

**Univerzita Karlova**  
**1. lékařská fakulta**  
Autoreferát disertační práce



**UNIVERZITA KARLOVA**  
**1. lékařská fakulta**

**Tukové emulze v domácí parenterální výživě.**

**MUDr. Stanislav Švela**

4.3.2023

**Doktorské studijní programy v biomedicině**  
*Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky*

**Obor: Biochemie a patobiochemie**

**Předseda oborové rady: Prof. RNDr. Zdeněk Kleibl, PhD**

**Školící pracoviště: 4.interní klinika VFN a 1.LF UK**

**Školitel: Doc. MUDr. František Novák, PhD**

*Obsah*

**Obsah**

Abstrakt .....	4
Abstract .....	5
1. Úvod .....	6
2. Hypotézy a cíle práce .....	7
3. Materiál a metodika .....	7
a/ Analýza mastných kyselin ve fosfolipidech erytrocytů a fosfolipidech plazmy .....	9
b/ Cytokiny .....	9
c/ Stimulace lipopolysacharidem z plné krve .....	9
d/ Analýza FGF-19 .....	10
e/ Stanovení cholestenu a žlučových kyselin .....	10
f/ Stanovení aktivity antioxidantních enzymů .....	10
4. Výsledky .....	11
a/ Třídy mastných kyselin v lipidových emulzích a fosfolipidech erytrocytů .....	11
b/ Třídy mastných kyselin ve fosfolipidech erytrocytů .....	11
c/ Profil mastných kyselin ve fosfolipidech erytrocytů .....	12
d/ Třídy mastných kyselin v plazmatických fosfolipidech .....	12
e/ Hodnoty cytokinů v séru a stimulované LPS <i>in vitro</i> .....	13
f/ Antioxidantní enzymy .....	14
g/ Biochemické parametry .....	15
a/ FGF19 a žlučové kyseliny .....	16
5. Diskuse .....	17
a/ Spektrum mastných kyselin .....	17
b/ Zánětlivá imunitní odpověď .....	17
c/ Antioxidantní systém .....	20
d/ Markery stavu jaterní tkáně .....	21
6. Závěry .....	23
7. Seznam zkratk .....	24
8. Použitá literatura .....	27

## Abstrakt

Kombinace intestinálního selhání a parenterální výživy je stavem spojeným s mírným chronickým zánětem a orgánovým poškozením, z nichž nejvýznamnější je poškození jaterní. Tato zkřížená intervenční studie zkoumala účinky různých intravenózních lipidových emulzí (IVLE) obohacených o zvýšené dávky omega-3 polynenasycených mastných kyselin (n-3 PUFA) z rybího oleje (RO) u pacientů na domácí parenterální výživě (DPVP) pro chronické intestinální selhání. Dvanácti pacientům byly postupně podávány tři různé IVLE, po každé z nich ještě přidána emulze RO. Studie rovněž zahrnovala dvanáct párovaných zdravých kontrol ke srovnání. Cílem této studie bylo zjistit, jak dlouhodobé podávání těchto IVLE ovlivnilo primárně spektrum mastných kyselin (MK) v erytrocytech a plazmě, dále pak zánětlivou odpověď, antioxidační stav, markery jaterních funkcí a spektrum žlučových kyselin u DPVP a jak se tyto změny lišily od zdravých osob.

Prokázali jsme úspěšnou inkorporaci n-3 PUFA do erytrocytárních fosfolipidů a odpovídající změny spektra plazmatických MK, charakterizované zejména signifikantní nárůsty n-3 vůči n-6 PUFA, s poklesem poměru n-6/n-3 PUFA. Zjistili jsme také dlouhodobější ovlivnění těchto změn při vysoké dávce podávaného RO.

Konstatujeme zvýšené koncentrace cytokinů v séru a *in vitro* lipopolysacharidem (LPS) stimulovanou produkci cytokinů u DPVP, a to navzdory nižším n-6/n-3 PUFA hodnotám vůči zdravým kontrolám. Dále studie ukázala vliv RO na nižší *in vitro* reaktivitu leukocytů, vyjádřenou sníženou produkcí cytokinů stimulovanou LPS. Produkce IL-6 stimulovaná LPS také v souboru negativně korelovala s parenterální dávkou n-3 PUFA, ale také s jejich podílem v erytrocytárních fosfolipidech, což naznačuje jejich protizánětlivý účinek.

Všechny režimy podávání IVLE byly spojeny se zvýšenými aktivitami SOD1 související zřejmě se zvýšeným oxidačním stresem (OS) a mírným zánětem. Intervence přidáním RO významně snížila hodnoty SOD1 na úroveň HC, na čemž se mohlo podílet snížení OS. Zaznamenali jsme narušení metabolismu žlučových kyselin ve smyslu jejich zvýšené syntézy a snížení fibroblastového růstového faktoru 19 a mírného zvýšení alkalické fosfatázy u DPVP. Ovlivnění jejich metabolismu podávanými IVLE ani při eskalaci dávky RO jsme však neprokázali.

**Klíčová slova:** domácí parenterální výživa, lipidové emulze, omega-3 mastné kyseliny, intestinální selhání, cytokiny, zánět, oxidační stres, antioxidační enzymy, superoxid dismutáza 1, hepatopatie asociovaná s intestinálním selháním, fibroblastový růstový faktor 19

## Abstract

The combination of intestinal failure and parenteral nutrition is a condition associated with mild chronic inflammation and organ injury, the most significant of which is hepatic injury. This crossover-controlled trial investigated the effects of different intravenous lipid emulsions (IVLE) enriched with increased doses of omega-3 polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFA) from fish oil (FO) in patients on home parenteral nutrition (HPNP) for chronic intestinal failure. Twelve patients were consecutively given three different IVLEs, with an FO emulsion added after each IVLE. The study also included twelve paired healthy controls for comparison. The aim of this study was to investigate how long-term administration of these IVLEs affected primarily the erythrocyte and plasma fatty acid (FA) spectrum, as well as the inflammatory response, antioxidant status, markers of liver function and bile acid spectrum in HPNP, and how these changes differed from healthy subjects.

We demonstrated successful incorporation of n-3 PUFA into erythrocyte phospholipids and corresponding changes in the plasma FA spectrum, characterized in particular by significant increases in n-3 versus n-6 PUFA, with a decrease in the n-6/n-3 PUFA ratio. We also found a more prolonged effect on these changes with high dose FO administration.

We observed increased serum cytokine concentrations and in vitro lipopolysaccharide (LPS)-stimulated cytokine production in HPNP, despite lower n-6/n-3 PUFA levels relative to healthy controls. Furthermore, the study showed an effect of FO on lower in vitro leukocyte reactivity, as expressed by reduced LPS-stimulated cytokine production. LPS-stimulated IL-6 production was also negatively correlated with parenteral dose of n-3 PUFA in the cohort, but also with their proportion in erythrocyte phospholipids, suggesting their anti-inflammatory effect.

All IVLE administration regimens were associated with increased superoxide dismutase 1 (SOD1) activities, probably related to increased oxidative stress (OS) and mild inflammation. Intervention by adding FO significantly reduced SOD1 levels to HC levels, which may have contributed to the reduction in OS. We observed impaired bile acid metabolism in terms of increased bile acid synthesis and decreased fibroblast growth factor 19 and a slight increase in alkaline phosphatase in HPNP. However, we did not demonstrate any effect of escalated dose of FO on their metabolism.

**Keywords:** Home parenteral nutrition, lipid emulsions, omega-3 fatty acids, intestinal failure, cytokines, inflammation, oxidative stress, antioxidant enzymes, superoxide dismutase 1, intestinal failure associated liver disease, fibroblast growth factor 19

## 1. Úvod

Intravenózní lipidové emulze (IVLE) jsou základní složkou parenterální výživy (PEV) nejen v akutních stavech, ale rovněž u pacientů s chronickým střevním selháním (CIF). Tento stav je charakterizovaný nedostatečností střevní kapacity pro splnění nutričních požadavků různé etiologie, nejčastěji syndromu krátkého střeva nebo těžké střevní dysmotility. Pacienti jsou pak závislí na dlouhodobě podávané PEV v domácím prostředí (domácí parenterální výživa, DPV) (Pironi et al., 2023). Současná klinická praxe nabízí řadu IVLE zahrnujících lipidy s poměrně rozmanitým spektrem mastných kyselin (MK) a jejich poměrné zastoupení. Jejich potenciální efekt se tedy může lišit. Triacylglyceroly obsažené v IVLE nejsou pouhým zdrojem energie, ale MK v nich vázané jsou navíc inkorporovány do lipidů buněčných membrán, a buď samy nebo jako prekurzory signálních molekul jsou významnými modulátory imunitní odpovědi a zánětu, ale i metabolických procesů (Kirk et al., 2022). IVLE jsou rozdělovány do čtyř generací, přičemž první byla vyráběna pouze ze sójového oleje (SojO) a z dnešního pohledu je zřejmé její spojení se zvýšeným rizikem produkce prozánětlivých lipidových mediátorů kvůli vysokému obsahu n-6 polynenasycených mastných kyselin (n-6 PUFA) s mnoha negativními dopady, včetně podílu na jaterním poškození. Modernější IVLE jsou pak směsí SojO a oleje se středně dlouhým řetězcem triacylglycerolů (MCT) - druhá generace, nebo olivového oleje (OO) - třetí generace, např. Clinoleic. Poslední, čtvrtá generace IVLE (Smoflipid a Lipoplus) pak obsahují přidaný rybí olej (RO), jsou bohaté na omega-3 polynenasycené mastné kyseliny (n-3 PUFA) a byly vyvinuty právě s ohledem na předpokládané protizánětlivé a imunomodulační vlastnosti (Sadu Singh et al., 2020). Metaanalýzy studií PEV porovnávající přípravky založené na IVLE na bázi OO a RO prokázaly mj. bezpečnost a určité pozitivní účinky na ukazatele jaterních funkcí. V souladu s tím systematický přehled u dospělých pacientů na domácí parenterální výživě (DPVP) naznačuje, že použití alternativních IVLE spíše než čistého SojO může mít klinické výhody (Kirk et al., 2022).

Složení IVLE, tedy spektrum MK v nich obsažených, také hraje důležitou roli v regulaci produkce reaktivních forem kyslíku a dusíku (RONS), které doprovázejí CIF, a samy také mohou být zdrojem oxidačního stresu (OS) vlivem lipoperoxidace, které mohou podléhat. Některé studie naznačují, že n-3 PUFA mohou příznivě modulovat a zmírnit zánětlivé poškození. Hlavní mechanismus je nicméně stále nejasný a může zahrnovat zvýšení antioxidantní aktivity nebo tlumení zánětlivé reakce. Na druhou právě n-3 PUFA jsou stranu náchylné k lipoperoxidaci vzhledem ke svým vícečetným dvojným vazbám. Není tedy jasné, zda a do jaké míry n-3 PUFA působí antioxidantně nebo prooxidálně (Zaloga, 2021). Kromě toho se kombinace zhoršené funkce střev s účinky PEV podílí na poškození jater, které se označuje pojmem intestinal-failure liver disease (IFALD). I když vývoj nových druhů IVLE snížily incidenci a závažnost IFALD, toto zůstává hlavní příčinou morbiditu a mortality u DPVP (Lucchinetti et al., 2021). V souvislosti s IFALD byly také popsány další faktory, jako je narušení koloběhu žlučových kyselin (ŽK), či syntézy fibroblastového růstového faktoru 19 (FGF19), endokrinně působícího člena rodiny růstových faktorů zastávající svou funkci nejen v regulaci metabolismu ŽK. Obojí se také považuje za faktor přispívající ke kontrole zánětu a oxidačního stresu (OS). CIF je rovněž spojeno s mikrobiální nerovnováhou a dysbiózou ve střevě (Cahova et al., 2017). Uvedené změny vyvolávají zánětlivou odpověď, která kromě jiných účinků zvyšuje OS. Celkově tedy lze CIF považovat za zánětlivý stav spojený s nerovnováhou antioxidantního systému (Lucchinetti et al., 2021).

Vzhledem k tomu, že neexistují jednoznačná klinická doporučení pro specificky cílenou aplikaci IVLE v DPV, je zapotřebí více studií využívajících IVLE třetí a čtvrté generace (zejména s eskalací n-3 PUFA). Proto jsme provedli studii u pacientů s CIF srovnávající dvě IVLE obohacené rybím olejem, Smoflipid a Lipoplus, a IVLE s nízkým obsahem PUFA, a

naopak vysokým obsahem mononenasycených mastných kyselin (MUFA) z olivového oleje, Clinoleic. Dále pak využitím přídatku Omegaven, IVLE na bázi čistého RO, jsme testovali dopad další eskalace dávky n-3 PUFA po podání všech tří výchozích IVLE. Zaměřili jsme se na vyšetření koncentrace prozánětlivých cytokinů v séru a *in vitro* lipopolysacharidem (LPS) stimulovanou produkci cytokinů v plné krvi ve vztahu k podílům n-3 PUFA v podaných IVLE. Další oblastí, kterou jsme pak zkoumali, byl účinek IVLE a zejména eskalace n-3 PUFA na antioxidační stav, a jako další aspekt patofyziologie IFALD také koncentrace žlučových kyselin, FGF19 a jaterní enzymy.

## 2. Hypotézy a cíle práce

Cílem studie bylo otestovat a popsat efekt 3 různých IVLE a následné eskalace dávky n-3 PUFA na zánětlivou odpověď, antioxidační kapacitu a patologii jater u pacientů s CIF na dlouhodobé DPV:

1. Sledovat změny ve spektru MK v plazmatických a erytrocytárních fosfolipidech.
2. Stanovit koncentrace cytokinů v séru
3. Analyzovat *in vitro* LPS stimulovanou produkci cytokinů v plné krvi ve vztahu k zastoupení n-3 PUFA v jednotlivých IVLE
4. Sledovat účinek jednotlivých IVLE a zejména eskalace n-3 PUFA na antioxidační kapacitu
5. Stanovit koncentrace žlučových kyselin, FGF19 a aktivity jaterních enzymů vzhledem k patologii jaterní tkáně při IFALD

## 3. Materiál a metodika

Studie byla navržena jako zkřížená (crossover), částečně zaslepená kontrolovaná klinická studie s pacienty na DPV (DPVP). Pacienti registrovaní v programu DPV 4.interní kliniky VFN byli zváženi ke způsobilosti zařazení. Celkem šlo o 55 pacientů, z nichž bylo zařazeno 12 vhodných a se studií souhlasících pacientů. Kritéria pro zařazení do studie byla: věk > 18 let, podávání parenterální výživy > 4 dny/týden s předpokládanou dobou trvání > 8 měsíců a stabilní klinický stav bez komplikací v posledních minimálně 2 měsících.

Vylučovacími kritérii byly: aktivní nádorové onemocnění nebo jeho léčba, prokázaný imunodeficit a pokročilá orgánová dysfunkce v důsledku chronického onemocnění.

