

Disertační práce byla vypracována v rámci *kombinovaného* studia doktorského studijního programu Fyziologie a patofyziologie člověka na Interní klinice 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy

Školitel: prof. MUDr. Jiří Charvát, CSc, Interní klinika 2.LF UK a FN Motol

Oponenti:

Obhajoba se bude konat před komisí pro obhajoby oborové rady Fyziologie a patofyziologie člověka dne v od hod.

Předsedou komise pro obhajobu disertační práce byl jmenován:

Předseda oborové rady a garant doktorského studijního programu:
Prof. MUDr. Otomar Kittnar, MBA, CSc.
Fyziologický ústav 1. LF UK

Děkan fakulty: prof. MUDr. Vladimír Komárek, CSc.

Tato práce vznikla za podpory grantu Ministerstva zdravotnictví České republiky č. 00064203

S disertační prací je možno se seznámit na Oddělení Ph.D. studia děkanátu 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy, V Úvalu 84, 150 06 Praha 5 (tel. 224 435 836).

1 Obsah

1	Obsah.....	3
2	Abstrakt.....	4
3	Abstract.....	5
4	Úvod do problematiky.....	6
4.1	Cystická fibróza.....	6
4.2	Oxidační stres.....	8
4.3	Imunonutrice.....	9
5	Hypotézy a cíle práce.....	10
6	Metodika.....	11
6.1	Soubor pacientů.....	11
6.2	Statistická analýza.....	12
7	Výsledky.....	13
7.1	Základní charakteristika souboru.....	13
7.2	Vliv aplikace imunonutrice na nutriční parametry ve sledovaném souboru.....	13
7.3	Cystická fibroza a zánětlivé biomarkery.....	15
7.4	Cystická fibróza a oxidační stres.....	15
7.5	Sledování bezpečnosti podání imunonutrice.....	16
7.6	Dlouhodobé sledování.....	17
8	Diskuze.....	19
8.1	Vliv aplikace imunonutrice na nutriční parametry ve sledovaném souboru.....	19
8.2	Cystická fibroza a zánětlivé biomarkery.....	21
8.3	Cystická fibróza a oxidační stres.....	21
8.4	Sledování bezpečnosti podání imunonutrice.....	23
8.5	Dlouhodobé sledování.....	23
9	Vztah práce k testovaným hypotézám.....	24
10	Závěry.....	25
11	Conclusions.....	26
12	Seznam literatury.....	27
13	Dodatek disertační práce – seznam publikací autora práce.....	29
13.1	Publikace, které jsou podkladem disertační práce.....	29
13.2	Publikace bez vztahu k tématu disertační práce.....	29

2 Abstrakt

Význam imunonutrice u pacientů s cystickou fibrózou

Cílem práce bylo zhodnocení aplikace imunonutrice u dospělých s cystickou fibrózou (CF) a malnutricí, užívajících nejméně rok enterální výživu formou standardního sippingu. U 30 dospělých nemocných byla imunonutrice (přípravek Impact) podávána po dobu 8 týdnů. Po 8 týdnech se pacienti vrátili ke standardní nutriční podpoře. Aplikace imunonutrice vedla k významnému snížení systolického tlaku a tepové frekvence, ke zvýšení glomerulární filtrace a k významným změnám v plazmatickém aminoacidogramu. Významně poklesla hodnota sérového amyloidu-A (SAA), která se po ukončení intervence opětovně zvýšila. Podání imunonutrice bylo ale asociováno se vzestupem sérového malonyldialdehydu, poklesem glutathionperoxidázy a selenu v séru. Podání imunonutrice vedlo tedy ke zvýšení markerů oxidačního stresu, avšak téměř všechny hodnoty zůstaly ve fyziologických mezích. Při 6-letém sledování byla dlouhodobá prognóza v multivariantní analýze závislá pouze na vstupním FEV1, respektive na stupni plicního postižení. Četnost a trvání následných hospitalizací a dlouhodobá prognóza byly významně asociovány s hladinou plazmatického fibrinogenu. Hlavním zjištěním práce je skutečnost, že aplikace imunonutrice u nemocných s CF vede k snížení aktivity zánětlivých parametrů (SAA). Je ale asociována se zvýšením sérového malonyldialdehydu jako markeru oxidačního stresu. Na podkladě našich výsledků je pravděpodobné, že toto zvýšení oxidačního stresu nemá negativní klinické důsledky.

Klíčová slova: cystická fibróza, imunonutrice, malnutrice, oxidační stres, zánětlivé parametry

3 Abstract

The impact of immunonutrition in patients with cystic fibrosis

The aim of the study was to evaluate the application of immunonutrition in adults with cystic fibrosis (CF) and malnutrition, who have been receiving enteral nutrition in the form of standard sipping for at least a year. In 30 adult patients, immunonutrice (Impact) was given for 8 weeks. After 8 weeks, patients returned to standard nutritional support. The application of immunonutrition led to a significant reduction in systolic blood pressure and heart rate, to an increase in glomerular filtration and significant changes in the plasma aminoacidogram. Serum amyloid-A (SAA) levels decreased significantly and increased again after the intervention. However, immunonutrition administration was associated with an increase in serum malonyldialdehyde, a decrease in serum glutathione peroxidase and selenium. Thus, administration of immunonutrition led to an increase in oxidative stress, but almost all values remained within physiological limits. At 6-year follow-up, the long-term prognosis in the multivariate analysis depended only on baseline FEV1 and the degree of pulmonary involvement, respectively. The frequency and duration of subsequent hospitalizations and long-term prognosis were significantly associated with plasma fibrinogen levels. The main finding of the work is the fact that the application of immunonutrition in patients with CF leads to a reduction in the activity of inflammatory parameters (SAA). However, it is associated with an increase in serum malonyldialdehyde as a marker of oxidative stress. Based on our results, it is likely that this increase in oxidative stress does not have negative clinical consequences.

Key words: cystic fibrosis; immunonutrition; inflammatory parameters; malnutrition; oxidative stress

4 Úvod do problematiky

4.1 Cystická fibróza

Cystická fibróza (CF) je vrozené multisystémové onemocnění s autozomálně recesivním (AR) typem dědičnosti. Je způsobeno mutací genu pro transmembránový regulátor vodivosti (CFTR – cystic fibrosis transmembran conductance regulator), která vede k dysfunkci žláz s vnější sekrecí, vysoké koncentraci chloridů v potu a tvorbě abnormálně vazkého hlenu v dýchacím, trávicím a pohlavním systému. V klinickém obraze pak dominuje chronické sinopulmonální onemocnění, dysfunkce trávicího systému s poruchou výživy a obstruktivní azoospermie.

V současné době je známo více než 2000 těchto mutací. Nejčastější mutací vyskytující se v České republice je F508del (delece fenylalaninu na pozici 508), tvořící asi 70% CF chromozomů pacientů s CF. Mutace CFTR genu se rozdělují do šesti tříd odlišujících se typem poškození i výsledným klinickým dopadem. Výskyt CF v České republice je podle dat vycházejících z prenatální diagnostiky a novorozeneckého screeningu 1:4023 (Fila 2014). Zastoupení obou pohlaví je vyrovnané. Ročně se v ČR narodí přibližně 35 dětí s cystickou fibrózou.

4.1.1 Patogeneze

CFTR je protein s funkcí chloridového kanálu lokalizovaný do apikální membrány epiteliálních buněk. Gen pro CFTR je přítomen ve všech buňkách lidského organismu, avšak pouze v epiteliálních buňkách je významně exprimován. Mimo cAMP řízený transport chloridových iontů ovlivňuje a reguluje i funkce jiných transmembránových proteinů. Právě lokalizace na membráně epiteliálních buněk vede k typickému postižení žláz se zevní sekrecí. Patofyziologie samotného děje vedoucího k poškození jednotlivých orgánů zahrnuje několik základních mechanismů. Jedním je samotná porucha transportu chloridů, bikarbonátů a tiokyanátů. Tím je narušena hypotonicita sekretu, která za normální situace aktivuje antimikrobiálně působící peptidy defenziny. To vede k narušení cytkonové odpovědi, snížení obranyschopnosti a nakonec k rozvoji zánětu. Druhou cestou je nadměrná resorbce sodíku a vody z produkovaného hlenu cestou epiteliálního natriového kanálu (ENaC), jehož funkce je správně fungujícím CFTR proteinem blokována. Tím dochází k vzestupu viskozity hlenu.

4.1.2 Klinický obraz

Výsledný klinický obraz u pacientů s CF je dán věkem manifestace a mírou postižení jednotlivých orgánových systémů (respirační, gastrointestinální, reprodukční) a je značně variabilní.

4.1.2.1 Postižení respiračního systému

V dýchacích cestách vede porušený transport chloridových a natriových iontů k tvorbě viskózního obtížně odstranitelného hlenu (Wine 1999), jehož hromadění je příčinou produktivního kašle, který patří k nejčastějším klinickým projevům onemocnění. Obtížná toaleta dýchacích cest se stagnujícím sekretem jsou příčinou sekundární bakteriální infekce a rozvoje neutrofilního zánětu. Mezi nejčastější mikrobiologické agens patří *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa* a komplex *Burkholderia cepacia*. Lokálně produkované kyslíkové radikály a proteázy buněk imunitního systému jsou zodpovědné za poškození plicní tkáně se vznikem bronchiektázií, obstrukční ventilační poruchy a následnou respirační insuficienci (Boucher 2004).

