

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Studijní program: Biomedicína

Studijní obor: Fyziologie a patofyziologie člověka



MUDr. Tomáš Pelcl

Vztah oxidačního stresu k parametrům kompenzace diabetu při rozvoji cévních komplikací

Relationship of oxidative stress to parameters of diabetes control in development of vascular complications

DISERTAČNÍ PRÁCE

Soubor komentovaných prací

Praha 2020

Školitel: doc. MUDr. Martin Prázný, CSc., Ph.D.

Obsah:

1. Prohlášení o samostatném zpracování disertační práce a identifikační záznam...	2
2. Poděkování.....	3
3. Abstrakt.....	4
4. Abstract.....	5
5. Úvod.....	6
6. Cíle práce.....	37
7. Hypotéza.....	37
8. Metodika.....	37
9. Výsledky disertační práce.....	42
10. Diskuse.....	52
11. Závěry.....	54
12. Hlavní výsledky vědecké práce.....	55
13. Vlastní publikace autora.....	55
14. Použité literární zdroje.....	57
15. Seznam použitých zkratk.....	68
16. Přílohy.....	71

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval 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, dne 22.7.2020

MUDr. Tomáš Pelcl

Podpis:

Identifikační záznam:

PELCL, Tomáš. Vztah oxidačního stresu k parametrům kompenzace diabetu při rozvoji cévních komplikací [Relationship of oxidative stress to parameters of diabetes control in development of vascular complications]. Praha, 2020. 102 stran. Disertační práce. Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, 3. interní klinika. Školitel Prázný, Martin.

Poděkování: Děkuji především svému školiteli doc. MUDr. Martinu Práznému, CSc., Ph.D. za odborné vedení v průběhu celého studia a za trpělivost s dokončením této disertační práce. Děkuji také celé diabetologické skupině 3. interní kliniky, její členové mi byli velikou oporou a odborně i lidsky mi byli všichni nápomocní. Poděkování patří také všem kolegům ze 3. interní kliniky, kteří mi pomáhali v odborné přípravě. Chci rovněž poděkovat za podporu své rodině.

Abstrakt

Cílem této disertační práce je přispět k objasnění patogeneze chronických komplikací diabetu. Hlavním předmětem studia byla glykemická variabilita, její podíl na aktivaci oxidačního stresu a její případná úloha v procesu pokročilé glykace, to vše nad rámec samotné setrvalé hyperglykémie. Dalším cílem práce bylo přispět k objasnění možného vztahu mezi glykemickou variabilitou a rozvojem cévních komplikací diabetu.

Jako první jsme popsali souvislost mezi koncentracemi reaktivních aldehydů vznikajících při peroxidaci lipidů a poruchami kožní mikrovaskulární reaktivity u pacientů s diabetem 1. typu (DM1). Kromě zvýšených parametrů oxidačního stresu jsme v této skupině prokázali vyšší antioxidační aktivitu plazmy v rámci tříletého sledování. Tyto nálezy nebyly závislé na metodě monitorace glukózy, ani na rozdílné glykemické variabilitě, která byla nižší v podskupině používající kontinuální monitoraci glukózy v reálném čase (real-time glucose monitoring, rt-CGM), ve srovnání s podskupinou používající klasické glukometry. Samotná hyperglykémie při diabetu však zvýšený oxidační stres nepochybně navozuje.

Prezentované studie demonstrují významný klinický přínos užívání rt-CGM pro pacienty s DM1. V globálně nejdelsí observační studii pacientů s DM1 užívajících rt-CGM jsme prokázali, že použití rt-CGM zlepšuje nejen zavedené parametry kompenzace diabetu jako glykovaný hemoglobin a glykémie, ale také pomáhá dosáhnout nových terapeutických cílů, jako je snížení glykemické variability, prodloužení času stráveného v cílovém rozmezí glukózy a snížení výskytu hypoglykemií. Toto zlepšení je rychlé a dlouhodobé.

Zároveň jsme pozorovali i opačný proces, tedy že oxidační stres negativně ovlivňuje metabolismus glukózy a podílí se na rozvoji diabetu, jak jsme ukázali u pacientů s chronickou intoxikací 2,3,7,8-tetrachlordibenzo-*p*-dioxinem (TCDD), kteří měli zvýšené markery oxidačního stresu i vyšší prevalenci diabetu.

Prevence cévních komplikací diabetu je komplexní. Souvislosti mezi prostou hyperglykemií a glykemickou variabilitou na jedné straně a oxidačním stresem, pokročilou glykací a cévním poškozením na straně druhé, jsou komplexní a mohou být ovlivněny i dalšími dosud nepoznanými faktory. Nález srovnatelné výše markerů oxidačního stresu a antioxidační aktivity plazmy, které jsme zjistili i při rozdílné glykemické variabilitě, však nevylučuje rychlejší nebo závažnější progresi cévních změn. Takové studium bude vyžadovat delší časový interval sledování obou skupin pacientů s rozdílným monitoringem.

Klíčová slova: glykemická variabilita, oxidační stres, kontinuální monitorace glukózy, diabetes mellitus, endotelová dysfunkce, glykovaný hemoglobin, mikrovaskulární komplikace

Abstract

The aim of this thesis is to contribute to the clarification of the pathogenesis of chronic complications of diabetes mellitus. The main goal of the research was glycaemic variability, its contribution to the activation of oxidative stress and its possible role in the process of advanced glycation, all beyond the scope of persistent hyperglycaemia itself. Another aim of the work is to contribute to the clarification of a possible relationship between glycaemic variability and vascular complications of diabetes.

We were the first to describe the association between the concentrations of reactive aldehydes formed during lipid peroxidation and disorders of skin microvascular reactivity in patients with type 1 diabetes (DM1). Elevated markers of oxidative stress were found in this group, furthermore during the 3 years of follow-up higher plasma antioxidant activity was observed. These findings were not dependent of the method of glucose monitoring and glucose variability, which was lower in a subgroup of patients using real-time continuous glucose monitoring (rt-CGM), compared to a subgroup using conventional glucometers. However, it is clear, that hyperglycaemia alone induces increased oxidative stress in patients with diabetes.

Simultaneously we observed the opposite process of oxidative stress negatively affecting the glucose metabolism and contributing to the development of diabetes. This was demonstrated in patients with chronic 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) intoxication who had increased markers of oxidative stress, as well as a higher prevalence of diabetes.

The presented studies demonstrate a significant clinical benefit of the rt-CGM use in patients with DM1. In the world's longest observational study of patients with DM1 and rt-CGM use, we showed that the use of rt-CGM improved not only established parameters of glucose control, such as glycated haemoglobin and glycaemia, but also helped achieving new therapeutic goals, such as reduction of glycaemic variability, prolongation of time spent in the target glucose range and decrease of occurrence of hypoglycaemia. This improvement is rapid and long-term.

Prevention of vascular complications of diabetes is multifaceted. The relationships between simple hyperglycaemia and glycaemic variability on the one hand and oxidative stress, advanced glycation and vascular damage on the other hand are complex and may be influenced by factors not yet recognized. Findings of comparable levels of markers of oxidative stress and plasma antioxidant activity, which were found regardless of glycaemic

variability, do not rule out a faster or more significant progression of vascular changes. Such a study would require a longer time frame of observation of both groups with different types of glucose monitoring.

Key words: glycaemic variability, oxidative stress, continuous glucose monitoring, diabetes mellitus, endothelial dysfunction, glycated haemoglobin, microvascular complications

Úvod:

1. Diabetes a jeho komplikace

Diabetes mellitus (DM) je časté onemocnění postihující globálně přes 463 milionů osob [IDF Atlas 2019]. V České republice je v ročence Ústavu zdravotnických informací a statistiky (ÚZIS) za rok 2018 uvedeno 1 018 300 pacientů s DM [ÚZIS 2018]. Pacientů s diabetem 1. typu (DM1) je zaznamenáno kolem 7,3 % z celkového počtu diabetiků v ČR [Doporučený postup péče o diabetes mellitus 1. typu, ČDS 2016]. Typickým znakem neuspokojivě kompenzovaného DM jsou akutní komplikace spojené s aktuální vysokou nebo nízkou hladinou glykémie a chronické komplikace způsobené dlouhodobou expozicí hyperglykémie. Některé hypotézy naznačují také možný podíl kolísání glykémie (tzv. glykemické variability, GV) na rozvoji komplikací diabetu [Hirsch IB et Brownlee M 2005, Škrha J 2010, Šoupal J et al. 2014, Škrha J et al. 2016].

Z chronických komplikací se uplatňuje především cévní postižení orgánů, konkrétně specifické postižení očí, ledvin a nervového systému. Nejčastější diagnostikovanou komplikací DM v ČR je **diabetická retinopatie**. V roce 2013 mělo tuto komplikaci 11,9 % pacientů s DM, z čehož bylo 2,4 % postiženo praktickou slepotou. Ve vyspělých zemích je diabetická retinopatie a její komplikace nejčastější příčinou nově vzniklé slepoty u osob ve věku 20–74 let. Riziko oslepnutí u pacienta s DM je až 20x vyšší, než u osoby bez DM [Česká diabetologická společnost 2016 – Doporučené postupy pro diagnostiku a léčbu diabetické retinopatie]. Oční postižení se rozlišuje podle typu změn na sítnici na neproliferativní retinopatii, proliferativní retinopatii a na diabetický makulární edém. Spojujícím prvkem očního postižení je hyperglykémie, na kterou navazují metabolické cesty (oxidační stres, polyolová cesta, neenzymová glykace) vedoucí ke strukturálním a hemodynamickým změnám v mikrovaskulárním řečišti sítnice. Vzrůstá kapilární permeabilita, postupně dochází k obliteraci kapilár a ke vzniku oblastí s nedostatečnou perfúzí. Následná hypoxie je silným stimulem pro lokální tvorbu a sekreci mediátorů zánětu a

růstových faktorů vedoucích k nežádoucím neovaskularizacím, což se může u pacienta projevat zhoršením zraku. Významným faktorem ovlivňujícím diabetickou retinopatii jsou změny pigmentového epitelu sítnice a neurodegenerativní změny nervových a gliálních buněk sítnice [Česká diabetologická společnost 2016 – Doporučené postupy pro diagnostiku a léčbu diabetické retinopatie].

Další chronickou komplikací DM je **diabetické onemocnění ledvin**. V řadě rozvinutých zemí (Evropa, USA, Japonsko) představuje v současné době hlavní příčinu vzniku chronického selhání ledvin [American Diabetes Association 2020] s následnou nutností pravidelné dialýzy nebo transplantace ledvin. Iniciální změny se objevují v renálních glomerulech a okolním mezangiu s následnými změnami glomerulárních cév vedoucími až k postupnému zániku glomerulů. V patogenezi diabetického onemocnění ledvin se uplatňuje kombinace hemodynamických faktorů (hypertenze v glomerulech) spolu s metabolickým postižením cév z důvodů souvisejících s hyperglykemií.

Poškození ledvin se projevuje postupně narůstající albuminurií a/nebo postupným poklesem renální funkce. Častým a časným projevem diabetického onemocnění ledvin bývá zvýšené vylučování albuminu do moči. Albuminurie predikuje vývoj cévních změn, je markerem vyššího kardiovaskulárního rizika a parametrem endotelové dysfunkce [Česká diabetologická společnost 2019 – Doporučený postup Diabetes mellitus – Laboratorní diagnostika]. Bez cílené terapie (a často i přes ni) časem u velké části pacientů albuminurie přechází v proteinurii, která může dosahovat až nefrotických hodnot se ztrátami v řádu gramů bílkovin denně (>3,5 g/24 hod). Zároveň dochází k progresivnímu snižování glomerulární filtrace, které může skončit až v terminální fázi onemocnění ledvin a nutnosti použití náhradních očišťovacích metod a/nebo indikaci k transplantaci ledvin.

Diabetická neuropatie představuje poškození nervového systému z části v důsledku poškození cév, které zásobují nervová vlákna a také jako následek řady metabolických poruch přímo působících při hyperglykémii na nervová vlákna. Uplatňuje se zde neenzymová glykace, akumulace produktů pokročilé glykace, aktivovaná polyolová metabolická cesta, aktivace proteinkinázy C a porucha metabolismu ω -6 esenciálních mastných kyselin. Komplexní mechanismy navozují endotelovou dysfunkci a endoneurální hypoxii [Česká diabetologická společnost 2016 – Doporučený postup diagnostiky a léčby diabetické neuropatie]. Dvěma hlavními typy diabetické neuropatie jsou symetrická distální polyneuropatie a autonomní neuropatie.

Symetrická distální polyneuropatie postihuje predilekčně dlouhá nervová vlákna dolních končetin. Poruchy percepce tlaku, tepla, chladu a bolesti výrazně zvyšuje riziko vzniku syndromu diabetické nohy. Symetrická distální polyneuropatie se také může projevit naopak hypersenzitivitou, která vede k paresteziím, syndromu neklidných nohou nebo až k výrazné bolesti či pocitu pálení, často obtížně farmakologicky zvladatelným.

Diabetická autonomní neuropatie naproti tomu postihuje orgány inervované vegetativním nervovým systémem. U pacientů s delší dobou trvání diabetu se často vyskytuje kardiovaskulární autonomní neuropatie, která se projevuje klidovou tachykardií, nedostatečným zvýšením srdeční frekvence v reakci na zátěž a obecně horší tolerancí zátěže. Projevy mohou také zahrnovat ortostatickou hypotenzi a vyšší riziko arytmií, vedoucích až k náhlé smrti. Dalším orgánovým systémem postiženým autonomní neuropatií je gastrointestinální systém, v němž dochází k funkčním poruchám pasáže. Gastroparéza se projevuje zpomalenou evakuací žaludku, nevolností až zvracením. Postižení střeva může vyvolat funkční průjmy nebo naopak obstipaci. Autonomní poruchy urogenitálního systému se mohou manifestovat neurogenním močovým měchýřem, erektilní dysfunkcí, retrográdní ejakulací či dyspareunií. Může docházet ke sníženému prokrvení kůže a sliznic, vzniku suché kůže, poruch pocení a následné špatné toleranci teplotních výkyvů [Česká diabetologická společnost 2016, Doporučený postup diagnostiky a léčby diabetické neuropatie].

Další specifickou komplikací diabetu je syndrom diabetické nohy, který je hlavní příčinou (až ze 70 %) netraumatické amputace dolní končetiny [Česká diabetologická společnost 2016, Doporučený postup pro prevenci, diagnostiku a terapii syndromu diabetické nohy]. Jde o kombinaci neuropatie s ischemickým postižením a infekcí měkkých tkání nohy. Neuropatie zpravidla vede k poruše architektiky kloubů nohy a větší náchylnosti k jejímu poranění, které navíc kvůli sníženému vnímání bolesti v nohou postižený nemusí včas zaznamenat a léčebně řešit. Ischemická složka a infekce se dále významně podílí na horším hojení defektů.

Mezi chronické komplikace diabetu postihující velké cévy patří **akcelerovaná ateroskleróza**. Projevuje se jako častější výskyt ischemické choroby srdeční a ischemické cévní mozkové příhody, jako celosvětově hlavní příčiny úmrtí pacientů s DM [IDF atlas 2019] a je také častější příčinou ischemické choroby dolních končetin. Tyto aterosklerotické komplikace se také vyskytují u mladších pacientů ve srovnání s osobami bez DM.

Péče o pacienty s DM je finančně velmi nákladná, kolem 10-13 % veškerých světových nákladů na zdravotní péči jde na přímou nebo nepřímou péči o pacienty s DM [IDF

atlas 2019]. Naprostá většina těchto nákladů je vynaložena na léčbu komplikací spojených s DM.

Mezi **akutní komplikace** DM patří hypoglykémie, diabetická ketoacidóza a hyperosmolární hyperglykemický stav.

Glykémie pod 3,9 mmol/l je označována jako **hypoglykémie**. Tato hodnota byla stanovena jako nejnižší hodnota glykémie, při níž ještě nedochází k aktivaci kontraregulačních dějů. Hranice klinicky významné hypoglykémie je však podle Americké diabetické asociace (ADA) stanovena na 3,0 mmol/l. Závažná hypoglykémie pak není spojena s konkrétní hodnotou glykémie, ale spíše s neuroglykopenií a nutností pomoci další osoby. Hypoglykémie jsou časté především u pacientů s DM1. Ti jsou v naprosté většině případů léčeni intenzifikovaným inzulínovým režimem, což je režim spojený s nejvyšším rizikem hypoglykémie. Většinu lehkých hypoglykemií pacient rozpozná z příznaků, jako je třes, pocení, palpitace, nervozita nebo hlad a sám bývá schopen hypoglykémii léčebně zvládnout konzumací sacharidů. V některých případech (syndrom porušeného vnímání hypoglykemií, příliš rychlý nebo naopak příliš pozvolný pokles glykémie) však nemusí být příznaky rozpoznány a může dojít k symptomům neuroglykopenie: zmatenosti, neúčelnému jednání, poruše vědomí až kómatu a obecně neschopnosti danou situaci zvládnout bez pomoci další osoby (každá taková hypoglykémie je označována jako klinicky závažná).

Lehké hypoglykémie zhoršují především kvalitu života, závažné hypoglykémie bezprostředně ohrožují pacienta na životě v důsledku nedostatku glukózy jako energetického substrátu pro vitálně důležité orgány, především centrální nervový systém. Hypoglykémie se také podílejí na rozvoji endotelové dysfunkce a zvyšují oxidační stres [Peña AS et al. 2012]. Závažné hypoglykémie jsou spojovány s bezprostředně vyšším rizikem vzniku akutního koronárního syndromu u starších osob [Nishioka Y et al. 2019].

V rámci neodkladné první pomoci je proto nutné perorální podání rychle vstřebatelných sacharidů. V případech závažné hypoglykémie, nebo pokud pacient není schopen bezpečně polykat, je nutné podat glukózu parenterálně. V rámci laické první pomoci může poučená osoba také podat intramuskulární nebo subkutánní injekci glukagonu (nově lze glukagon podat jako prášek i nazálně). Korekce hypoglykémie pacientem požitím sacharidů je často přehnaná a vede k následné rychle nastupující hyperglykémii. Podobné extrémní oscilace glykémie mohou nastat i několikrát denně a značně se podílejí na vysoké GV.

Hyperglykémie je spojena s diabetem již na základě jeho definice. Klinicky významná hyperglykémie vyvolává typické příznaky, jako žízeň, polydipsii, polyurii a zvýšenou únavu. Dále může být přítomno hubnutí, zrakové poruchy a urogenitální infekce.

Pacienti však mohou být oligosymptomatictí nebo asymptomatictí, adaptovaní na hyperglykémii (včetně zvýšené renální absorpce glukózy, což snižuje stupeň glykosurie). Zejména se to týká pacientů s DM2, u kterých bývá nález hyperglykémie často náhodný.

Diabetická ketoacidóza je akutní komplikace diabetu. Vyskytuje se zejména u pacientů s DM1 v situacích s absolutním deficitem inzulínu. Může se projevit již při primomanifestaci DM1 ve chvíli, kdy pankreas není schopen produkovat dostatečné množství inzulínu a ještě nebyla zahájena substituční inzulínová terapie. Může vzniknout i u pacientů se známým diabetem při opomenutí nebo nesprávné aplikaci inzulínu, při technických komplikacích s inzulínovým perem nebo inzulínovou pumpou nebo v situacích výrazné inzulinorezistence, jako jsou horečnaté stavy, infekce, operace, rozsáhlé úrazy a podobně, pokud není adekvátně zvýšena dávka inzulínu. Ketoacidóza se projevuje zvýšenou koncentrací ketolátek, poklesem pH, hyperglykemií a v pokročilém stádiu výraznou dehydratací, nevolností, zvracením, dušností, poruchami vědomí až kómatem. V rámci terapie je nutná rehydratace, intravenózní inzulinoterapie, korekce minerálové dysbalance (substituce kalia) a v případě závažné acidózy podání bikarbonátu.

Hyperglykemický hyperosmolární stav je akutní komplikací charakterizovanou především extrémní hyperglykemií, dehydratací a hyperosmolaritou vnitřního prostředí. Vzniká při dekompenzaci DM2, například při delším vynechání antidiabetické léčby nebo při nedostatečné hydrataci zejména u starších pacientů. Projevuje se poruchou vědomí až kómatem a hypotenzí. V nejzávažnějších případech se může rozvinout hypovolemický šokový stav, který je spojen s relativně vysokou mortalitou. V rámci terapie je zásadní parenterální rehydratace a inzulinoterapie, postup léčby je podobný jako u diabetické ketoacidózy.

2. Mechanismy tkáňového poškození při hyperglykémii

A) Oxidační stres

Oxidační stres je jedním ze spojujících článků patogenetických pochodů vedoucích k cévním změnám u diabetiků. Oxidační stres je výraz pro nepoměr mezi tvorbou reaktivních forem kyslíku a dusíku (prooxidační mechanismy) a jejich eliminací enzymy a neenzymovými systémy (antioxidační mechanismy). Reaktivní formy kyslíku (Reactive Oxygen Species, ROS) jsou chemické sloučeniny s jedním nebo více nespárovanými elektrony ve valenční slupce, které snadno reagují s okolními molekulami. Mezi nejdůležitější reaktivní formy kyslíku patří peroxid vodíku, superoxidový anion a hydroxylový radikál. Peroxidační reakce nepříznivě ovlivňují četné buněčné funkce jednak přímým účinkem na

buněčné proteiny, lipidy a nukleové kyseliny, dále pak nepřímo přes signální dráhy zprostředkované receptory [Syslová K et al. 2014]. Hyperglykémie iniciuje zvýšení oxidačního stresu, který urychluje endotelovou dysfunkci a aterogenezi [Škrha J 2010].

1. Mechanismy vzniku reaktivních forem kyslíku

ROS jsou neustále tvořeny řadou endogenních procesů i za fyziologických okolností, například při oxidativní fosforylaci v dýchacím řetězci mitochondrií, nebo při fagocytóze bakterií a virů. U pacientů s DM je tvorba těchto reaktivních forem zvýšena, podobně jako u některých dalších stavů nebo onemocnění. Zvýšený oxidační stres tedy není specifický pouze pro DM. Zvýšený vznik ROS se vyskytuje za fyziologických stavů, kterými může být například gravidita [Leal CA et al. 2010] nebo stárnutí [Syslová K et al. 2014]. Především se však vyskytuje v souvislosti s patologickými stavy spojenými se zánětlivou odpovědí. Postihuje například pacienty s obezitou [Marseglia L et al. 2015], bronchiálním astmatem [Sahiner UM et al. 2011], či osoby po expozici cizorodým či toxickým látkám, například paracetamolu [Du K et al. 2016] nebo 2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-*p*-dioxinu [Pelclová D et al. 2011].

