

1.LF UK Praha
Postgraduální doktorské studium biomedicíny

1999-2007

Dizertační práce

Doktorand: MUDr. Vladimíra Fejfarová
Školitel: Doc. MUDr. Alexandra Jirkovská, CSc.

Centrum diabetologie Institutu klinické a experimentální medicíny, Praha

Téma dizertační práce:
Imunologické abnormality a infekční komplikace
u pacientů se syndromem diabetické nohy a
terapie syndromu diabetické nohy odlehčením

Studijní program: Postgraduální doktorské studium v biomedicině

Oborová rada: 5 - Fyziologie a patofyziologie člověka

(předseda Prof. MUDr. Stanislav Trojan, DrSc.)

Fakulta: 1. lékařská fakulta University Karlovy

Školící pracoviště: Centrum diabetologie, IKEM, Vídeňská 1958/9, 140 21, Praha 4

Oponenti: 1.....
2.....
3.....

V Praze.....

Obsah:

1. Úvod dizertační práce a literární přehled k její problematice.....	4
1.1 Patofyziologie syndromu diabetické nohy.....	4
1.2 Imunitní systém a jeho poruchy způsobené diabetem.....	8
1.3 Vliv vitamínů a vybraných prvků na imunitní funkce.....	11
1.4 Infekční komplikace u pacientů se syndromem diabetické nohy.....	13
1.5 Terapie syndromu diabetické nohy odlehčením.....	17
2. Jednotlivé cíle dizertační práce.....	20
3. Vybrané metodiky jednotlivých studií.....	21
3.1 Clampové techniky.....	21
3.2 Stanovení funkce polymorfonukleárních buněk.....	24
3.3 Mikrobiologické metody.....	27
3.4 Aplikace kontaktních fixací.....	30
3.5 Stanovení biochemických parametrů.....	33
3.6 Použité statistické metody.....	34
4. Přehled výsledků a diskuze k jednotlivým studiím.....	35
4.1 Abnormality imunitních funkcí ve vztahu k diabetu a jeho komplikacím, zejména syndromu diabetické nohy (studie 1-5).....	35
Studie 1: Vliv akutní hyperglykémie a/nebo hyperinzulinémie na funkce polymorfonukleárních buněk u zdravých dobrovolníků.....	35
Studie 2: Vliv akutní hyperglykémie a hyperinzulinémie na funkce polymorfonukleárních buněk u pacientů s diabetes mellitus 1. typu.....	45
Studie 3: Nespecifický imunitní systém u pacientů se syndromem diabetické nohy.....	51
Studie 4: Změny imunitního systému a zánětlivých parametrů u pacientů se syndromem diabetické nohy.....	53
Studie 5: Vitamíny a vybrané prvky u pacientů se syndromem diabetické nohy a jejich vztah k funkcím polymorfonukleárních buněk.....	58
4.2 Infekční komplikace syndromu diabetické nohy (studie 6-8).....	63
Studie 6: Výskyt patogenů a jejich rezistence na antibiotika u transplantovaných, dialyzovaných a ostatních pacientů se syndromem diabetické nohy.....	63
Studie 7: Vliv antibiotické rezistence bakteriálních agens na četnost amputací u pacientů se syndromem diabetické nohy.....	68
Studie 8: Mykotické infekce u pacientů se syndromem diabetické nohy se zaměřením na jejich diagnostiku a sledování rizikových faktorů.....	72
4.3 Terapie syndromu diabetické nohy odlehčením (studie 9-11).....	77
Studie 9: Vliv léčby snímatelnými kontaktními fixacemi na hojivost syndromu diabetické nohy.....	77
Studie 10: Komplikace léčby snímatelnými kontaktními fixacemi se zaměřením na osteomyelitidu	82
Studie 11: Srovnání efektu léčby snímatelnými kontaktními fixacemi a ortézami typu „Removable Cast Walker“ na hojení syndromu diabetické nohy	84

5. Závěry dizertační práce.....	89
6. Souhrn.....	91
7. Poděkování.....	95
8. Seznam použitých zkratk.....	96
9. Seznam použité literatury.....	97
10. Přehled vlastních publikací.....	108
11. Přílohy dizertační práce.....	120

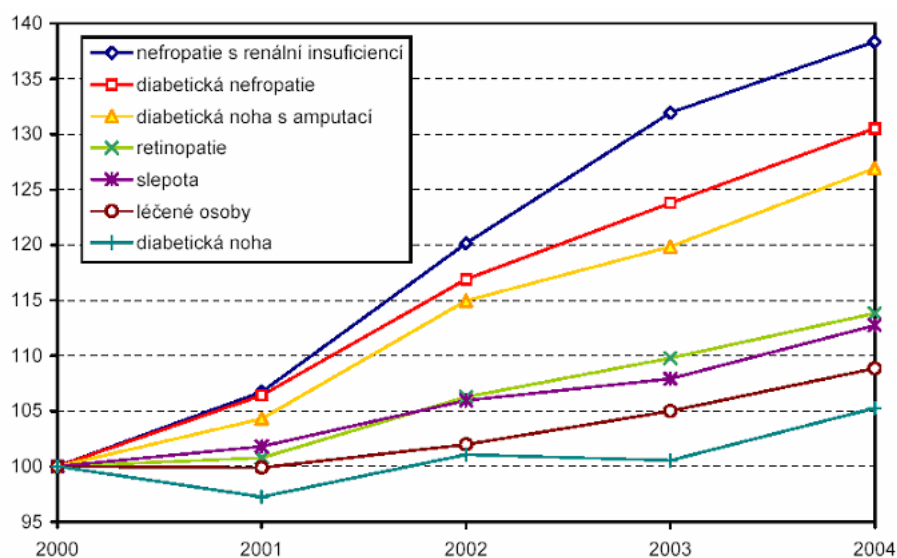
1. Úvod dizertační práce a literární přehled k její problematice:

Jednou z nejčastějších a kvalitu života podstatně zhoršujících diabetických komplikací je syndrom diabetické nohy (SDN). Dizertační práce je zaměřena na imunologické abnormality a infekční komplikace SDN a na zavedení nových terapeutických metod u pacientů se SDN. **Výsledky studia mohou přispět ke komplexnímu pohledu na patofyziologické mechanismy ovlivňující SDN.**

1.1 Patofyziologie syndromu diabetické nohy

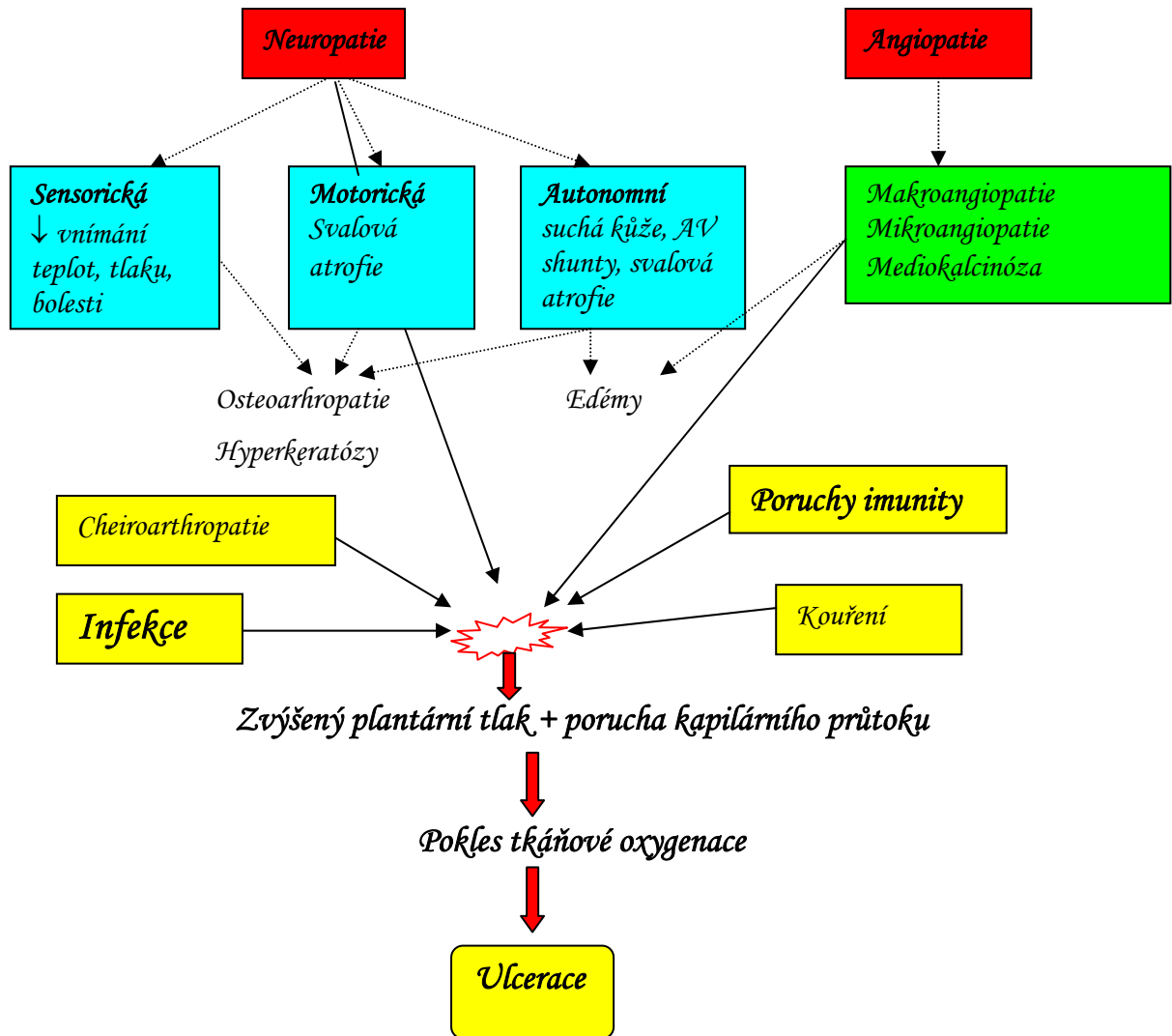
SDN je definován dle WHO jako destrukce tkání nohy spojená s neurologickými abnormalitami (diabetickou neuropatií) a s různým stupněm ischemické choroby dolních končetin (ICHDK; 1). V České republice se vyskytuje u 5.6% všech nemocných s diabetes mellitus 1. i 2.typu (www.uzis.cz), přičemž meziroční přírůstek činí 5%. Graf 1 zobrazuje relativní přírůstek amputací dolních končetin, který patří v posledních letech spolu s přírůstkem diabetické nefropatie k nejvyšším.

Graf č. 1: Relativní přírůstky komplikací diabetu a léčených pacientů v letech 2001-2004 ve srovnání s rokem 2000 (www.uzis.cz).



Patofyziologické mechanismy rozvoje SDN jsou zachyceny na obrázku 1 (2):

Obrázek č.1: Schéma patogeneze SDN.



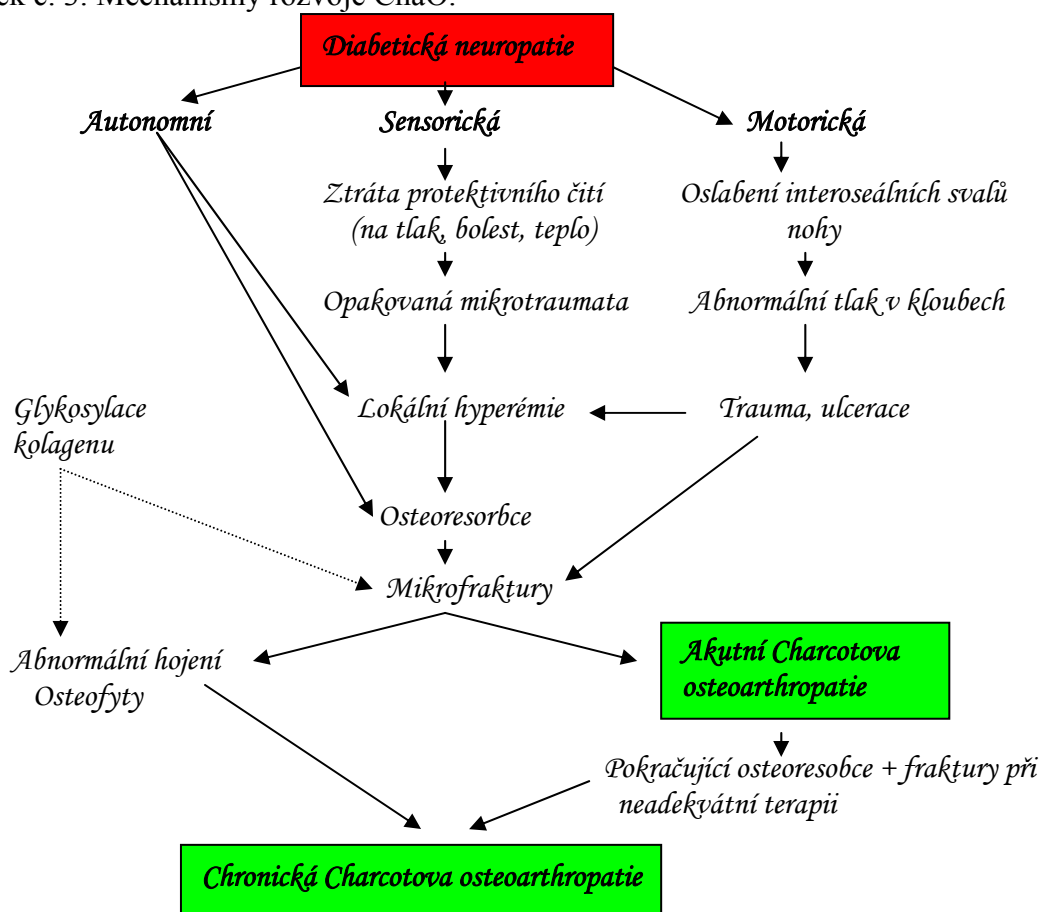
K nejvýznamnějším faktorům, které mohou přispět k rozvoji SDN, řadíme diabetickou neuropatii, infekci tkání a poruchu imunitních funkcí zpomalující proces hojení. Diabetická neuropatie, vedoucí k alteraci autonomních, motorických a sensorických nervových vláken, způsobuje poruchu inervace interoseálních svalů a poruchu fyziologické distribuce tlaku lokalizovaného na plantě. **Tyto abnormality vedou k rozvoji malformací, např. kladívkových prstů, k prominencím metatarsálních hlaviček a ke ztrátě podélné či příčné klenby (1).** Deformity dolních končetin vedou ke zvýšení plantárního tlaku v predominantních oblastech, kterými jsou u pacientů s diabetem především oblasti hlaviček metatarsálních kostí a calcanea. Diabetické ulcerace se rozvíjejí na základě popsaných mechanismů až u 10% všech diabetiků(1).

Další součástí SDN je tzv. **Charcotova osteoarthropatie (ChaO; obr. 2).**

Obrázek č. 2: Akutní ChaO u pacienta se SDN.



Obrázek č. 3: Mechanismy rozvoje ChaO.



Existuje mnoho teorií vysvětlujících možný mechanismus vzniku ChaO (3; obr. 3). Podle jedné z nejznámějších dochází vlivem ztráty vnímání propriocepce a bolesti v kombinaci s opakovanými mechanickými traumaty k destrukci kostí (4, 5). Další teorie tvrdí, že původem destrukce kostí je tvorba arteriovenózních shuntů, které postupně vedou k hyperémii dolní končetiny a periartikulární osteopenii. K těmto abnormalitám se přidružují poruchy interoseálních svalů, zvýšení plantárních tlaků, aktivace osteoklastů apod.. Vše vede k rozvoji mikrofraktur (4).

Klasifikaci ChaO je možno provádět na základě aktivity procesu (6) nebo podle lokalizace patologických změn (7).

Proces hojení SDN je velmi často zdlouhavý. Jednou z příčin zpomaleného hojení SDN může být přítomnost infekce (obr. 4). Infekční komplikace se snažíme léčit během ambulantní péče, jelikož hospitalizace je v porovnání s ambulantní terapií finančně náročnější (8). Ovšem infekční komplikace SDN tvoří jednu z nejčastějších příčin dlouhodobé hospitalizace pacientů s diabetes mellitus (9-11).

Obrázek č. 4: Infekční komplikace v rámci SDN.



Infekce v rámci SDN způsobuje poruchu průtoku krve cévami septickou mikrotrombotizací nebo edémem a může proto vést k ischemii hlubších tkáňových

struktur (2). Obvykle je nutno infekci léčit rychle a radikálně, jelikož může ohrozit nejen končetinu pacienta, ale zvláště u některých rizikových skupin pacientů (např. transplantovaní a dialyzovaní nemocní) může ohrozit i jejich život.

Lidský organismus se brání proti infekci pomocí imunitního systému. Ten ovšem může být u pacientů se SDN porušen vlivem různých faktorů, mimo jiné i vlivem diabetu samotného.

1.2 Imunitní systém a jeho poruchy způsobené diabetem

Projevy a léčba infekčních komplikací u pacientů se SDN mohou být ovlivněny porušenou funkční kapacitou specifického i nespecifického imunitního systému.

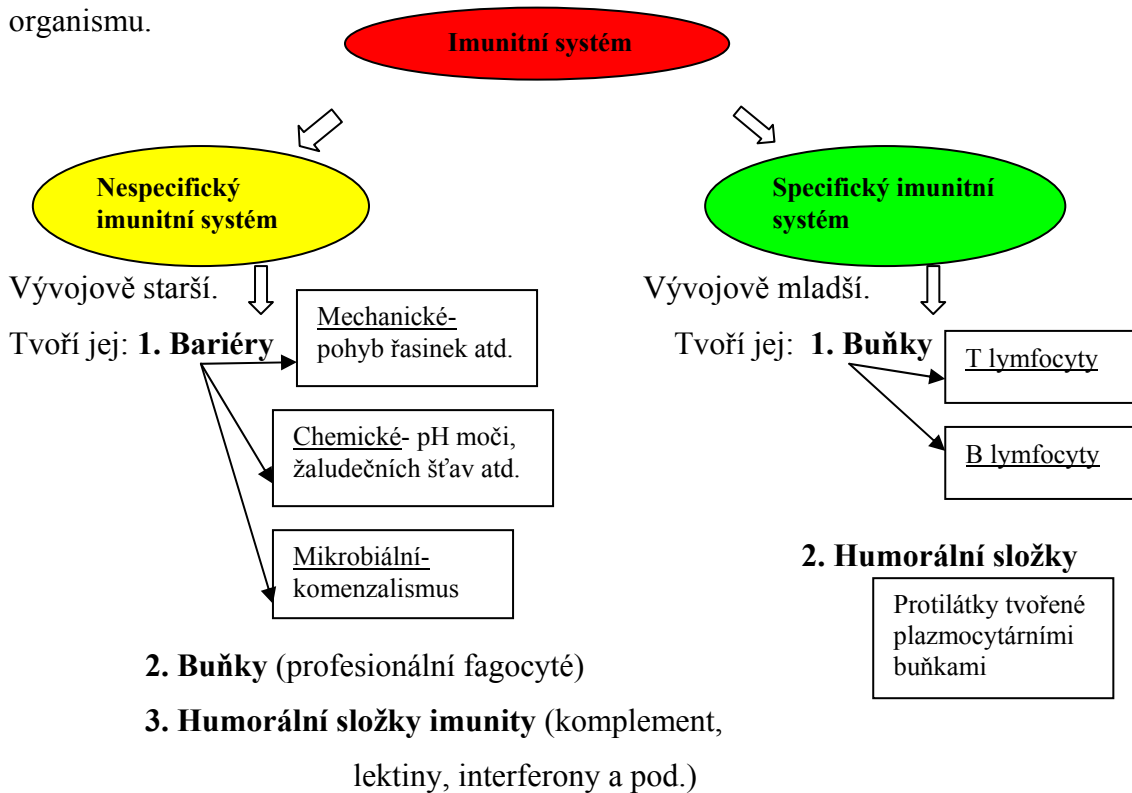
Diabetes mellitus se řadí dle WHO mezi sekundární imunodeficitní onemocnění. V literatuře existuje řada studií, které prokázaly poruchy specifického i nespecifického imunitního systému u pacientů s diabetem. Nicméně jejich výsledky jsou často kontroverzní.

Nespecifický imunitní systém se skládá z humorální a buněčné složky imunity (obr. 5). Jednou z nejdůležitějších součástí tohoto systému jsou fagocytární buňky.

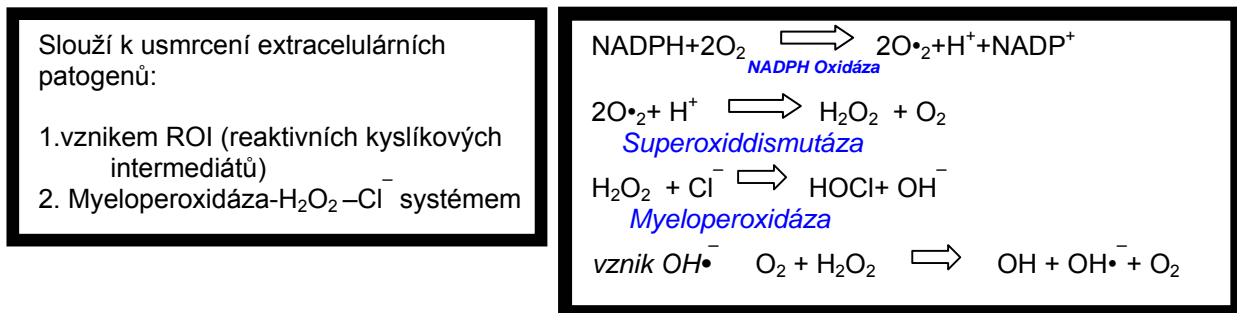
Fagocytóza polymorfonukleárních (PMN) buněk hraje jednu z nejdůležitějších rolí v obraně hostitele před bakteriálními či mykotickými infekcemi. Proces fagocytózy je rozdělen do několika hlavních kroků: chemotaxe, adherence - vazba částic na buněčný povrch fagocytů, ingesce a intracelulárního zabíjení pomocí kyslík-dependentních a kyslík-independentních mechanismů (12, 13), viz obrázek 6 a 7.

Oxidativní vzplanutí, zobrazené na obrázku 6, je definováno jako na kyslíku závislé intracelulární zabíjení. **Oxidativní vzplanutí se skládá z navzájem na sebe navazujících metabolických dějů aktivovaných kontaktem membrány PMN buněk s cizorodou částicí.** Vlivem metabolické kaskády zpracovávající NADPH a O₂ dochází k produkci ROI (superoxidový anion, peroxid vodíku, hydroxidové radikály a singletonové kyslíky; 14-17). ROI jsou považovány za toxické reaktanty, které narušují struktury biopolymerů mikroorganismů, porušují aktivity jejich enzymů, ničí jejich strukturu DNA a mohou alterovat funkce intra- i intercelulárních posílů v PMN buňkách (18). Mikrobicidní aktivita aktivovaných makrofágů proti určitým intracelulárním a

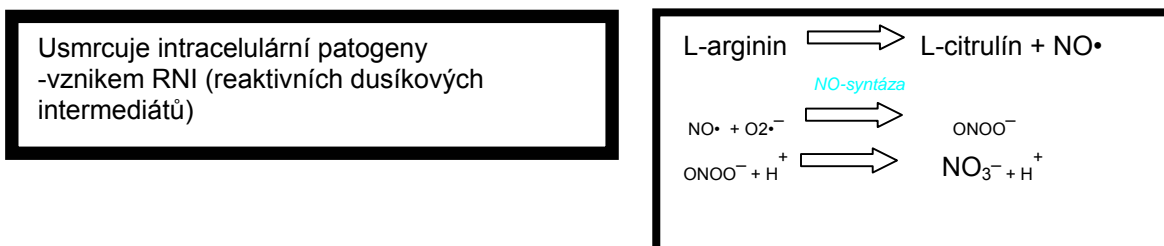
Obrázek č. 5: Schéma nespecifického a specifického imunitního systému v lidském organismu.