4.1.2.2 Postižení gastrointestinálního systému

S postupným prodlužováním délky života pacientů s CF narůstá význam a četnost gastrointestinálních obtíží jako zdroje morbidity nemocných. V gastrointestinálním systému postihuje CF pankreas, játra a střevo.

Postižení pankreatu nacházíme až u 90% pacientů s CF a vede k typické fibróze a cystické přestavbě, která dala tomuto onemocnění jméno. Ztráta funkční tkáně slinivky se zánikem Langerhansových ostrůvků vede k deficitu inzulínu s rozvojem diabetu mellitu (CFRD Cystic fibrosis- related diabetes mellitus). Selhání exokrinní sekrece patří ke klinicky nejzávažnějším komplikacím CF. Nediagnostikovaná a neléčená způsobuje malabsorpci tuků, proteinů a řady mikronutrientů (vit A, D, E, K). Nepřímo se podílí na poruše růstu a kostním poškození. Substituce pankreatických enzymů představuje jeden pilířů komplexní terapie pacientů s CF.

4.1.3 **Nutrice u pacientů s CF**

Problematika nutrice u pacientů s CF je z pohledu prognózy onemocnění, morbidity a mortality zásadní. Etiologie obtíží je multifaktoriální s podílem malabsorpce, zvýšeného energetického výdeje (Zemel et al. 2000) a snížené chuti k jídlu v důsledku chronické infekce (Reilly et al. 1997). Ke správné a komplexní léčbě CF patří nutriční podpora, suplementace jednotlivých nutrientů a ovlivnění malabsorpce.

4.1.3.1 Deficit nutrientů

Celková energetická potřeba je v podstatě u všech pacientů s CF zvýšená. K nejvýznamnějším nutrientům, jejichž deficit CF provází, patří vitaminy A, D, E a K

4.1.3.2 Formy nutriční podpory

Dosažení a udržení dobrého nutričního stavu patří k hlavním cílům léčby pacientů s CF. K pokrytí zvýšené energetické potřeby vyžaduje velká část pacientů s CF některou z forem dlouhodobé nutriční podpory. K nejčastěji používaným formám nutriční podpory patří sipping. Je spojen s pozitivním efektem na nutriční parametry a plicní funkce (Shimmin et al. 2019). Základem léčby pankreatické insuficience je substituce pankreatických enzymů.

4.2 Oxidační stres

Oxidační stres je proces sehrávající důležitou roli v patogenezi řady chronických onemocnění a stárnutí organismu obecně. Z těchto důvodů je v řadě prací intenzivně zkoumán. Oxidační stres je podmíněn tvorbou volných radikálů, zvláště pak volných kyslíkových radikálů ROS (reactive oxygen species) a jejich působením na buňky organismu. K hlavním producentům volných radikálů patří dýchací řetězec mitochondrií, fagocytující buňky, lysozomy a další. Rozhodující je pak poměr mezi produkcí oxidačních produktů a antioxidační kapacitou organismu (Finkel a Holbrook 2000). Oxidační stres vede k poškození DNA, oxidaci polynenasycených mastných kyselin, alteraci mitochondriálních funkcí, poškození buněčné membrány a může vyústit až ve smrt buňky (Holze et al. 2018).

4.2.1 Biomarkery oxidačního stresu

Měření oxidačního stresu je komplikováno velmi krátkým biologickým poločasem volných radikálů, které nelze přímo měřit. K jeho stanovení se tak využívají produkty peroxidace lipidů. K nejznámějším patří malonyldialdehyd (MDA), izoprostan F₂, 4-hydroxyalkeny .

MDA je konečný produkt oxidace polynenasycených mastných kyselin volnými kyslíkovými radikály. MDA může reagovat se strukturami DNA za vzniku antigenních sloučenin, které podněcují tvorbu specifických protilátek. Ty se pak podílejí na akcentaci aterosklerózy (Duryee et al. 2010).

4.2.2 Antioxidační mechanismy

Na endogenní antioxidační aktivitě se podílí řada enzymatických i neenzymatických systémů. K nejdůležitějším intracelulárním antioxydačním enzymatickým systémům patří superoxiddismutáza (SOD). Další enzymatický systém glutathion peroxidáza (GPx) se vyskytuje ve dvou variantách, na selenu nezávislé formě GST a na selenu závislé GPx, a sehrává významnou roli v metabolismu antioxidačně působícího glutathionu.

Neenzymatické systémy pak zahrnují řadu vitaminů (vitamin E a C) a stopových prvků (např. selen). K neenzymatickým antioxidačně působícím látkám patří také bilirubin, což vysvětluje nižší riziko aterosklerózy u pacientů s Gilbertovým syndromem (vrozená hyperbilirubinemie).

4.3 Imunonutrice

Imunonutrice je relativně nový směr zabývající se interakcemi mezi výživou a imunitním systémem. Hlavním cílem je modulace imunitního systému a zánětlivé odpovědi. Za tímto účelem podáváme nutrienty, jejichž dávky přesahují běžně užívaná množství. Mezi hlavní imunonutrienty řadíme arginin, glutamin a ω -3 mastné kyseliny. Vzhledem k faktu, že v průběhu zánětu se zvyšuje oxidační stres, řadíme mezi imunonutrienty i látky s antikoaxidačním účinkem.

4.3.1 Dosavadní vědecké poznatky o klinickém použití imunonutrice

Významem a využitím imunonutrice v klinické péči o pacienty se zabývá řada vědeckých týmů a pracovišť. Z doposud provedených studií a analýz lze imunonutrici považovat za užitečnou a indikovanou pro specifickou skupinu pacientů. Typický pacient, který z dané terapie bude nejvíce profitovat, je ten, který se připravuje na velký chirurgický výkon z onkologické i neonkologické indikace (Yu et al. 2020). Naopak nevhodná je imunoterapie u akutních infekčních onemocnění (Radrizzani et al. 2006). V klinické praxi se setkáváme s celou řadou stavů a onemocnění, u kterých z jejich patofyziologické podstaty lze pozitivní efekt imunonutrice předpokládat, ale prozatím neexistují dostatečná data k ospravedlnění jejího rutinního podávání. Mezi tato onemocnění provázená recidivujícími záněty a zvýšeným oxidačním stresem řadíme i cystickou fibrózu.

5 Hypotézy a cíle práce

Cíl práce

Posouzení vlivu imunonutrice na vybrané metabolické a zánětlivé parametry u nemocných s cystickou fibrozou a malnutricí. Posouzení bezpečnosti aplikace imunonutrice v období po prokázané akutní exacerbaci plicní infekce.

Vědecká hypotéza

Při podání imunonutrice u nemocných s cystickou fibrozou a malnutricí dochází k metabolickým změnám vedoucím k stimulaci imunitního systému, která vede k poklesu aktivity zánětu, což může pozitivně ovlivnit prognózu.

6 Metodika

6.1 Soubor pacientů

Studie byla provedena v letech 2014-2015 na Interní klinice 2. LF UK a FN Motol. Všichni pacienti jsou dlouhodobě sledováni s cystickou fibrózou na Pneumologické klinice 2. LF UK a FN Motol. Vstupním kritériem byl věk nad 18 let a dlouhodobá enterální nutriční podpora v délce trvání alespoň jeden rok. Pacienti v dobrém nutričním stavu bez potřeby nutriční podpory nebo pacienti s parenterální výživou byli vyřazeni. Před zařazením do studie byla klinickým vyšetřením a laboratorními testy vyloučena přítomnost akutní nebo exacerbace chronické infekce.

Po vstupním klinickém vyšetření bylo provedeno vyšetření nutričního stavu, biochemických a hematologických parametrů, zánětlivé aktivity, oxidačního stresu a antioxidační kapacity. Po vstupním klinickém a laboratorním vyšetření byla změněna výživa z Nutridrinku na imunonutrici (Impact Nestle, Switzerland) v odpovídající energetické dávce. Srovnání složení Nutridrinku a Impactu je uvedeno v tabulce 1. Po 8 týdnech byly uvedené parametry vyšetřeny znovu a pacientova výživa se vrátila k standardnímu Nutridrinku na dalších 8 týdnů. Na závěr byla provedena stejná sada vyšetření.

Tab.1 Srovnání složení Nutridrinku a preparátu Impact—energetický obsah 100 kcal

	Nutridrink	Impact
Bílkoviny	4 g (16%)	5.6 g (22%)
Sacharidy	12.2 g (49%)	13.3g (53%)
Tuky	3.9 g (35%)	2.8 g (25%)
Vláknina	0.4 g	1.0 g
L-Arginin		1.27 g
Polynenasycené mastné kyseliny		0.65 g
ω3 mastné kyseliny		0.32 g

V průběhu sledování byly hodnoceny změny vybraných parametrů nutriční intervence, zánětu, oxidačního stresu v souvislosti se změnou nutriční intervence. Současně byly sledovány klinické změny, případně změny biochemických a hematologických ukazatelů.

Po ukončení průřezové studie byli nemocní dlouhodobě sledováni na Pneumologické klinice FN v Motole. V průběhu sledování trvajících celkem 6 let byla hodnocena četnost a délka hospitalizací, četnost úmrtí a provedení transplantace plic. Význam vyšetření provedených na začátku studie vzhledem k sledovaným parametrům byl statisticky posouzen.

