycznej ELISA przy użyciu spektrofotometru Bio Tek Elx808 (USA).

W celu dokonania oznaczeń ilościowych i jakościowych wybranych bakterii wskaźnikowych i grzybów w przewodzie pokarmowym oraz określenia pH kału poproszono badanych mężczyzn o dostarczenie próbki kału w czasie 48h od pobrania (materiał pozostaje stabilny przez 3 dni od

pobrania, stanowiąc czas umożliwiającą analizę). Pobranie kału należało wykonać wg ustalonej procedury opracowanej przez KyberKompaktPRO (Instytut Mikrobiologii). W tym celu jałowy pojemnik o objętości 150ml należało wypełnić do $\frac{3}{4}$ pojemności, najlepiej z ośmiu różnych miejsc i szczelnie zamknąć pokrywką. Analizę kału wykonano w laboratorium Instytutu Mikrobiologii metodą posiewu oraz przy zastosowaniu techniki łańcuchowej reakcji polimerazy (polymerase chain reaction – PCR) Real – time PCR (qPCR).

Posiew mikrobiologiczny w kierunku ilościowej oceny wykorzystano do oceny wybranych mikroorganizmów z rodziny *Enterobacteriaceae* - *Escherichia coli*, *Escherichia coli* Biovare, *Proteus spp.*, *Pseudomonas spp* i innych bakterii proteolitycznych, należących do bakterii tlenowych z gromady *Proteobacteria*, tlenowych bakterii *Enterococcus spp.* z gromady *Firmicutes*, beztlenowych *Lactobacillus spp.*, *Clostridium spp.* należących do gromady *Firmicutes* oraz grzybów drożdżopodobnych. (tab.2).

Techniką Real-time PCR [qPCR] oznaczono bakterie beztlenowe: *Faecalibacterium prausnitzii* z gromady *Faecalibacterium*, *Akkermansia muciniphila* z gromady *Akkermansia*, *Bifidobacterium spp.* z gromady *Actinobacteria* oraz *Bacteroides spp.* z gromady *Bacteroidetes* oraz oznaczono ogólną liczbę bakterii [TBC, ang. total bacterial count] (tab.2)

Tabela 2. Wybrane bakterie wskaźnikowe oznaczone wg procedury opracowanej przez KyberKompaktPRO

Szczep [gatunek bakterii]	Charakterystyka	Norma [CFU/g kału]	Metoda oznaczenia	Charakterystyka metody
Bakterie tlenowe				
<i>Escherichia coli</i>	Mikrobiota ochronna	$\geq 10^6$	posiew	Chromid CPSE agar (BioMerieux) Inkubacja w 37°C przez 18-24 godz. Warunki tlenowe.
<i>E.coli Biovare</i>	Mikrobiota proteolityczna	$< 2 \times 10^4$	posiew	Chromid CPSE agar (BioMerieux) Inkubacja w 37°C przez 18-24 godz. Warunki tlenowe.
<i>Proteus spp.</i>	Mikrobiota proteolityczna	$< 2 \times 10^4$	posiew	Chromid CPSE agar (BioMerieux) Inkubacja w 37°C przez 18-24 godz. Warunki tlenowe.
<i>Pseudomonas spp.</i>	Mikrobiota proteolityczna	$< 2 \times 10^4$	posiew	Inkubacja w 37°C przez 18-24 godz. Warunki tlenowe.
<i>Inne bakterie proteolityczne</i>	Mikrobiota proteolityczna	$< 2 \times 10^4$	posiew	Inkubacja w 37°C przez 18-24 godz. Warunki tlenowe.
Bakterie beztlenowe				
<i>Bifidobacterium spp.</i>	Mikrobiota ochronna	$\geq 10^8$	qPCR	
<i>Bacteroides spp.</i>	Mikrobiota ochronna	$\geq 10^9$	qPCR	
<i>Lactobacillus spp.</i>	Mikrobiota ochronna	$\geq 10^5$	posiew	Inkubacja w 37°C przez 48 godz. Eksykator z generatorem atmosfery 15% CO ₂ (Genbag CO ₂ , BioMerieux)
<i>H₂O₂ - Lactobacillus</i>	Mikrobiota ochronna	$\geq 10^5$	posiew	
<i>Clostridium spp.</i>	Mikrobiota proteolityczna	$\leq 10^5$	posiew	Inkubacja w 37°C przez 48 godz. Anaerostaty z generatorem warunków beztlenowych
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	Mikrobiota odżywiająca nabłonek jelita	$\geq 10^9$	qPCR	
<i>Akkermansia muciniphila</i>	Mikrobiota odżywiająca nabłonek jelita	$\geq 10^8$	qPCR	

W celu wykonania posiewu w kierunku wybranych bakterii pobierano 0,25 g stolca do próbki z 2,25 ml jałowego roztworu NaCl 0,85%. Probówkę mieszano na mieszadle celem homogenizacji. Tak przygotowana próbka stanowiła rozcieńczenie 10⁻¹ badanego materiału. Następnie wykonywano szereg dziesięciokrotnych rozcieńczeń, od 10⁻² do 10⁻⁸ dla każdej badanej próbki. W tym celu przenoszono 100 µl zawiesiny kału z rozcieńczenia 10⁻¹ do próbki z zawartością 900 µl NaCl 0,85% i uzyskiwano rozcieńczenie 10⁻². Następnie przenoszono 100 µl zawiesiny kału z rozcieńczenia 10⁻² do

próbówki z zawartością 900 µl NaCl 0,85% i uzyskiwano rozcieńczenie 10⁻³. Postępowano tak aż do uzyskania ostatniego rozcieńczenia czyli 10⁻⁸. Następnie w celu wykonania posiewu mikrobiologicznego przenoszono po 50 µl zawiesiny z określonych rozcieńczeń, zaczynając od najwyższego (10⁻⁸) na poszczególne podłoża mikrobiologiczne. Zawiesinę rozprowadzano po podłożach diagnostycznych jałową eżą.

Do hodowli poszczególnych mikroorganizmów użyto następujących mikrobiologicznych podłoży diagnostycznych (tab. 3).

Tabela 3. Podłoża diagnostyczne oraz warunki hodowli mikroorganizmów oznaczanych wg procedury opracowanej przez KyberKompaktPRO

Nazwa	Opis	Rodzaj bakterii	Warunki hodowli
Columbia agar z 5% krwią baranią (Becton Dickinson)	podłoże uniwersalne, nieselektywne	hodowla tlenowych i beztlenowych, niewymagających bakterii	Inkubacja w 37°C przez 18-24 godz. Warunki tlenowe.
Chromid CPSE agar (BioMerieux)	podłoże chromogenne do izolacji, oceny ilościowej oraz bezpośredniej identyfikacji	<i>E.coli</i> , <i>Proteus</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Enterobacter-Serratia</i> , <i>Citrobacter</i> (KESC)	Inkubacja w 37°C przez 18-24 godz. Warunki tlenowe.
Rogosa Agar + TMB + Peroksydaza (Heipha)	podłoże selektywne przez niskie pH do izolacji bakterii	z rodzaju <i>Lactobacillus</i>	Inkubacja w 37°C przez 48 godz. Eksykator z generatorem atmosfery 15% CO ₂ (Genbag CO ₂ , BioMerieux)
SPM-Agar z Polimiksyną (Heipha)	podłoże do izolacji bakterii	z rodzaju <i>Clostridium</i>	Inkubacja w 37°C przez 48 godz. Anaerostaty z generatorem warunków beztlenowych (GENbox anaer, BioMerieux) i wskaźnikiem atmosfery beztlenowej.
Enterococcosel agar (Graso)	podłoże do izolacji bakterii oraz potwierdzenie ziarenkowców	z rodzaju <i>Enterococcus</i>	Inkubacja w 37°C przez 18-24 godz. Warunki tlenowe.

Izolację bakteryjnego DNA z próbki stolca wykonywano za pomocą zestawu QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (QIAGEN). W tym celu odważano 180-220 mg stolca do sterylnej próbówki o pojemności 2ml. Następnie dodawano 1,0 ml buforu InhibitEX i mieszano na vortexie przez ok. 1 min. do całkowitej homogenizacji próbki. Probówkę z próbką umieszczano w bloku grzejnym o temperaturze 70°C i inkubowano przez 5 minut. Następnie próbkę mieszano na vortexie przez 15 sekund, a dalej wirowano przez 1 minutę przy prędkości 14000 rpm. Do nowej próbówki o pojemności 1,5 ml przenoszono 15 µl proteinazy K, a następnie dodawano do niej 200 µl nadsącza uzyskanego w poprzednim etapie oraz 200

μ l buforu trawiącego AL i mieszano na vortexie przez 15 sekund. Probówkę umieszczano w bloku grzejmym o temperaturze 70°C i inkubowano przez 10 minut. Następnie probówkę wirowano przez 15 sekund w celu usunięcia kropel z wieczka. Dodawano 200 μ l etanolu i mieszano na vortexie przez 15 sekund. Następnie probówkę wirowano przez 15 sekund w celu usunięcia kropel z wieczka. Całą zawartość próbki przenoszono na kolumnę QIAamp umieszczoną na próbce odbierającej i wirowano 1 min/14000 rpm. Kolumnę przekładano do nowej próbki odbierającej, przesącz odrzucano. Na kolumnę dodawano 500 μ l buforu płuczącego AW1, wirowano przez 1 minutę przy prędkości 14000 rpm. Kolumnę przekładano do nowej próbki odbierającej, a przesącz odrzucano. Na kolumnę dodawano 500 μ l buforu płuczącego AW2 i wirowano przez 3 minuty przy prędkości 14000 rpm. Po tym etapie wykonywano dodatkowe wirowanie na nowej próbce odbierającej przez 3 min przy prędkości 14000rpm. Kolumnę przekładano do nowej próbki o pojemności 1,5ml, przesącz odrzucano. Na kolumnę dodawano 200 μ l buforu elucyjnego AE, inkubowano 1 minutę, a następnie wirowano przez 1 minutę przy prędkości 14000 rpm. Dalszej analizy dokonano przy użyciu 7300 Real-Time PCR System. W łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym (Real-time PCR) stosowane były startery (ang. *primers*), czyli krótkie oligonukleotydy, o sekwencji zaprojektowanej specjalnie dla badanego fragmentu DNA. Umożliwiały one polimerazie DNA połączenie z matrycą. Amplifikacja określonego rejonu DNA wymagała zawsze obecności dwóch starterów, otaczających żądany fragment z obu stron, są to tzw. starter forward (F) i starter reverse (R). Specyficzne startery (Sigma - Aldrich) dla oznaczanych w badaniu mikroorganizmów przedstawiono w tabeli 4.

Tabela 4. Specyficzne startery stosowane dla poszczególnych mikroorganizmów i ogólnej liczby bakterii oznaczanych wg procedury opracowanej przez KyberKompaktPRO

Nazwa	Opis produktu	Sekwencja
Praus-F480	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i> starter forward	CAGCAGCCGCGGTA
Praus-R631	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i> starter reverse	CTACCTCTGCACTACTCAAGAAA
Akk.muc-F	<i>Akkermansia muciniphila</i> starter forward	CAGCACGTGAAGGTGGGGAC
Akk.muc-R	<i>Akkermansia muciniphila</i> starter reverse	CCTTGCGGTTGGCTTCAGAT
F-Bifid09c	<i>Bifidobacterium spp.</i> starter forward	CGGGTGAGTAATGCGTGACC
R-Bifid06	<i>Bifidobacterium spp.</i> starter reverse	TGATAGGACGCGACCCCA
Bacter11	<i>Bacteroides spp.</i> starter forward	CCTWCGATGGATAGGGGTT
Bacter08	<i>Bacteroides spp.</i> starter reverse	CACGCTACTTGGCTGGTTCAG
Uni-F340	Starter uniwersalny forward	ACTCCTACGGGAGGCAGCAGT
Uni-R514	Starter uniwersalny reverse	ATTACCGCGGCTGCTGGC

W technice Real-time PCR stosowana jest krzywa standardowa, w odniesieniu do której interpretowane są oznaczenia poszczególnych próbek. Krzywą standardową otrzymuje się poprzez rozcieńczenia standardu DNA o znanym stężeniu badanego parametru. Standardy do analizy produkowane były w Instytucie Mikroekologii w Herborn, Niemcy. W tabeli 5 przedstawiono standardy użyte w badaniu.

Tabela 5. Specyficzne standardy stosowanych dla oznaczanych mikroorganizmów i ogólnej liczby bakterii w oznaczeniach wg procedury opracowanej przez KyberKompaktPRO

Nazwa	Opis produktu
<i>Bifidobacterium infantis</i> DNA	Standard do oznaczeń <i>Bifidobacterium spp.</i> , izolowany z <i>Bifidobacterium infantis</i>
<i>Bacteroides fragilis</i> DNA	Standard do oznaczeń <i>Bacteroides spp.</i> , izolowany z <i>Bacteroides fragilis</i>
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i> DNA	Standard do oznaczeń <i>Faecalibacterium prausnitzii</i>
<i>Akkermansia muciniphila</i> DNA	Standard do oznaczeń <i>Akkermansia muciniphila</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DNA	Standard do oznaczeń całkowitej liczby bakterii izolowany z <i>Pseudomonas aeruginosa</i>

Po zakończeniu reakcji ilościowe wyniki odczytywano przy użyciu systemu komputerowego (7300 System SDS Software).