Každému pacientovi na DPV byly v rámci individuálně připravovaných roztocích PEV podávány následující komerčně dostupné tukové emulze ve třech základních cyklech (bazální režimy):

Smoflipid™ (deklarovaný obsah 30 % sójového oleje, 30 % MCT, 25 % olivového oleje; 15 % rybího oleje),

Lipoplus™ (40 % sójový olej, 50 % MCT, 10 % rybí olej reesterifikovaný)

a Clinoleic™ (20 % sójový olej, 80 % olivový olej).

První tukovou emulzí byl u všech pacientů Smoflipid, který byl užíván minimálně 12 týdnů.

Poté byl u všech na další 4 týdny přidán Omegaven (obsahující 10 % rybí olej), v dávce 100 ml, tj 10 gramů, nahrazujících proporcionální část základní tukové emulze.

Po tomto cyklu byli pacienti randomizováni tak, aby následně dostávali dva cykly s Lipoplus, nebo Clinoleic po dobu 6 týdnů plus následně 4 týdny přidání Omegavenu po každém cyklu, ve zkříženém designu. Celková dávka tuků, stejně jako složení dalších nutrientů zůstaly tedy zachovány. Z tohoto hlediska byla výživa pro daného pacienta po celou dobu izokalorická, měnily se pouze tukové emulze.

Po každém cyklu byly odebrány vzorky krve pro následné analýzy. Odběry byly provedeny po minimálním 5hodinovém lačnění, resp. odpojení výživového vaku.

Všechny testované IVLE byly dobře snášeny a nebyly zaznamenány žádné s nimi související komplikace. Veškeré složky parenterální výživy byly použity v souladu s Evropským souhrnem údajů o přípravku. Protokol studie byl schválen etickou komisí Všeobecné fakultní nemocnice v Praze. Před zařazením do studie byl od všech účastníků získán písemný informovaný souhlas. Studie byla provedena v souladu s Helsinskou deklarací a směrnicí o klinickém hodnocení a byla registrována v databázi ClinicalTrials.gov: NT13236-4/2012. Před zařazením do studie byl od všech účastníků získán písemný informovaný souhlas. Dále bylo do studie zařazeno 12 zdravých jedinců jako kontrolní skupina (HC), kteří byli s pacienty párováni podle věku ( $\pm 5$  let) a pohlaví.

**Tabulka 1:** Složení tukových emulzí a dávkování rybího oleje včetně popisu jejich analýz

Složení IVLE	Smoflipid		Lipoplus		Clinoleic	
	základní	+ Omegaven	základní	+ Omegaven	základní	+ Omegaven
Sójový olej (g) <sup>+</sup>	16	12	20	16	10	8
MCT olej (g) <sup>+</sup>	15	12	25	20	-	-
Olivový olej (g) <sup>+</sup>	12,5	10	-	-	40	32
Rybí olej (g) <sup>+</sup>	6,5	16	5	14	-	10
Vaječné fosfolipidy(g) <sup>+</sup>	4	4	4	4	4	4
Vitamin E (mg/l) <sup>+</sup>	50	60	50	60	~ 16*	~ 32,5*
SFA (mol%)	44,3	39,9	61,1	53,4	18,0	18,8
MUFA (mol%)	30,4	28,9	12,5	14,5	62,2	54,3
n-6 PUFA (mol%)	19,2	16,5	20,2	17,2	18,3	15,7
n-3 PUFA (mol%)	6,1	14,7	6,3	14,9	1,6	11,2

<sup>+</sup> Údaje o množství olejů převzaty z příslušných lékopisů jednotlivých přípravků IVLE.

Zastoupení tříd MK v IVLE vyjádřeno v mol%, jde o průměry laboratorního měření 2 vzorků IVLE metodikou popsanou dále.

\* Clinoleic není suplementován  $\alpha$ -tokoferolem, ale obsahuje jiné tokoferoly obsažené v přírodním oleji.

IVLE, intravenózní lipidové emulze; MCT, triacylglyceroly se středním řetězcem; MUFA, mononenasyčené mastné kyseliny;

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

SFA, nasycené mastné kyseliny

**Tabulka 2:** Přehled dávek parenterální výživy a makronutrientů v jednotlivých režimech

	Smoflipid		Lipoplus		Clinoleic	
	základní	+ Omegaven	základní	+ Omegaven	základní	+ Omegaven
Počet infuzí za týden	6 $\pm$ 1	6 $\pm$ 1	6 $\pm$ 1	6 $\pm$ 1	6 $\pm$ 1	6 $\pm$ 1
Objem infuzí za týden (v litrech)	19,89 $\pm$ 8,4	21,17 $\pm$ 8,6	20,20 $\pm$ 8,5	20,33 $\pm$ 8,5	20,14 $\pm$ 8,4	20,32 $\pm$ 8,5
Parenterálních aminokyselin (g/kg těl.hm/den)	0,86 $\pm$ 0,2	0,86 $\pm$ 0,2	0,87 $\pm$ 0,2	0,88 $\pm$ 0,2	0,87 $\pm$ 0,2	0,87 $\pm$ 0,2
Parenterální glukóza (g/kg těl.hm/den)	2,48 $\pm$ 1,3	2,46 $\pm$ 1,3	2,5 $\pm$ 1,4	2,55 $\pm$ 1,4	2,52 $\pm$ 1,4	2,51 $\pm$ 1,4
Parenterální tuk (g/kg těl.hm/den)	0,79 $\pm$ 0,1	0,79 $\pm$ 0,1	0,80 $\pm$ 0,1	0,81 $\pm$ 0,1	0,80 $\pm$ 0,1	0,80 $\pm$ 0,1
Parenterální rybí olej (g/kg těl.hm/den)	0,12 $\pm$ 0,02	0,25 $\pm$ 0,04	0,08 $\pm$ 0,01	0,23 $\pm$ 0,04	-	0,16 $\pm$ 0,03
Parenterální dávka EPA+DHA (g/kg)	0,05 $\pm$ 0,01	0, 12 $\pm$ 0,02	0,03 $\pm$ 0,01	0,10 $\pm$ 0,02	-	0,07 $\pm$ 0,01

\* EPA + DHA z rybího oleje; EPA, kyselina eikosapentaenová; DHA, kyselina dokosahexaenová



**Tabulka 3:** Charakteristiky pacientů a zdravých kontrol

Pacienti DPV	Pohlaví	Věk	BMI	Patofyziologická klasifikace IF *	Klinická klasifikace IF*	Kontroly	Pohlaví	Věk	BMI
P1	M	85	25,9	SBS II.	C3	K1	M	89	24,2
P2	M	78	17,4	obstrukce	C1	K2	M	76	28,7
P3	M	28	19,8	SBS I.	D4	K3	M	32	20,9
P4	Ž	57	24,1	SBS III.	C3	K4	Ž	62	26,4
P5	Ž	66	22,1	SBS III.	C3	K5	Ž	71	24,7
P6	M	68	19,2	malabsorpce	D2	K6	M	73	24,9
P7	Ž	53	21,4	SBS III.	C4	K7	Ž	53	28,3
P8	Ž	31	24,3	SBS I.	C3	K8	Ž	36	22,4
P9	Ž	57	32,2	SBS I.	B4	K9	Ž	60	20,2
P10	Ž	63	26,3	SBS I.	D4	K10	Ž	61	23,5
P11	Ž	38	22,3	SBS I.	D4	K11	Ž	41	30,5
P12	Ž	76	25,5	SBS I.	C3	K12	Ž	73	26,8
<b>N=12</b>	Ž/M	Průměr±SO	Průměr±SO	SBS/jiné		<b>N=12</b>	Ž/M	Průměr±SO	Průměr±SO
	8/4	58,3±17,6	23,4±3,7	10/2			8/4	60,6±16,6	25,1±3,0

BMI, Body mass index; DPV, domácí parenterální výživa; IF, intestinální selhání; SBS, Syndrom krátkého střeva; SO, směrodatná odchylka; M, muž; Ž, žena

\* dle ESPEN klasifikace (Pironi, 2023); velkým písmenem označen denní průměr celkové energie (kcal/kg tělesné hmotnosti) podané za týden: 1-10 (B), 11-20 (C), >20 (D) a číslicí označen denní průměr celkového objemu (ml) podaného za týden.

#### a/ Analýza mastných kyselin ve fosfolipidech erytrocytů a fosfolipidech plazmy

Erytrocytární fosfolipidy (EFL) byly extrahovány podle Rose a Oklander (Rose & Oklander, 1965). EFL byly separovány jednorozměrnou tenkovrstvou chromatografií (0,5 mm Silica Gel H, Merck, Německo) za použití směsi rozpouštědel hexan-ether-kyselina octová (70:30:1 v/v/v) a detekovány pomocí 2,7-dichlorfluoresceinu (0,005 % v methanolu) pod UV.

Plazmatické fosfolipidy (PFL) byly extrahovány podle modifikované metody Folch et al. (Folch et al., 1957). Plazma (1 ml) byla rozpuštěna v 21 ml směsi chloroform-methanol (2:1) a protřepána v baňce. Precipitát bílkovin byl odstraněn filtrací a poté bylo přidáno 10 ml směsi chloroform-methanol-voda (3:48:47 v/v/v). PFL byly separovány jednorozměrnou tenkovrstvou chromatografií (0,5 mm Silica Gel H, Merck) za použití směsi rozpouštědel hexanu, éteru a kyseliny octové (70:30:1 obj./obj.) a detekovány pomocí 2,7-dichlorfluoresceinu (0,005 % v methanolu) pod UV. Metylestery MK (fatty acids methyl esters, FAME) byly připraveny ze čtyř komerčních lipidových emulzí použitých ve studii a z EFL. FAME byly následně separovány a detekovány plynovou chromatografií (Tvrzická et al., 2002)

#### b/ Cytokiny

Cytokiny v séru a supernatantech kultur z plné krve byly analyzovány pomocí enzymatických imunoanalýz, a to IL-1 $\beta$  a IL-8 (Thermo Fisher Scientific, CA, USA), TNF- $\alpha$  IL-6 (Beckman-Coulter, Česká republika).

#### c/ Stimulace lipopolysacharidem z plné krve

Pro stimulaci krevních buněk LPS *in vitro* byla plná krev zředěna v poměru 1:10 HEPES pufrovaným médiem RPMI 1640 (Gibco, Thermo Fisher Scientific) doplněným penicilinem (100 U/ml, Sigma-Aldrich), streptomycinem (100  $\mu$ g/ml, Sigma-Aldrich), L-glutaminem (2 mmol, Sigma Aldrich) a autologním sérem (10 %). Naředěná krev (1,8 ml) byla kultivována na 24jamkových destičkách s 0,2 ml bakteriálního LPS o konečné koncentraci 10  $\mu$ g/ml (E.

coli 0111:B4, Sigma-Aldrich) po dobu 24 h ve zvlhčené atmosféře 95 % (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) (Yaqoob et al., 2000). Konečná koncentrace LPS a doba inkubace byly zvoleny na základě předběžných experimentů s cílem vyvolat maximální odpověď.

#### d/ Analýza FGF-19

Sérové koncentrace FGF19 byly stanoveny pomocí enzymatické imunosorbční analýzy (FGF19 Quantikine ELISA kit, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) podle návodu výrobce.

#### e/ Stanovení cholesterinu a žlučových kyselin

Cholesten (7 $\alpha$ -hydroxy-4-cholesten-3-on; C4) a ŽK byly měřeny pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií, vzorek byl připraven ze 100  $\mu$ l purifikovaného séra smíchaného s 320  $\mu$ l acetonitrilu, vše poté 15 minut centrifugováno při 13 000 g, následně byl odebrán supernatant. Vzorek byl separován na systému HPLC (Dionex Ultimate 3000, Dionex Softron GmbH, Německo) vybaveném kolonou Hypersil GOLD (150  $\times$  2,1 mm, 3  $\mu$ m, Thermo Scientific, USA) a kolonou SecurityGuard (Phenomenex, USA). Mobilní fáze se skládala z vody, metanolu a octanu amonného; průtoková rychlost byla 0,3 ml/min, přičemž komora kolony byla nastavena na 40 °C (Lenicek et al., 2016).

#### f/ Stanovení aktivity antioxidantních enzymů

Aktivity antioxidantních enzymů byly měřeny v erytrocytech spektrofotometricky pomocí dříve publikovaných kinetických metod (Kodydková et al., 2009; Vavrova et al., 2016).

*Aktivita glutathionperoxidázy 1 (GPx1)* byla měřena pomocí terc-butyhydroperoxidu jako substrátu a byla sledována rychlost degradace NADPH. Přesněji, 580  $\mu$ l 172,4 mmol tris-HCl pufru obsahujícího 0,86 mmol EDTA, pH = 8,0; 100  $\mu$ l 20 mmol GSH, 100  $\mu$ l 10 U/ml GR, 100  $\mu$ l 2 mmol NADPH a 100  $\mu$ l naředěného vzorku byly pipetovány do kyvet. Reakce byla spuštěna po 10 minutách inkubace při 37 °C přidáním 20  $\mu$ l roztoku 9,99 mmol terc-butyhydroperoxidu. Rychlost NADPH byla sledována spektrofotometricky při 340 nm. Aktivita GPx1 byla vypočtena pomocí molárního extinkčního koeficientu NADPH 6220 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> a vyjádřena v U/g hemoglobinu. Jedna jednotka GPx1 (U) je definována jako 1  $\mu$ mol NADPH oxidovaný na 1  $\mu$ mol NADP za minutu.

*Aktivita glutathionreduktázy (GR)* byla měřena sledováním rychlosti degradace NADPH. V této metodě bylo 700  $\mu$ l 0,127 mol. draslíku fosfátového pufru obsahujícího 0,633 mmol Na<sub>2</sub>EDTA-2H<sub>2</sub>O, pH = 7,2 bylo přidáno do kyvety a následně 100  $\mu$ l 22 mmol oxidovaného glutathionu (GSSG) a 100  $\mu$ l zředěného GSSG. Reakce byla spuštěna po 10 minutách inkubace při teplotě 37 °C přidáním 100  $\mu$ l 1,7 mmol NADPH. Rychlost NADPH byla sledována spektrofotometricky při hodnotě 340 nm. Aktivita GR byla vypočtena pomocí molárního extinkčního koeficientu NADPH 6220 mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> a vyjádřena jako U/g hemoglobinu. Jedna jednotka GR (U) je definována jako množství enzymu katalyzující redukci 1  $\mu$ mol GSSG za minutu.

*Aktivita katalázy (CAT)* - reakční směs v kyvetách obsahovala 876  $\mu$ l 50 mmol fosfátového pufru, pH = 7,2 a 25  $\mu$ l pufru naředěného vzorku. Reakce byla zahájena po 10 min. při 30 °C přidáním 99  $\mu$ l 10 mmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Rychlost rozkladu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> byla sledována spektrofotometricky při 240 nm. Kataláza byla vypočtena pomocí molárního extinkčního koeficientu katalázy H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 43,6 mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> a vyjádřena jako kU/g hemoglobinu. Jedna jednotka CAT (U) je definována jako 1  $\mu$ mol rozkladu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> za minutu.

