

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Buněčná a vývojová biologie



Bc. Hana Svěchová

Vliv podávání n-3 polynenasycených mastných kyselin na ukazatele zánětu u pacientů s dlouhodobou parenterální výživou

Influence of supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids on inflammatory markers in patients on long-term parenteral nutrition

Diplomová práce

Vedoucí práce: MUDr. František Novák, PhD.

4. interní klinika VFN a 1. LF UK

Praha, 2011

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 26. 8. 2011

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli MUDr. Františku Novákovi, PhD. za vedení a pomoc při vypracování této diplomové práce, Doc. RNDr. Olze Novákové, CSc. a Doc. RNDr. Františku Novákovi, CSc. za čas, který mi věnovali a za cenné rady a připomínky, které mi poskytli.

Dále bych chtěla poděkovat paní laborantce Jarmile Ševčíkové, Mgr. Denise Myslivcové, PhD., Mgr. Janě Kodydkové, Mgr. Lucii Vávrové, Mgr. Marku Veckovi, PhD. a všem dalším pracovníkům 4. interní kliniky 1. LF. UK, kteří se na této studii podíleli.

V neposlední řadě musím poděkovat svým nejbližším za trpělivost, podporu a vytvoření vhodného zázemí nejen při psaní diplomové práce.

Tato diplomová práce byla vypracována v rámci klinické studie FA-HPN na 4. interní klinice 1. LF UK a VFN.

Abstrakt

SMOFLipid[®] je v klinické praxi běžně používaná tuková emulze pro parenterální výživu. Sledovali jsme, jak se po obohacení emulze SMOFLipid[®] o n-3 polynenasycené mastné kyseliny (PUFA) ve formě druhé emulze, Omegaven[®], změni zastoupení mastných kyselin ve fosfolipidech plazmy a erytrocytů, koncentrace cytokinů v séru a v *in vitro* kultuře plné krve stimulované lipopolysacharidem (LPS) a hodnotili jsme také změny v oxidoredukční rovnováze. Osm pacientů na dlouhodobé domácí parenterální výživě dostalo postupně obě emulze, SMOFLipid[®] (6 týdnů) a SMOFLipid[®]+Omegaven[®] (4 týdny). Mezi oběma druhy výživy jsme nezaznamenali významné rozdíly v základních laboratorních a klinických parametrech. Obohacení emulze SMOFLipid[®] o Omegaven[®] vedlo ke zvýšenému zastoupení kyseliny eikosapentaenové (EPA) a dokosahexaenové (DHA) v totálních fosfolipidech plazmy a podíl EPA stoupl také ve fosfolipidech erytrocytů, zatímco zastoupení DHA se již neměnilo. Tyto změny byly u fosfolipidů plazmy i erytrocytů kompenzovány především poklesem podílu kyseliny linolové a arachidonové (n-6 PUFA). V séru pacientů byly po obou typech výživy zvýšené koncentrace IL-6 a TNF- α . Při výživě se SMOFLipid[®]+Omegaven[®] klesla po stimulaci *in vitro* kultury plné krve LPS produkce IL-6 o 36%, produkce TNF- α poklesla dokonce o 60%. Mezi emulzemi nebyl rozdíl v míře lipidové peroxidace, aktivita superoxiddismutázy (jako ukazatele antioxidační kapacity) při vyšším příjmu n-3 PUFA navzdory předpokladům poklesla.

Klíčová slova: domácí parenterální výživa, SMOFLipid[®], Omegaven[®], n-3 polynenasycené mastné kyseliny, tumor nekrotizující faktor- α , interleukin-6, antioxidační enzymy

Abstract

SMOFLipid[®] is a commonly used fat emulsion for parenteral nutrition. We investigated how enrichment of SMOFLipid[®] with n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) in a form of second fat emulsion, Omegaven[®], changes fatty acid composition of total plasma phospholipids and erythrocyte phospholipids, cytokine concentrations in serum and in supernatant from *in vitro* whole blood culture stimulated with lipopolysaccharide (LPS) and we evaluated also changes in oxido-reductive balance. Eight patients on long-term home parenteral nutrition received both emulsions, SMOFLipid[®] (6 weeks) and SMOFLipid[®]+Omegaven[®] (4 weeks), one by one. We observed no significant differences in common laboratory and clinical parameters between these two types of diet. Enrichment of SMOFLipid[®] with Omegaven[®] led to an increase in eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) in total plasma phospholipids and there was also an increase in proportion of EPA in erythrocyte phospholipids, while proportion of DHA remained unchanged. These changes were in both phospholipids of plasma and erythrocyte compensated for a decrease in proportion of linoleic and arachidonic acid (n-6 PUFA). There were elevated IL-6 and TNF- α serum concentrations in patients after both diets. There was a decrease in IL-6 production by 36% with SMOFLipid[®]+Omegaven[®] diet after stimulation of *in vitro* whole blood culture with LPS, production of TNF- α decreased even more, by 60%. There was no difference between SMOFLipid[®] and SMOFLipid[®]+Omegaven[®] in the extent of lipid peroxidation. Despite expectations, superoxid dismutase activity (as a marker of antioxidant capacity) decreased with the diet rich in n-3 PUFA.

Key words: home parenteral nutrition, SMOFLipid[®], Omegaven[®], n-3 polyunsaturated fatty acids, tumor necrosis factor- α , interleukin-6, antioxidant enzymes

Obsah

1.	Úvod.....	9
2.	Cíle.....	11
3.	Literární přehled.....	12
3.1.	Lipidy v lidském organismu.....	12
3.1.1.	Charakteristika lipidů	12
3.1.2.	Mastné kyseliny.....	12
3.1.3.	Význam n-3 PUFA	14
3.1.4.	N-3 PUFA a zánět.....	15
3.1.5.	Lipidová peroxidace	16
3.1.5.1.	Neenzymové antioxidanty	17
3.1.5.2.	Antioxidační enzymy.....	17
3.2.	Doplňování (suplementace) živin v klinické praxi	18
3.2.1.	Tukové emulze v parenterální výživě.....	20
3.2.1.1.	Tukové emulze na bázi sojového oleje	22
3.2.1.2.	Tukové emulze obsahující MCT.....	22
3.2.1.3.	Tukové emulze obsahující olivový olej	23
3.2.1.4.	Tukové emulze s obsahem rybího tuku	24
3.3.	Zánět a farmakonutriční intervence jako možnost jeho ovlivnění.....	25
3.3.1.	Průběh zánětu	26
3.3.1.1.	Akutní fáze zánětu	26
3.3.1.2.	Ukončení (rezoluce) akutní fáze.....	28
3.3.2.	Mediátory zánětlivé odpovědi	29
3.3.2.1.	Cytokiny.....	30
3.3.2.2.	Chemokiny.....	31
3.3.2.3.	Eikosanoidy	32
3.3.2.4.	Mediátory odvozené od DHA.....	33
3.3.3.	<i>In vitro</i> model zánětu	33
3.3.4.	Ovlivnění zánětu pomocí farmakonutriční suplementace	34
4.	Metodika	36
4.1.	Pacienti zařazení do studie	36
4.2.	Intervence v rámci studie	37
4.3.	Odběr krevních vzorků.....	38
4.4.	<i>In vitro</i> kultivace plné krve se stimulací lipopolysacharidem.....	38
4.5.	Parametry hodnocené u pacientů ve studii.....	38
4.6.	Stanovení mastných kyselin v lipidech plazmy a erytrocytů	39
4.6.1.	Extrakce lipidů z plazmy	39
4.6.2.	Extrakce lipidů z erytrocytů	39
4.6.3.	Rozdělení lipidových druhů chromatografií na tenké vrstvě (TLC)	40
4.6.4.	Příprava methylesterů mastných kyselin	40
4.7.	Stanovení koncentrace cytokinů v séru a v supernatantu stimulované krevní..... kultury	41
4.7.1.	Stanovení koncentrace IL-6.....	41
4.7.2.	Stanovení koncentrace TNF- α	42
4.8.	Stanovení aktivity antioxidačních enzymů	42
4.8.1.	CuZn-superoxid dismutáza.....	42
4.8.2.	Kataláza	43
4.8.3.	Glutathionreduktáza	43

4.9.	Statistické zpracování dat.....	43
5.	Výsledky	44
5.1.	Srovnání zastoupení tříd FA v tukových emulzích použitých ve studii	44
5.2.	Vliv tukové emulze SMOFLipid [®] na zastoupení tříd FA v lipidech plazmy a fosfolipidech erytrocytů.....	45
5.3.	Srovnání běžných laboratorních parametrů u pacientů s emulzí SMOFLipid [®] ... a SMOFLipid [®] +Omegaven [®]	49
5.4.	Srovnání zastoupení mastných kyselin ve fosfolipidech plazmy a erytrocytů..... u pacientů s tukovou emulzí SMOFLipid [®] a SMOFLipid [®] +Omegaven [®]	51
5.5.	Závislost koncentrace cytokinů na koncentraci LPS v <i>in vitro</i> krevní kultuře .	57
5.6.	Vliv emulzí SMOFLipid [®] a SMOFLipid [®] +Omegaven [®] na koncentraci cytokinů v séru	58
5.7.	Vliv emulzí SMOFLipid [®] a SMOFLipid [®] +Omegaven [®] na produkci cytokinů ... po <i>in vitro</i> stimulaci LPS krevní kultury	58
5.8.	Vliv emulzí SMOFLipid [®] a SMOFLipid [®] +Omegaven [®] na koncentraci..... konjugovaných dienu a aktivitu antioxidantních enzymů	61
6.	Diskuze.....	63
7.	Seznam literatury	73

Seznam použitých zkratek

- AA - kyselina arachidonová
- ALA - kyselina α -linolenová
- CAT - kataláza
- COX - cyklooxygenáza
- DHA - kyselina dokosaheptaenová
- EFA - esenciální mastné kyseliny
- EPA - kyselina eikosapentaenová
- EV - enterální výživa
- FA - mastná kyselina
- GR - glutathionreduktáza
- IL - interleukin
- LA - kyselina linolová
- LCT - long-chain triglycerides; triacylglyceroly s dlouhými FA
- LF - lékařská fakulta
- LOX - lipoxygenáza
- LPS - lipopolysacharid
- LT - leukotrien
- MCT - mid-chain triglycerides; triacylglyceroly se středně dlouhými FA
- MUFA - mononenasyčené mastné kyseliny
- PBMC - periferal blood mononuclear cells; mononukleární buňky z periferní krve
- PG - prostaglandin
- PLA₂ - fosfolipáza A₂
- PUFA - polynenasycené mastné kyseliny
- PV - parenterální výživa
- ROS – reaktivní formy kyslíku
- SAT FA - nasycené mastné kyseliny
- SOD - superoxiddismutáza
- TLC - chromatografie na tenké vrstvě
- TNF - tumor nekrotizující faktor
- TX - tromboxan
- VFN - všeobecná fakultní nemocnice

1. Úvod

Lipidy jsou vedle proteinů, sacharidů a nukleových kyselin jednou ze základních stavebních složek živých organismů. Slouží nejen jako významný zdroj energie, ale mají i důležitou strukturní funkci a také se podílejí na buněčné signalizaci. Za fyziologických podmínek se lipidy v organismu vyskytují v určité kvalitě a kvantitě, dané jejich syntézou *de novo* a příjmem v potravě. Kvalita i množství lipidů se mění během různých patologických stavů, jako je např. zvýšený oxidační stres, zánět a podvýživa.

U mnohých onemocnění nejsou pacienti schopni přijímat živiny v potřebné kvalitě a kvantitě. Proto potřebují nutriční podporu (umělou výživu), v případech střevního selhání v podobě parenterální výživy. Jejím hlavním účelem je zvýšit nebo zcela pokrýt příjem živin pacienta. Tukové emulze byly původně do parenterální výživy zavedeny kvůli zlepšení kalorického příjmu pacientů. Dodatečně však bylo zjištěno, že kvalita lipidů může ovlivňovat zánět a že důležitou roli v regulaci zánětlivé odpovědi hrají polynenasycené mastné kyseliny (PUFA) tříd n-3 a n-6. Zatímco n-6 PUFA jsou obecně prozánětlivé, n-3 PUFA působí relativně protizánětlivě. Původní tukové emulze byly bohaté na n-6 PUFA, postupně se pak začaly používat emulze se sníženým zastoupením n-6 PUFA a se zvýšeným přidavkem n-3 PUFA s cílem omezit negativní vliv na nadměrnou zánětlivou odpověď organismu. Navzdory intenzivnímu studiu však stále není jasné, jaké množství n-3 PUFA je v tukových emulzích z hlediska optimální regulace zánětu nejvýhodnější a zároveň pro pacienty nejbezpečnější.

Rozvoj zánětu provází řadu klinických situací (infekční onemocnění, pooperační stavy, popáleniny). Zánět je univerzální reakcí těla na potenciálně nebezpečný podnět (infekce, fyzické poškození tkáně). Z tohoto hlediska se jedná o přirozený a velmi důležitý obranný mechanismus organismu, bez kterého by mohla mít i sebemenší infekce fatální následky. Na druhou stranu může být zánět nebezpečný, pokud dojde k jeho deregulaci. Tělu pak hrozí poškození vlastním hyperaktivovaným imunitním systémem, což může vést k nekontrolované systémové zánětlivé reakci, nebo naopak k imunosupresi a snížení obranyschopnosti organismu. V obou případech se může jednat o nebezpečný a potenciálně život ohrožující stav.

Studium vlivu suplementace n-3 PUFA na ukazatele zánětu v lidské populaci je poměrně složité, protože příjem tuků v potravě je nutné ovlivnit na poměrně dlouhou dobu za současné kontroly aktivity zánětu. Obě tato hlediska splňují pacienti na dlouhodobé

parenterální výživě. U těchto pacientů je omezeno vstřebávání živin ve střevě a příjem mastných kyselin je u nich dlouhodobě závislý na složení tukových emulzí, které jsou součástí parenterální výživy. Vzhledem k různorodosti klinicky dostupných tukových emulzí lze těmto pacientům postupně podat emulze o různém složení mastných kyselin (při zachování stejného kalorického příjmu) a srovnat jejich vliv na zánětlivou odpověď imunokompetentních buněk u téhož pacienta. Tento přístup pomůže vyloučit vliv genetických rozdílů v populaci.

Tato diplomová práce je součástí rozsáhlejší klinické studie, která srovnává lipidové emulze o různém zastoupení tříd mastných kyselin. Tyto emulze jsou běžně používané v klinické praxi pro dlouhodobou domácí parenterální výživu. Bude hodnocen jejich vliv na zánětlivou odpověď a oxidoredukční rovnováhu organismu vzhledem k zastoupení jednotlivých mastných kyselin v lipidech plazmy a fosfolipidech erytrocytů.

2. Cíle

Tato diplomová práce sleduje u pacientů na dlouhodobé domácí parenterální výživě působení tukové emulze SMOFLipid[®] s poměrně vysokým podílem n-3 PUFA a směsné emulze SMOFLipid[®]+Omegaven[®] vedoucí ještě k dalšímu navýšení n-3 PUFA s následujícími cíli:

1. srovnat vliv těchto tukových emulzí na spektrum mastných kyselin v lipidech plazmy a fosfolipidech erytrocytů
2. zjistit vliv změn spektra mastných kyselin na produkci IL-6 a TNF- α v séru a po *in vitro* stimulaci plné krve lipopolysacharidem
3. zjistit vliv zvýšeného zastoupení n-3 PUFA ve výživě na některé parametry oxidoredukční rovnováhy a základní laboratorní ukazatele

3. Literární přehled

3.1. Lipidy v lidském organismu

3.1.1. Charakteristika lipidů

Mezi lipidy řadíme široké spektrum molekul převážně hydrofobní, případně amfifilní povahy. Můžeme je dělit na jednoduché lipidy (tuky, vosky), složené lipidy (př. glycerofosfolipidy, glykoglycerolipidy, sfingolipidy) a na prekurzorové a odvozené lipidy (mastné kyseliny, steroly). Mezi lipidy řadíme také vitamíny a hormony rozpustné v tucích (vitamíny A, D, E, K; testosteron, estradiol a jiné).

Lipidy mají v organismu několik důležitých funkcí. Především jsou vydatným zdrojem energie. Energetická hodnota 1 g tuků je přibližně 38 kJ, zatímco energie získaná z 1 g glukózy je asi 16 kJ. Rezervoárem lipidů v těle je tuková tkáň tvořená adipocyty. Tyto buňky uchovávají lipidy v podobě triacylglycerolů a cholesterolesterů. Lipidy mají dále strukturní funkci, jelikož jsou důležitou součástí biologických membrán (glycerofosfolipidy, fosfosfingolipidy, cholesterol). Fosfolipidy mohou díky svému amfifilnímu charakteru vytvořit dvojvrstvou membránu, která oddělí dvě vodná prostředí, jako je cytoplazma a okolí buňky, prostředím hydrofobním. Tím vzniká semipermeabilní membrána nepropustná pro hydrofilní molekuly.

Lipidy hrají roli také v buněčné signalizaci. Řada lipidových signálních molekul může díky svému hydrofobnímu charakteru procházet skrze membrány, proto nemohou být, narozdíl od jiných signálních molekul, před uvolněním shromažďovány ve váčcích a jsou tedy syntetizovány na určeném místě ve chvíli potřeby. Mezi lipidové signální molekuly se řadí např. kyselina lyzofosfatidová, ceramid, prostaglandiny, steroidní hormony nebo inositoltrisfosfát a diacylglyceroly (odvozené od fosfatidylinositol bisfosfátu), což jsou molekuly řadící se mezi tzv. druhé posly zprostředkovávající přenos signálu uvnitř buňky (Vance and Vance, 2002)

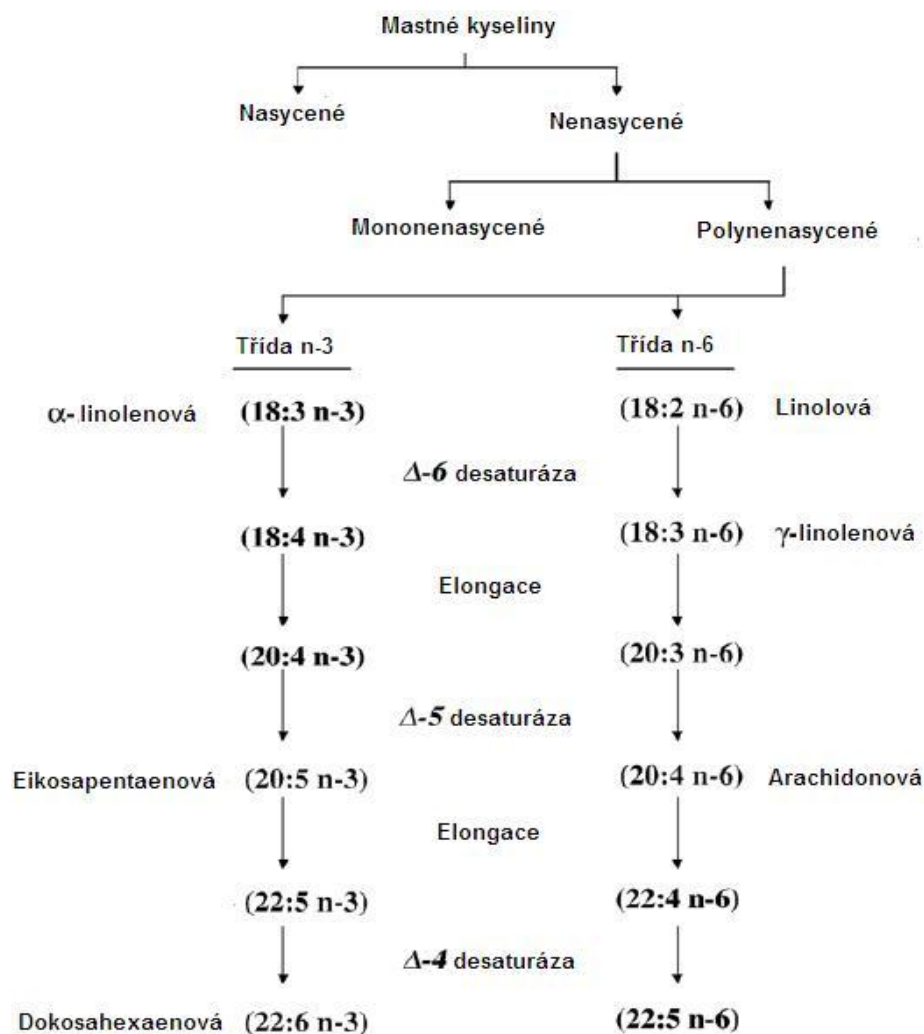
Většina funkcí zprostředkovaných lipidy je ovlivněna kvalitou jejich mastných kyselin (FA).

3.1.2. Mastné kyseliny

FA jsou monokarboxylové kyseliny s uhlíkatým řetězcem o délce osm a více uhlíkových atomů. Podle počtu dvojných vazeb se dělí na satureované (SAT FA), které

neobsahují žádnou dvojnou vazbu, mononenasyčené (MUFA) s jednou dvojnou vazbou a polynenasycené mastné kyseliny (PUFA) s dvěma a více dvojnými vazbami v molekule. PUFA se dále dělí do dvou tříd, n-3 (známé také jako ω -3) a n-6 (ω -6). Toto označení symbolizuje, na kolikátém uhlíku od koncové methylové skupiny se nachází první dvojná vazba v uhlíkovém řetězci příslušné FA.

Při syntéze nenasycených FA zavádějí v molekule dvojnou vazbu enzymy desaturázy. Lidské buňky nemají k dispozici Δ -12 a Δ -15 desaturázy (běžně přítomné v rostlinách), proto nemohou zavádět dvojně vazby dále než na devátý uhlík (Δ -9 desaturázy) od karboxylové skupiny. U člověka proto nedochází k *de novo* syntéze prekurzorů PUFA n-3 série, kyseliny alfa-linolenové (ALA, 18:3n-3) a prekurzorů n-6 série, kyseliny linolové (LA, 18:2n-6). Tyto, pro člověka esenciální, FA (EFA) proto musí být přijímány v potravě, hlavně v rostlinných olejích (Vance and Vance, 2002). Bohatým zdrojem LA je např. kukuřičný nebo slunečnicový olej, ALA pak najdeme v řepkovém nebo lněném (De Caterina and Basta, 2000). EFA mohou být v lidském organismu dále přeměňovány pomocí elongace a desaturace na další více nenasycené PUFA (viz Obr. 1). Z třídy n-6 je významná kyselina arachidonová (AA, 20:4n-6), z třídy n-3 kyselina eikosapentaenová (EPA, 20:5n-3) a dokosahexaenová (DHA, 22:6n-3). Jelikož je přeměna ALA na EPA, resp. DHA u lidí omezená a tuková tkáň je schopná ukládat n-3 PUFA také jen v omezené míře, je důležité tyto FA neustále přijímat v potravě (Arterburn et al., 2006). Hlavním zdrojem EPA a DHA je pro člověka rybí tuk.



Obr. 1: Schéma syntézy polynenasycených mastných kyselin (PUFA) s dlouhým řetězcem z prekurzorů, kyseliny α -linolenové pro n-3 PUFA, kyseliny linolové pro n-6 PUFA (převzato ze Siddiqui et. al, 2008; upraveno).

3.1.3. Význam n-3 PUFA

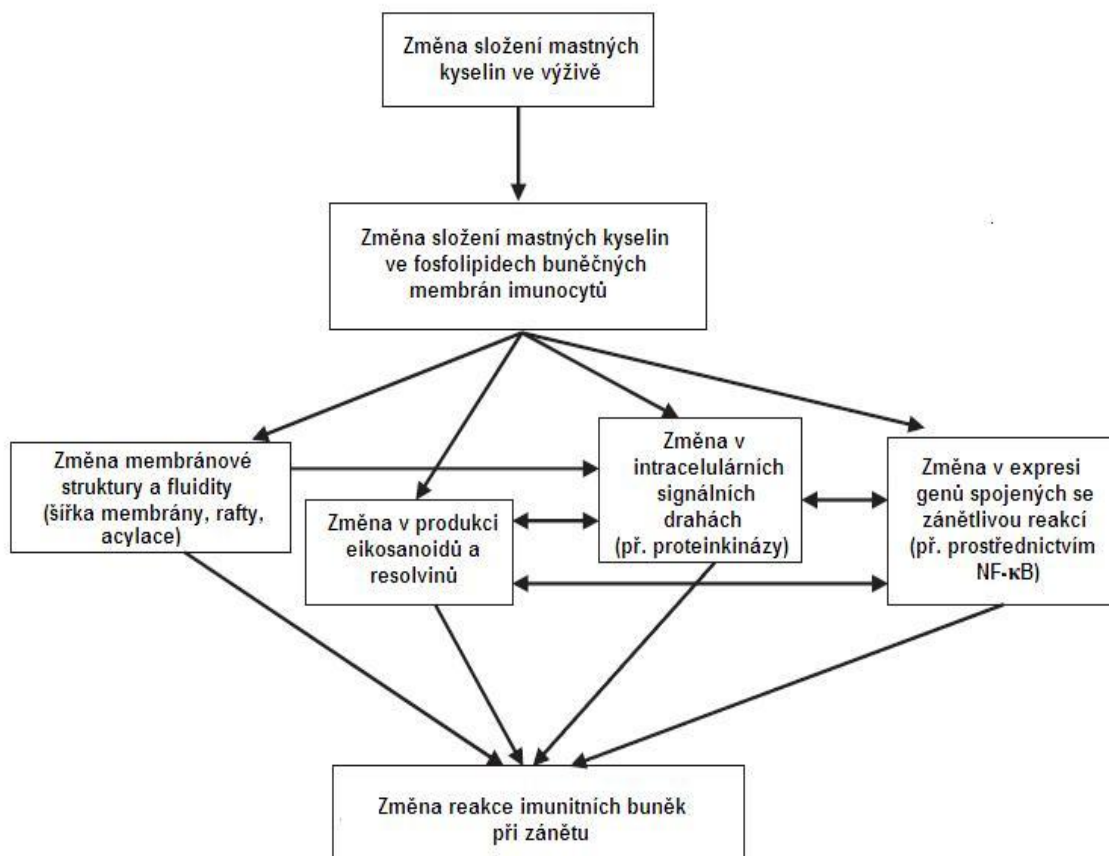
V současnosti je pro většinu obyvatel vyspělého světa typická tzv. západní dieta. Ta je bohatá především na n-6 PUFA s velmi nízkým podílem n-3 PUFA. Obvykle se uvádí poměr n-6/n-3 PUFA pro západní dietu 20:1. Přitom se odhaduje, že u našich předků byl tento poměr asi 2:1. Takto nízký je dnes poměr n-6/n-3 PUFA jen v dietě obyvatel některých přímořských států. Zvýšené zastoupení n-6 PUFA v západní dietě je dáno nízkou konzumací rybího masa, vysokou mírou konzumace masa průmyslově chovaných zvířat a průmyslově pěstovaných rostlin, v nichž jsou n-3 PUFA zastoupeny jen v malé míře (převzato ze Simopoulos, 2000).

Studie ze 70. a 80. let minulého století na grónských Eskymácích a u obyvatel Japonska, u kterých velkou část stravy tvořily ryby, naznačovaly, že n-3 PUFA mohou

snižovat riziko vzniku srdečních onemocnění. Od té doby byla ukázána řada prospěšných účinků, které mají tyto FA pro lidský organismus. n-3 PUFA mohou působit protizánětlivě, mohou mít antikoagulační a antiarytmické účinky, mohou bránit vzniku aterosklerózy, u pacientů s hypertriglyceridemií mohou upravovat lipidový profil plazmy (souhrnně v Siddiqui et al., 2008). Všechny výše zmíněné účinky mohou přispívat ke kardioprotektivnímu působení n-3 PUFA, které je dnes dobře známo (Valagussa et al., 1999). Další práce naznačují, že n-3 PUFA snižují riziko vzniku Alzheimerovy choroby (Morris et al., 2003), hrají roli v prevenci vzniku rakoviny tlustého střeva (Roynette et al., 2004) i dalších chorob (v souhrnu v Simopoulos, 1991). Díky protizánětlivému působení mohou být užitečné v léčbě některých akutních a chronických zánětlivých onemocnění (v souhrnu Calder, 2006).

