

# VYŠETŘOVACÍ METODY MIKROCIRKULACE KŮŽE U SYNDROMU DIABETICKÉ NOHY

DISERTAČNÍ PRÁCE

**MUDr. Michal Krčma**, I. interní klinika FN a LF UK Plzeň

Školitel: **Prof. MUDr. Zdeněk Rušavý, Ph.D.**

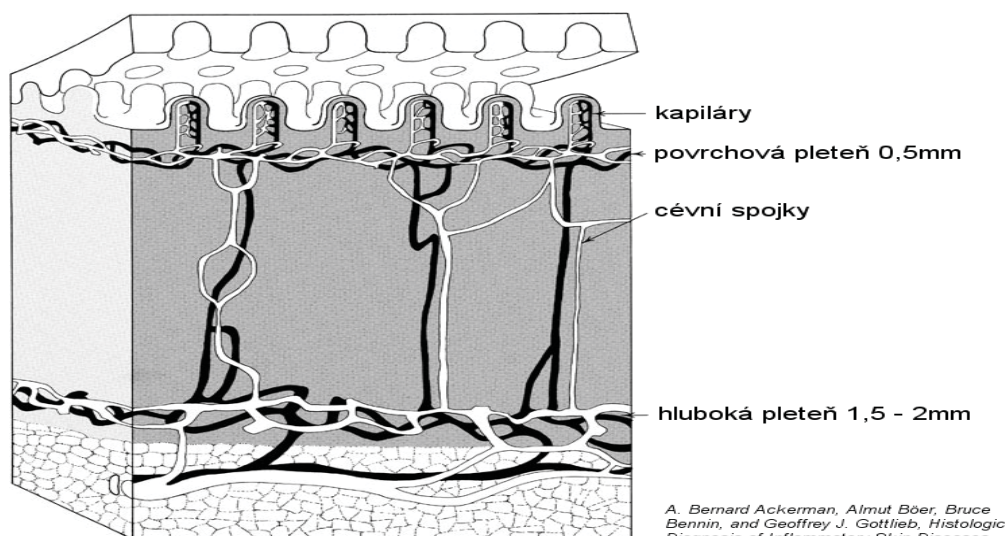
**Lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Plzni, 2010**

## 1. ÚVOD

Samotný pojem mikrocirkulace je překvapivě starý. Již v 17. století, několik desetiletí po objevu krevního oběhu Williamem Harveyem popisuje Marcello Malpighi „vláskovitá“ spojení mezi tepnami a žilami v plicích žab a nazývá je vlasečnicemi (capillaries). V roce 1920 získává Nobelovu cenu August Krogh za objev regulace kapilárního průtoku u kosterního svalu. Souhrnné práce, popisující poškození mikrocirkulace u diabetu mellitu, se objevují od 70. let minulého století a celkové množství publikací roste exponenciálně – v současnosti téměř 3000 článků registrovaných v Medline.

Mikrocirkulace bývá definována jako suma cév o menším průměru než 100 mikrometrů, zahrnuje arterioly, prekapilární svěrače, kapiláry a venuly. Většinu konvenčních vyšetřovacích metod je dostupná kožní mikrocirkulace, jejíž řečiště je uloženo v dermis ve dvou pleteních. První, subpapilární pleteň, se nachází blízko rozhraní epidermis/dermis cca v hloubce 500 mikrometrů pod povrchem kůže a její hlavní funkcí je výživa, druhá, kožní pleteň je uložena v cca 1,5 – 2 mm hloubce. Obě pleteně jsou propojeny spojkami, které zejména v terminálních částech těla (uši, rty, břicha prstů, apod.) plní funkci termoregulačních AV shuntů.

Obr. 1. Schéma kožní mikrocirkulace (Ackerman et al, 2005)



## 2. MIKROCIRKULACE KŮŽE DIABETICKÉHO PACIENTA

U diabetiků – nezávisle na typu diabetu – dochází ke zvýšení celkového kožního průtoku, zároveň je snížen průtok nutritivními kapilárami ve srovnání se zdravými osobami (Flynn et al.). U diabetické neuropatie je i klinicky končetina teplejší, pletysmograficky jsou známky vyšší perfúze. Tato skutečnost je doložena řadou prací – např. Netten et al. zjistili zvýšený celkový průtok krve kůží u pacientů s diabetickou kardiovaskulární autonomní neuropatií – ( $26,2 \pm 2,2$  PU proti  $16,1 \pm 2,0$  PU u zdravých kontrol), zároveň vyšší počet viditelných kapilár a vyšší rychlost krevních elementů při kapilaroskopii. LDF sonda byla umístěna na bříšku palce, v místě s vysokým počtem AV shuntů. Funkční změny mikrocirkulace pravděpodobně příliš nezávisí na době trvání diabetu - Houben et al. našli zvýšené hodnoty kožní perfúze u pacientů s krátkou dobou trvání diabetu ve srovnání jak se zdravými kontrolami, tak s pacienty s delší dobou trvání diabetu.

V obdobné práci (Stansberry), kde byla měřena perfúze na dorzu nohy, nebyly pozorovány signifikantní změny perfúze za bazálních podmínek, při stimulaci teplotou ( $44^{\circ}\text{C}$ ) došlo u zdravých k nárůstu perfúze, u diabetiků byl tento nárůst statisticky významně nižší. Při porovnání změn perfúze podle věku subjektů byla nalezena vysoce signifikantní nepřímá úměra mezi věkem a nárůstem perfúze u zdravých osob, podobná závislost u diabetiků zjištěna nebyla.

Rozdílům mezi pohlavími se mimo jiné věnuje práce Karnafel et al., kde bylo vyšetřováno 65 pacientů, zdravých dobrovolníků i pacientů s komplikovaným a nekomplikovaným diabetem mellitem. LDF vyšetřením postokluzivní reaktivní hyperémie byla zjištěna nižší hyperémie u diabetiků, čas k dosažení maximální hyperémie byl delší u mužů. Rozdíly mezi zdravými a diabetiky byly nižší u žen, zřejmě vzhledem k protektivnímu účinku estrogenů.

Vztahem inzulinové senzitivity, krevního tlaku a parametrů mikrocirkulace se zabývala práce (Serné et al.), kdy byla u zdravých normotenčních dobrovolníků hyperinzulinemickým

euglykemickým clampem nejprve zjištěna senzitivita k inzulínu. Následně byla měřena perfúze pomocí LDF, vazodilatace indukovaná iontoforézou acetylcholinu a nitroprusidu sodného a kapilaroskopicky denzita kapilár. Vazodilatační odpověď na lokální podání acetylcholinu signifikantně pozitivně korelovala s inzulínovou senzitivitou a statisticky nevýznamně negativně s průměrným systolickým krevním tlakem během předcházející 24-hodinové monitorace. Poměr pas-boky (WHR) signifikantně negativně koreloval s inzulínovou senzitivitou, i vasodilatací způsobenou acetylcholinem.

Stav mikrocirkulace podle některých prací závisí na dlouhodobé kompenzaci diabetu, jeho zhoršení popisuje Jörneskog et al. u pacientů s chronickou dekompenzací diabetu ( $HbA1C < 7,5$ ), postižena především postokluzivní reaktivní hyperémie, kde u diabetiků dochází k prodloužení a snížení amplitudy odpovědi. Po zlepšení kompenzace lze očekávat i pozitivní efekt na cévní řečiště; jak ukazuje Kastrup et al., funkční abnormality mikrocirkulace kůže u diabetiků je možno normalizovat těsnou kompenzací diabetu, na rozdíl od nevratných morfologických změn, které jsou dány ztluštělou bazální membránou kapilár (Williamson et al.), zvýšenou tuhostí prekapilárních cévních stěn způsobenou zvýšenou glykosylací proteinů a tvorbou pozdních produktů glykace (Mullarkey et al.). Podobné výsledky ukazují i práce Le Devehat et al., kde u pacientů s chronickou dekompenzací diabetu byly zjištěny změny v kapilárním řečišti; po zahájení inzulínové terapie došlo k regresi těchto změn.

Lokální mikrovaskulární regulaci narušuje i endoteliální dysfunkce (Furchgott, Stehouwer et al.). U diabetiků je též postižena periferní vasomoce (spontánní rytmická oscilace průměru arteriol a venul kolem střední hodnoty, jejíž fyziologický účel je zatím nejasný, předpokládá se podíl na řízení průtoku krve kapilárami). Ztráta těchto nízkofrekvenčních a snížení amplitudy vasomoce koreluje se ztrátou tenké myelinizovaných C vláken (Stansberry et al.). Poruchy vasomoce u diabetiků popisuje i práce (Meyer et al.), kde u diabetiků 1. typu negativně koreluje hladina glykovaného hemoglobinu s amplitudou vasomoce (v pásmu 5-8

Hz). Amplituda vasomoce byla přímo úměrná výši systolického i diastolického krevního tlaku. U diabetiků 2. typu nebyla pozorována signifikantní korelace.

Porucha mikrocirkulace souvisí s neuropatickým postižením, což demonstruje i studie (Walewski), která zkoumala mikrocirkulaci u diabetiků 1. typu bez známek syndromu diabetické nohy, rozdělených do dvou skupin podle přítomnosti periferní neuropatie. Měřené parametry (klidová perfúze, odpověď na zahřátí, postokluzivní hyperémie) vykazovaly signifikantní změny u pacientů s neuropatií, kde byla prodloužená a nižší maximální postokluzivní hyperémie a nižší reaktivita na lokální zahřátí.

Ve výše zmíněných studiích byla ke sledování mikrocirkulace použita především laserová dopplerometrie, výhodná je kombinace s transkutánní oximetrií, jejíž výsledky korelují se změnami v nutritivní části řečiště. Práce (Zimny) porovnávala hodnoty tcpO<sub>2</sub> (vleže) u pacientů s diabetem 2. typu s neuropatií, ale bez známek syndromu diabetické nohy ( $6,04 \pm 0,52$  kPa), s diabetiky bez neuropatie ( $7,14 \pm 0,43$  kPa) a zdravými kontrolami ( $8,10 \pm 0,44$  kPa). Bylo zjištěno signifikantní snížení parciálního tlaku kyslíku u pacientů s neuropatií na rozdíl od předchozích dvou skupin; odchylky byly největší v leže. Rozdíl výsledků vleže/vsedě je výrazně vyšší u diabetiků s neuropatií.

Využití LDF k predikci vzniku syndromu diabetické nohy bylo předmětem studie (Cobb), kde byly výsledkem signifikantně nižší hodnoty LDF u pacientů dosud bez defektů, ale s cévními komplikacemi nebo neuropatií (Cobb). Negativní výsledky přinesla práce Lawal et al., kde bylo 78 pacientů se syndromem diabetické nohy vyšetřeno videokapilaroskopicky, byl změřen transkutánní tlak i LDF. Pacienti byli rozděleni do 3 skupin podle etiologie – neuropatické, cévní a smíšené. Nebyly zaznamenány významné rozdíly ani v jedné z použitých metod. Dalším výstupem této práce je zjištění, že měření tcpO<sub>2</sub> při teplotě sondy 37°C není dostatečně reprodukovatelné, je nutno měřit při 44°C.

TcpO<sub>2</sub> se častěji používá k posouzení hojení defektů u diabetiků, dosud publikované práce většinou stanovují jako cut-of hranici pro pravděpodobné hojení defektů 30mmHg. Dosud nepublikovaná práce (Sheffield, Bakken) ukazuje význam provokačního testu s dýcháním čistého kyslíku – pacienti, kteří dosáhli dvojnásobné hodnoty tcpO<sub>2</sub> ve srovnání s klidovými podmínkami, měli statisticky výrazně lepší prognózu.

Zajímavým vylepšením výše uváděných metod k diagnostice souvislostí neuropatie a angiopatie je použití iontoforézy. Práce (Arora et al.) porovnávala reakci perfúze na zahřátí a na lokální aplikaci acetylcholinu (působí vazodilataci přes C-vlákna) a nitroprusidu sodného (působí přímo na endotel) pomocí iontoforézy. Pacienti byli rozděleni do 3 skupin – diabetici (1. i 2. typu) s periferní neuropatií, diabetici (1. i 2. typu) bez neuropatie a zdravé kontroly. U pacientů s neuropatií došlo k výrazně nižšímu zvýšení perfúze po zahřátí (44°C, 20min) na předloktí i na noze ve srovnání se zdravými kontrolami i diabetiky bez neuropatie, mezi kterými nebyly statisticky významné rozdíly. U zdravých dobrovolníků byla reakce na podání acetylcholinu i nitroprusidu menší na noze než na předloktí, u pacientů s neuropatií rozdíl zachován (při snížených obou hodnotách). Nepřímá vasodilatace při použití acetylcholinu (měřená na rozdíl od přímé LDF sondou v blízkosti iontoforetické komůrky – cca 5mm) byla výrazně snižena u neuropatií, částečně snižena i u diabetiků bez neuropatie. Podobné výsledky ukazuje i práce Morris et al.

Vlivem oxidu dusného a prostaglandinů na krevní průtok se zabývala práce (Kvandal et al.), kdy byla u zdravých dobrovolníků měřena laser-dopplerometricky perfúze při iontoforéze acetylcholinu a nitroprusidu. Zároveň byla provedena frekvenční analýza výsledků. Výsledky ukázaly, že kožní perfúze za bazálních podmínek je částečně ovlivňována přes NO, neprokázala ovlivňování cestou endogenních prostaglandinů.

Odpověď na iontoforézu acetylcholinu byla statisticky významně vyšší než u nitroprusidu a deionizované vody, použité jako placebo (Hamdy et al.). U zdravých kontrol a diabetiků bez

Michal Krčma, Vyšetřovací metody mikrocirkulace u syndromu diabetické nohy, 2010

neuropatie je podíl vasodilatace indukované acetylcholinem cestou neuroaxonální odpovědi zhruba 1/3 z celkové. U diabetiků s neuropatií je významně nižší.

### 3. VLIV INZULÍNU NA PARAMETRY MIKROCIRKULACE

V posledních několika desetiletích se nachází mnoho důkazů o pozitivním vlivu inzulínu na prognózu pacientů v těžkém stavu, není zatím zcela jasné, zda se jedná přímo o efekt inzulínu nebo zda je příčinou normoglykémie (VanDenBerghe, Malmberg). Efekt inzulínu na mikrocirkulaci a tím na vznik nebo progresi pozdních komplikací diabetu je předmětem řady publikovaných prací.

V experimentu na zvířeti bylo pozorováno (Biessels), že léčba inzulínem (1 měsíc) u diabetických potkanů zlepšila prokrvení nervu (n. ischiadicus) měřeného pomocí LDF; zároveň došlo k signifikantnímu zlepšení vodivosti motorickými i senzorickými vlákny.

Vliv inzulínu podávaného intraarteriálně na hemodynamiku (Ueda) byl předmětem studie, kdy za podmínek dvojité slepé studie byl zdravým mužům aplikován lokálně krátce působící inzulín do brachiální artérie rychlostí 1 a 5 mU/min po dobu 90 minut. Pletysmograficky byl měřen krevní průtok. Vyšší dávka inzulínu způsobila ve srovnání s placebem statisticky významnou vasodilataci (20%). Podání inzulínu + L-glukózy (metabolicky neaktivní stereoizomer) nezpůsobilo zvýšení vasodilatace proti samotnému inzulínu, aplikace inzulínu + D-glukózy vyvolalo vyšší zvýšení perfúze v porovnání se samotným inzulínem (47% proti placebo). Infúze glukózy sama o sobě neměla za následek signifikantní změny v průtoku krve. Tooke et al. zkoumal efekt inzulínu u diabetiků 1. typu při použití dvou různých rychlostí infúze (1,5u/h, 15u/h), při nižší dávce inzulínu vzestup průtoku, při vyšší pokles (LDF), kapilaroskopicky průtok roste i při vyšší dávce. Hyperinzulinémie zřejmě vede k redistribuci průtoku ve prospěch nutritivních kapilár. Nezávislý efekt (od hormonální aktivity) na mikrocirkulaci. Inzulín působí vazodilataci kožních kapilár - měřeno LDF, kapilaroskopií, reaktivní hyperémie po 60s arteriální (200mmHg) a 30s venózní (50mmHg) okluze. V jiné práci (Utriainen et al.), kde probíhalo měření u zdravých dobrovolníků během



hyperinzulinemického euglykemického clampu s třemi postupně narůstajícími hladinami inzulinémie ( $61 \pm 2$ ,  $139 \pm 6$ ,  $462 \pm 15$  mU/l), byl zaznamenán nárůst perfúze měřený pletysmograficky, došlo k statisticky nevýznamným změnám kožního průtoku měřeného LDF. Zároveň byla měřena arteriovenózní diference glukózy, která dosáhla maximální hodnoty při nejnižší inzulinémii ( $61 \pm 2$  mU/l), dále byla konstantní.

Při kontinuálním podkožním podávání inzulinu (CSII) dochází během 9 dnů k redistribuci kožní perfúze ve smyslu zvýšení rychlosti kapilárního průtoku a poklesu obsahu kyslíku ve venózní krvi, což naznačuje částečný uzávěr arteriovenózních spojek (Tymms et al.).

Problém, zda pozitivní efekt inzulinu na perfúzi je způsoben zvýšenou utilizací glukózy nebo jestli se jedná o samostatné působení inzulinu jako takového není zatím uspokojivě vyřešen. Pomocí by mohlo být využití lokální aplikace pomocí iontoforézy. Serne et al. popisuje efekt lokálně podávaného inzulinu pomocí iontoforézy u zdravých dobrovolníků. Měření probíhalo během hyperinzulinemického euglykemického clampu a místní podání inzulinu pomocí katodové iontoforézy způsobilo rychlý nárůst kožní perfúze (z  $33,2 \pm 7,9$  na  $59,7 \pm 26,7$  PU) ve srovnání s nižší reakcí u kontrolní skupiny (z  $35,0 \pm 13,5$  na  $46,7 \pm 20,4$  PU). Na rozdíl od hyperinzulinémie nemělo lokální podání inzulinu systémové účinky (nedošlo k signifikantnímu zvýšení celkové perfúze končetiny, měřené pletysmograficky).

Přínosem pro léčbu pozdních komplikací diabetu mohou být i následující práce shrnující výsledky při použití jiných farmak.

Sulodexid (Vessel Due F) v kombinaci s inzulinem po 10 týdenní léčbě zvyšuje procento zhojení defektů u pacientů s diabetickou neuropatií (Koblik) a zkracuje dobu hojení (92% zhojených defektů, průměrně 46,4 dnů hojení) ve srovnání s léčbou samotným inzulinem (83% zhojených defektů, průměrně 63,0 dnů hojení). Pozorovány signifikantní známky zlepšení postokluzivní reaktivní hyperémie (LDF). V podobné studii se sulodexidem, do které

byli zařazeni pacienti s těžkými nekrotickými defekty DK u syndromu diabetické nohy (Svetukhin) byl zaznamenán pokles hladiny fibrinogenu v periferní krvi, snížení průtoku AV shunty a zlepšení kapilárního průtoku a tkáňové oxygenace dle LDF a tcpO<sub>2</sub>. Sulodexid zatím není běžně indikovanou podpůrnou léčbou u syndromu diabetické nohy.