*Aktivita superoxidismutázy (SOD1)* byla měřena sledováním rychlosti tvorby nitroblue tetrazolium-formazanu (NBT-). Reakční směs v kyvetách obsahovala 700  $\mu$ l 50 mmol fosfátového pufru, pH = 7,2; 50  $\mu$ l xantinoxidázy; 100  $\mu$ l NBT a 50  $\mu$ l zředěného vyšetřovaného vzorku. Reakce byla zahájena po 10 minutách inkubace při 25 °C přidáním 100  $\mu$ l 1 mmol xanthinu. Rychlost tvorby NBT-formazanu byla sledována

spektrofotometricky při 540 nm. Pro každý vzorek byl proveden slepý pokus. Aktivita superoxidodismutázy byla vypočtena pomocí kalibrační křivky a vyjádřena v U/g hemoglobinu. Jedna jednotka SOD (U) je definována jako množství enzymu potřebné k tomu, aby vykazovala 50% dismutaci superoxidového radikálu. Standard superoxid dismutázy (kat. č. S9636-1kU) byl zakoupen od společnosti Sigma Aldrich (St. Louis, MO USA).

Aktivita arylesterázy paraoxonázy 1 (PON1) byla měřena za použití fenylacetátu jako substrátu. Při reakci bylo 900  $\mu$ l 20 mmol pufru tris-HCl obsahujícího 1 mmol  $\text{CaCl}_2$  (pH = 8,0) přidáno do kyvety a následně k tomu 50  $\mu$ l zředěného vzorku séra. Reakce byla zahájena přidáním 50  $\mu$ l 100 mmol fenylacetátu. Rychlost tvorby fenolu byla sledována spektrofotometricky při 270 nm. Pro každý vzorek byl proveden slepý pokus. Arylesterázová aktivita PON1 byla pak vypočtena pomocí molárního extinkčního koeficientu  $1310 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  a vyjádřena v U/ml séra. Jedna jednotka PON1 (U) je definována jako 1  $\mu$ mol degradace fenylacetátu na fenol za minutu.

Koncentrace PON1 byla měřena soupravou Human Paraoxonase 1 Elisa (BioVendor research and Diagnostic products, sro, Heidelberg, Německo).

Měření ox-LDL bylo provedeno pomocí oxidovaného LDL ELISA kitu (Mercodia, Uppsala, Švédsko).

Všechna rutinní klinická vyšetření byla provedena v Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky Všeobecné fakultní nemocnice v Praze aktuálně zavedenými metodami.

## 4. Výsledky

### a/ Třídy mastných kyselin v lipidových emulzích a fosfolipidech erytrocytů

Hlavní třídy MK v jednotlivých IVLE (průměrné hodnoty ze dvou různých měřených šarží vzorků) jsou uvedeny na začátku oddílu Materiál a metodika v [tabulce 1](#).

MUFA představují hlavní složku Clinoleic. Největší podíl celkových SFA byl v přípravku Lipoplus, a to především díky složce MCT oleje.

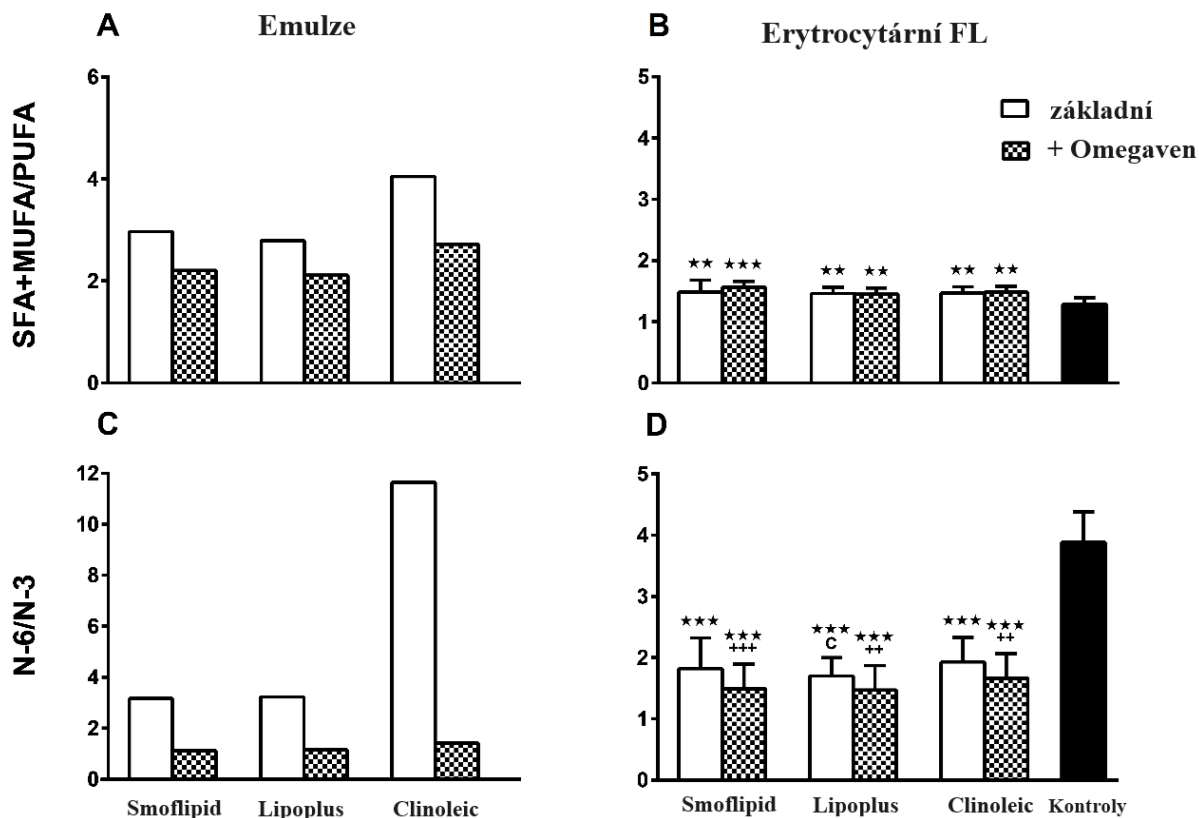
Ve Smoflipid bylo zastoupení SFA a MUFA ve srovnání s ostatními základními LE nejvyrovnanější. Podíl n-6 byl ve všech základních IVLE podobný, zatímco podíl n-3 PUFA byl v Clinoleic menší a v ostatních dvou IVLE podstatně vyšší. Přídavek přípravku Omegaven snížil významně poměr n-6/n-3 PUFA ve srovnání s příslušným základním režimem IVLE ([obrázek 2](#) část C).

### b/ Třídy mastných kyselin ve fosfolipidech erytrocytů.

Srovnání EFL DPVP s EFL HC ukázalo, že DPVP mají vyšší podíl MUFA a n-3 PUFA, ale nižší podíl n-6 PUFA v EFL bez ohledu na podávanou IVLE.

Poměr SFA+MUFA/PUFA byl vyšší u Clinoleic ve srovnání s ostatními IVLE ([obrázek 2](#), část A), ale tyto rozdíly se neodrazily v rozdílech EFL u jednotlivých DPVP. Nicméně tento poměr byl vyšší v EFL všech DPVP oproti HC u všech režimů IVLE. ([obrázek 2](#), část B).

Poměr n-6/n-3 PUFA byl srovnatelný u Smoflipid i Lipoplus, ale u Clinoleic byl podstatně vyšší ([obrázek 2](#), část C). Mezi DPVP a s ohledem na základní IVLE jsme pozorovali nižší n-6/n-3 u režimu Lipoplus ve srovnání s režimem Clinoleic. Následné podávání přípravku Omegaven tento parametr dále snížilo u všech režimů. EFL u DPVP měly nižší n-6/n-3 PUFA oproti EFL u HC ([obrázek 2](#), část D).

**Obrázek 2:** Grafy poměrů tříd MK v použitých IVLE (A, C) a EFL (B, D)

Hodnoty v IVLE jsou průměry měření 2 vzorků. Hodnoty v EFL jsou vyjádřeny jako průměr a směrodatná odchylka SD.

\* DPVP vs. kontroly; počítáno one-way ANOVA; <sup>C</sup> Lipoplus vs. Clinoleic; počítáno Friedmann ANOVA; + Omegaven vs. základní emulze; počítáno párovým t-testem

<sup>C</sup>  $p < 0,05$ ; \*\*,++  $p < 0,01$ ; \*\*\*,+++  $p < 0,001$

SFA, nasycené mastné kyseliny; MUFA, mononenasyčené mastné kyseliny; PUFA, polynenasycené mastné kyseliny; n-6, omega-6 polynenasycené mastné kyseliny; n-3, omega-3 polynenasycené mastné kyseliny; FL, fosfolipidy

Převzato a upraveno z (Novak et al., 2019)

### c/ Profil mastných kyselin ve fosfolipidech erytrocytů

Při podávání výchozích LE jsme pozorovali vyšší koncentrace kyseliny stearové (18:0) v EFL u DPVP na režimech Smoflipid i Lipoplus ve srovnání s režimem Clinoleic. Byl také zjištěn vyšší podíl kyseliny arachidonové (20:4n-6, ARA) v EFL na režimu Smoflipid než na režimu Lipoplus. Dále pak v EFL DPVP na režimu Lipoplus byl pozorován nižší poměr ARA/EPA (20:4n-6/ 20:5n-3 ve srovnání s režimem Clinoleic. Kyseliny palmitová (16:0), olejová (18:1n-9), EPA (20:5n-3) a DHA (22:6n-3) byly zvýšeny a naopak LA (18:2n-6), dihomo- $\gamma$ -linolová (20:3n-6), ARA (20:4n-6) a celkové PUFA byly v EFL u všech režimů IVLE sníženy ve srovnání s jejich hladinami u HC. Tyto rozdíly vedly k nižším poměrům 20:4n-6/20:5n-3 a 20:4n-6/20:6n-3 v EFL DPVP ve srovnání s HC.

### d/ Třídy mastných kyselin v plazmatických fosfolipidech

Zvýšený byl podíl palmitové (16:0), EPA, (20:5n-3), dokosapentaenové (22:5n-3, DPA), DHA (22:6n-3), celkových SFA a n-3 PUFA. Naopak LA (18:2n-6), ALA (18:3 n-3),

dihomo- $\gamma$ -linoleová (20:3n-6), ARA (20:4n-6), celkové n-6 PUFA a celkové PUFA byly u PFL sníženy u všech režimů IVLE ve srovnání s jejich hodnotami u HC.

Tyto rozdíly vedly k nižším poměrům 20:4n-6/20:5n-3 a 20:4n-6/22:6n-3 a vyšším poměrům 22:6n-3/18:3n-3 v PFL u DPVP ve srovnání s HC.

Při porovnání DPVP na základních emulzích jsme pozorovali nižší podíly dihomu- $\gamma$ -linoleové kyseliny (20:3n-6) a celkových n-6 PUFA, a naopak vyšší podíly 20:5n-3 a celkových n-3 PUFA v PFL na režimu Smoflipid ve srovnání s režimem Clinoleic.

Tyto rozdíly vedly k nižšímu poměru 20:4n-6/20:5n-3 a 20:4n-6/22:6n-3 a vyššímu poměru 22:6n-3/18:3n-3. Mezi režimy Smoflipid vs. Lipoplus a Lipoplus vs. Clinoleic nebyly zjištěny žádné rozdíly. A konečně přidání přípravku Omegaven k základním režimům LE dále snížilo podíl n-6 a zvýšilo podíl n-3 PUFA u všech těchto intervencí.

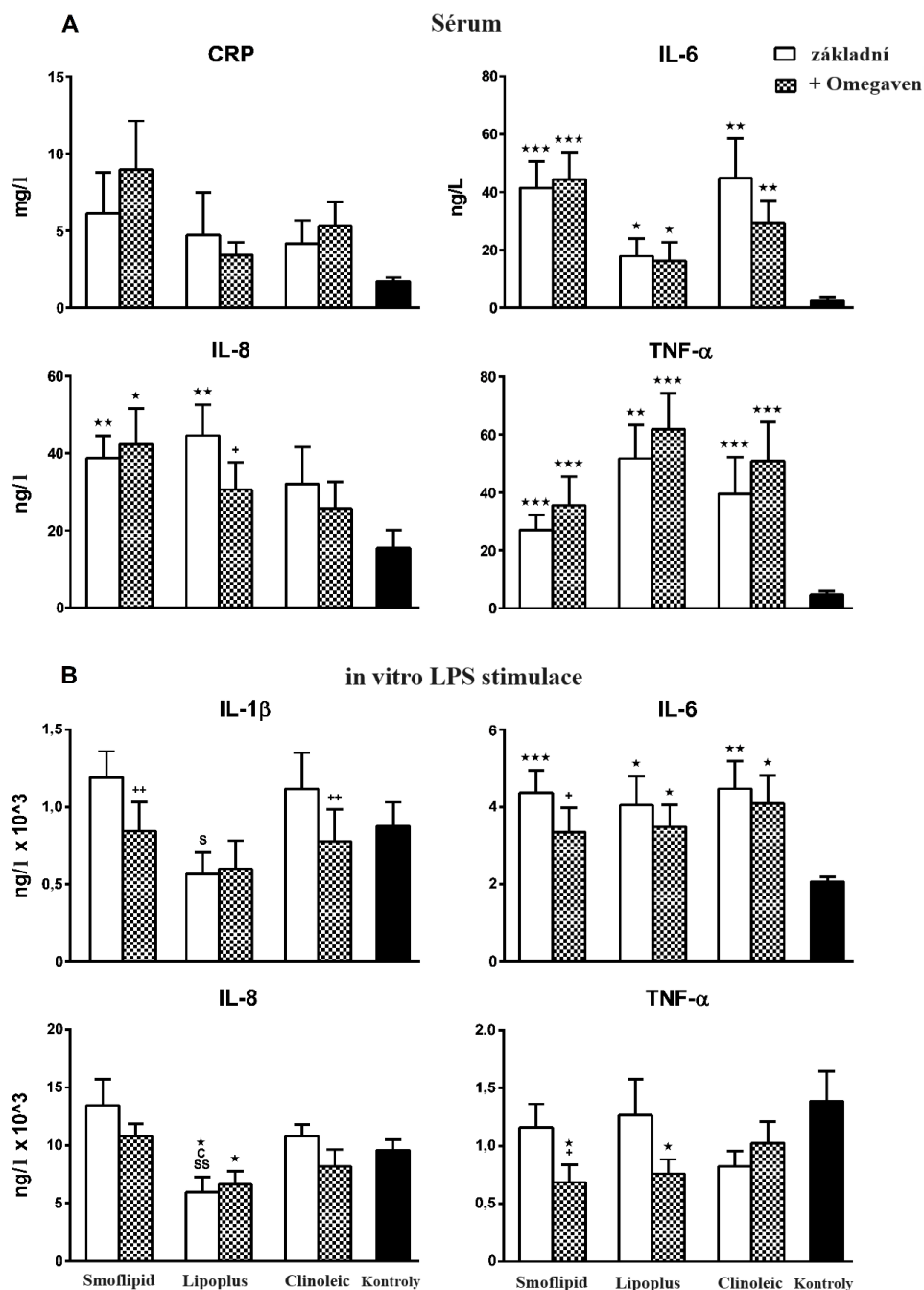
#### e/ Hodnoty cytokinů v séru a stimulované LPS *in vitro*

Nezaznamenali jsme žádné významné rozdíly v sérových cytokinech mezi základními režimy IVLE. Podávání přípravku Omegaven nemělo vliv na žádné sérové parametry s výjimkou snížení koncentrace IL-8 u režimu Lipoplus ([Obrázek 3](#), část A). Zvýšení, nebo trendy ke zvýšení koncentrací IL-6, IL-8 a TNF- $\alpha$  byly nicméně pozorovány u všech režimů DPVP ve srovnání s HC. Počet leukocytů a hodnota hemoglobinu (uvedeno dále v tabulce 6) se pohybovaly v rozmezí normálních hodnot jak u DPVP, tak u HC, bez významného rozdílu. Srovnání jednotlivých výchozích IVLE prokázalo nižší LPS stimulovanou produkci IL-1 $\beta$  u pacientů v režimu Lipoplus ve srovnání s pacienty, kterým byl podáván Smoflipid a Clinoleic, a také nižší IL-8 ve srovnání s pacienty užívajícími režim Smoflipid.