3.1.4. N-3 PUFA a zánět

Je řada způsobů, jak mohou n-3 PUFA ovlivnit činnost imunitních buněk při zánětu (viz Obr. 2). Spektrum FA přijatých v potravě se odráží na složení buněčných membrán všech tkání včetně buněk imunitního systému. Zvýšení podílu n-3 PUFA ve fosfolipidech membrány může ovlivnit strukturu celé membrány, její fluiditu a organizaci lipidových raftů (Stulnig et al., 2001). Změny ve složení FA membránových fosfolipidů souvisí také se změnou vlastností signálních molekul odvozených od fosfolipidů, jako jsou diacylglyceroly, kyselina fosfatidová, lyzofosfolipidy (Serhan et al., 1996). Ty mohou následně ovlivnit aktivaci dalších členů signálních kaskád, jako je proteinkináza C (De Jonge et al., 1995), která může např. modulovat činnost cyklooxygenázy-2 (COX-2) (Giroux and Descoteaux, 2000). COX-2 je jedním z enzymů produkujících zánětlivé mediátory zvané eikosanoidy. Prekurzory pro syntézu eikosanoidů jsou především AA a EPA, změna poměru AA/EPA v membráně ovlivní produkci různých druhů eikosanoidů s různými účinky při zánětu (viz kapitola 3.3.2.3 Eikosanoidy). N-3 PUFA jsou prekurzory pro řadu dalších lipidových mediátorů s imunomodulačními účinky (kapitola 3.3.2.4 Mediátory odvozené od DHA). N-3 PUFA mohou ovlivňovat také genovou expresi vazbou na jaderné receptory a regulovat tak např. expresi jaderného transkripčního faktoru- κ B, který ovlivňuje imunitní reakci na infekci (Deckelbaum et al., 2006). Kromě toho mohou n-3 PUFA modulovat apoptózu lymfocytů (souhrnně ve Wanten and Calder, 2007).



Obr. 2: Způsoby, kterými mohou n-3 polynenasycené mastné kyseliny (n-3 PUFA) ovlivnit reakci imunitních buněk při zánětu. Příjem n-3 PUFA ve výživě vede k inkorporaci n-3 PUFA do fosfolipidů membrán imunitních buněk, což může ovlivnit řadu buněčných procesů, jako je buněčná signalizace, produkce lipidových mediátorů nebo genová exprese, souvisejících se zánětlivou reakcí. NF-κB - jaderný transkripční faktor-κB (převzato z Wanten and Calder, 2007; upraveno).

3.1.5. Lipidová peroxidace

Za normálních okolností je v organismu vyvážená produkce volných radikálů a tzv. reaktivních forem kyslíku (ROS) a jejich degradace antioxidantním systémem. V případě, že dojde k nadměrné produkci ROS nebo snížení schopnosti antioxidantního systému ROS eliminovat, dochází k oxidačnímu stresu. ROS mohou napadat lipidy, proteiny i DNA, což může vést k funkčnímu poškození, případně smrti buňky.

Oxidační poškození lipidů (lipidová peroxidace) je typické především pro PUFA (jak třídy n-6, tak n-3), ať už volné nebo vázané v membráně. Oproti SAT FA a MUFA mají vyšší počet dvojných vazeb, které jsou odděleny methylenovou skupinou -CH₂-. Ta snadno reaguje s volnými radikály za vzniku nestabilního lipidového radikálu. Následně dochází k řetězové reakci produkující další lipidové radikály a další produkty lipidové

peroxidace, které jsou toxické. K zastavení takovéto řetězové reakce slouží antioxidanty, jako např. vitamín E. Lipidová peroxidace může vést k poškození membrán (zvýšená permeabilita, snižování membránového potenciálu, vliv na funkci proteinů) (Halliwell and Chirico, 1993).

Antioxidant můžeme dělit na neenzymové a enzymové.

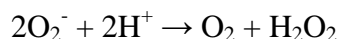
3.1.5.1. Neenzymové antioxidanty

Do této skupiny patří látky nízkomolekulární, jako je vitamín C, vitamín E, glutathion nebo kyselina močová, a vysokomolekulární, kam patří transportní proteiny v plazmě - př. albumin, transferin, ferritin.

3.1.5.2. Antioxidační enzymy

- Superoxiddismutáza

Superoxiddismutáza (SOD; EC 1.15.1.1) katalyzuje dismutaci superoxidového radikálu na kyslík a peroxid vodíku podle reakce:

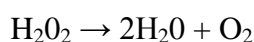


Existují dva hlavní typy SOD lišící se svými kovovými kofaktory a buněčnou lokalizací. Nejběžnější je měďzinková SOD (CuZn-SOD), která se nachází v cytosolu eukaryotních buněk. Druhý typ SOD obsahuje železo nebo mangan (Fe/Mn-SOD) a je běžný u prokaryot a v mitochondriích a plastidech eukaryotních buněk (Weisiger and Fridovich, 1973).

Superoxidový radikál je běžný ve většině živých organismů. Není příliš reaktivní. Vzniká např. při mitochondriální respiraci a je také produkován buňkami imunitního systému jako obrana proti mikroorganismům (Štípek et al., 2002).

- Kataláza

Kataláza (CAT; EC 1.11.1.6) je běžný enzym vyskytující se od aerobních bakterií až po člověka. Katalyzuje rozklad peroxidu vodíku na vodu a kyslík podle reakce:



Katalázy obsahují ve své struktuře hem. Obvykle se nachází v peroxizomech.

Peroxid vodíku je vedlejším produktem řady metabolických procesů. Sám o sobě není příliš reaktivní, ale může se redukovat za vzniku velmi toxického hydroxylového radikálu. Podobně jako superoxidové radikály i peroxid vodíku je produkován buňkami

imunitního systému při obraně proti mikroorganismům (Štípek et al., 2002).

- Glutathion reduktáza

Glutathion reduktáza (GR; EC 1.8.1.7) je enzym katalyzující redukci oxidované formy glutathionu na redukovanou formu. Tato reakce vyžaduje přítomnost NADPH. Glutathion je důležitým buněčným antioxidantem chránícím před poškozením volnými radikály a peroxidy. Kromě toho redukuje disulfidické vazby v cytoplazmatických proteinech. Ve zdravé buňce se nachází až 90% glutathionu v redukované formě. Zvyšující se poměr oxidovaný/redukovaný glutathion může být známkou oxidačního stresu (Štípek et al., 2002).

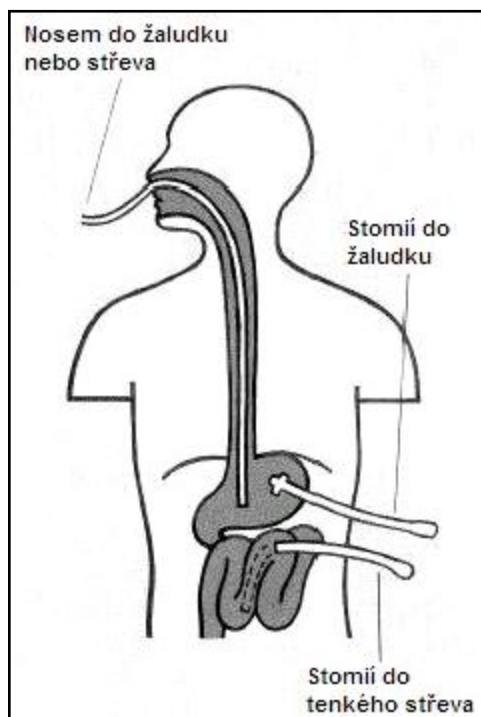
3.2. Doplnování (suplementace) živin v klinické praxi

Existuje řada onemocnění, ať už psychického (mentální anorexie) či fyzického charakteru (syndrom krátkého střeva, nádorová onemocnění, chronická pankreatitida), které jsou provázeny malnutricí (podvýživou), která oslabuje obranyschopnost organismu, prodlužuje pobyt v nemocnici, vede ke komplikacím při léčbě a také zvyšuje mortalitu. Malnutrice v nemoci se často rozvíjí navzdory vyvážené racionální dietě. V klinické praxi se proto v těchto případech přistupuje k nutriční podpoře formou umělé výživy (Shikora and Blackburn, 1997). Existuje celá řada způsobů, jak suplementovat živiny pomocí umělé výživy. V principu lze rozlišit enterální a parenterální způsob umělé výživy. Při enterální výživě (EV) jsou živiny přijímány střevem, zatímco u parenterální výživy (PV) jsou živiny aplikovány přímo do cévního řečiště. EV lze dále dělit na perorální suplementaci (ang. sipping) a EV sondou, při které jsou roztoky živin aplikovány sondou zavedenou přímo do trávicího traktu. EV, protože je přirozenější a zachovává funkce trávicího traktu, je vždy preferována před PV, která je rezervována pro případy střevního selhání nebo nemožnosti dodávky živin do trávicího traktu.

Nejjednodušším a zároveň nejlevnějším typem suplementace živin je jejich perorální podávání. K tomu se přistupuje vždy, je-li pacient schopen přijímat potravu ústy a jeho trávicí trakt je funkční. Existují různé nutriční doplňky pro perorální užití, ať už se jedná o nutričně definované roztoky určené k popíjení či kapsle obsahující například rybí tuk pro zvýšení příjmu n-3 PUFA.

EV sondou se aplikuje v případech, kdy pacient není schopen přijímat potravu ústy,

například při poruchách polykání či ve stavu bezvědomí, ale při zachované správné funkci gastrointestinálního traktu (Gibney et al., 2005). Tento způsob výživy je oproti orální suplementaci více invazivní, ve srovnání s PV však způsobuje méně závažných komplikací a také zachovává funkci střeva. EV se aplikuje sondou zavedenou přes nos, nebo břišní dutinu do žaludku, nebo do tenkého střeva (viz Obr. 3). Standardní formule EV obsahuje 50-55% sacharidů, 15-20% proteinů a 30% lipidů. Existují i různé speciální formule připravené pro případ konkrétního onemocnění (Shikora and Blackburn, 1997).

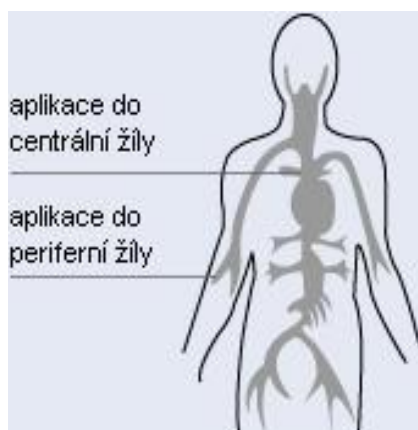


Obr. 3: Možnosti zavedení enterální výživy. Enterální výživa může být zavedena sondou procházející nosem do žaludku, ale také do tenkého střeva (není zobrazeno). Další možností je zavedení sondy do žaludku či tenkého střeva skrze břišní dutinu formou stomie (zdroj: <http://www.nutritioncare.org/wcontent.aspx?id=266>; upraveno)

PV, jak již bylo řečeno, znamená aplikaci živin do cévního systému. PV je aplikována v podobě komplexních roztoků obsahujících glukózu, aminokyseliny, lipidy, vitamíny, elektrolyty a stopové prvky. Využívá se v případech, kdy pacient má nefunkční nebo poškozený trávicí trakt a vstřebávání živin ve střevě je nedostačující pro pokrytí nutričních potřeb pacienta. PV se nevyužívá v případě, kdy může být plně nahrazena výživou enterální. Mezi nejčastější indikace PV patří syndrom krátkého střeva a syndrom nádorové obstrukce (Svačina, 2008).

Rozlišujeme totální PV, je-li tato jediným zdrojem živin, a částečnou PV, pokud

pacient zároveň přijímá živiny perorálně či enterálně. PV může být aplikována do periferní či centrální žíly (viz Obr. 4). Někteří pacienti vyžadují dlouhodobou nutriční podporu, kterou dostávají v prostředí svých domovů, tzv. domácí PV.



Obr. 4: Možnosti aplikace parenterální výživy. Totální parenterální výživa se aplikuje do centrální žíly, zatímco částečná parenterální výživa bývá aplikována do periferní žíly (zdroj: <http://www.pfk.com.au/3947.htm>; upraveno).

3.2.1. Tukové emulze v parenterální výživě

Tukové emulze (viz Obr. 5) se staly součástí parenterální výživy v 60. letech 20. století. Důvodů pro přidání tukových emulzí do parenterální výživy bylo několik. Především šlo o vysoký energetický obsah tuků, který umožnil snížit objem tekutiny dodávané pacientům. Aby se zabránilo cévním komplikacím, nesmí roztok pro PV překročit určitou koncentraci. Proto byl při použití aminokyselin a cukrů jako zdroje energie potřeba příliš velký objem tekutiny (Hallberg et al., 1967). Navíc díky tukovým emulzím se snížilo množství glukózy v PV a zamezilo se řadě s tím spojených komplikací. Kleslo tak riziko hyperglykémie, steatózy jater či metabolického stresu (Vinnars and Hammarqvist, 2004). Dále bylo možné dodat do těla EFA a zabránit tak jejich deficienci, která vede k řadě zdravotních potíží, jako je poškození pokožky nebo vypadávání vlasů (Fleming et al., 1976). Kromě toho mají tuky důležitou stavební funkci, jsou potřebné k transportu vitamínů rozpustných v tucích a velice významná je také úloha FA jako prekurzorů biologicky aktivních látek při zánětlivých reakcích.



Obr. 5: Tukové emulze pro parenterální výživu. (vlevo: <http://trialx.com/curebyte/2011/06/16/what-is-nutrition-parenteral/>; vpravo: <http://pharm.kku.ac.th/thaiiv/depart/clinic/DispensingPharmacy/iv/iv.htm>).

Už od 20. let 20. století byla vyvíjena řada tukových emulzí, které se měly stát součástí PV. Tyto emulze musely před klinickým využitím projít mnoha testy. Bylo třeba zjistit, že jejich podávání v malých či velkých dávkách nepůsobí toxicky, zda nepůsobí negativně na lidské zdraví při krátkodobém ani dlouhodobém podávání, že neovlivňují jaterní funkce apod. (Hallberg et al., 1967). Za první netoxickou tukovou emulzi je považován Intralipid[®], jeho složení bylo publikováno v roce 1961 Arvinem Wretlindem ze Švédska. Intralipid[®], připravovaný ze sojového oleje, byl v Evropě schválen ke klinickému použití v roce 1963 (Bozzeti et al., 2006) a je používán dodnes. V USA byla v té době testována jiná emulze, Lipomul[®], připravovaná z bavlníkového semene. Kvůli řadě nepříznivých vedlejších účinků (Kaley, 1959; Meng and Kaley, 1965) však bylo její použití v roce 1964 zakázáno (Bozzeti et al., 2006) a po několik následujících let byl v USA zájem o možnost využití tukových emulzí v PV značně omezen (Vinnars and Hammarqvist, 2004). Během let byly vyráběny a klinicky využívány další druhy emulzí obohacené např. o olivový olej nebo rybí tuk.

Přes značné úsilí nebyl doposud uspokojivě vyřešen problém přípravy tukové emulze o optimálním zastoupení FA, která by splňovala potřeby jak kalorické podpory, tak vhodných prekurzorů pro syntézu signálních molekul, které by příznivě ovlivnily prognózu pacienta, zejména v průběhu zánětu.

3.2.1.1. Tukové emulze na bázi sojového oleje

Jak již bylo zmíněno, Intralipid[®], jakožto první klinicky schválená emulze, byl připravován ze sojového oleje. Ten je zdrojem triacylglycerolů obsahujících FA s dlouhým řetězcem, tzn. se 14 a více uhlíky (tzv. long-chain triglycerides, LCT). Obsah FA v sojovém oleji je následující: k. palmitová (11,3%), stearová (4,9%), olejová (29,7%), LA (46%) a ALA (8,1%). Hlavní složkou je tedy LA patřící do skupiny n-6 PUFA a poměr n-6/n-3 PUFA je přibližně 6:1. Tukové emulze založené na bázi sojového oleje splňují svou úlohu jakožto zdroj energie a EFA. Od 70. let 20. století se však začaly objevovat studie poukazující na to, že používání těchto emulzí může vést ke zhoršení některých funkcí imunitního systému, ačkoli výsledky byly nejednoznačné (Nordenstrom et al., 1979; Nugent, 1984; Ota et al., 1984).

Přesto se postupně začaly objevovat pokusy o přípravu tukových emulzí s nižším obsahem n-6 PUFA. Tyto snahy zahrnovaly nahrazení části n-6 PUFA triacylglyceroly se středně dlouhými FA (tzv. mid-chain triglycerides, MCT) či olivovým olejem, další volbou pro modifikaci emulzí byl rybí tuk bohatý na n-3 PUFA.

3.2.1.2. Tukové emulze obsahující MCT

Jak již bylo zmíněno, MCT jsou triacylglyceroly obsahující středně dlouhé nasycené FA (se 6-12 atomy uhlíku). MCT slouží v tukových emulzích pro PV především jako zdroj energie. Jsou totiž oproti triacylglycerolům obsahujícím PUFA více rozpustné ve vodě a snáze se hydrolyzují. K transportu středně dlouhých FA do mitochondrií není třeba karnitinu a jsou tak rychleji oxidovány. Jejich další výhodou je, že neobsahují dvojné vazby, a proto nepodléhají lipidové peroxidaci. Neukládají se do tukové tkáně a nehromadí se v játrech. Tukové emulze však nemohou obsahovat pouze MCT, jelikož by mohlo docházet ke vzniku metabolických komplikací jako je ketóza a acidóza (Ulrich et al., 1996). Kromě toho MCT nejsou zdrojem EFA.

MCT se získávají z kokosového oleje. Emulze, které MCT obsahují, existují buď ve formě fyzikální směsi MCT a LCT (obvykle v poměru 1:1) nebo ve formě strukturovaných lipidů. Strukturované lipidy jsou synteticky připravované sloučeniny, v nichž jsou na jednu molekulu glycerolu navázány jak středně dlouhé FA, tak dlouhé FA. Existují ve formě randomizované (FA jsou rozmístěny náhodně) a chemicky definované (je přesně daná pozice jednotlivých FA) (Calder et al., 2010).

Tukové emulze obsahující fyzikální směs MCT a LCT jsou pacienty dobře tolerovány a vykazují některé pozitivní klinické účinky oproti LCT emulzím pouze

ze sojového oleje. MCT/LCT emulze mají ve srovnání s LCT emulzemi lepší vliv na jaterní a plicní funkce (v přehledu v Calder et al., 2010). Bylo zjištěno, že MCT/LCT emulze narozdíl od LCT emulzí vykazují proteiny-šetřící efekt - zlepšují dusíkovou bilanci, která bývá narušena hlavně u pacientů, kteří prodělali operaci, a to jak u dospělých (Jiang et al., 1993), tak pediatrických pacientů (Lai and Chen, 2000). Tento efekt je připisován rychlé přeměně MCT na ketolátky snadno využitelné jako zdroj energie.

Strukturované lipidy jsou stejně jako fyzikální směsi MCT a LCT dobře snášeny. Jejich výhodou před fyzikální směsí je především pomalejší uvolňování středně dlouhých FA. Snižuje se tím riziko vzniku ketonémie (Rubin et al., 2000). Nicméně, Chambrier a spol. srovnávali vliv fyzikální směsi MCT/LCT a strukturovaných lipidů na pacienty, kteří prodělali operaci v břišní oblasti. Oba typy emulzí vykazovaly podobné účinky, neovlivňovaly funkci jater a působily příznivě na dusíkovou bilanci (Chambrier et al., 1999). Pokud jde o srovnání se sojovým olejem, krátkodobé podávání emulze se strukturovanými lipidy (3 dny) pacientům v sepsi nebo s mnohačetnými zraněními vykazovalo zlepšení dusíkové bilance (Lindgren et al., 2001). Ukázalo se, že strukturované lipidy jsou dobře tolerovány také pacienty na dlouhodobé domácí PV. Ačkoliv emulze byla podávána pouze 4 týdny, u žádného z pacientů se při podávání strukturovaných lipidů neobjevily jaterní dysfunkce (Rubin et al., 2000).

3.2.1.3. Tukové emulze obsahující olivový olej

Olivový olej je hlavní součástí tukové emulze ClinOleic[®]. Tato emulze obsahuje 80% olivového oleje a 20% sojového oleje. Olivový olej je bohatý především na kyselinu olejovou (18:1n-9) patřící mezi MUFA. Obsah jednotlivých skupin FA je dle údajů od výrobce přibližně následující: 15% SAT FA, 65% MUFA, 20% PUFA. ClinOleic[®] tedy obsahuje výrazně nižší množství PUFA než emulze založené pouze na sojovém oleji. MUFA podléhají lipidové peroxidaci v nižší míře než PUFA vzhledem k přítomnosti jen jedné dvojnásobné vazby v molekule. Olivový olej je kromě toho také bohatý na účinný antioxidant α -tokoferol.

Řada studií ukázala, že ClinOleic[®] je bezpečná a pacienty dobře snášená emulze, ať už při krátkodobém podávání (Webb et al., 2008) či při dlouhodobé domácí PV (Reimund et al., 2005). Ačkoli obsahuje ClinOleic[®] poměrně nízké množství PUFA, neobjevily se ani po třech měsících podávání této emulze příznaky deficiencie EFA (Vahedi et al., 2005). Po pěti dnech podávání ClinOleic[®] kriticky nemocným novorozencům nebyly pozorovány změny v množství ukazatelů oxidačního stresu (Webb et al., 2008). Göbel a

spol. srovnávali vliv emulzí Intralipid[®] (sojový olej) a ClinOleic[®] u předčasně narozených dětí (délka PN = 7 dní) a zjistili, že u skupiny dostávající emulzi založenou na olivovém oleji byl lepší antioxidační stav (tito jedinci vykazovali vyšší poměr α -tokoferol/celkové lipidy). Hodnoty malondialdehydu v moči, jakožto ukazatele oxidačního stresu, mezi srovnávanými skupinami nevykazovaly signifikantní rozdíly (Gobel et al., 2003). Podobně Reimund a spol. nezjistili žádné signifikantní změny v množství malondialdehydu, ovšem ani α -tokoferolu, po podání ClinOleicu[®] dospělým lidem na domácí PV ve srovnání s LCT ani LCT/MCT emulzí (Reimund et al., 2005).

Předpokládané zmírnění oxidačního stresu oproti emulzím bohatým na PUFA nebylo zatím jasně prokázáno. Zdá se ovšem, že ClinOleic[®] na rozdíl od emulzí ze sojového oleje neovlivňuje funkce imunitního systému (Moussa et al., 2000; Reimund et al., 2005).

3.2.1.4. Tukové emulze s obsahem rybího tuku

Rybí tuk je bohatým zdrojem n-3 PUFA, především EPA a DHA. Použití rybího tuku při přípravě tukových emulzí je výhodné díky tomu, že umožňuje snížit podávané množství n-6 PUFA a zároveň dodat do těla n-3 PUFA, kterým je přisuzována řada pozitivních vlivů na lidský organismus, včetně relativně protizánětlivého působení ve srovnání s n-6 PUFA.

Tuková emulze čistě na bázi rybího oleje se nazývá Omegaven[®]. Dle údajů od výrobce obsahuje 100 ml této emulze 1,3-2,8 g EPA a 1,5-3 g DHA. Kvůli poměrně vysokému množství n-3 PUFA smí být Omegaven[®] používán pouze v kombinaci s jinou tukovou emulzí tak, že tvoří 10-20% přijímaného tuku. Doba podávání Omegavenu[®] je omezena na 4 týdny.

Bylo ukázáno, že aplikace totální PV s přidavkem Omegavenu[®] (směs Intralipid[®] a Omegaven[®] v poměru 5:1) měla oproti samotnému Intralipid[®] lepší vliv na zdravotní stav pacientů po operaci v oblasti břišní dutiny (odstranění různých nádorů gastrointestinálního traktu). Ve skupině pacientů dostávajících Omegaven[®] byl nižší výskyt infekčních komplikací a syndromu systémové zánětlivé odpovědi organismu, kromě toho doba pobytu v nemocnici byla u této skupiny pacientů kratší než u skupiny kontrolní (Jiang et al., 2010). Bin a spol. v podobně navržené studii (pacienti prodělali resekci kolorektálního karcinomu a pooperačně u nich byla aplikována totální PV za použití stejných tukových emulzí jako v předchozím případě) zaznamenali kratší dobu pobytu v nemocnici u pacientů dostávajících Omegaven[®] (Bin et al., 2008).

Dále jsou v současné době dostupné dvě tukové emulze, které obsahují rybí tuk v kombinaci s rostlinnými oleji - Lipoplus[®] a SMOFLipid[®]. Lipoplus[®] je emulze obsahující 50% MCT, 40% sojového oleje a 10% rybího tuku. SMOFLipid[®] má následující složení: 30% MCT, 30% sojový olej, 25% olivový olej a 15% rybí tuk. Je tedy propojením všech výše zmiňovaných principů - snížení podílu n-6 PUFA, přidání MCT jako rychle dostupného zdroje energie, přidání MUFA neovlivňujících imunitní systém a nepodléhajících lipidové peroxidaci a dodání n-3 PUFA s benefičními účinky nejen při zánětu.

Obě zmíněné emulze byly při rozsáhlých studiích shledány bezpečnými pro klinické použití a ukázalo se, že pacienti je dobře snášejí. Zároveň byla u pacientů, kterým byly tyto emulze aplikovány pooperačně, pozorována signifikantně kratší doba pobytu v nemocnici než u kontrolních skupin s PV bohatou na n-6 PUFA (Schlotzer and Kanning, 2004; Wichmann et al., 2007; Mertes et al., 2006). Řada studií se zaměřila na imunomodulační účinky těchto dvou emulzí obsahujících rybí tuk a tedy obohacených o n-3 PUFA a ukázala jak pokles v produkci eikosanoidů odvozených od AA, tak pokles v produkci prozánětlivých cytokinů (viz kapitola 3.3.4. Ovlivnění zánětu pomocí farmakonutriční suplementace).

Při podávání emulzí SMOFLipid[®] i Lipoplus[®] dochází u pacientů ke zvýšení plasmatického α -tokoferolu (Grimm et al., 2006; Wichmann et al., 2007), který je jakožto antioxidant důležitou součástí zmíněných emulzí vzhledem k vysokému počtu dvojných vazeb u n-3 PUFA, které mohou snadno podléhat lipidové peroxidaci a být tak zdrojem tvorby nebezpečných volných radikálů a narušení antioxidační rovnováhy.

3.3. Zánět a farmakonutriční intervence jako možnost jeho ovlivnění

Schopnost organismu reagovat na různé typy poškození je klíčová pro jeho přežití. Během života je tělo vystaveno řadě mechanických poranění, napadení ze strany patogenních mikroorganismů, poškozením způsobených teplem či naopak chladem. Na všechny tyto podněty reaguje tělo spuštěním složitých mechanismů zahrnujících jak humorální, tak buněčnou odpověď, které slouží k nápravě poškození a navrácení postižené tkáně do původního stavu. Tato komplexní reakce organismu se nazývá zánět.