Obrázek č. 6: Intracelulární zabíjení na kyslíku závislé (oxidativní vzplanutí).



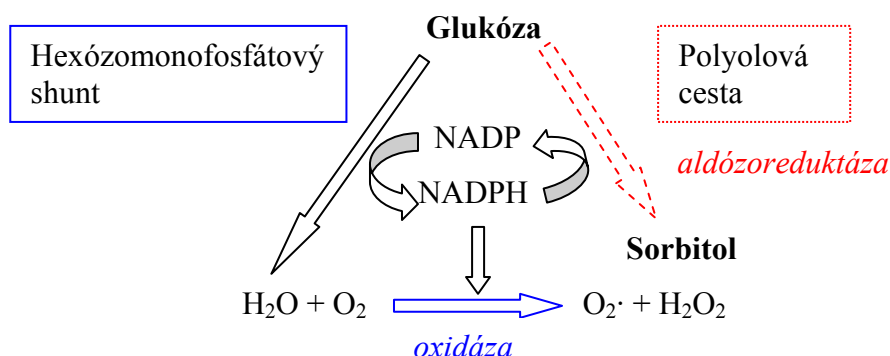
Obrázek č. 7: Intracelulární zabíjení na kyslíku nezávislé.



extracelulárním patogenům koreluje s produkcí ROI v těchto buňkách (19).

Produkce ROI v PMN buňkách je podporována oxidací glukózy cestou hexózomonofosfátového shuntu (obr. 8). Pravděpodobně zde existuje úzké spojení mezi metabolismem glukózy a funkcemi PMN buněk za určitých metabolických a patofyziologických podmínek.

Obrázek č. 8: Zapojení metabolismu glukózy do oxidativního vzplanutí PMN buněk.



U pacientů s diabetes mellitus byla nalezena 50% redukce metabolismu glukózy v PMN buňkách (20); k jeho signifikantnímu zvýšení dochází v leukocytech po zahájení inzulinoterapie (20, 21). Některé studie prokázaly u diabetiků ve spojení s chronickou hyperglykemií funkční změny PMN buněk jako např. poruchu chemotaxe (22, 23), adherence (24) a ingesce (22, 25, 26). V literatuře byla popsána také signifikantní redukce oxidativního vzplanutí stimulovaných PMN buněk jak u dekompenzovaných pacientů s diabetes mellitus 1. typu (25, 27), tak i 2. typu (28).

Není doposud známo, zda-li krátkodobě působící akutní hyperglykémie a/nebo hyperinzulinémie může ovlivnit funkce PMN buněk in vivo a zvýšit tak riziko infekce. Vliv akutní hyperglykémie na PMN funkce byl doposud sledován pouze během in vitro studií. Při vysokých koncentracích glukózy v médiu byla popsána redukováná fagocytóza a oxidativní vzplanutí PMN buněk (29-31). Dle dostupné literatury se vyšetřovaly aktivity PMN buněk in vivo jen zřídka a pouze za hyperinzulinemických podmínek (20, 32), vliv akutní hyperglykémie in vivo na funkci PMN buněk doposud studován nebyl.

Cílem našich studií bylo zjistit vliv krátkodobě působící akutní hyperglykémie a hyperinzulinémie, izolované hyperinzulinémie a izolované hyperglykémie na fagocytózu a oxidativní vzplanutí PMN buněk u zdravých dobrovolníků (**studie 1**) i u

pacientů s diabetem 1. typu (**studie 2**). Tento model experimentů může více korespondovat s patofyziologickými podmínkami přítomnými u pacientů s diabetes mellitus v porovnání s podmínkami in vitro testů.

Vyšší výskyt infekčních komplikací u pacientů s diabetem je ovlivněn celou řadou faktorů - např. dekompenzací diabetu (33, 34), diabetickými komplikacemi (23), genetickými faktory (33), oxidačním stresem (35), přidruženými chorobami, malnutricí a léky (23, 24, 34). **Všechny vyjmenované faktory mohou přispět k poruše (redukci) imunitních funkcí zejména pak PMN fagocytózy a oxidativního vzplanutí (28, 36-38)**. Ovšem v literatuře nalezneme kontraverzní vztahy mezi defekty leukocytárních funkcí a metabolickými abnormalitami přítomnými u diabetu (39, 40). Několik studií prokázalo zmíněné abnormality imunitního systému u těch nemocných, kteří měli glykovaný hemoglobin (HbA1c) vyšší nežli 9% (25, 40, 41). Navzdory těmto nálezům byla v jiných odborných statích popsána normální nebo dokonce zvýšená funkční odpověď PMN buněk u diabetiků (34, 42-47).

Hojení SDN může být ovlivněno poruchami specifického i nespecifického imunitního systému, které byly nalezeny u pacientů s diabetem (viz výše). U nemocných s neuspokojivým hojením diabetických ulcerací jsme se pokusili zjistit funkční stav PMN buněk stanovením jejich fagocytózy a oxidativního vzplanutí (**studie 3**). Očekávali jsme, že parametry imunitních funkcí budou ovlivněny jak diabetem, tak i přítomnou chronickou infekcí.

V rámci specifického imunitního systému byly popsány u diabetiků změny jak ve spektru imunoglobulinů (48, 49), tak v hladinách komplementu (48, 50) a v subpopulacích lymfocytů (51, 52). Jiné literární zdroje ovšem uvádí normální hodnoty zmíněných parametrů (49, 50). Ve **studii 4** jsme se zaměřili na stanovení změn zánětlivých markerů a části specifického imunitního systému u pacientů se SDN.

1.3 Vliv vitamínů a vybraných prvků na imunitní funkce

Hořivost diabetických ulcerací může být ovlivněna různými faktory, např. zmíněnými imunitními dysfunkcemi, ICHDK a pod. Imunitní dysfunkce a rozvoj makroangiopatií (související např. s oxidací LDL částic) může souviset nejen s hyperglykémiemi, ale i poruchami metabolismu mikronutrientů, které zasahují do

metabolických procesů organismu. **Vitamín C, E a vybrané prvky (magnesium- Mg, měď-Cu, zinek-Zn, železo-Fe) jsou zapojeny v glukózovém, lipidovém, proteinovém a rovněž i v energetickém metabolismu.** Tyto mikronutrienty ovlivňují i oxidační stres a mohou mít také vliv na imunitní funkce PMN buněk: vitamíny C a E jsou zapojeny v redoxních systémech a v produkci ROI (53), Cu a Zn jsou hlavními kofaktory Cu,Zn-superoxiddismutázy (54, 55) a ovlivňují regulaci proliferace imunitních buněk (54, 56, 57); snížené hladiny Fe a Mg zhoršují funkce PMN buněk, zejména pak fagocytózu (57, 58).

Vliv mikronutrientů na oxidační stres a tvorbu ROI

V organismu dochází u vitamínů C a E k recipročním změnám jejich radikálů během oxidačně-redukčních reakcí (59). Snížené hladiny vitamínu C mohou vést ke zvýšenému oxidačnímu stresu, jelikož volné radikály z α -tokoferolu nemohou být v adekvátním množství předány hydrofilní látce- vitamínu C. Tento mechanismus je zobrazen na obrázku 9 (59).

Obrázek č. 9: Vliv diabetu na metabolismus vitamínu C a cyklus interakcí vitamínu C a E podílejících se na tvorbě ROI.

Diabetes mellitus → zvýšená glykémie

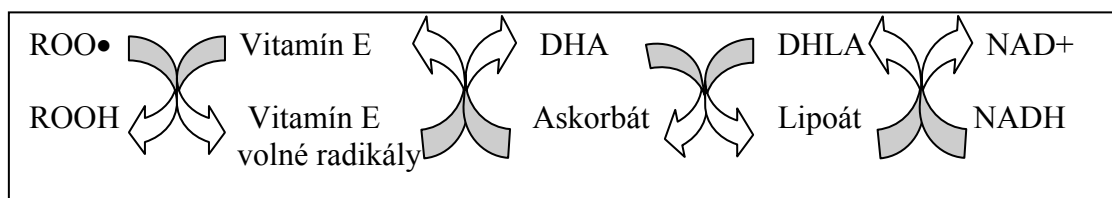
↓
Porucha buněčného vychytávání dehydroaskorbové kyseliny (DHA)

↓
Deficit askorbátu

↓
Lokalizované kurděje

↘
Vyšší aktivita Vitamin C a E redoxních cyklů.

⇓ *Oxidačně-redukční reakce*

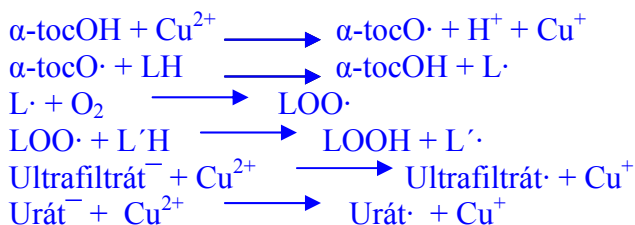


Cu a Zn jsou kofaktory řady enzymů např. již zmíněné Cu, Zn-superoxiddismutázy. Superoxiddismutáza je jedním z nejdůležitějších enzymů

zapojených v antioxidačním systému našeho organismu. Superoxiddismutáza katalyzuje transformaci ROI na H₂O₂ a O₂ a redukuje tak riziko rozvoje aterosklerózy (35).

Avšak chování některých mikronutrientů není vždy jednoznačné. Za normálních podmínek Cu²⁺ ionty mají antioxidační vlastnosti. Avšak, pokud dojde k redukcí Cu²⁺ iontů na Cu¹⁺ (za přispění α-tokoferolu), Cu se začne chovat jako silný prooxidant (60). Při redukcí Cu vznikají α-tokoferoxylové radikály, které jsou následně zapojeny do oxidačně-redukčních reakcí. Do redukce Cu²⁺ iontů jsou zapojeny i LDL částice, sérový ultrafiltrát a kyselina močová (obr. 10; 60-62).

Obrázek č. 10: Reakce vedoucí k redukcí Cu²⁺ iontů a k LDL peroxidaci.



α-toc- α-tokoferol; L- lipidy

Mikronutrienty a diabetes

Některé studie demonstrují poruchu inzulinové sekrece, rozvoj inzulinové rezistence a glukózové intolerance vlivem abnormalit metabolismu Mg, Cu a Zn (63-65). Existuje také několik prací, které prokázaly změny sérových hladin zmíněných mikronutrientů u pacientů s diabetem (66-69). U nemocných se SDN jsme předpokládali změny sérových hladin vitamínů a vybraných stopových prvků majících vztah k funkcím nespecifického imunitního systému (zejména oxidativnímu vzplanutí a tvorbě ROI) vlivem přítomnosti chronické infekce a neuspokojivé kompenzace diabetu (studie 5).

1.4 Infekční komplikace u pacientů se SDN

Mezi lokální projevy infekce řadíme flegmónu dolní končetiny, otoky, nekrózy v ráně, absces, hnisavou a nadměrnou sekreci z rány a zápach rány (1). Infekce měkkých tkání může vést k infekčnímu poškození hlubších struktur, např. k fasciitidě, tendinitidě a osteomyelitidě (OM).

Byla provedena celá řada studií zkoumajících výskyt infekčních agens v diabetických ulceracích (70-72); řada z nich prokázala, že diabetické ulcerace bývají infikovány častěji a větším počtem patogenů než-li nediabetické rány (73-75).

Infekce a mikrobiální rezistence (obr. 4)

Pacienti s chronickou renální insuficiencí, dialyzovaní a transplantovaní nemocní reprezentují skupiny pacientů s vysokým rizikem rozvoje infekce, diabetických ulcerací a následně amputací dolních končetin (76, 77). Přítomnost neuropatie spolu s porušenými imunitními funkcemi, ICHDK (78, 79) a dalšími rizikovými faktory, jakými jsou pokročilý věk a kouření, predisponuje zmíněné rizikové skupiny k rozvoji diabetických ulcerací (77, 78, 80).

V naší podiatrické ambulanci se často setkáváme s těmito rizikovými typy pacientů. Stanovení rozdílů v mikrobiálních nálezech a rozdílů v jejich bakteriální citlivosti k antibiotikům (ATB) mezi rizikovými nemocnými a ostatními pacienty se SDN by mohlo přispět k určení patřičné ATB léčebné strategie. Výběr ATB terapie je doposud postaven na empirických zkušenostech a až v pozdějších fázích léčby se řídí mikrobiální citlivostí nalezených patogenů. Empirická ATB terapie by měla obsahovat terapeutika zaměřená zejména proti stafylokokům a streptokokům, které převažují v kultivačních nálezech ze stěrů (70, 71), nebo širokospektrá ATB, pokud předpokládáme výskyt Gram negativních patogenů či anaerobů v diabetických ulceracích (81). Ve **studii 6** jsme zkoumali rozdíly ve výskytu jednotlivých bakteriálních agens ve stěrech z diabetických ulcerací a rozdíly jejich rezistence na rozličná ATB mezi transplantovanými, dialyzovanými a ostatními pacienty se SDN.

Infekce a amputace (obr. 11)

SDN často vede k invalidizaci pacienta a snížení kvality jeho života. Pokud ovšem u těchto nemocných dojde k vysoké amputaci, je nejen ovlivněna kvalita jejich života (82), ale také u nich hrozí vysoká morbidita a mortalita (1, 82).

Z řady studií víme, že u pacientů s diabetes mellitus dochází častěji k amputacím dolních končetin v porovnání s pacienty bez diabetu. Nízké amputace dolních končetin (pod transmetatarzální úrovní) jsou indikovány u diabetiků k odstranění gangrény, infikované tkáně a ke korekci deformit nohou (1). Vysoké

amputace (nad transmetatarzální úrovní) jsou u pacientů indikovány při progresi ischemické nekrózy nebo septického stavu, který nelze zvrátit konzervativní terapií, dále při výrazných klidových ischemických bolestech, které nelze řešit cévním

Obrázek č. 11: Infekce v amputační ráně.



revaskularizačním zákrokem, které neodpovídají na analgetickou terapii a které nelze řešit nízkou amputací (1).

V literatuře bylo popsáno několik faktorů, které zvyšují riziko amputací dolních končetin u pacientů s diabetem:

- úroveň kompenzace diabetu a trvání diabetu (83)
- poškozená nožní biomechanika a omezená kloubní pohyblivost (84)
- kostní deformity (85)
- renální insuficience zhoršující hojení diabetických ulcerací (10, 86) předchozí hospitalizace pro SDN (10)
- hlubší ulcerace (87)
- vyšší tělesná teplota, která je známkou progresu infekce (10)
- ICHDK a diabetická neuropatie (88-90).

K nejzávažnějším faktorům predisponujícím pacienta k amputaci dolních končetin bezesporu patří ranná infekce (91, 92). Infekce je příčinou amputací dolních končetin až u 25-50% diabetiků (1, 91). Ne všechny pacienty se závažnou infekcí je možné léčit parenterální aplikací ATB do úplné eradikace infekčního agens vzhledem k možným vedlejším účinkům léčby, nedostatku hospitalizačních míst, sociálním a ekonomickým podmínkám a pod. Proto se pokoušíme většinu pacientů léčit ambulantně perorálními ATB. Nicméně mikrobiální rezistence k perorálním ATB

podstatně limituje možnosti ambulantní preskribce a mohla by proto ovlivnit i výskyt amputací dolních končetin u pacientů se SDN. Ve **studii 7** jsme posuzovali vliv přítomnosti všech patogenů rezistentních na perorální ATB na výskyt amputací u pacientů se SDN.

Mykotické infekce

Pacienti s diabetes mellitus mívají poměrně často mykotické postižení dolních končetin, mezi něž řadíme onychomykózu a tinea pedis (93). Tyto abnormality mohou přispět k rozvoji SDN (94; obr. 12) a pravděpodobně mohou vést ke zpomalení hojení diabetických ulcerací.

Obrázek č. 12: Mykotické postižení dolní končetiny.



Většina studií týkajících se mykotických infekcí u pacientů s diabetem je zaměřena na detekci prevalence onychomykózy (obr. 13), která se udává u pacientů s diabetem mezi 7-21% (95-97), nebo na prevalenci tinea pedis, jejíž přítomnost byla popsána u 20-40% případů (98). Mayser a spol. ovšem popsali dokonce 83% výskyt tinea pedis u pacientů s diabetes mellitus (99).

Zajímavá byla studie Boyka a spol., která zkoumala výskyt komplikací v rámci SDN u pacientů s onychomykózou (100, 101). Studie prokázala signifikantně vyšší výskyt sekundárních infekcí (16% vs. 6%), gangrén dolních končetin (4,7% vs. 1%) a

diabetických ulcerací (6,2 vs. 2,2%) u pacientů s onychomykózou oproti nemocným bez mykotického postižení dolních končetin (101).

Výskyt mykotických agens je ovlivněn několika rizikovými faktory, mezi něž řadíme věk pacienta, dekompenzaci diabetu, pozdní komplikace diabetu, zejména diabetickou retinopatii a polyneuropatii, ICHDK, obezitu, imunosupresiva a imunodeficitní choroby (100, 102).

Obrázek č. 13: Onychomykóza u pacienta se SDN.



Problematickými zůstávají otázky výskytu mykotických agens v diabetických ulceracích, jejich vlivu na zpomalené hojení SDN a jejich diagnostiky. Ve studii Denninga a spol. určovali přítomnost mykotické infekce pouze na základě mikroskopického nálezu mykotických agens a doporučovali zahájit antimykotickou terapii pouze na základě mikroskopicky pozitivních vzorků (103). Proto jsme se v naší studii zaměřili na detekci mykotických agens v diabetických ulceracích a zhodnocení diagnostiky jejich přítomnosti ve vzorcích odebraných z plantárních hyperkeratóz a ulcerací jak mikroskopickými, tak kultivačními metodami (**studie 8**).

1.5 Terapie SDN odlehčením

Standardní léčba SDN zahrnuje několik kroků. První z nich je reprezentován lokálními terapiemi, která je prováděna odstraněním hyperkeratóz, lokálním debridementem a aplikací různých antiseptických roztoků či prostředků využívajících principy vlhkého hojení. Dalším krokem v terapii hlavně infekčních komplikací SDN je ATB léčba.

Jelikož by měla být léčba SDN komplexní, je její nedílnou součástí i léčba ischemie a kontrola metabolických parametrů, mezi něž řadíme kontrolu kompenzace diabetu (HbA1c), lipidového spektra a hmotnosti nemocného.

Mezi nejdůležitější součásti léčby SDN patří odlehčení dolních končetin, které zlepšuje tvorbu granulací a epitelizaci. Opakovaný mechanický stres při ztrátě protektivního cití u diabetické neuropatie končetinu ischemizuje a porušuje normální reparační mechanismy. U každého pacienta je nutné najít vhodnou formu odlehčení, ať již pomocí preventivní obuvi se speciálně upravenou vložkou, terapeutické obuvi (obr. 14), speciálních diabetických ortopedických bot, ortéz typu „Walker“ (Removable Cast Walker -

Obrázek č. 14: Terapeutická obuv – „poloviční bota“.



Obrázek č. 15: RCW a r-TCC.



RCW; obr. 15), **plastických ortéz nebo i nově pomocí snímatelných kontaktních fixací** (removable Total Contact Cast - r-TCC; obr. 15; 1).

r-TCC se obvykle indikují u pacientů s chronickými neuropatickými či neuroischemickými ulceracemi, akutní ChaO a neuropatickými frakturami v terénu ChaO nebo OM (1).

Kontraindikací aplikace r-TCC je kritická ICHDK, patologická konfigurace hlezenních či metatarzálních kloubů (hyperextenze nebo hyperflexe), non-compliance pacienta, přítomnost klinických známek zánětu (flegmóna, otok a/nebo febrilní stav), bércový vřed, přítomnost pregangrény nebo gangrény dolní končetiny.

Aplikace TCC má několik nesporných předností. Jednou z nich je rovnoměrné rozložení vertikálního tlaku působícího na plantu dolní končetiny a vyloučení maximálních tlaků na exponovaná místa (104). Dále jsou TCC schopné redukovat rozvoj edémů dolních končetin a stabilizovat dolní končetinu v požadované poloze. Dle provedených studií Langa (104), Armstronga (105), Helma (106) a Laveryho (107) urychluje terapie TCC hojení diabetických ulcerací. Obvykle dochází ke zhojení 70-100% vředů již během 1-2 měsíců. TCC jsou také schopny zlepšit jak klinické známky ChaO (pokles kožních teplot a redukce edémů), tak i parametry zobrazovacích metod (108). Ve **studii 9** jsme zkoumali hojení SDN pomocí aplikace r-TCC v různých indikacích – u diabetických ulcerací, CHaO a neuropatických fraktur.

Léčba pomocí r-TCC, jako každá terapie, má i své nevýhody:

- Nutná kvalifikace zdravotníků v podiatrické péči
- Časová náročnost aplikace
- Vyšší hmotnost fixace v porovnání s poloviční botou
- Omezení pacienta při chůzi, mytí a ve spánku
- Zvýšený výskyt mykóz
- Omezení hybnosti talokrurálního skloubení
- Rozvoj otlakových defektů
- Finanční nákladnost léčby

Klinicky nejzávažnějšími komplikacemi jsou progresse lokálního nálezu (rozvoj flegmóny, zhoršení diabetické ulcerace, otok dolní končetiny) a rozvoj OM. Studie 10 sledovala výskyt komplikací léčby r-TCC se zaměřením na OM a **studie 11** porovnávala výhody a nevýhody léčby pomocí dvou různých typů odlehčení – kontaktní fixace (r-TCC) a speciální ortézy (RCW).

2. Jednotlivé cíle dizertační práce:

Práce je zaměřena na imunologické abnormality, infekční komplikace a terapeutické ovlivnění SDN.

Imunologické abnormality jsme zkoumali v 5 studiích. Cílem jednotlivých studií bylo:

- a. Posouzení vlivu akutní hyperglykémie a/nebo hyperinzulinémie na nespecifický imunitní systém u zdravých dobrovolníků (**studie 1**) a u pacientů s diabetes mellitus 1. typu (**studie 2**).
- b. Posouzení změn nespecifického a specifického imunitního systému a zánětlivých markerů u pacientů se SDN (**studie 3, 4**).
- c. Posouzení změn hladin vybraných vitamínů a stopových prvků a zhodnocení jejich vztahu k imunitním funkcím u pacientů se SDN (**studie 5**).