Hodnocen byl význam spirometrických parametrů – zejména FEV1, hsCRP, SAA, IL1, IL6 jako parametrů zánětu, imunoglobulinů IgM,IgA,IgG, sérového MDA jako parametru oxidačního stresu, BMI, prealbumin, albumin jako parametrů nutriční a plazmatického fibrinogenu.

6.2 Statistická analýza

Statistické vyhodnocení. Číselné hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD. Normalita distribuce dat byla hodnocena vizuální kontrolou histogramu a normálního grafu pravděpodobnosti. Parametrická spojitá data byla porovnávána pomocí Studentových testů a neparametrická pomocí Mann-Whitneyových testů. K prozkoumání vztahu mezi parametrickými a neparametrickými numerickými proměnnými byla použita Pearsonova nebo Spearmanova bivariační korelační analýza. Význam hodnocených parametrů na četnost a délku následných hospitalizací a na dlouhodobou prognózu byl hodnocen pomocí logistické regrese. Všechny statistické analýzy byly provedeny pomocí Statistica 12.0 (StatSoft, Tulsa, OK)

7 Výsledky

7.1 Základní charakteristika souboru

Celkem bylo do studie zařazeno 30 pacientů s cystickou fibrózou, 22 mužů a 8 žen. Průměrný věk(\pm SD) byl $24,7\pm 3,6$ let. Všichni pacienti užívali v době zařazení do studie nutriční podporu ve formě standardního sippingu (Nutridrink). K nejčastějším komorbiditám patřily exokrinní pankreatická insuficience (90%), kostní onemocnění(46,6%) a diabetes mellitus (43,3%). Z celého souboru bylo pouze 8 pacientů (26,6%) bez prokázané bronchopulmonální infekce. Z 23 pacientů (76,6%) s prokázanou infekcí byla u 4 (13,3%) zaznamenána infekce více než jedním bakteriálním kmenem.

7.2 Vliv aplikace imunonutriče na nutriční parametry ve sledovaném souboru

Hmotnost pacientů zůstala stejně jako ostatní antropometrické parametry v celém průběhu studie bez významných změn. Některou z antropometrických známek malnutrice jsme vstupně zaznamenali u 29 (96,6%) pacientů souboru. BMI (body mass index) nižší než 18,5 byl u 15 pacientů, tloušťka kožní řasy menší než 12,5 mm u mužů a 16,5 mm u žen byla u 29 pacientů (96,6% z celého souboru).

Pro srovnání specifické skupiny pacientů s CF a jejich výživových parametrů bylo vybráno 55 zdravých kontrolních subjektů. Ti byli zařazeni do studie způsobem, který je srovnatelný se sledovanými pacienty co se týče věku a pohlaví. Konkrétně 35 mužů a 20 žen, průměrný věk byl $25,4 \pm 3,5$ roku. Žádný kontrolní subjekt nedostal žádnou medikaci ani nutriční intervenci. V tabulce 2 jsou uvedeny hodnoty vybraných nutričních parametrů a koncentrace lipidového profilu u kontrolních subjektů ve srovnání s parametry pacientů s CF.

Tab.2 Srovnání vybraných nutričních parametrů a lipidogramu u pacientů s cystickou fibrózou užívajících standardní výživu nebo imunonutriči s kontrolní skupinou

	Kontrolní skupina n=55	Cystická fibróza a Nutridrink n=30	Cystická fibróza a Impact n=30
BMI (kg/m^2)	23.5 ± 2.1	18.8 ± 1.7	18.9 ± 1.6
Albumin (g/L)	43.5 ± 2.9	45.7 ± 2.8	45.0 ± 2.9
Prealbumin (g/L)	0.29 ± 0.12	0.23 ± 0.04	0.22 ± 0.05
Transferrin (g/L)	3.2 ± 0.6	2.8 ± 0.5	2.7 ± 0.4
Celk.cholesterol (mmol/L)	4.2 ± 0.7	3.4 ± 0.6	3.3 ± 0.9
HDL cholesterol (mmol/L)	1.3 ± 0.2	1.1 ± 0.2	1.1 ± 0.2
LDL cholesterol (mmol/L)	2.3 ± 0.4	1.8 ± 0.2	1.9 ± 0.5

Triacylglyceroly (mmol/L)	1.4±0.3	1.1±0.4*	0.9±0.3**
Abs.počet lymfocytů(10 ⁹ /L)	2,00±0,45	2,10±0,51	2,02±0,54

* P<0.05 srovnání mezi kontrolní skupinou a pacienty s CF užívající Nutridrink

** P<0.05 srovnání mezi pacienty s CF užívající Nutridrink a Impact

V tabulce 3 jsou uvedeny plazmatické koncentrace aminokyselin u kontrolní skupiny pacientů ve srovnání se změnami profilu aminokyselin v plazmě pacientů s CF. Pacienti s CF měli významně nižší plazmatickou koncentraci kyseliny glutamové, kyseliny asparagové, serinu, histidinu, tyrosinu, methioninu, fenylalaninu, leucinu, isoleucinu, ornithinu a lysinu. Na druhé straně koncentrace glutaminu, glycinu, citrulinu, argininu a tryptofanu byla významně vyšší u pacientů s CF. Imunonutrice vede ve skupině pacientů s CF k statisticky významnému zvýšení kyseliny glutamové, koncentrace methioninu, argininu a ornithinu v plazmě. Naopak plazmatické koncentrace glutaminu, glycinu, valinu, threoninu a tryptofanu výrazně poklesly.

Tab.3 Srovnání vlivu Nutridrinku a Impactu na plazmatické hladiny aminokyselin u pacientů s CF se zdravými osobami

Aminokyseliny (umol/l)	Kontrolní skupina n=55	Cystická fibróza a Nutridrink n=30	Cystická fibróza a Impact n=30
Kys. Glutamová	205.9±56.9	45.2±20.1*	161.4±55.0**
Kys.Asparagová	42.2±7.9	34.8±10.2*	36.9±6.8
Serin	172.5±53.2	112.7±27.1*	127.7±27.9
Glutamin	334.7±53.7	508.2±87.9*	365.1±53.5**
Histidin	89.9±4.3	80.2±24.3*	84.5±11.6
Glycin	349.9±89.8	423.9±102.6*	286.6±72.8**
Threonin	136.4±51.1	131.9±35.3	95.1±28.8**
Citrulin	25.8±8.6	30.3±10.9*	27.5±9.9
Arginin	56.1±7.0	82.5±20.5*	100.7±16.5**
Alanin	296.2±95.5	344.1±138.8	311.1±104.8
Tyrosin	83.6±32.6	57.8±11.4*	52.3±17.2
Valin	229.3±47.8	230.1±44.9	190.1±39.8**
Methionin	54.6±18.8	23.0±5.4*	42.4±12.5**
Tryptophan	11.5±5.1	16.8±7.5*	2.8±1.0**
Phenylalanin	64.6±8.0	44.2±10.3*	43.2±10.0
Isoleucin	77.0±18.4	63.7±13.5*	75.2±31.3
Leucin	148.8±46.3	98.8±23.0*	104.8±30.0
Ornithin	75.9±14.4	61.7±14.1*	81.3±40.1**
Lysin	194.8±22.9	150.5±36.8*	163.6±66.3

*P<0.05 srovnání kontrolní skupiny s pacienty s CF užívající Nutridrink

** P<0.05 srovnání mezi pacienty s CF užívající Nutridrink a Impact

Vzhledem k zaznamenaným změnám v aminoacidogaramu a hodnotách triglyceridů bylo posouzeno, zda nedochází i ke změnám v tělesné kompozici. Měření tělesného složení pomocí bioimpedanční spektroskopie nezaznamenalo statisticky významné změny v množství tělesné vody, tuku ani beztukové tělesné hmoty.

7.3 Cystická fibroza a zánětlivé biomarkery

V rámci naší práce jsme posuzovali vliv imunonutrice na řadu parametrů souvisejících se zánětlivou odpovědí organismu. Všechny tyto parametry jsou uvedeny v tabulce 4. Byl prokázán statisticky významný pokles SAA ($25,59 \pm 11,04$ vs $17,59 \pm 5,94$) po 8 týdnech podávání imunonutrice. Po návratu zpět k Nutridrinku se SAA opět zvýšil ($17,59 \pm 5,94$ vs $21,20 \pm 8,44$).

Tab.4 Změny zánětlivých parametrů při imunonutrici a návratu k standardní výživě

	Vstupní hodnota	Imunonutrice	Návrat k standardní výživě
SAA (mg/L)	$25,59 \pm 11,04$	$17,59 \pm 5,94^*$	$21,20 \pm 8,44^{**}$
CRP (mg/L)	$13,85 \pm 14,14$	$18,31 \pm 16,93$	$26,99 \pm 28,38$
IL_6 (mM)	$8,33 \pm 8,25$	$7,47 \pm 6,31$	$6,25 \pm 5,95$
IL_1 (mM)	$10,14 \pm 4,54$	$11,24 \pm 5,95$	$9,04 \pm 4,22$
IgM (g/L)	$1,71 \pm 0,57$	$1,68 \pm 0,51$	$1,85 \pm 0,63$
IgA (g/L)	$3,63 \pm 1,57$	$3,50 \pm 1,49$	$3,70 \pm 1,51$
IgG (g/L)	$16,11 \pm 3,18$	$15,98 \pm 3,38$	$16,62 \pm 3,13$

* $P < 0,05$ srovnání mezi hodnotami vstupními a po imunonutrici u pacientů s CF

** $P < 0,05$ srovnání mezi hodnotami po imunonutrici a po návratu k standardní výživě u pacientů s CF

SAA, serový amyloid A; CRP, C reaktivní protein; IL_6, interleukin 6; IL_1, interleukin 1; IgM, imunoglobulin M; IgA, imunoglobulin A; IgG, imunoglobulin G

7.4 Cystická fibróza a oxidační stres

Další oblastí naší práce bylo posouzení vlivu imunonutrice na vybrané parametry oxidačního stresu. Po 8 týdnech podávání imunonutrice byla prokázána statisticky významná změna ve smyslu elevace MDA ($0,66 \pm 0,18$ vs $0,96 \pm 0,23$). Naopak po návratu pacientů zpět k Nutridrinku došlo k jeho poklesu ($0,96 \pm 0,23$ vs $0,77 \pm 0,23$). Korelace MDA se zánětlivými parametry jsou shrnuty v tabulce 6. Zároveň při podávání imunonutrice došlo k významnému poklesu GpX a jejího kofaktoru selenu, zatímco hodnota SOD ani kofaktoru zinku se významně nezměnila.