Po 4 týdny trvající lokální léčbě gelovou směsí aescinu a heparinu (Essaven gel) u diabetiků s neuropatií došlo k signifikantnímu poklesu celkové perfúze měřené LDF na DK ve srovnání s placebem (De Sanctis). Změny přetrvávaly 1 týden po ukončení léčby. V podobné studii, trvající 2 týdny, došlo i k nárůstu tcpO<sub>2</sub> (Cesarone).

#### 4. VYŠETŘOVACÍ METODY MIKROCIRKULACE KŮŽE

##### 4.1. Transkutánní oxymetrie (tcpO<sub>2</sub>)

První zkušenosti s měřením obsahu kyslíku v tkáni pocházejí z 80.let 20. století z USA. Narozdíl od běžně používaného měření saturace O<sub>2</sub>, které stanovuje fotometrickou metodou procento hemoglobinu s navázaným kyslíkem z celkového hemoglobinu v krvi, stanovuje tcpO<sub>2</sub> přímo obsah kyslíku difundujícího tkáni do povrchových vrstev kůže. Používá k tomu polarografický princip měření, kdy je sonda těsně přiložena na kůži a elektroda se přes kontaktní roztok přímo dotýká povrchu kůže. Maximální vazodilatace se dosahuje zahřátím na teplotu do 45°C (vyšší teplota nemá za následek výraznější vazodilataci a navíc může být nepříjemná pro pacienta). TcpO<sub>2</sub> lze použít s určitými výhradami jako marker průtoku nutritivními kapilárami (za předpokladu zachování konstantních vnějších podmínek experimentu). V klinické praxi se dnes tcpO<sub>2</sub> rutinně využívá v několika indikacích, dokonce i v ČR je již schválena úhrada pojišťovnou. Z hlediska podiatrie je nejčastější aplikací transkutánní oxymetrie posouzení viability a možnosti zhojení tkání před amputačními výkony, dále posouzení efektu intervence na makrocirkulaci (angioplastika, bypass), event. ke zjištění reaktivity tkání (a tím předpokládané efektivity) hyperbarické oxygenoterapie. Shrneme-li pro praktické využití literární údaje, lze říci, že u viabilní tkáně transkutánní tlak kyslíku převyšuje 30mmHg (40 mmHg), případně při vdechování čistého O<sub>2</sub> klidový tcpO<sub>2</sub> stoupne alespoň na dvojnásobek.

##### 4.2. Přímá kapilaroskopie

Neinvazivní měření pomocí optické mikroskopie, případně spojené s počítačovým vyhodnocením počtu a rychlosti pohybu erytrocytů, je považováno za zlatý standard v hodnocení nutritivního zásobení tkáně. Velkou výhodou je spojení kapilaroskopie s osvětlením tkáně polarizovaným zeleným světlem, přičemž pozorujeme přes filtr s posunutou

rovinou polarizace o 90°. Tím dojde k potlačení odrazů od tkáně ve prospěch odrazů od pohyblivých elementů. Nevýhodou kapilaroskopie je její omezení v praxi hlavně na kapiláry nehtového lůžka a relativní pracnost vyšetření. Kapilaroskopie také nezobrazuje spolehlivě hlubší pleteně.

Fotopletysmografie, metoda která měří absorpci světla procházejícího tkání a na jejím základě relativní perfúzi, má v dnešní době omezené využití.

### **4.3. Laser-doppler flowmetrie (LDF)**

Neinvazivní metoda na principu podobném klasickému ultrazvukovému doppleru. Optickým vláknem je do sondy přiveden laserový paprsek, který je částečně absorbován tkání, zčásti se odráží. Při odrazu od pohybujících se částic (krevní buňky) se mění jeho vlnová délka na základě fázového posunu - Dopplerův princip. Velikost změny a její frekvenční rozložení je přímo úměrné rychlosti pohybujících se částic a jejich počtu. Laserovou dopplerometrií nelze přesně stanovit absolutní velikost průtoku, naměřený frekvenční posun je závislý na vlastnostech tkáně, které se u každého subjektu liší. Výstupem je hodnota perfúze, měřená v PU (perfusion units) - bezrozměrné číslo.

Hloubka měření je závislá na vzdálenosti optických vláken vysílače laserového světla (dále transmitteru, Tx) a přijímače (receiveru, Rx). Čím větší je tato vzdálenost (v anglické literatuře "fiber separation"), tím větší je dosah sondy. Hloubku měření dále ovlivňuje vlnová délka použitého světla (čím větší vlnová délka, tím vyšší dosah a menší přesnost, běžně používané přístroje se pohybují v oboru červeného viditelného světla – cca 600-700 nm) a vlastnosti tkáně (absorbce světla). Běžné sondy mají osovou vzdálenost vláken cca 0,25 mm (průměr optického vlákna 0,125 mm, s ochranným obalem 0,25 mm), což odpovídá hloubce měření perfúze tkání do cca 1,0-2,0 mm. LDF lze tedy považovat za marker lokálního průtoku veškerým cévním řečištěm (arterioly, kapiláry, venuly i arteriovenózní shunty), přičemž se

zkracující se osovou vzdáleností optických vláken a klesajícím objemem oblasti zájmu roste relativní podíl nutritivní perfúze.

Zvláštním typem jsou jednovláknové sondy, kde je kanál pro transmitter a receiver společný. Výhodou je úzký průměr vlákna a jednoduchá manipulace (sterilizace apod.), nevýhodou nemožnost přesně stanovit hloubku zkoumané tkáně (pro některé paprsky je vzdálenost Tx/Rx rovna průměru optického vlákna – cca 0,5 mm, pro některé se limitně blíží 0).

Vzhledem ke skutečnosti, že není možné hodnotit absolutní hodnotu perfúze, používá se celá řada provokačních testů, kdy se měří jimi vyvolané změny v perfúzi tkáně. Mezi nejpoužívanější patří:

- zahřátí na 43-44°C
- okluze – typicky končetiny manžetou tonometru
- iontoforéza – použitím farmak ovlivňujících perfúzi různými mechanismy (viz dále)
- posturální – leg elevation test
- chlad – při měření Raynaudova fenoménu
- elektrická stimulace – stimulace C vláken nízkými proudy

Mezi nejběžnější provokační testy používané na našem pracovišti patří především zahřátí sondy na 44°C, které vede k dilataci kožních kapilár a tím k nárůstu perfúze, dále okluze končetiny manžetou tonometru. V tomto případě je nutné okluzí dosáhnout biologické nuly – tzn. zastavení průtoku kapilárami. Po krátké době trvání okluze (20s – 5 minut) se měří čas, za jak dlouho dosáhne perfúze maxima a hodnota tohoto maxima vztažená k hodnotě perfúze před provedením okluze. Laserová dopplerometrie je relativně technicky náročná vzhledem k vysoké variabilitě měření a velké citlivosti (je nutné omezit rušivé vlivy – vibrace, konstantní teplota v místnosti, klidné, tiché prostředí). I hodnocení je obtížnější vzhledem k interindividuálním rozdílům. LDF se zřejmě proto v klinické praxi zatím používá výjimečně –

v plastické chirurgii k monitoraci perfúze štěpu a v stomatochirurgii k posouzení úspěšnosti replantace zubu. Změnu by mohly přinést nové dimenze hodnocení LDF záznamu, které přinášejí zvláště informace o endoteliálním podílu poruchy mikrocirkulace a zvláště o postižení autonomní inervace cévního řečiště – ať už frekvenční analýza záznamu nebo iontoforéza s použitím acetylcholinu nebo nitroprusidu sodného. Ani pro jednu z uvedených modalit zatím nejsou k dispozici širší klinická data.

#### **4.3.1. Iontoforéza**

Iontoforéza je metoda, která využívá elektrického náboje iontů k urychlení jejich průniku do tkáně (za normálních okolností, bez vlivu elektrického proudu by vstřebávání látek z povrchu kůže trvalo několik desítek hodin). Využívá se dvou elektrod – první, s nábojem stejného znaménka jako má použitý iont, který je touto elektrodou odpuzován a přitahován ke druhé, s nábojem opačného znaménka. Docílí se tak rychlejšího a v čase konstantního vstřebávání zkoumané látky. Pro dobrou porovnatelnost jednotlivých měření a pro zajištění stabilních vlastností tkáně během měření je nutné iontoforézu provádět za konstantní teploty tkáně (např. 32°C). Při zkoumání mikrocirkulace se používají látky působící na cévní řečiště:

- acetylcholin – jako neurotransmitter působí cestou C vláken
- pilokarpin – ovlivňuje endotel cestou NO
- nitroprusid sodný – působí přímo na endotel

Velikost proudu procházejícího tkání se pohybuje mezi 100 – 500 mikroampérů – vyšší proud by aktivoval přímo C-vlákná a tento efekt by zkresloval změnu perfúze způsobenou iontoforézou určité látky. Iontoforéza má i své kontraindikace – především přítomnost implantátů citlivých na elektrické impulsy, jako je kardiostimulátor nebo kardioverter, dále poškození kůže v místě měření (dermatitida, ulcerace) a alergická reakce na použitou látku v

anamnéze. Technické provedení je náročné na přístrojové i personální vybavení, proto využití iontoforézy zůstává vyhrazeno pro výzkumné účely.

#### 4.3.2. Laser Doppler Perfusion Imaging

Laser Doppler Perfusion Imaging je technologie založená na zobrazení perfúze většího okrsku tkáně obdobným principem jako klasická laser doppler flowmetrie, ale za pomoci skenování vzdáleným laserovým paprskem. Výhodou je větší zobrazený region, nevýhodou nemožnost kontinuální monitorace změn perfúze, ale jen získání statického obrázku.

#### 4.3.3. Spektrální analýza vasomoce

Obr. 2. Vasomoce u zdravého pacienta (vlevo) a u pacienta s autonomní neuropatií (vpravo)



Vasomoce je periodická změna tonusu prekapilárních svěračů, nezávislá na tepové frekvenci, jejímž hlavním důvodem existence je pravidelný cévní průtok všemi kapilárami v situaci, kdy z důvodu potřeby organismu není otevřeno 100% kapilár (běžná situace). Dochází k pravidelnému a rytmickému otevírání a uzavírání prekapilárních svěračů, na záznamu laser doppler flowmetrie se projevuje jako oscilace vyšších řádů. Experimentálně byla formulována rozmezí frekvencí, na nichž se podílí různé typy řízení (Kvermno HD et al, Kvandal P et al, Benedicic M et al).

frekvenční rozmezí

0,009 – 0,02 Hz	endoteliální aktivita
0,02 – 0,06 Hz	sympatikus
0,06 – 0,20 Hz	vlastní myogenní aktivita
0,2 – 0,6 Hz	respirační arytmie
0,6 – 1,6 Hz	kardiální aktivita, změny v důsledku tepu

K vyšetření vasomoce je třeba dostatečně dlouhý klidový záznam LDF, ideálně při norm. kožní teplotě. Následně se na naměřená data aplikuje rychlá Fourierova transformace.

#### **4.3.4. Praktické aplikace LDF a transkutánní oxymetrie**

Navzdory stoupajícímu počtu publikací s tématem mikrocirkulace a jejích změn u diabetu není zatím vyšetření výše jmenovanými metodami součástí běžné klinické praxe. Naproti tomu makrocirkulace je vyšetřována a intervenována běžně. Hlavní důvod tohoto rozporu tkví v technické náročnosti vyšetření mikrocirkulace a ve složitosti interpretace výsledků, v neexistenci jednoznačných norem a v neposlední řadě nejsou dostatečně podložena doporučení, jak mikrocirkulaci intervenovat.

Stanovení norem LDF pro jednotlivé věkové skupiny zdravé populace a pro nemocné s diabetem mellitem si vyžádá studie na velkém počtu pacientů, u transkutánní oxymetrie je situace v tomto ohledu jednodušší - za posledních 25 let jsou k dispozici data u více než 4500 pacientů a souvislost mezi transkutánním tlakem kyslíku a predikcí hojení je ověřena (úroveň důkazu B), přestože neexistuje zatím jednoznačná shoda na cut-of hodnotě (30mmHg / 40mmHg).

Slibné výsledky přináší využití laser doppler flowmetrie, především provokačního testu zahřátím, k měření funkční rezervy mikrocirkulace a její změny po intervenci na makrocirkulaci. Zdá se, že zvýšení reaktivity mikrocirkulace také nastává velmi brzy po úpravě životního stylu obézních nemocných s diabetem, dříve než se změní ostatní metabolické parametry; využití LDF jako časného markeru je také předmětem výzkumu.

Léky, které by přímo ovlivňovaly mikrocirkulaci, nejsou zatím klinicky dostatečně ověřené. V malých studiích svůj efekt prokázala některá antitrombotika (sulodexid), antioxidanty (pycnogenol) a nízkomolekulární hepariny. Nově je přikládána velká důležitost polysacharidovému komplexu na endotelu cév, glykocalyxu, jehož poškození vlivem



oxidačního stresu předchází morfologickým změnám kapilár. Infúze hyaluronidázy v experimentu na zvířeti pomáhá restaurovat glycocalyx, předcházet nevratným změnám mikrocirkulace a zlepšuje její reaktivitu. Endoteliální a destičkové (např. becaplermin) růstové faktory, považované za velmi nadějně pro hojení diabetických defektů, většího rozšíření nedosáhly. V posledních letech se věnuje pozornost antagonistům endotelinových receptorů, které se podílejí na vazokonstrikci při inzulínové rezistenci, kdy se aktivita receptorů pro tromboxan A2 zvyšuje díky oxidačnímu stresu.

Laser doppler flowmetrie nalézá využití i ve východní medicíně; v místech, tradičně označovaných za akupunkturální body, lze změřit signifikantně větší průtok mikrocirkulací za bazálních podmínek (Hsiu H, 2007).

## 5. CÍLE VÝZKUMU

- A. Posoudit vliv fyziologické a suprafyziologické inzulinémie na reaktivitu kožní mikrocirkulace u zdravých dobrovolníků.
- B. Určit vliv samotné fyzické aktivity na reaktivitu kožní mikrocirkulace u nemocných v riziku syndromu diabetické nohy.
- C. Stanovit korelaci mezi přítomností kardiovaskulární autonomní neuropatie a jednotlivými komponentami spektrální analýzy laser-doppler flowmetrie (LDF).
- D. Využít vyšetření kožní mikrocirkulace pomocí LDF k posouzení hojení syndromu diabetické nohy.
- E. Zpětnou analýzou získaného souboru dat vytipovat robustní parametr popisující PORH křivku, ve vztahu k vzestupu perfúze po zahřátí

## 6. VLIV FYZIOLOGICKÉ A SUPRAFYZIOLOGICKÉ INZULINÉMIE NA REAKTIVITU KOŽNÍ MIKROCIRKULACE U ZDRAVÝCH DOBROVOLNÍKŮ

### 6.1. Metodika

Mikrocirkulace byla vyšetřována za klidových podmínek a po stimulaci fyziologicky (50 mIU/l) a suprafyziologicky (150 mIU/l) zvýšenou hladinou inzulínu. Vyšetření bylo provedeno u 12-ti neobézních zdravých dobrovolníků, bez anamnézy diabetu u rodičů a sourozenců, bez chronických onemocnění, bez trvalé farmakoterapie s výjimkou kontraceptiv u žen, srovnatelných věkově i podle základních antropometrických i biochemických parametrů (viz níže tabulka č.1). Protokol studie byl schválen etickou komisí Lékařské fakulty UK Plzeň, všichni dobrovolníci byli dopředu podrobně seznámeni s průběhem experimentu a používanými metodami, což stvrdili podpisem informovaného souhlasu. V den předcházející vyšetření zachovávali dobrovolníci běžný režim s vyloučením větší fyzické námahy a excesivní konzumace sacharidů, tuků a alkoholu a s posledním jídlem do 21. hodiny. Během dopoledne následujícího dne byl proveden dvoustupňový hyperinzulinemický clamp s cílovými inzulinémiemi 50 a 150 mIU/l dle zavedené metodiky (DeFronzo), tedy s rychlostmi inzulínu 2,4 U/m<sup>2</sup>/hod a 6,0 U/m<sup>2</sup>/hod. U poloviny subjektů bylo zaměněno pořadí inzulinémií (tzn. nejprve 6,0 U/m<sup>2</sup>/hod a dále 2,4 U/m<sup>2</sup>/hod). Za bazálních podmínek a v obou ustálených stavech byla změřena perfúze pomocí laser-doppler flowmetrie a transkutánní oxymetrie, respirační kvocient a energetický výdej pomocí nepřímé kalorimetrie (V-max Sensormedics, Yorba Linda, CA, USA) podle standardní metodiky (Weir). Byla vypočtena M hodnota každého clampu k posouzení změny inzulinorezistence. Výsledky ve formě mediánu a interkvartilového rozpětí byly zhodnoceny Wilcoxonovým testem.

Tab. č. 1. Charakteristika probandů

	medián (interkvartilové rozpětí), event. N
počet (muži/ženy)	12 (6/6)
věk [roky]	24 (23 – 25)
BMI [kg.m <sup>-2</sup> ]	21,6 (20,7 – 23,7)
obvod pasu [cm]	74,5 (66,3 – 80,0)
lrevní tlak [mmHg]	113/75 (107/66 – 117/80)
lačná glykémie [mmol/l]	4,7 (4,6 – 5,3)
sérové triglyceridy [mmol/l]	0,8 (0,7 – 0,9)
HDL cholesterol [mmol/l]	1,4 (1,1 – 1,6)
LDL cholesterol [mmol/l]	2,5 (2,3 – 3,1)
fibrinogen [mmol/l]	2,3 (2,2 – 2,5)

#### *Laser-doppler flowmetrie*

Kožní perfúze byla vyšetřena za bazálních podmínek před clampem a v ustáleném stavu při obou hladinách inzulínu. Byl použit systém Periflux 5000 (Perimed, Švédsko) se sondou PF 5010 emitující laserové světlo o frekvenci 780nm a výkonu 1mW. Sonda byla přiložena na dorzum nedominantní nohy a měření bylo provedeno u všech subjektů při stabilní teplotě 33°C. Následně byly použity provokační testy (Muller) – zahřátí (zahřátí sondy na 44°C mající za následek maximální vazodilataci) a okluze (3 minutová okluze končetiny manžetou tonometru nafouknutou na tlak o 30mmHg vyšší než systolický krevní tlak), kdy byl měřen čas do dosažení maximálního prokrvení po uvolnění okluze. Tyto provokační testy jsou standardem při vyšetřování perfúze tkání (Leahy, Walmsley, Albrecht, Wohlrab) vzhledem k vysoké časové a prostorové variabilitě prostého měření bazální perfúze. Vzorkovací kmitočet byl 31ms, ke zhodnocení výsledků bylo použito firemního softwaru Perisoft (Perimed, Švédsko).