Omegaven přidaný k přípravku Smoflipid snížil produkci IL-1  $\beta$ , IL-6 a TNF- $\alpha$ , zatímco Omegaven přidaný k přípravku Clinoleic snížil pouze produkci IL-1 $\beta$ . Omegaven neměl žádný vliv na produkci cytokinů stimulovaných LPS během režimu Lipoplus. Koncentrace IL-6 byla vyšší u DPVP než u HC pro všechny základní IVLE.

Produkce IL-1 $\beta$ , IL-8 a TNF- $\alpha$  se mezi DPVP při všech základních režimech LE a HC významně nelišila. S výjimkou hodnoty IL-8, která byla nižší u pacientů na režimu Lipoplus ([Obrázek 3](#), část B). Hodnoty jsou zaznamenány jako rozdíl v koncentracích se stimulací a bez stimulace. Rovněž jsme zaznamenali výraznou negativní korelaci mezi dávkou EPA+DHA v podaných IVLE a hodnotami LPS stimulované produkce IL-6 ve všech DPVP režimech s výjimkou Lipoplus+Omegaven.

**Obrázek 3:** Grafy hodnot CRP a cytokinů v séru (A) a *in vitro* LPS-stimulované produkce cytokinů (B).



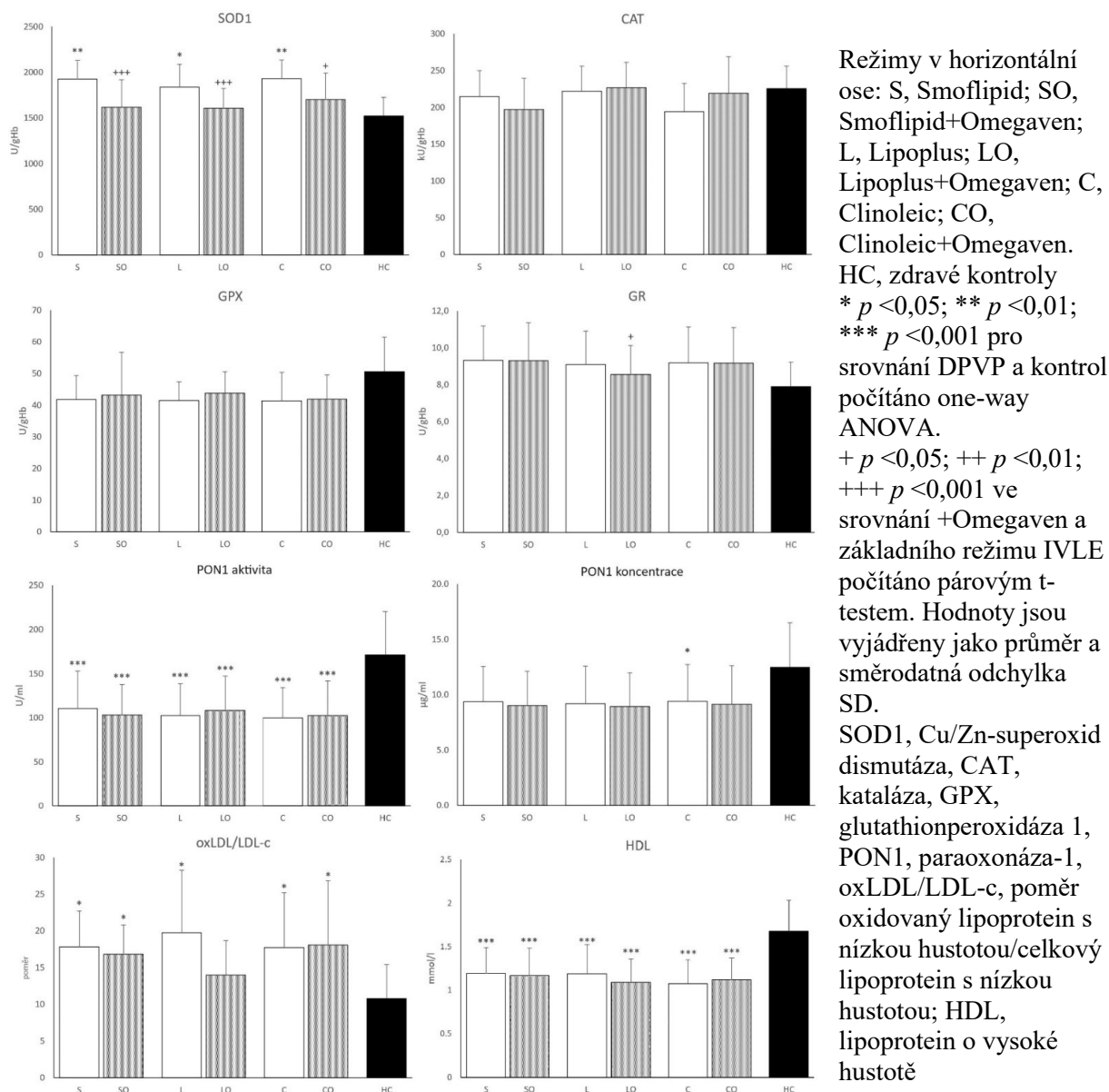
Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměry a směrodatná odchylka SD. \* DPVP vs. kontroly počítáno one-way ANOVA; <sup>S</sup> Lipoplus vs. Smoflipid; <sup>C</sup> Lipoplus vs. Clinoleic počítáno Friedmann ANOVA testem; <sup>+</sup> Omegaven vs. základní režim emulze počítáno párovým t-testem; \*<sub>C,+</sub>  $p < 0,05$ ; \*\*<sub>SS,++</sub>  $p < 0,01$ ; \*\*\*<sub>+,+++</sub>  $p < 0,001$  CRP, C-reaktivní protein; IL-6, interleukin 6; IL-8, interleukin 8, TNF-α, tumor necrosis factor-α, LPS, lipopolysacharid Převzato a upraveno z (Novak et al., 2019)

### f/ Antioxidační enzymy

Aktivity antioxidačních enzymů v erytrocytech jsou vyjádřeny v grafech na [obrázku 4](#). Pozoruhodné výsledky byly pozorovány u aktivit SOD1. Ve všech základních režimech DPVP byly hodnoty SOD1 zvýšené ve srovnání s hodnotami ve skupině HC. Přidaný Omegaven pak významně snížil aktivity SOD1 směrem k aktivitám pozorovaným u HC, resp. prakticky na jejich úroveň. Aktivity CAT v erytrocytech se nelišily mezi jednotlivými režimy DPVP ani vzhledem k HC. Aktivity GPX a GR byly mírně odlišné od HC, ale bez statistické významnosti. Pouze aktivita GR byla významně nižší v režimu Lipoplus + Omegaven ve

srovnání s bazálním režimem Lipoplus. Aktivita PON1 byla nižší u všech režimů DPVP ve srovnání s HC. Koncentrace PON1 obecně sledovala hodnoty jeho aktivity, ale rozdíl mezi DPVP a HC neměl statistickou významnost vyjma režimu Clinoleic. Podobně i koncentrace HDL cholesterolu byly nižší u režimů DPVP ve srovnání s HC. Poměr oxLDL cholesterolu k celkovému LDL cholesterolu byl vyšší u všech DPVP s výjimkou režimu Lipoplus + Omegaven, kde rozdíl oproti HC nebyl významný. Mezi režimy DPVP rozdíl pozorován nebyl.

**Obrázek 4:** Grafy aktivit antioxidantních enzymů v séru a sérové koncentrace HDL.



Převzato a upraveno z (Sevela et al., 2024)

### g/ Biochemické parametry

U všech režimů DPV byly hladiny celkového cholesterolu, HDL cholesterolu, apoprotein A1, apoprotein B nižší v porovnání s HC. V hodnotách triacylglycerolů, LDL cholesterolu a lipoproteinu (a) nebyly významné rozdíly. Dále byla nižší koncentrace vápníku, naopak vyšší množství transferinu u DPVP ve srovnání s HC. Ferritin by sice v průměru vyšší u DPVP, ale

vykazoval také velký rozptyl a statistická významnost potvrzena nebyla. Hodnota sérového amyloidu A (SAA) se statisticky nelišila.

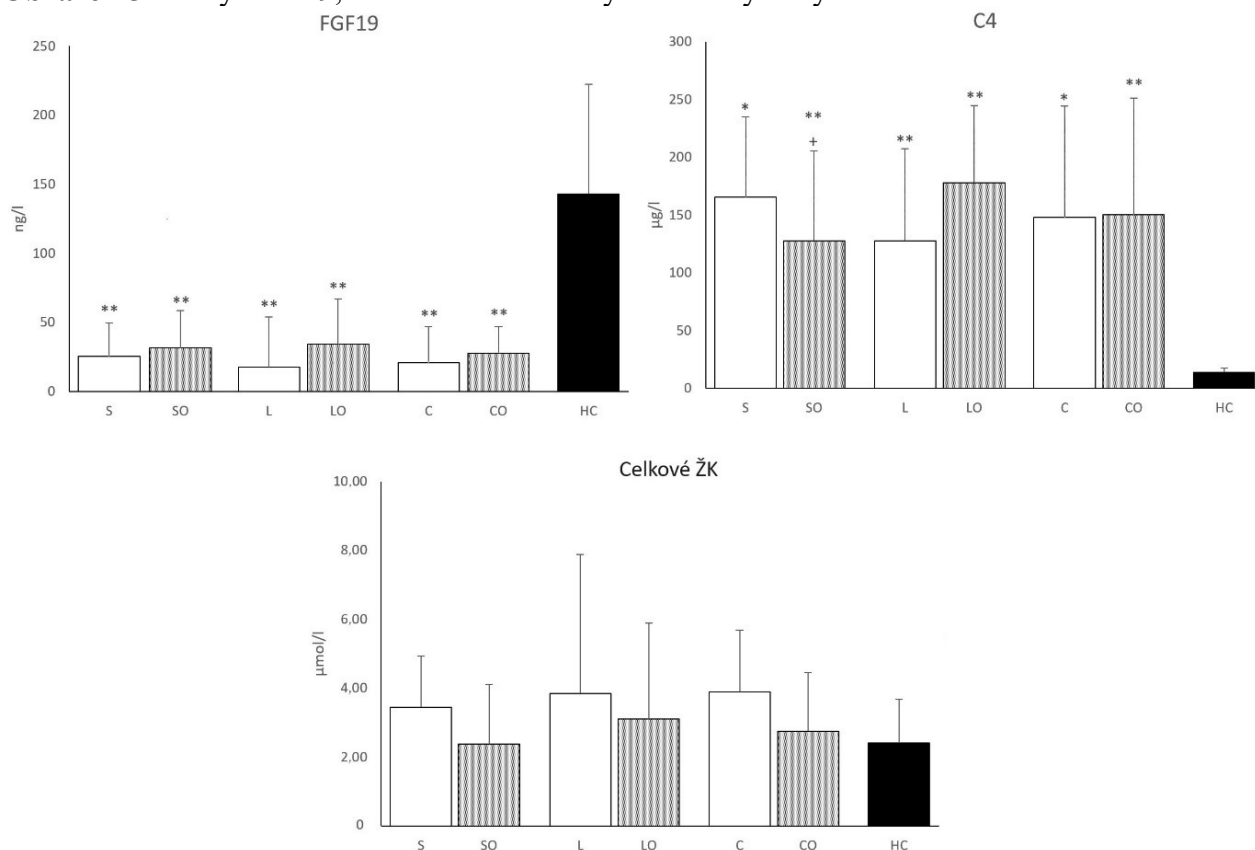
Pokud jde o základní biochemické jaterní parametry, tj koncentrace celkového bilirubinu, aktivity enzymů AST, ALT a GGT se mezi režimy a oproti HC nelišily se statistickou významností (tabulka 8). V hodnotách ALP jsme však zaznamenali vyšší aktivitu u všech DPVP ve srovnání s HC. Nicméně hodnoty byly stále ve rozmezí fyziologických hodnot. Přidání přípravku Omegaven snížilo aktivitu ALP pouze u režimu Smoflipid.

#### a/ FGF19 a žlučové kyseliny

Zjistili jsme významně nižší hodnoty FGF19, a naopak vyšší koncentrace cholestenu (C4) u všech DPVP oproti skupině HC. Přidání přípravku Omegaven statisticky významně snížilo koncentraci C4 pouze u režimu Smoflipid a u všech režimů byl zaznamenán mírný vzestupný trend FGF19, ale bez statistické významnosti.

Koncentrace celkových ŽK měly tendenci k vyšším hodnotám ve všech bazálních režimech oproti HC, nikoli však se statistickou významností. Grafické vyjádření je na [obrázku 5](#).

**Obrázek 5:** Grafy FGF19, cholestenu a celkových žlučových kyselin v séru.



Režimy v horizontální ose: S, Smoflipid; SO, Smoflipid+Omegaven; L, Lipoplus; LO, Lipoplus+Omegaven; C, Clinoleic; CO, Clinoleic+Omegaven. HC, zdravé kontroly

Hodnoty pro FGF19, C4 a celkové ŽK jsou vyjádřeny jako medián a 75% percentil

\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  pro srovnání DPVP a zdravých kontrol počítáno Kruskal-Wallis testem

+  $p < 0,05$ ; ++  $p < 0,01$  pro srovnání +Omegaven a základního režimu počítáno Wilcoxon signed-rank testem

FGF19, fibroblastový růstový faktor 19; C4, cholesten, ŽK, žlučové kyseliny

Převzato a upraveno z (Sevela et al., 2024)

Z hlediska spektra ŽK, sérová koncentrace konjugované kyseliny glykodeoxycholové byla významně nižší ve všech skupinách DPVP a nekonjugovaná kyselina lithocholová byla nižší pouze v režimech Smoflipid, Lipoplus, Clinoleic a Clinoleic + Omegaven ve srovnání s HC. V ostatních koncentracích ŽK nebyly zjištěny žádné rozdíly. U všech DPVP byl ve srovnání s HC sledován zvýšený poměr primárních a sekundárních ŽK.



