

# **STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST**

**Obor č. 6: Zdravotnictví**

**Profil aminokyselin v séru a moči u pacientů  
s dlouhodobou domácí parenterální výživou a jeho  
optimalizace**

**Milan Dastych  
Jihomoravský kraj**

**Brno, 2021**

# STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 6: Zdravotnictví

Profil aminokyselin v séru a moči u pacientů  
s dlouhodobou domácí parenterální výživou a jeho  
optimalizace

Serum and urine amino acids profile in patients with  
long-term home parenteral nutrition and its optimization

**Autor:** Milan Dastych

**Škola:** Gymnázium Brno, Křenová, příspěvková organizace,  
Křenová 304/63, 602 00 Brno

**Kraj:** Jihomoravský

**Konzultant:** doc. MUDr. Milan Dastych, CSc., MBA

Brno, 2021

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracoval samostatně a použil jsem pouze prameny a literaturu uvedené v seznamu bibliografických záznamů.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné.

Nemám závažný důvod proti zpřístupnění této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších předpisů.

V Brně dne 7. 4. 2021 .....

Milan Dastych

## **Poděkování**

Nejprve bych rád poděkoval svému školiteli doc. MUDr. Milanu Dastychovi, CSc., MBA, který tento zajímavý výzkum inicioval a umožnil mi podílet se na něm. Zasloužil mě do tématu a trpělivě odpovídal na všechny mé dotazy ohledně obsahu a rozsahu teoretické i praktické části práce.

Můj další dík patří paní RNDr. Aleně Mikuškové (OKB Dětské nemocnice FN Brno), která se mě ujala při laboratorní části tohoto výzkumu. Byla ochotna mi podrobně vysvětlit a názorně předvést proces analýzy aminokyselin a případné nesrovnalosti mi vždy vyjasnila.

Na závěr děkuji také MUDr. Milanu Dastychovi (Interní gastroenterologické klinika FN Brno) za jeho praktické poznatky ohledně problematiky domácí parenterální výživy a objasnění dalších souvislostí.

## **Anotace**

V této práci jsme se zaměřili na 36 pacientů trpících selháním střeva, a tedy dlouhodobě závislých na parenterální výživě. Cílem bylo srovnáním se souborem zdravých osob ověřit, zda je denní dávka a rychlost podání jednotlivých aminokyselin pro tyto pacienty optimální, případně navrhnout změny ve složení a intervalu podávání infuzních roztoků. U těchto pacientů proto byla zjištěna jednak sérová koncentrace jednotlivých aminokyselin, a jednak odpady jednotlivých aminokyselin v moči vyloučené v době podání parenterální výživy a mimo tuto dobu. Všechna výsledná data byla srovnána s referenčními hodnotami získanými z kontrolní skupiny 20 zdravých osob. Vzorky séra a moče byly analyzovány prostřednictvím analyzátoru aminokyselin, využívající techniky iontoměničové HPLC, která umožňuje stanovení koncentrace všech proteinogenních aminokyselin. Ve výsledku se ukázalo, že individuálně připravované „all-in-one“ vaky podávané pacientům závislým na domácí parenterální výživě obsahují optimální množství téměř všech aminokyselin a není třeba navrhovat rozsáhlejší úpravy. Koncentrace všech esenciálních aminokyselin v séru pacientů se totiž signifikantně nelišila od referenčních hodnot kontrolního souboru. Signifikantně vyšší koncentrace při podání infuze byla prokázána pouze u glycinu (o 197  $\mu\text{mol/L}$ , tj. o 73 %), signifikantně nižší byla koncentrace glutaminu (o 91  $\mu\text{mol/L}$ , tj. o 17 %). V moči vyloučené v době podání infuzního roztoku jsme zjistili signifikantně vyšší hodnoty pro všechny jednotlivé aminokyseliny oproti hodnotám v moči vyloučené mimo podání výživy. Největší nárůst se opět objevil u glycinu, jehož koncentrace vzrostla o 92 mg, druhou nejvíce vylučovanou aminokyselinou byl histidin. Průměrný odpad všech aminokyselin v moči odpovídal 0,4 % z podané dávky. Odpady všech jednotlivých aminokyselin mimo dobu podání infuze odpovídaly odpadům zdravých osob.

## **Klíčová slova**

Aminokyseliny; domácí parenterální výživa; all-in-one vaky; HPLC

## **Annotation**

In this thesis we aimed at 36 patients suffering from intestinal failure, which means they are dependent on the long-term parenteral nutrition. The aim was to check, whether the daily dose and rate of administration of each amino acid had been optimal to these patients, eventually to suggest changes in compound of infusion solutions and its rate of administration too. Therefore, serum concentrations of each amino acid and urine wastes of each amino acid excreted at the time of application of parenteral nutrition (and out of this period) were found in these patients. All the resulting data were compared with the reference values obtained from a control set of 20 healthy persons. Serum and urine samples were analysed using an amino acid analyzer based on the ion-exchange HPLC, which allows the determination of the concentration of all proteinogenic amino acids. As a result, individually mixed "all-in-one" bags given to patients addicted to home parenteral nutrition have been shown to contain the optimal amount of almost all amino acids, and there is no need to suggest more extensive modifications. The concentration of all essential amino acids in patients' serum was not significantly different from the reference values of the set of healthy persons. A significantly higher concentration in serum was shown only for glycine (197  $\mu\text{mol/L}$ , i.e. 73 %). Significantly lower was glutamine concentration (91  $\mu\text{mol/L}$ , i.e. 17 %). In urine excreted at the time of application of the infusion solution, we found significantly higher values for all individual amino acids compared to those in urine produced outside of nutrition administration. The biggest increase appeared again in glycine, which concentration increased of 92 mg. The second most excreted amino acid was histidine. The average waste of all amino acids was equal to 0.4 % of the administrated dose. The waste of all individual amino acids excreted outside the infusion time corresponded to waste of healthy persons.

## **Keywords**

Amino acids; home parenteral nutrition; all-in-one bags; HPLC

# OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b> .....	8
<b>2</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	9
<b>2.1</b>	<b>Aminokyseliny</b> .....	9
2.1.1	Rozdělení aminokyselin.....	9
2.1.2	Vlastnosti aminokyselin.....	10
2.1.3	Metabolismus proteinů a aminokyselin .....	11
2.1.4	Jednotlivé aminokyseliny a jejich hlavní funkce .....	13
<b>2.2</b>	<b>Selhání střeva (<i>Intestinal Failure</i>)</b> .....	19
<b>2.3</b>	<b>Syndrom krátkého střeva (<i>Short Bowel Syndrome</i>)</b> .....	19
<b>2.4</b>	<b>Crohnova nemoc (<i>Crohn Disease</i>)</b> .....	19
<b>2.5</b>	<b>Parenterální výživa</b> .....	20
2.5.1	Rozdělení .....	20
2.5.2	Domácí parenterální výživa .....	21
2.5.3	Konstrukce PV .....	21
2.5.4	All-in-one system – preferovaná forma podání parenterální výživy .....	22
2.5.5	Žilní vstupy pro PV.....	23
2.5.6	Monitorace .....	25
<b>2.6</b>	<b>Chromatografie</b> .....	25
2.6.1	High Performance Liquid Chromatography (HPLC) .....	25
2.6.2	Iontoměničová HPLC – separace aminokyselin.....	26
<b>3</b>	<b>CÍL PRÁCE</b> .....	27
<b>4</b>	<b>PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	28
<b>4.1</b>	<b>Popis souboru</b> .....	28
<b>4.2</b>	<b>Klinická část</b> .....	30
<b>4.3</b>	<b>Laboratorní část</b> .....	32
4.3.1	Příprava vzorků.....	32
4.3.2	Analyzátor aminokyselin .....	33

4.3.3	Popis procesu analýzy.....	36
4.3.4	Kvalifikace, kvantifikace (kalibrace, metoda vnitřního standardu).....	38
<b>4.4</b>	<b>Zpracování výsledků.....</b>	<b>39</b>
<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY .....</b>	<b>40</b>
<b>6</b>	<b>DISKUZE.....</b>	<b>45</b>
<b>7</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>47</b>
	<b>SEZNAM ZKRATEK.....</b>	<b>48</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ.....</b>	<b>49</b>
	<b>SEZNAM TABULEK .....</b>	<b>50</b>
	<b>POUŽITÁ LITERATURA.....</b>	<b>51</b>



# 1 ÚVOD

Z hlediska absorpce živin je nejdůležitějších částí trávicí soustavy tenké střevo. Právě v této části trávicí trubice se z rozmělněné potravy dostávají do krevního řečiště hlavní živiny – aminokyseliny, sacharidy a lipidy. Dobrá funkčnost tenkého střeva je nezbytnou součástí zdravého metabolismu potřebného k přežití. V důsledku mnohých střevních onemocnění dochází k částečné ztrátě funkce střeva.

Tato studie se věnovala pacientům, kteří dlouhodobě trpí funkčním selháním tenkého střeva. Selhání střeva může nastat z mnoha příčin, z nichž je nečastější „syndrom krátkého střeva“. Při tomto syndromu trpí pacient nedostatečnou délkou tenkého střeva v důsledku rozsáhlé střevní resekce, která často bývá posledním krokem při léčbě idiopatických střevních zánětů. U našich pacientů byla nejčastější příčinou resekce Crohnova nemoc.

Je zřejmé, že tito pacienti si nejsou schopni zajistit dostatečný příjem živin běžným způsobem. Jsou tedy dlouhodobě odkázáni na nitrožilní přívod živin prostřednictvím infuzních roztoků („all in one“ vaků) a musejí být zařazeni do programu domácí parenterální výživy (dále DPV). Tento program je logisticky náročný a realizovatelný pouze ve specializovaných centrech DPV. Roztok obsahující živiny se pacientům do krevního řečiště dostává skrz centrální žilní vstup, nejčastěji prostřednictvím Broviacova katétru. Rychlost podání infuze je regulována stacionární nebo mobilní pumpou. Mobilní pumpa umožňuje přijímat parenterální výživu (dále PV) i mimo domácí/nemocniční prostředí. Pacienti, kteří přijímají PV v běžném životě musejí být schopni samostatné aplikace infuzí a péče o katétr, k ostatním jsou posílány vyškolené zdravotní sestry. Všichni pacienti jsou pravidelně klinicky a laboratorně monitorováni.

Součástí běžného laboratorního vyšetření není stanovení profilu jednotlivých aminokyselin v séru a v moči. Z klinického pohledu jde ovšem o významný parametr, který vypovídá o správnosti složení a plynulosti podávání parenterální výživy. Při neoptimálním příjmu aminokyselin by mohlo dojít v případě nadbytečného množství k dlouhodobému přetěžování ledvin a v případě nedostatečného příjmu k poruchám metabolismu jako je ztráta svalové hmoty, zhoršená regenerace tkání, horší imunita atd.

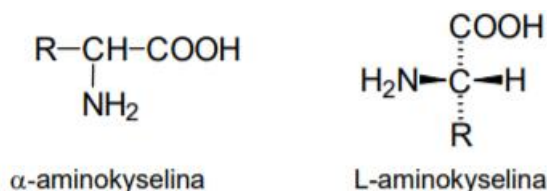
Cílem naší práce tedy bylo prostřednictvím analýzy jednotlivých aminokyselin zjistit jejich koncentraci v séru pacientů, kteří každodenně přijímají PV. Dále jsme se rozhodli určit jejich odpady v moči v době podávání parenterální výživy a mimo tuto dobu a následně provést statistické zhodnocení. V obou případech také bylo v plánu výsledky statisticky srovnat s referenčními hodnotami kontrolního souboru dvaceti zdravých osob.

Získaná data nám umožnila prověřit, zda jsou z hlediska aminokyselin infuzní roztoky pro pacienty na domácí parenterální výživě správně konstruovány, případně poukázat na signifikantní nedostatky ve složení PV. Další cenou informací jsme viděli ve zjištění vztahu mezi rychlostí podání infuze a následnými ztrátami jednotlivých aminokyselin v moči, tedy míry jejich utilizace. Tyto poznatky by mohly vést k úpravě složení a doby podání infuzí ve prospěch správné utilizace aminokyselin a tím přispět k prodloužení doby přežití pacientů.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Aminokyseliny

Aminokyseliny (dále AMK) jsou substituční deriváty karboxylových kyselin obsahující nejméně jednu aminovou funkční skupinu ( $-\text{NH}_2$ ). Tyto organické sloučeniny jsou základní stavební jednotkou peptidů a bílkovin, které mají v lidském organismu mnoho funkcí (stavební, katalytickou, regulační, obrannou a transportní). Jsou tedy pro člověka nenahraditelné. Rozlišujeme dvacet<sup>1</sup> základních proteinogenních aminokyselin, které mají primární aminoskupinu  $\text{NH}_2$  vázanou v poloze  $\alpha$ , tedy na uhlíku sousedícím s karboxylem. Jelikož jsou téměř všechny proteinogenní AMK opticky aktivní látky, které stáčejí rovinu polarizovaného světla doleva, jsou označovány jako L-aminokyseliny. Podmínkou optické aktivity je přítomnost alespoň jednoho chirálního uhlíku v uhlovodíkovém řetězci. Tuto funkci v proteinogenních AMK plní právě  $\alpha$ -uhlík, který je substituován čtyřmi různými substituenty. Označení „L-aminokyselina“ plně neodpovídá glycin, který nemá chirální uhlík. Z těchto dvaceti proteinogenních AMK vyčleňujeme osm tzv. esenciálních, které musejí být do těla přivedeny v potravě, jelikož si je lidské tělo nedokáže samo syntetizovat. Patří sem valin, leucin, izoleucin, threonin, lysin, methionin, fenylalanin a tryptofan. Zbylé proteinogenní AMK jsou neesenciální, což znamená, že mohou být v těle vytvořeny z esenciálních AMK. Některé AMK, které je potřeba přijímat v potravě pouze za určitých podmínek, označujeme jako poloesenciální (např. arginin, histidin, tyrozin a cystein). [1,2,3]



Obrázek 1: Primární struktura proteinogenních aminokyselin [2]

#### 2.1.1 Rozdělení aminokyselin

Jednotlivé aminokyseliny můžeme rozdělit podle jejich postranního řetězce (R), který má polární, nepolární, kyselý či zásaditý charakter. [2]

Tabulka 1: Rozdělení AMK dle vlastností jejich postranního řetězce [2]

Postranní řetězec	Aminokyseliny
Nepolární	Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Pro, Trp, Met
Polární (nedisociovaný)	Ser, Thr, Asn, Gln, Tyr, Cys
Zásaditý (protonizovaný)	Lys, Arg, His
Kyselý (deprotonizovaný)	Asp, Glu

<sup>1</sup> Jsou známy také další 2 proteinogenní AMK (selenocystein a pyrolysin), které jsou kódovány stop kodóny

## 2.1.2 Vlastnosti aminokyselin

Většina aminokyselin jsou amfoterní látky. Nositelkou kyselých vlastností je karboxylová skupina, zásaditý charakter je způsoben přítomností aminové skupiny. V zásaditém prostředí se tedy aminokyseliny chovají jako kyseliny (disociuje se karboxylová skupina) a v kyselém prostředí jako zásady (je disociována aminová skupina). Důležitou roli tedy hraje pH prostředí, ve kterém se AMK nachází. V závislosti na pH se můžou AMK vyskytovat ve třech podobách – ve formě aniontu, kationtu nebo amfiontu. Čím je pH vyšší, tím zápornější náboj molekuly aminokyselin dostávají. Nadbytek hydroxidových aniontů v soustavě totiž iniciuje disociaci karboxylové skupiny a zároveň brání disociaci aminové skupiny. Naopak s klesající hodnotou pH se zvyšuje kladný náboj molekul AMK, kdy tentokrát vysoká koncentrace  $\text{H}_3\text{O}^+$  brání disociaci karboxylové skupiny, ale aminová skupina přijímá  $\text{H}^+$ . Třetí možnou formou je již zmíněný amfion, kdy je pH prostředí takové, že molekuly dané aminokyseliny mají ionizované obě funkční skupiny – jsou elektroneutrální. [1,2,4]

Hodnota pH, při kterém je vyrovnán kladný a záporný náboj ionizovaných skupin, se nazývá **izoelektrický bod (pI)**. Molekuly dané AMK jsou ve formě amfiontu. Isoelektrický bod je specifický pro každou AMK, jeho hodnota roste se zásaditostí jednotlivých AMK. [2]

„Výpočet pI:

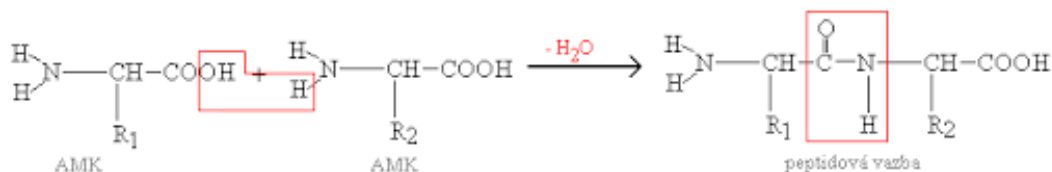
- obecně: 
$$\text{pI} = \frac{1}{2} (\text{pK}_{a1} + \text{pK}_{a2})$$
  
*pI je aritmetickým průměrem pKa kyselých a bazických skupin*
- bazické aminokyseliny: 
$$\text{pI} = \frac{1}{2} (\text{pK}_{a2} + \text{pK}_{a3})$$
  
*pI je průměrem pKa obou bazických skupin*
- kyselé aminokyseliny: 
$$\text{pI} = \frac{1}{2} (\text{pK}_{a1} + \text{pK}_{a3})$$
  
*pI je průměrem pKa obou kyselých skupin*
- slabě kyselé aminokyseliny: 
$$\text{pI} = -\frac{1}{2} \log (\text{K}_{a1} \cdot \text{K}_{a2} + \text{K}_{a1} \cdot \text{K}_{a3})$$
  
*při výpočtu pI pro Tyr a Cys je třeba zohlednit všechny disociabilní skupiny* [5]

Tabulka 2: Disociační konstanty jednotlivých disociaibilních skupin AMK, vyjádřené jako záporný dekadický logaritmus disociační konstanty kyseliny (pKa) [6]

Zkratky AMK	Ala	Arg	Asn	Asp	Cys	Phe	Gln	Glu	Gly	His
$\text{pK}_{a1} (\alpha\text{-COOH})$	2,35	1,82	2,10	1,99	1,99	2,16	2,17	2,10	2,35	1,80
$\text{pK}_{a2} (\alpha\text{-NH}_3^+)$	9,87	8,99	8,84	9,90	10,78	9,18	9,13	9,17	9,78	9,33
$\text{pK}_{a3} (\text{R})$	-	12,48	-	3,90	8,33	-	-	4,07	-	6,04

Zkratky AMK	Ile	Leu	Lys	Met	Pro	Ser	Thr	Trp	Tyr	Val
$\text{pK}_{a1} (\alpha\text{-COOH})$	2,33	2,33	2,16	2,13	2,95	2,19	2,09	2,43	2,20	2,29
$\text{pK}_{a2} (\alpha\text{-NH}_3^+)$	9,76	9,74	9,18	9,28	10,65	9,21	9,10	9,44	9,11	9,74
$\text{pK}_{a3} (\text{R})$	-	-	10,79	-	-	-	-	-	10,13	-

