

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Studijní program: Biomedicína

Studijní obor: Fyziologie a patofyziologie člověka



MUDr. Eva Horová

**MIKROVASKULÁRNÍ REAKTIVITA A FUNKCE ENDOTELU
U DIABETES MELLITUS A DALŠÍCH ENDOKRINOPATIÍ**

**Microvascular reactivity and endothelial function
in patients with diabetes mellitus and other endocrinopathies**

Dizertační práce

Školitel: Doc. MUDr. Martin Prázný, CSc., PhD.

Praha, 2012

OBSAH

Poděkování	4
Seznam použitých zkratk	5
Abstrakt (CZ)	7
Abstract (EN)	8
1. Úvod	9
2. Teoretická část	10
2.1. Endotelová dysfunkce	10
2.1.1. Patogeneze endotelové dysfunkce	11
2.1.2. Důsledky endotelové dysfunkce	19
2.2. Mikrocirkulace a mikrovaskulární reaktivita	23
2.3. Hodnocení funkce endotelu a mikrovaskulární reaktivity	26
2.3.1. Biochemické parametry	27
2.3.2. Instrumentální metody	28
2.3.3. Kombinace biochemických parametrů a instrumentálních metod	33
2.4. Endotelová dysfunkce a mikrovaskulární reaktivita u diabetu a endokrinopatií	34
2.5. Shrnutí teoretické části	37
3. Hypotéza a cíle práce	38
4. Metodika	39
4.1. Biochemické metody	39
4.2. Mikrovaskulární reaktivita	40
4.3. Statistické vyhodnocení	41
5. Vlastní studie	42
5.1. Mikrovaskulární reaktivita a funkce endotelu u pacientů s Cushingovým syndromem	42
5.2. Vliv rychlé změny glykémie během hyperinzulinemického izoglykemického a hyperglykemického clampu na mikrovaskulární reaktivitu a funkci endotelu u pacientů s diabetem 1. typu	52
5.3. Změny mikrovaskulární reaktivity a funkce endotelu po standardní snídani u pacientů v časných stádiích diabetu 2. typu	62
5.4. Parametry glykemické variability a jejich vztah ke kompenzaci diabetu a mikrovaskulární reaktivitě u pacientů s diabetem 1. typu léčených inzulinovou pumpou	74

6. Diskuse	82
7. Shrnutí výsledků práce	92
8. Závěr	94
9. Literatura	95
10. Přílohy	106
10.1. Prohlášení autora	106
10.2. Identifikační záznam	106
10.3. Seznam publikací autora	107
10.4. Separáty publikací	110

Poděkování

Tato práce vznikla v rámci doktorského studijního programu v biomedicině na III. interní klinice 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze. Poděkování patří v první řadě mému školiteli doc. MUDr. Martinu Práznému, CSc., PhD. za vynikající odborné vedení v průběhu celého studia a všestrannou pomoc a podporu při tvorbě doktorské dizertační práce. Dále bych ráda vyjádřila své díky všem klinickým a laboratorním spolupracovníkům podílejícím se na vzniku odborných publikací sloužících jako podklady pro dizertační práci. Chtěla bych rovněž poděkovat prof. MUDr. Štěpánu Svačinovi, DrSc., MBA., který mi jako přednosta III. interní kliniky 1. LF UK a VFN vytvořil optimální podmínky k postgraduálnímu studiu a k mé práci a také všem kolegům ze III. interní kliniky, kteří mi předávali své cenné zkušenosti na poli klinické medicíny a vědeckého výzkumu. Zvláštní poděkování zasluhuje prof. MUDr. Jan Škrha, DrSc., MBA. za všestrannou podporu, odbornou supervizi a morální vzor.

Seznam použitých zkratek

ACTH	adrenokortikotropní hormon
ADMA	asymmetric dimethylarginine
ADRR	average daily risk range
AGE	advanced glycation end-products, pokročilé produkty glykace
A _{II}	angiotenzin II
AT ₁	specifický receptor A _{II}
AV zkrat	arterio-venózní zkrat
BMI	body mass index
CSII	kontinuální subkutánní infúze inzulínu, inzulínová pumpa
DM	diabetes mellitus
dTK	diastolický krevní tlak
EDHF	endothelium-derived hyperpolarizing factor
EGF	epidermální růstový faktor
E-selektin	endotelový selektin (L- leukocytární, P- destičkový)
FMD	flow-mediated dilation, měření dilatace tepny průtokem
GLUT	glukózový transportér
GV	glykemická variabilita
HbA _{1c}	glykovaný hemoglobin
HBGI	high blood glucose index, odhad rizika hyperglykémie
HC	skupina pacientů s hyperkortizolizmem
HDL-C	high density lipoprotein cholesterol
HOMA-R	homeostasis model assessment insulin resistance index
hs-CRP	high sensitivity C-reactive protein
ICAM-1	inter-cellular adhesion molecule-1
KD	konjugované dieny
LBGI	low blood glucose index, odhad rizika hypoglykémie
LDDST	dexametazonový supresní test s nízkou dávkou dexametazonu
LDL-C	low density lipoprotein cholesterol
Lp(a)	lipoprotein(a)
M	glucose disposal rate, charakterizuje souhrnný transport glukózy
MAPK	mitogen activated protein kinase
MCP	monocyte chemotactic protein
MCR _G	metabolická clearance glukózy
MCR _{G/I}	index inzulínové senzitivity
MDA	malondialdehyd
MVR	mikrovaskulární reaktivita
NAG	sérová N-acetyl-beta-glukosaminidáza
NC	skupina pacientů s normální hodnotou kortizolu
NF-κB	nukleární faktor κB
NO	oxid dusnatý
NOS	NO-synthasa
PAF	platelet activating factor
PAI-1	plasminogen activator inhibitor, inhibitor aktivátoru plazminogenu
PI3K	fosfatidylinozitol-3-kináza
PKC	proteinkináza C
PORH	post okluzivní reaktivní hyperémie
PORHb	bazální perfúze
PORHmax	maximální perfúze při PORH
PORHt	čas potřebný k dosažení maximální perfúze při PORH

PORHmax/t	rychlost vzestupu perfúze při PORH
PORH%	relativní hyperémie při PORH
PU	perfúzní jednotka
RAGE	specifický receptor AGE
ROS	reaktivní formy kyslíku
SDBG	standard deviation of blood glucose, směrodatná odchylka glykémie
SOD	superoxiddismutáza
sTK	systolický krevní tlak
TC	celkový cholesterol
TF	tissue factor, tkáňový faktor
TG	triglyceridy
TH	termální hyperémie
THmax	maximální perfúze při TH
THt	čas potřebný k dosažení maximální perfúze při TH
THmax/t	rychlost vzestupu perfúze při TH
TH%	relativní hyperémie při TH
TNF- α	tumor necrosis factor α
tPA	tissue plasminogen activator, aktivátor tkáňového plazminogenu
UFC	volný močový kortizol
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule
vWF	von Willebrandův faktor

Abstrakt (CZ)

Výzkum endotelové dysfunkce a mikrocirkulace se stal v poslední době středem zájmu, neboť endotelová dysfunkce je prvním stadiem cévního poškození a ukazatelem rizika následného kardiovaskulárního onemocnění. Cílem předkládané práce je proto posouzení funkce endotelu a mikrovaskulární reaktivity u pacientů s některými metabolickými a hormonálními poruchami.

Práce shrnuje čtyři studie s různými soubory subjektů: pacienty s Cushingovým syndromem, pacienty s diabetem 2. typu a dva soubory pacientů s diabetem 1. typu. U prvně jmenované skupiny byl zkoumán vliv hyperkortizolizmu a přidružených onemocnění na mikrovaskulární reaktivitu a dále byly posuzovány změny v mikrocirkulaci po úspěšné operaci. U pacientů s diabetem 2. typu byly hodnoceny změny mikrovaskulární reaktivity a funkce endotelu po standardní snídani. Pacienti s diabetem 1. typu podstoupili hyperinzulinemický izoglykemický a hyperglykemický clamp, během něhož byla sledována mikrovaskulární reaktivita, a u druhé skupiny pacientů s diabetem 1. typu byla zkoumána glykemická variabilita a její souvislost s mikrocirkulací a se způsobem vedení inzulínoterapie.

Získané výsledky naznačují, že mikrovaskulární reaktivita a funkce endotelu je vedle dalších faktorů významně ovlivněna inzulinémií a inzulinovou rezistencí. U pacientů s Cushingovým syndromem byla mikrovaskulární reaktivita nejvíce snížena při současné přítomnosti diabetu a arteriální hypertenze. Pacienti s diabetem 2. typu měli proti osobám bez diabetu nižší hodnoty mikrovaskulární reaktivity nalačno a došlo u nich k dalšímu poklesu mikrovaskulární reaktivity postprandiálně. V obou studiích s pacienty s diabetem 1. typu byla mikrocirkulace významně ovlivněna inzulinem. Neprokázáli jsme však u nich negativní vliv rychle navozené hyperglykémie na mikrovaskulární reaktivitu při clampu ani jsme nenalezli vztah mezi parametry mikrovaskulární reaktivity a glykemickou variabilitou.

Klíčová slova: mikrovaskulární reaktivita, mikrocirkulace, endotelová dysfunkce, laser-Doppler, diabetes mellitus 1. typu, diabetes mellitus 2. typu, Cushingův syndrom.

Abstract (EN)

Endothelial dysfunction is an early marker of atherosclerotic and cardiovascular complications. It is also a target of research aimed at the factors and mechanisms leading to the vascular impairment. The aim of the thesis was to evaluate the microvascular reactivity and endothelial function in patients with specific metabolic and hormonal disorders.

Four separate studies are included in the thesis. First, the influence of hypercortisolism and associated diseases on microvascular reactivity was evaluated in patients with Cushing's syndrome. Second, the changes in microvascular reactivity and endothelial function after standard breakfast were studied in patients with type 2 diabetes. Next two studies were done in type 1 diabetic patients. The impact of acute hyperglycemia on microvascular reactivity was evaluated during hyperinsulinemic isoglycemic and hyperglycemic clamp. Finally, the influence of glycemic variability and insulin treatment on microvascular reactivity and its possible relationship were studied in type 1 diabetic patients.

The results indicate that microvascular reactivity and endothelial function are, among other factors, influenced by insulinemia and insulin resistance. Microvascular reactivity was predominantly impaired by the arterial hypertension and diabetes in patients with Cushing's syndrome. In patients with type 2 diabetes, microvascular reactivity was decreased in fasting compared to the control group and further decrease was observed postprandially. Microcirculation was significantly influenced by insulinemia in both studies in type 1 diabetic patients. However, there was no negative influence of acute hyperglycemia on microcirculation and no significant relationship between glycemic variability and microvascular reactivity was observed.

Keywords: microvascular reactivity, microcirculation, endothelial function, laser-Doppler, type 1 diabetes mellitus, type 2 diabetes mellitus, Cushing's syndrome.

1. Úvod

Cílem této dizertační práce je uvést přehledně náplň a výsledky postgraduálního doktorského studia, jehož tématem je mikrovaskulární reaktivita (MVR) a funkce endotelu u pacientů s různým typem diabetu a některými dalšími endokrinopatiemi. Práce měla ověřit hypotézu o vlivu některých faktorů (hyperglykémie, hyperinzulinémie, arteriální hypertenze, dyslipidémie, humorálních i hormonálních dysbalancí, příjmu potravy) na funkci endotelu a mikrovaskulární reaktivitu a popsat změny ve sledovaných parametrech po odstranění nebo zmírnění ovlivňujícího faktoru. Zlepšení funkce endotelu a mikrovaskulární reaktivity bylo po úpravě negativně působících faktorů opakovaně pozorováno v mnoha studiích (1, 2). U diabetu i různých endokrinopatií však může docházet k rozvoji endotelové dysfunkce, poruše MVR i jejich úpravě různými způsoby a mohou mít rozdílný průběh (3-8).

V průběhu studia byly provedeny čtyři hlavní výzkumné projekty se zaměřením na funkci endotelu a MVR: u pacientů s Cushingovým syndromem, u pacientů s diabetem 1. typu při akutní hyperglykémii během clampu, u pacientů s diabetem 2. typu v postprandiálním stavu a u pacientů s diabetem 1. typu ve vztahu k variabilitě glykémie. Funkce endotelu byla v projektech hodnocena pomocí biochemických parametrů endotelové dysfunkce a mikrovaskulární reaktivita pomocí instrumentálního vyšetření metodou laser-Doppler. Výzkum probíhal u hospitalizovaných i ambulantních pacientů na III. interní klinice VFN. Získaná data byla prezentována na domácích i zahraničních kongresech a publikována v odborných časopisech, nebo jsou v současné době k publikaci připravována. Přínosem práce jsou nové poznatky v oblasti detekce a ovlivnění poruch funkce endotelu, mikrovaskulární reaktivity a cévních komplikací.

V širší souvislosti se základním tématem dizertační práce je studie zabývající se rizikovými faktory kardiovaskulárních onemocnění u pacientů s erektilní dysfunkcí, jejíž součástí bylo i hodnocení mikrovaskulární reaktivity a funkce endotelu (uvedena v příloze 10.4.) a dvě studie genetické a funkční analýzy kandidátních genů pro rozvoj diabetu a diabetické nefropatie provedené během studijního pobytu v Karolinska Institutet ve Stockholmu (v příloze 10.4.).

2. Teoretická část

2.1. Endotelová dysfunkce

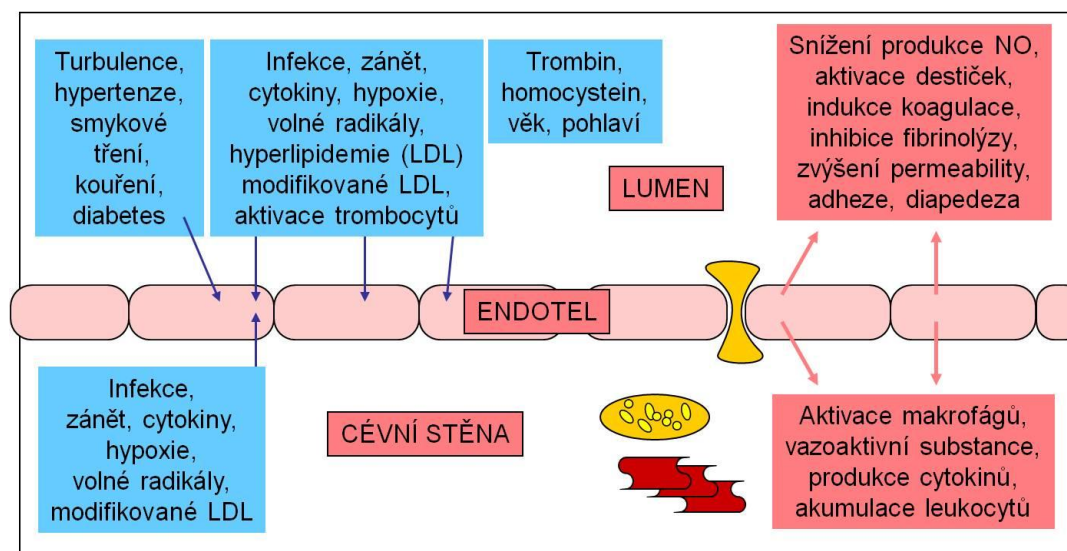
Endotel je tvořen jedinou vrstvou buněk pokrývající vnitřní povrch cév. Nejedná se však o prostou cévní výstelku sloužící pouze jako strukturální bariéra, ale o plně funkční a pro organismus nepostradatelný orgán. Vzhledem k množství cév v lidském těle se jedná o orgán s obrovskou plochou a s klíčovým postavením v regulaci řady biochemických a fyziologických procesů. Funkce endotelu není pouze autokrinní, působí také parakrinně a endokrinně. Strukturální a funkční integrita endotelových buněk je základním předpokladem pro homeostázu cévní stěny, pro udržení vazomotorické rovnováhy a pro zachování fyziologické cirkulace (9). Homeostáza cévní stěny je zajišťována produkcí protrombotických i antitrombotických komponent, prokoagulačních i antikoagulačních látek a látek působících v procesu fibrinolýzy. Endotel svojí funkcí ovlivňuje buněčnou proliferaci, migraci, adhezi i aktivaci leukocytů a účastní se i imunologických a zánětlivých procesů.

Endotelová dysfunkce je první fází poškození cévní stěny. Je definována jako funkční poškození endotelu, charakterizované především zvýšenou propustností cévní stěny, nerovnováhou mezi vazoaktivními a hemokoagulačně působícími látkami a nerovnováhou mezi látkami inhibujícími či stimulujícími proliferaci. Iniciální poškození endotelu je také označováno jako aktivace endotelu (*obr. 1*). Již ve stadiu endotelové dysfunkce se nachází porucha cévní relaxace, nedostatečná vazomotorická odpověď na podněty závislé na endotelu a predispozice k vazokonstrikci i k tvorbě destičkového trombu. Dochází také k selektivnímu zvýšení permeability, k infiltraci zánětlivých buněk do cévní stěny a k nedostatečné inhibici subendotelové proliferace (10).

Endotelová dysfunkce představuje časnou, morfologicky němou fází aterosklerózy. Podílí se však i na vývoji morfologicky zřejmých aterosklerotických lézí a přispívá ke klinické manifestaci aterosklerózy. Hraje důležitou roli také v patogenezi hypertenze, srdečního selhání, renálního selhání, komplikací diabetu, sepse a dalších chorob (7, 8). Existuje řada příčin endotelové dysfunkce. Většina z nich jsou známé rizikové faktory aterosklerózy spojené s oxidačním stresem. Mezi hlavní příčiny patří arteriální hypertenze, hyperlipoproteinémie, hyperglykémie a kouření. K těmto systémovým negativním faktorům se mohou přidat ještě faktory působící lokálně, jako turbulence krevního toku, vrozené či získané cévní anomálie a intravaskulární výkony

(angioplastika). Další faktory pak mohou menší či větší měrou k rozvoji endotelové dysfunkce přispívat (11, 12). Endotelová dysfunkce je naopak sama o sobě považována za jeden z markerů zvýšeného kardiovaskulárního rizika.

Klinické studie potvrzují, že endotelová dysfunkce je v časném stadiu reverzibilní, což je důvod ke snaze o důslednou prevenci jejího vzniku a progresu.



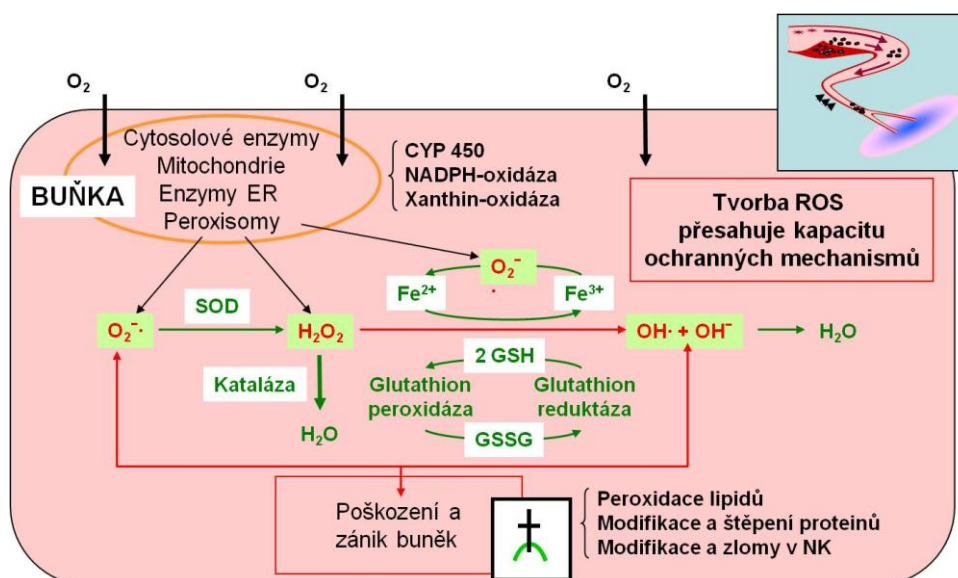
Obrázek 1. Hlavní faktory aktivace endotelu (modře) a hlavní projevy endotelové dysfunkce (červeně) v lumen a ve stěně cévy (upraveno podle 13).

2.1.1. Patogeneze endotelové dysfunkce

K rozvoji endotelové dysfunkce přispívají podněty metabolické, mechanické, biologické i fyzikální. Rozdělení faktorů vedoucích ke vzniku endotelové dysfunkce a mechanismů jejich působení je vytvořené uměle. V lidském organismu prakticky nikdy nenastane moment, kdy by se negativně uplatnil pouze jediný faktor či jeden konkrétní metabolický proces. Stejně tak nejsou důsledky endotelové dysfunkce spjaty pouze s procesy odehrávajícími se v cévách. Rozvoj endotelové dysfunkce je ovlivněn různými dalšími vlivy - genetickou dispozicí, výživou i životním prostředím a míra dysfunkce endotelu proto nemusí být přímo úměrná počtu či intenzitě rizikových faktorů. Uvedené faktory se většinou v lidském organismu kombinují a jejich jednotným projevem v cévní stěně je oxidační stres.

Oxidační stres

Vystupňovaný oxidační stres je výsledkem porušené rovnováhy mezi vznikem a odstraňováním reaktivních forem kyslíku (ROS). Je vyvolán zvýšenou tvorbou kyslíkových radikálů, snížením kapacity antioxidačních mechanismů nebo kombinací obou uvedených situací. Za normálních okolností je tvorba ROS v rovnováze s činností antioxidačních mechanismů, které jsou schopny reaktivní formy kyslíku neutralizovat. K tvorbě ROS dochází za určitých okolností ve tkáních při aerobním metabolismu (obr. 2). Hlavním zdrojem ROS jsou v aterosklerotických cévách makrofágy, buňky endotelu a hladké svaloviny. Mezi nejdůležitější ROS patří *peroxid vodíku*, *superoxidový anion* a *hydroxylový radikál* (14).



Obrázek 2. Reaktivní částice kyslíku v buňce (upraveno podle 15).

Antioxidační systémy se rozdělují na enzymové a neenzymové. Enzym *superoxiddismutáza* (SOD) katalyzuje přeměnu superoxidu na peroxid vodíku. Nejznámější subtypy jsou Cu, Zn-SOD, která se nachází v cytosolu a mezimembránovém prostoru mitochondrií, Mn-SOD z mitochondriální matrix a extracelulární EC-SOD. Superoxiddismutáza odpovídá za antioxidační vlastnosti tělesných tekutin a v mitochondriích inaktivuje superoxid vznikající v dýchacím řetězci. Peroxid vodíku se rozkládá *katalázou*, která tím brání v mitochondriích vzniku hydroxylového radikálu. K dalším enzymovým antioxidačním látkám patří *glutathionperoxidáza*, *glutathiontransferáza* a *glutathionreduktáza*. Neenzymové antioxidy inaktivují radikál přeměnou na méně toxický produkt, který se vyloučí nebo

metabolizuje. Mezi nejznámější neenzymové antioxidanty patří některé bílkoviny a peptidy (glutathion, transferin, ferritin, haptoglobin, ceruloplazmin), nízkomolekulární antioxidanty (vitamin C, vitamin E, karotenoidy, bilirubin, kyselina močová) a koenzym Q10.

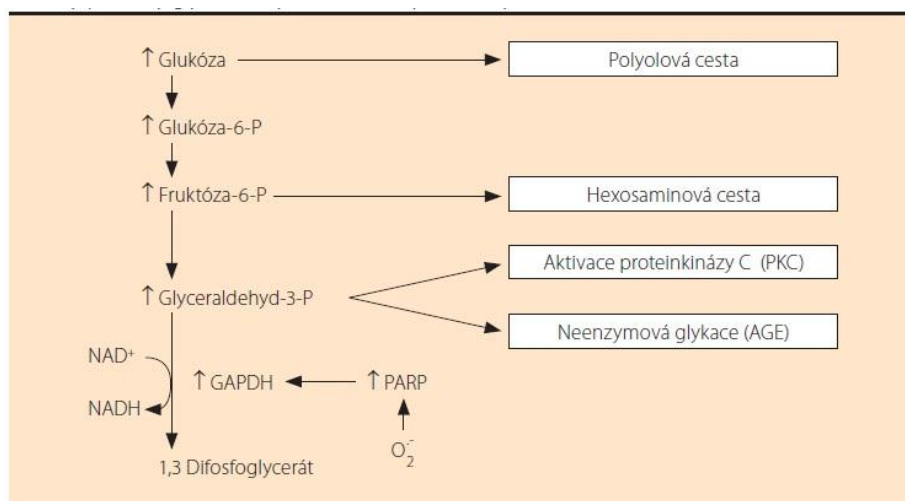
Hyperglykémie

Hyperglykémie podmiňuje zvýšený transport glukózy z plazmy do endotelové buňky. Tento proces je usnadněn glukózovými transportéry GLUT 1 nezávislymi na inzulinu, které transportují glukózu do buňky podle koncentračního spádu a intracelulární prostředí tak zůstává nechráněné před hyperglykemií (na rozdíl např. od svalů, kde transport probíhá pomocí transportéru GLUT 4, jehož funkce závisí na inzulinu). Hyperglykémie dále vede k aktivaci alternativních glukózových metabolických drah, jejichž konečným důsledkem jsou známé mikro- a makroangiopatické komplikace (16, 17). Patogeneze těchto komplikací se vysvětluje několika způsoby (*obr. 3*).

Hyperglykémie podmiňuje v buňkách již zmiňovaný *oxidační stres*, tedy zvýšenou produkci ROS a depleci kofaktorů antioxidantních enzymů (NADH, NADPH). Zvýšená tvorba reaktivních forem kyslíku je popisována v respiračním řetězci mitochondrií a v endoplazmatickém retikulu (18).

Neenzymová glykace proteinů je spontánní proces probíhající bez katalytického působení enzymů jako následek interakce proteinů s glukózou. Dochází při něm k vazbě glukózy na intra- i extracelulárně lokalizované proteiny a následně k jejich funkčním i morfologickým změnám. V první fázi této reakce vzniká labilní Schiffova báze (časný produkt glykace), která je reverzibilní. V další fázi tzv. Amadoriho přesmyku pak vzniká ketoamin a následně pokročilé produkty glykace (Advanced Glycation End-products, AGE), které jsou již stabilní. Působení pokročilých produktů glykace je zprostředkováno specifickými receptory (RAGE), které jsou solubilní nebo vázané na povrchu makrofágů a endotelových buněk. Po vazbě AGE na specifický receptor se pozoruje vyšší syntéza cytoadhezivních molekul, cytokinů a růstových faktorů (19). AGE tak nepřímo způsobují proliferaci vaziva, zmnožení mimobuněčné hmoty a ztlustění bazálních membrán. Tyto změny jsou podkladem rozvoje komplikací diabetes mellitus (DM) včetně orgánových změn (16). AGE s glukózou dávají za přítomnosti kyslíku také vznik dalším ROS, tento proces se nazývá glykoxidace (20).

Při hyperglykémii dále dochází ke *vzniku a akumulaci polyolů* (sorbitol), jejichž účinek je zčásti osmotický.



Obrázek 3. Lokalizace patogenetických cest chronických komplikací diabetu v glykolýze a vliv blokády superoxidovým radikálem (převzato z 21).

Snižená koncentrace oxidu dusnatého (NO)

Oxid dusnatý je klíčovým faktorem ovlivňujícím cévní tonus. Je považován za silně antiaterogenní molekulu. Vzhledem ke své nízké molekulové hmotnosti snadno difunduje přes buněčné membrány a intimu, způsobuje relaxaci hladkého svalstva cévní stěny a vede k následné vazodilataci. NO inhibuje agregaci krevních destiček, adhezi leukocytů a je významným inhibitorem proliferace hladké svaloviny v cévách. Antiaterogenně působí také redukcí vaskulární permeability a inhibicí syntézy adhezivních molekul (10).

NO je produkován v endotelových buňkách přeměnou L-argininu na L-citrulin. Tento proces katalyzuje NO-syntáza (NOS), která je aktivována smykovým třením krevního proudu (shear-stress), hypoxií a celou řadou lokálních faktorů. NOS se vyskytuje ve třech izoformách. Dvě konstitutivní izoformy (c-NOS) jsou produkovány v relativně malém množství, ale pomocí jejich katalýzy je tvorba NO rychlá (n-NOS z nervové tkáně a e-NOS z endotelových buněk). Třetí, indukibilní, i-NOS je tvořena ve větším množství především makrofágy a endotelovými buňkami aktivovanými prozánětlivými cytokiny, např. tumor necrosis faktorem α (TNF- α). Tvorba NO však probíhá působením i-NOS pomalu. Syntéza NO je ovlivňována řadou okolností jako je dostupnost kofaktorů tetrahydrobiopterinu a flavinmononukleotidu, redukovanými thioley, dále endogenním inhibitorem NOS a dostupností substrátu. Oxidační stres inhibuje NOS oxidací jejího klíčového kofaktoru – tetrahydrobiopterinu (22). Aktivita e-NOS je inhibována také přes

nukleární faktor κ B (NF- κ B). Snížená produkce e-NOS je považována za důležitý faktor přispívající ke vzniku endotelové dysfunkce (19).

Arteriální hypertenze

Arteriální hypertenze může být považována za příčinu i důsledek endotelové dysfunkce. Aktivovaný endotel uvolňováním některých látek významně ovlivňuje cévní tonus. Změny průtoku krve vyvolávají zvýšenou produkci vazoaktivních substancí. Funkčně nepoškozený endotel cév produkuje vyvážený poměr oxidů dusíku a v menší míře prostacyklinu, které způsobují vazodilataci, a vazokonstrikčních látek endotelinu-1 a tromboxanu A_2 (23). Poškozený endotel produkuje méně NO a ve větší míře endotelin-1, a proto dochází k vazokonstrikci a zvýšení cévního tonu.

Endotelin-1 působí v organismu jako jedna z nejučinnějších vazokonstrikčních látek. Také stimuluje proliferaci myocytů v cévní stěně. Syntéza endotelinu-1 se vedle podnětů vedoucích k uvolnění NO (např. bradykinin, angiotenzin II, smykové tření) zvyšuje také některými aterogenními proteiny (trombin) či lipoproteiny (oxidovaný low density lipoprotein - LDL). Koncentrace endotelinu-1 v plazmě je zvýšena u pacientů s pokročilou aterosklerózou (24).

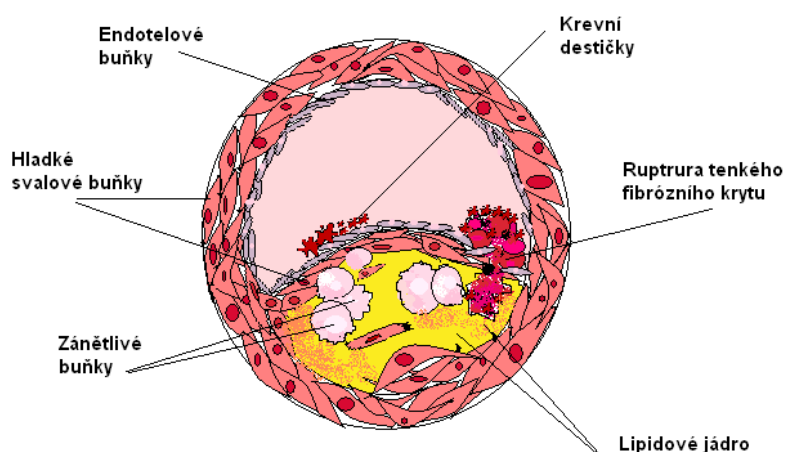
Angiotenzin II (A_{II}) je silnou vazokonstrikčně působící látkou způsobující arteriální hypertenzi a stimující proliferaci buněk cévní hladké svaloviny. Dále působí protrombogenně, aktivuje expresi cytoadhezivních molekul i adhezi leukocytů a podporuje tak progresi aterosklerózy (9). A_{II} působí přes specifický receptor AT_1 . Stimulace AT_1 vede k uvolnění reaktivních forem kyslíku a dusíku v buňkách stěny arterií.

Oxidační stres navozuje atrakci a aktivaci monocytů. Cestou superoxidového aniontu je stimulována exprese adhezivních molekul intercellular adhesion molecule (ICAM-1) a vascular cell adhesion molecule (VCAM-1) v endotelových buňkách. Cestou aktivace fosfolipázy C se zvyšuje intracelulární koncentrace Ca^{2+} , kontrahuje se cévní svalovina a dochází k hypertrofii hladké svaloviny stěny cévní. Receptor AT_1 po vazbě s A_{II} také zvyšuje aktivitu lipoxygenázy v buňkách hladké svaloviny a tím stimuluje zánětlivou odpověď a lipoperoxidaci LDL (25). A_{II} se tak podílí na progresi cévního poškození ve všech stádiích jeho rozvoje. Stimulací proliferace buněk cévní hladké svaloviny přispívá A_{II} k hypertrofii a remodelaci cévní stěny i myokardu, způsobuje hypertrofii glomerulů a proliferaci mezangia v ledvině. A_{II} dále stimuluje tvorbu aldosteronu v *zona*

glomerulosa kůry nadledvin a uvolnění antidiuretického hormonu ze zadního laloku hypofýzy (26).

Dyslipidémie

Dyslipidémie, zejména hypercholesterolemie a zvýšená hladina LDL, je dalším patogenetickým činitelem podporujícím vznik endotelové dysfunkce. Negativní vliv na cévní stěnu mají hlavně LDL částice, které mohou být modifikované oxidací, glykací, agregací nebo asociací s glykoproteiny. Takto modifikované LDL vedou ke zvýšené produkci prozánětlivých cytokinů, růstových faktorů a cytoadhezivních molekul, především ICAM-1 a endotelového selektinu (E-selektin), které umožní vazbu s monocyty. Monocyty a T-lymfocyty jsou z krevní cirkulace do místa léze přitahovány aktivovanými buňkami endotelu. Současné zvýšení permeability endotelové výstelky umožňuje pronikání lipoproteinových částic do subendotelového prostoru, kde část z nich podléhá oxidaci. Oxidované LDL částice se váží na scavengerové receptory na povrchu makrofágů a jsou jimi pohlcovány. V důsledku nadměrné akumulace cholesterolu se pak makrofágy mění na pěnové buňky, které se stávají základem pro vznik lipidového jádra aterosklerotického plátu (*obr. 4*) (27). Stěna cévy se v důsledku proliferace vláken hladkých svalů a tvorby kolagenové matrix rozšiřuje a změna smáčivosti povrchu endotelu vede ke zvýšené koagulační aktivitě.



Obrázek 4. Vznik aterosklerotického plátu (upraveno podle 28).

Nezávislým mechanismem se na poškození cévní stěny podílí lipoprotein(a) (Lp[a]), který vzniká vazbou specifického apoproteinu(a) na apoB LDL-částic. Jeho hlavní

působení je protrombogenní. Lp(a) je strukturálně podobný plazminogenu, který má fibrinolytické účinky, proto s ním Lp(a) kompetuje o vazebné místo a působí tak antifibrinolyticky. Další výzkumy ukázaly, že zvýšené koncentrace Lp(a) mohou vyvolávat též endotelovou dysfunkci (29), zřejmě jednak přímou vazbou na endotel, jednak nepřímo aktivací leukocytů.

Kouření

Kouření cigaret je úzce spojeno se vznikem endotelové dysfunkce, pro což svědčí pozitivní asociace kouření s řadou markerů endotelové dysfunkce. U kuřáků bývá zvýšená koncentrace oxidovaného LDL-cholesterolu a zvýšená hladina dimethylargininu (asymetrický dimethylarginin, ADMA), endogenního inhibitoru NO syntázy (30). U pravidelných kuřáků cigaret je také prokázána zvýšená hladina cytoadhezivních molekul (především VCAM-1 a E-selektinu), která dokonce přetrvává i po zanechání kouření (31). Dále bylo opakovaně prokázáno, že kouření vede ke zvýšené agregaci destiček, tvorbě fibrinogenu, zvyšuje viskozitu krve a počet leukocytů. Všechny tyto ukazatele jsou rizikovými faktory endotelové dysfunkce (32).

Přestože je prokázána asociace mezi kouřením, aterosklerotickým procesem a kardiovaskulárními nemocemi, patofyziologický mechanismus, který se na vzniku těchto nemocí podílí, není zatím zcela objasněn. Studie ukazují, že kuřáci mají často poruchy metabolismu lipidů, endotelovou dysfunkci, vyšší sympatickou nervovou aktivitu, vyšší hladiny fibrinogenu a další projevy potvrzující sklon ke zvýšené koagulaci a snížené fibrinolýze. Kuřáci mají častěji hyperinzulinémii a jsou více inzulinorezistentní ve srovnání s nekuřáky (33).

Proudění krve a smykové tření

Na vnitřním povrchu cév v organismu dochází přirozeně vlivem proudění krve k tzv. smykovému tření (shear stress), které je za normálních podmínek udržováno v určitém rozmezí. Smykové tření na povrchu endotelu je jedním z nejdůležitějších impulzů pro uvolnění NO. V arteriálním řečišti však existují predilekční místa (bifurkace, ohyby, větvení), kde dochází ke změnám v proudu krve, zvýšené turbulenci, ale i ke zpomalení toku krve. Zvýšená rychlost proudění krve za normálních podmínek způsobuje prostřednictvím zvýšené produkce NO tzv. vazodilataci závislou na endotelu (endotel dependentní). Je-li však smykové tření zvýšené nad kritickou hodnotu, dochází k mechanickému poškození a erozi endotelu, agregaci destiček nebo přímo k ruptuře

aterosklerotického plátu, je-li přítomen. Naopak v oblastech s obleněním toku či s retrográdním tokem je produkce NO snížena. V těchto místech je zvýšená koncentrace adhezivních molekul a růstových faktorů a dochází zde k aktivaci zánětlivých procesů (9).

Infekce

Často se uvažuje o možné souvislosti mezi chronickou virovou infekcí, některými bakteriemi a endotelovou dysfunkcí. V aterosklerotických plátech byly nalezeny např. herpetické viry a Chlamydia pneumoniae. U pacientů s akutním koronárním syndromem byla pozorována zvýšená koncentrace protilátek proti různým infekčním agens (Helicobacter pylori, Cytomegalovirus, virus Epstein a Barrové, Hemophilus influenzae, Mycoplasma pneumoniae) (34). Rovněž chronický zánět parodontia je často považován za faktor přispívající k rozvoji aterosklerózy (35).

Patogeneze pravděpodobně spočívá ve změně funkce endotelových buněk infikovaných patogenem. Dochází v nich ke zvýšené expresi adhezivních molekul, stimulaci tvorby cytokinů, růstových faktorů, zvyšuje se oxidační stres kumulací ROS a rozvíjí se proces aterogeneze. Aterosklerotické léze mohou být také infekčními patogeny kolonizovány dodatečně (36).

Homocystein

Spornou a stále často diskutovanou zůstává úloha homocysteinu jako patogenetického činitele cévního poškození a rizikového faktoru aterogeneze. Výrazné zvýšení koncentrace homocysteinu zvyšuje především riziko žilní trombózy. Dřívější epidemiologické studie ukázaly také zvýšení kardiovaskulárního rizika se zvyšující se koncentrací homocysteinu, a to již v pásmu jeho normálních nebo jen mírně zvýšených koncentrací (37).

