

Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Plzni

I. interní klinika FN Plzeň

MUDr. Michal Krčma

VYŠETŘOVACÍ METODY MIKROCIRKULACE KŮŽE U SYNDROMU DIABETICKÉ NOHY

Autoreferát disertační práce

obor: Vnitřní nemoci
Plzeň 2010



Disertační práce byla vypracována v rámci kombinované formy doktorského studijního programu v oboru Vnitřní nemoci na I. interní klinice FN a LF UK v Plzni.

Uchazeč:

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

Školitel:

Prof. MUDr. Zdeněk Rušavý, Ph.D.
I. interní klinika FN Plzeň, LF UK Plzeň

Oponenti:

Prof. MUDr. Karel Horký, DrSc.
II. interní klinika VFN Praha, 1. LF UK Praha

Prof. MUDr. Jan Filipovský, CSc.
II. interní klinika FN Plzeň, LF UK Plzeň

Doc. MUDr. Martin Prázný, CSc., Ph.D.
III. interní klinika VFN Praha, 1. LF UK Praha

S disertační prací je možno se seznámit na Děkanátu LF UK Plzeň, Husova 3.

Autoreferát byl rozeslán dne:

Obhajoba disertační práce se koná dne, LF UK Plzeň, Šafránkův pavilon, Alej Svobody 31, Plzeň

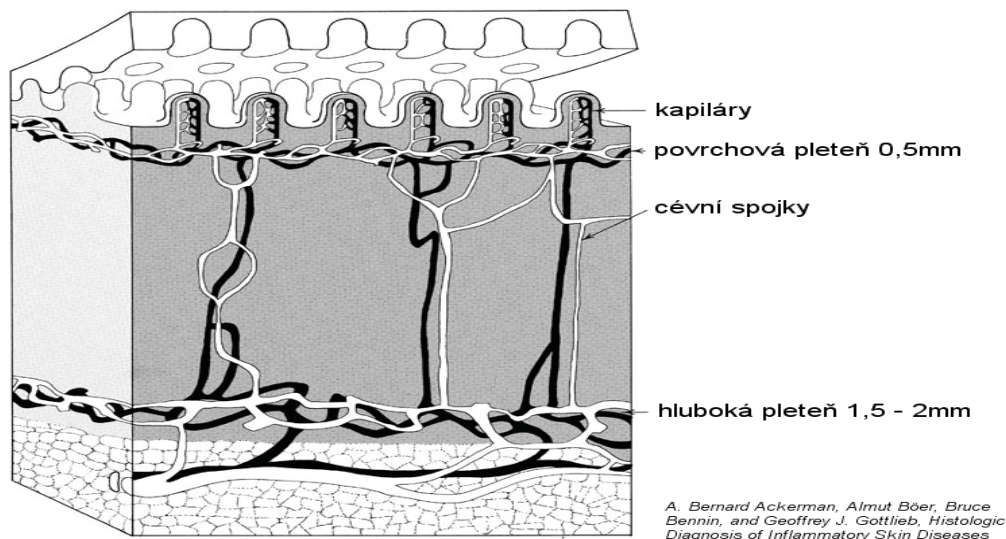
1. Úvod	4
2. Mikrocirkulace kůže diabetického pacienta	4
3. Vliv inzulínu na parametry mikrocirkulace	6
4. Vyšetřovací metody mikrocirkulace kůže	8
4.1. Transkutánní oxymetrie (tcpO ₂)	8
4.2. Přímá kapilaroskopie	8
4.3. Laser-doppler flowmetrie (LDF)	8
4.3.1. Iontoforéza	9
4.3.2. Laser Doppler Perfusion Imaging	10
4.3.3. Spektrální analýza vasomoce	10
4.3.4. Praktické aplikace LDF a transkutánní oxymetrie	10
5. Cíle výzkumu	11
6. Vliv fyziologické a suprafyziologické inzulinémie na reaktivitu kožní mikrocirkulace u zdravých dobrovolníků	12
6.1. Metodika	12
6.2. Výsledky	13
6.3. Diskuse a limitace práce	14
6.4. Závěr	15
7. Vliv samotné fyzické aktivity na reaktivitu kožní mikrocirkulace u nemocných v riziku syndromu diabetické nohy.	15
7.1. Metodika	15
7.2. Výsledky	16
7.3. Diskuse a limitace práce	17
7.4. Závěr	17
8. korelace mezi přítomností kardiovaskulární autonomní neuropatie a jednotlivými komponentami spektrální analýzy laser-doppler flowmetrie	17
8.1. Metodika	17
8.2. Výsledky	18
8.3. Diskuse a závěry	19
9. Využití vyšetření mikrocirkulace u sledování hojení rány po aplikaci gelu z autologní plazmy	19
9.1. Platelet rich plasma	19
9.2. Metodika	20
9.3. Výsledky	20
9.4. Diskuse a závěry	20
10. Určení robustního parametru popisujícího PORH křivku ve vztahu k vzestupu perfúze po zahřátí.	21
10.1. Úvodní poznámky	21
10.2. Metodika	22
10.3. Výsledky a závěr	22
11. Literatura	22
12. Publikační činnost autora	27

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. Většinou konvenčních vyšetřovacích metod je dostupná kožní mikrocirkulace, jejíž řečiště je uloženo v dermis ve dvou pleteních. První, subpapilární pletěň, se nachází blízko rozhraní epidermis/dermis cca v hloubce 500 mikrometrů pod povrchem kůže a její hlavní funkcí je výživa, druhá, kožní pletěň 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 (1)



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 (22). U diabetické neuropatie je i klinicky končetina teplejší, pletysmograficky jsou známky vyšší perfúze. Tato skutečnost je doložena řadou prací – 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 (49). 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. (28) 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 (60), kde byla měřena perfúze na dorzu nohy, nebyly pozorovány signifikantní změny perfúze za bazálních podmínek, při stimulaci teplotou (44°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. (31), 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 (56), kdy byla u zdravých normotenzních dobrovolníků hyperinzulinemickým euglykemickým clampem nejprve zjištěna senzitivita k inzulinu. 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 inzulinovou senzitivitou a statisticky nevýznamně negativně s průměrným systolickým krevním tlakem během předcházející 24-hodinové monitorace. Poměr pas-boky (WHR) signifikantně negativně koreloval s inzulinovou senzitivitou, i vazodilatací způsobenou acetylcholinem.