### *Transkutánní oxymetrie*

Parciální tlak kyslíku byl měřen pomocí tcpO<sub>2</sub> elektrody PF 5040 systému Periflux 5000 (Perimed, Švédsko), pracujícím na polarografickém principu (Lawall). Zahříváná Clarkova elektroda (45°C) byla připevněna ke kůži dorza nohy ve standardní lokalizaci (mezi 1. a 2. metatarzem) pomocí adhezivního kroužku, prostor mezi elektrodou a kůží byl vyplněn kontaktním roztokem dodaným výrobcem. Sonda byla aplikována minimálně 10 minut před začátkem měření. Vzorkovací kmitočet byl 31ms, ke zhodnocení výsledků bylo použito firemního softwaru Perisoft (Perimed, Švédsko).

## **6.2. Výsledky**

Při fyziologické hyperinzulinémii bylo dosaženo statisticky významně vyšší perfúze kožní mikrocirkulace v obou testech (hyperémie po zahřátí na 44°C – 1848% [984 – 2046] vs. 1599% [801 – 1836],  $p < 0,05$ , poločas dosažení maximální perfúze po uvolnění okluze 1.2 s [0.9 – 2.6] vs. 4.9 s [1.8 – 11.4],  $p < 0,05$ . Došlo k statisticky významnému zvýšení oxygenace tkáně (tcpO<sub>2</sub> – 48.6 mmHg [45.5 – 49.7] vs. 38.9mmHg [35.5 – 40.8],  $p < 0,05$ ).

Při suprafyziologické hyperinzulinémii bylo dosaženo ještě vyšší perfúze kožní mikrocirkulace v obou testech (hyperémie po zahřátí na 44°C – 1937% [1177 – 2488] vs. 1599% [801 – 1836],  $p < 0,005$ , poločas dosažení maximální perfúze po uvolnění okluze 1.0 s [0.7 – 1.1] vs. 4.9 s [1.8 – 11.4],  $p < 0,005$ . Došlo k statisticky významnému zvýšení oxygenace tkáně (tcpO<sub>2</sub> – 57.4 mmHg [51.7 – 66.2] vs. 38.9mmHg [35.5 – 40.8],  $p < 0,005$ . Rozdíly v perfúzi a oxygenaci mezi fyziologickou a suprafyziologickou hyperinzulinémií nebyly statisticky významné. M-hodnota měřená v clampu k posouzení inzulinorezistence se neměnila.

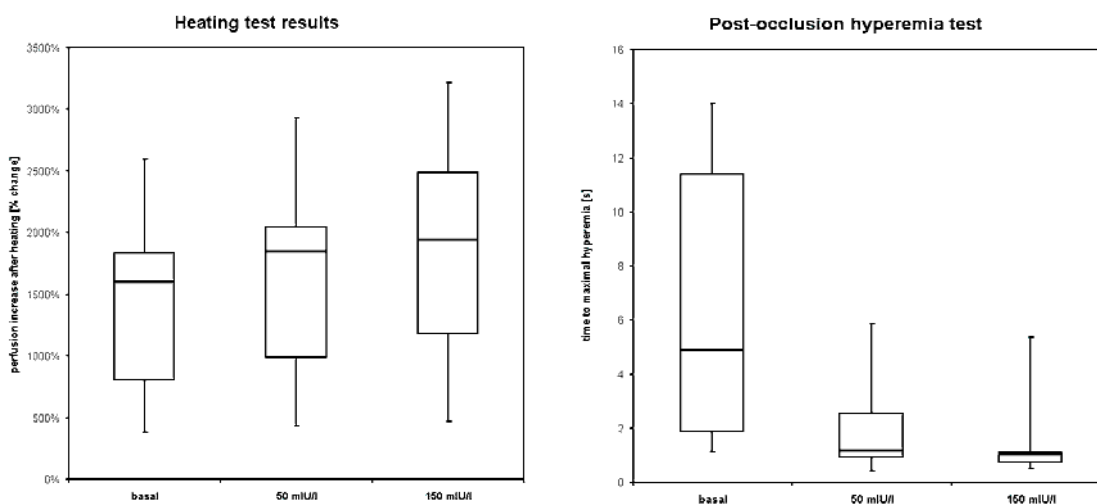
**Tab. 2. Výsledky**

	medián (interkvartilové rozpětí)		
	basal	50 mIU/l	150 mIU/l
měřená inzulinémie [mIU/l]	3,5 (1,8 – 4,1)	47,5* (36,0 – 53,3)	144,5* (115,9 – 170,5)
LDF baseline [PU]	7,5 (6,8 – 10,2)	12,3 <sup>NS</sup> (9,2 – 21,8)	12,9 <sup>NS</sup> (8,6 – 29,9)
LDF test zahřátím [%]	1599 (801 – 1836)	1848 <sup>+</sup> (984 – 2046)	1937* (1177 – 2488)
LDF post-okluzivní reaktivní hyperémie [s]	4,9 (1,8 – 11,4)	1,2 <sup>+</sup> (0,9 – 2,6)	1,0* (0,7 – 1,1)
tcpO <sub>2</sub> [mmHg]	38,9 (35,5 – 40,8)	48,6 <sup>+</sup> (45,5 – 49,7)	57,4 <sup>+</sup> (51,7 – 66,2)

+ p < 0.05

\* p < 0.005

<sup>NS</sup> nesignifikantní



### 6.3. Diskuse a limitace práce

Alternativou k systémovému podání inzulínu je lokální kožní aplikace pomocí iontoforézy (DeJongh, Serne), jehož výhodou je omezená lokální hyperinzulinémie, která nevyžaduje

clampové vyšetření spojené s infúzí tekutin a změnou jaterní produkce glukózy a pankreatické inzulínové sekrece. V naší práci jsme zvolili systémovou aplikaci, jejíž výhodou je fyziologická distribuce inzulínu a odstranění vlivu průchodu elektrického proudu, který může cestou napětově závislých natriových a kalciových kanálů indukovat vasokonstrikci (Figuroa).

V některých starších studiích (Utriainen, Tooke) autoři popisují rozdíl od výsledku naší práce žádné, případně statisticky nevýznamné zvýšení perfúze mikrocirkulace následkem infúze inzulínu. Naproti tomu novější práce (Serné, deJongh) ukazují vzestup perfúze při fyziologické hyperinzulinémii. Vysvětlením může být použití jiné metodiky. Ve starších studiích byla měřena perfúze sondou pouze za bazálních podmínek a nebyl použit žádný z výše zmíněných provokačních testů. Dle našich zjištění hodnota bazální LDF perfúze vykazovala pouze nesignifikantní trend k nárůstu, což koresponduje s dříve naměřenými daty (Utriainen, Tooke).

Otázkou je, zda samotná nálož tekutin během clampového vyšetření nevede k aktivaci sympatiku a k zvýšení reaktivity mikrocirkulace. V literatuře lze najít i zmínku o mírném nárůstu reaktivity mikrocirkulace při rychlé infúzi fyziologického roztoku (Forst). V našem experimentu jsme podávali zdravým dobrovolníkům vždy během 2-hodinového clampu celkem 1 – 1,5 l glukózy, nedošlo k vzestupu tepové frekvence a lze se domnívat, že rychlost infúze tekutiny nebyla dostatečná k vyvolání odpovědi sympatiku. Mezi oběma podskupinami pacientů (s nižší a vyšší počáteční inzulinémií) také nebyl pozorován signifikantní rozdíl v měřených parametrech přesto, že podané množství tekutin při prvním a druhém ustáleném stavu se lišilo. Neprovedení kontrolních vyšetření bez podání glukózy a inzulínu přesto lze považovat za určitou limitaci práce.

Námi pozorovaný nárůst transkutánního tlaku kyslíku odpovídá předchozím literárním údajům (Tymms), kdy při kontinuální podkožní infúzi inzulínu stoupla arteriovenózní

diference kyslíku, což nasvědčuje redistribuci průtoku ve prospěch funkčního řečiště. Naproti tomu u pacientů s diabetem mellitem 2. typu, kde je přítomna inzulinorezistence a hyperinzulinémie, je transkutánní tlak kyslíku nepřímo úměrný inzulinémii – s jejím zvýšením klesá (Kizu). U obézních pacientek s metabolickým syndromem, ale bez diabetu, byla popsána (DeJongh) snížená vasomoce a redukce odpovědi na lokálně podaný inzulin. Tato data nasvědčují odlišnému chování řečiště mikrocirkulace u hyperinzulinémických inzulinorezistentních pacientů, kde je odpověď mikrocirkulace na exogenní podání inzulinu alterována a nedochází ke zlepšení nutritivní perfúze (možná dokonce ke zhoršení), zatímco u pacientů senzitivních na inzulin vede jeho podání k otvírání většího množství nutritivních kapilár. Mechanismus patogeneze změn reaktivity se dává do souvislosti s oxidačním stresem vyvolaným hyperlipidémií a inzulinovou rezistencí, který vede k vazokonstrikci cestou zvýšené aktivity endotelinových receptorů (pro tromboxan A2) v hladké svalovině cév (Xiang). Zajímavé v této souvislosti bude sledovat inzulinem zprostředkovanou redistribuci mikrocirkulace u nemocných s chronickým srdečním selháním, léčených nově vyvíjenými endotelinovými receptorovými antagonisty.

#### **6.4. Závěr**

U zdravých dobrovolníků při systémovém podání inzulinu vede hyperinzulinémie k vzestupu reaktivity mikrocirkulace i vzestupu transkutánního tlaku kyslíku. Tento efekt se zvyšující se hladinou inzulinu nelineárně stoupá. Rozdílný vliv inzulinu u obézních subjektů a nemocných s diabetem mellitem 2. typu si vysvětlujeme přítomností oxidačního stresu při hyperlipidémií a inzulinorezistencí.



## 7. VLIV SAMOTNÉ FYZICKÉ AKTIVITY NA REAKTIVITU KOŽNÍ MIKROCIRKULACE U NEMOCNÝCH V RIZIKU SYNDROMU DIABETICKÉ NOHY.

### 7.1. Metodika

8 dobrovolníků, nemocných s diabetem mellitem 2. typu, nesportujících, bylo zařazeno do studie po podpisu informovaného souhlasu. Vyloučeni byli nemocní s limitovanou mobilitou, ischemickou chorobou srdeční (> AP I.st), v jakémkoli stádiu ischemické choroby dolních končetin, či syndromem diabetické nohy nebo jiným onemocněním, kde je nutnost zachovávání klidového režimu. Jako mírná fyzická aktivita byla užita chůze, protože šlo o nesportující probandy. Intenzita zátěže byla objektivizována krokoměrem. Mikrovaskulární reaktivita a kožní perfúze na dolní končetině byla měřena laser doppler flomwetrií a transkutánní oxymetrií (Periflux 5000, Perimed, Švédsko).

Tab. 3. Charakteristika probandů.

	V2	V3	V4	
počet kroků	3439 (2915 – 4230)	4189 (3335 – 5550)*	3489 (2917 – 4316)	
věk		62 (54 – 69)		
trvání diabetu		12,0 (10,0 – 15,5)		
systolický TK	128 (121 – 130)	133 (115 – 135)	128 (125 – 130)	
diastolický TK	80 (73 – 84)	75 (70 – 80)	75 (71 – 79)	
lačná glykémie [mmol/l]	8,4 (7,3 – 9,8)	8,4 (4,4 – 11,8)	8,5 (6,4 – 12,3)	NS
HbA <sub>1c</sub> [% IFCC]	6,4 (6,1 – 7,6)	6,5 (4,7 – 8,5)	6,3 (5,5 – 6,7)	NS
triglyceridy [mmol/l]	2,4 (1,6 – 3,0)	2,4 (1,5 – 3,3)	2,2 (1,8 – 2,6)	NS
cholesterol [mmol/l]	4,8 (4,0 – 5,5)	4,4 (4,2 – 4,8)	4,7 (4,1 – 4,9)	NS
změna váhy [kg]	0,1 (-0,4 – +0,8)	0,3 (-0,4 - +0,5)	0,5 (+0,1 - +0,5)	NS

\* $p < 0.001$

Při první návštěvě byli pacienti edukováni o používání krokoměru a byly zhodnoceny antropometrické a metabolické parametry jejich zdravotního stavu (věk, výška, váha, obvod pasu, lačná glykémie, glykovaný hemoglobin, triglyceridy, cholesterol, sérový kreatinin). V následujících 4 týdnech byli nemocní instruováni o zachování běžné fyzické aktivity a nošení krokoměru alespoň každý druhý den. Při druhé návštěvě, po uplynutí 4 týdnů, byl spočítán jejich denní průměr kroků a nemocní byli požádáni o zvýšení své fyzické aktivity o 10 – 15%. Po další 4-týdenní periodě byli instruováni opět ke snížení zátěže ke zvyklému režimu, při této návštěvě proběhlo stejné vyšetření metabolických a antropometrických parametrů jako při první kontrole. Poslední návštěva proběhla opět se stejným vyšetřením a po 4 týdnech zvyklé fyzické aktivity. Při každé kontrole od 2. návštěvy byl spočítán počet kroků a změřena reaktivita mikrocirkulace pomocí laser doppler flowmetrie a transkutánní oxymetrie. Výsledky byly zhodnoceny Friedmanovým a párovým Wilcoxonovým testem.

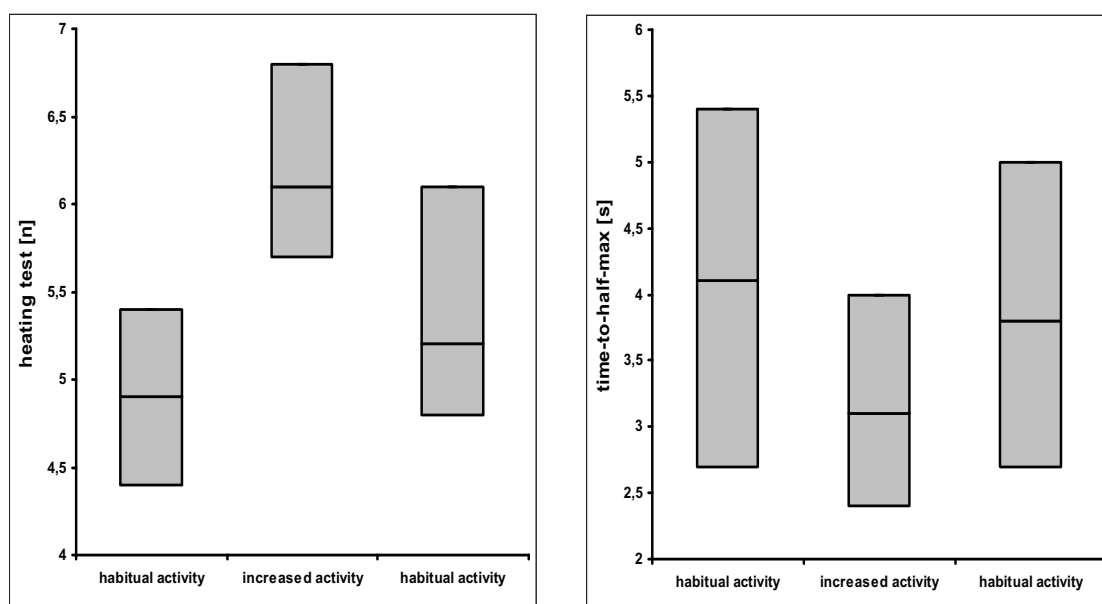
## **7.2. Výsledky**

Po 4 týdnech lehce zvýšené aerobní aktivity (chůze cca 800 [560 – 1 400] metrů / denně, odpovídající 20% navýšení), došlo ke zvýšení reaktivity mikrocirkulace v obou testech, a to statisticky významně ( $p < 0,01$ ; resp.  $p < 0,05$ ). Vyšší rozdíl byl přítomen v testu zahřátím. Zvýšená perfúze přetrvávala v menší míře i po následujících 4 týdnech běžné fyzické aktivity, ale rozdíl nebyl proti vstupním hodnotám statisticky významný ( $p = 0,30$ ). Metabolické a antropometrické parametry ani transkutánní tlak kyslíku se nezměnily.

Tab 4. Výsledky

	V1-V2 (zvyklá aktivita)	V2-V3 (zvýšená aktivita)	V3-V4 (zvyklá aktivita)	
LDF test zahřátím [%]	490 (440 – 540)	610 (570 – 680)	520 (480 – 610)	<b>p &lt;0,01</b>
LDF postokluzivní reaktivní hyperémie [s]	4,1 (2,7 – 5,4)	3,1 (2,4 – 4,0)	3,8 (2,7 – 5,0)	<b>p &lt;0,05</b>

Obr. 3 + 4., změna reaktivity mikrocirkulace při zvýšení a opětovném snížení fyzické aktivity.



### 7.3. Diskuse a limitace práce

Narozdíl od obdobné práce (5) byly zařazeni pouze obézní a nesportující pacienti proti náhodně vybraným pacientům typického diabetologického centra. Chůze byla pro účastníky studie jedinou relevantní fyzickou aktivitou. Důvod, proč se naše výsledky liší, lze najít ve dvou rovinách. Jednak, je otazné, zda půlhodinové cvičení 3x týdně je dostatečné trvání aktivity – v naší studii byli zařazeni pacienti s nízkou úrovní fyzické aktivity, jak již bylo zmíněno, ale po delší čas – odhadem 30 minut denně, ale s ohledem na design nelze přesnou

dobu určit. Druhý důvod je zařazení pouze pacientů se sedavým způsobem života, kde je největší rezerva pro zlepšení mikrovaskulárních funkcí skrze cvičení.

Diskrepance mezi zvýšenou reaktivitou mikrocirkulace měřenou LDF a nezměněným tcpO<sub>2</sub> představuje zajímavé zjištění. Hodnoty tcpO<sub>2</sub> byly v normálním rozmezí pro zdravou populaci (basal tcpO<sub>2</sub> > 30mmHg), pacienti byli bez ischemické choroby dolních končetin.

Předpokládáme, že zde není perferní deficit kyslíku a proto není rezerva pro zvýšení následkem fyzické aktivity.

#### **7.4. Závěr**

Malá, metabolicky a antropometricky nevýznamná fyzická aktivita má potenciál zvýšit perfúzi mikrocirkulace u obézních a nesportující nemocných s diabetem mellitem 2. typu.

