

**Univerzita Karlova v Praze**  
**1. lékařská fakulta**

Autoreferát dizertační práce



**Mikrovaskulární reaktivita a funkce endotelu  
u diabetes mellitus a dalších endokrinopatií**

MUDr. Eva Horová

2012

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

Obor: **Fyziologie a patofyziologie člověka**

Předseda oborové rady: **Prof. MUDr. Jaroslav Pokorný, DrSc.**

Školící pracoviště: **3. interní klinika 1. LF UK a VFN**

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

## **OBSAH**

Abstrakt (CZ) .....	4
Abstract (EN) .....	5
1. Úvod .....	6
2. Hypotéza a cíle práce .....	6
3. Metodika .....	7
4. Výsledky .....	9
5. Diskuse .....	15
6. Závěry .....	21
7. Literatura .....	24
8. Seznam publikací .....	27

## **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.

## **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.

## **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 MVR a popsat změny ve sledovaných parametrech po odstranění nebo zmírnění ovlivňujícího faktoru. Zlepšení funkce endotelu a MVR 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 MVR 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 MVR a funkce endotelu a dvě studie genetické a funkční analýzy kandidátních genů pro rozvoj diabetu a diabetické nefropatie provedené během studijního pobytu v Karolinska Institutet ve Stockholmu.

## **2. 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 inzulínové terapie a s mikrovaskulární reaktivitou u pacientů s diabetem 1. typu léčených inzulínovou pumpou

### **3. Metodika**

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

Do studie zabývající se MVR a funkcí endotelu u pacientů s hyperkortizolizmem bylo zařazeno 29 pacientů s aktivním Cushingovým syndromem (věk  $47 \pm 12$  let). Deset z nich bylo vyšetřeno ještě podruhé po úspěšném operačním výkonu a vyléčení hyperkortizolizmu. 52% pacientů mělo zároveň diabetes mellitus (DM), 59% arteriální hypertenzi. Dále bylo vyšetřeno 16 zdravých osob, které sloužily jako kontrolní skupina. K měření kožní MVR byla stejně jako v ostatních studiích použita metoda laser-Doppler a stimulační testy s post-okluzivní reaktivní hyperémií (PORH) a s termální hyperémií (TH), při kterých byla měřena maximální perfúze (PORHmax, THmax) a rychlost vzestupu perfúze (PORHmax/t a THmax/t). Cu,Zn-superoxiddismutáza (SOD) a malondialdehyd (MDA) sloužily k hodnocení oxidačního stresu. Fibrinolýza byla charakterizována plazmatickou koncentrací aktivátoru tkáňového plazminogenu (tPA)

a inhibitoru aktivátoru plazminogenu (PAI-1). Aktivita sérové N-acetyl-beta-glukosaminidázy (NAG), E-selektin, P-selektin a ICAM-1 (inter-cellular adhesion molecule-1) byly použity jako biochemické markery endotelové aktivity.

Do studie vlivu rychle navozené hyperglykémie během hyperinzulinemického clampu na MVR a funkci endotelu bylo zařazeno 16 pacientů s diabetem 1. typu (věk  $51 \pm 7$  let, trvání diabetu  $24 \pm 7$  let, HbA<sub>1C</sub>  $7,8 \pm 0,9\%$  dle IFCC). Všichni pacienti byli léčeni kontinuální subkutánní infúzí inzulínu pomocí inzulínové pumpy. Pacienti podstoupili hyperinzulinemický clampový test v izo- a hyperglykemické fázi a s odstupem maximálně dvou měsíců další clampové vyšetření s aplikací pouze své běžné dávky inzulínu a pouze s volumovou zátěží, bez indukce hyperglykémie. Toto vyšetření sloužilo k hodnocení vlivu možných nespecifických faktorů na zkoumané parametry. Kožní MVR byla měřena pomocí metody laser-Doppler před clampem bazálně a na konci obou fází clampu. Byly sledovány parametry lipidogramu, jako marker oxidačního stresu sloužila koncentrace MDA, fibrinogen byl stanoven v rámci vyšetření koagulace. Ukazatelem funkce endotelu byly koncentrace E- a P-selektinu, ICAM-1 a VCAM (vascular cell adhesion molecule). Dále byly vypočítány parametry inzulínové senzitivity.