Stav mikrocirkulace podle některých prací závisí na dlouhodobé kompenzaci diabetu, jeho zhoršení popisuje Jörneskog et al. (30) u pacientů s chronickou dekompenzací diabetu ($HbA_{1C} < 7,5$), 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. (32), funkční abnormality mikrocirkulace kůže u diabetiků je možno normalizovat těsnou kompenzací diabetu, na rozdíl od nevratných morfologických změn, které jsou dány ztlustělou bazální membránou kapilár (76), zvýšenou tuhostí prekapilárních cévních stěn způsobenou zvýšenou glykosylací proteinů a tvorbou pozdních produktů glykace (48). Podobné výsledky ukazují i práce Le Devehat et al. (38), kde u pacientů s chronickou dekompenzací diabetu byly zjištěny změny v kapilárním řečišti; po zahájení inzulinové terapie došlo k regresi těchto změn.

Lokální mikrovaskulární regulaci narušuje i endoteliální dysfunkce (25, 61). 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 tence myelinizovaných C vláken (60). Poruchy vasomoce u diabetiků popisuje i práce (44), 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 (73), 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 (80) porovnávala hodnoty $tcpO_2$ (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 (10), kde byly výsledkem signifikantně nižší hodnoty LDF u pacientů dosud bez defektů, ale s cévními komplikacemi nebo neuropatií (10). Negativní výsledky přinesla práce Lawal et al. (37), 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 tcpO₂ při teplotě sondy 37°C není dostatečně reprodukovatelné, je nutno měřit při 44°C.

TcpO₂ 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 (57) ukazuje význam provokačního testu s dýcháním čistého kyslíku – pacienti, kteří dosáhli dvojnásobné hodnoty tcpO₂ ve srovnání s klidovými podmínkami, měli statisticky výrazně lepší prognózu.

Zajímavým vylepšením výše uvedených metod k diagnostice souvislostí neuropatie a angiopatie je použití iontoforézy. Práce (3) 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 Morrise a spolupracovníků (47).

Vlivem oxidu dusného a prostaglandinů na krevní průtok se zabývala práce (36), 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 (27). U zdravých kontrol a diabetiků bez 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 (42, 72). Efekt inzulínu na mikrocirkulaci a tím na vznik nebo progresi pozdních komplikací diabetu je předmětem řady publikovaných prací.

V experimentu na zvířeti bylo pozorováno (5), že léčba inzulinem (1 měsíc) u diabetických potkanů zlepšila prokrvení nervu (n. ischiadicus) měřeného pomocí LDF; zároveň došlo k signifikantnímu zlepšení vodivosti motorickými i senzoryckými vlákny.

Vliv inzulinu podávaného intraarteriálně na hemodynamiku (69) byl předmětem studie, kdy za podmínek dvojité slepé studie byl zdravým mužům aplikován lokálně krátce působící inzulin do brachiální artérie rychlostí 1 a 5 mU/min po dobu 90 minut. Pletysmograficky byl měřen krevní průtok. Vyšší dávka inzulinu způsobila ve srovnání s placebem statisticky významnou vasodilataci (20%). Podání inzulinu + L-glukózy (metabolicky neaktivní stereoizomer) nezpůsobilo zvýšení vasodilatace proti samotnému inzulinu, aplikace inzulinu + D-glukózy vyvolalo vyšší zvýšení perfúze v porovnání se samotným inzulinem (47% proti placebo). Infúze glukózy sama o sobě neměla za následek signifikantní změny v průtoku krve. Tooke (65) zkoumal efekt inzulinu u diabetiků 1. typu při použití dvou různých rychlostí infúze (1,5u/h, 15u/h), při nižší dávce inzulinu 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. Inzulin působí vazodilataci kožních kapilár - měřeno LDF, kapilaroskopií, reaktivní hyperémie po 60s arteriální (200mmHg) a 30s venózní (50mmHg) okluze. V jiné práci (71), kde probíhalo měření u zdravých dobrovolníků během hyperinzulinemického euglykemického clampu s třemi postupně narůstajícími hladinami inzulinémie (61 ± 2 , 139 ± 6 , 462 ± 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 inzulinemii (61 ± 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 (67).

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 (56) 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 v kombinaci s inzulinem po 10 týdenní léčbě zvyšuje procento zhojení defektů u pacientů s diabetickou neuropatií (34) 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 (64) byl zaznamenán pokles hladiny fibrinogenu v periferní krvi, snížení průtoku AV shunty a zlepšení kapilárního průtoku a tkáňové oxygenace dle LDF a tcpO_2 . 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 (14). Změny přetrvávaly 1 týden po ukončení léčby. V podobné studii, trvající 2 týdny, došlo i k nárůstu tcpO₂ (9).

4. VYŠETŘOVACÍ METODY MIKROCIRKULACE KŮŽE

4.1. Transkutánní oxymetrie (tcpO₂)

První zkušenosti s měřením obsahu kyslíku v tkáni pocházejí z 80.let 20. století z USA. Narozdíl od běžně používaného měření saturace O₂, které stanovuje fotometrickou metodou procento hemoglobinu s navázaným kyslíkem z celkového hemoglobinu v krvi, stanovuje tcpO₂ 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). TcpO₂ lze použít s určitými výhradami jako marker průtoku nutritivními kapilárami (za předpokladu zachování konstantních vnějších podmínek experimentu). V klinické praxi se dnes tcpO₂ 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 O₂ klidový tcpO₂ 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 tkáně 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 okluzi 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-vlákna 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 (36).

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 glykocalyx, 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 (29).

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 (15), tedy s rychlostmi inzulínu 2,4 U/m²/hod a 6,0 U/m²/hod. U poloviny subjektů bylo zaměněno pořadí inzulinémií (tzn. nejprve 6,0 U/m²/hod a dále 2,4 U/m²/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 (65). 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 ⁻²]	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 – zahřátí (zahřátí sondy na 44°C mající za následek maximální vazodilataci) a okluzí (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 okluzy. Tyto provokační testy jsou standardem při vyšetřování perfúze tkání (2, 39, 74, 77) 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 tcpO₂ elektrody PF 5040 systému Periflux 5000 (Perimed, Švédsko), pracujícím na polarografickém principu (37). Zahřívána 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 (tcpO₂ – 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 (tcpO₂ – 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.