Spojením dvou aminokyselin vzniká **peptidová vazba**, při které reaguje aminoskupina jedné aminokyseliny s karboxylem druhé aminokyseliny za vzniku vody, kdy karboxyl poskytuje hydroxyl a aminoskupina proton vodíku. [1]



Obrázek 4: Schéma peptidové vazby [7]

Sloučeniny vzniklé spojením dvou a více aminokyselin nazýváme peptidy. Pokud jsou složeny z 2 až 10 aminokyselinových zbytků, hovoříme o oligopeptidech, když jich obsahují 11 až 100, jsou to polypeptidy. Jakmile je ve sloučenině více jak 100 AMK zbytků, jde již o proteiny. [1]

### 2.1.3 Metabolismus proteinů a aminokyselin

Aminokyseliny se do organismu za normálních okolností dostávají při příjmu potravy ve formě živočišných nebo rostlinných bílkovin. Přijaté bílkoviny jsou v trávicí trubici postupně rozkládány jednotlivými enzymy. Proces štěpení začíná v žaludku, kde jsou v reakci s HCl denaturovány a následně vlivem pepsinu a chymozinu rozloženy na polypeptidy. Štěpení pak pokračuje v tenkém střevě působením trypsinu, chymotrypsinu a elastázy (ze slinivky) a pomocí peptidáz kartáčového lemu enterocytů. Tyto enzymy postupně rozkládají polypeptidy na oligopeptidy (di- a tripeptidy) nebo až na jednotlivé AMK. V tenkém střevě jsou rovněž tyto AMK nebo krátké oligopeptidy vstřebávány skrz střevní buňky do krve, přičemž mohou být některé AMK metabolizovány již v enterocytech (hlavně glutamin), což způsobuje změny v krevním spektru oproti spektru přijatých AMK. Většina AMK je ovšem metabolizována až v játrech. Přesto se v určitém množství dostávají všechny AMK do krevní plazmy v nezměněné formě, aby si z nich jednotlivé buňky mohly syntetizovat proteiny. Metabolismu v játrech nejméně podléhají valin, leucin a izoleucin, jelikož jsou hojně využívány periferními tkáněmi. Toxický amoniak (vzniklý při metabolických přeměnách AMK) a přebytečné AMK jsou v játrech přeměňovány na močovinu, která je následně krví transportována do ledvin. V ledvinách krev protéká přes nefrony, kde se filtrací přes Malpighiho tělíska z krve oddělí toxické nebo přebytečné látky (močovina, AMK, glukóza atd.) čímž vznikne primární moč. Primární moč dále prochází tubulárním systémem, kde se tubulární buňky snaží vychytávat co nejvíce nevyužitých látek zpět do krevního řečiště. Ochuzením primární moči o tyto látky vznikne sekundární moč, která je již sběrným kanálem odváděna do ledvinových kalichů a následně močovodem do močového měchýře. Často tubulární buňky nevychytají veškeré přebytečné AMK, proto jsou v moči běžně obsaženy všechny AMK. Nejvíce se do moče ztrácí glycin a histidin. Tyto dvě AMK jsou totiž vůbec nejvíce filtrovány přes nefrony a zároveň nejméně reabsorbovány tubulárními buňkami. Mimo močovinu se v moči nachází také amoniak, u zdravých jedinců se ovšem tvoří až v močovém měchýři činností bakterií. [11,47,48]

Složitost metabolismu AMK ještě umocňuje fakt, že je lidské tělo získává nejen z potravy, ale také kontinuálně štěpí a opět vytváří tělesné bílkoviny. Denně zdravý člověk rozštěpí a opět vytvoří asi 300 g bílkovin. Aminokyseliny, které jsou tělu k dispozici (přijaté potravou a uvolněné z tělesných bílkovin) pro všechny anabolické i katabolické procesy tvoří tzv. „labilní pool“. Tyto aminokyseliny slouží v organismu k několika účelům: pro syntézu nových bílkovin, potřebných při obnově tkání, růstu či buněčném dělení, pro tvorbu různých potřebných dusíkatých látek jako jsou biogenní aminy (hormony, enzymy,...), puriny (adenin, guanin), pyrimidiny (thymin, uracil, cytosin), kreatin, atd. Ve výjimečném případě (nedostatek AMK v potravě, zranění, hladovění...) mohou být proteiny využity i jako zdroj energie. Využití bílkovin jako energie, je ovšem pro tělo neefektivní, protože bílkoviny mají nízkou energetickou hodnotu (cca 17 kJ/g, tj. 4 kcal/g) a také produkty vzniklé při rozkladu bílkovin (močovina, amoniak, anorganické kyseliny) zatěžují ledviny. Každá ztráta bílkovin s sebou nese také ztrátu funkce orgánů, primárně se redukuje kosterní svalstvo. Pokud bychom ztratili více než 40–50 % tělesných bílkovin, došlo by k poruchám imunity vedoucím ke smrti. [8,9,10,11,12]

Pro správně fungující metabolismus je nutné denně přijmout minimálně asi 0,5g bílk./kg, optimální dávka pro organismus ve vyrovnaném stavu bez zátěže je však 1,0–1,2g bílk./kg. Při těžkých katabolických stavech (např. rozsáhlé popáleniny) stoupá denní potřeba aminokyselin až na 3g bílk./kg. S přijetím bílkovin je zároveň třeba přijmout dostatečné množství energie ve formě sacharidů a lipidů, a zajistit tak jejich tzv. energetické krytí. Bílkoviny přijaté potravou musí být komplexní, a tedy obsahovat všech 8 esenciálních aminokyselin, které tělo samo vytvořit neumí. Také je za daných okolností potřeba v potravě přijmout navíc určité aminokyseliny, které označujeme za semiesenciální. Např. histidin a arginin u dětí, potřebné pro tělesný růst, tyrosin u nemocných s poškozenými ledvinami, cystein u nedonošených novorozenců atd. [11]

Dalším ukazatelem vypovídajícím o našem správně fungujícím metabolismu aminokyselin je **dusíková bilance**, která je definována jako rozdíl mezi příjmem dusíku z aminokyselin a jeho výdejem ve formě dusíkatých látek: [11,12]

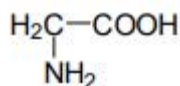
$$\text{„NB} = \text{NP} - (\text{NU} + \text{NS} + \text{NK})$$

*NB...bilance dusíku; NP...příjem dusíku ve výživě; NS...odpad dusíku ve stolici (10-15mg/kg za den); NK...odpad dusíku kůží a kožními anexy (5-10 mg/kg za den); NU...odpad dusíku do moči (asi 80%)“ [11]*

Při záporné dusíkové bilanci můžeme tedy říci, že množství rozkládaných bílkovin je větší než jejich syntéza a organismus přijímá nedostatečné množství aminokyselin. Pokud známe hodnotu denních odpadů dusíku, můžeme přesně určit, kolik aminokyselin navíc pacient potřebuje. Stačí tuto hodnotu vynásobit 6,25 (1 g dusíku je totiž obsažen v 6,25 g bílkovin). Ztráta 40 g dusíku odpovídá ztrátě 250 g proteinů, tj. ztráta 1kg svaloviny. [11,12]

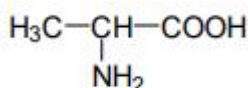
## 2.1.4 Jednotlivé aminokyseliny a jejich hlavní funkce

**glycin (Gly):** Nejjednodušší aminokyselina vyskytující se zvláště v kolagenu, přenašeč v CNS, prekurzor např. purinů, pirimidinů, kreatinu, porfyrinů (hemoglobin), glutathionu (antioxidant – odstraňuje reaktivní formy kyslíku), dále částečně funguje jako regulátor cukru v krvi. [2, 12, 14,15]



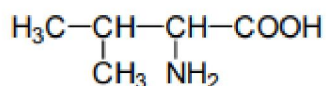
Obrázek 5: Strukturální vzorec glycinu [2]

**alanin (Ala):** V játrech je substrátem pro tvorbu glukózy (glukoneogeneze), kdy je meziproduktem mezi glukózou a alaninem pyruvát (konjugovaná zásada kys. pyrohroznové, vzniká mimo jiné transaminací alaninu nebo glykolýzou glukózy, významný metabolit), zajišťuje tedy stabilní hladinu glukózy v krvi během fyzické zátěže, či při hladovění. Může být snadno syntetizován ve svalcích transaminací z pyruvátu a sloužit tak jako transportní forma dusíku. Dostatečný příjem alaninu je důležitý při metabolickém stresu. [16,17]

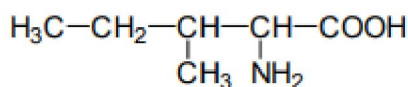


Obrázek 6: alanin [2]

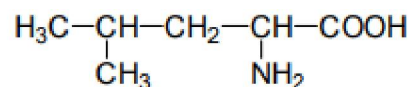
**valin (Val), leucin (Leu), izoleucin (Ile):** Tyto tři aminokyseliny označujeme jako rozvětvené aminokyseliny, nebo také BCAA aminokyseliny, které jsou pro svůj složitě syntetizovatelný rozvětvený postranní řetězec řazeny mezi esenciální AMK. Jsou důležité pro tvorbu proteinových struktur (protilátky, obnova tkání,...), neboť v bílkovinách jsou zastoupeny 20–25 %. Jsou tedy nepostradatelnou součástí infuzí při těžkých katabolických stavech (např. jaterní či ledvinové onemocnění), kdy redukuje zápornou dusíkovou bilanci, tím že nahradí volné aminokyseliny v krvi jinak uvolňované ze svaloviny. Mimo jiné jsou donorem dusíku při tvorbě alaninu a glutaminu, které jsou přenašeči aminoskupiny mezi tkáněmi a také substráty při glukoneogenezi. Dále se účastní metabolismu CNS a bývají podávány také při neurologických stavech, aby vylučovaly aromatické aminokyseliny a zabráňovaly tak encefalopatii. Ve sportu jsou často užívány jako suplement pro oddálení pocitu únavy<sup>2</sup>, zvýšenou tvorbu glukózy, ochranu svalových vláken a zrychlení regenerace<sup>3</sup>. Z BCAA má největší schopnost ochrany a tvorby svalových vláken leucin, izoleucin a valin jsou dobrým zdrojem energie pro svaly. [18,19]



Obrázek 5: valin [2]



Obrázek 7: izoleucin [2]

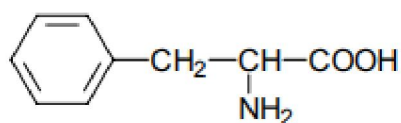


Obrázek 6: leucin [2]

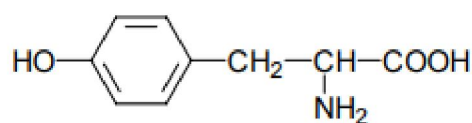
<sup>2</sup> zabráňují tryptofanu při transportu z krve do mozku, který je substrát při výrobě serotoninu, který mimo jiné způsobuje únavu

<sup>3</sup> snižují hladinu kortizolu, který má silně katabolické účinky, a udržují hladinu testosteronu

**fenylalanin (Phe) a tyrozin (Tyr):** Tato dvojice aminokyselin spolu úzce souvisí. Tyrozin se totiž v těle tvoří hydroxylací fenylalaninu za přítomnosti tetrahydrobiopterinu (BH<sub>4</sub>). Fenylalanin je esenciální aminokyselinou, tyrozin pouze podmíněně esenciální, a to v případě nedostatku Phe nebo při jaterním selhání. Důležitou roli v organismu hraje právě tyrozin, který je stavebním kamenem melaninu, katecholaminů (hormony a neurotransmitery adrenalin a noradrenalin) a tyroxinu nebo je oxidován v játrech a využit jako zdroj energie. Při poruše metabolismu fenylalaninu, kdy se v těle netvoří hydroxylasa či BH<sub>4</sub> hovoříme o fenylketonurii. Fenylalanin se nemůže katabolizovat na tyrozin, hromadí se v krvi a poškozuje mozkovou tkáň. V brzkém věku dětí se za těchto okolností rozvíjí mentální retardace doprovázená slabou pigmentací v důsledku deficitu melaninu. [11,12,16,20]



Obrázek 8: fenylalanin [2]



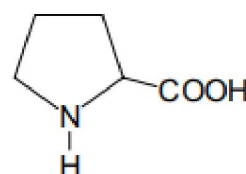
Obrázek 9: tyrozin [2]

**tryptofan (Trp):** Protože je potřebný pro syntézu řady důležitých látek, je tryptofan řazen mezi esenciální aminokyseliny. Mezi látky, jejichž je prekurzorem, řadíme kyselinu nikotinovou (nebo amid kyseliny nikotinové), pro kterou se také používá označení niacin nebo vitamin B<sub>3</sub>, a která jsou nutná pro tvorbu NAD<sup>4</sup> a NADP<sup>5</sup>, což jsou koenzymy důležité v metabolismu organismů. Dále Trp tvoří serotonin – neurotransmiter v mozku, prekurzor v biosyntéze melatoninu. Při nedostatku niacinu souvisejícím s nedostatkem tryptofanu dochází k onemocnění s názvem Pelagra, tzv. nemoc 3 D (Dermatitida, Diarrhoea, Demence). [11,12, 21,22]



Obrázek 10: tryptofan [2]

**prolin (Pro):** Jeho prekurzorem je glutamát (kys. glutamová), v důsledku zvrtné reakce, se také glutamát může z prolinu syntetizovat. Společně s hydroxyprolinem jsou hlavními složkami kolagenu. Prolin by mohl být označen jako iminokyselina, protože, co se dusíku týče, obsahuje iminoskupinu, a tudíž nepodléhá transaminaci. Při poruše degradace prolinu hovoříme o hyperprolinémií, což vede ke zvýšené koncentraci prolinu v buňkách a je jednou z příčin jaterní fibrózy. Schopnost degradace prolinu je také zpomalována požitím ethanolu. [12,25]



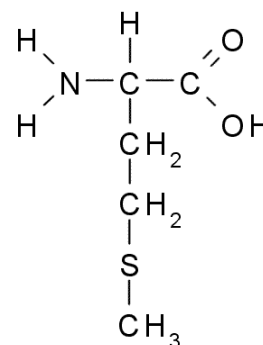
Obrázek 11: prolin [2]

<sup>4</sup> oxidačně-redukční reakce v organismu, tvorba ATP [20]

<sup>5</sup> oxidačně redukční reakce, syntéza lipidů, vznik volných radikálů [20]

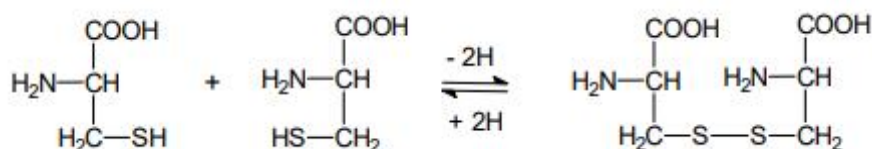


**methionin (Met):** Hraje důležitou roli při syntéze různých látek, ať už látek obsahujících síru (cystein a jeho metabolity), tak látek obsahujících methylovou skupinu (adrenalin, cholin,...). Řadíme jej mezi esenciální aminokyseliny. [12, 2]



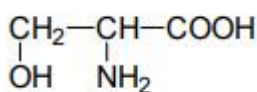
Obrázek 12: methionin<sup>[23]</sup>

**cystein (Cys):** Druhá z dvojice AMK obsahujících síru. Mezi jeho důležité metabolity patří cystin, glutathion, taurin, anorganický sulfát a pyruvát. Cystin je dipeptid vytvořený ze dvou molekul cysteinu. Tato reakce je vratná a důležitá pro sloučeniny obsahující cysteinové zbytky a také pro tvorbu disulfidových můstků v bílkovinách. Glutathion je významný antioxidant, mimo jiné potřebný v játrech, kde zabraňuje toxickému poškození jater acitoaminofenem. Při syntéze pyruvátu je vedlejším produktem sulfát ( $\text{SO}_4^{2-}$ ), který je využíván k sulfatacím. Celkově metabolismus cysteinu okyseluje vnitřní prostředí. **Taurin** je velmi důležitý derivát cysteinu, je totiž také antioxidantem a významným neurotransmitterem v CNS, hojně se objevuje v sítnici, svalstvu a plicích a také hraje značnou roli při stabilizaci membrán, např. myokardu při kritických stavech. Jeho silně kyselá sulfonová skupina je uplatněna např. ve žlučových kyselinách (k. taurocholová), kde umožňuje emulgaci tuků. Taurinu je nedostatek v těžkých katabolických stavech, kdy je nefunkční enzym pro jeho tvorbu – cysteindekarboxyláza. V mnoha komerčních roztocích AMK bývá množství taurinu nedostatečné nebo nulové, je totiž špatně rozpustný a ovlivňuje jiné aminokyseliny. Podobně je náročné přimíchat do roztoku cystein, v důsledku stejných negativních vlastností jako u taurinu. [12,15,16,24]



Obrázek 13: Schéma reakce dvou molekul cysteinu za vzniku cystinu [2]

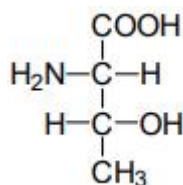
**serin (Ser):** V těle ho je možné syntetizovat při štěpení glukózy dehydrogenací 3-fosfoglycerátu, kdy vznikne 3-fosfoserin, ze kterého se po odštěpení fosforylu vytvoří L-serin. Je potřebný pro tvorbu fosfolipidů a cysteinu a také z něj může být metabolizován glycin. Dále je serin využitelný pro svou hydroxylovou skupinu, na kterou se nejčastěji váže fosfát při fosforylaci proteinů. Jeho dekarboxylací vzniká ethanolamin, který se po metylaci přeměňuje na cholin známý jako součást neurotransmiteru acetylcholinu. Serin může být přeměněn také na pyruvát. [2,12,26]



Obrázek 14: serin [2]



**threonin (Thr):** Stejně jako serin, i threonin ve svém řetězci obsahuje hydroxylovou skupinu, která potencuje jeho polární charakter. Na rozdíl od serinu jej ale řadíme mezi esenciální aminokyseliny. Je totiž základní stavební jednotkou řady dalších látek. Je katabolizován L-threoninaldolasou za vzniku glycinu a acetaldehydu. Glycin se poté může transformovat na serin a ten až na pyruvát. Acetaldehyd na acetyl-CoA<sup>6</sup>.<sup>[26]</sup>