Do studie zabývající se vlivem příjmu potravy na MVR a funkci endotelu bylo zařazeno 20 pacientů s diabetem 2. typu v počátečním stadiu onemocnění (věk  $58 \pm 6$  let, HbA<sub>1C</sub>  $4,8 \pm 0,5\%$  dle IFCC, doba od diagnózy diabetu  $2 \pm 1$  rok, léčba pouze metforminem) a 14 osob bez diabetu (věk  $59 \pm 3$  roky, HbA<sub>1C</sub>  $4,1 \pm 0,4\%$ ). MVR byla měřena metodou laser-Doppler nalačno a po 60 a 180 minutách po standardní snídani (celkově 2006 kJ, bílkoviny 22,36 g, sacharidy 62,94 g, tuky 15,51 g). Dále byly vždy nalačno a po 60, 120 a 180 minutách postprandiálně stanoveny základní biochemické parametry (glykémie, inzulinémie, parametry lipidogramu, CRP), některé parametry oxidačního stresu (MDA, konjugované dieny - KD), koagulační parametry (tPA, PAI-1) a cytoadhezivní molekuly. Do studie porovnávající parametry glykemické variability (GV) s kompenzací diabetu a MVR bylo zařazeno 18 pacientů s diabetem 1. typu (věk  $39 \pm 10$  let, aktuální HbA<sub>1C</sub>  $7,2 \pm 1,8\%$  dle IFCC, průměrný HbA<sub>1C</sub> z posledních třech měření  $6,9 \pm 1,4\%$ , trvání diabetu  $17 \pm 7$  let) léčených inzulínovou pumpou. Byly získány výsledky selfmonitoringu za posledních 6-12 týdnů pomocí přístroje AccuChek SmartPix (Roche). Jako parametry GV byly použity hodnoty průměrné glykémie, směrodatná odchylka glykémie (SDBG), index hyperglykémie (HBGI) a index hypoglykémie (LBGI). Z parametrů inzulínové léčby byla použita celková denní dávka inzulínu, bazální

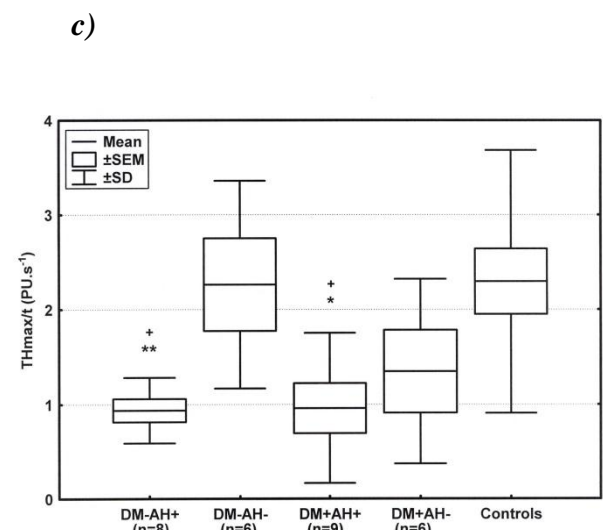
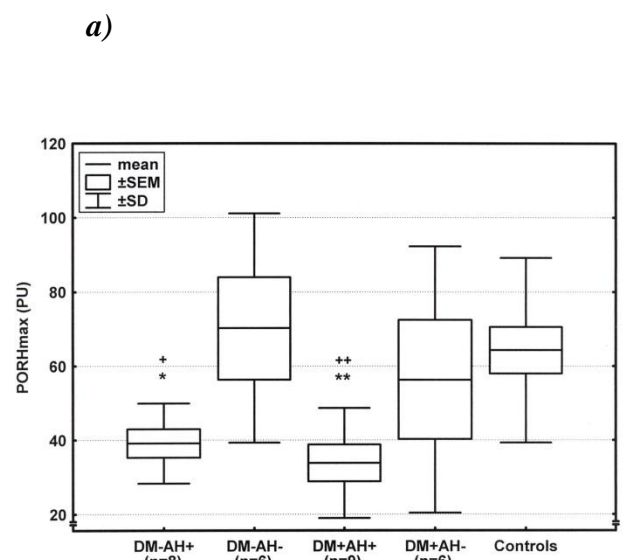
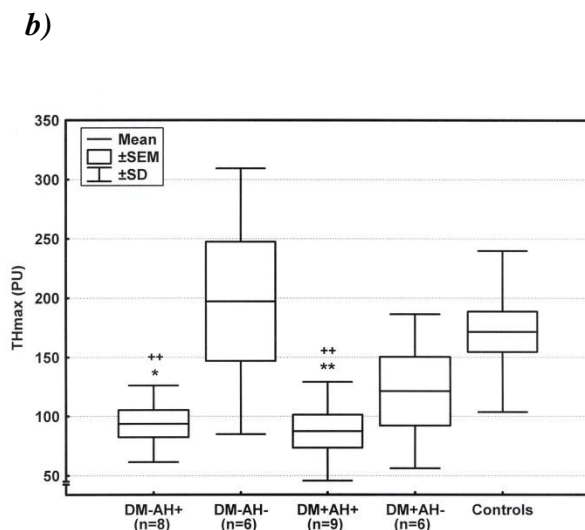