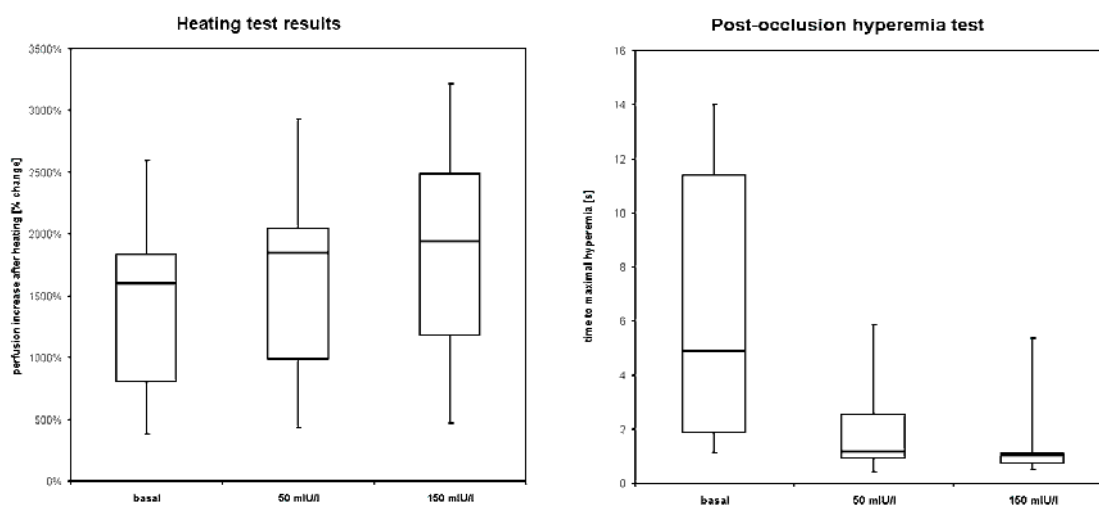
Tab. 2. Výsledky

	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 ^{NS} (9,2 – 21,8)	12,9 ^{NS} (8,6 – 29,9)
LDF test zahřátím [%]	1599 (801 – 1836)	1848 ⁺ (984 – 2046)	1937* (1177 – 2488)
LDF post-okluzivní reaktivní hyperémie [s]	4,9 (1,8 – 11,4)	1,2 ⁺ (0,9 – 2,6)	1,0* (0,7 – 1,1)
tcpO ₂ [mmHg]	38,9 (35,5 – 40,8)	48,6 ⁺ (45,5 – 49,7)	57,4 ⁺ (51,7 – 66,2)

⁺ $p < 0.05$

^{*} $p < 0.005$

^{NS} nesignifikantní



6.3. Diskuse a limitace práce

Alternativou k systémovému podání inzulínu je lokální kožní aplikace pomocí iontoforézy (13, 56), 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 napět'ově závislých natriových a kalciových kanálů indukovat vasokonstrikci (21). V některých starších studiích (65, 71) autoři popisují rozdíl od výsledku naší práce žádné, případně statisticky nevýznamné zvýšení perfúze mikrocirkulace následkem infúze inzulínu. Naproti tomu novější práce (13, 56) 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 (65, 71). 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 (23). 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 inzulinií) 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 (67), 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 inzulínorezistence a hyperinzulinémie, je transkutánní tlak kyslíku nepřímo úměrný inzulinií – s jejím zvýšením klesá (33). U obézních pacientek s metabolickým syndromem, ale bez diabetu, byla popsána (12) snížená

vasomoce a redukce odpovědi na lokálně podaný inzulín. Tato data nasvědčují odlišnému chování řečiště mikrocirkulace u hyperinzulinémických inzulinorezistentních pacientů, kde je odpověď mikrocirkulace na exogenní podání inzulínu alterována a nedochází ke zlepšení nutritivní perfúze (možná dokonce ke zhoršení), zatímco u pacientů senzitivních na inzulín 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 (78). 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 inzulínu vede hyperinzulinémie k vzestupu reaktivity mikrocirkulace i vzestupu transkutánního tlaku kyslíku. Tento efekt se zvyšující se hladinou inzulínu nelineárně stoupá. Rozdílný vliv inzulínu 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. Vyloučení 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 zachování 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 _{1c} [% 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.

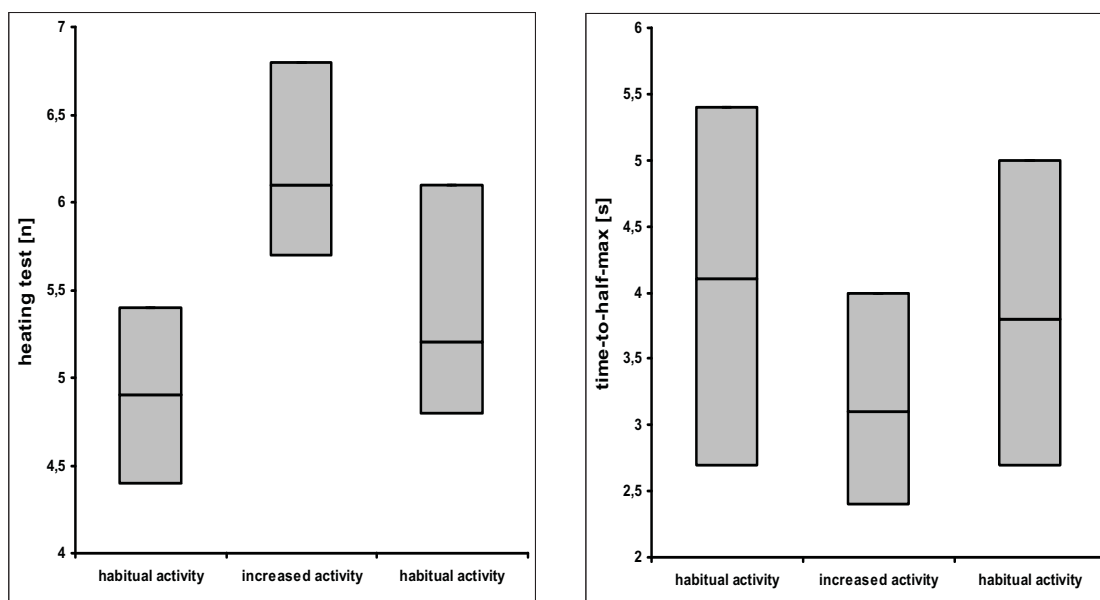
7.2. Výsledky

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)	p < 0,01
LDF postokluzivní reaktivní hyperémie [s]	4,1 (2,7 – 5,4)	3,1 (2,4 – 4,0)	3,8 (2,7 – 5,0)	p < 0,05

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 tcpO₂ představuje zajímavé zjištění. Hodnoty tcpO₂ byly v normálním rozmezí pro zdravou populaci (basal tcpO₂ > 30mmHg), pacienti byli bez ischemické choroby dolních končetin. Předpokládáme, že zde není periferní 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 déletrvajícího 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).