## 8. KORELACE MEZI PŘÍTOMNOSTÍ KARDIOVASKULÁRNÍ AUTONOMNÍ NEUROPATIE A JEDNOTLIVÝMI KOMPONENTAMI SPEKTRÁLNÍ ANALÝZY LASER-DOPPLER FLOWMETRIE

### 8.1. Metodika

Autonomní neuropatie je běžnou komplikací déletrvajících diabetu mellitu 1. typu a podílí se na vyšší morbiditě i mortalitě; ohrožuje pacienty náhlou arytmiickou srdeční smrtí. Běžně vyšetřujeme její kardiální složku (KAN) pomocí časové analýzy variability srdeční frekvence (VSF) spolu s reakcí krevního tlaku na vertikalizaci (Ewingova baterie testů) nebo spektrální analýzou VSF. U 45 pacientů s diabetem mellitem byla po podpisu informovaného souhlasu vyšetřena za klidových podmínek KAN pomocí Ewingova testu a spektrální analýza (VariaCardio PC, Sima Media, Olomouc, ČR). Zároveň byla změřena kožní mikrocirkulace pomocí laser doppler flowmetrie (Periflux 5000, Perimed, Švédsko) jednak za bazálních podmínek při kožní teplotě 32°C, jednak po zahřátí na 44°C.

Pacienti byli rozděleni do dvou skupin, nelišících se věkem, pohlavím, dobou trvání diabetu, lipémií, výší krevního tlaku ani BMI, ale lišících se přítomností manifestní nebo závažné (1. skupina) a nepřítomností (2. skupina) KAN. Dále se obě skupiny lišily klidovou tepovou frekvencí, která byla vyšší u pacientů s KAN a výskytem periferní diabetické polyneuropatie DK (testované Weinsteinovými mikrofilamenty a biothesiometrem).

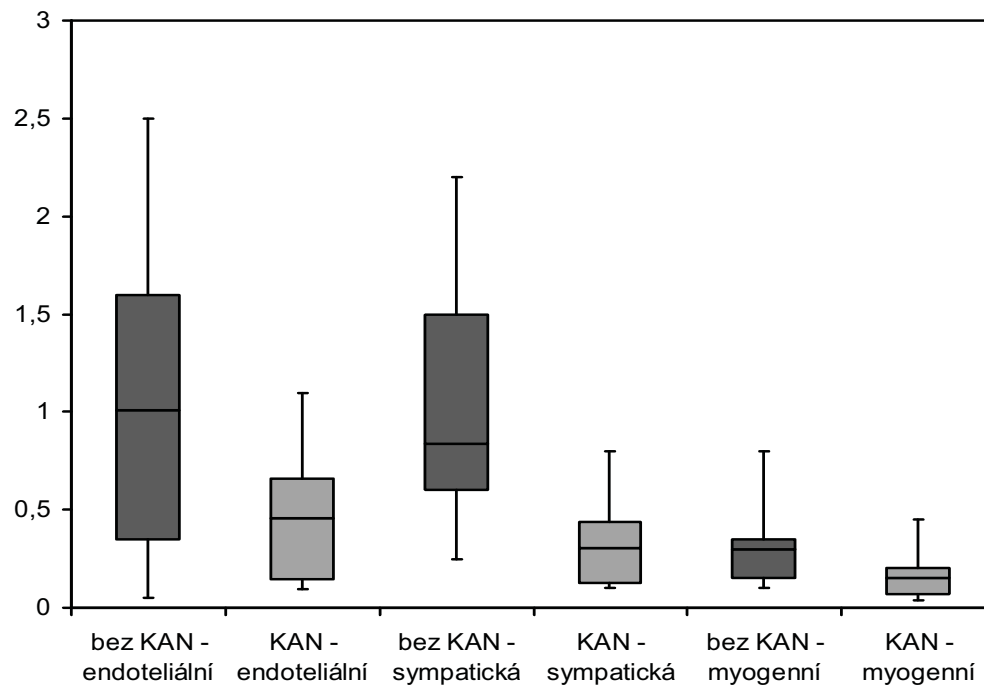
Byla provedena spektrální analýza obou záznamů s vypočtením spektrální síly v rozmezích odpovídající endoteliální aktivitě (0,009 – 0,02 Hz), aktivitě sympatiku (0,02 – 0,06 Hz), vlastní myogenní aktivitě (0,06 – 0,20 Hz), respiraci (0,2 – 0,6 Hz) a kardiální aktivitě (0,6 – 1,6 Hz). Výsledky byly zhodnoceny neparametrickými testy (Mann-Whitney U test, Spearmanův test).

počet [M/Ž]	13/16	14/18	NS
věk [roky]	32,4 ± 11,5	37,6 ± 10,4	NS
HbA <sub>1C</sub> [% IFCC]	7,5 ± 2,6	7,8 ± 2,6	NS
cholesterol [mmol/l]	5,1 ± 1,0	5,4 ± 2,3	NS
triglyceridy [mmol/l]	1,3 ± 0,7	1,6 ± 1,8	NS
<b>TF [min<sup>-1</sup>]</b>	<b>68 ± 8</b>	<b>80 ± 9</b>	<b>p&lt;0,01</b>
STK [mmHg]	116 ± 13	120 ± 12	NS
DTK [mmHg]	71 ± 10	72 ± 11	NS
retinopatie	8 / 16	7 / 18	NS
nefropatie	3 / 16	5 / 18	NS
<b>polyneuropatie DK</b>	<b>4 / 16</b>	<b>10 / 18</b>	<b>p &lt; 0,05</b>
makroangiopatie	2	3	NS

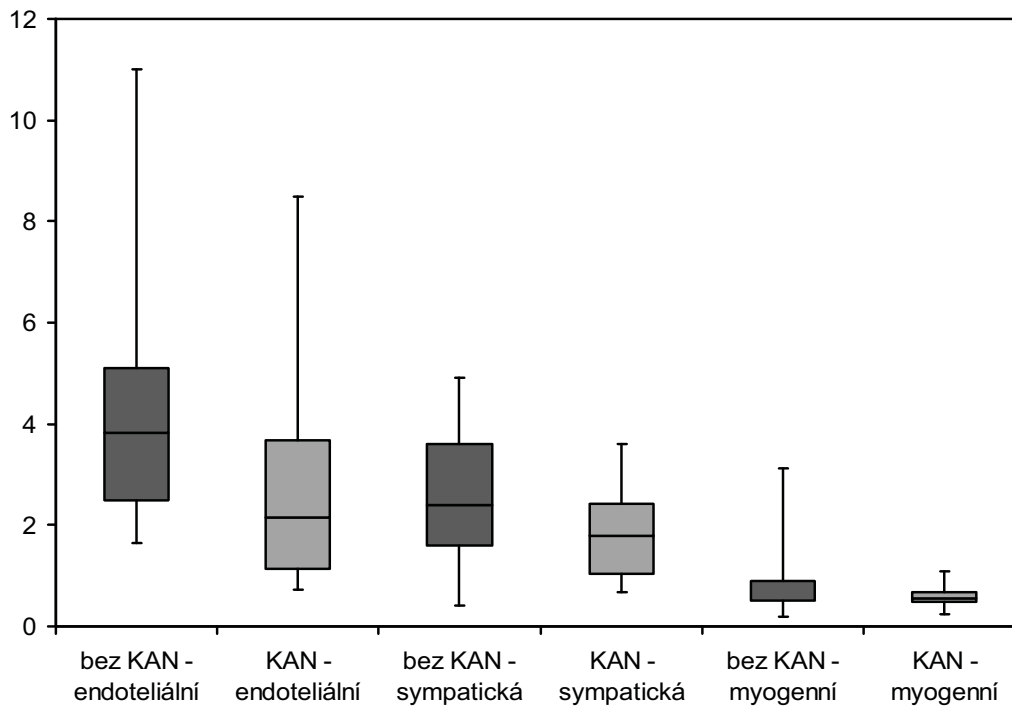
## 8.2. Výsledky

Skupiny se navzájem nelišily bazálním průtokem mikrocirkulací kůže, ani vzestupem po zahřátí (8,6x vs. 8,3x). U pacientů s přítomnou KAN byla statisticky významně nižší spektrální síla v oblasti odpovídající endoteliální aktivitě ( $p < 0,01$ ), aktivitě sympatiku ( $p < 0,005$ ) a hraničně nižší v oblasti odpovídající vlastní myogenní aktivitě ( $p = 0,06$ ) při měření bazálního průtoku. Při měření za maximální vasodilatace došlo ke snížení rozdílu, především endoteliální aktivity, který se pohyboval na hranici statistické významnosti.

Obr. 5. KAN a variabilita perfúze (spektrální síla v jednotlivých oblastech) – vyšetření při kožní teplotě 32 °C.



Obr. 6. KAN a variabilita perfúze (spektrální síla v jednotlivých oblastech) – vyšetření při kožní teplotě 44 °C.



### **8.3. Diskuse a závěry**

Několik prací se zabývalo souvislostí VSF a průtoku kožní mikrocirkulací, nebyla prokázána významnější souvislost. Přitom se předpokládá, že právě pokles aktivity sympatiku vede k redistribuci perfúze ve prospěch AV shuntů a na úkor nutritivních kapilár a tím vzniku teplé ischémie mikrocirkulace.

Měření ukazuje, že změny pozorovatelné u diabetických pacientů s kardiovaskulární autonomní neuropatií jsou detekovatelné i v periferním cévním řečišti mikrocirkulace, byť jejich výše nestačí k ovlivnění průtoku měřeného LDF. Nabízí se tak alternativní metoda vyšetření autonomní neuropatie přímo v periférii, kde její postižení působí největší změny. Lépe vycházejí změny měřené při kožní teplotě 32°C, bereme-li hranici spektrální síly v pásmu sympatiku pro predikci KAN 0,5, pak je senzitivita 79%, specifická 84%, PPV 85%, NPV 78%. Je třeba mít na vědomí malý počet pacientů, tudíž statistická síla těchto výsledků není dostatečně velká pro formulování normy.



## 9. VYUŽITÍ VYŠETŘENÍ MIKROCIRKULACE U SLEDOVÁNÍ HOJENÍ RÁNY PO APLIKACI GELU Z AUTOLOGNÍ PLAZMY

### 9.1. Platelet rich plasma

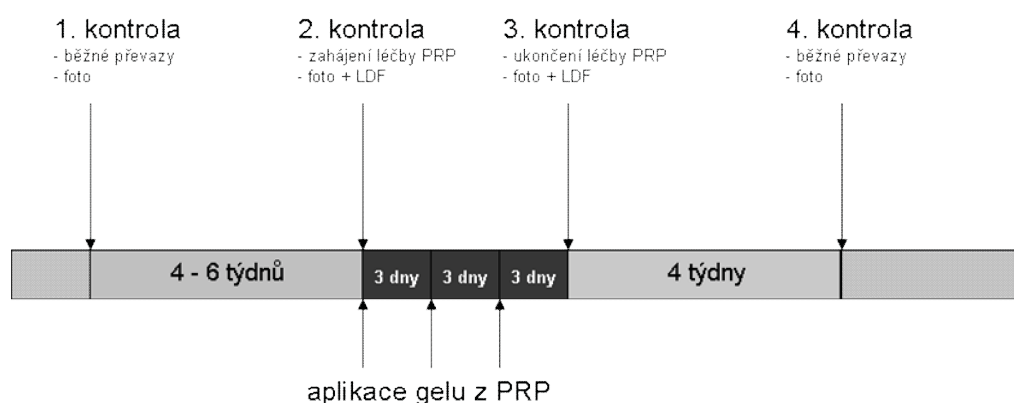
Relativně novou metodou, zatím používanou rutinně v kardiochirurgii a dentální chirurgii je lokální ošetřování ranných ploch pomocí autologní trombocyty obohacené plazmy (PRP), která působí na hojení především prostřednictvím z destiček odvozeného růstového faktoru (PDGF). Trombocyty jsou získávány z vlastní krve pacienta, ze které se speciálním separátorem získá obohacená plazma. Částečným spuštěním koagulační kaskády je dosaženo gelovité konzistence přípravku, která je výhodná pro aplikaci na ranné plochy. PRP obsahuje 10x více trombocytů než je v krevní plazmě. Nejdůležitější faktory získané z destiček, platelet derived growth factor (PDGF) a transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), byly zkoumány v posledních desetiletích a jejich efekt in vitro na angiogenezu a proliferaci buněk byl dobře doložen.

### 9.2. Metodika

Do pilotní studie bylo po podpisu informovaného souhlasu zařazeno celkem 5 pacientů se syndromem diabetické nohy ischemické (nebo převážně ischemické) příčiny, s nehojícími se defekty více než 2 měsíce, stabilními (rozměrově) v posledním měsíci, bez zánětu či antibiotické léčby. Vylučující kritéria zahrnovala pacienty s provedeným intervenčním výkonem na tepnách DK v posledních 2 měsících, pacienty těžkou ischemickou chorobou srdeční (NYHA III-IV), pacienty s jiným autoimunním onemocněním nebo pacienty léčené kortikosteroidy.

Pacientovi bylo odebráno 50 ml krve a v separátoru (Magellan, Medtronic, USA) získáno 5 ml plazmy obohacené trombocyty.

Po dobrém lokálním debridementu byl gel nanesen na defekt a pod okluzivním obvazem ponechán 3 dny. Následně byl proveden stěr na mikrobiologickou kultivaci a provedena další aplikace PRP gelu. Každý pacient podstoupil celkem 3 aplikace PRP gelu. Efekt léčby byl posouzen pomocí plochy defektu zjištěné digitální fotografií (na začátku léčby, na konci léčby a po 4-5 týdnech po léčbě), před a po aplikaci PRP byla změřena perfúze mikrocirkulace pomocí laser-doppler flowmetrie.



### 9.3. Výsledky

Během 4-5 týdnů studie se plocha defektů zmenšila v průměru o 35% v porovnání s 5% v předchozích 5 týdnech před aplikací PRP. Nebyl pozorován lokální zánět ani nebyl zjištěn pozitivní mikrobiologický nález. Kožní perfúze, hodnocená laser-doppler-flowmetrií, byla lehce zvýšena (jak bazální perfúze, tak reaktivita v testu zahřátím na 44°C). Detailní statistická analýza nebyla s ohledem na nízký počet pacientů provedena.

### 9.4. Diskuse a závěry

Limitací studie je především nízký počet pacientů. Studie se účastnilo 5 pacientů, u tří bylo přítomno lehčí postižení – st. 1-2 dle Wagnerovy klasifikace syndromu diabetické nohy a dva pacienti byli s řadu měsíců nehojícím se pahýlem po transmetatarzální amputaci, kde byla zvažována vyšší amputace. Nebyli tedy zahrnuti pacienti s Wagner 3 a 4.

Michal Krčma, Vyšetřovací metody mikrocirkulace u syndromu diabetické nohy, 2010

Studie neměla kontrolní skupinu, každý pacient byl kontrolou sám sobě. Srovnával se efekt 5-týdenní standardní terapie versus 4-5 týdnů po PRP aplikaci. Z pohledu medicíny založené na důkazech je toto největší limitací práce.

Všichni pacienti byli pro PRP léčbu (9 dnů) přijati k hospitalizaci. Vliv imobilizace končetiny není tak velký jako u neuropatické diabetické nohy, ale nelze jej take podceňovat.

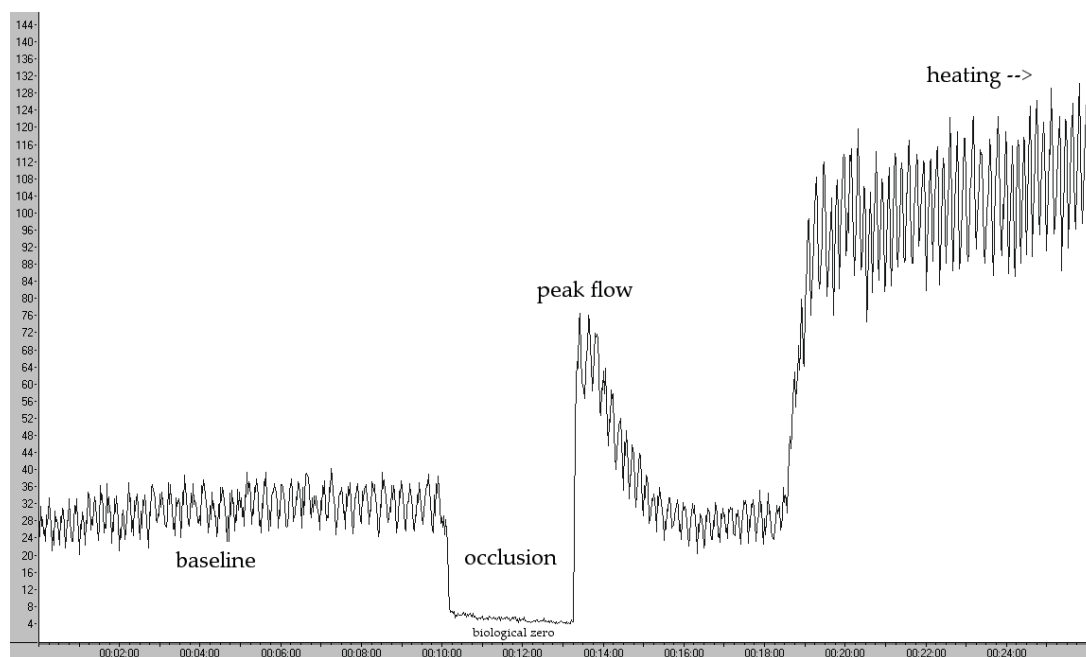
Pilotní studie ukázala slibný efekt gelu PRP na vzrůst mikrovaskulární perfúze a urychlení hojení ischemického jinak neřešitelného defektu. Přesněji odpoví až randomizovaná studie.

## 10. URČENÍ ROBUSTNÍHO PARAMETRU POPISUJÍCÍHO PORH KŘIVKU VE VZTAHU K VZESTUPU PERFÚZE PO ZAHŘÁTÍ.

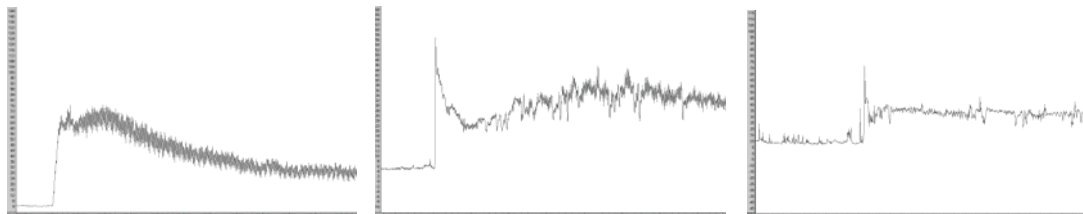
### 10.1. Úvodní poznámky

Laser-doppler-flowmetrie poskytuje relativně komplexní data a je někdy obtížné vybrat adekvátní metodu vyhodnocení. Počínaje měřením bazálního průtoku, přes provokační testy zmíněné v úvodu až spektrální analýzu. Naším cílem bylo najít nový rychle měřitelný a robustní parametr, dobře korelující s vzestupem perfúze po zahřátí (tento provokační test je literárně nejrozšířenější a i dle našich zkušeností poskytuje dobré a opakované výsledky). Nevýhodou testu zahřátím je dlouhá doba měření, převyšující včetně přípravy pacienta 30 minut. Nejméně 10-15 minut trvá stabilizace maximální vasodilatace a jsou i takové pacienti, kde se doba pohybuje nad 20 minut. Naproti tomu test postokluzivní hyperémie je rychlý, u zdravých subjektů dobře hodnotitelný, ale naráží na problém u diabetických nemocných, zejména s neuropatií, kde tvar typické perfúzní křivky je silně alterován.