a bolusová dávka, počet kroků bazální dávky, průměrný počet bolusů na den. Jako ukazatel cévního poškození byla stanovena mikroalbuminurie. MVR byla měřena jednorázově metodou laser-Doppler.

#### 4. Výsledky

Ve studii zabývající se MVR a funkcí endotelu u pacientů s Cushingovým syndromem jsme zjistili, že u pacientů s hyperkortizolizmem byly PORHmax a PORHmax/t výrazně nižší u pacientů s přidruženou arteriální hypertenzí ( $36,3 \pm 13,0$  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 byly nižší i hodnoty 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 s ohledem na přítomnost arteriální hypertenze a/nebo diabetes mellitus jsou zobrazeny na grafu 1a,b,c.

**Graf 1.** Porovnání perfúze při PORHmax na předloktí **a)**, THmax **b)** a THmax/t **c)** u pacientů s Cushingovým syndromem s diabetem 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-  $*p < 0,03$ ,  $**p < 0,01$ .



Koncentrace PAI-1 korelovaly pozitivně s BMI ( $r=0,62$ ,  $p=0,001$ ), triglyceridy ( $r=0,56$ ,  $p=0,003$ ), se sérovou aktivitou NAG ( $r=0,58$ ,  $p=0,008$ ) a koncentrací tPA ( $r=0,65$ ,  $p=0,002$ ). Koncentrace MDA závisela na koncentraci celkového cholesterolu ( $r=0,61$ ,  $p=0,004$ ). Mezi PORHmax a THmax/t byla zjištěna inverzní korelace se systolickým krevním tlakem ( $r=-0,50$ ,  $p=0,009$  a  $r=-0,42$ ,  $p=0,03$ ). Byla zjištěna závislost mezi ICAM-1 a THmax/t u pacientů s hyperkortizolizmem ( $r=0,75$ ,  $p=0,03$ ). Nejvyšší koncentrace ICAM-1 byla nalezena ve skupině pacientů s normalizovaným kortizolem po léčbě. Výsledky laboratorních vyšetření jsou uvedeny v *tabulce 1*.

**Tabulka 1.** Biochemické parametry, parametry oxidačního stresu, funkce endotelu a fibrinolýzy u pacientů s hyperkortizolizmem (HC), s normalizovanou sekrecí kortizolu (NC) a kontrolní skupiny.