Zánět je přirozeným procesem, který můžeme zařadit mezi obranné mechanismy organismu. Na druhou stranu jde o potenciálně nebezpečný proces, který musí být

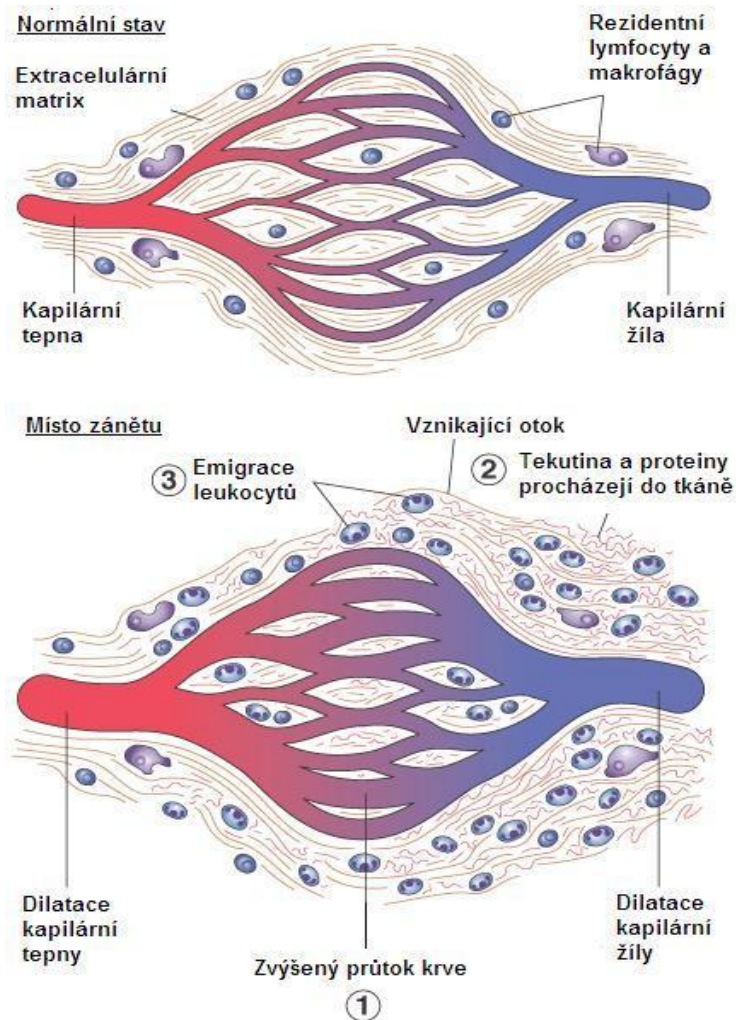
vzhledem ke své složitosti přísně regulován. Dojde-li ke ztrátě kontroly nad zánětlivým procesem, je-li zánětlivá odpověď příliš silná nebo naopak nedostatečná, může to mít pro tělo fatální následky v podobě poškození tkání a orgánů. Abnormální zánětlivá odpověď je spojena s poruchami jako jsou astma, ateroskleróza, revmatoidní artritida, zánětlivé onemocnění střev (Chandrasoma and Taylor, 1998; Serhan et al., 2010).

3.3.1. Průběh zánětu

Základními makroskopickými projevy zánětu jsou zčervenání (rubor), zteplání (calor), bolest (dolor), otok (tumor) a také porucha funkce postižené tkáně. Tyto projevy jsou dány fyziologickými změnami, ke kterým v poškozené tkáni a jejím okolí dochází. Je produkována řada zánětlivých mediátorů, aktivuje se imunitní systém a ke změnám dochází lokálně i ve vaskulárním systému. Nastává tzv. akutní fáze zánětlivé odpovědi, během níž je aktivován imunitní systém, jsou odstraňovány vlastní poškozené buňky a jsou eliminovány patogenní mikroorganismy. Následuje fáze rezoluce zánětu, jejímž účelem je celý proces ukončit (Serhan et al., 2010).

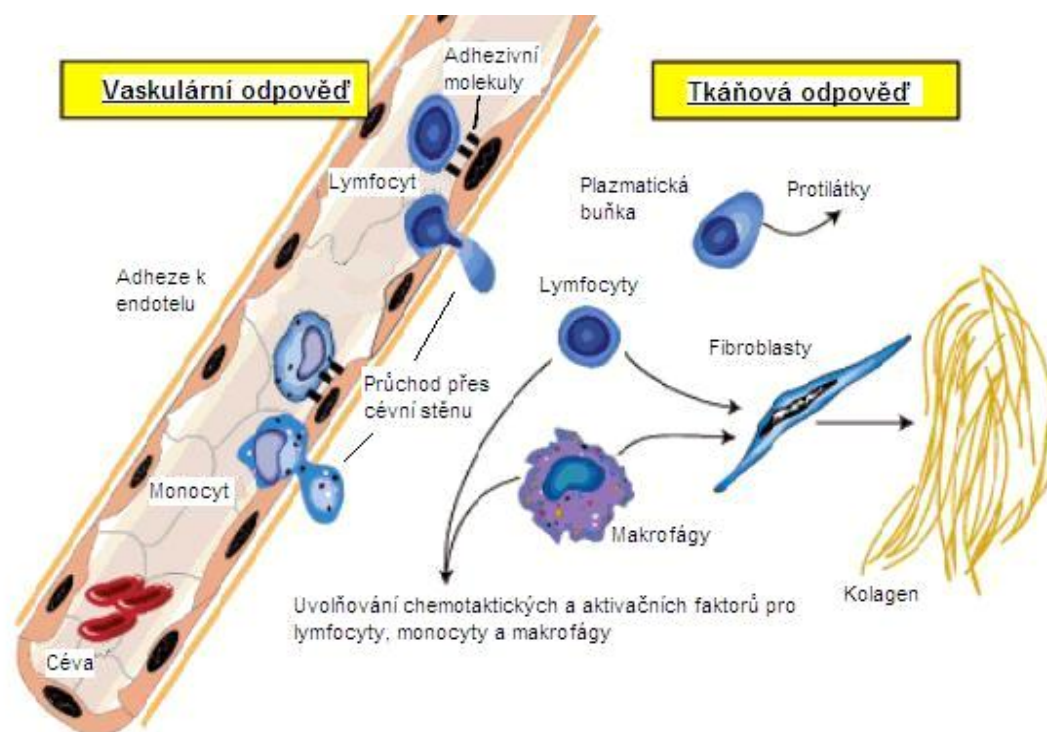
3.3.1.1. Akutní fáze zánětu

Akutní fáze zahrnuje procesy, k nimž dochází v prvních hodinách po poranění nebo výskytu infekce. Jako první zprostředkovávají odpověď na poškození tkáně makrofágy a žírné buňky, které se v tkáni trvale nacházejí. Tyto buňky reagují na fyzické poranění nebo přítomnost patogenních mikroorganismů uvolněním prozánětlivých mediátorů - cytokinů, chemokinů, eikosanoidů a histaminu. Mnoho změn následně nastává ve vaskulárním systému v blízkosti poškozeného místa. Na základě signálů z tohoto místa dochází k vazodilataci, čímž se zvětšuje objem protékající krve (proto dochází k zčervenání a zteplání). Dále se zvyšuje permeabilita cév vlivem reverzibilního otevření těsných spojů endoteliálních buněk. Tím je umožněn průchod tekutiny a proteinů z vaskulárního prostoru do tkáně, vzniká otok (viz Obr. 6).



Obr. 6: Srovnání vaskulárního systému za normálního stavu a při rozvoji zánětu. V místě zánětu dochází ke zvýšenému průtoku krve (1), který způsobuje zčervení a zteplání dané oblasti. Do tkáně prochází tekutina a proteiny a vzniká otok (2). Leukocyty migrují skrze stěny kapilár k místu poškození (3) (převzato z Kumar et al., 2005; upraveno).

Prostřednictvím signálních molekul produkovaných z poškozeného místa jsou aktivovány endoteliální buňky. Ty začínají exprimovat a vystavovat na svém povrchu adhezivní molekuly. Uvolňují také prozánětlivé mediátory, které působí chemotakticky na bílé krvinky. Leukocyty jsou těmito mediátory jednak naváděny do poškozené oblasti, jednak aktivovány a začínají produkovat receptory, kterými se spojí s nově vzniklými adhezivními molekulami na povrchu endoteliálních buněk. Leukocyty poté migrují skrze cévy do extravaskulárního prostoru (viz Obr. 7). Kromě toho je aktivován komplement a také krevní destičky (Kumar et al., 2005; Serhan et al., 2010).



Obr. 7: Děje, ke kterým dochází v zanícené tkáni a okolních cévách při zánětu. Vlivem zánětlivých mediátorů produkovaných ve tkáni se na endotelu začínají objevovat adhezivní molekuly, které umožní bílým krvinkám uchycení k endotelu. Díky zvýšené permeabilitě cév mohou bílé krvinky následně procházet skrze stěnu cév do tkáně. Lymfocyty a makrofágy v tkáni produkují další mediátory zajišťující správný průběh zánětu. Fibroblasty produkují kolagen, který nahrazuje poškozenou tkáň (převzato ze Serhan et al., 2010; upraveno).

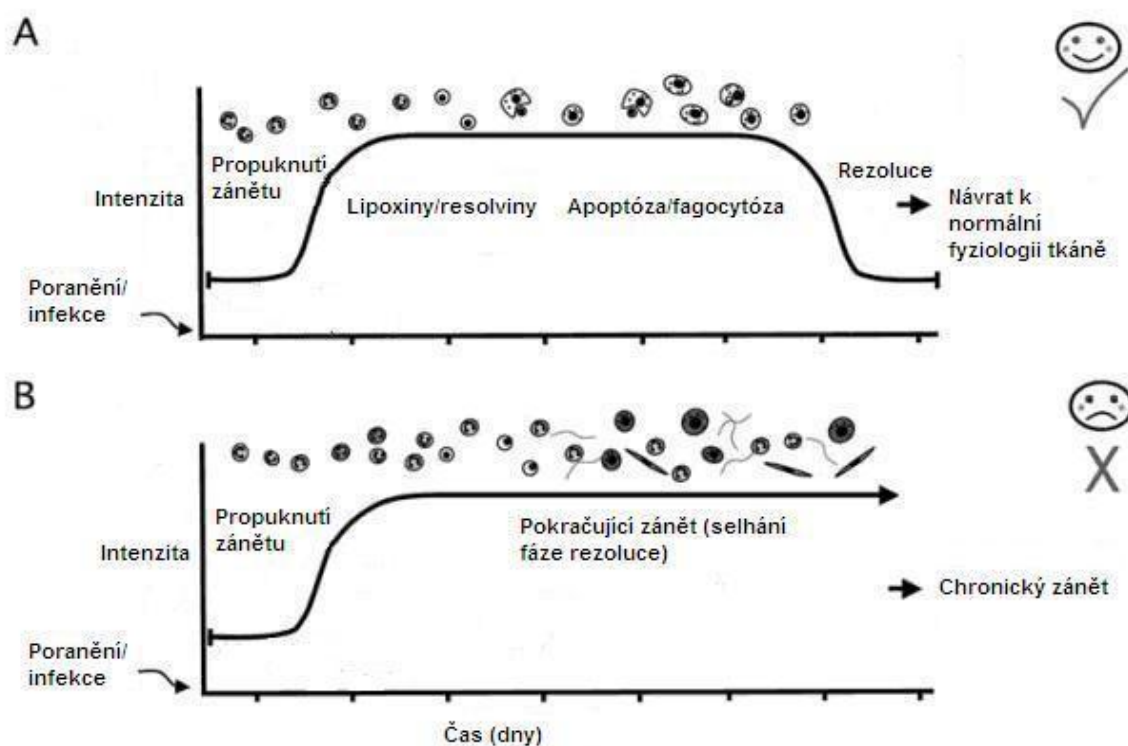
3.3.1.2. Ukončení (rezoluce) akutní fáze

Během akutní fáze zánětu je spuštěna řada mechanismů, jejichž účelem je eliminovat vzniklé poškození tkáně nebo infekci. Pokud by však akutní fáze nebyla včas ukončena, mohlo by dojít ke vzniku chronického zánětu. Nejdůležitějším krokem vedoucím k rezoluci zánětlivé odpovědi je odstranění stimulu, který zánět spustil, tedy například přítomnost patogenních bakterií. Pokud je tento stimulus eliminován, přestávají být produkovány prozánětlivé mediátory. Zánětlivé mediátory mají velmi krátkou životnost, takže jakmile se zastaví jejich produkce, jejich koncentrace rychle klesá. Zároveň jsou produkovány protizánětlivé mediátory a v důsledku toho se opět sníží vaskulární permeabilita a leukocyty přestanou migrovat do tkáně. Již aktivované leukocyty v postižené tkáni jsou odstraněny buď zpětným vstřebáním přes lymfatický systém, nebo prodělají programovanou buněčnou smrt. Zbytky buněk jsou fagocytovány makrofágy. Poškozená tkáň regeneruje a dostává se do stejného stavu jako před poraněním nebo

infekcí (Rossi and Sawatzky, 2008).

Výše popsaný výsledek zánětlivé reakce je ovšem typický spíše pro menší poranění nebo lehčí infekce, kdy nebyla postižená tkáň příliš poničena a je schopna regenerace. Při rozsáhlejších poškození nebo u tkání s omezenou nebo žádnou schopností regenerace (např. srdeční tkáň), dochází k nahrazení poškozené části tkáně pojivovou tkání (fibróza).

Nedojde-li k rezoluci akutní fáze, může vzniknout chronický zánět (viz Obr. 8). Důvodem může být neschopnost odstranit podnět vyvolávající zánětlivou reakci nebo porucha v přirozeném procesu rezoluce zánětu a obnovy poškozené tkáně (Kumar et al., 2005).



Obr. 8: Po akutní fázi zánětu obvykle následuje rezoluce (A), vlivem produkce protizánětlivých mediátorů nastává apoptóza leukocytů a jejich zbytky jsou fagocytovány makrofágy. Tkáň se vrací do původního stavu. V případě, že rezoluce zánětu selže, vzniká chronický zánět (B). Počet leukocytů neklesá, dochází k dalšímu poškození tkáně a nadměrné tvorbě pojivové tkáně v postiženém místě (převzato z Rossi and Sawatzky, 2008; upraveno).

3.3.2. Mediátory zánětlivé odpovědi

Zánětlivá odpověď má velice komplikovaný průběh a je řízena velkým množstvím signálních látek, jako jsou chemokiny, eikosanoidy, cytokiny a další mediátory. Tyto molekuly jsou produkovány především granulocyty, monocyty/makrofágy, žírnými

buňkami a krevními destičkami, ale na jejich produkci se podílejí také například endoteliální buňky a fibroblasty. Prozánětlivé mediátory musí být produkovány během celé akutní fáze, protože jejich poločas života je velmi krátký. Některé se rychle rozpadají, některé jsou enzymaticky odbourány nebo jiným způsobem inhibovány.

Jednotlivé mediátory mají velmi rozmanité účinky, některé působí na úzké spektrum buněk, jiné ovlivňují mnoho buněčných typů. Mohou vyvolávat produkci stejného typu mediátoru jako jsou samy, nebo mohou být signálem pro tvorbu jiného druhu mediátoru aktivujícího procesy akutní fáze. Těmito mechanismy dochází k amplifikaci původního signálu. Cílové buňky mohou ale produkovat i inhibiční molekuly působící proti původnímu signálu, což je důležité z hlediska regulace zánětlivé reakce. Pro správný průběh zánětu je třeba určitá vyváženost a samozřejmě vhodné načasování produkce prozánětlivých a protizánětlivých faktorů (Kumar et al., 2005).

3.3.2.1. Cytokiny

Cytokiny jsou malé signální molekuly proteinové povahy. Jsou produkovány řadou buněčných typů a jejich účinky jsou velmi široké. Cílová buňka musí mít na svém povrchu přítomný receptor pro daný cytokin. Reakcí na přijatý podnět od cytokinového receptoru je změna v genové expresi. Ta může vést mimo jiné k další tvorbě stejného cytokinu a tím k amplifikaci signálu, nebo k produkci cytokinu s opačným efektem a tím ke zpětnovazebné regulaci signálu.

Cytokiny jsou redundantní, řada z nich má identickou funkci. To je důležité z hlediska zachování správného průběhu zánětu (ale i dalších procesů, kterých se cytokiny účastní, např. buněčná proliferace), kdy porucha v signalizaci přes jeden cytokin nemá fatální následky a je nahrazena signalizací jiným cytokinem. Někdy může společné působení dvou cytokinů jejich účinky znásobit, jindy mohou působit proti sobě. To činí celou cytokinovou síť velice složitou (House and Descotes, 2007).

Cytokiny zahrnují stále se rozšiřující skupinu molekul zvaných interleukiny (IL) a další látky jako jsou tumor nekrotizující faktory (TNF) či interferony. Z praktického hlediska je výhodné dělení cytokinů na základě biologických účinků. Podle jejich působení při infekci a zánětu můžeme tedy cytokiny rozdělit na prozánětlivé a protizánětlivé.

Typicky prozánětlivé účinky mají např. IL-1, TNF- α nebo IL-6 účastníci se akutní fáze zánětu (Dinarello, 2010). IL-1 a TNF- α sdílejí řadu funkcí, spouští expresi dalších cytokinů, adhezivních molekul na endoteliálních buňkách nebo aktivují geny pro enzymy syntetizující další látky s funkcí při zánětlivé reakci, jako je krevní destičky aktivující

faktor nebo oxid dusnatý. Aktivují expresi fosfolipázy A₂ (PLA₂) a cyklooxygenázy-2 (COX-2). COX-2 poté produkuje velké množství prostaglandinu E₂ (PGE₂). IL-1 i TNF- α stimulují také produkci leukotrienů. Narozdíl od IL-1 je TNF- α schopen vyvolávat programovanou buněčnou smrt. TNF- α dále indukuje syntézu proteinů akutní fáze v játrech, podobně jako IL-6, jehož exprese je v některých buněčných typech stimulována právě prostřednictvím TNF- α . TNF- α je produkován především aktivovanými monocyty, T-lymfocyty, žírnými buňkami a fibroblasty (Dinarello, 2010; Strieter et al., 1993).

IL-6 je dalším prozánětlivým cytokinem působícím během akutní fáze zánětu. Je produkován například monocyty, T- a B-lymfocyty, fibroblasty. Mezi jeho hlavní účinky patří stimulace tvorby proteinů akutní fáze v játrech. Dále způsobuje přeměnu B lymfocytů na plazmatické buňky produkující protilátky a podílí se na aktivaci T lymfocytů. IL-6 zpětnovazebně inhibuje tvorbu TNF- α (Kishimoto, 1989; Feghali and Wright, 1997). IL-1, TNF- α a IL-6 jsou ve velké míře produkovány při gramnegativní sepsi, kdy je jejich tvorba vyvolána bakteriálním lipopolysacharidem (LPS). Tyto cytokiny jsou pak zodpovědné za systemické projevy sepse, jako je horečka a nízký krevní tlak (převzato z Feghali and Wright, 1997).

Protizánětlivé cytokiny svými účinky blokují nebo alespoň zpomalují procesy spouštěné prozánětlivými mediátory. Protizánětlivě mohou působit např. IL-4, IL-10, IL-13 a TGF- β 1 a to inhibicí produkce IL-1 a TNF- α , chemokinů a adhezivních molekul v endotelu (v souhrnu Dinarello, 2000).

Je třeba si ovšem uvědomit, že toto dělení není absolutní a že v různých situacích mohou mít cytokiny různé účinky.

3.3.2.2. Chemokiny

Chemokiny neboli "chemotaktické cytokiny" hrají nejdůležitější roli, jak již z názvu vyplývá, jako chemoatraktans pro leukocyty. Kromě toho se však podílejí na aktivaci leukocytů, ovlivňují jejich adhezi k endotelu i jejich průchod do tkáně.

Chemokiny jsou produkovány z postiženého místa v hojném množství a ve velkém počtu druhů. Podobně jako cytokiny jsou chemokiny redundantní. Aby mohl být určitý typ bílé krvinky aktivován produkovánými chemokiny, musí nejprve exprimovat a na svém povrchu mít příslušný receptor. Leukocyty s odpovídajícím receptorem na svém povrchu jsou tedy aktivovány chemokiny, které se z místa tvorby šíří do vaskulárního systému. Leukocyty pak migrují po směru zvyšující se koncentrace chemokinů a dostávají se do kontaktu s aktivovaným endotelem v blízkosti cílové tkáně. Působení chemokinů

upevňuje adhezi leukocytů k endotelu, což umožňuje jejich následný průchod do tkáně. Zde se leukocyty dále chemotakticky pohybují po gradientu chemokinů až dosáhnou jeho maxima, což je pro ně signálem pro ukončení migrace a zahájení vlastní funkce, jako je např. degranulace granulocytů (Serhan et al., 2010). Mezi nejznámější chemokiny patří IL-8 (Chandrasoma and Talyor, 1998).

3.3.2.3. Eikosanoidy

Eikosanoidy jsou důležitými lipidovými signálními molekulami. Ovlivňují například agregaci krevních destiček, kontrakci hladkého svalstva a účastní se také signalizace při zánětlivých reakcích. Hlavními prekurzory eikosanoidů jsou PUFA o délce 20 uhlíků, které jsou součástí membránových fosfolipidů. Nejvíce dostupným a tedy i nejčastějším prekurzorem eikosanoidů je AA (20:4n-6). Méně častými prekurzory eikosanoidů jsou pak kyselina dihomogamalinolenová (20:3n-6) a EPA (20:5n-3) (Ormerod et al., 1990).

Typicky je AA nejprve uvolněna z fosfolipidů pomocí PLA₂. Tento typ fosfolipázy rozeznává sn-2 pozici fosfolipidu a katalyzuje hydrolytické odštěpení FA nacházející se na tomto místě, což bývá nejčastěji právě AA. Existuje mnoho forem PLA₂ lišících se svým intracelulárním umístěním a biochemickými vlastnostmi. Po odštěpení z membránových fosfolipidů se může AA stát substrátem několika různých enzymů produkujících různé typy eikosanoidů. Je to především COX produkující prostanoidy a 5-lipoxygenáza (5-LOX) tvořící leukotrieny (LT). Další LOX a cytochrom P450 pak generují různé hydroxy- a epoxykyseliny (Brock and Peters-Golden, 2007).

COX má dvě izoformy: COX-1 a COX-2. Obě izoformy produkují z AA poměrně nestabilní meziprodukt prostaglandin H₂ (PGH₂), který je dále různými izomerázami přeměňován na prostaglandiny (PGD₂, PGE₂, PGF₂), prostacyklin (PGI₂) a tromboxan A₂ (TXA₂). Všechny tyto molekuly patří mezi biologicky aktivní prostanoidy. Například TXA₂ je produkován krevními destičkami a způsobuje jejich agregaci, proti agregaci krevních destiček působí PGI₂ tvořený endoteliálními buňkami. Jeho účinky jsou také vazodilatační. PGE₂ způsobuje horečku, podílí se na vzniku otoku v místě zánětu, ovlivňuje aktivitu B- a T-lymfocytů (v souhrnu v Harris et al., 2002; Curtis-Prior, 2004). 5-LOX produkuje z AA LT série-4. LTB₄ působí jako chemoatraktans pro neutrofilů, monocytů a lymfocytů a také je aktivuje. Další leukotrieny (LTC₄, LTD₄, LTE₄) způsobují průchod tekutiny z vaskulárního prostoru do tkáně a vznik otoku v daném místě (Brock and Peters-Golden, 2007).

Množství AA v buněčných membránách, a tedy i její dostupnost pro tvorbu eikosanoidů může být ovlivněna složením diety. Zvýšený příjem n-3 PUFA v dietě snižuje zastoupení AA v membránách, a tak snižuje produkci prozánětlivých eikosanoidů. EPA může nahradit AA na sn-2 pozici fosfolipidu a po odštěpení se může stát substrátem pro COX a 5-LOX. EPA je prekurzorem prostanoidů série-3 a leukotrienů série-5. Většinou se jedná o méně potentní mediátory - např. TXA₃ vyvolává nižší agregaci krevních destiček než TXA₂ (De Caterina and Basta, 2000), LTB₅ má slabší chemotaktické účinky na neutrofile než LTB₄ (Lee et al., 1984). COX má kromě toho větší afinitu k AA než k EPA, proto je přeměňována s menší účinností, čímž se snižuje množství produkovaných eikosanoidů (Laneuville et al., 1995).

3.3.2.4. Mediátory odvozené od DHA

V posledních letech se ukázalo, že nejenom AA a EPA jsou prekurzory pro potentní lipidové mediátory, které se účastní procesu zánětu. DHA je prekurzorem dokosanoidů, které zahrnují resolviny série-D, dokosatrieny a protektiny. Resolviny jsou důležité mediátory podílející se na rezoluci zánětu (odtud jejich název), mohou být odvozeny od EPA (série-E) i DHA (série-D). Dokosatrieny jsou tvořeny z DHA a je pro ně typická struktura konjugovaných trienů. Neuroprotektin D1 je dalším dokosanoidem, produkovaným hlavně v mozku, který má neuroprotektivní účinky. Resolviny, dokosatrieny i neuroprotektin D1 působí protizánětlivě, snižují schopnost neutrofilů pronikat do místa zánětu a snižují rozsah zánětlivé reakce (souhrnně v Serhan, 2005). Tyto mediátory se mohou podílet na benefičním působení n-3 PUFA při zánětu.

3.3.3. ***In vitro* model zánětu**

Pro studium reaktivity imunitních buněk na zánětlivý podnět se běžně využívají tzv. endotoxiny, nejčastěji LPS. LPS je součástí buněčných stěn gramnegativních bakterií. Skládá se z O-antigenu, což je polysacharidová část vystavená okolí bakterie, která je terčem protilátek. Na O-antigen navazuje oligosacharidové jádro (core). Celou strukturu ukotvuje do membrány lipid A, tvořený dvěma fosforylovanými molekulami glukosaminu, na které jsou navázány FA. Struktura lipidu A je poměrně konzervativní a právě tato část je zodpovědná za toxicitu LPS. Dojde-li k rozpadu bakterií a lipid A je uvolněn z membrány, váže se na receptory buněk imunitního systému a endotelu a vyvolává prudkou zánětlivou odpověď, která může vést až ke vzniku septického šoku (Raetz and Whitfield, 2002).

Obvykle se LPS využívá pro *in vitro* stimulaci kultur plné krve, mononukleárních

buněk, makrofágů apod.. V těchto kulturách lze pak sledovat produkci zánětlivých mediátorů, reaktivních forem kyslíku, transkripčních faktorů atd.

3.3.4. Ovlivnění zánětu pomocí farmakonutriční suplementace

Řada studií ukázala, že použití různých tukových emulzí v PV může mít vliv na zánětlivou reakci. Ukázalo se, že již při krátkodobém podávání emulzí Lipoplus[®] a SMOFLipid[®] obsahujících n-3 PUFA (po dobu 5 či 6 dnů, pooperačně) se výrazně zvyšuje zastoupení EPA a DHA jako volných FA v plazmě, v menší míře bylo zvýšené zastoupení těchto FA pozorováno také v plasmatických (Wichmann et al., 2007) a leukocytárních fosfolipidech (Grimm et al., 2006). Díky zvýšenému podílu EPA v membránách se tato FA stává snadněji dostupnou pro enzymy COX a 5-LOX, což někteří autoři potvrdili. Koller a spol. zaznamenali zvýšený poměr LTB₅/LTB₄ po podání emulze Lipoplus[®] ve srovnání s emulzí bohatou na n-6 PUFA. Zvýšení tohoto poměru bylo dáno zvýšením produkce LTB₅ a současným snížením produkce LTB₄ (Koller et al., 2003). Obdobný vliv na produkci LTB₅ a LTB₄ pozorovali Grimm a spol. u tukové emulze SMOFLipid[®] (Grimm et al., 2006). Obdobně zaznamenali Mayer a spol. zvýšený poměr TXA₃/TXA₂ po 10 dnech podávání emulze Omegaven[®] (vysoký obsah n-3 PUFA) pacientům v sepsi oproti pacientům s tukovou emulzí bohatou na n-6 PUFA (Mayer et al., 2003c).