Infekční komplikace SDN jsme analyzovali ve 3 studiích. Jejich cílem bylo:

- a. Posouzení rozdílu mikrobiologických nálezů a ATB rezistence mezi transplantovanými, dialyzovanými a ostatními nemocnými se SDN (**studie 6**).
- b. Zjištění vlivu ATB rezistence na výskyt amputací u pacientů se SDN (**studie 7**).
- c. Stanovení výskytu mykotických infekcí u pacientů se SDN se zaměřením na jejich diagnostiku a sledování rizikových faktorů (**studie 8**).

Terapii SDN odlehčením jsme zkoumali ve 3 studiích, jejichž cílem bylo:

- a. Srovnání hojení a výskytu komplikací se zaměřením na OM u pacientů se SDN, kteří byli léčeni různými metodami odlehčení (**studie 9-11**).

3. Vybrané metodiky jednotlivých studií:

3.1 Clampové techniky (studie 1, 2)

Clampové techniky u zdravých dobrovolníků

4 hodinové clampové studie byly provedeny u 12 zdravých dobrovolníků (**studie 1**) vždy po 12 hodinovém lačnění. Tři dny před započítím každé clampové studie dodržovali dobrovolníci předepsaný režim spočívající v racionální stravě bez výraznějších jídelních excesů, ve vynechání alkoholu a výrazných sportovních výkonů. Minimální odstup mezi jednotlivými clampovými studiemi byl 14 dní.

Jako první byl proveden **hyperglykemický hyperinzulínový clamp (HHC)**. Design studie byl koncipovaný obdobně jako clampové studie provedené v minulosti de Fronzem (109, 110). Pro aplikaci všech intravenózních infuzí bylo nutné zavést teflonovou braunylu antegrádně (Venflon; OHMEDA, Helsingborg, Švédsko) do jedné z žil v kubitální jamce. Druhá braunyla (Venflon; Becton-Dickinson, Helsingborg, Švédsko) byla umístěna retrográdně do jedné z žil na zápěstí. Tato braunyla sloužila k pravidelným odběrům krve. Ruka a předloktí dané končetiny byly umístěny do hřející dečky k dosažení arterializace venózní krve. Cílem HHC bylo akutně zvýšit plasmatickou hladinu glukózy a poté udržet hyperglykemické plató 17 mmol/l po dobu 4 hodin. Vysoká plasmatická koncentrace glukózy byla navozena pomocí aplikace bolusu 40% glukózy. Množství bolusu byla vypočteno podle následující rovnice (109):

$$\text{dávka (ml)} = \text{hmotnost (kg)} \times (17 - \text{plasmatická koncentrace glukózy}) \times 0,0855$$

Po aplikaci bolusu 40% glukózy byla stanovována glykémie v pravidelných 5-10 minutových intervalech. Během 4 hodinové clampové studie byla udržována hyperglykémie 17 mmol/l pomocí kontinuální infuze 15% glukózy různými rychlostmi verifikovanými dle aktuálních glykemií. Krevní vzorky určené ke stanovení volného inzulínu pomocí IRI (imunoreaktivního inzulínu) byly odebírány vždy v 0., 60., 120., 180., 210., 225. a 240. minutě každé clampové studie. Dále před začátkem všech clampových studií (0.minuta) a po jejich skončení (240. minuta) byly odebrány vzorky

krve ke stanovení krevního obrazu, parametrů fagocytózy a oxidativního vzplanutí PMN buněk.

Další clampovou studií byl **hyperinzulínový euglykemický clamp (HEC)**, který byl proveden dle předchozích studií (109-111). Během clampové studie byl intravenózně podáván inzulin rychlostí $1 \text{ mU} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ (Actrapid HM; NovoNordisk, Copenhagen, Německo) k udržení konstantní inzulinémie cca 60 mU/l . Plasmatická koncentrace glukózy byla udržována na hladině výchozí lačné glykémie (glykémie $4\text{-}6 \text{ mmol/l}$) pomocí kontinuální intravenózní infuze 15% glukózy. Rychlost aplikace glukózy byla opět verifikována podle aktuálních glykemií určovaných v pravidelných $5\text{-}10$ minutových intervalech. K dodržení volumové zátěže dosažené během HHC bylo nutné zbylý objem tekutin substituovat pitnou vodou.

Hyperglykemický clamp je vždy u zdravých dobrovolníků doprovázen reaktivní hyperinzulinémií. Abychom otestovali izolovaný vliv hyperglykémie na funkce imunitních funkcí *in vivo*, bylo nutné provést **izolovaný hyperglykemický clamp (HGC)** s bloádou endogenní produkce inzulinu. K dosažení hyperglykemického plató 17 mmol/l bylo nutné aplikovat bolus 40% glukózy (množství bolusu viz vzorec uvedený výše) a poté byla kontinuálně intravenózně podávána 15% glukóza různými rychlostmi určenými podle glykemií naměřených v $5\text{-}10$ minutových intervalech. Endokrinní sekrece inzulinu byla zablokována kontinuální infuzí somatostatinu rychlostí $500 \text{ ug} \cdot \text{hod}^{-1}$ (Somatostatin inj. Power $1 \times 3 \text{ mg} + \text{ solvens}$; UCB s.a. Pharma, Braine. L'Alleut, Belgie). Abychom zajistili volumovou kompatibilitu HGC s HHC, byl zbylý objem tekutin, který byl celkově podán během HHC, hrazen adekvátním perorálním příjmem pitné vody.

Kontrolní clamp (CC) spočíval v kontinuální infuzi fyziologického roztoku 20 ml/min . Zbylé množství volumu bylo doplněno pitím vody tak, aby CC odpovídal volumově HHC. Kontrolní clampová studie měla vždy odlišit vliv volumové a časové zátěže i dalších stresujících faktorů od vlivu působící hyperglykémie a/nebo hyperinzulinémie.

Průměrná plasmatická koncentrace glukózy během HHC byla $17 \pm 0,35 \text{ mmol/l}$ s koeficientem variací glykemií $< 5\%$. Průměrná koncentrace sérového inzulinu zapříčiněná fyziologickou stimulací jeho endogenní produkce byla $352,3 \pm 66 \text{ mU/l}$. Během HEC bylo dosaženo euglykémie (průměrná plasmatická hladina glukózy $4,7 \pm$

0,09 mmol/l) a hyperinzulinémie s průměrnými sérovými hladinami inzulínu 57 ± 5 mU/l. Stabilní hyperglykémie ($16,4 \pm 0,7$ mmol/l s koeficientem variací $< 5\%$) bylo dosaženo během HGC. Endogenní blokáda inzulínu pomocí kontinuální infuze somatostatinu významně snížila průměrné sérové hladiny endogenního inzulínu ($23,8 \pm 3,6$ mU/l). Během CC se udržovala glykémie a inzulinémie ve fyziologických hodnotách (průměrná glykémie $4,8 \pm 0,12$ mmol/l s koeficientem variací $< 5\%$ a průměrná inzulinémie $3,4 \pm 0,5$ mU/l, respektive).

Clampové techniky u pacientů s diabetes mellitus 1. typu

Všichni pacienti s diabetes mellitus 1. typu zařazení do studie 2 byli vyšetřeni po 12 hodinovém lačnění a 3 denním dodržení režimových opatření popsaných výše (viz studie 1). U 10 nemocných, kteří splnili vstupní kritéria, byly provedeny následující dvě čtyřhodinové clampové studie s odstupem 14 – 30 dní.

První clampovou studií byl čtyřhodinový **hyperglykemický hyperinzulinový clamp (HHC)**, pomocí něhož byla navozena a dále udržována akutní hyperglykémie a hyperinzulinémie. Design studie byl modifikován dle clampových studií prováděných v minulosti (109, 110) a na základě zkušeností ze studie 1.

Během clampové studie byly všechny odběry a infuze prováděny braunylami zavedenými stejným způsobem jako ve studii 1. Arterializace venózní krve bylo dosaženo umístěním distální části horní končetiny do hřející dečky. Cílem HHC bylo akutně navodit a udržet u pacientů s diabetes mellitus 1. typu vyšší plasmatickou koncentraci glukózy (17 mmol/l) a hyperinzulinémii (přibližně 250 umol/l) po dobu 4 hodin. Akutní hyperglykémie (17 mmol/l) bylo dosaženo pomocí aplikace bolusu 40% glukózy. Množství bolusu bylo dáno již výše zmíněnou rovnicí (109).

Po aplikaci bolusu 40% glukózy byla stanovována glykémie v pravidelných 5-10 minutových intervalech. Během 4 hodinové clampové studie byla udržována hyperglykémie 17 mmol/l pomocí kontinuální infuze 15% glukózy různými rychlostmi verifikovanými dle aktuálních glykemií.

Cílové hladiny volného inzulínu byly kalkulovány podle fyziologicky indukované hyperinzulinémie dosažené během HHC u zdravých dobrovolníků. Hyperinzulinémie byla navozena arteficiálně intravenózní kontinuální infuzí inzulínu rychlostí $4 \text{ mU} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ (Actrapid HM; NovoNordisk, Kodaň, Dánsko). Vzorčky ke

stanovení volného inzulínu, krevních obrazů, fagocytózy a oxidativního vzplanutí PMN buněk byly odebrány podle stejného schématu jako ve studii 1.

Pacienti s diabetes mellitus 1.typu absolvovali jako druhou clampovou studii **kontrolní izoinzulínový euglykemický clamp (CC)**, během něhož musela být udržována fyziologická hodnota glykémie a nízká inzulinémie a který časově i volumově odpovídal HHC. Pacientům bylo během této clampové studie podáváno intravenózně malé množství inzulínu (Actrapid HM perfuzorem rychlostí $0,3 \text{ IU} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) k udržení konstantní inzulinémie. K udržení euglykémie bylo nutné pacientům aplikovat malé množství 10% glukózy. Rychlost podávání glukózy byla verifikována podle aktuálních glykemií zjištěných v pravidelných 5-10 minutových intervalech. Zbylý objem tekutin, který byl celkově intravenózně aplikován během HHC, byl nahrazen během CC pitím vody.

Během HHC byla akutně navozena hyperglykémie $17,8 \pm 0,4 \text{ mmol/l}$ s koeficientem variací glykemií $< 5\%$ a hyperinzulinémie $253 \pm 21,2 \text{ mU/l}$. Během CC byla průměrná glykémie $5,6 \pm 0,2 \text{ mmol/l}$ a průměrná inzulinémie $19,1 \pm 2,8 \text{ mU/l}$.

3.2 Stanovení funkcí PMN buněk (studie 1,2,3,5)

Fagocytóza PMN buněk

Fagocytóza PMN buněk byla stanovena průtokovou cytometrií za použití komerčně dostupného kvantitativního testu (PHAGOTEST; Orpegen Pharma, Heidelberg, Německo) podle metod již dříve popsanych v odborné literatuře (49, 50). Phagotest umožňuje detekovat procento neutrofilů, kteří vykazují známky fagocytózy, tzn. ingesci jedné či více bakterií na jeden polymorfonukleár, a také individuální buněčnou fagocytární aktivitu určenou průměrnou fluorescenční intenzitou fagocytujících PMN buněk (počet fagocytovaných bakterií na jednu PMN buňku).

PMN fagocytóza byla stanovena z heparinizované krve. Polovina vzorku heparinizované krve (100 ul/l test) byla inkubována v ledové lázni po dobu 10 minut jako tzv. negativní kontrola. Druhá polovina testovacího vzorku heparinizované krve byla inkubována s fluoresceinem značenými opsonizovanými (imunoglobulinem a komplementem) bakteriemi *Escherichia coli* (*E.Coli* FITC opsonizované bakterie $1 \times 10^9/\text{ml}$) po dobu 10 minut ve vodní lázni s 37°C . Na konci inkubace byla fagocytóza

zastavena přemístěním vzorků do ledové tříště a přidáním 100 ul zhášecího roztoku. Po dvoufázovém promytí krevních vzorků promývacím roztokem, byly erytrocyty lyzovány přidáním 2 ml lyzujícího roztoku. Na závěr analýzy bylo přidáno ke vzorkům 200 ul DNA barvicího roztoku. Měření PMN fagocytózy (stanovení průměrného procenta a průměrné fluorescence intenzity fagocytujících buněk) bylo provedeno do 60 minut.

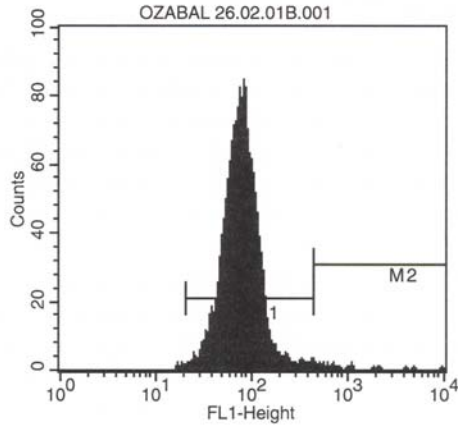
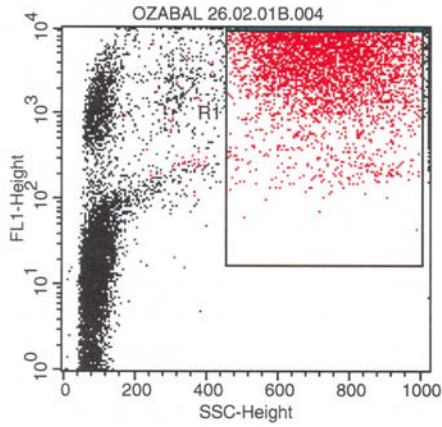
Oxidativní vzplanutí PMN buněk

Oxidativní vzplanutí PMN buněk bylo také stanoveno pomocí průtokové cytometrie použitím komerčně dostupného testu BURSTTEST (Orpegen Pharma, Heidelberg, Germany; obr. 16). Test je schopen detekovat procento a enzymatickou aktivitu PMN buněk (průměrnou fluorescenční intenzitu aktivních PMN buněk produkujících ROI). BURSTTEST používá ke stimulaci PMN buněk nezačleněnou opsonizovanou bakterii *E. coli*. V naší studii jsme jako stimulans k detekci aktivity PMN buněk využili *E. coli*, jelikož tento patogen je fyziologičtějším stimulantem a má bližší vztah k infekci jako takové v porovnání s fMLP (formyl-methionyl-leucyl-fenylalanine) a PMA (phorbol 12-myristát 13-acetát).

Oxidativní vzplanutí PMN buněk bylo analyzováno podle postupu popsaného v odborné literatuře (49, 50). V krátkosti, promíchaná heparinovaná krev (100 ul/test) byla inkubována v ledové lázni po dobu 10 minut, aby došlo k ochlazení krevních vzorků na 0°C. Polovina každého vzorku byla dále promíchána s 20 ul již ochlazených bakterií (*E. coli*). Část vzorku bez stimulans sloužila jako negativní kontrola. 20 ul promývacího roztoku bylo přidáno do testovacích zkumavek. Po promíchání všech zkumavek, byly vzorky inkubovány po dobu 10 minut ve vodní lázni při 37°C. Po přidání 20 ul substrátového roztoku (dihydrorhodamin 123) byly zkumavky inkubovány při stejné teplotě po dobu dalších 10 minut. Ke konci inkubace došlo k lýze a fixaci buněk přidáním 2 ml lyzujícího roztoku. Po jedné fázi promývání pomocí 3 ml promývacího roztoku bylo přidáno 200 ul DNA barvicího roztoku, aby bylo zamezeno agregačním artefaktům bakterií a PMN buněk. Po 10 minutové inkubaci vzorků s barvicím roztokem byla provedena do 30 minut detekce oxidativního vzplanutí průtokovou cytometrií.

Obrázek č. 16: Ukázka Bursttestu

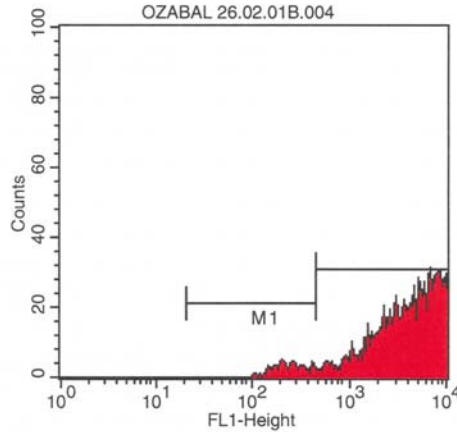
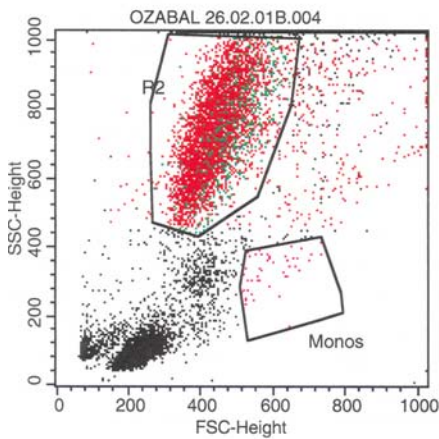
Flow Cytometric Lab, IP IKEM, Dr. Jan Kalanin



File: OZABAL 26.02.01B.001
Gate: Grans

Tube: Negative C

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	6659	100.00	44.39	84.43	167.70	73.65	77
M1	21, 441	6621	99.43	44.14	79.35	45.62	73.65	77
M2	441, 9910	29	0.44	0.19	1264.99	137.07	582.94	482



File: OZABAL 26.02.01B.004

Tube: E-Coli stimul

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	3946	100.00	26.31	4282.90	60.62	3977.49	6097
M1	21, 441	200	5.07	1.33	245.89	33.65	229.79	186
M2	441, 9910	3747	94.96	24.98	4497.36	55.30	4179.21	6097

**BECTON
DICKINSON**

11/29/01

12:25:59 PM

Analýza PMN funkcí pomocí průtokové cytometrie

Procento a průměrná fluorescenční intenzita fagocytujících PMN buněk a procento a průměrná fluorescenční intenzita aktivních PMN buněk (v buňkách probíhající oxidativní vzplanutí) byly stanoveny ze vzorků krve za použití FACSCalibur průtokového cytometru (Becton-Dickinson) používajícího argon-iontový laserový paprsek s modro-zelenou excitační vlnovou délkou 488 nm. Analýza leukocytů ze vzorku krve (obsahujícího cca 10 000 buněk) byla provedena pomocí CellquestTM softwaru.

3.3 Mikrobiologické metody (studie 6-8)

Stanovení bakteriálních agens a ATB rezistence (studie 6 a 7)

Stěry z diabetických ulcerací byly odebrány ze spodiny defektu nebo z hlubokých tkání ulcerace po lokálním debridementu. Tyto stěry byly bezprostředně transportovány na mikrobiologické pracoviště v Amiensově transportním mediu. Zde byl materiál ze stěrů aplikován na pevné půdy (Endova půda, krevní agar, Sabouraudova půda) pro určení přítomnosti mikroorganismů. Zbylý materiál byl vložen do živného bujónu. Za 24 hodin po pomnožení bylo provedeno opětné rozočkování na pevné půdy. V pozitivních stěrech byly jednotlivé bakteriální kmeny stanoveny standardními mikrobiologickými metodami- např. barvením dle Gramma, růstem mikroorganismů v selektivních médiích a komerčně vyrobenými testy, detekujícími mikroorganismy podle utilizace rozličných substrátů (112).

Mikroorganismy byly rozděleny podle Gramma do dvou základních skupin. První skupina obsahovala Gram pozitivní patogeny; do této skupiny bylo zařazeno 5 subpopulací- *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus koaguláza negativní*, *Streptococcus*, *Enterococcus* a *Corynebacterium species*. Do druhé skupiny byly zařazeny Gram negativní patogeny obsahující druh *Enterobacteriacea* (fermentativní mikroorganismy), kam patří bakterie *E. coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Proteus species*, a druh Gram negativních oxidativních mikroorganismů jakými jsou *Pseudomonas* a *Acinetobacter species*.

Bakteriální citlivost k jednotlivým ATB byla detekována pomocí testovacích setů ATB, jejichž složení bylo určeno předchozí analýzou bakteriální rezistence

nalezené v IKEM a podle doporučení Národní antibiotické referenční laboratoře Státního zdravotního ústavu v Praze. Mikrobiální ATB citlivost byla stanovena semikvantitativně pomocí diskové difúzní metody (113, 114). Pouze ve speciálních případech byla určena minimální inhibiční koncentrace (MIC) pomocí mikrodilučních metod na mikrodestičkách nebo použitím E-testů s rozličnými ATB koncentracemi (115).

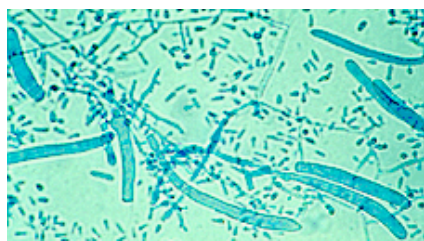
Mykologické vyšetření (studie 8)

U každého nemocného byly odebrány vzorky z hyperkeratózy (červená šipka) a spodiny ulcerace po lokálním debridementu (modrá šipka; obr. 17). Stejně odběry vzorků byly provedeny s odstupem 1 měsíce ke zjištění shod daných vyšetření. Mykotická agens byla stanovena 2 metodami – mikroskopicky a kultivačně.

Mikroskopické vyšetření

Vzorky tkání byly vyšetřeny imunofluorescenčně za použití blankoforu.

Obrázek č. 17: Odběr vzorků k mykotickému vyšetření.



Mikroskopický nález
Trichophyton rubrum



Mikroskopický nález Dematiaceae
(*Cladosporium sp.*)

Dle mikroskopického vyšetření byla mykotická agens rozdělena do 4 skupin (viz tab. 1).

Tabulka č. 1: Srovnání analogických nálezů detekovaných při mikroskopickém a kultivačním vyšetření.

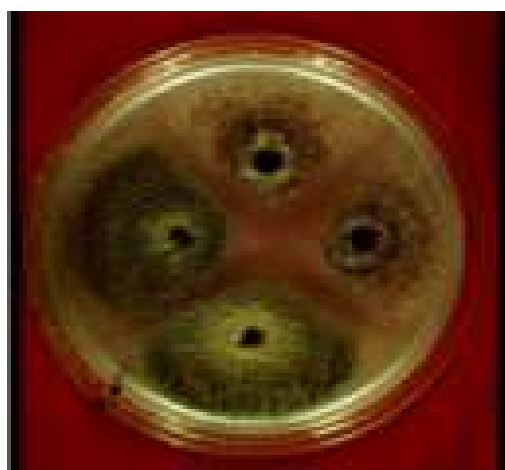
Mykotické mikroskopické nálezy	Mykotické kultivační nálezy
Negativní	Negativní
Septovaná nebo větvená vlákna	Dermatofyta (př. <i>Trichophyton rubrum</i>)
Kandidy	<i>Candida parapsilosis</i> , <i>famata</i> , <i>albicans</i> , <i>zeylanoides</i> , <i>Sacchromyces cerevisiae</i> , <i>Rhodotorula rubra</i> , <i>Rhodotorula minuta</i>
<i>Malassezia furfur</i>	(<i>Pityriosporum ovale</i>)
Spory	Mucoraceae (<i>Mucor</i> sp.) Aspergillaceae (<i>Aspergillus niger</i>) Dematiaceae (<i>Cladosporium</i> sp.) Saprofytická flóra

Kultivační vyšetření

Vzorky byly kultivačně vyšetřeny za použití Sabouraudova agaru s chloramfenikolem, který je schopen zamezit přerůstání bakterií. Pro diagnostiku dermatofyt je určena kultivace na Sabouraudově agaru s chloramfenikolem a cycloheximidem. Kultivace mykotických agens se provádí při 25-30°C a trvá přibližně 4 týdny.