	HC (n = 29)	NC (n = 10)	kontrolní skupina (n = 16)
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	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 <sub>1C</sub> (% DCCT)	7,5 ± 1,8 <sup>x</sup>	5,8 ± 1,3	4,7 ± 0,3
TC (mmol/l)	7,22 ± 1,67 <sup>y,c</sup>	5,35 ± 0,50	5,38 ± 0,78
HDL-C (mmol/l)	1,44 ± 0,27 <sup>b</sup>	1,27 ± 0,34	1,19 ± 0,21
LDL-C (mmol/l)	4,28 ± 1,27 <sup>x,b</sup>	3,29 ± 0,39	3,44 ± 0,67
TG (mmol/l)	2,89 ± 1,26 <sup>b</sup>	1,94 ± 1,28	1,66 ± 0,94
inzulinémie (mIU/l)	35 ± 24 <sup>c</sup>	21 ± 5	16 ± 12
HOMA-R	12,20 ± 12,58	4,60 ± 1,45	3,4 ± 1,9
MDA (μmol/l)	2,71 ± 0,61 <sup>x,b</sup>	2,07 ± 0,28	2,14 ± 0,37
Cu,Zn-SOD (U)	0,88 ± 0,29 <sup>c</sup>	0,95 ± 0,18 <sup>b</sup>	1,31 ± 0,13
tPA (ng/ml)	7,87 ± 3,43 <sup>x,a</sup>	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 <sup>x,b</sup>	290,84 ± 74,22 <sup>a</sup>	210,94 ± 56,33

Statistická významnost rozdílů mezi skupinami HC a NC <sup>x</sup> $p<0,05$ , <sup>y</sup> $p<0,01$ , mezi skupinami HC nebo NC a kontrolní skupinou <sup>a</sup> $p<0,05$ , <sup>b</sup> $p<0,01$ , <sup>c</sup> $p<0,001$ .

Výsledky studie vlivu rychle navozené hyperglykémie během hyperinzulinemického izoglykemického a hyperglykemického clampu na MVR a funkci endotelu u pacientů s diabetem 1. typu jsou uvedeny v *tabulce 2*.

**Tabulka 2.** Biochemické parametry a parametry 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 <sup>a</sup>	152 ± 47 <sup>a</sup>	74 ± 55	65 ± 46
TC (mmol/l)	4,6 ± 0,7	-	4,3 ± 0,6 <sup>b</sup>	4,7 ± 0,8	4,3 ± 0,8 <sup>b</sup>
HDL-C (mmol/l)	1,3 ± 0,4	-	1,2 ± 0,4 <sup>b</sup>	1,3 ± 0,4	1,2 ± 0,3 <sup>b</sup>
LDL-C (mmol/l)	2,9 ± 0,6	-	2,7 ± 0,5 <sup>b</sup>	2,9 ± 0,6	2,7 ± 0,6 <sup>b</sup>
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 <sup>b</sup>
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 <sup>a</sup>	29 ± 15	28 ± 14 <sup>b</sup>
P-selektin (ng/ml)	132 ± 50	-	93 ± 34 <sup>a</sup>	126 ± 50	111 ± 27
ICAM-1 (ng/ml)	251 ± 48	-	215 ± 41 <sup>a</sup>	237 ± 40	212 ± 33 <sup>b</sup>
VCAM (ng/ml)	812 ± 183	-	673 ± 117 <sup>a</sup>	815 ± 203	665 ± 165 <sup>a</sup>
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 <sup>b</sup>	32 ± 12	35 ± 12
PORHtmax předloktí (s)	13,5 ± 5,1	6,1 ± 4,7 <sup>a</sup>	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 <sup>c</sup>	10,4 ± 16,5 <sup>c</sup>	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 <sup>x</sup>	70 ± 16	64 ± 19
THmax/t (PU/s)	1,3 ± 0,5	1,2 ± 0,7	1,4 ± 0,8 <sup>x</sup>	1,3 ± 1,0	1,7 ± 1,6

Statistická významnost rozdílů mezi hodnotami měřenými v průběhu hyperinzulinemického nebo kontrolního clampu a příslušnými bazálními hodnotami <sup>a</sup>p<0,001, <sup>b</sup>p<0,01, <sup>c</sup>p<0,05 a <sup>x</sup>p<0,05 při srovnání izo- a hyperglykemické fáze.