W celu wykonania posiewu w kierunku grzybów drożdżopodobnych pobierano 0,25 g stolca do probówki z 2,5 ml trypsyny oraz 25 μ l antybiotyku (Penicylina/Streptomycyna, Sigma-Aldrich), w celu zahamowania wzrostu bakterii. Odpowiednio przygotowaną próbkę, po rozmieszaniu na mieszadle, umieszczano w komorze inkubacyjno-wytrząsającej w temperaturze 37°C na 15 min w celu nadtrawienia resztek pokarmowych, mogących utrudniać wzrost grzybow. Po tym czasie 400 μ l zawiesiny przenoszono do 1,6 ml roztworu PBS, celem wypłukania pozostałości enzymu trawiennego. Następnie w celu wykonania posiewu przenoszono po 100 μ l zawiesiny na podłoże Sabouraud agar z gentamycyną i chloramfenikolem (Becton Dickinson GmbH, Germany). Zawiesinę rozprowadzano po podłożu jałową eżą. Posiane podłoże inkubowano w 37°C oraz 25°C przez 48 godzin w warunkach tlenowych. W przypadku wzrostu kolonii grzybów przeprowadzano identyfikację - grzyby drożdżopodobne identyfikowano wstępnie do gatunku przy użyciu podłoża chromogenego Candida chromagar (Becton Dickinson GmbH, Germany), a pleśniowe w oparciu o preparat bezpośredni i klucz mikologiczny. W przypadkach wymagających zastosowania dokładniejszych metod identyfikacyjnych, zastosowano panele biochemiczne RapID™ YEAST PLUS System (Remel) z 18 substratami chemicznymi.

Uzyskana liczba bakterii /g kału w reakcji real – time PCR jest wynikiem przeliczenia liczby kopii amplifikowanej sekwencji w reakcji PCR w genomie bakteryjnym [odpowiednio dla *Faecalibacterium*, *Akkermansia muciniphila*, *Bifidobacterium spp.*, i *Bacteroides spp.*] oraz współczynnika rozcieńczenia wynikającego z zastosowanego do izolacji DNA z kału zestawu. Zastosowany w badaniach przelicznik został sprawdzony i zwalidowany w Instytucie Mikroekologii w Herborn, Niemcy.

Ograniczeniem wykorzystanej w badaniu metody analitycznej, jest brak możliwości oznaczenia dokładniej liczby mikroorganizmów poniżej wartości 102 [CFU/g kału]. Dla wartości oznaczeń poniżej 102 [CFU/g kału] [cut-off], przyjęto wartość 0, która jednak nie oznacza braku bakterii w analizowanej próbce.

Otrzymane w badaniu wartości analizy jakościowej i ilościowej bakterii, poddano logarytmowi dziesiętnemu (Log₁₀).

4.1.2. Analiza statystyczna

Wyniki badań zostały opracowane statystycznie z wykorzystaniem pakietu procedur statystycznych STATISTICA 10.0. (StatSoft Inc., USA). Wyniki zaprezentowano w postaci wartości średnich (\bar{x} , ang. *mean*), odchyłeń standardowych (\pm SD, ang. *standard deviation*). W przypadku wartości o rozkładzie odbiegającym od normalnego oraz dużej zmienności danych, wyniki przedstawiano w postaci median (Me, ang. *median*) oraz kwartyli (ang. *quartile*) dolnego (Q_1) i górnego (Q_3). Weryfikacja hipotezy o normalności analizowanych zmiennych została przeprowadzona testem W Shapiro-Wilka. Istotność różnic pomiędzy grupami sprawdzono za pomocą testu nieparametrycznego U Manna-Whitneya. Istotność różnic pomiędzy zmiennymi o rozkładzie różnym od normalnego, odnotowanymi przed i po okresie startowym, w obu grupach badawczych sprawdzano testem kolejności par Wilcoxon'a. Wielkość $p < 0,05$ została uznana za istotną statystycznie.

4.1.3. Wyniki badań

Wykonana analiza w zakresie badanych wskaźników antropometrycznych w I terminie badań nie wykazała istotnych różnic pomiędzy grupą kolarzy a mężczyzn o zbliżonym wieku nie podejmujących wysokiej aktywności fizycznej. Wykonana analiza pomiędzy terminami badań wykazała jedynie różnicę w zakresie masy ciała i procentowej zawartości wody u badanych kolarzy ($p < 0.05$; tab.6)

Wyniki badań wskaźników fizjologicznych wykonane podczas testu wysiłkowego w I terminie badań u mężczyzn obu grup oraz w II terminie badań w grupie kolarzy wraz z analizą porównawczą zaprezentowano w tabeli 6.

W zakresie wskaźników fizjologicznych dokonana analiza porównawcza pomiędzy badanymi grupami wykazała istotne zróżnicowanie w zakresie obciążenia progowego i maksymalnego, tętna progowego, maksymalnego czasu wysiłku oraz maksymalnego poboru tlenu ($p < 0.01$; tab.6)

W analizie porównawczej wskaźników fizjologicznych zarejestrowanych u kolarzy podczas testu wysiłkowego przed i po zakończeniu okresu startowego rocznego cyklu treningowego wykazano istotne statystycznie różnice w zakresie maksymalnego obciążenia i czasu wysiłku oraz $VO_{2\text{ mx}}$ ($p < 0.01$; tab.6).

Tabela 6. Analiza porównawcza wskaźników fizjologicznych w I terminie badań w grupie kolarzy i grupie kontrolnej oraz u kolarzy pomiędzy I a II terminem badań

zmienna	kolarze I term. (n=15)		grupa kontrolna I term. (n=15)		test U Manna-Whitney'a p	kolarze II term. (n=15)		test Wilcoxon p
	\bar{X} ± SD	Me Q1÷Q3	\bar{X} ± SD	Me Q1÷Q3		\bar{X} ±SD	Me Q1÷Q3	
Obciążenie progowe [W]	250,4 ± 49	250,0 139÷330	168,7 ± 31,6	170,0 110 ÷210	0,0001**	251,3 ± 27,7	250,0 210÷330	NS
Obciążenie max [W]	368,7 ± 31,6	370,0 330÷430	270,0 ± 31,2	270,0 210÷310	0,000**	348,7 ± 35,0	350,0 290÷430	0,0033**
Tętno progowe [bpm/min]	171,7 ± 34,4	164,0 144÷290	150,0 ± 12,3	154,0 123÷164	0,0017**	162,5 ± 8,3	162,0 148÷177	NS
Tętno max [bpm/min]	184,7 ± 7,7	182,0 172÷201	184,7 ± 9,8	186,0 163÷197	NS	184,2 ± 7,7	184 173÷197	NS
Czas wysiłku max [min]	18,8 ± 7,7	19,0 16,5÷22	14,0 ± 1,6	14,0 10,8÷16	0,000**	17,8 ± 1,8	17,3 15÷22	0,0022**
(VO _{2max}) [ml/kg/min]	55,9 ± 5,9	56,3 45,9÷64,8	41,3 ± 7,6	42,9 27,6÷52,4	0,000**	51,2 ± 5,5	51,9 41,4÷58,9	0,0007**

\bar{x} - średnia; SD - odchylenie standardowe; Me - mediana; Q1 - dolny kwartyl; Q3 - górny kwartyl; *p < 0,05; **p < 0,0; NS - brak istotności statystycznej, VO_{2max} - maksymalny pobór tlenu

Wyniki wskaźników biochemicznych w I terminie u mężczyzn obu grup oraz w II terminie badań w grupie kolarzy wraz z analizą porównawczą zaprezentowano w tabeli 7. Wykonana analiza porównawcza pomiędzy badanymi grupami mężczyzn w I terminie badań wykazała istotne zróżnicowanie w zakresie wszystkich oznaczanych cytokin tj. IL-4, IL-12, TNF – alfa (p < 0.01; tab.7)

Dokonana analiza porównawcza u kolarzy przed i po zakończeniu okresu startowego rocznego cyklu treningowego wykazała istotne różnice w zakresie IL- 4 (p < 0.01) oraz TNF – alfa (p < 0,05; tab.7).

Tabela 7. Analiza porównawcza wskaźników biochemicznych w I terminie badań w grupie kolarzy i grupie kontrolnej oraz u kolarzy pomiędzy I a II terminem badań

zmienna	kolarze I term. (n=15)		grupa kontrolna (n=15)		test U Manna- Whitney'a p	kolarze II term. (n=15)		test Wilcoxon p
	\bar{X} ±SD	Me Q1÷Q3	\bar{X} ±SD	Me Q1÷Q3		\bar{X} ±SD	Me Q1÷Q3	
IL-4	1,1 ± 1,7	0,7 0,4÷1,4	5,8 ± 3	6,6 3,4÷8,4	0,00**	3,9 ± 2,1	3,8 2,0÷5,6	0,004**
IL-12	12,7 ± 1,2	12,5 11,6÷13,4	11,7 ± 1,9	11,0 10,8÷11,5	0,003**	13,1 ± 2,7	11,9 11,1÷14,8	NS
TNF - alfa	21,1 ± 8,1	20,1 15÷22,9	15,2 ± 5,1	15,0 12,6÷16,0	0,050**	13,1 ± 5,7	12,6 9,9÷16,6	0,028*

\bar{x} - średnia; SD - odchylenie standardowe; Me - mediana; Q1 - dolny kwartyl; Q3 - górny kwartyl; *p<0,05; **p<0,0; NS - brak istotności statystycznej, IL - 4 - interleukina 4, IL - 12 - interleukina 12, TNF - alfa - czynnik martwicy nowotworu - alfa

Wyniki badań wybranych bakterii wskaźnikowych, ilości bakterii, wybranych grzybów oraz wartość pH kału w I terminie badań w grupie kolarzy i grupie kontrolnej oraz w II terminie badań w grupie kolarzy wraz z analizą porównawczą zaprezentowano w tabeli 8.

Wykonana analiza porównawcza pomiędzy badanymi grupami nie wykazała istotnych różnic w zakresie wybranych bakterii wskaźnikowych, ilości bakterii, wybranych grzybów oraz pH kału (tab.8)

Dokonana analiza porównawcza bakterii wskaźnikowych, ilości bakterii, wybranych grzybów oraz pH kału u kolarzy przed i po zakończeniu okresu startowego rocznego cyklu treningowego wykazała istotne różnice w zakresie szczepów bakterii tlenowych należących do gatunku *Enterococcus spp.* oraz dla gatunków należących do szczepów pozostałych bakterii proteolitycznych (p<0.05). W zakresie szczepów bakterii beztlenowych wykazano istotną różnicę w gatunkach: *Bifidobacterium spp.*, *Bacteroides spp.*, *Lactobacillus*, *H₂O₂ Lactobacillus*, *Clostridium spp.*, *F.prausnitzii* oraz *A.muciniphila* oraz w zakresie liczby drożdżaków (p < 0.01; tab. 8).

Dokonana analiza porównawcza wartości pH kału pomiędzy grupami i terminami badań u kolarzy nie wykazała istotnych zmian.

Tabela 8. Analiza porównawcza wybranych bakterii wskaźnikowych, ilości bakterii, wybranych grzybów oraz pH kału w I terminie badań w grupie kolarzy i grupie kontrolnej oraz u kolarzy w I i II terminie badań. Liczbę oznaczonych bakterii zaprezentowano w postaci Log₁₀ CFU/g kału

	cyclists I term (n=15)		kontrol group I term.(n=15)		test U Manna- Whitney'a p	cyclists II term (n=15)		test Wilcoxon P
	\bar{X} ± SD	Me Q1÷Q3	\bar{X} ± SD	Me Q1÷Q3		\bar{X} ± SD	Me Q1÷Q3	
<i>E.coli</i> (bakterie tlenowe)	5,6 2,2	5,9 4,6÷7,5	6,3 1,8	6,3 4,8÷7,9	NS	6,5 1,0	6,9 5,9÷7,3	NS
<i>E.coli Biovare</i> (bakterie tlenowe)	2,9 1,8	2,0 2,0÷2,0	2,2 0,8	2,0 2,0÷2,0	NS	2,3 1,1	2,0 2,0÷2,0	NS
<i>Inne b.proteolit.</i> (bakterie tlenowe)	3,2 1,9	2,0 2,0÷4,6	4,3 2,4	4,3 2,0÷6,3	NS	6,2 1,8	6,8 4,6÷7,5	0,0431*
<i>Enterococcus spp.</i> (bakterie tlenowe)	5,9 1,5	6,3 5,0÷6,6	4,9 2,4	5,0 2,0÷6,8	NS	6,5 1,7	6,8 6,3÷7,6	0,0015**
<i>Bifidobacterium spp.</i> (bakterie beztlenowe)	6,9 0,7	6,9 6,5÷7,5	7,0 0,6	7,0 6,3÷7,5	NS	6,4 0,6	6,3 6,0÷6,7	0,0022**
<i>Bacteroides spp.</i> (bakterie beztlenowe)	8,8 0,4	8,9 8,5÷9,3	8,8 0,6	8,8 8,3÷9,3	NS	9,0 0,4	9,0 8,9÷9,3	0,001**
<i>Lactobacillus</i> (bakterie beztlenowe)	5,4 1,6	5,5 4,9÷6,3	4,1 1,9	5,0 2,0÷5,7	NS	5,0 1,7	5,5 4,3÷6,5	0,0019**
<i>H2O2 – Lactobacillus</i> (bakterie beztlenowe)	4,4 2,2	5,0 2,0÷6,0	3,4 1,8	2,0 2,0÷5,3	NS	3,3 1,6	2,0 2,0÷4,6	0,0010**
<i>Clostridium spp.</i> (bakterie beztlenowe)	2,7 1,4	2,0 2,0÷4,3	2,9 1,3	2,0 2,0÷4,6	NS	2,9 1,6	2,0 2,0÷4,6	0,0167*
<i>F. prausnitzii</i> (bakterie beztlenowe)	8,2 0,4	8,3 8,0÷8,6	7,9 0,6	7,9 7,3÷8,3	NS	8,3 0,6	8,5 8,0÷8,7	0,0015**
<i>A. muciniphila</i> (bakterie beztlenowe)	5,1 1,9	6,0 3,5÷6,5	5,6 2,1	6,6 4,7÷7,0	NS	6,0 1,4	6,0 4,8÷7,3	0,0076**
Łączna ilość bakterii	9,8 0,7	10,0 9,5÷10,3	9,5 0,5	9,6 9,3÷9,9	0,0555*	10,0 0,7	10,0 9,8÷10,3	0,0014**
pH kału	6,4 0,5	6,5 6,0÷6,5	6,2 0,7	6,5 5,5÷6,5	NS	6,9 0,7	7,0 6,0÷7,5	NS
Drożdżaki	3,0 1,0	3,0 2,0÷3,5	2,4 0,8	2,0 2,0÷3,0	NS	2,8 1,0	2,0 2,0÷3,5	0,0010**