Kultivační nález *Mucor* sp.



Kultivační nález *Aspergillus* sp.

Podle výsledků kultivací byla rozdělena mykotická agens do 8 skupin (viz tab. 1).

3.4 Aplikace kontaktních fixací (studie 9-11)

Typy používaných fixací

Během posledních 4 let jsme uvedli do klinické praxe v České republice dosud nezavedenou metodu odlehčení SDN pomocí TCC. **Podle mechanismu jejich zhotovení a různého typu odlehčení lze TCC rozdělit na rigidní, snímatelné (r-TCC), fenestrované TCC a TCC modifikované dle Sarmienteho.**

V klinické praxi používáme především z ekonomických důvodů jak pro pacienty s neuropatickými ulceracemi, tak pro pacienty s akutní či subakutní ChaO, **r-TCC**. Její velkou výhodou je bezpečnější aplikace, snadnější ošetření diabetických ulcerací a podle výsledků klinických studií i urychlené hojení SDN (105, 107, 116-118). U akutní či subakutní ChaO je jednoznačně indikováno odlehčení dolních končetin pomocí TCC, nejlépe **rigidní**. Ovšem nevýhodou terapie rigidními fixacemi je fakt, že tato léčba vyžaduje časté ambulantní kontroly a velký počet výměn fixací (při každé ambulantní návštěvě).

Dalšími modifikovanými fixačními prostředky jsou **fenestrovaná TCC**, která je indikována u pacientů s hlubšími neuropatickými ulceracemi (W3) ke snazšímu lokálnímu ošetření dolních končetin (obr. 18), a **TCC modifikovaná dle Sarmienteho**. Poslední typ fixace je určen k odlehčení neuropatických ulcerací v terénu výrazných deformit při chronické ChaO, k odlehčení dolní končetiny s OM tarsálních nebo hlezenních kostí (obr. 19). Výhodou této fixace je změna těžiště příslušné končetiny, které se přesouvá z oblasti plosky do oblasti kolenního kloubu.

Obrázek č. 18: Fenestrovaná TCC.



Obrázek č. 19: TCC modifikována dle Sarmienteho.



Zhotovení snímatelné kontaktní fixace

Metodiku zhotovení r-TCC k odlehčení SDN jsme v naší republice zavedli na základě modifikace zahraničních metodik, zejména nizozemských. Zhotovení r-TCC probíhá v několika etapách. V první řadě je nutné u pacientů s neuropatickými ulceracemi ošetřit vřed pomocí lokálního debridementu a povrch ulcerace překrýt vhodným lokálním krytím např. polyuretanovým, silikonovým nebo pěnovým. Abychom docílili maximálního odlehčení dané ulcerace, aplikujeme do okolí defektu silné filcové vypodložení (obr. 20), které vytvarujeme podle plosky nohy, velikosti a pozice defektu. Na takto připravenou dolní končetinu se natahuje punčochovitý materiál a následně speciální tenké filcové krytí (obr. 21). Stabilitu r-TCC je dosaženo aplikací dlah. Na plantu dolní končetiny se přikládá klasický sádrový obvaz. Dále se přikládá k plošce dolní končetiny a na zadní plochu lýtkva dlaha z rigidního materiálu

Obrázek č. 20: Aplikace silného filcového vypodložení.



Obrázek č. 21: Aplikace tenkého filcového vypodložení.



(Scotchcast, 3M, Neuss, Německo), která je ve tvaru písmene L. Nejdůležitější fází zhotovení r-TCC je aplikace semirigidního materiálu (Softcast, 3M, Santé, Francie). Ten musí kopírovat povrch dolní končetiny a zafixovat jej v požadované poloze a to v 90° dorsální flexi v hlezenním kloubu. Obvykle se materiál natáčí na dolní končetinu ve 2-3 vrstvách (obr. 22). Ke konci zhotovení fixace je upravována prstová oblast fixace tak, aby se vytvořil dostatečný prostor pro prsty nohy a aby bylo možné je vizuálně kontrolovat (obr. 23). Poté je po 20 minutách TCC rozstřižena. Posledním krokem

Obrázek č. 22: Aplikace semirigidního materiálu.



Obrázek č. 23: Úprava prstové části r-TCC.



v aplikaci r-TCC je vyrobení malé snímatelné rigidní dlahy, která se umísťuje do pretibiální oblasti. Tato dlahy má schopnost zabránit třecím pohybům uvnitř sádry. Taktéž brání tvorbě zlomenin fixace v oblasti kotníku, které mohou vznikat časným nebo nepřipustným pohybem hlezna při došlapu. Konečné úpravy fixace spočívají v oblepení r-TCC náplastí a tenkým podkladovým filcovým materiálem.

Abychom předešli komplikacím léčby, snímají nemocní s neuropatickými ulceracemi denně či obden r-TCC a následně lokálně ošetřují ulcerace; bezprostředně po ošetření jim doporučujeme r-TCC vždy opět nasadit. U pacientů s akutní ChaO či neuropatickými frakturami je r-TCC aplikována po ústupu výrazných edémů dolní končetiny. U pacientů s ulceracemi byla r-TCC aplikována po zvládnutí akutních lokálních i celkových projevů infekce (pacient musí být afebrilní, bez výrazné elevace CRP, bez flegmóny či otoku a bez hnisavé sekrece z rány). OM ani hluboká ulcerace Wagner 3 však nebyly v našich studiích kontraindikací nasazení r-TCC.

Před aplikací r-TCC byli pacienti vždy řádně poučeni o rizicích terapie TCC. Kontrolováni byli vždy s odstupem jednoho týdne po aplikaci r-TCC a dále dle klinického nálezu na dolní končetině - pacienti s neuropatickými ulceracemi po 2-3 týdnech, pacienti s akutní ChaO či neuropatickými frakturami po 4 týdnech.

Nové r-TCC byly ve studiích aplikovány v případě výrazné redukce otoku dolní končetiny nebo při výrazném poškození TCC.

3.5 Stanovení biochemických parametrů (studie 1-11)

Plasmatické koncentrace glukózy byly stanovovány oxidázovou metodou pomocí přístroje Beckman Analyzer (Beckman Instruments Inc, Fullerton, CA, USA). HbA1c byl určen pomocí Bio-Rad Hemoglobin A1c Column Test (Bio-Rad Laboratories GmbH, Munich, Německo). IRI byl detekován pomocí radioimunoassay za použití kitu IMMUNOTECH Insulin IRMA (IMMUNOTECH as, Praha, Česká republika). C-peptid byl určen pomocí Radioimmunoradioassay použitím IRMA kitu (IRMA, Immunotech, Praha, Česká republika). CRP bylo stanoveno turbidimetricky přístrojem Cobas (Cobas Integra, Roche, Francie).

3.6 Použité statistické metody (studie 1-11)

Statistické metody použité v této práci zahrnovaly jak posouzení kvalitativních, tak i kvantitativních parametrů. Používali jsme jak parametrické, tak neparametrické testy. Parametrické testy jsme použili např. při posuzování průměrů veličin, jejich rozptylu a podobně. Pokud nebylo známo rozložení dat, používali jsme neparametrické testování, například medián či mezikvartilové rozložení.

V našich studiích byly ke statistickému zhodnocení využity následující statistické testy:

- **Jednovýběrový t-test-** Tento test nám na 5% hladině významnosti testoval, zda-li se průměr dané veličiny statisticky významně lišil od normy. V tomto testu jsme předpokládali odchylky pouze jedním směrem (př. nad normu určité veličiny).
- **Dvouvýběrový t-test-** jsme použili v případě, pokud jsme předpokládali normální rozložení veličiny, sloužil ke statistickému porovnání průměrů skupin. Používali jsme dvě varianty a to pro stejné či různé rozptyly.
- **Neparametrický Mann-Whitneyův test** (obdobný dvouvýběrovému Wilcoxonovu testu)- nám sloužil k porovnání střední hodnoty obou skupin. Během jeho provedení se spojí oba porovnávané soubory dat a ke každé veličině se vypočte určité pořadí. Následně se sečtou všechna pořadí v 1.souboru. Ta se srovnají s pořadím, které bylo zjištěno ve 2. souboru.
- **Párový t-test-** jsem použili k posouzení změn mezi prvním a druhým měřením veličiny u jednotlivých osob. Ke stejnému účelu jsme použili i **párový Wilcoxonův test.**
- Ke statistickému zhodnocení více skupin byl použit **ANOVA** test analyzující rozptyl veličin. Test byl schopen parametrizovat veličiny. Test nám odhalil, zda-

li průměry ve sledovaných skupinách byly rozdílné nebo zda-li pozorované rozdíly mohly vzniknout jako důsledek náhodného kolísání.

- **Kruskal-Wallisův test** nám sloužil k analýze rozptylu, ovšem za předpokladu normality. Test porovnal mediány.
- **Spearmanův korelační koeficient**- koeficient byl schopen porovnat, do jaké míry bylo uspořádání analyzovaných dat podle veličiny X stejné jako uspořádání podle veličiny Y. Koeficient porovnal pořadí hodnot (koeficientem se měřil model závislosti X na Y). Vždy se jednalo o veličiny na „stejně“ úrovni, které byly pozorovány najednou- např. koncentrace určitých látek v krvi.
- Regresní analýzy sloužily k odhadnutí druhé veličiny podle znalosti té první. **Logistická regresní analýza** popsala a modelovala vztah rizikových faktorů k dichotomické veličině (kvalitativní).
- **Kontingenční tabulky** jsme použili ke zjištění závislosti jedné kvalitativní veličiny na druhé. **Fisherův test** byl přesnější, prováděly se během něj všechny řádkové i sloupcové součty v rámci možných tabulek. Následně jsme vybraly z tabulek ty, které méně odpovídaly (byly méně pravděpodobné) původním kontingenčním tabulkám. Hodnotou Fisherova testu byla pravděpodobnost těchto tabulek. Jednodušší pro větší soubor sledovaných objektů bylo použití χ^2 -testu s kontingenčními tabulkami.
- **McNemarův test** se využíval k testování určitých hypotéz např. závislosti jedné veličiny na druhé (119).

Statistická analýza všech dat zjištěných ve studii byla provedena pomocí statistického softwaru BMDP PC 90.

4. Přehled výsledků a diskuze k jednotlivým studiím

4.1 Abnormality imunitních funkcí ve vztahu k diabetu a jeho komplikacím, zejména syndromu diabetické nohy (studie 1-5)

Studie 1- Vliv akutní hyperglykémie a/nebo hyperinzulinémie na funkce PMN buněk u zdravých dobrovolníků (příloha 1-4)

Cílem naší studie bylo posoudit vliv akutní hyperglykémie a/nebo hyperinzulinémie na fagocytózu a oxidativní vzplanutí PMN buněk in vivo u zdravých dobrovolníků.

Charakteristika souboru zdravých dobrovolníků

Do naší prospektivní studie bylo zařazeno 12 zdravých mužů mladších 40 let, s BMI < 28 kg.m⁻², bez přidružených onemocnění. Základní charakteristiky souboru jsou uvedeny v tabulce 2. Každý z dobrovolníků měl fyziologický krevní obraz, normální glukózovou toleranci ověřenou glukózovým tolerančním testem podle diagnostických kritérií WHO (48) a fyziologický HbA1c.

Tabulka č. 2: Základní charakteristiky souboru zdravých dobrovolníků (n=12).

Sledované parametry	Průměry a směrodatné odchylky
Průměrný věk (roky)	26,9 ± 1,6
Lačná glykémie (mmol/l)	4,6 ± 0,12
HbA1c dle DCTT (%)	4,8 ± 0,09
Kreatinin (umol/l)	97,1 ± 4,6
BMI (kg.m ⁻²)	24,4 ± 0,84

Nikdo z dobrovolníků nebyl léčen medikací, která by mohla ovlivnit glykémii, inzulinémií nebo imunitní funkce. U všech zdravých objektů byly přítomny fyziologické hodnoty sedimentace erytrocytů a biochemických parametrů (kreatinin, urea, ionty, lipidové spektrum, moč chemicky+sediment). Imunologické abnormality byly vyloučeny laboratorními testy imunologických funkcí (komplement, hladiny imunoglobulinů a subpopulace lymfocytů).

Vylučovací kritéria zahrnovala respirační, ledvinové, jaterní, gastrointestinální, imunitní, infekční a jiné onemocnění, alkoholismus a drogovou závislost. Byla vyloučena i jiná akutní nebo chronická onemocnění na základě anamnézy pacienta, fyzikálního vyšetření, rutinních laboratorních testů krevního obrazu, biochemických parametrů apod. Dobrovolníci neměli žádný známý imunodeficit a akutní infekční onemocnění v posledních 3 měsících před zařazením do studie. Všichni dobrovolníci podepsali informovaný souhlas před zařazením do studie. Struktura clampových studií byla projednávána a schválena etickou komisí.

Schéma studie I a statistické zhodnocení nalezených dat

U každého dobrovolníka byly provedeny 4 clampové studie (HHC, HEC, HGC a CC) podle techniky popsané v kapitole 3. PMN funkce (fagocytóza a oxidativní vzplanutí) byly detekovány za bazálních podmínek (aktivita negativních vzorků) a po stimulaci *E. coli* vždy před příslušnou clampovou studií a po ní. Byly vypočteny fagocytární a respirační indexy jako poměry průměrné fluorescenční intenzity fagocytujících nebo aktivních PMN buněk a průměrné fluorescenční intenzity nefagocytujících nebo neaktivních PMN buněk. Všechny imunitní parametry včetně jejich změn (Δ – bazální vs. bazální hodnota, stimulovaná vs. stimulovaná hodnota), které byly nalezeny po HHC, HEC a HGC, byly porovnány s parametry detekovanými před jednotlivými clampovými studiemi a dále byly porovnány s parametry nalezenými během časově i volumově kompatibilního CC, čímž byl odlišen eventuelní vliv hemodiluce nebo jiných faktorů spojených s clampovou technikou (např. stresem) na imunologické funkce.


Po HHC a po HGC došlo k redukci celkového počtu leukocytů (viz příloha 1), tyto výsledky ovšem nemohly ovlivnit procento a průměrnou fluorescenční intenzitu fagocytujících a aktivních PMN buněk, jelikož při průtokové cytometrii je analyzováno vždy přibližně 10000 PMN buněk z každého vzorku nezávisle na počtu leukocytů.

Ke statistickému porovnání parametrů imunitních funkcí nalezených u jednotlivých dobrovolníků před a po každé clampové studii byl použit párový Wilcoxonův test a porovnání jejich změn bylo provedeno pomocí Kruskal – Wallisova testu. Spearman rank korelační koeficient byl použit ke stanovení signifikantních korelací mezi nalezenými výsledky. Všechna data byla uvedena jako průměrné hodnoty

± SE. Všechna získaná data byla také analyzována po logaritmické transformaci ne-Gausovsky distribuovaných dat. Za statisticky signifikantní byly považovány nálezy s $p < 0,05$.

Výsledky studie 1 (tab. 3-6)

Nalezli jsme signifikantně snížená procenta fagocytujících PMN buněk za bazálních podmínek po HHC ($p < 0,05$) a po HGC ($p < 0,05$; tab. 3A). Ostatní parametry fagocytózy PMN buněk detekované před a po jednotlivých clampových studiích se za bazálních podmínek vzájemně signifikantně nelišily (tab. 3A). Změny bazálních hodnot PMN fagocytózy nalezené během jednotlivých clampových studií se signifikantně nelišily od změn detekovaných během CC (tab. 3B). Ostatní stimulované parametry fagocytózy PMN buněk (tab. 4A) včetně jejich změn (tab. 4B) nebyly ovlivněny akutně navozenou hyperglykemií a/nebo hyperinzulinémií během jednotlivých clampových studií. Výsledky testů oxidativního vzplanutí PMN buněk měřené za bazálních podmínek (tab. 5A) i po stimulaci (tab. 6A) před a po jednotlivých clampových studiích se vzájemně signifikantně nelišily. Jejich změny detekované během HHC, HEC a HGC se taktéž signifikantně nelišily od nálezů prokázaných během CC (tab. 5B, 6B).

Signifikantně vyšší fagocytární index a index oxidativního vzplanutí byl nalezen za bazálních podmínek po HEC ($p < 0,05$). Avšak tyto indexy opět nebyly významně odlišné od indexů nalezených během CC studie (tab. 3 a 5). Ostatní indexy objasňující aktivitu fagocytózy a oxidativního vzplanutí za bazálních podmínek a po stimulaci E.coli nebyly statisticky odlišné při jejich porovnání před a po jednotlivých clampových studiích. Při srovnání jejich hodnot s indexy detekovanými během CC, nebyly prokázány signifikantní změny i po provedené logaritmické transformaci (tab. 4 a 6) 

Tabulka č. 3: Fagocytóza PMN buněk měřená za bazálních podmínek před a po HHC, HEC, HGC a CC u zdravých dobrovolníků.

A. Fagocytární parametry detekované za bazálních podmínek před jednotlivými clampovými studii a po nich (n=12).

Typ clampu	HHC		HEC		HGC		CC	
	Před clampem	Po clampu	Před clampem	Po clampu	Před clampem	Po clampu	Před clampem	Po clampu
MP fagocytujících PMN buněk (%)	12,1 ± 4,4	6,7 ± 1,3*	7,3 ± 1,7	7,5 ± 1,5	9,9 ± 2,1	4,5 ± 1,8*	7,8 ± 2,2	5,8 ± 1,8
MFI fagocytujících PMN buněk	389±121	392±70	214±122	341±152	177±98	167±93	418±142	427±139
Fagocytární index	14,6±1,2	13,2±1,1	35,8±18,6	115,1±65†	65,5±40,6	65±40,8	176±67,3	122,5±37

B. Rozdíly (změny- Δ) v parametrech fagocytózy detekované za bazálních podmínek během jednotlivých clampových studií porovnané s rozdíly detekovanými během CC (n=12).

Typ clampu	HHC	HEC	HGC	CC
Δ MP fagocytujících PMN buněk	-5,4 ± 4	0,27 ± 1,8	-5,1 ± 2	-1,1 ± 2,3
Δ MFI fagocytujících PMN buněk	2,84 ± 96	126,5 ± 150	3,3 ± 6	-27 ± 151
Δ fagocytárních indexů	1,5 ± 0,83	-87,2 ± 68,8	0,1 ± 0,7	18,5 ± 32

Výsledky jsou uvedeny jako průměrné hodnoty ± SE. HHC- hyperglykemický hyperinzulinový clamp, HEC- hyperinzulinový euglykemický clamp, HGC- izolovaný hyperglykemický clamp, CC- kontrolní clamp, n- počet, MP-průměrné procento, MFI- průměrná fluorescenční intenzita, Δ – změny parametrů před a po clampové studii. Fagocytární index- poměr MFI fagocytujících PMN buněk a MFI nefagocytujících PMN buněk.

* p<0,05- signifikantní redukce MP fagocytujících PMN buněk po HHC a HGC v porovnání s parametry nalezenými před HHC a HGC clampy, respektive; †p<0,05- signifikantně vyšší fagocytární index po HEC za bazálních podmínek v porovnání s indexem nalezeným před HEC.

Tabulka č. 4: Fagocytóza PMN buněk detekovaná po stimulaci E.Coli před a po HHC, HEC, HGC a CC u zdravých dobrovolníků.

A. Stimulované fagocytární parametry detekované před jednotlivými clampovými studiemi a po nich (n=12).

Typ clampu	HHC	HHC	HEC	HEC	HGC	HGC	CC	CC
Stimulované parametry	Před clampem	Po clampu	Před clampem	Po clampu	Před clampem	Po clampu	Před clampem	Po clampu
MP fagocytujících PMN buněk (%)	81,9 ± 3,9	81,6 ± 4,5	59,4 ± 9,6	56,4 ± 7,7	66 ± 8,8	69,5 ± 4,5	60 ± 6,8	57,3 ± 7,4
MFI fagocytujících PMN buněk	1268±214	1333±247	1018±219	638±196	1159±445	653±215	1129±198	1240±145
Fagocytární index	104,4±28,8	78,7±21,7	362±98	349,5±92	451±87	429±38,2	417±84,2	410,3±81,1

B. Rozdíly (změny- Δ) v parametrech fagocytózy detekované po stimulaci během jednotlivých clampových studií porovnané s rozdíly detekovanými během CC (n=12).

Typ clampu	HHC	HEC	HGC	CC
Změny parametrů				
Δ MP fagocytujících PMN buněk	-0,3 ± 1,1	4,8 ± 5	-3,1 ± 0,5	-2,4 ± 1,7
Δ MFI fagocytujících PMN buněk	65,4 ± 113	-156 ± 57	-193,8 ± 27	-26,9 ± 59
Δ fagocytárních indexů	31,1 ± 41,6	16,6 ± 11,1	21,3 ± 48,1	13,4 ± 40,7

Všechny výsledky nalezené během HHC, HEC a HGC nebyly signifikantně rozdílné i po porovnání s CC.

Tabulka č. 5: Oxidativní vzplanutí PMN buněk měřené za bazálních podmínek před a po HHC, HEC, HGC a CC u zdravých dobrovolníků.

A. Bazální parametry oxidativního vzplanutí detekované před jednotlivými clampovými studiemi a po nich (n=12).

Typ clampu Bazální parametry	HHC	HHC	HEC	HEC	HGC	HGC	CC	CC
	Před clampem	Po clampu	Před clampem	Po clampu	Před clampem	Po clampu	Před clampem	Po clampu
MP aktivních PMN buněk (%)	4,5 ± 1,4	2,5 ± 0,4	2,9 ± 0,7	2,1 ± 0,6	3,9 ± 1	6,8 ± 2,6	3,4 ± 1,1	3,1 ± 1,1
MFI aktivních PMN buněk	288±53	300±66	501±95	678±156	475±116	494±173	516±128	684±175
Index oxidativního vzplanutí	14,6±1,2	13,2±1,1	10,1±1,4	16,5±3*	14,6±3,1	17,3±3,5	10,1±1,3	11,9±2,3

B. Rozdíly (změny-Δ) v parametrech oxidativního vzplanutí zjištěné za bazálních podmínek během jednotlivých clampových studií porovnané s rozdíly detekovanými během CC (n=12).

Typ clampu Změny parametrů	HHC	HEC	HGC	CC
Δ MP aktivních PMN buněk	-2 ± 1,4	-0,8 ± 0,7	2,8 ± 1,7	-0,3 ± 1
Δ MFI aktivních PMN buněk	12,1 ± 60	177,5 ± 104	6,6 ± 92	168,2 ± 106
Δ indexů oxidativního vzplanutí	1,7 ± 0,9	-5,0 ± 3,3	0,7 ± 3,8	-2,9 ± 2,1

Index oxidativního vzplanutí- poměr MFI aktivních PMN buněk a MFI neaktivních PMN buněk.