V parametrech MVR byl vstupně při hyperinzulinemickém clampu pozorován negativní vztah mezi koncentrací fibrinogenu a THmax i PORHmax na prstu ( $r=-0,67$ ,  $p=0,009$ ,  $r=-0,77$ ,  $p<0,0005$ ). Pozitivní vztah byl mezi ICAM-1 a THtmax ( $r=0,63$ ,  $p=0,016$ ). Negativní korelace byla pozorována mezi inzulinémií a PORHtmax na prstu ( $r=-0,7$ ,  $p=0,007$ ). Stejně tak byl pozorován negativní vztah mezi hodnotou P-selektinu a PORHtmax na prstu i předloktí ( $r=-0,57$ ,  $p=0,035$ ,  $r=-0,6$ ,  $p=0,029$ ).

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.

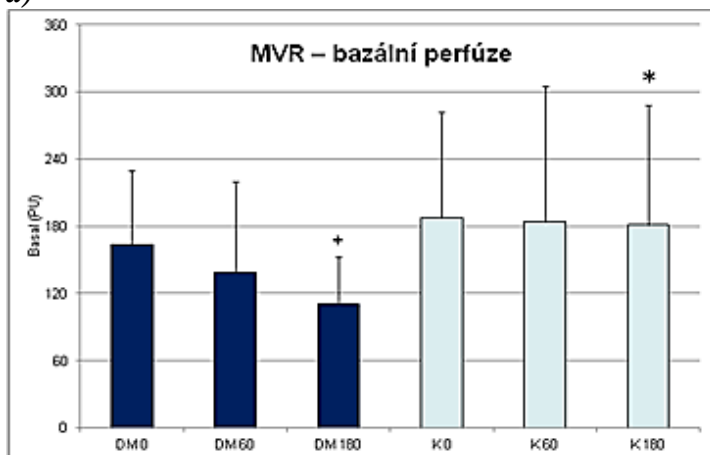
Ve studii zabývající se vlivem příjmu potravy na MVR a funkci endotelu u pacientů s diabetem 2. typu jsme pozorovali postprandiální vzestup inzulinémie u pacientů s diabetem ( $35 \pm 17$  vs.  $139 \pm 76$  vs.  $49 \pm 37$  mIU/l,  $p<0,001$ ) i v kontrolní skupině ( $27 \pm 8$  vs.  $118 \pm 58$  vs.  $35 \pm 20$  mIU/l,  $p<0,001$ ), i když rozdíly mezi oběma skupinami nebyly statisticky významné. Pacienti s diabetem měli bazálně vyšší hodnotu MDA ve srovnání s kontrolní skupinou ( $3,0 \pm 0,5$  vs.  $2,2 \pm 0,4$   $\mu\text{mol/l}$ ,  $p<0,001$ ), u pacientů s DM, nikoliv však u kontrol, došlo během vyšetření k jejímu významnému poklesu ( $3,0 \pm 0,5$  vs.  $2,8 \pm 0,5$   $\mu\text{mol/l}$ ,  $p<0,05$ ).

U pacientů s DM poklesla v 60. i ve 180. minutě postprandiálně ve srovnání se vstupní hodnotou bazální perfúze i PORHmax na prstu ( $164 \pm 66$  vs.  $139 \pm 81$  vs.  $111 \pm 42$  PU,  $p<0,05$  a  $240 \pm 67$  vs.  $221 \pm 85$  vs.  $203 \pm 49$  PU,  $p<0,05$ ) (*graf 2a, 2b*). Tento pokles nebyl pozorován u kontrolní skupiny, u které byly ve 180. minutě ve srovnání s pacienty s diabetem významně vyšší hodnoty bazální perfúze ( $181 \pm 107$  vs.  $111 \pm 42$  PU,  $p<0,05$ ) i PORHmax ( $323 \pm 89$  vs.  $203 \pm 49$  PU,  $p<0,001$ ). Pacienti s diabetem měli nalačno nižší PORHmax i PORHmax/t na prstu ve srovnání s kontrolní skupinou ( $240 \pm 67$  vs.  $297 \pm 97$  PU,  $p<0,05$  a  $21,5 \pm 11,6$  vs.  $57,7 \pm 31,4$  PU/s,  $p<0,001$ ) (*graf 2b, 2c*). Tyto rozdíly přetrvávaly i v 60. a 180. minutě testu.