\bar{x} - średnia; SD - odchylenie standardowe; Me - mediana; Q1 - dolny kwartył; Q3 - górny kwartył; * $p < 0,05$; ** $p < 0,0$; NS - brak istotności statystycznej, CFU/g kału - jednostka tworząca kolonię tj. liczba mikroorganizmów w gramie kału

Dodatkowo wykonano analizę liczby badanych mężczyzn obu grup oraz liczby kolarzy przed i po zakończeniu okresu startowego rocznego cyklu treningowego, u których oznaczona całkowita ilość bakterii oraz ilość wybranych gatunki bakterii tworzących kolonie jest zgodna z wartościami referencyjnymi zalecanymi przez Instytut Mikrobiologii. Zakres wartości referencyjnych oraz liczba badanych mężczyzn, u których oznaczona całkowita ilość bakterii oraz ilość wybranych gatunki bakterii tworzących kolonie jest zgodna z wartościami referencyjnymi dla tych bakterii w tabeli 9.

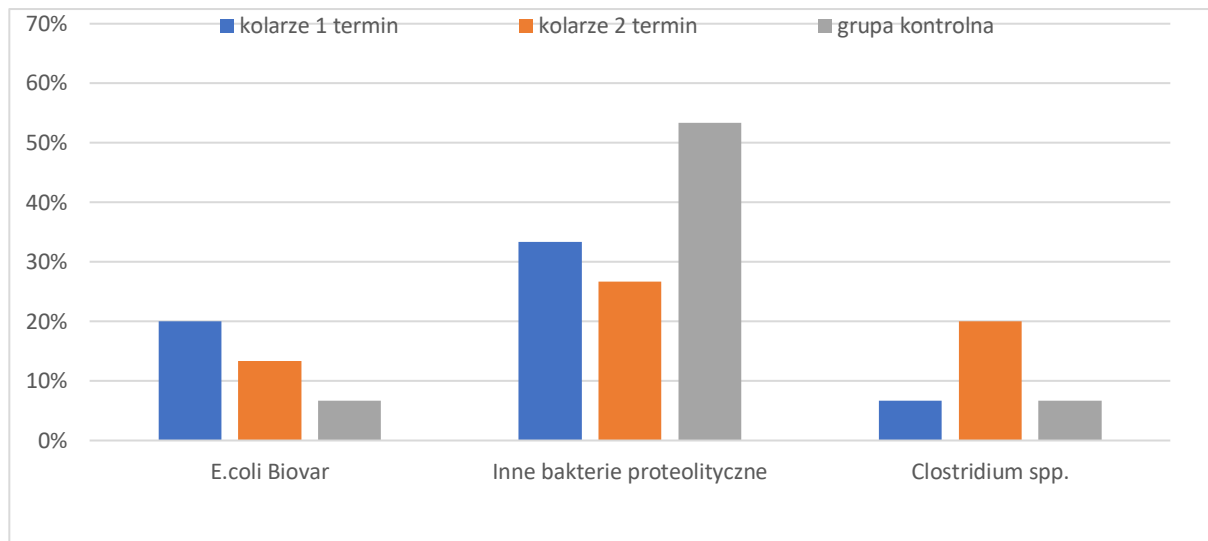
Tabela 9. Wykaz wartości referencyjnych dla ilości oznaczonych bakterii wskaźnikowych tworzących kolonie w gramie kału oraz analiza liczby badanych mężczyzn w grupie kolarzy i grupie kontrolnej w I terminie badań oraz w grupie kolarzy w II terminie badań

Nazwa	Wartości referencyjne Liczba bakterii [CFU/g kału]	Wartości referencyjne / wartości poza wartościami referencyjnymi	kolarze 1 termin	kolarze 2 termin	grupa kontrolna
<i>Bacteroides spp.</i>	$\geq 10^9$	w normie poza normą	6 9	5 9	7 8
<i>Bifidobacterium spp.</i>	$\geq 10^8$	w normie poza normą	0 15	1 13	0 15
<i>Lactobacillus spp.</i>	$\geq 10^5$	w normie poza normą	11 4	9 5	8 7
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	$\geq 10^9$	w normie poza normą	0 15	0 14	0 15
<i>Akkermansia muciniphila</i>	$\geq 10^8$	w normie poza normą	0 15	0 14	0 15
<i>E.coli</i> Biovare	$< 2 \times 10^4$	w normie poza normą	12 3	12 2	14 1
Inne proteolityczne	$< 2 \times 10^4$	w normie poza normą	5 14	4 11	8 14
<i>Clostridium spp.</i>	$\geq 10^5$	w normie poza normą	14 1	11 3	14 1
Całkowita liczba bakterii	$10^{11} - 10^{12}$	w normie poza normą	14 1	14 0	14 0

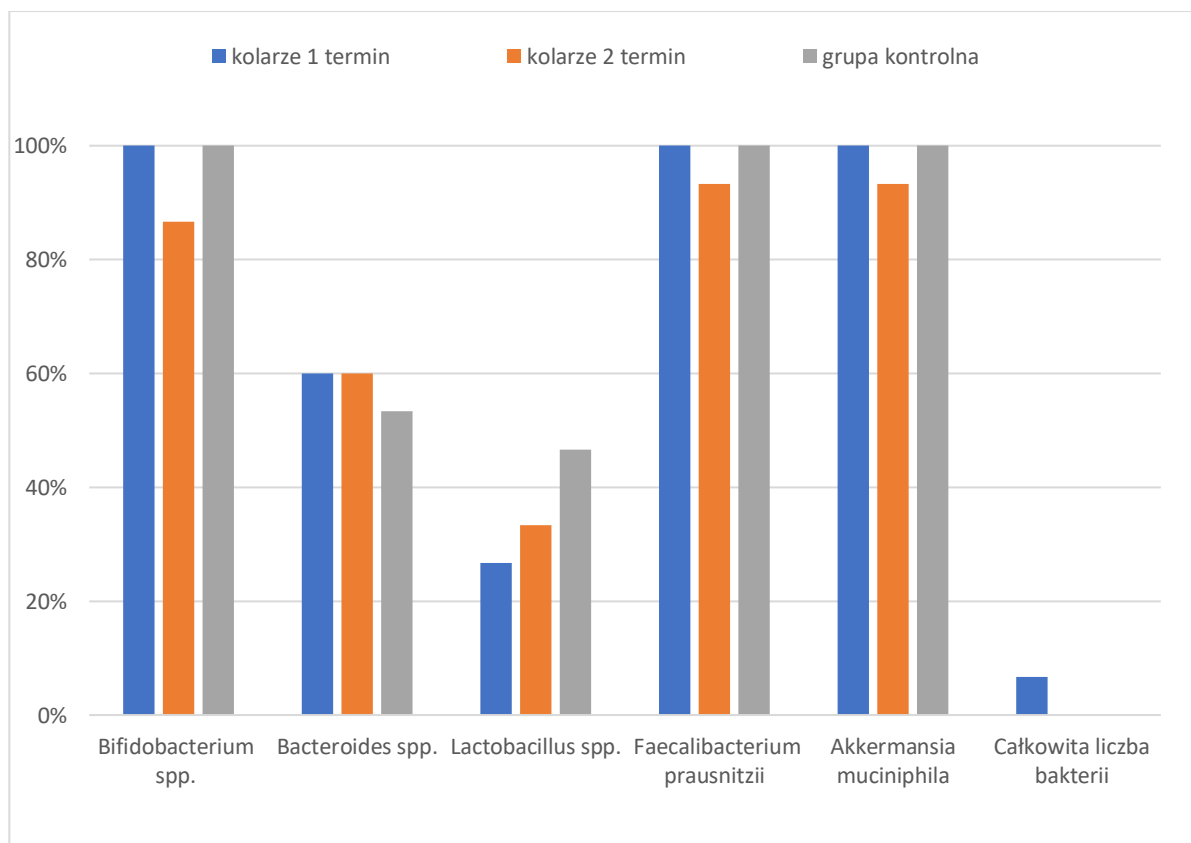
CFU/g kału – jednostka tworząca kolonię tj. Liczba mikroorganizmów w gramie kału

Procentowy udział badanych mężczyzn, u których stwierdzono ilość bakterii wskaźnikowych mieszczących się poza wartościami referencyjnymi przedstawiono w na rycinach 1 - 2.

Rycina 1. Procentowy udział mężczyzn w I terminie badań w grupie kolarzy i w grupie kontrolnej oraz w II terminie badań w grupie kolarzy, u których stwierdzono ilość wybranych bakterii wskaźnikowych *E.coli Biovar*, *Clostridium spp.* i innych bakterii proteolitycznych mieszczących się poza wartościami referencyjnymi



Rycina 2. Procentowy udział mężczyzn w I terminie badań w grupie kolarzy i w grupie kontrolnej oraz w II terminie badań w grupie kolarzy, u których stwierdzono ilość wybranych bakterii wskaźnikowych *Bifidobacterium spp.*, *Bacteroides spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Akkermansia muciniphila* oraz całkowitą liczbę bakterii mieszczących się poza wartościami referencyjnymi



Wykonana analiza w zakresie dziennego spożycia energii [kcal], białka [%], węglowodanów [%], tłuszczu [%] oraz błonnika [g] w I terminie badań wykazała istotne różnice pomiędzy grupami w zakresie procentowego udziału białek, węglowodanów i tłuszczu w diecie ($p < 0.01$; tab.10).

Dokonana analiza porównawcza u kolarzy przed i po zakończeniu okresu startowego rocznego cyklu treningowego wykazała istotne różnice w zakresie dziennego spożycia energii oraz % udziału białka w diecie ($p < 0.05$; tab.10).

Tabela 10. Analiza porównawcza dziennego spożycia energii [kcal], białka [%], węglowodanów [%], tłuszczu [%] oraz błonnika [g] w I terminie badań w grupie kolarzy i grupie kontrolnej oraz u kolarzy w II terminie badań

zmienna	kolarze I term (n=15)		grupa kontrolna I term.(n=15)		test U Manna- Whitney'a p	kolarze II term (n=15)		test Wilcoxon p
	\bar{X} ± SD	Me Q1÷Q3	\bar{X} ± SD	Me Q1÷Q3		\bar{X} ± SD	Me Q1÷Q3	
Energy intake [kcal / d]	2807 ± 129,4	2401 2067÷3563	2882 ± 1422,4	2640 2038÷3233	NS	3107 ± 1183,3	2498,4 2067÷3563	0,0157*
protein [% of E]	15,5 ± 2,3	14,8 13,8÷17,8	22 ± 6,3	21,4 18÷2	0,002**	17,1 ± 2,2	16,5 14,4÷23,4	0,0277*
carbohydrates [% of E]	52,1 ± 4,8	51,9 50,6÷55	44,7 ± 14,2	41,7 36,9÷48	0,0016**	51,7 ± 5	51,9 43,8÷60,4	NS
fat [% of E]	32,4 ± 4,9	31,8 29,6÷34,1	40,4 ± 10	36,4 35,3÷41,6	0,0006**	31,2 ± 6	31,7 16,2÷41,1	NS
Total fiber [g/d]	27,6 ± 13,8	25 17,1÷36,2	33,8 ± 24,9	31,6 15,5÷41,7	NS	26,4 ± 10,4	25,0 15,4÷35,6	NS

\bar{X} - średnia; SD – odchylenie standardowe; Me - mediana; Q1- kwartyl dolny, Q3 – kwartyl górny,

* $p < 0,05$ – poziom istotności $< 0,05$, ** $p < 0,01$ - poziom istotności statystycznej $< 0,01$; NS – brak istotności statystycznej, Energy intake [kcal/d] – ilość spożytej energii w czasie jednego dnia wyrażona w kilokaloriach, Protein [% of E]- dzienne spożycie białka wyrażone w procentach w odniesieniu do ilości spożytej energii w czasie jednego dnia, Carbohydrate [% of E] - dzienne spożycie węglowodanów wyrażone w procentach w odniesieniu do ilości spożytej energii w czasie jednego dnia, fat [% of E] - dzienne spożycie tłuszczu wyrażone w procentach w odniesieniu do ilości spożytej energii w czasie jednego dnia, Total fiber [g/d] - dzienne spożycie błonnika wyrażone w gramach

4.2. PROJEKT II

Ocena jakościowa i ilościowa bakterii wskaźnikowych mikrobioty jelitowej oraz stężenia wybranych cytokin IL-4, IL – 12, TNF – alfa u sportowców trenujących dyscyplinę o charakterze wytrzymałościowym (kolarze) i sportowców trenujących dyscyplinę o charakterze siłowym (kulturysty) oraz mężczyzn nietrenujących o zbliżonym wieku.