* p<0,05- signifikantně vyšší index oxidativního vzplanutí po HEC v porovnání s indexem nalezeným před HEC; ostatní výsledky detekované během HHC, HEC a HGC nebyly signifikantně rozdílné i ve srovnání s CC.

Tabulka č. 6: Oxidativní vzplanutí PMN buněk měřené po stimulaci E.coli před a po HHC, HEC, HGC a CC u zdravých dobrovolníků.

A. Stimulované parametry oxidativního vzplanutí detekované před jednotlivými clampovými studiemi a po nich (n=12).

Typ clampu Stimulované parametry	HHC	HHC	HEC	HEC	HGC	HGC	CC	CC
	Před clampem	Po clampu	Před clampem	Po clampu	Před clampem	Po clampu	Před clampem	Po clampu
MP aktivních PMN buněk (%)	89,6 ± 5,3	89,8 ± 4,8	91,1 ± 3,3	79,4 ± 8,9	82,6 ± 7	91,2 ± 2,7	90 ± 3,5	89,4 ± 2,5
MFI aktivních PMN buněk	2850±508	2620±476	2487±353	2407±307	1906±358	1662±287	3045±344	2886±393
Index oxidativního vzplanutí	104,4±28,8	78,7±21,7	52,9±25,4	45±14,5	36,9±14,8	38,3±14,2	37±9,6	40,1±12,5

B. Rozdíly (změny-Δ) v parametrech oxidativního vzplanutí detekované po stimulaci během jednotlivých clampových studií porovnané s rozdíly detekovanými během CC (n=12).

Změny parametrů Typ clampu	HHC	HEC	HGC	CC
Δ MP aktivních PMN buněk	0,7 ± 4,4	-11,7 ± 8,8	10,3 ± 7,1	-0,5 ± 2,4
Δ MFI aktivních PMN buněk	-107 ± 212	-80,3 ± 83	-238 ± 198	-158,5 ± 389
Δ indexů oxidativního vzplanutí	29,7 ± 35,3	-1,8 ± 21,5	1,3 ± 9,1	-7,1 ± 9,4

Všechny výsledky nalezené během HHC, HEC a HGC nebyly signifikantně rozdílné i ve srovnání s CC.

Diskuze ke studii I

Cílem naší studie bylo zjistit, zda krátkodobá akutní hyperglykémie a/nebo hyperinzulinémie indukované clampovými studiemi mohou ovlivnit *in vivo* funkce PMN buněk u zdravých dobrovolníků. Schéma studie bylo založeno na patofyziologických předpokladech z předchozích *in vitro* experimentů, protože doposud nebyla provedena studie, která by zkoumala danou problematiku *in vivo* za přesně definovaných clampových podmínek.

Na základě experimentálních studií *in vitro* jsme předpokládali převážně negativní účinek hyperglykémie na fagocytózu a zvláště na oxidativní vzplanutí PMN buněk, i když v některých ohledech jsou tyto údaje kontraverzní.

Za normálních okolností jsou ROI produkovány během oxidativního vzplanutí z molekuly kyslíku, vody a NADPH za působení NADPH oxidázy (obr. 8; 16). 40% glukózy je metabolizováno v PMN buňkách hexózomonofosfátovým shuntem. Tvorba ROI roste proporcionálně se zvýšenou produkcí NADPH (120). Naopak, během výrazné hyperglykémie může dojít k saturaci hexokinázového enzymu, což vede v polyolové cestě ke konverzi glukózy na sorbitol za působení enzymu NADPH dependentní aldózoreduktázy. NADPH je při této reakci spotřebován enzymem aldózoreduktázou a z tohoto důvodu se může produkce ROI snížit (121).

Během experimentálních *in vitro* studií prováděných na neutrofilech zdravých dobrovolníků po krátkodobé expozici buněk hyperglykémii byly popsány některé poruchy PMN buněk. Cendoroglo a spol. prokázali, že po 30 minutové inkubaci PMN buněk zdravých jedinců vysoké koncentraci glukózy v médiu dochází k inhibici fagocytózy i oxidativního vzplanutí (29). Liberek a spol. našli ve své studii po expozici vysokým koncentracím glukózy (25 mmol/l) v médiu inhibici fagocytózy a intaktní oxidativní vzplanutí PMN buněk zdravých dobrovolníků (122). Nielson a kol. prokázali během 30 minutové inkubace *in vitro* poruchu oxidativního vzplanutí PMN buněk zdravých jedinců v závislosti na vzrůstající koncentraci glukózy v médiu v rozmezí 11-56 mmol/l (123).

V naší clampové studii jsme nenalezli u zdravých dobrovolníků signifikantní vliv krátkodobé akutní hyperglykémie (17 mmol/l) na PMN funkce, a to jak na fagocytózu, tak na oxidativní vzplanutí PMN buněk. Tento nálezný může být ovlivněn

kompenzačním efektem obou výše zmíněných patofyziologických mechanismů ovlivňujících produkci ROI.

Obdobně jako u hyperglykémie jsme nenalezli ani statisticky významný vliv krátkodobé hyperinzulinémie na funkce PMN buněk u zdravých dobrovolníků. Podle předchozích experimentálních studií jsme předpokádali, že inzulín může aktivovat hlavní funkce PMN buněk jeho specifickou vazbou na membránový receptor PMN buňky (124, 125). Inzulín je také schopen zvýšit *in vitro* vychytávání glukózy PMN buňkami u nediabetických jedinců, aniž by ovlivnil permeabilitu jejich plasmatických membrán pro glukózu (126). Spagnoli potvrdil aktivaci PMN funkcí v důsledku vysoké koncentrace inzulinu (126). Na druhé straně, Hu a spol. ukázali ve své studii, že inzulín oslabuje PMN oxidativní vzplanutí (127).

V naší studii jsme ale nenalezli významný vliv krátkodobé hyperinzulinémie navozené během HEC na imunologické funkce PMN buněk u zdravých dobrovolníků. Ve shodě s našimi výsledky byly nálezy Safronové a spol. (124), které prokázaly, že po 60 minutové inkubaci buněk v různých koncentracích inzulinu nezměnil inzulín bazální produkci ROI v PMN buňkách. Avšak autoři podotkli, že inzulín může modulovat na rozdíl od bazálních parametrů stimulované parametry oxidativního vzplanutí cestou fosforylace tyrosinu v závislosti na teplotě a předchozím ovlivnění PMN buněk inzulinem.

Recentní studie Walranda a spol. sledovala, obdobně jako naše clampové studie, vliv hyperinzulinémie na PMN buňky zdravých dobrovolníků *in vivo*. Na rozdíl od naší studie, byly nalezeny u zdravých dobrovolníků zvýšená chemotaxe, fagocytóza a baktericidní kapacita po 4 hodinovém HEC (20). Rozdíly mezi Walrandovou a naší studií spočívaly v nižší hladině inzulinémie navozené během Walrandovy studie v porovnání s naším HEC (46 vs. 60 mU/l) a v rozličných metodách stanovení PMN funkcí. Nejpodstatnějším rozdílem je, že oproti naší studii neprovedli Walrand a spol. porovnání nalezených dat s výsledky nalezenými během CC a nebyl tedy vyloučen vliv dalších faktorů spojených s clampem, jako stresu, času a volumové expanze. V naší studii jsme použili fyziologičtější stimulans imunologických funkcí PMN buněk (*E.coli*), než bylo použito ve studii Walranda a spol. (fMLP a PMA; 20).

Existuje mnoho rozdílů mezi studii provedenými *in vivo*, které stanovují vliv krátkodobé hyperglykémie a/nebo hyperinzulinémie, a experimentálními *in vitro*

studiemi. In vitro studie používají k testování výrazně vyšší koncentrace glukózy (až 56 mmol/l) oproti hyperglykémii, se kterými se setkáváme v humánní medicíně. V naší studii jsme testovali glykémii 17 mmol/l, která je realističtější i v klinické praxi. Navíc studie prováděné in vitro neodrážejí fyziologické regulační mechanismy, které kompenzují vliv akutní hyperglykémie a hyperinzulinémie na funkce PMN buněk u zdravých jedinců in vivo. Tyto mechanismy jsou např. zprostředkovány sekundárními messengery jako intracelulárním kalcium, tyrosinkinázou, enzymy hexózomonofosfátového shuntu, cytokiny a scavengerovským systémem reprezentovaným např. superoxididismutázou.

Limitacemi naší studie byly variace při stanovení detekovaných parametrů fagocytózy a oxidativního vzplanutí PMN buněk, které byly korigovány adekvátními statistickými metodami. Nemůžeme vyloučit menší změny PMN funkcí spojené s krátkodobými změnami glukózy a inzulínu, jež by mohly být detekovány při větším počtu osob (tj. vyšší síle studie). Clampové studie jsou však metodologicky natolik náročné, že náš počet 12 vyšetřovaných osob odpovídá běžně publikovaným in vivo studiím.

Klinicky významná redukce PMN funkcí se objevuje v praxi jen zřídka. Je reprezentována např. chronickou granulomatózní chorobou, deficitem myeloperoxidázy, deficitem Glc-6-P-dehydrogenázy v leukocytech a geneticky přenosnými metabolickými chorobami (128). Všechny zmíněné choroby se projevují opakovanými vážnými infekcemi a obvykle tito pacienti mají patologické parametry fagotestu a bursttestu. Tyto abnormality nebyly v naší studii nalezeny u žádného zdravého dobrovolníka.

Studie 2- Vliv akutní hyperglykémie a hyperinzulinémie na funkce PMN buněk u pacientů s diabetes mellitus 1.typu (přílohy 5-6)

Jelikož nebyly prokázány žádné abnormality funkcí PMN buněk vlivem akutních metabolických změn u zdravých dobrovolníků, pokusili jsme se v následující studii sledovat podobnými prostředky změny PMN funkcí u pacientů s diabetes mellitus 1.typu. Cílem této prospektivní studie bylo posoudit vliv akutně navozené

hyperglykémie a hyperinzulinémie na fagocytózu a oxidativní vzplanutí PMN buněk u pacientů s diabetes mellitus 1. typu.

Charakteristika skupiny pacientů

Do prospektivní studie bylo podle vstupních kritérií zařazeno 10 nemocných.

Vstupní kritéria zahrnovala:

- Diabetes mellitus 1. typu trvající alespoň 5 let, bez dalších přidružených chorob
- Nepřítomnost pozdních mikrovaskulárních komplikací diabetu (diabetická retinopatie, nefropatie nebo polyneuropatie)
- Nízký C-peptid odpovídající dlouhodobému trvání diabetu 1. typu (průměrné hodnoty v souboru byly nalačno $0,04 \pm 0,016$ pmol/l a 6 minut po stimulaci 1 mg glukagonu $0,05 \pm 0,022$ pmol/l)
- BMI < $28 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-2}$
- Nepřítomnost akutního infekčního onemocnění v posledních 3 měsících před zařazením do studie
- Nepřítomnost známého defektu imunity.

Základní charakteristiky souboru pacientů jsou uvedeny v tabulce 7.

Tabulka č. 7: Charakteristika souboru pacientů s diabetes mellitus 1. typu (n=10).

Vyšetřované parametry	Průměry a směrodatné odchylky
Věk (roky)	$28,4 \pm 1,9$
Trvání diabetes mellitus (roky)	$9,1 \pm 1,5$
HbA1c dle DCCT (%)	$8,1 \pm 0,3$
Lačná glykémie (mmol/l)	$12 \pm 1,1$
Kreatinin (umol/l)	$89,5 \pm 2,4$
BMI ($\text{kg} \cdot \text{m}^{-2}$)	$23,5 \pm 0,8$
Spotřeba inzulínu (j/den)	$45,3 \pm 4,1$

Vylučovací kritéria a spektrum vyšetření vylučující organické postižení nebo poruchu imunitních funkcí byly obdobné jako u zdravých dobrovolníků ve studii 1. Pacienti podepsali před vstupem do studie informovaný souhlas. Studie byla schválena lokální etickou komisí.

Schéma studie 2 a statistické zpracování nalezených dat

Pacienti s diabetes mellitus 1. typu absolvovali postupně HHC a CC dle metodiky popsané v kapitole 3. Statistické porovnání parametrů fagocytózy a oxidativního vzplanutí PMN buněk bylo provedeno obdobným způsobem jako ve studii 1.

Výsledky studie 2

U pacientů s diabetes mellitus 1. typu nebyly nalezeny signifikantně rozdílné parametry fagocytózy detekované po HHC za bazálních podmínek a po stimulaci E.coli při jejich srovnání s výsledky nalezenými před HHC (tab. 8). Parametry oxidativního vzplanutí PMN buněk detekované za bazálních podmínek a po stimulaci E.coli nebyly také významně ovlivněny akutně navozenou hyperglykemií a hyperinzulinémií během HHC (tab. 10). Jak parametry fagocytózy, tak parametry oxidativního vzplanutí nalezené během HHC se signifikantně nelišily od parametrů nalezených během CC (tab. 8 a 10). Změny (Δ) parametrů PMN fagocytózy a oxidativního vzplanutí během HHC nebyly signifikantně rozdílné od změn detekovaných během CC (tab. 9 a 11).

Ani fagocytární indexy, které jsou méně variabilní než absolutní hodnoty příslušných parametrů, se signifikantně nezměnily během obou clampových studií (tab. 8 a 9). Pouze index oxidativního vzplanutí nalezený za bazálních podmínek po HHC byl významně vyšší ve srovnání s indexem nalezeným před danou clampovou studií (tab. 10), avšak signifikantně se nelišil od výsledků detekovaných během CC (tab. 10 a 11).

Diskuze ke studii 2

Jelikož u zdravých dobrovolníků nebyla odhalena porucha imunitních funkcí PMN buněk během clampových studií, sledovali jsme ve studii 2 možné změny PMN funkcí navozené akutní hyperglykemií a hyperinzulinémií u pacientů s diabetes mellitus 1. typu in vivo. Na základě literárních dat a podle patofyziologických předpokladů vyplývajících z metabolických reakcí účastníků se na vzniku ROI jsme očekávali poruchu PMN fagocytózy a oxidativního vzplanutí.

Funkce PMN buněk zahrnující motilitu, fagocytózu a baktericidní aktivitu, vyžadují energii, která se získává z glukózy (129). U pacientů s diabetes mellitus byla nalezena 50% redukce využití glukózy a aerobní glykolýzy v PMN buňkách (130), a proto zmíněné PMN funkce mohou být alterovány. Jak bylo prokázáno ve studii Cavalota a spol., inzulín zvyšuje glykolýzu a využitelnost glukózy v PMN buňkách a tím zlepšuje jejich funkce, které bývají u diabetiků poškozeny vlivem nedostatku inzulínu zejména u dekompenzovaných osob (125). Esmann a spol. podpořili hypotézu, že léčba inzulínem může normalizovat PMN funkce nejen dosažením lepší metabolické

Tabulka č. 8: Parametry fagocytózy PMN buněk detekované za bazálních podmínek a po stimulaci E. coli před a po HHC a CC u pacientů s diabetes mellitus 1. typu (n=10).

Typ clampu Sledované parametry	HHC Za bazálních podmínek		HHC Po stimulaci		CC Za bazálních podmínek		CC Po stimulaci	
	Před clampem	Po clampu	Před clampem	Po clampu	Před clampem	Po clampu	Před clampem	Po clampu
MP fagocytujících PMN buněk (%)	9,1 ± 1,6	13,2 ± 3,2	53,7 ± 6,2	57,5 ± 5,6	20,2 ± 7,3	13,4 ± 4,1	73,9 ± 4,4	80,5 ± 3,6
MFI fagocytujících PMN buněk	438 ± 68	370 ± 72	1184 ± 129	1198 ± 138	328 ± 75	321 ± 60	1540 ± 160	1609 ± 169
Fagocytární index	140,5 ± 26,5	124,5 ± 24,4	316,6 ± 43,3	333,1 ± 34,9	107,8 ± 27,4	105,4 ± 22,4	407 ± 50,1	384,6 ± 58,9

Tabulka č. 9: Rozdíly (změny) v parametrech fagocytózy PMN buněk nalezené před a po HHC za bazálních podmínek a po stimulaci E. coli porovnané i s rozdíly detekovanými během CC u pacientů s diabetes mellitus 1. typu (n=10).

Typ clampu Změny parametrů	HHC Za bazálních podmínek	HHC Po stimulaci	CC Za bazálních podmínek	CC Po stimulaci
Δ MP fagocytujících PMN buněk	4,1 ± 2,5	1,3 ± 4,2	-6,8 ± 5,9	6,6 ± 3,1
Δ MFI fagocytujících PMN buněk	-67,8 ± 90	16,8 ± 98	-6,6 ± 48	69,6 ± 64,7
Δ Fagocytárních indexů	-16,0 ± 30,1	-6,8 ± 24,8	-2,4 ± 18,2	-22,5 ± 25,3

Hodnoty jsou uvedeny jako průměry ± SE; HHC- hyperglykemický hyperinzulinový clamp, CC- kontrolní clamp, n- počet, MFI- průměrná fluorescenční intenzita, MP- průměrné procento, Δ- změny sledovaných parametrů před a po příslušné clampové studii. Fagocytární index- poměr MFI fagocytujících PMN buněk a MFI nefagocytujících PMN buněk.

Všechny parametry zjištěné během HHC nebyly signifikantně rozdílné i ve srovnání s CC;

Tabulka č. 10: Parametry oxidativního vzplanutí PMN buněk za bazálního stavu a po stimulaci E. coli před a po HHC a CC u pacientů s diabetes mellitus 1. typu (n=10).

Typ clampu Sledované parametry	HHC Za bazálních podmínek		HHC Po stimulaci		CC Za bazálních podmínek		CC Po stimulaci	
	Před clampem	Po clampu	Před clampem	Po clampu	Před clampem	Po clampu	Před clampem	Po clampu
MP aktivních PMN buněk (%)	0,7 ± 0,2	0,5 ± 0,1	56,7 ± 6,9	50,7 ± 6,5	0,6 ± 0,2	0,8 ± 0,3	66,4 ± 8,2	67,0 ± 8,7
MFI aktivních PMN buněk	1313 ± 200	1392 ± 158	2730 ± 465	2509 ± 304	1085 ± 198	1246 ± 191	3230 ± 533	3096 ± 555
Indexy oxidativního vzplanutí	10,4 ± 0,9	14,8 ± 1,7*	13,1 ± 2,1	12,1 ± 1,8	11,5 ± 2	17,9 ± 7,2	26,1 ± 13,5	26,1 ± 10,7

Tabulka č. 11: Rozdíly (změny) v parametrech oxidativního vzplanutí PMN buněk nalezené před a po HHC za bazálního stavu a po stimulaci E.coli porovnané i s rozdíly detekovanými před a po CC u pacientů s diabetes mellitus 1. typu (n=10):

Typ clampu Změny parametrů	HHC Za bazálních podmínek	HHC Po stimulaci	CC Za bazálních podmínek	CC Po stimulaci
Δ MP aktivních PMN buněk	-0,2 ± 0,6	-2,1 ± 16,4	0,2 ± 0,8	-0,7 ± 12,8
Δ MFI aktivních PMN buněk	78,7 ± 479	-221,2 ± 577	160,6 ± 760	129,7 ± 387,4
Δ indexů oxidativního vzplanutí	4,4 ± 1,6	-0,9 ± 1,1	6,4 ± 5,4	-2,7 ± 3,5

Index oxidativního vzplanutí- poměr MFI aktivních PMN buněk a MFI neaktivních PMN buněk.

*p<0,05 index oxidativního vzplanutí PMN buněk byl signifikantně vyšší po HHC v porovnání s indexem nalezeným před daným clampem; Ostatní výsledky zjištěné během HHC nebyly signifikantně rozdílné i ve srovnání s CC.

kontroly, jak prokázaly in vivo studie u diabetických pacientů, ale také přímým efektem inzulínu (131). Inzulín hraje hlavní roli v modulaci oxidativního vzplanutí PMN buněk - inzulín sice nestimuluje hexózový transport v PMN buňkách, ale reguluje intracelulárně glukózový metabolismus jinými cestami. Bylo prokázáno, že se inzulín navazuje na membránový receptor PMN buňky a aktivuje tak její hlavní funkce (20, 124, 125). Další možné vysvětlení stimulačního účinku inzulínu na fagocytózu spočívá v jeho vlivu na části buněčného cytoskeletu a sekreci PMN granulí (132). Za bazálních podmínek se působením inzulínu produkce ROI nemění, nicméně inzulín může měnit stimulované oxidativní vzplanutí, které může být ovlivněno interakcí signalizační kaskády inzulínu se stimulačními receptory PMN buněk (124). Walrand a spol. zdokumentovali, podobně jako jiní autoři (124, 126) během in vitro studií, stimulační vliv infuze inzulínu na fagocytózu a oxidativní vzplanutí PMN buněk u osob bez diabetu (20). Ovšem Hu a spol. prokázali, že produkce ROI PMN buňkami inkubovanými s inzulínem (30 a 300 mU/l) byla u zdravých kontrol snížena (127).

U pacientů s diabetem je většina výzkumů zaměřena na in vitro studie prováděné na PMN buňkách (133, 134). Některé z nich prokázaly alteraci fagocytózy a oxidativního vzplanutí PMN buněk. Jiné studie demonstrovaly inhibiční vliv vysokých hladin glukózy na vznik ROI (123, 135-140). Ihm, podobně jako Uchimura, našel u pacientů s diabetes mellitus redukované PMN intracelulární zabíjení vlivem vysokých koncentrací glukózy v médiu (35, 141); Wilson prokázal totéž, ale v exponenciálně se zvyšujících koncentracích glukózy v médiu (od 5 do 50 mmol/l; 142). Na druhé straně jiné studie naopak neprokázaly alteraci PMN fagocytózy a oxidativního vzplanutí (40, 143, 144). Rozdíly mezi výsledky studií prováděných in vitro a in vivo lze vysvětlit různými faktory, např. experimentální in vitro studie používají k testování rozličné i nefyziologické koncentrace glukózy v médiu (11-56 mmol/l) v porovnání s koncentracemi glukózy typickými pro lidský organismus. Účinek akutně indukovaných metabolických změn působících na PMN funkce in vivo může být značně odlišný od vlivu vysokých koncentrací glukózy nebo inzulínu in vitro, protože se do něj zapojují další regulační mechanismy. Ještě více se od situace in vitro liší chronický vliv hyperglykémie vyskytující se u dekompenzovaných pacientů s diabetes mellitus 1. typu, jelikož se přidávají i další faktory zahrnující např. psychosociální aspekty.

Naše studie prokázala po HHC signifikantně vyšší index oxidativního vzplanutí PMN buněk za bazálních podmínek v porovnání s indexem nalezeným před HHC. Ovšem tyto výsledky se signifikantně nelišily od dat zjištěných během CC. Ostatní parametry

oxidativního vzplanutí spolu s parametry fagocytózy se u pacientů s diabetes mellitus 1. typu signifikantně nezměnily vlivem akutně navozené hyperglykémie a hyperinzulinémie.