Hlavním místem vzniku ROS v cévách jsou mitochondrie, endoplazmatické retikulum, buněčná membrána a peroxisomy endotelových buněk, buněk hladké svaloviny a makrofágů [Moldovan L et Moldovan NI 2004]. Oxidační stres poškozují endotelové buňky, krevní elementy, fibroblasty i další buňky intersticia a extracelulární hmotu. To vede k funkčním a morfologickým změnám buněk i extracelulární hmoty a následně k poruše funkce orgánů. Struktura samotné glukózy umožňuje její snadnou interakci s proteiny (neenzymovou glykaci) alterací jejich vlastností, glukóza ale podléhá i procesu autooxidace (spontánní oxidace) za tvorby reaktivních meziproductů glykace (glyoxal, methylglyoxal), které dále přispívají ke vzniku reaktivních forem kyslíku [Škrha J 2010]. Dominantní postižení endotelu je dáno faktem, že endotelové buňky nejsou před hyperglykemií chráněny specifickými systémy, které se vyskytují například v příčně pruhovaném svalu a dalších orgánech. Ve svalu je intracelulární koncentrace glukózy řízená down-regulací transportérů pro glukózu GLUT4 prostřednictvím jejich endocytózy. V endotelu však glukóza prochází podle koncentračního spádu přes permanentně otevřené glukózové membránové transportéry GLUT1. Zvýšená koncentrace glukózy pak vede ke zvýšené glykolýze a následně nadměrné utilizaci pyruvátu v Krebsově cyklu, čímž se zvyšuje nabídka elektronů pro dýchací řetězec v mitochondriích. Hyperglykémie zde však prostřednictvím elektronových transportérů NADH (redukovaný nikotinamid adenin dinukleotid) a FADH₂ (flavin adenin dinukleotid) navozuje takové

přetížení, že gradient napětí na membráně dosáhne kritické hodnoty a dojde k zablokování komplexu III, jedné ze složek proteinů dýchacího řetězce. Elektronů pak alternativně vytvářejí z molekulárního kyslíku superoxidový radikál. Působením superoxidového radikálu se aktivuje polymeráza ADP-ribózy, která následně inhibuje glycerinaldehydfosfatát dehydrogenázu, klíčový enzym glykolýzy. Zablokuje se tím přeměna glukózy na pyruvát a hromadí se tak meziprodukty této hlavní metabolické dráhy glukózy (glukóza, fruktózo-6-fosfát, glycerinaldehyd-6-fosfát), čímž se zvyšuje jejich nabídka pro alternativní dráhy [Škrha J 2010]. Zvýšené plazmatické koncentrace nitrotyrozinu (3-NOTyr) byly nalezeny ve zvýšených koncentracích u pacientů s DM2 v porovnání s osobami bez diabetu [Ceriello A et al. 2002].

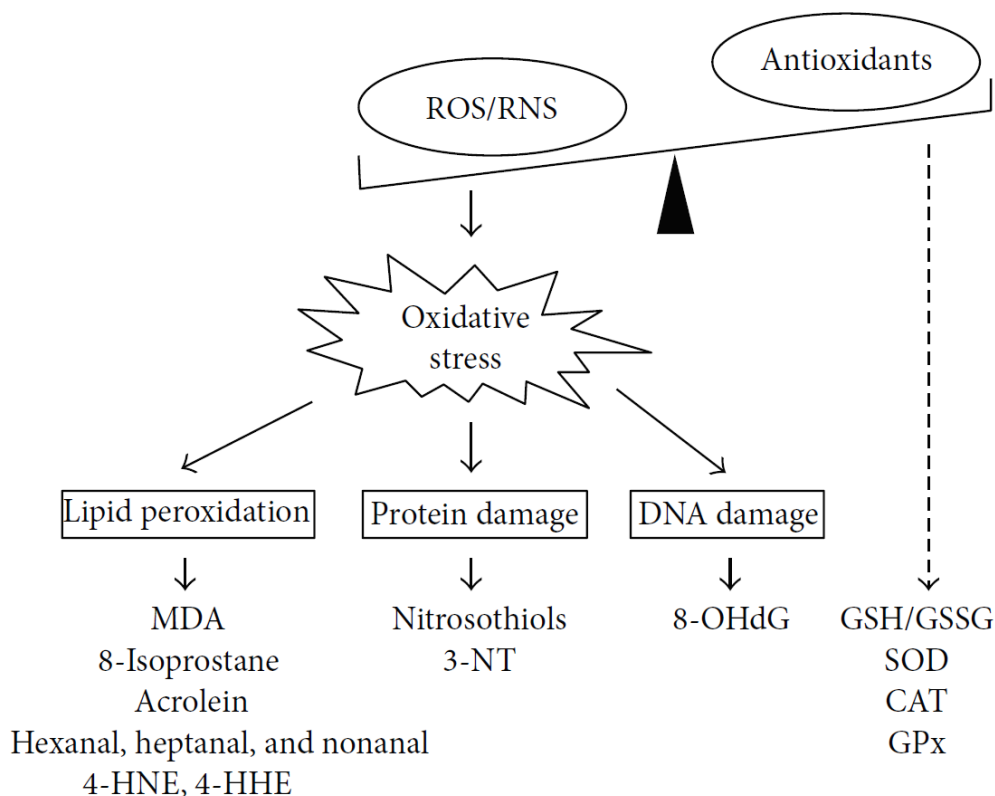
Kromě oxidace proteinů je pro membrány endotelu zásadní vliv volných radikálů na lipidy buněčných membrán - lipoperoxidace. K oxidaci jsou zvláště citlivé polynenasycené mastné kyseliny (například kyselina linolová a kyselina arachidonová) pro velké množství dvojných vazeb. Samotný proces lipoperoxidace se skládá z fáze iniciace, propagace a terminace. Ve fázi iniciace kyslíkový radikál odejme elektron z molekuly mastné kyseliny a přemění se ve vodu a lipidový radikál. Ten ve fázi propagace reaguje s molekulou kyslíku za vzniku lipidového peroxyradikálu reagujícího se sousední lipidovou molekulou. Dochází tak k řetězové reakci, membránové nestabilitě a k poruše její permeability. Na fázi propagace navazuje fáze terminace za přítomnosti antioxidantu, který poskytne vodíkový atom lipidovému peroxyradikálu [Ayala A et al. 2014]. Při reakci polynenasycených mastných kyselin s kyslíkem vzniká řada oxidačních produktů, především různé aldehydy. Oxidací vzniká například octanal (aldehyd C₈), nonanal (aldehyd C₉), decanal (aldehyd C₁₀), undodecanal (aldehyd C₁₁) a další aldehydy, které lze využít jako biomarkery oxidačního stresu.

Malondialdehyd (MDA) je konečný produkt peroxidace polynenasycených mastných kyselin z buněčných membrán. Je považován za spolehlivý indikátor lipidové peroxidace i za nepřímý marker oxidačního stresu [Ayala et al. 2014]. MDA má však kromě role markeru dekompozice polynenasycených mastných kyselin také významné aterogenní a kancerogenní vlastnosti, dané jeho reaktivitou s DNA a proteiny [Antus B 2016].

Při peroxidaci lipidů vznikají také další reaktivní aldehydy, jejichž koncentrace souvisí s oxidačním stresem, například 4-hydroxy-*trans*-hexenal (HHE) a 4-hydroxy-*trans*-nonenal (HNE), které tvoří kovalentní vazby s DNA a proteiny a mají tak genotoxický a cytotoxický potenciál [Antus B 2016, Syslová K et al. 2014]. Volný 8-iso-prostaglandin F_{2alfa} (8-

isoprostan) v plazmě i moči lze stanovit jako stabilní marker peroxidace lipidů z kyseliny arachidonové [Syslová K et al 2014].

Oxidací mohou být modifikovány také nukleové kyseliny. K oxidaci je z nukleových bází nejvíce náchylný guanosin. K posouzení míry oxidačního poškození DNA lze stanovit koncentraci 8-hydroxyguanosinu (8-OHG) a 8-hydroxy-2-deoxyguanosinu (8-OHdG). K posouzení oxidace RNA lze měřit koncentraci 5-hydroxymethyluracilu (5-OHMeU) [Antus B 2016].



Obrázek č. 1 - Příklady markerů oxidačního stresu podle jednotlivých forem tkáňové reakce na oxidační stres. ROS = reaktivní formy kyslíku, RNS = reaktivní formy dusíku, MDA = malondialdehyd, 5-HHE = D-hydroxyhexanal, 4-HNE = 4-hydroxynonenal, 3-NT = 3-nitrotyrosin, 8-OHdG = 8-hydroxy-2'-deoxyguanosin, SOD = superoxididismutáza, CAT = kataláza, GSH = glutathion, GSSG = glutathion disulfid, GPx = glutathion peroxidáza. Převzato z [Antus B 2016]

Oxidační stres v současné době nelze v živých organismech měřit přímo, vzhledem k nestabilitě molekul ROS. Je však možné stanovovat koncentrace biomarkerů oxidačního stresu, od kterých můžeme míru oxidačního stresu odvodit. Biologický poločas MDA je přes 20 dní [Siciarz A et al. 2001], což umožňuje jeho snadnější stanovení v krvi a dalších tělních tekutinách [Syslová K et al. 2014], než u ROS, kde je biologický poločas podstatně kratší.

Jednou z dalších metod měření ROS je stanovení derivátů reaktivních kyslíkových metabolitů (d-ROMs), při kterém se kvantifikují koncentrace peroxidu vodíku z krve. Využívá se při tom Fentonovy reakce. Molekuly peroxidu vodíku jsou při tomto vyšetření přeměněny na radikály, které dokáží oxidovat N, -N-diethyl-*p*-fenylendiamin, který je barevný a lze ho měřit spektrofotometricky. Pacienti s DM1 i DM2 mají obecně hodnoty biomarkerů oxidačního stresu v krvi zvýšené [Demircan N et al. 2008, Fatima N et al. 2016].

2. Antioxidační mechanismy

Lidský organismus disponuje řadou mechanismů, kterými snižuje míru oxidačního stresu. Porucha antioxidačních procesů má na výslednou míru oxidačního stresu podobně zásadní vliv jako zvýšení prooxidačních mechanismů. Antioxidační mechanismy se dělí na enzymové a neenzymové [Škrha J 2010]. Mezi **enzymové** se řadí působení **superoxiddismutázy** (SOD), která katalyzuje přeměnu superoxidu na peroxid vodíku. Existuje několik jejích podtypů, například -Cu, -Zn-SOD, která se nachází v cytosolu a mezimembránovém prostoru mitochondrií, dále Mn-SOD v mitochondriální matrix nebo mimobuněčná EC-SOD (extracellular SOD). Dalším antioxidačním enzymem je **kataláza** – enzym rozkládající peroxid vodíku, čímž brání tvorbě hydroxylového radikálu v mitochondriích. Tripeptid **glutathion** je ve své redukované podobě hlavním intracelulárním antioxidantem a jeho různé formy jsou metabolizovány řadou intracelulárních i extracelulárních enzymů, například glutathionperoxidázou, jejichž hlavní funkcí je redukce peroxidu vodíku za vzniku vody a přeměna lipidových hydroperoxidů na alkoholy. Dále se do reakcí s glutathionem zapojuje glutathiontransferáza, která se významně podílí na detoxikaci endogenních sloučenin (například peroxidovaných lipidů) a glutathionreduktáza, která redukuje disulfid glutathionu na jeho sulfhydrilovou formu.

Neenzymové systémy inaktivují ROS přeměnou na podstatně méně toxické produkty. Patří sem vitamin C, vitamin E, karotenoidy, bilirubin, kyselina močová, koenzym Q10 a některé peptidy a glykoproteiny (glutathion, transferrin, ferritin, haptoglobin, ceruloplazmin) [Marrazzo G et al. 2014]. Řadu těchto látek lze v séru změřit. Komplexnější pohled však přináší měření celkového antioxidačního účinku krevní plazmy. Antioxidační účinek krevní plazmy se vyjadřuje jako kapacita plazmy redukovat specifický substrát (neboli poskytnout elektrony - například volným radikálům).

Některé molekuly, například ionty železa, se mohou vyskytovat ve více stavech (konkrétně Fe^{3+} a Fe^{2+}), které mají odlišnou schopnost vazby na okolní molekuly. Vzniklé barevné změny lze hodnotit fotometricky (například vazbu Fe^{2+} na thiocyanát, projevující se

červenou barvou). Tento jev se používá při stanovení plazmatických antioxidantů (Plasma Antioxidant Test, PAT), kdy se měří koncentrace antioxidantů rozpustných ve vodě, schopných redukovat Fe^{3+} na Fe^{2+} . U pacientů s DM2 byla zjištěna výrazně nižší celková antioxidační kapacita hodnocená parametrem Total Antioxidant Status (TAS) [Ford ES et al. 2003, Demircan N et al. 2008], současně s významně zvýšenou koncentrací peroxidů a dalších biomarkerů oxidačního stresu [Demircan N et al. 2008].

B) Neenzymová glykace a produkty pokročilé glykace

Produkty pokročilé glykace (Advanced Glycation Endproducts, AGEs) jsou konečné produkty **neenzymových reakcí** mezi glukózou a okolními molekulami (glykace), konkrétně s proteiny, nukleovými kyselinami a lipidy. Molekuly AGEs vznikají v konečné fázi Maillardovy reakce. Proces glykace proteinů je podmíněn přítomností volných aminoskupin v molekule proteinu. V počáteční fázi glukóza reaguje s aminoskupinou proteinu, vzniká labilní aldimin typu Schiffovy báze (časný produkt glykace). Ten se dále mění během několika dní na podstatně stabilnější Amadoriho produkty, které mají charakter ketoaminu. Mezi Amadoriho produkty patří například glykovaný hemoglobin HbA_{1c} nebo fruktosamin [Da Moura Semedo C et al. 2017]. Obě tyto reakce jsou reverzibilní a koncentrace ketoaminů lze snížit normalizací glykémie. Ve třetí fázi (pokročilá glykace) Amadoriho produkty během týdnů až měsíců nezávisle na přítomnosti glukózy, pozvolna degradují za vzniku reaktivních dikarbonylových sloučenin, které se již ireverzibilně mění na AGEs [Da Moura Semedo C et al. 2017].

Glykace významně ovlivňuje funkce proteinů, nukleových kyselin a lipidů změnou jejich molekulární struktury, usnadňuje vznik křížových vazeb a mění aktivitu postižených enzymů. Ukládání AGEs kromě toho postihuje buňky nepřímo v důsledku změn v biotransformaci i ovlivněním transkripčních faktorů.

Glykace postihuje především proteiny s dlouhým biologickým poločasem. Glykace strukturálních proteinů kolagenu a elastinu vede ke snížené elasticitě cévní stěny [Zieman SJ et al. 2007, Yoshinaga E et al. 2012]. Dále AGEs ovlivňují řadu enzymových dějů v buňce vazbou na specifické proteiny, které se uplatňují jako receptory pro AGEs (RAGE). Aktivace těchto receptorů vede k následné aktivaci zánětlivé reakce zvýšenou expresí genů pro růstové faktory a cytokiny. Jde o interferon gama ($\text{IFN}\gamma$), platelet derived growth factor (PDGF), tumor necrosis factor alfa ($\text{TNF}\alpha$), interleukin 1 (IL-1) a cytoadhezivní molekuly intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1), P-selektin a E-selektin.

AGEs aktivují nukleární faktor κ B (NF- κ B), který indukuje řadu růstových faktorů, například tumor growth factor beta (TGF-beta) a vascular endothelium growth factor (VEGF). AGEs také indukují expresi inhibitoru tkáňového aktivátoru plasminogenu (plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1) a stimulují expresi cytoadhezivních molekul v endotelu (endotelin-1) [Giardino I et al. 1994, Hofmann MA et al. 1999, Basta et al. 2002, Haslbeck KM et al. 2005].

Významné je uplatnění solubilní formy RAGE (sRAGE), která patrně brání nadměrné aktivaci RAGE [Katakami N et al. 2008, Vazzana N et al. 2009, Yan SF et al. 2010]. Stanovení koncentrace sRAGE v krvi se využívá jako nepřímého ukazatele glykace.

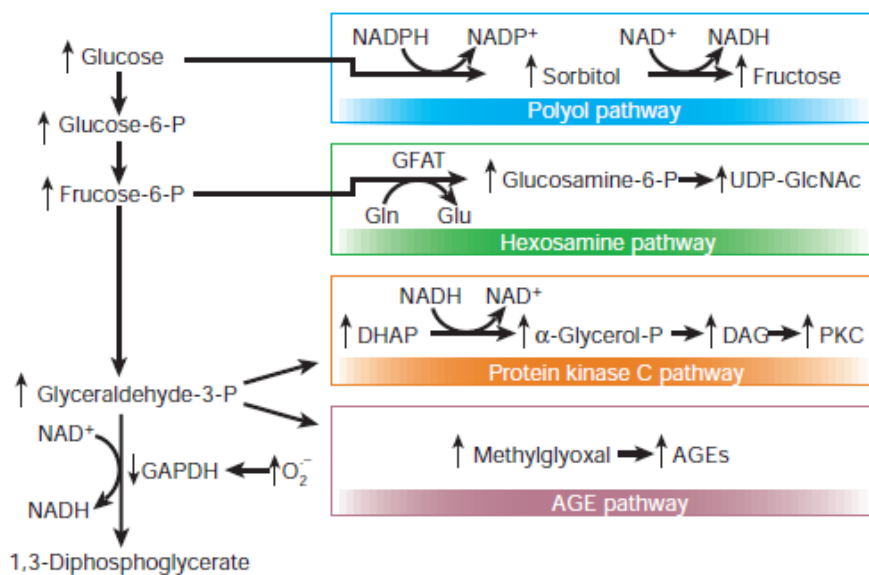
Míra akumulace AGEs v tkáních může být přesnějším prediktorem rozvoje chronických diabetických komplikací než je v rutinní praxi měřený HbA_{1c}, protože odráží dlouhodobé kumulativní působení hyperglykémie. Koncentrace AGEs zjištěná z kožní biopsie byla lepším prediktorem vzniku a progresu diabetického onemocnění ledvin, než koncentrace HbA_{1c}, podle analýzy podskupiny pacientů ve studii DCCT/EDIC [Genuth S et al. 2005]. Míru akumulace AGEs lze přímo stanovit pomocí kožní biopsie, tato invazivní metoda se však což je však zřídka využívána invazivní metoda.

Měření kožní autofluorescence je instrumentální metoda neinvazivně detekující akumulaci AGEs v kůži a tím nepřímo odrážející míru glykace v celém organismu. Vychází z poznatku, že některé AGEs kumulované v kůži vykazují fluorescenční vlastnosti. Měří se záření emitované molekulami AGEs poté, co jsou excitovány ultrafialovým zářením [Da Moura Semedo C et al. 2017]. Tuto metodu používáme i na našem pracovišti. Koreluje se stanovením AGEs z kožních biopsií [Meerwaldt R et al. 2004]. Proti zdravým kontrolám, byly u pacientů s DM1 a DM2, zejména u těch, kteří měli albuminurii, nebo u pacientů se zvýšenými markery endotelové dysfunkce (ICAM-1, VCAM-1), zjištěny významně vyšší hodnoty kožní autofluorescence. Také byla zjištěna pozitivní korelace mezi autofluorescencí a sRAGE [Škrha J et al. 2013]. Kožní autofluorescence byla vyšší u pacientů s diabetem s vyšším rizikem rozvoje pozdních komplikací (diabetické onemocnění ledvin a neuropatie) [Gerrits E et al. 2008].

C) Aktivace proteinkinázy C (PKC)

Zvýšená intracelulární koncentrace glukózy indukuje vznik diacylglycerolu (DAG) z membránových fosfoinositidů. DAG je buněčný druhý posel, který aktivuje PKC. Aktivovaná PKC indukuje expresi růstových faktorů, například VEGF, mediátor angiogeneze a permeability cévní stěny, dále endotelin-1, TGF-beta a PAI-1. PKC také zasahuje do exprese

transkripčního faktoru NF- κ B, což vede ke změnám v expresi proteinů prozánětlivé odpovědi – cytokinů, chemokinů a adhezivních molekul. NF- κ B ovlivňuje proliferaci a ve svém důsledku zvyšuje tloušťku bazální membrány, což představuje typický znak cévního poškození u pacientů s diabetem [Chen S et al. 2003]. Zesílení bazální membrány může komplikovat vstup kyslíku a prohlubuje tkáňovou hypoxii. PKC také snižuje expresi endotelové NO-syntázy [Brownlee M 2001] a aktivuje oxidázu NADPH (redukovaný nikotinamid adenin dinukleotid), čímž se dále zvyšuje tvorba ROS. Hyperglykémie také aktivuje PKC nepřímo vazbou na RAGE a zvýšením aktivity polyolové cesty. Také samotný superoxid aktivuje PKC.



Obrázek č. 2 – Alternativní metabolické dráhy glukózy aktivované při hyperglykémii, převzato z [Brownlee M 2001]

D) Polyolová (sorbitolová) dráha

Polyolová dráha je jedním z dalších alternativních způsobů metabolismu glukózy. Za euglykémie se uplatňuje jen omezeně. Při hyperglykémii je však nabídka glukózy jako substrátu pro tuto alternativní enzymovou přeměnu glukózy na sorbitol tak veliká, že se uvažuje o jejím významném přídavném podílu na buněčném poškození. Pomocí aldózo-reduktázy vzniká z glukózy sorbitol. Ten může být dále oxidován za vzniku fruktózy. Při oxidaci sorbitolu rovněž dochází k vzniku prekurzorů AGEs a ke vzniku DAG, který dále aktivuje PKC. Oxidací sorbitolu se také spotřebovává NADPH, kterého pak není dostatek k redukci glutathionu, což může zvyšovat úroveň oxidačního stresu. Sorbitol má významný osmotický efekt, který se může podílet na vzniku chronických diabetických komplikací,

především očních [Česká diabetologická společnost 2016 – Doporučené postupy pro diagnostiku a léčbu diabetické retinopatie].

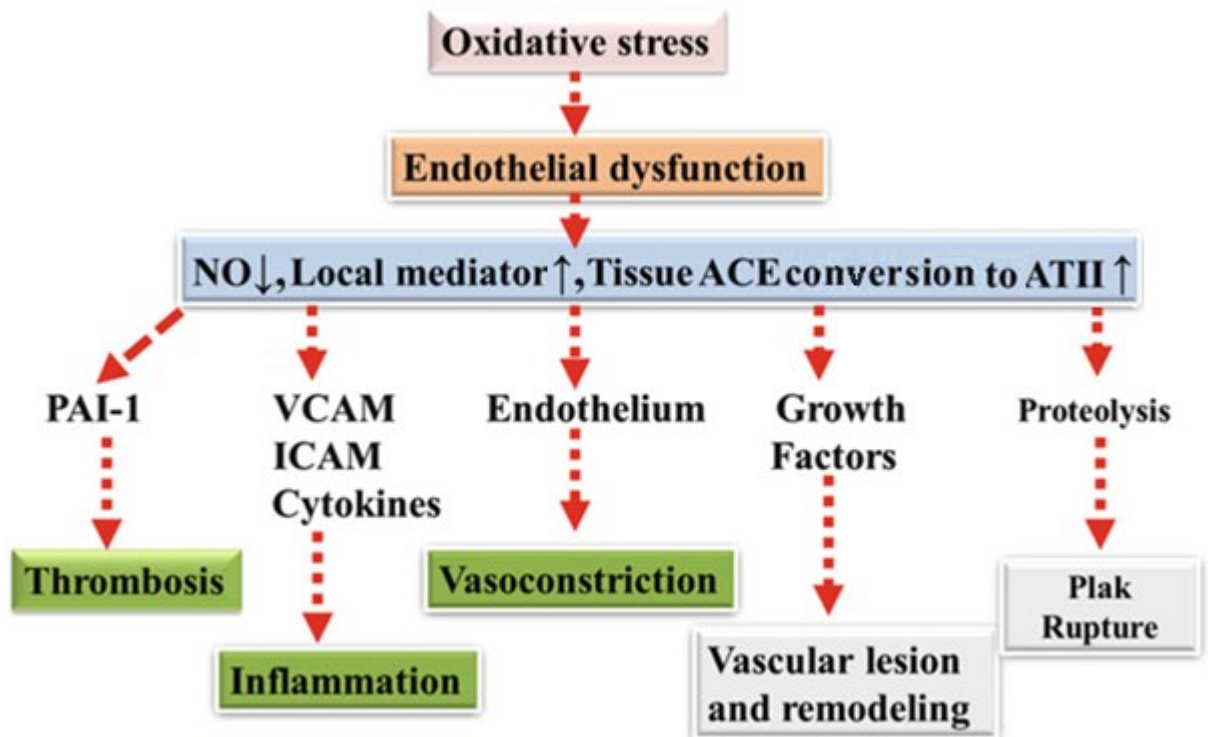
E) Hexosaminová dráha

Zvýšená intracelulární koncentrace glukózy vede k nadměrné tvorbě glukosamin-6-fosfátu, prekursoru derivátů hexosaminu. Hexosaminy se následně podílejí na biosyntéze buněčných regulačních proteinů, vedoucích mimo jiné také k hyperinzulinémii a následně ke zvýšené inzulinové rezistenci. Tyto regulační proteiny ovlivňují genovou expresi a indukují například zvýšenou tvorbu PAI-1 a TGF-beta [Brownlee M 2001].