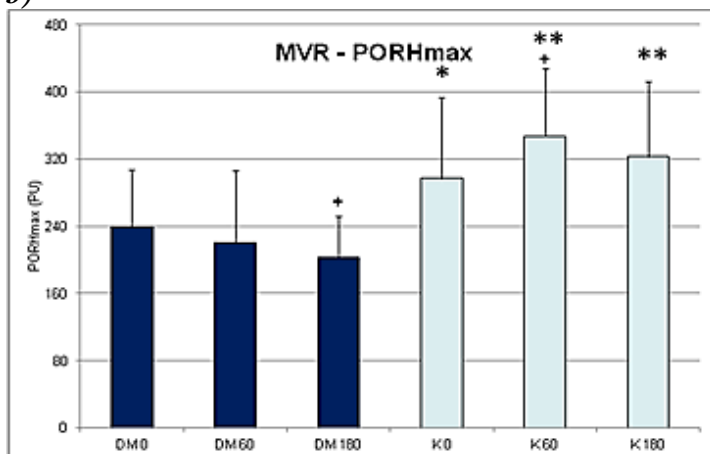
Parametry MVR korelovaly zejména ve 180. minutě s některými cytoadhezivními molekulami. Dále byl pozorován vztah mezi MVR a oxidačním stresem. U pacientů s diabetem bylo v 60. minutě testu nalezeno několik korelací mezi parametry MVR a inzulinémií. Koncentrace inzulinu pozitivně korelovala s bazálním průtokem na prstu ( $r=0,52$ ,  $p<0,05$ ), s PORHmax 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 DM a kontrolní skupinou významně nelišily.

**Graf 2.** 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).

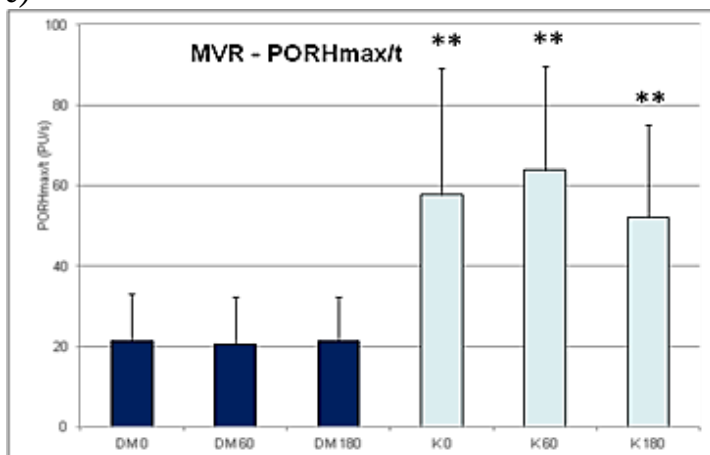
*a)*



*b)*



*c)*



Statistická významnost rozdílů mezi vstupními a následnými postprandiálními hodnotami po 60 a 180 min u pacientů s diabetem i v kontrolní skupině <sup>+</sup>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.

Výsledky selfmonitoringu, parametrů glykemické variability a parametrů inzulínové terapie ve studii porovnávající parametry glykemické variability s kompenzací diabetu a MVR u pacientů s diabetem 1. typu léčených inzulínovou pumpou jsou uvedeny v *tabulce 3*.

**Tabulka 3.** Parametry selfmonitoringu, glykemické variability a terapie inzulínem u pacientů s diabetem 1. typu léčených inzulínovou pumpou.

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

<b>Parametry glykemické variability</b>	
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

<b>Parametry inzulínové terapie</b>	
celková denní dávka inzulínu (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

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

## 5. 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. Po normalizaci sekrece kortizolu se všechny měřené parametry lipidogramu snížily na hodnoty srovnatelné s kontrolní skupinou. U pacientů s hyperkortizolémií jsme zaznamenali vyšší sérové koncentrace inzulínu, které dokazují přítomnost inzulínové rezistence, jak dokládá také zvýšený HOMA-R index. Inzulínová rezistence se po normalizaci hladin plazmatického kortizolu snížila stejně jako koncentrace inzulínu.