Tab.5 Změny parametrů oxidačního stresu při imunonutrici a návratu k standardní výživě

	Vstupní hodnota	Imunonutrice	Návrat k standardní výživě
MDA (umol/L)	$0,66 \pm 0,18$	$0,96 \pm 0,23^*$	$0,77 \pm 0,23^{**}$
SOD (U/gHb)	$1496,9 \pm 319,6$	$1694,8 \pm 321,4$	$1866,5 \pm 363,8$

GpX (U/gHb)	26,76±5,75	22,53±4,33*	19,86±4,05
Selen (umol/L)	86,00±14,62	77,22±13,77*	80,86±17,94
Zinek (umol/L)	12,76±0,89	12,36±1,30	12,65±1,13
Vit E (umol/L)	19,80±6,81	20,55±6,96	20,58±6,43

* P<0.05 srovnání mezi hodnotami vstupními a po imunonutrici u pacientů s CF

** P<0.05 srovnání mezi hodnotami po imunonutrici a po návratu k standardní výživě u pacientů s CF

MDA, malonyldialdehyd; SOD, superoxid dismutáza; GpX, glutation peroxidáza

Vzhledem k významným změnám parametrů zánětu a biomarkerů oxidačního stresu jsme hodnotili vzájemné korelace.

Tab.6 Korelace MDA se zánětlivými parametry

	IgG	IgM	IgA	IL_1	IL_6
MDA – cc	-0.574	-0.187	-0.319	-0.041	-0.487
p	<0.001	0.096	0.003	0.717	<0.001
	SAA	CRP			
MDA – cc	-0.283	-0.436			
p	0.009	<0.001			

MDA, malonyldialdehyd; SAA, sérový amyloid A; CRP, C reaktivní protein; IL_6, interleukin 6; IL_1, interleukin 1; IgM, imunoglobulin M; IgA, imunoglobulin A; IgG, imunoglobulin G; cc, korelační koeficient

7.5 Sledování bezpečnosti podání imunonutrice

K posouzení bezpečnosti podávání imunonutrice jsme v rámci studie posuzovali změny v hodnotách základních fyziologických funkcí, jaterních a pankreatických markerů, renálních funkcí a krevního obrazu.

Statisticky významné změny po 8 týdnech aplikace imunonutrice (Impact) jsme zaznamenali u systolického tlaku krve (115±11 mmHg vs 110±7mmHg) a také u srdeční frekvence (88±15 /min vs 77±17/min). Po návratu k běžné výživě (Nutridrink) došlo k vymizení uvedeného efektu a návratu hodnot na vstupní úroveň.

Tab.7 Změny fyziologických funkcí po imunonutrici a návratu k standardní výživě

	Vstupní hodnota	Imunonutrice	Návrat k standardní výživě
Systolický TK (mmHg)	115±11	110±7*	117±11**
Diastolický TK (mmHg)	69±9	64±8	69±9
Akce srdeční(tep/min)	88±15	77±17*	80±14**

* P<0.05 srovnání mezi hodnotami vstupními a po imunonutrici u pacientů s CF

** P<0.05 srovnání mezi hodnotami po imunonutrici a po návratu k standardní výživě u pacientů s CF

K často postiženým orgánům u pacientů s CF patří játra a slinivka břišní. Proto jsme posuzovali změny v jaterních a pankreatických funkcích v závislosti na typu podávané výživy. V žádném z parametrů jsme nezaznamenali statisticky významné změny, které by se nacházely mimo fyziologické rozmezí pro daný parametr.

Při vyhodnocení renálních parametrů bylo zaznamenáno zvýšení vypočítané cystatinové clearance (tabulka 8).

Tab.8 Změny renálních parametrů při imunonutrici a návratu k standardní výživě

	Vstupní hodnota	Imunonutrice	Návrat k standardní výživě
Cystatin C (mg/L)	0,96±0,12	0,86±0,12*	0,98±0,11**
eGFR-cystatin (ml/s)	1.57±0.32	1.90±0.45*	1.50±0.29**
Kreatinin (umol/L)	64,03±11,04	64,88±11,51	64,88±12,08
Urea (mmol/L)	3.95±1.03	4.31±1.09	4.31±1.03

* P<0.05 srovnání mezi hodnotami vstupními a po imunonutrici u pacientů s CF

** P<0.05 srovnání mezi hodnotami po imunonutrici a po návratu k standardní výživě u pacientů s CF

V parametrech krevního obrazu a spirometrie nebyly zaznamenány žádné významné změny v souvislosti s užíváním imunonutrice nebo jejím vysazením.

7.6 Dlouhodobé sledování

Změny v zánětlivých parametrech u pacientů s CF nás vedly ke snaze zjistit, jaký vliv tyto změny měly na dlouhodobou prognózu. Plazmatický fibrinogen byl negativně a sérový MDA pozitivně korelován s FEV1 měřeným v pozánětlivém období. Nebyla však nalezena žádná korelace mezi FEV1 a hs-CRP, IL-1, IL-6 a SAA. Sledování trvalo 6 let. Endpoint (transplantace nebo exitus) byl zaznamenán u 11 pacientů (2 ženy a 9 mužů). Transplantováni byli dva pacienti, oba muži. Z devíti zemřelých pacientů bylo 7 mužů a 2 ženy. Mortalita ve skupině mužů byla 31,8% u žen 18,2%.

Korelace CRP, IL-1, IL-6, SAA, MDA, plazmatického fibrinogenu, BMI a FEV1 s délkou a počtem následujících hospitalizací jsou uvedeny v tabulce 9 a tabulce 10. Vztahy endpointů (úmrtí nebo transplantace plic) k vyšetřovaným parametrům jsou uvedeny v tabulce 11.

Nicméně v multivariační analýze byla přítomnost endpointů významně spojena pouze s FEV1 (p=0,001) viz tabulka 12.

Tab.9 Srovnání klinických a laboratorních parametrů s trváním hospitalizace

	Věk	BMI	hs-CRP	IL1	IL6	SAA	MDA	Fibrinogen	FEV1
CI	0.073	0.335	0.205	0.102	0.262	0.049	0.279	0.550	0.501
P	0.79	0.07	0.30	0.62	0.20	0.79	0.13	0.001	0.001

Tab.10 Srovnání klinických a laboratorních parametrů s počtem hospitalizací

	Věk	BMI	CRP	IL1	IL6	SAA	MDA	Fibrinogen	FEV1
CI	0.125	0.338	0.206	0.027	0.305	0.056	0.279	0.570	0.559
P	0.52	0.07	0.293	0.85	0.13	0.66	0.13	0.001	0.001

CI, korelační koeficient; BMI, body mass index; hs-CRP, vysoce sensitivní C-reaktivní protein; IL1, interleukin1; IL6, interleukin 6; SAA, sérový amyloid A; MDA, malonyldialdehyd; FEV1, usilovně vydechnutý objem za první sekundu

Tab.11 Analýza vyšetřovaných parametrů s dlouhodobou prognózou

	Skupina 1 (n=19)	Skupina 2 (p=11)	P
Věk (roky)	24.6±4.8	24.8±4.8	0.89
Pohlaví (počet žen/ %)	2 (25%)	9(41%)	0.67
BMI (kg/m ²)	19.3±1.9	17.7±1.6	0.03
hs-CRP (mg/L)	7.6±8.7	25.0±36.0	0.19
IL1 (mM)	11.0±7.5	8.5±3.9	0.39
IL6 (mM)	6.2±8.9	12.4±15.4	0.74
SAA (mg/L)	24.7±15.0	27.0±18.5	0.74
Fibrinogen (g/L)	3.7±0.7	4.5±0.4	0.001
MDA (umol/L)	0.72±0.3	0.55±0.1	0.01
FEV1 (%)	65.6±18.3	38.5±15.9	0.001

Skupina 1 pacienti přeživší 6 let bez plicní transplantace

Skupina 2 pacienti, kteří zemřeli nebo podstoupili transplantaci plic

BMI, body mass index; hs-CRP, vysoce sensitivní C-reaktivní protein; IL1, interleukin1; IL6, interleukin 6; SAA, sérový amyloid A; MDA, malonyldialdehyd; FEV1, usilovně vydechnutý objem za první sekundu

Tab. 12 Multivariantní analýza, endpoint(exitus nebo transplantace)

	Df	Deviance	Resid. Df	Resid. Dev	Pr(>Chi)
NULL	NA	NA	27	36.49837	NA
POHLAVÍ	1	0.5805384	26	35.91783	0.4461014
VĚK	1	0.1157918	25	35.80204	0.7336443
FEV1	1	16.3627565	24	19.43928	0.0000523
CEPACIA	1	2.0629263	23	17.37635	0.1509201
BMI	1	0.6828816	22	16.69347	0.4085962
IgG	1	0.2585502	21	16.43492	0.6111180
Fibrinogen	1	2.5594512	20	13.87547	0.1096366
MDA	1	1.7313405	19	12.14413	0.1882398

FEV1 usilovně vydechnutý objem za první sekundu; CEPACIA, infekce komplexem *Burkholderia cepacia*; BMI, body mass index; IgG, immunoglobulin G; MDA v umol/L;

8 Diskuze

8.1 Vliv aplikace imunonutrice na nutriční parametry ve sledovaném souboru

V našem souboru byli dospělí nemocní s cystickou fibrózou a malnutricí, která byla nejméně jeden rok intervenována podáváním standardní enterální výživy formou sippingu. Přes tuto intervenci byl nutriční stav sledovaných nemocných významně horší než v kontrolní skupině stejně starých zdravých jedinců.