3. Specifické mechanismy cévního postižení

Poruchy vazodilatace

Jednou ze základních rolí endotelu je schopnost přizpůsobovat hemodynamické funkce cévního řečiště aktuálním potřebám organismu prostřednictvím regulace tonu hladké svaloviny cév. Pokud je tato funkce endotelu narušena, hovoříme o endotelové dysfunkci. Endotelová dysfunkce je reverzibilní a předchází morfologickým aterosklerotickým změnám cév [Maruhashi T et al 2018]. Většina vyšetření posuzujících funkci endotelu spočívá v posouzení změn průtoku krve ve vybraném cévním řečišti po stimulaci, která má vést k vazodilataci. Narušená schopnost vazodilatace odráží přítomnost endotelové dysfunkce. Porucha vazodilatace může být vyvolána poruchou endotelu, neadekvátní reakcí hladké svaloviny na stimulaci, určitou roli mohou hrát i lokální axonové reflexy. K rozlišení endotelové dysfunkce od dysfunkce hladké svaloviny se hodnotí vazodilatace závislá nebo nezávislá na endotelu (endotel-dependentní a endotel-independentní). Endotel-independentní vazodilataci je možno hodnotit například po podání nitroglycerinu, nitroprusidu sodného nebo isosorbid dinitrátu. U osob s rizikovými faktory pro kardiovaskulární onemocnění nebo s již přítomným kardiovaskulárním onemocněním je cévní poškození komplexní a zahrnuje jak složku závislou na endotelu, tak i složku na endotelu nezávislou. Předpokládá se zde vliv působení ROS i na hladkou svalovinu cév většího kalibru. ROS ovlivňuje nejen produkci NO v endotelu, ale i buněčnou signalizaci a relaxační odpověď hladkého svalstva na NO [Maruhashi T et al 2018].



Obrázek č. 3 - Mechanismy cévního poškození navozeného oxidačním stresem, podle [Konukoglu et Uzum 2017]

Vazodilatační účinek inzulínu

Inzulín má kromě účinků na metabolismus glukózy také významný podíl na regulaci mikrocirkulace. Inzulín ovlivňuje cévní tonus řadou vazokonstrikčních i vazodilatačních mechanismů. Inzulínem zprostředkované signální dráhy endotelu regulující produkci NO jsou příbuzné metabolickým signálním drahám cílových tkání pro inzulín (kosterní svalovina, tuková tkáň). Inzulínem zprostředkovaná vazodilatace je zprostředkována stimulací endotelové NO syntázy, což vede ke zvýšenému průtoku kapilárami, který se otevírá větší počet (kapilární „recruitment“ po vazodilataci terminálních arteriol), i k celkovému zvýšení prokrvení kosterní svaloviny. Tím se zlepšuje dostupnost a utilizace glukózy v cílových tkáních. Inzulín se tak za fyziologických okolností podílí na zajištění metabolické i hemodynamické homeostázy.

Kromě vazodilatačního působení zprostředkovaného NO aktivuje inzulín také Ras/MAPK-dependentní signální dráhu vedoucí k aktivaci vazokonstriktoru endotelinu-1 [Meza et al. 2019]. Inzulín také aktivuje sympatický nervový systém, který má mimo jiné vazokonstrikční účinky, dále inzulín stimuluje renální reabsorpci natria, což může přispívat k arteriální hypertenzi. Za fyziologických okolností však vazodilatační účinek inzulínu převažuje [Meza CA et al.2019].

U DM1 jsou systémové koncentrace exogenně podávaného inzulínu často vyšší než za fyziologických okolností, což může vůči fyziologickému stavu měnit perfúzi svalovou a tukovou tkání. U DM2 hraje výraznou roli inzulínová rezistence, která vede k hyperinzulinémii. Pacienti s DM2 a s obezitou, kteří mají hyperinzulinémii při inzulinorezistenci, mají zvýšené koncentrace endotelinu-1 [Kalani M 2008]. V důsledku inzulínové rezistence převažuje vazokonstrikce nad vazodilatačními faktory, což se může podílet na rozvoji arteriální hypertenze, aterosklerózy a dalších cévních komplikací [Vincent MA 2003]. Inzulínová rezistence tedy ovlivňuje nejen metabolismus glukózy, ale i mikrovaskulární reaktivitu (MVR), která může být detekována ještě dříve, než se rozvine porucha glukózového metabolismu.

Poruchy a biologická dostupnost NO

Oxid dusnatý zásadním způsobem reguluje cévní tonus myorelaxačním působením na hladkou svalovinu cév. NO syntetizuje endotelová NO-syntáza (eNOS). NO je tak považován za endotel-dependentní vazodilatátor. Enzym eNOS se aktivuje jednak mechanickými silami smykového tření proudu krve a hypoxií, jednak v krvi přítomnými eNOS-agonisty jako je acetylcholin, nitroprusid sodný, bradykinin, ATP, nebo substance P. Tyto látky aktivují membránový transportér pro vápníkové a draselné ionty, který transportuje vápníkové ionty z krve do endotelu. Vápník je nutný ke změně konformace kalmodulinu – ten pak může aktivovat eNOS. Inzulín aktivuje eNOS odlišnou metabolickou cestou, přes inositol trifosfát (IP3), bez účasti vápník-draselného transportéru. Samotný NO vzniká z L-argininu a kyslíku působením eNOS za účasti kofaktoru tetrahydrobiopterinu a kofaktoru NADPH. Z buňky endotelu se NO dostává difúzí k myocyту cévní stěny. Tam stimuluje guanylátcyklázu, což vede ke zvýšení koncentrace cyklického guanosin monofosfátu (cGMP) a následnou relaxaci svalových vláken [Mordi I et al. 2016].

Kromě vazodilatačních účinků má NO i silně antiaterogenní účinky, snižuje agregaci a aktivaci trombocytů i adhezi leukocytů k cévní stěně a inhibuje proliferaci hladké svaloviny v cévách. Snižuje permeabilitu a inhibuje syntézu cytoadhezivních molekul [Verma S et al. 2003]. Bylo prokázáno, že nižší koncentrace NO vedly k poruchám neovaskularizace v myokardu [Zhao X et al. 2002].

Tvorbu NO potlačuje oxidační stres. Za patologických situací dochází k snížené produkci NO v endotelu, kdy se významně uplatňuje „uncoupling“ NO (odpřažení). Endotelová NO syntáza je „odpřažena“ a místo tvorby NO dochází k tvorbě superoxidu. Superoxid snižuje aktivitu eNOS oxidací kofaktorů eNOS a reakcí s přítomným NO za tvorby

peroxynitrilového radikálu (reaktivní forma dusíku navozující nitrilový stres), čímž se dostupnost NO dále snižuje. Peroxynitrilový radikál je nestabilní molekula, oxidující eNOS [Meza CA et al. 2019]. Peroxynitrilový radikál také reaguje s tyrozinem v proteinech endotelu za vzniku 3-NOTyr, který má cytotoxické účinky. Jeho koncentrace jsou u pacientů s DM2 zvýšené v porovnání se zdravou populací [Ceriello A et al. 2002]. Exprese eNOS je také inhibována hyperglykemií akcelerovanou tvorbou AGEs [Williams SB et al. 1998].

Jedním z důvodů snížené produkce NO z eNOS je deficit tetrahydrobiopterinu, jednoho z kofaktorů eNOS [Wu G et Meininger CJ 2009, Meza CA et al. 2019]. Zvýšené koncentrace peroxynitrilového radikálu spolu se superoxidem oxidují tetrahydrobiopterin na neaktivní dihydrobiopterin [Meza CA et al. 2019]. Při deficitu tetrahydrobiopterinu není enzymová redukce molekulárního kyslíku spřažena s oxidací L-argininu a eNOS vytváří superoxid. Pro funkci eNOS je dále klíčová dostatečná koncentrace argininu. Arginin je jednak substrátem pro vznik samotného NO, dále také stimuluje tvorbu tetrahydrobiopterinu. U pacientů s DM byly popsány nižší koncentrace argininu, pravděpodobně vlivem nižší endogenní syntézy [Wu G et Meininger CJ 2009].

Dále aktivitu eNOS snižuje glukosamin, který inhibuje pentózový cyklus a netvoří se tak dostatek NADPH, dalšího kofaktoru eNOS. Glukosamin vzniká z glukózy a L-glutaminu, ve větší míře především při hyperglykémii. Glukosamin se podílí na inzulinorezistenci, snižuje prokrvení kosterní svaloviny a translokaci GLUT4 [Wu G et Meininger CJ 2009], což vede ke snížené utilizaci glukózy v kosterním svalu.

Pro tvorbu NO je dále zásadní správná funkce oxidáz NADPH. Oxidázy NADPH jsou membránové enzymové komplexy považované za významné stimulatory produkce ROS v buňkách endotelu a to především při hyperglykémii. Za fyziologických okolností mají tyto ROS především úlohu buněčných posílů, zprostředkovávajících biologické procesy jako je například endotelová angiogeneze. Následně jsou tyto ROS neutralizovány glutathion peroxidázou [Meza CA et al. 2019]. Při soustavné hyperglykémii však tvorba ROS převyší antioxidační rezervy endotelu a dochází k oxidačnímu poškození, které se projeví i nižší schopností endotelu produkovat NO. Ještě více jsou ROS generovány při kolísajících glykemiích než při setrvalé hyperglykémii [Meza CA et al. 2019].

Nepoměr mezi vazodilatačními a vazokonstrikčními faktory

Endotel není pasivní bariéra mezi krví a cévou, jde spíše o komplexní orgán produkující řadu vazoaktivních látek, které ovlivňují cévní tonus podle proměnlivých nároků organismu. Efekt inzulínu na hladkou svalovinu cévní stěny je vyvážen řadou

kontraregulačních mechanismů, které zajistí udržení cévního tonu jak při bazálním stavu (lačnění), tak při vazodilatačním působení inzulínu postprandiálně [Meza CA et al. 2019]. Tyto mechanismy fungují v součinnosti se sympatickou nervovou soustavou, která hladkou svalovinu cév rovněž reguluje.

Z vazodilatačních molekul tvoří endotel kromě NO také prostacyklin a endothelium derived hyperpolarizing factor (EDHF). Dále je endotel místo, kde vznikají vazokonstrikční látky (tromboxan A₂, endotelin-1 a angiotensin II) [Maruhashi T et al 2018].

Endotelová dysfunkce se projevuje změnou produkce a působení těchto vazoaktivních látek. Při endotelové dysfunkci je tvorba NO snížena do takové míry, že může převážit vazokonstrikční efekt endotelinu-1. Snížení NO ale působí i kompenzačně zvýšenou tvorbu prostacyklinu, který má podobně jako NO vazodilatační a protidestičkové účinky.

Prostacyklin a tromboxan A₂ jsou oba tvořeny z kyseliny arachidonové a jsou převážně antagonisté. Receptory pro prostacyklin jsou lokalizované na trombocytech a v hladké svalovině. Aktivace receptorů na trombocytech vede k inhibici agregace trombocytů. Na hladkou svalovinu cév působí prostacyklin vazodilatačně. Prostacyklin se tvoří ve zvýšené míře kompenzačně při snížené produkci NO. Tromboxan A₂ zvyšuje agregaci trombocytů a vazokonstrikci [Konukoglu et Uzum 2017].

Endotelin-1 je významným vazokonstriktorem. Jeho syntéza a uvolňování jsou stimulovány zánětem (interleukiny a TNF-alfa) a inzulínem a snižovány NO a prostacykliny. Receptory pro endotelin-1 se vyskytují na endotelu a hladké svalovině. Endotelin-1 působí také prozánětlivě (aktivuje makrofágy, uvolňuje volné radikály), což přispívá k endotelové dysfunkci. Osoby s hyperinzulinémií při DM2 mají vyšší koncentrace endotelinu-1 v krvi a tato koncentrace korelovala s přítomností mikrovaskulárních diabetických změn i tloušťkou intimo-mediální vrstvy karotid [Kalani M 2008, Wang M et al. 2019].

Arteriální hypertenze

Arteriální hypertenze je přímo spojována s endotelovou dysfunkcí. Systémová arteriální hypertenze zvyšuje smykové napětí a tření v cévách, což mechanicky poškozuje endotel a vede k endotelové dysfunkci a posléze i ke strukturálním změnám cévní stěny. Pacienti s arteriální hypertenzí mají ve studiích zvýšené parametry endotelové dysfunkce. U normotenzních pacientů má endotelová dysfunkce prognostický význam pro rozvoj arteriální hypertenze v pozdějších letech. Antihypertenzní medikace v řadě studií vedla ke snížení jak krevního tlaku, tak markerů endotelové dysfunkce, i když výsledky nebyly vždy jednoznačné

[Mordi I et al. 2016, Konukoglu et Uzum 2017]. Zda jsou změny krevního tlaku převážně následkem nebo spíše příčinou endotelové dysfunkce, není v tuto chvíli jasné. Je však vysoce pravděpodobné, že se oba tyto faktory vzájemně silně ovlivňují.

Poruchy lipidového spektra

Rozvoj endotelové dysfunkce a aterosklerózy souvisí s dyslipidémií, především s vysokými koncentracemi cholesterolu vázaného v LDL-částicích (low density lipoprotein). LDL-částice se váží na tzv. scavengerové receptory na makrofázích, které vycestovaly do cévní stěny a následně se uvnitř těchto makrofágů hromadí. Tyto receptory na makrofázích mají vysokou afinitu zejména k oxidovaným LDL částicím (ox-LDL). Ox-LDL jsou částice změněné oxidací lipidových molekul a proteinů. Jako produkt peroxidace mastných kyselin v částici LDL vzniká MDA. Při akumulaci ox-LDL v makrofázích se mění jejich struktura a biologické funkce a makrofágy již nejsou schopny opustit cévní stěnu, označují se pak jako pěnové buňky. Předpokládá se, že především ox-LDL částice přispívají ke vzniku aterosklerotických lézí. Ke konverzi LDL-částic na ox-LDL dochází především v subendotelovém prostoru, kde LDL-částice nejsou chráněny antioxidačními vlastnostmi krevní plazmy [Steinberg D et al 1989].

U pacientů s DM bývá dyslipidémie přítomna častěji, než ve zdravé populaci. Hyperglykémie je spojena s vyšší koncentrací ox-LDL [Yamada T et al 2020]. Navíc diabetickou dyslipidémií charakterizuje přítomnost zvýšené koncentrace aterogenních lipoproteinů dalších tříd, například intermediate-density-lipoproteinu (IDL) a remnantních částic. Statiny snižují koncentraci LDL-cholesterolu i ox-LDL [Ogawa K et al 2015]. Při posuzování celkového rizika rozvoje endotelové dysfunkce a aterosklerotických změn je tedy nutno vzít v úvahu komplexní posouzení lipidového spektra.

Kouření

Kouření je dalším z prokázaných rizikových faktorů pro endotelovou dysfunkci a aterosklerotické postižení cév. Přímý vliv na cévní choroby potvrdila řada studií, mimo jiné již Framinghamská studie [Dawber TR et al. 1963]. Kouření působí na cévní stěnu mnoha faktory. Narušuje vazomotorické funkce endotelu, snižuje poddajnost cévní stěny, zvyšuje tvorbu ROS, ovlivňuje lipidové spektrum a souvisí i s vyššími koncentracemi ox-LDL [Ogawa K et al 2015]. Vlivem kouření dochází ke snížení produkce NO v endotelu., zvyšuje se tloušťka intimo-mediální vrstvy a dochází k poruše vazodilatace zprostředkované průtokem

(Flow Mediated Dilatation – FMD – více viz Metody hodnocení cévního poškození) [Aschermann M et al 2010]. Kouření je silným a nezávislým rizikovým faktorem pro rozvoj aterosklerózy, o to významnějším, že se jedná o faktor ovlivnitelný.

4. Metody hodnocení cévních změn a funkce cév

Instrumentální vyšetření cév

Mikroskopická konfokální kapilaroskopie mikroskopicky hodnotí počet a strukturu kapilár nehtového lůžka. Po užití imerzního oleje naneseného na nehtové lůžko se posuzují změny kapilár podle velikosti, počtu a strukturních charakteristik. Nejčasnější jsou změny jejich velikosti, hlavním hodnotícím parametrem je však počet kapilárních klíčků. Redukce počtu kapilár a strukturální změny lze pozorovat v aktivní fázi a v pozdní fázi mikroangiopatie. U pacientů s DM byly pozorovány významné kapilaroskopické změny [Maldonado G et al. 2017].

Laser Doppler flowmetrie je neinvazivní metoda umožňující hodnocení mikrocirkulace a mikrovaskulární reaktivity (MVR). Považuje se za zlatý standard posouzení funkce endotelu v mikrocirkulaci [Rodriguez LM et al. 2017]. Metoda je založena na odrazu světelného (laserového) paprsku v kůži. Světlo mění svou vlnovou délku, pokud je odraženo pohybujícími se erytrocyty (Dopplerův efekt) v mikrocirkulaci. Měření probíhá v kůži do hloubky 1 – 1,5 mm. Velikost a frekvenční rozložení změn vlnové délky odpovídá počtu a rychlosti pohybujících se erytrocytů a odráží tedy mikrovaskulární perfúzi. Používá se především v souvislosti s funkčními testy, při kterých se perfúze dynamicky mění.

Jedním z dynamických testů je post-okluzní reaktivní hyperémie (PORH), při níž se hodnotí míra a rychlost zvýšení prokrvení po dočasné tkáňové ischemii (způsobené nejčastěji manžetou tonometru se suprasystolickým tlakem). Dalším z testů je termální hyperémie, při které se sledují změny zvýšeného prokrvení po lokálním zahřátí kůže (termální hyperémie - TH).

Metodou Laser Doppler flowmetrie lze u pacientů s diabetem zjistit výraznou poruchu mikrocirkulace [Fuchs D et al. 2017], u pacientů s DM1 především ve spojení s klinicky vyjádřenou polyneuropatií [Kasalová Z et al. 2006]. MVR je u pacientů chronicky vystavených hyperglykémii významně snižena. Akutní krátkodobá hyperglykémie u pacientů

s DM1 však MVR neovlivňuje, jak jsme na našem pracovišti prokázali již dříve [Horová E et al. 2012].

Analýza rychlosti pulzové vlny je další z diagnostických metod endotelové dysfunkce velkých tepen. Využívá zvýšené rychlosti pohybu pulzové vlny v tepnách se sníženou elasticitou cévní stěny. Tuhost cévní stěny je závislá na množství a podílu kolagenních a elastických vláken. Právě vyšší tuhost stěny tepny způsobuje dřívější návrat odražené pulzové vlny v pozdní systole, což zvyšuje systémový systolický tlak krve. To má za následek zvýšenou zátěž levé komory, vedoucí postupně k její hypertrofii. Zvýšená rychlost pulzové vlny představuje rizikový faktor pro rozvoj ischemické choroby srdeční (ICHS) [Mattace-Raso FU et al. 2006] a cévní mozkové příhody [Hansen TW et al. 2006].

Pletysmografie cév je funkční vyšetření na podkladě změn cévního objemu. Principem je změna objemu tepen při pulzaci v závislosti na vyvolávající podnět (například PORH). Tepny se sníženou elasticitou cévní stěny nezvýší svůj objem při pulzové vlně o tolik jako tepny nepostižené. Touto metodou lze predikovat rozvoj DM2 u pacientů bez poruchy glukózového metabolismu avšak se sníženou elasticitou cévní stěny [Hahad O et al. 2019].

Flow mediated dilation (FMD, dilatace zprostředkovaná průtokem) je odrazem reaktivity velkých tepen. Při zvýšeném krevním průtoku dochází k dilataci tepny, její příčinou je uvolnění NO z endotelových buněk. FMD tedy umožňuje posouzení účinku NO. Vyšetření FMD využívá ultrasonografické zobrazení průsvitu arterie brachialis nebo jiné končetinové tepny po několikaminutové okluzi předloktí, zápěstí nebo jiné periferní části končetiny za pomoci manžety tonometru naplněné vzduchem na suprasystolický tlak. Ischemie vede k vazodilataci v periferním řečišti, po uvolnění okluze arterií tak dojde k reaktivní hyperémii distálně od okluze. Zvýšený průtok v tepně vedoucí k periférii po odeznění okluze má za následek zvýšení smykového napětí na stěnu tepny, což vede ke zvýšené produkci NO a následné vazodilataci. Pokud je však přítomna endotelová dysfunkce, bývá dilatace tepny méně výrazná [Raitakari OT et al. 2000]. U pacientů s DM bývá FMD ve srovnání s nediabetickou populací snížena. Významný pokles FMD byl zaznamenán již u dětských pacientů s dobou trvání DM1 průměrně 4,7 let [Zhang Y et al. 2019]. Nevýhodou tohoto vyšetření je kromě potřeby přístrojového vybavení také značná závislost na zkušenostech vyšetřujícího, rozdílné výsledky různých vyšetřujících [Šejda T et al. 2005] a

nedostatečná standardizace samotného vyšetření. Různá pracoviště mají vlastní protokoly vyšetření, což vede k rozdílným výsledkům i nehomogenním závěrům v klinických studiích.

Ultrasonografie karotid je poměrně rozšířené vyšetření tepenného systému, vzhledem k dobré dostupnosti cév pro ultrazvukové vyšetření a k dobré korelaci aterosklerotického postižení karotických tepen a tepen v dalších lokalizacích lidského těla. K vyšetření se používá lineární vysokofrekvenční sonda. Při vyšetření lze detekovat aterosklerotický plát, zhodnotit jeho tloušťku a případnou hemodynamická významnost. Nález samotného plátu však již znamená pokročilé aterosklerotické postižení s možným klinickým významem. Pro posouzení časných stádií poškození velkých cév se používá měření tloušťky intimo-mediální vrstvy karotid.

Měření tloušťky intimo-mediální vrstvy karotid (Intima-Media Thickness IMT) se provádí rovněž pomocí ultrazvuku a slouží k posouzení počátečních morfologických změn cévní stěny, které obvykle předchází ateroskleróze. Toto vyšetření přispívá k posouzení kardiovaskulárního rizika [Näslund U et al. 2019]. Je časově a personálně náročnější, než běžná ultrasonografie karotid a provádí se proto ve specializovaných centrech. Evropské doporučené postupy pro posuzování kardiovaskulárního rizika ani American Heart Association však měření IMT nedoporučují k rutinnímu vyšetřování, vzhledem k nejednotné metodice a rozporuplnými výsledkům ve studiích [Goff DC et al. 2014, Piepoli MF et al. 2016]. Podobnou roli v posuzování aterosklerotických změn má i intravaskulární ultrazvuk.

Biopsie cév je invazivní metoda umožňující po odběru a zpracování vzorku přímé **mikroskopické zobrazení** struktury cévy. Pro výzkumné účely v rámci studia endotelové dysfunkce se využívá zřídka, vzhledem k nemožnosti posoudit touto metodou funkční cévní změny. Funkční změny lze navíc dobře vyšetřit metodami neinvazivními.

Selektivní koronarografie je velmi přesná a přínosná metoda k posouzení klinicky významných stenóz v tepenném řečišti myokardu. Provádí se rutinně, především v rámci diagnostiky a terapie pacientů s ICHS. Touto metodou lze též výzkumně posoudit vazodilatační a vazokonstrikční funkci endotelu po intraarteriálním podání vazodilatačních látek závislých na endotelu, například acetylcholinu. Dále lze pro stimulaci použít i vazodilatační látky nezávislé na endotelu, jako jsou nitráty, adenosin či papaverin. Zároveň je možný lokální odběr arteriální krve přímo ze zkoumané části tepny. Koronární tepny bývají

postižené v lidském těle jako jedny z prvních, proto jsou dobrým indikátorem aterogeneze. Vyšetření koronárního řečiště lze doplnit intravaskulárním ultrazvukovým vyšetřením, které může detailně zobrazit i zcela incipientní morfologické změny. Nevýhody koronarografie spočívají ve značné invazivitě, náročnosti časové i ekonomické a na erudici personálu. Vyšetření pro pacienta není zcela bez rizika komplikací, a nelze je snadno opakovat v průběhu longitudinálního sledování.