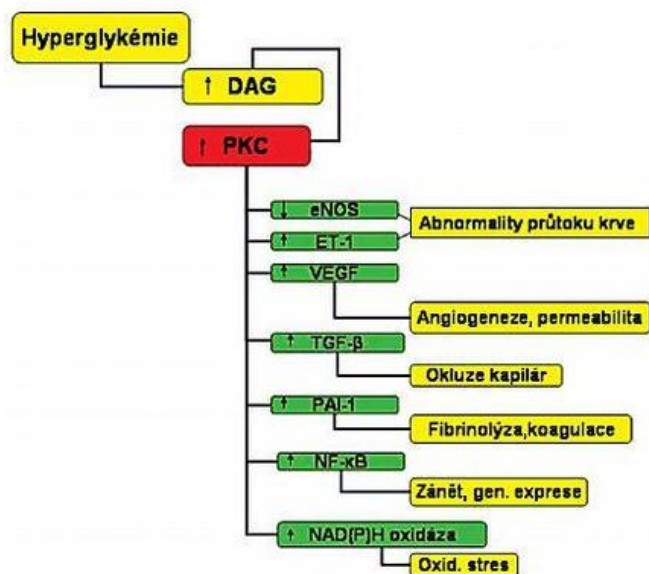
Hlavním mechanismem patogenetického působení homocysteinu je zřejmě především zvýšení oxidačního stresu, které vede k přímému poškození cévní stěny, aktivaci zánětlivých mechanismů a zvýšené peroxidaci LDL-částic (38). Ve shodě s tím bylo při zvýšení koncentrace homocysteinu prokázáno zhoršení endotelové dysfunkce. Experimentální práce také prokázaly zlepšení endotelové dysfunkce po snížení koncentrace homocysteinu podáváním folátů, výsledky však nejsou zcela jednoznačné (39).

Na základě těchto experimentálních i epidemiologických studií vznikl předpoklad, že léčba hyperhomocysteinémie povede ke snížení kardiovaskulárního rizika. Bylo proto překvapením, že žádná z dosud provedených klinických studií (VISP, NORVIT, SEARCH, HOPE-2) neprokázala jakékoliv příznivé účinky snížení koncentrace homocysteinu. Vysvětlení pro tyto výsledky zůstávají zatím spekulativní, mnoho odborníků však v současné době zastává názor, že zvýšení koncentrace homocysteinu je spíše markerem kardiovaskulárního rizika, než přímým patogenetickým činitelem kardiovaskulárních příhod (40).

2.1.2. Důsledky endotelové dysfunkce

Odpověď endotelové buňky na podněty způsobující endotelovou dysfunkci se děje prostřednictvím signálních drah. Mezi nejznámější cestu zánětlivé a proliferační odpovědi patří dráha proteinkinasy aktivované mitogenem (MAPK, mitogen activated protein kinase). Centrální úlohu při buněčném převodu signálů na prozánětlivé stimuly hrají transkripční faktory. V případě endotelové dysfunkce se nejvíce uplatňuje *nukleární faktor kappa B* (NF- κ B). Tento faktor je aktivován řadou různých stimulů, především oxidačním stresem a prozánětlivými cytokiny. Uvolněné dimery NF- κ B se přemísťují do jádra k příslušným genům, kde navodí transkripci a tvorbu různých cytokinů, chemokinů a adhezivních molekul. NF- κ B dále aktivuje geny podporující proliferaci i apoptózu buněk a mimo jiné také aktivuje geny pro expresi svého vlastního inhibitoru, což zpětně inhibuje jeho aktivaci (autoregulační systém) (41).

NF- κ B zvyšuje produkci *proteinkinázy C* (PKC) a PKC indukovanou genovou expresi. Zvýšené množství PKC je přítomno u hyperglykémie, negativně ovlivňuje kontraktilitu i propustnost cévní stěny (19) a má za následek zvýšení produkce cytokinů, extracelulární hmoty a superoxidu (*obr. 5*) (42).



Obrázek 5. Vliv hyperglykémie na endotelovou dysfunkci (upraveno podle 43).

DAG – diacylglycerol, ET-1 – endotelin 1, VEGF – vaskulární endoteliální růstový faktor, TGF-β – transformující růstový faktor beta.

Adhezivní molekuly a cytokiny

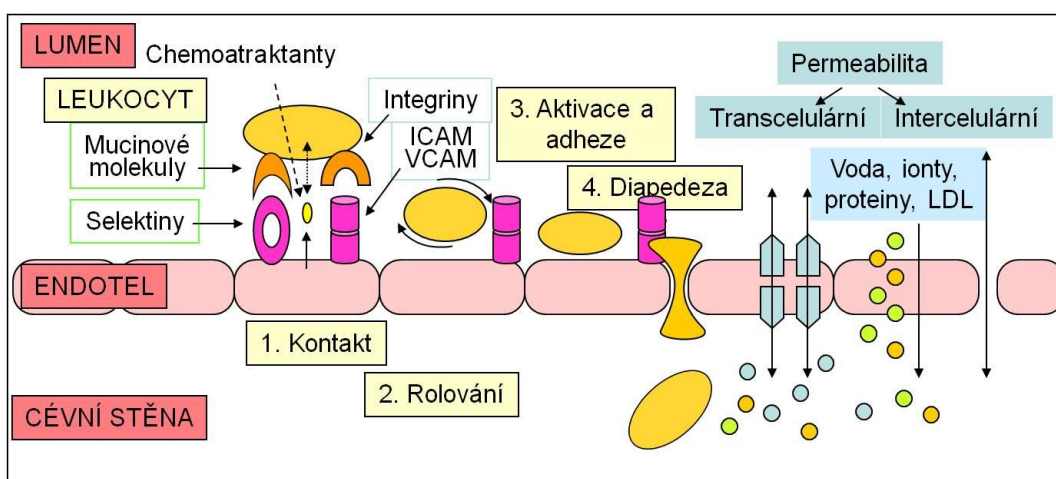
Prozánětlivé cytokiny a oxidační stres aktivují NF-κB, který vede k dalšímu zvýšení exprese cytokinů, interleukinů, chemokinů a adhezivních molekul. Tato heterogenní skupina molekul se významně podílí na aktivaci endotelu i na následném rozvoji aterosklerózy. Adhezivní molekuly se účastní adheze imunocytů k extracelulární hmotě, komunikace mezi buňkami imunitního systému a podílejí se i na neoangiogenezi (*obr. 6*) (44). Adhezivní molekuly lze rozdělit do tří skupin:

Integriny jsou membránové glykoproteiny lokalizované na různých buňkách a zodpovídají za intercelulární adhezi a adhezi k extracelulární matrix (31). Nejčastěji se vyskytují na leukocytech, trombocytech, fibroblastech, endotelových buňkách a váží se nejvíce k proteinům kolagenu, lamininu a fibronektinu. Touto vazbou integriny umožňují adhezi krevních destiček k subendotelové matrix a vazbu cirkulujících leukocytů na endotelové buňky.

Selektiny jsou povrchové glykoproteiny, které mají na svém N-terminálním konci lektinům podobnou doménu, jež váže některé sacharidové zbytky, a dále obsahují doménu homologní části molekuly epidermálního růstového faktoru (EGF). *E-selektin* je exprimován převážně na povrchu endotelových buněk. Váží se na něho receptory lokalizované na povrchu granulocytů, monocytů a části T-lymfocytů. Selektiny jsou zodpovědné za iničiální stadia leukocytární adheze. Adheze mezi endotelovými buňkami

a leukocyty je velmi rychlá, působí shlukování leukocytů a usnadní jejich diapedézu mimo cévu do místa zánětu. *L-selektin* (leukocytární) je exprimován pouze na povrchu leukocytů, ligand pro L-selektin je lokalizován na endotelu. *P-selektin* (destičkový) mohou exprimovat jak krevní destičky, tak endotelové buňky. P-selektin je lokalizován uvnitř destiček a po jejich aktivaci (např. trombinem) se rychle translokuje na jejich povrch (44).

Adhezivní molekuly imunoglobulinové rodiny jsou molekuly s imunoglobulinovými doménami, které váží molekuly integrinů na povrchu jiných buněk. Působí tedy jako endotelové ligandy pro integriny exprimované na leukocytech a destičkách. Zajišťují migraci buněk do cévní stěny (31). Patří sem ICAM-1 a ICAM-2, které jsou exprimovány endotelovými a některými dalšími buňkami. Jejich exprese se zvyšuje po stimulaci cytokiny. VCAM-1 je exprimována endotelem a podílí se na adhezi paměťových T-lymfocytů, monocytů a bazofilů (45).



Obrázek 6. Navázání leukocytů na cytoadhezivní molekuly a jejich vstup endotelovou bariérou (upraveno podle 46).

Po aktivaci endotelu dochází v první fázi (pod vlivem cytokinů IL-1 a TNF- α) ke zvýšení exprese E-selektinu. Selektiny spolu s molekulami mucinového typu na povrchu endotelových buněk zprostředkují vazbu s leukocyty, což podporuje jejich adhezi a hromadění těchto buněk i trombocytů na cévní stěně. Současně s popsáním procesem endotel produkuje volné (solubilní) molekuly – chemoatraktanty, které aktivují cestou G proteinu integriny na povrchu leukocytů. Jako chemoatraktanty působí leukotrien B₄, faktor aktivující destičky (platelet activating factor, PAF), komplement C5, některé chemokiny (IL-8, tromboglobulin β , monocyte chemotactic protein MCP) a bakteriální

proteiny. Integriny se váží s vazebnou bílkovinou typu imunoglobulinu (VCAM a ICAM) na endotel a umožňují tak průnik leukocytů do subendotelových vrstev. Rovněž exprese integrinů na endotelové membráně je řízena cytokiny (45).

Vstup zánětlivých buněk (především makrofágů) do cévní stěny je tedy vícestupňový proces. Zahrnuje postupně navazující interakce mezi adhezivními molekulami ze skupiny selektinů (P-selektin), chemokinů (MCP-1), adhezivními molekulami ze skupiny imunoglobulinů (VCAM-1), chemoatraktanty (PAF) a cytokiny (IL-1). Adhezivní molekuly a cytokiny se významně podílejí na celém procesu aktivace endotelu, poškození cévní stěny zánětem a aterosklerózou. Tyto molekuly se také účastní lokální i systémové odpovědi na poškození endotelu a jeho reparace (31).

Hemokoagulace a fibrinolýza

Jak již bylo uvedeno výše, endotelová dysfunkce je spojena se zvýšenou tvorbou prokoagulačních molekul a s nerovnováhou mezi prokoagulačními a antikoagulačními faktory i složkami působícími v procesu fibrinolýzy. Zánětlivé cytokiny indukují v endotelových buňkách tvorbu prokoagulačních molekul (vWF, PAI-1 a PAI-2) (47).

Von Willebrandův faktor (vWF) je syntetizován v trombocytech (alfa granula) a endotelu. Při narušení povrchu cévní stěny je vWF uvolňován z buněk endotelu a vázán na kolagen subendotelových vrstev. Po obnažení subendotelových vrstev je vychytáván i solubilní vWF z plazmy. Vazbou vWF s glykoproteinovým integrinovým receptorem na povrchu destiček vzniká v místě poškození cévní stěny základní vrstva trombocytů. Adheze trombocytů vede k jejich aktivaci, následné agregaci a vzniku bílého trombu (primární hemostáza). Aktivací destiček dochází také k jejich degranulaci s uvolněním řady proagregačně a vazokonstrikčně působících látek (tromboxan, PAF a další) (48).

Klíčovou roli v aktivaci sekundární hemostázy hraje *tkáňový faktor* (tissue factor, TF), glykoprotein vázaný na buněčné membrány většiny epitelálních, stromálních či perivaskulárních buněk organismu. Vaskulární poškození spouští koagulační kaskádu, v níž vlivem tkáňového faktoru dochází k tvorbě trombinu v místě poškození. Trombin katalyzuje v přítomnosti faktoru XIII a iontů kalcia přeměnu fibrinogenu v nerozpustnou fibrinovou síť (49).

Rychlost a rozsah krevního srážení jsou regulovány rychlostí toku krve, koncentrací inhibičních faktorů (antitrombinu III, proteinu C, trombomodulinu a proteinu S) a fibrinolýzou. Fibrinolýza je zprostředkována serinovou proteázou *plazminem*, který cirkuluje jako neaktivní proenzym (plazminogen). Je aktivován tkáňovým aktivátorem

plazminogenu tPA za vzniku plazminu. Aktivita tPA je inhibována inhibitorem aktivátoru plazminogenu (PAI-1) (49).

Tkáňový aktivátor plazminogenu (tissue plasminogen activator, t-PA) je glykoprotein syntetizovaný v endotelových buňkách, z nichž je uvolňován po podnětu vyvolaném různými mediátory (trombin, adrenalin, dezmozpresin), ale i mechanickými vlivy (tělesná zátěž, komprese cév). V oběhu se váže na fibrin a tvoří s ním komplex s plazminogenem. Rychle jej inaktivuje PAI-1 (50).

Inhibitor tkáňového aktivátoru plazminogenu (plasminogen activator inhibitor PAI-1,2,3) se fyziologicky tvoří zejména v endotelu (PAI-1), v placentě (PAI-2), v hepatocytech a v trombocytech (PAI-3). Při fibrinolýze se plazminogen a aktivátor plazminogenu váží na fibrin, současně se aktivují inhibitory aktivátoru plazminogenu a jelikož koncentrace těchto inhibitorů významně převyšují koncentraci plazminu, nadměrná fibrinolýza je tak blokována. Efekt inhibitorů plazminogenu je především lokální. PAI-1 je tak nejvýznamnějším regulátorem fibrinolýzy. K endotelové dysfunkci patří snížená produkce t-PA a zvýšená koncentrace PAI-1 (50, 51).

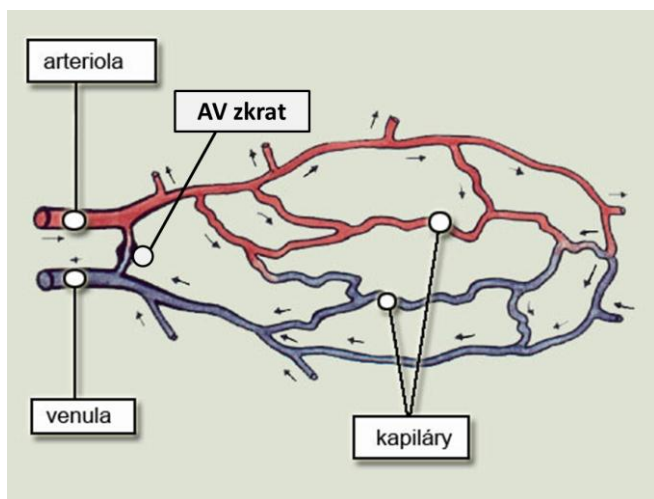
Endotelové mikročástice

Aktivované endotelové buňky v poškozené mikrocirkulaci uvolňují do oběhu membranózní částice, které jsou pro jejich extrémě malou velikost (0,1-2 μm) nazývané mikročástice. Tyto mikročástice nesou na povrchu membránové proteiny, fosfolipidy a některé markery, které byly původně na povrchu mateřských endotelových buněk (52). Endotelové mikročástice lze považovat za marker endotelové dysfunkce a rizikový faktor vzniku vaskulárních onemocnění, jejich detekce je však obtížná (52, 53). Konkrétně se na jejich uvolnění podílí TNF- α , IL-6 a tučná dieta. Tyto částice jsou schopné snížit dilatační schopnost endotelu na podání acetylcholinu, podporují tvorbu superoxidového aniontu a působí prokoagulačně a prozánětlivě (54).

2.2. Mikrocirkulace a mikrovaskulární reaktivita

Malé cévy neboli mikrocirkulace je cévní řečiště zahrnující malé arterie, arterioly, kapiláry, venuly a arteriolo-venulózní zkraty (*obr. 7*). Funkce a velikost cév mikrocirkulace se od systémového cévního řečiště velmi liší. Velké cévy zajišťují především transport krve mezi orgány, malé cévy kromě transportní funkce zajišťují také regulaci krevního tlaku ve tkáních a nutriční funkci. K přizpůsobení průtoku a zajištění homeostázy i metabolických potřeb tkání slouží v mikrocirkulaci především lokální

regulační systémy. Základní funkční procesy v mikrovaskulárním řečišti jsou *myogenní odpověď*, *vazomoce* a *permeabilita* (55).



Obrázek 7. Mikrocirkulace (upraveno podle 56).

Malé arterie (průměr 100-200 μm) jsou místem cévní rezistence a jejich porušená funkce vede ke vzniku arteriální hypertenze. Na této úrovni je cévní tonus regulován především smykovým třením krevního proudu. S klesajícím průměrem malých cév se v mikrocirkulaci jako hlavní dilatační faktor namísto NO uplatňuje endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) (57). EDHF je uvolňován při zvýšené rychlosti toku krve, při bazálním průtoku je jeho koncentrace nízká. Elasticita malých arterií (ne velkých, jak bylo předpokládáno) predikuje riziko kardiovaskulárních příhod (58). Malé arterie se větví do arterioly.

Arterioly a jejich řečiště jsou hlavním místem řízení kapilárního průtoku, regulují a v krátkém čase přizpůsobují průtok krve potřebám tkání. Každá arteriola se dále větví na další 3-4 arterioly s postupně klesajícím průměrem až k tzv. terminálním arteriolám o průměru 10-15 μm . Mechanismus regulace arterioly je odlišný od regulace malých arterií. Hlavním prostředkem regulace *větších arterioly* (20-30 μm) je tlakem ovlivněná konstriční schopnost hladkého svalstva v jejich stěnách, tzv. myogenní odpověď (59). Zvýšený transmurní tonus indukuje konstriční k zamezení zvýšeného přítoku do kapilárního řečiště. Tento autoregulační systém průtoku v mikrocirkulaci udržuje tlak ve tkáních stabilně pouze s malými odchylkami od normálního krevního tlaku a předchází tak kapilární hyperperfuzi a hypertenzi ve tkáních. Autoregulace mikrocirkulace probíhá v organismu nepřetržitě a její porucha předznamenává vznik mikrovaskulárních

komplikací. V *menších arteriolách* (méně než 20 μm) se v regulaci tonu uplatňuje především lokální výměna látek. Všechny mechanismy arteriolárního řečiště plynule regulují přítok a hlavně redistribuci krve do kapilárního řečiště a zajišťují tak adekvátní metabolickou potřebu cílových tkání. Kapiláry jsou organizovány po 10-15 do funkčních jednotek, přičemž každá funkční jednotka je zásobena a regulována jednou arterioulou. V klidovém stavu je plně prokrvena pouze asi polovina kapilárního řečiště a průtok jednotlivými funkčními jednotkami je nepravidelný. Toto uspořádání má výhodu velké flexibility a funkční rezervy. Distribuce krve do kapilárních funkčních jednotek je řízena vazomocí (60).

Vazomoce se odehrává na úrovni větvení malých arteriol téměř ve všech tkáních. Je to spontánní rytmická aktivita cév, která se projevuje periodickými změnami cévního průsvitu a následně změnami perfúze. Její přesný mechanismus není dosud podrobně objasněn, hlavní vliv má však fenomén jakési lokální autostimulace vycházející pravděpodobně ze svalové komponenty cévní stěny, která v určitých místech působí jako pacemaker. Kontrakce se následně šíří dále do periferie. Za klidových podmínek je amplituda vazomoce malá, zvýraznit ji lze stimulací, nejlépe zahřátím. Vazomoce je také pravděpodobně ovlivněna nervovou stimulací, protože je prokázán inhibiční vliv lokální anestezie (61). Malé arterioly jsou bohatě inervované a porucha jejich reaktivity na neuronální podněty spolu s porušeným metabolismem vlastních nervů jsou podkladem diabetické neuropatie (62).

Kapiláry (5-8 μm) jsou cévy nejmenšího průměru a jejich hlavní funkcí je výměna plynů a nutrientů ve tkáních. Tento proces je regulován změnami transendoteliální a interendoteliální permeability. K zajištění bezprostřední metabolické potřeby při zvýšené aktivitě mají různé tkáně různě hustou kapilární síť. Zvýšenou metabolickou potřebu zajišťuje především vazodilatace zásobujících arteriol spolu s mobilizací zavřených či v klidu kontrahovaných kapilár. Tyto cévy nejmenšího průměru jsou ovlivněny také nervovými podněty (nejvíce přes α_1 adrenoreceptory) (1).

Přímé spoje mezi arterioly a venulami se nazývají *AV zkratky* (AV shunts), jimiž průtok obchází kapilární řečiště. Plní především termoregulační funkci. Podíl AV zkratů a kapilárního řečiště je různý podle druhu tkáně, nejvýraznější rozdíl je mezi papilárním (prst, dlaň, planta) a nepapilárním typem kůže. Přibližně 25% krevního průtoku mikrovaskulárním řečištěm v papilárním typu kůže probíhá v nutričních kapilárách a 75% v AV zkratech (63, 64). Proti tomu nepapilární typ kůže má minimum AV zkratů a mikrocirkulace zde plní především nutriční funkci.

Mikrovaskulární reaktivita je odpověď mikrocirkulace na různé vlivy. Klíčovou úlohu v tomto procesu hraje NO. Mezi faktory ovlivňující MVR patří různé cirkulující substance, neurotransmitery, lokálně působící látky a krevní plyny. Nezanedbatelný vliv má také nervová stimulace. Malé cévy reagují na podněty dvěma typy odpovědí – na endotelu závislou a nezávislou (endotel dependentní a endotel non-dependentní). Následkem endotelové dysfunkce je snížená dostupnost NO (9) a tím snížená schopnost cév k vazodilataci závislé na endotelu. Mechanismus této odpovědi spočívá v navázání acetylcholinu na endotelové receptory, zvýšení koncentrace nitro-buněčného kalcia, aktivaci eNOS a tím zvýšené produkci NO. Vazodilatace nezávislá na endotelu je založena na přímé difuzi NO skrz endotelovou buňku. Konečným krokem obou mechanismů je ovlivnění hladké svaloviny ve stěně cév molekulami NO s následnou vazodilatací (65).

Citlivost mikrocirkulace na vazodilatačně působící látky se využívá k hodnocení její reaktivity. Hodnocení je založeno na porovnání průtoku řečištěm v klidovém stavu a po stimulaci. V praxi se ke stimulaci používají přímo vazodilatačně působící látky nebo různé fyzikální stimulační testy (teplo, tlak), které vazodilataci způsobují nepřímo, většinou přes zvýšenou koncentraci NO. Nejpoužívanější vazodilatačně působící látkou je acetylcholin (odpověď závislá na endotelu) a nitroprusid sodný (odpověď nezávislá na endotelu). Ze stimulačních testů jsou nejčastěji využívány post-okluzivní reaktivní hyperémie (PORH) a termální hyperémie (TH). Reaktivní hyperémie je fyziologický proces. Proto je k hodnocení MVR vhodná a v praxi jako stimulace relativně jednoduše navoditelná. Reakce mikrocirkulace je při hyperémii podmíněna podnětem ze zvýšeného smykového tření (66). Reaktivní hyperémii zajišťuje jak vazodilatační kapacita větších cév, tak především procesy v mikrocirkulaci – vazodilatace arteriol a otevření rezervních kapilár.

2.3. Hodnocení funkce endotelu a mikrovaskulární reaktivity

Moderní angiologie se stále častěji zabývá otázkou endotelové dysfunkce, možnostmi jejího hodnocení a ovlivnění. Endotelová dysfunkce a MVR se hodnotí za pomoci biochemických parametrů v krvi i v moči, instrumentálních invazivních i neinvazivních metod nebo kombinací obou postupů. Stanovení přítomnosti dysfunkce endotelu a její kvantifikace by mohly být využity například i při odhadu kardiovaskulárního rizika pacienta (31). Veškeré metody detekce endotelové dysfunkce zde popisované jsou sice proveditelné v praxi, nicméně rutinně se k tomuto účelu zatím neprovádějí a zůstávají tak

hodnocením okrajovým či experimentálním. Výjimkou je vyšetření mikroalbuminurie používané běžně k diagnostice i kontrole terapie.

2.3.1. Biochemické parametry

Existuje několik biochemických parametrů, podle jejichž plazmatických koncentrací a podle změn těchto koncentrací lze stanovit míru aktivace endotelu. Dosud nebyly vyvinuty metody k přímému biochemickému hodnocení funkce endotelu, a proto se používají vyšetření, z jejichž výsledků ji lze odvodit nepřímě. Cirkulující biomarkery se mohou měřit nejen jako nepřímé indikátory poškození endotelových buněk, ale i jako ukazatele počínajícího zánětu. O funkci endotelu nejlépe vypovídají vzorky krve získané přímo z postiženého místa, např. při koronarografii, což však vyžaduje složitý invazivní výkon. Pro praxi je tedy vhodnější stanovení plazmatických či sérových koncentrací z žilní krve. Toto stanovení však může být ovlivněno biotransformací látek endotel ovlivňujících i látek endotelem produkovaných či paralelně probíhajícím patologickým procesem (např. zánětem). Podle potřeby lze hodnotit bazální koncentraci markerů endotelové dysfunkce či jejich koncentraci po stimulaci (fyzickou zátěží, farmaky) (12, 17).

Nepřímé hodnocení vychází ze stanovení koncentrace cirkulujících adhezivních molekul, enzymů, proaterogenních látek, antifibrinolytických látek a koncentrace markerů zánětu. O zvýšené aktivaci endotelu vypovídají vyšší hladiny cytoadhezivních molekul ICAM, VCAM, E- a P-selektinů, zvýšené hodnoty aktivity sérové N-acetyl-beta-glukosaminidázy (NAG), fibronektinu a vitronektinu. Rozvoj oxidačního stresu může být také dokumentován stanovením malondialdehydu (MDA) jako indikátoru lipidové peroxidace (67).

Z faktorů koagulační kaskády a složek podílejících se na fibrinolýze se pozoruje při endotelové dysfunkci především snížená produkce t-PA, zvýšená hladina PAI-1 a vzestup koncentrace vWF.

Z faktorů ovlivňujících vazokonstrikci a vazodilataci se stanovují koncentrace všech tří izoforem NO-syntázy, angiotenzinu II, endotelinů a poměr množství nitritů a nitrátů. Ideální by bylo stanovení koncentrace NO, to je však pro jeho nestabilitu obtížné (65).

Některé cytokiny uvolňované při aktivaci endotelu (IL-6) zvyšují plazmatickou koncentraci CRP, fibrinogenu, PAI-1 a sérového amyloidového proteinu A. CRP pak dále urychluje imunologickou odpověď včetně zvýšené tvorby adhezivních molekul a chemokinů, podporuje uvolňování PAI-1 z endotelových buněk, uvolňování

endotelinu-1 a také snižuje aktivitu e-NOS. CRP je pokládán za jeden z cirkulujících markerů endotelové dysfunkce, je však značně nespecifický. Laboratorně se stanovuje hs-CRP (high sensitivity C-reactive protein) (10).

Endotelovou dysfunkci lze hodnotit i vyšetřením moči, kde se stanovuje albuminurie. Mikroalbuminurie je definována jako mírný vzestup exkrece albuminu do moči, který není prokazatelný semikvantitativní metodou (indikátorovými proužky ke stanovení proteinurie), a to v množství mezi 20 - 200 $\mu\text{g}/\text{min}$ (tj. 30 - 300 mg/den), nebo poměrem albumin/kreatinin v moči 2,5 – 25 mg/mmol. Exkrece albuminu do moči závisí na integritě glomerulární membrány i tubulární reabsorpci. Po počáteční hyperfiltraci a následné mikroalbuminurické fázi onemocnění dochází u pacientů k postupnému vzestupu exkrece bílkovin do moči a k poklesu glomerulární filtrace. Následuje proteinurie již prokazatelná indikátorovými proužky (makroproteinurie), která je charakteristická pro klinicky manifestní nefropatii. Mikroalbuminurie je sdružena s řadou rizikových kardiovaskulárních faktorů jako je arteriální hypertenze, inzulinová rezistence, diabetes mellitus, dyslipidémie a endotelová dysfunkce (68).

Vyšetřování mikroalbuminurie je velmi důležitým a klinicky snadno zjistitelným markerem endotelové dysfunkce, prediktorem renálního poškození, kardiovaskulárního rizika i celkové mortality. Používá se jak v diagnostice, tak i ke kontrole léčby. Zvláště přínosné je toto vyšetření u nemocných s diabetem obou typů a u nemocných s arteriální hypertenzí. Nález mikroalbuminurie upozorňuje na nezbytnost zahájení či úpravy terapie, protože časná léčebná intervence může progresi nefropatie zpomalit či zastavit a tím ovlivnit riziko pacienta (69). Pokles mikroalbuminurie je navíc projevem pozitivní reakce na zvolený terapeutický postup.

2.3.2. Instrumentální metody

Funkci endotelu lze hodnotit pomocí instrumentálních metod jak na velkých cévách, tak i na kapilárách v mikrocirkulaci. Vyšetření parametrů mikrocirkulace a hodnocení tkáňové perfúze bylo ještě donedávna obtížně proveditelné, protože tyto cévy jsou k přímému neinvazivnímu pozorování in vivo málo dostupné. Moderní vyšetřovací metody však již tuto detekci umožňují.

Zobrazovací metody stanovující endotelovou dysfunkci na základě reakce cévní stěny lze rozdělit na invazivní a neinvazivní. Použití těchto metod vychází z předpokladu, že endotelová dysfunkce je systémový děj a že výsledky získané ve vyšetřované oblasti vypovídají o stavu cévního řečiště v ostatních, méně přístupných, a přitom klinicky

významnějších lokalizacích. Tyto metody jsou založeny na principu omezené schopnosti poškozené cévní stěny reagovat přiměřenou vazodilatací na podněty závislé na endotelu. Patofyziologickým podkladem je snížení biologické dostupnosti NO v důsledku endotelové dysfunkce (70).

Vyšetření velkých cév

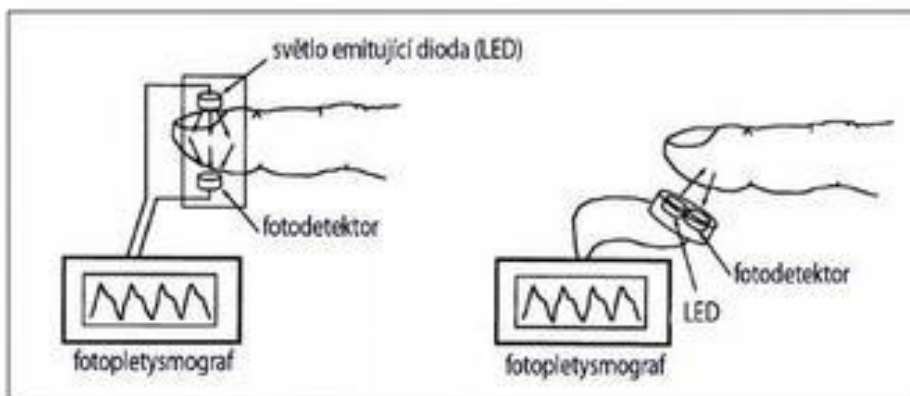
Přímo v koronárním řečišti lze pomocí kvantitativní koronarografie či intrakoronární dopplerovské ultrasonografie posuzovat schopnost dilatace epikardiálních věnčitých tepen po podání infúze acetylcholinu, který představuje na endotelu závislý podnět, podobně jako bradykinin, serotonin či L-arginin (65). Tuto invazivní metodu lze využít i v periferním řečišti. Ke srovnání lze užít podněty na endotelu nezávislé např. nitráty, adenosin či papaverin. U pacientů s aterosklerózou, endotelovou dysfunkcí, ale i u pacientů s pouhou přítomností kardiovaskulárních rizikových faktorů je na endotelu závislá odpověď na stimuly snižena, nebo se může objevit paradoxní vazokonstrikce (10, 71). Endotelová dysfunkce ovlivňuje oba typy vazodilatačních odpovědí.

Vzhledem k invazivitě i náročnosti na prostorové a přístrojové vybavení se však k detekci endotelové dysfunkce používají metody méně invazivní a jednodušší.

Pletyzmografie a digitální fotopletyzmografie

K detekci změn v tkáňové perfúzi lze dále využít částečně invazivní pletyzmografii na předloktí s aplikací acetylcholinu nebo metacholinu. Pletyzmografie je založena na registraci změn objemu tkáně různými snímači. Slouží k zaznamenávání pulzací, měření tlaku a průtoku krve. Nejčastěji se dnes užívá tzv. strain-gauge pletyzmografu (trubičky naplněné rtuť), reopletyzmografu nebo fotopletyzmografu (*obr. 8*). Průtok se měří na principu okluzivní pletyzmografie - proximálně od snímače je insuflovanou manžetou tonometru dočasně zastaven odtok krve z končetiny. Počáteční vzestup objemu končetiny odpovídá přítoku krve, tedy i průtoku. Obvykle se neměří klidové hodnoty průtoku, ale tzv. maximální průtok po 3-5 minutové tepenné okluzi (reaktivní hyperémie) (71).

Digitální fotopletyzmografie je jedna z neinvazivních metod, která je schopna posoudit hemodynamiku žilního i tepenného toku. Je založena na digitálním měření pulzní vlny pomocí infračerveného světla, jehož zdrojem i snímačem jsou diody upevněné na vyšetřovaném prstu (72).



Obrázek 8. Princip fotoelektrické prstové pletyzmografie (upraveno podle 73).

Flow mediated dilation

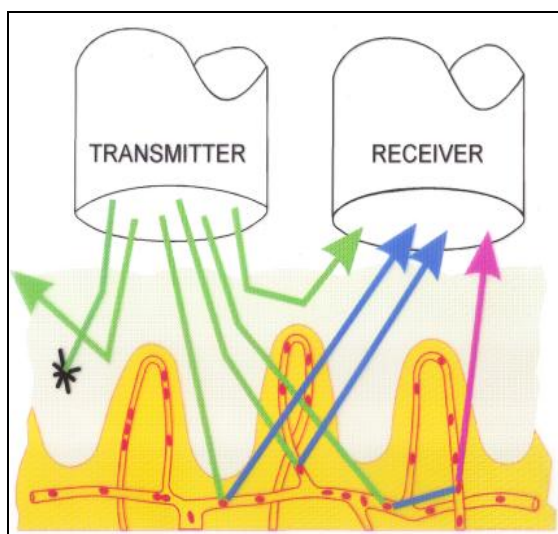
Mezi ultrazvukové metody detekující endotelovou dysfunkci se řadí i měření dilatace tepny průtokem – flow-mediated dilation (FMD). Tato metoda je založena na stanovení postischemické, na endotelu závislé vazodilatace tepny, která je ultrazvukovému vyšetření dobře dostupná. Vyšetřovanou tepnou je nejčastěji a. brachialis, eventuelně a. poplitea (72). S poklesem FMD jsou spojeny i hlavní rizikové faktory aterosklerózy. Snížení FMD je prokázáno u dětí s familiární hypercholesterolémií, u dospělých kuřáků a u jedinců s již diagnostikovanou koronární nemocí. Snížená FMD byla detekována také v přítomnosti dalších rizikových faktorů, jako jsou pozdní věk, arteriální hypertenze, diabetes mellitus, rodinná anamnéza koronární nemoci, menopauza, nedostatek pohybu, hyperhomocysteinémie či obezita (70, 71).

FMD je závislá na řadě faktorů (bazálním průměru vyšetřované tepny, požití alkoholu, kofeinu a tučného jídla, kouření, předchozí fyzické aktivitě, užívání různých léků i vitamínů). Dále záleží na technickém vybavení, způsobu vyhodnocování a erudici vyšetřujícího (71).

Laser-Doppler

Další metodou vhodnou k vyšetření mikrocirkulace je stanovení kožní perfúze založené na principu metody laser-Doppler. Lze tak hodnotit parametry cirkulace i v nejmenších cévách. Její výhodou je možnost měření i velmi nízkých hodnot tkáňové perfúze a také fakt, že se jedná o metodu neinvazivní, pacienta nezatěžující a relativně jednoduchou pro vyšetřující osobu (74). Na rozdíl od sonografického vyšetření však metoda laser-Doppler z mnoha důvodů není vhodná k měření průtoku krve ve větších cévách.

Princip metody laser-Doppler je založen na tzv. dopplerovském efektu. V přístroji je emitován světelný laserový paprsek, který je optickými vlákny veden do sondy připevněné oboustranně lepící páskou ke kůži vyšetřovaného pacienta. V kůži se světelný paprsek odráží od pevných i pohybujících se struktur, ale jen paprsek odražený od pohybující se částice (většinou krvinky) může změnit svoji vlnovou délku. Část odražených paprsků se pomocí dalšího světelného vodiče vrací zpět do analytické jednotky, kde je intenzita světla a velikost dopplerovského posunu vlnové délky vyhodnocena (*obr. 9*).



Obrázek 9. Princip metody laser-Doppler, odraz světelného paprsku od pohybujících se červených krvinek v kůži (převzato z firemních materiálů www.perimed-instruments.com).

Touto metodou lze změřit počet pohybujících se krevních elementů a jejich rychlost do maximální hloubky přibližně 0,8-1,2 mm. Změřené hodnoty se násobí a za použití korekčních algoritmů se vypočítává perfúze v tzv. perfúzních jednotkách (PU), které jsou arbitrární a nejsou vztaženy k přesnému objemu měřené tkáně. Aktuální hodnoty jsou zobrazeny na displeji přístroje a současně zaznamenávány pro pozdější vyhodnocení (*obr. 10*). Vyšetření musí být prováděno za standardních podmínek (zejména teploty vzduchu) a u aklimatizovaného pacienta. Hodnocena je klidová kožní mikrocirkulace na předloktí nedominantní horní končetiny, kde je převážně nutriční mikrovaskulární řečiště (nepapilární typ kůže), a prstu na téže končetině, kde je převaha funkčních kapilár a AV zkratů (papilární typ kůže) (75).

Při měření pomocí metody laser-Doppler se využívá změn perfúze před stimulací a po ní, protože klidové hodnoty perfúze bez stimulace neposkytují dostatečnou výpovědní hodnotu. Stimulačním testem je zde reaktivní hyperémie po ischemii končetiny (PORH), která je zajištěna standardní manžetou tonometru insuflovanou na suprasystolický tlak po dobu několika minut s následným uvolněním. Toto vyšetření je založeno na produkci NO endotelem, jeho vazodilatačním efektu a funkční kapacitě endotelu. Hlavním stimulem k syntéze a uvolnění NO je již zmíněné smykové tření na stěně cévy, které je způsobené zrychlením toku krve a vede k následné vazodilataci (76). Kožní perfúze je silně závislá na teplotě kůže. Proto se jako druhý stimulační zátěžový test používá lokální zahřátí za použití speciální termostatické sondy, způsobující reaktivní hyperémii (TH) (77).

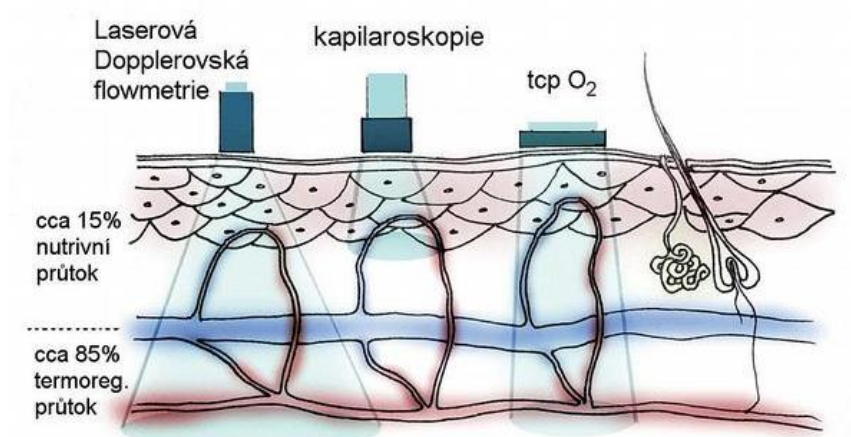


Obrázek 10. Přístroj a ukázka vyšetření metodou laser-Doppler (převzato z firemních materiálů www.perimed-instruments.com).