Nedochází pouze ke změnám v produkci eikosanoidů. U pacientů po operaci střeva, kterým byla podávána emulze Lipoplus[®], byla zaznamenána snížená koncentrace plasmatického TNF- α oproti kontrolám (MCT/sojový olej). Podobný trend byl také u IL-6, ale rozdíly nebyly signifikantní (Wachtler et al., 1997). Schade a spol. podávali pooperačním pacientům emulzi SMOFLipid[®] a ve srovnání s emulzí ClinOleic[®] (vysoký obsah MUFA) pozorovali po pěti dnech snížení plasmatických koncentrací IL-6 a TNF- α (Schade et al., 2008). Barbosa a spol. studovali pacienty s diagnózou SIRS a sepse, kterým podávali emulzi Lipoplus[®] (5 dnů). U těchto pacientů zaznamenali ve srovnání s kontrolní skupinou (MCT/sojový olej) nižší koncentraci plasmatického IL-6 a vyšší koncentraci plasmatického IL-10. Žádné změny nebyly pozorovány u plasmatického TNF- α a IL-1 β (Barbosa et al., 2010). Mayer a spol. pozorovali naopak výrazné změny v produkci cytokinů u LPS stimulovaných monocytů pocházejících od pacientů v sepsi po podání parenterální emulze Omegaven[®] (5 dnů). Zjistili sníženou produkci TNF- α , IL-1 β , IL-6 a IL-8 (Mayer et al., 2003a). Podobné výsledky se podařilo získat stejné výzkumné skupině i u zdravých jedinců po krátkodobém podání (48 h) emulze Omegaven[®] (Mayer et al.,

2003b). Rozdíly pozorované v jednotlivých studiích mohou vycházet z rozdílného množství n-3 PUFA v použitých emulzích a rozdílného stavu pacientů. Můžeme ale shrnout, že při PV obohacené o n-3 PUFA klesá produkce prozánětlivých cytokinů a naopak stoupá produkce protizánětlivých cytokinů. Větší vyváženost v produkci pro- a protizánětlivých cytokinů může mít pozitivní vliv na prognózu pacientů s rizikem výskytu infekčních komplikací.

4. Metodika

4.1. Pacienti zařazení do studie

V této fázi se podařilo zařadit do studie osm pacientů IV. interní kliniky 1. LF UK s potřebou dlouhodobé parenterální výživy. Při výběru pacientů byla zohledněna tato vstupní kritéria:

- věk více než 18 let
- očekávaná délka PV déle než 6 měsíců
- potřeba PV více než 3 dny v týdnu
- stabilní nutriční režim před vstupem do studie nejméně 2 měsíce
- bez infekčních komplikací nejméně 1 měsíc
- stabilizovaný klinický stav pacienta

Kvůli možnému ovlivnění výsledků nebyli do studie zařazeni pacienti podle vylučovacích kritérií:

- aktivní nádorové onemocnění nebo jeho léčba (méně než 3 měsíce od ukončení chemoterapie nebo ozařování)
- diagnostikovaný imunodeficit
- pokročilá orgánová dysfunkce v rámci chronického onemocnění

Podmínkou zařazení do studie bylo seznámení s průběhem studie a podepsání informovaného souhlasu.

Jako kontrola byli vybráni zdraví jedinci odpovídající věkem a pohlavím pacientům, bez PV a s běžnou západní dietou bez suplementace n-3 PUFA

Tabulka 1: Označení, věk, pohlaví a diagnóza pacientů a k nim přiřazené kontroly

Pacienti				Kontroly		
Označení	Věk	Pohlaví	Diagnóza	Označení	Věk	Pohlaví
P1	78	M	NNO	K1	78	M
P2	29	M	SBSy	K2	33	M
P3	64	M	MAL	K3	60	M
P4	86	M	SBSy	K4	82	M
P5	56	F	PE	K5	56	F
P6	63	F	SBSy	K6	63	F
P7	32	F	SBSy	K7	26	F
P8	54	F	SBSy	K8	52	F

P1-P8 - jednotliví pacienti, K1-K8 - zdraví jedinci věkem a pohlavím odpovídající pacientům, M – muž, F – žena, SBSy – syndrom krátkého střeva, NNO – nenádorová obstrukce, MAL – malabsorpce, PE – postradiační enteritis

4.2. Intervence v rámci studie

U každého pacienta byly postupně aplikovány dva druhy tukové emulze v dávce 0,8 g lipidů/kg tělesné hmotnosti/den:

- SMOFLipid[®] 20% (Fresenius Kabi, Bad Homburg, Německo)
- směs SMOFLipid[®] 20% + Omegaven[®] 10% (Fresenius Kabi, Bad Homburg, Německo)

Emulze SMOFLipid[®] 20% je v klinické praxi běžně používaná emulze, směsná emulze byla tvořena 200 ml SMOFLipid[®] 20% a 100 ml Omegaven[®] 10%, tzn. že Omegaven[®] tvořil 20% přijatého tuku. 100 ml emulze SMOFLipid[®] obsahuje asi 0,5 g EPA a 0,5 g DHA. Omegaven[®] je vyráběn z rybího tuku, 100 ml obsahuje přibližně 2 g EPA a 2 g DHA. Doba používání emulze Omegaven[®] je vzhledem k vysoké dávce n-3 PUFA omezena na 4 týdny. Emulze SMOFLipid[®] byla podávána po dobu 6 týdnů, směsná emulze SMOFLipid[®] + Omegaven[®] byla podávána po dobu 4 týdnů. Pacienti přijímali asi 3,5 g n-3 PUFA/den s emulzí SMOFLipid[®] a 7 g n-3 PUFA se směsnou emulzí.

Složení ostatních živin se v průběhu studie neměnilo. Vždy se jednalo o izokalorickou PV včetně mikronutrientů. PV byla podávána ve formě "all in one" vaků individuálně připravovaných v nemocniční lékárně VFN.

4.3. Odběr krevních vzorků

Pacientům bylo odebráno 24 ml krve, rozdělených do 7 vacutainerů (vakuově uzavřených zkumavek pro odběr krve). Tři vacutainery byly odeslány do Centrální laboratoře Ústavu klinické biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF UK a VFN na stanovení běžných laboratorních parametrů. Čtyři vacutainery (dva s přidavkem antikoagulantu K₂EDTA pro přípravu plazmy a erytrocytů, dva bez antikoagulantů pro přípravu séra) byly předány pracovníkům IV. interní kliniky 1. LF UK k provedení preanalytického zpracování krevních vzorků. V těchto vzorcích byly potom provedeny analýzy parametrů, které jsou uvedeny v této práci.

4.4. *In vitro* kultivace plné krve se stimulací lipopolysacharidem

In vitro kultivace plné krve a její stimulace LPS byla prováděna modifikovanou metodou dle De Groote a spol. (De Groote et al., 1992).

Kultivační médium: bylo smícháno 86,3 ml RPMI 1640 média (Gibco, Breda, Nizozemsko), 2,7 ml NaHCO₃ a 1 ml penicilinu + streptomycinu (obě Sigma-Aldrich, Mnichov, Německo) (směs připravena ze 400 ml destilované vody, 1254 mg penicilinu a 2 g streptomycinu).

Kultivace: byl smíchán 1 ml plné krve, 8,1 ml kultivačního média, 0,9 ml autologního séra (sérum stejného jedince, jehož krev byla použita). Takto zředěná krev se rozpíetovala po 2 ml do čtyř jamek na 24-jamkové polystyrenové destičce (Corning, New York, USA). Do dvou jamek pak bylo přidáno 100 µl LPS (Sigma-Aldrich, Mnichov, Německo) o koncentraci 10 µg/ml. Zbylé dvě jamky sloužily jako kontrola bez stimulace. Vzorky se kultivovaly po dobu 24 hodin při teplotě 37 °C a atmosféře s 5% CO₂. Poté se vzorky centrifugovaly (5 min, 300 x g) a supernatant byl rozpíetován po 0,5 ml do zkumavek typu Eppendorf a zamražen při -80 °C pro další použití.

4.5. Parametry hodnocené u pacientů ve studii

Parametry stanovené v centrální laboratoři Ústavu klinické biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF UK a VFN:

- Krevní obraz
- Minerály
- Lipidogram
- Jaterní testy

- Hladiny antioxidantů
- Koncentrace hormonů štítné žlázy
- Koncentrace konjugovaných dienu
- Quickův test koagulace krve

Parametry stanovené v rámci diplomové práce:

- Zastoupení FA ve fosfolipidech plazmy a erytrocytů
- Koncentrace IL-6 a TNF- α v séru a v supernatantu krevní kultury po stimulaci LPS
- Aktivita antioxidantních enzymů v erytrocytech

4.6. Stanovení mastných kyselin v lipidech plasmy a erytrocytů

4.6.1. Extrakce lipidů z plazmy

Lipidy plazmy jsme extrahovali pomocí modifikované metody dle Folche a spol. (Folch et al., 1957). Vzorčky plazmy uchovávané v kryozkumavkách při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ jsme za mírného chlazení rozmrazili. Celý další postup jsme prováděli za neustálého chlazení na ledové tříšti. Plazmu jsme rozpipetovali po 0,5 ml do dvou 25 ml zkumavek a do každé jsme přidali 9,5 ml směsi chloroform:methanol v poměru 2:1. Dobře jsme promíchali na vortexu a nechali 5 min stát. Došlo k vysrážení proteinů, které jsme odstranili přefiltrováním směsi přes filtrační papír. K filtrátu jsme přidali 1,8 ml 0,9% roztoku NaCl. Směs jsme dobře promíchali na vortexu a centrifugovali 5 min, při 2000 ot./min (centrifuga MPW-360, Mechanika Precyzyjna, Polsko) a teplotě $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po oddělení fází jsme Pasteurovou pipetou odstranili horní vodnou fázi. Ke spodní fázi jsme přidali 12 ml směsi chloroform:methanol:voda v poměrech 3:48:47. Vzniklou směs jsme promíchali skleněnou tyčinkou a centrifugovali opět 5 min, 2000 ot./min při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (centrifuga MPW-360, Mechanika Precyzyjna, Polsko). Po oddělení fází jsme pomocí skleněné stříkačky Hamilton[®] odebrali spodní fázi a převedli ji do kónické odpařovací zkumavky o objemu 10 ml. Odpařovali jsme pod proudem plynného dusíku na bločku vyhřátém na $45\text{ }^{\circ}\text{C}$. Odparek jsme pak uchovávali při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.6.2. Extrakce lipidů z erytrocytů

Provedli jsme extrakci lipidů z erytrocytů pomocí modifikované metody dle Rose a Oklandera (Rose and Oklander, 1965). Vzorčky erytrocytů uchovávané

v kryozkumavkách při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ jsme za mírného chlazení rozmrazili. Celou extrakci jsme prováděli za chlazení na ledové tříšti. Pipetovali jsme 0,5 ml vzorku erytrocytů do 15 ml zkumavky a přidali 0,5 ml destilované vody. Promíchali jsme na vortexu a nechali půl hodiny stát. Přidali jsme 5,5 ml izopropanolu a opět jsme promíchali na vortexu. Tuto směs jsme nechali hodinu stát a občas jsme ji promíchali na vortexu. Přidali jsme 3,5 ml chloroformu, promíchali jsme na vortexu a opět jsme nechali stát po dobu 1 hodiny s občasným zamícháním. Dále jsme centrifugovali 20 min, 2500 ot./min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (centrifuga MPW-360, Mechanika Precyzyjna, Polsko). Supernatant jsme filtrovali přes skelnou vatu do čisté zkumavky a přidali jsme 0,9% roztok NaCl v množství odpovídajícím 20% objemu supernatantu. Promíchali jsme na vortexu a centrifugovali 10 min, 2500 ot./min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (centrifuga MPW-360, Mechanika Precyzyjna, Polsko). Po oddělení fází jsme skleněnou stříkačkou Hamilton[®] odebrali spodní fázi a převedli jsme ji do 10 ml kónické odpařovací zkumavky. Zkumavku jsme umístili na bloček vyhřátý na $45\text{ }^{\circ}\text{C}$, směs jsme odpařili pod proudem plynného N_2 . Odparek jsme uchovali při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.6.3. Rozdělení lipidových druhů chromatografií na tenké vrstvě (TLC)

Pro přípravu desek na TLC jsme smíchali 22,5 g silikagelu H60, 2,5 g magnézium trisilikátu (Merk, Německo) a 63 ml destilované vody, směs jsme protřepali a nanесли v tenké vrstvě na skleněné desky. Ty jsme aktivovali při $110\text{ }^{\circ}\text{C}$, 75 min a poté nechali vychladnout v exsikátoru.

Do chromatografické kyvety jsme 30 minut před vložením desek nalili směs rozpouštědel hexan:ether:kyselina octová v poměru 85:15:1. Předem odpařené lipidové extrakty z plazmy a erytrocytů jsme ředili 200 μl směsi chloroform:methanol v poměru 2:1. Pomocí stříkačky typu Hamilton[®] jsme nanесли rozpuštěné extrakty na desky pro TLC (do 3 cm stop). Desky jsme vložili do kyvety a nechali vyvíjet cca 45 min (čelo 1 cm pod horním okrajem). Rozpouštědla jsme nechali vyvanout 1 hodinu. Skvrny požadovaných lipidových druhů jsme detekovali pod UV lampou a následně jsme silikagel vyškrábali a kvantitativně převedli do zkumavek. V této fázi lze práci přerušit max na 24 hodin, do zkumavek je třeba nafoukat plynný dusík a pak se uchovávají v $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.6.4. Příprava methylesterů mastných kyselin

Ke kvantitativně převedenému silikagelu ve zkumavkách jsme přidali 1 ml methanolátu sodného. Zkumavky jsme nechali stát po dobu 1 hodiny ve tmě. Poté jsme přidali 2 ml 0,5 N kyseliny octové a 1,5 ml hexanu. Promíchali jsme na vortexu

a centrifugovali 10 min, 1000 ot./min (centrifuga MPW-360, Mechanika Precyzyjna, Polsko). Po oddělení fází a sedimentaci silikagelu jsme odebrali skleněnou Pasteurovou pipetou horní fázi a přefiltrovali ji přes přesušený síran sodný. Ke spodní fázi jsme přidali 1,2 ml hexanu, promíchali na vortexu a znova centrifugovali 10 min, 1000 ot./min. Horní fázi jsme znova odebrali a přefiltrovali přes přesušený síran sodný. Vzorky jsme odpařovali pod proudem plynného dusíku na bločku vyhřátém na 45 °C a poté jsme je uchovávali při -20 °C. Methylestery FA byly následně analyzovány pomocí plynové chromatografie na 4. interní klinice 1. LF UK (Tvrzická et al., 2002). Při analýze bylo stanoveno zastoupení celkem 29 FA. Ve výsledcích jsou prezentovány pouze FA, jejichž zastoupení dosahovalo nejméně 0,1 molárních procent (mol%).

4.7. Stanovení koncentrace cytokinů v séru a v supernatantu stimulované krevní kultury

4.7.1. Stanovení koncentrace IL-6

Stanovovali jsme koncentraci IL-6 v séru a v supernatantu získaném po *in vitro* kultivaci celé krve bez a po stimulaci LPS. Stanovení bylo provedeno metodou ELISA pomocí kitu pro stanovení IL-6 (Immunotech, Marseille, Francie). Postupovali jsme dle návodu od výrobce: Smíchali jsme 50 ml promývacího roztoku (20x) s 950 ml destilované vody. Rozpustili jsme lyofilizovaný kalibrátor, konjugát, substrát a ředící roztok 2 v množství destilované vody uvedeném na lahvičkách. Z roztoku kalibrátoru a ředícího roztoku 1 pro supernatant kultury nebo ředícího roztoku 2 pro sérum jsme si připravili ředící řadu pro měření kalibrační křivky. Vzorky supernatantu kultury po stimulaci LPS jsme ředili s ředícím roztokem 1:9. Na 96-jamkovou destičku jsme postupně pipetovali (v duplikátu) 100 µl kalibrátoru nebo vzorku na jamku, poté jsme přidali 100 µl konjugátu. Destičku jsme inkubovali 2 hodiny při laboratorní teplotě za neustálého třepání na třepačce. Poté jsme jamky promyli promývacím roztokem (3x). Přidali jsme 200 µl substrátu a inkubovali 30 minut ve tmě, při laboratorní teplotě za neustálého třepání na třepačce. Nakonec jsme přidali 50 µl stop-roztoku. Změřili jsme absorbanci při 405 nm (spektrofotometr Multiskan Spectrum Microplate Spectrophotometer, Thermo Electron Corporation, Finsko). V programu Microsoft Excel jsme vytvořili graf kalibrační křivky a rovnicí této křivky. Pomocí této rovnice jsme dopočítali hodnoty koncentrací IL-6 ve vzorcích.

4.7.2. Stanovení koncentrace TNF- α

Stanovovali jsme koncentraci TNF- α v séru a v supernatantu získaném po *in vitro* kultivaci celé krve bez a po stimulaci LPS. Stanovení bylo provedeno metodou ELISA pomocí kitu pro stanovení TNF- α (Immunotech, Marseille, Francie). Postupovali jsme dle návodu od výrobce: Smíchali jsme 50 ml promývacího roztoku (20x) s 950 ml destilované vody. Připravili jsme si kalibrátor, konjugát, substrát a ředící roztoky podle návodu na lahvičkách. Z roztoku kalibrátoru a ředícího roztoku 1 pro supernatant kultury, resp. ředícího roztoku 2 pro sérum jsme si připravili ředící řadu pro měření kalibrační křivky. Vzorky supernatantu kultury po stimulaci LPS jsme ředili s ředícím roztokem 1:1. Na 96-jamkovou destičku jsme napipetovali 100 μ l konjugátu na jamku a poté postupně 100 μ l kalibrátoru nebo vzorku (v duplikátu) na jamku. Destičku jsme inkubovali 2 hodiny při laboratorní teplotě za neustálého třepání na třepačce. Poté jsme jamky promyli promývacím roztokem (3x). Přidali jsme 200 μ l substrátu a inkubovali 45 minut ve tmě, při laboratorní teplotě za neustálého třepání na třepačce. Nakonec jsme přidali 50 μ l stop-roztoku. Změřili jsme absorbanci při 405 nm (spektrofotometr Multiskan Spectrum Microplate Spectrophotometer, Thermo Electron Corporation, Finsko). V programu Microsoft Excel jsme vytvořili graf kalibrační křivky a rovnici této křivky. Pomocí této rovnice jsme dopočítali hodnoty koncentrací TNF- α ve vzorcích.

4.8. Stanovení aktivity antioxidantních enzymů

4.8.1. CuZn-superoxid dismutáza

Ke 350 μ l vzorku erytrocytů jsme přidali 1000 μ l deionizované destilované vody. Tím došlo k lyzi buněk. 1000 μ l hemolyzátu jsme smíchali s 800 μ l vychlazené směsi ethanol:chloroform (5:3) a promíchali 20 s na vortexu. Po 1,5 min jsme opět 20 s míchali a po další 1,5 min znova. Směs jsme centrifugovali 15 min při 12 000 ot./min (centrifuga MiniSpin[®] plus, Eppendorf, Německo). 50 μ l supernatantu jsme zředili se 450 μ l fosfátového pufru. Aktivitu SOD jsme stanovovali modifikovanou metodou podle Štípka a spol. (Štípek et al., 1995). Do kyvet jsme napipetovali 700 μ l 50mM fosfátového pufru, pH=7,2, 50 μ l xantinoxidázy, 100 μ l nitrotetrazoliové modři (NBT) a 50 μ l zředěného supernatantu. Inkubovali jsme 10 minut při teplotě 25 °C. Reakci jsme zahájili přidáním 100 μ l 1mM xantinu. Měřili jsme rychlost tvorby NBT-formazanu pomocí spektrofotometru (Helios Gamma, Thermo Electron Corporation, Velká Británie) při 540

nm. Aktivitu SOD jsme vypočítali podle kalibrační křivky a vyjádřili jako U/g hemoglobinu ($U = \mu\text{mol}/\text{min}$).

4.8.2. Kataláza

Ke 200 μl vzorku erytrocytů jsme přidali 1000 μl deionizované destilované vody. Došlo k lyzi buněk. 10 μl hemolyzátu jsme následně ředili s 4990 μl fosfátového pufru. Aktivitu CAT jsme měřili upravenou metodou dle Aebiho (Aebi, 1984). Do kyvet jsme napipetovali 876 μl 50 mM fosfátového pufru o $\text{pH}=7,2$ a 25 μl zředěného vzorku. 10 minut jsme inkubovali při 30 °C a následně jsme zahájili reakci přidáním 99 μl 10 nM H_2O_2 . Rychlost degradace H_2O_2 jsme měřili pomocí spektrofotometru (Helios Gamma, Thermo Electron Corporation, Velká Británie) při 240 nm. Aktivita byla vypočítána za použití molárního extinkčního koeficientu H_2O_2 ($43,6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) a vyjádřena v kU/g hemoglobinu ($U = \mu\text{mol}/\text{min}$).

4.8.3. Glutathionreduktáza

K 50 μl vzorku erytrocytů jsme přidali 200 μl deionizované destilované vody. Tím došlo k lyzi buněk. 20 μl hemolyzátu jsme přidali do 580 μl fosfátového pufru. Aktivitu GR jsme měřili podle metody Goldberga a Spoonera (Goldberg and Spooner, 1983). Do kyvet jsme napipetovali 700 μl 0,127 M fosfátového pufru obsahujícího 0,633 mM $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{pH}=7,2$ a přidali jsme 100 μl 22 mM oxidovaného glutathionu a 100 μl zředěného vzorku. Reakci jsme zahájili po 10 minutách inkubace při 37 °C přidáním 100 μl 1,7mM NADPH. Rychlost degradace NADPH jsme měřili pomocí spektrofotometru (Helios Gamma, Thermo Electron Corporation, Velká Británie) při 340 nm. Aktivitu GR jsme vypočítali za použití molárního extinkčního koeficientu NADPH ($6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) a vyjádřili jako U/g hemoglobinu ($U = \mu\text{mol}/\text{min}$).

4.9. Statistické zpracování dat

Získaná data byla zpracována pomocí programu Microsoft Excel a Statistica verze 10 od firmy StatSoft. Výsledky jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr \pm směrodatná odchylka (SD). Hodnoty u odběrů pacientů po užívání tukové emulze SMOFLipid[®] a směsi SMOFLipid[®]+Omegaven[®] jsme porovnávali párovým t-testem, srovnání se zdravými kontrolami pak nepárovým t-testem. Jako signifikantní byly označeny rozdíly na hladině významnosti nižší než 0,05 ($p < 0,05$).

5. Výsledky

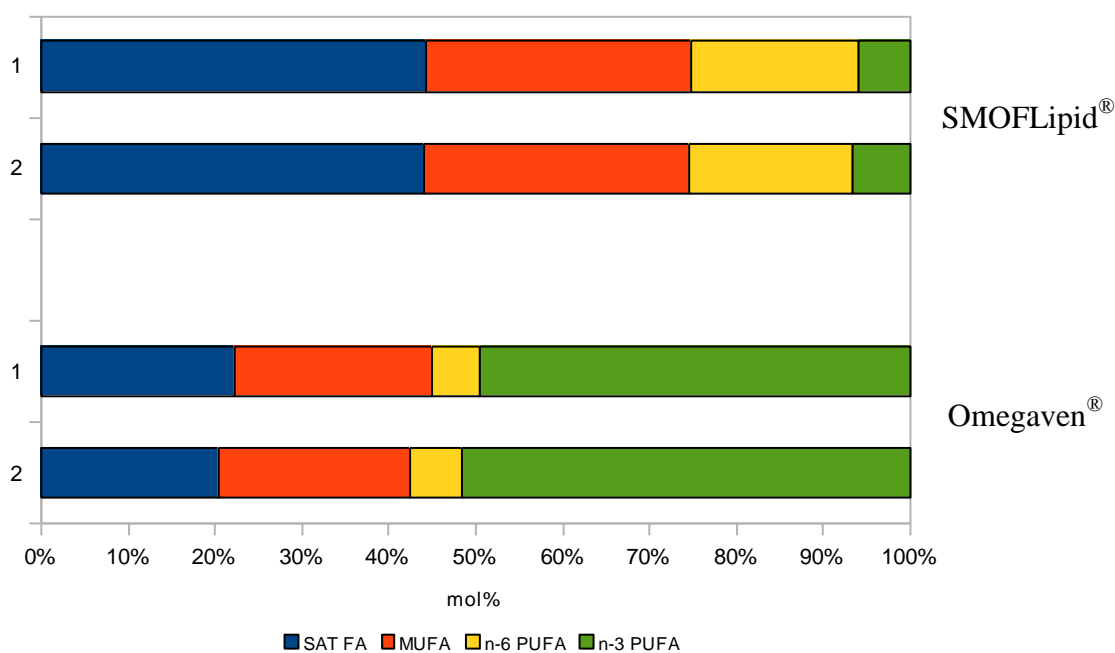
5.1. Srovnání zastoupení tříd FA v tukových emulzích použitých ve studii

U tukových emulzí SMOFLipid[®] a Omegaven[®] jsme stanovili zastoupení jednotlivých FA a získali jsme tak zároveň sumy zastoupení jednotlivých tříd FA. Stanovení jsme provedli pro dvě různé výrobní šarže obou tukových emulzí.

SMOFLipid[®] obsahuje 45% SAT FA, 30% MUFA, 20% n-6 PUFA a 5% n-3 PUFA. U Omegavenu[®] zaujímají SAT FA a MUFA shodně 22,5%, n-6 PUFA 5% a zbylých 50% tvoří n-3 PUFA.

Při srovnání dvou různých výrobních šarží SMOFLipidu[®] a Omegavenu[®] nebyly v zastoupení FA zaznamenány rozdíly, které by byly pro účel této studie významné (viz Graf 1).

Graf 1: Srovnání zastoupení tříd FA ve dvou různých šaržích tukových emulzí SMOFLipid[®] a Omegaven[®]



SAT FA - satureované mastné kyseliny, MUFA - mononenasycené mastné kyseliny, n-6 PUFA - n-6 polynenasycené mastné kyseliny, n-3 PUFA - n-3 polynenasycené mastné kyseliny
čísla 1 a 2 jsou označeny dvě odlišné výrobní šarže emulzí SMOFLipid[®] a Omegaven[®]

5.2. Vliv tukové emulze SMOFLipid[®] na zastoupení tříd FA v lipidech plazmy a fosfolipidech erytrocytů

V přípravné fázi studie jsme stanovili zastoupení FA ve čtyřech typech lipidů - triacylglycerolech, cholesterolesterech, totálních fosfolipidech plazmy a fosfolipidech erytrocytů u pacientů s tukovou emulzí SMOFLipid[®] (n=6) a srovnali jsme ho s pohlavím a věkem odpovídajícími zdravými kontrolami (K) s typickou západní dietou bohatou na n-6 PUFA.

Ve všech lipidových třídách výživa s tukovou emulzí SMOFLipid[®] způsobila u pacientů především zvýšení n-3 PUFA (20:5n-3, 22:5n-3, 22:6n-3) někdy provázené i zvýšením některých SAT FA a MUFA, toto zvýšení bylo v případě triacylglycerolů kompenzováno snížením 18:1n-9 a u cholesterolesterů snížením 18:2n-6 (Tabulka 2). Ve fosfolipidech plazmy a erytrocytů bylo zvýšení jednotlivých FA kompenzováno snížením podílu 18:2n-6 a 20:4n-6 (Tabulka 3). SMOFLipid[®] proto výrazně snížil poměr n-6/n-3 PUFA, resp. 20:4n-6/20:5n-3 u všech analyzovaných lipidových tříd. Po SMOFLipidu[®] jsme také ve všech lipidech kromě triacylglycerolů pozorovali zvýšený poměr SAT FA+MUFA/PUFA. Graficky jsme vyjádřili zastoupení jednotlivých tříd FA ve všech sledovaných typech lipidů v Grafech 2a-d. Zjistili jsme, že po emulzi SMOFLipid[®] se ve všech typech lipidů objevuje obdobný trend navýšení třídy n-3 PUFA provázený snížením n-6 PUFA ve srovnání s kontrolami.

V další fázi studie jsme se proto rozhodli analyzovat pouze fosfolipidy plazmy a erytrocytů.