4.2.1. Materiały i metody

W badaniach uczestniczyło 41 mężczyzn w wieku 20 – 44 lat. Ze względu na rodzaj uprawianej dyscypliny sportowej oraz stosowanej diety związanej z charakterem dyscypliny sportowej mężczyzn podzielono na trzy grupy. Pierwszą grupę (n=15) stanowili mężczyźni uprawiający na poziomie amatorskim kolarstwo szosowe (staż treningowy 5 ± 2 lat), pochodzący z klubów sportowych *FTI Sports & Fitness Group* i *Fogt Bikes Team*, którzy wykonywali treningi o długim czasie i wysokiej intensywności i stosowali dietę z większym procentowym udziałem węglowodanów. Drugą grupę (n=11) stanowili mężczyźni trenujący kulturystykę (staż treningowy 5 ± 3 lat) należący do klubów sportowych *TKKF Winogrady*, którzy wykonywali treningi o charakterze siłowym oraz stosowali dietę z wyższym procentowym udziałem białka. Trzecią grupę (n=15) stanowili mężczyźni o zbliżonym wieku wykazujący niski poziom aktywności fizycznej (studenci kierunku Dietetyka, Akademii Wychowania Fizycznego w Poznaniu) stosujący dietę zbilansowaną. Przed przystąpieniem do badań wszyscy zawodnicy zostali poinformowani o celu i przebiegu badań oraz wyrazili zgodę na ich przeprowadzenie. Badania uzyskały zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu o numerze uchwały nr173/16 z dnia 04 lutego 2016 roku.

Kryterium włączenia uczestników do badań było udzielenie pisemnej zgody na udział w badaniu, wiek 20– 44 lat. oraz brak przebytych kontuzji w okresie ostatnich 4 tygodniach przed badaniem. Dodatkowymi kryteriami w grupie kolarzy był: staż treningowy minimum 2 lata, częstość treningów w czasie tygodnia 5 x w tygodniu; łącznie 10h tygodniowo, natomiast u kulturystów staż treningowy minimum 2 lata, częstość treningów w czasie tygodnia 5 x w tygodniu; łącznie 7,5h tygodniowo.

Kryteriami wykluczenia uczestników z badań było przyjmowanie środków steroidowych przyjmowanie środków doustnych przeciwgrzybiczych, przeciw Pasożytniczych (nie dotyczyło środków przeciwgrzybiczych przyjmowanych miejscowo), przyjmowanie pre – i/lub probiotyków oraz odbycie podróży do krajów tropikalnych w czasie ostatnich 4 tygodni przed badaniem.

Masę oraz skład ciała w grupie kolarzy oraz mężczyzn nietrenujących oznaczono za

pomocą metody bioimpedancji elektrycznej, analizatorem TANITA BC 418-MA (certyfikat MDD Approved, NAWI Class III; producent Tanita Corporation). Natomiast w grupie kulturystów pomiar masy i składu ciała wykonano z użyciem metody densytometrycznej techniką podwójnej wiązki promieniowania rentgenowskiego (DXA) aparatem GE Healthcare Lunar Prodigy Advance; GE Medical Systems. Pomiary zostały wykonane w Zakładzie Higieny oraz Laboratorium Analizy Ruchu Człowieka Zakładu Lekkiej Atletyki LAbTHLETICS Akademii Wychowania Fizycznego w Poznaniu.

Badani zostali przeszkoleni z zakresu prawidłowego zapisu spożycia pokarmów i napojów, których ilość i jakość monitorowana była w czasie 3 dni. Oceny ilości spożytych kilokalorii oraz proporcji makroskładników dokonano na podstawie trzydniowego dziennika żywieniowego wypełnianego przez każdego uczestnika badania. W celu obliczenia danych związanych ze spożytą ilością kalorii oraz makroskładników, wykorzystano program Dietetyk 2014.

Informacje dotyczące stanu zdrowia, poziomu aktywności fizycznej, przyjmowanej suplementacji, przebytych chorób, przyjmowanych leków, zostały poddane ocenie za pomocą metody kwestionariusza wypełnionego w dniu badania.

W celu dokonania analiz wskaźników biochemicznych pobrano od badanych będących na czczo 3 ml krwi z żyły odłokciowej. Materiał do oznaczeń biochemicznych, to jest osocze, frakcjonowano w Laboratorium Analitycznym Zakładu Higieny Akademii Wychowania Fizycznego w Poznaniu. Próby materiału biologicznego były przechowywane w temperaturze -80°C do chwili oznaczeń biochemicznych. W osoczu krwi oznaczono stężenie interleukiny IL – 4, IL – 12, TNF – alfa, za pomocą testu immunoenzymatycznego ELISA (R & D System, Inc., Minneapolis, MN, USA). Minimalna czułość stosowanych testów diagnostycznych wynosiła dla IL-12 $< 5,0 \text{ pg / mL}$, dla IL-4 $< 10 \text{ pg / mL}$, dla TNF-alfa $< 1,3 \text{ pg / mL}$. Pomiaru stężeń dokonano metody immunoenzymatycznej ELISA przy użyciu spektrofotometru Bio Tek Elx808 (USA).

W celu dokonania oznaczeń ilościowych i jakościowych wybranych bakterii wskaźnikowych i grzybów w przewodzie pokarmowym oraz pH kału, poproszono badanych mężczyzn o dostarczenie próbki kału w czasie 48h od pobrania (materiał pozostaje stabilny przez 3 dni od pobrania, stanowiąc czas umożliwiającą analizę). Pobranie kału należało wykonać wg ustalonej procedury KyberKompaktPRO (Instytut Mikroeologii). Dokładny opis metody, przedstawiono w punkcie 4.1.1.

Otrzymane w badaniu wartości analizy jakościowej i ilościowej bakterii, poddano logarytmowi dziesiętnemu (Log_{10})

4.2.2. Analiza statystyczna

Wyniki badań zostały opracowane statystycznie z wykorzystaniem pakietu procedur statystycznych STATISTICA 10.0. (StatSoft Inc., USA). Wyniki zaprezentowano w postaci wartości średnich (\bar{x} , ang. *mean*), odchyłeń standardowych (\pm SD, ang. *standard deviation*). W przypadku wartości o rozkładzie odbiegającym od normalnego oraz dużej zmienności danych, wyniki przedstawiano w postaci median (Me, ang. *median*) oraz kwartyli (ang. *quartile*) dolnego (Q_1) i górnego (Q_3). Weryfikację hipotezy o normalności analizowanych zmiennych przeprowadzono testem W Shapiro – Wilka. Istotność różnic pomiędzy grupami sprawdzono za pomocą testu ANOVA Kruskala-Wallis'a i testami post-hoc Tukeya. Jako istotny statystycznie został przyjęty poziom istotności $p < 0,05$

4.2.3. Wyniki

Analiza porównawcza wskaźników antropometrycznych pomiędzy badanymi grupami mężczyzn wykazała istotną różnicę w zakresie masy ciała i beztłuszczowej masy ciała pomiędzy grupą kulturystów, a kolarzy ($p < 0.01$) oraz pomiędzy grupą kulturystów, a grupą kontrolną $p < 0.05$; tab.11)

Tabela 11. Analiza porównawcza wskaźników antropometrycznych pomiędzy grupami badanych mężczyzn

zmienna	kulturysty (n=11)		kolarze (n=15)		grupa kontrolna (n=15)		test ANOVA p
	\bar{X} \pm SD	Me Q1÷Q3	\bar{X} \pm SD	Me Q1÷Q3	\bar{X} \pm SD	Me Q1÷Q3	
wiek [lat]	27 \pm 6	25 23÷28	33 \pm 6	36 24÷38	29 \pm 8	24 22÷37	NS
wysokość ciała [cm]	182,0 \pm 6,3	181,5 179,3÷185	183,0 \pm 7,7	183,0 177÷187	181,7 \pm 4,4	182,0 179,0÷185,0	NS
masa ciała [kg]	96,4 ^{†††} \pm 8,9	96,8 93,8÷103	78,9 \pm 10,3	75,2 71,3÷88,9	83,4 [†] \pm 13,2	76,6 72,4÷99,8	0,0023**
Fat [%]	14,0 \pm 4,5	14,4 9,5÷18,2	13,5 \pm 6,0	13,0 8,2÷18,1	15,3 \pm 7,7	15,8 6,6÷20,7	NS
Fat mass [kg]	13,2 \pm 4,2	13,7 7,9÷16,7	10,9 \pm 5,7	10,0 6,4÷13,1	13,5 \pm 8,5	11,6 5÷21,1	NS
FFM [kg]	80,6 ^{†††} \pm 8,9	81,1 74÷87,2	68,0 \pm 8,2	65,5 63,2÷73,1	69,7 [†] \pm 6,4	70,6 63,2÷74,0	0,0035**

\bar{X} - średnia; SD - odchylenie standardowe; Me - mediana; Q1 - kwartył dolny; Q3 - kwartył górny; [†] - istotna różnica pomiędzy grupą kulturystów a grupą kontrolną; ^{††} - istotna różnica pomiędzy grupą kolarzy i grupą kontrolną; ^{†††} - istotna różnica pomiędzy grupą kulturystów i kolarzy; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; NS - brak istotności statystycznej; Fat [%] - procentowa zawartość tkanki tłuszczowej; Fat mass [kg] - masa tkanki tłuszczowej, FFM [kg] - beztłuszczowa masa ciała

Analiza porównawcza wybranych cytokin pomiędzy badanymi grupami mężczyzn nie wykazała istotnego zróżnicowania. Wyniki przedstawione zostały w tabeli 12.

Tabela 12. Analiza porównawcza wybranych cytokin pomiędzy badanymi grupami mężczyzn

zmienna	kulturyści (n=11)		kolarze (n=15)		grupa kontrolna (n=15)		test ANOVA p
	\bar{X} ± SD	Me Q1÷Q3	\bar{X} ± SD	Me Q1÷Q3	\bar{X} ± SD	Me Q1÷Q3	
IL-4	5,7 ± 2,8	5,7 4,5÷7,9	1,1 ± 1,7	0,7 0,4÷1,4	5,8 ± 3,0	6,6	NS
IL-12	11,8 ± 1,3	11,6 10,8÷12,0	12,7 ± 1,2	12,5 11,6÷13,4	11,7 ± 1,9	11,0	NS
TNF - alfa	11,3 ± 3,5	11,8 8÷14,2	21,1 ± 8,1	20,1 15,0÷22,9	15,2 ± 5,1	15,0	NS

\bar{X} - średnia; SD – odchylenie standardowe; Me - mediana; Q1- kwartył dolny; Q3 – kwartył górny; NS – brak istotności statystycznej
IL – 4 – interleukina 4; IL – 12 – interleukina 12; TNF – alfa – czynnik martwicy nowotworu-alfa

Analiza porównawcza wybranych bakterii wskaźnikowych, pomiędzy badanymi grupami mężczyzn wykazała istotną różnicę w zakresie innych bakterii proteolitycznych ($p < 0.01$) oraz wartością pH kału ($p < 0.05$) pomiędzy grupą kulturystów a kolarzy (tab 13.).