Jsme si vědomi některých limitací naší studie, např. variací detekovaných parametrů PMN funkcí, které ale byly korigovány adekvátními statistickými metodami. Podobně jako ve studii 1 nemůžeme vyloučit méně pokročilé abnormality PMN funkcí způsobené krátkodobými změnami sérových hladin glykózy a inzulínu, které mohou být detekovány až při větším počtu sledovaných osob. Data nalezená během studie nebyla porovnána s daty, která by byla získána během HEC a HGC, jako tomu bylo ve studii 1. Zmíněné clampové studie nebyly provedeny vzhledem k nemožnosti udržet kontinuálně izolovanou hyperinzulinémii nebo hyperglykémii bez vlivu spolupůsobících látek (glukózy, inzulínu). HGC by mohl dokonce v některých případech vést k navození mírné formy ketoacidózy.

Studie 3- Nespecifický imunitní systém u pacientů se SDN (příloha 7):

Cílem naší průřezové studie bylo posoudit rozdíly funkční kapacity nespecifického imunitního systému mezi pacienty se SDN a zdravou populací.

Charakteristika souborů pacientů

Do naší studie byli zařazeni pacienti se SDN, kteří splňovali následující vstupní kritéria:

- ❑ Diabetes mellitus 2. typu, pacienti mladší 65 let
- ❑ Léčba SDN (diabetických ulcerací) standardními metodami (1) po dobu alespoň 3 měsíců
- ❑ Pacienti bez těžší chronické renální insuficience (kreatinin < 150 $\mu\text{mol/l}$) a bez hemodialýzy
- ❑ Bez známého defektu imunity
- ❑ Bez ICHDK (ICHDK byla definovaná jako Dopplerovské indexy (kotník/paže) < 0,8, tenze transkutánního kyslíku (TcPO₂) < 30 mm Hg nebo angiografický nález stenóz či obliterací tepenného řečiště dolních končetin)
- ❑ Bez orgánové transplantace
- ❑ Nepřítomnost akutní infekce v posledních 3 měsících před zařazením do studie.

Dle vstupních kritérií bylo do studie zařazeno 19 pacientů se SDN (průměrný věk 55 ± 11 let, trvání diabetu 20 ± 9 let, průměrný HbA_{1c} $8,5 \pm 2$ % dle DCCT, trvání diabetické ulcerace 32 ± 46 měsíců, průměrná doba léčby ATB před zařazením do studie 13 ± 14 měsíců). Parametry fagocytózy a oxidativního vzplanutí byly porovnány s kontrolní skupinou

20 zdravých dobrovolníků, která byla srovnatelná věkem i pohlavím se sledovanou skupinou pacientů.

Schéma studie 3 a statistické zpracování nalezených dat

U všech sledovaných subjektů byly stanoveny glykémie a HbA1c vždy při odběru vzorku krve k detekci imunitních funkcí. Zmíněné biochemické parametry a parametry fagocytózy a oxidativního vzplanutí PMN buněk byly určeny podle metod popsanych v kapitole 3.

Během studie byly porovnány mezi pacienty se SDN a zdravými kontrolami parametry fagocytózy a oxidativního vzplanutí PMN buněk detekované za bazálních podmínek a po stimulaci E.coli. Ke statistickému porovnání dat získaných od pacientů se SDN a od kontrolní skupiny byl použit párový Wilcoxonův test. Všechna data jsou uvedena jako průměrné hodnoty \pm SD. Za statisticky signifikantní byly považovány nálezy s $p < 0,05$.

Výsledky studie 3

Byly nalezeny pouze signifikantně redukována procenta fagocytujících PMN buněk po stimulaci E.coli u pacientů se SDN v porovnání se zdravou populací. Ostatní parametry fagocytózy (tab. 12A a B) a oxidativního vzplanutí PMN buněk (tab. 13A a B) se mezi sledovanými skupinami signifikantně nelišily jak za bazálního stavu, tak po stimulaci E.coli.

Tabulka č. 12: Srovnání parametrů fagocytózy PMN buněk nalezených za bazálního stavu (A) a po stimulaci E.coli (B) mezi pacienty se SDN a zdravou populací.

A.

Sledované parametry	Pacienti se SDN (n=19)	Kontrolní skupina (n=20)	P
MP fagocytujících PMN buněk (%)	9,9 \pm 6	9,3 \pm 4	NS
MFI fagocytujících PMN buněk	505 \pm 201	460 \pm 352	NS

B.

Sledované parametry	Pacienti se SDN (n=19)	Kontrolní skupina (n=20)	P
MP fagocytujících PMN buněk (%)	66,4 \pm 24 *	81,8 \pm 10	<0,05
MFI fagocytujících PMN buněk	1145 \pm 275	1309 \pm 450	NS

Hodnoty jsou uvedeny jako průměry \pm SD; n- počet, MFI- průměrná fluorescenční intenzita, MP- průměrné procento, P-signifikance, NS- nesignifikantní; *- $p < 0,05$ - signifikantně snížené MP fagocytujících PMN buněk po stimulaci u pacientů se SDN oproti zdravým kontrolám; Ostatní parametry nebyly signifikantně rozdílné.

Tabulka č. 13: Srovnání parametrů oxidativního vzplanutí PMN buněk za bazálního stavu (A) a po stimulaci E.coli (B) mezi pacienty se SDN a zdravou populací.

A.

Sledované parametry	Pacienti se SDN (n=19)	Kontrolní skupina (n=20)	P
MP aktivních PMN buněk (%)	3,2 ± 2	4,6 ± 3	NS
MFI aktivních PMN buněk	442 ± 454	502 ± 303	NS

B.

Sledované parametry	Pacienti se SDN (n=19)	Kontrolní skupina (n=20)	P
MP aktivních PMN buněk (%)	92 ± 9	97 ± 4	NS
MFI aktivních PMN buněk	4568 ± 1559	5217 ± 1363	NS

Všechny parametry nebyly signifikantně rozdílné.

Studie 4- Změny imunitního systému a zánětlivých parametrů u pacientů se SDN (přílohy 8-10)

Cílem průřezové studie bylo zjistit rozdíly vybraných parametrů nespecifického a specifického imunitního systému a zánětlivých markerů mezi pacienty s chronickou bakteriální infekcí v rámci SDN a zdravými dobrovolníky.

Charakteristika souborů pacientů

Do studie bylo zařazeno 35 pacientů se SDN dle vstupních kritérií shodných se studií 3. Kontrolní skupinu tvořilo 28 zdravých dobrovolníků, kteří odpovídali věkem i pohlavím studované skupině diabetiků. Charakteristika skupiny nemocných se SDN je zobrazena v tabulce 14.

Tabulka č. 14: Charakteristika sledovaných pacientů se SDN (n=35).

Sledované parametry	Průměry a směrodatné odchylky
Věk (roky)	56 ± 9,1
HbA1c (%) dle DCCT	8,7 ± 1,6
Lačná glykémie (mmol/l)	10 ± 3,2
BMI (kg.m ⁻²)	30,3 ± 4,3
Kreatinin (umol/l)	101,4 ± 20,7

Schéma studie 4 a statistické zpracování nalezených dat

Parametry zánětu a nespecifického imunitního systému:

Během studie 4 byly posuzovány u obou sledovaných skupin rozdíly v krevním obrazu, sérových hladinách CRP, v komplementu (C3, C4) a cirkulujících imunokomplexech (CIK). Krevní obrazy a diferenciální počty byly stanoveny analyzátozem Abbott 3500 (Abbott

3500, USA). CRP a C3, C4 byly určeny turbidimetricky přístrojem Cobas (Cobas Integra, Roche, Francie). CIK byly detekovány zákalovou metodou po odečtení Readerem po inkubaci séra s polyethylenglykolem a borátovým pufrem.

Parametry specifického imunitního systému:

Během studie byly porovnány mezi sledovanými skupinami sérové hladiny imunoglobulinů a subpopulace T-lymfocytů. Jednotlivé imunoglobuliny (IgA, IgM, IgG) byly stanoveny turbidimetricky pomocí přístroje Cobas (Cobas Integra, Roche, Francie). Subpopulace T-lymfocytů byly detekovány průtokovou cytometrií po navázání značené monoklonální protilátky na specifické povrchové antigeny jednotlivých lymfocytárních populací (Becton and Dickinson, USA).

Všechny výsledky jsou uváděny jako průměrné hodnoty \pm SD; výsledky byly statisticky zhodnoceny pomocí t-testu a neparametrického Mann-Whitneyova testu. Za statisticky signifikantní byly považovány nálezy s $p < 0,05$.

Výsledky studie 4

V naší studii byly nalezeny signifikantně zvýšené hladiny zánětlivých markerů – sedimentace erytrocytů (FW), CRP, hladiny leukocytů, neutrofilů a CIK u pacientů se SDN v porovnání s kontrolní skupinou (tab. 15). **Ovšem 69% nemocných mělo CRP v normě a 83% pacientů mělo hladiny leukocytů v normě.**

Tabulka č. 15: Porovnání zánětlivých imunologických parametrů mezi pacienty se SDN a kontrolní skupinou.

Sledované parametry	Pacienti se SDN (n=35)	Kontrolní skupina (n=28)	P
FW (mm)	41/72 \pm 29/31	9/22 \pm 7/15	<0,001
CRP (mg/l)	5,8 \pm 10,7	1,6 \pm 1,8	<0,05
Leukocyty ($\times 10^9/l$)	7,7 \pm 2,1	6,6 \pm 2,1	<0,05
Neutrofilů ($\times 10^9/l$)	4,7 \pm 1,9	3,9 \pm 1,7	<0,05
Lymfocyty ($\times 10^9/l$)	2,2 \pm 0,8	2,1 \pm 0,6	NS
Monocyty ($\times 10^9/l$)	0,47 \pm 0,18	0,39 \pm 0,21	NS
Eosinofily ($\times 10^9/l$)	0,26 \pm 0,16	0,14 \pm 0,08	<0,001
Basofily ($\times 10^9/l$)	0,08 \pm 0,09	0,05 \pm 0,03	<0,05
CIK (U)	43 \pm 29	28 \pm 18	<0,05

Hodnoty jsou uvedeny jako průměry \pm SD; n- počet, FW- sedimentace erytrocytů, CRP- C-reaktivní protein, CIK- cirkulující imunokomplexy; P-signifikance, NS- nesignifikantní.

Při studiu ostatních parametrů byly nalezeny signifikantně vyšší sérové hladiny imunoglobulinů IgA a IgG u pacientů se SDN v porovnání se zdravými kontrolami. Ostatní

složky nespecifického imunitního systému (C3 a C4) spolu se složkami specifické imunity (IgM) se významně nelišily mezi studovanými skupinami (tab. 16).

Tabulka č. 16: Srovnání imunologických parametrů mezi pacienty se SDN a zdravými kontrolami.

Sledované parametry	Pacienti se SDN (n=35)	Kontrolní skupina (n=28)	P
IgA (g/l)	3,5 ± 1,6	2,4 ± 0,9	<0,01
IgM (g/l)	1,2 ± 0,8	1,2 ± 0,7	NS
IgG (g/l)	12,9 ± 5,2	10,8 ± 2,8	< 0,05
C3 (g/l)	1,2 ± 0,3	1,1 ± 0,2	NS
C4 (g/l)	0,2 ± 0,05	0,18 ± 0,04	NS

Ig- imunoglobulin, C- část komplementu.

Při rozboru subpopulací T lymfocytů mezi sledovanými skupinami bylo nalezeno vyšší procento CD8+ T lymfocytů u pacientů se SDN, což ovlivnilo výsledný imunoregulační index (CD4/CD8), který byl u této skupiny nemocných signifikantně nižší oproti kontrolám (tab. 17).

Tabulka č. 17: Subpopulace T-lymfocytů u pacientů se SDN a u zdravé populace.

Sledované parametry	Pacienti se SDN (n=35)	Kontrolní skupina (n=28)	P
CD3 Lymfocyty (%)	75 ± 9	72 ± 9	NS
CD4 Lymfocyty (%)	44 ± 10	46 ± 8	NS
CD8 Lymfocyty (%)	33 ± 13	25 ± 10	<0,01
Lymfocyty CD16/56 - NK buňky (%)	14 ± 6	17 ± 9	NS
CD 69 Lymfocyty (%)	9 ± 4	11 ± 4	NS
Imunoregulační index CD4/CD8	1,6 ± 0,8	2,1 ± 0,9	<0,05

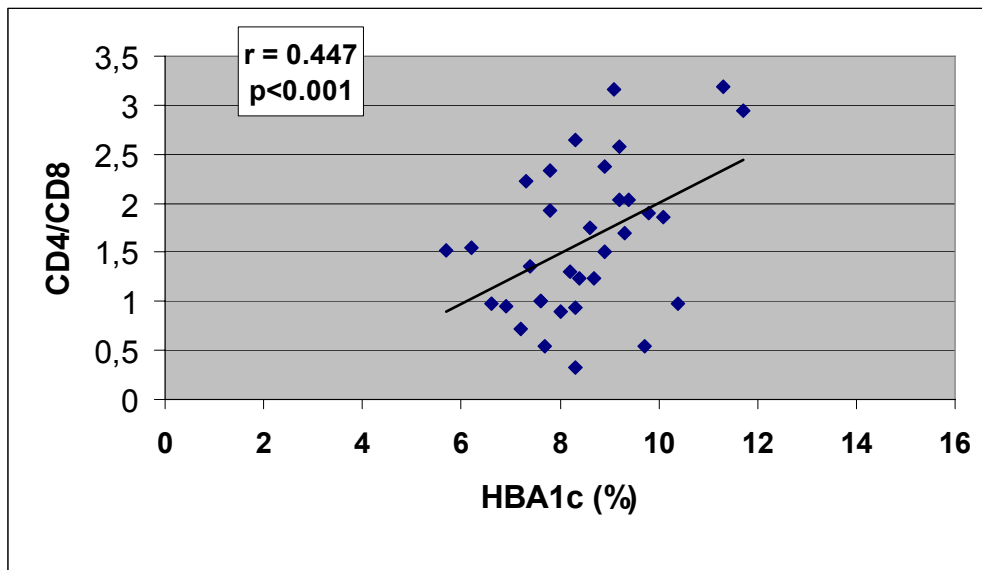
CD- Cluster of differentiation, NK- Natural killers

Ve studii jsme hodnotili i korelace nalezených imunologických parametrů s kompenzací diabetu. Dle výsledků, HbA1c pozitivně koreloval pouze s imunoregulačním indexem CD4/CD8 ($r= 0,447$, $p<0,001$), což je znázorněno v grafu 2. Ostatní nalezené imunologické parametry neměly významný vztah ke kompenzaci diabetu.

Diskuze ke studii 3 a 4

Při vyšetřování imunologických funkcí PMN buněk u pacientů se SDN a s chronicky infikovanými ulceracemi bylo nalezeno signifikantně nižší procento fagocytujících PMN buněk po stimulaci E.coli v porovnání s kontrolní skupinou zdravých dobrovolníků. Nicméně produkce ROI nebyla oproti kontrolní skupině významně odlišná.

Graf č. 2: Korelace HbA1c s imunoregulačním indexem (CD4/CD8) u pacientů se SDN (n=35).



Jak jsme se již zmínili, v literatuře jsou popsány kontroverzní výsledky studií zkoumajících fagocytózu a oxidativní vzplanutí PMN buněk u pacientů s diabetem. Některé studie neprokázaly výraznou alteraci (40, 42, 142, 143, 145), jiné popsaly určité abnormality fagocytózy u diabetických pacientů (25, 146, 147). Např. Marhoffer a spol. prokázal redukovanou fagocytózu i oxidativní vzplanutí PMN buněk pacientů s diabetem v porovnání se zdravými kontrolami (25), podobně jako Peck a spol., který zkoumal pouze produkci ROI (148). Serlenga prokázal poruchu počáteční fáze fagocytózy, ale ne produkci ROI (147).

Byl prokázán i signifikantní vliv kompenzace diabetu na funkce PMN buněk (145). Např. ve studii Marhoffera a spol. byla nalezena negativní korelace mezi HbA1c a fagocytózou PMN buněk (25).

V naší studii jsme předpokládali vyšší fagocytární aktivitu i produkci ROI u pacientů s chronicky infikovanými diabetickými ulceracemi vlivem chronické infekce, dekompenzace diabetu a zvýšeného oxidačního stresu. Nenalezli jsme signifikantní rozdíly v obou imunitních funkcích PMN buněk mezi pacienty se SDN a zdravou populací, pouze procenta fagocytujících stimulovaných PMN buněk, nikoli ale jejich aktivita, byla snižena. Proto se zdá, že reaktivita PMN funkcí je u pacientů se SDN snížena, jelikož za normálních okolností by v přítomnosti infekce měla být u zdravé populace vyšší. Také jsme nenalezli přímý vztah mezi PMN funkcemi a HbA1c, pouze vztah mezi HbA1c a subpopulacemi T-lymfocytů. Naše výsledky se shodovaly s nálezy studie, která prokázala, že dobře kompenzovaní diabetici mají baktericidní aktivitu srovnatelnou se zdravými osobami (22).

U pacientů se závažnou infekcí v rámci SDN nemusí být vždy přítomny typické klinické příznaky jakými jsou horečka, flegmóna, sepse a nemusí být významně zvýšeny laboratorní zánětlivé parametry jakými jsou leukocyty, FW a CRP (1, 149, 150).

Za normálních podmínek dochází v organismu vlivem produkce cytokinů v místě zánětu ke stimulaci proteinů akutní fáze, např. CRP (151). CRP slouží dále v organismu jako opsonizující částice, která aktivuje komplement a podporuje tak fagocytózu patologických částic profesionálními fagocyty. V naší studii jsme našli signifikantně zvýšené sérové hladiny CRP u pacientů se SDN v porovnání se skupinou zdravých dobrovolníků. Nicméně naměřené hodnoty nebyly příliš vysoké a nevybočovaly výrazně z fyziologických hodnot (fyziologické rozmezí 1-5 mg/l), dokonce u 69% nemocných byly v normě. Tyto nálezy mohou svědčit pro poruchu zánětlivé odpovědi u pacientů s chronickou infekcí přítomnou v diabetických ulceracích.

V naší studii jsme dále u pacientů se SDN našli zvýšené sérové hladiny IgA a IgG, které mohou být přítomny ve zvýšené míře jako zánětlivá reakce a reakce přirozených bariér těla na infekci přítomnou v diabetické ulceraci. Sérové hladiny IgM byly v naší studii u obou sledovaných skupin v normě. IgA se v lidském organismu vyskytuje ve dvou podobách – jako slizniční a sérová forma. Tento imunoglobulin funguje jako opsonin, přičemž dále neutralizuje antigeny lokalizované na povrchu sliznic (152). Podobně jako v naší studii popsaly některé práce také zvýšení sérových hladin IgA u pacientů s diabetem 2. typu, a to až o 56% (153, 154). Abnormality v sérových hladinách imunoglobulinů byly vysvětlovány možnou neenzymatickou glykací imunoglobulinů, která může ovlivnit funkci daných částic a jejich metabolismus (153), nebo častou asymptomatickou slizniční infekcí přítomnou u pacientů s diabetem (151, 154).

V naší studii byly u pacientů se SDN signifikantně zvýšeny sérové hladiny CIK a dále v krevním obraze byly signifikantně vyšší počty leukocytů, neutrofilů, basofilů a eosinofilů oproti kontrolní skupině. Tyto nálezy spíše svědčí pro mírnou aktivaci zánětlivé odpovědi, nicméně nedosahují takových hodnot, které bychom očekávali u reakce organismu na infekci přítomnou v diabetických ulceracích.

Při studiu subpopulací lymfocytů byla nalezena u pacientů se SDN signifikantně zvýšená procenta CD8⁺ T lymfocytů (cytotoxických T lymfocytů), které za normálních okolností uvolňují po kontaktu s terčovými elementy (s buňkami infikovanými virem, nádorovými buňkami a buňkami aloštěpu) serinové proteázy a perforiny vyvolávající lýzu buněk. Při elevaci počtu CD8⁺ T lymfocytů došlo u pacientů se SDN k signifikantnímu

poklesu imunoregulačního indexu (CD4+/CD8+), který v naší studii pozitivně koreloval s HbA1c. Pozitivní korelace HbA1c s imunoregulačním indexem může být vysvětlena vlivem zánětu a dekompenzace diabetu – to znamená, čím byl hůře kompenzovaný diabetes (vyšší HbA1c), tím byla menší zánětlivá reakce (suprese CD8+T-lymfocytů). Studie Bouter a spol. prokázala pozitivní vliv kompenzace (poklesu glykemií) na zvýšení počtu CD4+ i CD8+ T Lymfocytů. Nárůst obou typů lymfocytů byl úměrný, proto nedošlo k signifikantnímu ovlivnění imunoregulačního indexu (155).

Studie 5- Vitamíny a vybrané prvky u pacientů se SDN a jejich vztah k funkcím PMN buněk (přílohy 11-15)

Cílem naší průřezové studie bylo porovnat hladiny vybraných vitamínů a stopových prvků a zhodnotit jejich vztah k imunitním funkcím PMN buněk u pacientů se SDN, pacientů s diabetes mellitus 2.typu bez pozdních komplikací a u zdravých dobrovolníků.

Charakteristika skupin pacientů

V naší průřezové studii byly sledovány 3 skupiny subjektů. První skupina byla tvořena 42 pacienty se SDN (muži/ženy- 29/13, průměrný věk $55 \pm 7,6$ roku, trvání diabetu $17,9 \pm 8,5$ roku, HbA1c dle DCCT $8,9 \pm 1,3\%$, BMI $30,5 \pm 4,5 \text{ kg.m}^{-2}$). Druhá skupina zahrnovala 29 nemocných s diabetes mellitus 2.typu bez pozdních komplikací, kteří nebyli před zařazením do studie léčeni pro SDN (muži/ženy- 19/10, průměrný věk $55,8 \pm 6,2$ roku, trvání diabetu $9,6 \pm 5,3$ roku, HbA1c $8,6 \pm 2,2\%$, BMI $31,9 \pm 5,9 \text{ kg.m}^{-2}$). Vstupní kritéria byla pro obě skupiny shodná s kritérii uvedenými ve studii 3 a 4. Kontrolní skupinu tvořilo 31 zdravých dobrovolníků, kteří odpovídali věkem a pohlavím předchozím dvěma skupinám. Skupiny se lišily v trvání diabetu ($p < 0,001$) a BMI ($p < 0,001$).

Schéma studie 5 a statistické zpracování nalezených dat

Sérové hladiny α - a γ - tokoferolu byly stanoveny pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí (156), sérové koncentrace vitamínu C byly detekovány modifikovanou spektrofotometrickou metodou dle Roeho a Kuethera, při které reaguje daná substance s 2,4 dinitrofenylhydrazidem (157), Cu a Zn byly stanoveny atomovou absorpcí (Varian Techtron AA30, Austrálie), sérové hladiny Fe byly určeny pomocí fotometrické metody se serozinem (Hitachi, Roche, Japan) a poslední sledovaný prvek, Mg, byl určen UV

metodou s xylidilovou modří (Hitachi, Roche, Japan). PMN funkce (fagocytóza a oxidativní vzplanutí) byly detekovány průtokovou cytometrií metodami popsány v kapitole 3.