Obr. 8. „Ideální“ PORH křivka s následujícím zahřátím



Obr. 9. Zleva příklady pacientů – diabetes mellitus bez neuropatie, s neuropatií a s neuropatií a těžkou ischemickou chorobou dolních končetin



Zřejmá obtížnost hodnocení u pacientů s neuropatií a ICHDK nás přivedla k testování ostatních možných parametrů křivky.

## 10.2. Metodika

Ze souboru všech pacientů, u nichž byl dobře hodnotitelný záznam vyšetření mikrocirkulace v testu hyperémií po zahřátí a kteří měli změřený PORH test bylo vybráno náhodně 120 měření u 105 pacientů. Byli zastoupeni nemocní s oběma typy diabetu mellitu i bez diabetu, s i bez periferní i autonomní neuropatie, různého věku, pohlaví a trvání diabetu. Všechna měření byla provedena na přístroji Periflux 5000 (Perimed, Švédsko), vždy byla měření provedena na nártu nedominantní nohy. Ke statistické analýze bylo použito Spearmanova korelačního koeficientu.

pacienti s DM / bez DM	94 / 11
věk [roky]	58 ± 19
BMI [kgm <sup>-2</sup> ]	29 ± 6
trvání diabetu DM [yr]	14 ± 11
HbA <sub>1c</sub> [% IFCC]	6,2 ± 1,8
cholesterol [mmol/l]	4,8 ± 1,2

### 10.3. Výsledky a závěr

Poměr špičkového průtoku (PF, peak flow) k bazálnímu (baseline) těsně koreloval s výsledky testu zahřátím ( $r = 0,95$ ;  $p < 0,01$ ). Druhý nejlepší parametr je bazální průtok (baseline) samotný – s horšími výsledky ( $r = 0,72$ ;  $p = 0,05$ ). Poločas dosažení maxima (time to half max, TH1) neměl statisticky významnou korelaci s testem zahřátím.

parametr	baseline	biological zero (BZ)	peak flow (PF)	time to max	time to half max	PF / baseline	BZ / baseline
correlation	<b>0,72</b>	-0,56	0,55	-0,32	-0,15	<b>0,95</b>	0,29
	<b>p = 0,05</b>	p = 0,1	p = 0,06	p = 0,3	p = 0,5	<b>p &lt; 0,01</b>	p = 0,3

Stanovení poměru špičkového ku bazálnímu průtoku (PF / baseline) může představovat dobrý parametr vyšetřování mikrocirkulace zejména tam, kde je test postokluzivní hyperémie zkreslen artefakty, jak tomu bývá u těžké ischemické choroby dolních končetin.

## OBSAH

<b>1. Úvod</b>	<b>2</b>
<b>2. Mikrocirkulace kůže diabetického pacienta</b>	<b>3</b>
<b>3. Vliv inzulínu na parametry mikrocirkulace</b>	<b>8</b>
<b>4. Vyšetřovací metody mikrocirkulace kůže</b>	<b>11</b>
4.1. Transkutánní oxymetrie (tcpO <sub>2</sub> ) .....	11
4.2. Přímá kapilaroskopie.....	11
4.3. Laser-doppler flowmetrie (LDF) .....	12
4.3.1. Iontoforéza.....	14
4.3.2. Laser Doppler Perfusion Imaging .....	15
4.3.3. Spektrální analýza vasomoce.....	15
4.3.4. Praktické aplikace LDF a transkutánní oxymetrie.....	16
<b>5. Cíle výzkumu</b>	<b>18</b>
<b>6. Vliv fyziologické a suprafyziologické inzulinémie na reaktivitu kožní mikrocirkulace u zdravých dobrovolníků</b>	<b>19</b>
6.1. Metodika.....	19
6.2. Výsledky.....	21
6.3. Diskuse a limitace práce.....	22
6.4. Závěr .....	24
<b>7. Vliv samotné fyzické aktivity na reaktivitu kožní mikrocirkulace u nemocných v riziku syndromu diabetické nohy.</b>	<b>25</b>
7.1. Metodika.....	25
7.2. Výsledky.....	26
7.3. Diskuse a limitace práce.....	27
7.4. Závěr .....	28
<b>8. korelace mezi přítomností kardiovaskulární autonomní neuropatie a jednotlivými komponentami spektrální analýzy laser-doppler flowmetrie</b>	<b>29</b>
8.1. Metodika.....	29
8.2. Výsledky.....	30
8.3. Diskuse a závěry .....	32
<b>9. Využití vyšetření mikrocirkulace u sledování hojení rány po aplikaci gelu z autologní plazmy</b>	<b>33</b>

9.1. Platelet rich plasma .....	33
9.2. Metodika.....	33
9.3. Výsledky.....	34
9.4. Diskuse a závěry .....	34
<b>10. Určení robustního parametru popisujícího PORH křivku ve vztahu k vzestupu perfúze po zahřátí.</b>	<b>36</b>
10.1. Úvodní poznámky .....	36
10.2. Metodika.....	37
10.3. Výsledky a závěr.....	38



## **Influence of physiological and supraphysiological hyperinsulinemia on skin microcirculation in healthy volunteers**

Michal Krčma, Daniela Čechurová, Jitka Gruberová, Zdeněk Jankovec, Silvie Lacigová, Michal Žourek, Zdeněk Rušavý

### **Introduction:**

Since the mid 1980s, a lot of attention has been dedicated to the importance of microcirculation; a part of arterial bed including arterioles, precapillary sphincters, capillaries, venules and arteriovenous shunts. It is a structure of decisive importance for an organism; in its domain an exchange of blood gases and metabolic products takes place and it contributes to thermoregulation. Mediation of vasomotor reaction and vasoarterial reflex maintaining a stable hydrostatic pressure is also an important function. Microcirculation is for its dimensions (capillary diameter approx.  $5 \times 10^{-5} \text{ mm}^2$ , blood flow velocity around  $0.4 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$ ) relatively difficult to access for more detailed examination, yet its impairments are very severe and dominate in many metabolic disorders. Microcirculation impairment is crucial in diabetes mellitus, where arteriovenous shunts open at the expense of nutritive bed due to a loss of sympathetic tone in peripheral circulation in diabetic neuropathy (Netten, Houben). Blood flow is therefore seemingly sufficient, but the affected tissue undergoes ischemia (warm ischemia). To what extent hyperinsulinemia contributes to this effect is not yet clearly known, one of the possible explanations may be a stimulation of sympathetic activity. Not a few studies are dealing with insulin's vasodilatory effect, however, with inconsistent findings regarding the extent of microcirculatory response at various insulin levels upon acute and chronic insulin administration.

Experimental work in rats showed an improvement in blood perfusion of sciatic nerve perineurium after a one-month insulin treatment, concurrently, amelioration in nerve conduction was proven electromyographically (Biessels). A short-term continuous subcutaneous insulin infusion (insulin pump treatment) led to an increase in capillary perfusion (Tymms) and to a decrease in venous oxygen tension in diabetic patients already after 9 days of treatment. This result suggests an existence of redistribution of skin perfusion favoring nutritive capillary bed.

Acute hemodynamic effects of insulin were tested in an experiment, where healthy young men were treated with a short insulin, locally administered into brachial artery with a rate of 1 and 5 mU/min for a period of 90 minutes in a double blinded study design. Blood flow was measured using body plethysmography. Higher insulin dose led to a statistically significant

vasodilatation (20%) compared to placebo. Administration of insulin + L-glucose (metabolically inactive stereoisomer) did not produce further increase in vasodilatation in comparison with pure insulin administration. Administration of insulin + D-glucose led to an increase in perfusion in comparison with pure insulin administration (47% compared to placebo). Glucose infusion itself did not cause any significant changes in blood flow (Ueda). In diabetes type 1 patients when using different insulin infusion rates (1.5 IU/hr, 15 IU/hr) there occurred an increase in blood flow measured by laser Doppler flowmetry (LDF) at the low dose of insulin, while a decrease occurred at the higher dose (Tooke). These measurements, however, were not performed in steady state conditions during clamp examination. Conversely, no statistically significant changes in perfusion of skin microcirculation were found in an experiment in healthy volunteers, where skin perfusion was monitored during a three-step insulin clamp with gradually increasing insulinemia levels 60 – 500 IU/ml. Arteriovenous difference of glucose attained maximum value already at the lowest insulinemia, subsequently it remained constant (Utriainen).

An increase in perfusion measured using LDF was noted at supraphysiological hyperinsulinemia in anesthetized rats under clamp conditions concurrently associated with an increase in femoral artery flow (Vincent).

Some studies dealing with physiologic hyperinsulinemia (approx. to 50 mIU/l) proved an increased blood flow through muscle and skin microvascular beds and increased density of opened capillaries under this condition (DeJongh, Serne). They used LDF and video capillary microscopy for measurements. In addition, local skin administration of insulin using iontophoresis has a vasodilatory effect in healthy volunteers, which diminishes with age (Rossi), was not proven in diabetes type 2 patients and is decreased in obese non-diabetic women (deJongh). An improvement in glycemic control leads to an increase in microvascular reactivity in diabetes type 2 patients (Forst).

To summarize the abovementioned findings; it is relatively well proven that physiological and even supraphysiological hyperinsulinemia leads to an increase in total limb blood perfusion. Study results regarding insulin influence on microcirculation vary; some authors (Utriainen) suggest an insignificant role of physiological as well as supraphysiological insulinemia, others (Tooke, Serne) observed an increase in perfusion only in physiological hyperinsulinemia. Furthermore, it is not completely clear, what part of the vascular bed contributes to the increase in perfusion; whether it is an increase in blood flow through nutritive capillaries or arteriovenous shunts.

## **Aim**

To examine vasodilatory effect of insulin on perfusion of skin microcirculation in healthy volunteers and assess, whether this effect follows a linear trend with insulinemia.

## **Methods**

Microcirculation was examined at rest and after stimulation by physiologically (50 mIU/l) and supraphysiologically (150 mIU/l) increased level of insulin. The examination was performed in 12 non-obese healthy volunteers with no history of diabetes in parents and siblings, with no chronic disease, with no chronic medication except hormonal contraception in women, matched in age as well as in basic anthropometric and biochemical parameters (see Table 1). Study protocol was approved by ethical committee of Medical Faculty in Pilsen, Charles University in Prague. All volunteers were fully acquainted in advance with the experiment and methods used, which they confirmed by signing an informed consent. The day before study commencement, the volunteers maintained an ordinary daily routine with the exception of heavy physical exercise, excessive consumption of saccharides, fats and alcohol, and last meal until 9 pm. The following morning, a two-step hyperinsulinemic clamp with target insulinemia 50 and 150 mIU/l was performed according to a well-established method (DeFronzo), i.e. rate of insulin infusion 2.4 IU/m<sup>2</sup>/hr and 6.0 IU/m<sup>2</sup>/hr. The order of insulinemias was inverted in one half of the subjects (i.e. first 6.0 IU/m<sup>2</sup>/hr then 2.4 IU/m<sup>2</sup>/hr). We measured skin perfusion using LDF and transcutaneous oxymetry, and respiratory quotient and energy expenditure by indirect calorimetry (V-max SensorMedics, Yorba Linda, CA, USA) according to a standard method (Weir et al.) at basal conditions and in both steady states. M-value of each clamp was calculated to assess the change in insulin resistance. Results in form of median and interquartile range were evaluated by Wilcoxon test.

## **Laser-doppler flowmetry**

Skin perfusion was examined at basal conditions before the clamp and in steady state at both insulin levels. System Periflux 5000 (Perimed, Sweden) with PF 5010 probe emitting laser with a wavelength of 780nm and power output 1mW was used for the measurement. The probe was placed to a dorsum of non-dominant foot and measurement was performed in all subjects at stable temperature of 33°C. Subsequently, stimulation tests (Muller et al.) were employed – heating (probe heating to 44°C inducing maximal vasodilatation) and occlusion (3-minute occlusion of a limb using a sphygmomanometer cuff inflated to a pressure of 30mmHg higher than systolic blood pressure), where time necessary for attaining maximal

perfusion after cuff release was measured. These stimulation tests are a standard in examination of tissue perfusion (Leahy, Walmsley, Albrecht, Wohlrab et al.) owing to a considerable time and spatial variability of plain basal perfusion measurement. Sampling rate was 31ms, firmware Perisoft (Perimed, Sweden) was used for data evaluation.

### **Transcutaneous oxygen monitoring**

Partial pressure of oxygen was measured using tcpO<sub>2</sub> probe PF 5040 of Periflux 5000 system (Perimed, Sweden), based on principle of polarography (Lawall et al.). Heated Clark electrode (45°C) was attached to skin of foot dorsum at a standard location (between the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> metatarsus) using an adhesive ring, the space between the electrode and skin was filled with contact solution supplied by the producer. The probe was applied at least 10 minutes prior measurement commencement. Sampling rate was 31ms, firmware Perisoft (Perimed, Sweden) was used for data evaluation.

### **Results:**

Data are clearly summarized in Table 2 and Graph 2, 3, and 4. The group, where the clamp with lower target insulinemia was performed first did not statistically differ from the group with initial higher insulinemic clamp. Statistically significant higher perfusion in skin microcirculation was achieved at physiological hyperinsulinemia in both tests (hyperemia after heating to 44°C – 1848% [984 – 2046] vs. 1599% [801 – 1836],  $p < 0.05$ , half time of reaching peak perfusion after occlusion release 1.2 s [0.9 – 2.6] vs. 4.9 s [1.8 – 11.4],  $p < 0.05$ . There occurred a statistically significant increase in tissue oxygenation (tcpO<sub>2</sub> – 48.6 mmHg [45.5 – 49.7] vs. 38.9mmHg [35.5 – 40.8],  $p < 0.05$ ).

The perfusion of skin microcirculation was even higher at supraphysiological hyperinsulinemia in both tests (hyperemia after heating to 44°C – 1937% [1177 – 2488] vs. 1599% [801 – 1836],  $p < 0.005$ , half time to reach peak perfusion after occlusion release 1.0 s [0.7 – 1.1] vs. 4.9 s [1.8 – 11.4],  $p < 0.005$ . There occurred a statistically significant increase in tissue oxygenation (tcpO<sub>2</sub> – 57.4 mmHg [51.7 – 66.2] vs. 38.9 mmHg [35.5 – 40.8],  $p < 0.005$ ). The difference in perfusion and oxygenation between physiological and supraphysiological hyperinsulinemia were not statistically significant. M-value measured during the clamp for insulin resistance evaluation did not change.

### **Discussion:**

Studies that monitored an influence of insulin on microcirculation used either local skin administration using iontophoresis (DeJongh, Serne et al.) or systemic delivery (Utriainen, Tooke, Ueda et al.). The advantage of local administration is limited local hyperinsulinemia, which does not require a clamp examination associated with fluid infusion and change in hepatic production of glucose and pancreatic production of insulin. In our study we chose the systemic administration, advantage of which is physiological insulin distribution and elimination of influence of passage of electrical current, which can induce vasoconstriction via voltage-dependent sodium and calcium channels (Figuroa et al.).

Simultaneous use of LDF and transcutaneous oxymetry methods was performed to distinguish perfusion of nutritive bed (assessed through O<sub>2</sub> release) from total blood flow through microcirculation (including arteriovenous shunts) in the region of interest of LDF probe, to which corresponds microvascular reactivity. However, measuring transcutaneous partial oxygen pressure can only be considered a rough indicator of nutritive bed perfusion. The exchange of oxygen between the vascular bed and tissues takes place also on other levels (larger vessels, via interstitial fluid) and there was found a discrepancy between capillary density assessed through video capillary microscopy and transcutaneous oxymetry values (Ubbink et al.).

In some older studies, (Utriainen, Tooke et al.) the authors describe no, or statistically insignificant, increase in microcirculation perfusion as a result of insulin infusion. On the other hand, more recent studies (Serne, deJongh et al.) demonstrate an increase in perfusion at physiological hyperinsulinemia. The explanation may lie in a different methodology used. In older studies the perfusion was measured by a probe only at basal conditions and no abovementioned stimulation test was employed. According to our findings the value of basal LDF perfusion showed only insignificant incremental trend (see Table 2.), which corresponds to data measured earlier (Utriainen, Tooke et al.).

Transcutaneous oxygen pressure monitoring is important for estimation of amputation wound healing in diabetic foot syndrome (Faglia et al.) as well as for angioplasty effect monitoring in patients with critical limb ischemia (Caselli et al.), tcpO<sub>2</sub> values at rest below 30 mmHg are an independent predictor of ischemia (Cechurova et al.). The increase in transcutaneous oxygen pressure observed in our study is consistent with previous study data (Tymms et al.), where arteriovenous difference of oxygen increased with continuous subcutaneous insulin

infusion, which suggests a flow redistribution favoring functional vascular bed. On the contrary, in patients with diabetes mellitus type 2, where insulin resistance and hyperinsulinemia are present, transcutaneous oxygen pressure is inversely proportional to insulinemia – it falls with its increase (Kizu et al.). In obese patients with metabolic syndrome, but without diabetes, decreased vasomotion and reduced response to locally administered insulin was described (DeJongh et al.). These findings suggest a different behavior of microcirculatory vascular bed in hyperinsulinemic insulin-resistant patients, where the response of microcirculation to exogenous insulin administration is altered and there is no improvement of nutritive perfusion (possibly even deterioration), while in insulin-sensitive patients, insulin administration causes more nutritive capillaries to open. Pathogenesis mechanism of reactivity changes is put in connection with oxidative stress induced by hyperlipidemia and insulin resistance, which causes vasoconstriction through augmentation of endothelin receptor activity (for thromboxane A<sub>2</sub>) in smooth muscle tissue (Xiang et al.). In this regard it will be interesting to observe insulin mediated microcirculation redistribution in patients with chronic heart failure treated with newly developed endothelin receptor antagonists, such study has not yet been done according to available literary data.

The question is, whether the fluid load itself associated with clamp examination does not lead to sympathetic activation and microcirculation reactivity increase. In literature, we can find a mention about slight microcirculatory reactivity increase associated with fast infusion of saline (Frost et al.). In our experiment, healthy volunteers were administered always a total of 1 – 1.5 l of glucose during the 2-hour clamp, there was no increase in heart rate observed. This rate of fluid infusion cannot be considered sufficient to trigger a sympathetic response. In addition, no significant difference in measured parameters was observed between the two subgroups (initially lower and higher insulinemia) despite the fact that the administered fluid volume at the first and the second steady state varied. Nevertheless, the failure to perform control examinations without glucose and insulin administration can be considered a certain limitation of the study.