Vysoké dávky některých substrátů imunonutrice, především argininu, ale i polynenasycených lipidů se uplatňují při podpoře imunitního systému. Z tohoto důvodu byly porovnány změny lipidového a aminokyselinového spektra a nutričních parametrů vyvolané imunonutricí oproti standardní enterální podpoře.

Nebyly zaznamenány žádné signifikantní rozdíly v BMI, sérovém albuminu, prealbuminu nebo transferinu mezi aplikací imunonutrice a běžné enterální výživy, což nebylo překvapivé, protože energetický obsah podané imunonutrice byl stejný jako do té doby podávaného standardního sippingu. Významný pokles byl zaznamenán u sérové koncentrace triacylglycerolů. V imunonutrici je významné množství omega 3 mastných kyselin, což může vysvětlit právě pokles sérových triacylglycerolů během aplikace preparátu Impact. Tato skutečnost představuje jeden z pozitivních efektů imunonutrice, protože zvýšená koncentrace triacylglycerolů v séru je spojena se zvýšeným rizikem rozvoje aterosklerotických změn.

Významné změny byly zjištěny v plazmatickém profilu aminokyselin. Při srovnání se zdravými kontrolními subjekty byly pouze koncentrace threoninu, alaninu a argininu srovnatelné s hodnotami u pacientů s cystickou fibrózou užívajících běžnou enterální výživu. Zjištěné změny je ale obtížné interpretovat pouze z hlediska významu přítomného onemocnění, protože aminoacidogram u nemocných s cystickou fibrózou byl modifikován aplikací standardní enterální výživy. Naopak změny, které byly navozeny imunonutricí ve srovnání se standardní enterální podporou, mohou být klinicky relevantní. Zvýšení plazmatické koncentrace ornitinu při imunonutrici je nejspíše následkem zvýšeného množství podaného argininu. V případě zvýšeného obratu aminokyselin je ornitin důležitý při produkci močoviny (Grasemann et al. 2006).

Koncentrace kyseliny glutamové a glutaminu se při aplikaci imunonutrice významně změnily. Došlo k významnému poklesu plazmatické koncentrace glutaminu a naopak ke zvýšení hladiny kyseliny glutamové, což je možné vysvětlit modulací aktivity enzymů glutaminázy a glutamindehydrogenázy. Glutamin je také zdrojem dusíku při biosyntéze purinů a dalších sloučenin, což může být způsobeno stimulací imunitního systému (Walker a van der Donk 2016).

Plazmatická koncentrace glycinu a valinu se během imunonutrice významně snížila. Glycin je prekurzorem pro tvorbu základních biologických sloučenin jako jsou puriny, porfyriny, kreatin nebo glutation. Po začlenění do většiny těchto sloučenin jej nelze znovu použít. Proto může být poptávka po této aminokyselině vyšší než rychlost, kterou ji lze syntetizovat ve stresových situacích (Jahoor et al. 2006). Aminokyselina s rozvětveným řetězcem valin je prekurzorem pro syntézu bílkovin a působí jako regulátor jejich obratu (Boirie et al. 1997). Obě aminokyseliny mohou být více využity, když je imunitní systém stimulován imunonutricí.

V pooperačním období dochází u neinfikovaných pacientů k poklesu sirných aminokyselin, což naznačuje jejich retenci v hojících se tkáních (Grimble a Grimble 1998). Podobnou situaci provázenou poklesem koncentrace threoninu a tryptofanu jsme zaznamenali u podvyživených pacientů s cystickou fibrózou během aplikace imunonutrice. Je také známo, že threonin pomáhá při produkci protilátek, které jsou hlavními složkami našeho imunitního systému (Grimble 2006). Jeho snížené hodnoty po imunonutrici by mohly svědčit pro jeho utilizaci zvýšenou imunitní aktivitou. Tryptofan je esenciální aminokyselina, která by měla být dodávána bílkovinami ze stravy. Degradace tryptofanu na kynurenin imunitními buňkami hraje klíčovou roli při kontrole imunitní odpovědi během infekce a zánětu. Zvýšená utilizace tryptofanu s jeho následnou deplecí plazmatické koncentrace byla hlášena během parazitárních, bakteriálních a virových infekcí, ale také v jiných případech dlouhotrvající imunitní aktivace (Le Floc'h et al. 2011). Pacienti s cystickou fibrózou jsou často infikováni *Pseudomonas aeruginosa* v plicní tkáni. Toto patologické agens využívá ke svému růstu tryptofan pomocí jeho přeměny na kynurenin (Esther et al. 2015). Lokální deplece tryptofanu by mohla být mechanismem, který kontroluje proliferaci bakterií, což vede k zastavení mikrobiální biosyntézy (Grimble 2006).

Koncentrace methioninu se naopak během imunonutrice výrazně zvýšila. Toto zvýšení methioninu lze vysvětlit metylací homocysteinu. Bohužel tuto skutečnost nemůžeme potvrdit, protože koncentrace homocysteinu v plazmě nebyla v našem souboru zkoumána. Pro imunitní systém methionin zvyšuje glutathion, taurin, CD4⁺ a CD8⁺ buňky. Je důležitý i pro iniciaci proteosyntézy (Alshaikh et al. 2016).

Významné změny v profilu aminokyselin v plazmě u pacientů s cystickou fibrózou a malnutricí mohou odrážet aktivaci imunitního systému. Na druhou stranu významný pokles plazmatických koncentrací glycinu, valinu, threoninu a tryptofanu během aplikace imunonutriční léčby může vyvolat otázku, zda by při aplikaci imunonutrice nemělo být podáváno dodatečné množství těchto substrátů. Nicméně je nepochybné, že během podání imunonutrice dochází k významným změnám v metabolismu aminokyselin, což může souviset s vlivem imunonutrice na imunitní systém.

8.2 Cystická fibroza a zánětlivé biomarkery

Sérový amyloid A je protein akutní fáze syntetizovaný převážně játry. Během akutního zánětu se mohou hladiny SAA v séru zvýšit až tisíckrát. SAA vykazuje významnou imunologickou aktivitu například tím, že indukuje syntézu několika cytokinů a je chemotaktický pro neutrofilů a žírné buňky. Nedávno se také ukázalo, že SAA indukuje zánětlivou kaskádu, která má klíčovou roli v imunitní aktivaci, čímž se dále zdůrazňuje jedinečná role SAA v imunomodulaci. Tradičně se má za to, že SAA má klíčovou roli v patogenezi amyloidózy typu A, ale nyní chápeme, že se může také podílet na patogenezi chronických zánětlivých onemocnění jako je revmatoidní artritida a ateroskleróza. SAA je proto jedním z potenciálních cílů při léčbě onemocnění spojených s chronickým zánětem (Eklund et al. 2012). V našem souboru, kdy nemocní byli vyšetřeni v období po prodělané plicní exacerbaci, bylo hsCRP sice u části nemocných ještě zvýšené, ale u většiny již byla jeho koncentrace v mezích normy. Naproti tomu hodnoty SAA v séru byly u všech nemocných významně zvýšené. Za zásadní zjištění je třeba považovat skutečnost, že při podávání imunonutrice došlo signifikantnímu poklesu SAA v séru. Po jejím vysazení a návratu k standardní nutriční podpoře se naopak SAA v séru významně zvýšilo, a to přesto, že v tomto období byli nemocní ve stabilizovaném stavu. Pozitivní vliv imunonutrice byl patrný i z dynamiky dalších sledovaných parametrů, především IL-6 a imunoglobulinů. U těchto parametrů ale nebyla prokázána statistická významnost, na čemž se nepochybně podílí i velikost souboru. Pozitivní vliv imunonutrice na dynamiku sérového SAA podporuje její aplikaci u nemocných s cystickou fibrózou.