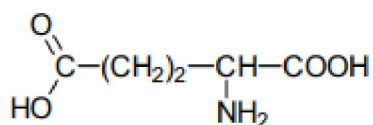
Obrázek 15: threonin<sup>[2]</sup>

**kyselina glutamová (Glu), glutamin (Gln):** Kyselina glutamová se v těle vyskytuje ve formě glutamátu – její konjugované zásady. Vzniká transaminací – reakcí 2-oxoglutarátu s nějakou aminokyselinou, která je donorem aminoskupiny, např. s alaninem. Z alaninu se při této reakci stává pyruvát. Pokud pak glutamát přijme -NH<sub>2</sub> skupinu, vznikne z něj glutamin. Vznik glutamátu mohou také iniciovat dva enzymy: glutamináza a glutamin syntetáza. Glutamináza syntetizuje glutamát z glutaminu odštěpením -NH<sub>2</sub>, zatímco glutamin syntetáza iniciuje produkci glutaminu. Různé buňky obsahují vždy jeden z těchto enzymů. Např. lymfocyty, enterocyty a buňky ledvin produkují glutaminázu a naopak svalové buňky ve velkém množství tvoří glutamin syntetázu. Jedině v játrech se objevují oba tyto enzymy. Glu a Gln jsou v organismu vůbec nejvíce zastoupené aminokyseliny. Glutamát se vyskytuje především uvnitř buněk, kde slouží jako zdroj energie, může se totiž transaminací přeměnit zpět na 2-oxoglutarát (α-ketoglutarát), který je základem glukoneogeneze. Jeho dekarboxylací vzniká inhibiční mediátor v CNS – GABA (γ-aminobutyryát), také je po dehydrogenační deaminaci hlavním zdrojem amoniaku pro organismus. Často je produkován při transaminaci mnoha aminokyselin. Mnohem podstatnější je ovšem příjem glutaminu. Může být sice z části syntetizován z glutamátu, je ale mnohem častěji syntetizován z rozvětvených aminokyselin (VLI) ve svalích. Společně s alaninem je vůbec nejobsáhlejší volnou aminokyselinou ve svalu, kde tvoří 50 % všech AMK (v organismu je 8 g Gln). V katabolickém stavu je tedy hlavní rozkládanou aminokyselinou potřebnou hlavně pro buňky hladké svaloviny (GIT) a imunitního systému či reparaci tkání. V tomto stavu je tedy semiesenciální aminokyselinou. Za normální situace má glutamin společně s alaninem také detoxikační funkci ve svalích. Tyto dvě AMK vychytávají amonný iont, a následně jsou krví transportovány do tkání, kde je jejich potřeba zvýšená (lymfocyty, tenké střevo,...). Jeho další funkcí je přesun amoniaku do moči. Kromě svalstva se glutamin tvoří také v plicích a tukové tkáni. Jeho důležitými metabolity jsou puriny a pyrimidiny (kterým poskytuje dusík), aminoglycidy tvořící glykoproteiny (sloužící mimo jiné jako receptory na buněčné membráně), a citrulin, na který se přeměňuje ve střevech. Poté je v této formě uváděn do oběhu a v ledvinách buď dále

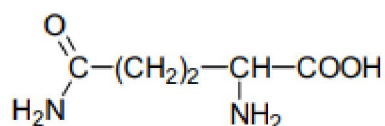
---

<sup>6</sup> acetylkoenzym A je fundamentální molekula pro syntézu sacharidů, lipidů, proteinů a dalších látek, jde o aktivovanou kys. octovou, obohacenou o koenzym A (enzym přenášející skupiny, který je navázán přes atom síry)<sup>[27]</sup>

metabolizován na arginin, nebo zpětně transaminován na glutamát, a tedy i všechny jeho metabolity. Pro všechny jeho důležité funkce by měl být glutamin součástí aminokyselinových roztoků. Jelikož je ale glutamin ve formě roztoku nestabilní, často součástí těchto roztoků není. Možným řešením je podání glutaminu ve formě dipeptidu (alanyl-glutamin), který je v roztoku stabilní a v krvi je snadno hydrolyzován na alanin a glutamin. Druhým řešením (často využívaným) je jeho náhrada ve formě glutamátu, který dokáže většinu jeho funkcí plně nahradit, ne ovšem jeho přímí účinek na proteinovou syntézu (zdroj energie, prekursor nukleotidů). Toto nahrazení glutamátem je ovšem limitované tím, že glutamát na rozdíl od glutaminu obtížně vstupuje od buněk a může být ve vyšší dávce při parenterální výživě pro tělo toxický. (dávka cca 15 g/den je ale bezpečná a užitečná). [11,12,16,26]

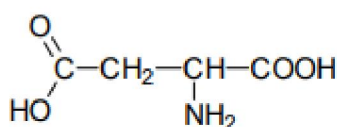


Obrázek 16: kys. glutamová [2]

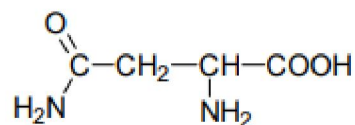


Obrázek 17: glutamin [2]

**kys. asparagová (Asp), asparagin (Asn):** Také kyselina asparagová se v těle vyskytuje v podobě konjugované zásady – aspartátu. Ten je důležitý při biosyntéze purinových a pyrimidových nukleotidů, močoviny a také pro tvorbu beta-alaninu (vzniká jeho dekarboxylací), potřebného spolu s mehlhistidinem pro syntézu karnosinu a jeho derivátu anserinu, obsažených v kosterním svalstvu a mozku. Aspartát vzniká transaminací, kdy oxalacetát reaguje s glutaminem za vzniku 2-oxoglutarátu a poté se reakcí s amoniakem přemění na asparagin, kdy se k asparátu připojí  $\text{NH}_2$  a vznikne amidová skupina ( $-\text{CONH}_2$ ). Asn je poskytovatelem aminoskupiny při biosyntézách (např. při syntéze glutamátu), také je využíván konečný produkt jeho štěpení – oxalacetát, jako součást Krebsova cyklu. Některé buňky si jej neumí syntetizovat, např. buňky akutní lymfoblastické leukémie a jiné maligní buňky, čehož je využíváno při asparaginázové terapii, kdy se do krve vpouští enzym asparagináza, která jej hydrolyzuje zpět na asparát a tyto buňky tak nemohou růst. [2,11,26,28]

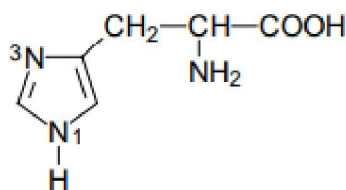


Obrázek 18: asparagová kyselina [2]



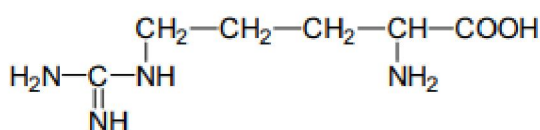
Obrázek 19: asparagin [2]

**histidin (His):** Histidin řadíme mezi semiesenciální aminokyseliny. U dětí, při zvýšeném růstu, a u pacientů s urémií je totiž jeho přísun v potravě nezbytný. V těle se tvoří štěpením dipeptidů (hlavně karnosinu) a při odbourávání se přeměňuje až na glutamát. Jeho hlavním metabolitem je histamin, který vzniká jeho dekarboxylací a je důležitým neurotransmiterem pro kontrakci hladkých svalů, hlavně střeva a průdušek. Histamin se také váže na H1 receptory, které vyvolávají alergické reakce, i na H2 receptory stimulující sekreci HCl v žaludku. Při snaze blokování těchto jeho účinků se podávají antihistaminika. Histidin má schopnost přijímat či odštěpovat  $\text{H}^+$  a podmiňuje tedy pufrční schopností bílkovin. [12,16,26]



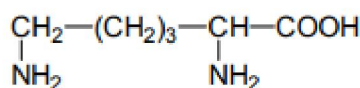
Obrázek 20: histidin [2]

**arginin (Arg):** Arginin může být v těle syntetizován v játrech – v cyklu močoviny (ornitin→citrulin→arginin), mozku a ledvinách – zde je produkován přímo z citrulinu dopraveného krví, který je uvolněn ve střevě z glutaminu (slouží tedy také k přenosu dusíku). Přesto řadíme arginin podobně jako histidin v období dětského věku mezi podmíněně esenciální aminokyseliny. Při močovinovém cyklu je arginin ihned po vytvoření rozštěpen působením enzymu arginázy na močovinu a ornitin a cyklus se uzavírá. Dále je arginin prekurzorem kreatinu, který vzniká v ledvinách a játrech z argininu a glycinu, polyaminů potřebných pro buněčné dělení a oxidu dusnatého (důležitý neurotransmitter a mediátor – podmiňuje vazodilataci endotelu cév, čehož je využíváno při léčbě anginy pectoris). Dostatečný přísun argininu je důležitý zejména při katabolických stavech. Vyvolává totiž tvorbu somatotropního hormonu a inzulinu a podporuje tedy anaboličké procesy, dále snižuje negativní dusíkovou bilanci a navíc podporuje imunitní systém zvyšováním počtu lymfocytů. Je tedy důležitou součástí aminokyselinových infuzních roztoků, ovšem při jeho nadměrném množství v roztoku dochází ke ztrátám lysinu do moči, což by bylo kontraproduktivní. [12,16,26]



Obrázek 21: arginin [2]

**lysin (Lys):** Jedná se o esenciální aminokyselinu, jediná společně s leucinem se odbourává až na acetyl-CoA, který je prekurzorem ketolátů a můžeme ji tedy označit jako ketogenní aminokyselinu. Katabolismus lysinu je poměrně složitý soubor reakcí. Nejprve lysin reaguje s 2-oxoglutarátem (α-ketoglutarátem), za vzniku sacharopinu, poté se přes několik dalších reakcí vytvoří acetacetát a z něj dekarboxylací výsledný acetyl-CoA. Dalším jeho metabolitem je karnitin, sloužící pro transport mastných kyselin do mitochondrií a detoxikaci, či hydroxylisin, vzniklý působením hydroxylasy, obsažený v pojivové tkáni, kde vytváří příčné vodíkové můstky. Při vrozené poruše metabolismu lysinu – hyperlysinémii, se v krvi hromadí tato AMK a způsobuje fyzickou a mentální retardaci. [2,11,12,26,29]



Obrázek 22: lysin [2]

## 2.2 Selhání střeva (*Intestinal Failure*)

Pod pojmem „selhání střeva“ (dále IF) máme na mysli „stav snížení střevních funkcí pod minimum nezbytné pro absorpci makronutrientů (sacharidy, proteiny, lipidy) nebo vody a iontů v míře, která vyžaduje parenterální podávání živin k zachování zdraví a růstu.“ IF může být podmíněno různými příčinami, které se liší z etiologického i patofyziologického hlediska. [39]

Dle funkční klasifikace, která vychází z délky trvání a předpokládaného dopadu IF, vyplývá, že pacienti na dlouhodobé parenterální výživě jsou postiženi selháním střeva III. typu (chronické IF). V tomto případě jsou pacienti klinicky stabilní, jsou ovšem závislí na dlouhodobém nitrožilním přívodu živin po dobu měsíců až roků. Tito pacienti jsou zařazeni do programu domácí parenterální výživy (dále DPV) a od nutričních specialistů jim jsou předepisovány nutriční vaky. Poměrně časté jsou případy, kdy jsou pacienti na DPV odkázáni doživotně. Co se týče dlouhodobého přežívání na DPV, je procento poměrně vysoké – po pěti letech 80 % u dospělých a 90 % u dětí. DPV navíc převážně většinu těchto pacientů umožňuje ucházející kvalitu života, možné komplikace ovšem bohužel nejsou vyloučeny. S prodlužující se dobou závislosti na PV tedy úmrtnost narůstá. Prevalence chronického IF s potřebou DPV z benigních důvodů je v ČR cca 1/100 000. Nejčastější příčinou selhání střeva je ve statistikách pacientů na DPV syndrom krátkého střeva (75 %). [39]

## 2.3 Syndrom krátkého střeva (*Short Bowel Syndrome*)

U zdravého člověka se délka tenkého střeva pohybuje v rozmezí 300–850 cm. O syndromu krátkého střeva (dále SBS) hovoříme v případě, že bylo tenké střevo zkráceno na délku pod 200 cm, nebo pod 150 cm, pokud na něj plynule navazuje tlusté střevo. SBS lze také diagnostikovat při střevním výdeji stolií větším než 1500 ml denně. [39]

Hlavním projevem SBS je tedy malabsorpce vody, iontů, proteinů, sacharidů, tuků, vitamínů a stopových prvků. Pokud je střevo příliš krátké a není schopno se adaptovat, jsou pacienti odkázáni na dlouhodobou parenterální výživu. [39]

U 40 % případů předchází SBS chirurgická resekce podnícená střevní ischemií, často je také výsledkem jiných abdominálních výkonů kvůli Crohnově nemoci, traumatu, stavům po radioterapii břišních nádorů atd. Adaptace střeva je úspěšná u 50 % dospělých a 73 % dětí. U většiny pacientů z našeho souboru byla důvodem SBS Crohnova nemoc. [39]

## 2.4 Crohnova nemoc (*Crohn Disease*)

Crohnova nemoc (dále CD) je nespecifický chronický zánět kterékoliv části trávicí trubice, nejčastěji konce tenkého střeva, poškozující celou tloušťku střevní stěny. Prívlastek „Crohnova“ odkazuje na Burrilla Bernarda Crohna, který jako první chorobu identifikoval (1932). [35,36]

Dnes je především ve vyspělých zemích jedním ze zásadních gastroenterologických problémů a její výskyt se stále zvyšuje. V ČR se incidence pohybuje v rozmezí 12–15/100 000 obyvatel a prevalence je 206/100 000 obyvatel. Za poslední roky je u nás patrný značný nárůst výskytu Crohnovy nemoci. Dle severoamerické studie nejvíce postihuje pacienty v období 33 a 45 let, také bylo prokázáno větší zastoupení u žen. V ČR je nyní pozorováno nejvíce nemocných ve věku cca od 10 do 24 let. [35,37]

Přesná příčina nemoci je zatím neznámá, pravděpodobně jde o deregulaci imunitní odpovědi na běžné bakteriální antigeny. Při výskytu nemoci prokazatelně hraje roli genetika, což dokazuje častý výskyt nemoci u přírodních příbuzných. Dále je prokázáno, že na vznik nemoci má negativní vliv kouření, spekuluje se také o psychogenním vlivu. [35,38]

Často se tento idiopatický zánět vyskytuje v tenkém i tlustém střevě zároveň, může být ale také pouze v jednom z nich, či v kterékoli jiné části trávicího traktu. V pokročilém stádiu se objevují typické rozsáhlé vředy, které pronikají skrz celou tloušťku stěny střeva, a makroskopicky pak sliznice připomíná dlažební kostky. Mezi jednotlivými vředy jsou zachovány nepostížené plochy sliznice a střevo je v místě zánětu ztluštěno. V důsledku těchto vředů může dojít k masivnímu krvácení nebo zúžení střevního průsvitu, což vede k střevní neprůchodnosti a následně střevní perforaci. Zánětem postižený úsek střeva ztrácí schopnost vstřebávat živiny, což vede k malabsorpci. Značnou komplikací je také přechod zánětu do okolních tkání, tedy tvorba zevních, vnitřních a smíšených píštělí a abscesů, především v perianální oblasti. [35,38]

Hlavními diagnostickými nástroji jsou endoskopická vyšetření (kolonoskopie, gastrokopie nebo v posledních letech také kapslová endoskopie), která stanoví přesnou diagnózu, případně stádium a rozsah zánětu. Ve všech případech nemoci je snaha pomocí konzervativní léčby (imunosupresiva, antibiotika, enterální a parenterální výživa) co nejvíce zmenšit plochu zánětu. Teprve při selhání této léčby je přistupováno k chirurgické resekci postižené oblasti. [35,38]

Po rozsáhlejších resekcích není střevo schopno s dostatečnou efektivitou vstřebávat živiny a pacienti jsou odkázáni na parenterální výživu.

## 2.5 Parenterální výživa

Pacient na totální parenterální výživě přijímá všechny potřebné živiny do žilního systému, tedy mimo trávicí trakt. Jde o nefyziologický způsob náhrady příjmu potravy, nutný z důvodu výše popsaných problémů, který může vyvolat řadu komplikací. Pacientům, u kterých z nějakého důvodu došlo k IF a nelze jim podávat enterální výživu, tato varianta příjmu živin umožňuje přežití. [39]

### 2.5.1 Rozdělení:

#### 1. Dle formy:

- **Multi bottle system** – nutriční výživa je rozdělena do tří různých infúzí

- **All-In-One system** (dále AIO) – nutriční výživa je podávána v jednom vaku
2. Dle místa podání:
    - **periferní výživa** – podávána do periferní žily
    - **centrální výživa** – podávána nejčastěji do horní duté žíly (nejčastější vstup – žíla podklíčková a vnitřní krční žíla)
  3. Dle složení:
    - **doplňková PV** – nahrazuje pouze část živin
    - **totální PV** – nahrazuje všechny potřebné živiny
    - **speciální PV** – obsahuje mimo nutriční složky také léčivé látky [12,39]
  4. Dle délky podání:
    - **krátkodobá** – pouze dočasné pooperační stavy
    - **dlouhodobá** – PV v rádech měsíců až let, i doživotně (při chronickém IF) [39]

Pacienti s dlouhodobou PV bývají zařazováni do programu domácí parenterální výživy.

## 2.5.2 Domácí parenterální výživa

Pacienti na domácí parenterální výživě (dále DPV), jsou pacienti, kteří jsou v důsledku selhání střeva dlouhodobě odkázáni na parenterální příjem živin. Tento program je logisticky složitý a umožňují ho pouze speciální nutriční centra s kvalifikovanými pracovníky. [39]

1. totální, dlouhodobá PV byla člověku v domácích podmínkách podána roku 1968 (Dudrick, USA), v ČR až roku 1994. Dnes je u nás 14 center domácí parenterální výživy, přičemž největší počet pacientů aktuálně vykazuje centrum DPV při FN Brno. [40,41]

V takovém centru nesmí chybět ambulantní a lůžkové zázemí včetně JIP s odborným personálem schopným kdykoli řešit případné komplikace, nezbytná je také ustavní lékárna zajišťující přípravu AIO vaků a jejich rozvoz včetně léků a potřebných pomůcek pacientům. Důležitá roli hraje edukace všech pacientů, kteří se musí naučit pracovat s vaky a pečovat o katétr (pacienti absolvují praktickou zkoušku). Pokud pacienti nejsou schopni samostatného podávání PV, jsou k nim denně posílány vyškolené sestry z agentury domácí péče. Cílem DPV je přiblížení k běžnému způsobu života pacientům dlouhodobě závislým na infuzním příjmu potravy. [39]

## 2.5.3 Konstrukce PV

Pro dobrou efektivitu a také bezpečnost parenterální výživy je nutné dodržet požadavky pro klinický stav a diagnózu konkrétního pacienta. Při konstrukci PV se musí dodržovat základní postup, který obsahuje následující body:

- **Stanovení vhodné denní energetické potřeby:** Nejčastěji je využívána Harrisova-Benedictova rovnice, možný je i kvalifikovaný odhad nutričních specialistů. Stav na počátku PV: 15–20 kcal/kg – hrozba refeeding syndromu; stabilní stav: 30–35 kcal/kg, pooperační stres: 35–45 kcal/kg. Je třeba zohlednit také fyzickou aktivitu nemocných a BMI.
- **Stanovení denní potřeby aminokyselin (dusíku):** Přesné určení potřeby AMK se stanovuje pomocí dusíkové bilance: na 1 g ztraceného N je třeba zvýšit příjem AMK o 6,25g. Denní potřeba AMK bývá také často určována odborným odhadem s ohledem na onemocnění, míra zánětu, fyzickou aktivitu a nutriční cíl (0,75–2 g AMK/kg).
- **Určení optimálního množství sacharidů a lipidů:** U sacharidů a lipidů je nutné optimalizovat nejen jejich množství, ale také rychlost jejich přívodu. V případě sacharidů je potřeba se ve stresovém stavu pohybovat v rozmezí 1,5–2 mg glukózy/kg/min, u stabilizovaných pacientů pak v rozmezí 3–4 mg glukózy/kg/min (toto odpovídá 5–6 g glukózy/kg/den). Co se tuků týče, denní dávka je 0,5–1,5 g/kg, přičemž by rychlost průtoku neměla přesáhnout 0,15 g lipidů/kg/h.
- **Rozhodnutí o použití nutričních substrátů s farmakologickými účinky:** Např. glutamin, arginin, BCAA aminokyseliny, tukové emulze atd.
- **Stanovení množství vody a iontů:** Potřebný denní příjem vody je 30–40 ml/kg, v určitých případech, kdy dochází k velkým ztrátám tekutin (pocení, píštěle, zvracení, průjmy,...) až 100 ml/kg. Do podaného množství vody započítáváme také metabolickou vodu (107 ml z oxidace 100 g lipidů, 55 ml ze 100 g sacharidů a 41 ml ze 100 g proteinů)
- **Určení optimálního množství vitamínů a stopových prvků:** Vychází se ze závažnosti situace pacienta, případné malnutrice a délce PV.
- **Rozhodnutí způsobu podání, formy a složení PV:** Viz rozdělení výše (1.–3.). [12]