Zaznamenali jsme také významnou pozitivní korelaci mezi FGF19 a SOD1 vyskytující se pouze v základních režimech DPVP, která po přidání přípravku Omegaven vymizela. Dále aktivita ALP pozitivně korelovala s koncentrací C4 a také s poměrem primární/sekundární ŽK (tabulka 4).

**Tabulka 4:** Základní jaterní enzymy, celkový bilirubin a korelační koeficienty

		Smoflipid		Lipoplus		ClinOleic		Kontroly
		základní	+Omegaven	základní	+Omegaven	základní	+Omegaven	
ALT	( $\mu\text{cat/l}$ )	0,61 $\pm$ 0,35	0,7 $\pm$ 0,44	0,89 $\pm$ 0,75	0,9 $\pm$ 0,81	0,91 $\pm$ 0,94	0,69 $\pm$ 0,43	0,36 $\pm$ 0,08
AST	( $\mu\text{cat/l}$ )	0,48 $\pm$ 0,17	0,53 $\pm$ 0,19	0,58 $\pm$ 0,22	0,6 $\pm$ 0,27	0,61 $\pm$ 0,34	0,55 $\pm$ 0,14	0,41 $\pm$ 0,07
GGT	( $\mu\text{cat/l}$ )	0,6 $\pm$ 0,54	0,65 $\pm$ 0,54	0,73 $\pm$ 0,57	0,74 $\pm$ 0,44	0,82 $\pm$ 0,72	0,83 $\pm$ 0,48	0,31 $\pm$ 0,19
ALP	( $\mu\text{cat/l}$ )	1,82 $\pm$ 0,48 <sup>*,+</sup>	1,67 $\pm$ 0,41 <sup>*</sup>	1,79 $\pm$ 0,43 <sup>*</sup>	1,71 $\pm$ 0,4 <sup>*</sup>	1,78 $\pm$ 0,38 <sup>**</sup>	1,82 $\pm$ 0,35 <sup>*</sup>	1,21 $\pm$ 0,54
Celkový bilirubin	( $\mu\text{mol/l}$ )	13,3 $\pm$ 9,8	15,6 $\pm$ 13,2	17,9 $\pm$ 20,4	18,3 $\pm$ 17,7	19,4 $\pm$ 24,2	16,6 $\pm$ 14,3	10,4 $\pm$ 4,5
FGF19 vs SOD1	#	0,82 <b>p=0,001</b>	0,38 p=0,228	0,7 <b>p=0,011</b>	0,47 p=0,88	0,76 <b>p=0,004</b>	0,39 p=0,21	0,2478 p=0,43
ALP vs C4	#	0,43 p=0,166	0,47 p=0,122	0,79 <b>p=0,002</b>	0,58 <b>p=0,047</b>	0,72 <b>p=0,008</b>	0,71 <b>p=0,009</b>	-0,08 p=0,81
ALP vs p/s ŽK	#	0,65 <b>p=0,021</b>	0,57 <b>p=0,053</b>	0,51 p=0,088	0,64 <b>p=0,026</b>	0,69 <b>p=0,012</b>	0,63 <b>p=0,028</b>	0,601 <b>p=0,04</b>

Bilirubin a jaterní enzymy jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  směrodatná odchylka SD.

\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ , pro srovnání DPVP a zdravých kontrol počítáno one-way ANOVA.

+  $p < 0,05$ ; pro srovnání +Omegaven a základního režimu, počítáno párovým t-testem

ALT, alanintransferáza; AST, aspartáttransferáza; GGT,  $\gamma$ -glutamyltransferáza; ALP, alkalická fosfatáza;

FGF19, fibroblastový růstový faktor 19; SOD1, Cu/Zn-superoxid dismutáza C4, cholesten; p/s ŽK,

primární/sekundární žlučové kyseliny; # Spearman korelační koeficienty;  $p < 0,05$  jako signifikantní

## 5. Diskuse

### a/ Spektrum mastných kyselin

Emulze s RO způsobily navýšení EPA a DHA a eskalace RO Omegavenem dále jejich podíl zvýšila s poklesem poměru n-6/n-3 PUFA. Emulze s OO zvýšila zejména podíl MUFA. Profil MK v EFL je považován za marker stavu tkáňového profilu MK (Harris et al., 2004). Studie zkoumající inkorporaci n-3 PUFA do membrány erytrocytů během perorální suplementace ukázaly, že ekvibrace MK v EFL trvá nejméně 1-2 měsíce. Intravenózní cesta suplementace je však účinnější z důvodu úplné biologické dostupnosti u zdravých dobrovolníků i v různých populacích pacientů, s dobou zabudování 3–5 dní a vymývání 2–3 týdny (Katan et al., 1997; Ling et al., 2001). S ohledem na to byly při plánování této studie považovány 6týdenní cykly podávání výchozích IVLE (Lipoplus a Clinoleic) za dostatečné. Nicméně výsledky průřezové studie Pironi a kol., v níž také sledovali zastoupení jednotlivých MK v EFL u DPVP v režimech Smoflipid a Clinoleic, byly plně v souladu s našimi výsledky pouze pro Smoflipid, ale nikoli pro Clinoleic, zejména co se týká podílů DHA a ARA (Pironi et al., 2017). Inkorporace MK po podání Omegavenu měla však významný klesající účinek na ARA a zvyšující se účinek na EPA v EFL u DPVP, které vedly k dalšímu poklesu poměru n-6/n-3, a tak potvrdily úspěšnou inkorporaci MK z Omegaven podávaného po všech základních režimech IVLE. Změny v profilu MK PFL byly podobné těm, které jsme popsali u EFL. To znamená, že byl významný pokles podílu ARA a vyšší podíl EPA a DHA v PFL u DPVP. Nicméně, musíme konstatovat, že režimy následující po Omegavenu byly stále ovlivněny vysokou dávkou RO. Týká se to zejména IVLE režimu s Clinoleic.

### b/ Zánětlivá imunitní odpověď

Při srovnávání jednotlivých výchozích režimů IVLE jsme nezaznamenali žádné statisticky významné rozdíly v sérové koncentraci CRP, leukocytů a SAA ani mezi DPVP samotnými, ani vůči HC. Nicméně byly patrné zvýšené hodnoty IL-6, TNF- $\alpha$  a zčásti také IL-8 (vyjma režimů s Clinoleic) u DPVP ve srovnání s HC.

Podobně několik studií srovnávalo DPVP po dlouhodobém podávání různých komerčně dostupných IVLE. Vahedi a kol. porovnávali Clinoleic vs Intralipid (lipidová emulze ze SojO), přičemž nepozorovali žádné rozdíly v koncentracích CRP (Vahedi et al., 2005). Podobně srovnání režimů Smoflipid vs Intralipid neprokázalo žádné rozdíly v sérových koncentracích CRP, IL-6 nebo TNF solubilního receptoru II v další studii (Klek et al., 2013). Náhrada původních IVLE Intralipid nebo Medialipid (50 % MCT a 50 % SojO) přípravkem Clinoleic u DPVP nezměnila zánětlivé parametry po jednom, ani po třech měsících podávání u DPVP ve starší studii (Reimund et al., 2005).

Na druhé straně, Osowska a kol. zkoumali účinek změny DPV z Intralipidu na Smoflipid nebo Clinoleic. Smoflipid neovlivnil sérové cytokiny, leč Clinoleic snižoval sérové koncentrace IL-8 (podobně jako v naší studii), ale také GGT (Osowska et al., 2019). V rámci srovnávání s naší studií je ovšem, že dávky IVLE ve studii Osowské byly relativně nízké, PEV obsahovala pouze 20 g lipidů, zatímco v našem souboru jsme podávali 50 g na dávku PEV. Ve studii Bohnert a kol. srovnávali 2 režimy IVLE, druhogenerační emulzi (MCT/SojO) s čtvrté generace (MCT/SojO/RO). Přesto, že byly po 8 týdnech výrazné změny ve spektru MK, neshledali rozdíly v CRP, ani zánětlivých cytokinech IL-6, TNF- $\alpha$ , či protizánětlivém IL-10 (Bohnert et al., 2018).

V naší studii vedlo přidání RO v podobě Omegavenu ke snížení LPS stimulované produkce IL-1 $\beta$ , IL-6 a TNF- $\alpha$  během cyklu Smoflipid ve srovnání se základní emulzí. V souladu s tím, Omegaven snížil LPS-stimulovanou produkci IL-1 $\beta$  v režimu Clinoleic. Nicméně přídavek Omegavenu již neměl žádný významný vliv na cyklus s Lipoplus. Je patrné, že koncentrace cytokinů již během základního režimu Lipoplus byly podobné koncentracím cytokinů v jiných režimech IVLE po přidání Omegavenu. Kromě toho byl Lipoplus + Omegaven jediným režimem, v němž nebyla žádná korelace mezi dávkou EPA+DHA v podávané IVLE a IL-6. Možným vysvětlením tohoto vztahu je plató efekt odpovědi na dávku, resp. že už v rámci cyklů a podávání RO již došlo k takovému nasycení n-3 PUFA, že se další vliv již neprojevil. Výsledky jiných studií *in vitro* stimulačních účinků LPS na leukocyty po suplementaci RO jsou spíše rozporuplné. U zdravých dobrovolníků bylo prokázáno, že krátkodobá parenterální suplementace čistého RO nemá žádný vliv na LPS-indukované produkce cytokinů ani ve srovnání se suplementací emulzí na bázi SojO. Neprokázali rovněž žádné rozdíly v TBARS, markerech oxidace a v aktivitách antioxidantních enzymů (Versleijen et al., 2012). Šlo zde o krátkodobé podávání IVLE, a byť s prokázaným efektem na složení PFL, srovnatelnost s námi je tímto omezená. V další studii Guarini a kol prokázali zvýšení EPA a DHA v neutrofilech zdravých dobrovolníků suplementovaných perorálním RO, ale bez jakéhokoli vlivu na funkci neutrofilů, naopak SojO zvýšil tvorbu superoxidu (Guarini et al., 1998). Další výsledky Reese a kol. naznačují určitý protizánětlivý efekt RO, neboť u nich byla u zdravých dobrovolníků po perorální suplementaci RO, s prokázaným efektem na MK v PFL a fosfolipidech monocytů, zaznamenána snížená produkce prostaglandinu E2 indukovaná LPS (Rees et al., 2006). U studie na populaci septických pacientů, nálezy Mayera a kol prokázaly pokles LPS indukované produkce prozánětlivých cytokinů monocytů po parenterálním podání RO ve srovnání s infuzí SojO (Mayer et al., 2003). Na zvířecím modelu pak Yakah a kol. prokázali výrazné snížení LPS indukované produkce IL-1 $\beta$ , ale ne dalších cytokinů u IVLE s RO (Yakah et al., 2021)

Existuje několik možných vysvětlení těchto nejednotností. Zásadní rozdíl zřejmě spočívá mezi akutním zánětlivým stavem po operaci či po traumatu a u pacientů se sepsí ve srovnání se stavy s nízkou mírou chronického zánětu, jako je u našich pacientů s chronickým intestinálním selháním, a také v odlišnosti od zdravých jedinců.

Další faktor může spočívat také ve velikosti podávané dávky RO a také na době podávání, eventuálně i cestě této suplementace. Tento pohled může podporovat srovnání několika studií, a to studie se suplementací 1400 mg EPA+DHA po dobu 18 týdnů, která nesnížila běžné

markery systémového zánětu u zdravých dospělých, ani neovlivnila produkci IL-6 *in vitro* (Muldoon et al., 2016). Ferguson a kol. podávali per os buď nízké (900 mg/d), nebo vysoké (3600 mg/d) dávky EPA+DHA po dobu 28 týdnů zdravým dobrovolníkům a prokázali, že v případě vysoké dávky byla signifikantně zmírněná horečka po LPS a byl zaznamenán trend ke snížení produkce zánětlivých mediátorů (Ferguson et al., 2014). V souladu s tímto prokázala další studie potlačení *in vitro* LPS indukované zánětlivé reakce monocytů odebraných skupině DPVP, kterým byla podávána velmi vysoká dávka Omegavenu. Naopak tato reakce byla zesílena přidáním SojO. V této studii byl Omegaven v dávce 1g/kg/d, 5x týdně po dobu 4 měsíců podáván 2 pacientům s IFALD, přičemž u nich zlepšil klinické parametry, markery fibrózy a snížil zánětlivé parametry včetně IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-6 a TNF- $\alpha$  až na úroveň zdravých kontrol. Tento účinek nicméně vymizel po ukončení podávání vysokých dávek RO a návratu k původním IVLE (Pastor-Clerigues et al., 2014). Další studie Kleka a kol. v retrospektivní analýze srovnávala podávání poměrně vysokých dávek RO kolem 0,4g/kg váhy u skupin pacientů s CIF, ale také se s nespecifickým střevním zánětem (IBD). Pozorovali snížení produkce IL-6 při intervenci RO, bohužel však detailnější parametry zánětu stanovovali jen u IBD skupiny, kterou sledovali 12 týdnů. V případě CIF sledovali pouze základní CRP a jaterní parametry, přičemž zaznamenali jen nesignifikantní snížení bilirubin a CRP (Klek et al., 2020).

Z našich výsledků rovněž vyplývá, že DPVP vykazovali (a to bez ohledu na druhy IVLE) mírný chronický prozánětlivý stav, potvrzený vyššími koncentracemi cytokinů v séru a také *in vitro* LPS stimulovanou produkcí cytokinů, navzdory nižším hodnotám poměru n-6/n-3 PUFA ve srovnání s HC. S tímto zjištěním se shoduje řada dalších studií zabývajících se pacienty s CIF (Bizari et al., 2016; Hise et al., 2006; Kosek et al., 2020).

Rovněž ve studii Kleka a kol. srovnávající 2 skupiny DPVP, které dostávaly buď emulzi se SojO (Intralipid), nebo Smoflipid po dobu 1 měsíce došli k tomuto závěru (Klek et al., 2013). V naší studii byla *in vitro* LPS stimulovaná produkce IL-1 $\beta$  nižší v režimu Lipoplus ve srovnání s režimem Smoflipid, produkce IL-8 byla v režimu Lipoplus rovněž nižší ve srovnání s ostatními základními režimy, v souladu s nižšími poměry n-6/n-3 PUFA u DPVP. Další možné vysvětlení rozdílů může také spočívat v různých zdrojích RO v IVLE. Zatímco ve Smoflipidu je obsažen přírodní RO (Pharmacopoeia, 2014), Lipoplus obsahuje reesterifikovaný RO obohacený EPA+DHA (Pharmacopoeia, 2012). RO v Lipoplus by tedy mohl poskytnout více protizánětlivých mediátorů na jednotku objemu než Smoflipid. Dále je zde už zmíněná skutečnost určitého nasycení RO v režimech následujících po podání Smoflipidu + Omegaven. Dosud nebyl publikován žádný výzkum, který by porovnával účinky přirozené vs. reesterifikovaného RO v parenterální výživě v rámci lidské populace. Fell a kol. provedli studii na myším modelu, kde prokázali, že zatímco vysoká dávka parenterálně podávané přirozeného RO byla bezpečná, podávání vysokých dávek reesterifikovaného RO mělo škodlivé účinky na orgány (Fell et al., 2017).