Kapilaroskopie a videokapilaroskopie

Kapilaroskopie je neinvazivní, poměrně levné a jednoduché mikroskopické vyšetření (*obr. 11*). In vivo se provádí na kapilárách oční spojivky nebo kůže, v praxi pro snadnou dostupnost nejčastěji v oblasti nehtových valů prstů horních končetin. Kličky kapilár zde na rozdíl od jiných lokalit probíhají paralelně s kožním povrchem. Před zahájením vyšetření je nutné adaptovat vyšetřovanou osobu na standardní teplotu a zajistit čistotu nehtového lůžka. Pro lepší rozlišení kapilárních kliček se aplikuje do oblasti nehtového valu kapka imerzního oleje. Obvykle se vyšetřuje 2.–5. prst na obou horních končetinách (78).

Dokonalejší modifikací standardního kapilaroskopického vyšetření je videokapilaroskopie. Jde o metodu, při které se kapilaroskopický obraz přenáší na obrazovku a záznam je nahráván, což umožňuje podrobné posouzení změn včetně měření průměru jednotlivých kapilár a současně usnadňuje sledování dynamiky nálezů na kapilárních kličkách v čase. V kapilaroskopickém obraze je jedním z hlavních hodnocených kritérií počet kapilárních kliček (79).



Obrázek 11. Porovnání vyšetřovacích technik mikrocirkulace (metoda laser-Doppler, kapilaroskopie a metoda transkutánního měření krevních plynů) (upraveno podle 80).

Kontrastní vyšetření mikrocirkulace s mikrobublinami

Kontrastní ultrazvukové vyšetření s mikrobublinami (contrast-enhanced ultrasound with microbubbles) patří mezi nové ultrasonografické metody k hodnocení mikrocirkulace. Toto vyšetření umožňuje v reálném čase hodnotit perfúzi různých tkání. Jako kontrastní látka se používá plyn ve stabilizovaných mikrobublinách (81). Výhodou je pak i interakce mezi ultrazvukovým vlněním a vlastním kontrastním médiem (za použití určitých frekvencí dochází k destrukci bublin).

2.3.3. Kombinace biochemických parametrů a instrumentálních metod

Kombinace hodnocení endotelové dysfunkce pomocí metod instrumentálních a biochemických může přinést komplexnější obraz o cévních změnách než samotné vyšetření pouze jedním z výše uvedených postupů a to i v počátečním stádiu poškození, kdy změny ve funkci endotelu ještě nelze detekovat jinými postupy (82).

2.4. Endotelová dysfunkce a mikrovaskulární reaktivita u diabetu a endokrinopatií

U pacientů s diabetem se cévní změny tradičně rozdělují na mikroangiopatii a makroangiopatii, přičemž endotelová dysfunkce je globální poruchou celého cévního řečiště. Mikroangiopatie způsobuje u pacientů s diabetem 1. i 2. typu rozvoj pozdních komplikací (nefropatie, retinopatie, neuropatie). Důsledkem přítomnosti makroangiopatických změn (aterosklerózy) je v této skupině pacientů zvýšený výskyt kardiovaskulárních a cerebrovaskulárních příhod a ischemické choroby dolních končetin. Zvýšené riziko výskytu cévních komplikací je popisováno i u pacientů s hormonálními nemocemi, jako je například akromegalie (spojená s nadprodukcí růstového hormonu) (4), Cushingův syndrom (s nadprodukcí kortizolu) (3, 5) a Connův syndrom (vyšší produkce aldosteronu s přítomností významné arteriální hypertenze) (6).

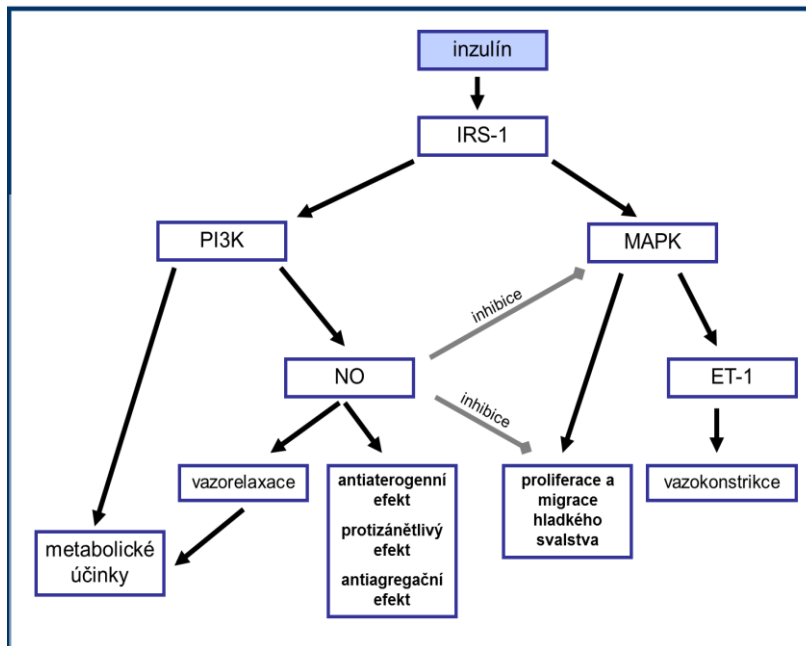
Podrobný patofyziologický podklad vzniku endotelové dysfunkce u jednotlivých onemocnění či stavů (hyperglykémie, arteriální hypertenze, hyperlipidémie) je popsán v kapitole 2.1.1.

Diabetes mellitus 2. typu je onemocnění úzce spojené s negativními civilizačními návyky, jako je nedostatečná fyzická aktivita, zvýšený příjem potravy, kouření a také s ostatními chorobami. Patofyziologickým podkladem vzniku endotelové dysfunkce pak u takového pacienta není pouze hyperglykémie, ale celý soubor negativních vlivů (hyperinzulinémie, arteriální hypertenze, hyperlipidémie a další). Můžeme se domnívat, že se tyto rizikové faktory sčítají a poškození endotelu vzniká o to rychleji (1).

Poruchy mikrocirkulace jsou přítomné i u pacientů s čerstvě diagnostikovaným diabetem, u nediabetiků s inzulinovou rezistencí a dokonce i u osob s normálním metabolizmem glukózy, ale s familiárním rizikem pro rozvoj diabetu (7, 83). Někteří obézní pacienti s inzulinovou rezistencí a normální glukózovou tolerancí mají stejně závažnou endotelovou dysfunkci jako pacienti s diabetem 2. typu bez inzulinové léčby. Tato skutečnost vede k domněnce, že endotelová dysfunkce může být více ovlivněna inzulinovou rezistencí než hyperglykemií (84). Podle jiného názoru by dokonce mohla být inzulinová rezistence vyvolávajícím faktorem poškození mikrovaskulární reaktivity (85).

Dysbalance inzulinémie s diabetem úzce souvisí. Pacienti s diabetem 2. typu mají většinou na počátku onemocnění hyperinzulinémií, sekrece inzulinu u nich postupně klesá a v pozdější fázi onemocnění se často stávají závislí na inzulinoterapii stejně jako pacienti s diabetem 1. typu. Inzulín má kromě řady metabolických účinků i významný

vliv na endotel a hladkou svalovinu v cévní stěně. Je důležitým stimulatorem tvorby NO v endotelu prostřednictvím aktivace fosfatidylinositol-3-kinázy (PI3K), což vede k vazodilataci a zvýšení kapilární perfúze. Za fyziologických podmínek vede stimulace tvorby NO inzulinem k udržení rovnováhy mezi vazodilatací a vazokonstrikcí (obr. 12). Při inzulinové rezistenci je aktivace cesty PI3K snížena a převažuje druhá hlavní signální cesta inzulinu, která působí přes mitogenem aktivovanou protein-kinázu (MAPK).



Obrázek 12. Schématické znázornění mechanismu působení inzulinu na cévní stěnu a rovnováhy mezi vazodilatačním a vazokonstrikčním působením inzulinu (autor M. Prázný). IRS-1 – inzulin responzivní substrát 1, ET-1 – endotelin 1.

Aktivace MAPK způsobuje převážně vazokonstrikci a zvyšuje riziko rozvoje endotelové dysfunkce a aterosklerotických změn (86).

Vazodilatační působení inzulinu v tepenném i žilním řečišti a zvýšení kapilární perfúze bylo prokázáno v řadě studií. V průběhu euglykemického clampu dochází ke zvýšení průtoku krve v kosterním svalu. Tento jev je závislý na délce působení a koncentraci inzulinu. Ke zvýšení množství kapilár zapojených do perfúze dochází v řádu minut a následně se zvyšuje i vychytávání glukózy v kosterním svalu (87). V případě inzulinové rezistence či inzulinopenie dochází k nedostatečnému vazodilatačnímu působení inzulinu, tím je otevřeno méně kapilár, snižuje se průtok kosterním svalem, je v něm snížena spotřeba glukózy, zatímco glykémie v plazmě stoupá (88).

Koncentrace inzulínu v krvi má vliv také na krevní tlak. Inzulín vede k aktivaci sympatického autonomního nervového systému a stimulaci sekrece vazokonstrikčně působícího endotelinu 1. U zdravých osob dochází po vzestupu koncentrace inzulínu ke zvýšení koncentrace katecholaminů. Inhibice MAPK a blokáda receptorů pro endotelin 1 vede ke zvýšení arteriálního krevního tlaku a převažující vazokonstrikci (89). Inzulín tak vykazuje protichůdné působení, které je za fyziologických podmínek v rovnováze a má tak pouze malý dopad na krevní tlak. Za situace, kdy se u jedince rozvine inzulínová rezistence, dochází ke snížení biologické dostupnosti NO a k chronické aktivaci sympatiku vlivem kompenzatorní hyperinzulinémie. Rovnováha mezi vazodilatačním a vazokonstrikčním působením inzulínu je tak vychýlena ve směru vazokonstrikce. Hyperinzulinémie se u pacientů s inzulínovou rezistencí proto může podílet i na rozvoji arteriální hypertenze (90).

Aktivací MAPK a dalších protoonkogenních transkripčních faktorů se inzulín uplatňuje jako růstový faktor. V kulturách hladkých buněk arteriální stěny stimuluje jejich růst a migraci (86). Zvýšená proliferační aktivita některých buněk cévní stěny se může projevit zvýšeným výskytem cévních komplikací u pacientů s hyperinzulinémií. V hladkých svalových buňkách cévní stěny dochází k interakci mezi signální cestou inzulínu a renin-angioteninovým systémem (91). Receptor pro angiotenzin II (AT_1) po aktivaci způsobuje prozánětlivou odpověď a má proaterogenní efekt. Inzulín stimuluje prostřednictvím MAPK expresi angiotenzinu a AT_1 v kulturách hladkého svalstva a naopak angiotenzin II ovlivňuje signální cestu inzulínu. Při inzulínové rezistenci tak nadměrná aktivace angiotenzinu II vede kromě vlastního proaterogenního působení navíc i k převažující aktivaci MAPK se všemi výše uvedenými důsledky a může se podílet na rozvoji kardiovaskulárních komplikací (92).

Diabetes mellitus ovlivňuje také distribuci krve v mikrocirkulaci. Dynamickým kapilaroskopickým vyšetřením byl v mikrovaskulárním řečišti u pacientů s diabetem prokázán mírně zvýšený průtok, pouze však u pacientů s diabetem bez makrovaskulárních komplikací, u pacientů s diabetem a vaskulárními komplikacemi byl průtok naopak snížený. Důvodem je pravděpodobně zvýšení průtoku AV zkraty a maldistribuce v mikrocirkulaci (93). U pacientů s diabetem byl také pozorován pokles průtoku v nutričních kapilárách se současným úměrným zvýšením průtoku v AV zkratech. K diabetické mikroangiopatii přispívá i ztráta venoarteriální reaktivity, která

v normální situaci omezuje arteriální přítok, zvyšuje prekapilární rezistenci ve tkáních a zamezuje výraznějšímu vzestupu kapilárního tlaku (94).

Mikrovaskulární dysfunkci u pacientů s diabetem v neposlední řadě negativně ovlivňují AGE. Vyšší koncentrace AGE se vyskytuje u pacientů s diabetem 2. typu i u pacientů s rizikem jeho rozvoje a je asociována se signifikantním zhoršením mikrovaskulární reaktivity (95).

2.5. Shrnutí teoretické části

Endotel má nezastupitelnou úlohu v regulaci funkce cévní stěny a mikrovaskulární reaktivity. Podílí se na regulaci cévního tonu, krevního tlaku, tkáňové perfúze a účastní se mnoha fyziologických procesů. Endotelové buňky pomocí různých mediátorů ovlivňují vazomotorickou činnost cév, rovnováhu koagulační kaskády, proces fibrinolýzy a regulují permeabilitu cév. Existuje mnoho mechanických, biologických i imunochemických faktorů, které vedou k rozvoji oxidačního stresu, negativně ovlivňují endotel, vedou k jeho aktivaci a dysfunkci. Endotelová dysfunkce předchází rozvoj aterosklerotických změn a je reverzibilní. Její včasná detekce a zahájení preventivních léčebných opatření by u predisponovaných pacientů mohlo vést k zabránění rozvoje cévních komplikací nebo alespoň k jejich oddálení. Výzkum endotelové dysfunkce i mikrocirkulace a vývoj nových metod k jejich hodnocení je proto aktuálním tématem moderní angiologie i řady jiných oborů. V současné době se míra endotelové dysfunkce a stav mikrovaskulárního řečiště hodnotí pomocí biochemických markerů, některými instrumentálními metodami nebo jejich kombinací. Znalost těchto parametrů může přinést souhrnný obraz o změnách funkce endotelu i v počátečním stadiu poškození, kdy tyto změny ještě nelze detekovat jinou metodou. U predisponovaných jedinců, například pacientů s diabetem, by mohlo být hodnocení endotelové dysfunkce a stavu mikrovaskulárního řečiště důležité pro posouzení rizika rozvoje vaskulárních komplikací. U rizikových pacientů by případně farmakologická i nefarmakologická intervence mohla vést ke snížení rizika rozvoje cévních komplikací již vzniklých.

Kromě mikroalbuminurie není endotelová dysfunkce zatím v praxi běžně vyšetřována. Limitací rutinního vyšetření je především rozporuplnost výsledků získaných z různých uvedených vyšetřovacích metod, neznalost přesnějších vztahových souvislostí jednotlivých markerů endotelové dysfunkce a rizika vzniku onemocnění, chybějící přesná diagnostická kritéria a v neposlední řadě nedostatek studiemi podložených možností léčebné intervence endotelové dysfunkce.

3. Hypotéza a cíle práce

Regulační mechanismy mikrocirkulace exponované komplexním patologickým vlivům jsou odlišné od regulace za podmínek fyziologických (1). Cílem práce je doložit na čtyřech přesně definovaných souborech pacientů s metabolickými a hormonálními poruchami vliv těchto patologických podmínek na regulaci mikrovaskulárního řečiště v klidu i po stimulaci. Vycházeli jsme z předpokladu, že po odstranění patologických podmínek dojde k normalizaci nebo alespoň k významnému zlepšení změn v mikrocirkulaci a v jejích regulačních mechanismech. Ke zkoumání mikrocirkulace byla použita kombinovaná metodika vyšetření vybraných biochemických ukazatelů funkce endotelu a neinvazivní vyšetření kožní mikrocirkulace pomocí metody laser-Doppler.

Specifické cíle naší práce byly následující:

- zhodnotit kožní mikrovaskulární reaktivitu a faktory, které ji mohou u pacientů s Cushingovým syndromem ovlivňovat (parametry fibrinolýzy, oxidačního stresu, přítomnost arteriální hypertenze, diabetu a hyperlipidémie)
- zhodnotit vliv rychlé změny glykémie na mikrovaskulární reaktivitu a funkci endotelu během hyperinzulinemického izoglykemického a hyperglykemického clampu u pacientů s diabetem 1. typu
- porovnat mikrovaskulární reaktivitu, metabolické parametry a parametry funkce endotelu před standardní snídaní a následně v několika časových intervalech postprandiálně u pacientů s recentně zjištěným diabetem 2. typu
- porovnat parametry glykemické variability s kompenzací diabetu, s parametry inzulinové terapie a s mikrovaskulární reaktivitou u pacientů s diabetem 1. typu léčených inzulinovou pumpou

4. Metodika

V jednotlivých studiích byly použity různé soubory pacientů s metabolickými a hormonálními poruchami, jejichž definice jsou uvedené v příslušných podkapitolách. Metody vyšetření biochemických parametrů, markerů endotelové dysfunkce a mikrovaskulární reaktivity, stejně tak jako použité statistické metody, byly shodné.

4.1. Biochemické metody

Celkový plazmatický cholesterol (TC), HDL- a LDL-cholesterol (HDL-C, LDL-C) a triglyceridy (TG) byly stanoveny rutinními metodami v analyzátoru HITACHI nebo analyzátoru COBAS Mira (Roche). LDL-C byl vypočítán pomocí Friedwaldova vzorce (96).

Glykovaný hemoglobin HbA_{1c} byl měřen pomocí Imx Ghb Assay system, Abbot analyzer (USA) s DCCT kalibrací ve studii s pacienty s Cushingovým syndromem a pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC – high performance liquid chromatography) s IFCC kalibrací v ostatních studiích. Plazmatická hladina glukózy byla měřena standardní glukózo-oxidázovou metodou analyzátozem Cobas Mira (ROCHE) či Super GL Ambulance (Dr. Müller Gerätebau, Německo). Hladina inzulínu v séru byla stanovena pomocí RIA kitu (Pharmacia-Upjohn Diagnostics, Švédsko a CIS Bio International, Francie). Inzulínová rezistence byla vypočítána pomocí HOMA-R indexu (homeostasis model assessment insulin resistance index) z glykémie nalačno (G) a koncentrace inzulínu (I) s použitím vzorce: $(G \cdot I) / 22.5$ (97).

Aktivita Cu,Zn-SOD v erytrocytech byla vyhodnocena xantin-xantin-oxidázovým systémem ve spektrofotometru Genesys 5, USA (98). Plazmatická koncentrace MDA byla měřena pomocí fluorimetrické metody (99).

Plazmatická koncentrace tPA a PAI-1 byly stanoveny pomocí ELISA, komerčním kitem Coalisa tPA and PAI-1 (KABI Diagnostics, Švédsko). Fibrinogen byl stanoven pomocí metody dle Clausse (100) v automatickém analyzátoru.

E-selektin, P-selektin, ICAM-1 a VCAM byly stanoveny komerčními kity ELISA, RD System Europe, (Abingdon, UK). Sérová NAG byla měřena spektrofotometricky s využitím p-nitrofenyl-N-acetyl- β -D-glukózaminu (Sigma, USA) jako substrátu (101).

Hladiny plazmatického kortizolu a volný močový kortizol (UFC) byly stanoveny pomocí RIA kitu (Immunotech, Francie).

Všechny vzorky pacientů v jednotlivých studiích byly zpracovány vždy najednou, aby se minimalizovala variabilita měření.

4.2. Mikrovaskulární reaktivita

Kožní mikrovaskulární reaktivita byla měřena metodou laser-Doppler, přístrojem PeriFlux PF 4001 Master a termostatickou jednotkou PeriTemp 4001 Heater, Perimed (Švédsko) (*obr. 13*). Nastavení přístroje bylo následovné: časová konstanta 0,02 s, frekvence měření 32 Hz. Vyšetřování probíhalo při pokojové teplotě 22°C, vsedě, pacienti byly před vyšetřením ponechány 30 minut v klidu z důvodu aklimatizace. Ke stanovení mikrovaskulární reaktivity byly vybrány stimulační testy post-okluzivní reaktivní hyperémie (PORH) a termální hyperémie (TH). Pro oba testy byly použity dvě sondy; standardní sonda umístěná na břišku třetího prstu nedominantní horní končetiny a termostatická sonda umístěná na ventrální stranu předloktí téže končetiny (typ 455, průměr 23 mm, vzdálenost vláken 0,25 mm). Světlovodná vlákna termostatické sondy jsou integrována do temperovaného disku, což umožňuje konzistentní zahřátí celé plochy pod sondou. Sondy byly připevněny oboustranně lepící náplastí (3M, USA). Termostatická sonda na předloktí byla zahřata na 32°C z důvodu stabilizace teploty kůže při PORH. Jako teplotní stimulace při TH byla teplota zvýšena na 44°C.



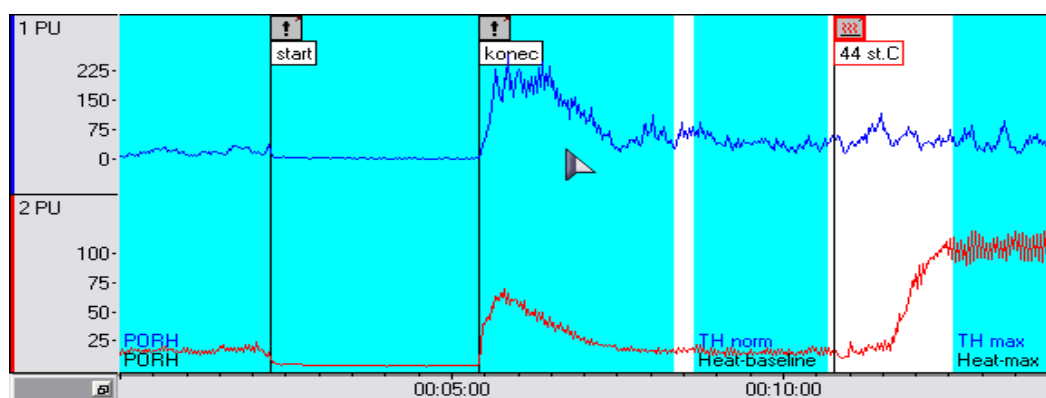
Obrázek 13. Přístroj na měření metodou laser-Doppler na 3. interní klinice VFN.

Bazální perfúze (PORHb) byla měřena 2 minuty před PORH testem. Následně byla provedena okluze brachiální arterie po dobu 3,5 min pomocí manžety tonometru insuflované na suprasystolickou hodnotu tlaku (+20 mmHg). K omezení manipulace s končetinou v průběhu testu byla manžeta tonometru upevněna kolem paže před začátkem vyšetření. PORH byla zaznamenána po rychlém uvolnění manžety po 3,5 min okluzi, včetně maximální perfúze při hyperémii (PORHmax) a času potřebného k dosažení maximální perfúze (PORHt). Dynamický parametr, rychlost vzestupu perfúze

(PORHmax/t), byla vypočítána jako poměr PORHmax a PORHt. Relativní hyperémie (PORH%) byla vypočítána jako procentuální vzestup nad bazální hodnotu $PORH\%=(PORH_{max}/PORH_b-1)*100$.

Termální hyperémie byla měřena 10 minut po testu s PORH na stejném místě paže. Teplota sondy byla nastavena na 44°C a podobně jako u testu s PORH byly zaznamenány nebo vypočítány parametry THmax, THt a THmax/t. TH% byla vypočítána s použitím vzorce $TH\%=(TH_{max}/PORH_b-1)*100$.

Hodnoty perfúze jsou uvedeny v arbitrárních perfúzních jednotkách (PU). Pro zaznamenání a vyhodnocení dat perfúze byl použit software Perisoft pro DOS 5.10C2 a Perisoft pro Windows 2.5 (obr. 14). Záznamy byly zaslepeny a vyhodnocování bylo prováděno v jednotlivých studiích jednou osobou. Intra-individuální koeficient variability metody laser-Doppler u 5 zdravých osob vyšetřovaných 10x během po sobě jdoucích dnů se lišil od 17 do 24% v TH a od 19 do 25% u PORH, v závislosti na měřených parametrech.



Obrázek 14. Ukázka záznamu měření metodou laser-Doppler, křivka ze sondy na prstu (nahore) a na předloktí (dole).

4.3. Statistické vyhodnocení

Ke statistické analýze byly použity software S.A.S. 8.2 a Statistica 6.0 pro Windows. K hodnocení byly využity základní metody deskriptivní statistiky, pro porovnání výsledků mezi skupinami párový a nepárový t-test, ANOVA nebo Wilcoxonův test (případně test Mann-Whitney a Kolmogorov-Smirnov podle distribuce dat). Pro korelační analýzu byla dále k hodnocení použita Pearsonova či případně Spearmanova korelační analýza, v závislosti na distribuci dat. Data jsou vyjádřena jako průměr \pm SD, není-li uvedeno jinak.

5. Vlastní studie

5.1. Mikrovaskulární reaktivita a funkce endotelu u pacientů s Cushingovým syndromem

Výsledky této studie byly publikovány v práci: Prázný, M., Ježková, J., Horová, E., Lazárová, V., Hána, V., Kvasnička, J. et al. *Impaired microvascular reactivity and endothelial function in patients with Cushing's syndrome: Influence of arterial hypertension*. *Physiological Research*, 2008. **57**(1): 13-22. IF=1,505 (příloha 10.4.).

Cíl práce

Cílem této studie bylo zhodnotit kožní mikrovaskulární reaktivitu a faktory, které ji mohou u pacientů s Cushingovým syndromem ovlivňovat. Mezi tyto možné faktory jsme zařadili parametry fibrinolýzy, oxidačního stresu, přítomnost arteriální hypertenze, diabetu a hyperlipidémie.

Úvod

Hyperkortizolémie je spojena s častějším výskytem aterosklerózy, cévních i jiných komplikací, a proto také s vyšší morbiditou a mortalitou. Cushingova choroba představuje asi 70% všech případů endogenní nadprodukce kortizolu (Cushingův syndrom). Je to vzácné endokrinní onemocnění s prevalencí okolo 3,9 případů na 100 000 obyvatel s přibližnou incidencí 0,24 případů na 100 000 obyvatel za rok (102). Pacienti s neléčeným Cushingovým syndromem mají výrazně zvýšené kardiovaskulární riziko a jejich mortalita z kardiovaskulárních příčin je 4-5x vyšší než u ostatní populace (102, 103). Nicméně i pacienti s léčeným Cushingovým syndromem mají zvýšenou prevalenci aterosklerózy ještě několik let po normalizaci hladin kortizolu (104, 105). Efekt hyperkortizolizmu na mikrovaskulární reaktivitu je málo znám. Cílem této studie bylo vyhodnocení mikrovaskulární reaktivity pomocí metody laser-Doppler a dále zhodnocení funkce endotelu, parametrů fibrinolýzy a oxidačního stresu u pacientů s Cushingovým syndromem. Výsledky byly porovnány s kontrolní skupinou a také s podskupinou pacientů po úspěšné operaci.

Kombinace vyšetření metodou laser-Doppler a stanovení biochemických parametrů endotelové dysfunkce, oxidačního stresu a fibrinolýzy by mohlo přinést užitečné informace o cévních změnách u pacientů s Cushingovým syndromem a mohlo by vést k lepšímu porozumění mechanismu vzniku cévního postižení při hyperkortizolizmu.



Obrázek 15. Schéma a fotografie typického obrazu pacientky s Cushingovým syndromem (schéma upraveno podle 106, autor fotografie M. Prázný).

Metody

Do studie bylo zařazeno 29 pacientů (8 mužů, 21 žen, věk 47 ± 12 let) s hyperkortizolizmem (skupina HC). Příčinou hyperkortizolizmu byl u 22 pacientů adenom hypofýzy (Cushingova choroba), u 6 pacientů adenom nadledvin a u 1 pacienta ektopická produkce ACTH. Pacienti s Cushingovým syndromem se vyznačovali typickým vzhledem (*obr. 15*), zvýšenou koncentrací volného kortizolu v moči (UFC), narušeným cirkadiánním rytmem sekrece kortizolu bez nočního poklesu a nedostatečným poklesem hladiny kortizolu v odpověď na dexametazonový supresní test s nízkou dávkou dexametazonu (LDDST – zkrácená varianta s 1 mg dexametazonu podaného perorálně večer ve 23:00 hodin). Diagnóza adenomu hypofýzy a adenomu kůry nadledvin byla potvrzena histologickým vyšetřením. 15 pacientů (52%) s hyperkortizolizmem mělo diabetes mellitus, 11 (38%) z nich bylo léčeno dietou či perorálními antidiabetiky a 4 (14%) inzulinem. Pacienti s diabetem byli do studie zahrnuti, protože sekundární diabetes je častou a neoddelitelnou komplikací klinicky vyjádřeného hyperkortizolizmu. Ve studii byli ponecháni i pacienti léčení inzulinem, neboť se svými parametry výrazněji

nelišili od zbytku skupiny. 17 pacientů (59%) bylo léčeno pro arteriální hypertenzi perorálními antihypertenzivy. Pouze jeden pacient měl v anamnéze ischemickou chorobu srdeční s anginou pectoris.

10 pacientů (4 muži, 6 žen, věk 45 ± 11 let) podstoupilo úspěšný chirurgický výkon a bylo znovu vyšetřeno v odstupu 6-24 měsíců (průměrně 16 ± 6 měsíců), kdy jejich hladiny kortizolu dosáhly normálních hodnot (skupina NC). Tato úspěšná léčba byla potvrzena normální koncentrací vylučovaného volného močového kortizolu za 24 hod, úpravou cirkadiánní sekrece kortizolu a snížením hladiny kortizolu po LDDST. Žádný z pacientů z NC skupiny neměl v době vyšetření po operaci přítomný diabetes ani arteriální hypertenzi.

16 zdravých osob srovnatelného věku a body mass indexu (BMI) (4 muži, 12 žen, věk 48 ± 11 let) bylo zařazeno do studie jako kontrolní skupina. Tyto osoby se studie zúčastnily dobrovolně a byly vybrány z řad personálu nemocnice a z řad jinak zdravých obézních pacientů nezapojených do redukčních programů ani jiných studií.

Parametry všech účastníků studie jsou uvedeny v *tabulce 1*. Fibrinolýza byla charakterizována plazmatickou koncentrací tPA a PAI-1. Aktivita sérové NAG, E-selektin, P-selektin a ICAM-1 byly použity jako biochemické markery endotelové aktivity. Mikrovaskulární reaktivita byla stanovena metodou laser-Doppler.

Studie byla schválena Etickou komisí 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a všichni účastníci podepsali před zařazením do studie informovaný souhlas.

Výsledky

Výsledky BMI, UFC, noční hladiny kortizolu a hladiny kortizolu po LDDST, glykémie, HbA_{1C}, triglyceridů, inzulinu a HOMA-R jsou uvedeny v *tabulce 1*. Pacienti s Cushingovým syndromem se podle očekávání signifikantně lišili od kontrolní skupiny v parametrech sekrece kortizolu: ve zvýšené hladině volného kortizolu v moči (UFC, $p < 0,001$), noční hladině kortizolu ($p < 0,001$) a v abnormální sekreci kortizolu v odpověď na podání 1,0 mg dexametazonu ($p < 0,001$). U skupiny HC byly naměřeny signifikantně vyšší koncentrace lipidových parametrů, po úspěšné operaci však došlo k jejich poklesu na hladiny srovnatelné s kontrolní skupinou. Pacienti ze skupiny HC měli také signifikantně vyšší systolický (sTK) a diastolický (dTK) krevní tlak v porovnání s kontrolní skupinou. Pacienti ze skupiny NC měli signifikantně zvýšený pouze sTK.

Tabulka 1. Charakteristika pacientů s hyperkortizolizmem (HC), s normalizovanou sekrecí kortizolu (NC) a kontrolní skupiny.

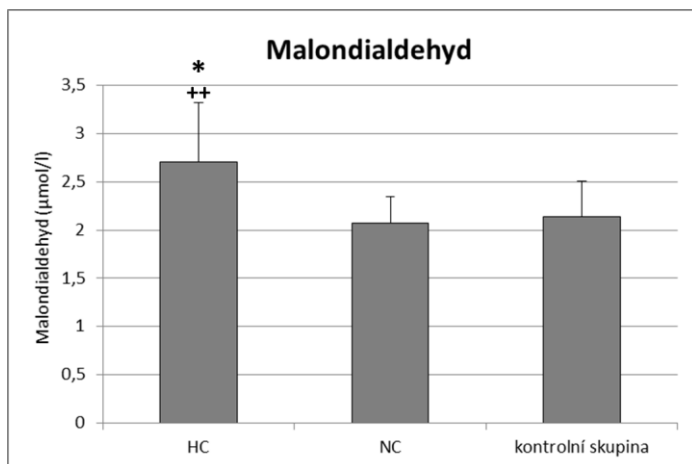
	HC (n = 29)	NC (n = 10)	kontrolní skupina (n = 16)
věk (roky)	47 ± 12	45 ± 11	48 ± 11
pohlaví (M/Ž)	8/21	4/6	4/12
BMI (kg/m ²)	31,30 ± 7,07	27,97 ± 8,09	28,66 ± 3,52
glykémie (mmol/l)	7,55 ± 3,75	5,27 ± 0,73	5,16 ± 0,24
HbA _{1C} (% , DCCT)	7,5 ± 1,8 ^x	5,8 ± 1,3	4,7 ± 0,3
UFC (nmol/24 hod)	1702,8 ± 2709,5 ^{x,c}	146,8 ± 110,1	186,0 ± 79,9
hladina nočního kortizolu (nmol/l)	682,9 ± 353,8 ^{x,c}	94,8 ± 38,2	-
kortizol při LDDST (nmol/l)	728,2 ± 369,1 ^{x,c}	47,6 ± 16,2	53,9 ± 12,5
TC (mmol/l)	7,22 ± 1,67 ^{y,c}	5,35 ± 0,50	5,38 ± 0,78
HDL-C (mmol/l)	1,44 ± 0,27 ^b	1,27 ± 0,34	1,19 ± 0,21
LDL-C (mmol/l)	4,28 ± 1,27 ^{x,b}	3,29 ± 0,39	3,44 ± 0,67
TG (mmol/l)	2,89 ± 1,26 ^b	1,94 ± 1,28	1,66 ± 0,94
inzulinémie (mIU/l)	35 ± 24 ^c	21 ± 5	16 ± 12
HOMA-R	12,20 ± 12,58	4,60 ± 1,45	3,4 ± 1,9
sTK (mmHg)	148 ± 21 ^c	133 ± 10 ^a	122 ± 6
dTK (mmHg)	92 ± 13 ^c	82 ± 8	77 ± 6

Statistická významnost rozdílů mezi skupinami HC a NC ^xp<0,05, ^yp<0,01, mezi skupinami HC nebo NC a kontrolní skupinou ^ap<0,05, ^bp<0,01, ^cp<0,001.

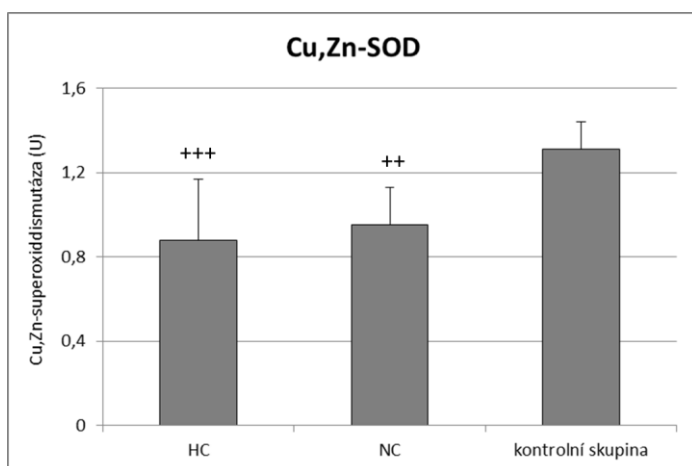
Výsledky parametrů fibrinolýzy, oxidačního stresu a funkce endotelu jsou uvedeny v *tabulce 2*. Plazmatická koncentrace MDA byla u HC pacientů signifikantně zvýšena (*graf 1a*) v porovnání s hodnotami po léčbě a v porovnání s kontrolní skupinou. Aktivita Cu,Zn-SOD byla signifikantně snížena u HC i NC pacientů v porovnání s kontrolami (*graf 1b*). Plazmatická hladina tPA byla signifikantně zvýšena při hyperkortizolémii a normalizována po léčbě. V porovnání s kontrolní skupinou byla u HC a NC pacientů zvýšena také hladina ICAM-1 (*graf 1c*), nejvyšší koncentrace byla překvapivě zjištěna u pacientů po normalizaci kortizolémie. Rozdíl byl signifikantní také při porovnání NC a HC skupiny. Hladiny E- a P- selektinu byly u pacientů s hyperkortizolémií zvýšeny nesignifikantně.

Graf 1. Porovnání plazmatické koncentrace MDA *a*), aktivity Cu,Zn-SOD *b*) a plazmatické hladiny ICAM-1 *c*) u pacientů s hyperkortizolizmem (HC), pacientů s normální hladinou kortizolu po úspěšné operaci (NC) a kontrolní skupinou.

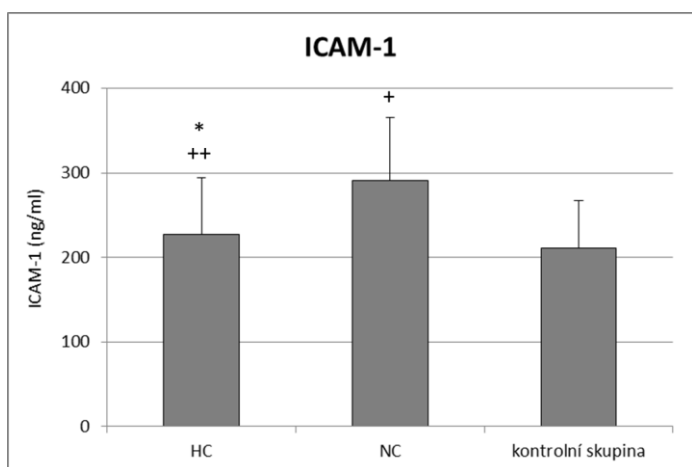
a)



b)



c)



Statistická významnost rozdílů mezi skupinami HC a NC * $p < 0,05$, mezi skupinami HC nebo NC a kontrolní skupinou $^+p < 0,05$, $^{++}p < 0,01$, $^{+++}p < 0,001$.

Výsledky mikrovaskulární reaktivity jsou uvedeny v *tabulce 2*. MVR byla ve třech parametrech signifikantně snížena u HC pacientů ve srovnání s kontrolami (*graf 2a,b,c*). Pozorovali jsme trend ke zlepšení MVR po normalizaci hladin kortizolu, ale rozdíl v porovnání s HC pacienty ani kontrolní skupinou nedosáhl statistického významu.

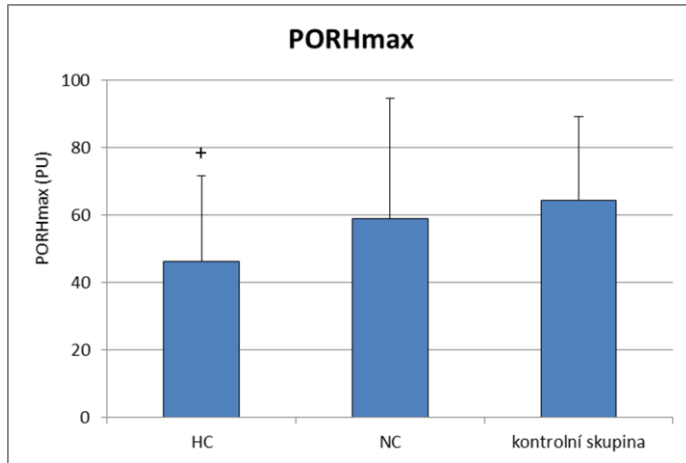
Tabulka 2. Parametry oxidačního stresu, funkce endotelu, fibrinolýzy a mikrovaskulární reaktivity u pacientů s hyperkortizolizmem (HC), s normalizovanou sekrecí kortizolu (NC) a kontrolní skupiny.