#### 2.5.4 All-in-one system – preferovaná forma podání parenterální výživy

Z hlediska podání PV rozlišujeme dvě formy. V prvním případě, je celá nutriční směs smíchána do jednoho velkého vaku – tzv. all-in-one systém. V druhém případě jsou makronutrienty rozděleny do tří oddělených lahví – tzv. multibottle system (stopové prvky se přidávají do láhve s glukózou). Dnes už je v podstatě ve všech případech nahrazen multibottle system AIO vaky, které jsou mnohem více flexibilní a mají řadu výhod: umožňují upravovat množství jednotlivých živin dle potřeb konkrétního pacienta, zaručují plynulý přísun všech živin (lepší vstřebání), nejsou omezeny pouze na centrální podání PV a navíc jsou méně náročné na provoz. [11,12]

Typy AIO vaků:

- **Univerzální** – používány u stabilizovaných pacientů, jsou připravovány předem za použití dlouhodobého schématu, řadí se sem také dvou a vícekomorové komerční vaky
- **Režimové** – připravovány dle konkrétních potřeb nemocného [12]

To, v čem je AIO systém nejnáročnější, je příprava jednotlivých vaků na míru. Nejen že jsou potřeba zkušenosti nutriční odborníci, ale také ústavní lékárna s proškoleným personálem, laminárním boxem pro práci ve sterilních podmínkách a autorem na míchání vaků. Tyto požadavky splňují většinou pouze velké nemocnice. Pro zařízení, která nedisponují takovým zázemím dvou a tří komorové komerční vaky se standardizovaným složením, které již nevyžadují další manipulaci. Na druhou stranu není možnost individuálních úprav. [39]

Při domácí parenterální výživě se používají jak komerční vaky, tak vaky připravené na míru. Ve všech případech jde o AIO vaky. Jelikož se v tomto případě jedná o stabilizované pacienty, je možnost výživové vaky připravovat dopředu. K pacientům jsou pak pravidelně distribuovány sanitním vozem. [39]

### 2.5.5 Žilní vstupy pro PV

V současné době existuje mnoho způsobů podání PV do krevního oběhu. Vždy je snahou, aby vybraný způsob byl co nejvhodnější a riziko komplikací minimální. Žilní vstupy se primárně dělí na periferní a centrální. [39]

**Periferní vstup** je upřednostňován pro podávání PV v rámci dnů (periferní kanyla, 3–6 cm). Kanyla je zavedena nejčastěji v oblasti předloktí, kde je snadno přístupná. Existují ale i katétry zavedené také do předloktní oblasti, které jsou delší (Mini-midline, 6–15 cm; Midline, 15–20 cm), čímž více centralizují přívod živin (až do oblasti podklíčkové žíly) a mohou být používány po delší dobu (týdny až měsíce). Důvodem, proč nejsou periferní vstupy vhodné pro dlouhodobou PV je omezení osmolarity nutričních roztoků (< 600 mosmol/l), které jsou při DPV často koncentrovanější. [39]

**Centrální vstup** je z hlediska DPV přednostní volbou. Při rozhodování mohou lékaři vybírat ze tří typů centrálních žilních vstupů:

- tunelizovaný centrální žilní katétr
- intravenózní port
- periferně zavedený centrální katétr (PICC)

Centrální žilní katétry mohou být dvoucestné nebo jednocestné. Jednocestné jsou používány v ambulantní péči, dvoucestné mohou být lepší pro dlouhodobě hospitalizované, protože umožňují podávat léky odděleně od PV. Mezi jednocestné katétry řadíme Broviacův, Hickmanův nebo Groshongův katétr, které se zavádí do podklíčkové žíly a ústí v oblasti horní duté žíly do pravé síně. Jedná se o silikonové trubice, jejichž výrobní délka je cca 75 cm, při zavádění bývají zkráceny dle individuální potřeby. Groshongův katétr má jako jediný na výstupním konci chlopeč, která při přerušení podávání PV zamezuje návratu krve dovnitř katétru. V případě DPV bývají katétry tunelizovány do oblasti hrudníku pro snížení rizika infekce a snazší manipulaci. [39]





Obrázek 23: Broviacův katétr <sup>[43]</sup>



Obrázek 24: Intravenózní port, na který je Huberovou jehlou napojena infuze <sup>[43]</sup>

Možnou alternativou při dlouhodobé parenterální výživě je intravenózní port. Jde o podkožní implantát v oblasti podklíčkové kosti, který se skládá z portu a katétru. V tomto případě vstupní konec katétru nevyúsťuje na povrch jako u předchozích typů, ale je napojen na implantabilní port. Výživa se do katétru dostává přes tento port prostřednictvím Huberovy jehly. Katétr je opět veden přes podklíčkovou žílu až do pravé síně. Tato alternativa je předněji využívána v případech, kdy je PV podávána méně než 1x týdně – je kosmeticky příznivější. Bývá také praktikována u onkologických pacientů, kteří mají tyto porty již implantované kvůli chemoterapii. Nevýhodou při častém používání je pravidelná potřeba výměny Huberovy jehly po 5–7 dnech a také složité odstranění katétru po ukončení PV. <sup>[39,42]</sup>

V případě střednědobé PV (2–3 měs.) je první volbou tzv. PICC, což je také obdoba centrálního katétru, ovšem se vstupem v periferní oblasti, často z podpažní žíly. Tento typ žilního vstupu je poměrně novodobou alternativou. Katétr je vyroben z polyuretanu s lepšími vlastnostmi, často je upřednostňován u pacientů s rizikem kanylce centrální žíly. Sejně jako Broviacův katétr i PICC je fixován bezstehově, jednodušeji se ale odstraňuje PICC, bez nutnosti chirurgického zákroku. V posledních letech se stává dobrou alternativou i pro dlouhodobé využití. Podání PV prostřednictvím PICC je opět často spojeno s onkologickými pacienty, kteří skrz tento žilní vstup mohou dostávat onkologickou léčbu. Důvodem, proč jsou ale stále při DPV upřednostňovány katétrů zavedené v hrudní oblasti, je jejich lepší manipulovatelnost. <sup>[39]</sup>



Obrázek 25: PICC napojený do axilární žíly <sup>[43]</sup>

## 2.5.6 Monitorace

Monitorace pacientů dlouhodobě závislých na PV je důležitou součástí programu domácí parenterální výživy. Lékařům totiž dává zpětnou vazbu o tom, jestli podaná výživa dostatečně nahrazuje všechny živiny, nebo jestli není některých živin přebytek. Díky tomu mohou být jednotlivé nutriční směsi upraveny dle individuálních potřeb a co nejefektivněji nahrazovat přirozenou stravu. [39]

Při klinickém vyšetření, které se u stabilizovaných pacientů provádí každé 2–3 měsíce, se zjišťují pacientovi antropometrické údaje (hmotnost, krevní tlak, pulz, teplota) a je zaznamenávána bilance tekutin (příjem tekutin, množství podané infuze, diuréza a ztráty do stomie). Nutriční lékař se také pacienta ptá, zda při PV netrpí nějakými zdravotními potížemi (zvýšená teplota při podání infuze, zimnice třesavka, nachlazení, prudký nárůst či ztráta hmotnosti, dušnost) a zkontroluje mu stav katétru. Pacienti na DPV jsou poučeni, že v případě jakýchkoli větších potíží mají neprodleně kontaktovat nutriční centrum. [39]

Při klinickém vyšetření se provádí také laboratorní testy. Sleduje se krevní obraz, funkce ledvin (urea, kreatinin) a jater (bilirubin, jaterní testy), hladina glukózy, triacylglycerolů, cholesterolu, transportních bílkovin (albumin, celková bílkovina, transferin) a iontů (Na, K, Cl, Ca, Mg, P) v krvi, v moči pak sediment, případně odpady iontů (stav hydratace). Jednou za rok se stanovují také vitamíny (A, D, B<sub>12</sub>) a stopové prvky (hlavně Zn, Cu). [39]

## 2.6 Chromatografie

Chromatografie je separační a zároveň analytická metoda, poskytující kvalitativní i kvantitativní informace o vzorku. Při této metodě jsou látky rozděleny do dvou nemísitelných fází – mobilní (pohyblivé) a stacionární (nepohyblivé). Existují různé typy chromatografie, které můžeme rozdělit podle určitých hledisek:

- *dle principu separace*: rozdělovací, adsorpční, iontoměničová, gelová, afinitní
- *dle způsobu provedení*: kolonová, plošná (papírová či tenkovrstevná)
- *dle povahy mobilní fáze*: plynová, kapalinová
- *dle účelu použití*: analytická, preparativní [30]

### 2.6.1 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Jedná se o nejčastěji používanou kolonovou chromatografickou techniku v klinických laboratořích s kapalinovou mobilní fází. Její výhodou je schopnost rychlé a senzitivní separace s přesnou kvantifikací výsledných analytů, aplikovatelná na široké spektrum látek. Samotný analyzátor je plně automatické zařízení, jehož hlavními součástmi jsou: autosampler, který odebírá vzorky; vysokotlaká dvoupístná pumpa, která pohání mobilní fázi uloženou zpravidla v horní části přístroje; dělicí kolona, kde dochází k samotné separaci vzorku; detektor nutný ke kvalifikaci a kvantifikaci a vyhodnocovací program v PC. Při této technice mohou být použity všechny uvedené principy separace, a tedy rozlišujeme pět typů HPLC,

přičemž jsou vybírány vhodné, dle charakteru analytu, od kterého se také odvíjí náplň kolony a vlastnosti mobilní fáze:

- rozdělovací
- adsorpční
- ionotměničová (IEC – Ion Exchange Chromatography)
- gelová
- afinitní

Také se HPLC dělí s hlediska typu eluce na isokratickou a gradientovou. Při isokratické eluci je mobilní fází konstantní roztok, zatímco u gradientové eluce se mobilní fáze postupně mění. Gradientová eluce je značně frekventovanější, umožňuje totiž separovat složité analyty o velkém počtu látek. [30]

Pro stanovení spektra aminokyselin v biologickém materiálu (sérum a moč) se v klinické praxi používají automatické analyzátory pracující na principu iontoměničové chromatografie.

### **2.6.2 Iontoměničová HPLC – separace aminokyselin**

Při této separační chromatografické metodě se využívá schopnosti aminokyselin, které se ve vodném roztoku mohou disociovat na ionty. Mezi mobilní fází obsahující analyt a v našem případě katexovou (kationtoměničovou) kolonou totiž dochází k výměně iontů na základě velikosti jejich disociačních konstant. Katexová kolona je naplněna syntetickou pryskyřicí, obsahuje tedy kyselé funkční skupiny  $\text{SO}_3^-$ . Tento záporný náboj je kompenzován lithiovými kationty  $\text{Li}^+$ . Analyt obsahující směs aminokyselin je do kolony vpouštěn při nízkém pH, kdy se u AMK projeví jejich zásadité vlastnosti, disociují se a navážou přes  $\text{NH}_3^+$  na  $\text{SO}_3^-$  ( $\text{Li}^+$  se oddělí). Právě v tomto okamžiku se dle hodnot disociačních konstant jednotlivých skupin v molekulách AMK vytvoří různě pevné elektrostatické vazby na kolonu. Nejpevněji se při kyselém pH na kolonu vážou bazické AMK (vytvoří mnoho vazebných kationtů  $\text{NH}_3^+$ ), zatímco kyselé AMK mají afinitu ke koloně menší. Pro oddělování AMK je kolona postupně eluována třemi lithiocitronanovými pufrů s graduálně se zvyšujícím pH, hovoříme tedy o gradientové eluci. AMK se od kolony odštěpí v momentě, kdy pH mobilní fáze dosáhne hodnoty jejího izoelektrického bodu a ona odštěpí z karboxylové skupiny vodík a stane se neutrální. Na základě těchto vazebných rozdílů má každá aminokyselina svůj retenční čas (doba od nástřiku vzorku na kolonu do průchodu dané AMK detektorem) a může být tedy v danou chvíli kvantifikována fotometrem, kam analyt pokračuje po projití kolonou. Na chromatogramu se peaky jednotlivých AMK zobrazí v pořadí pevnosti vazby ke katexové koloně od nejslabší k nejpevnější. Nejprve tedy kyselé a nedisociované polární AMK, poté nepolární, a nakonec bazické AMK. [30]

### 3 CÍL PRÁCE

Cílem naší práce bylo v první řadě prověřit, zda infuzní roztoky podávané pacientům na domácí parenterální výživě obsahují optimální množství jednotlivých aminokyselin, případně navrhnout úpravu těch, které by toto nesplňovaly. V případě, kdy bychom prokázali nedostatečné či přebytné dávky AMK, a na základě tohoto podnětu by byly dávky upraveny, zkvalitnila by se tím celková substituce živin těchto pacientů. Pokud by se ukázalo, že je podané množství AMK optimální, byla by to cenná informace pro nutriční lékaře, kteří by si tímto potvrdili správnost postupu při konstrukci parenterální výživy.

V druhé řadě jsme chtěli zjistit, jestli jsou infuzní roztoky podávány pacientům přiměřenou rychlostí, tedy zda nedochází k velkým ztrátám aminokyselin do moče. Na základě tohoto zjištění by mohla být regulována doba podání nutriční směsi za účelem usnadnění její každodenní aplikace pacientům na DPV. Abychom mohli dojít k závěru, museli jsme najít odpovědi na několik otázek:

- Které komerční roztoky aminokyselin byly použity pro přípravu AIO vaků našeho souboru pacientů?
- Kolik obsahují AIO vaky aminokyselin (celkově i jednotlivých), tedy kolik bylo denně pacientovi podáno AMK?
- Jaká byla celková denní dávka všech AMK na kg váhy pro jednotlivé pacienty?
- Jakých hodnot dosahuje sérová koncentrace jednotlivých AMK při podání PV?
- Jaké jsou ztráty jednotlivých AMK v moči během podání PV?
- Jaké jsou ztráty jednotlivých AMK mimo dobu podání PV?
- Jakých hodnot nabývají koncentrace jednotlivých AMK v séru a moči zdravých osob?

## 4 PRAKTICKÁ ČÁST

V této části mé práce budou popsány všechny kroky, které vedly k zodpovězení výše stanovených cílů.

### 4.1 Popis souboru

Vliv podávání aminokyselin při domácí parenterální výživě na jejich koncentraci v séru a odpad v moči jsme sledovali u 36 pacientů Interní gastroenterologické kliniky Fakultní nemocnice Brno. Demografické údaje o těchto pacientech jsou uvedeny v **Tabulce 4**.

Nejčastějším primárním důvodem DPV u pacientů našeho souboru byla Crohnova nemoc, která v pokročilém stádiu vyžaduje rozsáhlé chirurgické resekce vedoucí k „syndromu krátkého střeva“, což u našich pacientů vedlo až k selhání střeva III. typu. V této situaci není tenké střevo schopno v dostatečné míře vstřebávat živiny přijaté perorální cestou a pacienti jsou proto dlouhodobě odkázáni na nitrožilním přívodu živin prostřednictvím AIO vaků. U pacientů, pro které nebyly vyhovující univerzální AIO vaky, byly vytvořeny režimové AIO vaky obsahující individuálně sestavenou směs makronutrientů i mikronutrientů v optimálním objemu vody.

Živiny se pacientům do krevního řečiště dostávají nejčastěji skrz Broviacův katétr, který mají trvale zavedený v oblasti hrudníku. Rychlost příjmu živin je regulována pomocí stacionární či mobilní pumpy. Doba podání AIO vaků se pohybovala okolo 12 hod. Pacienti na DPV jsou pravidelně klinicky i laboratorně kontrolováni pro zjištění jejich celkového nutričního stavu, hodnot minerálů, případně stopových prvků a vitaminů. Z hlediska nitrožilního podání aminokyselin je důležitým parametrem jejich utilizace (přechod z krevní plazmy do buněk, kde se účastní proteosyntézy a slouží jako zdroj energie). Metabolicky významný je také proces eliminace močí při nárazovém vzestupu jejich koncentrace v krvi. Při laboratorním vyšetření ovšem není běžně dostupné stanovení sérového profilu všech aminokyselin, stejně tak také stanovení ztrát jednotlivých podaných aminokyselin v moči vyloučené v době podání infuze. Nutriční lékaři sice mohou při tvorbě AIO vaků komerční roztoky aminokyselin libovolně kombinovat, a tedy individuálně regulovat množství podaných AMK, nedostává se jim ale zpětné vazby o optimální koncentraci jednotlivých AMK v séru, ani o množství jednotlivých AMK vyloučených močí při infuzi a jsou nuceni vytvářet výživu na základě studií výrobců nebo vlastní praxe.

**Tabulka 3: Demografické údaje sledovaného souboru pacientů**

Počet pacientů zařazených do studie	n = 36	
	Muži	Ženy
počet (%)	22 (61 %)	14 (39%)
Průměrný věk [roky] (rozmezí)	43 (22–69)	39 (22–66)
Průměrná hmotnost [kg] (rozmezí)	77 (56–100)	60 (39–93)
Průměrná délka DPV [měs.] (rozmezí)	30 (3–75)	35 (8–60)
Průměrné podané množství AMK za den [g/24 hod] (rozmezí)	125 (51–200)	86 (50–159)
Průměrné podané množství AMK na kg váhy [g/kg] (rozmezí)	1,7 (0,6–2,4)	1,6 (0,5–3,4)
Příčina selhání střeva vedoucí k DPV	SBS jako následek Crohnovy nemoci.....18 SBS z jiného důvodu.....3 Crohnova nemoc (bez resekce).....1	SBS jako následek Crohnovy nemoci.....5 Crohnova nemoc (bez resekce).....2 SBS z jiného důvodu.....6 ulcerózní kolitida.....1
Průměrná denní délka podání infuze [hod] (rozmezí)	12,9 (10–16)	12,8 (9–16)
Aplikace infuze	Pumpa stacionární / kapací set.....5 Pumpa mobilní.....17	Pumpa stacionární / kapací set.....5 Pumpa mobilní.....9
Nitrožilní přístup	Centrální žilní katétr.....15 PICC.....5 Intravenózní port.....2	Centrální žilní katétr.....10 PICC.....3 Intravenózní port.....1

DPV: domácí parenterální výživa; AMK: aminokyseliny; SBS: syndrom krátkého střeva; PICC: periferně zavedený centrální katétr

## 4.2 Klinická část

V této části výzkumu bylo nejprve nutné zjistit, jaké množství jednotlivých AMK je pacientům našeho souboru denně podáváno, a poté provést sběr moče a odběry krve.