Dalším vysvětlením rozdílného účinku Lipoplus, ve srovnání s jinými IVLE, je jeho vysoký obsah přímo metabolizovaného MCT oleje, složeného z 6- až 12uhlíkových MK. Ve vodě relativně lépe rozpustné MK se středně dlouhým řetězcem se přímo portálním řečištěm rychleji dostávají do jater, kde jsou snadněji oxidovány než MK s dlouhým řetězcem (Carlson et al., 2015; Mundi et al., 2017). Navíc MK se středně dlouhým řetězcem nejsou inkorporovány do membránových fosfolipidů, postrádají tedy biologické účinky. Skutečné poměry SFA+MUFA/PUFA v emulzích s MCT (Lipoplus a Smoflipid) dostupnými pro začlenění do EFL byly ve skutečnosti nižší, zejména pro Lipoplus (1,76 bez C6-C12 MK vs 2,79 při zahrnutí všech MK) a Smoflipid (2,34 oproti 2,97). Tento nálezný může být podpořen studií na zvířatech, která ukazuje, že přidání MCT do RO diety může snížit zánětlivou odpověď hostitele (Carlson et al., 2015).

Je však třeba poznamenat, že klinický význam snížené imunitní reaktivity je zcela neznámý. Může být jak prospěšný, ale i potenciálně škodlivý. Není dostatečně znám ani vliv oslabení normální imunitní reakce na chronický zánět nebo sepsi. Suplementace může být užitečná pro pacienty s vystupňovanou zánětlivou odpovědí, ale škodlivá pro pacienty s imunosupresivním a hypoinflamatorním stavem.

### c/ Antioxidační systém

Vliv suplementace n-3 PUFA na redoxní stav u DPVP je kontroverzní problematika (Heshmati et al., 2019). Většina studií potvrzuje, že n-3 PUFA díky velkému počtu dvojných vazeb zvyšují OS, což zároveň stimuluje expresi transkripčních faktorů navyšující kapacitu antioxidačních systémů (Zaloga, 2021). Velký vliv v tomto má i parenterální podávání tukové emulze, která je k lipoperoxidaci náchylná. Zvýšený OS je jedním z hlavních mechanismů přispívajících k patogenezi několika chronických onemocnění spojených se zánětem nízkého stupně a podílí se rovněž mimo jiné na poškození jater (Heshmati et al., 2019; Koek et al., 2011), přičemž nízký zánět byl pozorován také u našich DPVP. Tento předpoklad podporuje naše zjištění signifikantně vyšší aktivity SOD1 erytrocytů a koncentrace oxLDL v plazmě ve všech bazálních režimech DPV při srovnání s HC. Zvýšení intracelulární exprese SOD1 je zřejmě účinným prostředkem ke zmírnění poškození buněk během zvýšeného OS (Vogt et al., 1998).

Ve studii (Kosek et al., 2020) byl potvrzen zvýšený OS u DPVP, a to jak při podávání IVLE s obsahem RO, tak v režimu Clinoleic + RO, vyjádřený vyššími koncentracemi malondialdehydu (MDA), proteinových karbonylů a sníženým redoxním statutem (GSH/GSSG). Pozorovali rovněž pozitivní korelaci MDA s n-3 PUFA. Hodnoty SOD1 a GPx-1 se však nelišily. V naší studii jsme nicméně jasné zvýšení OS při eskalaci dávky RO neprokázali, byť jasnější porovnání je v tomto omezeno absencí srovnatelných markerů oxidačního stresu či redoxního statusu. Jako nepřímý ukazatel OS máme k dispozici zvýšené hodnoty oxLDL ve všech IVLE režimech, pouze v režimu Lipoplus + Omegaven jsme zaznamenali určitý pokles. Pokud jde o Omegaven, ten naopak snížil aktivitu SOD1 po všech třech režimech téměř na úroveň HC.

Částečné vysvětlení rozporů se srovnávanou studií Kosek a spol. může spočívat v již diskutované skutečnosti, že 6týdenní vymývací období pro Omegaven před následnou bazální emulzí bylo příliš krátké, a tak v režimu Clinoleic zůstal membrány pacientů se zvýšeným obsahem n-3 PUFA, jak dokazuje složení MK jak v EPL, tak v PFL.

Antioxidační kapacita u DPVP byla rovněž zkoumána skupinou Rogulska a kol., kteří konstatovali její snížení vůči zdravým kontrolám. Srovnání různých IVLE (Smoflipid, Intralipid a Clinoleic) ukázalo nejmenší hodnoty MDA v případě podávaného Smoflipidu. Případné komorbidity pacientů hodnoty MDA významně navýšily (Rogulska et al., 2021). Ve studii zaměřené na OS u pacientů s 2. typem IF bylo popsáno snížení MDA u pacientů, kteří dostávali IVLE obohacenou RO (Flores-López et al., 2023). Srovnatelnost ovšem omezuje kratší doba podávání 7 dní a subakutní typ IF.

Vliv suplementace n-3 PUFA na aktivitu SOD1 v séru byl studován v 10 studiích. A byť šlo vesměs o perorální aplikaci, metaanalýza těchto studií neprokázala žádný významný rozdíl v aktivitě SOD1 v séru mezi skupinami suplementovanými n-3 PUFA ve srovnání se skupinami, kterým bylo podáváno placebo, a to bez ohledu na délku podávání nebo dávku n-3 PUFA (200–2500 mg EPA+ DHA). Rovněž další metaanalýza 25 obdobných studií konstatovala snížení MDA při podávání n-3 PUFA (Heshmati et al., 2019). Srovnatelnost je samozřejmě omezená, neboť nešlo o aplikaci IVLE.

Můžeme nicméně konstatovat, že v naší studii jsme podávali mnohem vyšší dávky RO přidáním Omegavenu (odpovídající průměrně 90 mg/kg tělesné hmotnosti a den u Clinoleic + Omegaven, až 120 mg/kg těl. váhy a den u Lipoplus + Omegaven, v přepočtu na absolutní

hodnoty 6300–8400 mg EPA+DHA v režimech s Omegaven). V tomto směru není zatím známa žádná srovnatelná intervence u lidských subjektů.

V rámci zvířecích modelů, Miloudi a kol. měřili jaterní markery OS u novorozenečích morčat, kterým byla po dobu 4 dnů podávána tuková emulze buď SojO (Intralipid 20%), nebo čistý Omegaven v poměrně vysoké dávce. Prokázali, že Omegaven u nich snížil OS vyjádřený markery lipoperoxidace a také poškození jater (Miloudi et al., 2012).

Při uvažování a posuzování antioxidační rovnováhy a IVLE je třeba vzít úvahu i antioxidační účinek  $\alpha$ -tokoferolu, který byl pacientům podáván společně s vysokou dávkou rybího tuku. Existují studie, které potvrzují ochranný účinek tohoto vitamínu proti peroxidaci PUFA, ale obecně jsou výsledky značně kontroverzní; existují rovněž studie prokazující jeho prooxidační účinek (Traber & Head, 2021; Zaloga, 2021). Přímo sérové koncentrace jsme sice neměřili, nicméně z obsahu  $\alpha$ -tokoferolu v podávaných IVLE je patrné, že jeho dávky byly rovněž navýšené v režimech s RO, leč stále bezpečné z hlediska možné toxicity. Toxické jsou v řádech stovek mg (Traber & Head, 2021), přičemž pacienti dostávali desítky mg.

Je rovněž zajímavé, že nedávno byl popsán vztah mezi FGF19 a OS několika možnými mechanismy zahrnující mj. modulaci reakce na OS aktivací antioxidačních drah (Shimizu & Sato, 2022). Toto může být v souladu s naším zjištěním úzké korelace mezi koncentrací FGF19 a aktivitou SOD1 ve všech bazálních emulzích, které mizí po podání Omegavenu, u kterého se normalizovalo SOD1 téměř na hodnoty HC.

Naše výsledky ukazují, že další suplementace n-3 PUFA pomocí Omegavenu neměla žádný účinek na hodnoty oxLDL což naznačuje, že nedochází k žádné další eskalaci OS. Tento výsledek by mohl naznačovat, že antioxidační systém byl dostatečně stimulován, aby zvládl další n-3 PUFA podáním Omegavenu, což také může ukazovat normalizovaná aktivita SOD1. Je rovněž zajímavé, že hodnoty dalších antioxidačních enzymů se při střídání IVLE neměnily. V režimu Lipoplus + Omegaven byl zaznamenán mírný, leč signifikantní pokles glutathion reductázy.

PON1 je protein spojený s HDL, jehož úlohou je chránit částice LDL před oxidačními modifikacemi tím, že snižuje tvorbu prozánětlivých oxidovaných fosfolipidů (Vakili et al., 2014). Pokud jde o naše DPVP, vykazující zánětlivý stav nízkého stupně, aktivita i koncentrace PON1 byly ve srovnání s HC sníženy (aktivita signifikantně). Snížení aktivity PON1 je rovněž popisováno u zánětlivého onemocnění střev, odrážející aktivitu a závažnost zánětu (Boehm et al., 2009).

Existují také důkazy, že množství a složení lipidů v potravě jsou klíčovými faktory při modulaci PON1. Zapojené molekulární mechanismy zahrnují účinek na jaterní syntézu nebo sekreci PON1 či modifikaci interakcí PON1 s HDL. Změny aktivity PON1 by také mohly souviset s příjmem oxidovaných lipidů, které se chovají jako inhibitory PON1 (Ferretti & Bacchetti, 2012). Fuhrman a kol. hodnotili oxidaci séra u myši suplementovaných různými MK nebo oleji. DHA (purifikovaná mastná kyselina) a RO (typ nespécifikovaný) zvýšily oxidaci séra a snížily aktivitu PON1 ve srovnání s kyselinou olejovou, OO, kyselinou linolovou a SojO (Fuhrman et al., 2006). Účinek byl potvrzen i u lidí další studií Freese a kol., kteří ale neprokázali signifikantní změny v markerech lipoperoxidace (Freese et al., 2002).

#### d/ Markery stavu jaterní tkáně

S ohledem na důležitou roli ŽK nejen ve střevním, ale i jaterním metabolismu a také rozvoji IFALD jsme se rozhodli prozkoumat jejich změny u pacientů s CIF a případný vliv n-3 PUFA. Až na mírně vyšší hodnoty DCA a trendy k vyšším gCA a gCDCA jsme nezjistili významné rozdíly v hodnotách celkových ŽK v séru ani rozdíly vzhledem k HC. Poměr primárních a sekundárních ŽK byl nicméně vyšší u všech DPVP ve srovnání s HC vlivem vyšších primárních a mírně nižších sekundárních ŽK u DPVP. Na druhé straně rozdíly

pozorované u FGF19 a C4 mezi DPVP a HC ukazují změnu metabolismu ŽK ve smyslu zvýšené syntézy ŽK pro pokrytí střevních ztrát, při zachování celkového poolu ŽK. Celkově jsou naše zjištění v souladu s dříve publikovanou studií zaměřenou na spektrum ŽK u syndromu krátkého střeva, kde byl zjevný vzestup poměru primární/sekundární ŽK, nepozorovali ani zvýšení celkových ŽK v séru (Boutte et al., 2022). Další studie Budínské a kol. zkoumající vztah mikrobiomu u DPVP a metabolismu ŽK popsala také významné změny, mj. rovněž vyšší primární ŽK a pokles až absenci LCA (Budinska et al., 2020). Nicméně v naší studii jsme vzhledem k heterogenitě kohorty DPVP, komplexnosti metabolomu ŽK a relativně nízkému počtu pacientů pozorovali zásadní změny v rámci suplementace RO.

Problematicke IFALD a jeho vztahu nejen k IVLE se věnuje řada prací založených na kazuistických sděleních, společně konstatujících zlepšení známek jaterního poškození při podávání emulzí s RO (Hurt & Mundi, 2017), ale také změnou IVLE ze SojO na směsnou emulzi Smoflipid, která navíc umožnila zvýšit dávku lipidů (Mundi et al., 2018). Příznivé ovlivnění jaterních markerů ALT, AST a bilirubinu zaznamenali také při podávání Smoflipidu ve srovnání se SojO IVLE ve studii Kleka a kol. již zmíněné v souvislosti s cytokiny (Klek et al., 2013). V této studii navíc shledali signifikantní zvýšení sérového  $\alpha$ -tokoferolu u skupiny Smoflipidu.

Zajímavá je dále studie na animálním modelu Chen a kol., kteří podávali 2 týdny buď RO IVLE, nebo MCT/LCT (II. generace IVLE), přičemž shledali, že emulze s RO snížila zánětlivou odpověď (vyjádřenou mj. snížením TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ), zlepšila oxidaci MK a snížila rovněž známky OS (zejm. snížení MDA). Navíc prokázali v RO skupině změnu mikrobioty ve prospěch eubacterií a bifidobakterií a zřejmě s tím související změny spektra ŽK (Chen et al., 2022). V tomto směru se ukazuje další možný potenciál a mechanismus působení zvýšené substituce n-3 PUFA.

Další animální studie Bechyňské a kol. zkoumala vliv n-3, n-6 PUFA podávaných v IVLE a enterálně. U IVLE pak došli k závěrům, že podávání n-3 PUFA má ochranné účinky svým pozitivním vlivem na antioxidační kapacitu ve srovnání s n-6 PUFA, které bylo spojeno s jejím snížením. Také bylo konstatováno normální spektrum ŽK při podávání RO IVLE. (Bechynska et al., 2019).

Všechny režimy DPVP byly spojeny s vyššími aktivitami ALP ve srovnání s HC, byť ty se stále nacházely v rozmezí stanovených fyziologických hodnot. Účinek přidaného Omegavenu byl pozorován pouze v režimu Smoflipid, kde došlo ke snížení aktivity ALP. Enzym ALP se tradičně používá jako marker cholestázy a také jako zástupný marker retence ŽK (Poupon, 2015). ŽK jsou také hlavními determinanty ovlivňující jaterní aktivity a sekrece ALP. Avšak je známo, že LPS také indukuje aktivitu ALP, což může hrát roli v protizánětlivé odpovědi (Pike et al., 2013; Tuin et al., 2006). V naší studii jsme dále našli pozitivní korelaci hodnot ALP s poměrem primárních a sekundárních ŽK spolu s trendem k negativní korelaci se sekundárními ŽK. Dále zde byla pozitivní korelace mezi hodnotami ALP a C4. Tyto výsledky patrně naznačují souvislost mezi možným zánětem nízkého stupně, vycházející ze střevní sliznice a zvýšeným průnikem LPS do portálního oběhu a jater, a narušením metabolismu a enterohepatálního cyklu ŽK u DPVP.

Zkřížený design a dlouhodobě stabilní klinické nastavení nám umožnily kontrolovat genetické rozdíly a do značné míry i další nutriční vlivy. PEV poskytovaná pacientům během celé studie byla izokalorická a jediné změny spočívaly právě v poskytnutých IVLE. Zahrnutí párovaných zdravých kontrol nám dovolilo lepší porovnání a interpretaci nálezů.