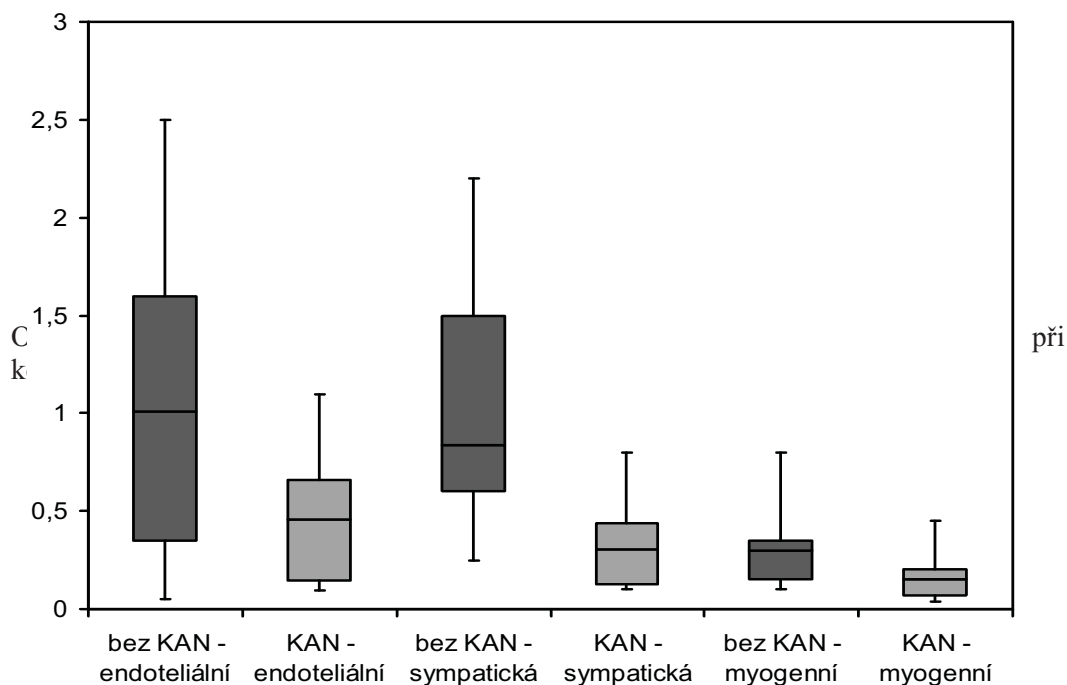
Byla provedena spektrální analýza obou záznamů s vypočtením spektrální síly v rozmezích odpovídající endoteliální aktivitě (0,009 – 0,02 Hz), aktivitě sympatiku (0,02 – 0,06 Hz), vlastní myogenní aktivitě (0,06 – 0,20 Hz), respiraci (0,2 – 0,6 Hz) a kardiální aktivitě (0,6 – 1,6 Hz). Výsledky byly zhodnoceny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

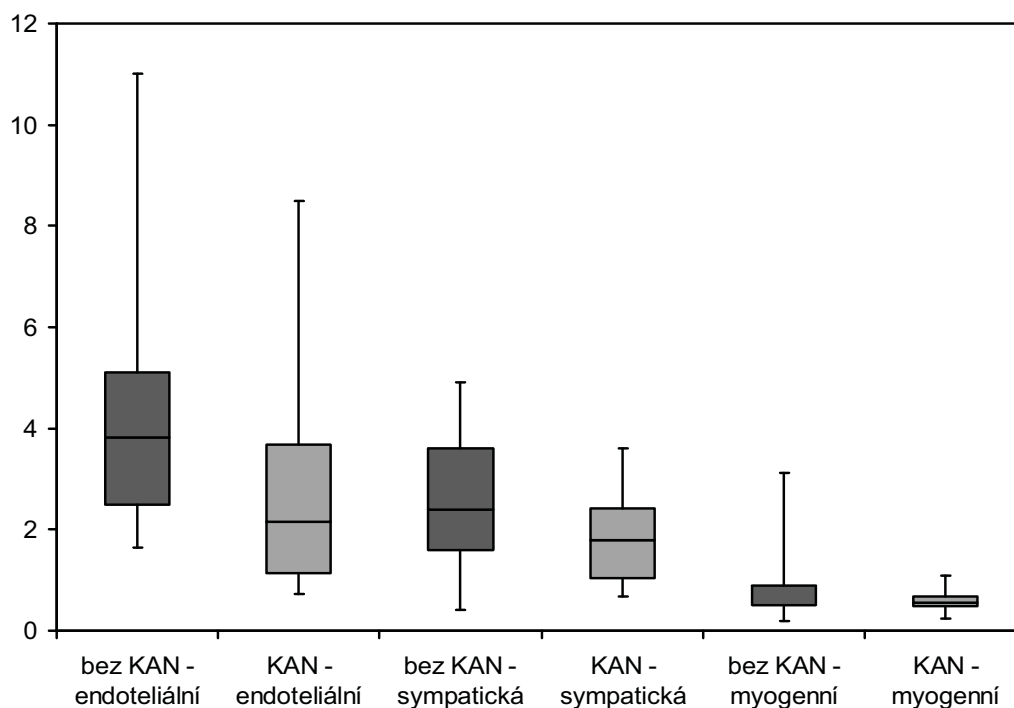
počet [M/Ž]	13/16	14/18	NS
věk [roky]	32,4 ± 11,5	37,6 ± 10,4	NS
HbA _{1C} [% IFCC]	7,5 ± 2,6	7,8 ± 2,6	NS
cholesterol [mmol/l]	5,1 ± 1,0	5,4 ± 2,3	NS
triglyceridy [mmol/l]	1,3 ± 0,7	1,6 ± 1,8	NS
TF [min⁻¹]	68 ± 8	80 ± 9	p < 0,01
STK [mmHg]	116 ± 13	120 ± 12	NS
DTK [mmHg]	71 ± 10	72 ± 11	NS
retinopatie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