Provedení studie bylo schváleno Etickou komisí FN Brno. Každý pacient byl obeznámen s cílem studie formou informovaného souhlasu.

Pro výpočet individuálních denních dávek AMK bylo nejprve nutné zjistit, které komerční roztoky aminokyselin byly pro přípravu AIO vaků použity a v jakém objemu. V použitých infuzních roztocích bylo následně z příbalových letáků zjištěno přesné množství 21 aminokyselin (ve dvou případech také taurin a v jednom také ornitin). V případě, kdy se některé AMK v roztoku nacházely ve formě hydrátů nebo esterů a v příbalových letácích nebyl uveden přepočten na jejich nederivované formy, byl přepočten proveden.

Pacienti zařazení do tohoto výzkumu sbírali moč vyloučenou za 24 hod do dvou graduovaných nádob. Do jedné během aplikace infuze, do druhé po zbytek dne. Z obou nádob byl odebrán vzorek do označené zkumavky, dále byl zaznamenán celkový objem vyloučené moče (ml) a doba sběru (hod). Následně byla pacientům odebrána krev z loketní žíly pomocí odběrové nádoby Lithium-Heparin Sarstedt (ještě před podáním další parenterální výživy).

**Tabulka 4: Infuzní roztoky aminokyselin použité při tvorbě AIO vaků podávaných pacientům na DPV a jejich výrobci**

Výrobce	Název přípravku	Obsah aminokyselin [g/L]
<b>Fresenius Kabi s.r.o. (CZ)</b>	Neonutrin 10%	99,3
	Nutramin VLI	30,0
	SmofKabiven	51,0
	Neonutrin 15%	148,7
<b>B. Braun Melsungen AG (GE)</b>	Aminoplasma Hepa 10%	100,0
	Nutriflex peri	40,0
	Nutriflex Omega special	56,0
<b>Fresenius Kabi Deutschland GmbH (GE)</b>	Nephroprotect	100,0
	Aminomix 2 Novum	50,0
	Aminoventoes N Paed 10%	100,0
<b>Fresenius Kabi AB (SWE)</b>	Dipeptiven	134,6

DPV: domácí parenterální výživa; AIO: all-in-one

Tabulka 5: Množství jednotlivých aminokyselin v roztocích, použitých při tvorbě AIO vaků pro pacienty na DPV, vyjádřené jako g/L

Podané infuzní roztoky AMK	Aminoplasmal Hepa 10%	Neonutrin 15%	Neonutrin 10%	Nephrorect	Aminovenoes N Paed 10%	Aminomix 2 Novum	Nutramin VLI	SmofKabiven	Nutriflex Omega special	Nutriflex peri	Dipeptiven
	AMK [g/L]										
taurin						1,0		0,5			
threonin	4,6	6,6	4,4	8,2	5,2	4,4		2,2	2,5	1,8	
serin	3,7	6,0	4,0	7,6	9,0	6,5		3,3	4,2	3,0	
asparagin	0,5	5,3	3,5								
k. glutam.	5,7	15,0	10,0						4,9	3,5	
glutamin											13,5
glycin	6,3	9,5	6,3	6,2	4,1	11,0		5,6	2,3	1,7	
alanin	8,3	9,0	6,0	6,2	7,2	14,0		7,1	6,8	4,9	8,2
valin	10,6	10,5	7,0	8,7	7,1	6,2	10,0	3,1	3,6	2,6	
cystin	0,6	1,7	1,3	0,4	0,4						
methionin	1,2	5,3	3,5	2,0	4,6	4,3		2,2	2,7	2,0	
isoleucin	8,8	7,5	5,0	5,8	6,4	5,0	7,2	2,5	3,3	2,3	
leucin	13,6	12,0	8,0	12,8	10,8	7,4	12,8	3,8	4,4	3,1	
tyrosin	0,7	3,3	2,3	2,7	5,5	0,4		0,2			
fenylalanin	1,6	9,8	6,5	3,5	4,6	5,1		2,6	4,9	3,5	
histidin	4,7	5,3	3,5	9,8	4,1	3,0		1,5	1,8	1,3	
ornitin	1,3										
lysin	7,5	10,8	7,2	12,0	7,1	6,6		3,4	3,2	2,3	
arginin	8,8	13,5	9,0	8,2	0,006	12,0		6,1	3,8	2,7	
k. asparag.	2,5	5,3	3,5						2,1	1,5	
prolin	7,1	9,0	6,0	3,0	16,2	11,2		5,7	4,8	3,4	
tryptofan	1,5	3,3	2,2	3,0	1,8	2,0		1,0	0,8	0,6	

DPV: domácí parenterální výživa; AIO: all-in-one

Vzorky krve a moče byly odebrány také dvaceti zdravým osobám. Dobrovolníci sbírali moč po dobu 24 hod a jejich vorky byly následně stejným způsobem jako vzorky pacientů laboratorně analyzovány.



## 4.3 Laboratorní část

V této fázi výzkumu bylo nutné zjistit koncentrace jednotlivých AMK v odebraných vzorcích moče a krve.

Stanovení aminokyselin ze vzorků moče a krve bylo provedeno na Oddělení klinické biochemie v Dětské nemocnici FN Brno.

### 4.3.1 Příprava vzorků

Aby bylo možné při kvantifikaci jednotlivých vzorků použít metodu vnitřního standardu a aby v případě krevních vzorků došlo k deproteinaci, bylo třeba provést několik úprav.

Vzorek krve je nejprve nutné vložit na 15 minut do centrifugy, kde při 12,8 tis. ot./min. a 20°C dojde k urychlené sedimentaci. Poté se do druhé eppendorf zkumavky napipetují dva objemové díly<sup>7</sup> krevního séra (všechny vzorky obsahovaly srážlivou krev), a následně je přidán jeden objemový díl roztoku obsahujícího 10 % kyselinu sulfosalicylovou (deproteinační činidlo) a methionin-sulfon o koncentraci 1000  $\mu\text{mol/l}$  (vnitřní standard), který je zásadní pro přesnou kvantifikaci jednotlivých AMK ve vzorku. Tato směs se pomocí Vortexu důkladně promíchá a nechá několik minut stát, nejlépe při 2–8°C. Následně je do této směsi s vysráženými proteiny přidán opět jeden objemový díl lithio-citrátového pufru A1 s hodnotou pH 2,9. Takto obohacená směs je znovu promíchána a po dobu 15 min. centrifugována. Výsledný supernatant se získá opatrným oddělením čirého roztoku volných aminokyselin od sedimentovaných proteinů pomocí pipety a v případě, že není ihned vložen ve vialce do analyzátoru, je uložen v Epp. zkumavce do mrazáku. Je třeba si uvědomit, že jsme ředěním zmenšily koncentraci AMK v původním séru na polovinu, a tedy na konci analýzy budeme muset výsledné množství vynásobit dvěma.

Při rozboru moči je proces jednodušší. Jelikož se v moči nevyskytují žádné proteiny, které by bylo nutné denaturovat, do vzorku je pouze v poměru 1:1 přidán pufr A1 obsahující tedy také interní standard methionin-sulfon. Směs je poté promíchána a po dobu 10 minut centrifugována. Nakonec je supernatant stejným způsobem jako u séra oddělen od případného sedimentu krystalů a vložen buď do analyzátoru, nebo do mrazáku. Opět bude třeba konečné množství jednotlivých AMK vynásobit dvěma.



Obrázek 26: Eppendorf mikrozkušavka, Vialka (2 ml) + víčko a septum

---

<sup>7</sup> jeden objemový díl obvykle odpovídá objemu 200  $\mu\text{l}$ .

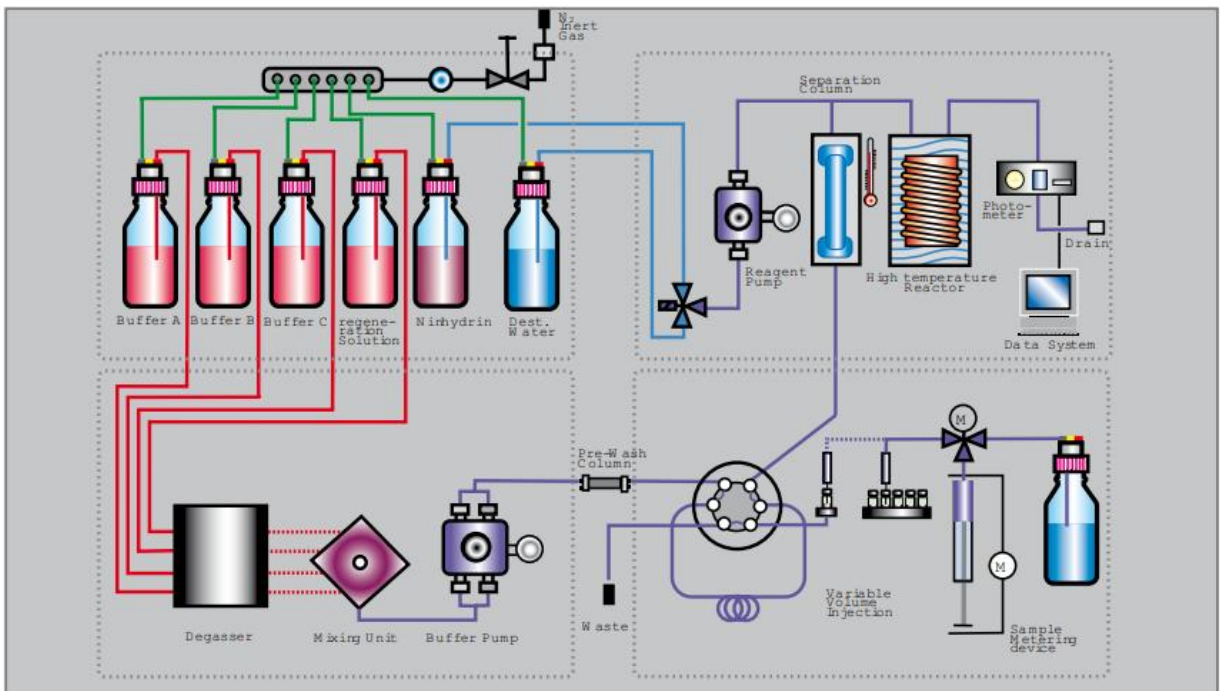
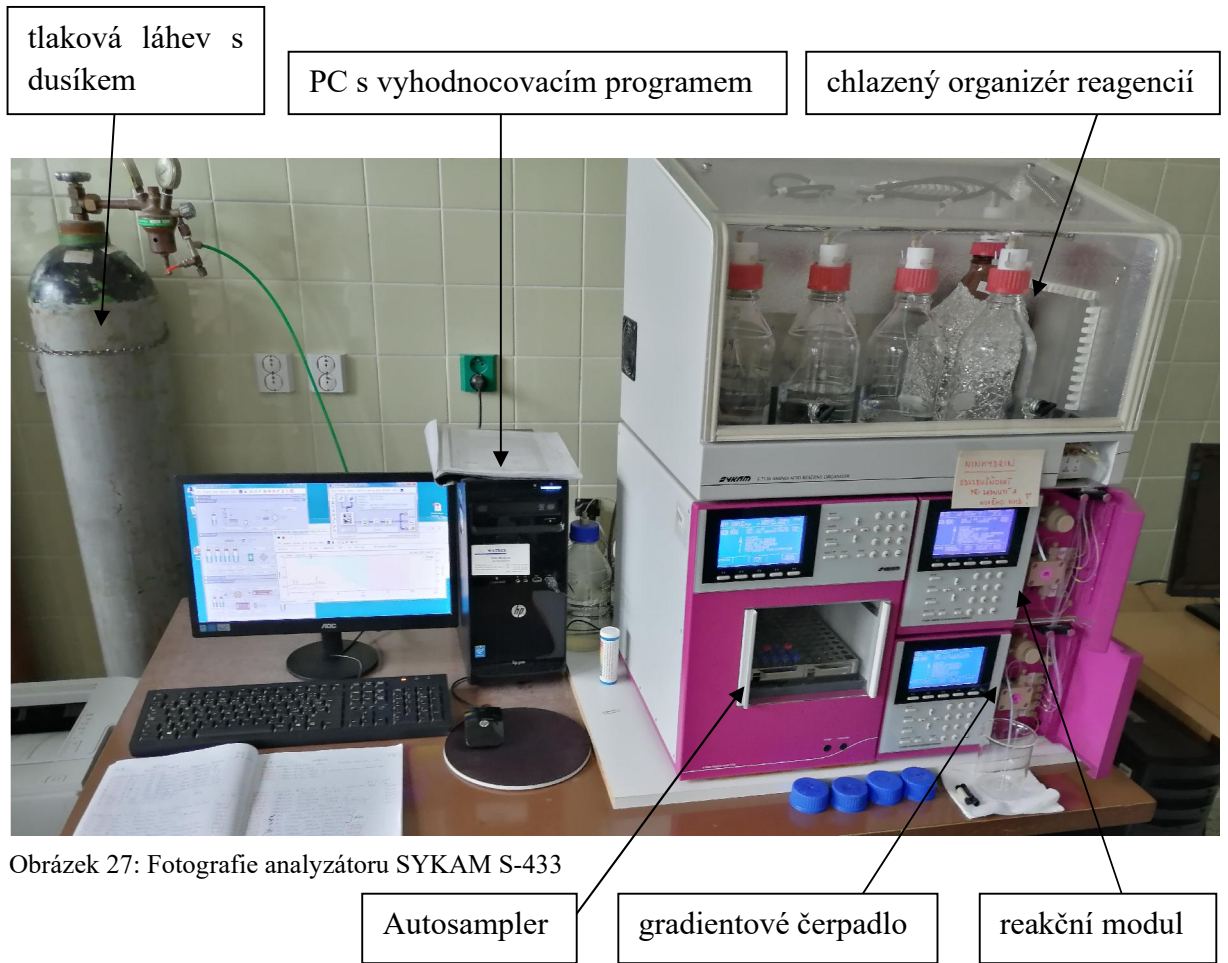
### 4.3.2 Analyzátor aminokyselin

Pro stanovení aminokyselin ze séra a moči se používá analyzátor aminokyselin. Jedná se o separačně-analytické automatické zařízení, používající techniku vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Stacionární fází je v tomto případě kolona, separující AMK na principu iontoměničové chromatografie, konkrétně kationtoměničové (na katexu).<sup>[30]</sup>

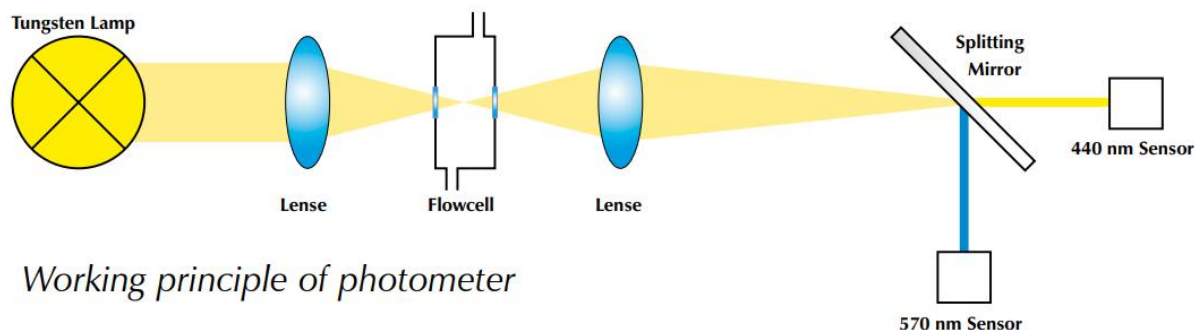
Přístroj, na kterém byly vzorky analyzovány, nese název SYKAM S-433 a skládá se z těchto modulů:

- **Chlazený organizér reagentů S7130** – připojen k tlakové lahvi s dusíkem, slouží tedy i jako chladicí zařízení pro stabilitu pufřů a ninhydrinového činidla; obsahuje speciální ventily pro aplikování čistého N<sub>2</sub> bez kyslíku a také barometr pro kontrolu tlaku N<sub>2</sub> v organizéru; lahve s reagenty jsou opatřeny šroubovacími uzávěry s uzavíratelnými konektory<sup>[32]</sup>
- **Autosampler S5200** – automaticky dávkuje vzorek z vialky na kolony v objemu max. 250 µl; skládá se z dávkovací jehly, šesticestného dávkovacího kohoutu se smyčkou, nasávacího pístu, motoru pro pohyb pístu, spojovací kapiláry, láhve s promývacím roztokem, stojánku pro 120 vzorků ve 2 ml vialkách, portů pro komunikaci a teploměru kontrolujícího teplotu vzorku; ovládání umožňuje display a klávesnice<sup>[32]</sup>
- **Gradientové čerpadlo (Solvent Delivery System) S2100** – obsahuje dvě dvoupístné vysokotlaké pumpy, které zajišťují téměř bezpulzní průtok (méně než 1 %) mobilní fáze systémem; směšovací komoru, která směšuje až 4 pufry; rychlost průtoku od 0,01 do 10,00 ml/min; maximální tlak do 400 bar; součástí modulu je také čtyř-kanálové odvodušňovací zařízení se vzduchovou pumpou a grafický displej ukazující profil míchaných pufřů<sup>[32]</sup>
- **Reakční modul S4300** – umožňuje kvalifikaci a kvantifikaci oddělených AMK, které prochází vyhřátou reakční smyčkou (do 180°C), aby reagovaly s ninhydrinem, který je do systému přidán pomocí reakční dvoupístné dávkovací pumpy s nastavitelnou rychlostí průtoku (0,01 až 2,0 ml/min); také reguluje teplotu kolony (20–99°C); další součástí je duální fotometr kontinuálně měřící vlnové délky 570 a 440 nm, display ukazující tlak v systému, automatický ventil pro vypláchnutí spirály a kontrolní zařízení (např. vysoký tlak, prosakování kolony); modul je napojen na počítač, který zaznamenává retenční časy a plochy adsorpčních peaků jednotlivých AMK<sup>[32]</sup>
- **PC + Aminoacid Clarity Software** – řídí všechny výše uvedené moduly, sbírá a vyhodnocuje data<sup>[32]</sup>

Všechna místa v analyzátoru, která přichází do kontaktu s reagenty a vzorky jsou vyrobeny s inertních materiálů, není proto třeba používat speciální nekorodující reagenty.