Hyperkortizolizmus je spojen se změnami fibrinolýzy. U pacientů s Cushingovým syndromem byla popsána hyperkoagulace a zvýšená incidence flebotrombóz a embolizací (9). 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 hyperkortizolemických pacientů s diabetem na inzulínoterapii, s obezitou a hypercholesterolémií. Změny v procesu fibrinolýzy u různých onemocnění úzce souvisí s endotelovou dysfunkcí (10) a výsledek naší studie ukázal přítomnost tohoto vztahu také u endogenního hyperkortizolizmu. Předpokládáme, že prokoagulační stav u pacientů s Cushingovým syndromem může být ovlivněn zvýšenou tělesnou hmotností a dysbalancí v metabolismu lipidů.

Glukokortikoidy inhibují produkci reaktivních forem kyslíku v hladké svalovině, jejich efekt tak může být protektivní (11). Na druhé straně častá přítomnost obezity u pacientů s Cushingovým syndromem je spojena se zvýšeným oxidačním stresem (12). Jak jsme předpokládali, v naší studii byla zjištěna vyšší koncentrace MDA u pacientů s Cushingovým syndromem. Aktivita Cu,Zn-SOD byla významně nižší v obou skupinách pacientů. 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.

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.

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 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 (13). V této studii byla výrazně snižená 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 izo- ani hyperglykemickém clampu žádný významný vztah. Toto zjištění je shodné s výsledky podobné studie Oomena *et al.* (14).

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 PORHtmax na prstu – pacienti s vyšší



koncentrací inzulínu v krvi tedy vykazovali rychlejší nástup maximální perfúze. Tyto výsledky naznačují, že vazodilatační efekt inzulínu může hrát významnou roli v regulaci perfúze mikrovaskulárního řečiště u pacientů s diabetem 1. typu. Při kontrolním vyšetření jsme nepozorovali žádné významné změny v parametrech MVR.

Důvod, proč jsme během clampu nezaznamenali významnou korelaci mezi inzulínémií 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 (15). Bazální perfúze na břišku prstu je obvykle několikanásobně vyšší než na ostatních místech těla, proto je snazší prokázat vazodilatační působení inzulínu sondou umístěnou na prstu.

Vyšetření biochemických parametrů během a po clampu neprokázalo významné změny ve 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 (16). 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 přívod většího množství tekutin do tělesného oběhu s metodou clampu neoddělitelně souvisí.

Hyperglykémie ovlivňuje hemokoagulaci a fibrinolýzu u pacientů s diabetem (17) i u zdravých osob (18). 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-sektinu, markeru aktivace krevních destiček (19), spojena s rychlejší vazodilatací při PORH na prstu i předloktí na konci clampu. Bohužel nemůžeme usuzovat, jestli to bylo v souvislosti s hyperglykémií, 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.

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

U pacientů s diabetem je postprandiální glykémie mimo jiné determinována stupněm inzulínové deficiencie a inzulínové rezistence i přítomnou léčbou perorálními antidiabetiky nebo inzulínem (20). Patologicky zvýšené hladiny glykémie po jídle jsou významným rizikovým faktorem vzniku kardiovaskulárních komplikací (21). Je známo, že postprandiální stav je spojen se sníženou funkcí endotelu, zvýšeným oxidačním stresem, zvýšenou aktivitou koagulačního systému a sklonem k vazokonstrikci (22, 23). Proto jsme v naší studii u pacientů s diabetem 2. typu předpokládali po příjmu potravy snížení MVR. Vliv příjmu potravy na MVR a postprandiální procesy v mikrovaskulárním řečišti dosud nebyly plně objasněny (24).

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.* (25), ve které bylo k hodnocení postprandiálního stavu mikrocirkulace využito metody FMD.