Tabulka 2: Vliv tukové emulze SMOFLipid® na zastoupení FA v triacylglycerolech a cholesterolesterech plazmy

FA	Triacylglyceroly		Cholesterolestery	
	K	SMOFLipid	K	SMOFLipid
16:0	25,89 ± 1,19	25,13 ± 1,13	10,78 ± 0,33	13,45 ± 0,74 †
16:1n-7	3,53 ± 0,36	4,95 ± 0,68	2,86 ± 0,41	5,48 ± 0,98 †
18:0	2,54 ± 0,14	3,56 ± 0,45	0,56 ± 0,04	0,67 ± 0,13
18:1n-9	41,33 ± 1,45	35,62 ± 1,01	18,50 ± 0,85	23,86 ± 1,88 †
18:2n-6	17,10 ± 1,47	15,02 ± 2,05	55,35 ± 1,65	37,17 ± 4,09 †
18:3n-3	1,07 ± 0,16	0,79 ± 0,11	0,53 ± 0,04	0,51 ± 0,06
20:4n-6	1,25 ± 0,17	2,06 ± 0,14 †	6,85 ± 0,60	6,96 ± 0,63
20:5n-3	0,16 ± 0,03	1,86 ± 0,35 †	0,66 ± 0,10	4,31 ± 0,48 †
22:5n-3	0,31 ± 0,05	1,02 ± 0,11 †	0,03 ± 0,01	0,13 ± 0,02 †
22:6n-3	0,32 ± 0,03	2,67 ± 0,53 †	0,27 ± 0,02	1,50 ± 0,14 †
n-6/n-3 PUFA	10,66 ± 0,66	3,06 ± 0,54 †	45,11 ± 6,05	7,49 ± 1,41 †
20:4n-6/20:5n-3	9,23 ± 1,59	1,25 ± 0,17 †	11,03 ± 1,21	1,73 ± 0,25 †
SAT FA+MUFA/PUFA	3,79 ± 0,33	3,18 ± 0,45	0,53 ± 0,02	0,93 ± 0,13 †

K - zdravá kontrola (n=6)

SMOFLipid - pacienti s tukovou emulzí SMOFLipid® (n=6)

SAT FA - satureované mastné kyseliny, MUFA - mononenasyčené mastné kyseliny, PUFA - polynenasycené mastné kyseliny

Hodnoty jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr ± směrodatná odchylka (SD).

† - p<0,05 - statisticky významný rozdíl pacienti vs. kontrola

Statisticky jsme hodnotili 10 nejvýznamnějších FA se zastoupením vyšším než 0,1 mol%. Sumy FA byly spočítány ze všech analyzovaných FA (celkem 29).

Tabulka 3: Vliv tukové emulze SMOFLipid[®] na zastoupení FA ve fosfolipidech plazmy a erytrocytů

N = 6 FA	Fosfolipidy plazmy		Fosfolipidy erytrocytů	
	K	SMOFLipid	K	SMOFLipid
16:0	29,12 ± 1,15	31,66 ± 0,79	22,03 ± 0,83	24,89 ± 0,69 †
18:0	14,14 ± 0,81	12,89 ± 0,61	16,44 ± 0,37	15,17 ± 0,51
18:1n-9	10,12 ± 0,60	11,33 ± 0,87	14,87 ± 0,58	16,98 ± 0,71 †
18:2n-6	24,24 ± 1,14	14,41 ± 1,59 †	13,25 ± 0,79	6,96 ± 0,63 †
18:3n-3	0,20 ± 0,01	0,15 ± 0,02	0,17 ± 0,03	0,11 ± 0,01 †
20:3n-6	3,21 ± 0,28	2,75 ± 0,38	1,72 ± 0,17	1,51 ± 0,12
20:4n-6	11,53 ± 0,86	8,92 ± 0,72 †	17,80 ± 0,44	12,95 ± 0,53 †
20:5n-3	0,70 ± 0,13	3,88 ± 0,13 †	0,57 ± 0,06	3,08 ± 0,30 †
22:5n-3	0,79 ± 0,09	1,97 ± 0,25 †	2,51 ± 0,19	4,15 ± 0,12 †
22:6n-3	2,33 ± 0,08	7,29 ± 0,61 †	3,91 ± 0,23	9,02 ± 0,40 †
n-6/n-3	10,08 ± 0,65	2,12 ± 0,30 †	5,23 ± 0,26	1,44 ± 0,11 †
20:4n-6/20:5n-3	18,85 ± 2,55	2,54 ± 0,40 †	33,37 ± 4,02	4,47 ± 0,57 †
SAT FA+MUFA/PUFA	1,27 ± 0,04	1,49 ± 0,07 †	1,25 ± 0,04	1,51 ± 0,06 †

K - zdravá kontrola (n=6)

SMOFLipid - pacienti s tukovou emulzí SMOFLipid[®] (n=6)

SAT FA - satureované mastné kyseliny, MUFA - mononenasycené mastné kyseliny, PUFA - polynenasycené mastné kyseliny

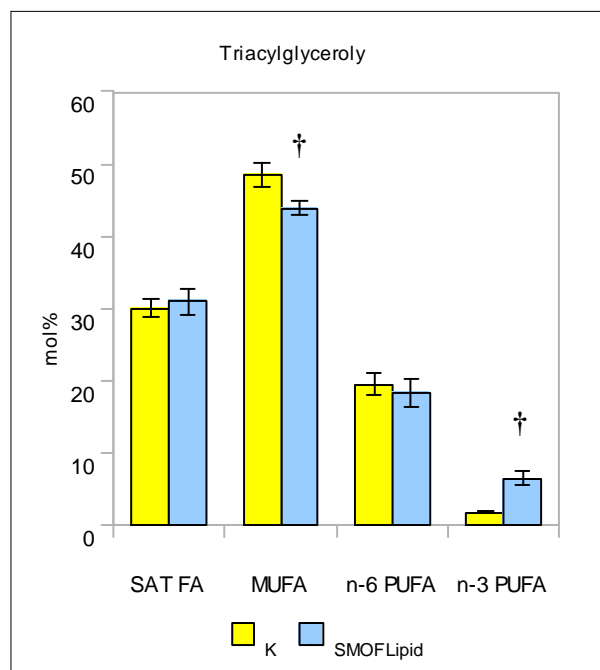
Hodnoty jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr ± směrodatná odchylka (SD).

† - p<0,05 - statisticky významný rozdíl pacienti vs. kontrola

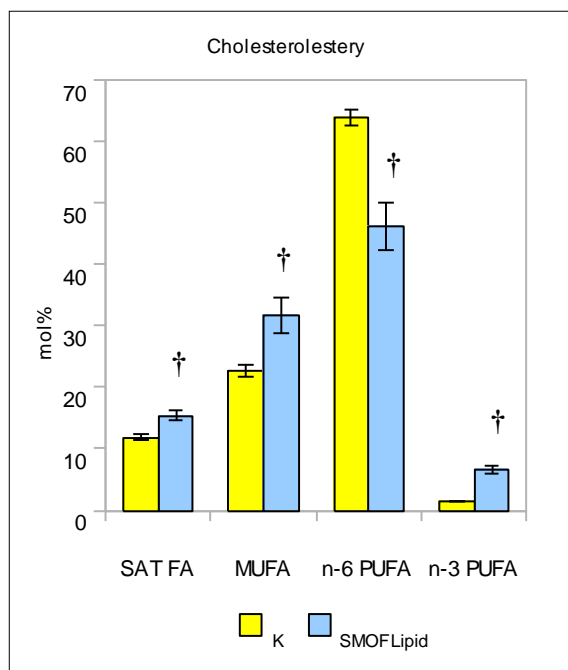
Statisticky jsme hodnotili 10 nejvýznamnějších FA se zastoupením vyšším než 0,1 mol%. Sumy FA byly spočítány ze všech analyzovaných FA (celkem 29).

Grafy 2a-d: Vliv tukové emulze SMOFLipid® na zastoupení tříd FA v lipidech plazmy a erytrocytů

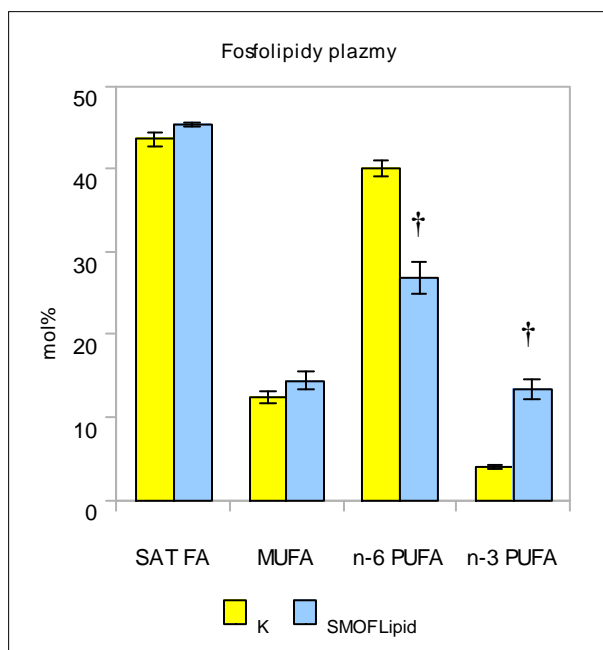
a)



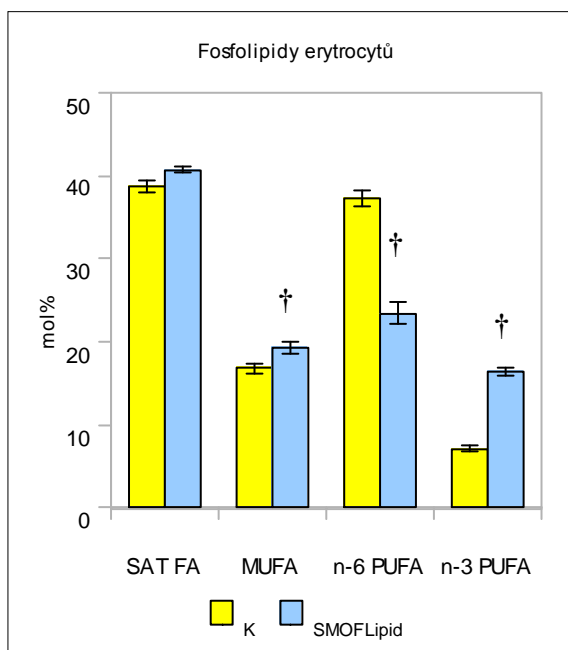
b)



c)



d)



K - zdravá kontrola (n=6)

SMOFLipid - pacienti s tukovou emulzí SMOFLipid® (n=6)

SAT FA - satureované mastné kyseliny, MUFA - mononenasycené mastné kyseliny, n-6 PUFA - n-6 polynenasycené mastné kyseliny, n-3 PUFA - n-3 polynenasycené mastné kyseliny

Chybové úsečky vyznačují směrodatnou odchylku (SD).

† - p<0,05 - statisticky významný rozdíl pacienti vs. kontrola

5.3. Srovnání běžných laboratorních parametrů u pacientů s emulzí SMOFLipid[®] a SMOFLipid[®]+Omegaven[®]

Tabulka 4 ukazuje hodnoty krevního obrazu a Tabulka 5 hodnoty dalších běžných laboratorních parametrů, které byly u pacientů hodnoceny. Většina parametrů se nelišila po výživě s emulzí SMOFLipid[®]+Omegaven[®] od výživy se SMOFLipid[®]. Zaznamenali jsme pouze zvýšení podílu bazofilů, snížení koncentrace vápníku a nižší aktivitu alkalické fosfatázy po výživě se směsnou emulzí. Všechny hodnoty však spadaly do referenčních mezí.

Tabulka 4: Krevní obraz u pacientů

	Jednotka	Referenční meze	SMOFLipid	Omegaven
Leukocyty	10 ⁹ /l	4,0-10,7	6,54 ± 2,95	6,37 ± 2,77
Erytrocyty	10 ¹² /l	3,54 - 5,18	4,33 ± 0,55	4,33 ± 0,55
Trombocyty	10 ⁹ /l	131-364	238,25 ± 64,01	227,87 ± 64,54
Střední objem erytrocytů	fl	82,3-100,6	91,28 ± 7,55	91,12 ± 7,83
Střední objem trombocytů	fl	7,1-10,4	8,51 ± 1,26	8,25 ± 1,20
Hemoglobin	g/l	116-163	131,62 ± 11,31	129,87 ± 15,44
Hematokrit	l	0,33-0,47	0,39 ± 0,03	0,39 ± 0,04
Neutrofilý	% leukocytů	50-75	57,40 ± 12,74	57,88 ± 13,96
Lymfocyty	% leukocytů	25-40	29,52 ± 11,29	30,78 ± 13,20
Monocyty	% leukocytů	3-8	8,15 ± 0,97	6,77 ± 1,72
Eozinofily	% leukocytů	1-3	4,57 ± 3,33	4,01 ± 3,00
Bazofily	% leukocytů	0-1	0,35 ± 0,20	0,53 ± 0,29 *

SMOFLipid - pacienti s tukovou emulzí SMOFLipid[®] (n=8)

Omegaven - pacienti se směsnou tukovou emulzí SMOFLipid[®]+Omegaven[®] (n=8)

Tabulka 5: Další laboratorní parametry hodnocené u pacientů

	Jednotka	Referenční meze	SMOFLipid	Omegaven
Na	mmol/l	137-146	140,75 ± 1,28	139,00 ± 3,02
K	mmol/l	3,8-5,0	4,48 ± 0,59	4,35 ± 0,49
Cl	mmol/l	97-108	105,87 ± 3,49	104,87 ± 2,64
Ca	mmol/l	2,0-2,75	2,23 ± 0,05	2,16 ± 0,08 *
P	mmol/l	0,65-1,61	1,25 ± 0,16	1,15 ± 0,17
Mg	mmol/l	0,7-1,0	0,83 ± 0,10	0,80 ± 0,07
Fe	μmol/l	6,6-28,0	13,12 ± 5,93	13,74 ± 5,07
Kreatinin	μmol/l	44,0-110,0	8700 ± 30,28	85,37 ± 26,60
Kyselina močová	μmol/l	220-420	246,00 ± 70,79	266,25 ± 81,03
Albumin	g/l	35,0-53,0	40,60 ± 10,44	42,97 ± 5,29
Celková bílkovina	g/l	65,0-85,0	72,13 ± 8,39	72,82 ± 8,53
Transferin	g/l	2,0-3,6	3,44 ± 1,15	3,57 ± 1,16
Prealbumin	g/l	0,2-0,4	0,24 ± 0,04	0,25 ± 0,06
Kyselina listová	μg/l	3,1-17,5	14,55 ± 7,66	16,53 ± 10,34
Ferritin	μg/l	22-322	46,66 ± 13,11	46,50 ± 19,76
Aktivní B12	pmol/l	19-119	91,37 ± 24,17	99,50 ± 37,08
C-reaktivní protein	mg/l	0,0-9,0	4,41 ± 3,91	7,27 ± 11,87
Bilirubin	μmol/l	2,0-17,0	13,51 ± 12,86	17,48 ± 16,79
Alaninaminotransferáza	μkat/l	0,10-0,78	0,52 ± 0,37	0,72 ± 0,53
Aspartátaminotransferáza	μkat/l	0,10-0,72	0,48 ± 0,18	0,54 ± 0,21
Gamaglutamyltransferáza	μkat/l	0,14-0,68	0,40 ± 0,15	0,55 ± 0,47
Alkalická fosfatáza	μkat/l	0,66-2,2	1,76 ± 0,35	1,59 ± 0,33 *
Cholinesteráza	μkat/l	87-190	122,37 ± 41,85	125,12 ± 32,50
Pankreatická amyláza	μkat/l	0,22-0,88	0,57 ± 0,23	0,58 ± 0,25
Celkový cholesterol	mmol/l	2,90-5,20	4,26 ± 1,26	4,47 ± 1,22
Triacylglyceroly	mmol/l	0,41-1,70	1,06 ± 0,32	1,19 ± 0,52
HDL-cholesterol	mmol/l	1,2-2,7	1,29 ± 0,29	1,27 ± 0,31
LDL-cholesterol	mmol/l	1,2-3,0	2,49 ± 1,11	2,66 ± 1,18
Apolipoprotein A1	g/l	1,1-1,9	1,37 ± 0,22	1,27 ± 0,31
Apolipoprotein B	g/l	0,5-1,0	0,90 ± 0,36	0,86 ± 0,35
Lipoprotein(a)	g/l	<0,3	0,23 ± 0,23	0,23 ± 0,19
Homocystein	μmol/l	4,0-14,6	13,08 ± 3,74	14,35 ± 5,34
Quickův test	INR	0,8-1,25	0,91 ± 0,09	0,92 ± 0,07

SMOFLipid - pacienti s tukovou emulzí SMOFLipid® (n=8)

Omegaven - pacienti se směsnou tukovou emulzí SMOFLipid®+Omegaven® (n=8)

HDL - high density lipoproteins, lipoproteiny o vysoké hustotě; LDL - low density lipoproteins, lipoproteiny o nízké hustotě; μkat/l - mikrokatal/l, INR - mezinárodní normalizovaný poměr, standardizovaná jednotka pro Quickův test

5.4. Srovnání zastoupení mastných kyselin ve fosfolipidech plazmy a erytrocytů u pacientů s tukovou emulzí SMOFLipid[®] a SMOFLipid[®]+Omegaven[®]

Provedli jsme analýzu FA ve fosfolipidech plazmy a erytrocytů u pacientů, kterým byla po dobu 6 týdnů aplikována tuková emulze SMOFLipid[®] a následně po dobu 4 týdnů směsná emulze SMOFLipid[®]+Omegaven[®]. Pro srovnání jsou uvedeny hodnoty zastoupení FA u zdravých kontrol odpovídajících pacientům věkem a pohlavím.

Tabulka 6 ukazuje zastoupení FA ve fosfolipidech plazmy. Pokud jde o srovnání pacientů s oběma tukovými emulzemi obohacenými n-3 PUFA (SMOFLipid[®] a SMOFLipid[®]+Omegaven[®]) se zdravými kontrolami, po obou emulzích jsme u pacientů zaznamenali výrazné zvýšení podílu n-3 PUFA (20:5n-3 a 22:6n-3) provázené snížením n-6 PUFA (18:2n-6, 20:2n-6, 20:4n-6 a 22:4n-6). Zvýšení n-3 PUFA u pacientů je provázeno zvýšením SAT FA. Srovnání FA po podávání emulze SMOFLipid[®]+Omegaven[®] se samotným SMOFLipid[®] ukázalo další navýšení podílu n-3 PUFA (22:6n-3) a snížení n-6 PUFA (18:2n-6, 20:4n-6). Zastoupení hlavních tříd FA, tj. SAT FA, MUFA, n-6 PUFA a n-3 PUFA je graficky znázorněno v grafu 6.

Tabulka 7 ukazuje, že změny ve složení FA ve fosfolipidech erytrocytů vyvolané podáváním emulzí SMOFLipid[®] a SMOFLipid[®]+Omegaven[®] do značné míry kopírovaly výsledky pozorované u plazmatických fosfolipidů. Důležitý rozdíl byl pouze v tom, že ve fosfolipidech erytrocytů nedošlo k dalšímu zvýšení celkových n-3 PUFA po SMOFLipid[®]+Omegaven[®] (zvýšila se pouze 20:5n-3 kompenzovaná 20:2n-6, 20:3n-6, 20:4n-6, 22:4n-6), zatímco v plazmatických fosfolipidech za pozorované zvýšení n-3 PUFA zodpovídala 22:6n-3 kompenzovaná snížením 18:2n-6. Rozdíly v podílu jednotlivých tříd FA (SAT FA, MUFA, n-6 PUFA a n-3 PUFA) znázorňuje Graf 7.

Tabulka 8 ukazuje rozdíly v některých poměrech FA ve fosfolipidech plazmy a erytrocytů u pacientů po podání tukových emulzí SMOFLipid[®] a SMOFLipid[®]+Omegaven[®] a u zdravých kontrol.

Tabulka 6: Vliv emulzí SMOFLipid[®] a SMOFLipid[®]+Omegaven[®] na zastoupení FA ve fosfolipidech plazmy

FA	K	SMOFLipid	Omegaven
	mol%		
14:0	0,25 ± 0,08	0,25 ± 0,05	0,27 ± 0,06
16:0	30,42 ± 2,33	31,71 ± 1,32	32,55 ± 1,80
16:1n-9	0,09 ± 0,01	0,14 ± 0,03 †	0,15 ± 0,03 †
16:1n-7	0,60 ± 0,13	0,55 ± 0,19	0,56 ± 0,18
18:0	12,73 ± 1,70	12,96 ± 1,48	13,53 ± 1,48
18:1n-9	10,43 ± 0,49	11,57 ± 1,34	11,17 ± 1,45
18:1n-7	1,57 ± 0,18	1,61 ± 0,28	1,58 ± 0,21
18:2n-6	23,61 ± 2,10	17,78 ± 1,65 †	15,86 ± 2,16 †*
18:3n-3	0,19 ± 0,05	0,17 ± 0,03	0,16 ± 0,06
20:1n-9	0,12 ± 0,02	0,11 ± 0,01	0,11 ± 0,02
20:2n-6	0,41 ± 0,07	0,24 ± 0,04 †	0,21 ± 0,03 †
20:3n-6	3,01 ± 0,53	2,47 ± 0,51	2,07 ± 0,60
20:4n-6	10,91 ± 2,52	8,11 ± 1,19 †	6,91 ± 0,98 †*
20:5n-3	0,83 ± 0,40	3,15 ± 0,76 †	4,64 ± 1,02 †
22:4n-6	0,29 ± 0,04	0,18 ± 0,01 †	0,16 ± 0,02 †
22:5n-6	0,19 ± 0,04	0,15 ± 0,02	0,17 ± 0,07
22:5n-3	0,92 ± 0,26	1,44 ± 0,36	1,58 ± 0,32
22:6n-3	3,22 ± 1,41	6,55 ± 1,01 †	7,45 ± 0,80 †*
SAT FA	43,46 ± 1,74	45,52 ± 1,46 †	46,99 ± 1,46 †
MUFA	12,83 ± 0,58	14,02 ± 1,58	13,61 ± 1,59
n-6 PUFA	38,51 ± 2,54	29,04 ± 2,04 †	25,47 ± 2,98 †*
n-3 PUFA	5,18 ± 1,89	11,40 ± 1,93 †	13,91 ± 1,76 †*

K - zdravá kontrola (n=8)

SMOFLipid - pacienti s tukovou emulzí SMOFLipid[®] (n=8)

Omegaven - pacienti se směsnou tukovou emulzí SMOFLipid[®]+Omegaven[®] (n=8)

SAT FA - suma saturevaných mastných kyselin, MUFA - suma mononenasycených mastných kyselin,

n-6 PUFA - suma n-6 polynenasycených kyselin, n-3 PUFA - suma n-3 polynenasycených kyselin

Hodnoty jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr ± směrodatná odchylka (SD).

* - p<0,05; statisticky významný rozdíl pacienti SMOFLipid[®]+Omegaven[®] vs. pacienti SMOFLipid[®]

† - p<0,05; statisticky významný rozdíl pacienti vs. kontrola

Statisticky jsme hodnotili 18 FA se zastoupením vyšším než 0,1 mol%. Sumy FA byly spočítány ze všech analyzovaných FA (celkem 29).

Tabulka 7: Vliv emulzí SMOFLipid[®] a SMOFLipid[®]+Omegaven[®] na zastoupení FA ve fosfolipidech erytrocytů

FA	K	SMOFLipid	Omegaven
	mol%		
14:0	0,21 ± 0,04	0,18 ± 0,03	0,25 ± 0,09
16:0	22,76 ± 1,46	23,99 ± 2,32	26,12 ± 2,21
16:1n-7	0,35 ± 0,10	0,34 ± 0,13	0,39 ± 0,15
18:0	16,22 ± 0,73	15,73 ± 1,12	15,53 ± 1,06
18:1n-9	15,01 ± 0,59	16,45 ± 1,11 †	16,53 ± 0,98 †
18:1n-7	1,36 ± 0,14	1,39 ± 0,20	1,37 ± 0,22
18:2n-6	12,06 ± 0,68	9,10 ± 1,33 †	8,70 ± 1,18 †
18:3n-3	0,16 ± 0,03	0,12 ± 0,03 †	0,12 ± 0,03 †
20:1n-9	0,23 ± 0,03	0,20 ± 0,04	0,17 ± 0,02 *
20:2n-6	0,29 ± 0,05	0,24 ± 0,05	0,18 ± 0,02 *
20:3n-6	1,66 ± 0,44	1,62 ± 0,13	1,37 ± 0,23 *
20:4n-6	17,38 ± 1,72	12,97 ± 1,44 †	11,04 ± 1,47 †*
20:5n-3	0,72 ± 0,47	2,58 ± 0,56 †	3,34 ± 0,47 †*
22:4n-6	3,21 ± 0,89	1,60 ± 0,31 †	1,34 ± 0,13 †*
22:5n-6	0,48 ± 0,10	0,25 ± 0,03 †	0,24 ± 0,02 †
22:5n-3	2,74 ± 0,42	4,04 ± 0,55 †	3,93 ± 0,42 †
22:6n-3	4,87 ± 1,67	8,35 ± 0,99 †	8,46 ± 1,02 †
SAT FA	39,26 ± 1,57	40,47 ± 1,49	42,54 ± 1,97 †
MUFA	17,03 ± 0,67	18,50 ± 1,15 †	18,59 ± 1,04 †
n-6 PUFA	35,18 ± 2,54	25,84 ± 2,80 †	22,94 ± 1,94 †*
n-3 PUFA	8,51 ± 2,38	15,17 ± 1,63 †	15,91 ± 1,31 †

K - zdravá kontrola (n=8)

SMOFLipid - pacienti s tukovou emulzí SMOFLipid[®] (n=8)

Omegaven - pacienti s tukovou emulzí SMOFLipid[®]+Omegaven[®] (n=8)

SAT FA - suma saturevaných mastných kyselin, MUFA - suma mononenasycených mastných kyselin,

n-6 PUFA - suma n-6 polynenasycených mastných kyselin, n-3 PUFA - suma n-3 polynenasycených mastných kyselin

Hodnoty jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr ± směrodatná odchylka (SD).

* - p<0,05; statisticky významný rozdíl pacienti SMOFLipid[®]+Omegaven[®] vs. pacienti SMOFLipid[®]

† - p<0,05; statisticky významný rozdíl pacienti vs. kontrola

Statisticky jsme hodnotili 17 FA se zastoupením vyšším než 0,1 mol%. Sumy FA byly spočítány ze všech analyzovaných FA (celkem 29).