	HC (n = 29)	NC (n = 10)	kontrolní skupina (n = 16)
MDA (μmol/l)	2,71 ± 0,61 ^{x,b}	2,07 ± 0,28	2,14 ± 0,37
Cu,Zn-SOD (U)	0,88 ± 0,29 ^c	0,95 ± 0,18 ^b	1,31 ± 0,13
tPA (ng/ml)	7,87 ± 3,43 ^{x,a}	4,47 ± 2,72	4,36 ± 1,57
PAI-1 (ng/ml)	80,83 ± 33,42	76,88 ± 33,50	99,19 ± 32,29
NAG (U/l)	22,92 ± 7,74	21,19 ± 6,06	18,66 ± 5,92
E-selektin (ng/ml)	47,65 ± 23,27	57,28 ± 26,18	41,36 ± 14,18
P-selektin (ng/ml)	169,00 ± 63,60	175,17 ± 62,08	132,02 ± 47,22
ICAM-1 (ng/ml)	227,40 ± 67,13 ^{x,b}	290,84 ± 74,22 ^a	210,94 ± 56,33
PORHmax (PU)	46,30 ± 25,39 ^a	59,02 ± 35,56	64,25 ± 24,97
PORHmax/t (PU/s)	3,95 ± 2,53	4,08 ± 3,41	5,41 ± 2,89
PORH% (%)	441,33 ± 265,64	469,90 ± 285,47	591,31 ± 194,53
THmax (PU)	115,89 ± 71,51 ^a	144,11 ± 73,80	171,63 ± 68,06
THmax/t (PU/s)	1,27 ± 0,90 ^b	1,66 ± 0,76	2,30 ± 1,39
TH% (%)	1305,37 ± 815,71	1281,70 ± 515,77	1768,06 ± 628,07

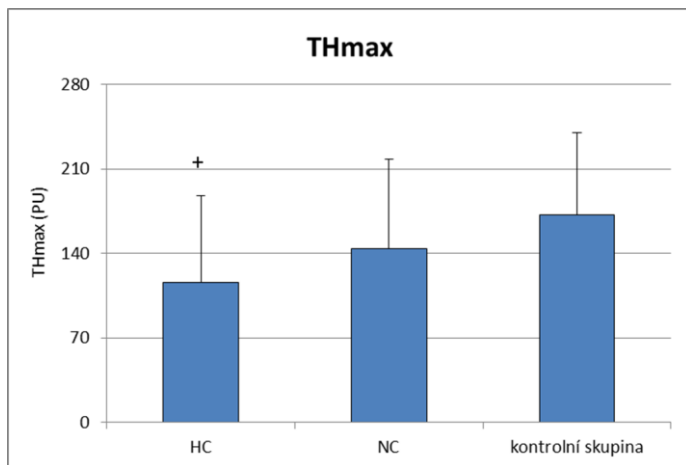
Statistická významnost rozdílů mezi skupinami HC a NC ^xp<0,05, ^yp<0,01, mezi skupinami HC nebo NC a kontrolní skupinou ^ap<0,05, ^bp<0,01, ^cp<0,001.

Graf 2. Porovnání parametrů mikrovaskulární reaktivity: PORHmax na předloktí **a)**, THmax **b)** a THmax/t **c)** u pacientů s hyperkortizolizmem (HC), pacientů s normální hladinou kortizolu po úspěšné operaci (NC) a kontrolní skupinou.

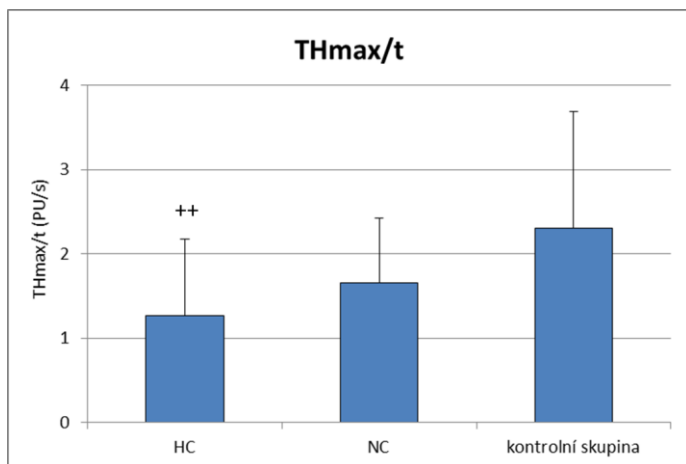
a)



b)



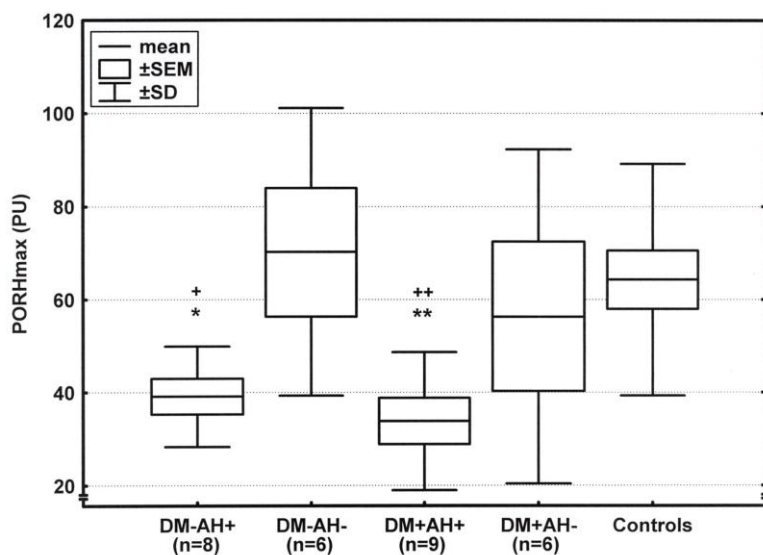
c)



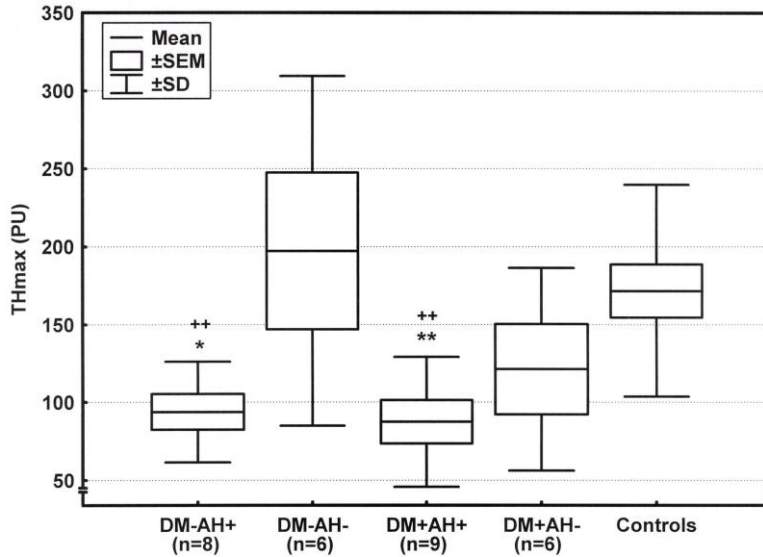
Statistická významnost rozdílů mezi skupinami HC a NC *p<0,05, mezi skupinami HC nebo NC a kontrolní skupinou ⁺p<0,05, ⁺⁺p<0,01.

V parametrech diabetu se HC pacienti léčení dietou, perorálními antidiabetiky či inzulinem od sebe výrazněji nelišili. Jediný statisticky významný rozdíl mezi pacienty s diabetem léčeným inzulinem a zbytkem HC skupiny byl v koncentraci PAI-1 ($123,5 \pm 30,8$ vs. $70,1 \pm 25,2$ ng/ml, $p < 0,01$). Biochemické parametry byly u skupiny HC pacientů s arteriální hypertenzí srovnatelné s HC pacienty bez arteriální hypertenze, ačkoliv se tyto dvě skupiny statisticky významně lišily v parametrech MVR. Hodnoty PORHmax a PORHmax/t byly signifikantně nižší u hypertenzních pacientů než u pacientů bez arteriální hypertenze ($36,3 \pm 13,0$ vs. $63,3 \pm 32,4$ PU, $p < 0,01$ a $3,2 \pm 1,5$ vs. $5,2 \pm 3,4$ PU/s, $p < 0,05$) a podobně THmax a THmax/t ($90,4 \pm 36,6$ vs. $159,2 \pm 95,3$ PU, $p < 0,05$ a $0,95 \pm 0,6$ vs. $1,8 \pm 1,1$ PU/s, $p < 0,05$). Porovnání těchto parametrů MVR u pacientů s hyperkortizolémií s ohledem na přítomnost diabetes mellitus a/nebo arteriální hypertenze jsou zobrazeny v *grafech 3, 4 a 5*.

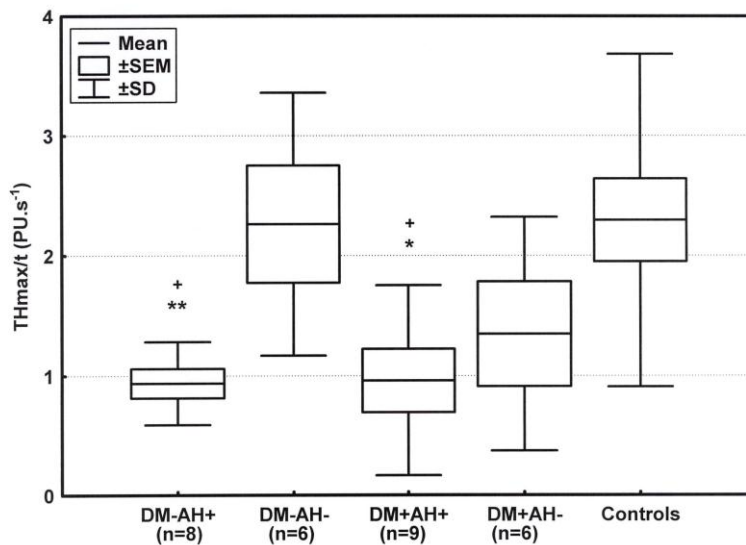
Graf 3. Porovnání maximální perfúze při PORHmax na předloktí u pacientů s Cushingovým syndromem s diabetes mellitus a bez něho (DM+, DM-) a s arteriální hypertenzí a bez ní (AH+, AH-) a u kontrolní skupiny. Statistická významnost rozdílů mezi DM-AH+ nebo DM+AH+ a kontrolní skupinou $^+p < 0,01$, $^{++}p < 0,005$ a mezi skupinou DM-AH+ nebo DM+AH+ a skupinou DM-AH- $*p < 0,03$, $**p < 0,01$.



Graf 4. Porovnání maximální perfúze při THmax u pacientů s Cushingovým syndromem s diabetes mellitus a bez něho (DM+, DM-) a s arteriální hypertenzí a bez ní (AH+, AH-) a u kontrolní skupiny. Statistická významnost rozdílu mezi DM-AH+ nebo DM+AH+ a kontrolní skupinou ⁺p<0,01, ⁺⁺p<0,005 a mezi skupinou DM-AH+ nebo DM+AH+ a skupinou DM-AH- *p<0,03, **p<0,01.



Graf 5. Porovnání rychlosti vzestupu perfúze při THmax/t u pacientů s Cushingovým syndromem s diabetes mellitus a bez něho (DM+, DM-) a s arteriální hypertenzí a bez ní (AH+, AH-) a kontrolní skupiny. Statistická významnost rozdílu mezi DM-AH+ nebo DM+AH+ a kontrolní skupinou ⁺p<0,01, ⁺⁺p<0,005 a mezi skupinou DM-AH+ nebo DM+AH+ a skupinou DM-AH- *p<0,03, **p<0,01.



U pacientů s hyperkortizolémií pozitivně korelovala koncentrace PAI-1 s BMI ($r=0,62$, $p=0,001$), triglyceridy ($r=0,56$, $p=0,003$), aktivitou NAG v séru ($r=0,58$, $p=0,008$) a koncentrací tPA ($r=0,65$, $p=0,002$). Významně pozitivní korelace byla zjištěna mezi aktivitou NAG a BMI ($r=0,63$, $p=0,002$), zatímco mezi aktivitou NAG a Cu,Zn-SOD ($r=-0,56$, $p=0,02$) a krevním tlakem ($r=-0,59$, $p=0,005$) byla korelace negativní. Negativní vztah byl zjištěn také mezi ICAM-1 a termální hyperémií vyjádřenou v % (TH%, $r=-0,44$, $p=0,02$), zatímco koncentrace ICAM-1 pozitivně korelovala s hladinou celkového cholesterolu ($r=0,46$, $p=0,02$) a glykemií nalačno ($r=0,58$, $p=0,003$). Také koncentrace MDA byla v pozitivním vztahu k celkovému cholesterolu ($r=0,61$, $p=0,004$). PORHmax a THmax/t negativně korelovaly s krevním tlakem ($r=-0,50$, $p=0,009$ a $r=-0,42$, $p=0,03$).

U pacientů po normalizaci sekrece kortizolu byla pozorována významná korelace pouze mezi ICAM-1 a rychlostí vzestupu perfúze při TH ($r=0,75$, $p=0,04$).

U kontrolní skupiny významně korelovala koncentrace ICAM-1 s BMI ($r=0,55$, $p=0,03$) a hladinou triglyceridů ($r=0,65$, $p=0,009$). Také koncentrace P-selektinu měla pozitivní vztah k hladině triglyceridů ($r=0,63$, $p=0,009$). Mezi aktivitou NAG a rychlostí vzestupu perfúze při PORH byla zjištěna negativní korelace ($r=-0,60$, $p=0,02$), zatímco mezi koncentrací tPA a aktivitou NAG byl vztah pozitivní ($r=0,84$, $p=0,02$). MDA byl v negativním vztahu k PORHmax/t ($r=-0,71$, $p=0,01$), THmax ($r=-0,59$, $p=0,05$) a THmax/t ($r=-0,62$, $p=0,03$).

Závěr

Ve studii zabývající se MVR a funkcí endotelu u pacientů s Cushingovým syndromem jsme u nemocných s hyperkortizolémií zjistili zvýšený výskyt arteriální hypertenze, inzulinové rezistence a dyslipidémie. Pacienti s Cushingovým syndromem měli také porušený proces fibrinolýzy, zvýšený oxidační stres a endotelovou dysfunkci. Samotný hyperkortizolizmus pravděpodobně není na inhibici oxidačního stresu dostatečný. Dále jsme u pacientů s Cushingovým syndromem prokázali sníženou MVR, která zatím u tohoto endokrinního onemocnění nebyla popsána. Přímá souvislost mezi MVR a hyperkortizolémií prokázána nebyla. Na základě výsledků studie se domníváme, že MVR může být při hyperkortizolizmu ovlivněna mnoha různými faktory. Jako nejvýznamnější faktor se jeví přítomnost arteriální hypertenze, nejvíce poškozenou MVR však měli pacienti s hyperkortizolémií a současnou kombinací arteriální hypertenze a diabetu.

Potvrzení těchto výsledků dalšími studiemi může být komplikováno relativně vzácným výskytem této choroby. Není jasné, zda porucha mikrocirkulace souvisí přímo i s makrovaskulárními komplikacemi, ale pokud by tomu tak bylo, intenzivnější léčba arteriální hypertenze a úprava hyperglykémie by mohla snížit výskyt cévních komplikací a kardiovaskulárního rizika u pacientů s Cushingovým syndromem.

5.2. Vliv rychlé změny glykémie během hyperinzulinemického izoglykemického a hyperglykemického clampu na mikrovaskulární reaktivitu a funkci endotelu u pacientů s diabetem 1. typu

Výsledky této studie byly publikovány v práci: Horová, E., Mazoch, J., Hilgertová, J., Kvasnička, J., Škrha, J., Šoupal, J., Prázný, M. *Acute hyperglycemia does not impair microvascular reactivity and endothelial function during hyperinsulinemic isoglycemic and hyperglycemic clamp in type 1 diabetic patients.* Exp Diabetes Res, 2012. 851487. IF=1,528 (příloha 10.4.).

Cíl práce

Cílem této studie bylo zhodnotit vliv rychlé změny glykémie na mikrovaskulární reaktivitu a funkci endotelu během hyperinzulinemického izoglykemického a hyperglykemického clampu u pacientů s diabetem 1. typu.

Úvod

Dlouhodobá hyperglykémie s indukci oxidačního stresu a dysfunkce endotelu je u pacientů s diabetem považována za jeden z klíčových faktorů při rozvoji mikro- i makrovaskulárních komplikací. Dostatečná kompenzace diabetu toto riziko významně snižuje (107, 108). Diskutovanou otázkou je vliv krátkodobé hyperglykémie a zvýšené variability glykemií (GV) na vznik diabetických komplikací. Zvýšená GV pravděpodobně může souviset s rozvojem mikro- i makrovaskulárních komplikací u pacientů s diabetem 2. typu (109-112). Pouze jedna studie s menším počtem diabetiků 1. typu dokládá pravděpodobnou souvislost mezi zvýšenou GV a diabetickou neuropatií (113). Nicméně na základě studie DCCT není zvýšená GV považována za rizikový faktor přispívající ke vzniku mikrovaskulárních komplikací u pacientů s diabetem 1. typu (114, 115). Limitací studie DCCT a možný důvod negativního výsledku je nízký počet křivek GV, které byly v této studii měřeny.

Detailnější význam zvýšené GV u pacientů s diabetem 1. typu, podložený klinickými studiemi, však není zatím zcela znám. Stejně tak není příliš jasné, jakým mechanismem by mohla zvýšená GV diabetické komplikace způsobit. Jedním z faktorů může být pravděpodobně endotelová dysfunkce indukovaná oxidačním stresem při zvýšené GV (116-120), což bylo prokázáno u pacientů s diabetem 2. typu (121, 122).

Proto bylo naším cílem zhodnotit vliv rychlých změn glykémie na MVR a funkci endotelu u pacientů s diabetem 1. typu. Zkoumali jsme vztah mezi rychle navozenou hyperglykemií během clampu a oxidačním stresem.

U pacientů s diabetem 2. typu může ovlivňovat cévní stěnu a tím i rozvoj cévních komplikací celá řada parametrů jako je hyperglykémie, hyperinzulinémie, arteriální hypertenze, hyperlipidémie a další faktory (123, 124). U pacientů s diabetem 1. typu je situace poněkud odlišná, primární poruchou je deficit endogenní produkce inzulínu, ale vliv inzulínu na cévní stěnu zůstává stejný. Stejně jako hyperglykémie, tak i hyperinzulinémie ovlivňuje cévní reaktivitu (125, 126).

Je známo, že inzulín má *in vivo* i *in vitro* protizánětlivé účinky a tlumí prooxidační reakce (127, 128). Nedávná práce Monniera *et al.* prokázala významný rozdíl v parametrech oxidačního stresu mezi diabetiky 1. i 2. typu léčenými inzulínem a diabetiky 2. typu bez inzulínoterapie. Tento rozdíl může být vysvětlen protektivním vlivem inzulínu na vznik oxidačního stresu (129).

Metody

Pacienti

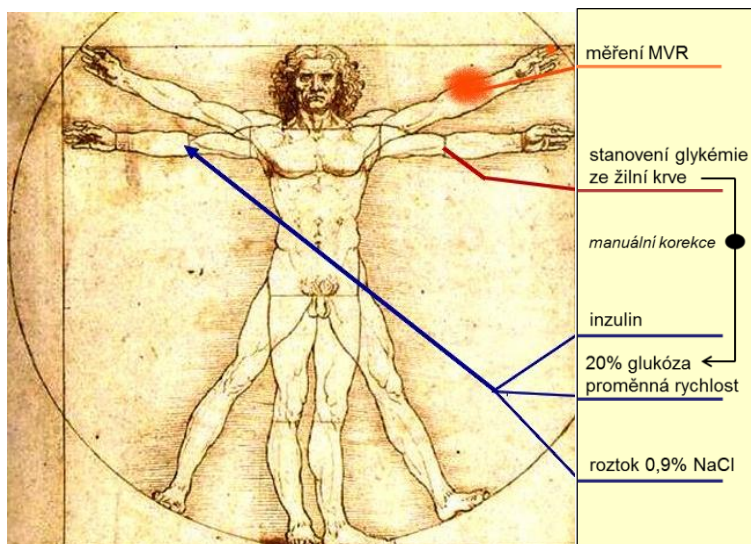
Do studie bylo zařazeno 16 pacientů s diabetem 1. typu (věk 51 ± 7 let, BMI $25,7 \pm 3,7$ kg/m², trvání diabetu 24 ± 7 let a HbA_{1C} $7,8 \pm 0,9\%$ dle IFCC). Diagnóza diabetu byla stanovena na podkladě klinického obrazu a nedetekovatelné hladiny C-peptidu (C-peptid $<0,05$ nmol/l). Do studie byli zařazeni pouze pacienti bez vyjádřených mikro- a makrovaskulárních komplikací. Všichni pacienti byli léčeni kontinuální subkutánní infúzí inzulínu (CSII) pomocí inzulínové pumpy. Použitý inzulín byl inzulínový analog lispro (n=8) nebo aspart (n=8). Průměrná denní dávka bazálního inzulínu byla $24,9 \pm 9,1$ IU, inzulínu podaného bolusy $21,8 \pm 5,7$ IU a celkového inzulínu $47,0 \pm 14$ IU za den. Studie byla schválena Etickou komisí 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a všichni účastníci podepsali před zařazením do studie informovaný souhlas.

Hyperinzulinemický izoglykemický a hyperglykemický clamp a kontrolní vyšetření

Pacienti ve studii podstoupili dva clampy: nejprve standardní hyperinzulinemický izo- a hyperglykemický clamp a následně s odstupem 2-8 týdnů kontrolní izoglykemický clamp. Kontrolní clamp bez aplikace inzulínu a bez zvýšení glykémie byl proveden z důvodu vyloučení nescifických vlivů souvisejících s metodou clampu, především zvětšení intravaskulárního volumu podávanými roztoky a z něho vyplývající hemodilucí. Dva pacienti ze šestnácti odmítli účast na kontrolním clampu. Ostatní pacienti tedy sloužili zároveň i jako kontrolní skupina.

Clamp byl proveden standardním způsobem (130, 131) (*obr. 16*) s použitím intravenózní infúze inzulínu 0,001 IU/kg/min. Inzulínová pumpa byla zastavena vždy bezprostředně před začátkem clampu a znovu spuštěna po jeho skončení. Vstupní glykémie byla $6,8 \pm 2,7$ mmol/l. Izoglykemická fáze testu trvala tři hodiny (průměrná glykémie $6,5 \pm 1,9$ mmol/l), stejně jako následná hyperglykemická fáze (3 hodiny, průměrná glykémie $12,0 \pm 1,6$ mmol/l). Hladina glukózy v krvi byla měřena v 5-10 min intervalech pomocí přístroje SuperGL Ambulance (Freital, Německo) a na základě glykémie byla manuálně upravována rychlost infúze 20% roztoku glukózy. Byly vypočítány parametry inzulínové senzitivity: glucose disposal rate (M) charakterizující souhrnný transport glukózy závislý a nezávislý na inzulínu, metabolická clearance glukózy (MCR_G) vyjádřená jako poměr M/glykémie a index inzulínové senzitivity (MCR_G/I) vyjádřený poměrem MCR_G /inzulinémie.

Během kontrolního clampu nebyl podáván inzulín intravenózně, ale pacienti ponechali inzulínovou pumpu zapojenou v bazálním režimu. Korekce glykémie byla prováděna infúzí 20% roztoku glukózy a paralelně byl intravenózně během šesti hodin podáván stejný objem tekutin (fyziologický roztok 0,9% NaCl) jako při předcházejícím izo- a hyperglykemickém hyperinzulinemickém clampu. Vstupní glykémie byla $6,9 \pm 2,2$ mmol/l a glykémie na konci testu $6,9 \pm 1,8$ mmol/l.



Obrázek 16. Schéma aplikace látek, měření MVR a krevních odběrů při izoglykemickém a hyperglykemickém hyperinzulinemickém clampu (upraveno podle Leonardo da Vinci, Vitruvius, 1485-90, Venezia, Galleria dell'Accademia).

Biochemické metody a mikrovaskulární reaktivita

Sledované biochemické parametry jsou uvedeny v *tabulce 3*, inzulinémie v plazmě byla měřena vstupně, v izo- i hyperglykemické fázi clampu a při kontrolním clampu vstupně a na konci. Ostatní biochemické parametry byly stanoveny vstupně a na konci hyperinzulinemického i kontrolního clampu.

MVR byla měřena pomocí metody laser-Doppler vstupně, na konci izo- i hyperglykemické fáze clampu a při kontrolním clampu vstupně a na konci.

Výsledky

Výsledky biochemických parametrů, inzulinové senzitivity, fibrinogenu, oxidačního stresu, cytoadhezivních molekul a MVR jsou uvedeny v *tabulce 3*. Vstupní hodnoty všech proměnných v hyperinzulinemickém a kontrolním clampu jsou srovnatelné, bez statisticky signifikantního rozdílu.

TC, HDL i LDL cholesterol významně klesl v hyperglykemické fázi clampu ve srovnání se vstupní hodnotou a stejně tak se tyto koncentrace snížily na konci kontrolního clampu. Hodnoty TG a MDA se významně neměnily. Koncentrace cytoadhezivních molekul (E- a P-selektinů, ICAM-1 a VCAM) signifikantně poklesly v hyperglykemické fázi clampu ve srovnání se vstupními hodnotami stejně jako během kontrolního clampu (pouze u P-selektinu při kontrolním clampu nebyl pokles statisticky významný).

Tabulka 3. Biochemické parametry, parametry inzulinové senzitivity a mikrovaskulární reaktivity při izoglykemické (IZO) a hyperglykemické (HYPER) fázi hyperinzulinemického clampu a při kontrolním clampu u pacientů s diabetem 1. typu.

	hyperinzulinemický clamp (n=16)			kontrolní clamp (n=14)	
	vstupně	IZO	HYPER	vstupně	na konci
glykémie (mmol/l)	6,8 ± 2,7	6,5 ± 1,9	12,0 ± 1,6	6,9 ± 2,2	6,9 ± 1,8
inzulinémie (mIU/l)	55 ± 39	155 ± 54 ^a	152 ± 47 ^a	74 ± 55	65 ± 46
M (μmol/kg.min)	-	30 ± 10	57 ± 26	-	-
MCR _G (ml/kg.min)	-	5,0 ± 2,3	4,8 ± 2,4	-	-
MCR _G /I (ml/kg.min/mIU/l x100)	-	3,5 ± 1,6	3,5 ± 2,2	-	-
TC (mmol/l)	4,6 ± 0,7	-	4,3 ± 0,6 ^b	4,7 ± 0,8	4,3 ± 0,8 ^b
HDL-C (mmol/l)	1,3 ± 0,4	-	1,2 ± 0,4 ^b	1,3 ± 0,4	1,2 ± 0,3 ^b
LDL-C (mmol/l)	2,9 ± 0,6	-	2,7 ± 0,5 ^b	2,9 ± 0,6	2,7 ± 0,6 ^b
TG (mmol/l)	0,9 ± 0,3	-	0,8 ± 0,2	1,1 ± 0,7	1,0 ± 0,5
fibrinogen (g/l)	3,4 ± 0,9	-	3,3 ± 0,8	3,4 ± 1,0	3,1 ± 0,9 ^b
MDA (μmol/l)	1,8 ± 0,3	-	1,8 ± 0,2	1,8 ± 0,5	1,7 ± 0,3
E-selektin (ng/ml)	29 ± 12	-	27 ± 11 ^a	29 ± 15	28 ± 14 ^b
P-selektin (ng/ml)	132 ± 50	-	93 ± 34 ^a	126 ± 50	111 ± 27
ICAM-1 (ng/ml)	251 ± 48	-	215 ± 41 ^a	237 ± 40	212 ± 33 ^b
VCAM (ng/ml)	812 ± 183	-	673 ± 117 ^a	815 ± 203	665 ± 165 ^a
PORHmax prst (PU)	224 ± 88	255 ± 112	234 ± 99	212 ± 92	199 ± 60
PORHtmax prst (s)	24,7 ± 22,1	15,4 ± 11,2	19,1 ± 12,2	19,4 ± 20,3	28,3 ± 27,8
PORHmax/t prst (PU/s)	8,3 ± 11,8	9,3 ± 12,6	4,5 ± 4,4	6,7 ± 7,7	13,1 ± 20,5
PORHmax předloktí (PU)	40 ± 16	39 ± 19	47 ± 16 ^b	32 ± 12	35 ± 12
PORHtmax předloktí (s)	13,5 ± 5,1	6,1 ± 4,7 ^a	10,4 ± 8,4	11,8 ± 6,0	11,3 ± 9,0
PORHmax/t předloktí (PU/s)	2,6 ± 1,5	11,2 ± 14,9 ^c	10,4 ± 16,5 ^c	2,7 ± 2,4	3,7 ± 3,0
THmax (PU)	94 ± 29	90 ± 42	97 ± 52	89 ± 46	91 ± 45
THtmax (s)	70 ± 13	77 ± 16	69 ± 15 ^x	70 ± 16	64 ± 19
THmax/t (PU/s)	1,3 ± 0,5	1,2 ± 0,7	1,4 ± 0,8 ^x	1,3 ± 1,0	1,7 ± 1,6

Statistická významnost rozdílů mezi hodnotami měřenými v průběhu hyperinzulinemického nebo kontrolního clampu a příslušnými bazálními hodnotami

^ap<0,001, ^bp<0,01, ^cp<0,05 a ^xp<0,05 při srovnání izo- a hyperglykemické fáze.

Při izoglykemické fázi clampu jsme v parametrech MVR pozorovali signifikantní zkrácení času nutného k dosažení maximální hodnoty perfúze při PORH na předloktí a zvýšení rychlosti vzestupu perfúze při PORH v porovnání se vstupními hodnotami (*graf 6b, 6c*). Parametry MVR měřené na prstu se signifikantně neměnily.

Při hyperglykemické fázi clampu jsme v parametrech MVR pozorovali signifikantní vzestup maximální perfúze a rychlosti vzestupu perfúze na předloktí při PORH v porovnání se vstupními hodnotami (*graf 6a, 6c*). Při TH nebyly během clampu pozorovány signifikantně významné změny, ačkoliv čas k dosažení maximální perfúze při TH byl během hyperglykemického clampu kratší a rychlost vzestupu perfúze při TH byla vyšší v porovnání s izoglykemickou fází clampu (*tab. 3*).

Při kontrolním clampu nebyly v parametrech MVR pozorovány významné změny.

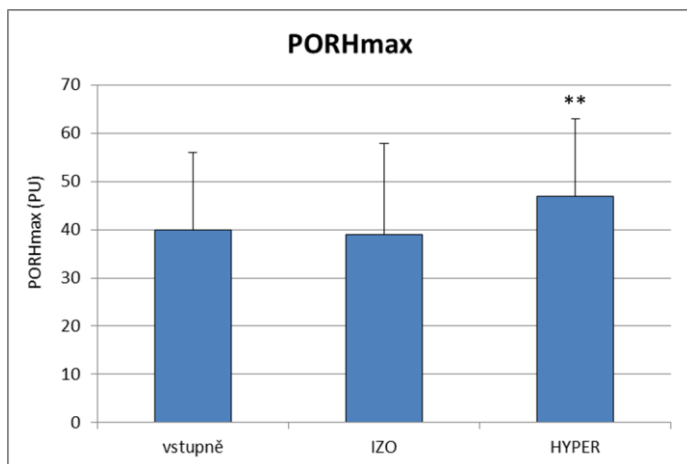
V parametrech MVR byl vstupně při hyperinzulinemickém clampu pozorován negativní vztah mezi koncentrací fibrinogenu a THmax i PORHmax na prstu ($r=-0,67$, $p=0,009$, *graf 7*, $r=-0,77$, $p<0,0005$, *graf 8*). Pozitivní vztah byl pozorován mezi ICAM-1 a THtmax ($r=0,63$, $p=0,016$, *graf 9*).

Negativní korelace byla pozorována mezi inzulinémií a časem nutným k dosažení maximální perfúze při PORH na prstu ($r=-0,7$, $p=0,007$, *graf 10*). Stejně tak byl pozorován negativní vztah mezi hodnotou P-selektinu a časem nutným k dosažení maximální perfúze při PORH na prstu i předloktí ($r=-0,57$, $p=0,035$, *graf 11*, $r=-0,6$, $p=0,029$, *graf 12*).

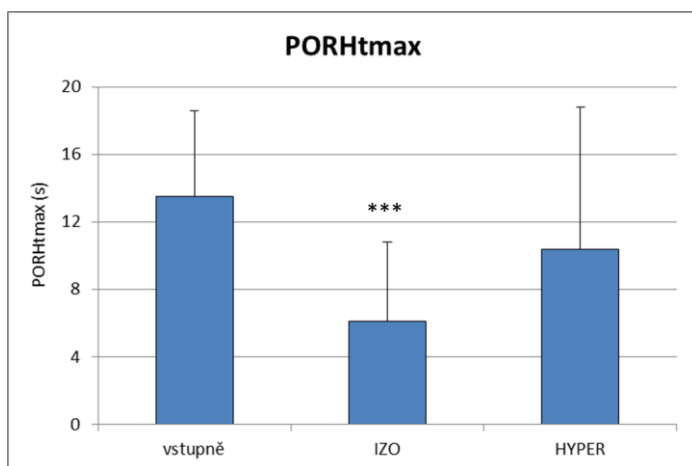
Mezi glykemií a MVR nebyla prokázána žádná významná korelace při hyperinzulinemickém ani při kontrolním clampu. Podobně nebyl prokázán žádný vztah mezi parametry inzulinové senzitivity a MVR.

Graf 6. Porovnání parametrů mikrovaskulární reaktivity: PORHmax na předloktí *a*), PORHtmax na předloktí *b*) a PORHmax/t na předloktí *c*) vstupně, při izoglykemické (IZO) a hyperglykemické (HYPER) fázi testu u pacientů s diabetem 1. typu.

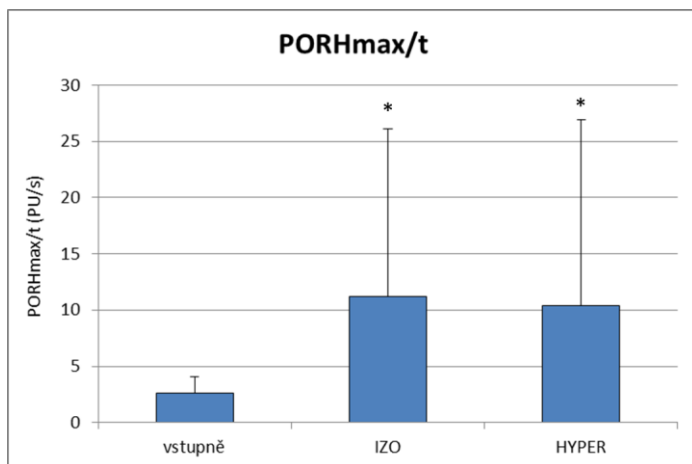
a)



b)

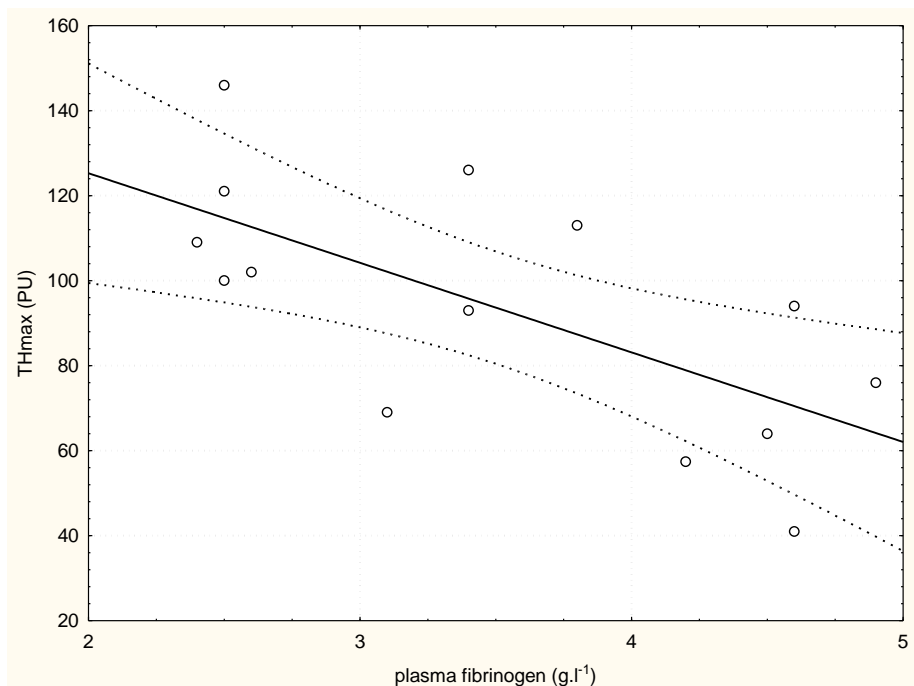


c)

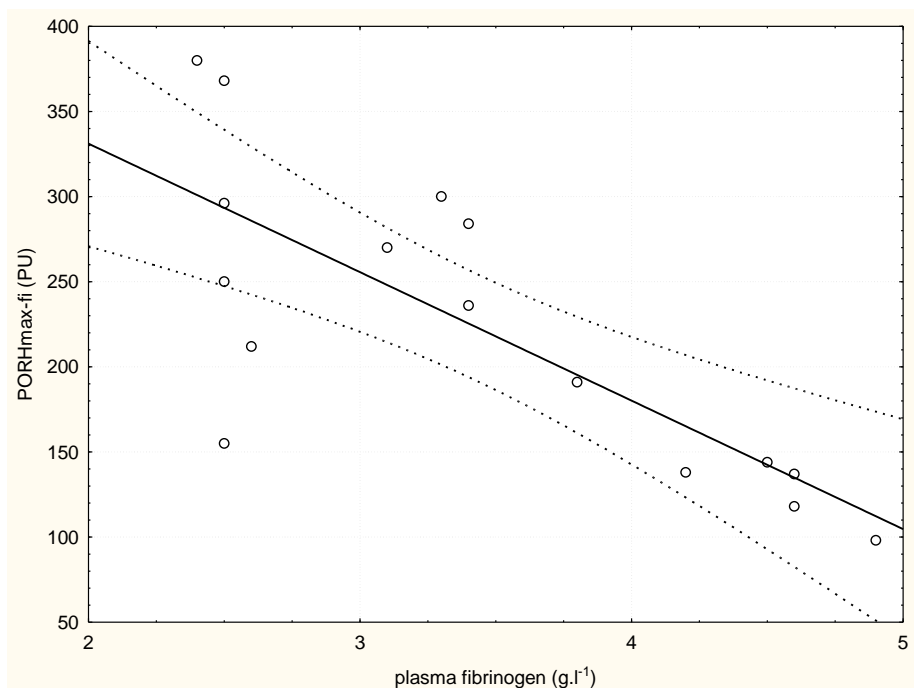


Statistická významnost rozdílů mezi vstupními hodnotami a hodnotami měřenými v průběhu izo- a hyperglykemické fáze clampu *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$.