Obrázek 28: Schéma toku reagentů a analytu v analyzátoru SYKAM S-433 [32]



Working principle of photometer

Obrázek 29: Schéma fotometru v reakčním modulu [32]

### Spotřební materiál:

- **Kolona:** CationSeparationColumn LCA K07/LiforPhysiological Fluid (PEEK - Column 4,6 x 150 mm, katex na bázi polystyrolu, velikost částic 7 $\mu$ m v Li<sup>+</sup> cyklu), měněna cca každý půl rok, dle vytíženosti



Obrázek 30: Separační katexová kolona LCA K19/Li 4,6 x 210 mm

- **Reagencie – pufrý a ninhydrinové činidlo**

Tabulka 6: použité reagencie

Výrobce	Název	Molarita	pH	Množství
SYKAM GmbH	Buffer A-1 (Lithium-citrát)	0,12	2,9	1000 ml
	Buffer B-1 (Lithium-citrát)	0,30	4,2	1000 ml
	Buffer C-4 (Lithium-citrát/borát)	0,30	8,0	1000 ml
	RegenerationSolution (LiOH)	0,45	-	1000 ml
	Ninhydrine Reagent + reducing agent	-	-	1000 ml + 1 ml

- **Vialky (nádobky do podadvače):** 2 ml Vials – Amber WideOpeningScrew Top, Agilent
- **Víčka k vialkám:** Red Open Top Screw Caps, Agilent
- **Septa:** Screw Cap Septa, Agilent
- **Laboratorní materiál:** špičky k automatickým pipetám, parafilm, buničitá vata, Epp zkumavky

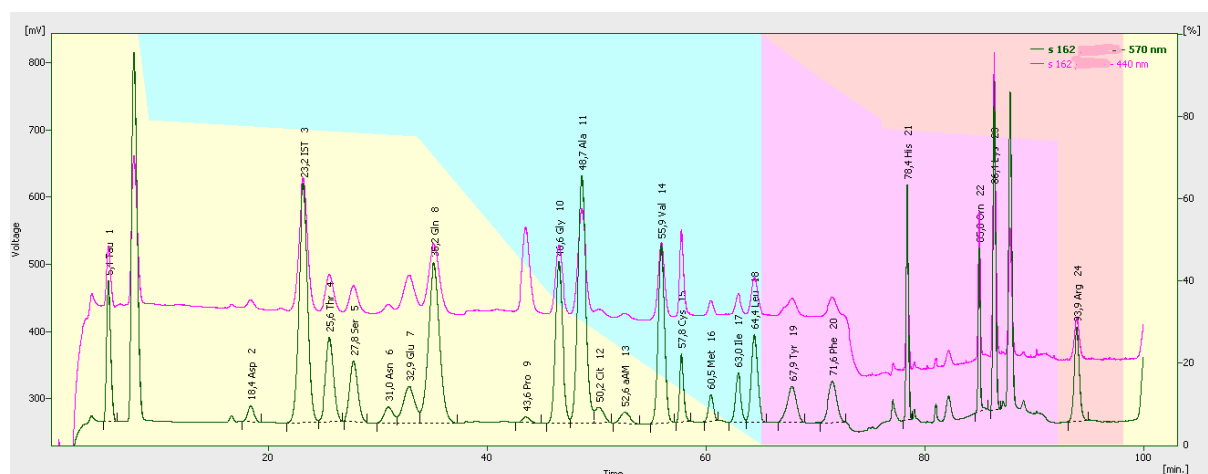
### 4.3.3 Popis procesu analýzy

Nejprve je pomocí gradientového čerpadla upravena mobilní fáze. Jednotlivé pufrы procházejí odvzdušňovacím zařízením, vzduchové váčky by totiž mohly narušit rychlost průtoku kolonou, jsou tedy pomocí vzduchové pumpy odstraněny. Poté mobilní fáze pokračuje do směšovací komory, kde jsou pufrы namíchány tak, aby mobilní fáze měla optimální hodnotu pH (s časem roste i pH). Tento roztok je poháněn dvěma dvoupístnými pumpami, které regulují tlak (obvykle 50 bar) a rychlost průtoku (0,45 ml/min). Před tím, než mobilní fáze postoupí do injektoru, je v předkoloně zbavena případných nežádoucích látek (především amoniaku). [32, 33]

Dalším krokem je přidání vzorku k mobilní fázi. Připravený vzorek se v tzv. vialce vloží do přístroje, poté je pomocí Autosampleru plně automaticky dávkován z vialky na kolonu v objemu max. 250  $\mu$ l. Zde se vzorek v dávkovacím kohoutu smísí s mobilní fází, poté je tlačěn dále do kolony. [31]

Dělicí proces nastává v katexové koloně. Jde o 15 cm dlouhou trubici s průměrem 4,6 mm a velikostí částic 7  $\mu$ m uloženou v termostatu (teplota při dělení je řízena pomocí počítačového programu, dle potřeby se mění v rozmezí 37–74°C). [32]

Jakmile eluát projde kolonou, je k němu pomocí reakční pumpy (0,25 ml/min) přimícháno barvicí ninhydrinové činidlo. Směs následně putuje do vyhřáté reakční smyčky (130°C), kde reaguje s ninhydrinem a jednotlivé AMK jsou různě intenzivně obarveny – primární do modra, sekundární do žluta (pouze prolin). Obarvený eluát pokračuje do průtokové kyvety duálního spektrofotometru, kde jsou kontinuálně měřeny vlnové délky 570 nm a 440 nm. Modře obarvené AMK dosahují absorpčního maxima při vlnové délce 570 nm, žlutě obarvené při 440 nm. Fotometr je napojen na PC s vyhodnocovacím programem, který zaznamenává na chromatogram (aminogram) retenční časy a peaky AMK dle odezvy fotometru v závislosti na propustnosti dané vlnové délky (intenzitě zbarvení), a následně vypočítává množství separované AMK ve zkoumaném vzorku. Koncentrace jednotlivých AMK je přímo úměrná jejich absorbanci. [30,32]



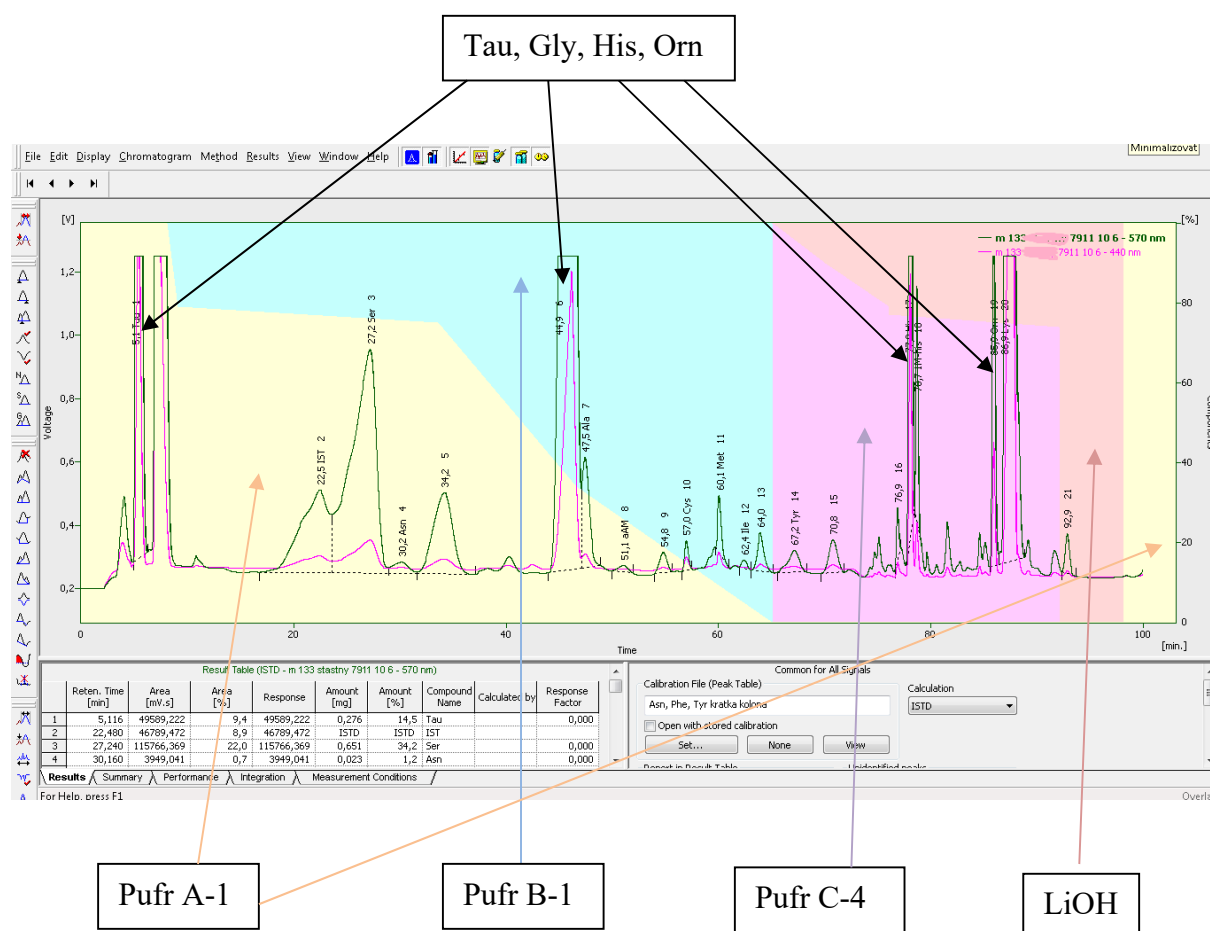
Obrázek 31: Chromatogram vzorku séra vytvořený programem Aminoacid Calrity



Na konci analyzačního procesu je nutné nechat kolonu protéct regenerační roztok (0,45M LiOH), aby byly odstraněny všechny zbytky separovaného vzorku a také případné nečistoty z pufrů. Poté je třeba kolonu stabilizovat pufrém A1, který kolonou musí protékat po dobu 25–30 min, aby na začátku dalšího separačního cyklu byly v koloně vždy totožné podmínky.

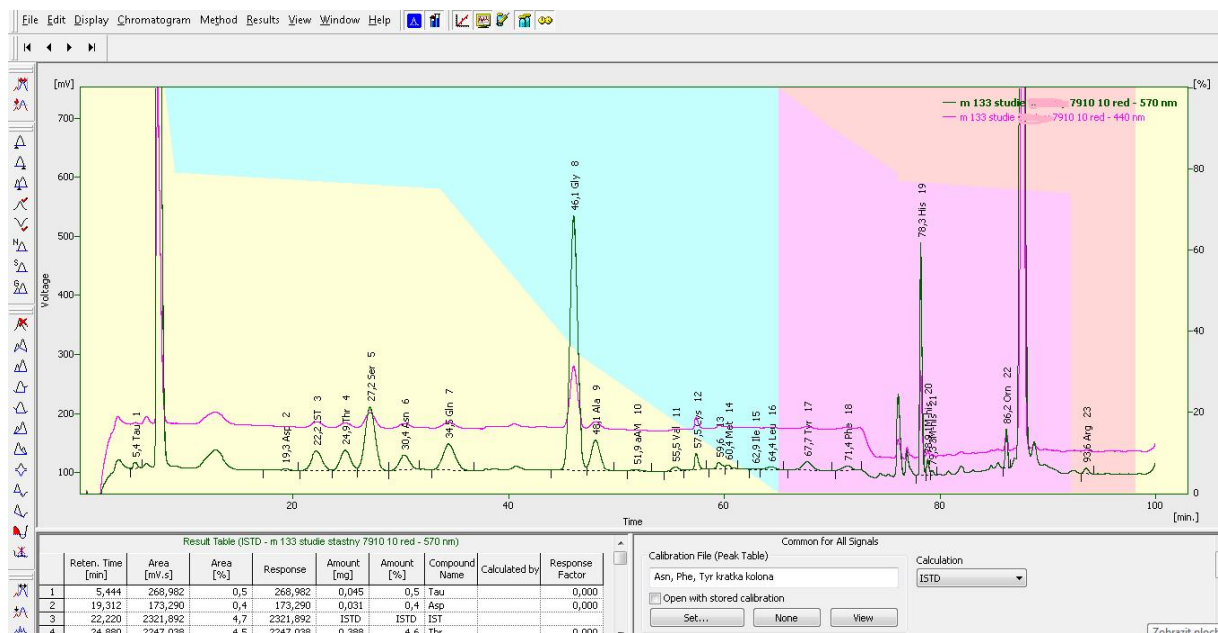
Na aminogramu vidíme odezvy fotometru jednotlivých AMK při vlnových délkách 570 nm a 440 nm. Z grafu je patrné, že peaky téměř všech AMK mají větší plochu při měření vlnové délky 570 nm, z čehož vyplývá, že většina AMK obarvených ninhidrinem intenzivněji pohlcuje tuto vlnovou délku, což vypovídá o jejich modrém zbarvení. Pouze prolin byl obarven do žluta, a proto má jeho integrační jednotka větší hodnotu při měření vlnové délky 440 nm. Čísla pod názvem AMK vykazují hodnotu retenčního času, který se zvyšuje od kyselých k zásaditým AMK. Barevné plochy v pozadí znázorňují postupné přimíchávání jednotlivých pufrů, resp. na konci také LiOH. Známkou toho, že je třeba vyměnit kolonu, je postupné rozšiřování peaků, které vede k splynutí dvou sousedních, což znemožní přesné ohraničení daného peaku, a kvantifikace se stává nepřesnou.

Především u vzorků moči, kde je koncentrace volných AMK větší než v séru, může nastat problém s kvantifikací určitých AMK. Je-li totiž koncentrace některých AMK ve vzorku příliš velká, na aminogramu se zobrazí pouze část daného peaku. Tento problém se řeší zředěním daného vzorku a opakovanou analýzou.



Obrázek 32: Chromatogram vzorku moči, kde byly některé AMK příliš koncentrované + přiřazení jednotlivých pufrů k barevnému schématu gradientové eluce v pozadí grafu

Po zředění se koncentrace všech AMK zmenší a na aminogram se zobrazí celé peaky všech analyzovaných AMK:



Obrázek 33: Chromatogram po zředění příliš koncentrovaného vzorku

Můžeme si všimnout, že na všech aminogramech se zobrazují také dvě látky o vysoké koncentraci a integrační jednotka interního standardu (IST). První vysoce koncentrovanou látkou je močovina (za taurinem), v druhém případě se jedná o amoniak (za lysinem). Interní standart je důležitým parametrem pro přesnou kvantifikaci.

#### 4.3.4 Kvalifikace, kvantifikace (kalibrace, metoda vnitřního standardu)

Při přípravě vzorku, kdy byl pomocí pipety oddělen čirý roztok volných AMK od sedimentovaných proteinů, mohlo dojít k nechtěným ztrátám. Aby byla analýza co nejpřesnější, je třeba před samotnou analýzou provést kalibraci a tím získat pro každou AMK její kalibrační faktor (F). Poté může být při analýze AMK použita tzv. metoda vnitřního standardu. Kalibrace analyzátoru se pro zajištění přesných výsledků provádí každý měsíc, popřípadě po každé změně v analytickém systému (výměna kolony a předkolony, změna programu analýzy, např. teplotní změna).

Bezprostředně před kalibrací musí kolona projít regenerací a stabilizací. Poté je nastaven definitivní program analytického cyklu a do analyzátoru je vložen kalibrační roztok, tj. komerční standard AMK (= externí standard, obsahující všechny AMK o známé koncentraci) s přídavkem určitého množství vnitřního standardu (methioninsulfon).

#### Příprava kalibrační směsi:

V epp. zkumavce se smísí 500 µl externího standardu A-9906 firmy SIGMA o koncentraci AMK 500 µmol/l, 250 µl roztoku methioninsulfonu o koncentraci 1000 µmol/l v 10 % kys.

sulfosalicylové (interní standard v deproteinačním činidle) a 250 µl pufru A1. Výsledná koncentrace všech AMK je 250 µmol/l.

Z kalibračního chromatogramu se zjistí retenční časy a kalibrační faktor (F) jednotlivých AMK.

$$F = \frac{\text{Integrační jednotka (plocha peaku) vnitřního standardu}}{\text{Integrační jednotka aminokyseliny}}$$

Vnitřní standard (methioninsulfon) se přidává také do analytu AMK. Použitím vnitřního standardu při kalibraci i analýze AMK jsou eliminovány negativní vlivy (stárnutí ninhydrinového činidla, případné ztráty vzorku atd.), které totiž působí také na interní standard. Při kvantifikaci vzorku je srovnán poměr integrační jednotky dané aminokyseliny a vnitřního standardu v kalibrační směsi s poměrem integrační jednotky oné aminokyseliny a vnitřního standardu ve vzorku. Na základě těchto srovnání nám vyjde výsledná koncentrace všech AMK obsažených v analytu v µmol/l.

$$\text{koncentrace AMK ve vzorku} = \frac{\text{Integrační jednotka AMK} * C * 2 * F}{\text{Integrační jednotka vnitřního standardu}} \text{ [}\mu\text{mol/l]}$$

C ... koncentrace AMK v kalibračním standardu

2 ... korekce ředění (při přípravě byl vzorek zředěn na poloviční koncentraci AMK)

F ... kalibrační faktor dané AMK

Všechny výpočty provádí Aminoacid Clarity Software v počítači připojeném k analyzátoru.

#### 4.4 Zpracování výsledků

Obsah aminokyselin stanovený ze séra jsme ponechali dle soustavy SI v jednotkách µmol/l. Odpady AMK v moči jsme v obou případech vztáhli na objem vyloučené moče. Z důvodu přehlednějšího srovnání s podanými dávkami (g) jsme je vyjádřili nejdříve v mg/l, následně dle hodnot diurézy jako hodinový odpad (mg/hod) a nakonec i jako procento z podané dávky. Abychom mohli srovnávat odpady AMK v moči pacientů s odpady AMK v moči zdravých osob, byla vypočítána průměrná doba podání infuze (12 hod; tedy průměrně po dobu 12 hod byl obsah AMK v moči podpořen podáním PV a zbylých 12 hod ze dne nikoli) a odpad AMK v moči zdravých osob byl také vztahen na tuto dobu (mg/12 hod).

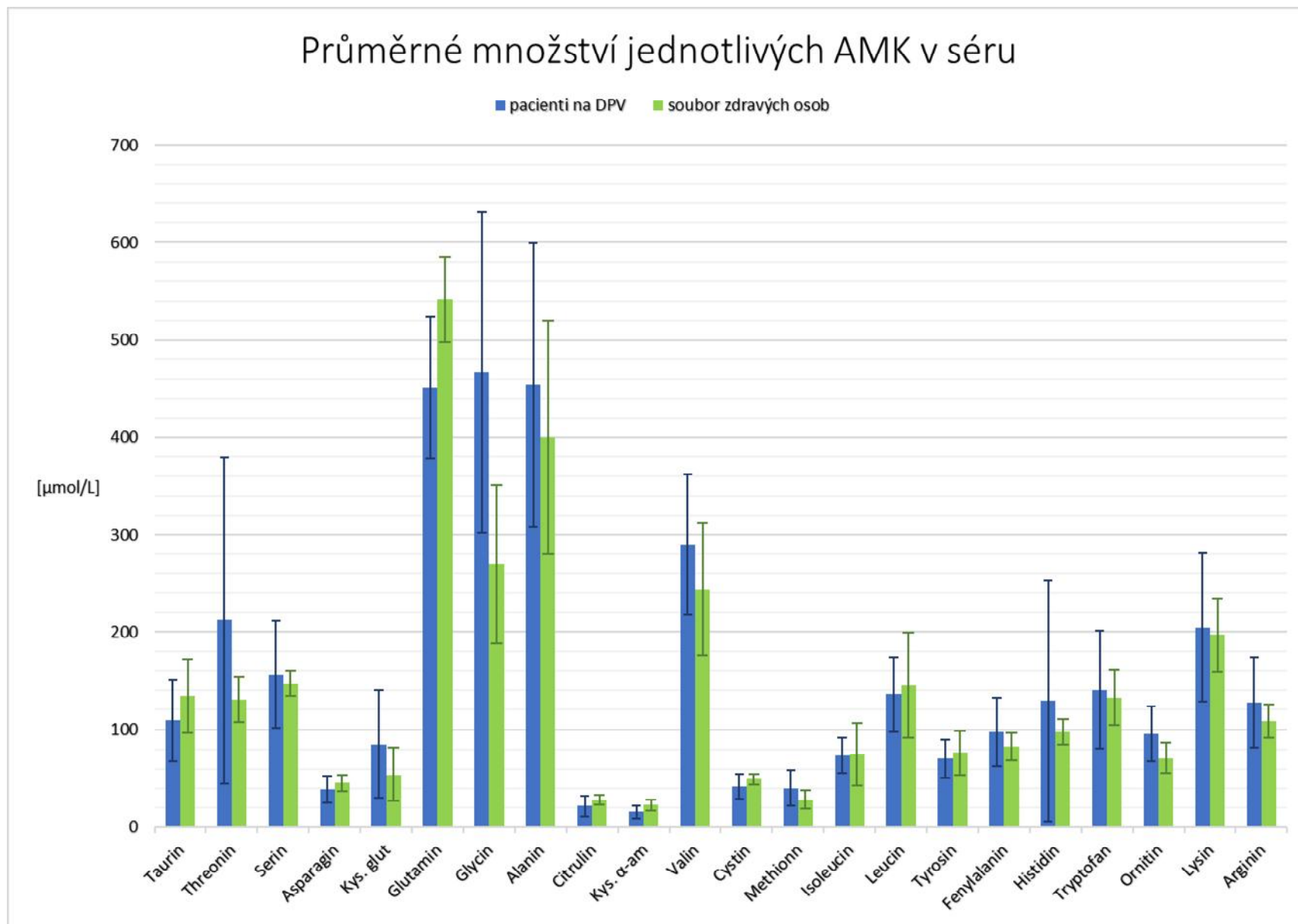
Pro statistické zpracování výsledků byl použit software MedCalc, který ze zadaných dat vypočetl průměrné obsahy jednotlivých AMK, jejich směrodatné odchylky a na principu Studentova T-testu určil hodnotu signifikance mezi hypoteticky odlišnými soubory. Za signifikantní byla považována hodnota  $p \leq 0,05$ .