Tabulka 8: Vliv emulzí SMOFLipid[®] a SMOFLipid[®]+Omegaven[®] na některé poměry FA ve fosfolipidech plazmy a erytrocytů

Poměr	K	SMOFLipid	Omegaven
Fosfolipidy plazmy			
n-6/n-3 PUFA	8,22 ± 2,55	2,61 ± 0,48 †	1,87 ± 0,41 †*
18:2n-6/20:4n-6	2,27 ± 0,56	2,22 ± 0,34	2,31 ± 0,32
20:4n-6/20:5n-3	15,76 ± 7,10	3,70 ± 1,66 †	1,83 ± 0,48 †*
22:6n-3/20:5n-3	4,45 ± 2,04	2,14 ± 0,47 †	1,65 ± 0,32 †*
SAT FA+MUFA/PUFA	1,29 ± 0,06	1,47 ± 0,13 †	1,54 ± 0,14 †*
Fosfolipidy erytrocytů			
n-6/n-3 PUFA	4,41 ± 1,15	1,73 ± 0,33 †	1,45 ± 0,21 †*
18:2n-6/20:4n-6	0,70 ± 0,08	0,70 ± 0,09	0,80 ± 0,16 *
20:4n-6/20:5n-3	30,98 ± 13,66	6,98 ± 1,45 †	3,96 ± 0,78 †*
22:6n-3/20:5n-3	7,88 ± 3,05	3,36 ± 0,80 †	2,57 ± 0,80 †*
SAT FA+MUFA/PUFA	1,29 ± 0,06	1,44 ± 0,13 †	1,57 ± 0,10 †

K - zdravá kontrola (n=8)

SMOFLipid - pacienti s tukovou emulzí SMOFLipid[®] (n=8)

Omegaven - pacienti s tukovou emulzí SMOFLipid[®]+Omegaven[®] (n=8)

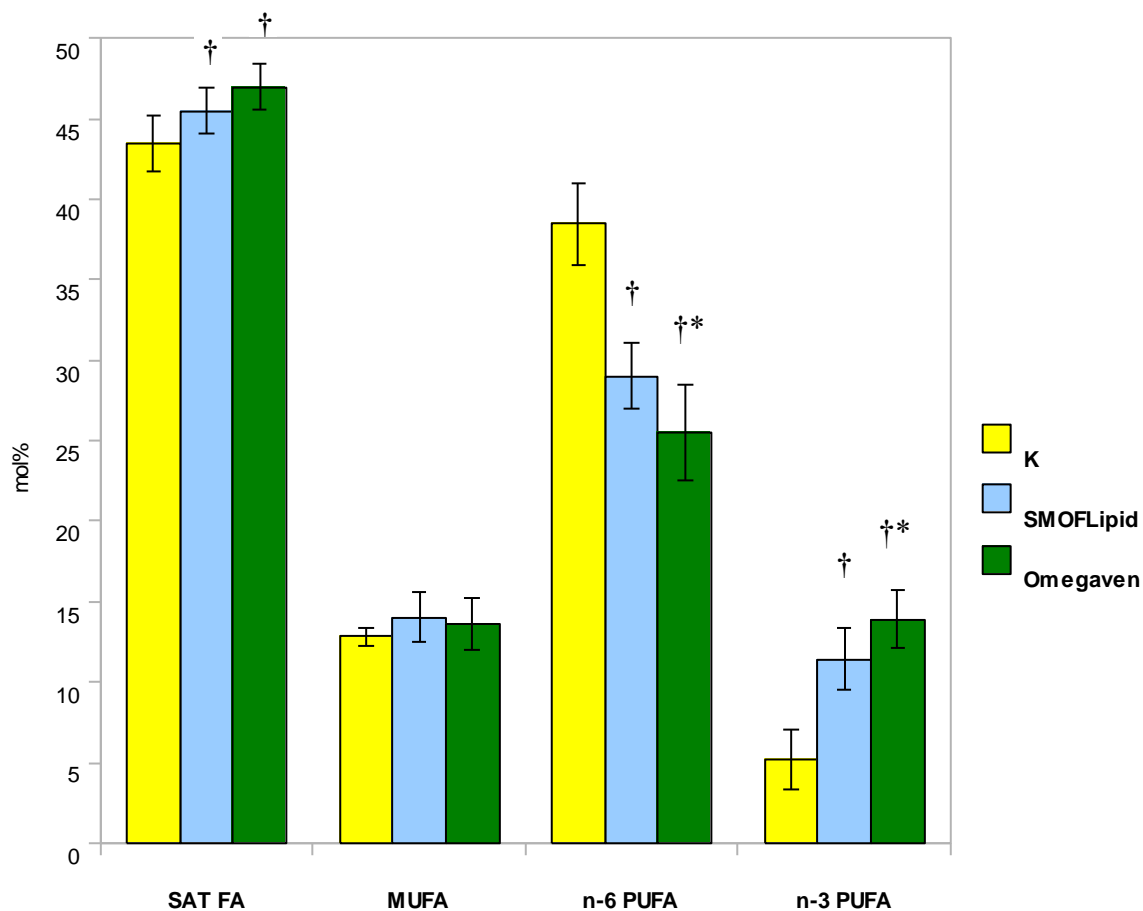
SAT FA - satureované mastné kyseliny, MUFA - mononenasyčené mastné kyseliny, PUFA - polynenasycené mastné kyseliny

Hodnoty jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr ± směrodatná odchylka (SD).

* - p<0,05; statisticky významný rozdíl pacienti SMOFLipid[®]+Omegaven[®] vs. pacienti SMOFLipid[®]

† - p<0,05; statisticky významný rozdíl pacienti vs. kontrola

Graf 6: Vliv emulzí SMOFLipid[®] a SMOFLipid[®]+Omegaven[®] na zastoupení FA ve fosfolipidech plazmy



K - zdravá kontrola (n=8)

SMOFLipid - pacienti s tukovou emulzí SMOFLipid[®] (n=8)

Omegaven - pacienti s tukovou emulzí SMOFLipid[®]+Omegaven[®] (n=8)

SAT FA - saturevané mastné kyseliny, MUFA - mononenasycené mastné kyseliny, n-6 PUFA -

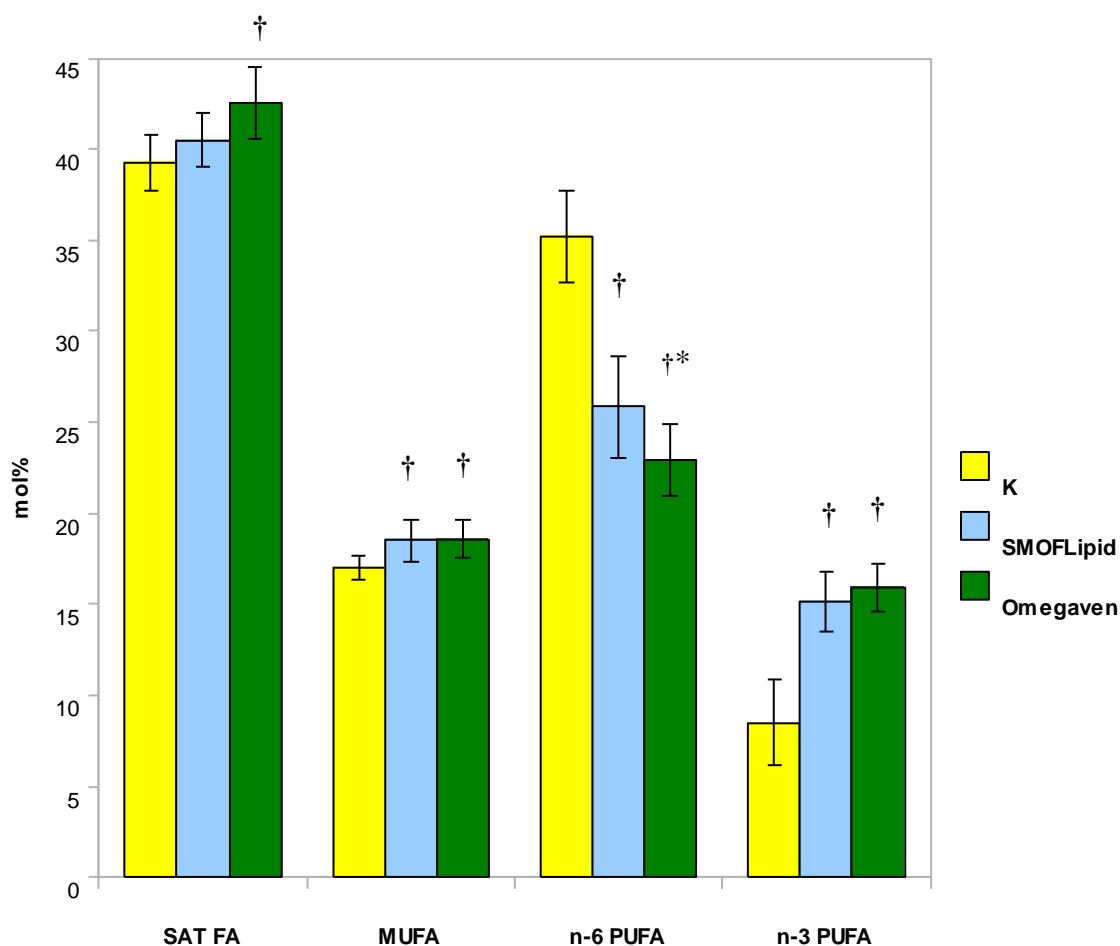
n-6 polynenasycené mastné kyseliny, n-3 PUFA - n-3 polynenasycené mastné kyseliny

Chybové úsečky vyznačují směrodatnou odchylku (SD).

* - $p < 0,05$; statisticky významný rozdíl pacienti SMOFLipid[®]+Omegaven[®] vs. pacienti SMOFLipid[®]

† - $p < 0,05$; statisticky významný rozdíl pacienti vs. kontrola

Graf 7: Vliv emulzí SMOFLipid[®] a SMOFLipid[®]+Omegaven[®] na zastoupení FA ve fosfolipidech erytrocytů



K - zdravá kontrola (n=8)

SMOFLipid - pacienti s tukovou emulzí SMOFLipid[®] (n=8)

Omegaven - pacienti s tukovou emulzí SMOFLipid[®]+Omegaven[®] (n=8)

SAT FA - saturevané mastné kyseliny, MUFA - mononenasycené mastné kyseliny, n-6 PUFA -

n-6 polynenasycené mastné kyseliny, n-3 PUFA - n-3 polynenasycené mastné kyseliny

Chybové úsečky vyznačují směrodatnou odchylku (SD).

* - $p < 0,05$; statisticky významný rozdíl pacienti SMOFLipid[®]+Omegaven[®] vs. pacienti SMOFLipid[®]

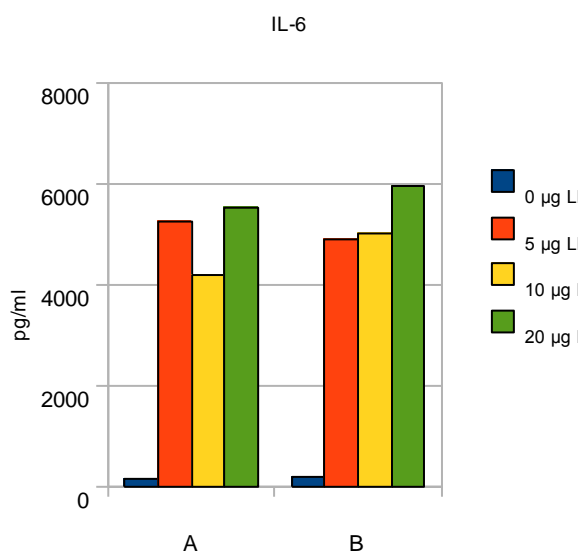
† - $p < 0,05$; statisticky významný rozdíl pacienti vs. kontrola

5.5. Závislost koncentrace cytokinů na koncentraci LPS v *in vitro* krevní kultuře

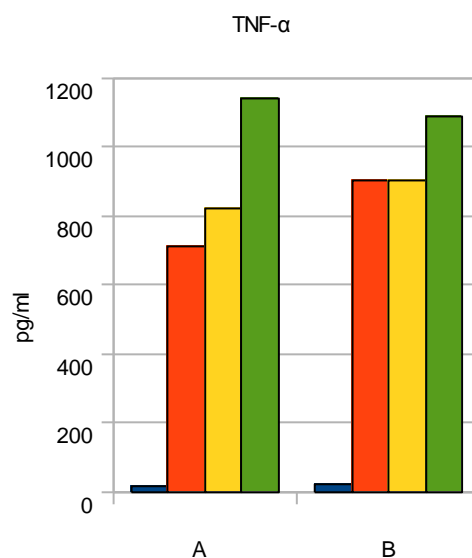
Graf 3 ukazuje závislost produkce cytokinů v *in vitro* krevní kultuře na koncentraci LPS u dvou pacientů s tukovou emulzí SMOFLipid[®]. Ke stimulaci byla použita koncentrace LPS 0 µg/ml (kontrolní vzorek), 5 µg/ml, 10 µg/ml a 20 µg/ml. Z naměřených koncentrací IL-6 (Graf 3a) a TNF-α (Graf 3b) vyplývá, že ve srovnání s nestimulovaným kontrolním vzorkem všechny koncentrace LPS vyvolaly zvýšení koncentrace cytokinů přibližně o dva řády. U všech použitých koncentrací LPS jsme dosáhli maximální stimulace. Pro studii jsme zvolili koncentraci LPS 10 µg/ml.

Graf 3a, b: Koncentrace IL-6 a TNF-α po *in vitro* stimulaci plné krve lipopolysacharidem

a) interleukin-6



b) tumor nekrotizující faktor-α



IL-6 – interleukin-6, TNF-α - tumor nekrotizující faktor-α
A, B - pacienti s tukovou emulzí SMOFLipid[®]
LPS - lipopolysacharid

5.6. Vliv emulzí SMOFLipid[®] a SMOFLipid[®]+Omegaven[®] na koncentraci cytokinů v séru

Tabulka 9 ukazuje, že koncentrace IL-6 byla v séru pacientů (u obou emulzí) asi 15x vyšší než u zdravých kontrol, koncentrace TNF- α byla u pacientů oproti kontrole vyšší přibližně 3,5x.

Tabulka 9: Vliv emulzí SMOFLipid[®] a SMOFLipid[®]+Omegaven[®] na koncentraci cytokinů v séru

	K	SMOFLipid	Omegaven
IL-6 (pg/ml)	3,76 \pm 4,8	55,26 \pm 28,82 †	62,47 \pm 23,67 †
TNF- α (pg/ml)	6,37 \pm 3,5	19,62 \pm 11,08 †	24,5 \pm 13,74 †

IL-6 - interleukin-6, TNF- α - tumor nekrotizující faktor α

K - zdravá kontrola

SMOFLipid - pacienti s tukovou emulzí SMOFLipid[®] (n=8)

Omegaven - pacienti s tukovou emulzí SMOFLipid[®]+Omegaven[®] (n=8)

Hodnoty jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr \pm směrodatná odchylka (SD).

† - p<0,05; statisticky významný rozdíl pacienti vs. kontrola

5.7. Vliv emulzí SMOFLipid[®] a SMOFLipid[®]+Omegaven[®] na produkci cytokinů po *in vitro* stimulaci LPS krevní kultury

Koncentrace IL-6 v krevní kultuře bez stimulace LPS se mezi emulzemi signifikantně nelišila a po stimulaci LPS narostla více než stonásobně. Po podání směsné emulze SMOFLipid[®]+Omegaven[®] poklesla produkce IL-6 ve stimulované krevní kultuře o 36% ve srovnání s emulzí SMOFLipid[®]. Koncentrace TNF- α v nestimulované krevní kultuře byla u emulze SMOFLipid[®]+Omegaven[®] signifikantně vyšší než u SMOFLipid[®]. Ve stimulované kultuře poklesla koncentrace TNF- α po podání směsné emulze oproti emulzi SMOFLipid[®] o 60% (Tabulka 10).

Průměrné hodnoty koncentrace obou cytokinů jsou uvedeny v Grafu 8a, značná směrodatná odchylka je dána individuálními rozdíly v míře odpovědi na stimulaci krve LPS u pacientů. Kromě jednoho pacienta byl však u všech ostatních pozorován značný pokles v produkci obou cytokinů po emulzi s vyšším podílem n-3 PUFA (SMOFLipid[®]+Omegaven[®]) (Grafy 8b,c).

Tabulka 10: Koncentrace cytokinů v krevní kultuře po stimulaci lipopolysacharidem

	SMOFLipid		Omegaven	
	bez LPS	s LPS	bez LPS	s LPS
IL-6 (pg/ml)	31,93 ± 9,10	5081,49 ± 1521,19	24,95 ± 5,89	3359,89 ± 1885,72 *
TNF-α (pg/ml)	10,7 ± 7,53	1125,9 ± 533,42	19,96 ± 10,09 *	459,48 ± 250,79 *

IL-6 - interleukin-6, TNF-α - tumor nekrotizující faktor α

LPS - lipopolaysacharid

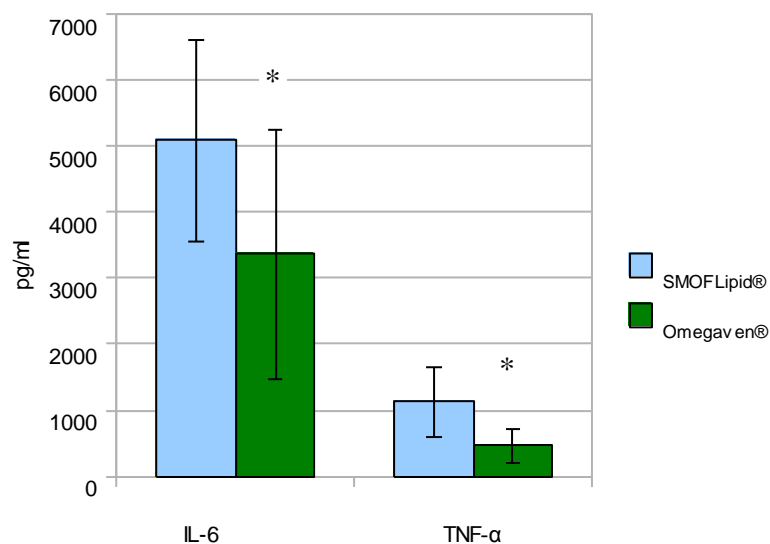
SMOFLipid - pacienti s tukovou emulzí SMOFLipid® (n=8)

Omegaven - pacienti s tukovou emulzí SMOFLipid®+Omegaven® (n=8)

Hodnoty jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr ± směrodatná odchylka (SD).

* - p<0,05; statisticky významný rozdíl pacienti SMOFLipid®+Omegaven® vs. pacienti SMOFLipid®

Graf 8a: Koncentrace IL-6 a TNF-α po stimulaci kultury plné krve lipopolysacharidem



IL-6 - interleukin 6, TNF-α - tumor nekrotizující faktor α

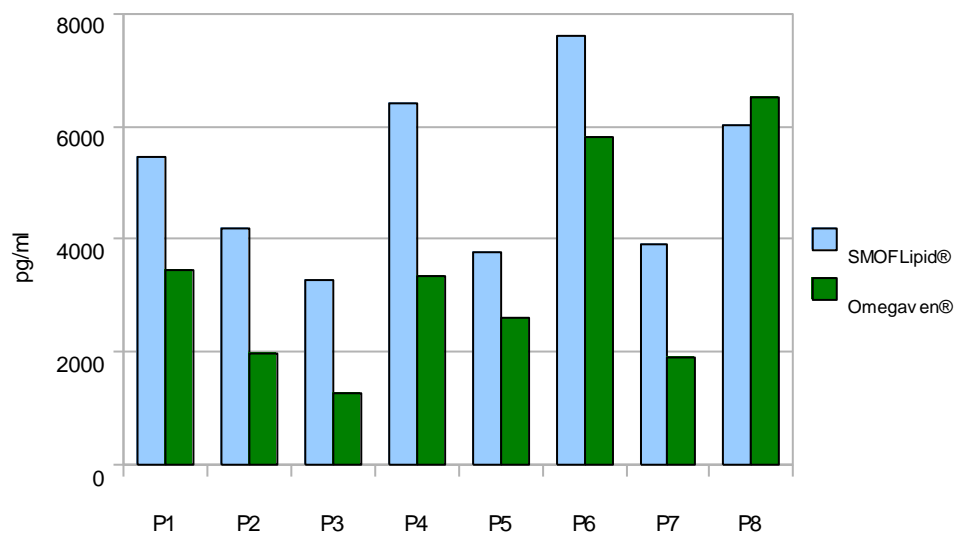
SMOFLipid® - pacienti s tukovou emulzí SMOFLipid® (n=8)

Omegaven® - pacienti s tukovou emulzí SMOFLipid®+Omegaven® (n=8)

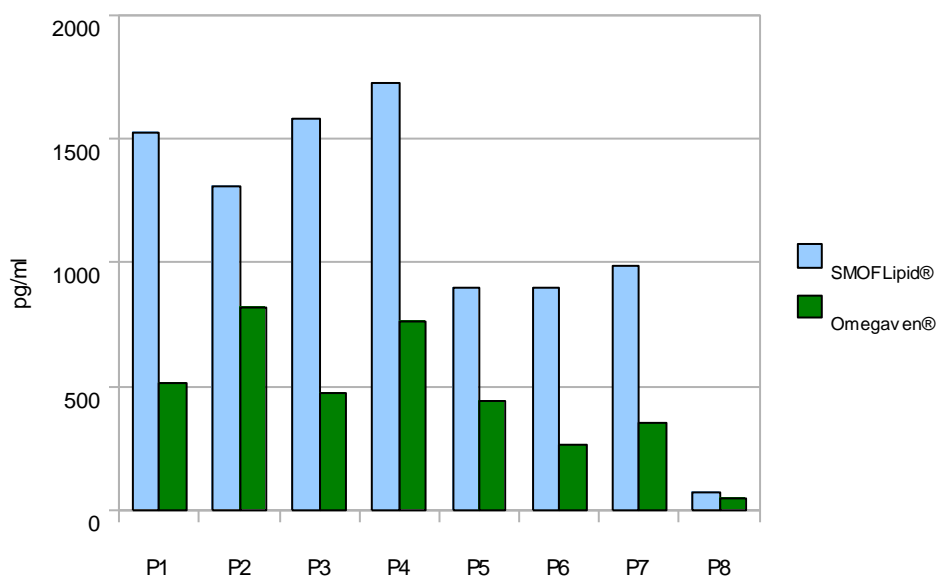
Chybové úsečky vyznačují směrodatnou odchylku (SD).

* - p<0,05; statisticky významný rozdíl pacienti SMOFLipid®+Omegaven® vs. pacienti SMOFLipid®

8b) koncentrace IL-6 po stimulaci lipopolysacharidem u jednotlivých pacientů



8c) koncentrace TNF- α u jednotlivých pacientů po stimulaci lipopolysacharidem



P1-P8 - jednotliví pacienti

SMOFLipid® - hodnoty po výživě s tukovou emulzí SMOFLipid®

Omegaven® - hodnoty po výživě s tukovou emulzí SMOFLipid®+Omegaven®

5.8. Vliv emulzí SMOFLipid[®] a SMOFLipid[®]+Omegaven[®] na koncentraci konjugovaných dienu a aktivitu antioxidantních enzymů

Byla stanovena koncentrace konjugovaných dienu (mimo experimentální část diplomové práce) a aktivita antioxidantních enzymů - CuZn-SOD, CAT a GR v erythrocytech pacientů s tukovou emulzí SMOFLipid[®], směsnou emulzí SMOFLipid[®]+Omegaven[®] a u zdravých kontrol. Hodnoty ukazuje Tabulka 11.

Koncentrace konjugovaných dienu v séru pacientů byly v případě obou emulzí téměř shodné, oproti kontrolám však byly nižší asi o 18% (Graf 9a).

Emulze SMOFLipid[®] zvýšila aktivitu SOD o 40% ve srovnání se zdravými kontrolami. Následné podávání SMOFLipid[®]+Omegaven[®] ji snížilo o 16%, hodnota přesto zůstala po SMOFLipid[®]+Omegaven[®] o 28% vyšší vzhledem ke kontrolám (Graf 9d).

Aktivity CAT a GR se u žádné ze skupin signifikantně nelišily (Grafy 9b,c).

Tabulka 11: Koncentrace konjugovaných dienu a aktivita antioxidantních enzymů

Enzym	K	SMOFLipid	Omegaven
Konjugované dieny	70,43 ± 5,80	58,73 ± 5,80 †	57,78 ± 9,46 †
Superoxiddismutáza	1169,93 ± 197,17	1920,16 ± 237,3 †	1618,92 ± 362,33 †*
Kataláza	200,76 ± 28,14	199,07 ± 20,35	194,27 ± 13,16
Glutathionreduktáza	7,46 ± 2,30	9,18 ± 1,29	9,57 ± 2,05

Konjugované dieny - jednotka: μmol/l séra

Superoxiddismutáza - jednotka: U/g hemoglobinu (U= μmol/min)

Kataláza - jednotka: kU/g hemoglobinu (U=μmol/min)

Glutathionreduktáza - jednotka: U/g hemoglobinu (U= μmol/min)

K - zdravá kontrola (n=8)

SMOFLipid - pacienti s tukovou emulzí SMOFLipid[®] (n=8)

Omegaven - pacienti s tukovou emulzí SMOFLipid[®]+Omegaven[®] (n=8)

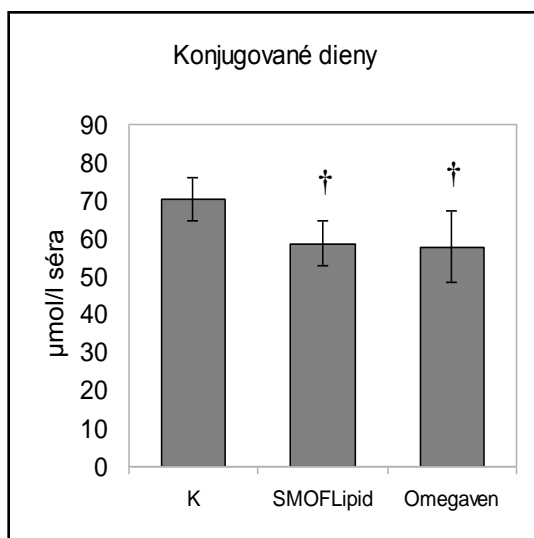
Hodnoty jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr ± směrodatná odchylka (SD).

* - p<0,05; statisticky významný rozdíl pacienti SMOFLipid[®]+Omegaven[®] vs. pacienti SMOFLipid[®]

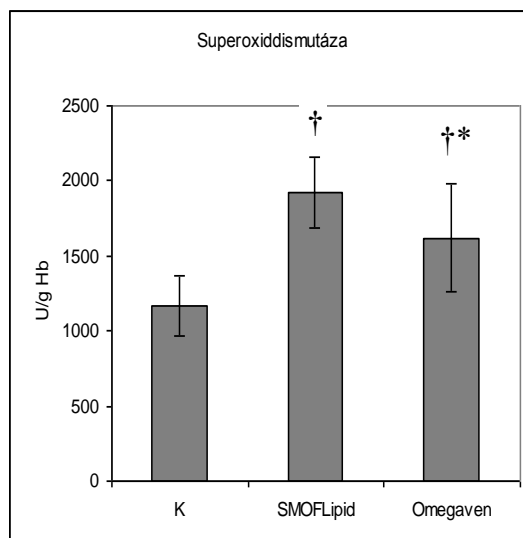
† - p<0,05; statisticky významný rozdíl pacienti vs. kontrola

Graf 9: Koncentrace konjugovaných dienu v séru a aktivita antioxidantních enzymů v erytrocytech

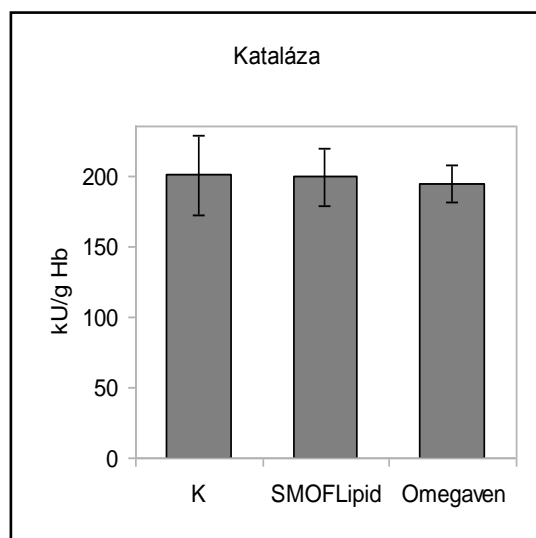
a) konjugované dieny



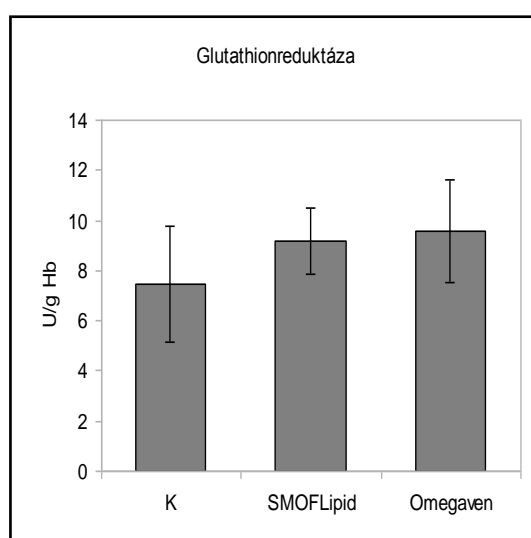
b) superoxididismutáza



c) kataláza



d) glutathionreduktáza



U=μmol/min

Hb - hemoglobin

K - zdravá kontrola (n=8)

SMOFLipid - pacienti s tukovou emulzí SMOFLipid® (n=8)

Omegaven - pacienti s tukovou emulzí SMOFLipid®+Omegaven® (n=8)

Chybové úsečky vyznačují směrodatnou odchylku (SD).