Tabela 13 Analiza porównawcza wybranych bakterii wskaźnikowych, ilości bakterii, wybranych grzybów oraz wartości pH kału pomiędzy badanymi grupami mężczyzn. Ilość oznaczonych bakterii zaprezentowano w postaci Log^{10} CFU/g kału

zmienna	kulturyści (n=11)		kolarze (n=15)		grupa kontrolna (n=15)		test ANOVA p
	\bar{X} ± SD	Me Q1÷Q3	\bar{X} ± SD	\bar{X} ± SD	Me Q1÷Q3	\bar{X} ± SD	
<i>E.coli</i>	6,5 1,0	6,9 5,9÷7,3	5,6 2,2	5,9 4,6÷7,5	6,3 1,8	6,3 4,8÷7,9	NS
<i>E.coli Biovare</i>	2,3 1,1	2,0 2,0÷2,0	2,9 1,8	2,0 2,0÷2,0	2,2 0,8	2,0 2,0÷2,0	NS
<i>Inne b.proteolityczne.</i>	6,2 ^{†††} 1,8	6,8 4,6÷7,5	3,2 1,9	2,0 2,0÷4,6	4,3 2,4	4,3 2,0÷6,3	0,0094**
<i>Enterococcus spp.</i>	6,5 1,7	6,8 6,3÷7,6	5,9 1,5	6,3 5,0÷6,6	4,9 2,4	5,0 2,0÷6,8	NS
<i>Bifidocacterium spp.</i>	6,4 [†] 0,6	6,3 6,0÷6,7	6,9 0,7	6,9 6,5÷7,5	7,0 0,6	7,0 6,3÷7,5	NS
<i>Bacteroides spp.</i>	9,0 0,4	9,0 8,9÷9,3	8,8 0,4	8,9 8,5÷9,3	8,8 0,6	8,8 8,3÷9,3	NS
<i>Lactobacillus</i>	5,0 1,7	5,5 4,3÷6,5	5,4 1,6	5,5 4,9÷6,3	4,1 1,9	5,0 2,0÷5,7	NS
<i>H2O2 - Lactobacillus</i>	3,3 1,6	2,0 2,0÷4,6	4,4 2,2	5,0 2,0 - 6,0	3,4 1,8	2,0 2,0÷5,3	NS
<i>Clostridium spp.</i>	2,9	2,0	2,7	2,0	2,9	2,0	NS

	1,6	2,0÷4,6	1,4	2,0÷4,3	1,3	2,0÷4,6	
<i>F. prausnitzii</i>	8,3 0,6	8,5 8,0÷8,7	8,2 0,4	8,3 8,0÷8,6	7,9 0,6	7,9 7,3÷8,3	NS
<i>A. muciniphila</i>	6,0 1,4	6,0 4,8÷7,3	5,1 1,9	6,0 3,5 - 6,5	5,6 2,1	6,6 4,7÷7,0	NS
Łączna ilość bakterii	10,0 [†] 0,7	10,0 9,8÷10,3	9,8 0,7	10,0 9,5÷10,3	9,5 0,5	9,6 9,3÷9,9	NS
pH kału	6,9 [†] 0,7	7,0 6,0÷7,5	6,4 0,5	6,5 6,0÷6,5	6,2 0,7	6,5 5,5÷6,5	0,0322*
Drożdżaki	2,8 1,0	2,0 2,0÷3,5	3,0 1,0	3,0 2,0÷3,5	2,4 0,8	2,0 2,0÷3,0	NS

\bar{x} - średnia; SD - odchylenie standardowe; Me - mediana; Q1 - dolny kwartył; Q3 - górny kwartył ;[†] - istotna różnica pomiędzy grupą kulturystów a grupą kontrolną; ^{††} - istotna różnica pomiędzy grupą kulturystów i kolarzy; *p<0,05; **p<0,0; NS - brak istotności statystycznej, CFU/g kału - jednostka tworząca kolonię tj. liczba mikroorganizmów w gramie kału

Wykonana analiza w zakresie dziennego spożycia energii [kcal], białka [%], węglowodanów [%], tłuszczu [%] oraz błonnika [g] wykazała istotne zróżnicowanie w zakresie procentowego udziału białka i węglowodanów w diecie pomiędzy grupami kulturystów a kolarzy odpowiednio na poziomie p<0.01; p<0.05 i pomiędzy grupą kontrolną i kolarzy (p<0.01) oraz w zakresie procentowego udziału tłuszczu w diecie pomiędzy grupą kontrolną a kulturystami (p<0.01) oraz grupą kontrolną a kolarzami (p<0.05; tab.14)

Tabela 14. Analiza porównawcza dziennego spożycia energii [kcal], białka [%], węglowodanów [%], tłuszczu [%] oraz błonnika [g] pomiędzy grupami badanych mężczyzn

zmienna	kulturysty (n=11)		Kolarze (n=15)		grupa kontrolna (n=15)		test ANOVA p
	\bar{X} ± SD	Me Q1÷Q3	\bar{X} ± SD	Me Q1÷Q3	\bar{X} ± SD	Me Q1÷Q3	
energia [kcal]	3516 ± 1433	3032 2685÷3951	2807 ± 1129	2401 2067÷3563	2882 ± 1422	2640 2038÷3233	NS
białko [%]	33,6 ^{†††} ± 6,5	34,3 29,2÷39,2	15,5 ± 2,3	14,8 13,8÷17,8	22 ^{††} ± 6,3	21,4 18,0÷24,0	0,0000**
węglowodany [%]	38,8 ^{†††} ± 14,8	43,2 38,3÷45,6	52,1 ± 4,8	51,9 50,6÷55,0	44,7 ^{††} ± 14,2	41,7 36,9÷48,0	0,0038**
tłuszcze [%]	27,6 [†] ± 18,9	21,1 16,0÷27,4	32,4 ± 4,9	31,8 29,6÷34,0	40,4 ^{††} ± 10,0	36,4 35,3÷41,6	0,0002**
błonnik [g]	29,4 ± 11,8	26,7 25,0÷33	27,6 ± 13,8	25,0 17,1÷36,2	33,8 ± 24,9	31,6 15,5÷41,7	NS

\bar{X} - średnia; SD - odchylenie standardowe; Me - mediana; Q1 - kwartył dolny; Q3 - kwartył górny; [†] - istotna różnica pomiędzy grupą kulturystów a grupą kontrolną; ^{††} - istotna różnica pomiędzy grupą kolarzy i grupą kontrolną; ^{†††} - istotna różnica pomiędzy grupą kulturystów i kolarzy; *p<0,05; **p<0,01; NS - brak istotności statystycznej;

4.3. PROJEKT III

Wpływ obciążenia termicznego na profil mikrobioty jelitowej oraz wskaźniki funkcji bariery jelitowej u mężczyzn zdrowych mężczyzn poddanych obciążeniom treningowym

4.3.1. Materiały i metody

Badania przeprowadzono u 15 młodych, zdrowych mężczyzn w wieku 25 – 30 lat. Uczestnicy badań losowo podzieleni zostali na dwie grupy, które poddane zostały dwóm różnym rodzajom oddziaływania. Grupę ET – S (n=8) stanowili mężczyźni, którzy zostali poddani treningowi fizycznemu, po którym badani przebywali w saunie. Grupę ET (n=7) stanowili mężczyźni poddani tylko treningowi fizycznemu w PWSZ w Nowym Sączu.

Przed rozpoczęciem badań w PWSZ w Nowym Sączu przeprowadzono kwalifikacyjne badania lekarskie, których celem było wykrycie ewentualnych przeciwwskazań do powtarzanego przebywania w warunkach podwyższonej temperatury otoczenia. Ostateczną decyzję o możliwości uczestnictwa w badaniach, podjął lekarz wchodzący w skład zespołu badawczego. Przed przystąpieniem do badań wszyscy zawodnicy zostali poinformowani o celu i przebiegu badań oraz wyrazili zgodę na ich przeprowadzenie. Badania uzyskały zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu o numerze uchwały 173/16 dnia 4 lutego 2016 roku.

Kryterium włączenia uczestników do badań było udzielenie pisemnej zgody na udział w badaniu, brak przeciwwskazań lekarza, brak przebytych infekcji, kontuzji w okresie ostatnich 4 tygodniach przed badaniem.

Kryteriami wykluczenia uczestników z badań było przyjmowanie antybiotyków, środków steroidowych przyjmowanie środków doustnych przeciwgrzybiczych, przeciwpasożytniczych (nie dotyczyło środków przeciwgrzybiczych przyjmowanych miejscowo), przyjmowanie pre – i/lub probiotyków oraz odbycie podróży do krajów tropikalnych w czasie ostatnich 4 tygodni przed badaniem.

W celu uniknięcia zaburzeń efektów interwencji treningowej przez inne zmienne, badani mężczyźni zostali poproszeni o utrzymanie przez okres prowadzonych badań racjonalnej, ale nie zmienionej w zakresie wartości energetycznej zwyczajowej diety z okresu przed przystąpieniem do badań. Badanym udzielono wskazówek dietetycznych odnośnie dodatkowego nawodnienia i czasu przyjmowania posiłków w okresie stosowania programu treningowego. Ponadto poproszono uczestników badań o prowadzenie, na początku i pod koniec całego cyklu treningowego, dzienniczek żywieniowych, celem weryfikacji powyższych zaleceń. Badani

zostali przeszkoleni z zakresu prawidłowego zapisu spożycia pokarmów i napojów, których ilość i jakość monitorowana była w czasie 3 dni. W celu obliczenia danych związanych ze spożytą ilością kalorii oraz makroskładników, wykorzystano program Dietetyk 2014.

Informacje dotyczące stanu zdrowia, poziomu aktywności fizycznej, przyjmowanej suplementacji, przebytych chorób, przyjmowanych leków, zostały poddane ocenie za pomocą metody kwestionariusza wypełnionego w dniu badania.

Przed i po ukończeniu programu treningowego, w obu badanych grupach mężczyzn przeprowadzono stopniowany test wysiłkowy na ergometrze rowerowym wykonano w Instytucie Sportu –Państwowym Instytucie Badawczym w Warszawie wg. procedury odpisanej w punkcie 4.1.1.

W obu terminach badań, przed przystąpieniem do testu wysiłkowego pobrano u badanych krew żylną (ok. 2 ml). Metodą cytometri przepływowej oznaczone zostały wskaźniki morfologiczne przy użyciu analizatora Synergy 2 SIAFRT (Bio Tek, Winooski, VT, USA).

Trzy razy w tygodniu, przez okres 4 tygodni (czyli razem 12 treningów), obie grupy badanych mężczyzn wykonywały 60-minutowy wysiłek fizyczny na ergometrze rowerowym. Początkowa intensywność wysiłków stanowiła 50% mocy, a po 2 tyg. (w miarę możliwości) 60% mocy maksymalnej uczestników badań uzyskanej w teście stopniowanym wykonywanym IS-PIB. Ponieważ, wykonywany przez badanych wysiłek fizyczny miał na celu prowadzić również do zwiększenia temperatury wewnętrznej organizmu, nie mógł być wykonywany w warunkach intensywnego schładzania (np. wiatrak, spożywanie chłodnych napojów etc.). Bezpośrednio po zakończeniu treningu, badani z grupy ET - S przez kolejne 30 min przebywali (w pozycji siedzącej) w suchej saunie o temp. ok. 90°C. Sumaryczny pobyt w saunie mógł być dzielony na części (np. 3 x 10 min, 2 x 15 min), pomiędzy którymi dopuszczalne były maksymalnie 1-min okresy na schłodzenie (np. zimny prysznic, zanurzenie w po pachy w chłodnej wodzie). W okresie treningu i pobytów w saunie, ilość przyjmowanych płynów przez badanych nie była ograniczana, a w diecie badani nie zmieniali zwyczajowej ilości spożywanej soli kuchennej.

W zakresie badań wykonano stopniowany test na ergometrze rowerowym (wykony w IS-PIB w Warszawie wg. procedury odpisanej w punkcie 4.1.1.

W celu uniknięcia zmian mikrobioty jelitowej wywołanej przez inne zmienne aniżeli interwencja treningowa i sauny, badani mężczyźni poproszeni zostali o utrzymanie przez okres prowadzonych badań racjonalnej, ale nie zmienionej zwyczajowej diety z okresu przed przystąpieniem do badań. Badanym mężczyznom udzielono wskazówek dietetycznych odnośnie nawodnienia i czasu przyjmowania posiłków w czasie stosowania programu treningowego.

Ponadto uczestnicy badań poproszeni zostali o prowadzenie dzienniczków żywieniowych, na początku i pod koniec całego cyklu treningowego, celem weryfikacji powyższych zaleceń. Oceny ilości spożytych kilokalorii oraz proporcji makroskładników dokonano na podstawie trzydniowego dziennika żywieniowego wypełnianego przez każdego uczestnika badania. W celu obliczenia danych związanych ze spożytą ilością kilokalorii oraz makroskładników, wykorzystano program Dietetyk 2014.

W celu dokonania oznaczeń ilościowych i jakościowych wybranych bakterii wskaźnikowych i grzybów w przewodzie pokarmowym pH kału, stężenia zonuliny oraz sIgA, pobrany został przez probantów kał z jednego wypróżnienia, do jałowego pojemnika, wypełniony $\frac{3}{4}$ jego objętości (materiał jest stabilny 48 godzin od pobrania). Do czasu dostarczenia go do laboratorium, materiał przechowywano w temp. lodówki (2–8°C), a następnie poddano analizie w Instytucie Mikrobiologii w Poznaniu. W celu oznaczeń ilościowych i jakościowych bakterii wskaźnikowych, grzybów oraz wartości pH kału, zastosowano procedury opisane w punkcie 4.1.1.

Otrzymane w badaniu wartości analizy jakościowej i ilościowej bakterii, poddano logarytmowi dziesiętnemu (Log10).

W celu oznaczenia parametru przesiąkliwości jelitowej, wykonano ocenę stężenia zonuliny testem IKD Zonulin ELISA Kit (Immunodiagnostik AG, Bensheim, Germany) oraz wydzielniczej immunoglobuliny A (sIgA) w próbce kału, wykorzystano test Secretory IgA (ImmuChrom GmbH, Heppenheim).

Do badania stężenia zonuliny w kale, niezbędna była ekstrakcja próbek. Do sporządzenia ekstraktu kału zastosowano wystandaryzowane nakłuwacze (Stool Sample Application System (SAS, K6998SAS), które napełniono 0,75 ml buforem płuczającym ogrzanym do temperatury pokojowej. Każdą próbkę kału worteksowano w celu ujednoczenia. Następnie nakłuwano próbkę kału, tak by wszystkie rowki nakłuwacza były pokryte kałem (15 mg). Następnie próby kału odwirowano i poddano analizie. Pomiaru stężeń dokonano metodą immunoenzymatyczną ELISA przy użyciu spektrofotometru BioTek PowerWave XS (USA). Otrzymane wyniki zostały pomnożone przez współczynnik rozcieńczenia (x12,5).