## **Conclusion**

Hyperinsulinemia causes an increase in reactivity of microcirculation as well as an increase in transcutaneous oxygen pressure in healthy volunteers upon systemic administration of insulin. This effect rises non-linearly with increasing insulinemia.

## Literature:

1. Albrecht HP, Hiller D, Muck-Weymann M, Buhler-Singer S, Boateng B, Hornstein OP., Dynamic function tests for detection of physiologic and pathophysiologic reactions in cutaneous microcirculation, *Hautarzt*. 1995 Jul;46(7):455-61
2. Biessels GJ et al., Insulin partially reverses deficits in peripheral nerve blood flow and conduction in experimental diabetes, *Journal of the Neurological Sciences*, 140 (1996), 12-20
3. Caselli A, Latini V, Lapenna A, Di Carlo S, Pirozzi F, Benvenuto A, Uccioli L., Transcutaneous oxygen tension monitoring after successful revascularization in diabetic patients with ischaemic foot ulcers. *Diabet Med*. 2005 Apr;22(4):460-5
4. Cechurová D, Rusavý Z, Lacigová S, Růžicka J, Novák M, Jankovec Z., Transcutaneous oxygen tension in hyperbaric condition as a predictor of ischaemia in non-healing diabetic foot ulcers, *Vnitr Lek*. 2002 Oct;48(10):971-5
5. De Jongh RT, Clark AD, IJzerman RG, Serne EH, de Vries G, Stehouwer CD., Physiological hyperinsulinaemia increases intramuscular microvascular reactive hyperaemia and vasomotion in healthy volunteers., *Diabetologia*. 2004 Jun;47(6):978-86
6. De Jongh RT, Serné EH, IJzerman RG, Jørstad HT, Stehouwer CD, Impaired local microvascular vasodilatory effects of insulin and reduced skin microvascular vasomotion in obese women, *Microvasc Res*. 2008 Mar;75(2):256-62. Epub 2007 Aug 21
7. DeFronzo RA, Tobin JD, Andres R., Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance, *Am J Physiol*. 1979 Sep;237(3):E214-23.
8. Faglia E, Clerici G, Caminiti M, Quarantiello A, Curci V, Morabito A., Predictive values of transcutaneous oxygen tension for above-the-ankle amputation in diabetic patients with critical limb ischemia., *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2007 Jun;33(6):731-6. Epub 2007 Feb 12.
9. Figueroa XF, Chen CC, Campbell KP, Damon DN, Day KH, Ramos S, Duling BR., Are voltage-dependent ion channels involved in the endothelial cell control of vasomotor tone? *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007 Sep;293(3):H1371-83. Epub 2007 May 18
10. Forst T, Lübben G, Hohberg C, Kann P, Sachara C, Gottschall V, Friedrich C, Roskopf R, Pfützner A., Influence of glucose control and improvement of insulin resistance on microvascular blood flow and endothelial function in patients with diabetes mellitus type 2, 1: *Microcirculation*. 2005 Oct-Nov;12(7):543-50.
11. Houben et al.: Skin blood cell flux in insulin dependent diabetic subjects in relation to retinopathy or incipient nephropathy, *European Journal of Clinical Investigation* 1992
12. Kizu A, Koyama H, Tanaka S, Maeno T, Komatsu M, Fukumoto S, Emoto M, Shoji T, Inaba M, Shioi A, Miki T, Nishizawa Y. , Arterial wall stiffness is associated with peripheral circulation in patients with type 2 diabetes., *Atherosclerosis*. 2003 Sep;170(1):87-91

13. Lawall H, Amann B, Rottmann M, Angelkort B, The role of microcirculatory techniques in patients with diabetic foot syndrome, *Vasa*. 2000 Aug;29(3):191-7.
14. Leahy MJ, de Mul FF, Nilsson GE, Maniewski R. Principles and practice of the laser-Doppler perfusion technique. *Technol Health Care* 1999;7:143-62.
15. M.A. Vincent<sup>1</sup>, D. Dawson<sup>1</sup>, A.D.H. Clark<sup>2</sup>, J.R. Lindner<sup>1</sup>, S. Rattigan<sup>2</sup>, M.G. Clark<sup>2</sup>, and E.J. Barrett<sup>1</sup>, Skeletal Muscle Microvascular Recruitment by Physiological Hyperinsulinemia Precedes Increases in Total Blood Flow, *Diabetes* 53:447-453, 2004
16. Müller P, Keller R, Imhof P., Laser Doppler flowmetry, a reliable technique for measuring pharmacologically induced changes in cutaneous blood flow? *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 1987 Jun;9(6):409-20.
17. Netten P et al. Skin microcirculation of the foot in diabetic neuropathy, *Clinical Science* (1996) 91, 559-565
18. Rossi M, Cupisti A, Ricco R, Santoro G, Pentimone F, Carpi A., Skin vasoreactivity to insulin iontophoresis is reduced in elderly subjects and is absent in treated non-insulin-dependent diabetes patients, *Biomed Pharmacother*. 2004 Dec;58(10):560-5.
19. Rossi M, Maurizio S, Carpi A., Skin blood flowmotion response to insulin iontophoresis in normal subjects, *Microvasc Res*. 2005 Jul;70(1-2):17-22. Epub 2005 Jul 1
20. Serné E. et al., Direct Evidence for Insulin-Induced Capillary Recruitment in Skin of Healthy Subjects During Physiological Hyperinsulinemia, *Diabetes* 51:1515-1522, 2002
21. de Jongh RT, Serné EH, IJzerman RG, Jørstad HT, Stehouwer CD, Impaired local microvascular vasodilatory effects of insulin and reduced skin microvascular vasomotion in obese women, *Microvasc Res*. 2008 Mar;75(2):256-62. Epub 2007 Aug 21.
22. Tooke JE et al., The effects of intravenous insulin infusion on skin microcirculatory flow in type 1 diabetes, *Int J Microcirc Clin Exp* 4: 69-83 (1985)
23. Tymms DJ et al., The effect of continuous subcutaneous insulin infusion on microvascular blood flow in diabetes mellitus. *Int J Microcirc Clin Exp* 1988, 7:341-356
24. Ubbink DT et al., Can transcutaneous oximetry detect nutritive perfusion disturbances in patients with lower limb ischemia? *Microvascular research* 1995, 49:315-324
25. Ueda S et al., The Vasodilating Effect of Insulin Is Dependent on Local Glucose uptake: A Double Blind, Placebo-Controlled Study, *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, Vol. 83, 1998
26. Utriainen et al., Methodological aspects, dose-response characteristics and causes of interindividual variation in insulin stimulation of limb blood flow in normal subjects, *Diabetologia* 1995, 38:555-564
27. Walmsley D, Wiles PG., Reactive hyperaemia in skin of the human foot measured by laser Doppler flowmetry: effects of duration of ischaemia and local heating., *Int J Microcirc Clin Exp*. 1990 Nov;9(4):345-55



28. Weir JB: New methods for calculating metabolic rate with special reference to protein metabolism, *J Physiol* 1949, 109:1-9
29. Wohlrab J, Korting R, Helmbold P, Marsch WC., The NO release test as a functional reference standard for laser Doppler fluxmetry in cutaneous microangiology., *Skin Res Technol*. 2001 Aug;7(3):172-5
30. Xiang L, Dearman J, Abram SR, Carter C, Hester RL., Insulin resistance and impaired functional vasodilation in obese Zucker rats, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008 Apr;294(4):H1658-66. Epub 2008

**Table 1. Characteristics of subjects**

	median (interquartil range)
number (male/female)	12 (6/6)
age [years]	24 (23 – 25)
BMI [kg.m <sup>-2</sup> ]	21,6 (20,7 – 23,7)
waist [cm]	74,5 (66,3 – 80,0)
blood pressure [mmHg]	113/75 (107/66 – 117/80)
fasting plasma glucose [mmol/l]	4,7 (4,6 – 5,3)
plasma triglycerides [mmol/l]	0,8 (0,7 – 0,9)
HDL cholesterol [mmol/l]	1,4 (1,1 – 1,6)
LDL cholesterol [mmol/l]	2,5 (2,3 – 3,1)
fibrinogen [mmol/l]	2,3 (2,2 – 2,5)

**Table 2. Results**

	median (interquartil range)		
	basal	50 mIU/l	150 mIU/l
real insulin level [mIU/l]	3.5 (1.8 – 4.1)	47.5 <sup>*</sup> (36.0 – 53.3)	144.5 <sup>*</sup> (115.9 – 170.5)
LDF baseline [PU]	7.5 (6.8 – 10.2)	12.3 <sup>NS</sup> (9.2 – 21.8)	12.9 <sup>NS</sup> (8.6 – 29.9)
LDF heating test [%]	1599 (801 – 1836)	1848 <sup>+</sup> (984 – 2046)	1937 <sup>*</sup> (1177 – 2488)
LDF post-occlusion hyperemia test [s]	4.9 (1.8 – 11.4)	1.2 <sup>+</sup> (0.9 – 2.6)	1.0 <sup>*</sup> (0.7 – 1.1)
tcpO <sub>2</sub> [mmHg]	38.9 (35.5 – 40.8)	48.6 <sup>+</sup> (45.5 – 49.7)	57.4 <sup>+</sup> (51.7 – 66.2)

<sup>+</sup> p < 0.05

<sup>\*</sup> p < 0.005

<sup>NS</sup> not significant

Fig. 2. Heating test results

### Heating test results

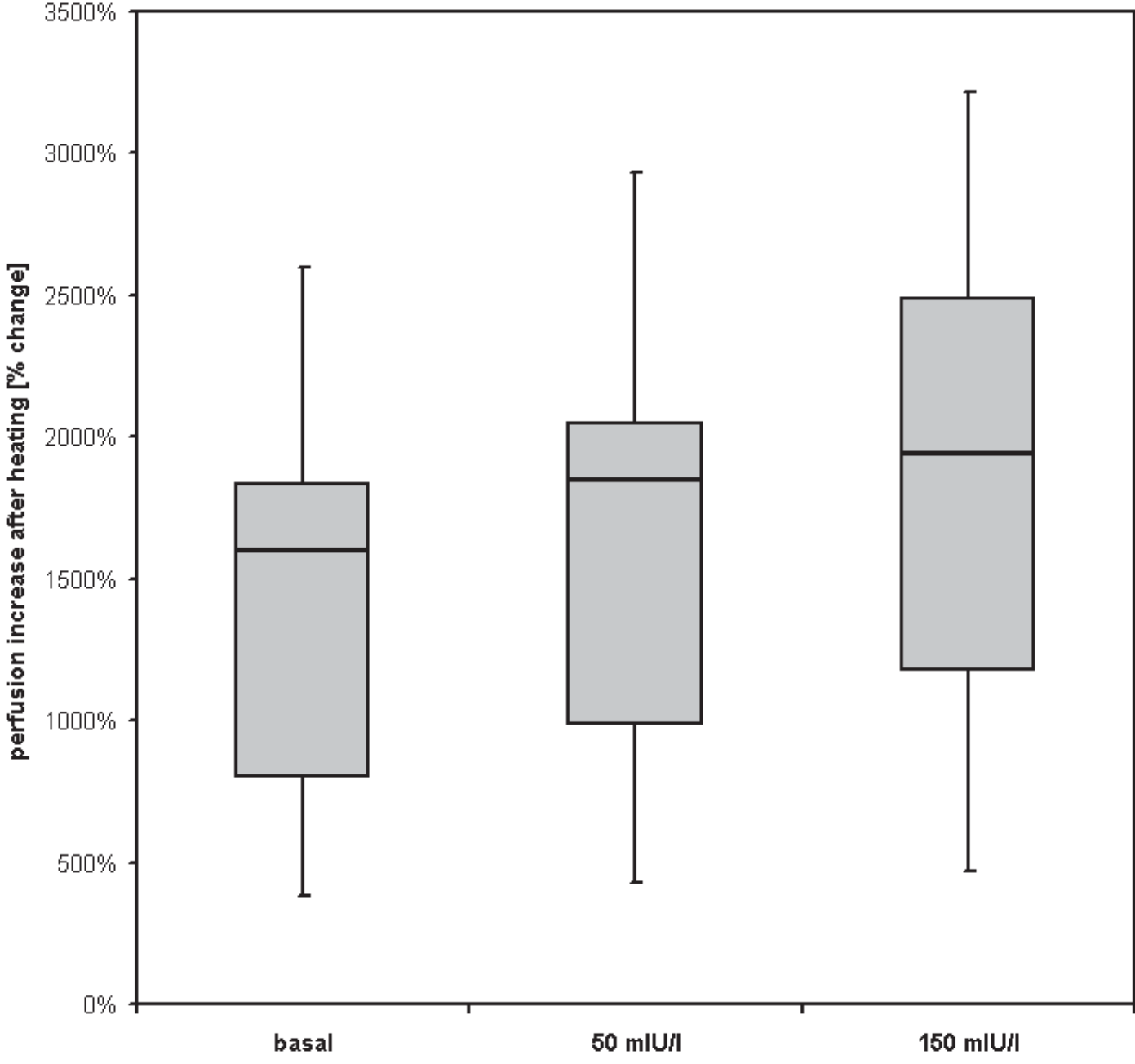


Fig.3. Post-occlusive hyperemia test results

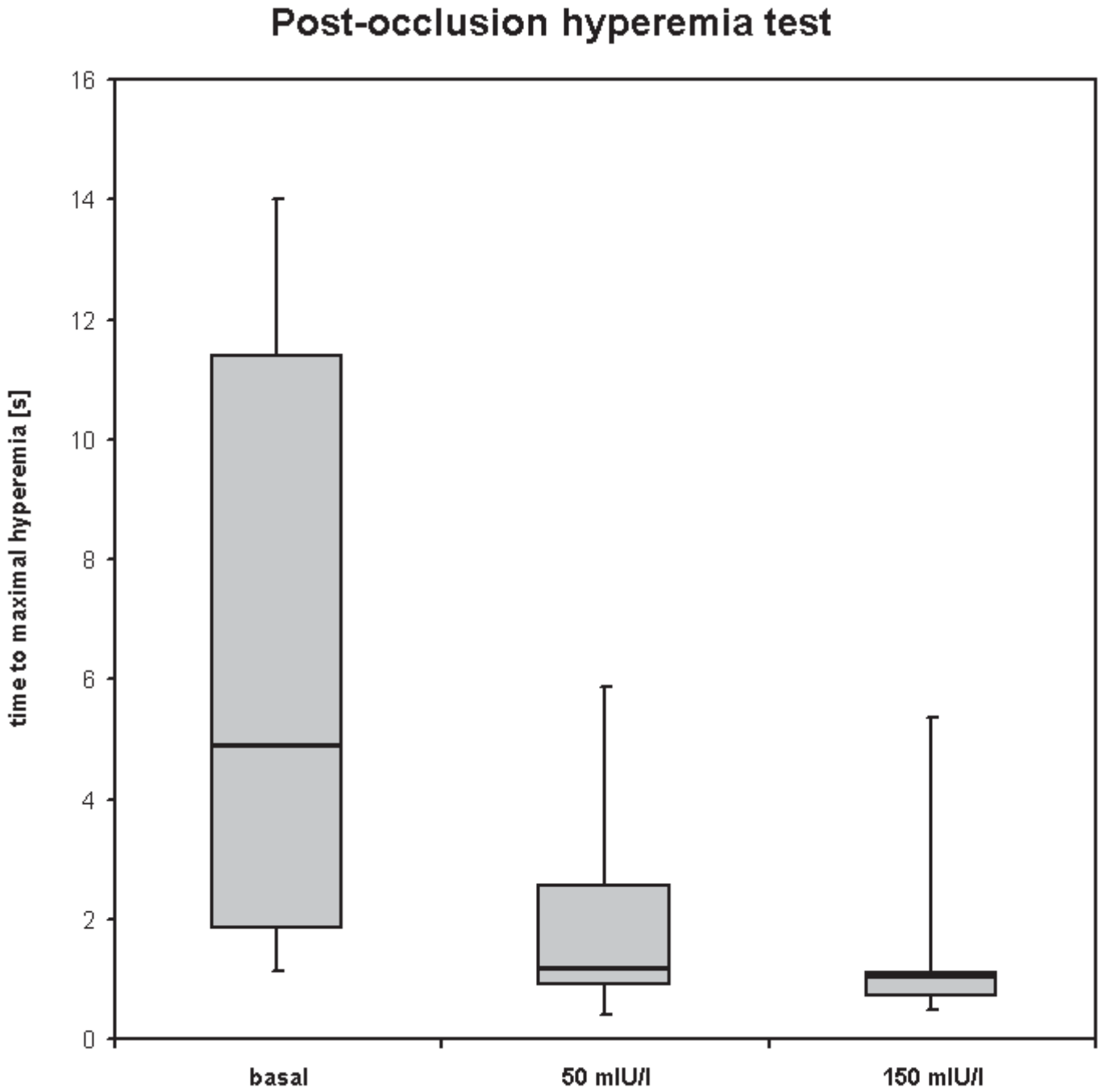
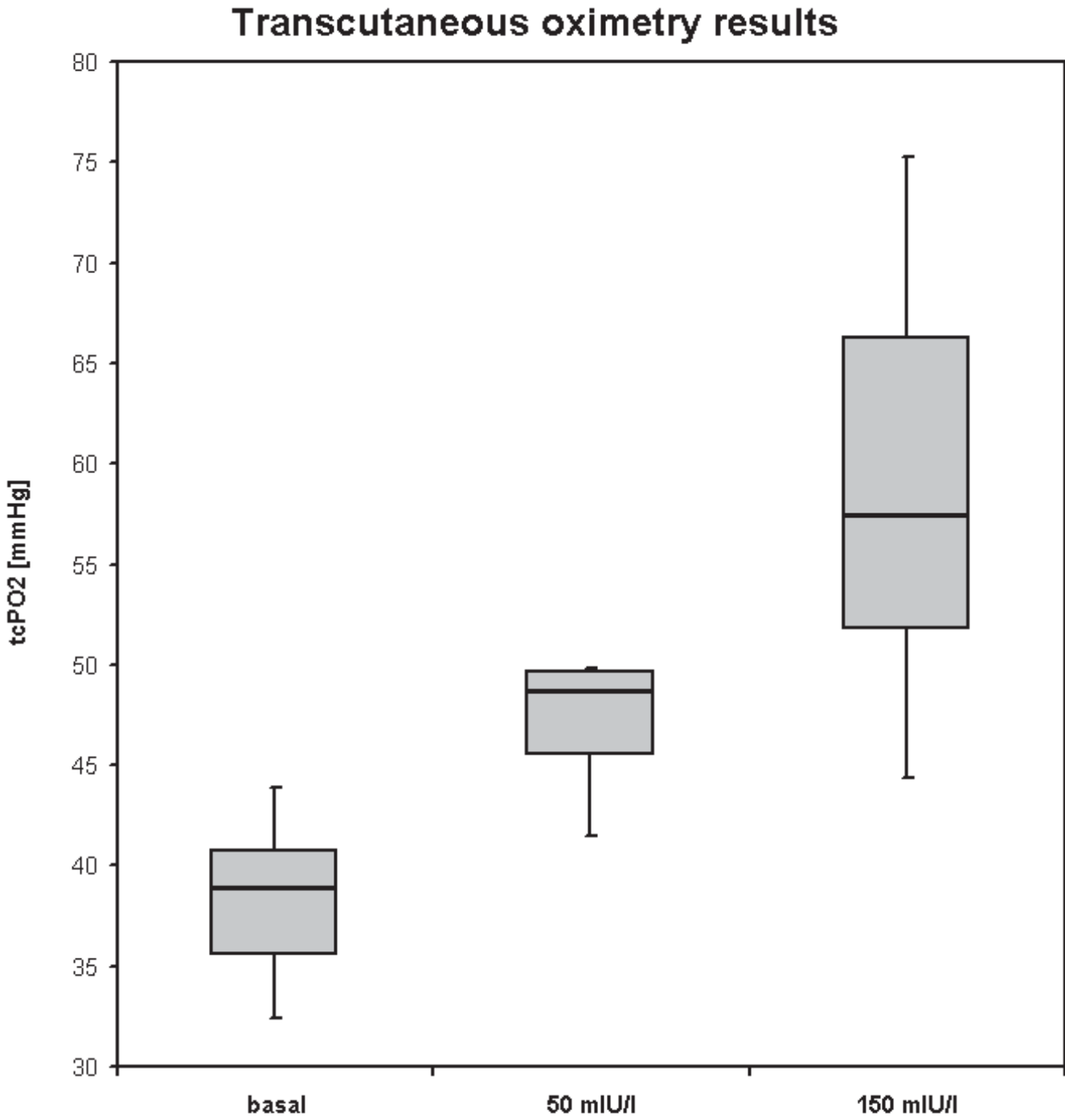


Fig. 4. Transcutaneous oximetry results



**Effect of Mild Increase of Physical Activity on Microvascular Reactivity in Obese Subjects with Diabetes Mellitus Type 2.**

M. Krcma, D. Cechurova, Z. Jankovec, S. Lacigova, M. Zourek, Z. Rusavy.

Diabetology centre, 1<sup>st</sup> Dept. of Internal Medicine, University Hospital and Medical Faculty  
Charles University, Plzen

**Acknowledgements:** Supported by Scientific Programme MSM 0021620814.

All authors have no personal bias or any relationship with mentioned companies.