8.3 Cystická fibróza a oxidační stres

Z literatury vyplývá, že vztahy oxidačního stresu jsou velmi komplikované, závisí na mnoha komplexních mechanismech a mohou se odlišně projevovat v různých kompartmentech. Pacienti s cystickou fibrózou mají nepochybně zvýšený oxidační stres ve srovnání s kontrolními zdravými subjekty. Oxidační stres se podílí na postupném zhoršování plicních funkcí po opakovaných infekčních inzultech. Míra oxidačního stresu je ale také závislá na momentálním celkovém stavu nemocného. Jistě bude vyšší v období akutní exacerbace plicní infekce než ve stabilizovaném stavu. V literatuře je řada studií, které dokazují, že jak v průběhu akutní exacerbace, tak v klidovém stavu je oxidační stres zvýšený, avšak není mnoho dat o tom, jak se mění oxidační stres bezprostředně po zklidnění akutní exacerbace plicní infekce. Tedy v pozánětlivé fázi, kdy je aktivována protizánětlivá aktivita.

V naší práci jsme hodnotili plasmatický malonyldialdehyd právě v této fázi a jeho ovlivnění podáním imunonutrice. Navíc ve skupině významně malnutričních pacientů, u kterých je imunitní systém deprivován nejenom samotným charakterem onemocnění, ale také špatným nutričním stavem. Sérový malonyldialdehyd je považován za jeden z vhodných parametrů pro sledování

stupně oxidačního stresu. U nemocných se sepsí není podání imunonutrice vhodné, protože vede k dalšímu zvýšení prozánětlivé aktivity s negativním dopadem na prognózu. Z tohoto důvodu jsme nezačali podání imunonutrice v období akutní exacerbace plicní infekce, ale až po jejím odeznění, tedy v období, kdy dochází k aktivaci protizánětlivých mechanismů. Naše představa byla, že v této fázi, kdy dochází k potlačení prozánětlivých působků, může imunonutrice vést k posílení imunitního systému, což bude spojeno s významným snížením prozánětlivé aktivity i oxidačního stresu. Po podání imunonutrice skutečně došlo k významnému poklesu sérového SAA a k poklesu i některých dalších parametrů spojených se zánětlivou aktivací (IL6, IgM). Vedle této pozitivní změny ale aplikace imunonutrice vedla k významnému zvýšení sérového malonyldialdehydu – tedy parametru oxidačního stresu. Tento rozporuplný výsledek není snadné vysvětlit. Avšak i další rozbor vztahu mezi sérovým malonyldialdehydem a sledovanými zánětlivými parametry přinesl nečekané výsledky. Hladina sérového malonyldialdehydu v období po akutní exacerbaci plicní infekce významně negativně korelovala se zánětlivými parametry. Dalším výsledkem, který je v rozporu s předchozími publikacemi, je skutečnost, že hladina sérového malonyldialdehydu pozitivně korelovala s FEV1. Současný pokles GpX a selenu svědčí pro kompenzační antioxidační aktivitu na intracelulární úrovni, kdy je hydrogenperoxidový iont měněn na vodu. V této souvislosti je zajímavé zjištění, že se v aminoacidogramu při imunonutrici významně snížila koncentrace glycinu a methioninu, které jsou nezbytné při tvorbě glutationu. Pro hodnocení významu imunonutrice může být důležitá i skutečnost, že nedošlo k významným změnám v SOD. Ta je využívána při neutralizaci superoxidového iontu, jenž způsobuje ireverzibilní změny v nukleových kyselinách.

U našich nemocných lze postavit hypotézu, že aplikace imunonutrice vede k aktivaci imunitního systému, což je v pozánětlivém období spojeno se zvýšeným oxidačním stresem. Při přijetí této hypotézy by zvýšení oxidačního stresu nemuselo být v této situaci považováno za nežádoucí, zejména když dochází současně k pozitivnímu ovlivnění parametrů zánětu.

Překvapivé výsledky sérového malonyldialdehydu u našich nemocných není snadné interpretovat. Je možné si představit, že po prodělané exacerbaci akutní plicní infekce došlo u mladých malnutričních jedinců k aktivaci protizánětlivých působků, jejíž intenzita byla úměrná závažnosti proběhlé exacerbace. V pozánětlivém období tato protizánětlivá aktivita vedla k potlačení oxidačního stresu a hodnoty sérového malonyldialdehydu byly téměř u všech nemocných ve fyziologických mezích, jen u tří byly lehce zvýšené a u 2 dokonce snižené. Během aplikace imunonutrice došlo k významnému zvýšení změřené hodnoty, avšak jen u 3 nemocných přesáhla zjištěná hodnota horní mez fyziologické hodnoty. Naopak po vysazení imunonutrice a návratu k běžnému sippingu došlo k poklesu sérového malonyldialdehydu, avšak i poté jeho hodnoty

zůstaly vyšší než v pozánětlivém období. Samozřejmě jde o spekulativní vysvětlení, které by bylo třeba posoudit na větším souboru nemocných s tím, že parametry oxidačního stresu budou pacientům odebírány v různých fázích jejich onemocnění, včetně akutní exacerbace plicní infekce.

8.4 Sledování bezpečnosti podání imunonutrice

Podání imunonutrice vedlo k významnému snížení systolického krevního tlaku a tepové frekvence, což je nejspíše následek účinku argininu (Khalaf et al. 2019). Rovněž další významná změna, ke které podání imunonutrice vedlo, bylo zvýšení vypočítané cystatinové clearance. I tuto změnu lze vysvětlit na podkladě vasodilatačního účinku argininu. Během aplikace také bylo opakovaně provedeno spirometrické vyšetření, kdy ve sledovaných parametrech nedošlo k významným změnám. Sledovány byly také parametry hodnotící jaterní funkce tzv. „jaterní“ testy, postižení pankreatu a krevní obraz. V žádném ze sledovaných parametrů nebyly zjištěny významné změny při a po podávání imunonutrice, což podporuje bezpečnost jejího podání u nemocných s cystickou fibrózou a malnutricí.

8.5 Dlouhodobé sledování.

Pro zlepšení hodnocení závažnosti plicního onemocnění a pro sledování účinnosti léčby u pacientů s cystickou fibrózou je nezbytné integrovat do klinické praxe pravidelné hodnocení laboratorních biomarkerů (Jain et al. 2021).

V této části naší práce jsme hodnotili v období 6 let souvislost vybraných zánětlivých parametrů a sérového MDA v pozánětlivém období s plicní funkcí (FEV1) a četností a délkou následných hospitalizací a také s četností úmrtí či transplantací plic. Na rozdíl od akutní exacerbace infekce nekorelovaly v pozánětlivém období koncentrace hs-CRP, IL6, IL1, SAA s FEV1 ani s dlouhodobou prognózou.

Na druhé straně byl plazmatický fibrinogen kromě negativní korelace s FEV1 významně spojen také s frekvencí a délkou následných hospitalizací a také s dlouhodobou prognózou.

Plazmatický fibrinogen však překvapivě doposud nebyl u pacientů s cystickou fibrózou hodnocen jako prognostický faktor. Ačkoli je FEV1 zásadní pro posouzení závažnosti poškození respiračních funkcí a dlouhodobé prognózy, plazmatické koncentrace fibrinogenu mohou být dalším velmi užitečným parametrem. V našem souboru byla koncentrace fibrinogenu pod 4 g/l spojena s dlouhodobě dobrou prognózou. Žádný pacient s koncentrací fibrinogenu pod 4 g/l nezemřel ani nebyl indikován k transplantaci plic v následujících 6 letech a počet a délka hospitalizací byly méně časté než u pacientů s hodnotami nad 4 g/l. Role fibrinogenu u pacientů s cystickou fibrózou je tedy složitější než jen jako parametr akutního zánětu.

9 Vztah práce k testovaným hypotézám

Hlavní hypotéza

Při podání imunonutrice u nemocných s cystickou fibrozou a malnutricí dochází k metabolickým změnám vedoucím k stimulaci imunitního systému, která vede k poklesu aktivity zánětu, což může pozitivně ovlivnit prognózu.

Odpověď ke stanovené hypotéze

V naší práci byl zjištěn významný vztah mezi aplikací imunonutrice a poklesem sérového amyloidu A, který je u nemocných s cystickou fibrózou zvýšen. Po vysazení imunonutrice a návratu k standardnímu sippingu bylo detekováno jeho opětovné významné zvýšení. Další sledované parametry zánětu nebyly ovlivněny významně, ale během aplikace imunonutrice byl zaznamenán pokles IL-6 a imunoglobulinů.

Naopak se při aplikaci imunonutrice neprokázalo významné snížení oxidačního stresu. Hodnota sérového malonyldialdehydu se po podání imunonutrice naopak významně zvýšila. Po návratu k standardnímu sippingu došlo opět k jejímu významnému poklesu. Podání imunonutrice u nemocných s malnutricí po prodělané akutní exacerbaci vedlo ke zvýšení tohoto ukazatele oxidačního stresu. Klinický význam této změny není snadné interpretovat z několika důvodů. Hodnoty sérového MDA byly až na výjimky v mezích normy i po podání imunonutrice - nedošlo k jejich zvýšení nad horní hranici normy u 90% nemocných. Překvapivě hladina sérového MDA významně nepřímo korelovala se sledovanými zánětlivými parametry a pozitivně s FEV1. Konečně, i při dlouhodobém sledování jeho hodnota v unilaterální analýze významně nepřímo korelovala s výskytem úmrtí nebo provedením plicní transplantace. Z uvedených důvodů je možné, že zvýšení sérového malonyldialdehydu po podání imunonutrice v pozánětlivém období nemusí mít klinicky negativní dopad.