W celu oznaczenia ilościowego stężenia wydzielniczej immunoglobuliny A (sIgA) w kale wykonano ekstrakcję. Do sporządzenia ekstraktu kału zastosowano wystandaryzowane nakłuwacze (Stool Sample Application System (SAS, K6998SAS), które napełniono 0,75 ml buforem płuczającym ogrzanym do temperatury pokojowej. Próbkę kału worteksowano w celu ujednoczenia. Następnie nakłuwano próbkę kału nakłuwaczem, tak by wszystkie rowki nakłuwacza były pokryte kałem (15 mg). Każdą próbkę kału wirowano, a następnie poddawano analizie. Pomiaru stężeń dokonano metodą immunoenzymatyczną ELISA

przy użyciu spektrofotometru BioTek PowerWave XS (USA). Minimalna czułość testu wynosiła 3,1 ng/ml.

4.3.2. Analiza statystyczna

Wyniki badań poddano analizie statystycznej, obejmującej elementy statystyki opisowej w postaci wartości średnich (\bar{x}), odchyłeń standardowych ($\pm SD$), median (Me) oraz kwartyli: dolnego i górnego (Q_1 i Q_3). Weryfikację hipotezy o normalności analizowanych zmiennych przeprowadzono testem W Shapiro – Wilka. Istotność różnic pomiędzy zmiennymi, odnotowanymi przed i po okresie treningowym, w obu grupach badawczych, dla zmiennych o rozkładzie normalnym i jednorodnych wariancjach oceniano testem T-Studenta dla prób zależnych, natomiast dla zmiennych o rozkładzie różnym od normalnego testem kolejności par Wilcoxon’a. Istotność różnic pomiędzy grupami badanych mężczyzn, dla zmiennych o rozkładzie różnym od normalnego i niejednorodnych wariancjach, oceniana była testem nieparametrycznym U Manna-Whitneya, natomiast dla zmiennych o rozkładzie normalnym i jednorodnych wariancjach zastosowano test t-Studenta., przyjmując jako istotny statystycznie poziom istotności $p < 0,05$. Opracowanie statystyczne wyników zostało przeprowadzone z wykorzystaniem pakietu procedur statystycznych STATISTICA 10.0 (StatSoft Inc.)

4.3.3. Wyniki

Wyniki badań wskaźników antropometrycznych i $VO_{2\text{ peak}}$ w I i II terminie badań w grupie mężczyzn poddanej treningowi wytrzymałościowemu (ET) oraz w grupie mężczyzn poddanej treningowi wytrzymałościowemu i saunie (ET+S) wraz z analizą porównawczą zaprezentowano w tabeli 15.

Analiza porównawcza wskaźników antropometrycznych i $VO_{2\text{ peak}}$ pomiędzy badanymi grupami mężczyzn wykazała istotną różnicę w zakresie $VO_{2\text{ peak}}$ w obu terminach badań ($p < 0,01$; tab.15).

Tabela 15. Analiza porównawcza wskaźników antropometrycznych i VO_2 peak w I i II terminie badań w grupie mężczyzn poddanej treningowi wytrzymałościowemu (ET) oraz w grupie mężczyzn poddanej treningowi wytrzymałościowemu i saunie (ET+S)

	I termin			II termin				
	ET(n=7)		ET+S(n=8)	ET (n=7)		ET+S(n=8)		
	\bar{x} ± SD	\bar{x} ± SD	test U Manna Whitneya p	\bar{x} ± SD	test Wilcoxon p	\bar{x} ± SD	test Wilcoxon p	test U Manna Whitneya p
Age [year]	22 ±1	22 ±1,5	NS					
High [cm]	183 ±4	182 ±5	NS					
Weight [kg]	80,0 ±6,6	78,5 ±9,9	NS	79,6 ±6,4	NS	78,5 ±9	NS	NS
Fat[%]	19 ±5,3	21,3 3,5	NS	18,6 ±4,7	NS	20,3 ±3,7	NS	NS
VO_2 peak (ml/kg/min)	47.6 ± 6.1	49.1 ± 7.0	0,049	48.0 ± 8.0	NS	50.5 ± 8.2	NS	0.047

\bar{x} - średnia; SD - odchylenie standardowe; NS - nieistotne statystycznie; * $p < 0,05$; VO_2 peak - peak oxygen uptake

Wyniki badań wskaźników funkcji bariery jelitowej i wskaźnika stanu zapalnego CRP w I i II terminie badań w grupie mężczyzn poddanej treningowi wytrzymałościowemu (ET) oraz w grupie mężczyzn poddanej treningowi wytrzymałościowemu i saunie (ET+S) wraz z analizą porównawczą zaprezentowano w tabeli 16.

Wykonana analiza porównawcza pomiędzy badanymi grupami mężczyzn w I i II terminie badań nie wykazała istotnego zróżnicowania pomiędzy badanymi grupami w zakresie wskaźników funkcji bariery jelitowej i wskaźnika stanu zapalnego CRP. Natomiast wykazano istotną różnicę pomiędzy terminami badań w grupie mężczyzn poddanych treningowi wytrzymałościowemu (ET) w zakresie stężenia zonuliny ($p < 0.05$), a w grupie mężczyzn poddanej treningowi wytrzymałościowemu i saunie (ET+S) w zakresie białka C-reaktywnego ($p < 0.05$; tab.16).

Tabela 16. Analiza porównawcza wskaźników funkcji bariery jelitowej i wskaźnika stanu zapalnego CRP w I i II terminie w grupie mężczyzn poddanej treningowi wytrzymałościowemu (ET) oraz w grupie mężczyzn poddanej treningowi wytrzymałościowemu i saunie (ET+S)

	I termin				test U Manna Whitneya p	II termin				test U Manna Whitneya p		
	ET (n=7)		ET+S (n=8)			ET (n=7)		ET+S (n=8)				
	\bar{x} ± SD	Me Q1÷Q3	\bar{x} ± SD	Me Q1÷Q3	\bar{x} ± SD	Me Q1÷Q3	test Wilcoxon p	\bar{x} ± SD	Me Q1÷Q3	test Wilcoxon p	test U Manna Whitneya p	
zonulina [ng/ml]	132,2 ±119	75,7 29,7÷252,1	118,8 79,7	101,5 61÷169,6	NS	288,6 ±182,6	244,8 159,6÷432,6	0,018*	228,4 ±179,1	132,8 94,9÷417,1	NS	NS
sIgA [µg/ml] 510 - 2040 [µg/ml]	1653,1 ±1389,8	1223 827÷1654	1385,1 1408,4	906 510,5÷1983	NS	1059,1 ±888,7	942 222÷1788	NS	1784,1 ±1212,8	1769 855÷2774,5	NS	NS
CRP[ng/dl] do 5 [ng/dl]	0,7 ±1,2	0,4 0,1÷0,4	1 ±1	0,6 0,3÷1,5	NS	1,4 ±2,5	0,5 0,2÷1	NS	0,4 ±0,5	0,3 0,2÷0,4	0,036*	NS

\bar{x} - średnia; SD - odchylenie standardowe; Me - mediana; Q1 - dolny kwartyl; Q3 - górny kwartyl; *p<0,05; **p<0,01; NS - brak istotności statystycznej; sIgA [µg/ml] - wydzielnicza immunoglobulina A; CRP [ng/dl] - białko C-reaktywne

Wyniki badań wskaźników morfologii krwi w I i II terminie badań w grupie mężczyzn poddanej treningowi wytrzymałościowemu (ET) oraz w grupie mężczyzn poddanej treningowi wytrzymałościowemu i saunie (ET+S) wraz z analizą porównawczą zaprezentowano w tabeli 17.

Analiza porównawcza wskaźników morfologii krwi pomiędzy badanymi grupami mężczyzn nie wykazała istotnego różnicowania pomiędzy badanymi grupami mężczyzn w obu terminach badań. Natomiast wykazano istotną statystycznie różnicę pomiędzy terminami badań

w obu grupach badanych mężczyzn w zakresie liczby i wartości procentowej granulocytów obojętnochłonnych (p<0.05) oraz w grupie mężczyzn poddanej treningowi wytrzymałościowemu (ET) w zakresie wartości procentowej bazofilii (p<0.05; tab. 17).

Tabela 17. Analiza porównawcza wskaźników morfologii krwi w I i II terminie badań w grupie mężczyzn poddanej treningowi wytrzymałościowemu (ET) oraz w grupie mężczyzn poddanej treningowi wytrzymałościowemu i saunie (ET+S)

	I termin				test U Manna Whitneya p	II termin				test U Manna Whitneya p	test U Manna Whitneya p	
	ET (n=7)		ET+S (n=8)			ET (n=7)		ET+S (n=8)				
	\bar{x} ± SD	Me Q1÷Q3	\bar{x} ± SD	Me Q1÷Q3		\bar{x} ± SD	Me Q1÷Q3	test Wilcoxon p	\bar{x} ± SD			Me Q1÷Q3
HGB [G/L] 140 - 180 [g/L]	156,7 ±11,4	153 145÷165	152,9 ±11,4	159 146,5÷160,5	NS	155,4 ±14,2	155 150÷162	NS	155,3 ±11,8	153,5 147÷165,5	NS	NS
RBC [liczba/uL] 4,7 - 6,1x10.e6/uL	5,2 ±0,5	5,2 4,9÷5,7	5,2 ±0,5	5,5 5÷5,5	NS	5,1 ±0,5	5,1 5÷5,6	NS	5,4 ±0,5	5,3 5,1÷5,8	NS	NS
HCT [%] 42 - 52 [%]	46,1 ±3,1	46,2 43,1÷48,8	45,3 ±3,2	46,2 43,6÷47,8	NS	45,3 ±3,9	45,2 43,5÷48,2	NS	46,2 ±3,3	45,6 44,3÷48,3	NS	NS
MCV [fL] 80 - 94 [fL]	88,9 ±2,7	88,6 87,2÷89,8	86,6 ±2,7	87,1 85,1÷88,2	NS	88,9 ±3	89 85,9÷89,7	NS	86,5 ±2,8	87,3 84,7÷87,7	NS	NS
RDW-CV [%] 11,5 - 14,5 [%]	11,9 ±0,4	12 12÷12	12,4 ±0,5	12,4 12÷12,7	NS	12,1 ±0,4	12 11,7÷12,4	NS	12,5 ±0,5	12,3 12,2÷12,9	NS	NS
MCH [pg] [fmol] 26 - 32 [pg] [fmol]	30,2 ±1,3	30,3 29,2÷31,1	29,2 ±0,6	29,4 28,7÷29,5	NS	30,5 ±1,3	30 29,5÷31,5	NS	29,1 ±0,7	29 28,9÷29,2	NS	NS
MCHC [g/L] 330 - 370 [g/L]	340,1 ±6,6	338 336÷347	337,5 ±5,9	336,5 333,5÷338	NS	343 ±6,7	345 336÷350	NS	336,1 ±8,1	334 331÷337	NS	NS
PLT [liczba/uL] 140 - 440 x10.e3/uL	245 ±40	255 211÷277	265,6 ±46,6	257 220,5÷313	NS	250,7 ±44,4	249 219÷293	NS	246,5 ±37,9	242,5 222,5÷270	NS	NS
MPV* 7,2 - 11,1 [fL]	9,9 ±0,4	9,7 9,7÷10,4	10,4 ±0,5	10,5 10÷10,8	NS	10 ±0,34	10 9,9÷10,4	NS	10,7 ±0,6	10,7 10,3÷11	NS	NS
WBC [liczba/uL] 4,5 - 10,4x10.e3/uL	6,6 ±1	6,9 5,55÷7,1	7,9 ±3,6	7,1 5,7÷8,2	NS	5,8 ±1,2	5,9 5,2÷6,7	NS	6,5 ±1,5	5,9 5,6÷7,5	NS	NS
%NEUT* [%] 40 - 74 [%]	51,2 ±8,5	54 43,7÷56,8	55,7 ±13,4	57,3 43,1÷62,4	NS	44,8 ±10,3	40,5 38,5÷50	0,028*	48,9 ±8,5	48,3 44,7÷53,8	0,009*	NS
%LYMPH* [%]	36,2	33,7	29,8	30,2	NS	40,8	45,8	NS	35,2	36,3	NS	NS

19 - 48 [%]	±8	31,7÷43	±10	24÷39,3		±9,6	36,4÷46,7		±5,1	33,1÷38,7		
%MONO* [%] 3,4 - 9 [%]	8,2 ±1,1	8,3 7,4÷9,5	10,3 ±2	10,7 9,6÷11,1	NS	8,9 ±1,7	9 7,1÷10	NS	10 ±1,1	9,8 9,1÷10,9	NS	NS
%EOS* [%] do 7 [%]	3,1 ±1,3	2,5 2,3÷3,9	3 ±2,6	1,6 1,3÷4,2	NS	3,9 ±2,9	3,1 2,3÷4	NS	4,5 ±4,8	3 2,7÷3,7	NS	NS
%BASO*[%] do 1,5 [%]	0,6 ±0,2	0,6 0,4÷0,6	0,4 ±0,2	0,4 0,3÷0,5	NS	0,8 ±0,2	0,8 0,6÷1	0,0277*	0,5 ±0,3	0,5 0,35÷0,7	NS	NS
NEUT*[uL] 1,9 - 8x10.e3/uL	3,3 ±0,5	3,7 3÷3,7	4,7 ±3,5	3,8 2,6÷5,1	NS	2,6 ±0,9	2,3 2,1÷3,3	0,028*	3,2 ±1	2,8 2,6÷3,8	0,0076*	NS
LYMPH* 0,9 - 5,2x10.e3/uL	2,4 ±0,8	2,3 1,7÷2,7	2,1 ±0,3	2 1,9÷2,1	NS	2,3 ±0,7	2,6 1,6÷2,8	NS	2,3 ±0,4	2,2 2÷2,5	NS	NS
MONO* 0,16 - 1x10.e3/uL	0,5 ±0,1	0,5 0,5÷0,6	0,8 ±0,2	0,7 0,6÷0,9	NS	0,5 ±0,2	0,5 0,4÷0,6	NS	0,7 ±23,4	0,6 0,5÷0,8	NS	NS
EOS* do 0,8x10.e3/uL	0,2 ±0,1	0,2 0,1÷0,3	0,2 ±0,2	0,2 0,1÷0,2	NS	0,2 ±0,2	0,2 0,1÷0,2	0,0258	0,3 ±0,4	0,2 0,2÷0,2	NS	NS
BASO*[uL] do 0,2x10.e3/uL	0,04 ±0,1	0,04 0,02÷0,05	0,03 ±0,01	0,03 0,02÷0,04	NS	0,04 ±0,011	0,04 0,04÷0,06	NS	0,04 ±0,02	0,03 0,02÷0,05	S,0440	NS