Michal Krcma, MD  
krcmam@fnplzen.cz  
1<sup>st</sup> Dept. of Internal Medicine  
University Hospital Plzen  
Alej Svobody 80  
304 60 Plzen

## **Introduction**

At present the effect of slight physical training on impaired microcirculation due to diabetes is examined in detail. Endothelial dysfunction, especially in overweighted patients with diabetes mellitus type 2 can be influenced by lifestyle modifications. Questionable is, whether this influence is partly caused by increase of physical activity by itself, or only secondarily through improvement of metabolic compensation. During six months following obese subjects with diabetes type 2 was observed amelioration of endothelial dysfunction parameters (1) in the course of lifestyle modification (caloric restriction in diet and structured exercise program). Subjects' weight, waist-to-hip-ratio, level of HbA<sub>1C</sub> and total cholesterol significantly decreased at the same time.

Difference between plasma NO<sub>x</sub> concentration and cutaneous blood flow measured by laser Doppler technique was found in healthy volunteers between two groups of men that differed only in intensity of chronic physical training (2, 4).

Similar work in healthy subjects at risk of developing type 2 diabetes demonstrated higher microvascular reactivity in the group with more frequent physical activity (3). Groups were matched to age and no differences in metabolic or anthropometric parameters were observed in between.

A recent paper focuses on increased metabolically indifferent physical activity for period of six months in subjects with type 2 diabetes and its influence on microcirculation. It did not prove any significant changes in microvascular reactivity in comparison with control group (5).

Concurrently a similar study with rather different design and result was performed in our centre.

## **Aim**

Primary to determine if moderate, short time, anthropometrically and metabolically indifferent increase of physical activities changes microvascular reactivity in obese subjects with diabetes mellitus type 2. Secondary point was to test if these findings persist after return to habitual lifestyle.

## **Materials and methods**

8 volunteers, obese type 2 diabetic patients, non sport-practicing, were exact informed about the procedures and signed informed consent. Protocol of this study has been approved by

ethical committee. Exclusion criteria were severe ischemic heart disease (myocardial infarction in history, heart failure NYHA > I), diabetic foot syndrome with ulcers, any walk restrictive musculoskeletal disease and respiratory insufficiency. As a mild physical training was used walking in the non sport-practicing subjects. Training intensity was objectified by pedometers. Microvascular reactivity and perfusion of skin in lower limbs were measured by laser-Doppler flowmetry and transcutaneous oximetry (Periflux 5000, Perimed, Sweden). At first visit subjects were good educated in pedometers using and were measured anthropometrical (age, height, weight, waist circumference) and laboratory (fasting plasma glucose, HbA<sub>1C</sub>, triglycerides, cholesterol, serum creatinine) parameters. In four weeks, at visit two, was calculated steps count and subjects were educated to increase day-to-day walk about 10-15%. After this four weeks period were subject at visit three instructed to return to habitual activity. Last visit was after four weeks this second period. At every visit was measured above mentioned anthropometric and laboratory parameters, from visit two was steps count calculated and were measured microvascular reactivity by laser-doppler flowmetry and transcutaneous oximetry. Not normally distributed results (in the form of median an interquartil range) were evaluated by Friedman and pair Wilcoxon test.

## **Results**

After four weeks of slightly increased aerobic activity (walk about 800 [560 - 1400] meters/day, corresponding to about 20% activity increase) microvascular reactivity increased significantly in both tests (after heating from 4.9x [4.4 – 5.4] to 6.1x [5.7 – 6.8],  $p < 0.01$ ), half time to reach maximum perfusion shortened from 4.1 [2.7 – 5.4] s to 3.1 [2.4 – 4.0] s,  $p < 0.05$ . The increased perfusion lasted after following four weeks of habitual activity in smaller extent (microvascular reactivity increase after heating 5.2 [4.8 – 6.1] s, half time to reach maximum perfusion 3.8 [2.7 – 5.0], this increase was not significant in comparison with habitual activity in the first period). Metabolic and anthropometric parameters and transcutaneous oxygen tension did not change significantly (Table 1).

## **Discussion**

In contrast to similar study (5) only obese non sport-practicing subjects were included in the study as opposed to all patients of typical diabetology centre. Walking was the only relevant muscular exercise for the subjects. They were asked about sports at every visit (Had they started practicing sports, they would have been excluded from the study).



Reasons, why our results are different from this paper, are possible to found in two arenas.

First, is questionable whether half an hour exercise 3 times a week is sufficient duration of the activity – in our study the patients were subjected to lower intensity exercise than previously mentioned, but for a longer period of time (approx. 30 min/day according to the design, but it is impossible to ascertain time exactly).

Second, our subject choice is different. Only subjects with sedentary lifestyle were enrolled in our study, where there should be the highest potential for amelioration of microvascular function through exercise.

Discrepancy between increased microvascular reactivity measured by LDF and unchanged transcutaneous oxygen pressure could represent an interesting finding.  $TcpO_2$  values were within normal range for healthy population (basal  $tcpO_2 > 30\text{mmHg}$ ), subjects had no lower leg ischemia history or clinical symptoms. We suggested there was not yet peripheral tissue oxygen deficit and this is why there is not reserve for increasing after exercise.

In agreement with cited papers, our study indicates the need of additional examination as to what type and what dose of physical activity lead to microvascular reactivity improvement and – in practice – how to choose patients, where regular physical training would have best efficacy. It is likely that we need therapeutics strategy “made-to-measure”.

#### **References:**

- 1) Hamdy O, Ledbury S, Mullooly C, Jarema C, Porter S, Ovalle K, Moussa A, Caselli A, Caballero AE, Economides PA, Veves A, Horton ES (2003) Lifestyle modification improves endothelial function in obese subjects with the insulin resistance syndrome. *Diabetes Care* 26(7): 2119-25.
- 2) Franzoni F, Galetta F, Morizzo C, Lubrano V, Palombo C, Santoro G, Ferrannini E, Quinones-Galvan A (2004) Effects of age and physical fitness on microcirculatory function, *Clin Sci (Lond)* 106(3): 329-335.
- 3) Middlebrooke AR, Armstrong N, Welsman JR, Shore AC, Clark P, MacLeod KM (2005) Does aerobic fitness influence microvascular function in healthy adults at risk of developing Type 2 diabetes? *Diabetic Medicine* 22: 483–489
- 4) Lenasi H, Struel M (2004) Effect of Regular Physical Training on Cutaneous Microvascular Reactivity. *Med. Sci. Sports Exerc.* 36(4): 606-612.
- 5) Middlebrooke AR, Elston LM, Macleod KM, Mawson DM, Ball CI, Shore AC, Tooke JE (2006) Six months of aerobic exercise does not improve microvascular function in type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia* 49(10): 2263-2271. Epub 2006 Aug 30



**Table 1**

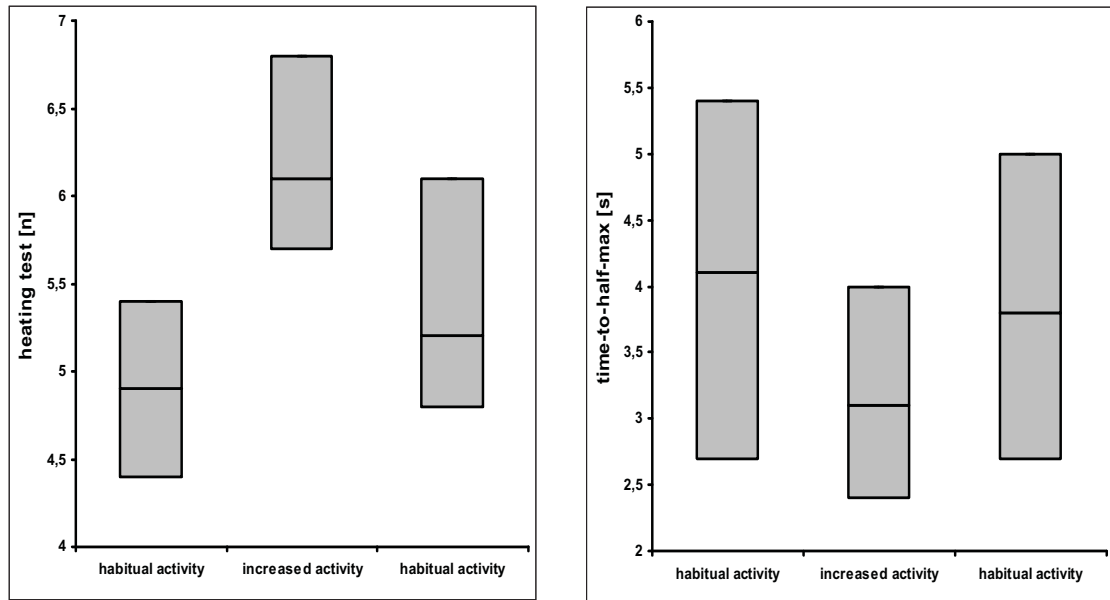
Subjects characteristics – median (interquartil range)

	<b>V2</b>	<b>V3</b>	<b>V4</b>	
steps count	3439 (2915 – 4230)	4189 (3335 – 5550)*	3489 (2917 – 4316)	
age				
diabetes duration				
systolic BP				
diastolic BP				
FPG [mmol/l]	8,4 (7,3 – 9,8)	8,4 (4,4 – 11,8)	8,5 (6,4 – 12,3)	NS
HbA1C [%]	6,4 (6,1 – 7,6)	6,5 (4,7 – 8,5)	6,3 (5,5 – 6,7)	NS
triglyceride [mmol/l]	2,4 (1,6 – 3,0)	2,4 (1,5 – 3,3)	2,2 (1,8 – 2,6)	NS
cholesterol [mmol/l]	4,8 (4,0 – 5,5)	4,4 (4,2 – 4,8)	4,7 (4,1 – 4,9)	NS
weight gain [kg]	0,1 (-0,4 – +0,8)	0,3 (-0,4 – +0,5)	0,5 (+0,1 – +0,5)	NS

\*  $p < 0.001$

**Fig. 1**

Microvascular reactivity results – LDF heating test (left) and LDF post-occlusion hyperemia test (right)

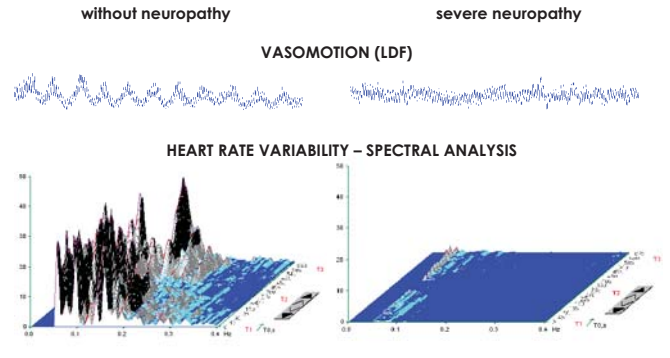


# SKIN MICROVASCULAR FLOW SPECTRAL ANALYSIS IN DIABETES AND ITS CONNECTION TO CARDIOVASCULAR NEUROPATHY

M. Krcma, D. Cechurova, J. Gruberova, S. Lacigova, Z. Rusavy  
Diabetology centre, 1st Dept. of Internal Medicine, University Hospital and Charles University Plzeň

## ABSTRACT

Cardiovascular neuropathy is common complication of diabetes mellitus, brings higher morbidity and mortality due to sudden cardiac death. Some literary data showed there is no correlation between cardiovascular autonomic neuropathy (CAN) and skin microcirculation flow. Whereas in many studies is decreased sympathetic activity supposed to be a reason of constricted nutrition capillaries in favour of arteriovenous shunts. Our task was to find relation between cardiovascular neuropathy and spectral power of skin microvascular flow variability (vasomotion). In 61 patients with diabetes mellitus type 1 was examined CAN by standard methods (Ewing tests, spectral analysis) and foot skin microcirculation by laser-doppler flowmetry with spectral power calculations in ranges corresponding with endothelial, sympathetic, intrinsic myogenic, breathing and cardiac activity. Subjects were divided into two groups with and without CAN; groups were comparable in age, gender, diabetes duration, triglyceride and cholesterol level, blood pressure and BMI. There was neither observed difference in basal microcirculation flow nor in heating test (increase 8,6x vs. 8,3x). In subjects with CAN was significantly lower spectral power in endothelial ( $p < 0.01$ ) and sympathetic ( $p < 0.005$ ) range. In myogenic range was observed lower spectral power with borderline significance ( $p = 0.06$ ) in subjects with CAN.



## AIM

- > Find dependency between skin perfusion and skin microvasculatory reactivity in diabetic patients type 1 with and without cardiovascular autonomic neuropathy (CAN)
- > Find relation between skin perfusion variability and CAN
- > Provide preliminary evaluation if LDF measured vasomotion spectral power can predict CAN

## METHODS

CAN examination - VariaCardio (VarCor PC) – spectral analysis, Ewing tests  
LDF examination - Periflux 5000 – probe on instep skin of non-dominant leg  
statistical analysis - Perisoft, Merlin for Excel, Statistica (FFT)

## STUDY GROUP

	without CAN	severe CAN	
subjects [M/F]	13/16	14/18	NS
age [y]	32.4 ± 11.5	37.6 ± 10.4	NS
HbA1c [% IFCC]	7.5 ± 2.6	7.8 ± 2.6	NS
cholesterole [mmol/l]	5.1 ± 1.0	5.4 ± 2.3	NS
triglycerides [mmol/l]	1.3 ± 0.7	1.6 ± 1.8	NS
TF [min-1]	68 ± 8	80 ± 9	$p < 0.01$
STK [mmHg]	116 ± 13	120 ± 12	NS
DTK [mmHg]	71 ± 10	72 ± 11	NS
retino/nephro/neuropathy	8 / 3 / 4	7 / 5 / 10	
macroangiopathy	2	3	

**Heart rate spectral analysis** – frequentional analysis of RR intervals from ECG, tested total power (LF + HF), LF/HF (sympathetic activity), age adjusted

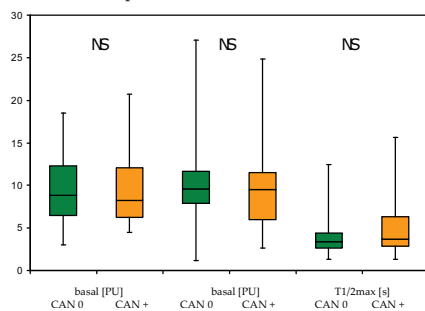
- ❖ HF (0.15 – 0.50 Hz) – parasympathetic (vagal) response
- ❖ LF (0.05 – 0.15 Hz) – sympathetic response
- ❖ VLF (0.02 – 0.05 Hz) – RAAS, termoregulation, neuropeptides

**Laser doppler spectral analysis** – vasomotion

- ❖ 0.009 – 0.02 Hz – endothelial activity
- ❖ 0.020 – 0.06 Hz – sympathetic tone
- ❖ 0.060 – 0.20 Hz – intrinsic myogenic activity
- ❖ 0.200 – 0.60 Hz – respiratory arrhythmia
- ❖ 0.600 – 1.60 Hz – cardiac activity – pulse

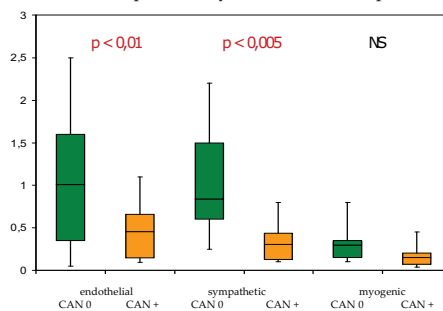
## RESULTS

### A. CAN & skin perfusion



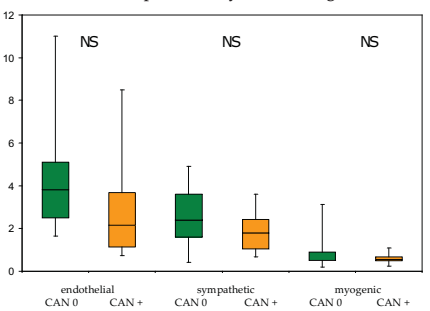
No differences between group with and without CAN. The same results in baseline, heat response 44°C, PORH.

### B. CAN & LDF spectral analysis in basal skin temperature



Significantly lower spectral power in subjects with CAN in endothelial and sympathetic portion.

### C. CAN & LDF spectral analysis in heating 44°C

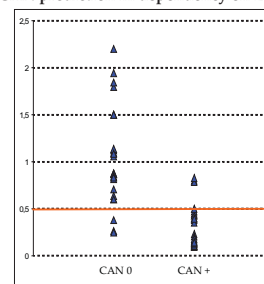


No differences between group with and without CAN.