Neinvazivní variantou zobrazení cévního řečiště jsou **CT angiografie** pomocí výpočetní tomografie a **MR angiografie** pomocí magnetické rezonance. Tato vyšetření hodnotí anatomické poměry a morfologii velkých a středních cév.

Biochemické metody hodnocení poškození nebo aktivace endotelu

Cytoadhezivní molekuly

Cytoadhezivní molekuly jsou molekuly proteinové povahy nacházející se v buněčné membráně a uskutečňující vzájemnou komunikaci a kontakt buněk. Exprese těchto molekul bývá ovlivněna řadou fyziologických i patologických procesů. Některé z nich se významně podílejí na procesu poškození cévní stěny indukci zánětu. Jejich koncentrace se při zvýšené úrovni oxidačního stresu obvykle zvyšuje a měřením jejich koncentrací lze nepřímo hodnotit míru oxidačního stresu a endotelové dysfunkce. Mezi cytoadhezivní molekuly patří integriny, selektiny a adhezivní molekuly imunoglobulinové řady.

Integriny jsou transmembránové glykoproteiny, které jsou svojí intracelulární doménou napojeny na proteiny cytoskeletu a zevní doménou zprostředkovávají adhezi buňky s extracelulární matrix a s okolními buňkami. Vyskytují se především na membránách krevních elementů, v endotelu a ve fibroblastech. Váží se zejména ke kolagenu, lamininu a fibronektinu. Po navázání na ligandy dochází k přenosu buněčných signálů vedoucích k regulaci buněčného cyklu, organizaci cytoskeletu a pohybu dalších receptorů k buněčné membráně.

Selektiny jsou povrchové glykoproteiny nacházející se na povrchu trombocytů (P-selektin), leukocytů (L-selektin) a endotelu (E-selektin, P-selektin). Tyto molekuly se uplatňují v komplexních zánětlivých procesech, ve vyzrávání lymfocytů a ve směřování cirkulujících leukocytů k cílovým místům a při jejich prostupu přes cévní stěnu.

Adhezivní molekuly imunoglobulinové řady jsou molekuly s imunoglobulinovými doménami. Pomocí těchto domén usměrňují distribuci leukocytů, ovlivňují koncentraci v určitém místě tkáně a také jejich adhezi k endotelu. Působí jako ligandy pro integriny na

leukocytech a trombocytech. Patří sem ICAM-1, ICAM-2 a VCAM-1. ICAM-1 je na endotelu přítomen konstitutivně. Působením řady zánětlivých cytokinů se jeho množství významně zvyšuje. Obecně vyšší hladiny ICAM, VCAM, selektinu P a selektinu E signalizují zvýšenou aktivaci endotelu [Horová E et al. 2009].

Koagulační kaskáda

von Willebrandův faktor (vWF) je glykoprotein, který působí jako kofaktor adheze trombocytů k endotelu a současně hraje významnou roli ve vzájemné adhezi trombocytů. vWF je syntetizován v endotelu a megakaryocytech a je nezbytný pro normální krevní srážlivost. Koncentrace cirkulujícího vWF jsou zvýšené při některých fyziologických stavech – fyzická zátěž, těhotenství, avšak výrazně zvýšené hodnoty se nacházejí při poškození endotelu u pacientů s akutními i chronickými angiopatiemi. Stanovení aktivity vWF tak může být přínosným přídatným ukazatelem endotelové dysfunkce a hodnocení jejího vývoje v čase [Lip GY, Blann AD 1995, Horvath B et al. 2004].

Tkáňový aktivátor plasminogenu (Tissue Plasminogen Activator, t-PA) je enzym katalyzující přeměnu plasminogenu na plasmin, což je nejdůležitější enzym v procesu trombolýzy. Je syntetizován v endotelu. Snížená tvorba t-PA a změny v jeho aktivitě jsou jedním z projevů a zároveň markerů endotelové dysfunkce [Oliver N et al. 2005].

Inhibitor aktivátoru plasminogenu 1 (Plasminogen Activator Inhibitor 1, PAI-1) je enzym inaktivující t-PA. Uplatňuje se především lokálně jako regulátor trombolýzy. PAI-1 je syntetizován převážně v endotelu a trombocytech. Zvýšené koncentrace PAI-1 a změny jeho aktivity jsou při endotelové dysfunkci dobře popsány [Brodsky SV et al. 2002]. Komplexní změny v koagulační kaskádě v souvislosti s endotelovou dysfunkcí navozují prokoagulační stav.

Albuminurie

Albuminurie je synonymem pro nález albuminu v moči. Zvýšené množství albuminu se vyskytuje u řady nemocí, především je typické pro pacienty s delší dobou trvání DM a pro pacienty s arteriální hypertenzí. Přítomnost albuminu v moči je indikátorem komplexního cévního rizika včetně rizika makrovaskulárních komplikací. Stanovení albuminurie patří mezi rutinní screeningové metody pacientů s diabetem určené pro časný záchyt a monitoraci diabetického postižení ledvin. U dospělých pacientů s DM se v rámci screeningu doporučuje jeho stanovení 1x ročně [Doporučené postupy při diabetickém onemocnění ledvin 2017,

Doporučený postup – Laboratorní diagnostika a sledování stavu pacientů 2019]. Screening se v ČR nejčastěji provádí stanovením poměru albumin ke kreatininu ve vzorku nativní ranní moče. 24hodinový sběr moči se již vzhledem k velkému zatížení preanalytickými chybami (zejména na straně pacienta) jako screeningové vyšetření neprovádí. Vyšetření může být zkresleno při současné infekci močových cest, menstruaci nebo po zvýšené fyzické námaze.

5. Hyperglykémie a hodnocení kompenzace DM

Metody hodnocení kompenzace diabetu založené na glykaci

Již řadu let se jako zlatý standard hodnocení dlouhodobé kompenzace diabetu používá koncentrace **glykovaného hemoglobinu** (HbA_{1c}) v žilní krvi. Jde o hemoglobin modifikovaný neenzymovou glykací. Jeho hodnota je výrazem dlouhodobé expozice glukóze. Hodnotu HbA_{1c} si lze představit jako vážený průměr hodnot glykémie [Tahara et al. 1995, Doporučený postup Diabetes mellitus - Laboratorní diagnostika a sledování stavu pacientů 2019] za dobu životnosti erytrocytu. Populace bez diabetu má hodnoty HbA_{1c} do 42 mmol/mol. U pacientů s diabetem bývají hodnoty značně vyšší, například arbitrární hranice pro posouzení kompenzace DM2 jako uspokojivé je stanovena na HbA_{1c} 53 mmol/mol. Tuto hodnotu je však nutno uvést do klinického kontextu, jelikož různé skupiny pacientů s diabetem mají různé cílové hodnoty HbA_{1c} [Doporučený postup péče o diabetes mellitus 1. typu, ČDS 2016, Doporučený postup péče o diabetes mellitus 2. typu, ČDS 2017]. Hodnota HbA_{1c} 53 mmol/l odpovídá průměrné glykémii 8,5 mmol/l, jak bylo zjištěno na velkých vzorcích pacientů [Beck RW et al. 2017]. Reálná průměrná glykémie u individuálních pacientů se však může značně lišit, jak bude diskutováno dále.

Využití HbA_{1c} při péči o pacienty s DM1 je široké [Doporučený postup péče o diabetes mellitus 1. typu, ČDS 2016]. Jeho asociace s rizikem rozvoje pozdních komplikací diabetu je již dlouho známá ze studie DCCT [Diabetes Control and Complications Trial Research Group 1993]. Také recentní observační studie z reálného světa potvrzují silnou asociaci chronických, ale i akutních komplikací diabetu s neuspokojivou kompenzací diabetu hodnocenou podle HbA_{1c} [Pettus JH et al. 2019]. Konkrétně ve zde citované studii v USA s velkým vzorkem (přes 30 000) pacientů čerpali více prostředků ze zdravotního rozpočtu pacienti s hůře kompenzovaným diabetem (a častěji přítomnými akutními i chronickými komplikacemi) než pacienti s lepší kompenzací. HbA_{1c} je podle nedávné analýzy 17letého sledování pacientů ze studie DCCT/EDIC nejdůležitější ovlivnitelný faktor vzniku kardiovaskulárních komplikací u pacientů s DM1 [Bebu I et al. 2020]. Podle dat ze švédského

registru dětských diabetiků vyšší HbA_{1c} v dětství koreluje se zvýšenou předčasnou mortalitou do 30 let věku, způsobenou především akutními komplikacemi [Samuelsson J et al. 2020]. Vyšší HbA_{1c} a též jeho kolísání se dává do souvislosti s vyšším výskytem koronárního postižení u pacientů s DM2 [Rezende PC et al. 2020]. Zvýšená dlouhodobá variabilita hodnot HbA_{1c} je dnes zvažována jako nezávislý rizikový faktor vzniku pozdních diabetických komplikací včetně kardiovaskulárního postižení a je spojena s vyšší celkovou mortalitou [Li S et al. 2020, Rezende PC et al. 2020].

Přes své široké využití má HbA_{1c} také významné nedostatky. Především nereflektuje krátkodobé kolísání glykémie – glykemickou variabilitu (GV), která je důležitá zejména k asociovanému riziku hypoglykemií a hyperglykemií, tj. stavům pacienty přímo ohrožujícím na zdraví nebo na životě. Zvýšená GV se týká zejména pacientů s DM léčených intenzifikovaným inzulinovým režimem. HbA_{1c} neposkytuje informace o četnosti ani o závažnosti hypoglykemií a hyperglykemií a není ukazatelem interdenní nebo intradenní GV. Hodnoty HbA_{1c} jsou navíc ovlivněny řadou stavů, například anémií, hemoglobinopatiemi, sideropenií, těhotenstvím, popsány jsou i rasové rozdíly.

Představa, že HbA_{1c} je jen vyjádřením průměrné glykémie za určité období v jiných jednotkách však není přesná. Rozdílné laboratorní hodnoty HbA_{1c} a průměrné koncentrace glukózy začaly být plně patrné až s rozšířením užívání senzorů na kontinuální monitoraci glukózy (Continuous Glucose Monitoring, CGM), které umožňují průměrnou koncentraci glukózy posoudit mnohem přesněji než dřívější měření pomocí osobních glukometrů. Na základě analýzy velkého počtu pacientů, u kterých byl stanoven HbA_{1c} a zároveň používali CGM, se ukázalo, že se obě hodnoty mohou značně lišit [Beck RW et al. 2017].

Tyto klinicky významné rozdíly nejsou plně objasněny a dle některých teorií souvisí s rozdílnou schopností glykace a deglykace hemoglobinu (a patrně též jiných proteinů) u různých osob s rozdílným metabolismem hemoglobinu a odlišnou délkou přežívání erytrocytů a patrně též genetickými faktory. Dosavadní výzkumy naznačují, že tyto rozdíly mezi laboratorně naměřeným HbA_{1c} a průměrnou koncentrací glukózy (tzv. glycation gap) jsou u jedinců poměrně stabilní [Juvenile Diabetes Research Foundation Continuous Glucose Monitoring Study Group 2011]. Není jednoznačné, zda je v případě významné diskrepance mezi oběma hodnotami pro pacienty lepší prognostický faktor nižší HbA_{1c}, nebo nižší průměrná koncentrace glukózy hodnocená pomocí CGM. Metoda CGM se v širší míře používá příliš krátce.

Fruktosamin je sérový **glykovaný albumin**, podle kterého lze kompenzaci diabetu hodnotit také, v klinické praxi se však využívá podstatně méně než HbA_{1c}. Vzhledem ke

kratší životnosti albuminu (2-3 týdny) než hemoglobinu, může stanovení fruktosaminu dříve zaznamenat změny kompenzace DM než HbA_{1c} [Koga M et Kasayama S 2010]. Lze jej proto využít i u nově diagnostikovaných pacientů s diabetem a dříve ověřit účinnost terapie [Ren Q et al. 2020]. Výsledky může falešně snížit hypoproteinémie.

Další měřitelnou glykovanou molekulou odrážející velmi dlouhodobou kompenzaci představuje **glykovaný kolagen**. Ten má poločas kolem 15 let a lze ho stanovit z kožní biopsie. Souvisí s délkou trvání DM a s kompenzací dle HbA_{1c}. Proti HbA_{1c} je však lepším prediktorem rozvoje diabetické retinopatie a diabetického onemocnění ledvin, jak vyplývá z analýzy studie DCCT/EDIC [Genuth S et al. 2005]. Jeho nevýhodou je nutnost invazivní biopsie. Neinvazivní alternativou vyšetření kožní glykace je měření kožní autofluorescence, které odráží množství AGEs v kůži (viz výše).

Glykemická variabilita

Glykemická variabilita (GV) je kolísání glykémie v průběhu času. Glykémie je za normálních okolností u zdravých osob regulována v relativně úzkém rozmezí (3,9 – 7,0 mmol/l nalačno v žilní plazmě). Fyziologické mechanismy regulace glykémie zahrnují především zvýšení endogenní sekrece inzulínu v reakci na příjem sacharidů v potravě a naopak zvýšení sekrece glukagonu v období lačnění. U osob s DM je endogenní sekrece inzulínu natolik snižená, že přirozené mechanismy regulace glukózy nedokáží glykémii udržet ve fyziologickém rozmezí. Zejména u osob s DM1 je GV silně vyjádřena, jelikož exogenním parenterálním podáváním inzulínu se velmi obtížně dosahují fyziologické koncentrace inzulínu v cílových tkáních (zejména v játrech). Důvodem je obtížný odhad velikosti dávky inzulínu, která musí mimo jiné přesně odrážet množství sacharidů v konzumovaném jídle, a dále farmakodynamiku inzulínu při jeho subkutánním podání. Opakované podkožní aplikace inzulínu do stejných míst vede k tvorbě podkožních lipohypertrofických změn. Vstřebávání inzulínu z ložisek lipohypertrofie je odlišné od vstřebávání ze zdravého podkoží a pacienti s lipohypertrofií mají GV zvýšenou [Frid AH et al. 2016]. Také optimální načasování aplikace inzulínu před konzumací jídla bývá náročné vzhledem k relativně pomalému nástupu účinku subkutánně podaného inzulínu (u rychle působících analog obecně v řádu desítek minut), který nestačí následovat relativně rychlé vstřebávání sacharidů z trávicího traktu (v řádu minut). Množství sacharidů v daném jídle se sice pacienti mohou dozvědět v nutričních tabulkách, nicméně glykemický index především kombinovaných jídel (příloha se zeleninou, omáčkou, polévka, nápoj) se odhaduje obtížně.

Inzulínová sensitivita je obvykle u pacientů s DM1 zachována, je však velmi variabilní inter- i intraindividuálně. Ovlivňuje ji řada faktorů, jako je pohybová aktivita, stres, množství tukové tkáně, interkurentní infekce, ovulační cyklus nebo podávání některých léků (glukokortikoidy, některá psychofarmaka, recentně i glifloziny) [Mathieu C et al. 2019]. Některé z uvedených faktorů se navíc obtížně kvantifikují, což komplikuje optimální substituci inzulínu.

Glykemická variabilita jako rizikový faktor komplikací DM

Podle některých teorií může zvýšená GV způsobovat cévní poškození ve větší míře než samotná setrvalá hyperglykémie [Škrha J 2010], a GV tak byla v některých studiích označena za přídatný nezávislý faktor rozvoje chronických cévních změn [Hirsch IB et Brownlee M 2005, Šoupal et al. 2014, Škrha et al. 2016].

Patofyziologické mechanismy vlivu GV na cévní změny nejsou plně objasněny [Ceriello A et al. 2013]. Jedním z předpokládaných procesů souvisejících s vysokou GV je ovlivnění genové exprese enzymů, které se podílejí na prevenci buněčného poškození vyvolané hyperglykemií [Kuricová K et al. 2016].

Buněčné kultury, které byly v laboratorním prostředí umístěny v prostředí s kolísající koncentrací glukózy, prokazovaly vyšší hladiny markerů oxidačního stresu než ty umístěné do stabilně hyperglykemického prostředí [Quagliaro L et al. 2003]. Expozice fluktující koncentraci glukózy rovněž indukovala zvýšenou aktivitu PKC [Quagliaro L et al. 2003]. V jiné studii se zvýšila aktivita transkripčního faktoru NF- κ B v periferní krvi po navození hyperglykémie u zdravých dobrovolníků, tedy i za nepřítomnosti vyšších koncentrací AGEs [Schiekofer S et al. 2003]. Také apoptóza byla více vyjádřena v buněčných kulturách vystavených střídavě normoglykémii a hyperglykémii než soustavně hyperglykémii [Risso A et al. 2001, Quagliaro L et al. 2003].

Dalším předpokladem je, že pacient s vysokou GV stráví více času v hyperglykémii a ani četné hypoglykémie nekompensují zvýšenou expozici organismu hyperglykémii [Killpatrick ES 2012]. Vysoká GV je rizikovým faktorem pro častější výskyt hypoglykemií [Qu Y et al. 2012] a bylo prokázáno, že i hypoglykémie se přímo podílí na rozvoji endotelové dysfunkce [Peña AS et al. 2012]. Vysoká glykemická variabilita byla prediktorem rozvoje závažných hypoglykemií dokonce i u pacientů s DM2 léčených inzulínem [Cox DJ et al. 2007]. V recentní studii u pacientů s diabetem v hemodialyzačním programu, což jsou pacienti s intenzivním zdravotnickým dohledem několikrát týdně, u kterých bylo možno

dobře dokumentovat změny glykemií, se ukázalo, že pacienti s vyšší GV měli vyšší celkovou mortalitu [Shi C et al. 2020].

Kumulativní efekt vysoké GV může být podkladem pro fenomén tzv. glykemické paměti. Tento fenomén je popsán jako rozvoj a progresse mikrovaskulárních změn u pacientů s diabetem i po zlepšení kompenzace diabetu. Byl pozorován ve studii DCCT a navazujícím observačním projektu EDIC. Při porovnávání intenzivního a standardního léčebného režimu u pacientů s DM1 v intenzivně léčené větvi došlo k významnému snížení HbA_{1c}, avšak mikrovaskulární postižení u nich během následného 7letého sledování dále progredovalo [Hirsch IB et Brownlee M 2005]. Dalším možným mechanismem vedoucím ke glykemické paměti je glykace molekul s podstatně delším poločasem než hemoglobin, které mohou podmiňovat rozvoj komplikací i po poklesu HbA_{1c}.

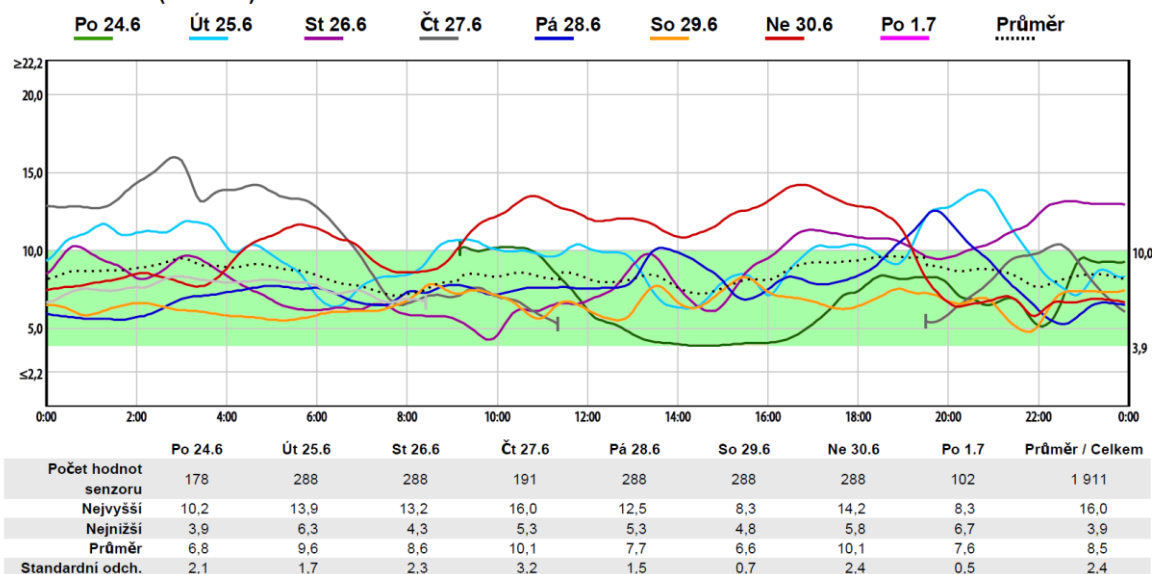
Při snížení GV dochází ke snížení výskytu hypoglykemií a zlepšuje se jejich rozpoznávání [Monnier L 2011]. Je tedy zřejmé, že GV je významný faktor nejen z hlediska jeho potenciální úlohy v rozvoji komplikací diabetu, ale i v oblasti akutních komplikací. Protože jde o faktor ovlivnitelný, stává se v poslední době stále častěji cílem terapeutického úsilí, které má vést k jeho minimalizaci.

Hodnocení glykemické variability a význam kontinuální monitorace glukózy

GV lze hodnotit podle selfmonitoringu glykémie pomocí osobního glukometru pacienta. Vzhledem k nízké frekvenci měření, obvykle do 5 měření/den, se tato metoda ukázala jako velmi nepřesná. Komplexní pohled na GV je možno získat pomocí dat z CGM, které poskytují řádově stovky měření denně. CGM měří glukózu v intersticiální tekutině pomocí tenkého senzoru zavedeného do podkoží. Senzor pracuje nejčastěji na glukózo-oxidázovém principu. Hodnoty napětí na elektrodě se přenášejí obvykle kontinuálně z CGM do přijímače, kde se napětí přepočítává na koncentraci glukózy a zobrazí. Přijímačem může být buď samostatné zařízení vybavené displejem, inzulínová pumpa, nebo „chytrý“ telefon. Znalost hodnot glukózy v reálném čase (Real time CGM, rt-CGM) pacientovi umožňuje okamžitě reagovat v případě nežádoucí odchylky koncentrace glukózy. Jiný způsob využití CGM spočívá ve sběru dat v zaslepeném módu (profesionální CGM), obvykle po dobu jednoho nebo více týdnů. Během této doby má pacient zavedený senzor, data se mu ale nezobrazují. Hodnoty se ukládají do paměti a slouží k retrospektivní analýze, kterou provádí zdravotník. Tento způsob CGM lze využít ke zjištění a analýze opakujících se glykemických trendů (se zaměřením na hypoglykémie), což může vést k úpravě léčby. Profesionální CGM lze také využít pro výzkumné hodnocení GV. Hodnocení GV ze záznamů z CGM nemá

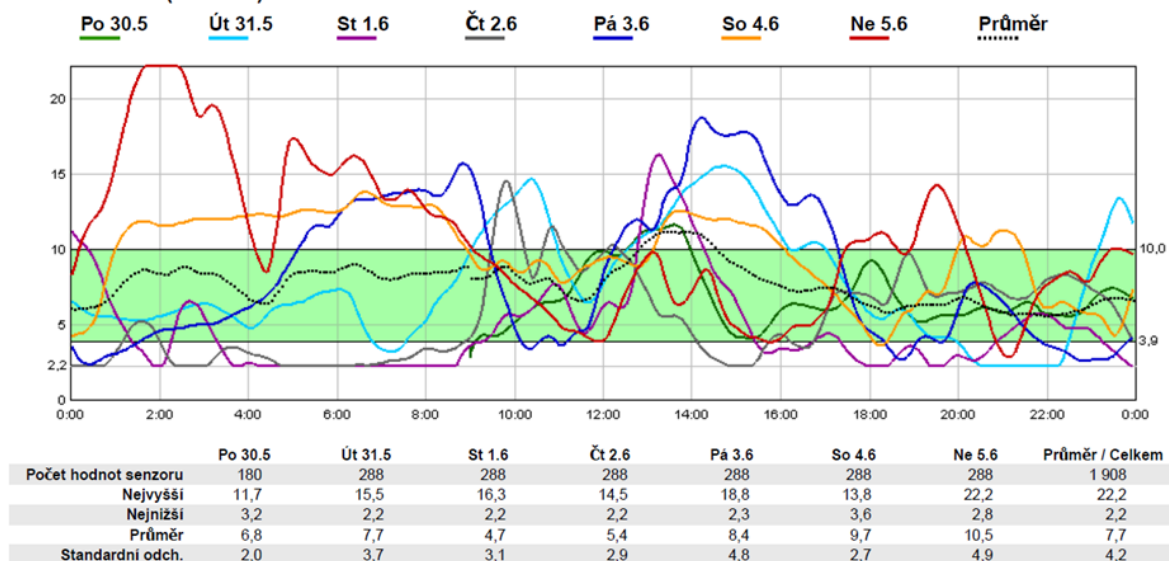
jednotnou metodiku, používá se celá řada parametrů. Kromě aritmetického průměru, směrodatné odchylky a variačního koeficientu se používají i složitější výpočty, z nichž nejrozšířenější jsou MAGE (Mean Amplitude of Glycemic Excursions) a CONGA (Continuous Overall Net Glycemic Action) [Šoupal J et Prázný M]. V klinické praxi i výzkumu se nejčastěji uplatňuje směrodatná odchylka a variační koeficient všech hodnot glukózy naměřených za období nejméně jednoho, ale lépe dvou týdnů.