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 ischemie 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 β (TGF- β), byly zkoumány v

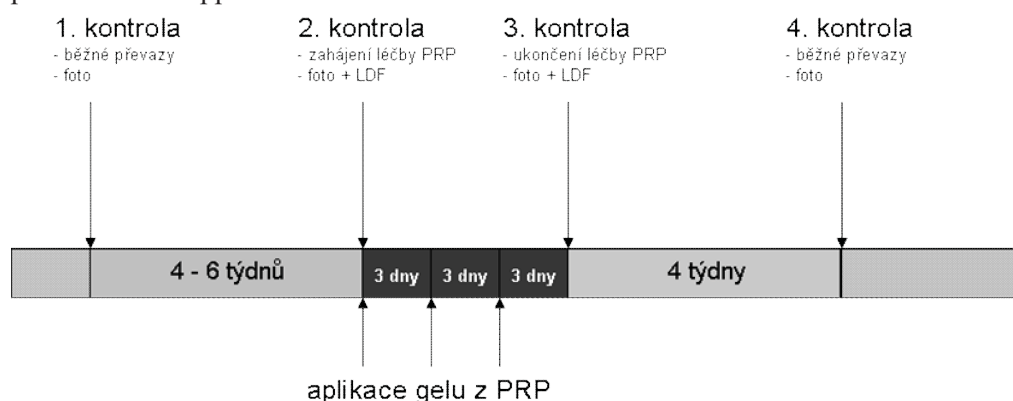
posledních desetiletích a jejich efekt in vitro na angiogenezu a proliferaci buněk byl dobře doložen.

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 nále. 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 transmetatarsální amputaci, kde byla zvažována vyšší amputace. Nebyli tedy zahrnuti pacienti s Wagner 3 a 4.

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.

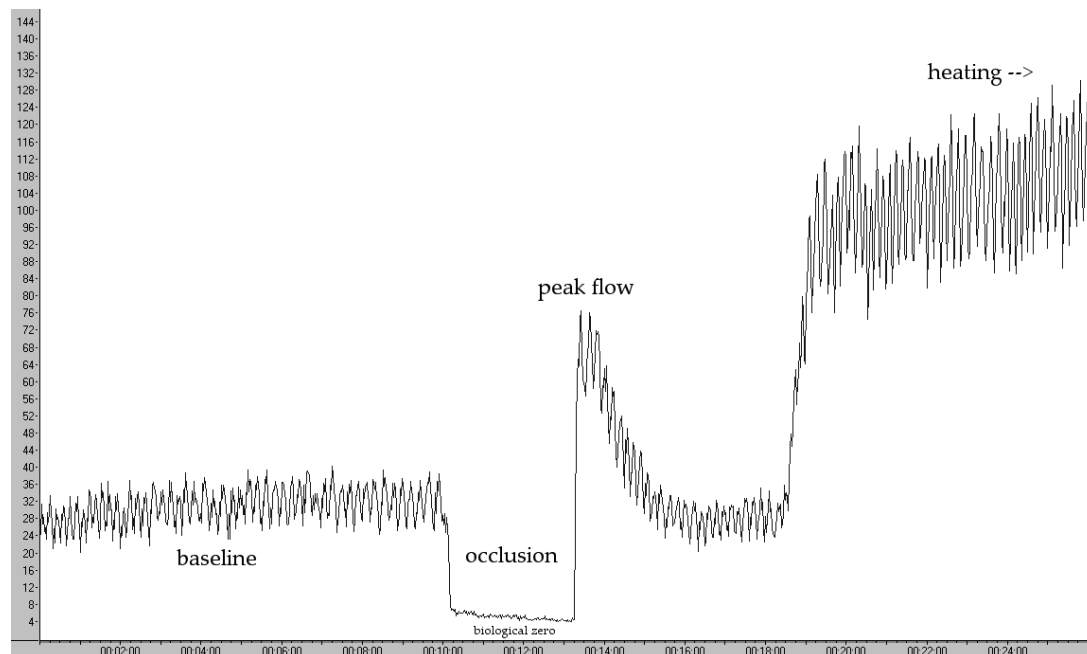
Všichni pacienti byli pro PRP léčbu (9 dnů) přijati k hospitalizaci. Vliv imobilizace končetiny není tak velký jako u neuropatické diabetické nohy, ale nelze jej také podceňovat. Pilotní studie ukázala slibný efekt gelu PRP na vzrůst mikrovaskulární perfúze a urychlení hojení ischemického jinak neřešitelného defektu. Přesněji odpoví až randomizovaná studie.

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

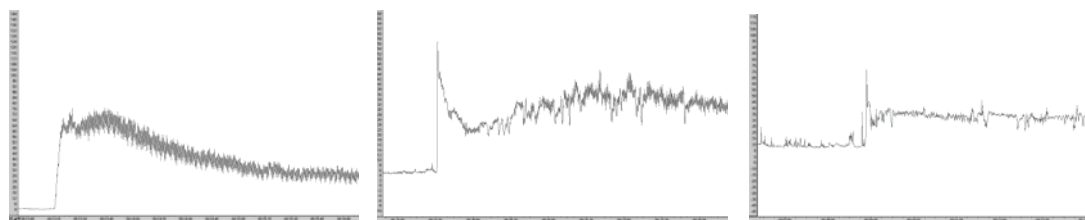
10.1. Úvodní poznámky

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 ⁻²]	29 ± 6
trvání diabetu DM [yr]	14 ± 11
HbA _{1c} [% 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	0,72	-0,56	0,55	-0,32	-0,15	0,95	0,29
	p = 0,05	p = 0,1	p = 0,06	p = 0,3	p = 0,5	p < 0,01	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.”