Při dlouhodobém sledování byl zjištěn význam sledování plazmatického fibrinogenu. Jeho hodnota pod 4g/L byla asociována s významně sníženou pravděpodobností následných hospitalizací a s méně závažnou dlouhodobou prognózou. Význam plazmatického fibrinogenu je znám a popsán u chronické obstrukční bronchopulmonální choroby, u cystické fibrózy byly ve vztahu k němu popsány určité komplikace, ale jeho vztah k dlouhodobé prognóze nebyl systematicky sledován.

10 Závěry

Naše práce představuje první studii zabývající se významem komplexní komerčně vyráběné imunonutrice u pacientů s cystickou fibrózou. Na podkladě našeho sledování je možné konstatovat, že podání imunonutrice u dospělých pacientů s cystickou fibrózou a malnutricí vede k pozitivnímu ovlivnění zánětlivých parametrů. Nejvýznamnější změny byly zjištěny u sérového amyloidu A, který je zvýšen jak u akutního, tak i chronického zánětu. Při aplikaci imunonutrice došlo k poklesu i dalších zánětlivých parametrů jako je IL6 nebo hladina imunoglobulinů. Podání imunonutrice bylo také spojeno s příznivým ovlivněním lipidového spektra, což právě u dospělých jedinců může mít pozitivní klinický význam. Z hlediska proteinového metabolismu podání imunonutrice sice nevedlo k významným změnám v nejčastěji sledovaných parametrech jako je albumin, prealbumin či transferin, ale zjistili jsme významné změny ve spektru plazmatických aminokyselin. Zjištěné změny mohou souviset s aktivitou imunitního systému. Vedle uvedených dopadů na zánětlivé a metabolické parametry, vedlo podání nutrice i k pozitivním hemodynamickým změnám jako je pokles systémové tenze a zvýšení glomerulární filtrace hodnocené na podkladě eGFRcystatinu. Překvapivým nálezem byla skutečnost, že podání imunonutrice vedlo ke zvýšení plazmatického malonyldialdehydu, markeru oxidačního stresu. Důležité je však upřesnit, že téměř všechny hodnoty sérového malonyldialdehydu byly i po podání imunonutrice ve fyziologických mezích. Odběr vzorků pro vyšetření byl prováděn v pozánětlivém období u malnutričních jedinců, kdy je možné předpokládat dominanci protizánětlivé aktivity s významnou depresí celkové imunitní reakce, pro což nepřímo svědčí významná negativní korelace mezi námi sledovanými prozánětlivými parametry a plazmatickým malonyldialdehydem. Při dlouhodobém sledování žádný ze sledovaných zánětlivých parametrů nepredikoval četnost a délku následných hospitalizací ani dlouhodobou prognózu. Pro takovou predikci se ukázala významnou hodnotu plazmatického fibrinogenu. Plazmatický fibrinogen do 4 g/L byl asociován s nízkým rizikem následných hospitalizací. Žádný s pacientů s plazmatickým fibrinogenem do 4g/L nezemřel ani nepotřeboval transplantaci plic v následujících 6 letech.

Hlavním zjištěním naší práce je skutečnost, že aplikace imunonutrice u nemocných s cystickou fibrózou vede ke snížení aktivity zánětlivých parametrů (SAA). Je ale asociována se zvýšením sérového malonyldialdehydu jako markeru oxidačního stresu. Na podkladě našich výsledků je pravděpodobné, že toto zvýšení oxidačního stresu nemá negativní klinické důsledky. Pro posouzení významu imunonutrice u pacientů s cystickou fibrózou je ale nezbytné provedení randomizované studie.

11 Conclusions

Our work represents the first study dealing with the importance of complex commercially produced immunonutrition in patients with cystic fibrosis. Based on our monitoring, it can be stated that the administration of immunonutrition in adult patients with cystic fibrosis and malnutrition leads to a positive effect on inflammatory parameters. The most significant changes were found in serum amyloid A, which is increased in both acute and chronic inflammation. Other inflammatory parameters such as IL6 or immunoglobulin levels also decreased during immunonutrition. Immunonutrition administration has also been associated with a beneficial effect on the lipid spectrum, which may have a positive clinical significance in adults. In terms of protein metabolism, administration of immunonutrition did not lead to significant changes in the most frequently monitored parameters such as albumin, prealbumin or transferrin, but we found significant changes in the spectrum of plasma amino acids. The observed changes may be related to the activity of the immune system. In addition to these effects on inflammatory and metabolic parameters, nutritional administration also led to positive hemodynamic changes such as a decrease in systemic tension and an increase in glomerular filtration rate based on eGFRcystatin. A surprising finding was that administration of immunonutrition led to an increase in plasma malonyldialdehyde, a marker of oxidative stress. However, it is important to clarify that almost all serum malonyldialdehyde levels were within physiological limits even after immunonutrition. Sampling for testing was performed in the post-inflammatory period in malnourished individuals, when it is possible to assume the predominance of anti-inflammatory activity with significant depression of the overall immune response, which is indirectly evidenced by a significant negative correlation between our observed pro-inflammatory parameters and plasma malonyldialdehyde. During long-term follow-up, none of the monitored inflammatory parameters predicted the frequency and duration of subsequent hospitalizations or long-term prognosis. Plasma fibrinogen has been shown to be significant for such prediction. Plasma fibrinogen up to 4 g / L was associated with a low risk of subsequent hospitalizations. None of the patients with plasma fibrinogen up to 4 g / L died or needed a lung transplant in the next 6 years.

The main finding of our work is the fact that the application of immunonutrition in patients with cystic fibrosis leads to a reduction in the activity of inflammatory parameters (SAA). However, it is associated with an increase in serum malonyldialdehyde as a marker of oxidative stress. Based on our results, it is likely that this increase in oxidative stress does not have negative clinical consequences. However, a randomized study is necessary to assess the importance of immunonutrition in cystic fibrosis patients.

12 Seznam literatury

1. ALSHAIKH, Belal, Joan I. SCHALL, Asim MAQBOOL, Maria MASCARENHAS, Michael J. BENNETT a Virginia A. STALLINGS, 2016. Choline supplementation alters some amino acid concentrations with no change in homocysteine in children with cystic fibrosis and pancreatic insufficiency. *Nutrition Research (New York, N.Y.)* [online]. **36**(5), 418–429. ISSN 1879-0739. Dostupné z: doi:10.1016/j.nutres.2015.12.014
2. BOIRIE, Y., P. GACHON a B. BEAUFRÈRE, 1997. Splanchnic and whole-body leucine kinetics in young and elderly men. *The American Journal of Clinical Nutrition* [online]. **65**(2), 489–495. ISSN 0002-9165. Dostupné z: doi:10.1093/ajcn/65.2.489
3. BOUCHER, R. C., 2004. New concepts of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *The European Respiratory Journal*. **23**(1), 146–158. ISSN 0903-1936.
4. DURYEE, Michael J., Lynell W. KLASSEN, Courtney S. SCHAFFERT, Dean J. TUMA, Carlos D. HUNTER, Robert P. GARVIN, Daniel R. ANDERSON a Geoffrey M. THIELE, 2010. Malondialdehyde-acetaldehyde adduct is the dominant epitope after MDA modification of proteins in atherosclerosis. *Free Radical Biology & Medicine* [online]. **49**(10), 1480–1486. ISSN 1873-4596. Dostupné z: doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.08.001
5. EKLUND, Kari K., K. NIEMI a P. T. KOVANEN, 2012. Immune functions of serum amyloid A. *Critical Reviews in Immunology* [online]. **32**(4), 335–348. ISSN 1040-8401. Dostupné z: doi:10.1615/critrevimmunol.v32.i4.40
6. ESTHER, Charles R., Raymond D. COAKLEY, Ashley G. HENDERSON, Yi-Hui ZHOU, Fred A. WRIGHT a Richard C. BOUCHER, 2015. Metabolomic Evaluation of Neutrophilic Airway Inflammation in Cystic Fibrosis. *Chest* [online]. **148**(2), 507–515. ISSN 1931-3543. Dostupné z: doi:10.1378/chest.14-1800
7. FILA, Libor, 2014. Cystická fibróza u dospělých. *Interní medicína pro praxi*. **16**(2), 54–60. ISSN 12345678, 12345678.
8. FINKEL, T. a N. J. HOLBROOK, 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* [online]. **408**(6809), 239–247. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/35041687
9. GRASEMANN, Hartmut, Raphael SCHWIERTZ, Corinna GRASEMANN, Udo VESTER, Kurt RACKÉ a Felix RATJEN, 2006. Decreased systemic bioavailability of L-arginine in patients with cystic fibrosis. *Respiratory Research* [online]. **7**, 87. ISSN 1465-993X. Dostupné z: doi:10.1186/1465-9921-7-87
10. GRIMBLE, R. F. a G. K. GRIMBLE, 1998. Immunonutrition: role of sulfur amino acids, related amino acids, and polyamines. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)* [online]. **14**(7–8), 605–610. ISSN 0899-9007. Dostupné z: doi:10.1016/s0899-9007(98)80041-5
11. GRIMBLE, Robert F., 2006. The effects of sulfur amino acid intake on immune function in humans. *The Journal of Nutrition* [online]. **136**(6 Suppl), 1660S-1665S. ISSN 0022-3166. Dostupné z: doi:10.1093/jn/136.6.1660S
12. HOLZE, Cathleen, Chloé MICHAUDEL, Claire MACKOWIAK, Darya A. HAAS, Christian BENDA, Philipp HUBEL, Friederike L. PENNEMANN, Daniel SCHNEPF, Jennifer WETTMARSHAUSEN, Marianne BRAUN, Daisy W. LEUNG, Gaya K. AMARASINGHE, Fabiana PEROCCHI, Peter STAEHELL, Bernhard RYFFEL a Andreas PICHLMAIR, 2018. Oxeiptosis, a ROS-induced caspase-independent apoptosis-like cell-death pathway. *Nature Immunology* [online]. **19**(2), 130–140. ISSN 1529-2916. Dostupné z: doi:10.1038/s41590-017-0013-y