Data senzoru (mmol/l)



Obrázek č. 4 - Ukázka záznamu profesionálního CGM. Pacientka s nízkou glykemickou variabilitou (SD 2,4 při průměrné koncentraci glukózy 8,5 mmol/l a HbA_{1c} 51 mmol/mol)

Data senzoru (mmol/l)



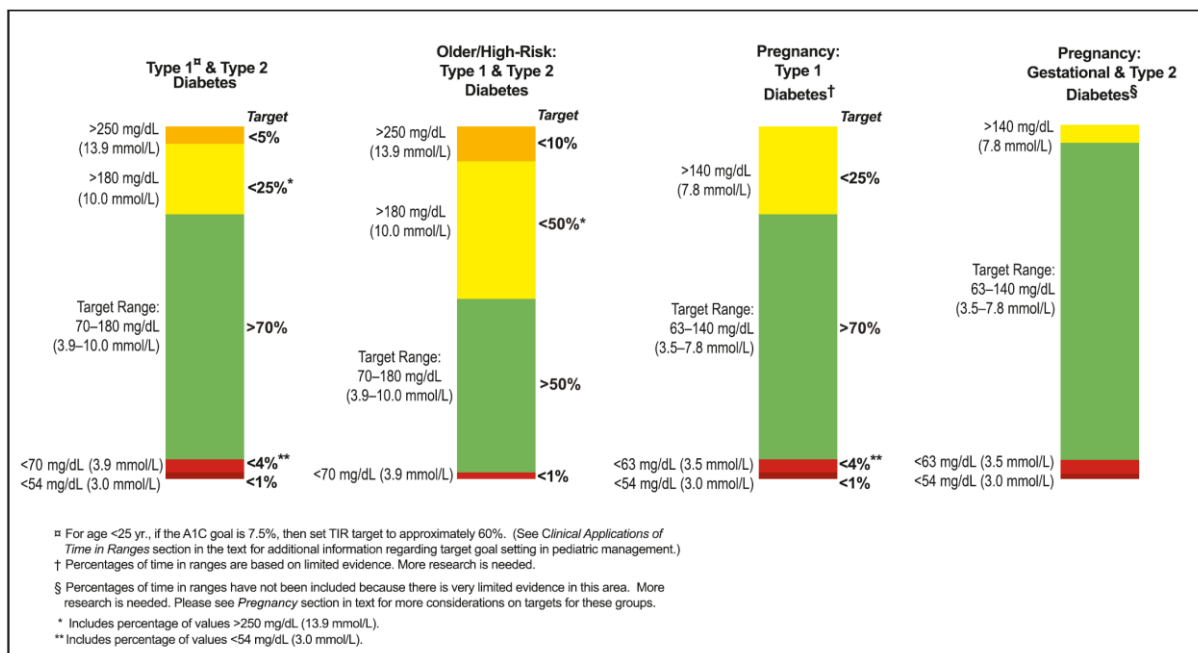
Obrázek č. 5 Ukázka záznamu profesionálního CGM. Pacientka s vysokou glykemickou variabilitou (SD 4,2 při průměrné koncentraci glukózy 7,7 mmol/l a HbA_{1c} 51 mmol/mol)

Přesnost starších typů CGM systémů (zejména v situacích s rychlými vzestupy nebo poklesy glykémie) byla častým problémem, který se v nejnovějších generacích systémů CGM podařilo úspěšně překonat. Ačkoliv je i dnes přesnost senzorů nižší na počátku a konci jejich životnosti, obecně je dnes přesnost systémů pro CGM srovnatelná s většinou osobních glukometrů a v některých případech je přesností předčí.

Využití CGM v běžné klinické praxi.

CGM dnes hraje v managementu DM1 klíčovou roli spolu s použitím moderních inzulínových analog a flexibilního dávkování inzulínu. Dlouhodobé využívání CGM v reálném čase (rt-CGM) vede ke zlepšení HbA_{1c} a snížení frekvence a délky hypoglykemií. Velmi rychle po zahájení monitorace glukózy pomocí rt-CGM dochází u pacientů s DM1 k poklesu GV. Výskyt hypoglykemií je u pacientů s DM1 využívajících rt-CGM proti pacientům, kteří si monitorují glykémii pomocí osobních glukometrů SMBG (Self-Monitored Blood Glucose) významně nižší i přes významný pokles průměrné koncentrace glukózy [Oliver N et al. 2020]. To ukazuje, že zlepšení kompenzace diabetu pomocí této metody je bezpečné. Dlouhodobé používání CGM vedlo ke zlepšení kompenzace diabetu, snížení rizika akutních komplikací a času stráveného v hypoglykemiích, došlo k poklesu výskytu závažných hypoglykemií, klesl také počet dnů zameškaných v práci a pacienti podle belgické studie [Charleer S et al. 2020] udávali větší spokojenost s léčbou i přesto, že CGM je částečně invazivním zařízením.

GV lze u pacientů s DM1 tedy pozitivně ovlivnit způsobem monitorace glukózy. Narůstající zkušenosti s používáním rt-CGM u dětských i dospělých pacientů s DM1 a výsledky klinických studií položily základy k formulaci nových doporučených postupů týkajících se použití CGM a inzulínových pump. Používání rt-CGM se dnes doporučuje všem pacientům s DM1 a dalším pacientům bez vlastní sekrece inzulínu. HbA_{1c} se u pacientů s DM1 dostává jako ukazatel kompenzace DM stále více do pozadí a jako užitečnější a přesnější parametr se začíná rozšiřovat doba stravení v cílovém rozmezí koncentrace glukózy 3,9 – 10,0 mmol/l (Time in Range, TIR). Pro pacienty s DM1 je doporučeno strávit v TIR > 70 % celkového času, méně než 4 % celkového času má být stráveno v hypoglykémii (< 3,9 mmol/l) a méně než 25 % by měl tvořit čas strávený v hyperglykémii (> 10,0 mmol/l) [Battelino T et al. 2019].



Obrázek č 6. - Cíle pro rozdílné kategorie pacientů s DM založené na využití CGM

Převzato z [Battelino T et al. 2019]

Ze záznamu hodnot CGM je možné vypočítat průměrnou koncentraci glukózy, kterou lze použít k odhadu koncentrace HbA_{1c}. Laboratorní stanovení HbA_{1c} a odhadovaný HbA_{1c} vypočítaný z dat z CGM se však mohou na základě individuálních rozdílů v glykaci (a deglykaci) značně lišit, což vedlo k rozpakům a frustracím zdravotníků i pacientů. Proto, a také na základě požadavků regulačních orgánů v USA, byl vytvořen nový parametr s méně matoucím názvem - Glucose Management Indicator (GMI) [Bergenstal RM et al. 2018]. Ten je i nadále vypočítáván z průměrných hodnot glukózy naměřených pomocí CGM a nahrazuje původní odhadovaný HbA_{1c}. Korelace mezi GMI a laboratorně stanovenou hodnotou HbA_{1c} je i nadále pouze částečná. [Bergenstal RM et al. 2018]. GMI je nejpřesnější při sběru dat za co nejdéší časové období, nejlépe za více než dva týdny.

Vzhledem k limitacím HbA_{1c} a nemožnosti individuální predikce vzniku pozdních diabetických komplikací (u některých pacientů s vyšším HbA_{1c} se komplikace nerozvinou, naopak u jiných pacientů s nižším HbA_{1c} se komplikace mohou rozvinout i relativně časně) je žádoucí vyvinout přesnější metodu k posouzení individuálního rizika rozvoje diabetických komplikací. Jedním z faktorů, které vedou k rozvoji cévních komplikací DM je oxidační stres. Podle některých studií je zvýšená GV spojena s vyšší úrovní oxidačního stresu. Není však jasné, zda vyšší krátkodobá GV samostatně přispívá k rozvoji cévních komplikací. Tato problematika se však nyní intenzivně zkoumá. Širší výzkum GV v souvislosti s komplikacemi

DM je umožněn vyšší dostupností CGM než v předchozích letech. GV je dnes možné nejen monitorovat, ale i terapeuticky ovlivnit specifickými léčebnými metodami – přesnějším dávkováním inzulínu a správným načasováním jeho aplikace, správnou technikou aplikace inzulínu (délka jehel, četnost jejich výměny, správné střídání aplikačních míst na těle) [Frid AH et al 2016], trvalým užíváním rt-CGM a moderní farmakoterapií diabetu, která vede ke zlepšení kompenzace DM (poklesu glykemií, HbA_{1c} i GV) bez zvýšeného rizika hypoglykemií [Mathieu C et al. 2019].

Cíl práce:

Cílem je přispět k objasnění patogeneze chronických diabetických komplikací v současné populaci. Hlavním cílem výzkumu je GV a její přídatná úloha v aktivaci oxidačního stresu a pokročilé glykace nad rámec samotné hyperglykémie a její podíl jako rizikového faktoru patogeneze cévních komplikací diabetu. Míru GV můžeme terapeutickými zásahy ovlivňovat, a snížit tak riziko cévního postižení. Naším cílem je posouzení souvislostí mezi GV a dalšími faktory cévního poškození a posouzení využití míry GV jako jednoho z terapeutických cílů.

Hypotéza:

Vysoká GV souvisí s oxidačním stresem, zvyšuje riziko cévního poškození u pacientů s diabetem a je nezávislým faktorem rozvoje pozdních komplikací diabetu nad rámec samotné hyperglykémie. Snížení GV redukuje oxidační stres. Léčebnými postupy (monitorace glukózy pomocí rt-CGM, moderní inzulínová analogá, moderní neinzulínová antidiabetika s nízkým rizikem hypoglykémie) lze GV snížit.

Metodika:

Glykemická variabilita:

GV byla měřena v průběhu 12 následných dní pomocí CGM iPro2 (Medtronic, Northridge, CA, USA) pomocí dvou šestidenních glukózových senzorů. Tento systém zaznamenává hodnoty koncentrace glukózy v intersticiální tekutině v podkožní tukové tkáni přibližně jednou za 5 minut.

Měření probíhalo v profesionálním (zaslepeném) módu – tedy bez možnosti pacienta pozorovat aktuální hodnotu naměřené glukózy, tak, aby byl zachován observační charakter

metody. Senzor byl aplikován do podkoží na břicho nebo paži a kalibrován podle doporučení výrobce. Pacienti byli instruováni, aby si měřili glykémie glukometrem alespoň 4x denně a jinak dodržovali svůj stávající denní režim. Pacienti byli v rámci CGM pozváni na tři návštěvy – k zavedení prvního senzoru, následně po 6 dnech k sejmutí prvního senzoru a zavedení druhého senzoru, při třetí návštěvě byl pacientům sejmout druhý senzor.



Obrázek č. 7 - Senzor na kontinuální monitoraci glukózy iPro2. Detail podkožní části senzoru (vlevo) a obvyklé umístění systému na těle pacienta (vpravo). (Z archivu autora)

Z CGM byla data stažena do počítače pomocí originálního softwaru výrobce a následně byla posouzena GV za použití vlastního softwaru, speciálně vytvořeného pro práci s hrubými daty získanými pomocí CGM. Tento software umožňuje vypočítat celou řadu parametrů glykemické variability jako směrodatnou odchylku (SD), koeficient variability (CV), MAGE a CONGA.

Pacienti se zúčastnili čtyřdenního strukturovaného edukačního pobytu, kde je zdravotníci edukovali o režimu pacienta s diabetem, stravování, monitoraci glukózy, o rizikových situacích, jejich prevenci a řešení. Pobyt byl nabídnut všem zařazeným pacientům, ve studii COMISAIR se zúčastnili všichni pacienti.



Obrázek č. 8 - Edukační pobyt pro pacienty s DMI. (Foto z archivu pořadatele akce)

Mikrovaskulární reaktivita:

MVR byla měřena pomocí Laser Doppler flowmetrie přístrojem PeriFlux PF 4001 Master a pomocí termostatické jednotky PeriTemp 4001 Heater (Perimed, Švédsko). Měření probíhala za pokojové teploty (22 °C) po minimálně 30 minutách klidu pro tepelnou aklimatizaci před samotným vyšetřením. K posouzení MVR byly použity testy PORH (post-okluzní reaktivní hyperémie) a TH (termální hyperémie). Termostatická jednotka s integrovanými optickými vlákny byla umístěna na předloktí nedominantní horní končetiny, druhá standardní sonda bez možnosti zahřívání byla umístěna na bříško 2. prstu stejné ruky. Teplota sondy byla nastavena na 32 °C k stabilizaci teploty před PORH. Bazální perfúze byla měřena 2 minuty před testem PORH, poté byla brachiální tepna stlačena manžetou tonometru insuflovanou o 20 mm Hg nad systolický tlak po dobu 3 minut. Po této době se manžeta tonometru uvolnila a byla změřena PORH. Následně byla nastavena teplota termální sondy na 44 °C a byl zaznamenán průběh termální hyperémie.

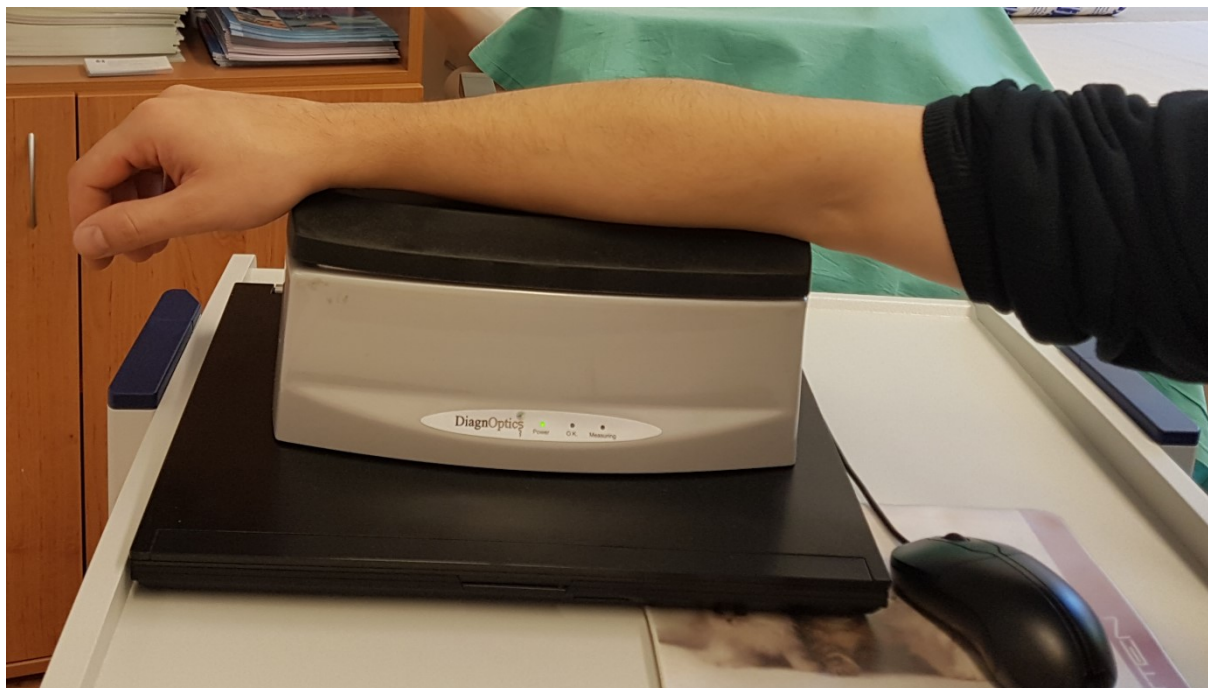
Perfúze byla měřena v arbitrárních perfúzních jednotkách (PU), záznam a hodnocení testů bylo provedeno v programu Perisoft for Windows 2.5. Všechna měření prováděl stejný zaškolený pracovník.



Obrázek č. 9 - Vyšetření mikrovaskulární reaktivity pomocí Laser Doppler flowmetrie (foto z archivu autora)

Kožní autofluorescence:

Toto vyšetření ke stanovení akumulace produktů pokročilé glykace (AGEs) v kůži bylo prováděno přístrojem AGE-Reader (DiagnOptics BV, Groningen, Nizozemí). Vyšetřovaná osoba položila své předloktí na přístroj, poté byla kůže odstíněna od okolního světla a po dobu 12 vteřin ozářena zářením s vlnovou délkou 370 nm. Kožní autofluorescence pak byla vyjádřena v arbitrárních jednotkách (AU).



Obrázek č. 10 - Vyšetření kožní autofluorescence přístrojem AGE-Reader (foto z archivu autora)

Renální exkrece albuminu a odhadovaná glomerulární filtrace

Přítomnost diabetického onemocnění ledvin byla hodnocena vyšetřením renální exkrece albuminu (albuminurie) a výpočtem odhadované glomerulární filtrace (eGFR). Albuminurie byla měřena jako poměr močového albuminu ke kreatininu v moči ve vzorku ranní moče. Hodnoty poměru albumin/kreatinin nad 2,5 g/mol pro muže a nad 3,5 g/mol pro ženy byly hodnoceny jako pozitivní pro albuminurii. Výpočet eGFR byl proveden podle rovnice CKD-EPI, která zohledňuje věk, pohlaví a hladinu sérového kreatininu. Hodnoty eGFR pod $1,5 \text{ ml/s} \cdot 1,73 \text{ m}^{-2}$ byly hodnoceny jako snížená glomerulární filtrace.

Diabetická retinopatie

Přítomnost diabetické retinopatie posuzoval oftalmolog při vyšetření očního pozadí přímou oftalmoskopií v umělé mydriáze.

Stanovení vibračního čítí

Přítomnost a závažnost periferní neuropatie byla posouzena vyšetřením vibračního čítí pomocí biothesiometru (Bio-Medical Instrument Co, Newbury, OH, USA). Při tomto vyšetření poruchy distálních senzoričkových nervových vláken se přístroj přikládá na dorzum 1. prstu nohy a zvyšuje se vibrační amplituda (tradičně udávaná v jednotkách napětí, se kterým přístroj aktuálně pracuje, tj. ve voltech, 0–50 V), dokud vyšetřovaná osoba neohlásí pocit vibrace. Poté se nastaví maximální vibrační amplituda a postupně se snižuje, dokud pacient neohlásí, že už vibrace nepocituje. Z těchto dvou hodnot se vypočítá aritmetický průměr, který odpovídá prahu vibračního čítí (Vibratory Perception Threshold – VPT). Provádí se tři měření pro každou nohu. Za normální se považuje VPT pod 15 V, za porušení vibračního čítí se považuje VPT nad 15 V a VPT nad 30 V navíc prokazuje i přítomnost senzitivní neuropatie.

Biochemické metody:

Vzorky ranní krve byly odebírané mezi 07.00 a 08.00 ráno po celonočním lačnění. HbA_{1c} byl měřen vysokovýkonnou kapalinovou chromatografií na analyzátoru Variant II (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Referenční meze pro naši laboratoř jsou 20-42 mmol/mol. Lipidové spektrum jsme analyzovali pomocí stanovení celkového a HDL cholesterolu analyzátozem Hitachi, Japonsko. LDL cholesterol byl vypočítaný pomocí Friedwaldovy rovnice. ICAM-1, VCAM-1 a VEGF se měřily pomocí ELISA kitů (RD System Europe Abingdon, UK), von Willebrandův faktor (vWf) metodou ELISA a byl vyjádřený v procentech koncentrace vWF ve vztahu ke zdravé populaci pomocí testovacích kitů

REAADS (Rapid ELISAs Applied to Autoimmune Diagnostic Systems, Corgenix, Broomfield, USA).

Oxidační stres byl hodnocen pomocí stanovení koncentrace MDA, testem derivátů reaktivních kyslíkových metabolitů (d-ROMs) a testem plazmatických antioxidantů (PAT v přístroji FRAS4, H&D, Itálie). Výsledky PAT a d-ROMs jsou vyjádřeny v arbitrárních Carratelliho jednotkách (U.Carr). Referenční rozmezí pro PAT je 2200 – 2800 a pro d-ROMs 250-300 U.Carr.

Antropometrické údaje:

U zkoumaných osob jsme zaznamenávali věk, pohlaví, dobu trvání diabetu, výšku, hmotnost, krevní tlak a abúzus nikotinu.

Statistická analýza

Data byla analyzována v programu Statistica for Windows (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA). Byly provedeny základní popisné statistické výpočty, dále byly použity: analýza variace, t-test, Wilcoxonův, Mann-Whitney a Kolmogorov-Smimovův test. Pearsonovy a Spearmanovy korelace byly použity k analýze korelace jednotlivých parametrů.

Výsledky disertační práce:

Peroxidace lipidů souvisí s poruchou mikrovaskulární reaktivity u pacientů s DM1

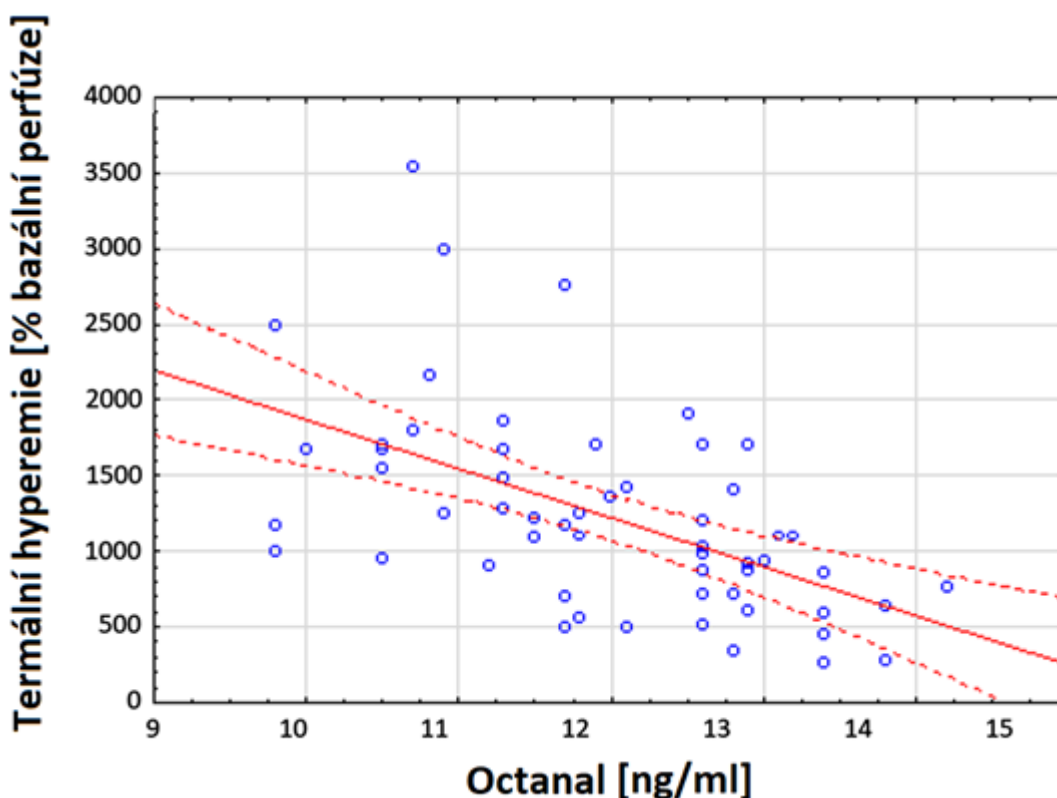
Cíl práce: Cílem této práce bylo zkoumat vztah mezi biomarkery oxidačního stresu (MDA a dalších reaktivních aldehydů) a parametry MVR a kompenzace diabetu.