Navíc je studie přínosná a specifická především v množství n-3 mastných PUFA podaných v IVLE pacientům a také dlouhé době podávání.

Na druhé straně, relativně malý počet pacientů představuje jedno z omezení této studie. Také určitá heterogenita v etiologii intestinálního selhání pacientů znamenala možné ovlivnění výsledků a ztížení interpretace zejména v metabolismu žlučových kyselin.

Za nedostatek také považujeme absenci více parametrů oxidačního stresu, resp. oxidačních produktů lipoperoxidace, která ztížila interpretaci výsledků SOD1. Z dalších parametrů, které mohly být změřeny, uvažujeme např. hladiny vitamínu E, který má k lipoperoxidaci také úzký vztah. Další rezervou je nestanovení některých protizánětlivých cytokinů, jako IL-10. Možností by také bylo zapojení dalších metod k posouzení stavu jaterního parenchymu a funkce, např. ultrazvukové a elastografické vyšetření. Metodickým problémem je také již diskutovaná doba podávání lipidových emulzí, která se projevila nedostatečnou, s ohledem na pravděpodobné ovlivnění následujících režimů základní IVLE předchozím podáváním Omegavenu.

## 6. Závěry

Intravenózní lipidové emulze jsou základní složkou DPV u pacientů s CIF. Tento stav je mimo jiné charakterizovaný mírným zánětem, poruchou oxidační rovnováhy a jaterním poškozením. V této studii jsme zkoumali ovlivnění některých parametrů související s těmito stavy podáváním tří různých komerčně vyráběných IVLE a následným navýšením suplementace n-3 PUFA emulzí rybího oleje.

Hlavní výsledky:

- Prokázali jsme úspěšnou inkorporaci n-3 PUFA, zejm. EPA a DHA do erytrocytárních a plazmatických fosfolipidů.
- Shledali jsme signifikantní nárůsty EPA a DHA vůči ARA s poklesem poměru n-6/n-3 PUFA. Významným zjištěním je také delší snížení poměru n-6/n-3 PUFA po eskalované dávce RO.
- Výsledky dále nasvědčují, že dlouhodobé podávání IVLE doplněné o RO má vliv na nižší *in vitro* reaktivitu leukocytů, vyjádřenou sníženou produkcí cytokinů stimulovanou LPS. Produkce IL-6 stimulovaná LPS také v našem souboru negativně korelovala s množstvím EPA+DHA v PEV, ale také s jejich podílem v EFL, což naznačuje jejich možný protizánětlivý účinek. Hypotéza, že suplementace RO by mohla snížit produkci prozánětlivých cytokinů, byla výsledky studie podpořena.
- Konstatujeme, že DPVP ve srovnání s HC vykazovaly mírný chronický prozánětlivý stav, jak je ukázáno zvýšenými koncentracemi cytokinů v séru a jejich *in vitro* LPS stimulovanou produkcí, a to navzdory nižším hodnotám poměru n-6/n-3 PUFA vůči zdravým kontrolám.
- Všechny základní režimy DPV jsou spojeny se zvýšenými aktivitami SOD1 související zřejmě se zvýšeným OS a diskutovaným zánětem. Intervence přidáním RO významně snížila hodnoty SOD1 na úroveň HC, na čemž se mohlo podílet snížení OS. Nicméně vzhledem k absenci dalších parametrů oxidačního stresu je obtížné se k tomuto s jistotou vyjádřit.
- Klinický význam tohoto zjištění není zatím jasný a jsou zapotřebí další studie k objasnění vlivu přidané RO na antioxidační stav u DPV.
- Zaznamenali jsme narušení metabolismu žlučových kyselin především ve smyslu jejich zvýšené syntézy, snížení FGF19 a mírného zvýšení ALP u DPVP. Ovlivnění jejich metabolismu jednotlivým podáváním IVLE ani při eskalaci dávky RO jsme však neprokázali.

V budoucnu bude jistě vhodné na tuto studii navázat s větším důrazem na odstranění jejich nedostatků. Rovněž k lepší definici dávkování RO a načasování jeho podávání během zánětlivého procesu jsou zapotřebí další studie.

## 7. Seznam zkratek

AIO – all-in-one  
ALA – alfa-linolenová kyselina  
ALP – alkalická fosfatáza  
ALT – alaninaminotransferáza  
ARA – arachidonová kyselina  
AST – aspartátaminotransferáza  
CA – cholová kyselina  
CAT – kataláza  
CDCA – chenodeoxycholová kyselina  
CIF – chronické intestinální selhání  
DCA – deoxycholová kyselina  
DHA – kyselina dokosaheptaenová  
DPV – domácí parenterální výživa  
DPVP – pacient/i na domácí parenterální výživě  
EFL – erytrocytární fosfolipidy  
EMK – esenciální mastné kyseliny  
EPA – kyselina eikosapentaenová  
FAME – fatty acids methyl esters  
FGF19 – fibroblastový růstový faktor 19  
GGT –  $\gamma$ -glutamyltransferáza  
GPx – glutathionperoxidáza  
GR – glutathion redukáza  
GSH – glutathion (redukovaný)  
GSSG – glutathion disulfid (oxidovaný)  
HC – „healthy control“, kontrolní skupina v provedené studii  
HDL – lipoproteiny o vysoké hustotě  
IF – střevní selhání, intestinal failure  
IFALD – intestinal failure-associated liver disease  
IL-1 $\beta$  – interleukin 1 $\beta$   
IL-6 – interleukin 6  
IL-8 – interleukin 8  
IVLE – intravenózní lipidové emulze  
LA – kyselina linolová  
LDL – lipoproteiny o nízké hustotě  
LPS – lipopolysacharid  
MCT – middle chain triacylglycerols; triacylglyceroly mastných kyselin se středním řetězcem  
MK – mastné kyseliny  
MUFA – mononenasyčené mastné kyseliny  
n-3 PUFA – omega-3 polynenasycené mastné kyseliny  
n-6 PUFA – omega-6 polynenasycené mastné kyseliny  
OO – olivový olej  
OS – oxidační stres  
oxLDL – oxidované lipoproteiny o nízké hustotě  
PEV – parenterální výživa  
PFL – plazmatické fosfolipidy  
PON1 – paraoxonáza 1  
PUFA – polynenasycené mastné kyseliny  
RO – rybí olej



### Příloha č. 3

RONS – reactive oxygen and nitrogen species; reaktivní formy kyslíku a dusíku

ROS – reactive oxygen species, reaktivní formy kyslíku

SBS – short bowel syndrome, syndrom krátkého střeva

SFA – nasycené mastné kyseliny

SOD1 – Cu/Zn-superoxid dismutáza

SojO – sójový olej

TBARS – thiobarbituric acid reactive substances

ŽK – žlučové kyseliny

*Seznam publikací:*

**1. publikace *in extenso*, které jsou podkladem disertace**

a) s impact factorem

**Sevela S**, Meisnerova E, Vecka M, Vavrova L, Rychlikova J, Lenicek M, Vitek L, Novakova O, Novak F. High Dose Fish Oil Added to Various Lipid Emulsions Normalizes Superoxide Dismutase 1 Activity in Home Parenteral Nutrition Patients. *Nutrients*. 2024 Feb 8;16(4):485. doi: 10.3390/nu16040485. PMID: 38398809; PMCID: PMC10891535. **IF: 5,9**

Novak F, Vecka M, Meisnerova E, **Sevela S**, Vavrova L, Rychlikova J, Dolezalova L, Myslivcova D, Zak A, Vitek L, Novakova O. Fish oil supplementation with various lipid emulsions suppresses in vitro cytokine release in home parenteral nutrition patients: a crossover study. *Nutr Res*. 2019 Dec;72:70-79. doi: 10.1016/j.nutres.2019.10.004. Epub 2019 Oct 23. PMID: 31759770. **IF: 2.767**

**2. publikace *in extenso* bez vztahu k tématu disertace**

a) s IF

Hlusicka J, **Sevela S**, Smid V, Sestak V, Roberts DM. Methaemoglobinaemia and oesophageal burns after accidental ingestion of an alkyl nitrite. *Clin Toxicol (Phila)*. 2022 Nov;60(11):1288-1290. doi: 10.1080/15563650.2022.2121718. Epub 2022 Sep 14. PMID: 36102625. **IF: 3,3**

b) bez IF

Čapková R, **Ševela S**, Petrášková H, Ryšánková M, Brůha R. ICU mortality of covid-19 patients - our experience. *Vnitr Lek*. 2021;67(5):e23-27. doi: 10.36290/vnl.2021.084.

**Ševela S**, Novák F, Kazda A, Brodská H. Realimentační syndrom [Refeeding syndrome]. *Cas Lek Cesk*. 2016;155(2):34-40. Czech. PMID: 27088791.

Kazda A, Brodská H, Novák F, **Ševela S**. Realimentační syndrom – patobiochemie, iontové dysbalance a jejich korekce. *Klin. Biochem. Metab.*, 22 (43), 2014, No. 4, p. 169–176.

## 8. Použitá literatura

- Bechynska, K., Daskova, N., Vrzackova, N., Harant, K., Heczková, M., Podzimkova, K., Bratova, M., Dankova, H., Berkova, Z., Kosek, V., Zelenka, J., Hajslova, J., Sedlacek, R., Suttnar, J., Hlavackova, A., Bartonova, L., & Cahova, M. (2019). The effect of  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids on the liver lipidome, proteome and bile acid profile: parenteral versus enteral administration. *Sci Rep*, 9(1), 19097. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54225-8>
- Bizari, L., da Silva Santos, A. F., Foss, N. T., Marchini, J. S., & Suen, V. M. (2016). Parenteral nutrition in short bowel syndrome patients, regardless of its duration, increases serum proinflammatory cytokines. *Nutr Res*, 36(7), 751-755. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2016.01.012>
- Boehm, D., Krzystek-Korpacka, M., Neubauer, K., Matusiewicz, M., Berdowska, I., Zielinski, B., Paradowski, L., & Gamian, A. (2009). Paraoxonase-1 status in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis*, 15(1), 93-99. <https://doi.org/10.1002/ibd.20582>
- Bohnert, H., Maurer, M., Calder, P. C., Pratschke, J., Thul, P., & Müller, V. (2018). Efficacy of a long-term home parenteral nutrition regimen containing fish oil-derived n-3 polyunsaturated fatty acids: a single-centre, randomized, double blind study. *Nutr J*, 17(1), 113. <https://doi.org/10.1186/s12937-018-0419-x>
- Boutte, H. J., Jr., Chen, J., Wylie, T. N., Wylie, K. M., Xie, Y., Geisman, M., Prabu, A., Gazit, V., Tarr, P. I., Levin, M. S., Warner, B. W., Davidson, N. O., & Rubin, D. C. (2022). Fecal microbiome and bile acid metabolome in adult short bowel syndrome. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 322(1), G154-G168. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00091.2021>
- Budinska, E., Gojda, J., Heczková, M., Bratova, M., Dankova, H., Wohl, P., Bastova, H., Lanska, V., Kostovcik, M., Dastych, M., Senkyrik, M., Krizova, J., Mraz, M., Hradecky, J., Hajslova, J., Lenicek, M., Podzimkova, K., Chalupsky, K., Sedlacek, R., & Cahova, M. (2020). Microbiome and Metabolome Profiles Associated With Different Types of Short Bowel Syndrome: Implications for Treatment. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 44(1), 105-118. <https://doi.org/10.1002/jpen.1595>
- Cahova, M., Bratova, M., & Wohl, P. (2017). Parenteral Nutrition-Associated Liver Disease: The Role of the Gut Microbiota. *Nutrients*, 9(9). <https://doi.org/10.3390/nu9090987>
- Carlson, S. J., Nandivada, P., Chang, M. I., Mitchell, P. D., O'Loughlin, A., Cowan, E., Gura, K. M., Nose, V., Bistran, B. R., & Puder, M. (2015). The addition of medium-chain triglycerides to a purified fish oil-based diet alters inflammatory profiles in mice. *Metabolism*, 64(2), 274-282. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2014.10.005>
- Fell, G. L., Cho, B. S., Pan, A., Nose, V., Anez-Bustillos, L., Dao, D. T., Baker, M. A., Nandivada, P., Gura, K. M., & Puder, M. (2017). A Comparison of Fish Oil Sources for Parenteral Lipid Emulsions in a Murine Model. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 41(2), 181-187. <https://doi.org/10.1177/0148607116640275>
- Ferguson, J. F., Mulvey, C. K., Patel, P. N., Shah, R. Y., Doveikis, J., Zhang, W., Tabita-Martinez, J., Terembula, K., Eiden, M., Koulman, A., Griffin, J. L., Mehta, N. N., Shah, R., Propert, K. J., Song, W. L., & Reilly, M. P. (2014). Omega-3 PUFA supplementation and the response to evoked endotoxemia in healthy volunteers. *Mol Nutr Food Res*, 58(3), 601-613. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201300368>
- Ferretti, G., & Bacchetti, T. (2012). Effect of dietary lipids on paraoxonase-1 activity and gene expression. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 22(2), 88-94. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2011.08.011>
- Flores-López, A., Guevara-Cruz, M., Avila-Nava, A., González-Garay, A. G., González-Salazar, L. E., Reyes-Ramírez, A. L., Pedraza-Chaverri, J., Medina-Campos, O. N.,