13. JAHOR, Farook, Asha BADALOO, Marvin REID a Terrence FORRESTER, 2006. Glycine production in severe childhood undernutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition* [online]. **84**(1), 143–149. ISSN 0002-9165. Dostupné z: doi:10.1093/ajcn/84.1.143
14. JAIN, Raksha, Arthur BAINES, Umer KHAN, Brandie D. WAGNER a Scott D. SAGEL, 2021. Evaluation of airway and circulating inflammatory biomarkers for cystic fibrosis drug development. *Journal of Cystic Fibrosis: Official Journal of the European Cystic Fibrosis Society* [online]. **20**(1), 50–56. ISSN 1873-5010. Dostupné z: doi:10.1016/j.jcf.2020.06.017
15. KHALAF, David, Marcus KRÜGER, Markus WEHLAND, Manfred INFANGER a Daniela GRIMM, 2019. The Effects of Oral L-Arginine and L-Citrulline Supplementation on Blood Pressure. *Nutrients* [online]. **11**(7), E1679. ISSN 2072-6643. Dostupné z: doi:10.3390/nu11071679
16. LE FLOC'H, Nathalie, Winfried OTTEN a Elodie MERLOT, 2011. Tryptophan metabolism, from nutrition to potential therapeutic applications. *Amino Acids* [online]. **41**(5), 1195–1205. ISSN 1438-2199. Dostupné z: doi:10.1007/s00726-010-0752-7
17. RADRIZZANI, D., G. BERTOLINI, R. FACCHINI, B. SIMINI, P. BRUZZONE, G. ZANFORLIN, G. TOGNONI a G. IAPICHINO, 2006. Early enteral immunonutrition vs. parenteral nutrition in critically ill patients without severe sepsis: a randomized clinical trial. *Intensive Care Medicine* [online]. **32**(8), 1191–1198. ISSN 0342-4642. Dostupné z: doi:10.1007/s00134-006-0238-y
18. REILLY, J. J., C. A. EDWARDS a L. T. WEAVER, 1997. Malnutrition in children with cystic fibrosis: the energy-balance equation. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* [online]. **25**(2), 127–136. ISSN 0277-2116. Dostupné z: doi:10.1097/00005176-199708000-00001
19. SHIMMIN, Deirdre, Jacqueline LOWDON a Tracey REMMINGTON, 2019. Enteral tube feeding for cystic fibrosis. *The Cochrane Database of Systematic Reviews* [online]. **7**, CD001198. ISSN 1469-493X. Dostupné z: doi:10.1002/14651858.CD001198.pub5
20. WALKER, Mark C. a Wilfred A. VAN DER DONK, 2016. The many roles of glutamate in metabolism. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* [online]. **43**(2–3), 419–430. ISSN 1476-5535. Dostupné z: doi:10.1007/s10295-015-1665-y
21. WINE, J. J., 1999. The genesis of cystic fibrosis lung disease. *The Journal of Clinical Investigation* [online]. **103**(3), 309–312. ISSN 0021-9738. Dostupné z: doi:10.1172/JCI6222
22. YU, Kaili, Xiaoya ZHENG, Guiyue WANG, Miao LIU, Yuhang LI, Pulin YU, Mengyuan YANG, Nana GUO, Xiaohui MA, Yue BU, Yahui PENG, Ci HAN, Kaijiang YU a Changsong WANG, 2020. Immunonutrition vs Standard Nutrition for Cancer Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis (Part 1). *JPEN. Journal of parenteral and enteral nutrition* [online]. **44**(5), 742–767. ISSN 1941-2444. Dostupné z: doi:10.1002/jpen.1736
23. ZEMEL, B. S., A. F. JAWAD, S. FITZSIMMONS a V. A. STALLINGS, 2000. Longitudinal relationship among growth, nutritional status, and pulmonary function in children with cystic fibrosis: analysis of the Cystic Fibrosis Foundation National CF Patient Registry. *The Journal of Pediatrics* [online]. **137**(3), 374–380. ISSN 0022-3476. Dostupné z: doi:10.1067/mpd.2000.107891

13 Dodatek disertační práce – seznam publikací autora práce

13.1 Publikace, které jsou podkladem disertační práce

13.1.1 S IF

HLOCH O, CHARVAT J, FILA L, HAVLIN J, 2017. Immunonutrition in patients with cystic fibrosis leads to drop of serum amyloid A and increase of oxidative stress. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* [online]. **60**(3), 176–179. ISSN 0912-0009.

HLOCH O, FILA L, HAVLIN J, CHARVAT J, PALOVA S, 2022. Significance of plasma fibrinogen and malonyldialdehyde in the post-inflammatory period in patients with cystic fibrosis. *Bratislava Medical Journal*. No. 2236/2021

13.1.2 Bez IF

HLOCH O, FILA L, HAVLIN J, CHARVAT J, PALOVA S, 2018. The Changes of Plasma Amino Acids and Lipid Profiles in Patients with Cystic Fibrosis and Malnutrition induced by Immunonutrition. *J Nutr Disorders Ther* 2018, 8:4

13.1.3 Posterová sdělení

LISOVA K, HLOCH, CHARVAT J, 2014. PP118-SUN: Outstanding abstract: The Effect of Immunonutrition on Serum Amyloid a in Patients with Cystic Fibrosis. *Clinical Nutrition* [online]. **33**, S63–S64. ISSN 02615614.

HLOCH O, CHARVAT J, HAVLIN J, 2016. MON-P091: The Impact of Immunonutrition on Serum Aminoacidogram in the Patients with Cystic Fibrosis and Malnutrition. *Clinical Nutrition* [online]. **35**, S186–S187. ISSN 02615614.

13.2 Publikace bez vztahu k tématu disertační práce

13.2.1 S IF

HLOCH O, CHARVAT J, MASOPUST J, HAVLIN J, 2012. Lactic acidosis in medical ICU - the role of diabetes mellitus and metformin. *Neuro Endocrinology Letters*. **33**(8), 792–795. ISSN 0172-780X.

ŽIDKOVÁ M, HORSLEY R, HLOCH O, HLOŽEK T, 2019. Near-fatal Intoxication with the „New" Synthetic Opioid U-47700: The First Reported Case in the Czech Republic. *Journal of Forensic Sciences* [online]. **64**(2), 647–650. ISSN 1556-4029.

PAVELKOVA K, LISOVA K, BLAHOVA P, MOKRA D, HLOCH O, CHARVAT J, 2020. Comparison of 12-cm versus 6-cm long peripheral catheters in patients with difficult intravenous access (DIVA). *The Journal of Vascular Access* [online]. 1129729820983151. ISSN 1724-6032.

13.2.2 Bez IF

HLOCH, O, MOKRA D, MASOPUST J, HASA J a CHARVAT J, 2014a. Antibiotic treatment following a dog bite in an immunocompromized patient in order to prevent Capnocytophaga canimorsus infection: a case report. *BMC research notes* [online]. **7**, 432. ISSN 1756-0500.

HLOCH, O, GLADIŠOVÁ D a HORÁČKOVÁ M, 2014b. Purple urine bag syndrome - rare but substantial symptom of urinary infection. *Vnitřní Lekarství*. **60**(5–6), 512–513. ISSN 0042-773X.

MASOPUST J, CHARVÁT J, MOKRÁ D, HLOCH O a HÁŠA J, 2015. Hypersensitive reaction after application of heparin with activation heparin induced trombocytopenia in initiation of intermittent haemodialysis. *Vnitřní Lekarství*. **61**(3), 260–263. ISSN 0042-773X.

13.2.3 Posterová sdělení

HLOCH O, CHARVAT J, HASA J, HAVLIN J, MASOPUST J. The impact of diabetes mellitus on clinical significance of lactic acidosis

2011 *ESPEN 33rd Congress of Clinical Nutrition and Metabolism Gothenburg*

aktivní účast, oceněn: ESPEN Best Abstracts 2011 & ESPEN Travel Awards

13.2.4 Přednášková sdělení

HLOCH O. Četnost a prognóza nemocných s laktátovou acidózou. Význam přítomnosti diabetu mellitu

2011 *XLVII.diabetologické dny Luhačovice*

HLOCH O. Naše zkušenosti s kontrolou glykémie u kriticky nemocných pomocí počítačového programu Space Glucose Control na jednotce intenzivní metabolické péče

2012 *XLVIII.Diabetologické dny Luhačovice*

HLOCH O. E.Coli jak ji neznáme

2019 *Seminář Společnosti pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP*

13.2.5 Monografie

Diabetologie 2013

Kapitola: Laktátová acidóza- je nutné se léčby metforminem obávat?

Triton 2005

Užitečné tabulky pro praxi: nejen v interních oborech

Kniha, Grada a.s. 2018, autor Hloch Ondřej

Oceněna 2. místo v kategorii Nejlepší monografie, České Internistické společnosti

Urgentní příjem: Komentované kazuistiky

Martin Polák, Jiří Zíka, Ondřej Hloch

Mladá fronta 2017