Metody: Do studie bylo zařazeno 56 pacientů s DM1 (22 mužů, 34 žen, s průměrným věkem 32 ± 8 let, průměrným HbA_{1c} 62 ± 12 mmol/mol a o průměrné délce trvání diabetu 14 ± 6 let). MVR byla měřena Laser Doppler flowmetrií při PORH a TH. Z parametrů kompenzace DM jsme měřili HbA_{1c} a GV vypočítanou z dat CGM – průměrnou koncentraci glukózy, její směrodatnou odchylku SD, koeficient variace CV, CONGA a MAGE. Z biomarkerů oxidačního stresu jsme hodnotili sérové koncentrace MDA, octanalů, nonanalů, decanalů a undodecanalů.

Výsledky: Relativní zvýšení perfúze při PORH oproti bazální perfúzi bylo nepřímě úměrné sérovým koncentracím octanalů ($r = -0,48$, $p = 0,0006$) a MDA ($r = -0,3$, $p = 0,035$). Čas do maximální perfúze během PORH byl nepřímě úměrný sérové koncentraci nonanalů ($r = -$

0,35; $p = 0,014$), decanalu ($r = -0,39$; $p = 0,012$) a undodecanalu ($r = -0,46$, $p = 0,001$). Relativní zvýšení perfúze při TH oproti bazální perfúzi bylo nepřímo úměrné sérové koncentraci octanalu ($r = -0,55$, $p < 0,0001$) a MDA ($r = -0,43$, $p = 0,001$). Nenalezli jsme však žádný vztah mezi koncentracemi aldehydů, HbA_{1c} a GV. Podobně kompenzace DM a GV nesouvisela ani s MVR.

Závěr: V naší průřezové studii jsme našli přímou souvislost mezi koncentracemi reaktivních aldehydů vznikajících při peroxidaci lipidů s poruchami kožní MVR u pacientů s DM1. Parametry kompenzace diabetu a GV však nesouvisely s lipoperoxidací ani se změnami MVR.



Obrázek č.11 - Negativní korelace mezi termální hyperémií vyjádřenou jako % bazální perfúze po zahřátí kůže a sérovou koncentrací octanalu u pacientů s DM1 ($r = -0,55$, $p < 0,0001$)

Originální článek byl publikován v časopise Monatshefte für Chemie – Chemical monthly, IF = 1,501. Kompletní znění článku v anglickém jazyce je přiloženo.

Zlepšení kompenzace diabetu 1. typu během 3 let nevedlo k zastavení progrese oxidačního stresu a endotelové dysfunkce

Cíl práce: Cílem práce bylo posoudit progresi markerů MVR a oxidačního stresu u pacientů s DM1 během tříletého sledování.

Metodika: Výzkum probíhal u 87 pacientů s DM1 (průměrný věk 37 ± 15 let, HbA_{1c} 63 ± 12 mmol/mol, délka trvání DM 18 ± 11 let). MVR byla měřena při PORH pomocí Laser Doppler flowmetrie. Kožní autofluorescence byla hodnocena přístrojem AGE-reader. Oxidační stres byl posuzován koncentrací MDA, testy d-ROMs a PAT. Byly měřeny markery endotelové dysfunkce ICAM-1, VCAM-1 a vWF. Dále jsme měřili rutinní biochemická a antropometrická data. Údaje byly zaznamenány na začátku studie a po 3 letech.

Výsledky: V průběhu 3 let došlo k mírnému zlepšení kompenzace diabetu (HbA_{1c} 63 ± 12 vs. 59 ± 10 mmol/l; $p < 0,05$), zatímco kožní autofluorescence se významně nezměnila ($2,1 \pm 0,5$ vs. $2,3 \pm 0,5$ AU), MVR se ve srovnání s bazálním vyšetřením zhoršila (čas k maximální PORH $12,7 \pm 13$ vs. $17,5 \pm 10$ s; $p < 0,05$). V biochemických parametrech došlo k vzestupu VCAM-1 (718 ± 186 vs. 918 ± 550 pg/l; $p < 0,005$), koncentrace ICAM-1 a vWf se významně nezměnily. Pozorovali jsme zvýšení parametrů oxidačního stresu MDA ($0,70 \pm 0,26$ vs. $0,81 \pm 0,23$ μ mol/l; $p < 0,05$) a PAT (2431 ± 645 vs. 2944 ± 466 U.Carr; $p < 0,0001$). Byla nalezena souvislost mezi kožní autofluorescencí a testem percepce vibrací ($r = 0,45$; $p < 0,0001$).

Závěr: I přes mírné zlepšení kompenzace diabetu hodnocené dle HbA_{1c} se během 3letého sledování zhoršily parametry endotelové dysfunkce, oxidačního stresu, MVR, statisticky nevýznamný trend byl pozorován u akumulace AGEs dle kožní autofluorescence. Došlo však také ke zvýšení antioxidační kapacity. Zvýšené hromadění AGEs bylo asociováno s horším vnímáním vibrací, tedy s klinickým markerem diabetické neuropatie.

Abstrakt byl přijat na 56. Diabetologické dny v Luhačovicích 2020, termín byl odložen pro COVID-19 na podzimní termín. Publikace se připravuje.

Kontinuální monitorace glukózy významně neovlivnila biochemické parametry aktivace endotelu a oxidačního stresu u pacientů s diabetem 1. typu během tříletého sledování

Cíl práce: Cílem této studie bylo porovnat biochemické parametry endotelové dysfunkce a oxidačního stresu u pacientů s DM1 během tříletého sledování pacientů, kteří buď používali, nebo nepoužívali rt-CGM.

Metodika: Výzkum probíhal u 55 pacientů s DM1 (průměrný věk 37 ± 15 let, HbA_{1c} 61 ± 10 mmol/mol, délka trvání DM 17 ± 9 let). Celkem 35 osob v průběhu studie přešlo na trvalé užívání rt-CGM (CGM+), zbylých 20 osob (CGM-) zůstalo na monitoraci glukometry (SMBG). Oxidační stres byl posuzován pomocí stanovení koncentrace MDA, testy d-ROMs a PAT. Dále jsme stanovili ICAM-1, VCAM-1 a vWF. U všech pacientů byla provedena profesionální (zaslepená) CGM a z dat získaných během 12 dnů byla vypočítána GV. Měření bylo provedeno na začátku studie a po 3 letech.

Výsledky: Ve skupině CGM+ došlo ke zlepšení kompenzace diabetu dle HbA_{1c} (62 ± 11 vs. 57 ± 9 mmol/l; $p < 0,002$), zatímco ve skupině CGM- byl vývoj kompenzace opačný (60 ± 11 vs. 63 ± 11 mmol/l; $p < 0,05$). Zároveň byl pozorován pokles GV ve skupině CGM+ (průměrná glukóza $9,5 \pm 1,7$ vs. $8,7 \pm 1,2$ mmol/l; $p < 0,02$; SD $4,0 \pm 0,9$ vs. $3,5 \pm 0,8$ mmol/l, $p < 0,01$), ve skupině CGM- se GV nezměnila (průměrná glukóza $8,6 \pm 1,5$ vs. $8,7 \pm 1,4$ mmol/l, NS; SD $3,4 \pm 0,8$ vs. $3,3 \pm 0,8$ mmol/l; NS). Ve skupině CGM+ se zvýšila koncentrace VCAM-1 (753 ± 182 vs. 968 ± 510 pg/l; $p < 0,05$), zatímco ve skupině CGM- byl naznačen pouze trend ke zvýšení (692 ± 189 vs. 851 ± 516 pg/l; NS). Ostatní parametry endotelové dysfunkce se mezi skupinami nelišily, stejně jako markery oxidačního stresu MDA a d-ROMs. Pouze v případě antioxidačního testu PAT byl v obou skupinách pozorován vzestup (CGM+ 2456 ± 545 vs. 2927 ± 367 U.Carr; $p < 0,005$; u CGM- 2332 ± 544 vs. 3009 ± 606 U.Carr, $p < 0,005$).

Závěr: Dlouhodobá kontinuální monitorace glukózy pomocí rt-CGM vedla u pacientů s DM1 během 3 let ke zlepšení kompenzace diabetu a snížení GV. Snížení GV nebylo v průběhu studie spojeno se zlepšením parametrů oxidačního stresu ani endotelové dysfunkce, u obou skupin byl pouze pozorován nárůst plazmatické antioxidační kapacity.

Abstrakt byl přijat na 56. Diabetologické dny v Luhačovicích 2020, termín byl odložen pro COVID-19 na podzimní termín. Publikace se připravuje.

Kontinuální monitorace glukózy zlepšuje kompenzaci pacientů s diabetem 1. typu v průběhu 52 týdnů léčby inzulínovou pumpou i inzulínovým režimem bazál-bolus: „studie COMISAIR“

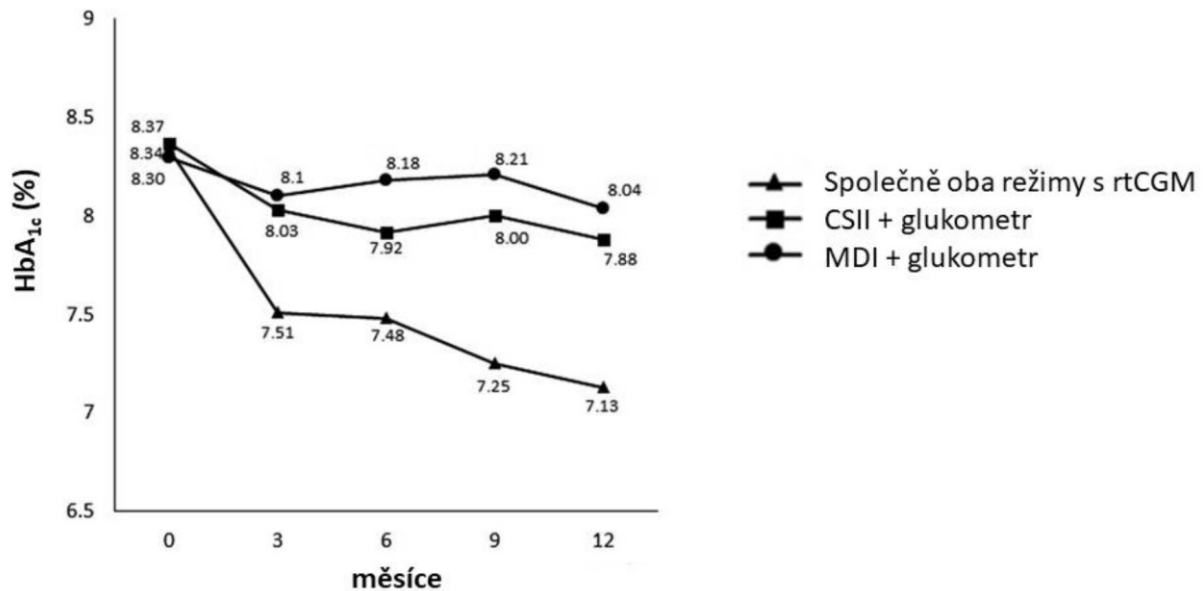
Cíl práce: Léčba inzulínovou pumpou (Continuous Subcutaneous Insulin Infusion, CSII) zlepšuje kompenzaci diabetu jak samostatně, tak v kombinaci s rt-CGM. Účinnost dlouhodobého užívání rt-CGM u pacientů léčených intenzifikovaným inzulínovým režimem inzulínovými pery (Multiple Daily Injections, MDI) však dosud nebyla popsána. Cílem studie bylo porovnat vliv dlouhodobého používání rt-CGM na parametry kompenzace diabetu a GV u pacientů léčených CSII a inzulínovými pery ve srovnání s SMBG.

Metodika: V této prospektivní studii bylo sledováno po dobu 1 roku 65 pacientů s DM1. Pacienti byli rozděleni do 4 skupin se srovnatelnými vstupními parametry. Celkem 27 pacientů zahájilo používání rt-CGM, z toho 15 v kombinaci s inzulínovou pumpou (Sensor Augmented Pump, SAP) a zbývajících 12 zůstalo na léčbě pery (MDI + CGM). Dále bylo sledováno 20 pacientů po zahájení léčby CSII s SMBG a 18 pacientů na kombinaci MDI + SMBG. Na začátku studie bylo u všech pacientů provedeno profesionální CGM. Hlavními sledovanými parametry byly HbA_{1c}, GV vyjádřená směrodatnou odchylkou (SD) glukózy a výskyt hypoglykemií.

Výsledky: Po jednom roce došlo ve skupině všech pacientů používajících rt-CGM k významnému poklesu HbA_{1c} ($67,5 \pm 10,4$ vs. $54,5 \pm 9,1$ mmol/mol; $p < 0,0001$), přitom obě podskupiny pacientů (SAP i MDI + CGM) vykazovaly srovnatelné zlepšení HbA_{1c}. Ke snížení HbA_{1c} vedla také samotná léčba pumpou bez rt-CGM ($68,3 \pm 9,0$ vs. $62,7 \pm 8,0$ mmol/mol; $p < 0,05$). Ve skupině pacientů MDI + SMBG naopak nebyl významný pokles HbA_{1c} pozorován. K významnějšímu poklesu HbA_{1c} došlo u pacientů s rt-CGM ve srovnání s léčbou pumpou samotnou ($54,5 \pm 9,1$ vs. $62,7 \pm 8,0$ mmol/mol; $p = 0,0032$). Ke snížení GV vedlo použití CGM (SD glukózy: $4,0 \pm 0,7$ vs. $3,0 \pm 0,5$; $p < 0,0001$) i léčba pumpou bez CGM (SD glukózy: $3,9 \pm 0,6$ vs. $3,4 \pm 0,6$; $p < 0,01$). Ke snížení času stráveného v hypoglykémii došlo pouze u pacientů na rt-CGM (8 ± 4 vs. $6 \pm 3\%$; $p < 0,01$).

Závěr: Používání rt-CGM vede k významnému zlepšení HbA_{1c}, GV a ke snížení času stráveného v hypoglykémii jak u pacientů léčených inzulínovou pumpou, tak u pacientů na inzulínových perech. Toto zlepšení je významnější než při použití samotné inzulínové pumpy. Kombinace senzoru s inzulínovými pery může být pro řadu pacientů vhodnou alternativou k režimu SAP.

Originální článek byl publikován v časopise *Diabetes Technology and Therapeutics*, IF = 2,198. Kompletní znění článku v anglickém jazyce je přiloženo.



Graf č.1 - Vývoj HbA_{1c} v průběhu ročního sledování pacientů s DM1 podle použité kombinace způsobu aplikace inzulínu a monitorace glukózy

Kompenzace diabetu je u dospělých pacientů s DM1 ovlivněná více používáním rt-CGM než metodou aplikace inzulínu; 3leté sledování ve studii COMISAIR

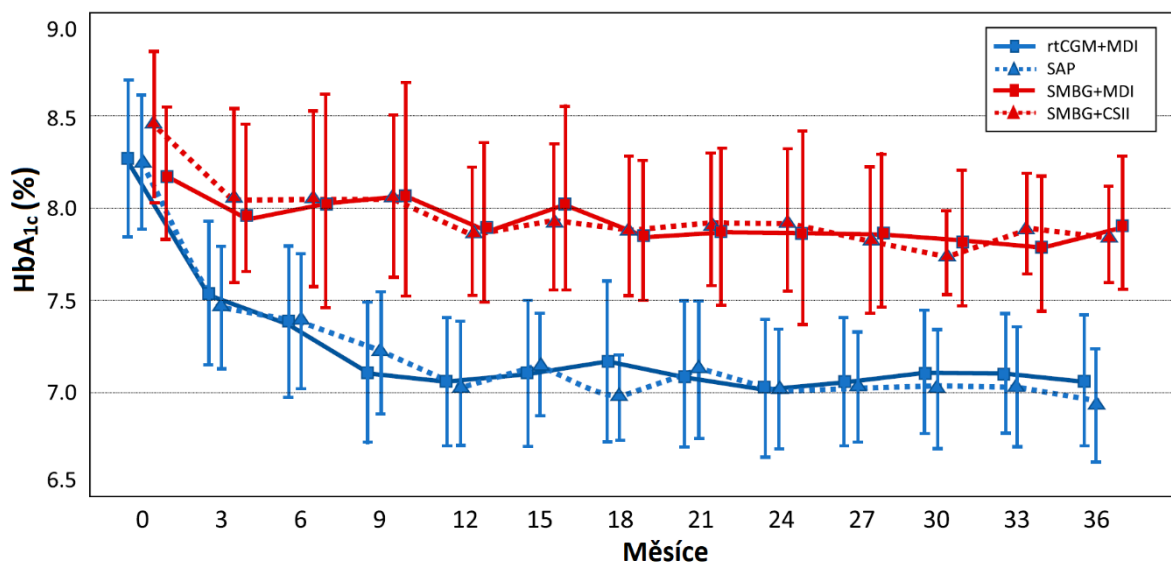
Cíl práce: Posouzení klinického dopadu na kompenzaci diabetu pomocí 4 rozdílných léčebných přístupů – CGM+MDI, CGM+CSII, SMBG+MDI a SMBG+CSII v dosud celosvětově nejdelší prospektivní observační studii s rt-CGM u pacientů s DM1.

Metodika: V této prospektivní observační studii bylo sledováno po dobu tří let celkem 94 pacientů s DM1. Hlavními sledovanými parametry byly změny HbA_{1c}, čas strávený v cílovém rozmezí, čas strávený v hypoglykémii, glykemická variabilita a výskyt závažných hypoglykemií.

Výsledky: Po třech letech měli pacienti v obou podskupinách užívajících rt-CGM (CGM+MDI a CGM+CSII) významně nižší HbA_{1c} (53 mmol/mol; p = 0,0002 a 52

mmol/mol; $p < 0,0001$ respektive) v porovnání s podskupinami užívající glukometry (61 mmol/mol; $p = 0,3574$ s podskupinou SMBG+MDI a 64 mmol/mol; $p = 1,000$ s podskupinou SMBG+CSII). Za tři roky sledování došlo k významnému zvýšení času stráveného v cílovém rozmezí u obou podskupin s rt-CGM (CGM+MDI ze 48,7 % na 69,0 %; $p < 0,0001$, CGM+CSII u 50,9 % na 72,3 %; $p < 0,0001$). Významné snížení času stráveného v hypoglykémii bylo zjištěno pouze u podskupin s rt-CGM (CGM+MDI z 9,4 % na 5,5 %; $p = 0,0387$, CGM+CSII z 9 % na 5,3 %; $p = 0,02$). Významně nižší glykemická variabilita byla zaznamenána mezi podskupinou rt-CGM+MDI vs. SMBG+MDI (nižší SD glukózy o 0,68 mmol/l; $p = 0,0003$), podskupinou rt-CGM+CSII vs. SMBG+MDI (nižší SD glukózy o 0,67 mmol/l; $p = 0,0006$) a mezi podskupinou SMBG+CSII vs. SMBG+MDI (nižší SD glukózy o 0,42 mmol/l; $p = 0,02$). Po dobu 3letého sledování došlo k 7 závažným hypoglykemiím, 5 ve skupině používající SMBG a 2 ve skupině s rt-CGM.

Závěr: Používání rt-CGM vede ve srovnání s klasickým selfmonitoringem osobními glukometry u pacientů s DM1 k významnému zlepšení HbA_{1c}, poklesu GV, ke zvýšení procenta času stráveného v cílovém glykemickém rozmezí a ke snížení času stráveného v hypoglykémii jak u pacientů léčených inzulínovou pumpou, tak i u pacientů na inzulínových perech. Toto zlepšení je rychlé a dlouhodobé, přetrvává po celou dobu tříletého sledování.



Graf č.2 - Vývoj HbA_{1c} v průběhu tříletého sledování pacientů s DM1 v závislosti na použitéch kombinacích způsobu aplikace inzulínu a monitorace glukózy.

rt-CGM+MDI = real time Continuous Glucose Monitoring + Multiple Daily Injections

SAP = Sensor Augmented Pump

SMBG + MDI = Self-Monitoring of Blood Glucose + Multiple Daily Injections

SMBG + CSII = Self-Monitoring of Blood Glucose + Continuous Subcutaneous Insulin Infusion

Článek byl publikován v časopise *Diabetes Care*, IF = 13,397. Kompletní znění článku v anglickém jazyce je přiloženo.

Diabetes, kardiovaskulární postižení a depo 2,3,7,8-tetrachlordibenzo-*p*-dioxinu u českých pacientů 50 let po intoxikaci

Cíl práce: Cílem bylo zjistit možnou souvislost rozvoje metabolických poruch (DM, dyslipidémie, arteriální hypertenze, ICHS) u posledních 8 přeživších mužů z 80 pracovníků intoxikovaných 2,3,7,8-tetrachlordibenzo-*p*-dioxinem (TCDD) během syntézy herbicidů v chemické továrně v letech 1965-1967, kdy se TCDD tvořil jako nechtěný vedlejší produkt výroby. Možná kauzální souvislost expozice TCDD v životním prostředí se zvyšujícím se výskytem DM je předmětem vědeckého zájmu, jako jeden z možných přídatných rizikových faktorů pro rozvoj ICHS, hypertenze a dyslipidémie. U této skupiny pacientů byla endotelová dysfunkce hodnocena v roce 2004 a zvýšené markery oxidačního stresu v moči a v kondenzátu vydechaného vzduchu byly popsány v roce 2010. Eliminační poločas TCDD je přibližně 9 let, proto v této skupině persistuje jeho vysoká hladina v séru po desetiletí.

Metodika: Vyšetření osmi mužů (průměrný věk $72,4 \pm 1,3$ let) zahrnovalo analýzu sérových koncentrací TCDD pomocí plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie, sérového cholesterolu a triacylglycerolů, glykémie, HbA_{1c}, duplexní sonografií krčních tepen, vyšetření očního pozadí, Laser Doppler flowmetrii pro zhodnocení MVR a klinické vyšetření. Celková hmotnost tělesného tuku byla stanovena denzitometricky.

Výsledky: Medián hladiny TCDD v krvi byl 112 (46-390) pg/g tuku, u kontrolní skupiny byl 12 pg/g (<0,10 až 22,2 pg/g tuku). Byla zjištěna vysoká prevalence DM (62,5 % vs. 17,6 %), ICHS (62,5 % vs. 26 %), změn očního pozadí (50 % vs. 14 %). Všech osm pacientů mělo aterosklerotické postižení krčních tepen (100 % vs. 43 %), šest mělo stenózu karotid nad 50 % a dva podstoupili intervenční výkon na karotidách.

Závěr: Prevalence DM u pacientů chronicky intoxikovaných TCDD je více než 3,5 krát vyšší než ve srovnání s mužskou populací srovnatelného věku. U těchto pacientů byly zároveň nalezeny zvýšené markery oxidačního stresu, který může být bezprostřední příčinou cévních komplikací a metabolických poruch.