Výsledky naší studie naznačují, že i v postprandiálním stavu hraje významnou úlohu inzulínémie. Podle očekávání došlo u pacientů s diabetem i u kontrolní skupiny k postprandiálnímu vzestupu inzulínémie 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 inzulínémií. 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 inzulínu a MVR dokládá vazodilatační vliv inzulínu na mikrovaskulární řečiště. Pacienti s nejvyšší inzulínémií měli v 60. minutě testu nejvyšší bazální perfúzi a zároveň i nejvyšší absolutní hodnotu perfúze při PORH na prstu. Negativní korelace inzulínémie a procentuálního (relativního) vzestupu perfúze je dána matematickým výpočtem tohoto parametru (PORH%), který je vypočítáván jako  $PORH_{max}/\text{bazál}$ . 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 snížená 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 sníží tvorbu reaktivních forem kyslíku a sníží plazmatickou koncentraci ICAM-1 a PAI-1 (26). 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 (27).

Jak již bylo uvedeno, je u pacientů s diabetem zvýšená postprandiální glykémie a lipémie spojena se zvýšeným oxidačním stresem (28). 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 (29). Míra oxidačního stresu je však závislá na složení přijaté potravy. V podobně navržené studii, ve které byla podána snídaně s větším podílem tuků, byl u pacientů s diabetem pozorován signifikantní vzestup TG, VCAM-1 a CRP (25). 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 snídaně.

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 (30) 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<sub>1C</sub>. Z těchto výsledků můžeme usuzovat, že kompenzace diabetu s glykemickou variabilitou úzce souvisí.

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 (31, 32).

Dále jsme v naší studii neprokázali významný vztah mezi GV a mikroalbuminurií. Korelace nebyla nalezena ani mezi parametry GV a MVR. Tyto výsledky se shodují se závěry studie DCCT, ve které nebyla prokázána souvislost zvýšené GV s rizikem rozvoje vaskulárních komplikací u pacientů s diabetem 1. typu (33, 34). Stejně jako v jiných, podobně zaměřených studiích (35), 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 (36), neboť k řadě poklesů a vzestupů glykémie dojde mezi měřeními bez povšimnutí (37).

Další zajímavou studii na téma vztahu cévních komplikací a GV u pacientů s diabetem 1. typu publikoval Bragd *et al.* (38). GV zde byla rovněž vypočítána ze selfmonitoringu glykemií. 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 (37). Tyto závěry však nebyly potvrzeny další retrospektivní analýzou dat studie DCCT (34).

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 (36).

Naše studie byla pilotní, měla ověřit koncept výzkumu zaměřeného na glykemickou variabilitu. Její limitací byl nízký počet zahrnutých pacientů daný vstupními podmínkami (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.

## 6. Závěry

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 funkcí 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 nesespecifických 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<sub>1C</sub> a indexem HBGI a mezi HbA<sub>1C</sub> 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**

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.

## 7. 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. 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.
10. 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.
11. 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.
12. Vincent, H.K., Taylor, A.G. *Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans*. *Int J Obes*, 2005. **30**: 400-418.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. Undas, A., Wiek, I., Stépien, 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.



18. 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.
19. 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.
20. Beisswenger, P.J., Brown, W.V., Ceriello, A. et al. *Meal-induced increases in C-reactive protein, interleukin-6 and tumour necrosis factor  $\alpha$  are attenuated by prandial + basal insulin in patients with Type 2 diabetes*. *Diabet Med*, 2011. **28**(9): 1088-1095.
21. 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.
22. Triggle, 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.
23. 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.
24. 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.
25. 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.
26. 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.
27. 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.
28. 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.
29. 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.
30. 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.
31. 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.
32. Bruttomesso, D., Crazzolara, 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.
33. 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.

34. 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.
35. 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.
36. Siegelaar, S.E., Holleman, F., Hoekstra, J.B. et al. *Glucose variability; does it matter?* Endocr Rev, 2010. **31**(2): 171-182.
37. Šoupal, J., Prázný, M. *Glykemická variabilita*. Diabetes, metabolismus, endokrinologie, výživa, 2012. Přijato k publikaci.
38. 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.

## 8. Seznam publikací

### 1. publikace, které jsou podkladem dizertace

#### 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.

### 2. publikace bez vztahu k tématu dizertace

#### 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 těliska v thymu, popis případu a patofyziologický rozbor. Kazuistiky v diabetologii*, 2009. 7(2): 22-27.

### 3. 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.*