Během studie byly porovnány všechny sérové hladiny vitamínů a vybraných prvků mezi studovanými skupinami. Hladiny celkového vitamínu E a jeho izomerů byly přepočítány na hladiny triacylglycerolů, aby byl odstraněn vliv hyperlipoproteinémie. Ve studii byly posouzeny u všech zařazených subjektů do studie korelace mezi sledovanými mikronutrienty a parametry imunitních funkcí PMN buněk.

Všechny výsledky byly prezentovány jako průměrné hodnoty \pm SD. Data byla statisticky zhodnocena použitím jedno- a dvojnásobného t-testu, neparametrického Mann Whitneyho testu a Wilcoxonova testu. Za statisticky signifikantní byly považovány nálezy s $p < 0,05$.

Výsledky studie 5

Při studiu sérových hladin vitamínů byla nalezena pouze signifikantně snížená koncentrace vitamínu C u pacientů se SDN v porovnání se skupinou nemocných s diabetes mellitus 2. typu bez komplikací a kontrolní skupinou ($57,1 \pm 21,3$ vs. $67,6 \pm 19,3$ vs. $72,2 \pm 23,6$ $\mu\text{mol/l}$, respektive; $p < 0,01$). Stanovené hladiny α - a γ -tokoferolu i po korekci jejich koncentrací na hladiny triacylglycerolů se signifikantně nelišily mezi sledovanými skupinami (tab. 18). V naší studii byly nalezeny signifikantně zvýšené sérové hladiny Cu ($p < 0,05$) a redukované hladiny Mg ($p < 0,05$) u pacientů se SDN a u pacientů s diabetes mellitus 2. typu bez komplikací v porovnání se zdravými kontrolami. Sérové koncentrace ostatních vybraných prvků (Zn a Fe) se významně nelišily mezi sledovanými skupinami (tab. 18).

Při porovnání parametrů fagocytózy a oxidativního vzplanutí PMN buněk nalezených po stimulaci E.Coli nebyly prokázány signifikantní rozdíly mezi pacienty se SDN, pacienty s diabetes mellitus 2. typu a kontrolní skupinou.

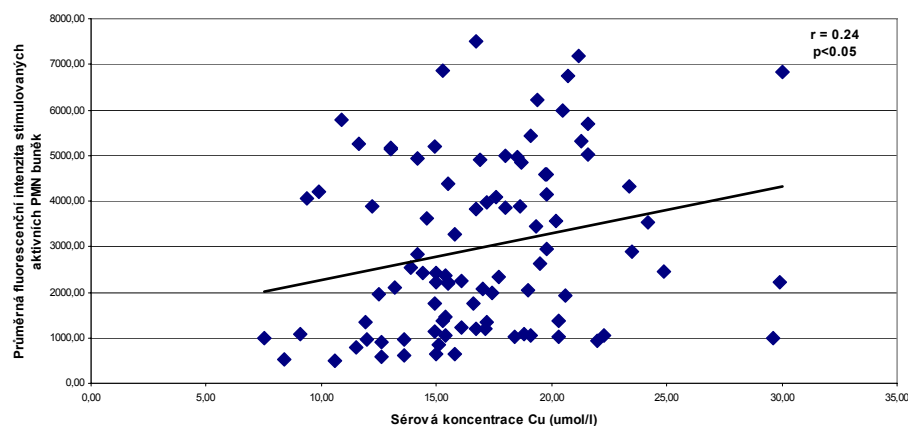
U všech sledovaných jedinců byla nalezena pozitivní korelace sérových hladin Cu a Mg s průměrnou fluorescenční intenzitou stimulovaných aktivních PMN buněk (graf 3 a 4; $r = 0,24$; $p < 0,05$ pro Cu a $r = 0,25$; $p < 0,05$ pro Mg). Nebyl prokázán vztah vitamínů C, E, jeho izomerů, Zn a Fe ke sledovaným parametrům imunitních funkcí PMN buněk.

Tabulka č. 18: Porovnání sérových hladin vitamínů a vybraných prvků mezi pacienty se SDN, pacienty s diabetes mellitus 2.typu bez komplikací a zdravými dobrovolníky.

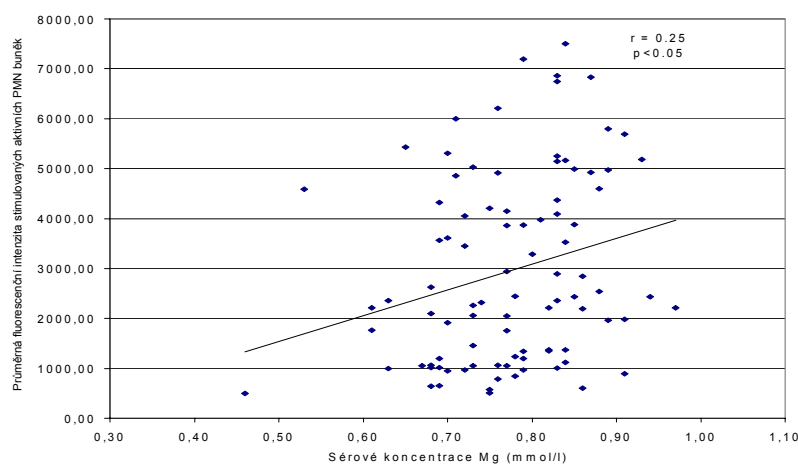
Sledované parametry	Pacienti se SDN (A; n=42)	Pacienti s diabetes mellitus 2.typu (B; n=29)	Kontrolní skupina (C; n=31)	Signifikance
Vitamin C (μmol/l)	57,1 ± 21,3	67,6 ± 19,3	72,2 ± 23,6	A vs B <0,01 A vs C <0,01 B vs C NS
Celkový vitamin E (μmol/l)	40 ± 13,7	38,9 ± 15,6	35,1 ± 11,1	NS
Celkový vitamin E/Triacylglyceroly	20,4 ± 9,6	19,5 ± 6,8	24,1 ± 9,8	NS
α-tokoferol (μmol/l)	36,3 ± 12,7	35,3 ± 13,3	32 ± 10,2	NS
α-tokoferol/Triacylglyceroly	18,6 ± 9,1	17,8 ± 6,3	22 ± 8,9	NS
γ-tokoferol (μmol/l)	3,7 ± 1,9	3,7 ± 2,6	3 ± 1,5	NS
γ-tokoferol/Triacylglyceroly	1,8 ± 1,1	1,7 ± 0,7	2,1 ± 1,2	NS
Cu (μmol/l)	17,4 ± 5	17,8 ± 3,4	15,4 ± 3,5	A vs C <0,05 B vs C <0,05 A vs B NS
Mg (mmol/l)	0,75 ± 0,1	0,76 ± 0,09	0,81 ± 0,07	A vs C <0,05 B vs C <0,05 A vs B NS
Zn (μmol/l)	12,7 ± 3,6	12,4 ± 1,3	12,7 ± 2,7	NS
Fe (μmol/l)	15,1 ± 5,5	16 ± 4,9	17,8 ± 4,8	NS

Hodnoty jsou uvedeny jako průměry ± SD; n- počet, NS- nesignifikantní

Graf č. 3: Korelace Cu s průměrnou fluorescenční intenzitou stimulovaných aktivních PMN buněk u všech sledovaných jedinců.



Graf 4: Korelace Mg s průměrnou fluorescenční intenzitou stimulovaných aktivních PMN buněk u všech sledovaných jedinců.



Diskuze ke studii 5

V lidském organismu existuje spojení mezi metabolickými pochody a vitamíny C a E vlivem recipročních změn jejich radikálů během oxidačně-redukčních reakcí (viz obr. 9; 59). Zmíněné vitamíny tedy mohou ovlivnit míru oxidačního stresu i produkci ROI. V naší studii byly prokázány signifikantně snížené sérové koncentrace vitamínu C u pacientů se SDN v porovnání s pacienty s diabetem mellitem 2.typu bez orgánových komplikací a se zdravými dobrovolníky. Sérové hladiny vitamínu E a jeho izomerů i po jejich korekci na triacylglyceroly se signifikantně nelišily mezi sledovanými skupinami.

Podobně jako v naší studii prokázal Ali a spol. snížené sérové hladiny vitamínu C u pacientů s diabetes mellitus, zejména u těch s manifestními pozdními komplikacemi (158). Stankova a spol. našla významně snížené sérové hladiny vitamínu C u pacientů s diabetes mellitus 1. i 2.typu v porovnání se zdravými kontrolami. Podobně jako v naší studii ovšem tyto hladiny nekorelovaly s metabolickou kompenzací diabetu (159). Ovšem Yue a spol. popsali, že dekompenzovaní pacienti mají vyšší riziko rozvoje deficitu vitamínu C v porovnání s dobře kompenzovanými pacienty (160). Snížené sérové koncentrace vitamínu C u pacientů s diabetem nejsou způsobeny sníženým příjmem vitamínu C v dietě, ale samotným onemocněním, jak prokázal Sinclair ve své studii (161). Nesignifikantní rozdíly v hladinách vitamínu C mezi pacienty s diabetes mellitus 2.typu bez pozdních komplikací a zdravými kontrolami zařazenými do naší studie by mohly být podmíněny nedostatečným počtem sledovaných osob (tendence k nižším hodnotám vitamínu C oproti kontrolám). Prokázané snížené hladiny vitamínu C u sledovaných pacientů se SDN mohou být podle našeho názoru

spojeny s onemocněním jako takovým a s vyšší konzumací kyseliny askorbové v prostředí s vyšším oxidačním stresem.

Cu a Zn ovlivňují míru oxidačního stresu v organismu zapojením v antioxidačním systému. Ovšem v některých případech se mohou vybrané stopové prvky chovat i prooxidačně (str. 13; 60).

Signifikantně vyšší sérové hladiny Cu a nižší sérové hladiny Mg byly nalezeny u obou skupin diabetických pacientů v porovnání se zdravou populací. Sérové hladiny Zn a Fe se signifikantně nelišily mezi třemi studovanými skupinami. Podobně jako v naší studii Raz našel vyšší sérové hladiny Cu u pacientů s diabetes mellitus (162), avšak tyto abnormality nebyly prokázány Williamsem a spol. (163). Jiná studie sledující sérové hladiny Cu a Zn našla zvýšené hladiny Cu a snížené koncentrace Zn u pacientů s diabetes mellitus v porovnání se zdravými dobrovolníky (67); obdobné změny koncentrací Zn prokázali Williams a Karahan ve svých studiích (163, 164). Zvýšené sérové hladiny Cu u obou skupin pacientů s diabetem 2. typu v naší studii byly zřejmě způsobeny diabetem samotným a jeho inklinací ke zvýšenému oxidačnímu stresu.

Podobně jako v naší studii byly často popisovány deficiencie Mg u pacientů s diabetes mellitus (165), zejména u pacientů se špatnou kompenzací diabetu (166, 167). Deficity Mg jsou často spojeny s inzulínovou rezistencí a přítomností diabetických komplikací (165). Rodriguez a spol. také našli redukované hladiny Mg u pacientů se SDN v porovnání se zdravými dobrovolníky (168). Avšak Raz našel vyšší hladiny Mg a Noto nenalezl signifikantní změny koncentrací Mg u diabetiků v porovnání s nediabetiky (67). Sérové hladiny Mg mohou být v naší studii sníženy u obou skupin diabetiků vlivem přítomné hyperinzulinémie v rámci metabolického syndromu, jelikož inzulín je schopen zvýšit vstup Mg do buňky spolu s molekulou glukózy a vést tak k relativní hypomagnezémii (169).

U všech vyšetřovaných subjektů jsme prokázali pozitivní korelaci Cu a Mg s produkcí ROI stimulovanými PMN buňkami. Ostatní vyšetřované prvky a vitamíny signifikantně nekorelovaly s funkcemi PMN buněk. Pravděpodobně po překonání určité hladiny nebo vlivem různých interakcí (s vitamínem E), se Cu začne chovat jako prooxidant v PMN buňkách a proto může dojít ke zvýšení produkce ROI PMN buňkami. Aktivita některých specifických enzymů, např. hexokinázy a Glc-6-fosfatázy, závisí na sérových hladinách Mg (170), což může přes hexózomonofosfátový shunt ovlivnit produkci ROI a zvýšené sérové hladiny Mg tak mohou nepřímo zvyšovat vznik ROI.

Patříčná suplementace nalezených deficitů může následně ovlivnit metabolické pochody a funkce organismu, zejména na úrovni imunitního systému. Např. Girodon a spol.

ve své studii uvedli, že suplementace rozličnými nutrienty, jako např. Zn, vitamínem C, E zlepšuje imunologické funkce a může vést k redukci infekčních komplikací (171).

4.2 Infekční komplikace SDN (studie 6-8)

Studie 6- Výskyt patogenů a jejich rezistence na ATB u transplantovaných, dialyzovaných a ostatních pacientů se SDN (přílohy 16, 17)

Cílem této retrospektivní studie bylo stanovit rozdíly mikrobiologických nálezů a ATB rezistence mezi transplantovanými, dialyzovanými a ostatními pacienty se SDN.

Charakteristika souborů pacientů

Do studie byli zařazeni všichni nemocní, kteří byli léčeni v podiatrické ambulanci IKEM během sledovaného období (12/1998 - 12/1999) a kteří měli alespoň jeden pozitivní stěr z diabetických ulcerací. První stěr byl odebrán vždy při první návštěvě podiatrické ambulance a poté byly stěry opakovány podle klinického stavu, tedy při objevení se flegmóny, purulentní sekrece z ulcerace a při ostatních známkách lokální infekce.

Pacienti zařazení do naší studie byli rozděleni do 3 skupin- 21 transplantovaných pacientů (průměrný věk 50 ± 12 let, trvání diabetu 23 ± 11 let, 67% nemocných mělo diabetes mellitus 1.typu), 22 dialyzovaných pacientů (průměrný věk 61 ± 12 let, trvání diabetu 21 ± 9 let, 27% diabetiků 1.typu) a zbylých 164 nemocných se SDN (průměrný věk 63 ± 13 let, trvání diabetu 17 ± 10 let, 15% diabetiků 1.typu). Poslední 2 zmiňované skupiny se lišily trváním diabetu ($p < 0,001$) a počtem pacientů s diabetes mellitus 1.typu ($p < 0,01$) oproti transplantovaným nemocným.

Závažnost diabetické ulcerace byla stanovena Wagnerovskou klasifikací (10). Ve studii se vyskytovaly převážně povrchové ulcerace (Wagner 1-22%, Wagner 2-48%, Wagner 3-24% a Wagner 4-6% nemocných). Mezi jednotlivými skupinami nebyly nalezeny signifikantní rozdíly v typech diabetických ulcerací.

Schéma studie 6 a statistické zpracování nalezených dat

Stanovení jednotlivých mikrobiálních agens přítomných v diabetických ulceracích a jejich ATB rezistence bylo provedeno podle metodiky popsané v kapitole 3.

Pozitivní nález jednotlivých bakterií u každého pacienta byl dán alespoň jedním jejich nálezem ve stěrech z diabetických ulcerací provedených během sledovaného období. Baktérie byly považovány za rezistentní k danému ATB, pokud byla alespoň jednou během sledovaného období prokázána rezistence k tomuto ATB. Mezi transplantovanými, dialyzovanými a ostatními pacienty se SDN byly porovnány průměrné počty bakterií nalezené v diabetických ulceracích na jednoho pacienta, rozdíly ve výskytu jednotlivých patogenů a jejich ATB rezistence.

Uvedená data byla prezentována jako průměrné hodnoty \pm SD; statistické rozdíly mezi jednotlivými sledovanými skupinami byly určeny použitím ANOVA testu a χ^2 -testu uvedeného v kontingenčních tabulkách. Za statisticky signifikantní byly považovány hodnoty $p < 0,05$.

Výsledky studie 6

Během studie nebyly nalezeny signifikantní rozdíly v metabolické kontrole mezi transplantovanými, dialyzovanými a ostatními pacienty se SDN (HbA1c dle DCCT $7,9 \pm 3\%$ vs. $7,9 \pm 2,1\%$ vs. $8,2 \pm 2\%$, respektive; NS).

Celkově bylo nalezeno ve všech pozitivních kultivacích ze stěrů 593 mikroorganismů. Nebyly prokázány signifikantní rozdíly v průměrném počtu patogenů/ 1 pacienta mezi transplantovanými, dialyzovanými a ostatními pacienty se SDN (2,8 vs. 2,0 vs. 3, respektive; NS).

U dialyzovaných nemocných bylo nalezeno vyšší procento Gram pozitivních patogenů (80%-35/44) v porovnání s transplantovanými (62%- 36/58) a ostatními pacienty (63%-310/491) se SDN ($p < 0,05$). Tabulka 19 zobrazuje výskyt jednotlivých bakteriálních agens ve sledovaných skupinách, jejich zastoupení mezi skupinami se signifikantně nelišilo.

Nejčastějšími patogeny nalezenými ve všech diabetických ulceracích byly S. Aureus (21%), Staphylococcus koaguláza negativní (21%) a Enterococcus sp. (13%). Prevalence klinicky závažných Gram negativních patogenů zahrnujících především E.coli a skupinu Klebsiel nepřesáhla 9% ve sledovaných skupinách.

Během studie byla zjištěna signifikantně vyšší rezistence S.Aureus k oxacilinu, imipenemu, kotrimoxazolu a erythromycinu u transplantovaných pacientů v porovnání s dialyzovanými a ostatními nemocnými se SDN (tab. 20).

U druhého nejčastěji se vyskytujícího patogena (Staphylococcus koaguláza negativní) nebyly nalezeny mezi sledovanými skupinami signifikantní rozdíly v jeho rezistenci ke zkoumaným ATB.

Tabulka č. 19: Srovnání výskytu jednotlivých patogenů v diabetických ulceracích mezi transplantovanými, dialyzovanými a ostatními pacienty se SDN.

Výskyt jednotlivých patogenů v diabetických ulceracích				
Nalezené patogeny	Transplantovaní pacienti (n=21)	Dialyzovaní pacienti (n=22)	Ostatní pacienti se SDN (n=164)	P
Počet nalezených patogenů	n=58	n=44	n=491	
S. Aureus	21%	25%	21%	NS
Staphylococcus koaguláza negativní	22%	27%	20%	NS
Enterococcus sp.	10%	21%	12%	NS
Streptococcus sp.	4%	5%	7%	NS
Corynebacterium sp.	5%	2%	3%	NS
Escherichia Coli	5%	9%	9%	NS
Klebsiella sp.	9%	2%	6%	NS
Enterobacter sp.	9%	2%	6%	NS
Citrobacter sp.	2%	-	2%	NS
Proteus sp.	5%	2%	6%	NS
Acinetobacter sp.	3%	-	3%	NS
Pseudomonas sp.	5%	5%	5%	NS

n- počet pacientů nebo patogenů; NS- nesignifikantní

Tabulka č. 20: Porovnání ATB rezistence S. Aureus mezi transplantovanými, dialyzovanými a ostatními pacienty se SDN.

Prevalence rezistence S. Aureus k vybraným ATB ve sledovaných skupinách

Typy ATB	Transplantovaní pacienti (n=21)	Dialyzovaní pacienti (n=22)	Ostatní pacienti se SDN (n=164)	P
Celkový počet pozitivních nálezů S. Aureus	12	11	102	
Oxacillin	75%	55%	32%	<0,01
Amoxicillin/ kys.klavulanová	58%	36%	29%	NS
Imipenem	60%	9%	16%	<0,01
Piperacillin	56%	33%	35%	NS
Cefpirom	60%	27%	26%	NS
Kotrimoxazol	82%	22%	29%	<0,01
Erythromycin	75%	36%	38%	<0,05
Ciprofloxacin	55%	36%	36%	NS
Klindamycin	67%	27%	37%	NS
Gentamycin	58%	27%	28%	NS
Ticarcillin/ kys. klavulanová	38%	17%	26%	NS
Vancomycin	0%	0%	0%	NS

n- počet pacientů; NS - nesignifikantní

Tabulka č. 21: Porovnání ATB rezistence *Enterococcus* sp. mezi transplantovanými, dialyzovanými a ostatními pacienty se SDN.

Prevalence rezistence *Enterococcus* sp. k vybraným ATB ve sledovaných skupinách

Typy ATB	Transplantovaní pacienti (n=21)	Dialyzovaní pacienti (n=22)	Ostatní pacienti se SDN (n=164)	P
Celkový počet nalezených kmenů enterokoků	6	9	61	
Ampicillin	40%	25%	2%	<0,01
Ampicillin/sulbaktam	0%	33%	0%	<0,01
Amoxicillin/kys. klavulanová	0%	0%	2%	NS
Piperacillin	50%	0%	2%	<0,0001
Ticarcillin/kys. klavulanová	50%	60%	12%	<0,01
Ciprofloxacin	83%	67%	56%	NS
Vancomycin	0%	0%	2%	NS
Tetracyclin	50%	43%	71%	NS

Tabulka 21 ukazuje signifikantně vyšší ATB rezistenci nalezených enterokoků k ampicilinu, piperacilinu a tikarcilin/kys.klavulanové u transplantovaných pacientů a k ampicilin/sulbaktamu, tikarcilin/ kys. klavulanové u dialyzovaných pacientů v porovnání s ostatními skupinami.

Z klinicky závažných patogenů, které se ale vyskytovaly v diabetických ulceracích pouze do 10%, se stanovovala ATB rezistence u *Pseudomonas* sp. Všechny pseudomonádové bakterie nalezené u dialyzovaných pacientů byly signifikantně rezistentnější k piperacilinu (100% vs. 33% vs. 19%, respektive; $p < 0,05$) a k cefpiromu (100% vs. 0% vs. 16%, respektive; $p < 0,05$) v porovnání s transplantovanými a ostatními pacienty se SDN.

Analýza dat výskytu ATB rezistence ostatních Gram negativních mikroorganismů nebyla provedena vzhledem k malému počtu izolovaných agens ve sledovaných skupinách.

Diskuze ke studii 6

Infekce diabetických ulcerací je často způsobena polymikrobiální flórou. Ve sledovaných skupinách bylo průměrně přítomno 2,9 patogena/1 diabetickou ulcerací, zároveň nebyl nalezen signifikantní rozdíl v průměrném počtu patogenů na 1 pacienta mezi studovanými skupinami. Studie Laveryho a spol. (75) prokázala přítomnost vyššího počtu bakterií v diabetických ulceracích (průměrně 2,6 patogena) oproti nediabetickým ranám (průměrně 1,3 bakterie). Jak bylo prokázáno Wheatem, přítomnost několika mikrobů

současně může způsobit rychlou progresi infekce měkkých tkání, přestože ulcerace jsou infikovány patogeny považovanými za fyziologických okolností za oportunní bakterie (74).

Většina diabetických ulcerací patří mezi povrchové, které jsou obvykle kolonizovány aerobními Gram pozitivními mikroorganismy (172). Hlubší diabetické ulcerace, zejména ty, které ohrožují dolní končetinu, jsou často infikovány polymikrobiální flórou zahrnující Gram pozitivní a negativní bakterie a anaeroby (173-175). V naší studii byly predominantními agens nalezenými v diabetických ulceracích Gram pozitivní patogeny, zřejmě v důsledku povrchovějších ulcerací. Nejčastějšími patogeny ve všech sledovaných skupinách byly *S.Aureus*, *Staphylococcus koaguláza negativní* a *Enterococcus sp.* Podobné výsledky zaznamenal ve své studii i Pitett a spol. (10).