- Medina-Vera, I., Reyes-García, J. G., Tovar, A. R., & Serralde-Zúñiga, A. E. (2023). n-3 Polyunsaturated Fatty Acid Supplementation Affects Oxidative Stress Marker Levels in Patients with Type II Intestinal Failure: A Randomized Double Blind Trial. *Antioxidants*, 12(8), 1493. <https://www.mdpi.com/2076-3921/12/8/1493>
- Folch, J., Lees, M., & Sloane Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem*, 226(1), 497-509.
- Freese, R., Alfthan, G., Jauhiainen, M., Basu, S., Erlund, I., Salminen, I., Aro, A., & Mutanen, M. (2002). High intakes of vegetables, berries, and apples combined with a high intake of linoleic or oleic acid only slightly affect markers of lipid peroxidation and lipoprotein metabolism in healthy subjects. *Am J Clin Nutr*, 76(5), 950-960. <https://doi.org/10.1093/ajcn/76.5.950>
- Fuhrman, B., Volkova, N., & Aviram, M. (2006). Postprandial serum triacylglycerols and oxidative stress in mice after consumption of fish oil, soy oil or olive oil: possible role for paraoxonase-1 triacylglycerol lipase-like activity. *Nutrition*, 22(9), 922-930. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2006.04.012>
- Guarini, P., Bellavite, P., Biasi, D., Carletto, A., Galvani, S., Caramaschi, P., Bambara, L. M., & Corrocher, R. (1998). Effects of dietary fish oil and soy phosphatidylcholine on neutrophil fatty acid composition, superoxide release, and adhesion. *Inflammation*, 22(4), 381-391. <https://doi.org/10.1023/a:1022368832035>
- Harris, W. S., Sands, S. A., Windsor, S. L., Ali, H. A., Stevens, T. L., Magalski, A., Porter, C. B., & Borkon, A. M. (2004). Omega-3 fatty acids in cardiac biopsies from heart transplantation patients: correlation with erythrocytes and response to supplementation. *Circulation*, 110(12), 1645-1649. <https://doi.org/10.1161/01.Cir.0000142292.10048.B2>
- Heshmati, J., Morvaridzadeh, M., Maroufizadeh, S., Akbari, A., Yavari, M., Amirinejad, A., Maleki-Hajiagha, A., & Sepidarkish, M. (2019). Omega-3 fatty acids supplementation and oxidative stress parameters: A systematic review and meta-analysis of clinical trials. *Pharmacol Res*, 149, 104462. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.104462>
- Hise, M. E., Compher, C., Harlan, L., Kohlmeier, J. E., Benedict, S. H., Gajewski, B., & Brown, J. C. (2006). Inflammatory mediators and immune function are altered in home parenteral nutrition patients. *Nutrition*, 22(2), 97-103. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2005.05.011>
- Hurt, R. T., & Mundi, M. S. (2017). Use of Mixed-Oil Fat Emulsion to Improve Intestinal Failure-Associated Liver Disease in Long-Term Home Parenteral Nutrition: A Case Report. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 41(1\_suppl), 17S-19S. <https://doi.org/10.1177/0148607117741870>
- Chen, S., Xiao, Y., Liu, Y., Tian, X., Wang, W., Jiang, L., Wu, W., Zhang, T., Cai, W., & Wang, Y. (2022). Fish oil-based lipid emulsion alleviates parenteral nutrition-associated liver diseases and intestinal injury in piglets. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 46(3), 709-720. <https://doi.org/10.1002/jpen.2229>
- Katan, M. B., Deslypere, J. P., van Birgelen, A. P., Penders, M., & 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. *J Lipid Res*, 38(10), 2012-2022.
- Kirk, C., Haigh, L., Thompson, N. P., Pearce, M., Jones, D. E., & Mathers, J. C. (2022). The effects of different parenteral nutrition lipid formulations on clinical and laboratory endpoints in patients receiving home parenteral nutrition: A systematic review. *Clin Nutr*, 41(1), 80-90. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2021.11.009>
- Klek, S., Chambrier, C., Singer, P., Rubin, M., Bowling, T., Staun, M., Joly, F., Rasmussen, H., Strauss, B. J., Wanten, G., Smith, R., Abraham, A., Szczepanek, K., & Shaffer, J.

- (2013). Four-week parenteral nutrition using a third generation lipid emulsion (SMOFlipid)--a double-blind, randomised, multicentre study in adults. *Clin Nutr*, 32(2), 224-231. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2012.06.011>
- Klek, S., Mankowska-Wierzbicka, D., Scislo, L., Walewska, E., Pietka, M., & Szczepanek, K. (2020). High Dose Intravenous Fish Oil Reduces Inflammation--A Retrospective Tale from Two Centers. *Nutrients*, 12(9). <https://doi.org/10.3390/nu12092865>
- Kodydková, J., Vávrová, L., Zeman, M., Jiráček, R., Macásek, J., Stanková, B., Tvrzická, E., & Zák, A. (2009). Antioxidative enzymes and increased oxidative stress in depressive women. *Clin Biochem*, 42(13-14), 1368-1374. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2009.06.006>
- Koek, G. H., Liedorp, P. R., & Bast, A. (2011). The role of oxidative stress in non-alcoholic steatohepatitis. *Clin Chim Acta*, 412(15-16), 1297-1305. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2011.04.013>
- Kosek, V., Heczkova, M., Novak, F., Meisnerova, E., Novakova, O., Zelenka, J., Bechynska, K., Vrzacova, N., Suttner, J., Hlavackova, A., Dankova, H., Bratova, M., Daskova, N., Malinska, H., Oliyarnyk, O., Wohl, P., Bastova, H., Hajslova, J., & Cahova, M. (2020). The omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Oxidative Stress in Long-Term Parenteral Nutrition Dependent Adult Patients: Functional Lipidomics Approach. *Nutrients*, 12(8). <https://doi.org/10.3390/nu12082351>
- Lenicek, M., Vecka, M., Zizalova, K., & Vitek, L. (2016). Comparison of simple extraction procedures in liquid chromatography-mass spectrometry based determination of serum 7 $\alpha$ -hydroxy-4-cholesten-3-one, a surrogate marker of bile acid synthesis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 1033-1034, 317-320. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.08.046>
- Ling, P. R., Khaodhriar, L., Bistrrian, B. R., Keane-Ellison, M., Thibault, A., & Tawa, N. (2001). Inflammatory mediators in patients receiving long-term home parenteral nutrition. *Dig Dis Sci*, 46(11), 2484-2489. <https://doi.org/10.1023/a:1012388206553>
- Lucchinetti, E., Lou, P. H., Wawrzyniak, P., Wawrzyniak, M., Scharl, M., Holtzhauer, G. A., Kramer, S. D., Hersberger, M., Rogler, G., & Zaugg, M. (2021). Novel Strategies to Prevent Total Parenteral Nutrition-Induced Gut and Liver Inflammation, and Adverse Metabolic Outcomes. *Mol Nutr Food Res*, 65(5), e1901270. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201901270>
- Mayer, K., Gokorsch, S., Fegbeutel, C., Hattar, K., Rosseau, S., Walmrath, D., Seeger, W., & Grimminger, F. (2003). Parenteral nutrition with fish oil modulates cytokine response in patients with sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*, 167(10), 1321-1328. <https://doi.org/10.1164/rccm.200207-674OC>
- Miloudi, K., Comte, B., Rouleau, T., Montoudis, A., Levy, E., & Lavoie, J. C. (2012). The mode of administration of total parenteral nutrition and nature of lipid content influence the generation of peroxides and aldehydes. *Clin Nutr*, 31(4), 526-534. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2011.12.012>
- Muldoon, M. F., Laderian, B., Kuan, D. C., Sereika, S. M., Marsland, A. L., & Manuck, S. B. (2016). Fish oil supplementation does not lower C-reactive protein or interleukin-6 levels in healthy adults. *J Intern Med*, 279(1), 98-109. <https://doi.org/10.1111/joim.12442>
- Mundi, M. S., Martindale, R. G., & Hurt, R. T. (2017). Emergence of Mixed-Oil Fat Emulsions for Use in Parenteral Nutrition. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 41(1\_suppl), 3s-13s. <https://doi.org/10.1177/0148607117742595>
- Mundi, M. S., McMahon, M. T., Carnell, J. J., & Hurt, R. T. (2018). Long-Term Use of Mixed-Oil Lipid Emulsion in Adult Home Parenteral Nutrition Patients: A Case Series. *Nutr Clin Pract*, 33(6), 851-857. <https://doi.org/10.1002/ncp.10014>

- Novak, F., Vecka, M., Meisnerova, E., Sevela, S., Vavrova, L., Rychlikova, J., Dolezalova, L., Myslivcova, D., Zak, A., Vitek, L., & Novakova, O. (2019). Fish oil supplementation with various lipid emulsions suppresses in vitro cytokine release in home parenteral nutrition patients: a crossover study. *Nutr Res*, 72, 70-79. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2019.10.004>
- Osowska, S., Kunecki, M., Sobocki, J., Tokarczyk, J., Majewska, K., Omid, M., Radkowski, M., Fisk, H. L., & Calder, P. C. (2019). Effect of changing the lipid component of home parenteral nutrition in adults. *Clin Nutr*, 38(3), 1355-1361. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2018.05.028>
- Pastor-Clerigues, A., Marti-Bonmati, E., Milara, J., Almudever, P., & Cortijo, J. (2014). Anti-inflammatory and anti-fibrotic profile of fish oil emulsions used in parenteral nutrition-associated liver disease. *PLoS One*, 9(12), e115404. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115404>
- Pharmacopoeia, E. (2012). Omega-3-acid triglycerides. *European Pharmacopoeia*, 7(5), 4677-4678.
- Pharmacopoeia, E. (2014). Fish oil, rich in omega-3-acids. *European Pharmacopoeia*, 8, 3941-3943.
- Pike, A. F., Kramer, N. I., Blaauboer, B. J., Seinen, W., & Brands, R. (2013). A novel hypothesis for an alkaline phosphatase 'rescue' mechanism in the hepatic acute phase immune response. *Biochim Biophys Acta*, 1832(12), 2044-2056. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.07.016>
- Pironi, L., Cuerda, C., Jeppesen, P. B., Joly, F., Jonkers, C., Krznaric, Z., Lal, S., Lamprecht, G., Lichota, M., Mundi, M. S., Schneider, S. M., Szczepanek, K., Van Gossum, A., Wanten, G., Wheatley, C., & Weimann, A. (2023). ESPEN guideline on chronic intestinal failure in adults - Update 2023. *Clin Nutr*, 42(10), 1940-2021. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2023.07.019>
- Pironi, L., Guidetti, M., Verrastro, O., Iacona, C., Agostini, F., Pazzeschi, C., Sasdelli, A. S., Melchiorre, M., & Ferreri, C. (2017). Functional lipidomics in patients on home parenteral nutrition: Effect of lipid emulsions. *World J Gastroenterol*, 23(25), 4604-4614. <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i25.4604>
- Poupon, R. (2015). Liver alkaline phosphatase: a missing link between cholestasis and biliary inflammation. *Hepatology*, 61(6), 2080-2090. <https://doi.org/10.1002/hep.27715>
- Rees, D., Miles, E. A., Banerjee, T., Wells, S. J., Roynette, C. E., Wahle, K. W., & Calder, P. C. (2006). Dose-related effects of eicosapentaenoic acid on innate immune function in healthy humans: a comparison of young and older men. *Am J Clin Nutr*, 83(2), 331-342. <https://doi.org/10.1093/ajcn/83.2.331>
- Reimund, J. M., Rahmi, G., Escalin, G., Pinna, G., Finck, G., Muller, C. D., Duclos, B., & Baumann, R. (2005). Efficacy and safety of an olive oil-based intravenous fat emulsion in adult patients on home parenteral nutrition. *Aliment Pharmacol Ther*, 21(4), 445-454. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2005.02354.x>
- Rogulska, J., Osowska, S., Kunecki, M., Sobocki, J., Ładyżyński, P., & Giebułtowicz, J. (2021). Antioxidant balance in plasma of patients on home parenteral nutrition: A pilot study comparing three different lipid emulsions. *Clin Nutr*, 40(6), 3950-3958. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2021.04.006>
- Rose, H. G., & Oklander, M. (1965). Improved procedure for the extraction of lipids from human erythrocytes. *J Lipid Res*, 6, 428-431.
- Sadu Singh, B. K., Narayanan, S. S., Khor, B. H., Sahathevan, S., Abdul Gafar, A. H., Fiaccadori, E., Sundram, K., & Karupaiah, T. (2020). Composition and Functionality of Lipid Emulsions in Parenteral Nutrition: Examining Evidence in Clinical Applications. *Front Pharmacol*, 11, 506. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00506>

- Sevela, S., Meisnerova, E., Vecka, M., Vavrova, L., Rychlikova, J., Lenicek, M., Vitek, L., Novakova, O., & Novak, F. (2024). High Dose Fish Oil Added to Various Lipid Emulsions Normalizes Superoxide Dismutase 1 Activity in Home Parenteral Nutrition Patients. *Nutrients*, 16(4). <https://doi.org/10.3390/nu16040485>
- Shimizu, M., & Sato, R. (2022). Endocrine Fibroblast Growth Factors in Relation to Stress Signaling. *Cells*, 11(3). <https://doi.org/10.3390/cells11030505>
- Traber, M. G., & Head, B. (2021). Vitamin E: How much is enough, too much and why! *Free Radic Biol Med*, 177, 212-225. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.10.028>
- Tuin, A., Huizinga-Van der Vlag, A., van Loenen-Weemaes, A. M., Meijer, D. K., & Poelstra, K. (2006). On the role and fate of LPS-dephosphorylating activity in the rat liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 290(2), G377-385. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00147.2005>
- Tvrzická, E., Vecka, M., Staňková, B., & Žák, A. (2002). Analysis of fatty acids in plasma lipoproteins by gas chromatography–flame ionization detection: Quantitative aspects. *Analytica Chimica Acta*, 465, 337-350. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(02\)00396-3](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(02)00396-3)
- Vahedi, K., Atlan, P., Joly, F., Le Brun, A., Evard, D., Perennec, V., Roux-Haguenu, D., Bereziat, G., & 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. *Br J Nutr*, 94(6), 909-916. <https://doi.org/10.1079/bjn20051550>
- Vakili, L., Navab, K. D., Shabihkhani, M., Pourtabatabaei, N., Vazirian, S., Barseghian, Z., Seyedali, S., & Hough, G. (2014). Systemic inflammation, intestine, and paraoxonase-1. *Adv Exp Med Biol*, 824, 83-88. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-07320-0\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-319-07320-0_8)
- Vavrova, L., Rychlikova, J., Mrackova, M., Novakova, O., Zak, A., & Novak, F. (2016). Increased inflammatory markers with altered antioxidant status persist after clinical recovery from severe sepsis: a correlation with low HDL cholesterol and albumin. *Clin Exp Med*, 16(4), 557-569. <https://doi.org/10.1007/s10238-015-0390-1>
- Versleijen, M. W., Roelofs, H. M., Rombouts, C., Hermans, P. W., Noakes, P. S., Calder, P. C., & Wanten, G. J. (2012). Short-term infusion of a fish oil-based lipid emulsion modulates fatty acid status, but not immune function or (anti)oxidant balance: a randomized cross-over study. *Eur J Clin Invest*, 42(3), 290-302. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2011.02582.x>
- Vogt, M., Bauer, M. K., Ferrari, D., & Schulze-Osthoff, K. (1998). Oxidative stress and hypoxia/reoxygenation trigger CD95 (APO-1/Fas) ligand expression in microglial cells. *FEBS Lett*, 429(1), 67-72. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(98\)00562-6](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(98)00562-6)
- Yakah, W., Ramiro-Cortijo, D., Singh, P., Brown, J., Stoll, B., Kulkarni, M., Oosterloo, B. C., Burrin, D., Maddipati, K. R., Fichorova, R. N., Freedman, S. D., & Martin, C. R. (2021). Parenteral Fish-Oil Containing Lipid Emulsions Limit Initial Lipopolysaccharide-Induced Host Immune Responses in Preterm Pigs. *Nutrients*, 13(1). <https://doi.org/10.3390/nu13010205>
- Yaqoob, P., Pala, H. S., Cortina-Borja, M., Newsholme, E. A., & Calder, P. C. (2000). Encapsulated fish oil enriched in alpha-tocopherol alters plasma phospholipid and mononuclear cell fatty acid compositions but not mononuclear cell functions. *Eur J Clin Invest*, 30(3), 260-274. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2362.2000.00623.x>
- Zaloga, G. P. (2021). Narrative Review of n-3 Polyunsaturated Fatty Acid Supplementation upon Immune Functions, Resolution Molecules and Lipid Peroxidation. *Nutrients*, 13(2). <https://doi.org/10.3390/nu13020662>