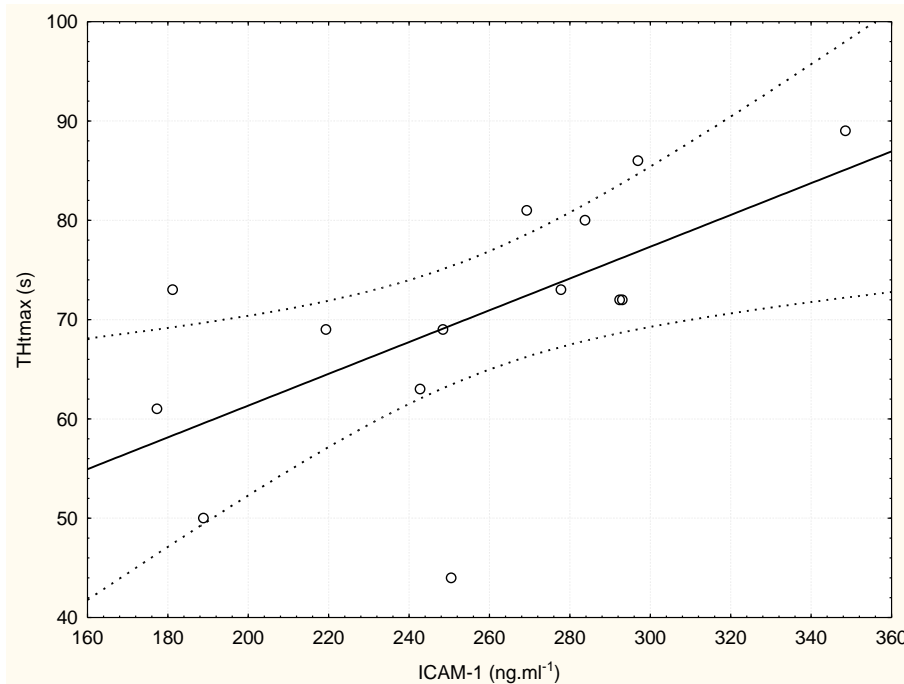
Graf 7. Vztah mezi koncentrací plazmatického fibrinogenu a maximální perfúzí při termální hyperémii (THmax) vstupně před clampem ($r = -0,67$, $p = 0,009$).



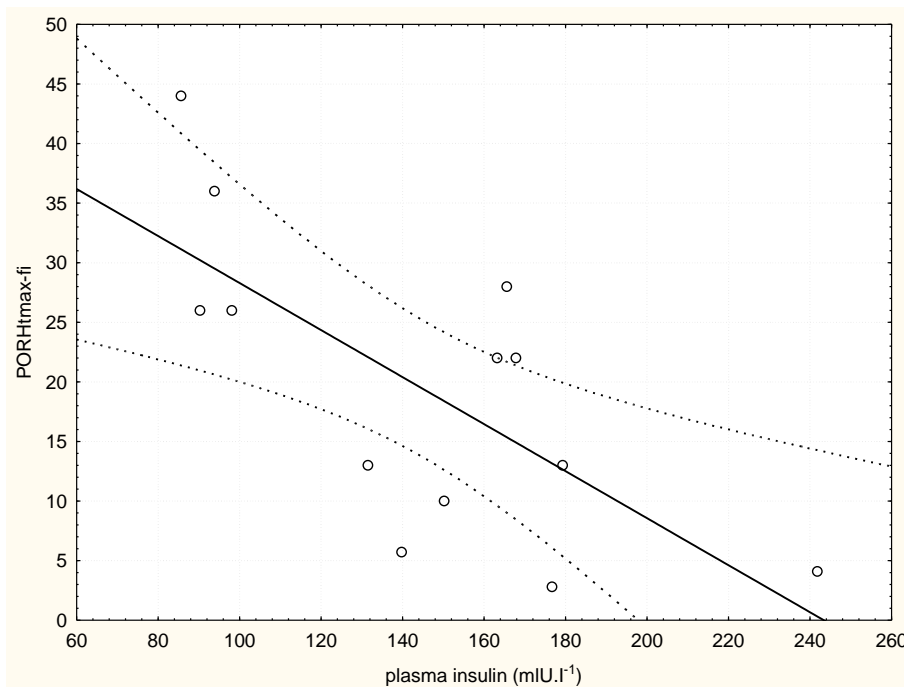
Graf 8. Vztah mezi koncentrací plazmatického fibrinogenu a maximální perfúzí při PORH na prstu (PORHmax) vstupně před clampem ($r = -0,77$, $p = 0,0005$).



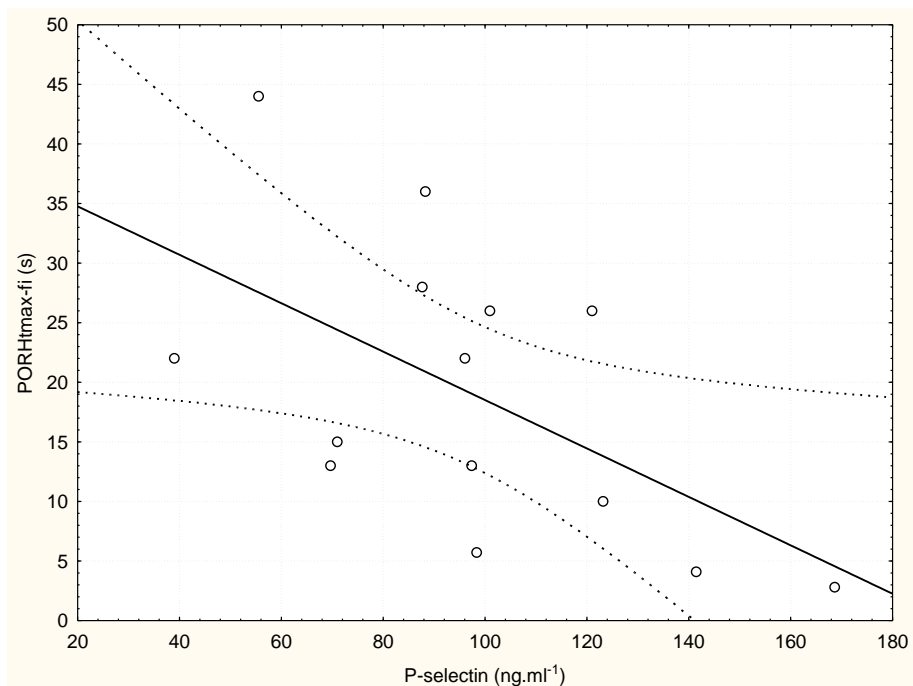
Graf 9. Vztah mezi ICAM-1 a časem potřebným k dosažení maximální perfúze při termální hyperémii (THtmax) vstupně před clampem ($r=-0,63$, $p=0,016$).



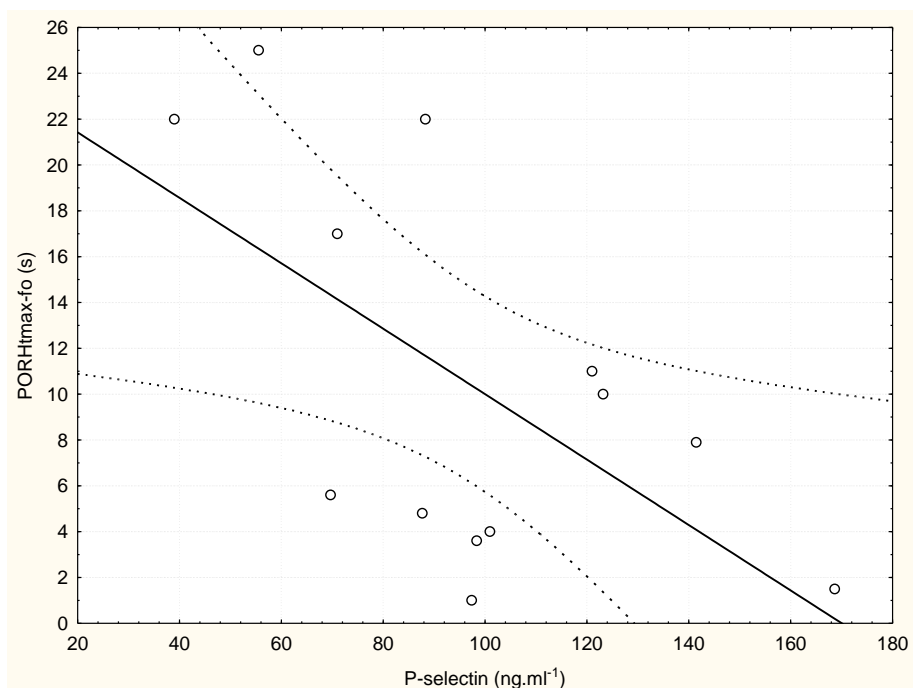
Graf 10. Vztah mezi plazmatickou koncentrací inzulinu a časem potřebným k dosažení maximální perfúze při PORH na prstu (PORHtmax) v hyperglykemické fázi clampu ($r=-0,70$, $p=0,007$).



Graf 11. Vztah mezi koncentrací P-selektinu v séru a časem potřebným k dosažení maximální perfúze při PORH na prstu (PORHtmax) v hyperglykemické fázi clampu ($r=-0,57$, $p=0,035$).



Graf 12. Vztah mezi koncentrací P-selektinu v séru a časem potřebným k dosažení maximální perfúze při PORH na předloktí (PORHtmax-fo) v hyperglykemické fázi clampu ($r=-0,60$, $p=0,029$).



Závěr

Studie vlivu rychle navozené hyperglykémie na MVR a funkci endotelu u pacientů s diabetem 1. typu prokázala, že během izoglykemického a hyperglykemického hyperinzulinemického clampu patrně nedochází k významným změnám MVR souvisejícím s rychlou změnou glykémie. Pozorovali jsme rychlejší mikrovaskulární vazodilataci v izoglykemické fázi clampu, která následně přetrvávala i v hyperglykemické fázi. Tyto změny MVR pravděpodobně souvisely s vazodilatačním působením inzulínu. Výsledek naší studie může svědčit o významném vlivu inzulínu na regulaci mikrovaskulární perfúze u pacientů s diabetem. U pacientů s diabetem 1. typu se onemocnění manifestuje ve chvíli, kdy úbytek B buněk pankreatu vede ke klinicky významnému nedostatku inzulínu. V závislosti na přiměřenosti substituce inzulínem mohou mít tyto pacienti hypo-, normo- i hyperinzulinémií (132). Je-li glykemická variabilita považována za rizikový faktor vzniku vaskulárních komplikací, mohla by variabilita inzulinémie mít stejně nezanedbatelný vliv. Možná by bylo proto přínosné, kdyby se studie zaměřené na vznik cévních komplikací diabetu zabývaly kromě sledování glykemií také sledováním a hodnocením vlivu inzulinémie.

V naší studii jsme neprokázali korelaci mezi MVR a parametry inzulinové senzitivity. Nezaznamenali jsme ani významné změny v biochemických parametrech oxidačního stresu a endotelové dysfunkce v souvislosti s rychle navozenou hyperglykemií, neboť doba jednoho clampového vyšetření pravděpodobně není dostačující k vyvolání takových změn. V neposlední řadě jsme potvrdili důležitost kontrolního vyšetření u clampové techniky, při které opakovaně dochází k nespecifickému ovlivnění oběhu objemovou zátěží.

5.3. Změny mikrovaskulární reaktivity a funkce endotelu po standardní snídani u pacientů v časných stádiích diabetu 2. typu

Tato studie byla dokončena v listopadu 2011 a je v současné době připravena k publikaci.

Cíl práce

Cílem práce bylo porovnat mikrovaskulární reaktivitu, metabolické parametry a některé parametry funkce endotelu před standardní snídaní a následně v několika časových intervalech postprandiálně u pacientů s diabetem 2. typu, kteří jsou v časném stadiu této metabolické poruchy a u kontrolní skupiny osob bez diabetu.

Úvod

Vlivem příjmu potravy dochází v organismu k mnoha biochemickým, hematologickým i cévním změnám. Zvýšené hladiny postprandiální glykémie i postprandiální triglyceridémie jsou nezávislým rizikovým faktorem kardiovaskulární morbidity a mortality (121, 133). Příčinami zvyšování postprandiálních glykemií nad fyziologické rozmezí jsou přítomná inzulinová rezistence a/nebo porucha inzulinové sekrece. Tyto patologické vlivy zcela mění kvalitu a kvantitu postprandiálního stavu. Období po jídle, které je spojeno s rizikovými hormonálními, metabolickými i jinými prozánětlivými změnami, se významně prodlužuje a u některých pacientů s diabetem může trvat i 24 hodin (134).

Hyperglykémie má přímý vliv na endotel zprostředkovaný oxidačním stresem, který je nezávislý na dalších kardiovaskulárních rizikových faktorech (např. hyperlipidémii a arteriální hypertenzi). Postprandiální zvýšení glykémie indukuje kromě oxidačního stresu také mechanismy glykace, glukózové autooxidace a intracelulární aktivace polyolové cesty (135, 136).

Z dalších postprandiálních změn je rizikové především zvýšení hladiny malých denzních LDL-částic, zvýšená aktivita koagulačního systému a zvýšení arteriálního tlaku. Všechny uvedené metabolické odpovědi na jídlo jsou vystupňovány u pacientů s diabetem 2. typu (137).

Dosud však nebyl plně objasněn vztah mezi postprandiálními změnami a MVR (136). Proto jsme provedli studii, v níž jsme porovnávali MVR s parametry endotelové dysfunkce, oxidačního stresu a s metabolickými parametry u pacientů v počáteční fázi onemocnění diabetem 2. typu. Předpokládali jsme vliv inzulinové rezistence a zachovalé vlastní sekrece inzulinu na MVR. Dále byla vyšetřena kontrolní skupina osob bez diabetu.

Metody

Pacienti

Do studie bylo zařazeno 20 pacientů s diabetem 2. typu v počátečním stadiu onemocnění (věk 58 ± 6 let, HbA_{1C} $4,8 \pm 0,5\%$, doba od diagnózy diabetu 2 ± 1 rok) a 14 osob bez diabetu (věk 59 ± 3 let, HbA_{1C} $4,1 \pm 0,4\%$) sloužilo jako kontrolní skupina. Skupiny se v základních parametrech (věk, BMI, TK, urea, kreatinin) významně nelišily, u skupiny diabetiků byly podle očekávání významně vyšší hodnoty glykémie nalačno a HbA_{1C}. Charakteristika obou skupin je uvedena v *tabulce 4*. Diagnóza diabetu byla stanovena na

základě hodnoty glykémie nalačno a/nebo orálního glukózového tolerančního testu. Všichni pacienti ve studii byli léčeni pouze metforminem v průměrné dávce 925mg/den. Žádný z pacientů neměl vyjádřené mikro- ani makrovaskulární komplikace. 15 (75%) pacientů mělo kromě diabetu ještě arteriální hypertenzi a 14 (70%) osob dyslipidémii. V kontrolní skupině bylo s arteriální hypertenzí léčeno 6 (43%) osob a s dyslipidémií 7 (50%) osob.

Studie byla schválena Etickou komisí 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a všichni účastníci podepsali před zařazením do studie informovaný souhlas.

Standardní snídane a provedená vyšetření

Vyšetření probíhalo u každého subjektu během jednoho dopoledne. Po vstupním odběru krve nalačno a změření MVR byla pacientům i kontrolním osobám podána standardní snídane. Od jejího dojedení byly za 60, 120 a 180 minut prováděny odběry žilní krve a po 60 a 180 minutách měřena MVR (*obr. 18*).

Standardní snídane obsahovala jeden rohlík 40 g, džem 20 g, máslo 10 g a 200 ml doplňkové výživy Resource (celkově 2006 kJ, bílkoviny 22,36 g, sacharidy 62,94 g, tuky 15,51 g). Pacientům i kontrolním osobám bylo během vyšetření povoleno volně přijímat neslazené neperlivé tekutiny do maximálního objemu 500 ml.



Obrázek 18. Schématické znázornění časového rozvrhu studie - odběrů krve, měření MVR a podání standardní snídane pacientům s diabetem a kontrolní skupině.

Laboratorní parametry byly stanoveny vždy nalačno a dále po 60, 120 a 180 minutách po standardní snídani. Z metabolických parametrů byla sledována glykémie, inzulinémie, parametry lipidogramu a CRP. Dále byly sledovány koncentrace cytoadhezivních molekul a koagulační parametry jako markery endotelové dysfunkce a MDA a konjugované dieny (KD) jako parametry oxidačního stresu.

Tabulka 4. Charakteristika pacientů s DM 2. typu a kontrolní skupiny.

	pacienti s DM 2. typu	kontrolní skupina
počet osob (M/Ž)	10/10	6/8
věk (roky)	58,3 ± 5,9	58,9 ± 3,3
trvání diabetu (roky)	2,3 ± 1,3	
glykémie nalačno (mmol/l)	6,9 ± 0,6	4,9 ± 0,6
HbA _{1C} (% , IFCC)	4,8 ± 0,5	4,1 ± 0,4
BMI (kg/m ²)	29,3 ± 5,0	29,0 ± 4,2
sTK (mmHg)	130 ± 14	133 ± 12
dTK (mmHg)	80 ± 9	81 ± 8
urea (mmol/l)	5,5 ± 1,2	5,0 ± 1,0
kreatinin (μmol/l)	72 ± 13	79 ± 13
arteriální hypertenze	15 (75%)	6 (43%)
dyslipidémie	14 (70%)	7 (50%)

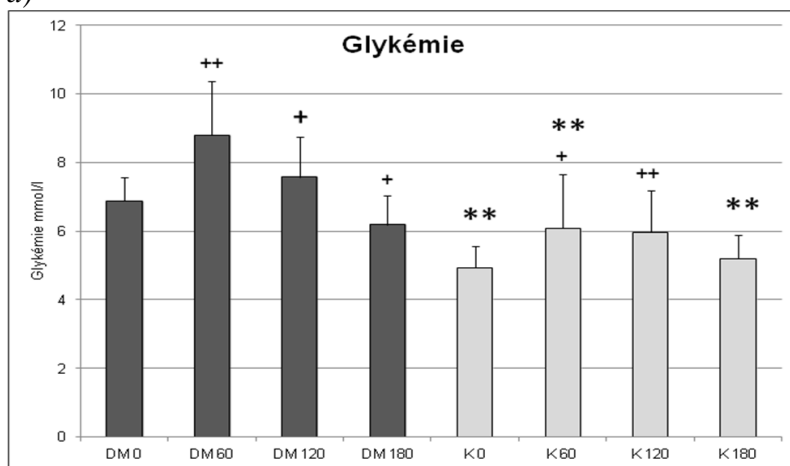
Výsledky

Podle očekávání došlo postprandiálně po 60 minutách k vzestupu glykémie a její následné normalizaci ve 180. minutě u pacientů s diabetem ($6,9 \pm 0,7$ vs. $8,8 \pm 1,6$ vs. $6,2 \pm 0,8$ mmol) i v kontrolní skupině ($4,9 \pm 0,6$ vs. $6,1 \pm 1,6$ vs. $5,2 \pm 0,7$ mmol/l) (*graf 13a*). Výrazně se zvýšila inzulinémie u pacientů s diabetem (35 ± 17 vs. 139 ± 76 vs. 49 ± 37 mIU/l, $p < 0,001$) i v kontrolní skupině (27 ± 8 vs. 118 ± 58 vs. 35 ± 20 mIU/l, $p < 0,001$), i když rozdíly mezi oběma skupinami nebyly statisticky významné (*graf 13b*). Pacienti s diabetem měli bazálně vyšší hodnotu MDA ve srovnání s kontrolní skupinou ($3,0 \pm 0,5$ vs. $2,2 \pm 0,4$ μmol/l, $p < 0,001$), u pacientů s DM, nikoliv však u kontrol, došlo během vyšetření k jejímu významnému poklesu ($3,0 \pm 0,5$ vs. $2,8 \pm 0,5$ μmol/l, $p < 0,05$) (*graf 13c*).

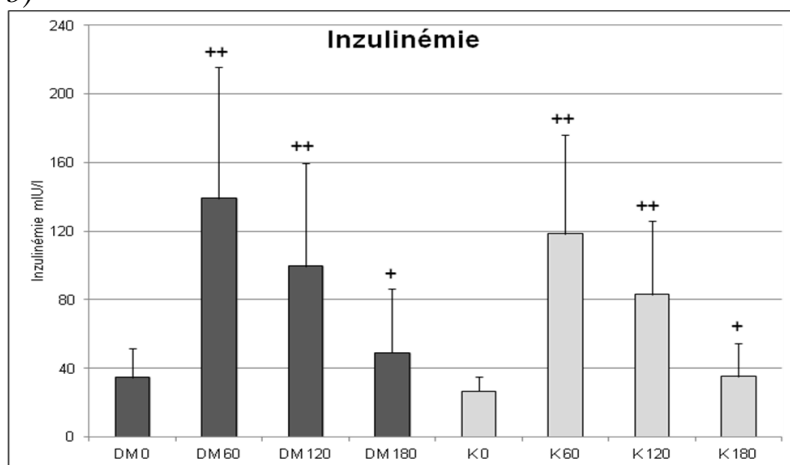
Parametry lipidogramu pravděpodobně ovlivnila lepší kontrola a důslednější terapie dyslipidémie ve skupině s diabetem. Vstupní hodnota TC byla u pacientů s diabetem významně nižší než v kontrolní skupině (*tab. 5*). Během vyšetření došlo překvapivě k významnému poklesu TC, HDL- i LDL-cholesterolu u pacientů s diabetem i v kontrolní skupině. Důvodem poklesu mohla být hemodiluce způsobená perorálním příjmem tekutin společně se standardní snídaní. Pouze v hodnotách TG došlo postprandiálně ke vzestupu, který však byl významný pouze v kontrolní skupině, neboť osoby bez diabetu měly nižší hodnotu TG bazálně.

Graf 13. Porovnání vývoje glykémie *a)*, inzulinémie *b)* a koncentrace MDA *c)* nalačno a v 60., 120. a 180. minutě postprandiálně u pacientů s diabetem (DM) a kontrol (K).

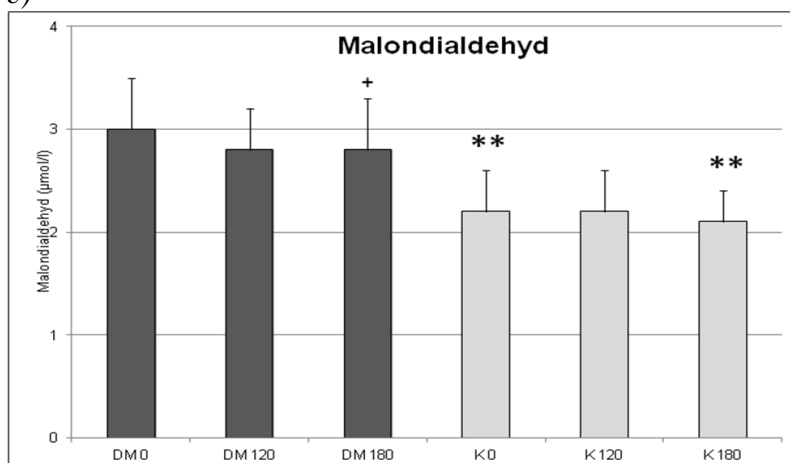
a)



b)



c)



Statistická významnost rozdílů mezi vstupními a následnými postprandiálními hodnotami po 60, 120 a 180 min u pacientů s diabetem i v kontrolní skupině ⁺⁺p<0,001, ⁺p<0,05. Statistická významnost rozdílů mezi skupinou pacientů s diabetem a kontrolní skupinou v časech 0, 60 a 180 ^{**}p<0,001, ^{*}p<0,05.

Stejně jako v parametrech lipidogramu došlo pravděpodobně vlivem hemodiluce v 60. minutě postprandiálně k poklesu ve všech hodnotách cytoadhezivních molekul ve skupině pacientů s diabetem i u kontrol. Vzájemné rozdíly obou skupin nebyly významné.

V parametrech koagulace jsme sledovali hodnoty vWF, t-PA a PAI-1. Ve skupině pacientů s diabetem i v kontrolní skupině došlo k významnému poklesu hodnot PAI-1 ve 180. minutě postprandiálně (*tab. 5*). Hodnota t-PA významně klesla ve 180. minutě pouze u pacientů s diabetem, nikoliv v kontrolní skupině.

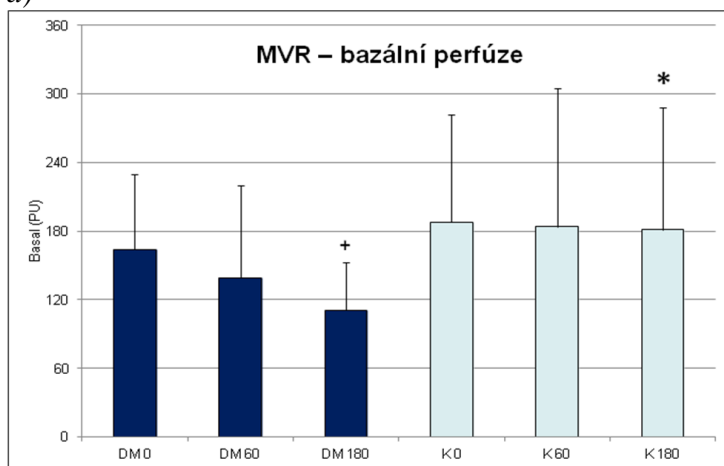
U pacientů s DM poklesla v 60. i ve 180. minutě postprandiálně ve srovnání se vstupní hodnotou bazální perfúze i maximální perfúze na prstu při PORH (164 ± 66 vs. 139 ± 81 vs. 111 ± 42 PU, $p < 0,05$ a 240 ± 67 vs. 221 ± 85 vs. 203 ± 49 PU, $p < 0,05$) (*graf 14a, 14b*). Tento pokles nebyl pozorován u kontrolní skupiny, u které byly ve 180. minutě ve srovnání s pacienty s DM významně vyšší hodnoty bazální perfúze (181 ± 107 vs. 111 ± 42 PU, $p < 0,05$) i maximální perfúze na prstu při PORH (323 ± 89 vs. 203 ± 49 PU, $p < 0,001$). Pacienti s diabetem měli nalačno nižší maximální perfúzi i rychlost vzestupu perfúze na prstu ve srovnání s kontrolní skupinou (240 ± 67 vs. 297 ± 97 PU, $p < 0,05$ a $21,5 \pm 11,6$ vs. $57,7 \pm 31,4$ PU/s, $p < 0,001$) (*graf 14b, 14c*). Tyto rozdíly přetrvávaly i v 60. a 180. minutě testu.

V parametrech MVR měřených na předloktí došlo u pacientů s diabetem, nikoliv u kontrol, ve 180. minutě postprandiálně k poklesu maximální perfúze při PORH a času nutného k dosažení maximální perfúze při PORH, avšak bez statistické významnosti (*graf 15a, 15b*). Rychlost vzestupu perfúze při PORH na předloktí v 60. minutě postprandiálně u obou skupin překvapivě vzrostla (*graf 15c*), ale rovněž bez statistické významnosti. Z těchto výsledků usuzujeme, že k hodnocení MVR v postprandiálním stavu může být vhodnější měření perfúze na prstu, v papilárním typu kůže, neboť příjem potravy a následná redistribuce krve MVR patrně ovlivňují.

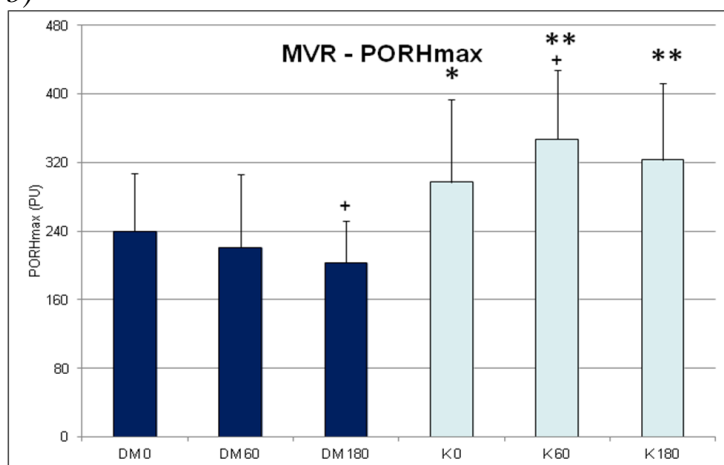
U pacientů s diabetem, nikoliv však u kontrolní skupiny, významně poklesla v 60. i ve 180. minutě postprandiálně ve srovnání se vstupní hodnotou maximální perfúze při TH (*tab. 6*). V kontrolní skupině významně poklesla pouze relativní hyperémie při TH v 60. minutě ve srovnání se vstupní hodnotou, přičemž hodnota relativní hyperémie při TH v 60. minutě byla významně vyšší u pacientů s diabetem ve srovnání s kontrolní skupinou.

Graf 14. Porovnání bazální perfúze na prstu *a*), PORHmax na prstu *b*) a PORHmax/t na prstu *c*) nalačno a v 60. a 180. minutě postprandiálně u pacientů s diabetem a kontrol (K).

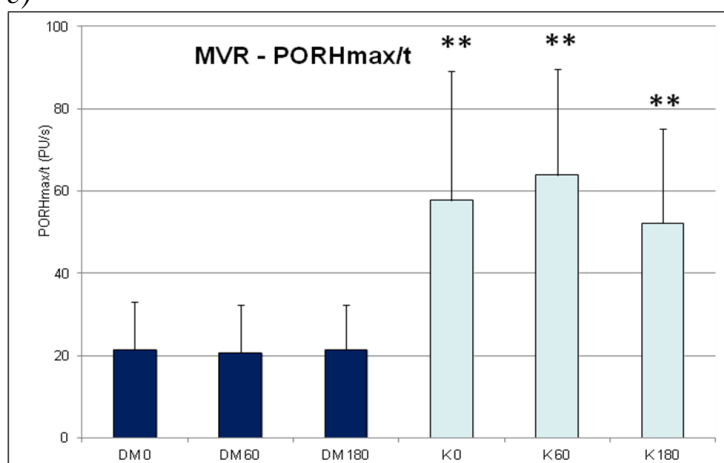
a)



b)



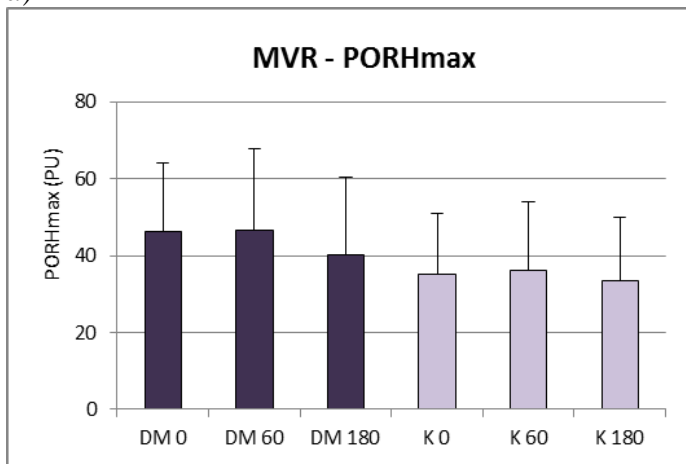
c)



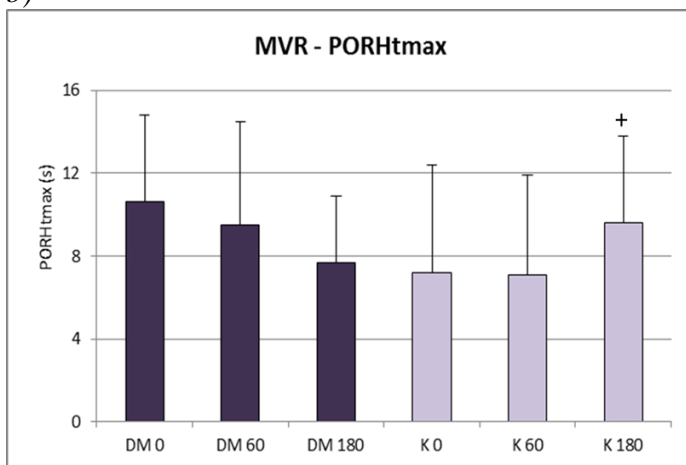
Statistická významnost rozdílů mezi vstupními a následnými postprandiálními hodnotami po 60 a 180 min u pacientů s diabetem i v kontrolní skupině ⁺p<0,05. Statistická významnost rozdílů mezi skupinou pacientů s diabetem a kontrolní skupinou v časech 0, 60 a 180 ******p<0,001, *****p<0,05.

Graf 15. Porovnání MVR na předloktí: PORHmax **a)**, PORHtmax **b)** a PORHmax/t **c)** nalačno a v 60. a 180. minutě postprandiálně u pacientů s diabetem (DM) a kontrol (K).

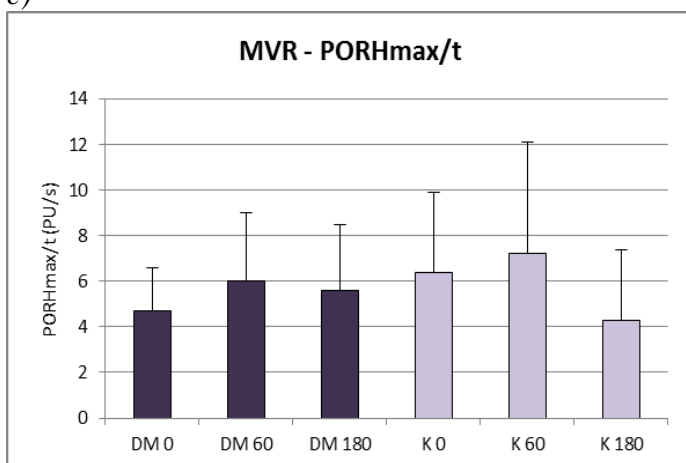
a)



b)



c)



Statistická významnost rozdílů mezi vstupními a následnými postprandiálními hodnotami po 60 a 180 min u pacientů s diabetem i v kontrolní skupině ⁺p<0,05. Statistická významnost rozdílů mezi skupinou pacientů s diabetem a kontrolní skupinou v časech 0, 60 a 180 min *p<0,05.

Tabulka 5. Biochemické parametry, parametry oxidačního stresu, funkce endotelu a fibrinolýzy u pacientů s DM 2. typu a kontrolní skupiny nalačno a v 60., 120. a 180. minutě postprandiálně.

	pacienti s DM 2. typu				kontrolní skupina			
	nalačno	60 min	120 min	180 min	nalačno	60 min	120 min	180 min
glykémie (mmol/l)	6,9 ± 0,7	8,8 ± 1,6 ^a	7,6 ± 1,2 ^b	6,2 ± 0,8 ^b	4,9 ± 0,6 ^x	6,1 ± 1,6 ^{b,x}	6,0 ± 1,2 ^a	5,2 ± 0,7 ^x
inzulinémie (mIU/l)	35 ± 17	139 ± 76 ^a	99 ± 60 ^a	49 ± 37 ^b	27 ± 8	118 ± 58 ^a	83 ± 43 ^a	35 ± 20 ^b
CRP (mg/l)	2,9 ± 2,7	1,8 ± 2,0 ^b	2,4 ± 2,2	2,1 ± 2,4	2,7 ± 2,0	2,4 ± 1,9 ^b	2,1 ± 1,9 ^b	2,4 ± 1,8 ^b
TC (mmol/l)	5,1 ± 0,9	4,8 ± 1,0 ^a	4,7 ± 0,9 ^a	4,9 ± 0,9 ^b	5,7 ± 0,6 ^y	5,6 ± 0,5 ^{b,y}	5,5 ± 0,6 ^b	5,5 ± 0,6 ^{b,y}
TG (mmol/l)	1,7 ± 0,9	1,8 ± 0,7	2,1 ± 0,9	2,0 ± 0,8	1,4 ± 0,7	1,6 ± 0,7 ^b	1,9 ± 0,9 ^b	2,0 ± 0,9 ^a
HDL (mmol/l)	1,33 ± 0,24	1,24 ± 0,21 ^a	1,20 ± 0,25 ^a	1,26 ± 0,23 ^b	1,60 ± 0,28 ^y	1,55 ± 0,27 ^{b,y}	1,53 ± 0,25 ^b	1,52 ± 0,24 ^{b,y}
LDL (mmol/l)	3,1 ± 0,7	2,8 ± 0,7 ^a	2,6 ± 0,6 ^a	2,7 ± 0,7 ^a	3,5 ± 0,5 ^y	3,3 ± 0,5 ^{b,y}	3,1 ± 0,4 ^a	3,1 ± 0,4 ^a
KD (μmol/l)	51,2 ± 12,8	52,4 ± 13,5	52,2 ± 13,7	52,5 ± 11,9	60,8 ± 21,7	61,7 ± 23,0	62,7 ± 21,7	64,0 ± 24,8
MDA (μmol/l)	3,0 ± 0,5	2,9 ± 0,5	2,8 ± 0,4 ^b	2,8 ± 0,5 ^b	2,2 ± 0,4 ^x	x	2,2 ± 0,4	2,1 ± 0,3 ^x
ICAM (ng/ml)	263 ± 72	245 ± 86 ^b	235 ± 63 ^a	253 ± 75	270 ± 94	253 ± 86 ^b	237 ± 94 ^b	255 ± 78
VCAM (ng/ml)	745 ± 171	658 ± 173 ^a	671 ± 169 ^a	697 ± 177	876 ± 225	767 ± 185 ^b	793 ± 213 ^b	757 ± 171 ^a
E-sel (ng/ml)	42,5 ± 13,8	38,6 ± 13,8 ^a	36,8 ± 12,1 ^a	37,9 ± 13,2	35,3 ± 12,0	33,5 ± 11,7 ^b	33,6 ± 12,6	33,0 ± 12,1 ^b
P-sel (ng/ml)	72,0 ± 25,6	60,1 ± 24,3 ^b	56,7 ± 25,5 ^a	61,8 ± 22,1	70,3 ± 16,2	58,3 ± 24,4 ^b	56,2 ± 25,9 ^b	49,2 ± 25,6 ^b
vWF	127 ± 33	x	x	125 ± 32	137 ± 25	x	x	136 ± 23
t-PA	7,0 ± 2,7	x	x	5,9 ± 2,8 ^a	6,7 ± 2,2	x	x	6,1 ± 2,5
PAI-1	67,9 ± 22,9	x	x	38,7 ± 18,9 ^a	75,2 ± 26,0	x	x	57,6 ± 25,8 ^{b,y}

Statistická významnost rozdílů mezi vstupními a postprandiálními hodnotami po 60, 120 a 180 min u pacientů s DM i v kontrolní skupině

^ap<0,001, ^bp<0,05. Statistická významnost rozdílů mezi pacienty s DM a kontrolní skupinou v časech 0, 60, 120 a 180 ^xp<0,001, ^yp<0,05.