\bar{x} - średnia; SD - odchylenie standardowe; Me - mediana; Q1 - dolny kwartyl; Q3 - górny kwartyl; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; NS - brak istotności statystycznej; HGB [g/L] - hemoglobina, RBC [liczba / ul] - liczba czerwonych krwinek, HCT [%] - hematokryt, MCV [fL] - wskaźnik średniej objętości krwinki czerwonej [femtolitr], RDW-CV [%] - współczynnik zmienności rozkładu objętości erytrocytów, MCH [pg] [fmol] - wskaźnik średniej masy hemoglobiny w erytrocytach, MCHC [g/L] - średnie stężenie hemoglobiny w erytrocytach, PLT [liczba / ul] - liczba trombocytów, MPV* [fL] - średnia objętość płytek krwi, WBC [liczba/uL] - liczba białych krwinek, %NEUT [%] - wartość procentowa granulocytów obojętnochłonnych, %LYMPH [%] - wartość procentowa limfocytów, %MONO [%] - wartość procentowa monocytów, %EOS [%] - wartość procentowa eozynofili, %BASO [%] - wartość procentowa bazofili, NEUT* [liczba/uL] - liczba granulocytów obojętnochłonnych, LYMPH* [liczba/ul] - liczba limfocytów, MONO* [liczba/ul] - liczba monocytów, EOS* [liczba/uL] - liczba eozynofili, BASO* [liczba/ul] - liczba bazofili

Wyniki badań wskaźników wybranych bakterii wskaźnikowych, ilości bakterii, wybranych grzybów oraz wartości pH kału w I i II terminie badań w grupie mężczyzn poddanej treningowi wytrzymałościowemu (ET) oraz w grupie mężczyzn poddanej treningowi wytrzymałościowemu i saunie (ET+S) wraz z analizą porównawczą zaprezentowano w tabeli 18.

Analiza porównawcza wskaźników wybranych bakterii wskaźnikowych, ilości bakterii, wybranych grzybów oraz wartości pH kału pomiędzy terminami badań w obu grupach badanych mężczyzn nie wykazała istotnego różnicowania. Natomiast wykazano istotną statystycznie różnicę

między badanymi grupami mężczyzn w I terminie badań w zakresie łącznej liczby bakterii (p < 0.05; tab.18)

Tabela 18. Analiza porównawcza wybranych bakterii wskaźnikowych, ilości bakterii, wybranych grzybów oraz wartości pH kału w I i II terminie badań w grupie mężczyzn poddanej treningowi wytrzymałościowemu (ET) oraz w grupie mężczyzn poddanej treningowi wytrzymałościowemu i saunie (ET+S). Liczbę oznaczonych bakterii zaprezentowano w postaci Log10 CFU/g kału

	I termin					II termin						
	ET (n=7)		ET+S (n=8)			ET (n=7)		ET+S (n=8)				
	\bar{x} ± SD	Me Q1 Q3	\bar{x} ± SD	Me Q1 Q3	test U Manna Whitneya p	\bar{x} ± SD	Me Q1 Q3	test Wilcoxon p	\bar{x} ± SD	Me Q1 Q3	test Wilcoxon p	test U Manna Whitneya p
<i>E.coli</i> [CFU/g kału]	6,1 ±1	6,7 4,9÷7	5,8 ±1,8	6,4 5÷7	NS	6,5 ±0,9	6,7 5,8÷7,3	NS	4,8 ±2,8	5,9 2÷7	NS	NS
<i>E.coli</i> <i>Biovare</i> [CFU/g kału]	3,2 ±2,1	2 2÷5,6	2,5 ±1,5	2 2÷2	NS	3,1 ±1,9	2 2÷5,8	NS	2,5 ±1,3	2 2÷2	NS	NS
<i>Klebsiella</i> spp. [CFU/g kału]	2,1 1,1	2 2÷2	2,5 1,3	2 2÷2	NS	2,3 0,9	2 2÷2	NS	2,3 0,8	2 2÷2	NS	NS
<i>Enterobacter</i> spp. [CFU/g kału]	2 2	2 2÷2	2,3 0,8	2 2÷2	NS	2 0	2 2÷2	NS	2 0	2 2÷2	NS	NS
<i>Serratia</i> spp. [CFU/g kału]	2,3 0,9	2 2÷2	2 0	2 2÷2	NS	2 2	2 2÷2	NS	2,4 1,2	2 2÷2	NS	NS
<i>Enterococcus</i> spp. [CFU/g kału]	4 ±2	4,3 2÷6,3	3,4 ±2	2 2÷5,5	NS	4,2 ±2,8	2 2÷7	NS	4,6 ±2,2	5,2 2÷6,5	NS	NS
<i>Bifidobacterium</i> spp. [CFU/g kału]	6 ±0,8	6,6 5,3÷6,8	6,2 ±0,8	6,2 5,8÷6,9	NS	6,4 ±0,9	6,7 6,5÷7	NS	6,2 ±0,8	6,4 5,6÷6,7	NS	NS
<i>Bacteroides</i> spp. [CFU/g kału]	8,9 ±0,3	8,6 8,8÷9,3	8,6 ±0,5	8,5 8,3÷8,8	NS	9 ±0,6	9,3 8,5÷9,3	NS	8,7 ±0,7	8,6 8,2÷9,2	NS	NS
<i>Lactobacillus</i> [CFU/g kału]	5,4 ±0,7	5,6 4,9÷6	3,9 ±1,7	4,5 2÷5,1	NS	4,8 ±1,3	4,9 4,9÷5,3	NS	4,5 ±1,3	4,3 4,3÷5,3	NS	NS
<i>H2O2 - Lactobacillus</i> [CFU/g kału]	4,8 ±1,4	4,9 4,8÷5,5	3,6 ±1,8	3,3 2÷5,1	NS	4,7 ±1,3	4,9 4,3÷5,3	NS	4,2 ±1,5	4,3 3,1÷5,3	NS	NS
<i>Clostridium</i> spp. [CFU/g kału]	2,8 ±1,3	2 2÷4,6	3,2 ±1,7	2 2÷4,8	NS	3,3 ±1,7	2 2÷4,8	NS	2,3 ±0,9	2 2÷2	NS	NS
<i>F. prausnitzii</i> [CFU/g kału]	8,5 ±0,3	8,6 8,3÷8,8	8,5 ±0,5	8,6 8,3÷8,8	NS	8,5 ±0,4	8,5 8,3÷8,9	NS	8,4 ±0,7	8,7 8÷9	NS	NS
<i>A. muciniphila</i> [CFU/g kału]	3,4 ±1	3,6 2÷4,5	4,1 ±2,3	3,8 2÷5,8	NS	4 ±1,9	3,6 2÷6,3	NS	4,2 ±2,2	3,8 2,5÷5,8	NS	NS
<i>Łączna ilość bakterii</i> [CFU/g kału]	1 ±0,2	10 9,8÷10	8,8 ±2,8	9,6 9,6÷9,8	0,0205*	9 ±3,1	10 9,8÷10,5	NS	9,9 ±0,2	9,8 9,7÷10	NS	NS

pH kału	6,1 ±0,5	6 6÷6,5	6,3 ±0,3	6,5 6÷6,5	NS	6,4 ±0,4	6,5 6÷7	NS	6,3 ±0,7	6,5 5,8÷6,8	NS	NS
Drożdżaki [CFU/g kału]	2,5 ±0,8	2 2÷3,3	3 ±0,9	3,4 2÷3,9	NS	2,7 ±0,9	2 2÷3,8	NS	2,9 ±1,4	2 2÷3,7	NS	NS

\bar{x} - średnia; SD - odchylenie standardowe; Me - mediana; Q1 - dolny kwartył; Q3 - górny kwartył; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; NS - brak istotności statystycznej; CFU/g kału - jednostka tworząca kolonię tj. liczba mikroorganizmów w gramie kału

Wyniki badań dziennego spożycia energii [kcal], białka [%], węglowodanów [%], tłuszczu [%] oraz błonnika [%] w I i II terminie badań w grupie mężczyzn poddanej treningowi wytrzymałościowemu (ET) oraz w grupie mężczyzn poddanej treningowi wytrzymałościowemu i saunie (ET+S) wraz z analizą porównawczą zaprezentowano w tabeli 20.

Analiza porównawcza dziennego spożycia energii [kcal], białka [%], węglowodanów [%], tłuszczu [%] oraz błonnika [%] pomiędzy badanymi grupami mężczyzn w I terminie badań wykazała istotne różnicowanie w zakresie procentową podażą w dziennej diecie tłuszczów oraz udziału błonnika ($p < 0,05$) natomiast w II terminie badań w zakresie procentowego udziału w dziennej diecie węglowodanów, tłuszczów oraz udziału błonnika ($p < 0,05$). Dokonana analiza porównawcza pomiędzy terminami badań wykazała istotnie statystyczną różnicę w grupie mężczyzn poddanej treningowi wytrzymałościowemu (ET) w zakresie podaży energii oraz procentowego udziału białka w codziennej diecie badanych ($p < 0,05$; tab.19)

Tabela 19. Analiza porównawcza dziennego spożycia energii [kcal], białka [%], węglowodanów [%], tłuszczu [%] oraz błonnika [%] w I i II terminie badań w grupie mężczyzn poddanej treningowi wytrzymałościowemu (ET) oraz w grupie mężczyzn poddanej treningowi wytrzymałościowemu i saunie (ET+S)

	ET (n=7)		ET+S (n=8)		test U Manna Whitneya p	ET (n=7)		II termin ET+S (n=8)		test Wilcoxon p	test U Manna Whitneya p	
	\bar{X} ±SD	Me Q1÷Q3	\bar{X} ±SD	Me Q1÷Q3		\bar{X} ±SD	Me Q1÷Q3	\bar{X} ±SD	Me Q1÷Q3			
Energy intake [kcal/d]	2500 ±382	2591 2409÷2689	2766 593	2606 2352÷2945	NS	2776 398	2695 2564÷2927	0,028**	2419 886	2101 1916÷2673	NS	NS
Protein [%]	20,3 ±3,5	20,3 18÷23,3	16,6 2,5	16,8 15÷18	NS	17,2 1,4	17,3 15,5÷18,3	0,028**	15,8 3	14,8 13,7÷16,9	NS	NS
Carbohydrate [%]	48,8 ±6,5	48,3 42÷55,4	44,3 7,8	47,6 37÷49	NS	52,2 4	52,6 50÷53,3	NS	45,7 5	47 44,1÷49,5	NS	0,004*
Fat [%]	29,5 ±5,4	28 26÷32	39 8,4	36,8 34÷44,5	0,0205*	30,1 3,7	30 28÷34,2	NS	38,5 6,9	38,8 34,5÷40,9	NS	0,0205*
Total fiber [g/d]	25,6 ±9	22,2 20÷31	24,2 13,5	21,6 14,6÷31	0,0401*	28,3 6,5	26,8 23,2÷33,4	NS	19,2 10,3	18 13÷21,3	NS	0,0205*

\bar{x} - średnia; SD - odchylenie standardowe; Me - mediana; Q1 - dolny kwartył; Q3 - górny kwartył; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; NS - brak istotności statystycznej;

5. OGRANICZENIA PRACY

Ograniczeniem przeprowadzonych badań jest relatywnie niewielka ilość mężczyzn objętych badaniem. Główną przyczyną były rygorystyczne kryteria włączenia i wykluczenia z badania. Zastosowane w badaniach kryteria pozwoliły dobrać możliwie homogeną grupę badaną, w której starano się wykluczyć inne czynniki mające wpływ na ilość i profil mikrobioty jelitowej. Również istotnym ograniczeniem wykonanych badań był bardzo wysoki koszt badań mikrobiologicznych. Na przestrzeni ostatnich kilku lat, techniki wykorzystywane w diagnostyce mikrobioty jelit znacznie uległy zmianie, co pozwala na precyzyjną analizę całości genomu mikrobiomu ludzkiego, ale koszt jego oznaczeń jest nadal bardzo wysoki.