## CONCLUSION

- In subjects with severe cardiovascular neuropathy is lowered LDF spectral power in sympathetic response region
- Adequately is lowered endothelial spectral power
- Skin microcirculation perfusion and microvasculatory reactivity is equal in both groups
- CAN prediction from LDF variability records is basically feasible, but there is lack of evidence

### CAN prediction in dependency on LDF-measured sympathetic activity



sensitivity 79%  
specificity 84%  
positive predictive value 85%  
negative predictive value 78%

## THE EFFECT OF PLATELET RICH PLASMA IN LOCAL TREATMENT OF DIABETIC FOOT SYNDROME

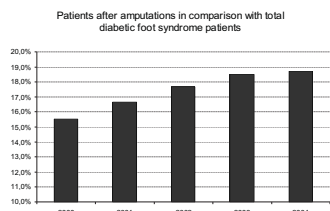
Krčma M, Jankovec Z, Rušavý Z.

Diabetology Center, 1st Dept. of Internal Medicine, Charles University and University Hospital Plzeň, Czech Republic

### INTRODUCTION

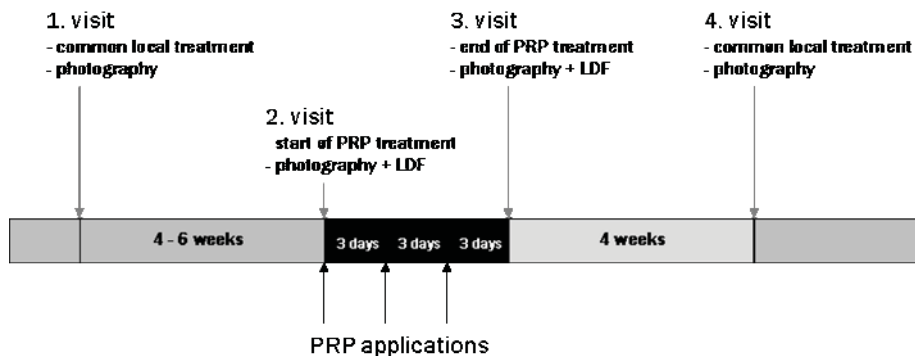
Diabetic foot syndrome is one of the most alarming complications of both types of diabetes mellitus. Diabetic foot also increases mortality (due to sepsis, peri- and postoperative mortality) and brings large expenses for healthcare.

Last time not only in our country the number of amputations increases, about 19% of all diabetic foot syndrome patients undergo small (toes or transmetatarsal) or higher amputation. Application of platelet rich plasma (PRP) as a new method of local treatment could assist to improve this negative trend.



### DESIGN

Platelet rich plasma contains about ten times higher concentration of platelets - thrombocytes. We used autologous PRP acquired by repeated centrifugation patient's blood. Two most important growth factors released from platelets, platelet derived growth factor (PDGF) and transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) were in



photography (at the beginning of treatment, at the end of treatment, 4-5 weeks after treatment) and before and after application of PRP was examined skin microcirculation in surrounding area by laser-doppler flowmetry.

### RESULTS

During the study, in 4-5 weeks the area of ulcer decreased in average of 35%, in comparison with 5% in previous 5 weeks. There were observed neither local inflammation nor bacterial colonization. Skin perfusion, measured by laser-doppler flowmetry, was slightly increased. Difference was not statistically significant. Detailed reasons with statistical assessment were not performed because to small number of patients.

#### BEFORE (V2):



#### AFTER (V4):



### SUBJECTS

All patients were exact informed about the procedures and signed informed consent. Protocol of this study has been approved by ethical committee.

#### Inclusion criteria:

- diabetes foot syndrome ischemic (or predominantly ischemic) etiology
- ulcer lasting over 2 months
- in last 4 weeks stable area and depth
- without inflammation, without antibiotic treatment

#### Exclusion criteria:

- planned or recent (2 months) intervention (PTA, by-pass, amputation)
- cardiac failure (EFLV < 35%)
- connective tissue disorders (vasculitis, etc.)
- corticosteroid or immunosuppressive treatment
- end stage chronic kidney disease
- dialysis

Two most important growth factors released from platelets, platelet derived growth factor (PDGF) and transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) were in last decades researched and its effect to angiogenesis and cell proliferation was proven in number of studies in vitro and in some studies in vivo (7). Nowadays, PRP has been used with success in dentistry (3, 5) and cardio surgery to improve healing wounds. Our theory was, through improvement angiogenesis and the microcirculation in the patients with grave impairment of microcirculation due to diabetes, to contribute to healing ulcers. After good debridement, gel from PRP was applied to the ulcer for three days under occlusive covering.

Effect of therapy was observed by measuring area of ulcer from digital

### PHARMACOECONOMICS

#### Sweden

- costs for one patient's treatment:
  - without amputation 51.000 SEK (3.000 - 808.000)
  - with amputation 344.000 SEK (27.000 - 992.000)

*Boulton, A.J.M., The diabetic foot: a global view. Diabetes Metab. Res. 2000*

Price for one patient's PRP treatment - 38.400 CZK ~ 1700 USD

### REFERENCES

- Bartáškova D., Kvapil.M. Náklady na terapii diabetu a pozdních komplikací v ČR. DMEV, Supplementum 1/2002;5: 11.
- Čechurová D., Lacičová S., Rušavý Z., Horáková N., Jankovec Z., Žourek M. Ekonomický pohled na syndrom diabetické nohy. Vnitř. Lék. 2003; 49: 453-456.
- Demiralp, B. et al. , Treatment of periapical inflammatory lesion with the combination of platelet-rich plasma and tricalcium phosphate: a case report. J.Endod. 30.11 (2004): 796-800.
- Eppley, B. L., J. E. Woodell, and J. Higgins. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. Plast.Reconstr.Surg. 114.6 (2004): 1502-08.
- Tozum, T. F. and B. Demiralp. Platelet-rich plasma: a promising innovation in dentistry. J.Can.Dent.Assoc. 69.10 (2003): 664.
- Boulton, A.J.M. The diabetic foot: a global view. Diabetes Metab. Res. Rev. 16(suppl.1), 2000, S2-S5
- Wieman TJ, Smiell JM, Su Y. Efficacy and safety of a topical gel formulation of recombinant human platelet-derived growth factor-BB (becaplermin) in patients with chronic neuropathic diabetic ulcers. A phase III randomized placebo-controlled double-blind study, Diabetes Care. 1998 May;21(5):822-7.

# THE EFFECT OF PLATELET RICH PLASMA IN LOCAL TREATMENT OF DIABETIC FOOT SYNDROME

MUDr. Michal Krčma, Doc. MUDr. Zdeněk Rušavý, Ph.D.

Diabetologic Centre, 1<sup>st</sup> Department of Internal Medicine, University Hospital, Plzeň

## **Introduction:**

Diabetic foot syndrome is one of the most alarming complications of both types of diabetes mellitus. Its incidence still grows in absolute numbers. Diabetic foot also increases mortality (due to sepsis, peri- and postoperative mortality) and brings large expenses for healthcare. Strongly limits patient's quality of life. Last time not only in our country the number of amputations increases, about 19% of all diabetic foot syndrome patients undergo small (toes or transmetatarsal) or higher amputation. Application of platelet rich plasma (PRP) as a new method of local treatment could assist to improve this negative trend.

## **Methods:**

Platelet rich plasma contains about ten times higher concentration of platelets – thrombocytes. We used autologous PRP acquired by repeated centrifugation patient's blood. Two most important growth factors released from platelets, platelet derived growth factor (PDGF) and transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) were in last decades researched and its effect to angiogenesis and cell proliferation was proven in number of studies in vitro and in some studies in vivo (7). Nowadays, PRP has been used with success in dentistry (3, 5) and cardio surgery to improve healing wounds. Our theory is, through improvement angiogenesis and the microcirculation in the patients with grave impairment of microcirculation due to diabetes, to contribute to healing ulcers. Inclusion criteria fulfilled patients with diabetic foot syndrome ischemic (or predominantly ischemic) etiology, with non-healing ulcers for two months, stable in last month, without inflammation or antibiotic treatment. Exclusion criteria cover patients with vascular reconstruction (lower leg by-pass) or angioplasty in previous two months, patients with grave heart ischemia (NYHA III-IV), autoimmune disorders or patients treated with corticosteroids. After good debridement, gel from PRP was applied to the ulcer for three days under occlusive covering. After that was performed microbiological examination and next application of PRP gel. Every patient undergoes three applications of PRP. Effect of therapy was observed by measuring area of ulcer from digital photography (at the beginning of treatment, at the end of treatment, 4-5 weeks after treatment) and before and after application of PRP was examined skin microcirculation in surrounding area by laser-doppler flowmetry.

## **Results:**

During the study, in 4-5 weeks the area of ulcer decreased in average of 35%, in comparison with 5% in previous 5 weeks. There were observed neither local inflammation nor bacterial colonization. Skin perfusion, measured by laser-doppler flowmetry, was slightly increased. Difference was not statistically significant. Detailed reasons with statistical assessment were not performed, because this was pilot study with very small number of patients.

## **Discussion:**

What should I mention at first; it was a very small group of patients. This pilot study include five patients; three with ulcers 1.-2.st. (according to Wagner classification), two with long time non-healing wound after

transmetatarsal amputation, where was considered higher amputation. It didn't include whole wide spectrum of diabetic ulcers, especially Wagner 3 and 4.

This study hadn't a control group. Every patient was control for himself. We compared healing (change of ulcer area) during 5 weeks standard therapy and 4 weeks after PRP applications. Absence of control group presents a limit for our study in the view of evidence based medicine.

All patients were for PRP treatment (9 days) admitted to the hospital. Influence of leg immobilization is not so big comparing with neuropathic ulcers, but it isn't possible to completely forget this factor. Randomized study answers this question satisfactory.

Important part of problematic, especially now in Czech Republic, is also farmaco-economical aspects. Two studies have been finished; in first in Sweden, total cost of healthcare for one patient was 51.000 SEK (3.000 – 808.000) without amputation and 344.000 SEK (27.000 – 992.000) with amputation (6). In second study in Czech Republic were average expenses for one patient 34.500 CZK (6.300 – 190.200) in case of uncomplicated course and 53.700 CZK (18.000 – 180.600) for patients with complications (2). Treatment with PRP gel costs (consumables) 38.040 CZK for one patient.

#### **Conclusion:**

Local application of PRP can be advantageous method for some of our diabetic patients, suffering by diabetic foot syndrome. It needs larger randomized, at least single blind study, for evidence of effect with statistical assessment.

#### **Literature:**

1. Bartášková D., Kvapil M. Náklady na terapii diabetu a pozdních komplikací v ČR. DMEV, Supplementum 1/2002;5: 11.
2. Čechurová D., Lacigová S., Rušavý Z., Horáková N., Jankovec Z., Žourek M. Ekonomický pohled na syndrom diabetické nohy. Vnitř. Lék. 2003; 49: 453-456.
3. Demiralp, B. et al. , Treatment of periapical inflammatory lesion with the combination of platelet-rich plasma and tricalcium phosphate: a case report. J.Endod. 30.11 (2004): 796-800.
4. Eppley, B. L., J. E. Woodell, and J. Higgins, Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. Plast.Reconstr.Surg. 114.6 (2004): 1502-08.
5. Tozum, T. F. and B. Demiralp, Platelet-rich plasma: a promising innovation in dentistry. J.Can.Dent.Assoc. 69.10 (2003): 664.
6. Boulton, A.J.M, The diabetic foot: a global view. Diabetes Metab. Res. Rev. 16(suppl.1), 2000, S2-S5
7. Wieman TJ, Smiell JM, Su Y, Efficacy and safety of a topical gel formulation of recombinant human platelet-derived growth factor-BB (becaplermin) in patients with chronic neuropathic diabetic ulcers. A phase III randomized placebo-controlled double-blind study, Diabetes Care. 1998 May;21(5):822-7.

#### **Souhrn:**

Úspěšná léčba syndromu diabetické nohy je stále velkým problémem jak z lékařského tak i z ekonomického hlediska. Cílem naší práce bylo ukázat možnost využití trombocyty obohacené krevní plazmy, získané separací z



krve pacienta, v léčbě dlouhodobě se nehojících ischemických nebo převážně ischemických diabetických defektů, kde byly vyčerpány ostatní běžně používané možnosti léčby. Principem účinku je podpora angiogeneze a hojení defektu růstovými faktory vyplavovanými z granul trombocytů (PDGF, TGF- $\beta$ ). Pilotní studie se zúčastnilo 5 pacientů, u nichž po aplikaci PRP došlo během 4 týdnů k 35% zmenšení plochy defektu proti max. 5% změnám plochy defektu v předchozích alespoň 5 týdnech. Došlo též ke statisticky nevýznamnému zlepšení kožní perfúze. Získaná data budou podkladem pro design randomizované jednoduše zaslepené studie na větším počtu pacientů.

# POST-OCLUSION PEAK FLOW - USEFUL DIAGNOSTIC TEST FOR LASER DOPPLER FLOWMETRY IN DIABETIC PATIENTS?

A-232-0010-00314

M. Krčma, J. Gruberova, J. Meinlova, Z. Jankovec, Z. Rusavy  
1st Dept. of Clinic Medicine, University Hospital Plzeň, Czech Republic

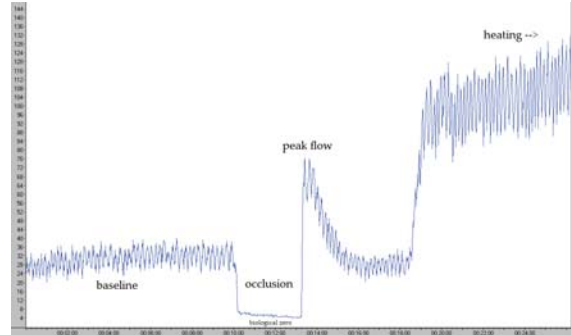
## ABSTRACT

**Introduction:** In addition to transcutaneous oximetry, laser Doppler flowmetry provides some important information about microvascular reactivity and cutaneous blood flow. There are many papers concerning diabetic foot syndrome, which are looking for a standard microcirculation assessment method (e.g. standard provocation test). Measuring basal flow itself is not sufficient, most widely used tests are heating test and post occlusion hyperemia test. Both tests have some disadvantages for common clinical practice - heating test lasts at least 20-30 minutes, standard evaluation of post occlusion hyperemia test (counting time to half before hyperemia) is strong dependent upon examiner's skills.

**Aim:** Our aim was to find a parameter, which can be simple measured from PORH test and highly correlated to heating test (relative flow rise in maximum vasodilatation).

**Methods:** We undertook retrospective analysis of 120 LDF measurements in 105 patients with diabetes type 1 and 2, with and without peripheral neuropathy. Statistical assessment was performed using Spearman's correlation test.

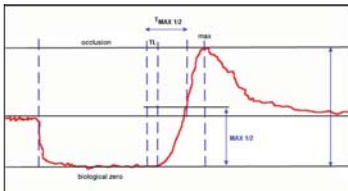
**Results:** PF (peak flow) to baseline rate after hyperemia correlates tight with heating test results (correlation coefficient 0.95;  $p < 0.01$ ). Second best parameter is basal flow itself with poorer results (correlation coefficient 0.72;  $p = 0.05$ ).



## AIM

- Find a robust and simple parameter from post-occlusion relative hyperemia test, which is well correlated with maximal vasodilatation after heat exposure (44°C)
- Compare others parameters from PORH curve
- Find a robust method for nearly all shapes of PORH curves

## METHODS



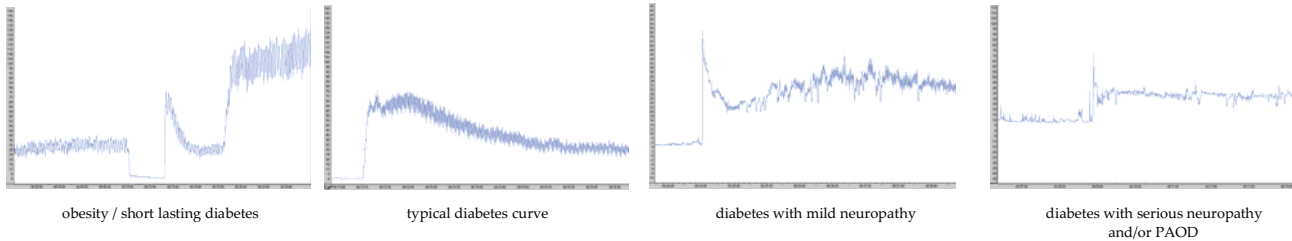
**Patient selection** - randomly selected patients with sufficient data were enrolled  
**LDF examination** - Periflux 5000 – probe on instep skin of non-dominant leg  
**Statistical analysis** - Perisoft, Merlin for Excel

**Measured parameters (see fig. in left):**  
 baseline flow, biological zero in occlusion, time to reach maximum perfusion, time to reach half maximum, peak flow after occlusion rest

## STUDY GROUP

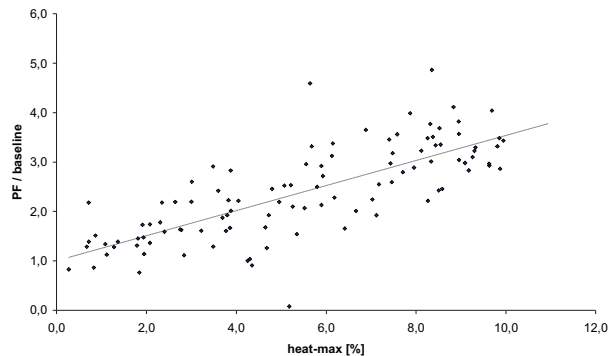
subjects DM / non-DM	94 / 11
age [y]	58 ± 19
BMI [kgm <sup>-2</sup> ]	29 ± 6
lasting DM [yr]	14 ± 11
HbA1c [% IFCC]	6,2 ± 1,8
cholesterol [mmol/l]	4,8 ± 1,2

Different shapes of PORH curves:



## RESULTS

parameter	baseline	biological zero (BZ)	peak flow (PF)	time to max	time to half max	PF / baseline	BZ / baseline
correlation	<b>0.72</b>	-0.56	0.55	-0.32	-0.15	<b>0.95</b>	0.29
	<b>p = 0.05</b>	p = 0.1	p = 0.06	p = 0.3	p = 0.5	<b>p &lt; 0.01</b>	p = 0.3



## CONCLUSION

- ❖ PF (peak flow) to baseline rate after hyperemia correlates tight with heating test results (correlation coefficient 0.95;  $p < 0.01$ ).
- ❖ Second best parameter is basal flow itself with poorer results (correlation coefficient 0.72;  $p = 0.05$ ).
- ❖ Time to half max or time to max did not correlate significantly
- ❖ Peak flow assessment seems to be a good method for skin microcirculation examination in subjects with serious neuropathy or peripheral arterial occlusion disease, where are PORH curves garbled with artifacts