11. LITERATURA

1. Ackerman AB, Boer A, Bennin B, Histologic Diagnosis of Inflammatory Skin Diseases, Ardor Scribendi 2005

2. 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
3. Arora S et al., Differences in foot and forearm skin microcirculation in diabetic patients with and without neuropathy, *Diabetes Care* (1998) 21,1339-1344
4. Bartášková D., Kvapil.M. Náklady na terapii diabetu a pozdních komplikací v ČR. *DMEV, Supplementum* 1/2002;5: 11.
5. 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
6. Boulton, A.J.M, The diabetic foot: a global view. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 16(suppl.1), 2000, S2-S5
7. 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
8. 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
9. Cesarone MR et al., Two-week topical treatment with Essaven gel in patients with diabetic microangiopathy - placebo controlled, randomized study, *Angiology* 2001, Dec;52 Suppl 3: S43-48
10. Cobb JE, Claremont DJ, In-shoe measurement of plantar blood flow in diabetic subjects: results of a preliminary clinical evaluation, *Physiol Meas* 2002, May: 23(2):287-99
11. Čechurová D., Lacigová S., Rušavý Z., Horáková N., Jankovec Z., Žourek M. Ekonomický pohled na syndrom diabetické nohy. *Vnitr. Léč.* 2003; 49: 453-456.
12. 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
13. 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
14. De Sanctis MT et al., Four-week treatment with Essaven gel in diabetic microangiopathy – placebo controlled, randomized study, *Angiology* 2001, Dec;52 Suppl 3: S49-55
15. 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.
16. DeGraaff JC, Ubbink DT, Legemate DA, Tijssen JGP, Jacobs MJHM. Evaluation of toe pressure and transcutaneous oxygen measurements in management of chronic leg ischaemia: A diagnostic randomized clinical trial. *J Vasc Surg.* 2003; 38: 528-34.
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. Fife CE, Buyukecakir C, Otto G, Sheffield P, Mader J, Pontani B, Harrist R. The predictive value of transcutaneous oxygen tension measurement in diabetic lower extremity ulcers treated with hyperbaric oxygen therapy: a retrospective analysis of 1144 patients. *Wound Rep Regen.* 2002; 10: 198-207.
21. 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
22. Flynn, MD, Tooke JE, Microcirculation and the diabetic foot, *Vascular Medicine Review*, 1990, 1:121-138
23. Forst T, Lübber 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.
24. 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.

25. Furchgott RF. Role of the endothelium in responses of vascular smooth muscles. *Circ Res* 1983, 53:557-573
26. Hamdy O et al., Contribution of Nerve-Axon Reflex-Related Vasodilation to the Total Skin Vasodilation in Diabetic Patients With and Without Neuropathy, *Diabetes Care* 24: 344-349, 2001
27. 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.
28. 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
29. Hsin Hsiu et al, Microcirculatory characteristics of acupuncture points obtained by laser Doppler flowmetry, 2007 *Physiol. Meas.* 28 N77-N86
30. Jorneskog G et al., Pronounced skin capillary ischemia in the feet of diabetic patient with bad metabolic control, *Diabetologia* 1998 Apr;41(4):410-5
31. Karnafel W et al., Microcirculation in the diabetic foot as measured by a multichannel laser Doppler instrument, *Med Sci Monit* 2002, 8(7): MT137-44
32. Kastrop J, Mathiesen ER, Effect of strict metabolic control on regulation of subcutaneous blood flow in insulin-dependent diabetic patients. *Diabetic Med* 1987, 4: 30-36
33. 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
34. Koblik T et al., The effect of insulin and sulodexide on diabetic foot syndrome, *Journal of Diabetes and Its Complications* 15 (2001) 69-74
35. Kranke P, Bennett M, Roeckl-Wiedmann I, Debus S. Hyperbaric oxygen for chronic wounds. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2004; 2: CD004123.
36. Kvandal P et al., Regulation of human cutaneous circulation evaluated by laser Doppler flowmetry, iontophoresis and spectral analysis: importance of nitric oxide and prostaglandines, *Microvascular Research* 65 (2003) 160-171
37. 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.
38. Le Devehat C et al., Role and limits of glycemic regulation in the pathogenesis of diabetic microangiopathy, *Clin Hemorheol Microcirc.* 1997 Sep-Oct;17(5):363-70
39. 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.
40. Lenasi H, Struel M (2004) Effect of Regular Physical Training on Cutaneous Microvascular Reactivity. *Med. Sci. Sports Exerc.* 36(4): 606-612.
41. M.A. Vincent, D. Dawson, A.D.H. Clark, J.R. Lindner, S. Rattigan, M.G. Clark, and E.J. Barrett, Skeletal Muscle Microvascular Recruitment by Physiological Hyperinsulinemia Precedes Increases in Total Blood Flow, *Diabetes* 53:447-453, 2004
42. Malmberg K et al, Randomized Trial of Insulin-Glucose Infusion Followed by Subcutaneous Insulin Treatment in Diabetic Patients With Acute Myocardial Infarction (DIGAMI Study): Effects on Mortality at 1 Year, *JACC* Vol. 26, 7/1995.
43. McMillan DE, Deterioration of the microcirculation in diabetes, *Diabetes*, Vol 24, Issue 10 944-957 (1975)
44. Meyer MF et al., Impairment of cutaneous arteriolar 0.1 Hz vasomotion in diabetes, *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2003 Apr;111(2):104-10.
45. 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
46. 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 3
47. Morris SJ et al., Responses of the skin microcirculation to acetylcholine and sodium nitroprusside in patients with NIDDM, *Diabetologia*. 1995 Nov;38(11):1337-44
48. Mullarkey et al., Biochemical basis of microvascular diseases. In: *Chronic complications of diabetes*, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1994, 20-29
49. Netten P et al. Skin microcirculation of the foot in diabetic neuropathy, *Clinical Science* (1996) 91, 559-565