* - p<0,05; statisticky významný rozdíl pacienti SMOFLipid®+Omegaven® vs. pacienti SMOFLipid®

† - p<0,05; statisticky významný rozdíl pacienti vs. kontrola

6. Diskuze

Tato diplomová práce měla za cíl porovnat dvě tukové emulze lišící se zastoupením n-3 PUFA u pacientů na dlouhodobé domácí parenterální výživě. Zaměřili jsme se na vliv rozdílné dávky n-3 PUFA v dietě na produkci zánětlivých mediátorů a aktivitu antioxidantních enzymů. Do studie byli zařazeni pacienti dlouhodobě stabilizovaní, kteří byli alespoň měsíc bez infekčních komplikací. U všech pacientů byly aplikovány postupně obě emulze. Při srovnání emulzí byl tedy každý pacient sám sobě kontrolou, čímž jsme eliminovali rozdíly v reaktivitě organismu dané např. genetickými vlivy. Jelikož všichni pacienti museli být nejméně dva měsíce před vstupem do studie na stabilním nutričním režimu, nebylo možné provést odběry před zahájením PV. Abychom zjistili, nakolik se sledované parametry budou lišit od běžné perorální výživy, vybrali jsme jako kontrolu zdravé jedince věkem a pohlavím odpovídající pacientům. Toto srovnání má určitá omezení, především proto, že kalorický příjem zdravých jedinců nebyl kontrolován, stejně jako nebyl sledován jejich příjem FA. Zdraví jedinci však představují typickou západní dietou bohatou na n-6 PUFA, s poměrem n-6/n-3 PUFA asi 20-25:1 a průměrným denním příjmem n-3 PUFA 1,5 g, z toho ovšem EPA+DHA tvoří pouze 0,1-0,5 g (Sanders, 2000), což je dávka velmi nízká. Pacienti v této studii při průměrné váze 65 kg přijímali s emulzí SMOFLipid[®] 3,5 g n-3 PUFA/den (z toho 1,3 g EPA, 1,3 g DHA) a se směsnou emulzí SMOFLipid[®]+Omegaven[®] 7 g n-3 PUFA/den (z toho 3 g EPA a 3 g DHA). Tyto dávky jsou tedy o řád vyšší než u západní diety. Přestože mají n-3 PUFA řadu benefičních účinků, při nadměrných dávkách (více než 10 g/den) mohou mít na lidský organismus nepříznivé účinky, především při dlouhodobějším podávání (Eritslund, 2000). Dlouhodobé užívání emulze Omegaven[®] také není výrobcem doporučováno (déle než 4 týdny). Jelikož se emulze připravují z přírodních olejů a tuků, ujistili jsme se ještě před zahájením studie, že se podíl FA mezi různými šaržemi emulzi SMOFLipid[®] a Omegaven[®] nemění.

Paralelně k našim analýzám byly u pacientů stanoveny rutinní laboratorní parametry v centrální laboratoři Ústavu klinické biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF UK a VFN. Byly provedeny běžné laboratorní testy, jako je koncentrace minerálů v krvi, lipidogram, jaterní testy, hladiny antioxidantů, koagulační testy, krevní obraz. Sledované laboratorní parametry se většinou pohybovaly v rozmezí referenčních hodnot uvedených v tabulkách. Nepozorovali jsme také významné rozdíly mezi oběma používanými tukovými emulzemi, u emulze SMOFLipid[®]+Omegaven[®] byla pouze snížená koncentrace vápníku v

krvi, snížená aktivita alkalické fosfatázy a zvýšené množství bazofilů ve srovnání s emulzí SMOFLipid[®]. Existuje studie, ve které byla zaznamenána mírně zvýšená aktivita jaterních enzymů po suplementaci n-3 PUFA (Eritsland et al., 1995). Na druhou stranu bylo publikováno, že n-3 PUFA měly u pacientů s nedostatečností střeva benefiční účinky na jaterní steatózu (Puder et al., 2009). Pokud jde o naši studii, hodnoty aktivity většiny jaterních enzymů se pohybovaly na horní hranici referenčních hodnot, zejména po podání emulze bohatší na n-3 PUFA, což by mělo být bráno v úvahu při navrhování diety s vysokým podílem n-3 PUFA. Fumeron a spol. zaznamenali zvýšenou koncentraci LDL-cholesterolu a HDL-cholesterolu u zdravých lidí při suplementaci n-3 PUFA (6 g/d EPA) (Fumeron et al., 1991). Po podobné dávce n-3 PUFA, kterou jsme u pacientů podávali v dietě obohacené o Omegaven[®], jsme nepozorovali žádné významné změny v koncentraci jednotlivých frakcí sérového cholesterolu. Dále byl ve studii Kristensena a spol. pozorován úbytek krevních destiček při vysokém příjmu n-3 PUFA (>10 g/d), jejich snížená agregace a s tím spojená zvýšená krvácivost (Kristensen et al., 1989), ale při mírných dávkách (2-4 g/d) nebyly pozorovány žádné klinicky významné změny v krvácivosti (Simopoulos, 1991). Ani v našem případě nebyly pozorovány změny v počtu krevních destiček v závislosti na množství přijatých n-3 PUFA, výsledky testu koagulace krve se také nelišily. Z tohoto hlediska byla tedy i vyšší dávka n-3 PUFA (7 g/den) bezpečná.

V naší práci, podobně jako v řadě dalších, se ukázalo, že se složení FA v lipidech diety promítá do složení FA v lipidech plazmy a fosfolipidech erytrocytů a ostatních tkání (Cao et al., 2006; Hulbert et al., 2005). Jednotlivé studie se však výrazně liší délkou podávání diety, kvalitativním a kvantitativním zastoupením FA v dietě, způsobem podávání diety (perorálně, parenterálně) i sledovanými subjekty (zdraví lidé, pooperační pacienti, lidé s dlouhodobou PV apod.). V přípravné fázi studie jsme provedli stanovení FA v triacylglycerolech, cholesterolesterech a totálních fosfolipidech plazmy a fosfolipidech erytrocytů u pacientů s emulzí SMOFLipid[®] a kontrolních zdravých jedinců s běžnou západní dietou. Triacylglyceroly v plazmě transportují do tkání FA přijaté v potravě a jejich složení tedy především odráží složení FA v dietě. Složení cholesterolesterů a totálních fosfolipidů plazmy odráží především syntézu v játrech (Hodson et al., 2008). Co se týče podílu EPA+DHA, fosfolipidy erytrocytů se podobají fosfolipidům plazmy, zastoupení 18:2n-6 je v nich však o polovinu nižší, zatímco podíl 20:4n-6 dvojnásobný. Vysoký obsah AA je pro buněčné membrány typický (Hodson et al., 2008). Jako ukazatel membránového složení tkání jsou tak vhodnější fosfolipidy erytrocytů. Vzhledem k tomu, že analýza všech lipidových tříd v plazmě po výživě s emulzí SMOFLipid[®] ukázala obdobný trend ve

změně zastoupení FA (především zastoupení n-6 a n-3 PUFA), analyzovali jsme ve studii, která srovnávala SMOFLipid[®] a SMOFLipid[®]+Omegaven[®], pouze fosfolipidy plazmy jako ukazatel plazmatických lipidů a fosfolipidy erytrocytů jako ukazatel složení lipidů buněčných membrán.

Vlivem diet s oběma tukovými emulzemi se měnilo nejvíce zastoupení n-6 a n-3 PUFA, a to u fosfolipidů plazmy i erytrocytů, které se zvyšovalo s rostoucí dávkou n-3 PUFA v dietě. Ve fosfolipidech plazmy bylo u pacientů se SMOFLipid[®] (2,6 g EPA+DHA/den po dobu 6 týdnů) zastoupení n-3 PUFA dvojnásobné oproti kontrolám (11% vs. 5%). Následující výživa s emulzí SMOFLipid[®]+Omegaven[®] (6 g EPA+DHA/den po dobu 4 týdnů) zastoupení n-3 PUFA dále zvýšila na 14%. Zvyšovalo se jak zastoupení EPA, tak DHA. To bylo kompenzováno snížením podílu n-6 PUFA, především LA a AA, které jsou nejvíce zastoupenými n-6 PUFA ve fosfolipidech plazmy (Hodson et al., 2008). Von Schacky a spol. podávali zdravým jedincům 2,5 až 9 g EPA+DHA/d po dobu 5 měsíců. Opět pozorovali zvýšení podílu EPA i DHA ve fosfolipidech plazmy provázené snížením LA a AA, ačkoli výraznější úbytek AA zaznamenali až s vyšší dávkou n-3 PUFA (Von Schacky et al., 1985). V naší studii jsme pozorovali výrazné snížení zastoupení AA oproti kontrolám již při dávce 2,6 g EPA+DHA. Obdobné změny ve složení fosfolipidů plazmy jako po dlouhodobém podávání jsou pozorovatelné i po krátkodobé suplementaci. Grimm a spol. pozorovali již po 6 dnech aplikace emulze SMOFLipid[®] (v dvojnásobné dávce než v naší studii, 5,2 g EPA+DHA/den) u pooperačních pacientů zvýšené zastoupení EPA a DHA ve fosfolipidech plazmy, zatímco podíl LA a AA oproti hodnotám před aplikací PV poklesl (Grimm et al., 2006). Je tedy zřejmé, že složení diety podávané formou PV s tukovými emulzemi se odrazí ve složení fosfolipidů plazmy během krátké doby podávání.

Ve fosfolipidech erytrocytů byl při výživě se SMOFLipid[®] podíl n-3 PUFA 15% oproti 8% u kontrol. Ovšem další výrazné navýšení n-3 PUFA (z 3,5 g/d na 7 g/d) ve směsné emulzi zvýšilo podíl n-3 PUFA jen velmi mírně, přičemž podíl DHA se téměř nezměnil, mírně se zvýšilo jen zastoupení EPA. To odpovídá výsledkům studie Katana a spol.. Při dlouhodobém podávání kapslí s různým obsahem rybího tuku (1, 2 nebo 3 g EPA+DHA/d) zjistili, že nárůst zastoupení EPA v membránách erytrocytů byl nejvýraznější během prvních 60 dnů suplementace a byl tím výraznější, čím vyšší dávka rybího tuku byla podána. Během následujících 120 dnů podíl EPA v membránách dále stoupal, ale jen mírně. Po 180 dnech se zastoupení EPA v erytrocytech ustálilo a až do konce studie zůstalo stabilní. Zastoupení DHA vzrostlo za celou studii jen mírně. Po 12

měsících suplementace byl podíl EPA+DHA ve fosfolipidech erytrocytů u subjektů s výživou se 2 g EPA+DHA/den 9,1%, u skupiny s 3 g EPA+DHA/den byl tento index 10,7% (Katan et al., 1997). U našich pacientů byl při výživě s emulzí SMOFLipid[®] (2,6 g EPA+DHA/den) podíl EPA+DHA ve fosfolipidech erytrocytů 10,8%, což přibližně odpovídá výsledkům z výše zmíněné studie. Při podávání emulze SMOFLipid[®]+Omegaven[®] byl tento podíl 11,7%. Takto vysoký podíl EPA+DHA v erytrocytech (11,6%) uvádí Harris a von Schacky po suplementaci zdravých jedinců 2 g EPA+DHA/den po dobu 20 týdnů (Harris and von Schacky, 2004) Můžeme tedy shrnout, že při suplementaci n-3 PUFA, ať už parenterální či orální, stoupá ve fosfolipidech erytrocytů nejvíce zastoupení EPA, méně pak DHA, a naopak klesá podíl AA, případně LA, a že při dlouhodobější (>5 měsíců) perorální výživě s obsahem 2-6 g EPA+DHA lze dosáhnout zastoupení EPA+DHA v erytrocytech 9-11%, zatímco formou PV lze takového zastoupení dosáhnout během 4-6 týdnů. Harris a von Schacky uvádí, že podíl EPA+DHA v erytrocytech (těmito autory nazývaný index n-3 PUFA) může být posuzován jako rizikový faktor pro vznik koronárního srdečního onemocnění a že kardioprotektivní je hodnota tohoto indexu alespoň 8%. Žádné podobné studie dávající do souvislosti n-3 PUFA index a modulaci zánětlivé odpovědi nebyly dosud provedeny. U PV by se např. mohl hledat vztah mezi zastoupením EPA+DHA v erytrocytech a výskytem infekčních komplikací.

Ve srovnání s kontrolami s typickou západní dietou u pacientů mírně vzrostl poměr SAT FA+MUFA/PUFA ve fosfolipidech erytrocytů i plazmy. Z literatury je známo, že tento poměr je zejména v buněčných membránách velmi stabilní a dietou málo ovlivnitelný (Hulbert et al., 2005), proto ani dieta obohacená o Omegaven[®] tento poměr neovlivnila. Jiná situace nastává za patologických stavů, jako je např. sepse, kdy dochází k úbytku PUFA a nárůstu MUFA a poměr SAT FA+MUFA/PUFA se tak výrazně snižuje (Novák et al., 2010). V takovém případě se stává obzvláště důležitým podávání tukové diety obohacené PUFA, zejména protizánětlivými n-3 PUFA.

Ve fosfolipidech erytrocytů jsme u pacientů s emulzí SMOFLipid[®] oproti kontrolám zaznamenali výrazně nižší poměr n-6/n-3 PUFA (o 60%) a poměr AA/EPA byl nižší dokonce o 80%. To se shoduje s výsledky Vidgrena a spol., kteří při suplementaci zdravých jedinců rybím tukem (2,2 g EPA+DHA/den; 14 týdnů) zaznamenali podobné změny těchto poměrů (Vidgren et al., 1997). S vyšším podílem n-3 PUFA v tukové emulzi v naší studii poklesl poměr n-6/n-3 jen mírně, poměr AA/EPA poklesl ještě o polovinu. Poměr n-6/n-3 PUFA, resp. AA/EPA je velmi důležitým parametrem membránových fosfolipidů. AA a EPA jsou totiž prekurzory pro syntézu rozdílných sérií eikosanoidů (z AA

jsou to prostanoidy série-2 a leukotrieny série-4, z EPA pak prostanoidy série-3 a leukotrieny série-5) s odlišnými účinky při zánětlivých reakcích.

Námi sledovaní pacienti s dlouhodobou domácí PV měli výrazně zvýšené koncentrace IL-6 a TNF- α v séru. Při krátkodobém podávání PV s emulzemi obohacenými n-3 PUFA u pooperačních pacientů byl naopak pozorován pokles plazmatických koncentrací IL-6 a TNF- α ve srovnání s emulzemi obsahujícími hlavně n-6 PUFA nebo MUFA (Schade et al., 2008; Wachtler et al., 1997). Zde je ale zřejmě důležitým faktorem délka PV, jelikož zvýšené koncentrace cytokinů u pacientů na dlouhodobé domácí PV (>rok) byly pozorovány (Ling et al., 2001, Hise et al., 2008), ačkoli nedosahovaly tak vysokých hodnot jako v našem případě ani nepřesahovaly referenční meze. Hladiny C-reaktivního proteinu jako markeru zánětu nebyly ve zmíněných pracích zvýšené, podobně jako v naší studii. Tito autoři neuvádí přesné složení PV ani jaká tuková emulze byla použita. Jako možné vysvětlení tohoto nálezu se nabízí vliv přítomnosti dlouhodobého katetru u pacientů na domácí PV, který způsobuje velmi malou, ale trvalou zánětlivou stimulaci vedoucí ke zvýšení koncentrací plazmatických cytokinů. Jiným vysvětlením zvýšených koncentrací stanovených cytokinů by mohla být mírná zánětlivá odpověď v rámci základních onemocnění u těchto pacientů.

Koncentraci IL-6 a TNF- α jsme stanovili také v supernatantu z *in vitro* kultury plné krve stimulované 10 μ g/ml LPS. Před stimulací se koncentrace IL-6 u výživy s emulzí SMOFLipid[®] (1,3 g EPA a 1,3 g DHA/den) významně nelišila od výživy obohacené o Omegaven[®] (3 g EPA a 3 g DHA/den), bazální koncentrace TNF- α byla u výživy s emulzí SMOFLipid[®]+Omegaven[®] zvýšená. Po stimulaci LPS se produkce IL-6 i TNF- α oproti hodnotám bez stimulace výrazně zvýšila. Srovnání obou emulzí ukázalo, že při výživě obohacené Omegavenem[®] byly imunokompetentní buňky stimulovány k produkci obou prozánětlivých cytokinů podstatně méně než po samotném SMOFLipid[®]. Naše výsledky jsou v souladu nemnoha studií, které také sledovaly vliv různých tukových emulzí na produkci cytokinů v PV. Mayer a spol. na septických pacientech srovnali emulzi Omegaven[®] s emulzí bohatou na n-6 PUFA po stimulaci mononukleárních buněk z periferní krve (periferal blood mononuclear cells, PBMC; zahrnují monocyty a lymfocyty) LPS (10 ng/ml). Po výživě s emulzí Omegaven[®] (5 dnů) pozorovali pokles produkce IL-6 a TNF- α oproti pacientům s emulzí bohatou na n-6 PUFA (Mayer et al., 2003a). Barbosa a spol. srovnávali tukovou emulzi obsahující 10% rybího tuku (asi 2 g EPA+DHA/den) s emulzí, která neobsahovala n-3 PUFA, u septických pacientů, u kterých byla koncentrace IL-6 v plazmě zvýšená. Vzhledem k septickému stavu pacientů byly

hodnoty plazmatického IL-6 blízké našim koncentracím IL-6 po stimulaci LPS. Po podávání emulze s n-3 PUFA (6 dnů) tato koncentrace klesla o 40%, zatímco u emulze bez n-3 PUFA byl pokles po 6 dnech pouhých 20%. Podávání PV s n-3 PUFA tedy může zlepšit prognózu septických pacientů, protože bylo publikováno, že vyšší koncentrace IL-6 v sepsi je spojena s vyšší úmrtností (Hack et al., 1989). Barbosa a spol. provedli také stimulaci plné krve se stejnou koncentrací LPS (10 µg/ml) jako v naší studii. Autoři však nepozorovali mezi oběma skupinami pacientů žádné rozdíly v produkci cytokinů, což připisují nižší schopnosti restimulace monocytů *in vitro* dané septickým stavem pacientů (Barbosa et al., 2010). Z uvedeného vyplývá, že použití PV s obsahem n-3 PUFA může mít při hyperzánětlivé reakci u septických pacientů benefiční účinky díky snížené produkci prozánětlivých cytokinů. Vzhledem k tomu, že pacienti v naší studii byli stabilizovaní a bez infekčních příznaků, měla by jejich reaktivita na *in vitro* stimulaci LPS být podobná spíše zdravým lidem. Řada prací ukazuje pokles produkce prozánětlivých cytokinů po orální suplementaci n-3 PUFA u zdravých jedinců. Enders a spol. podávali zdravým jedincům rybí tuk (2,7 g EPA, 1,8 g DHA/den) po dobu 6 týdnů. Po této době klesla produkce TNF- α stimulovanými PBMC o 40%. Jako stimulus použili 1 ng/ml LPS (Endres et al., 1989). Výraznější pokles v produkci TNF- α (o 70%) LPS-stimulovanými PBMC zaznamenali Caughey a spol., přestože jejich dávka n-3 PUFA byla nižší, odpovídající přibližně naší použité dávce v emulzi SMOFLipid[®] (1,6 g EPA, 1,1 g DHA; 4 týdny) (Caughey et al., 1996). Trebble a spol. sledovali vliv různých dávek n-3 PUFA (0,3, 1,0 a 2,0 g EPA+DHA/den) na produkci IL-6 a TNF- α u zdravých jedinců po stimulaci PBMC LPS. Se zvyšující se dávkou n-3 PUFA koncentrace cytokinů podobně jako v naší studii klesala, i když mezi dávkou 1,0 g a 2,0 g EPA+DHA/den byl rozdíl v produkci cytokinů jen mírný (Trebble et al., 2003). Ve většině zmíněných prací sledovali autoři zároveň změny ve spektru FA ve fosfolipidech plazmy a/nebo membránových fosfolipidech a uvádí nárůst podílu n-3 PUFA (především EPA) a pokles zastoupení n-6 PUFA. V našem případě byl vidět značný pokles v produkci cytokinů mezi oběma emulzemi, ačkoli u emulze SMOFLipid[®]+Omegaven[®] se již výrazně nezvyšoval podíl n-3 PUFA ve fosfolipidech erytrocytů. Poměr AA/EPA byl ovšem asi o polovinu nižší než u výživy s emulzí SMOFLipid[®], mohla tedy být ovlivněna produkce eikosanoidů. Přesný mechanismus, který vede ke snížení produkce prozánětlivých cytokinů po suplementaci n-3 PUFA není znám. Změny v produkci eikosanoidů jsou jednou z možností. Bylo např. ukázáno, že TXA₂, PGE₂ a LTB₄ mohou stimulovat produkci IL-1 β , IL-6 a TNF- α monocytů (Caughey et al., 1996; Rola-Pleszczynski and Stankova, 1992), dojde-li tedy ke snížení zastoupení AA v

buněčných membránách vlivem zvýšené inkorporace n-3 PUFA, produkce TXA₂, PGE₂ a LTB₄ poklesne, což může vést ke snížení produkce prozánětlivých cytokinů. Roli mohou hrát ale i změny v intracelulární signalizaci nebo genové expresi.

Vysoký podíl n-3 PUFA v tukových emulzích může být potenciálně nebezpečný, protože tyto FA obsahují velký počet dvojných vazeb a jsou proto náchylné k lipidové peroxidaci. V naší studii byla proto určena koncentrace konjugovaných dienů jako jeden z ukazatelů peroxidace lipidů a aktivita SOD, CAT a GR v erythrocytech jako ukazatele antioxidační kapacity organismu. Aktivita SOD byla u pacientů s emulzí SMOFLipid[®] výrazně vyšší než u zdravých kontrol. To by naznačovalo vyšší oxidační stres při zvýšeném příjmu n-3 PUFA. Emulze SMOFLipid[®]+Omegaven[®] obohacená o další n-3 PUFA paradoxně aktivitu SOD snížila (přesto zůstala aktivita tohoto enzymu vyšší než u zdravých jedinců). Je možné, že nižší aktivita SOD při podávání směsné emulze souvisí s vyšším obsahem α -tokoferolu v této emulzi (o 7,5-14,8 mg). Aktivity CAT a GR nevykazovaly žádné rozdíly ani mezi výživami s různými tukovými emulzemi, ani mezi pacienty a zdravými kontrolami. Velmi málo studií se zabývalo vlivem PUFA v PV na aktivitu antioxidačních enzymů. Pironi a spol. sledovali účinky dlouhodobé domácí PV s emulzí bohatou na n-6 PUFA (asi 29,5 g/den). Podobně jako my zjistili zvýšenou aktivitu SOD v erythrocytech. Kromě toho zaznamenali sníženou hladinu α -tokoferolu (jako významného antioxidantu) v plazmě a naopak zvýšené hladiny malondialdehydu v séru (Pironi et al., 1998). Malondialdehyd je nejvíce studovaným produktem peroxidace PUFA a je také běžně používaným ukazatelem oxidačního stresu (převzato z Del Rio a spol., 2005). Výše zmíněná studie tedy naznačovala zvýšenou lipidovou peroxidaci a oxidační stres u pacientů na domácí PV. Naopak jiná studie neukázala zvýšenou lipidovou peroxidaci ani oxidativní poškození proteinů u pacientů na domácí PV ve srovnání s kontrolami. Autoři nezaznamenali ani změnu v aktivitě SOD, pouze hladiny antioxidantů v plazmě byly u pacientů mírně snížené (Schepens et al., 2006). Je tedy vidět, že výsledky různých studií se liší a předpoklad vyšší peroxidace u diet bohatých na PUFA nemusí být pravidlem. Doposud žádná ze studií na domácí PV se nezabývala vlivem n-3 PUFA v tukových emulzích na lipidovou peroxidaci a oxidační stres. Higdon a spol. podávali zdravým ženám po menopauze kapsle s rybím tukem (2 g EPA a 1,4 g DHA/den; 5 týdnů). Ve srovnání se suplementací stejných subjektů dietou bohatou na LA (10,6 g/den; 5 týdnů) pozorovali sníženou produkci malondialdehydu. Celkový příjem PUFA se však u obou diet lišil a po vztažení koncentrace malondialdehydu k zastoupení PUFA v plazmě už rozdíly mezi oběma dietami nebyly patrné (Higdon et al., 2000). Interpretace výsledků této studie

tedy může být, že příjem n-3 PUFA, které jsou více nenasycené než n-6 PUFA, nezvýšil výskyt produktů lipidové peroxidace. V naší studii byla jako ukazatel lipidové peroxidace stanovena koncentrace konjugovaných dienů. Ta byla u pacientů dokonce nižší než u kontrol (nelišila se mezi oběma emulzemi), což značí spíše sníženou lipidovou peroxidaci po podání tukových emulzí s obsahem n-3 PUFA. Naopak Balková a spol. pozorovali zvýšené hladiny konjugovaných dienů po podání n-3 PUFA potkanům (Balková et al., 2009). Kromě rozdílného experimentálního modelu může být náš protikladný výsledek dán opět zvýšeným příjmem α -tokoferolu, který je obsažen v tukových emulzích aplikovaných v naší studii. Bohužel koncentrace α -tokoferolu v plazmě pacientů a zdravých kontrol nebyly v rámci naší studie stanoveny. Koncentrace jiných antioxidantů v séru, jako je kyselina močová, kyselina listová, albumin či transferin, stanoveny byly a jejich hodnoty nebyly u pacientů na PV zvýšené. Avšak vzhledem ke zvýšené aktivitě SOD v erytrocytech pacientů byl zřejmě příjem n-3 PUFA spojen s aktivací antioxidantní kapacity jako odpověď na možné zvýšení oxidačního stresu.

Souhrn a závěr

Tato diplomová práce byla zaměřena na srovnávní tukových emulzí SMOFLipid[®] a SMOFLipid[®]+Omegaven[®] lišících se obsahem n-3 PUFA z hlediska vlivu na spektrum mastných kyselin ve fosfolipidech plazmy a erytrocytů, ovlivnění zánětlivé odpovědi a oxidačního stavu u pacientů na dlouhodobé parenterální výživě.

Při této klinické studii jsme zjistili, že:

1. Se zvyšujícím se podílem n-3 PUFA ve výživě se zvyšovalo zastoupení n-3 PUFA, především EPA a DHA, ve fosfolipidech plazmy, což bylo provázeno snížením zastoupení n-6 PUFA, hlavně LA a AA. Podíl n-3 PUFA ve fosfolipidech erytrocytů narostl se zvýšeným příjmem n-3 PUFA ve výživě s emulzí SMOFLipid[®]+Omegaven[®] jen mírně ve srovnání se samotnou emulzí SMOFLipid[®]. Zvýšilo se pouze zastoupení EPA za současného poklesu podílu některých n-6 PUFA včetně AA, což vedlo k poklesu poměru AA/EPA.
2. Koncentrace plazmatického TNF- α a IL-6 byly u pacientů o řád vyšší než u zdravých kontrol.
3. Po stimulaci *in vitro* kultury plné krve LPS došlo při výživě s emulzí SMOFLipid[®]+Omegaven[®] k výraznému poklesu produkce cytokinů oproti výživě s emulzí SMOFLipid[®], konkrétně o 36% u IL-6 a o 60% u TNF- α .
4. Aktivita SOD byla při výživě s emulzí SMOFLipid[®]+Omegaven[®] nižší než s emulzí SMOFLipid[®], přesto byla v obou případech vyšší než u zdravých kontrol. Aktivita CAT ani GR nebyla ovlivněna.
5. Během podávání obou emulzí nedošlo k významným odchylkám v základních laboratorních parametrech pacientů, pouze hodnota jaterních testů se u emulze SMOFLipid[®]+Omegaven[®] pohybovala u horní hranice referenčních hodnot.