Tabulka 6. Parametry MVR u pacientů s DM 2. typu a kontrolní skupiny nalačno a v 60. a 180. minutě postprandiálně.

	pacienti s DM 2. typu				kontrolní skupina			
	nalačno	60 min	120 min	180 min	nalačno	60 min	120 min	180 min
basal prst (PU)	164 ± 66	139 ± 81	x	111 ± 42 ^b	188 ± 94	184 ± 121	x	181 ± 107 ^y
basal předloktí (PU)	8,0 ± 2,5	7,7 ± 3,5	x	7,6 ± 3,6	8,1 ± 2,9	8,7 ± 5,7	x	6,7 ± 2,0 ^b
PORHmax prst (PU)	240 ± 67	221 ± 85	x	203 ± 49 ^b	297 ± 97 ^y	347 ± 81 ^{b,x}	x	323 ± 89 ^x
PORHmax předloktí (PU)	46,1 ± 18,0	46,7 ± 21,0	x	40,3 ± 20,0	35,0 ± 16,0	36,3 ± 17,6	x	33,4 ± 16,7
PORHtmax prst (s)	15,3 ± 11,6	13,2 ± 6,4	x	12,3 ± 6,8	6,8 ± 4,5 ^y	6,2 ± 2,5 ^y	x	7,9 ± 5,2
PORHtmax předloktí (s)	10,6 ± 4,2	9,5 ± 5,0	x	7,7 ± 3,2 ^b	7,2 ± 5,2	7,1 ± 4,8	x	9,6 ± 4,2
PORHmax/t prst (PU/s)	21,5 ± 11,6	20,7 ± 11,5	x	21,4 ± 11,0	57,7 ± 31,4 ^x	63,9 ± 25,8 ^x	x	52,2 ± 22,8 ^x
PORHmax/t předloktí (PU/s)	4,7 ± 1,9	6,0 ± 3,0	x	5,6 ± 2,9	6,4 ± 3,5	7,2 ± 4,9	x	4,3 ± 3,1
PORH% prst (%)	69 ± 43	92 ± 65	x	118 ± 110	80 ± 58	160 ± 156	x	123 ± 117
PORH% předloktí (%)	467 ± 221	608 ± 351	x	453 ± 179	344 ± 173	367 ± 176 ^y	x	411 ± 216
TH basal	7,4 ± 2,1	7,4 ± 3,7	x	7,1 ± 3,0	7,3 ± 2,4	8,6 ± 4,7	x	6,5 ± 2,4
THmax (PU)	145 ± 71	131 ± 88	x	113 ± 53 ^b	112 ± 46	99 ± 40	x	109 ± 48
THtmax (s)	115 ± 21	116 ± 27	x	111 ± 23	133 ± 23 ^y	124 ± 31	x	133 ± 24 ^y
THmax/t (PU/s)	1,2 ± 0,6	1,2 ± 0,7	x	1,0 ± 0,4	0,9 ± 0,4	0,9 ± 0,5	x	0,8 ± 0,4
TH% (%)	1772 ± 768	1719 ± 797	x	1595 ± 714	1489 ± 600	1183 ± 490 ^{b,y}	x	1637 ± 576

Statistická významnost rozdílů mezi vstupními a následnými postprandiálními hodnotami po 60 a 180 min u pacientů s DM i v kontrolní skupině

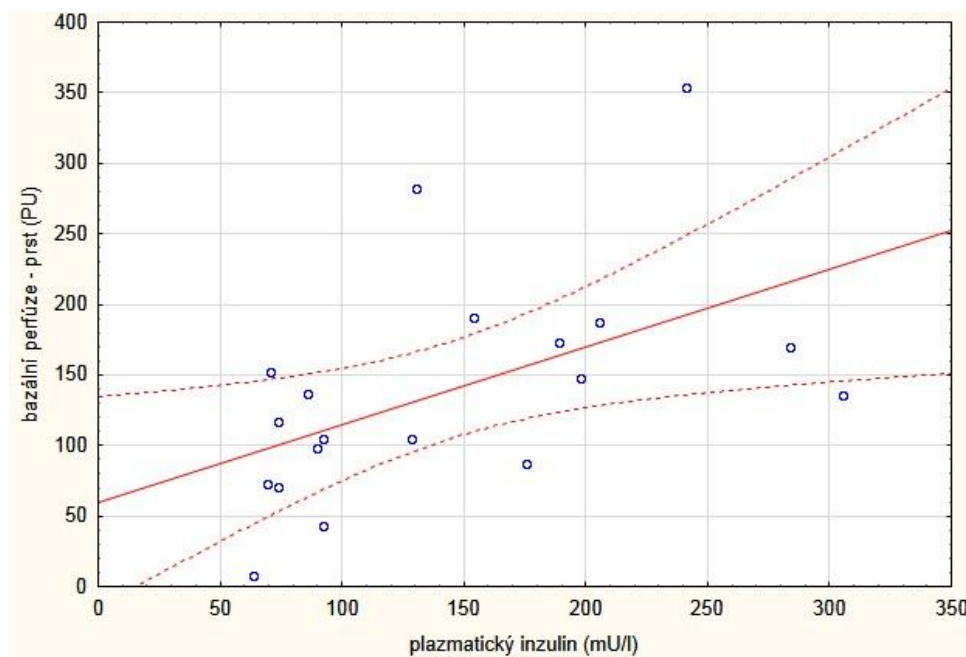
^ap<0,001, ^bp<0,05. Statistická významnost rozdílů mezi pacienty s DM a kontrolní skupinou v časech 0, 60 a 180 ^xp<0,001, ^yp<0,05.

Parametry MVR korelovaly zejména ve 180. minutě postprandiálně s některými cytoadhezivními molekulami. U pacientů s diabetem byl v tomto čase pozorován negativní vztah mezi P-selektinem a časem nutným k dosažení maximální perfúze při PORH na předloktí ($r=-0,51$, $p<0,05$) a pozitivní vztah mezi koncentrací E-selektinu a TH% ($r=0,48$, $p<0,05$). U kontrolní skupiny pak ve stejném čase pozitivní vztah mezi ICAM-1 a maximální hodnotou perfúze při PORH na předloktí ($r=0,66$, $p<0,05$) a časem nutným k dosažení maximální perfúze při TH ($r=0,62$, $p<0,05$).

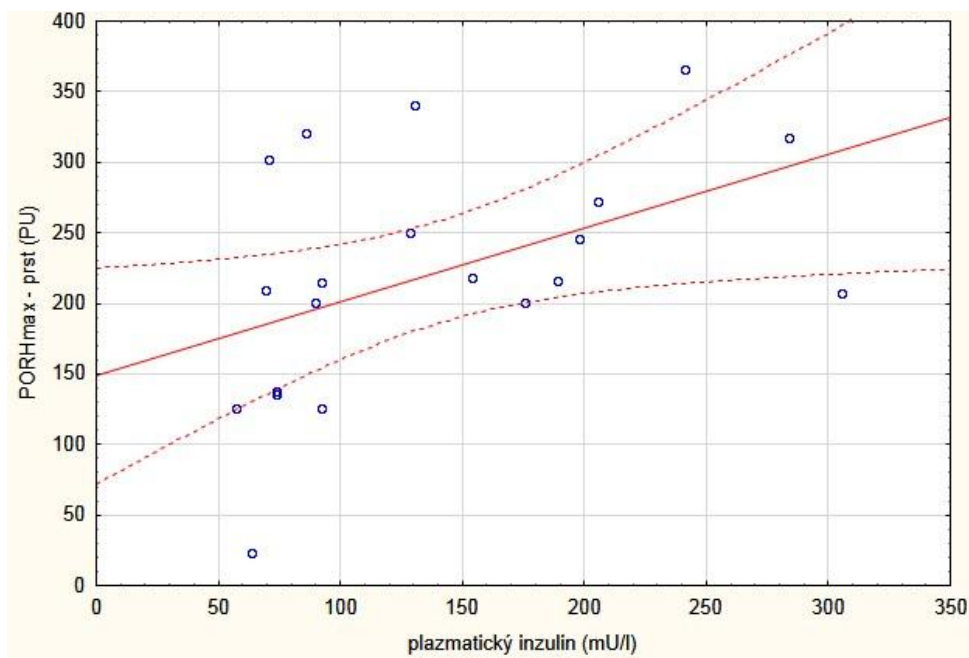
Dále byl pozorován vztah mezi MVR a oxidačním stresem. U pacientů s diabetem ve 180. minutě postprandiálně negativně korelovala hodnota MDA s bazálním průtokem na prstu ($r=-0,55$, $p<0,05$) a ve stejném čase byl nalezen pozitivní vztah mezi koncentrací KD a časem nutným k dosažení maximální perfúze při TH ($r=0,59$, $p<0,01$). U kontrolní skupiny negativně korelovala v 60. minutě postprandiálně koncentrace KD s maximální hodnotou perfúze při TH ($r=-0,65$, $p<0,05$).

U pacientů s DM bylo v 60. minutě testu nalezeno několik korelací mezi parametry MVR a inzulinémií (*graf 16, 17 a 18*). Koncentrace inzulinu pozitivně korelovala s bazálním průtokem na prstu ($r=0,52$, $p<0,05$), s maximální hodnotou perfúze při PORH na prstu ($r=0,47$, $p<0,05$) a negativně korelovala s PORH% ($r=-0,50$, $p<0,05$). Tyto korelace nebyly zjištěny v kontrolní skupině, přestože hodnoty inzulinémie se mezi pacienty s diabetem a kontrolní skupinou statisticky signifikantně nelišily.

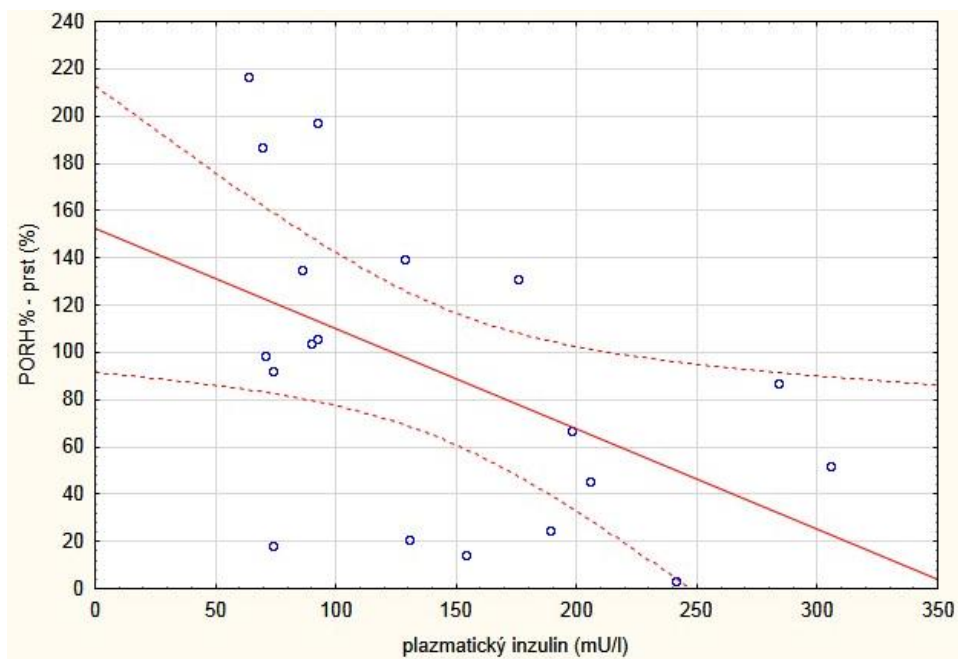
Graf 16. Vztah mezi plazmatickou koncentrací inzulinu a bazální perfúzí na prstu v 60. minutě testu ($r=0,52$, $p<0,02$).



Graf 17. Vztah mezi plazmatickou koncentrací inzulínu a maximální hodnotou perfúze při PORH na prstu v 60. minutě testu ($r=0,47$, $p<0,036$).



Graf 18. Vztah mezi plazmatickou koncentrací inzulínu a relativním vzestupem perfúze při PORH (PORH%) v 60. minutě testu ($r=-0,50$, $p<0,03$).



Závěr

Ve studii zabývající se vlivem příjmu potravy na MVR a funkci endotelu u pacientů s recentně diagnostikovaným diabetem 2. typu jsme pozorovali významné rozdíly v glykémii nalačno i v postprandiálním stavu mezi pacienty s DM a kontrolní skupinou

a to i navzdory terapii metforminem. Z důvodu těchto změn je při hodnocení kompenzace diabetu důležité brát v úvahu nejen hodnotu HbA_{1C} a glykémie nalačno, ale také vzestupy glykemií po jídle (138). Inzulinémie byla u pacientů s diabetem proti kontrolám zvýšena pouze nevýznamně. U pacientů s diabetem jsme dále zjistili možné zvýšení oxidačního stresu bazálně i po příjmu potravy. V parametrech koagulace došlo postprandiálně ke změnám v obou skupinách.

U pacientů s diabetem i v kontrolní skupině byla zjištěna celá řada korelací mezi MVR a biochemickými parametry funkce endotelu a oxidačního stresu. Některé parametry MVR byly u pacientů s diabetem bazálně i postprandiálně významně nižší ve srovnání s kontrolami a podle očekávání také došlo u pacientů s diabetem k významnému poklesu MVR po jídle. Důležitým parametrem postprandiálního stavu se zdá být především inzulinémie, která má mimo jiné pravděpodobně podíl i na regulaci MVR u pacientů s diabetem 2. typu. K podrobnějším znalostem vlivu inzulinové rezistence a stupně poruchy funkce B-buněk (včetně trvání diabetu) bude potřeba dalších experimentů.

5.4. Parametry glykemické variability a jejich vztah ke kompenzaci diabetu a mikrovaskulární reaktivitě u pacientů s diabetem 1. typu léčených inzulinovou pumpou

Tato práce vznikla na III. interní klinice 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a VFN v Praze v době, kdy zde ještě nebyla rutinně používána kontinuální monitorace glykemií. Veškerá data glykemické variability byla tedy získána pouze z glukometrů. V současné době provádíme studie s podobným zaměřením, ale již s využitím kontinuální monitorace glykémie.

Cíl práce

Cílem naší práce bylo porovnat parametry glykemické variability s kompenzací diabetu, s parametry inzulinové terapie a s mikrovaskulární reaktivitou u pacientů s diabetem 1. typu léčených inzulinovou pumpou.

Úvod

Kompenzaci diabetu můžeme hodnotit několika různými parametry. Běžně používané vyšetření glykovaného hemoglobinu HbA_{1C} ukazuje, jaká byla kompenzace za uplynulých 6-8 týdnů, jde tedy o dlouhodobý parametr. V posledních letech však přibývají důkazy o tom, že HbA_{1C} jako sumární parametr neinformuje o krátkodobých

změnách glykémie – glykemické variabilitě (*obr. 19*) (139). Selfmonitoring glykemií nebo laboratorní hodnoty glykémie sice ukazují aktuální stav, ale ten je ovlivněn mnoha různými okolnostmi a je v čase velmi proměnný.

Glykemická variabilita tedy popisuje míru kolísání hodnot glykémie. Pokud je GV nízká, hodnoty glykemií jsou stabilní a nedochází k výraznějším vzestupům ani poklesům. Naopak pokud je GV zvýšená, kolísání glykémie je výraznější a vzestupy glykémie i výskyt hypoglykemií jsou častější.

Při neuspokojivé kompenzaci diabetu glykémie stejně jako HbA_{1C} stoupají, což je spojeno se zvýšeným rizikem rozvoje mikro- i makrovaskulárních komplikací (123, 124, 140, 141). Hlavními rizikovými faktory vzniku cévních komplikací jsou u DM právě zvýšená hladina HbA_{1C}, trvání diabetu a v menší míře také věk, ve kterém se onemocnění diabetem rozvinulo (142). Patogenetickým podkladem chronických komplikací DM je setrvalá hyperglykémie, která aktivuje oxidační stres zvýšením produkce superoxidu. Ten spouští kaskádu dějů vedoucích ke spuštění čtyř hlavních škodlivých mechanismů tkáňového poškození. Těmito mechanismy jsou zvýšení aktivity polyolové dráhy, zvýšení intracelulární produkce prekurzorů AGE, aktivace PKC a zvýšení aktivity hexosaminové dráhy (*obr. 3*) (116).

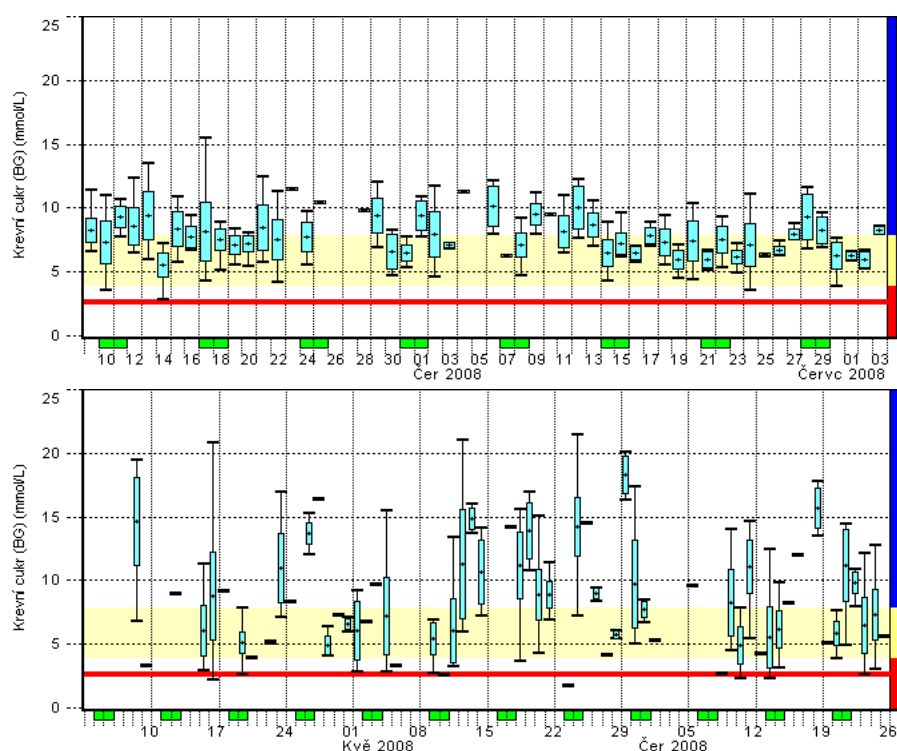
Podle některých studií je oxidační stres aktivován také díky zvýšené GV (122). Dosud nezodpovězenou otázkou však zůstává, zda zvýšená GV zvyšuje i riziko rozvoje diabetických komplikací.

Podle studií *in vitro* dochází při vyšší GV mechanismem zvýšeného oxidačního stresu ke vzniku endotelové dysfunkce (143). Podle některých dat byla tato skutečnost pozorována i v klinických studiích *in vivo*, především u pacientů s diabetem 2. typu (109-112, 121, 122). U pacientů s diabetem 1. typu může zvýšená GV pravděpodobně souviset s rozvojem a závažností diabetické neuropatie (113), ale není spojena se zvýšeným rizikem rozvoje diabetické retinopatie a nefropatie (113, 114). Studie provedené na základě dat z DCCT však souvislost mezi glykemickou variabilitou a zvýšeným rizikem cévních komplikací zpochybňují (115).

Studie zabývající se touto problematikou jsou tedy zatím rozporuplné. Jejich autoři však hodnotili GV rozdílnými způsoby, buď nepřímo nebo analýzou dat z rutinního selfmonitoringu glykemií s různou frekvencí měření (113, 144). K hodnocení GV je možno použít několik metod. Kromě uvedeného selfmonitoringu glykemií je to nověji možnost kontinuální monitorace glykemií, prozatím však není žádná metoda akceptována jako univerzální (145).

Kromě zvýšeného rizika vzniku vaskulárních komplikací má studování GV ještě další důvody. Pacienti s častými hypoglykémiami mají vyšší mortalitu, sníženou kvalitu života a jsou omezeni v běžných pracovních i společenských podmínkách (146). Hypoglykémie jsou také největší překážkou v léčbě diabetu 1. typu (147).

S ohledem na nejednoznačnost dosavadních výsledků jsme se v naší studii zaměřili na zkoumání vlivu GV na kompenzaci diabetu a na MVR u pacientů s diabetem 1. typu léčených inzulinovou pumpou.



Obrázek 19. Záznam selfmonitoringu glykemií u dvou různých pacientů se srovnatelným HbA_{1C}, ale s odlišnou GV – nízká variabilita glykemií (nahore) a vysoká variabilita glykemií (dole).

Metody

Pacienti

Do studie bylo zařazeno 18 pacientů s diabetem 1. typu (10 mužů a 8 žen), průměrný věk 39 ± 10 let, BMI $24,9 \pm 4,1$ kg/m², trvání diabetu 17 ± 7 let, kteří byli léčeni inzulinovou pumpou. Aktuální průměrný glykovaný hemoglobin v době studie byl $7,2 \pm 1,8\%$ dle IFCC a průměrná hodnota HbA_{1C} vypočítaná ze tří posledních měření $6,9 \pm 1,4\%$ dle IFCC. Diagnóza diabetu byla stanovena na podkladě klinického obrazu a nedetekovatelné hladiny C-peptidu (C-peptid $<0,05$ nmol/l). Do studie byli zařazeni

i pacienti s již rozvinutými mikrovaskulárními komplikacemi, neboť diabetická retinopatie, neuropatie a nefropatie jsou součástí základního onemocnění při dlouhodobě neuspokojivé kompenzaci. Diabetická retinopatie byla přítomna u tří pacientů (17%), diabetická neuropatie u dvou pacientů (11%), žádný pacient neměl rozvinutou diabetickou nefropatii (hodnoceno dle mikroalbuminurie korigované podle kreatininu v moči ze sběru za 24 hodin, albumin/creatinine ratio ACR <2.5 mg/mmol, v celém souboru průměrná hodnota $0,87 \pm 0,8$ mg/mmol). Žádný pacient neměl syndrom diabetické nohy. V celém studovaném souboru neměl žádný z pacientů s diabetem 1. typu v anamnéze kardiovaskulární příhodu. Vzhledem k designu studie nebylo možné vytvořit kontrolní skupinu.

Studie byla schválena Etickou komisí 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a všichni účastníci podepsali před zařazením do studie informovaný souhlas.

Terapie inzulinem

Všichni pacienti byli v době studie léčeni kontinuální subkutánní infúzí inzulinu (CSII) pomocí inzulinové pumpy Accu-Chek Spirit, Roche (*obr. 20*) (terapie inzulinovou pumpou $4,5 \pm 3,1$ let). Použitý byl inzulinový analog lispro (n=10) nebo aspart (n=8). Pacienti byli před zařazením do studie instruováni ponechat základní nastavení pumpy, počty kroků bazální dávky, počty aplikovaných bolusů a také intenzitu selfmonitoringu dle svých zvyklostí. Z parametrů inzulinové léčby byla sledována celková denní dávka inzulinu, celková bazální dávka inzulinu, celková dávka aplikovaná v bolusech, počet kroků bazální dávky a průměrný počet bolusových dávek na den.



Obrázek 20. Inzulinová pumpa Accu-Chek Spirit od firmy ROCHE (převzato z firemních materiálů accu-chek.com).

Glykemická variabilita

Podklady pro hodnocení GV byly získány na základě selfmonitoringu pacientů za posledních 6-12 týdnů pomocí přístroje AccuChek SmartPix (Roche). Byla sledována frekvence selfmonitoringu a celkový počet měření za 6-12 týdnů. Jako parametry GV byly použity hodnoty průměrné glykémie, směrodatné odchytky SDBG (standard deviation of blood glucose), odhad rizika hyperglykémie HBGI (high blood glucose index) a odhad rizika hypoglykémie LBGI (low blood glucose index) vypočítané přímo softwarem AccuChek SmartPix (Roche).

Glykovaný hemoglobin HbA_{1C} byl stanoven v odstupe maximálně 1 týdne od dne stažení dat glykémie a dále byla vypočítána průměrná hodnota HbA_{1C} ze tří posledních měření.

Mikrovaskulární reaktivita

Mikrovaskulární reaktivita byla u pacientů měřena metodou laser-Doppler, jednorázově, v rozmezí 1-4 týdnů ode dne stažení dat.

Výsledky

Výsledky selfmonitoringu, parametrů glykemické variability a parametrů inzulínové terapie jsou uvedeny v *tabulce 7*, výsledky mikrovaskulární reaktivity v *tabulce 8*.

Podle očekávání byla zjištěna statisticky významná pozitivní korelace mezi průměrnou glykemií a hodnotou posledního HbA_{1C} ($r=0,56$, $p=0,15$) i průměrného HbA_{1C} z posledních třech měření ($r=0,62$, $p=0,006$). Dále byla zjištěna významná pozitivní korelace mezi oběma hodnotami HbA_{1C} a indexem HBGI ($r=0,48$, $p=0,044$ a $r=0,81$, $p=0,014$, *graf 19*) a mezi HbA_{1C} a SDBG ($r=0,61$, $p=0,0025$, *graf 20*). Mezi ostatními parametry GV a parametry léčby inzulínem nebyl prokázán žádný významný vztah, stejně jako nebyla zjištěna žádná korelace mezi GV a mikrovaskulární reaktivitou nebo mikroalbuminurií.

Tabulka 7. Parametry selfmonitoringu, glykemické variability a terapie inzulinem u pacientů s diabetem 1. typu léčených inzulinovou pumpou.

Parametry selfmonitoringu	
frekvence selfmonitoringu (měření/den)	2,1 ± 1,3
celkový počet měření/ 6-12 týdnů	143 ± 69

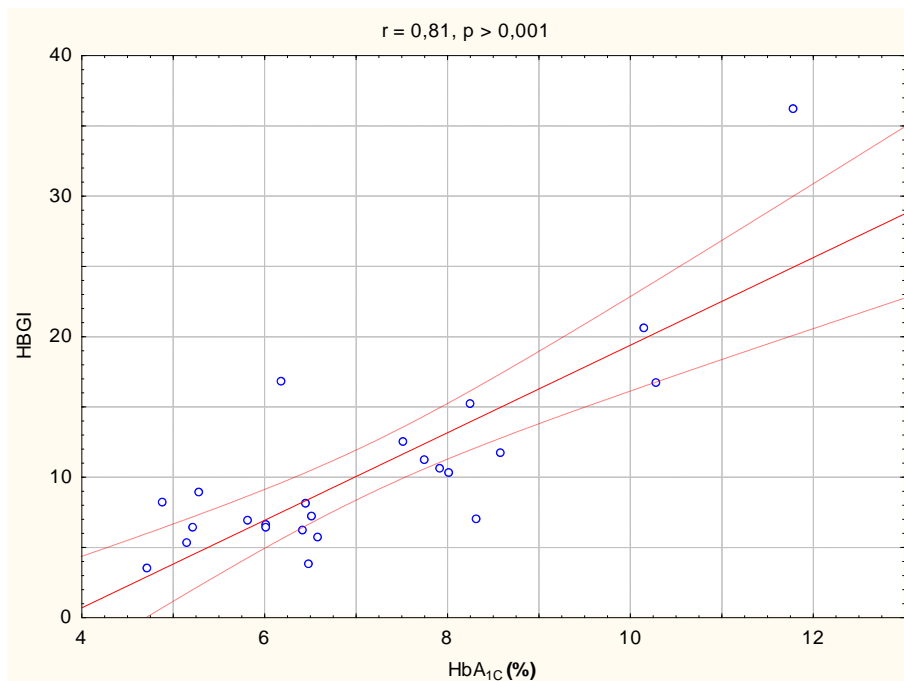
Parametry glykemické variability	
průměrná glykémie ze všech testů (mmol/l)	8,8 ± 1,3
směrodatná odchylka glykemií (mmol/l)	4,5 ± 1,0
HBGI	9,3 ± 3,8
LBGI	3,4 ± 1,7

Parametry inzulinové terapie	
celková denní dávka inzulinu (IU/den)	42,2 ± 8,6
bazální dávka (IU/den)	22,4 ± 4,5
dávka v bolusech (IU/den)	19,8 ± 6,8
počet kroků bazální dávky/den	3,8 ± 3,0
počet bolusových dávek/den	4,7 ± 1,6

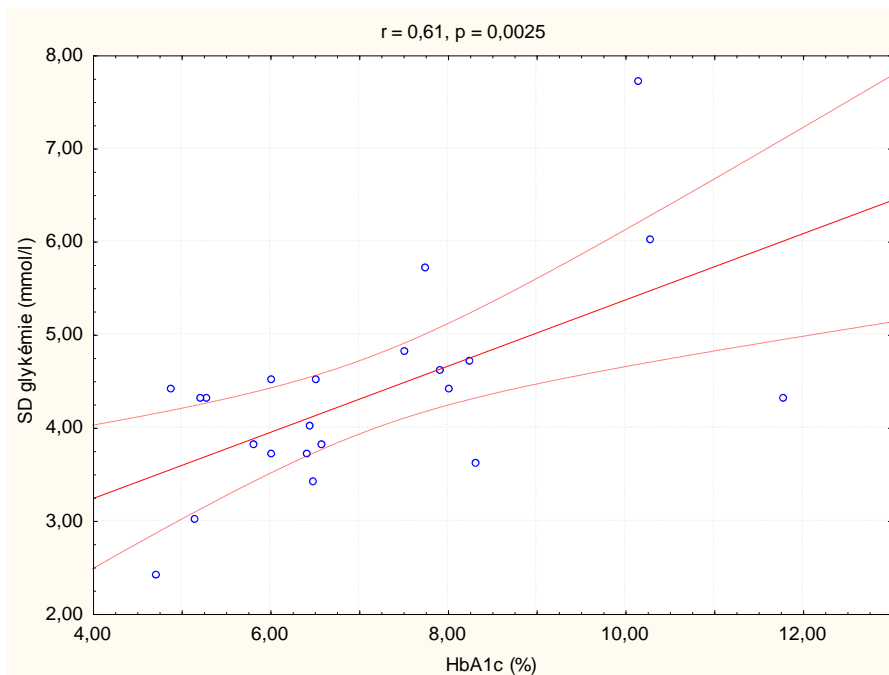
Tabulka 8. Parametry mikrovaskulární reaktivity u pacientů s diabetem 1. typu léčených inzulinovou pumpou.

Mikrovaskulární reaktivita	
PORHmax prst (PU)	126 ± 86
PORHmax předloktí (PU)	51,6 ± 25,8
PORHtmax prst (s)	17,6 ± 13,2
PORHtmax předloktí (s)	10,7 ± 4,9
PORHmax/t prst (PU/s)	3,6 ± 4,8
PORHmax/t předloktí (PU/s)	6,5 ± 7,4
PORH% prst (%)	139 ± 144
PORH% předloktí (%)	435 ± 167
THmax (PU)	136 ± 79
Thtmax (s)	92 ± 26
THmax/t (PU/s)	1,4 ± 0,6
TH% (%)	1335 ± 558

Graf 19. Vztah mezi hodnotou glykovaného hemoglobinu (HbA_{1C}) a indexem hyperglykémie (HBGI).



Graf 20. Vztah mezi hodnotou glykovaného hemoglobinu (HbA_{1C}) a směrodatnou odchylkou glykémie SDBG.



Závěr

Ve studii porovnávající parametry GV s kompenzací diabetu a MVR u pacientů s diabetem 1. typu léčených inzulinovou pumpou jsme zjistili významné vztahy mezi jednotlivými parametry kompenzace a parametry GV. Významnou souvislost mezi GV a parametry léčby inzulinem se nám nepodařilo prokázat, i když je podle výsledků jiných studií pravděpodobná (148, 149). Zda se GV podílí na zvýšeném riziku vzniku diabetických vaskulárních komplikací není zatím podle dostupných studií jednoznačně prokázáno, podle naší studie jsme významnou souvislost mezi glykemickou variabilitou a MVR neprokázali. K potvrzení či vyvrácení této hypotézy v brzké době pravděpodobně přispějí moderní technologie v diabetologii, především kontinuální monitorace glykémie. Glykemická variabilita se patrně stane dalším ze sledovaných parametrů kompenzace diabetu. Kolísání glykémie nelze nikdy zamezit zcela, ale snaha diabetologa i pacienta by měla vždy vést k udržení GV co nejnižší. Zdali se tím sníží riziko vzniku diabetických vaskulárních komplikací není ještě zcela prokázáno, ale jisté je, že nižší variabilita glykemií přináší pacientům s diabetem uspokojivější kvalitu života a vede k lepší compliance v léčbě (150, 151).

6. Diskuse

Mikrovaskulární reaktivita a funkce endotelu u pacientů s Cushingovým syndromem

Z parametrů lipidogramu jsme u pacientů s hyperkortizolémií zjistili zvýšený celkový, HDL- i LDL- cholesterol a triglyceridy. Abnormální lipidogram spojený s obezitou, sníženou aktivitou sympatiku, hyperglykemizujícím efektem kortizolu a relativní inzulinopenií jsou dobře známé charakteristické znaky hyperkortizolizmu (152). U pacientů s Cushingovým syndromem byla prokázána významně zvýšená lipolýza v břišní podkožní tukové tkáni (153). Po normalizaci sekrece kortizolu se všechny měřené parametry lipidogramu snížily na hodnoty srovnatelné s kontrolní skupinou. Po úspěšné léčbě se snížil také BMI, rozdíl však nebyl statisticky významný. BMI byl ve všech třech skupinách srovnatelný.

U pacientů s hyperkortizolémií jsme zaznamenali vyšší sérové koncentrace inzulinu, které dokazují přítomnost inzulinové rezistence, jak dokládá také zvýšený HOMA-R index. Glukokortikoidy zvyšují inzulinovou rezistenci a mohou způsobit sekundární „steroidní“ diabetes mellitus, který je proto u pacientů s Cushingovým syndromem velmi častý (v naší skupině HC pacientů byl diabetes diagnostikován u více než poloviny pacientů). Inzulinová rezistence se po normalizaci hladin plazmatického kortizolu snížila stejně jako koncentrace inzulinu. Metabolismus glukózy se obvykle po úspěšné léčbě zlepšil. V této studii nebyl za 6-24 měsíců po normalizaci hladin kortizolu u žádného pacienta přítomen diabetes a sérová koncentrace inzulinu i HOMA-R index byly srovnatelné s kontrolní skupinou.

Hyperkortizolizmus je spojen se změnami fibrinolýzy. Tyto změny mohou také přispívat k rozvoji aterosklerózy (154). U pacientů s Cushingovým syndromem byla popsána hyperkoagulace a zvýšená incidence flebotrombóz a embolizací (155). Tyto změny v procesu koagulace jsou dány zvýšenou hladinou prokoagulačních faktorů a sníženou koncentrací antitrombinu-III (156). V naší skupině s hyperkortizolémií měli pouze dva pacienti v předchozí anamnéze plicní embolii. Koncentrace plazmatického tPA byla významně vyšší u pacientů s hyperkortizolizmem a v této skupině pozitivně korelovala pouze s PAI-1. PAI-1 u pacientů s hyperkortizolizmem významně koreloval s BMI, triglyceridy a aktivitou NAG, ne však u pacientů po léčbě ani u kontrol. Nejvyšší koncentrace PAI-1 byly zjištěny u HC pacientů s diabetem na inzulinoterapii, s obezitou a hypercholesterolémií (průměrný BMI 35 kg/m², TC 8,2 mmol/l). Změny v procesu fibrinolýzy u různých onemocnění úzce souvisí s endotelovou dysfunkcí (157) a výsledek naší studie ukázal přítomnost tohoto vztahu také u endogenního

hyperkortizolizmu. Vztah mezi tPA a aktivitou NAG u kontrolní skupiny naznačil možnou souvislost fibrinolýzy s funkcí endotelu také za normálního stavu. Předpokládáme, že prokoagulační stav u pacientů s Cushingovým syndromem může být ovlivněn zvýšenou tělesnou hmotností a dysbalancí v metabolismu lipidů.

Oxidační stres, reaktivní formy kyslíku a jejich produkty stimulují NF- κ B (158). Aktivovaný NF- κ B prochází jadernou membránou a moduluje genovou transkripci. Tento proces vede k produkci růstových a chemotaktických faktorů, adhezivních molekul a k aktivaci endotelu. Glukokortikoidy inhibují NF- κ B indukci syntézy jeho inhibitoru snížením počtu vazeb na citlivé částice v jádře a pravděpodobně i jinými mechanismy (159). Glukokortikoidy také inhibují produkci reaktivních forem kyslíku v hladké svalovině, jejich efekt tak může být protektivní (160). Na druhé straně, jak je popsáno výše, častá přítomnost obezity u pacientů s Cushingovým syndromem je spojena se zvýšeným oxidačním stresem (161).

V této studii jsme ke zhodnocení oxidačního stresu měřili plazmatickou koncentraci MDA a aktivitu Cu,Zn-SOD. MDA je produkt oxidace lipidů a jeho zvýšené hladiny jsou přítomné u většiny pacientů s hypercholesterolémií (162). Jak jsme předpokládali, v naší studii byla zjištěna vyšší koncentrace MDA u pacientů s Cushingovým syndromem. Nalezli jsme vztah mezi celkovým cholesterolem a MDA, překvapivě však mezi triglyceridy a MDA významný vztah nebyl. Aktivita Cu,Zn-SOD byla signifikantně nižší v obou skupinách pacientů. Cu,Zn-SOD negativně korelovala s aktivitou NAG ve skupině HC pacientů, což ukazuje na možný vliv oxidačního stresu na funkci endotelu u hyperkortizolizmu. Určitý vztah je pravděpodobný také mezi oxidačním stresem a arteriální hypertenzí (163). Vzestup koncentrace MDA a snížená aktivita Cu,Zn-SOD dokazují zvýšený oxidační stres a sníženou kapacitu antioxidantních mechanismů u pacientů s hyperkortizolémií. Na základě výsledků studie usuzujeme, že hyperkortizolizmus nemá inhibiční vliv na oxidační stres a protektivní vliv glukokortikoidů je u pacientů s Cushingovým syndromem potlačen prooxidačními procesy nebo nedostatečnou kapacitou antioxidantních mechanismů.

Aktivita NAG, P-selektinu, E-selektinu a koncentrace ICAM-1 byly stanoveny jako biochemické markery endotelové dysfunkce. Zvýšená koncentrace ICAM-1 nalezená u pacientů s hyperkortizolizmem nasvědčovala přítomnosti endotelové dysfunkce. Ve skutečnosti však byly nejvyšší hladiny ICAM-1 zjištěny u pacientů po normalizaci hladin kortizolu, což by mohlo svědčit pro přetrvávání endotelové dysfunkce i po úspěšné léčbě.

Koncentrace NAG, P-selektinu a E-selektinu byly srovnatelné s kontrolami. Ve skupině kontrol navíc významně korelovaly hladiny ICAM-1 a P-selektinu s TG. Tato zjištění naznačují vztah mezi endotelovou dysfunkcí a parametry metabolismu lipidů také za normálních podmínek. Vztah mezi adhezivními molekulami a oxidačním stresem byl již zmiňován (164, 165). Aktivita NAG souvisí s oxidačním stresem (166), v naší studii je tento vztah u pacientů s hyperkortizolizmem dokumentován negativní korelací mezi aktivitou NAG a aktivitou Cu,Zn-SOD. Endotelová dysfunkce hodnocená v naší studii podle aktivity NAG a koncentrace ICAM-1 může být tedy také u pacientů s hyperkortizolizmem ovlivněná oxidačním stresem.

Z parametrů MVR jsme v této studii pozorovali u pacientů s Cushingovým syndromem sníženou maximální perfúzi při PORH i při TH. Stejně tak byla snížena hodnota dynamického parametru THmax/t. Tyto změny ukazují přítomnost endotelové dysfunkce a snížené MVR u pacientů s Cushingovým syndromem.

U pacientů s aktivním Cushingovým syndromem byl ICAM-1 v negativní korelaci s TH. Naopak u pacientů po normalizaci hladin kortizolu byla zjištěna pozitivní korelace mezi koncentrací ICAM-1 a rychlostí vzestupu perfúze při TH. Jak jsme již zmínili, u těchto pacientů byla koncentrace ICAM-1 nejvyšší, překvapivě však nesouvisela s MVR. Můžeme se domnívat, že zvýšené hladiny ICAM-1 v této skupině pacientů mohou svědčit například o intenzivních reparačních změnách v cirkulaci po dlouhotrvajícím negativním vlivu hyperkortizolizmu. U kontrolní skupiny byla zjištěna negativní korelace mezi rychlostí vzestupu perfúze při TH a aktivitou sérové NAG, stejně jako mezi koncentrací MDA a třemi parametry MVR. Tyto vztahy nebyly pozorovány u pacientů s hyperkortizolémií ani u pacientů po léčbě. Oxidační stres a endotelová dysfunkce může proto ovlivňovat MVR za normálních podmínek, v případě hyperkortizolizmu jsou však pravděpodobně dominantní jiné faktory.