6. PIŚMIENICTWO

1. Ahlman, H., Nilsson, O. (2001). The gut as the largest endocrine organ in the body. *Annals of Oncology*, 12(suppl_2), S63-S68.
2. Alakomi, H. L., Skyttä, E., Saarela, M., Mattila-Sandholm, T., Latva-Kala, K., Helander, I. M. (2000). Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66(5), 2001-2005.
3. Bäckhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L. V., Koh, G. Y., Nagy, A., Gordon, J. I. (2004). The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(44), 15718-15723.
4. Bienenstock J., Kunze W., Forsythe P. (2015) Microbiota and the gut-brain axis, *Nutrition Review*, vol.73(S1):28-31,,DOI:10.1093/nutrit/nuv019.
5. Bjorksten, B., Naaber, P., Sepp, E., Mikelsaar, M. (1999). The intestinal microflora in allergic Estonian and Swedish 2-year-old children. *Clinical and Experimental Allergy*, 29(3), 342-346.
6. Blaut, M. (2015). Gut microbiota and energy balance: role in obesity. *Proceedings of the Nutrition Society*, 74(3), 227-234.
7. Buchheit, M., Laursen, P. B. (2013). High-intensity interval training, solutions to the programming puzzle. *Sports medicine*, 43(10), 927-954.
8. Cario, E., Gerken, G., Podolsky, D. K. (2007). Toll-like receptor 2 controls mucosal inflammation by regulating epithelial barrier function. *Gastroenterology*, 132(4), 1359-1374.
9. Cash, H. L., Whitham, C. V., Behrendt, C. L., Hooper, L. V. (2006). Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin. *Science*, 313(5790), 1126-1130.
10. Cenit, M., Olivares, M., Codoñer-Franch, P., Sanz, Y. (2015). Intestinal microbiota and celiac disease: cause, consequence or co-evolution?. *Nutrients*, 7(8), 6900-6923.
11. Cerdá, B., Pérez, M., Pérez-Santiago, J. D., Tornero-Aguilera, J. F., González-Soltero, R., Larrosa, M. (2016). Gut microbiota modification: another piece in the puzzle of the benefits of physical exercise in health?. *Frontiers in physiology*, 7, 51.
12. Chiller, K., Selkin, B. A., & Murakawa, G. J. (2001, December). Skin microflora and bacterial infections of the skin. In *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings* (Vol. 6, No. 3, pp. 170-174). Elsevier.
13. Clark, A., Mach, N. (2016). Exercise-induced stress behavior, gut-microbiota-brain axis and diet: a systematic review for athletes. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 13(1), 43.

14. Compare, D., Coccoli, P., Rocco, A., Nardone, O. M., De Maria, S., Carteni, M., Nardone, G. (2012). Gut–liver axis: the impact of gut microbiota on non alcoholic fatty liver disease. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 22(6), 471-476.
15. Conlon, M., Bird, A. (2015). The impact of diet and lifestyle on gut microbiota and human health. *Nutrients*, 7(1), 17-44
16. Corr, S. C., Gahan, C. G., Hill, C. (2007). Impact of selected *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species on *Listeria monocytogenes* infection and the mucosal immune response. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 50(3), 380-388.
17. Cukrowska, B. (2014). Klewicka E. Programowanie mikrobiotyczne– homeostaza mikrobioty jelitowej a ryzyko chorób cywilizacyjnych. *Stand Med Pediatr*, 11, 913-922.
18. Den Besten, G., van Eunen, K., Groen, A. K., Venema, K., Reijngoud, D. J., Bakker, B. M. (2013). The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *Journal of lipid research*, 54(9), 2325-2340.
19. Di Pierro, M., Lu, R., Uzzau, S., Wang, W., Margareten, K., Pazzani, C., Fasano, A. (2001). Zonula occludens toxin structure-function analysis Identification of the fragment biologically active on tight junctions and of the zonulin receptor binding domain. *Journal of Biological Chemistry*, 276(22), 19160-19165.
20. Eckburg, P. B., Bik, E. M., Bernstein, C. N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Relman, D. A. (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. *science*, 308(5728), 1635-1638.
21. Eisenstein M. (2016) Microbiome: Bacterial broadband. *Nature*; 533:104-6.
22. Fasano, A. (2001). Pathological and therapeutical implications of macromolecule passage through the tight junction. In *Tight Junctions* (pp. 715-740). CRC Press.
23. Galley, J. D., Nelson, M. C., Yu, Z., Dowd, S. E., Walter, J., Kumar, P. S., Bailey, M. T. (2014). Exposure to a social stressor disrupts the community structure of the colonic mucosa-associated microbiota. *BMC microbiology*, 14(1), 189.
24. Gebbers, J. O., Laissue, J. A. (1989). Immunologic structures and functions of the gut. *Schweizer Archiv fur Tierheilkunde*, 131(5), 221-238.
25. Gómez-Hurtado, I., Santacruz, A., Peiró, G., Zapater, P., Gutiérrez, A., Pérez-Mateo, M., Francés, R. (2011). Gut microbiota dysbiosis is associated with inflammation and bacterial translocation in mice with CCl4-induced fibrosis. *PLoS One*, 6(7), e23037.
26. Greiner, T., Bäckhed, F. (2011). Effects of the gut microbiota on obesity and glucose homeostasis. *Trends in Endocrinology Metabolism*, 22(4), 117-123.

27. Hue, S., Ahern, P., Buonocore, S., Kullberg, M. C., Cua, D. J., McKenzie, B. S., Maloy, K. J. (2006). Interleukin-23 drives innate and T cell-mediated intestinal inflammation. *Journal of Experimental Medicine*, 203(11), 2473-2483.
28. Hull, M. W., Chow, A. W. (2007). Indigenous microflora and innate immunity of the head and neck. *Infectious disease clinics of North America*, 21(2), 265-282.
29. Ivanov, I. I., de Llanos Frutos, R., Manel, N., Yoshinaga, K., Rifkin, D. B., Sartor, R. B., Littman, D. R. (2008). Specific microbiota direct the differentiation of IL-17-producing T-helper cells in the mucosa of the small intestine. *Cell host & microbe*, 4(4), 337-349.
30. Jandhyala, S. M., Talukdar, R., Subramanyam, C., Vuyyuru, H., Sasikala, M., Reddy, D. N. (2015). Role of the normal gut microbiota. *World journal of gastroenterology: WJG*, 21(29), 8787.
31. Jeukendrup, A. E., Vet-Joop, K., Sturk, A., Stegen, J. H. J. C., Senden, J., Saris, W. H. M., Wagenmakers, A. J. M. (2000). Relationship between gastro-intestinal complaints and endotoxaemia, cytokine release and the acute-phase reaction during and after a long-distance triathlon in highly trained men. *Clinical Science*, 98(1), 47-55.
32. Lam, Y. Y., Mitchell, A. J., Holmes, A. J., Denyer, G. S., Gummesson, A., Caterson, I. D., Storlien, L. H. (2011). Role of the gut in visceral fat inflammation and metabolic disorders. *Obesity*, 19(11), 2113-2120.
33. Lamprecht, M., Frauwallner, A. (2012). Exercise, intestinal barrier dysfunction and probiotic supplementation. In *Acute topics in sport nutrition* (Vol. 59, pp. 47-56). Karger Publishers.
34. Laparra, J. M., Sanz, Y. (2010). Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals. *Pharmacological research*, 61(3), 219-225.
35. Ley, R. E., Bäckhed, F., Turnbaugh, P., Lozupone, C. A., Knight, R. D., Gordon, J. I. (2005). Obesity alters gut microbial ecology. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(31), 11070-11075.
36. Ley, R. E., Peterson, D. A., Gordon, J. I. (2006). Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell*, 124(4), 837-848.
37. Liévin-Le Moal, V., Servin, A. L. (2006). The front line of enteric host defense against unwelcome intrusion of harmful microorganisms: mucins, antimicrobial peptides, and microbiota. *Clinical microbiology reviews*, 19(2), 315-337.
38. Lopez-Legarrea, P., Fuller, N. R., Zulet, M. A., Martinez, J. A., Caterson, I. D. (2014). The influence of Mediterranean, carbohydrate and high protein diets on gut microbiota composition in the treatment of obesity and associated inflammatory state. *Asia Pacific*

- journal of clinical nutrition, 23(3), 360-368.
39. Lorenzo, S., Halliwill, J. R., Sawka, M. N., Minson, C. T. (2010). Heat acclimation improves exercise performance. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*.
 40. Lyte, M., Vulchanova, L., Brown, D. R. (2011). Stress at the intestinal surface: catecholamines and mucosa–bacteria interactions. *Cell and tissue research*, 343(1), 23-32.
 41. Mach, N., Fuster-Botella, D. (2017). Endurance exercise and gut microbiota: A review. *Journal of Sport and Health Science*, 6(2), 179-197.
 42. MacKinnon, L. T. (2000). Overtraining effects on immunity and performance in athletes. *Immunology and cell biology*, 78(5), 502-509.
 43. Marlicz, W., Loniewski, I. (2015). The effect of exercise and diet on gut microbial diversity. *Gut*, 64(3), 519-520.
 44. Martínez, I., Lattimer, J. M., Hubach, K. L., Case, J. A., Yang, J., Weber, C. G., Haub, M. D. (2013). Gut microbiome composition is linked to whole grain-induced immunological improvements. *The ISME journal*, 7(2), 269.
 45. Medellin-Pena, M. J., Griffiths, M. W. (2009). Effect of molecules secreted by *Lactobacillus acidophilus* strain La-5 on *Escherichia coli* O157: H7 colonization. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75(4), 1165-1172.
 46. Montiel-Castro, A. J., González-Cervantes, R. M., Bravo-Ruiseco, G., Pacheco-López, G. (2013). The microbiota-gut-brain axis: neurobehavioral correlates, health and sociality. *Frontiers in integrative neuroscience*, 7, 70.
 47. Mu, C., Yang, Y., Luo, Z., Guan, L., Zhu, W. (2016). The colonic microbiome and epithelial transcriptome are altered in rats fed a high-protein diet compared with a normal-protein diet. *The Journal of nutrition*, 146(3), 474-483.
 48. Neish, A. S. (2009). Microbes in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology*, 136(1), 65-80.
 49. Peterson, D. A., McNulty, N. P., Guruge, J. L., Gordon, J. I. (2007). IgA response to symbiotic bacteria as a mediator of gut homeostasis. *Cell host microbe*, 2(5), 328-339.
 50. Purvis, D., Gonsalves, S., Deuster, P. A. (2010). Physiological and psychological fatigue in extreme conditions: overtraining and elite athletes. *Pm&r*, 2(5), 442-450.
 51. Rakoff-Nahoum, S., Paglino, J., Eslami-Varzaneh, F., Edberg, S., Medzhitov, R. (2004). Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell*, 118(2), 229-241.
 52. Sandhu Kiran V., Eoin Sherwin, Harriet Schellekens, Catherine Stanton, Timothy G.

- Dinan, John F. Cryan, (2017). Feeding the microbiota-gut-brain axis: diet, microbiome, and neuropsychiatry, *Translation Research*, January, 179, 223-244.
53. Savage, D. C. (1977). Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annual Reviews in Microbiology*, 31(1), 107-133.
54. Scoon, G. S., Hopkins, W. G., Mayhew, S., Cotter, J. D. (2007). Effect of post-exercise sauna bathing on the endurance performance of competitive male runners. *Journal of Science and Medicine in Sport*, 10(4), 259-262.
55. Scott, K. P., Martin, J. C., Duncan, S. H., Flint, H. J. (2014). Prebiotic stimulation of human colonic butyrate-producing bacteria and bifidobacteria, in vitro. *FEMS microbiology ecology*, 87(1), 30-40.
56. Sekirov, I., Russell, S. L., Antunes, L. C. M., Finlay, B. B. (2010). Gut microbiota in health and disease. *Physiological reviews*, 90(3), 859-904.
57. Spendlove, J., Mitchell, L., Gifford, J., Hackett, D., Slater, G., Cobley, S., O'Connor, H. (2015). Dietary intake of competitive bodybuilders. *Sports Medicine*, 45(7), 1041-1063.
58. Tilg, H., Moschen, A. R. (2006). Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nature Reviews Immunology*, 6(10), 772.
59. Turnbaugh, P. J., Bäckhed, F., Fulton, L., Gordon, J. I. (2008). Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell host microbe*, 3(4), 213-223.
60. Turnbaugh, P. J., Hamady, M., Yatsunenko, T., Cantarel, B. L., Duncan, A., Ley, R. E., Egholm, M. (2009). A core gut microbiome in obese and lean twins. *nature*, 457(7228), 480.
61. Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Mahowald, M. A., Magrini, V., Mardis, E. R., Gordon, J. I. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *nature*, 444(7122), 1027.
62. Ulluwishewa, D., Anderson, R. C., McNabb, W. C., Moughan, P. J., Wells, J. M., Roy, N. C. (2011). Regulation of tight junction permeability by intestinal bacteria and dietary components. *The Journal of nutrition*, 141(5), 769-776.
63. Vaishnava, S., Behrendt, C. L., Ismail, A. S., Eckmann, L., Hooper, L. V. (2008). Paneth cells directly sense gut commensals and maintain homeostasis at the intestinal host-microbial interface. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(52), 20858-20863.
64. Wehkamp, J., Stange, E. F., Fellermann, K. (2009). Defensin-immunology in

- inflammatory bowel disease. *Gastroenterologie clinique et biologique*, 33, S137-S144.
65. Whitman, W. B., Coleman, D. C., Wiebe, W. J. (1998). Perspective Prokaryotes: The unseen majority 95, no.
66. Yamashita, H., Maruta, H., Jozuka, M., Kimura, R., Iwabuchi, H., Yamato, M., Hiemori, M. (2009). Effects of acetate on lipid metabolism in muscles and adipose tissues of type 2 diabetic Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 73(3), 570-576.