Tabulka č. 1 – charakteristika pacientů a srovnání prevalence se srovnatelnou populací

Pacient	Věk (roky)	Kuřák	Koncentrace TCDD (pg/g tuku)	Depo TCDD, µg	BMI	DM	Aterosklerotické pláty v karotickém povodí	ICHS	Arteriální hypertenze	Dyslipidémie	Síťicová hypertenzní angiopatie
1	72	Ano	390	11,71	29,7	Ano	Ano	Ano	Ano	Ano	Ne
2	73	Ne	320	7,11	25,6	Ne	Ano	Ne	Ano	Ano	Ano
3	77	Ne	300	7,71	29,4	Ne	Ano	Ano	Ano	Ano	Ano
4	73	Ano	140	3,15	27,0	Ano	Ano	Ano	Ano	Ano	Ne
5	72	Ano	84	2,13	28,7	Ano	Ano	Ne	Ano	Ano	Ano
6	73	Ne	83	2,32	28,4	Ano	Ano	Ano	Ano	Ano	Ne
7	73	Ne	66	4,6	44,1	Ano	Ano	Ano	Ano	Ano	Ano
8	77	Ne	48	0,82	23,9	Ne	Ano	Ne	Ne	Ne	Ne
Průměr	72,4	37,5	180	4,95	28,2	62,5%	100%	62,5%	87,5%	88,8%	50%
Prevalence ve srovnatelné populaci						17,6%	43%	26%	71,8%	88,8%	14%

Článek byl publikován v časopise Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology, IF = 2,452. Kompletní znění článku v anglickém jazyce je přiloženo.

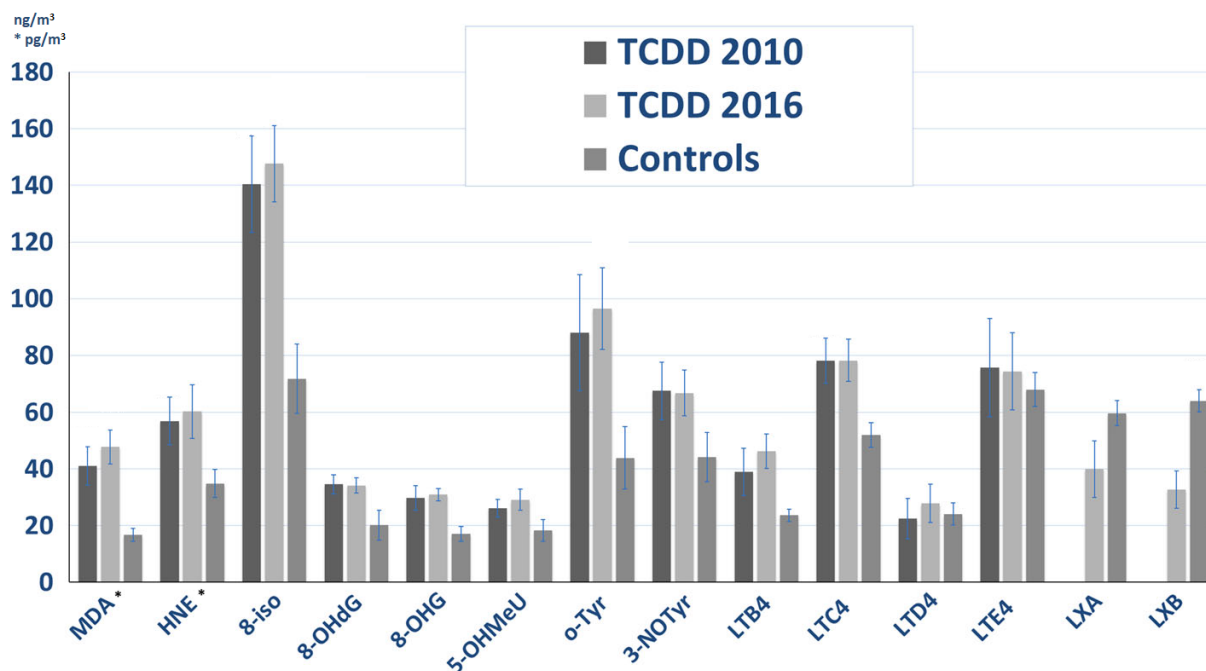
Biomarkery z kondenzátu vydechaného vzduchu odrážejí systémové změny u pacientů s chronickou otravou dioxiny

Cíl práce: Cílem bylo změřit markery oxidačního stresu v kondenzátu vydechaného vzduchu u pacientů chronicky intoxikovaných TCDD. Zároveň bylo provedeno zobrazovací i funkční vyšetření plic (RTG a spirometrie) k posouzení případného poškození plic touto vysoce toxickou látkou.

Metody: Vyšetření osmi mužů (průměrný věk 72,4 ± 1,3 let) zahrnovalo analýzu kondenzátu vydechaného vzduchu (vyšetření na MDA, 4-hydroxy-trans-nonenal, 8-iso-prostaglandin F_{2alfa}, markery oxidace nukleových kyselin a proteinů 8-hydroxy-2-deoxyguanosin, 8-hydroxyguanosin a hydroxymetyluracil. Byl proveden skiagram hrudníku a vyšetření plicních funkcí bodyplety smografií včetně vyšetření frakce vydechaného NO (Fractional concentration of Exhaled Nitric Oxide - FeNO).

Výsledky: Všechny měřené markery oxidace lipidů, proteinů a nukleových kyselin v kondenzátu vydechaného vzduchu byly u pacientů exponovaných TCDD významně zvýšené. Průměrné výsledky plicních funkcí i FeNO se nacházely v rámci referenčních hodnot pro odpovídající populaci. Hraniční nálezy na skiagramu hrudníku nebo lehká kombinovaná ventilační porucha byly nalezeny jen u pacientů s nižšími plazmatickými koncentracemi TCDD. Nebyla zjištěna korelace spirometrických parametrů s koncentrací TCDD.

Závěr: TCDD významně neovlivňuje plicní funkce. Zvýšené markery oxidačního stresu a zánětu u osmi pacientů s těžkou chronickou intoxikací TCDD nebyly spojeny s patologickými rentgenovými nálezy ani poruchami plicních funkcí. Markery oxidačního stresu v kondenzátu vydechaného vzduchu odrážejí systémové poškození TCDD a zvýšení těchto biomarkerů lze vysvětlit nejspíše jejich vznikem mimo respirační systém a transportem z jiných tkání.



Graf č. 2 - Markery oxidačního stresu a zánětu u pacientů exponovaných TCDD (hodnoty z let 2010, 2016, hodnoty u kontrol z roku 2010) v kondenzátu vydechaného vzduchu. (MDA = malondialdehyd; HNE = 4-hydroxy-trans-nonenal; 8-iso = 8-isoprostaglandin F2a; 8-OHdG = 8-hydroxy-2-deoxyguanosin; 8-OHG = 8-hydroxyguanosin; 5-OHMeU = 5-(hydroxymethyl)uracil; o-Tyr = o-tyrosin; 3-NOTyr = 3-nitrotyrosin; LT = leukotrien; LX = lipoxin). MDA a HNE jsou vyjádřeny v pg/m^3 , ostatní molekuly v ng/m^3 .

Článek byl publikován v časopise Monatshefte für Chemie, IF = 1,501. Kompletní znění článku v anglickém jazyce je přiloženo.

Diskuse:

V průběhu výzkumu jsme navázali na předchozí studie zaměřené na GV a mikrovaskulární změny u pacientů s DM, např. na studii z roku 2014 [Šoupal J et al. 2014], která popsala souvislost vyšší GV s přítomností mikrovaskulárních komplikací bez ohledu na hodnoty HbA_{1c}.

V průběhu prospektivního sledování jsme posuzovali vztah kompenzace DM a GV k oxidačnímu stresu, mikrovaskulární reaktivitě, biochemickým markerům endotelové dysfunkce a neuropatii. Každý pacient byl vyšetřen dvakrát, s odstupem 3-4 let. To umožnilo posoudit vývoj sledovaných parametrů v čase.

V první studii jsme našli souvislost mezi peroxidací lipidů a poruchou MVR. GV ani HbA_{1c} však nekorelovaly s lipoperoxidací ani se změnami MVR. Během tříletého sledování pacientů s DM1 se dále zhoršovaly parametry MVR a endotelové dysfunkce nezávisle na zlepšení kompenzace diabetu – pro toto pozorování však nemáme jednoduché vysvětlení. Nabízí se zde však mechanismus tzv. glykemické paměti, kdy je rozvoj komplikací podmíněn neuspokojivou kompenzací DM v předcházejícím období v řádu let.

Zaměřili jsme se i na další faktory ovlivňující oxidační stres. V celosvětově unikátní, i když velikostí souboru malé skupině pacientů intoxikovaných TCDD, jsme zkoumali působení toxického vlivu TCDD na organismus a vztah této intoxikace s oxidačním stresem a rozvojem DM2. Pacienti měli i desítky let po expozici TCDD zvýšenou sérovou koncentraci TCDD a výrazně zvýšené parametry oxidačního stresu. Aterosklerotické komplikace a poruchy metabolismu glukózy i lipidů se u nich rozvinuly častěji než u srovnatelné mužské populace. To ukazuje na společný mechanismus rozvoje cévního poškození při DM a intoxikaci TCDD a navíc naznačuje, že oxidační stres se může na rozvoji DM sám podílet. Tyto výsledky jsou v souladu s nálezy naší dřívější studie s průkazem endotelové dysfunkce, poruchy mikrocirkulace a MVR [Pelclová D et al. 2007].

V podskupině pacientů s DM užívajících trvale rt-CGM došlo k významnému zlepšení HbA_{1c} a GV. Toto zlepšení kompenzace diabetu však nebylo doprovázeno změnami ve sledovaných parametrech oxidačního stresu na začátku studie ani po tříletém sledování. Výsledky parametrů oxidačního stresu byly navíc srovnatelné se skupinou pacientů bez CGM, u kterých se GV ani HbA_{1c} nesnížily. U obou skupin pacientů však bylo zjištěno zvýšené antioxidační působení plazmy, a je proto možné, že reálná závažnost oxidačního stresu byla při druhém vyšetření nižší než na začátku studie.

Zajímavé je, že se parametry oxidačního stresu významně nezvýšily ani ve skupině pacientů bez CGM, u kterých nedošlo ke zlepšení kompenzace DM. I když jejich průměrná hodnota HbA_{1c} 63 mmol/mol není z dlouhodobého hlediska optimální, ve skutečnosti jde o spíše o průměrnou kompenzaci DM než o kompenzaci významně neuspokojivou. Chronické komplikace diabetu ve skupině s touto úrovní kompenzace DM by se proto u predisponovaných pacientů rozvinuly patrně za mnohem delší dobu sledování.

V průběhu studie došlo celosvětově i v ČR k významnému rozšíření užívání rt-CGM u pacientů s DM1. K tomu přispěl jednak technologický pokrok, který pacientům přinesl přesnější a trvanlivější (a tedy i v běžném životě použitelnější) systémy CGM, narůstající zkušenosti diabetologů a snaha poskytnout CGM většině pacientů s DM1. V ČR tomu napomohlo také zavedení úhrady CGM z prostředků veřejného zdravotního pojištění. K vyjednávání úhrady CGM přitom významně přispěla i studie COMISAIR. Hodnocení měřených parametrů v naší skupině pacientů však zkomplikoval přechod pacientů na tuto modernější metodu monitorace glukózy v rámci nového léčebného standardu. Proto došlo k určitému odklonu od původního výzkumného plánu. Na druhou stranu to však umožnilo zhodnocení efektu rt-CGM na klinické parametry kompenzace DM a naše výzkumné cíle. Snížení GV a HbA_{1c} pomocí rt-CGM je tak jedním z hlavních přínosů našeho výzkumu, rovněž jsme popsali některé prioritní nálezy, jako je hodnocení oxidačního stresu na membránách a souvislost s endotelovou dysfunkcí a MVR u pacientů s DM1 používajících rt-CGM.

Ve studii COMISAIR se však zejména jednoznačně prokázal trvalý přínos dlouhodobého užívání rt-CGM na kompenzaci diabetu hodnocenou dle HbA_{1c} a TIR, na snížení počtu hypoglykemií i na snížení GV bez ohledu na způsob aplikace inzulínu pery nebo inzulínovou pumpou (CSII). Tato studie je globálně nejdelší prospektivní studií sledující pacienty s DM1 používající trvale rt-CGM.

V minulosti byl obvyklým postupem přechod pacienta na inzulínovou pumpu s cílem zlepšení kompenzace diabetu. Na základě výsledků studie COMISAIR je však zřejmé, že pro pacienty může být stejně vhodnou alternativou používání inzulínových per a rt-CGM. Léčba inzulínovými pery je navíc ve srovnání s CSII méně nákladná a náročná na znalosti a schopnosti pacientů

Naše studie mají několik limitací. Období, během kterého se provádí profesionální CGM, nemusí odpovídat běžnému režimu pacienta, přestože jsme pacienty instruovali, aby po dobu profesionální monitorace CGM neměnili svůj režim. Tato limitace se však nevyskytuje při hodnocení rt-CGM, které pacienti používají prakticky trvale (v našem tříletém sledování

pacienti používali rt-CGM po >80 % času). Studie s rt-CGM nejsou zaslepené, pacienti věděli, že používají CGM. K objektivnějšímu hodnocení parametrů GV jsme však nepoužívali patientský rt-CGM systém, ale profesionální zaslepenou CGM. Studie dále nebyly randomizované, pacienti si zvolili podle svých preferencí, jestli CGM chtějí nebo nechtějí využívat. Ve skupině pacientů s rt-CGM proto nemůžeme vyloučit selekční bias – mohlo jít o motivovanější pacienty, kteří více dbají o své zdraví a přísněji dodržují doporučená režimová a terapeutická opatření. Proto u nich v průběhu studie mohlo dojít k výraznějšímu zlepšování parametrů kompenzace než u pacientů, kteří CGM nepoužívali, přestože vstupní parametry kompenzace diabetu byly v obou skupinách srovnatelné. Na druhou stranu odráží otevřený a nerandomizovaný charakter výzkumu rt-CGM reálnou klinickou praxi.

V naší práci se nám také nepodařilo odpovědět na otázku, zda a jak souvisí kauzálně oxidační stres a GV s rozvojem mikrovaskulárních komplikací. Péče o pacienty s DM1 se v ČR v posledních letech totiž natolik zlepšila, že 3-4letá doba sledování nebyla u uspokojivě kompenzovaných pacientů dostatečná k rozvoji chronických komplikací.

Závěry:

Hlavním přínosem prezentovaného výzkumu je prokázání významného vlivu metody monitorace glukózy u pacientů s DM1 na etablované parametry kompenzace DM jako je HbA_{1c} nebo glykémie, ale i na nové terapeutické cíle, kterými jsou zejména GV a TIR. V průběhu výzkumu jsme prokázali přínos používání rt-CGM na efektivní a trvalé zlepšení kompenzace diabetu snížením HbA_{1c} i GV, což významně zlepšuje péči a život pacientů s DM1 a oddaluje rozvoj mikrovaskulárních komplikací diabetu. Zaměřili jsme se na výzkum vztahů mezi novými parametry kompenzace DM a oxidačním stresem či endotelovou dysfunkcí a přispěli k porozumění v této oblasti. Zároveň jsme ověřili opačný proces, tedy že oxidační stres ovlivňuje metabolismus glukózy a podílí se na rozvoji DM, jak jsme ukázali u pacientů s chronickou intoxikací TCDD. Souvislosti mezi prostou hyperglykemií a GV na jedné straně a oxidačním stresem, pokročilou glykací a cévním poškozením na straně druhé jsou multifaktoriální a nejspíše jsou ovlivněny i dalšími dosud nepoznanými faktory. Nález srovnatelné výše markerů oxidačního stresu a TAS, které jsme zjistili i při rozdílné GV, však nevylučuje rychlejší nebo závažnější progresi cévních změn u pacientů s vyšší GV. Takové studium bude vyžadovat delší časový interval sledování obou skupin pacientů s rozdílným způsobem monitoringu.

Hlavní výsledky vědecké práce:

- pacienti s DM1 mají zvýšené markery oxidačního stresu
- jako první jsme popsali souvislost mezi koncentracemi reaktivních aldehydů vznikajících při peroxidaci lipidů s poruchami kožní MVR u pacientů s DM 1. typu
- po tříletém sledování se markery oxidačního stresu a endotelové dysfunkce nezměnily ve skupině používajících trvale rt-CGM ani ve skupině pacientů používající klasický SMBG, u obou skupin pacientů jsme našli vyšší antioxidační aktivitu plazmy
- zvýšené hromadění AGEs bylo asociováno s porušeným vibračním čítím, klinickým markerem diabetické neuropatie
- v globálně první a nejdelší studii s rt-CGM u pacientů s DM1 léčených inzulínovými pery jsme popsali, že použití rt-CGM zlepšuje kompenzaci DM1, snižuje HbA_{1c}, snižuje GV, snižuje výskyt hypoglykemií a zvyšuje dobu strávenou v cílovém rozmezí glukózy, u pacientů léčených jak MDI, tak i CSII, ve srovnání s klasickým SMBG. Toto zlepšení je rychlé a dlouhodobé
- markery oxidačního stresu jsou u pacientů s chronickou intoxikací TCDD zvýšeny a zároveň je chronická intoxikace TCDD spojená s vyšším výskytem cévních komplikací a metabolických onemocnění včetně DM2

Publikace související s tématem:

Pelcl T, Škrha J Jr, Šoupal J, Flekač M, Kačer P, Škrha J, Navrátil T, Prázný M. Lipid peroxidation and impaired vascular function in patients with type 1 diabetes mellitus. *Monatsh Chem.* 2019; 150: 525. IF 1,501

Šoupal J, Petruželková L, Flekač M, Pelcl T, Matoulek M, Daňková M, Škrha J, Svačina Š, Prázný M. Comparison of different treatment modalities for Type 1 diabetes Including Sensor-Augmented Insulin Regimens in 52-weeks follow-up: a COMISAIR study. *Diabetes Technol Ther.* 2016. IF 2,198

Šoupal J, Petruželková L, Grunberger G, Hásková A, Flekač M, Matoulek M, Mikeš O, Pelcl T, Škrha J jr, Horová H, Škrha J, Parkin ChG, Svačina Š, Prázný M. Glycemic Outcomes in Adults With T1D Are Impacted More by Continuous Glucose Monitoring Than by Insulin Delivery Method: 3 Years of Follow-Up From the COMISAIR Study. *Diabetes Care*. 2020 Jan;43(1) IF = 13,397

Pelcl T, Škrha J Jr, Prázný M, Vlčková S, Fenclová Z, Navrátil T, Malík J, Diblík P, Zikán V, Pelclová D. Diabetes, Cardiovascular Disorders and 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-Dioxin Body Burden in Czech Patients 50 Years After the Intoxication. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2018 Sep;123(3):356-359. IF 2,452

Pelclová D, Navrátil T, Vlčková Š, Fenclová Z, Pelcl T, Kačerová T, Kačer P. Exhaled breath condensate biomarkers reflect systemic changes in patients with chronic dioxin intoxication *Monatsh Chem*. 2018; 149:9 IF 1,501

Publikace nesouvisející s tématem:

Pelcl T, Prázný M. Aplikační technika inzulínu u dospělých pacientů s diabetem. *Vnitr Lek*. 2016;62(6):486-90

Pelcl T. Novinky v péči o pacienty s diabetem mellitem I. typu a nové technologie
In Event Report z EASD 2017. *We Make Media*, 2017, 19-21

Pelcl T. Kanyly a infuzní sety inzulínových pump. *Aktuální medicína*. 2019;1

Horová E, Pelcl T, Šoupal J, Škrha J Jr, Flekač M, Vejražka M, Škrha J, Prázný M. Postprandial microvascular reactivity is significantly modified by endogenous insulin in recently diagnosed Type 2 diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract*. 2018 May;139:300-307

Pelclová D, Ždímal V, Kačer P, Fenclová Z, Vlčková S et al., Syslová K, Navrátil T, Schwarz J, Ziková N, Barošová H, Turci F, Komarc M, Pelcl T, Běláček J, Kukutschová J, Zakharov S.

Oxidative stress markers are elevated in exhaled breath condensate of workers exposed to nanoparticles during iron oxide pigment production. *J Breath Res.* 2016 Feb 1;10(1):016004.