U pacientů s Cushingovým syndromem působí několik patofyziologických mechanismů, které vedou ke vzniku arteriální hypertenze: stimulace mineralokortikoidních a glukokortikoidních receptorů, inzulinová rezistence a nadměrná aktivita renin-angiotenzinového systému (167). V naší studii negativně korelovaly dva parametry MVR se systolickým krevním tlakem. Po zvážení tohoto výsledku jsme porovnali podskupiny pacientů s Cushingovým syndromem s diabetes mellitus a/nebo s arteriální hypertenzí s podskupinami pacientů s Cushingovým syndromem bez těchto komorbidit. Jak diabetes mellitus, tak arteriální hypertenze jsou spojeny s endotelovou dysfunkcí (163, 168). V této studii byla výrazně snižena MVR u pacientů s arteriální hypertenzí. Přítomnost

diabetes mellitus přispívala ke snížení MVR v THmax a PORHmax, avšak bez statistické významnosti. Přítomnost kombinace obou těchto komplikací, diabetes mellitus i arteriální hypertenze, souvisela s největším poklesem MVR u pacientů s Cushingovým syndromem.

Vliv rychlé změny glykémie během hyperinzulinemického izoglykemického a hyperglykemického clampu na mikrovaskulární reaktivitu a funkci endotelu u pacientů s diabetem 1. typu

V této studii jsme nepotvrdili hypotézu, že rychle navozená hyperglykémie zhoršuje mikrovaskulární reaktivitu u pacientů s diabetem 1. typu. Mezi glykemií a MVR nebyl pozorován při hyperinzulinemickém izoglykemickém ani hyperglykemickém clampu žádný významný vztah. Toto zjištění je shodné s výsledky podobné studie Oomena *et al.* (126).

Dynamické parametry MVR prokázaly rychlejší mikrovaskulární vazodilataci v izoglykemické fázi clampu, kdy je přítomna pouze hyperinzulinémie. Rychlejší mikrovaskulární vazodilatace přetrvávala i v hyperglykemické fázi clampu, ale k jejímu negativnímu ovlivnění po rychlém vzestupu glykémie nedošlo. V hyperglykemické fázi clampu inzulinémie negativně korelovala s časem nutným k dosažení maximální perfúze při PORH na prstu – pacienti s vyšší koncentrací inzulinu v krvi tedy vykazovali rychlejší nástup maximální perfúze. Tyto výsledky z naší studie naznačují, že vazodilatační efekt inzulinu může hrát významnou roli v regulaci perfúze mikrovaskulárního řečiště u pacientů s diabetem 1. typu.

Důvod, proč jsme během clampu nezaznamenali významnou korelaci mezi inzulinémií a parametry MVR také na předloktí, spočívá pravděpodobně v rozdílech kapilárního řečiště v obou místech. Kapilární řečiště na předloktí na rozdíl od řečiště na břišku prstu neobsahuje tolik AV zkratů a není tak husté (64). Řečiště mikrocirkulace na prstu v papilárním typu kůže je spíše funkční než nutriční. Bazální perfúze v této lokalitě je obvykle několikanásobně vyšší než na ostatních místech těla, proto je snazší prokázat vazodilatační působení inzulinu sondou umístěnou na prstu.

Při kontrolním vyšetření jsme nepozorovali žádné významné změny v parametrech MVR.

Dlouhodobá hyperglykémie je příčinou mnoha změn v biochemických procesech organismu. Ovlivňuje oxidační stres, hemokoagulaci, fibrinolýzu a syntézu cytoadhezivních molekul (19, 82, 169, 170). Vyšetření biochemických parametrů během

a po clampu však neprokázalo významné změny v těchto sledovaných parametrech. Domníváme se, že rychle navozená hyperglykémie po relativně krátkou dobu tří hodin není dostatečná k vyvolání významných změn v námi stanovených parametrech oxidačního stresu, hemokoagulace a cytoadhezivních molekul (171). Významný pokles koncentrací cytoadhezivních molekul, stejně jako parametrů lipidogramu, byl pravděpodobně nespecifický, způsobený hemodilucí při významné cirkulační zátěži během clampu. K poklesu koncentrace uvedených parametrů došlo také při kontrolním vyšetření. Tento nespecifický vliv objemové zátěže nebyl překvapující, neboť přivod většího množství tekutin do tělesného oběhu s metodou clampu neoddělitelně souvisí.

Hyperglykémie ovlivňuje hemokoagulaci a fibrinolýzu u pacientů s diabetem (172) i u zdravých osob (173, 174). Tyto procesy úzce souvisí s endotelovou dysfunkcí. V naší studii jsme pozorovali negativní vztah koncentrace plazmatického fibrinogenu a MVR vstupně před clampem. Překvapivě byla vyšší koncentrace P-selektinu, markeru aktivace krevních destiček (175), spojena s rychlejší vazodilatací při PORH na prstu i předloktí na konci clampu. Bohužel nemůžeme usuzovat, jestli to bylo v souvislosti s hyperglykemií, hyperinzulinémií nebo obojím.

Vliv inzulínu na rozvoj vaskulárních komplikací diabetu je nejasný. Koncentrace inzulínu se výrazně liší u jednotlivých typů diabetu i v závislosti na stadiu nemoci a je silně ovlivněna antidiabetickou léčbou. Tyto různé vlivy znesnadňují porozumění vztahu mezi koncentrací inzulínu a cévními komplikacemi. Ceriello *et al.* se ve své studii pokusil eliminovat vliv inzulínu u pacientů s diabetem 2. typu blokádou somatostatinem a prokázal negativní vliv zvýšené GV na vznik oxidačního stresu a funkci endotelu (121). Podobného výsledku dosáhl Monnier *et al.* bez blokády inzulínu s použitím kontinuální monitorace glykémie u pacientů s diabetem 2. typu (122). Nedávná studie stejného autora prokázala srovnatelnou úroveň oxidačního stresu u pacientů léčených inzulínem (s diabetem 1. i 2. typu), ale výrazně vyšší úroveň oxidačního stresu u pacientů léčených perorálními antidiabetiky (129). Tento výsledek by mohl potvrdit teorii o prospěšném působení inzulínu na faktory jako je oxidační stres a endotelová dysfunkce.

Změny mikrovaskulární reaktivity a funkce endotelu po standardní snídani u pacientů v časných stádiích diabetu 2. typu

U zdravých osob je hladina postprandiální glykémie určována řadou faktorů jako je čas podání jídla, množství jídla, obsah cukrů a tuků, inzulínová a glukagonová sekrece, rychlost vyprazdňování žaludku, rychlost absorpce živin v tenkém střevě a fyzická

aktivita před i po jídle (176). U pacientů s diabetem je postprandiální glykémie také determinována stupněm inzulínové deficience a inzulínové rezistence i přítomnou léčbou perorálními antidiabetiky nebo inzulínem (177, 178). Přítomnost inzulínové rezistence zcela mění kvalitu a kvantitu postprandiálního stavu, dochází k výraznějším vzestupům glykémie po jídle a k protrahovanému trvání těchto zvýšených hodnot. Patologicky zvýšené hladiny glykémie po jídle jsou významným rizikovým faktorem vzniku kardiovaskulárních komplikací (121, 133). Je známo, že postprandiální stav je spojen se sníženou funkcí endotelu, zvýšeným oxidačním stresem, zvýšenou aktivitou koagulačního systému a sklonem k vazokonstrikci (135, 137). Proto jsme v naší studii u pacientů s diabetem 2. typu předpokládali po příjmu potravy snížení MVR. Mimo uvedených faktorů je MVR v postprandiálním stavu ovlivněna ještě mnoha dalšími parametry (179). Nezanedbatelný vliv má redistribuce krve z periferie do splanchniku, která může způsobit mírnou periferní vazokonstrikci. Vliv příjmu potravy na MVR a postprandiální procesy v mikrovaskulárním řečišti dosud nebyly plně objasněny (136). V naší studii jsme u pacientů s diabetem pozorovali nižší hodnoty perfúze i snížené dynamické parametry MVR nalačno i v průběhu celého testu ve srovnání s kontrolní skupinou. Podle očekávání došlo postprandiálně u pacientů s diabetem, ale nikoliv u kontrol, k významnému poklesu některých parametrů MVR. Tyto výsledky jsou ve shodě s výsledky studie autorů Neri *et al.* (180), ve které bylo k hodnocení postprandiálního stavu mikrocirkulace využito metody FMD.

Výsledky naší studie naznačují, že i v postprandiálním stavu hraje významnou úlohu inzulinémie. Inzulin má kromě řady metabolických účinků i významný vliv na endotel a hladkou svalovinu v cévní stěně. Je důležitým stimulatorem tvorby NO v endotelu, což vede k vazodilataci a zvýšení kapilární perfúze. Za fyziologických podmínek vede stimulace tvorby NO inzulínem k udržení rovnováhy mezi vazodilatací a vazokonstrikcí. Při inzulínové rezistenci však dochází vlivem rozdílné signální cesty inzulínu spíše k vazokonstrikci (*obr. 12*) a zvyšuje se tak riziko rozvoje endotelové dysfunkce a aterosklerotických změn (181, 182). Podle očekávání došlo u pacientů s diabetem i u kontrolní skupiny k postprandiálnímu vzestupu inzulinémie a jejímu následnému poklesu k původním hodnotám. Překvapivě nebyl mezi oběma skupinami v koncentraci inzulínu prokázán významný rozdíl. Navzdory tomuto faktu jsme pouze u pacientů s diabetem pozorovali v 60. minutě testu několik významných korelací mezi parametry MVR a inzulinémií. Koncentrace inzulínu u diabetiků pozitivně korelovala s bazálním

průtokem a s maximální hodnotou perfúze při PORH na prstu a negativně korelovala s PORH%.

Souvislost koncentrace inzulinu a MVR dokladuje vazodilatační vliv inzulinu na mikrovaskulární řečiště. Pacienti s nejvyšší inzulinémií měli v 60. minutě testu nejvyšší bazální perfúzi a zároveň i nejvyšší absolutní hodnotu perfúze při PORH na prstu. Negativní korelace inzulinémie a procentuálního (relativního) vzestupu perfúze je dána matematickým výpočtem tohoto parametru (PORH%), který je vypočítáván jako $PORH_{max}/bazál$. Proto mají pacienti s nejvyšší bazální perfúzí relativně nejnižší vzestup perfúze v průběhu testu PORH. Již bazální perfúze je sama o sobě vysoká a je tudíž snižená vazodilatační rezerva pro další navýšení perfúze po stimulačním testu.

Se vzestupem inzulinémie po příjmu potravy může souviset také pokles PAI-1, který jsme pozorovali ve skupině pacientů s diabetem i u kontrol ve 180. minutě postprandiálně. Je prokázáno, že infúze malé dávky inzulinu s 5% glukózou obézním osobám snižuje tvorbu reaktivních forem kyslíku a snižuje plazmatickou koncentraci ICAM-1, MCP-1 a PAI-1 (183). Domníváme se proto, že zvýšená hladina inzulinu postprandiálně může tímto způsobem příznivě ovlivňovat potravou způsobený prokoagulační stav. Ve skupině pacientů s diabetem, nikoliv však u kontrol, jsme pozorovali významný pokles hodnoty t-PA ve 180. minutě postprandiálně. Tento výsledek může svědčit pro výraznější alteraci funkce endotelu postprandiálně u pacientů s diabetem proti osobám bez diabetu, neboť snížená produkce t-PA s endotelovou dysfunkcí souvisí (50, 51).

Jak již bylo uvedeno, je u pacientů s diabetem zvýšená postprandiální glykémie a lipémie spojena se zvýšeným oxidačním stresem (179). Významně vyšší hladiny MDA nalačno i postprandiálně u pacientů s diabetem ve srovnání s kontrolami v naší studii pravděpodobně souvisí se zvýšeným oxidačním stresem přítomným u tohoto metabolického onemocnění bez závislosti na příjmu potravy, neboť MDA je významný marker oxidčního stresu (184). Míra oxidčního stresu je však závislá na složení přijaté potravy. V podobně navržené studii, ve které byla podána snídane s větším podílem tuků, byl u pacientů s diabetem pozorován signifikantní vzestup TG, VCAM-1 a CRP (180). V naší studii jsme u pacientů s diabetem i u kontrol pozorovali pouze postprandiální vzestup TG, statisticky významný byl však pouze v kontrolní skupině a to pravděpodobně z důvodu nižší hodnoty TG u kontrol bazálně. Ostatní parametry lipidogramu i koncentrace cytoadhezivních molekul postprandiálně překvapivě klesaly.

Domníváme se, že důvodem mohla být hemodiluce způsobená příjmem tekutin během snídane.

Významný rozdíl v koncentraci TC mezi pacienty s diabetem a kontrolní skupinou nalačno mohl pravděpodobně ovlivnit bazální i následnou postprandiální MVR, neboť koncentrace lipidů MVR ovlivňuje (185, 186). Rozdíly v parametrech lipidogramu mezi pacienty s diabetem a kontrolní skupinou byly patrně způsobeny dosud nediodagnostikovanou či nedostatečně léčenou dyslipidemií v kontrolní skupině.

Několik významných korelací bylo nalezeno u pacientů s diabetem i u kontrolní skupiny mezi parametry MVR a oxidačním stresem, hodnoceným podle koncentrace MDA a KD. Souvislost postprandiálního stavu se zvýšenou dispozicí k zánětu se nám nepodařilo prokázat, navzdory našemu očekávání nedošlo po jídle ani u jedné skupiny k vzestupu CRP. Můžeme se domnívat, že postprandiální vzestup inzulinémie by mohl díky protizánětlivému působení inzulinu (187, 188) působit u pacientů s diabetem i u zdravých osob protektivně.

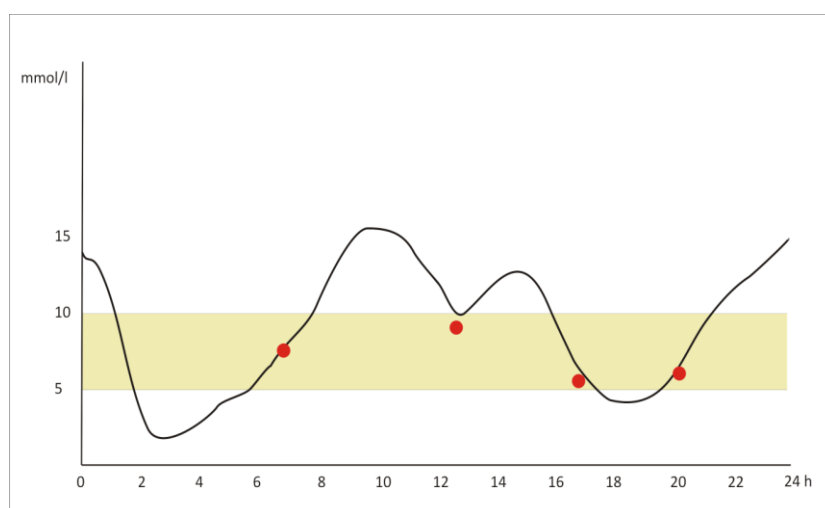
Parametry glykemické variability a jejich vztah ke kompenzaci diabetu a mikrovaskulární reaktivitě u pacientů s diabetem 1. typu léčených inzulinovou pumpou

Bez ohledu na patofyziologické mechanismy je pro klinickou praxi nejdůležitější otázka, zda GV ovlivňuje morbiditu a mortalitu pacientů s DM. V naší studii jsme zjistili statisticky významnou souvislost mezi průměrnou glykemií, SDBG, indexem hyperglykémie HBGI a hodnotami HbA_{1C}. Z těchto výsledků můžeme usuzovat, že kompenzace diabetu s glykemickou variabilitou úzce souvisí.

Standardní odchylku glykémie (SDBG) jsme ve studii použili jako hlavní parametr k hodnocení GV, neboť představuje nejjednodušší a nejpoužívanější metodu výpočtu GV (145). Dále jsme hodnotili odhad rizika hyperglykémie HBGI a odhad rizika hypoglykémie LBGI, i když podle studie Kovatcheva *et al.* (143) je k hodnocení těchto výkyvů glykémie vhodnější a citlivější parametr ADRR (average daily risk range). Tento parametr je prediktorem hypo- i hyperglykemií a k jeho výpočtu není potřeba normální distribuce hodnot glykémie. Kombinuje současně HBGI a LBGI, které samostatně nejsou citlivé k opačnému výkyvu glykémie. Nevýhodou tohoto parametru je potřeba dostatečného počtu dní s četností měření ≥ 3 /den, což nebyl případ naší studie, ve které byla průměrná frekvence měření pouze 2-3x denně.

V naší studii jsme nepozorovali žádný statisticky významný vztah mezi parametry GV a parametry léčby inzulinem pomocí inzulinové pumpy. Tento výsledek se neshoduje s výsledky studií, ve kterých častější podávání menších bolusových dávek vedlo ke snížení GV u pacientů s diabetem 1. typu (148, 149).

Dále jsme v naší studii neprokázali významný vztah mezi GV a mikroalbuminurií. Korelace nebyla nalezena ani mezi parametry GV a mikrovaskulární reaktivitou. Tyto výsledky se shodují se závěry studie DCCT, ve které nebyla prokázána souvislost zvýšené GV s rizikem rozvoje diabetických vaskulárních komplikací u pacientů s diabetem 1. typu (114, 115). Stejně jako v jiných, podobně zaměřených studiích (109-111), však byly ve studii DCCT k hodnocení GV použity pouze 5-7 bodové křivky GV měřené s odstupem několika měsíců. Takovýto výpočet GV z klasického glykemického profilu může být nepřesný (145), neboť k řadě poklesů a vzestupů glykémie dojde mezi měřeními bez povšimnutí (*obr. 21*) (189).



Obrázek 21. Schéma jednodenního záznamu kontinuální monitorace glykémie. Čtyři body označují glykémii zjištěnou glukometrem, řada poklesů a vzestupů glykémie tak může být nezachycena (převzato z firemních materiálů společnosti Dexcom, www.aimport.cz).

Další zajímavou studii na téma vztahu cévních komplikací a GV u pacientů s diabetem 1. typu publikoval Bragd *et al.* (113). GV zde byla rovněž vypočítána ze standardního selfmonitoringu glykemií. Výskyt mikrovaskulárních komplikací včetně periferní neuropatie byl hodnocen po dobu jedenácti let. Studie prokázala pozitivní korelaci mezi výskytem periferní neuropatie a GV vyjádřenou pomocí SDBG. Je tedy možné, že

periferní nervový systém by mohl být vůči GV citlivější (189). Tyto závěry však nebyly potvrzeny další retrospektivní analýzou dat studie DCCT (115).

V roce 2011 byla publikována studie, ve které byla hodnocena souvislost GV s přítomností a závažností ischemické choroby srdeční u pacientů s DM 2. typu (190). GV zde byla vypočítána z dat kontinuální monitorace. V této studii se ukázalo, že pacienti s ischemickou chorobou srdeční měli signifikantně vyšší GV a také závažnost postižení koronárního řečiště stoupala s mírou GV. Mezi oběma skupinami přitom nebyly pozorovány signifikantní rozdíly v hodnotě HbA_{1c} a hodnotách glykémie nalačno. Výsledky této studie tedy ukazují na možnou souvislost GV s přítomností a mírou aterosklerotických změn.

Na základě našich výsledků a na základě dat z dostupných studií se tedy domníváme, že k přesnějšímu zhodnocení vztahu GV a diabetických cévních komplikací je nutno získat podrobnější údaje o exkurzích glykémie během dne, a to buď intenzivnějším selfmonitoringem, nebo ideálně kontinuální monitorací glykémie (145).

Naše studie byla pilotní, měla ověřit koncept výzkumu zaměřeného na glykemickou variabilitu. Její limitací byl nízký počet zahrnutých pacientů daný vstupními podmínkami (DM 1. typu, terapie inzulinovou pumpou Accu-Chek Spirit), často nekvalitní selfmonitoring glykemií vycházející z reálného testování pacientem a s tím související omezená výpovědní hodnota dat. Negativní výsledek této pilotní studie vedl ke změně metodiky výzkumu GV, k němuž nyní na našem pracovišti používáme hlavně kontinuální monitoraci glykémie.

7. Shrnutí výsledků práce

Ve studii zabývající se MVR a funkcí endotelu u pacientů s Cushingovým syndromem jsme u nemocných s hyperkortizolémií zjistili:

- zvýšený výskyt přidružených onemocnění (arteriální hypertenze, diabetes mellitus, dyslipidémie)
- pokles výskytu těchto přidružených onemocnění po úspěšné operační léčbě
- inzulinovou rezistenci
- porušený proces fibrinolýzy
- zvýšený oxidační stres
- endotelovou dysfunkci
- **sníženou MVR, která dosud u pacientů s Cushingovým syndromem nebyla popsána**
- **přetrvání snížené MVR i po úspěšné operační léčbě**
- **MVR byla patrně nejvíce ovlivněna přítomností arteriální hypertenze**
- **MVR byla nejvíce snížena u pacientů, kteří měli současně arteriální hypertenzi a diabetes mellitus**

Ve studii vlivu rychle navozené hyperglykémie během hyperinzulinemického clampu na MVR a funkci endotelu u pacientů s diabetem 1. typu jsme zjistili následující poznatky:

- **pozorovali jsme rychlejší mikrovaskulární vazodilataci v izoglykemické fázi clampu, při které jsme navodili pouze hyperinzulinémií**
- **rychlejší mikrovaskulární vazodilatace přetrvávala i v hyperglykemické fázi clampu a patrně nebyla ovlivněna rychlým vzestupem glykémie**
- **inzulin má pravděpodobně významný vliv na regulaci MVR díky vazodilatačnímu efektu**
- během clampu nedošlo ke změnám v biochemických parametrech oxidačního stresu a endotelové dysfunkce způsobeným rychle navozenou hyperglykemií
- nenalezli jsme souvislost mezi parametry inzulinové senzitivity a MVR
- kontrolní clampové vyšetření nám poskytlo důležitou informaci o nespecifických změnách při použití metody clampu (např. vliv objemové zátěže, hemodiluce)

Ve studii zabývající se vlivem příjmu potravy na MVR a funkci endotelu u pacientů s recentně zjištěným diabetem 2. typu jsme zjistili:

- pacienti s diabetem měli i přes užívání antidiabetické terapie metforminem vyšší bazální i postprandiální glykémie ve srovnání s kontrolní skupinou
- inzulinémie byla u pacientů s diabetem bazálně i postprandiálně pouze nevýznamně vyšší ve srovnání s kontrolní skupinou
- pacienti s diabetem měli bazálně i postprandiálně vyšší hladiny MDA, což může svědčit o zvýšeném oxidačním stresu
- v parametrech lipidogramu a cytoadhezivních molekul došlo postprandiálně v obou skupinách k poklesu, pravděpodobně vlivem hemodiluce
- **nalezli jsme několik korelací mezi MVR a cytoadhezivními molekulami (E- a P-selektinem, ICAM-1) i parametry oxidačního stresu (MDA, KD)**
- **bazální perfúze na prstu u pacientů s diabetem postprandiálně klesala a na konci testu byla významně nižší než u kontrol, v kontrolní skupině k poklesu bazální perfúze nedošlo**
- **maximální perfúze na prstu při PORH u pacientů s diabetem (nikoliv u kontrol) postprandiálně klesala a byla ve všech fázích testu významně nižší ve srovnání s kontrolami**
- **dynamický parametr MVR (rychlost vzestupu perfúze při PORH na prstu) byl u pacientů s diabetem významně nižší ve srovnání s kontrolami po celou dobu testu a významněji se v průběhu testu neměnil**
- **MVR je v postprandiálním stavu u pacientů s diabetem pravděpodobně ovlivněna inzulinémií a inzulinovou rezistencí**

Ve studii porovnávající parametry glykemické variability s kompenzací diabetu a MVR u pacientů s diabetem 1. typu léčených inzulinovou pumpou jsme zjistili:

- pozitivní korelace mezi HbA_{1C} a indexem HBGI a mezi HbA_{1C} a SDBG, což ukazuje na možnou souvislost GV a kompenzace diabetu
- neprokázali jsme významnou souvislost mezi parametry GV a parametry léčby inzulinem
- **neprokázali jsme významnou souvislost mezi parametry GV a MVR**
- **výpočet GV z běžného (mnohdy nedostatečného) selfmonitoringu nemusí poskytovat dostatek informací o skutečné míře glykemické variability**

8. Závěr

Provedli jsme čtyři odlišné studie MVR a funkce endotelu u pacientů s metabolickými a endokrinními poruchami. V jednotlivých studiích jsme pozorovali různé změny MVR v souvislosti se základním onemocněním a s experimentálně provedenými stimulačními testy. Změny MVR, které jsme pozorovali, byly patrně způsobeny více faktory, nikoliv pouze základní metabolickou či endokrinní poruchou, ale souborem všech působících přidružených onemocnění a odchylek, které se základním onemocněním souvisí. Tyto faktory mohou být navíc navzájem úzce propojeny a mohou se navzájem ovlivňovat.

Jedním z hlavních přínosů této práce je zjištění, že kromě již známých faktorů je MVR pravděpodobně výrazně ovlivněna inzulinémií a patrně i inzulinovou rezistencí. Domníváme se, že bychom měli při hodnocení MVR a funkce endotelu u metabolických a endokrinních onemocnění v budoucnu přihlížet také k inzulinémii, sekreční kapacitě B-buněk pankreatu (tedy zvýšené či snížené produkci inzulinu), citlivosti na inzulin či případné léčbě inzulinem.

Limitací této práce je kromě malých souborů pacientů, daných nízkým výskytem určitého onemocnění, vstupními kritérii či náročností prováděného vyšetření, také rozporuplnost dosavadních znalostí o MVR a funkci endotelu. Vzhledem k aktuálnosti tématu nejsou dosud zcela jasné a studii podložené souvislosti endotelové dysfunkce a MVR s rozvojem cévních komplikací. Uvedené vyšetřovací metody nejsou zatím až na výjimky v praxi rutinně používány a neexistuje jednotná a standardizovaná diagnostika, proto jsou data získaná pomocí současně využívaných vyšetřovacích metod obtížně hodnotitelná a srovnatelná.

Data o možnostech účinné terapeutické intervence endotelové dysfunkce a MVR jsou rovněž omezená. Vzhledem k souvislosti poškození MVR a funkce endotelu tíží a trváním metabolické či endokrinní poruchy by však mělo být hlavní intervencí dostatečně kompenzovat základní onemocnění či odchylky v metabolismu, které jsou s ním spojené. Včasnou léčbou je tak pravděpodobně možné zabránit vzniku a rozvoji závažných cévních komplikací nebo alespoň zpomalit jejich progresi.

V této práci zároveň uvádím některé vyšetřovací metody či směry, které v budoucnu diagnostiku i další výzkum funkce endotelu a MVR pravděpodobně ovlivní. Velkou výhodou v této oblasti bude možnost využití moderních technologií, zdokonalování diagnostiky, výzkum nových markerů endotelové dysfunkce a poznatky o dalších faktorech, které mají na mikrocirkulaci vliv.

9. Literatura

1. Wiernsperger, N., Nivoit, P., De Aguiar, L.G. et al. *Microcirculation and the metabolic syndrome*. *Microcirculation*, 2007. **14**(4-5): 403-438.
2. Stapleton, P.A., Goodwill, A.G., James, M.E. et al. *Hypercholesterolemia and microvascular dysfunction: interventional strategies*. *J Inflamm*, 2010. **18**(7): 54.
3. Zaane, van B., Reuwer, A.Q., Büller, H.R. et al. *Hormones and cardiovascular disease: a shift in paradigm with clinical consequences?* *Semin Thromb Hemost*, 2009. **35**(5): 478-487.
4. Boero, L., Manavela, M., Gómez, R.L. et al. *Alterations in biomarkers of cardiovascular disease (CVD) in active acromegaly*. *Clin Endocrinol*, 2009. **70**(1): 88-95.
5. Yiu, K.H., Marsan, N.A., Delgado, V. et al. *Increased myocardial fibrosis and left ventricular dysfunction in Cushing's syndrome*. *Eur J Endocrinol*, 2012. **166**(1): 27-34.
6. Clark, D., Ahmed, M.I., Calhoun, D.A. *Resistant hypertension and aldosterone: an update*. *Can J Cardiol*, 2012. **28**(3): 318-325.
7. Funk, S.D., Yurdagul, A., Orr, A.W. *Hyperglycemia and endothelial dysfunction in atherosclerosis: lessons from type 1 diabetes*. *Int J Vasc Med*, 2012. 569654.
8. Lobato, N.S., Filgueira, F.P., Akamine, E.H. et al. *Mechanisms of endothelial dysfunction in obesity-associated hypertension*. *Braz J Med Biol Res*, 2012. **45**(5): 392-400.
9. Esper, R.J., Nordaby, R.A., Vilariño, J.O. et al. *Endothelial dysfunction: a comprehensive appraisal*. *Cardiovasc Diabetol*, 2006. **5**: 4.
10. Verma, S., Buchanan, M.R., Anderson, T.J. *Endothelial function testing as a biomarker of vascular disease*. *Circulation*, 2003. **108**(17): 2054-2059.
11. Zhang, H., Dellsperger, K.C., Zhang, C. *The link between metabolic abnormalities and endothelial dysfunction in type 2 diabetes: an update*. *Basic Res Cardiol*, 2012. **107**(1): 237.
12. Karásek, D., Vaverková, H., Halenka, M. et al. *Endoteliální dysfunkce, možnosti její detekce a využití v klinické praxi*. *Interní medicína pro praxi*, 2004. **9**: 450-453.
13. Veselý, J. *Dysfunkce endotelu*, Ústav patologické fyziologie LF UP v Olomouci, 2012. Online na <http://pfyziolffup.upol.cz/castwiki2/?p=1456>.
14. Matough, F.A., Budin, S.B., Hamid, Z.A. et al. *The role of oxidative stress and antioxidants in diabetic complications*. *Sultan Qaboos Univ Med J*, 2012. **12**(1): 5-18.
15. Veselý, J. *Ischemická choroba srdeční*, Ústav patologické fyziologie LF UP v Olomouci, 2012. Online na <http://pfyziolffup.upol.cz/castwiki2/?p=1037>.
16. Del Turco, S., Basta, G. *An update on advanced glycation endproducts and atherosclerosis*. *Biofactors*, 2012. 10.1002/biof.1018.
17. Lyons, T.J., Basu, A. *Biomarkers in diabetes: hemoglobin A1c, vascular and tissue markers*. *Transl Res*, 2012. **159**(4): 303-312.
18. Pangare, M., Makino, A. *Mitochondrial function in vascular endothelial cell in diabetes*. *J Smooth Muscle Res*, 2012. **48**(1): 1-26.
19. Škrha, J. *Diabetes and vascular disease: From pathogenesis to treatment. Are vascular effects of hypoglycemic and hypolipidemic drugs independent of their metabolic effects?* *Diabetes and metabolic syndrome* 2007. **1**: 61-69.
20. Schleicher, E., Friess, U. *Oxidative stress, AGE, and atherosclerosis*. *Kidney Int Suppl*, 2007. **106**: 17-26.

21. Škrha, J. *Oxidační stres a jeho vztah ke komplikacím diabetu*, Interní medicína pro praxi, 2010. 12(9):414-418.
22. Li, L., Chen, W., Rezvan, A. et al. *Tetrahydrobiopterin deficiency and nitric oxide synthase uncoupling contribute to atherosclerosis induced by disturbed flow*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011. **31**(7): 1547-1554.
23. Hamilton, S.J., Chew, G.T., Watts, G.F. *Therapeutic regulation of endothelial dysfunction in type 2 diabetes mellitus*. Diab Vasc Dis Res, 2007. **4**(2): 89-102.
24. Pernow, J., Shemyakin, A., Böhm, F. *New perspectives on endothelin-1 in atherosclerosis and diabetes mellitus*. Life Sci, 2012. [Epub ahead of print].
25. Touyz, R.M. *Reactive oxygen species and angiotensin II signaling in vascular cells – implications in cardiovascular disease*. Braz J Med Biol Res, 2004. **37**(8): 1263-1273.
26. Kanikowska, D., Sugenoja, J., Sato, M. et al. *Influence of season on plasma antidiuretic hormone, angiotensin II, aldosterone and plasma renin activity in young volunteers*. Int J Biometeorol, 2010. **54**(3): 243-248.
27. Takei, A., Huang, Y., Lopes-Virella, M.F. *Expression of adhesion molecules by human endothelial cells exposed to oxidized low density lipoprotein. Influences of degree of oxidation and location of oxidized LDL*. Atherosclerosis, 2001. **154**(1): 79-86.
28. Tomečková, M. *Ateroskleróza*, Ústav informatiky AV ČR, 2011. Online na <http://pfyziol.fup.upol.cz/castwiki2/?p=1449>.
29. Wu, H.D., Berglund, L., Dimayuga, C. et al. *High Lipoprotein(a) levels and small Apolipoprotein(a) sizes are associated with endothelial dysfunction in a multiethnic cohort*. J Am Coll Cardiol, 2004. **43**(10): 1828-1833.
30. Stühlinger, M.C., Abbasi, F., Chu, J.W. et al. *Relationship between insulin resistance and an endogenous nitric oxide synthase inhibitor*. JAMA, 2002. **287**(11): 1420-1426.
31. Mizia-Stec, K. *Cytokines and adhesive molecules in detection of endothelial dysfunction*. Pharmacol Rep, 2006. **58**(Suppl): 21-32.
32. Rosolová, H., Petřlová, B. *Kouření jako rizikový faktor kardiovaskulárních onemocnění – možnosti terapie*. Postgraduální medicína, 2008. **4**: 77.
33. Reaven, G., Tsao, P.S. *Insulin resistance and compensatory hyperinsulinemia: the key player between cigarette smoking and cardiovascular disease?* J Am Coll Cardiol, 2003. **41**(6): 1044-1047.
34. Kuppaswamy, V.C., Gupta, S. *Antibiotic therapy for coronary heart disease: the myth and the reality*. Timely Top Med Cardiovasc Dis, 2006. **10**: E2.
35. Scannapieco, F.A. *Periodontal inflammation: from gingivitis to systemic disease?* Compend Contin Educ Dent, 2004. **25**(7, Suppl 1): 16-25.
36. Kozarov, E. *Bacterial invasion of vascular cell types: vascular infectology and atherogenesis*. Future Cardiol, 2012. **8**(1): 123-138.
37. Boushey, C.J., Beresford, S.A.A., Omenn, G.S. et al. *A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes*. JAMA, 1995. **274**: 1049.
38. Hankey, J.G., Eikelboom, J.W. *Homocysteine and vascular disease*. Lancet, 1999. **354**: 407.
39. Moat, S.J., Lang, D., McDowell, I.F.W. et al. *Folate, homocysteine, endothelial function and cardiovascular disease*. Journal of Nutritional Biochemistry, 2004. **15**: 64-79.
40. Hoffman, M. *Hypothesis: hyperhomocysteinemia is an indicator of oxidant stress*. Med Hypotheses, 2011. **77**(6): 1088-1093.

41. Tabruyn, S.P., Griffioen, A.W. *NF-kappaB: a new player in angiostatic therapy*. *Angiogenesis*, 2008. **11**(1): 101-106.
42. Zeng, L., Webster, S.V., Newton, P.M. *The biology of protein kinase C*. *Adv Exp Med Biol*, 2012. **740**: 639-661.
43. Škrha, J. *Umožní poznání patogeneze účinnější prevenci a léčbu chronických komplikací diabetu?* 2007. Online na <http://zdravi.e15.cz/clanek/postgradualni-medicina-priloha/korekce-hyperglykemie-v-prevenci-a-lecbe-kardiovaskularnich-komp-422567>.
44. Malý, M., Vojáček, J., Hraboš, V. et al. *Tissue factor, tissue factor pathway inhibitor and cytoadhesive molecules in patients with an acute coronary syndrome*. *Physiol Res*, 2003. **52**(6): 719-728.
45. Cook-Mills, J.M., Deem, T.L. *Active participation of endothelial cells in inflammation*. *J Leukoc Biol*, 2005. **77**(4): 487-495.
46. Veselý, J. *Dysfunkce endotelu*, Ústav patologické fyziologie LF UP v Olomouci, 2012. Online na <http://pfyziolffup.upol.cz/castwiki2/?p=1456>.
47. Kohler, H.P. *Insulin resistance syndrome: interaction with coagulation and fibrinolysis*. *Swiss Med Wkly*, 2002. **132**(19-20): 241-252.
48. Lenting, P.J., Pegon, J.N., Groot, E. et al. *Regulation of von Willebrand factor-platelet interactions*. *Thromb Haemost*, 2010. **104**(3): 449-455.
49. Sørensen, B., Tang, M., Larsen, O.H. et al. *The role of fibrinogen: a new paradigm in the treatment of coagulopathic bleeding*. *Thromb Res*, 2011. **128**(Suppl 1): 13-16.
50. Gebbink, M.F. *Tissue-type plasminogen activator-mediated plasminogen activation and contact activation, implications in and beyond haemostasis*. *J Thromb Haemost*, 2011. **9**(Suppl 1): 174-181.
51. Duvnjak, L., Duvnjak, M. *The metabolic syndrome - an ongoing story*. *J Physiol Pharmacol*, 2009. **60**(Suppl 7): 19-24.
52. Brown, M.D., Fearheller, D.L., Thakkar, S. et al. *Racial differences in tumor necrosis factor- α -induced endothelial microparticles and interleukin-6 production*. *Vasc Health Risk Manag*, 2011. **7**: 541-550.
53. Jimenez, J.J., Jy, W., Mauro, L.M. et al. *Endothelial microparticles (EMP) as vascular disease markers*. *Adv Clin Chem*, 2005. **39**: 131-157.
54. Martínez, M.C., Tesse, A., Zobairi, F. et al. *Shed membrane microparticles from circulating and vascular cells in regulating vascular function*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005. **288**(3): 1004-1009.
55. Wiernsperger, N.F. *In defense of microvascular constriction in diabetes*. *Clin Hemorheol Microcirc*, 2001. **25**(2): 55-62.
56. *Obrazová dokumentace střední zdravotnické školy Tábor*. Online na http://www.szs-tabor.cz/Projekt/projekt/som/Obrazovy_pruvodce/tema/t07/obsah.htm.
57. Triggle, C.R., Ding, H., Anderson, T.J. et al. *The endothelium in health and disease: a discussion of the contribution of non-nitric oxide endothelium-derived vasoactive mediators to vascular homeostasis in normal vessels and in type II diabetes*. *Mol Cell Biochem*, 2004. **263**(1-2): 21-27.
58. Grey, E., Bratteli, C., Glasser, S.P. et al. *Reduced small artery but not large artery elasticity is an independent risk marker for cardiovascular events*. *Am J Hypertens*, 2003. **16**(4): 265-269.
59. Wiernsperger, N., Nivoit, P., Bouskela, E. *Microcirculation in obesity: an unexplored domain*. *An Acad Bras Cienc*, 2007. **79**(4): 617-638.