50. Padberg FT, Back TL, Thompson PN, Hobson RW 2nd. Transcutaneous oxygen (TcPO₂) estimates probability of healing in the ischaemic extremity. *J Surg Res.* 1996; 60: 365-369.
51. Poredos P, Rakovec S, Guzic-Salobir B. Determination of amputation level in ischaemic limbs using tcPO₂ measurement. *Vasa J Vasc Dis.* 2005; 34: 108-12.
52. Prázný M, Škrha J, Vyšetření kožní mikrocirkulace na horních končetinách u diabetiků 1. typu pomocí laser doppleru, *Časopis lékařů českých*, 2000
53. 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.
54. 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
55. Serné EH et al., Microvascular Function Relates to Insulin Sensitivity and Blood Pressure in Normal Subjects, *Circulation* 1999; 99:896-902
56. Serné, EH et al., Direct Evidence for Insulin-Induced Capillary Recruitment in skin of Healthy Subjects During Physiological Hyperinsulinemia, *Diabetes* Vol.51, 5/2002.
57. Sheffield PJ, Bakken B, Use of Transcutaneous Oximetry and Laser Doppler with Local Heat Provocation to Assess Patients with Problem Wounds, *Perimed Sweden*, nepublikované pozorování
58. Sheffield PJ. Measuring tissue oxygen tension: a review. *Undersea Hyperb Med.* 1998; 25: 179-88.
59. Smart DR, Bennett MH, Mitchell SJ. Transcutaneous oximetry, problem wounds and hyperbaric oxygen therapy. *Diving and Hyperbaric Med* 2006; 36: 72-86.
60. Stansberry, KB et al. , Impairment of Peripheral Blood Flow Responses in Diabetes Resembles an Enhanced Aging Effect, *Diabetes Care* (1997) 20: 1711-1715
61. Stehouwer CDA et al., Endothelial dysfunction precedes development of microalbuminuria in IDDM, *Diabetes* 1995, 44:561-564
62. Steinberg HO, Baron AD, Insulin mediated vasodilation: why ones physiology could be the others pharmacology, *Diabetologia* (1999) 42:493-498
63. Strauss MB, Bryant BJ, Hart GB. Transcutaneous oxygen measurements under hyperbaric oxygen conditions as a predictor for healing of problem wounds. *Foot Ankle Int.* 2002; 23: 933-7.
64. Svetukhin AM et al., Experience in the use of sulodexide in patients with suppurative-necrotic forms of diabetic foot without critical ischemia, *Ter Arkh* 2001: 73(4):31-3
65. 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)
66. Tozum, T. F. and B. Demiralp, Platelet-rich plasma: a promising innovation in dentistry. *J.Can.Dent.Assoc.* 69.10 (2003): 664.
67. 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
68. Ubbink DT et al., Can transcutaneous oximetry detect nutritive perfusion disturbances in patients with lower limb ischemia? *Microvascular research* 1995, 49:315-324
69. 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
70. Urbanová R et al, Transkutánní oxymetrie v diagnostice ischemické choroby dolních končetin u diabetiků, *Vnitřní lékařství* 47, 2001, 330-332
71. 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
72. Van den Berghe, Intensive insulin therapy in critically ill patients, *A Engl J Med* 2001, 345:1359-1367
73. Walewski J et al., Microcirculatory evaluation of the early diabetic foot syndrome using laser doppler, *Pol Merkuriusz Lek* 1997 Jan;2(7):18-20
74. 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
75. 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.
76. Williamson JR, Kilo JC., Current status of capillary basementmembrane disease in DM, *Diabetes* 1997

77. 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
78. 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
79. Yki-Järvinen H, Utriainen T., Insulin induced vasodilatation: physiology or pharmacology?, *Diabetologia* (1998) 41: 369-379
80. Zimny S et al., Early detection of Microcirculatory Impairment in Diabetic Patients With Foot at Risk, *Diabetes Care* 24:1810-1814, 2001
81. Materiály firmy KK Research Technology, <http://www.videoscopy.com>
82. Materiály firmy Moor Instruments, <http://www.moor.co.uk>
83. Materiály firmy Perimed, <http://www.perimed.se>

12. PUBLIKAČNÍ ČINNOST AUTORA

Publikace v časopisech s IF, první autor

- **Krcma M**, Cechurova D, Jankovec Z, Lacigova S, Zourek M, Rusavy Z., Effect of mild increase of physical activity on microvascular reactivity in obese subjects with diabetes mellitus type 2., *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2009 Mar;117(3):150-2. Epub 2008 Dec 3.
- **Michal Krčma**, Daniela Čechurová, Jitka Gruberová, Zdeněk Jankovec, Silvie Lacigová, Michal Žourek, Zdeněk Rušavý, Influence of physiological and supraphysiological hyperinsulinemia on skin microcirculation in healthy volunteers. Odesláno k publikaci do *Wiener Klinische Wochenschrift*, 2010.

Publikace v časopisech s IF, spoluautor

- Cechurová D, Lacigová S, Jankovec Z, Haladová I, Zourek M, **Krcma M**, Rusavý Z, Turek J., The insulin analog glargine during an unplanned pregnancy, *Wien Klin Wochenschr*. 2006 Oct;118(19-20):619-20.
- Jankovec Z, Cechurova D, **Krcma M**, Lacigova S, Zourek M, Rusavy Z., The influence of insulin pump treatment on metabolic syndrome parameters in type 2 diabetes mellitus., *Wien Klin Wochenschr*. 2009;121(13-14):459-63.
- Jankovec Z, Hahn M, Grunder S, Lacigova S, Cechurova D, **Krcma M**, Zourek M, Haladova I, Rusavy Z., Analysis of continuous patient data from the Czech National Register of patients with type 1 and type 2 diabetes using insulin pump therapy, *Diabetes Res Clin Pract*. 2010 Feb;87(2):219-23. Epub 2009 Oct 23.
- Lacigova S, Bartunek L, Cechurova D, Visek J, Gruberova J, **Krcma M**, Jankovec Z, Rusavy Z, Zourek M., Influence of cardiovascular autonomic neuropathy on atherogenesis and heart function in patients with type 1 diabetes., *Diabetes Res Clin Pract*. 2009 Jan;83(1):26-31. Epub 2008 Nov 14.
- Lacigová S, Safránek P, Cechurová D, **Krcma M**, Visek J, Jankovec Z, Zourek M, Haladová I, Rusavý Z., Could we predict asymptomatic cardiovascular autonomic neuropathy in type 1 diabetic patients attending out-patients clinics? *Wien Klin Wochenschr*. 2007;119(9-10):303-8.
- Zourek M, Kyselová P, Mudra J, **Krcma M**, Jankovec Z, Lacigová S, Visek J, Rusavý Z., The relationship between glycemia, insulin and oxidative stress in hereditary hypertriglyceridemic rat., *Physiol Res*. 2008;57(4):531-8. Epub 2007 Jul 26.