Závěrem lze říci, že navýšení dávky rybího tuku přidáním 20% lipidů ve formě Omegavenu[®] k tukové emulzi SMOFLipid[®] zásadně neovlivnilo rutinně sledované laboratorní a klinické parametry pacientů na dlouhodobé domácí PV a je pravděpodobně bezpečné. Nezaznamenali jsme ani zvýšenou lipidovou peroxidaci a možná i díky vyšší substituci α -tokoferolu se snížila míra oxidačního stresu. Zvýšený příjem n-3 PUFA vedl ke zvýšení zastoupení EPA ve fosfolipidech buněčných membrán, a tím zřejmě došlo

k ovlivnění reakce imunokompetentních buněk na zánětlivý podnět v podobě LPS. Modulace zánětlivé odpovědi ve smyslu snížené produkce prozánětlivých cytokinů při PV bohaté na n-3 PUFA by mohla být prospěšná zejména v případě výskytu infekčních komplikací.

7. Seznam literatury

- Aebi, H.** (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology* **105**: 121-126.
- Arterburn, L.M., Hall, E.B., and Oken, H.** (2006). Distribution, interconversion, and dose response of n-3 fatty acids in humans. *American Journal of Clinical Nutrition* **83**, 1467S-1476S.
- Balkova, P., Jezkova, J., Hlavackova, M., Neckar, J., Stankova, B., Kolar, F., Novak, F., and Novakova, O.** (2009). Dietary polyunsaturated fatty acids and adaptation to chronic hypoxia alter acyl composition of serum and heart lipids. *British Journal of Nutrition* **102**(9): 1297-1307.
- Barbosa, V.M., Miles, E.A., Calhau, C., Lafuente, E., and Calder, P.C.** (2010). Effects of a fish oil containing lipid emulsion on plasma phospholipid fatty acids, inflammatory markers, and clinical outcomes in septic patients: a randomized, controlled clinical trial. *Critical Care* **14**, 113-128
- Bin, L., Wang, S., Ye, Y.L., Yang, X.D., Wang, Y.L., Qu, J., Xie, Q.W., and Yin, M.J.** (2008). Impact of postoperative omega-3 fatty acid-supplemented parenteral nutrition on clinical outcomes and immunomodulations in colorectal cancer patients. *World Journal of Gastroenterology* **14**, 2434-2439.
- Bozzeti, F., Staun, M., and Van Gossum, A.** (2006). Home parenteral nutrition. 1st edition. Wallingford (UK) : CABI Pub.. Parenteral nutrition: an overview, s. 1-43. ISBN 1-84593-156-4.
- Brock, T. G., and Peters-Golden, M.** (2007). Activation and regulation of cellular eicosanoid biosynthesis. *TheScientificWorldJournal* **7**: 1273-1284.
- Calder, P.C.** (2006). n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *American Journal of Clinical Nutrition* **83**, 1505S-1519S.
- Calder, P.C., Jensen, G.L., Koletzko, B.V., Singer, P., and Wanten, G.J.A.** (2010). Lipid emulsions in parenteral nutrition of intensive care patients: current thinking and future directions. *Intensive Care Medicine* **36**, 735-749.
- Cao, J., Schwichtenberg, K.A., Hanson, N.Q., and Tsai, M.Y.** (2006). Incorporation and clearance of omega-3 fatty acids in erythrocyte membranes and plasma phospholipids. *Clinical Chemistry* **52**(12): 2265-2272.
- Caughey, G.E., Mantzioris, E., Gibson, R.A., Cleland, L.G., and James, M.J.** (1996). The effect on human tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 beta production of diets enriched in n-3 fatty acids from vegetable oil or fish oil. *American Journal of Clinical Nutrition* **63**(1): 116-122.
- Chambrier, C., Guiraud, M., Gibault, J.P., Labrosse, H., and Bouletreau, P.** (1999). Medium- and long-chain triacylglycerols in postoperative patients: Structured lipids versus a physical mixture. *Nutrition* **15**, 274-277.
- Chandrasoma, P., and Taylor, C.R.** (1998). *Concise Pathology*. 3rd edition. Stamford, Connecticut : Appleton & Lange. 990 s. ISBN 0838514995.
- Curtis-Prior, P.** (2004). *The Eicosanoids*. 1 edition. Chichester, West Sussex : Wiley. 654 s. ISBN 0471489840.
- De Jonge, H.W., Dekkers, D.H.W., and Lamers, J.M.J.** (1995) Polyunsaturated fatty acids and signalling via phospholipase C-beta and A(2) in myocardium. In *Satellite Symposium on Signal Transduction in Normal and Diseased Myocardium*, at the XVth World Congress of the International-Society-for-Heart-Research, Rotterdam, Netherlands, 199-210.
- Dinarello, C.A.** (2000). Proinflammatory cytokines. *Chest* **118**, 503-508.

- Dinarello, C.A.** (2010). Anti-inflammatory Agents: Present and Future. *Cell* **140**, 935-950.
- De Caterina, R., and Basta, G.** (2000). n-3 fatty acids and the inflammatory response - biological background. In Consensus Meeting on Clinical Effect, Biological Background, and Research Priorities on n-3 Fatty Acids (Florence, Italy: W B Saunders Co Ltd), pp. D42-D49.
- De Grotte, D., Zangerle, P.F., Gevaert, Y., Fasotte, M.F., Beguin, Y., Noizat-Pirenne, E., Gathy, R., Lopez, M., Dehart, I., Igot, D., Baudrihay, M., Delacroix, D. and Franchimont, P.** (1992) Direct stimulation of cytokines (IL-1, TNF-alpha, IL-6, IL-2, INF-gamma, GM-CSF) in whole blood. I. Comparison with isolated PBMC stimulation. *Cytokine* **4**: 239-248
- Deckelbaum, R.J., Worgall, T.S. and Seo, T.** (2006). n-3 fatty acids and gene expression. *American Journal of Clinical Nutrition* **83**(6): 1520S-1525S.
- Del Rio, D., Stewart, A.J., and Pelegrini, N.** (2005). A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition Metabolism and Cardiovascular Diseases* **15**(4): 316-328.
- Endres, S., Ghorbani, R., Kelley, V.E., Georgilis, K., Lonnemann, G., van der Meer, J.W., Cannon, J.G., Roggers, T.S., Klempner, M.S., and Weber, P.C.** (1989). The effect of dietary supplementation with n-3 poly-unsaturated fatty-acids on the synthesis of interleukin-1 and tumor necrosis factor by mononuclear-cells. *New England Journal of Medicine* **320**(5): 265-271.
- Eritsland, J.** (2000). Safety considerations of polyunsaturated fatty acids. *American Journal of Clinical Nutrition* **71**(1): 197S-201S.
- Eritsland, J., Arnesen, H., Seljeflot, I., and Hostmark, A.T.** (1995). Long-term metabolic effects of n-3 polyunsaturated fatty-acids in patients with coronary-artery disease. *American Journal of Clinical Nutrition* **61**(4): 831-836.
- Feghali, C.A. and Wright, T.M.** (1997). Cytokines in acute and chronic inflammation. *Frontiers in Bioscience* **2**: 12-26
- Fleming, C.R., Smith, L.M. and Hodges, R.E.** (1976). Essential fatty acid deficiency in adults receiving total parenteral nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition* **29**: 976.
- Folch, J., Lees, M., and Stanley, G.H.S.** (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry* **226**(1): 497-509.
- Fumeron, F., Brigant, L., Ilivier, F., de Prost, D., Driss, F., Darcet, P., Bard., J.M., Parra, H.J., Fruchart, J.D., and Apfelbaum, M.** (1991). N-3 polyunsaturated fatty-acids raise low-density lipoproteins, high-density lipoprotein-2, and plasminogen-activator inhibitor in healthy young men. *American Journal of Clinical Nutrition* **54**(1): 118-122.
- Gibney, M.J., Elia, M., Ljungqvist, O., and Dowsett, J.** (2005). *Clinical nutrition*. 1st edition. Oxford (UK) : Blackwell Science. Nutritional support, s. 115-131. ISBN 0632056266.
- Giroux, M. and Descoteaux, A.** (2000). Cyclooxygenase-2 expression in macrophages: Modulation by protein kinase C-alpha. *Journal of Immunology* **165**(7): 3985-3991.
- Gobel, Y., Koletzko, B., Bohles, H.J., Engelsberger, I., Forget, D., Le Brun, A., Peters, T., and Zimmermann, I.** (2003). Parenteral fat emulsions based on olive and soybean oils: A randomized clinical trial in preterm infants. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* **37**, 161-167.
- Goldberg, D.M., and Spooner, R.J.** (1983). Assay of glutathione reductase. In: H.U. Bergmeyer, J. Bergmeyer and M. Grassl, Editors, In *Methods of Enzymatic Analysis*, Weinheim, Verlag Chemie, 258-264.

- Grimm, H., Mertes, N., Goeters, C., Schlotzer, E., Mayer, K., Grimminger, F., and Furst, P.** (2006). Improved fatty acid and leukotriene pattern with a novel lipid emulsion in surgical patients. *European Journal of Nutrition* **45**, 55-60.
- Hack, C.E., Groot, E.D. and Felt-Berma, R.F.** (1989). Increased plasma levels of interleukin-6 in sepsis. *Blood*, **74**, 1704.
- Hallberg, D., Holm, I., Obel, A.L., Schubert, O., and Wretling, A.** (1967). Fat emulsions for complete intravenous nutrition. *Postgraduate Medical Journal* **43**, 307-&.
- Halliwell, B. And Chirico, S.** (1993). Lipid-peroxidation – its mechanism, measurement, and significance. *American Journal of Clinical Nutrition* **57**(5): 715-725.
- Harris, S.G., Padilla, J., Koumas, L., Ray, D. and Phipps, R.P.** (2002) Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends in Immunology* **23**: 144–150.
- Harris, W.S. and von Schacky, C.** (2004) The omega-3 index: a new risk factor for death from coronary heart disease? *Preventive Medicine* **39**:212–20.
- Higdon, J.V., Liu, J., Du, S.H., Morrow, J.D., Ames, B.N., and Wander, R.C.** (2000). Supplementation of postmenopausal women with fish oil rich in eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid is not associated with greater in vivo lipid peroxidation compared with oils rich in oleate and linoleate as assessed by plasma malondialdehyde and F-2-isoprostanes. *American Journal of Clinical Nutrition* **72**(3): 714-722.
- Hise, M., Compher, C., and Brown, J.** (2008). Inflammatory mediators and home parenteral nutrition. *Nutrition in Clinical Practice* **23**(1): 42-48.
- Hodson, L., Skeaff, C.M., and Fielding, B.A.** (2008). Fatty acid composition of adipose tissue and blood in humans and its use as a biomarker of dietary intake. *Progress in Lipid Research* **47**(5): 348-380.
- House, R. V., and Descotes, J.** (2007). *Cytokines in Human Health: Immunotoxicology, Pathology, and Therapeutic Applications*. 1st ed. Totowa, NJ: Humana Press. 376 s. ISBN 1617375861.
- Hulbert, A., J., Turner, N., Storlie, L., H., and Else, P., L.** (2005). Dietary fats and membrane function: implications for metabolism and disease. *Biological Reviews* **80**(1): 155-169.
- Jiang, Z.M., Zhang, S.Y., Wang, X.R., Yang, N.F., Zhu, Y., and Wilmore, D.** (1993). A comparison of medium-chain and long-chain triglycerides in surgical patients. *Annals of Surgery* **217**, 175-184.
- Jiang, Z.M., Wilmore, D.W., Wang, X.R., Wei, J.M., Zhang, Z.T., Gu, Z.Y., Wang, S., Han, S.M., Jiang, H., and Yu, K.** (2010). Randomized clinical trial of intravenous soybean oil alone versus soybean oil plus fish oil emulsion after gastrointestinal cancer surgery. *British Journal of Surgery* **97**, 804-809.
- Kaley, J.S., Meng H.C. and Bingham, C.** (1959). Some hematologic changes in patients receiving multiple intravenous infusions of fat emulsion. *American Journal of Clinical Nutrition* **7**(6): 652-656.
- Katan, M. B., Deslypere, J., P., van Birgelen, A., P., Penders, M., and Zegwaard, M.** (1997). Kinetics of the incorporation of dietary fatty acids into serum cholesteryl esters, erythrocyte membranes, and adipose tissue: an 18-month controlled study. *Journal of Lipid Research* **38**(10): 2012-2022.
- Kishimoto, T.** (1989). The biology of interleukin-6. *Blood* **74**: 1-10.
- Koller, M., Senkal, M., Kemen, M., Konig, W., Zumtobel, V., and Muhr, G.** (2003). Impact of omega-3 fatty acid enriched TPN on leukotriene synthesis by leukocytes after major surgery. *Clinical Nutrition* **22**, 59-64.
- Kristensen, S. D., Schmidt, E., B., and Dyerberg, J.** (1989). Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and human platelet function – a review with

- particular emphasis on implications for cardiovascular disease. *Journal of Internal Medicine* **225**: 141-150.
- Kumar, V., Fausto, N., and Abbas, A.** (2005). Robbins and Cotran pathologic basis of disease. Seventh Edition. Philadelphia, Pennsylvania : Saunders. 1525 s. ISBN 9780721601878.
- Lai, H.S., and Chen, W.J.** (2000). Effects of medium-chain and long-chain triacylglycerols in pediatric surgical patients. *Nutrition* **16**, 401-406.
- Laneuville, O., Breuer, D.K., Xu, N.X., Huang, Z.H., Gage, D.A., Watson, J.T., Lagarde, M., Dewitt, D.L., and Smith, W.L.** (1995) Fatty-acid substrate specificities of human prostaglandin endoperoxide-h synthase-1 and synthase-2 - formation of 12-hydroxy- (9z,13e/z,15z)-octadecatrienoic acids from alpha-linolenic acid. *Journal of Biological Chemistry*, **270**(33), 19330-19336.
- Lee, T.H., Menciahuerta, J.M., Shih, C., Corey, E.J., Lewis, R.A., and Austen, K.F.** (1984) Characterization and biologic properties of 5,12-dihydroxy derivatives of eicosapentaenoic acid, including leukotriene-b5 and the double lipoxygenase product. *Journal of Biological Chemistry*, **259**(4), 2383-2389.
- Lindgren, B.F., Ruokonen, E., Magnusson-Borg, K., and Takala, J.** (2001). Nitrogen sparing effect of structured triglycerides containing both medium-and long-chain fatty acids in critically ill patients; a double blind randomized controlled trial. *Clinical Nutrition* **20**, 43-48.
- Ling, P.R., Khaodhiar, L., Bistrrian, B.R., Keane-Ellison, M., Thibault, A., Tawa, N.** (2001). Inflammatory mediators in patients receiving long-term home parenteral nutrition. *Digestive Diseases and Sciences* **46**(11): 2484-2489.
- Mayer, K., Gokorsch, S., Fegbeutel, C., Hattar, K., Rosseau, S., Walmrath, D., Seeger, W., and Grimminger, F.** (2003a). Parenteral nutrition with fish oil modulates cytokine response in patients with sepsis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **167**, 1321-1328.
- Mayer, K., Meyer, S., Reinholz-Muhly, M., Maus, U., Merfels, M., Lohmeyer, J., Grimminger, F., and Seeger, W.** (2003b). Short-time infusion of fish oil-based lipid emulsions, approved for parenteral nutrition, reduces monocyte proinflammatory cytokine generation and adhesive interaction with endothelium in humans. *Journal of Immunology* **171**, 4837-4843.
- Mayer, K., Fegbeutel, C., Hattar, K., Sibelius, U., Kramer, H.J., Heuer, K.U., Temmesfeld-Wollbruck, B., Gokorsch, S., Grimminger, F., and Seeger, W.** (2003c). Omega-3 vs. omega-6 lipid emulsions exert differential influence on neutrophils in septic shock patients: impact on plasma fatty acids and lipid mediator generation. *Intensive Care Medicine* **29**, 1472-1481.
- Meng, H. C. and Kaley, J.S.** (1965). Effects of multiple infusions of a fat emulsion on blood coagulation liver function and urinary excretion of steroids in schizophrenic patients. *American Journal of Clinical Nutrition* **16**(1): 156-164.
- Mertes, N., Grimm, H., Furst, P., and Stehle, P.** (2006). Safety and efficacy of a new parenteral lipid emulsion (SMOFlipid) in surgical patients: A randomized, double-blind, multicenter study. *Annals of Nutrition and Metabolism* **50**, 253-259.
- Morris, M.C., Evans, D.A., Bienias, J.L., Tangney, C.C., Bennett, D.A., Wilson, R.S., Aggarwal, N., and Schneider, J.** (2003). Consumption of fish and n-3 fatty acids and risk of incident Alzheimer disease. *Archives of Neurology* **60**(7): 940-946.
- Moussa, M., Le Boucher, J., Garcia, J., Tkaczuk, J., Ragab, J., Dutot, G., Ohayon, E., Ghisolfi, J., and Thouvenot, J.P.** (2000). In vivo effects of olive oil-based lipid emulsion on lymphocyte activation in rats. *Clinical Nutrition* **19**, 49-54.
- Nordenstrom, J., Jarstrand, C., and Wiernik, A.** (1979). Decreased chemotactic and

- random migration of leukocytes during intralipid infusion. *American Journal of Clinical Nutrition* **32**, 2416-2422.
- Novák, F., Borovská, J., Vecka, M., Vávrová, L., Kodydková, J., Mráčková, M., Novák, F. sr., Nováková, O., and Žák, A.** (2010). Změny ve složení mastných kyselin v lipidech plazmy a erytrocytů u kriticky nemocných v průběhu sepsy. *Časopis lékařů českých* **149**(7), 324-331.
- Nugent, K.M.** (1984). Intralipid effects on reticuloendothelial function. *Journal of Leukocyte Biology* **36**(2): 123-132.
- Ormerod, L.D., Garsd, A., Abelson, M.B., and Kenyon, K.R.** (1990). Effects of altering the eicosanoid precursor pool on neovascularization and inflammation in the alkali-burned rabbit cornea. *American Journal of Pathology* **137**, 1243-1252.
- Ota, D.M., Jessup, J.M., Babcock, G.F., Kirschbaum, L., Mountain, C.F., McMurtrey, M.J., and Copeland, E.M.** (1984). Immune function during soybean oil emulsion infusion. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* **8**(1): 84-84.
- Pironi, L., Ruggeri, E., Zolezzi, C., Savarino, L., Incasa, E., Beluzzi, A., Munarini, A., Piazzi, S., Tolomelli, M., Pizzoferrato, A., and Miglioli, M.** (1998). Lipid peroxidation and antioxidant status in adults receiving lipid-based home parenteral nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition* **68**(4): 888-893.
- Puder, M., Valim, C., Meisel, J.A., Le, H.D., de Meijer, V. E., Robinson, E.M., Zhou, J., Duggan, C. and Gura, K.M.** (2009) Parenteral fish oil improves outcomes in patients with parenteral nutrition-associated liver injury. *Ann Surg*;250:395-402.
- Raetz, C.R.H. and Whitfield C.** (2002). Lipopolysaccharide endotoxins. *Annual Review of Biochemistry* **71**: 635-700.
- Reimund, J.M., Rahmi, G., Escalin, G., Pinna, G., Finck, G., Muller, C.D., Duclos, B., and Baumann, R.** (2005). Efficacy and safety of an olive oil-based intravenous fat emulsion in adult patients on home parenteral nutrition. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* **21**, 445-454.
- Rola-Pleszczynski, M. and Stankova, J.** (1992) Leukotriene B4 enhances interleukin-6 (IL-6) production and IL-6 messenger RNA accumulation in human monocytes in vitro: transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *Blood* **80**:1004-1011.
- Rose, H.G., and Oklander, M.** (1965). Improved procedure for extraction of lipids from human erythrocytes. *Journal of Lipid Research* **6**(3): 428-&.
- Rossi, A., and Sawatzky, D.A.** (2008). *The resolution of inflammation*. 1st ed. Basel: Birkhäuser Verlag. s. 250. ISBN 9783764375058.
- Royette, C.E., Calder, P.C., Dupertuis, Y.M., and Pichard, C.** (2004). n-3 Polyunsaturated fatty acids and colon cancer prevention. *Clinical Nutrition* **23**(2): 139-151.
- Rubin, M., Moser, A., Vaserberg, N., Greig, F., Levy, Y., Spivak, H., Ziv, Y., and Lelcuk, S.** (2000). Structured triacylglycerol emulsion, containing both medium- and long-chain fatty acids, in long-term home parenteral nutrition: A double-blind randomized cross-over study. *Nutrition* **16**, 95-100.
- Sanders, T.A.** (2000) Polyunsaturated fatty acids in the food chain in Europe. *Journal of Clinical Nutrition* **71**(suppl):176-8
- Schade, I., Rohm, K.D., Schellhaass, A., Mengistu, A., Boldt, J., Piper, S.N.** (2008) Inflammatory response in patients requiring parenteral nutrition-comparison of a new fish oil containing emulsion (SMOFlipid®) versus an olive/soybean oil-based formula. *Critical Care* **12** (suppl 2):56-57.
- Schepens, M.A., Roelofs, H.M.J., Peters, W.H.M. and Wanten, G.J.A.** (2006). No evidence of oxidative stress in patients on home parenteral nutrition. *Clinical nutrition* **25**: 939-948

- Schlotzer, E., and Kanning, U.** (2004). Elimination and tolerance of a new parenteral lipid emulsion (SMOF) - A double-blind cross-over study in healthy male volunteers. *Annals of Nutrition and Metabolism* **48**, 263-268.
- Serhan, C.N.** (2005). Novel eicosanoid and docosanoid mediators: resolvins, docosatrienes, and neuroprotectins. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* **8**(2): 115-121.
- Serhan, C.N., Haeggstrom, J.Z. and Leslie, C.C.** (1996). Lipid mediator networks in cell signaling: Update and impact of cytokines. *Faseb Journal* **10**(10): 1147-1158.
- Serhan, Ch. N., Ward, P. A., and Gilroy, D. W.** (2010). *Fundamentals of Inflammation*. 1 edition. New York : Cambridge University Press. 488 s. ISBN 9780521887298.
- Shikora, S., and Blackburn, G. L.** (1997). *Nutrition support: theory and therapeutics*. 1st edition. New York : Chapman and Hall. Rationale for nutrition support, s. 10. ISBN 0412066815.
- Siddiqui, R.A., Harvey, K.A., and Zaloga, G.P.** (2008). Modulation of enzymatic activities by n-3 polyunsaturated fatty acids to support cardiovascular health. *Journal of Nutritional Biochemistry* **19**(7): 417-437.
- Simopoulos, A.P.** (1991). Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *American Journal of Clinical Nutrition* **54**(3): 438-463.
- Simopoulos, A.P.** (2000) Human requirement for N-3 polyunsaturated fatty acids. *Poultry Science* **79**(7): 961-70.
- Strieter, R.M., Kunkel, S.L., and Bone, R.C.** (1993). Role of tumor-necrosis-factor-alpha in disease states and inflammation. *Critical Care Medicine* **21**(10): S447-S463.
- Stulnig, T.M., Huber J., Leitinger, N., Imre, E.M., Angelisova, P., Nowotny, P. and Waldhausl, W.** (2001). Polyunsaturated eicosapentaenoic acid displaces proteins from membrane rafts by altering raft lipid composition. *Journal of Biological Chemistry* **276**(40): 37335-37340.
- Svačina, Š.** (2008). *Klinická dietologie*. 1. vydání. Grada, Praha. Parenterální výživa, s. 67-70. ISBN 80-247-2256-6.
- Štípek, S., Crkovská J., and Dvořák, V.** (1995). Spectrophotometric assay for superoxide dismutase controlled by PC-programme developed in LabWindows system. *Klin. Biochem. Metab.* **3**, 93–97.
- Štípek, S., Borovanský, J., Čejková, J., Homolka, J., Klener, P., Lukáš., M., Špičák, J., Tesař, V., Zeman, M., and Žák, A.** (2002). *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci*. 1. vydání. Grada, Praha. ISBN 80-716-9704-4
- Trebble, T., Arden, N.K., Stroud, M.A., Wootton, S.A., Burdge, G.C., Miles, E.A., Ballinger, A.B., Thompson, R.L. and Calder, P.C.** (2003) Inhibition of tumour necrosis factor-a and interleukin 6 production by mononuclear cells following dietary fishoil supplementation in healthy men and response to antioxidant co-supplementation. *British Journal of Nutrition* **90**, 405–412.
- Tvrzicka, E., Vecka, M., Stankova, B., and Zak, A.** (2002) Analysis of fatty acids in plasma lipoproteins by gas chromatography-flame ionisation detection. Quantitative aspects. *Anal Chim Acta* **465**, 337–350
- Ulrich, H., Pastores, S.M., Katz, D.P., and Kvetan, V.** (1996). Parenteral use of medium-chain triglycerides: A reappraisal. *Nutrition* **12**, 231-238.
- Vahedi, K., Atlan, P., Joly, F., Le Brun, A., Evard, D., Perennec, V., Roux-Haguenu, D., Bereziat, G., and Messing, B.** (2005). A 3-month double-blind randomised study comparing an olive oil- with a soyabean oil-based intravenous lipid emulsion in home parenteral nutrition patients. *British Journal of Nutrition* **94**, 909-916.
- Valagussa, F., Franzosi, E., and Tuci, C.** (1999). Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the

- GISSI-Prevenzione trial. *Lancet* **354**(9177): 447-455.
- Vance, D.E., and Vance, J.E.** (2002) *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes*. 2nd ed., Elsevier, Amsterdam, 04-448-2364-6.
- Vidgren, H.M., Agren, J.J., Schwab, U., Rissanen, T., Hänninen, O., and Usitupa, M.I.** (1997). Incorporation of n-3 fatty acids into plasma lipid fractions, and erythrocyte membranes and platelets during dietary supplementation with fish, fish oil, and docosahexaenoic acid-rich oil among healthy young men. *Lipids* **32**(7): 697-705.
- Von Schacky, C., Fischer, S., and Weber, P.C.** (1985). Long-term effects of dietary marine omega-3 fatty acids upon plasma and cellular lipids, platelet function and eicosanoid formation. *Journal of Clinical Investigation* **76**(4): 1626-1631.
- Vinnars, E., and Hammarqvist, F.** (2004). 25th Arvid Wretling's Lecture - Silver anniversary, 25 years with ESPEN, the history of nutrition. *Clinical Nutrition* **23**, 955-962.
- Wachtler, P., Konig, W., Senkal, M., Kemen, M., and Koller, M.** (1997). Influence of a total parenteral nutrition enriched with omega-3 fatty acids on leukotriene synthesis of peripheral leukocytes and systemic cytokine levels in patients with major surgery. *Journal of Trauma-Injury Infection and Critical Care* **42**, 191-198.
- Wanten, G.J.A. and Calder, P.C.** (2007). Immune modulation by parenteral lipid emulsions. *American Journal of Clinical Nutrition* **85**(5): 1171-1184.
- Webb, A.N., Hardy, P., Peterkin, M., Lee, O., Shalley, H., Croft, K.D., Mori, T.A., Heine, R.G., and Bines, J.E.** (2008). Tolerability and safety of olive oil-based lipid emulsion in critically ill neonates: A blinded randomized trial. *Nutrition* **24**, 1057-1064.
- Weisiger, B.A., and Fridovich, I.** (1973). Superoxide dismutase. Organelle specificity. *J Biol Chem* **248**, 3582-92.
- Wichmann, M.W., Thul, P., Czarnetzki, H.D., Morlion, B.J., Kemen, M., and Jauch, K.W.** (2007). Evaluation of clinical safety and beneficial effects of a fish oil containing lipid emulsion (Lipoplus, MLF541): Data from a prospective, randomized, multicenter trial. *Critical Care Medicine* **35**, 700-706.

Internetové zdroje:

<http://pharm.kku.ac.th/thai/department/clinic/DispensingPharmacy/iv/iv.htm>

<http://trialx.com/curebyte/2011/06/16/what-is-nutrition-parenteral/>

<http://www.nutritioncare.org/wcontent.aspx?id=266>

<http://www.pfk.com.au/3947.htm>