60. Pradhan, R.K., Chakravarthy, V.S. *Informational dynamics of vasomotion in microvascular networks: a review*. Acta Physiol (Oxf), 2011. **201**(2): 193-218.
61. Fagrell, B., Intaglietta, M. *Microcirculation: its significance in clinical and molecular medicine*. J Intern Med, 1997. **241**(5): 349-362.
62. Jörneskog, G. *Why critical limb ischemia criteria are not applicable to diabetic foot and what the consequences are*. Scand J Surg, 2012. **101**(2): 114-118.
63. Midttun, M., Sejrsen, P., Paaske, W.P. *Blood flow rate during orthostatic pressure changes in the pulp skin of the first toe*. Eur J Vasc Endovasc Surg, 1997. **13**(3): 278-284.
64. Freccero, C., Holmlund, F., Bornmyr, S. et al. *Laser Doppler perfusion monitoring of skin blood flow at different depths in finger and arm upon local heating*. Microvascular Research, 2003. **66**(3): 183-189.
65. Chaudhuri, A. *Vascular reactivity in diabetes mellitus*. Curr Diab Rep, 2002. **2**(4): 305-310.
66. Kelm, M. *Flow-mediated dilatation in human circulation: diagnostic and therapeutic aspects* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002. **282**(1): 1-5.
67. Soedamah-Muthu, S.S., Chaturvedi, N., Schalkwijk, C.G. et al. *Soluble vascular cell adhesion molecule-1 and soluble E-selectin are associated with micro- and macrovascular complications in Type 1 diabetic patients*. J Diabetes Complications, 2006. **20**(3): 188-195.
68. Thomas, G., Sehgal, A.R., Kashyap, S.R. et al. *Metabolic syndrome and kidney disease: a systematic review and meta-analysis*. Clin J Am Soc Nephrol, 2011. **6**(10): 2364-2373.
69. Redon, J., Martinez, F. *Microalbuminuria as Surrogate Endpoint in Therapeutic Trials*. Curr Hypertens Rep, 2012. [Epub ahead of print].
70. Celermajer, D.S., Sorensen, K.E., Gooch, V.M. et al. *Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis*. Lancet, 1992. **340**(8828): 1111-1115.
71. Lekakis, J., Abraham, P., Balbarini, A. et al. *Methods for evaluating endothelial function: a position statement from the European Society of Cardiology Working Group on Peripheral Circulation*. Eur J Cardiovasc Prev Rehabil, 2011. **18**(6): 775-789.
72. Lane, H.A., Smith, J.C., Davies, J.S. *Noninvasive assessment of preclinical atherosclerosis*. Vascular Health and Risk Management, 2006. **2**(1): 19-30.
73. Tomášková, I., Souček, R. *Pletysmografie, využití v cévní diagnostice*, Interní kardiologická klinika FN Brno, 2010. Online na <http://zdravi.e15.cz/clanek/priloha-lekarske-listy/pletysmografie-vyuziti-v-cevni-diagnostice-451205>.
74. Yvonne-Tee, G.B., Rasool, A.H., Halim, A.S. et al. *Noninvasive assessment of cutaneous vascular function in vivo using capillaroscopy, plethysmography and laser-Doppler instruments: its strengths and weaknesses*. Clin Hemorheol Microcirc, 2006. **34**(4): 457-473.
75. Prázný, M. *Vyšetření kožní mikrocirkulace laser-Dopplerem při diabetes mellitus a při deficitu růstového hormonu*. Kandidátská dizertační práce, 1. LF UK v Praze, 2001, 6-13.
76. Cooke, J.P., Tsao, P.S. *Go with the flow*. Circulation, 2001. **103**(23): 2773-2775.
77. Gooding, K.M., Hannemann, M.M., Tooke, J.E. et al. *Maximum skin hyperaemia induced by local heating: possible mechanisms*. J Vasc Res, 2006. **43**(3): 270-277.
78. Awan, Z.A., Wester, T., Kvernebo, K. *Human microvascular imaging: a review of skin and tongue videomicroscopy techniques and analysing variables*. Clin Physiol Funct Imaging, 2010. **30**(2): 79-88.

79. Shore, A.C. *Capillaroscopy and the measurement of capillary pressure*. Br J Clin Pharmacol, 2000. **50**(6): 501-513.
80. Poláková, I. *Klinická kapilaroskopie*, 2010. Online na <http://www.zdn.cz/clanek/postgradualni-medicina/klinicka-kapilaroskopie-448900>.
81. Eggleston, E.M., Jahn, L.A., Barrett, E.J. *Hyperinsulinemia rapidly increases human muscle microvascular perfusion but fails to increase muscle insulin clearance: evidence that a saturable process mediates muscle insulin uptake*. Diabetes, 2007. **56**(12): 2958-2963.
82. Škrha, J., Prázný, M., Haas, T. et al. *Comparison of laser-Doppler flowmetry with biochemical indicators of endothelial dysfunction related to early microangiopathy in Type 1 diabetic patients*. Journal of Diabetes and its Complications, 2001. **15**(5): 234-240.
83. Caballero, A.E., Arora, S., Saouaf, R. et al. *Microvascular and macrovascular reactivity is reduced in subjects at risk for type 2 diabetes*. Diabetes, 1999. **48**(9): 1856-1862.
84. Matsumoto, Y., Ohno, H., Noguchi, I. Et al. *Disturbance of microcirculation due to unhealthy lifestyle: Cause of type 2 diabetes*. Med Hypotheses, 2006. **66**(3): 550-553.
85. Yudkin, J.S., Eringa, E., Stehouwer, C.D. *"Vasocrine" signalling from perivascular fat: a mechanism linking insulin resistance to vascular disease*. Lancet, 2005. **365**(9473): 1817-1820.
86. Doronzo, G., Viretto, M., Russo, I. et al. *Nitric oxide activates PI3-K and MAPK signalling pathways in human and rat vascular smooth muscle cells: influence of insulin resistance and oxidative stress*. Atherosclerosis, 2011. **216**(1): 44-53.
87. Baron, A.D., Brechtel-Hook, G., Johnson, A. et al. *Effect of perfusion rate on the time course of insulin-mediated skeletal muscle glucose uptake*. Am J Physiol, 1996. **271**: 1067-1072.
88. Rattigan, S., Bussey, C.T., Ross, R.M. et al. *Obesity, insulin resistance, and capillary recruitment*. Microcirculation, 2007. **14**(4-5): 299-309.
89. Cardillo, C., Nambi, S.S., Kilcoyne, C.M. et al. *Insulin stimulates both endothelin and nitric oxide activity in the human forearm*. Circulation, 1999. **24**;100(8): 820-825.
90. Putnam, K., Shoemaker, R., Yiannikouris, F. et al. *The renin-angiotensin system: a target of and contributor to dyslipidemias, altered glucose homeostasis, and hypertension of the metabolic syndrome*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2012. **302**(6): 1219-1230.
91. Schulman, I.H., Zhou, M.S., Jaimes, E.A. et al. *Dissociation between metabolic and vascular insulin resistance in aging*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. **293**(1): 853-859.
92. Nigro, J., Osman, N., Dart, A.M. et al. *Insulin resistance and atherosclerosis*. Endocr Rev, 2006. **27**(3): 242-259.
93. Jörneskog, G., Brismar, K., Fagrell, B. *Skin capillary circulation severely impaired in toes of patients with IDDM, with and without late diabetic complications*. Diabetologia, 1995. **38**(4): 474-480.
94. Cisek, P.L., Eze, A.R., Comerota, A.J. et al. *Microcirculatory compensation to progressive atherosclerotic disease*. Ann Vasc Surg, 1997. **11**(1): 49-53.
95. Szabó, C., Zanchi, A., Komjáti, K. et al. *Poly(ADP-Ribose) polymerase is activated in subjects at risk of developing type 2 diabetes and is associated with impaired vascular reactivity*. Circulation, 2002. **106**(21): 2680-2686.

96. Laker, M.F. *Laboratory testing and biochemical analysis of hyperlipidaemias*. Postgrad Med J, 1993. **69**(Suppl 1): 12-17.
97. Matthews, D., Hosker, J., Rudenski, A. et al. *Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man*. Diabetologia, 1985. **28**: 412-419.
98. McCord, J., Fridovich, I. *Superoxide dismutase*. J Biol Chem, 1969. **244**: 6049-6055.
99. Yagi, H. *A simple fluorimetric assay for lipoperoxide in blood plasma*. Biochemical Medicine, 1976. **15**: 212-216.
100. Clauss, A. *A rapid physiological coagulation method for the determination of plasma fibrinogen*. Lancet, 1951. **2**: 501.
101. Škrha, J., Perušičová, J., Štolba, P. et al. *Comparison of N-acetyl-beta-glucosaminidase and albuminuria with clinical finding of microangiopathy in type I diabetes mellitus*. Clin Chim Acta, 1987. **166**: 135-141.
102. Etxabe, J., Vayquez, J. *Morbidity and mortality in Cushing's disease: an epidemiological approach*. Clin Endocrinol (Oxf), 1994. **40**: 479-484.
103. Mancini, T., Kola, B., Mantero, F. et al. *High cardiovascular risk in patients with Cushing's syndrome according to 1999 WHO/ISH guidelines*. Clinical Endocrinology, 2004. **61**: 768-777.
104. Colao, A., Pivonello, R., Spiezia, S. et al. *Persistence of Increased Cardiovascular Risk in Patients with Cushing's Disease after Five Years of Successful Cure*. J Clin Endocrinol Metab, 1999. **84**: 2664-2672.
105. Faggiano, A., Pivonello, R., Spiezia, S. et al. *Cardiovascular Risk Factors and Common Carotid Artery Caliber and Stiffness in Patients with Cushing's Disease during Active Disease and 1 Year after Disease Remission*. J Clin Endocrinol Metab, 2003. **88**: 2527-2533.
106. Obrazová dokumentace společnosti Cushings-help. Online na <http://www.cushings-help.com/family-letter.htm>.
107. Holman, R.R., Paul, S.K., Bethel, M.A. et al. *10-Year Follow-up of Intensive Glucose Control in Type 2 Diabetes*. The New England Journal of Medicine, 2008. **359**(15): 1577-1589.
108. Nathan, D.M., Cleary, P.A., Backlund, J.Y. et al. *Intensive diabetes treatment and cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes*. New England Journal of Medicine, 2005. **353**(25): 2643-2653.
109. Muggeo, M., Verlato, G., Bonora, E. et al. *Long-term Instability of Fasting Plasma Glucose, a Novel Predictor of Cardiovascular Mortality in Elderly Patients With Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus : The Verona Diabetes Study*. Circulation, 1997. **96**(6): 1750-1754.
110. Muggeo, M., Zoppini, G., Bonora, E. et al. *Fasting plasma glucose variability predicts 10-year survival of type 2 diabetic patients: the Verona Diabetes Study*. Diabetes Care, 2000. **23**(1): 45-50.
111. Gimeno-Orna, J.A., Castro-Alonso, F.J., Boned-Juliani, B. et al. *Fasting plasma glucose variability as a risk factor of retinopathy in Type 2 diabetic patients*. Journal of Diabetes and its Complications, 2003. **17**(2): 78-81.
112. Takao, T., Ide, T., Yanagisawa, H. et al. *The effect of fasting plasma glucose variability on the risk of retinopathy in type 2 diabetic patients: Retrospective long-term follow-up*. Diabetes Research and Clinical Practice, 2010. **89**(3): 296-302.
113. Bragd, J., Adamson, U., Bäcklund, L.B. et al. *Can glycaemic variability, as calculated from blood glucose self-monitoring, predict the development of*

- complications in type 1 diabetes over a decade?* Diabetes and Metabolism, 2008. **34**(6): 612-616.
114. Kilpatrick, E.S., Rigby, A.S. Atkin, S.L. *The Effect of Glucose Variability on the Risk of Microvascular Complications in Type 1 Diabetes.* Diabetes Care, 2006. **29**(7): 1486-1490.
 115. Siegelaar, S.E., Kilpatrick, E.S., Rigby, A.S. et al. *Glucose variability does not contribute to the development of peripheral and autonomic neuropathy in type 1 diabetes: data from the DCCT.* Diabetologia, 2009. **52**(10): 2229–2232.
 116. Brownlee, M. *Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications.* Nature, 2001. **414**(6865): 813-820.
 117. Brownlee, M., Hirsch, I.B. *Glycemic variability: A hemoglobin A1c-independent risk factor for diabetic complications.* Journal of the American Medical Association, 2006. **295**(14): 1707-1708.
 118. Quagliaro, L., Piconi, L., Assaloni, R. et al. *Intermittent High Glucose Enhances Apoptosis Related to Oxidative Stress in Human Umbilical Vein Endothelial Cells: The Role of Protein Kinase C and NAD(P)H-Oxidase Activation.* Diabetes, 2003. **52**(11): 2795-2804.
 119. Risso, A., Mercuri, F., Quagliaro, L. et al. *Intermittent high glucose enhances apoptosis in human umbilical vein endothelial cells in culture.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2001. **281**(5): 924-930.
 120. Wentholt, I.M., Kulik, W., Michels, R.P. et al. *Glucose fluctuations and activation of oxidative stress in patients with type 1 diabetes.* Diabetologia, 2007. **51**(1).
 121. Ceriello, A., Esposito, K., Piconi, L. et al. *Oscillating glucose is more deleterious to endothelial function and oxidative stress than mean glucose in normal and type 2 diabetic patients.* Diabetes, 2008. **57**(5): 1349-1354.
 122. Monnier, L., Mas, E., Ginet, C. et al. *Activation of oxidative stress by acute glucose fluctuations compared with sustained chronic hyperglycemia in patients with type 2 diabetes.* Journal of the American Medical Association, 2006. **295**(14): 1681-1687.
 123. Rask-Madsen, C., King, G.L. *Mechanisms of disease: Endothelial dysfunction in insulin resistance and diabetes.* Nature Clinical Practice Endocrinology and Metabolism, 2007. **3**(1): 46-56.
 124. Wassink, A.M.J., Olijhoek, J.K., Visseren, F.L.J. *The metabolic syndrome: Metabolic changes with vascular consequences.* European Journal of Clinical Investigation, 2007. **37**(1): 8-17.
 125. Joshua, I.G., Zhang, Q., Falcone, J.C. et al. *Mechanisms of endothelial dysfunction with development of type 1 diabetes mellitus: Role of insulin and C-peptide.* Journal of Cellular Biochemistry, 2005. **96**(6): 1149-1156.
 126. Oomen, P.H.N., Kant, G.D., Dullaart, R.P. et al. *Acute hyperglycemia and hyperinsulinemia enhance vasodilatation in type 1 diabetes mellitus without increasing capillary permeability and inducing endothelial dysfunction.* Microvascular Research, 2002. **63**(1): 1-9.
 127. Dandona, P., Chaudhuri, A., Ghanim, H. et al. *Insulin as an Anti-Inflammatory and Antiatherogenic Modulator.* Journal of the American College of Cardiology, 2009. **53**(5 SUPPL): 14-20.
 128. Kuboki, K., Jiang, Z.Y., Takahara, N. et al. *Regulation of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene expression in endothelial cells and in vivo - A specific vascular action of insulin.* Circulation, 2000. **101**(6): 676-681.
 129. Monnier, L., Colette, C., Mas, E. et al. *Regulation of oxidative stress by glycaemic control: Evidence for an independent inhibitory effect of insulin therapy.* Diabetologia, 2010. **53**(3): 562-571.

130. DeFronzo, R.A., Tobin, J.D., Andres, R. *Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance*. The American journal of physiology, 1979. **237**(3).
131. Šindelka, G., Škrha, J., Prázný, M. et al. *Association of obesity, diabetes, serum lipids and blood pressure regulates insulin action*. Physiological Research, 2002. **51**(1): 85-91.
132. Geddes, J., Schopman, J.E., Zammitt, N.N. et al. *Prevalence of impaired awareness of hypoglycaemia in adults with type 1 diabetes*. Diabetic Medicine, 2008. **25**(4): 501-504.
133. Lutt, W.W. *Postprandial insulin resistance as an early predictor of cardiovascular risk*. Ther Clin Risk Manag, 2007. **3**(5): 761-770.
134. Fonseca, V.A. *Identification and treatment of prediabetes to prevent progression to type 2 diabetes*. Clin Cornerstone, 2007. **8**(2):10-18.
135. Triggie, C.R. *The early effects of elevated glucose on endothelial function as a target in the treatment of type 2 diabetes*. Timely Top Med Cardiovasc Dis, 2008. **12**: E3.
136. Wright, E., Scism-Bacon, J.L., Glass, L.C. *Oxidative stress in type 2 diabetes: the role of fasting and postprandial glycaemia*. Int J Clin Pract, 2006. **60**(3): 308-314.
137. Su, Y., Liu, X.M., Sun, Y.M. et al. *The relationship between endothelial dysfunction and oxidative stress in diabetes and prediabetes*. Int J Clin Pract, 2008. **62**(6): 877-882.
138. Ceriello, A. *The glucose triad and its role in comprehensive glycaemic control: current status, future management*. Int J Clin Pract, 2010. **64**(12): 1705-1711.
139. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *The relationship of glycemic exposure (HbA1c) to the risk of development and progression of retinopathy in the Diabetes Control and Complications Trial*. Diabetes, 1995. **44**(8): 968 –983.
140. Chittari, M.V., McTernan, P., Bawazeer, N. et al. *Impact of acute hyperglycaemia on endothelial function and retinal vascular reactivity in patients with Type 2 diabetes*. Diabetic Medicine, 2011. **28**(4): 450-454.
141. Rohlfing, C.L., Wiedmeyer, H.M., Little, R.R. et al. *Defining the relationship between plasma glucose and HbA(1c): analysis of glucose profiles and HbA(1c) in the Diabetes Control and Complications Trial*. Diabetes Care, 2002. **25**(2): 275-278.
142. Dyck, P.J., Davies, J.L., Clark, V.M. et al. *Modeling chronic glycemic exposure variables as correlates and predictors of microvascular complications of diabetes*. Diabetes Care, 2006. **29**(10): 2282-2288.
143. Kovatchev, B.P., Otto, E., Cox, D. et al. *Evaluation of a new measure of blood glucose variability in diabetes*. Diabetes Care, 2006. **29**(11): 2433-2438.
144. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus*. N Engl J Med, 1993. **329**(14): 977–986.
145. Siegelaar, S.E., Holleman, F., Hoekstra, J.B. et al. *Glucose variability; does it matter?* Endocr Rev, 2010. **31**(2): 171-182.
146. Cryer, P.E., Davis, S.N., Shamoon, H. *Hypoglycemia in diabetes*. Diabetes Care, 2003. **26**(6): 1902-1912.
147. Cryer, P.E. *Hypoglycaemia: the limiting factor in the glycaemic management of Type I and Type II diabetes*. Diabetologia, 2002. **45**(7): 937-948.

148. Mohsin, F., Craig, M.E., Cusumano, J. et al. *Discordant trends in microvascular complications in adolescents with type 1 diabetes from 1990 to 2002*. Diabetes Care, 2005. **28**(8): 1974-1980.
149. Bruttomesso, D., Crazzolaro, D., Maran, A. et al. *In Type 1 diabetic patients with good glycaemic control, blood glucose variability is lower during continuous subcutaneous insulin infusion than during multiple daily injections with insulin glargine*. Diabet Med, 2008. **25**(3): 326-332.
150. Fanelli, C.G., Porcellati, F., Pampanelli, S. et al. *Insulin therapy and hypoglycaemia: the size of the problem*. Diabetes Metab Res Rev, 2004. **20**(Suppl 2): 32-42.
151. Valla V. *Therapeutics of diabetes mellitus: focus on insulin analogues and insulin pumps*. Exp Diabetes Res, 2010. 178372.
152. Friedman, T., Mastorakos, G., Newman, T. et al. *Carbohydrate and lipid metabolism in endogenous hypercortisolism: shared features with metabolic syndrome X and NIDDM*. Endocr J, 1996. **43**: 645-655.
153. Kršek, M., Rosická, M., Nedvídková, J. et al. *Increased lipolysis of subcutaneous abdominal adipose tissue and altered noradrenergic activity in patients with Cushing's syndrome: An in-vivo microdialysis study*. Physiological Research, 2006. **55**: 421-428.
154. Škrha, J. *Pathogenesis of angiopathy in diabetes*. Acta Diabetol, 2003. **40**.
155. Boscaro, M., Sonino, N., Scarda, A. et al. *Anticoagulant Prophylaxis Markedly Reduces Thromboembolic Complications in Cushing's Syndrome*. J Clin Endocrinol Metab, 2002. **87**: 3662-3666.
156. Jacoby, R., Owings, J., Ortega, T. et al. *Biochemical Basis for the Hypercoagulable State Seen in Cushing Syndrome*. Arch Surg, 2001. **136**: 1003-1007.
157. With, N., Mathiesen, E.B., Amiral, J. et al. *Endothelial dysfunction and systemic inflammation in persons with echolucent carotid plaques*. Thrombosis and Haemostasis, 2006. **96**: 53-59.
158. Aoki, M., Nata, T., Morishita, R. et al. *Endothelial apoptosis induced by oxidative stress through activation of NF- κ B: Antiapoptotic effect of antioxidant agents on endothelial cells*. Hypertension, 2001. **38**: 48-55.
159. Almawi, W.Y., Melemedjian, O.K. *Negative regulation of nuclear factor-kappaB activation and function by glucocorticoids*. J Mol Endocrinol, 2002. **28**: 69-78.
160. Marumo, T., Schini-Kerth, V.B., Brandes, R.P. et al. *Glucocorticoids Inhibit Superoxide Anion Production and p22 Phox mRNA Expression in Human Aortic Smooth Muscle Cells*. Hypertension, 1998. **32**: 1083-1088.
161. Vincent, H.K., Taylor, A.G. *Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans*. Int J Obes, 2005. **30**: 400-418.
162. Rumley, A.G., Woodward, M., Rumley, A. et al. *Plasma lipid peroxides: relationships to cardiovascular risk factors and prevalent cardiovascular disease*. QJM, 2004. **97**: 809-816.
163. Landmesser, U., Harrison, D.G. *Oxidative stress and vascular damage in hypertension*. Coronary Artery Disease, 2001. **12**: 455-461.
164. Ceriello, A., Falletti, E., Bortolotti, N. et al. *Increased circulating intercellular adhesion molecule-1 levels in type II diabetic patients: The possible role of metabolic control and oxidative stress*. Metabolism: Clinical and Experimental, 1996. **45**: 498-501.
165. Cominacini, L., Fratta, P.A., Garbinu, U. et al. *E-Selectin plasma concentration is influenced by glycaemic control in NIDDM patients: Possible role of oxidative stress*. Diabetologia, 1997. **40**: 584-589.

166. Škrha, J., Hilgertová, J. *Relationship of serum N-acetyl-beta-glucosaminidase activity to oxidative stress in diabetes mellitus*. Clin Chim Acta, 1999. **282**: 167-174.
167. Sacerdote, A., Weiss, K., Tran, T. et al. *Hypertension in patients with Cushing's disease: Pathophysiology, diagnosis, and management*. Curr Hypertens Rep, 2005. **7**: 212-218.
168. Schalkwijk, C.G., Stehouwer, C.D.A. *Vascular complications in diabetes mellitus: The role of endothelial dysfunction*. Clin Sci, 2005. **109**: 143-159.
169. Brownlee, M. *The pathobiology of diabetic complications: A unifying mechanism*. Diabetes, 2005. **54**(6): 1615-1625.
170. Meigs, J.B., O'Donnell, C.J., Tofler, G.H. et al. *Hemostatic markers of endothelial dysfunction and risk of incident type 2 diabetes: The Framingham Offspring Study*. Diabetes, 2006. **55**(2): 530-537.
171. Kotzailias, N., Graninger, M., Knechtelsdorfer, M. et al. *Acute effects of hyperglycaemia on plasma concentration of soluble P-selectin and von Willebrand Factor in healthy volunteers -a prospective randomised double blind controlled study*. Thrombosis Research, 2009. **123**(3): 452-459.
172. Undas, A., Wiek, I., Stêpien, E. et al. *Hyperglycemia is associated with enhanced thrombin formation, platelet activation, and fibrin clot resistance to lysis in patients with acute coronary syndrome*. Diabetes Care, 2008. **31**(8): 1590-1595.
173. Vaidyula, V.R., Boden, G., Rao, A.K. *Platelet and monocyte activation by hyperglycemia and hyperinsulinemia in healthy subjects*. Platelets, 2006. **17**(8): 577-585.
174. Vaidyula, V.R., Rao, A.K., Mozzoli, M. et al. *Effects of hyperglycemia and hyperinsulinemia on circulating tissue factor procoagulant activity and platelet CD40 ligand*. Diabetes, 2006. **55**(1): 202-208.
175. Blann, A.D., Nadar, S.K., Lip, G.Y.H. *The adhesion molecule P-selectin and cardiovascular disease*. European Heart Journal, 2003. **24**(24): 2166-2179.
176. O'Keefe, J.H., Bell, D.S. *Postprandial hyperglycemia/hyperlipidemia (postprandial dysmetabolism) is a cardiovascular risk factor*. Am J Cardiol, 2007. **100**(5): 899-904.
177. Beisswenger, P.J., Brown, W.V., Ceriello, A. et al. *Meal-induced increases in C-reactive protein, interleukin-6 and tumour necrosis factor α are attenuated by prandial + basal insulin in patients with Type 2 diabetes*. Diabet Med, 2011. **28**(9): 1088-1095.
178. Anderson, R.A., Evans, M.L., Ellis, G.R. et al. *The relationships between postprandial lipaemia, endothelial function and oxidative stress in healthy individuals and patients with type 2 diabetes*. Atherosclerosis, 2001. **154**(2): 475-483.
179. Bell, D.S., O'Keefe, J.H., Jellinger, P. *Postprandial dysmetabolism: the missing link between diabetes and cardiovascular events?* Endocr Pract, 2008. **14**(1): 112-124.
180. Neri, S., Calvagno, S., Mauceri, B. et al. *Effects of antioxidants on postprandial oxidative stress and endothelial dysfunction in subjects with impaired glucose tolerance and type 2 diabetes*. Eur J Nutr, 2010. **49**(7): 409-416.
181. Andreozzi, F., Laratta, E., Sciacqua, A. et al. *Angiotensin II impairs the insulin signaling pathway promoting production of nitric oxide by inducing phosphorylation of insulin receptor substrate-1 on Ser312 and Ser616 in human umbilical vein endothelial cells*. Circ Res, 2004. **94**(9): 1211-1218.
182. Schulman, I.H., Zhou, M.S. *Vascular insulin resistance: a potential link between cardiovascular and metabolic diseases*. Curr Hypertens Rep, 2009. **11**(1): 48-55.

183. Aljada, A., Ghanim, H., Mohanty, P. et al. *Insulin inhibits the pro-inflammatory transcription factor early growth response gene-1 (Egr)-1 expression in mononuclear cells (MNC) and reduces plasma tissue factor (TF) and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) concentrations.* J Clin Endocrinol Metab, 2002. **87**(3): 1419-1422.
184. Giera, M., Lingeman, H., Niessen, W.M. *Recent Advancements in the LC- and GC-Based Analysis of Malondialdehyde (MDA): A Brief Overview.* Chromatographia, 2012. **75**(9-10): 433-440.
185. Prázný, M., Kasalová, Z., Mazoch, J. et al. *Microvascular Reactivity and Endothelial Function in Type 2 Diabetic Patients with Hyperlipidemia Treated with Simvastatin: 3-year Follow-up.* Prague Med Rep, 2009. **110**(4): 290-300.
186. Štulc, T., Kasalová, Z., Prázný, M. et al. *Microvascular reactivity in patients with hypercholesterolemia: effect of lipid lowering treatment.* Physiol Res, 2003. **52**: 439-445.
187. Dandona, P., Mohanty, P., Chaudhuri, A. et al. *Insulin infusion in acute illness.* J Clin Invest, 2005. **115**(8): 2069-2072.
188. Hyun, E., Ramachandran, R., Hollenberg, M.D. et al. *Mechanisms behind the anti-inflammatory actions of insulin.* Crit Rev Immunol, 2011. **31**(4): 307-340.
189. Šoupal, J., Prázný, M. *Glykemická variabilita.* Diabetes, metabolismus, endokrinologie, výživa, 2012. Přijato k publikaci.
190. Su, G., Mi, S., Tao, H. et al. *Association of glycemic variability and the presence and severity of coronary artery disease in patients with type 2 diabetes.* Cardiovasc Diabetol, 2011. **10**: 19.

10. Přílohy

10.1. Prohlášení autora

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 30.6.2012

MUDr. Eva Horová

Podpis.....

10.2. Identifikační záznam

HOROVÁ, Eva. *Mikrovaskulární reaktivita a funkce endotelu u diabetes mellitus a dalších endokrinopatií. [Microvascular reactivity and endothelial function in patients with diabetes mellitus and other endocrinopathies]*. Praha, 2012. 110 stran, 6 příloh. Dizertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, III. interní klinika VFN Praha. Školitel: Prázný, Martin.

10.3. Seznam publikací autora

Publikace se vztahem k tématu dizertační práce

a) s impakt faktorem

Horová, E., Mazoch, J., Hilgertová, J., Kvasnička, J., Škrha J, Šoupal, J., Prázný, M. *Acute Hyperglycemia Does Not Impair Microvascular Reactivity and Endothelial Function during Hyperinsulinemic Isoglycemic and Hyperglycemic Clamp in Type 1 Diabetic Patients.* Exp Diabetes Res, 2012. ID 851487. – **IF 1,528**

Prázný, M., Ježková, J., **Horová, E.**, Lazárová, V., Hána, V., Kvasnička, J., Pecen, L., Marek, J., Škrha, J., Kršek, M. *Impaired microvascular reactivity and endothelial function in patients with Cushing's syndrome: influence of arterial hypertension.* Physiol Res, 2008. 57(1): 13-22. - **IF 1,505**

b) bez impakt faktoru

Horová, E., Prázný, M. *Endotelová dysfunkce: příčiny, důsledky a možnosti jejího hodnocení.* Diabetes, metabolismus, endokrinologie, výživa, 2009. 12(3): 94-102.

Publikace bez vztahu k tématu dizertační práce

a) s impakt faktorem

Gu, T., **Horová, E.**, Möllsten, A., Abu Seman, N., Falhammar, H., Prázný, M., Brismar, K., Gu, H.F. *IGF2BP2 and IGF2 genetic effects in diabetes and diabetic nephropathy* Přijato do Journal of Diabetes and Its Complications, 2012. Ref. No.: JDC-D-12-00095R1. – **IF 2,147**

Horová, E., Prázný, M., Kaňková, K., Brismar, K., Gu, H.F. *Genetic and functional analyses of MRAS and HNF1A genes in diabetes and diabetic nephropathy.* Folia Biologica, 2012. 58: 121-127. – **IF 0,729**

Prusíková, M., Vrablík, M., Zámečník, L., **Horová, E.**, Lánská, V., Češka, R. *Prevalence of risk factors of cardiovascular diseases in men with erectile dysfunction. Are they as frequent as we believe?* Neuro Endocrinol Lett, 2011. 21;32(Suppl2): 60-63. - **IF 1,05**

b) bez impakt faktoru

Horová, E. *Novinky v diabetologii – linagliptin v léčbě hyperglykémie.* Med praxi, 2012. 9(13): 10-12.

Horová, E. et al. Kapitola Metabolismus, podk. Diabetes mellitus, str. 224-256. In: Češka R. et al. Interna, Triton, Praha 2010.

Horová, E., Škrha, J. *Hypoglykemický syndrom.* Kazuistiky v diabetologii, 2009. 7(2): 4-7.

Maruna, P., Campr, V., Raška, I., **Horová, E.**, Michalská, D., Štulc, T., Broulík, P. *Hyperfunkční cystický adenom příštítného tělíska v thymu, popis případu a patofyziologický rozbor*. Kazuistiky v diabetologii, 2009. 7(2): 22-27.

Rukopisy připravené k publikaci

Horová, E., Škrha, J., Prázný, M. *Changes in microvascular reactivity and endothelial function after standard breakfast in patients with type 2. diabetes*.

Prezentace na kongresech a sympoziích

(abstrakta pouze jako 1. autor či přednášející)

Horová, E., Prázný, M., Ježková, J., Lazárová, V., Hána, V., Kvasnička, J. et al. *Mikrovaskulární reaktivita u pacientů s Cushingovým syndromem*. 8. Studentská vědecká konference 1. LF UK, Praha, 22.5.2007, pregraduální sekce, část klinická.

Horová, E., Prázný, M., Ježková, J., Lazárová, V., Hána, V., Kvasnička, J. et al. *Mikrovaskulární reaktivita u pacientů s Cushingovým syndromem*. Vědecká konference studentů českých a slovenských lékařských fakult, Praha, 21.- 22.11.2007.

Horová, E., Prázný, M., Mazoch, J., Kvasnička, J., Škrha, J. *Vliv rychlé změny glykémie během clampu na mikrovaskulární reaktivitu a funkci endotelu u pacientů s diabetem 1. typu*. 44. Diabetologické dny v Luhačovicích, 17.- 19.4.2008. Diabetes, metabolismus, endokrinologie, výživa, 2008. 11(Suppl.1): str. 17.

Horová, E., Prázný, M., Mazoch, J., Kvasnička, J., Škrha, J. *Vliv rychlé změny glykémie během clampu na mikrovaskulární reaktivitu a funkci endotelu u pacientů s diabetem 1. typu*. XXVII. Dni mladých internistů, Martin, Slovenská republika, 22.- 23.5.2008. Vnitřní lékařství, 2008. 54(5): str. 550.

Horová, E., Prázný, M., Škrha, J. *Microvascular reactivity in acute Hyperglycemia in type 1. diabetes*. 25th Conference of the European Society for Microcirculation, Budapešť, Maďarsko, 26.- 29.9.2008. Journal of Vascular Research, 2008. 45(Suppl.2): str. 84.

Horová, E., Prázný, M. *Parametry glykemické variability a jejich vztah ke kompenzaci diabetu a léčbě inzulinem u pacientů s DM 1. typu léčených inzulinovou pumpou*. 45. Diabetologické dny v Luhačovicích, 23.- 25.4.2009. Diabetes, metabolismus, endokrinologie, výživa, 2009. 12(Suppl.1): str. 48.

Horová, E., Prázný, M. *Parametry glykemické variability u pacientů s diabetes mellitus 1. typu léčených inzulinovou pumpou*. 10. Studentská vědecká konference 1. LF UK, Praha, 27.5.2009.

Horová, E., Prázný, M. *Parametry glykemické variability a jejich vztah ke kompenzaci diabetu a léčbě inzulínem u pacientů s DM 1. typu léčených inzulínovou pumpou.* XXVIII. Dny mladých internistů, Olomouc, 4.- 5.6.2009. Vnitřní lékařství, 2009. 55(Suppl.1): str. 173.

Horová, E., Prázný, M. *Hyperglykémie rezistentní k terapii u pacienta s diabetes mellitus 2. typu – kazuistika. „Žinkovy dny“ aneb technologie v diabetologii,* Darovanský dvůr, 27.- 29.8.2009.

Horová, E., Prázný, M., Škrha, J. *Změny funkce endotelu a mikrovaskulární reaktivity po standardní snídani u pacientů s diabetem 2. typu.* XIII. Kongres o ateroskleróze, Špindlerův mlýn, 10.- 12.12.2009. Vnitřní lékařství, 2009. 55(12): P1-P44, P25.

Horová, E., Šoupal, J., Prázný, M., Škrha, J. *Changes in endothelial function and microvascular reactivity after standard breakfast in patients with type 2 diabetes.* XXXV. Angiologické dny, Praha, 25.- 27.2.2010. Central European Vascular Journal, 2010. 9(Number 1): str. 25.

Horová, E., Prázný, M., Škrha, J. *Změny mikrovaskulární reaktivity po standardní snídani u pacientů s diabetem 2. typu.* XLVI. Diabetologické dny, Luhačovice, 22.- 24.4.2010. Diabetologie, metabolismus, endokrinologie, výživa, 2010. 13(Suppl.1): str. 38.

Horová, E., Prázný, M., Škrha, J. *Microvascular reactivity and oxidative stress after standard breakfast in patients with recently diagnosed type 2 diabetes.* 12th European Congress of Endocrinology, Prague, 24.- 28.4.2010. Endocrine Abstracts, 2010. 22: P346.

Horová, E., Prázný, M., Škrha, J. *Microvascular reactivity and oxidative stress after standard breakfast in patients with recently diagnosed type 2 diabetes.* 46th Annual Meeting EASD, Stockholm, Sweden, 20.- 24.9.2010. Diabetologia, 2010. 53(Suppl 1): S1-S556, Abstr. No. 1309.

Horová, E., Prázný, M., Kaňková, K., Brismar, K., Gu, H.F. *Genetická asociační a funkční analýza kandidátních genů pro rozvoj diabetu a diabetické nefropatie MRAS a HNF1A.* XLVII. Diabetologické dny, Luhačovice, 14.- 16.4.2011. Diabetologie, metabolismus, endokrinologie, výživa, 2011. 14(Suppl.1): str. 47.

Horová, E., Prázný, M., Kaňková, K., Brismar, K., Gu, H.F. *Genetic and functional analyses of the MRAS and HNF1A genes in diabetes and diabetic nephropathy.* 10th Congress of the European Federation of Internal Medicine, Athens, Greece, 5.- 8.10.2011.

Horová, E., Vejražka, M., Škrha, J. jr., Kalousová, M., Škrha, J., Prázný, M. *Změny mikrovaskulární reaktivity po standardní snídani u pacientů v časných stádiích DM 2. typu.* Diabetologické dny, Luhačovice, 19.- 21.4.2012. Diabetologie, metabolismus, endokrinologie, výživa, 2012. 15(Suppl. 1): P4, str. 39.

10.4. Separáty publikací

Horová, E., Mazoch, J., Hilgertová, J., Kvasnička, J., Škrha J, Šoupal, J., Prázný, M. *Acute Hyperglycemia Does Not Impair Microvascular Reactivity and Endothelial Function during Hyperinsulinemic Isoglycemic and Hyperglycemic Clamp in Type 1 Diabetic Patients.* Exp Diabetes Res, 2012. ID 851487. – **IF 1,528**

Prázný, M., Ježková, J., **Horová, E.**, Lazárová, V., Hána, V., Kvasnička, J., Pecen, L., Marek, J., Škrha, J., Kršek, M. *Impaired microvascular reactivity and endothelial function in patients with Cushing's syndrome: influence of arterial hypertension.* Physiol Res, 2008. 57(1): 13-22. - **IF 1,505**

Horová, E., Prázný, M. *Endotelová dysfunkce: příčiny, důsledky a možnosti jejího hodnocení.* Diabetes, metabolismus, endokrinologie, výživa, 2009. 12(3): 94-102.

Gu, T., **Horová, E.**, Möllsten, A., Abu Seman, N., Falhammar, H., Prázný, M., Brismar, K., Gu, H.F. *IGF2BP2 and IGF2 genetic effects in diabetes and diabetic nephropathy* Přijato do Journal of Diabetes and Its Complications, 2012. Ref. No.: JDC-D-12-00095R1. – **IF 2,147**

Horová, E., Prázný, M., Kaňková, K., Brismar, K., Gu, H.F. *Genetic and functional analyses of MRAS and HNF1A genes in diabetes and diabetic nephropathy.* Folia Biologica, 2012. 58: 121-127. – **IF 0,729**

Prusíková, M., Vrablík, M., Zámečník, L., **Horová, E.**, Lánská, V., Češka, R. *Prevalence of risk factors of cardiovascular diseases in men with erectile dysfunction. Are they as frequent as we believe?* Neuro Endocrinol Lett, 2011. 21;32(Suppl2): 60-63. - **IF 1,05**