Publikace v recenzovaných časopisech bez IF, první autor

- **Krčma M.**, Rušavý Z, Přínos vyšetření mikrocirkulace kůže u syndromu diabetické nohy, Plzeňský lékařský sborník 2004.
- **M. Krčma**, Z. Rušavý, The effect of platelet rich plasma in local treatment of diabetic foot syndrome, New frontiers in the research of PhD students
- **M. Krčma**, 8. workshop na téma Technologie v diabetologii Žinkovy 30.9. – 2.10. 2004 (zpráva ze sjezdu), Journal of Diabetes and its Complications – CZ
- **Krčma M**, Autoimunní polyglandulární syndrom 2. typu. Kazuistiky v diabetologii 2009, 7, č.4 - Endokrinologie: 47-48
- **Krčma M**, Výskyt izolované hypotyroxinémie u pacientek s gestačním diabetes mellitus - koincidence nebo kauzalita? Kazuistiky v diabetologii 2009, 7, č. 3 - Endokrinologie: 30-32

Abstrakta přednášek a posterů, první autor

- Krcma M, Jankovec Z, Rusavy Z: The Effect of Platelet Rich Plasma in Local Treatment of Diabetic Foot Syndrome, 6th Diabetes Technology Meeting 2006, Atlanta (sborník konference)
- Krcma M, Rusavy Z, How insulinemia influences skin microcirculation of lower limbs in healthy subjects, 23rd European Conference on Microcirculation (2004)
- Krcma M., Jankovec J., Mudra J, Rusavy Z: How Insulinemia Influences Skin Microcirculation of Lower Limbs in Healthy Subjects, 65th Annual Scientific Sessions ADA (sborník konference)
- Krcma M., Jankovec Z., Lacigova S., Zourek M., Mudra J., Rusavy Z., How Insulinemia Influences Skin Microcirculation of lower limbs in healthy subjects, J Vasc Res 2004;41(Suppl.2)
- Krcma M., Rusavy Z.: Effect of Mild Increase of Physical Activity on Microvascular reactivity in Obese Subjects with Diabetes Mellitus Type 2, European Conference on Microcirculation, 2006 (sborník konference)
- Krčma M, Jankovec Z, Mudra J, Rušavý Z: How Insulinemia Influences Skin Microcirculation of Lower Limbs in Healthy Subjects. 65th Annual Scientific Sessions ADA, 2005 in Diabetes 2005, 54, Suppl 1: A619.
- Krčma M, Jankovec Z.,Lacigová S., Žourek M., Rušavý Z., Využití autologní plazmy bohaté na trombocyty při hojení diabetických neuroischemických ulcerací, Konference mladých lékařů Brno, červen 2004
- Krčma M, Rušavý Z., Srovnání přesnosti tří fyzikálně-chemických metod bed-side měření glykémie v intenzivní péči, Konference mladých lékařů Brno, červen 2004

- Krčma M, Rušavý Z: Využití autologní trombocyty obohacené krevní plazmy při léčbě diabetických neuroischemických ulcerací. Studentská vědecká konference Lékařské fakulty University Karlovy v Plzni, květen 2005, Sborník referátů. S: 20-21.
- Krčma M, Z. Rušavý, The effect of platelet rich plasma in local treatment of diabetic foot syndrome, Medical Postgraduate Conference 2nd meeting, Hradec Králové, New frontiers in the research of PhD students, sborník konference
- Krčma M., Mudra J., Jankovec Z., Lacigová S., Rušavý Z: Vliv inzulinu na mikrocirkulaci kůže nohy u zdravých dobrovolníků. XL. Diabetologické dny, Luhačovice, 22.-24.4.2004, Diabetologie, Metabolismus, Endokrinologie, Výživa 7. 2004; Suppl 1: s.30.
- Krčma M., Mudra J., Vliv inzulinu na mikrocirkulaci kůže, Studentská vědecká konference LF UK Plzeň 2004 (3. místo)
- Krčma M., Rušavý Z., Jankovec Z., Šafránek P., Hájková L., Porovnání přesnosti různých metod měření glykémie u pacientů v intenzivní péči, kongres SKVIMP, Hradec Králové
- Krčma M., Rušavý Z., Měření glykémie v intenzivní péči pomocí suché chemie, Novinky léčebné výživy u kriticky nemocných, květen 2004, Praha
- Krčma M., Rušavý Z., Srovnání přesnosti tří fyzikálně chemických metod měření glykémie v podmínkách intenzivní péče, XI. dny intenzivní medicíny, červen 2004, Kroměříž
- Krčma M., Rušavý Z., Vliv inzulinémie na mikrocirkulaci kůže nohy, SVK 2003/4, Plzeň
- M Kréma, S Lacigova, Z Rusavy, Skin microvascular flow spectral analysis in diabetes and its connection to cardiovascular neuropathy, 25th European Conference on Microcirculation (2008)
- M. Kréma, D. Cechurova, J. Gruberova, S. Lacigova, J. Meinlova, Z. Rusavy, SKIN MICROVASCULAR FLOW SPECTRAL ANALYSIS AND ITS CORRELATION TO CARDIOVASCULAR NEUROPATHY IN DIABETIC PATIENTS TYPE 1, ATTD 2009, 25.2.-28.2., Athény
- M. Kréma, Z. Jankovec, J. Mudra, Z. Rusavy, How Insulinemia Influences Skin Microcirculation of Lower Limbs in Healthy Subjects, 65th Annual Scientific Sessions ADA
- M. Kréma, Z. Jankovec, Z. Rusavy, The Effect of Platelet Rich Plasma in Local Treatment of Diabetic Foot Syndrome, 6th Diabetes Technology Meeting
- M. Kréma, Z. Rusavy, Effect of Mild Increase of Physical Activity on Microvascular Reactivity in Obese Subjects with Diabetes Mellitus Type 2, 24th European Conference on Microcirculation, (2006)
- M. Krčma, D. Čechurová, E. Dvořáková, Z. Rušavý, Izolovaná hypotyroxinémie u pacientek s gestačním diabetem mellitem - 4. rok sledování, XXXII Endokrinologické dny, Český Krumlov, 24.9.-26.9.2009
- M. Krčma, H. Winkelhoferová: Nová metoda lokální léčby syndromu diabetické nohy – kasuistiky, Workshop Technologie v diabetologii, Žinkovy 2004
- M. Krčma, Kasuistika - Addisonská krize, XXXII Endokrinologické dny, Český Krumlov, 24.9.-26.9.2009

- M. Krčma, L. Vokurková, D. Čechurová, E. Dvořáková, L. Vokurková, Z. Rušavý, Izolovaná hypotyroxinémie u žen s gestačním diabetem mellitem a její vliv na potřebu inzulínu. 45. diabetologické dny, Luhačovice, 23.5.-25.5.2009
- M. Krčma: Internet a technologie, Workshop Technologie v diabetologii, Žinkovy 2004