## 5 VÝSLEDKY

Ukázalo se, že většina zjištěných průměrných hodnot aminokyselin v séru pacientů na dlouhodobé parenterální výživě se signifikantně nelišila od hodnot aminokyselin stanovených ze séra zdravých osob kontrolního souboru. Konkrétní stanovené hodnoty jsou uvedeny v **Grafu 1** (*viz následující strana*).

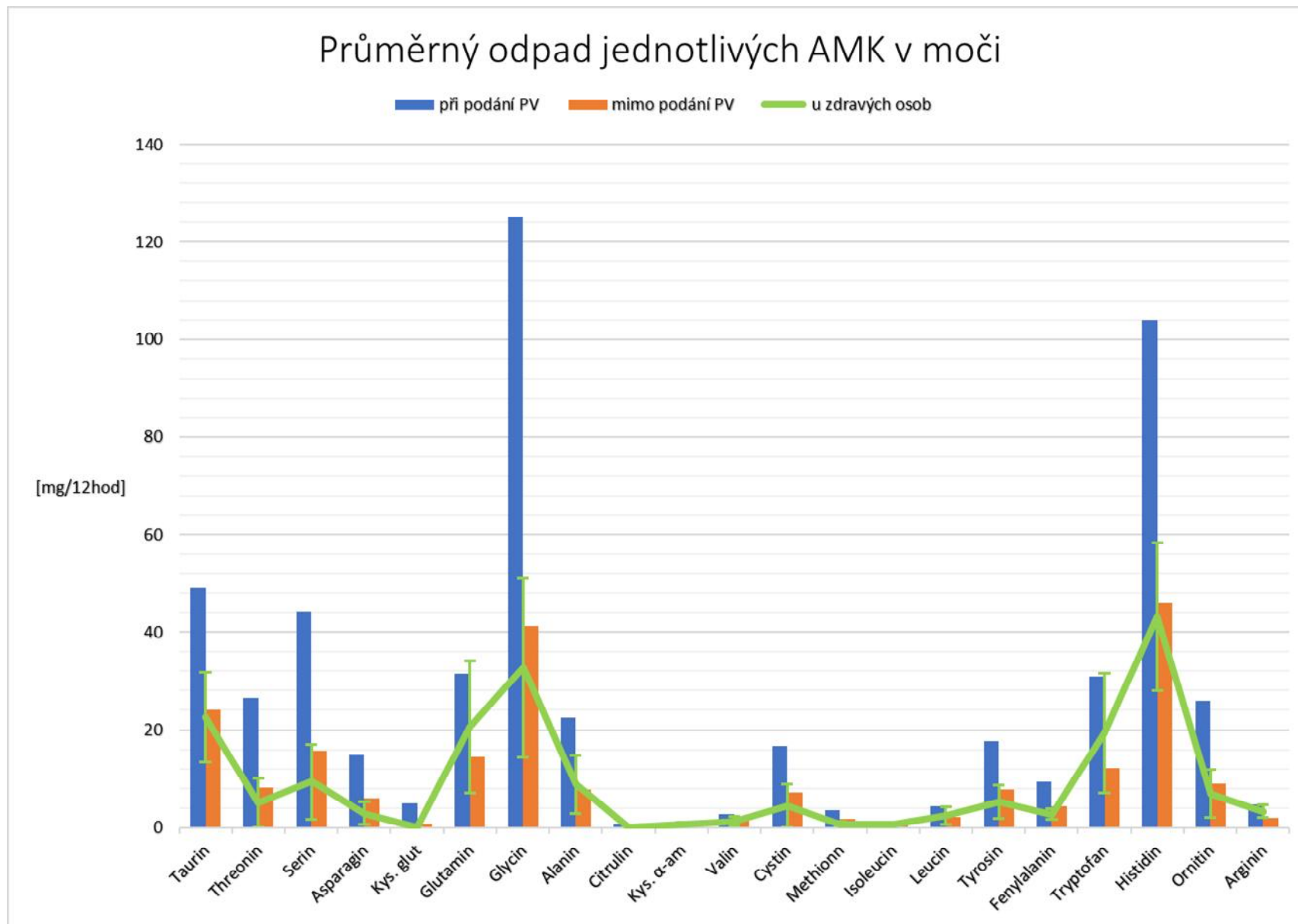
Jak naznačuje graf 1, jedinou aminokyselinou o signifikantně vyšší koncentraci v séru oproti zdravým osobám se ukázal být glycin (v průměru o 197  $\mu\text{mol/L}$ , tj. o 73 %). Signifikantně nižší koncentrace se objevila pouze u glutaminu (průměrně o 91  $\mu\text{mol/L}$ , tj. o 17 %). Na aminogramech se objevovaly také citrulin a kys.  $\alpha$ -amino máselná, které v AIO vacích nebyly obsaženy vůbec.



**Graf 1: Sloupcový graf srovnávající průměrné koncentrace aminokyselin v séru u pacientů na domácí parenterální výživě a normální sérové hodnoty dvaceti zdravých osob**

Dále bylo prokázáno, že odpady všech jednotlivých aminokyselin v moči vyloučené během podání infuze jsou signifikantně větší než jejich množství v moči vyloučené mimo dobu podání infuze (pro všechny AMK bylo  $p < 0,05$ ). Ztráty v době podání PV ovšem ani u jedné aminokyseliny nepřekročily 130 mg. Naopak mimo dobu podání infuze se ztráty všech AMK pohybovaly v rozmezí ztrát souboru zdravých osob. Průměrné stanovené hodnoty jednotlivých AMK v moči jsou uvedené v **Grafu 2** (*viz následující strana*). Opady jednotlivých AMK v době podání PV vyjádřené jako procentuální podíl z podané dávky jsou shrnuty v **Tabulce 7**. Hromadné srovnání všech AMK obsažených v moči v souvislosti s podáním AIO vaků ukazuje **Tabulka 8**.

Z grafu 2 je patrné, že při podání PV se do moče nejvíce ztrácel glycin (průměrně o 92 mg více než u zdravých osob) a histidin (průměrně o 61 mg více než u zdravých osob), ztráty těchto dvou aminokyselin byly největší také v době mimo podání PV i u souboru zdravých osob. Za zmínku stojí také poměrně vysoké ztráty taurinu, glutaminu a ornitinu, které byly v infuzních roztocích zastoupeny minimálně, a dále přítomnost citrulinu a kys.  $\alpha$ -amino máselné, které součástí AIO vaků nebyly vůbec.



**Graf 2: Kombinovaný graf srovnávající odpady aminokyselin vyloučených do moči v době podání parenterální výživy a mimo tuto dobu s množstvím vyloučených aminokyselin kontrolního souboru dvaceti zdravých osob. Množství AMK je vyjádřeno v mg a je vztaženo na objem moče vyloučené za 12 hod**

**Tabulka 7: Roztřídění jednotlivých aminokyselin dle jejich procentuálních ztrát v moči z podané dávky do tří skupin: méně než 0,5 %, mezi 0,5–1,0 % a větší než 1 % z podané dávky**

< 0,5 %		0,5 – 1,0 %		> 1,0 %	
isoleucin	0,02	Treonin	0,57	tyrosin	1,31
kys. glutamová	0,03	serin	0,84	glycin	1,49
valin	0,04			cystin	1,84
leucin	0,05			histidin	2,9
arginin	0,05				
methionin	0,11				
phenylalanin	0,14				
alanin	0,26				
asparagin	0,38				
glutamin	0,49				

V této tabulce není zahrnutý taurin a ornitin, jejichž koncentrace v moči byla větší než jejich množství v podaném roztoku, a také citrulinu a kys.  $\alpha$ -amino máselná, které, jak již bylo zmíněno, nebyly součástí infuzních roztoků vůbec. K vysokým hodnotám glycinu a histidinu se při tomto vyjádření ztrát přidaly také tyrosin a cystin. Odpady žádné esenciální AMK v průměru nepřesáhly 0.6 % z podané dávky. Horní hranicí představuje histidin, jehož ztráty dosáhly necelých 3 % z podaného množství.

**Tabulka 8: Průměrné odpady všech AMK v moči během podání PV a mimo dobu podání PV vyjádřené v mg, v % z podané dávky a v mg/hod. V tabulce je uvedena také SD a signifikance rozdílu sledovaných parametrů.**

	odpad AMK v moči [mg]	odpad AMK v moči [%] z podané dávky	odpad AMK v moči [mg/hod]
<b>Během intravenózního podání infuze AMK</b>			
<b>Průměr</b>	393	0,37	27,8
<b>SD</b>	269	0,21	19,6
<b>signifikance</b>	P < 0,001	P < 0,001	P < 0,001
<b>Mimo intravenózního podání AMK</b>			
<b>Průměr</b>	166	0,16	12,2
<b>SD</b>	175	0,15	8,4

AMK: aminokyseliny; PV: parenterální výživa; SD: směrodatná odchylka

Zde se můžeme přesvědčit o vysoce signifikantně větších ztrátách všech AMK v době podání PV ( $p < 0,001$ ). V tabulce jsou třemi způsoby vyjádřeny průměrné celkové ztráty všech AMK, přičemž pokaždé byla hodnota signifikance mezi odpady v moči vyloučené v době podání infuze a odpady mimo dobu podání infuze menší než 0,05, čímž byla ve všech případech potvrzena.

## 6 DISKUZE

V minulosti se výzkumem parenterální výživy z hlediska dostatečného obsahu jednotlivých živin zabývala řada prací. Tři studie, z nichž dvě poměrně aktuální byly zaměřeny přímo na dostatečný obsah aminokyselin, byly provedeny v italské fakultní nemocnici v Naples. První z nich (2014) se zabývala složením komerčních a individuálně připravených AIO vaků a došla k závěru, že za použití komerčních roztoků není náhrada živin dostatečná a je třeba nahlížet na pacienty individuálně. Druhý výzkum (2018) byl zaměřen na dostatečné množství esenciálních AMK v PV a prokázal jejich hodnoty odpovídající teoretické denní potřebě u všech roztoků s obsahem AMK větším než 1 g/kg. S ohledem na udržení svalové hmoty vědci navrhli pouze zvýšení obsahu BCAA podle vzoru syrovátkového proteinu. Tématem třetí italské práce (2020) bylo zastoupení tentokrát už všech AMK v roztocích PV. Tato práce znovu poukázala na nedostatky při použití komerčních výživových směsí, u těch individuálních se ukázal problém s nedostatečným množstvím některých esenciálních AMK, cysteinu a tyrozinu. [44,45,46]

Při srovnání našeho výzkumu se zmíněnými předešlými můžeme konstatovat, že jsou dnes zcela běžně tvořeny AIO vaky přímo na míru pacienta, což rozhodně zlepšuje kvalitu substituce živin. Dále můžeme vyzdvihnout optimální individuální přípravu jednotlivých AIO vaků nutričními odborníky v centru DPV při FN Brno, jelikož jsme neobjevili žádné podstatnější nedostatky v množství podaných esenciálních AMK. V případě neesenciálních AMK se v séru ukázala lehce snížená koncentrace glutaminu a zvýšená koncentrace glycinu. Zjištění ohledně glutaminu patrně souvisí s tím, že tato AMK v naprosté většině použitých infuzních roztoků chyběla. Fakt, že glutamin často nebývá součástí aminokyselinových roztoků, je všeobecně známý. Souvisí s jeho špatnou stabilitou v těchto roztocích, může být avšak nahrazen ve formě alanylglutaminu, který je v roztoky stabilní. U některých pacientů našeho souboru tato látka byla součástí AIO vaků. Co se glycinu týče, ukázalo se, že jeho podaná dávka byla u většiny pacientů lehce vyšší, než by bylo třeba (jeho koncentrace v séru byla o 73 % vyšší než u zdravých osob). [12]

Na rozdíl od italských studií, které optimální složení AMK v infuzních roztocích zjišťovali podle mezinárodně uznávaných konvekčních hodnot, jsme v našem výzkumu prověřovali užití jednotlivých AMK u konkrétních pacientů, na základě stanovení jejich hodnot v séru a moči, a následném porovnání s odpovídajícími hodnotami souboru dvaceti zdravých osob. [44,45,46]

Takto podložený výsledek naší práce prokazující optimální zastoupení všech esenciálních a téměř všech neesenciálních AMK v individuálně tvořených AIO vacích pro pacienty na DPV můžeme považovat za velmi hodnotnou aktuální informaci. Nález upozorňuje na vhodné zařazení infuzního roztoku s obsahem alanylglutaminu (Dipeptiven) do AIO vaků, ve kterých se tato látka není obsažena, také informuje o mírně přebytném množství podaného glycinu. [12]

V posledních dvaceti letech je problematice močových ztrát aminokyselin v průběhu jejich nitrožilního podání věnována jen malá pozornost. Práce věnující se jejich ztrátám při DPV v tomto období zcela chybí. Srovnatelný výzkum byl proveden v roce 1974 (Francois G, Moisan G, Pedrant G. Study of the elimination of amino acids in the urine during parenteral feeding with a complete food, trvemil (EB51). *Annales de Anesthesiologie Francaise* 15 (2), pp. 123-127). V této studii byl při parenterální výživě s obsahem 60 g AMK/den zjištěn jejich odpad v moči v rozsahu 1–10 % (0,6–6,0 g).

V naší studii byl během podání parenterální výživy s průměrnou délkou podání 12hod a při průměrné denní dávce 1,6g AMK/kg váhy zjištěn průměrný odpad všech AMK v moči ve výši 393 mg, což odpovídá 0,4 % z celkové podané dávky AMK. Ztráty v rozmezí 1–3 % z podané dávky AMK se objevily pouze u tyrozinu, glycinu, histidinu a cystinu, přičemž v případě glycinu a histidinu je tento jev běžnou záležitostí. Tyto dvě AMK jsou totiž vůbec nejvíce filtrovány přes nefrony, a navíc je jejich reabsorpce menší než u ostatních AMK. Vzhledem k tomuto zjištění můžeme konstatovat, že kvalita substituce živin pro pacienty na domácí parenterální výživě je podstatně vyšší, než tomu bylo v 80. letech minulého století. <sup>[48]</sup>

Další cenou informací pro nutriční specialisty ohledně optimální rychlosti podání infúze jsme přinesli objasněním rozdílu ve ztrátách jednotlivých AMK do moče v době podání PV a mimo tuto dobu. V době mimo podání PV odpovídaly průměrné odpady všech jednotlivých AMK hodnotám kontrolního souboru. Dále se ukázalo, že odpad všech jednotlivých AMK při podání PV je signifikantně větší než mimo dobu podání výživy. Avšak jelikož průměrný odpad všech AMK (hromadně) v moči při podání PV byl jen o 227 mg větší než jejich průměrný odpad mimo dobu podání živin, je patrné, že rychlost přívodu nutriční směsi do krevního řečiště je téměř optimální. Nejvíce se do moče ztrácel glycin a histidin. Glycin se ovšem oproti hodnotě souboru zdravých lidí svou koncentrací v průměru lišil o necelých 100 mg, histidin pouze o 61 mg. Jak již bylo zmíněno, zvýšené ztráty těchto dvou AMK souvisí s jejich nadměrnou filtrací a menší reabsorpcí, v případě glycinu také s jeho lehce zvýšenou sérovou koncentrací. Tímto nálezem tedy poukazujeme na to, že během podání AIO vaků se v moči objevují zvýšené ztráty především glycinu a histidinu. Vzhledem k tomu, že se jedná o neesenciální AMK a že jejich koncentrace v moči nebyla ani o 100 mg větší než u zdravých osob, považujeme toto zjištění za klinicky nevýznamné. Naopak by se dalo spekulovat o mírném zkrácení doby podání živin, které by nemělo žádné negativní dopady, pouze by pacientům (zvláště těm kteří mají k dispozici pouze stacionární pumpu) usnadnilo každodenní aplikaci nitrožilní výživy. <sup>[48]</sup>

V obou analyzovaných vzorcích se objevily poměrně vysoké koncentrace taurinu, glutaminu a ornitinu, jejichž podané množství bylo minimální. V séru a moči byly zastoupeny také kys.  $\alpha$ -amino máselná a citrulin, které nebyly součástí infuzních roztoků vůbec. Tento jev svědčí o tom, že v moči jsou zastoupeny také některé metabolity AMK. V případě glutaminu je to důkaz, že si tělo dokáže neesenciální AMK samo syntetizovat.

## 7 ZÁVĚR

Cílem naší studie bylo prověřit, zda je pro pacienty dlouhodobě závislé na parenterální výživě denní dávka a rychlost podání jednotlivých aminokyselin optimální. Našeho cíle jsme dosáhli stanovením sérového profilu jednotlivých aminokyselin a jejich ztrát do moče u 36 pacientů a následným srovnáním těchto hodnot s odpovídajícími hodnotami 20 zdravých osob.

Vzhledem k tomu, že koncentrace všech esenciálních aminokyselin v séru pacientů odpovídala hodnotám kontrolního souboru, můžeme konstatovat, že prostřednictvím AIO vaků lze dnes téměř plnohodnotně nahradit přirozený příjem aminokyselin. Tento pozitivní poznatek jistě souvisí s individuálním pohledem na potřeby konkrétních pacientů, jak tomu bylo u všech pacientů našeho souboru.