Použité literární zdroje:

1. American Diabetes Association. 11. Microvascular Complications and Foot Care: Standards of Medical Care in Diabetes-2020. *Diabetes Care.* 2020 Jan;43(Suppl 1):S135-S151
2. Antus B. Oxidative Stress Markers in Sputum. *Oxid Med Cell Longev* 2016:2930434
3. Aschermann M, Linhart A. Kouření a kardiovaskulární onemocnění *Cor Vasa* 2010;52(9)
4. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxid Med Cell Longev.* 2014; 360438
5. Basta G, Lazzerini G, Massaro M, Simoncini T, Tanganelli P et al. Advanced glycation endproducts activate endothelium through signal-transduction receptor RAGE: a mechanism for amplification of inflammatory responses. *Circulation* 2002; 105: 816–822
6. Battelino T, Danne T, Bergenstal RM, Amiel SA, Beck R et al. Clinical Targets for Continuous Glucose Monitoring Data Interpretation: Recommendations From the International Consensus on Time in Range. *Diabetes Care.* 2019 Aug;42(8):1593-1603
7. Bebu I, Schade D, Braffett B, Kosiborod M, Lopes-Virella M et al. Reducing HbA1c best strategy to avoid initial, subsequent CVD events in type 1 diabetes. *Diabetes Care.* 2020;February
8. Beck RW, Connor CG, Mullen DM, Wesley DM, Bergenstal RM. The Fallacy of Average: How Using HbA1c Alone to Assess Glycemic Control Can Be Misleading. *Diabetes Care.* 2017 Aug;40(8):994-999
9. Bergenstal RM, Beck RW, Close KL, Grunberger G, Sacks DB et al. Glucose Management Indicator (GMI): A New Term for Estimating A1C From Continuous Glucose Monitoring *Diabetes Care* 2018 Sep; dc181581

10. Brodsky SV, Malinowski K, Golightly M, Jesty J, Goligorsky MS. Plasminogen activator inhibitor-1 promotes formation of endothelial microparticles with procoagulant potential. *Circulation*. 2002 Oct 29;106(18):2372-8
11. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001;414(6865):813-20
12. Ceriello A, Quagliaro L, Catone B Pascon R, Piazzola M et al. Role of hyperglycemia in nitrotyrosine postprandial generation. *Diabetes Care*, 2002;25:1439– 1443
13. Ceriello A, Kilpatrick ES. Glycemic variability: both sides of the story. *Diabetes Care*. 2013;36 Suppl 2:S272-5
14. Cox DJ, Gonder-Frederick L, Ritterband L, Clarke W, Kovatchev BP. Prediction of severe hypoglycemia. *Diabetes Care*. 2007; 30: 1370–1373
15. Česká diabetologická společnost ČLS JEP. Doporučený postup péče o diabetes mellitus 1. typu; 2016: www.diab.cz
16. Česká diabetologická společnost ČLS JEP, Doporučený postup péče o diabetes mellitus 2. typu; 2017: www.diab.cz
17. Česká diabetologická společnost ČLS JEP, Česká nefrologická společnost a Česká společnost klinické biochemie ČLS JEP. Doporučené postupy při diabetickém onemocnění ledvin; 2017: www.diab.cz
18. Česká diabetologická společnost ČLS JEP, Česká společnost klinické biochemie ČLS JEP, Doporučený postup Diabetes mellitus - Laboratorní diagnostika a sledování stavu pacientů; 2019: www.diab.cz
19. Česká diabetologická společnost ČLS JEP – Doporučený postup diagnostiky a léčby diabetické neuropatie; 2016: www.diab.cz
20. Da Moura Semedo C, Webb M, Waller H, Khunti K, Davies M. Skin autofluorescence, a non-invasive marker of advanced glycation end products: clinical relevance and limitations. *Postgrad Med J*. 2017 May;93(1099):289-294
21. Dawber TR, Kannel WB, Lyell LP. An approach to longitudinal studies in a community: the Framingham Study. *Ann N Y Acad Sci*. 1963 May 22;107:539-56

22. Demircan N, Gürel A, Armutcu F, Ünalacak M, Aktunç E et al. The evaluation of serum cystatin C, malondialdehyde, and total antioxidant status in patients with metabolic syndrome. *Med Sci Monit.* 2008;14(2):CR97-101
23. 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):977-86
24. Du K, Ramachandran A, Jaeschke H. Oxidative stress during acetaminophen hepatotoxicity: Sources, pathophysiological role and therapeutic potential. *Redox Biol.* 2016; 10: 148–156
25. Fatima N, Faisal SM, Zubair S, Ajmal M, Siddiqui SS et al. Role of Pro-Inflammatory Cytokines and Biochemical Markers in the Pathogenesis of Type 1 Diabetes: Correlation with Age and Glycemic Condition in Diabetic Human Subjects. *PLoS ONE* 2016; 11(8): e0161548
26. Frid AH, Kreugel G, Grassi G, Halimi S, Hicks D et al. New Insulin Delivery Recommendations. *Mayo Clin Proc.* 2016 Sep;91(9):1231-55
27. Ford ES, Mokdad AH, Giles WH, Brown DW. The Metabolic Syndrome and Antioxidant Concentrations. *Diabetes* 2003; 52(9): 2346-2352
28. Fuchs D, Pepijn PD, Laura AS, Draijer R. The association between diabetes and dermal microvascular dysfunction non-invasively assessed by laser Doppler with local thermal hyperemia: a systematic review with meta-analysis. *Cardiovasc Diabetol* 2017; 16:11
29. Genuth S, Sun W, Cleary P, Sell DR, Dahms W et al. Glycation and carboxymethyllysine levels in skin collagen predict the risk of future 10-year progression of diabetic retinopathy and nephropathy in the diabetes control and complications trial and epidemiology of diabetes interventions and complications participants with type 1 diabetes. *Diabetes.* 2005 Nov;54(11):3103-11
30. Gerrits E, Luther H, Kleefstra N, Graaff R, Groenier K et al. Skin autofluorescence *Diabetes Care* 2008. 31:517–521
31. Giardino I, Edelstein D, Brownlee M. Nonenzymatic glycosylation in vitro and in bovine endothelial cells alters basic fibroblast growth factor activity. A model for intracellular glycosylation in diabetes, *J Clin Invest.* 1994;94(1):110-7

32. Goff DC Jr, Lloyd-Jones DM, Bennett G, Coady S, D'Agostino RB et al. 2013 ACC/AHA guideline on the assessment of cardiovascular risk: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation*. 2014 Jun 24;129(25 Suppl 2):S49-73
33. Hahad O, Wild PS, Prochaska JH, Schulz A, Hermanns I et al. Endothelial Function Assessed by Digital Volume Plethysmography Predicts the Development and Progression of Type 2 Diabetes Mellitus. *J Am Heart Assoc*. 2019 Oct 15;8(20):e012509
34. Hansen TW, Staessen JA, Torp-Pedersen C, Rasmussen S, Li Y et al. Ambulatory arterial stiffness index predicts stroke in a general population. *J Hypertens*. 2006 Nov;24(11):2247-53
35. Haslbeck KM, Schleicher E, Bierhaus A, Nawroth P, Haslbeck M et al., The AGE/RAGE/NF- κ B pathway may contribute to the pathogenesis of polyneuropathy in impaired glucose tolerance (IGT), *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2005;113(5):288-91
36. Hirsch IB, Brownlee M. Should minimal blood glucose variability become the gold standard of glycemic control? *J Diabetes Complications*. 2005;19(3):178-81
37. Hofmann MA, Drury S, Fu C, Qu W, Taguchi A et al., RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides, *Cell*. 1999;97(7):889-901
38. Horová E, Prázný M. Endotelová dysfunkce: Příčiny, důsledky a možnosti jejího hodnocení. *Diabetes, Metabolismus, Endokrinologie a Výživa* 2009: 12(3)
39. Horová E, Mazoch J, Hilgertová J, Kvasnička J, Škrha J et al. 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
40. Horvath B, Hegedus D, Szapary L, Marton Z, Alexy T et al. Measurement of von Willebrand factor as the marker of endothelial dysfunction in vascular diseases *Exp Clin Cardiol*. 2004; 9(1): 31–34
41. Charleer S, De Block C, Van Huffel L, Broos B, Fieuws S et al. Quality of Life and Glucose Control After 1 Year of Nationwide Reimbursement of Intermittently Scanned

Continuous Glucose Monitoring in Adults Living With Type 1 Diabetes (FUTURE): A Prospective Observational Real-World Cohort Study. *Diabetes Care* 2020 Feb;43(2):389-397

42. Chen S, Khan ZA, Cukiernik M, Chakrabarti S. Differential activation of NF-kappa B and AP-1 in increased fibronectin synthesis in target organs of diabetic complications. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003;284(6):E1089-97

43. International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas, 9th edn.* Brussels, Belgium: 2019. <https://www.diabetesatlas.org>

44. Juvenile Diabetes Research Foundation Continuous Glucose Monitoring Study Group, Wilson DM, Xing D, Beck RW, Block J, Bode B et al. Hemoglobin A1c and mean glucose in patients with type 1 diabetes: analysis of data from the Juvenile Diabetes Research Foundation continuous glucose monitoring randomized trial. *Diabetes Care.* 2011 Mar;34(3):540-4

45. Kalani M. The importance of endothelin-1 for microvascular dysfunction in diabetes. *Vasc Health Risk Manag.* 2008;4(5):1061-8

46. Kasalová Z, Prázný M, Škrha J. Relationship between peripheral diabetic neuropathy and microvascular reactivity in patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus - neuropathy and microcirculation in diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2006;114(2):52-7

47. Katakami N, Matsuhisa M, Kaneto H, Matsuoka TA, Sakamoto K et al. Endogenous secretory RAGE but not soluble RAGE is associated with carotid atherosclerosis in type 1 diabetes patients, *Diab Vasc Dis Res.* 2008;5(3):190-7

48. Kilpatrick ES. The rise and fall of HbA_{1c} as a risk marker for diabetes complications. *Diabetologia* 2012 55: 2089

49. Koga M, Kasayama S. Clinical impact of glycated albumin as another glycemic control marker. *Endocr J.* 2010;57(9):751-62

50. Konukoglu D, Uzun H. Endothelial Dysfunction and Hypertension. *Adv Exp Med Biol.* 2017;956:511-540

51. Kuricová K, Pácal L, Šoupal J, Prázný M, Kaňková K. Effect of glucose variability on pathways associated with glucotoxicity in diabetes: Evaluation of a novel in vitro experimental approach. *Diabetes Res Clin Pract.* 2016;114:1-8

52. Li S, Nemeth I, Donnelly L, Hapca S, Zhou K, et al. Visit-to-Visit HbA1c Variability Is Associated With Cardiovascular Disease and Microvascular Complications in Patients With Newly Diagnosed Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*. 2020 Feb;43(2):426-432
53. Lip GY, Blann AD. von Willebrand factor and its relevance to cardiovascular disorders. *Br Heart J*. 1995;74(6):580-3
54. Leal CA, Schetinger MR, Leal DB, Morsch VM, Schafer da Silva A et al, Oxidative stress and antioxidant defenses in pregnant women. *Redox Rep*. 2011;16(6):230-6
55. Maldonado G, Guerrero R, Paredes C, Rios C. Nailfold capillaroscopy in diabetes mellitus. *Microvasc Res*. 2017 Jul;112:41-46
56. Mattace-Raso FU, van der Cammen TJ, Hofman A, van Popele NM, Bos ML et al. Arterial stiffness and risk of coronary heart disease and stroke: the Rotterdam Study. *Circulation*. 2006 Feb 7;113(5):657-63
57. Marrazzo G, Barbagallo I, Galvano F, Malaguarnera M, Gazzolo D et al. Role of dietary and endogenous antioxidants in diabetes. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2014;54(12):1599-616
58. Maruhashi T, Kihara Y, Higashi Y. Assessment of endothelium-independent vasodilation: from methodology to clinical perspectives. *J Hypertens*. 2018 Jul;36(7):1460-1467
59. Marseglia L, Manti S, D'Angelo G, Nicotera A, Oarisi E et al. Oxidative Stress in Obesity: A Critical Component in Human Diseases. *Int J Mol Sci*. 2015; 16(1): 378–400
60. Mathieu C, Van Den Mooter L, Eeckhout B. Empagliflozin in type 1 diabetes. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2019 Aug 22;12:1555-1561
61. Meerwaldt R, Graaff R, Oomen PHN, Links TP, Jager JJ et al. Simple non-invasive assessment of advanced glycation endproduct accumulation. *Diabetologia*. 2004 Jul;47(7):1324-1330
62. Meza CA, La Favor JD, Kim DH, Hickner RC. Endothelial Dysfunction: Is There a Hyperglycemia-Induced Imbalance of NOX and NOS? *Int J Mol Sci*. 2019 Aug 2;20(15)

63. Moldovan L, Moldovan NI. Oxygen free radicals and redox biology of organelles. *Histochemistry and Cell Biology*. 2004;122(4):395–412
64. Monnier L, Wojtuszczyzn A, Colette C, Owens D. The contribution of glucose variability to asymptomatic hypoglycemia in persons with type 2 diabetes. *Diabetes Technol Ther*. 2011; 13: 813–818
65. Monnier L, Mas E, Ginet C, Michel F, Villon L et al. Activation of oxidative stress by acute glucose fluctuations compared with sustained chronic hyperglycemia in patients with type 2 diabetes. *JAMA*. 2006 Apr 12;295(14):1681-7
66. Mordi I, Mordi N, Delles C, Tzemos N. Endothelial dysfunction in human essential hypertension. *J Hypertens*. 2016 Aug;34(8):1464-72
67. Näslund U, Ng N, Lundgren A, Fhärm E, Grönlund C et al. Visualization of asymptomatic atherosclerotic disease for optimum cardiovascular prevention (VIPVIZA): a pragmatic, open-label, randomised controlled trial. *Lancet*. 2019 Jan 12;393(10167):133-142
68. Nishioka Y, Okada S, Noda T, Myojin T, Kubo S et al. Absolute risk of acute coronary syndrome after severe hypoglycemia: A population-based 2-year cohort study using the National Database in Japan. *J Diabetes Investig*. 2019 Oct 3
69. Oliver JJ, Webb DJ, Newby DE. Stimulated tissue plasminogen activator release as a marker of endothelial function in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005 Dec;25(12):2470-9. Epub 2005 Oct 6
70. Oliver N, Gimenez M, Calhoun P, Cohen N, Moscardo V et al. Continuous Glucose Monitoring in People With Type 1 Diabetes on Multiple-Dose Injection Therapy: The Relationship Between Glycemic Control and Hypoglycemia. *Diabetes Care* 2020 Jan;43(1):53-58
71. Ogawa K, Tanaka T, Nagoshi T, Sekiyama H, Arase S et al. *BMJ Open*. Increase in the oxidised low-density lipoprotein level by smoking and the possible inhibitory effect of statin therapy in patients with cardiovascular disease: a retrospective study. 2015 Jan 21;5(1):e005455

72. Pelclová D, Navrátil T, Fenclová Z, Vlčková S, Kupka K et al. Increased oxidative/nitrosative stress markers measured non-invasively in patients with high 2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-*p*-dioxin plasma level. *Neuro Endocrinol Lett.* 2011;32 Suppl 1:71-6
73. Pelclová D, Prázný M, Škrha J, Fenclová Z, Kalousová M et al. 2,3,7,8-TCDD exposure, endothelial dysfunction and impaired microvascular reactivity. *Hum Exp Toxicol.* 2007 Sep;26(9):705-13
74. Peña AS, Couper JJ, Harrington J, Gent R, Fairchild J et al. Hypoglycemia, but not glucose variability, relates to vascular function in children with type 1 diabetes. *Diabetes Technol Ther.* 2012;14(6):457-62
75. Pettus JH, Zhou FL, Shepherd L, Mercaldi K, Preblich R et al. Differences between patients with type 1 diabetes with optimal and suboptimal glycaemic control: A real-world study of more than 30 000 patients in a US electronic health record database. *Diabetes Obes Metab.* 2019 Dec 2
76. Piepoli MF, Hoes AW, Agewall S, Albus C, Brotons C et al. 2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: The Sixth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of 10 societies and by invited experts) Developed with the special contribution of the European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR). *Eur Heart J.* 2016 Aug 1;37(29):2315-2381
77. Qu Y, Jacober SJ, Zhang Q, Wolka LL, DeVries JH. Rate of hypoglycemia in insulin-treated patients with type 2 diabetes can be predicted from glycemic variability data. *Diabetes Technol Ther.* 2012; 14: 1008–1012
78. Quagliaro L, Piconi L, Assalone R, Martinelli L, Motz E. 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, 2795– 2804
79. Raitakari OT, Celermajer DS. Flow-mediated dilatation. *Br J Clin Pharmacol.* 2000 Nov;50(5):397-404
80. Ren Q, Ji LN, Lu JM, Li YYF, Li QM et al. Search for clinical predictors of good glycemic control in patients starting or intensifying oral hypoglycemic pharmacological

therapy: A multicenter prospective cohort study. *J Diabetes Complications*. 2020 Feb;34(2):107464

81. Rezende PC, Hlatky MA, Hueb W, Garcia RMR, da Silva Selistre L et al. Association of Longitudinal Values of Glycated Hemoglobin With Cardiovascular Events in Patients With Type 2 Diabetes and Multivessel Coronary Artery Disease. *JAMA Netw Open*. 2020 Jan 3;3(1)

82. Risso A, Mercuri F, Quagliaro L, Damante G, Ceriello A et al. Intermittent high glucose enhances apoptosis in human umbilical vein endothelial cells in culture. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001; 281: E924–E930

83. Rodrigues LM, Rocha C, Ferreira H, Silva H. Different lasers reveal different skin microcirculatory flowmotion - data from the wavelet transform analysis of human hindlimb perfusion. *Sci Rep* 2019 Nov 18;9(1):16951

84. Samuelsson J, Samuelsson U, Hanberger L, Bladh M, Åkesson K. Poor metabolic control in childhood strongly correlates to diabetes-related premature death in persons <30 years of age-A population-based cohort study. *Pediatr Diabetes*. 2020 Jan 14

85. Sahiner UM, Birben E, Erzurum S, Sackesen C, Kalayci O et al. Oxidative Stress in Asthma. *World Allergy Organ J*. 2011; 4(10): 151–158

86. Shi C, Liu S, Yu H-F, Han B. Glycemic variability and all-cause mortality in patients with diabetes receiving hemodialysis: A prospective cohort study. *Journal of Diabetes and Its Complications*, 2020;107549

87. Schiekofler S, Andrassy M, Chen J, Rudofsky G, Schneider J et al. Acute hyperglycemia causes intracellular formation of CML and activation of ras, p42/44 MAPK, and nuclear factor κ B in PBMCs. *Diabetes*, 2003. 52, 621–633

88. Siciarz A, Weinberger B, Witz G, Hiatt M, Hegyi T. Urinary Thiobarbituric Acid-Reacting Substances as Potential Biomarkers of Intrauterine Hypoxia. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2001;155(6):718-722

89. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med*. 1989 Apr 6;320(14):915-24

90. Syslová K, Böhmová A, Mikoška M, Kuzma M, Pelclová D. Multimarker screening of oxidative stress in aging. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;562860
91. Šejda T, Piřha J, Švandová E, Poledne R. Limitations of non-invasive endothelial function assessment by brachial artery flow-mediated dilatation. *Clin Physiol Funct Imaging*. 2005 Jan;25(1):58-61
92. Škrha J. Oxidační stres a jeho vztah ke komplikacím diabetu, *Interni Med*. 2010; 12(9): 414–418
93. Škrha J jr, Šoupal J, Loni EG, Prázný M, Kalousová M et al. Skin autofluorescence relates to soluble receptor for advanced glycation end-products and albuminuria in diabetes mellitus. *J Diabetes Res*. 2013;650694
94. Škrha J, Šoupal J, Škrha J jr, Prázný M. Glucose variability, HbA_{1c} and microvascular complications. *Rev Endocr Metab Disord*. 2016;17(1):103-10
95. Šoupal J, Prázný M, Glykemická variabilita, *Diabetes, Metabolismus, Endokrinologie a Výživa* 2012, 15(3)
96. Šoupal J, Škrha J jr, Fajmon M, Horová E, Mráz M et al. Glycemic variability is higher in type 1 diabetes patients with microvascular complications irrespective of glycemic control. *Diabetes Technol Ther*. 2014;16(4):198-203
97. Tahara Y, Shima K. Kinetics of HbA_{1c}, glycated albumin, and fructosamine and analysis of their weight functions against preceding plasma glucose level. *Diabetes Care* 1995; 18(4): 440-447
98. The Writing Team for the Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Research Group. Sustained Effect of Intensive Treatment of Type 1 Diabetes Mellitus on Development and Progression of Diabetic Nephropathy, The Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (EDIC) Study, *JAMA*. 2003; 290(16): 2159–2167
99. Ústav zdravotnických informací a statistiky, *Zdravotnická ročenka České republiky* 2018 <https://www.uzis.cz/res/f/008280/zdroccz-2018.pdf>
100. Vazzana N, Santilli F, Cucurullo C, Davi G. Soluble forms of RAGE in internal medicine. *Intern Emerg Med*. 2009t;4(5):389-401

101. Verma S, Buchanan MR, Anderson TJ. Endothelial function testing as a biomarker of vascular disease. *Circulation*. 2003;108(17):2054-9
102. Vincent MA, Montagnani M, Quon MJ. Molecular and physiologic actions of insulin related to production of nitric oxide in vascular endothelium. *Curr Diab Rep*. 2003 Aug;3(4):279-88.
103. Williams SB, Goldfine AB, Timimi FK, Ting HH, Roddy MA et al. Acute hyperglycemia attenuates endothelium-dependent vasodilation in humans in vivo. *Circulation*. 1998;97(17):1695-701
104. Wang M, Sui J, Wang S, Wang X. Correlations of carotid intima-media thickness with endothelial function and atherosclerosis degree in patients with type 2 diabetes mellitus. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2019;72(4):431-439
105. Wu G, Meininger CJ. Nitric oxide and vascular insulin resistance. *Biofactors*. 2009 Jan-Feb;35(1):21-7
106. Yamada T, Ogawa K, Tanaka TD, Nagoshi T, Minai K et al. Increase in oxidized low-density lipoprotein level according to hyperglycemia in patients with cardiovascular disease: A study by structure equation modeling. *Diabetes Res Clin Pract*. 2020 Mar;161:108036
107. Yan SF, Ramasamy R, Schmidt AM. Soluble RAGE: therapy and biomarker in unraveling the RAGE axis in chronic disease and aging. *Biochem Pharmacol*. 2010;79(10):1379-86
108. Yoshinaga E, Kawada A, Ono K, Fujimoto E, Wachi H et al. N^ε-(Carboxymethyl)lysine Modification of Elastin Alters Its Biological Properties: Implications for the Accumulation of Abnormal Elastic Fibers in Actinic Elastosis. *J Invest Dermatol*. 2012;132(2):315-23
109. Zhang Y, Zhang H, Li P. Cardiovascular risk factors in children with type 1 diabetes mellitus. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2019 Jul 26;32(7):699-705
110. Zhao X, Lu X, Feng Q. Deficiency in endothelial nitric oxide synthase impairs myocardial angiogenesis. *Am J Cardiol* 2002; 283: H2371–H2378

111. Zieman SJ, Melenovsky V, Clattenburg L, Corretti MC, Capriotti A et al. Advanced glycation endproduct crosslink breaker (alagebrium) improves endothelial function in patients with isolated systolic hypertension, J Hypertens. 2007;25(3):577-83

Seznam použitých zkratek:

ADA – American Diabetes Association (Americká diabetologická společnost)

AGEs – Advanced Glycation Endproducts (konečné produkty pokročilé glykace)

AU – Arbitrary Units (arbitrární jednotky)

CGM – Continuous Glucose Monitoring (kontinuální monitorace glukózy)

CKD-EPI - Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration – způsob výpočtu eGFR

CONGA – Continuous Overall Net Glycemic Action

CV – Coefficient of Variation (koeficient variability)

CSII – Continuous Subcutaneous Insulin Infusion (inzulínová pumpa)

ČDS – Česká diabetologická společnost

DCCT – Diabetes Control and Complications Trial

DM – Diabetes mellitus

DM1 – Diabetes mellitus 1. typu

DM2 – Diabetes mellitus 2. typu

d-ROMs – derivatives of Reactive Oxygen Metabolites – deriváty reaktivních kyslíkových metabolitů

eGFR – estimated Glomerular Filtration Rate (odhadovaná glomerulární filtrace)

eNOS – endotelová NO syntáza

FeNO - Fractional concentration of Exhaled Nitric Oxide (frakce vydechaného oxidu uhličitého)

FMD - Flow Mediated Dilatation - dilatace zprostředkovaná průtokem

FRAS – Free Radical Analytical System (analytický systém pro měření volných radikálů)

GLUT – Glucose Transporter (glukózový přenašeč)

GMI – Glucose Management Indicator

GV – Glykemická variabilita

HbA_{1c} – Glykovaný hemoglobin

ICAM - Intercellular Adhesion Molecule (intracelulární adhezivní molekula)

IFN γ - interferon gama

IDL – intermediate-density-lipoprotein (lipoprotein o střední hustotě)

ICHS – ischemická choroba srdeční

IL-1 – interleukin 1

IF – impact factor

IMT – Intima-Media Thickness (tloušťka intimo-mediální vrstvy)

LDL – Low Density Lipoprotein (lipoprotein o nízké hustotě)

MAGE – Mean Amplitude of Glycemic Excursions

MDI – Multiple Daily Injections – intenzifikovaný inzulínový režim injekcemi nebo inzulínovými pery

MVR – mikrovaskulární reaktivita

PAI - Plasminogen Activator Inhibitor (inhibitor tkáňového aktivátoru plasminogenu)

PAT – Plasmatic Antioxidant Test (test plazmatických antioxidantů)

PDGF - platelet derived growth factor

PKC – Proteinkináza C

PORH – post okluzní reaktivní hyperémie

PU – Perfusion Units (jednotky perfúze)

RAGE – Receptor for Advanced Glycation Endproducts (receptor pro konečné produkty pokročilé glykace)

ROS – Reactive Oxygen Species (reaktivní formy kyslíku)

rt-CGM – real time Continuous Glucose Monitoring (kontinuální monitorace glukózy v reálném čase)

SAP – Sensor Augmented Pump (pumpa v propojení s CGM)

SD – Standard Deviation (směrodatná odchylka)

SMBG - Self Monitored Blood Glucose (monitorování glykémie pacientem)

SOD – Superoxiddismutáza

sRAGE – Soluble Receptor for Advanced Glycation Endproducts (solubilní receptor pro konečné produkty pokročilé glykace)

TCDD - 2,3,7,8-tetrachlordibenzo-*p*-dioxin

TIR – Time In Range (čas strávený v cílovém rozmezí)

TH – Termální hyperémie

TNF α - tumor necrosis factor alfa

tPA - Tissue Plasminogen Activator (Tkáňový aktivátor plasminogenu)

TGF-beta - Tumor Growth Factor beta

ÚZIS - Ústav zdravotnických informací a statistiky

VCAM - Vascular Cell Adhesion Molecule (adhezní molekula cévních buněk)

VEGF - Vascular Endothelium Growth Factor

VPT – Vibratory Perception Threshold (práh vibračního čítí)

vWF - von Willebrandův faktor