Z hlediska neesenciálních AMK se už ale drobné odchylky ukázaly. Za největší objevený nedostatek považujeme lehce sníženou sérovou koncentraci glutaminu (o 17 %) a navrhujeme přidání jeho ve vodě rozpustného derivátu (alanylglutaminu) do AIO vaků, ve kterých tato aminokyselina chybí. Druhou aminokyselinou, jejíž sérová koncentrace se také signifikantně odlišovala od ideálu, se ukázal být glycin, který tuto hodnotu převyšoval v průměru o 197  $\mu\text{mol/L}$  (o 73 %). Tuto nuanci lze považovat za klinicky nevýznamnou.

Rychlost aplikace PV se v našem souboru pacientů jevila optimální. Při nitrožilním podání výživy byla totiž i v případě glycinu ztráta v moči jen o necelých 100 mg větší než u zdravých osob. V moči, vyloučené mimo dobu aplikace infúze, odpovídaly ztráty všech AMK ztrátám osob kontrolního souboru.

Jelikož se ukázalo, že profil AMK v séru je téměř optimální a v době aplikace PV se do moče průměrně ztrácí jen 0,4 % z podaných AMK, dalo by se spekulovat o zkrácení doby podání parenterální výživy, které by nemělo žádné negativní dopady. Naopak by usnadnilo každodenní podávání PV a zlepšilo kvalitu života pacientů, zvláště těch, kteří mají k dispozici pouze stacionární pumpu.

Celkově naše práce přinesla další poznatky ohledně složení a rychlosti podání parenterální výživy, která je pro pacienty se selháním střeva majoritním zdrojem příjmu živin. Prověření optimálního množství jednotlivých aminokyselin, jakožto důležitých složek výživy, je obzvláště z dlouhodobého hlediska důležitým kontrolním parametrem a může vést ke zdokonalování náhrady živin. Výzkum v brněnské fakultní nemocnici bude pokračovat i nadále.



## SEZNAM ZKRATEK

DPV	domácí parenterální výživa
PV	parenterální výživa
AMK	aminokyseliny
pI	izoelektrický bod
pKa	záporný dekadický logaritmus disociační konstanty kyseliny
BCAA	rozvětvená aminokyseliny (z angl. branched-chain amino acids)
CNS	centrální nervová soustava
NAD	nikotinamidadenin dinukleotid
NADP	nikotinamidadenin dinukleotidfosfát
ATP	adenosin trifosfát
acetyl-CoA	acetylkoenzym A
GABA	kys. $\gamma$ -amino máselná (z angl. gamma amino butyric acid)
VLI	valin, leucin, izoleucin
GIT	gastrointestinální trakt
IF	selhání střeva (z angl. intestinal failure)
SBS	syndrom krátkého střeva (z angl. short bowel syndrome)
CD	Crohnova nemoc (z angl. Crohn disease)
AIO	forma podání parenterální výživy, kdy jsou všechny živiny obsaženy v jednom vaku (z angl. all-in-one)
JIP	jednotka intenzivní péče
PICC	periferně zavedený centrální katétr (z angl. peripherally inserted central catheter)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z angl. high performance liquid chromatography)
Epp	Eppendorf
LiOH	hydroxid lithný
IST	interní standard (z angl. internal standard)

## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: Primární struktura proteinogenních aminokyselin.....	9
Obr. 2: Schéma peptidové vazby.....	11
Obr. 3: strukturní vzorec glycinu.....	13
Obr. 4: alanin.....	13
Obr. 5: valin.....	13
Obr. 6: leucin.....	13
Obr. 7: izoleucin.....	13
Obr. 8: fenylalanin.....	14
Obr. 9: tyrozin.....	14
Obr. 10: tryptofan.....	14
Obr. 11: prolin.....	14
Obr. 12: methionin.....	15
Obr. 13: Schéma reakce dvou molekul cysteinu za vzniku cystinu.....	15
Obr. 14: serin.....	15
Obr. 15: threonin.....	16
Obr. 16: kys. glutamová.....	17
Obr. 17: glutamin.....	17
Obr. 18: asparagová kyselina.....	17
Obr. 19: asparagin.....	17
Obr. 20: histidin.....	18
Obr. 21: arginin.....	18
Obr. 22: lysin.....	18
Obr. 23: Broviacův katétr.....	24
Obr. 24: Intravenózní port, na který je Huberovou jehlou napojena infuze.....	24
Obr. 25: PICC napojený do axilární žíly.....	24
Obr. 26: Eppendorf mikrokumavka, Vialka (2 ml) + víčko a septum.....	32
Obr. 27: Fotografie analyzátoru SYKAM S-433.....	34
Obr. 28: Schéma toku reagentů a analytu v analyzátoru SYKAM S-433.....	34
Obr. 29: Schéma fotometru v reakčním modulu.....	35
Obr. 30: Separační katexová kolona LCA K19/Li 4,6 x 210 mm.....	35
Obr. 31: Chromatogram vzorku séra vytvořený programem Aminoacid Calrity.....	36
Obr. 32: Chromatogram vzorku moči, kde byly některé AMK příliš koncentrované + přiřazení jednotlivých pufřů k barevnému schématu gradientové eluce v pozadí grafu.....	37
Obr. 33: Chromatogram po zředění příliš koncentrovaného vzorku.....	38

## SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Rozdělení AMK dle vlastností jejich postranního řetězce .....	9
Tabulka 2: Disociační konstanty jednotlivých disociačních skupin AMK, vyjádřené jako záporný dekadický logaritmus disociační konstanty kyseliny (pKa) .....	10
Tabulka 3: Demografické údaje sledovaného souboru pacientů .....	29
Tabulka 4: Infuzní roztoky aminokyselin použité při tvorbě AIO vaků podávaných pacientům na DPV a jejich výrobci .....	30
Tabulka 5: Množství jednotlivých aminokyselin v roztocích, použitých při tvorbě AIO vaků pro pacienty na DPV, vyjádřené jako g/L .....	31
Tabulka 6: použité reagenty .....	35
Tabulka 7: Roztřídění jednotlivých aminokyselin dle jejich procentuálních ztrát v moči z podané dávky do tří skupin: méně než 0,5%, mezi 0,5–1,0% a větší než 1% z podané dávky .....	44
Tabulka 8: Průměrné odpady všech AMK v moči během podání PV a mimo dobu podání PV vyjádřené v mg, v % z podané dávky a v mg/hod. ....	44

## POUŽITÁ LITERATURA

- [1] BENEŠOVÁ, Marika, Erna PFEIFEROVÁ a Hana SATRAPOVÁ. *Odmaturuj! z chemie*. 2., přeprac. vyd. Brno: Didaktis, c2014. Odmaturuj! ISBN 978-80-7358-232-6.
- [2] Microsoft Word - 08-AK.doc. *Is.muni.cz* [online]. Brno, 2020 [cit. 2020-09-12]. Dostupné z: [https://is.muni.cz/el/med/podzim2012/BLKLC011p/um/AK\\_struktury\\_2012.pdf](https://is.muni.cz/el/med/podzim2012/BLKLC011p/um/AK_struktury_2012.pdf)
- [3] Arginin - WikiSkripta. *Wikiskripta.eu* [online]. Praha, 2020 [cit. 2020-09-21]. Dostupné z: <https://www.wikiskripta.eu/w/Arginin>
- [4] Biochemie: Bílkoviny - MojeChemie. *Mojechemie.cz* [online]. 2011 [cit. 2020-09-25]. Dostupné z: <https://www.mojechemie.cz/Biochemie:B%C3%ADlkoviny>
- [5] A. *Is.muni.cz* [online]. Brno, 2020 [cit. 2020-09-25]. Dostupné z: [https://is.muni.cz/el/1431/jaro2015/C4200/um/54195291/Skripta\\_seminar\\_1\\_R2011.pdf](https://is.muni.cz/el/1431/jaro2015/C4200/um/54195291/Skripta_seminar_1_R2011.pdf)
- [6] Kompletní skripta 2008.rtf. *Prf.upol.cz* [online]. Olomouc, c2020 [cit. 2020-09-28]. Dostupné z: [https://www.prf.upol.cz/fileadmin/userdata/PrF/katedry/biochemie/Dokumenty/Materialy\\_k\\_vyuce/KBC-BCHC\\_Pec\\_skripta2008.pdf](https://www.prf.upol.cz/fileadmin/userdata/PrF/katedry/biochemie/Dokumenty/Materialy_k_vyuce/KBC-BCHC_Pec_skripta2008.pdf)
- [7] *Porovnání konzervačních postupů pro archeologické usně* [online]. Brno, 2016 [cit. 2020-09-28]. Dostupné z: [https://is.muni.cz/th/fk4q4/diplomka\\_-\\_konec.txt](https://is.muni.cz/th/fk4q4/diplomka_-_konec.txt). Diplomová práce. MASARYKOVA UNIVERZITA Přírodovědecká fakulta, Ústav experimentální biologie, Oddělení genetiky a molekulární biologie.
- [8] Metabolismus proteinů a aminokyselin. *Is.muni.cz* [online]. Brno, 2020 [cit. 2020-10-13]. Dostupné z: [https://is.muni.cz/el/1411/jaro2016/BLKBC0211p/um/Metabolismus\\_proteinu\\_a\\_aminokyselin\\_16.pdf](https://is.muni.cz/el/1411/jaro2016/BLKBC0211p/um/Metabolismus_proteinu_a_aminokyselin_16.pdf)
- [9] Cs.wikipedia.org. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2020-10-13]. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Purin>
- [10] Pyrimidiny. *Wikiskripta.eu* [online]. Praha, 2020 [cit. 2020-10-13]. Dostupné z: <https://www.wikiskripta.eu/w/Pyrimidiny>
- [11] NAVRÁTILOVÁ, Miroslava, Luboš SOBOTKA a Eva ČEŠKOVÁ. *Klinická výživa v psychiatrii: teoretické předpoklady, praktická doporučení, osobní zkušenosti*. Praha: Maxdorf, 2000. ISBN 80-859-1233-3.
- [12] ZADÁK, Zdeněk. *Výživa v intenzivní péči*. Praha: Grada, 2002. ISBN 80-247-0320-3.

- [13] Aminokyselina. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2020-10-20]. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Aminokyselina>
- [14] ARNDT, Tomáš. Celostnimedicina.cz. *Https://www.celostnimedicina.cz/* [online]. Chrudim, 2018 [cit. 2020-10-21]. Dostupné z: <https://www.celostnimedicina.cz/glycin.htm>
- [15] Glutathion - Wikiskripta. *Wikiskripta.eu* [online]. Praha, 2020 [cit. 2020-10-21]. Dostupné z: <https://www.wikiskripta.eu/w/Glutathion>
- [16] Přeměny aminokyselin. *Is.muni.cz* [online]. Brno, 2020 [cit. 2020-10-28]. Dostupné z: [https://is.muni.cz/el/med/jaro2012/BLKBC0211p/um/AK-reakce\\_2012.pdf](https://is.muni.cz/el/med/jaro2012/BLKBC0211p/um/AK-reakce_2012.pdf)
- [17] Kyselina pyrohroznová - Wikipedie. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2020-10-28]. Dostupné z: [https://cs.wikipedia.org/wiki/Kyselina\\_pyrohroznov%C3%A1](https://cs.wikipedia.org/wiki/Kyselina_pyrohroznov%C3%A1)
- [18] JIŘÍČKOVÁ, Kamila. *Větvené aminokyseliny ve zdraví a nemoci* [online]. Brno, 2013 [cit. 2020-10-30]. Dostupné z: [https://is.muni.cz/th/k57vm/BP\\_Vetvene\\_aminokyseliny\\_ve\\_zdravi\\_a\\_nemoci.pdf](https://is.muni.cz/th/k57vm/BP_Vetvene_aminokyseliny_ve_zdravi_a_nemoci.pdf). Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Lékařská fakulta.
- [19] Co jsou BCAA? | Zdraví a fitness. *Zdraviafitness.cz* [online]. [cit. 2020-10-30]. Dostupné z: <https://www.zdraviafitness.cz/blog/co-jsou-bcaa-a-jejich-pouiti>
- [20] Fenylketonurie - WikiSkripta. *Wikiskripta.eu* [online]. Praha, 2020 [cit. 2020-10-30]. Dostupné z: <https://www.wikiskripta.eu/w/Fenylketonurie>
- [21] NADH, NADPH - WikiSkripta. *Wikiskripta.eu* [online]. Praha, 2020 [cit. 2020-11-03]. Dostupné z: [https://www.wikiskripta.eu/w/NADH,\\_NADPH](https://www.wikiskripta.eu/w/NADH,_NADPH)
- [22] Pelagra - WikiSkripta. *Wikiskripta.eu* [online]. Praha, 2020 [cit. 2020-11-03]. Dostupné z: <https://www.wikiskripta.eu/w/Pelagra>
- [23] Molekula methioninu. In: *Wikiskripta.eu* [online]. Praha, 2020 [cit. 2020-11-06]. Dostupné z: <https://www.wikiskripta.eu/w/Methionin#/media/File:Methionine.png>
- [24] Taurin - WikiSkripta. *Wikiskripta.eu* [online]. Praha, 2020 [cit. 2020-11-07]. Dostupné z: <https://www.wikiskripta.eu/w/Taurin>
- [25] Prolin - WikiSkripta. *Wikiskripta.eu* [online]. Praha, 2020 [cit. 2020-11-07]. Dostupné z: <https://www.wikiskripta.eu/w/Prolin>
- [26] *Lékařská chemie a biochemie: celostátní vysokoškolská učebnice pro studium lékařských fakult v ČSFR, studijní obor všeobecné lékařství, dětské lékařství a hygiena*. Praha: Avicenum, 1991. Učebnice pro lékařské fakulty. ISBN 80-201-0114-4.

- [27] Acetyl-CoA - WikiSkripta. *Wikiskripta.eu* [online]. Praha, 2020 [cit. 2020-11-11]. Dostupné z: <https://www.wikiskripta.eu/w/Acetyl-CoA>
- [28] Asparagin - Wikipedie. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2020-11-14]. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Asparagin>
- [29] Lyzin - WikiSkripta. *Wikiskripta.eu* [online]. Praha, 2020 [cit. 2020-11]. Dostupné z: <https://www.wikiskripta.eu/w/Lyzin>
- [30] DASTYCH, Milan. *Instrumentální technika: obor zdravotní laborant*. Brno: Masarykova univerzita, 2007. ISBN 978-80-210-4226-1.
- [31] High Performance Liquid Chromatography HPLC- UV-VIS Detector Animation. *YouTube* [online]. [cit. 2020-12-21]. Dostupné z: <https://www.youtube.com/watch?v=eCj0cRtJvJg>
- [32] ASA\_Web.pdf. *Sykam.com* [online]. [cit. 2020-12-25]. Dostupné z: [https://sykam.com/wp-content/uploads/ASA\\_Web.pdf](https://sykam.com/wp-content/uploads/ASA_Web.pdf)
- [33] Introduction to HPLC - Lecture 1: HPLC Basics. *Youtube.com* [online]. [cit. 2020-12-25]. Dostupné z: <https://www.youtube.com/watch?v=td7rovVi168>
- [34] Kreatinin - WikiSkripta. *Wikiskripta.eu* [online]. Praha [cit. 2020-12-28]. Dostupné z: [https://www.wikiskripta.eu/w/Kreatinin#Kreatinin\\_v\\_mo.C4.8Di](https://www.wikiskripta.eu/w/Kreatinin#Kreatinin_v_mo.C4.8Di)
- [35] MAŘATKA, Zdeněk. *Gastroenterologie*. V Praze: Karolinum, 1999. ISBN 80-718-4561-2.
- [36] Zánět granulomatózní - WikiSkripta. *Wikiskripta.eu* [online]. Praha [cit. 2021-01-04]. Dostupné z: [https://www.wikiskripta.eu/w/Z%C3%A1n%C4%9Bt\\_granulomat%C3%B3zn%C3%AD](https://www.wikiskripta.eu/w/Z%C3%A1n%C4%9Bt_granulomat%C3%B3zn%C3%AD)
- [37] *Idiopatické střevní záněty*. Praha: Mladá fronta, 2018. Aeskulap. ISBN 978-80-204-4720-3.
- [38] Crohnova choroba - WikiSkripta. *Wikiskripta.eu* [online]. Praha [cit. 2021-01-05]. Dostupné z: [https://www.wikiskripta.eu/w/Crohnova\\_choroba](https://www.wikiskripta.eu/w/Crohnova_choroba)
- [39] OLIVERIUS, Martin a Pavel KOHOUT. *Selhání střeva a transplantace tenkého střeva*. Praha: Mladá fronta, 2017. Edice postgraduální medicíny. ISBN 978-80-204-4088-4.
- [40] Centra domácí parenterální výživy - SKVIMP. *Skvimp.cz* [online]. [cit. 2021-01-18]. Dostupné z: <http://www.skvimp.cz/pracovni-skupiny/domaci-parentalni-vyziva/centra-domaci-parentalni-vyzivy/>

- [41] Stanley Dudrick - Wikipedia. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2021-01-18]. Dostupné z: [https://en.wikipedia.org/wiki/Stanley\\_Dudrick](https://en.wikipedia.org/wiki/Stanley_Dudrick)
- [42] CHARVÁT, Jiří. *Žilní vstupy: dlouhodobé a střednědobé*. Praha: Grada Publishing, 2016. ISBN 978-80-247-5621-9.
- [43] Parenterální výživa a její aplikace. Jiří Charvát - PDF Free Download. *Docplayer.cz* [online]. [cit. 2021-01-20]. Dostupné z: <http://docplayer.cz/106341670-Parenteralni-vyziva-a-jeji-aplikace-jiri-charvat.html>
- [44] Iacone R, Scanzano C, Santarpia L, Cioffi I, Contaldo F, Pisanisi F. Macronutrients in Parenteral Nutrition: Amino Acids. *Nutrients*. 2020 Mar 14;12(3):772. doi: 10.3390/nu12030772. PMID: 32183395; PMCID: PMC7146427.
- [45] Iacone R, Scanzano C, Santarpia L, Alfonsi L, Marra M, Pagano MC, D'Isanto A, Frangipane I, Vitalone A, D'Angeli M, Contaldo F, Pisanisi F. Essential Amino Acid Profile in Parenteral Nutrition Mixtures: Does It Meet Needs? *Nutrients*. 2018 Dec 6;10(12):1937. doi: 10.3390/nu10121937. PMID: 30563270; PMCID: PMC6316548.
- [46] Scanzano C, Iacone R, Alfonsi L, Galeotalanza MR, Sgambati D, Pastore E, D'Isanto A, Fierro F, Contaldo F, Santarpia L. Composition of personalized and standard nutritional mixtures in patients on home parenteral nutrition. *Eur J Clin Nutr*. 2014 Apr;68(4):433-6. doi: 10.1038/ejcn.2014.10. Epub 2014 Feb 12. PMID: 24518751.
- [47] Funkční morfologie ledvin - WikiSkripta. *Wikiskripta.eu* [online]. Praha [cit. 2021-02-28]. Dostupné z: [https://www.wikiskripta.eu/w/Funk%C4%8Dn%C3%AD\\_morfologie\\_ledvin](https://www.wikiskripta.eu/w/Funk%C4%8Dn%C3%AD_morfologie_ledvin)
- [48] BERARD, M.-P., R. HANKARD a L. CYNOBER. Amino acid metabolism during total parenteral nutrition in healthy volunteers: evaluation of a new amino acid solution. *Clinical Nutrition* [online]. 2001, 20(5), 407-414 [cit. 2021-03-21]. ISSN 02615614. Dostupné z: doi:10.1054/clnu.2001.0466