Základem terapie infekčních komplikací v rámci SDN je ATB léčba, která je schopna pozastavit nebo zvrátit progresi infekce (112). Nicméně výsledky studií, které sledovaly využití ATB v léčbě SDN, jsou rozporuplné. Např. Chantelau a spol. nenalezli významné rozdíly v době hojení podobných diabetických ulcerací u pacientů léčených amoxicillin/kys. klavulanovou v porovnání s nemocnými bez ATB terapie (190), avšak jednalo se pouze o pacienty s defekty Wagner 2 bez významnější infekce.

Výběr ATB je buďto empirický nebo se řídí citlivostí nalezených bakteriálních patogenů. Empirická ATB léčba by měla zahrnovat ATB účinná proti stafylokokům a streptokokům nebo širokospektrá ATB, pokud očekáváme infekci způsobenou Gram negativy nebo anaeroby (88). V naší studii nebyly nalezeny mezi sledovanými skupinami signifikantní rozdíly ve výskytu jednotlivých mikrobiálních agens. Na druhé straně studie prokázala významné rozdíly v bakteriální citlivosti k testovanými ATB mezi studovanými skupinami. Vyšší ATB rezistence *S.Aurea* a *Enterococcus sp.* byla nalezena u transplantovaných nemocných. U dialyzovaných pacientů byly zase zjištěny signifikantně vyšší ATB rezistence *Pseudomonas sp.*

Dlouhodobá hospitalizace a déletrvající nebo opakovaná ATB léčba jiných infekčních komplikací (např. respiračních nebo močových infekcí) mohou vést k selektivnímu ATB tlaku. Tento mechanismus může být v naší studii možnou příčinou značné bakteriální rezistence některých bakterií, zejména *S.Aurea*, u transplantovaných nemocných.

Naše výsledky prokázaly, že během léčby diabetických ulcerací u transplantovaných nemocných není příliš vhodné podávat oxacilin, kotrimoxazol, erytromycin a imipenem. Vzhledem k nízké rezistenci přítomných patogenů k ciprofloxacinu a tikarcilin/kys.klavulanové můžeme tato ATB doporučit k léčbě transplantovaných pacientů se SDN. Vankomycin by měl být stále indikován u závažných infekcí. Na základě našich výsledků

doporučujeme, aby empirická ATB léčba založená na datech získaných od širší diabetické populace byla modifikována u transplanovaných nemocných se SDN vzhledem k vyššímu výskytu rezistentních bakterií u těchto pacientů. ATB terapie by se měla řídit vždy aktuálními výsledky stěrů a mikrobiální ATB citlivostí.

Studie 7- Vliv ATB rezistence bakteriálních agens na četnost amputací u pacientů se SDN (přílohy 18-20)

Cílem naší studie bylo zjistit vliv ATB rezistence patogenů přítomných v diabetických ulceracích na výskyt amputací dolních končetin u pacientů se SDN.

Charakteristika souborů pacientů a definice

Do dvouleté průřezové retrospektivní studie bylo konsekutivně zařazeno 181 pacientů, kteří byli ošetřeni na podiatrické ambulanci IKEM v období 12/1998-11/1999 pro SDN a kteří měli pozitivní kultivační nálezy ze stěrů z diabetických ulcerací. Do studie byli zařazeni pacienti s alespoň mírnými známkami lokálního zánětu nebo se závažným kultivačním nálezem, reulceracemi nebo chronickými ulceracemi léčenými alespoň po dobu 3 měsíců. Charakteristika souboru je uvedena v tabulce 22.

Tabulka č. 22: Základní charakteristika celého souboru pacientů (n=181).

Sledované parametry	Průměry a směrodatné odchylky
Věk (roky)	61,9 ± 13,4
HbA1c (%) dle DCCT	8,1 ± 2,2
Trvání diabetes mellitus (roky)	18,2 ± 10,1
Závažnost diabetické ulcerace hodnoceno dle stupně Wagnera	2,1 ± 0,9

U všech studovaných nemocných byl sledován výskyt amputací do doby zhojení nebo po dobu minimálně 12 a maximálně 24 měsíců. Pacienti zařazení do studie byli rozděleni do 2 skupin- na skupinu pacientů bez amputace ve sledovaném období a na skupinu pacientů s amputací dolní končetiny. Pacienti s amputací absolvovali nízkou (pod tarsometatarsální úrovní) nebo vysokou amputací dolní končetiny (nad tarsometatarsální úrovní). Indikací k amputaci byly- septický stav, projevy kritické ICHDK včetně klidových bolestí, dlouhotrvající OM nebo neřešitelná progresse lokální infekce. O indikaci vždy rozhodoval multidisciplinární tým složený především z chirurga a diabetologa.

Infekce byla definována jako přítomnost pozitivního kultivačního nálezu ze spodiny ulcerace s lokálními (zarudnutí, indurace, purulence apod.; 177) a/nebo systémovými známkami infekce (teplota, leukocytóza, zvýšené CRP;1).

Ke zhodnocení závažnosti diabetické ulcerace byla použita Wagnerovská klasifikace (10). Diabetickou ulcerací Wagner 1 mělo 25% pacientů, Wagner 2 - 43%, Wagner 3 - 21% a Wagner 4 - 11% nemocných zařazených do studie.

Před amputací dolních končetin a u neamputovaných pacientů na počátku léčby a v jejím průběhu byly odebrány u sledovaných pacientů stěry z hlubokých tkání či spodiny ulcerace po lokálním debridementu. Detekce mikrobiálních agens a určení jejich rezistenci byly popsány v kapitole 3. Za rezistentní mikroorganismy byly považovány ty, které byly necitlivé ke všem vyšetřovaným perorálním ATB. Necitlivost k perorálním ATB byla zvolena jako kritérium rezistence proto, že značně komplikuje ambulantní léčbu pacientů se SDN. Rezistentní stafylokoky byly definovány jako kmeny stafylokoků rezistentní k oxacillinu, MRSA byl definován jako patogen rezistentní téměř ke všem testovaným ATB kromě vankomycinu, teikoplaninu a kolistinu.

ICHDK byla diagnostikována pomocí neinvazivních metod (Dopplerovské indexy < 0,8 nebo TcPO₂ < 30 mm Hg; 178) nebo pomocí invazivních metod (angiografie - průkaz obliterací nebo stenóz tepenného řečiště).

OM jsme prokázali klinicky (přítomen defekt Wagner 3 s kostí na spodině, flegmóna nebo píštěl jdoucí ke kosti) v kombinaci s rentgenologickým (RTG) vyšetřením a laboratorními známkami zánětu (82).

Schéma studie 7 a statistické zhodnocení nalezených dat

Během studie byly posuzovány faktory asociované s amputacemi, mezi něž jsme zařadili vedle již dříve sledovaných faktorů jako je ICHDK a OM i rezistenci k perorálním ATB.

Všechna data byla posouzena t-testem a párovým Mann-Whitneyovým testem. Fisherův test a χ^2 test byly použity ke stanovení vztahu mezi OM, ICHDK, přítomností rezistentních patogenů a amputacemi dolních končetin. Postupná regresní analýza byla použita ke stanovení asociací detekovaných rizikových faktorů s počtem amputací dolních končetin. Všechna data jsou uváděna jako průměry \pm SD. Za signifikantní byly považovány výsledky s $p < 0,05$.

Výsledky studie 7

Celkově ze 181 pacientů se SDN bylo amputováno 42 nemocných (23%). 37/42 pacientů absolvovalo nízkou amputaci (88%) a 5/42 pacientů (12%) podstoupilo vysokou amputaci.

Patogeny rezistentní ke všem perorálním ATB byly nalezeny alespoň v 1 případě u 29% (53/181) všech nemocných, přičemž z tohoto množství u 21% (38/181) všech pacientů byly nalezeny rezistentní stafylokoky. MRSA bylo přítomno u 16% všech nemocných.

Během studie jsme prokázali významně vyšší výskyt rezistentních patogenů na perorální ATB u pacientů po amputaci (57% amputovaných pacientů; tab. 23) oproti nemocným bez amputace (21% neamputovaných; $p < 0,001$). Před výkonem měli amputovaní pacienti signifikantně více jak rezistentních kmenů stafylokoků, tak MRSA v diabetických ulceracích v porovnání s pacienty bez amputace (tab. 23).

Tabulka č. 23: Výskyt rezistentní mikroorganismů na perorální ATB u amputovaných a neamputovaných pacientů se SDN.

Typy rezistentních patogenů	Výskyt u amputovaných pacientů	Výskyt u pacientů bez amputace	Signifikance
Rezistentní Gram pozitivní a negativní patogeny	24/42 (57%)	29/139 (21%)	$p < 0,001$
Rezistentní S.Aureus	18/42 (43%)	20/139 (14%)	$p < 0,001$
MRSA	14/42 (33%)	15/139 (11%)	$p < 0,001$

Kromě přítomnosti jednotlivých bakteriálních agens infikujících diabetické ulcerace jsme sledovali i jiné faktory, které mohou ovlivnit výskyt amputací u pacientů se SDN. ICHDK byla prokázána celkově u 63% (114/181) nemocných. ICHDK se vyskytovala u 81% (34/42) amputovaných pacientů oproti 58% (80/139) neamputovaných nemocných ($p < 0,01$). OM byla nalezena u 25% (46/181) všech pacientů se SDN. Signifikantně vyšší výskyt OM byl nalezen u amputovaných v porovnání s neamputovanými nemocnými (67% (28/42) vs. 13% (18/139) pacientů; $p < 0,001$).

Při podrobnějším statistickém zhodnocení amputovaných pacientů s OM, nebylo u těchto nemocných předoperačně nalezeno signifikantně více rezistentních patogenů ve stěrech z ulcerací v porovnání s nemocnými s OM bez amputace (54,5% vs. 33,3%; NS). Nicméně signifikantně vyšší procento amputovaných pacientů bez OM mělo rezistentního patogena (tab. 24) v diabetické ulceraci v porovnání s pacienty bez OM a amputace (80% vs. 20,5%; $p < 0,001$); obdobné nálezy platí i pro výskyt MRSA (tab. 24).

Postupná regresní analýza sledovaných skupin nemocných prokázala, že přítomnost všech rezistentních patogenů k perorálním ATB (OR 5,58, CI 2,1-15,1), rezistentních

stafylokoků a zejména MRSA (OR 4,34; CI 1,6-12,1) v diabetických ulceracích zvyšuje jednoznačně riziko amputace dolních končetin u pacientů se SDN. Prokázaná OM zvýšila riziko amputace téměř 17-krát (OR 16,7; CI 6,1-45,8) a ICHDK téměř 4-krát (OR 4,4; CI 1,3-14,9).

Tabulka č. 24: Rozložení počtu nemocných s a bez OM mezi pacienty bez amputace a nemocnými po amputaci dolní končetiny se zaměřením na patogeny rezistentní k perorálním ATB.

	Pacienti s amputací dolní končetiny (n=42)	Pacienti bez amputace dolní končetiny (n=139)	P
Pacienti s OM			
Pacienti s rezistentními patogeny	54,5%	33,3%	NS
Pacienti s MRSA	27,6%	16,7%	NS
Pacienti bez OM			
Pacienti s rezistentními patogeny	80%	20,5%	p<0,001
Pacienti s MRSA	46,2%	10,7%	p<0,01

Diskuze ke studii 7

Naše studie byla zaměřena na zjištění rizikových faktorů a stupně jejich závažnosti ve vztahu k amputacím dolních končetin u pacientů se SDN. Zajímalo nás možné riziko amputace dolní končetiny vzhledem k přítomnosti mikroorganismů rezistentních k perorálním ATB, jelikož tato rezistence může komplikovat ambulantní léčbu pacientů se SDN. Výsledky naší studie prokázaly, že infekce způsobená patogeny rezistentními k perorálním ATB může významně ovlivnit incidenci amputací dolních končetin u pacientů se SDN, spolu s jinými faktory, jako např. ICHDK a OM.

Podobné výsledky uveřejnil Oyibo ve své studii, kde samotná infekce zvyšovala riziko amputací, zejména v kombinaci s ICHDK, avšak samotná ICHDK bez infekce nevedla ke vzestupu amputací (179). My jsme prokázali u našich pacientů až 4 násobné zvýšení rizika výskytu amputací vlivem ICHDK.

Na základě našich výsledků je vhodné co nejdříve začít vysoce účinnou léčbu infekčních komplikací SDN, zvláště v terénu ICHDK, abychom zabránili rozvoji ATB rezistence. K jejímu rozvoji vede špatný průnik ATB do tkání, zejména při nízkých dávkách ATB, a ICHDK spolu s edémem periferních tkání (180).

Jak prokázal Hartemann, rezistentní mikrobiální flóra může vést k přetrvávání OM, která je hůře léčitelná konzervativní terapií (181). Naše studie prokázala, že existuje vyšší výskyt rezistentních patogenů v diabetických ulceracích u amputovaných pacientů, přestože

nemají OM. Rezistentní patogeny přítomné v měkkých tkáních mohou pravděpodobně sami o sobě častěji způsobit progresi lokální infekce a septický stav vyžadující amputaci dolní končetiny.

Lze shrnout, že přítomnost organismů rezistentních k perorálním ATB byla druhým nejzávažnějším faktorem zvyšujícím incidenci amputací dolních končetin u pacientů se SDN v naší studii. Nejrizikovějším faktorem zůstává OM, třetím v pořadí je ICHDK. Vyšší počet amputací dolních končetin na našem pracovišti může být ovlivněn akumulací rizikových pacientů s ICHDK a pozdními komplikacemi jako např. chronickou renální insuficiencí léčenou transplantací.

Edukace pacientů a efektivní péče o SDN může zabránit infekci a redukovat počet amputací dolních končetin o více než 50-75% (182-184). Otázkou zůstává, kdy je vhodné provést nízkou amputaci a kdy pokračovat v konzervativní ATB terapii při přetrvávající infekci u pacientů se SDN. Na základě našich dat může přítomnost rezistentních patogenů v diabetických ulceracích přispět k preferenci chirurgické terapie.

Studie č. 8: Mykotické infekce u pacientů se SDN se zaměřením na jejich diagnostiku a sledování rizikových faktorů (příloha 21-23)

V naší prospektivní studii jsme se snažili zjistit výskyt mykotických infekcí u pacientů se SDN, prozkoumat vhodné metody jejich diagnostiky a sledovat rizikové faktory ovlivňující výskyt mykotických agens.

Charakteristika pacientů

Do studie bylo zařazeno 27 nemocných, kteří byli léčeni v podiatrické ambulanci IKEM pro diabetické ulcerace Wagner 1-3 v období 11/2004-5/2005. Základní podmínkou zařazení do studie byla nehojící se neuropatická ulcerace. Ze studie byli vyřazeni pacienti s kritickou ICHDK, která byla verifikována neinvazivními (Dopplerovské indexy < 0.6 , TcPO₂ < 20 mm Hg) nebo invazivními metodami (angiografie), dále pacienti s kožními chorobami, se známým imunodeficitním onemocněním nebo ti, kteří byli léčeni imunosupresivy. Základní charakteristika souboru je uvedena v tabulce 26.

Schéma studie 8 a statistické zhodnocení nalezených dat

U každého nemocného byl odebrán HbA_{1c} ke stanovení kompenzace diabetu; k vyloučení OM byly provedeny odběry krevního obrazu, CRP a RTG vyšetření dolní

Tabulka č. 26: Základní charakteristika souboru pacientů se SDN (n=27).

Sledované parametry	Průměry a směrodatné odchylky
Věk pacientů (roky)	58,1 ± 7,6
Trvání diabetu (roky)	14,6 ± 10,5
HbA1c dle IFCC (%)	6,1 ± 2,1
BMI (kg.m ⁻²)	30,3 ± 3,8

končetiny. Sledované biochemické parametry byly stanoveny podle metod popsanych v kapitole 3.

Stanovení mykotických agens jak mikroskopicky, tak kultivačně, bylo provedeno dle metodiky uvedené v kapitole 3. Ve studii byl posuzován výskyt jednotlivých mykotických agens detekovaných mikroskopicky a kultivačně. Dále byla posuzována shoda mikroskopických a kultivačních nálezů z hyperkeratóz nebo spodin ulcerací u každého pacienta. Také byly posuzovány shody kultivačně nalezených mykotických patogenů mezi vzorky odebranými z hyperkeratóz a ze spodin ulcerací.

Ve studii jsme sledovali i následující rizikové faktory, které mohly ovlivnit výskyt mykotických agens u pacientů se SDN:

- věk pacienta
- trvání diabetu
- kompenzaci diabetu
- BMI
- závažnost diabetické ulcerace (hodnoceno Wagnerovskou klasifikací)
- trvání diabetické ulcerace
- délku předchozí ATB terapie.

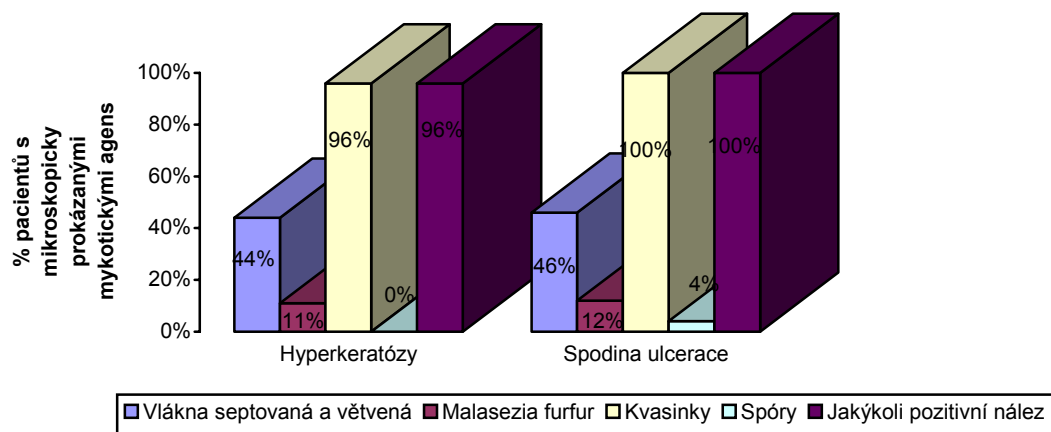
Posouzení shod jak mikroskopického, tak kultivačního vyšetření ze vzorků odebraných z hyperkeratóz a ze spodiny ulcerace a posouzení shod patřičných mikroskopických a kultivačních nálezů bylo provedeno McNemarovým testem s kontingenčními tabulkami. Výsledek byl uveden jako konkordance s konfidencním intervalem. Korelace přítomnosti kultivačně prokázaných mykotických agens se sledovanými rizikovými faktory byla provedena za použití Mann-Whitneyova testu a χ^2 -testu. Všechny výsledky byly prezentovány jako průměry ± SD. Za signifikantní byly považovány hodnoty s $p < 0,05$.

Výsledky studie 8

Mikroskopickým vyšetřením byla prokázána přítomnost mykotických agens ze vzorků hyperkeratóz u 95% (26/27) nemocných a ze vzorků ze spodiny ulcerace u 100% (27/27)

pacientů. Nejčastějšími mykotickými agens byly kvasinky (96% a 100%), druhými v pořadí septovaná či větvená vlákna značící dermatofyta (44% a 46%; graf 5).

Kultivačně pozitivní nálezy byly přítomny v menším počtu případů. Vzorky hyperkeratóz byly kultivačně pozitivní u 48% nemocných (13/27), vzorky odebrané ze spodin ulcerací ve 28% případů (7/25). Distribuce kultivačních nálezů je zachycena v grafu 6. Nejčastějšími mykotickými agens v hyperkeratózách i v ulceracích byly kvasinky (převážně Graf č. 5: Mikroskopicky pozitivní mykotické nálezy u pacientů s diabetickými ulceracemi.



Candida albicans a parapsilosis) a dermatofyta reprezentovaná zejména Trichophyton rubrum. Obdobné nálezy byly zjištěny i po měsíční kontrole.

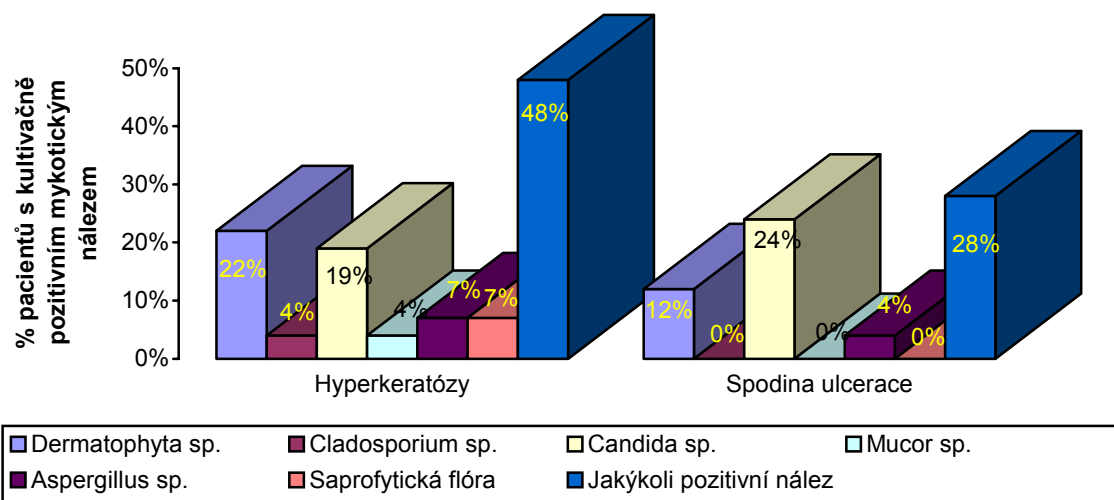
Při stanovení shod mikroskopických a kultivačních nálezů nebyla nalezena shoda vyšetření ani ve vzorcích odebraných z hyperkeratóz, ani ve vzorcích odebraných ze spodin ulcerací (signifikance neshody - $p < 0,001$). Dále jsme porovnávali shodu pouze kultivačních nálezů z různých lokalizací planty u téhož pacienta - ze vzorků z hyperkeratóz a ze spodin ulcerací. Velice často byly kultivace mykotických agens z daných vzorků u téhož pacienta odlišné, konkordance činila pouze 56% (CI 0,37-0,75; NS).

Nebyla nalezena signifikantní asociace sledovaných rizikových faktorů s kultivačními nálezy mykotických agens z odebraných vzorků hyperkeratóz a spodin ulcerací (tab. 27).

Diskuze ke studii 8

Diabetici mají sklon k mykotickým onemocněním vzhledem k hyperglykemiím a poruše imunitních funkcí, zejména na úrovni nespecifické imunity. Pacienti se SDN navíc užívají chronicky celou řadu ATB, která brání růstu normální bakteriální flóry a umožňují tak růst oportunních mikroorganismů (185).

Graf č. 6: Kultivační nálezy mykotických agens u pacientů s diabetickými ulceracemi.



Tabulka č. 27: Asociace rizikových faktorů s výskytem mykotických agens u pacientů se SDN (n=27).

Rizikové faktory	Průměrné hodnoty	Asociace s pozitivitou mykotických kultivací
Věk pacientů (roky)	58,1 ± 7,6	NS
Trvání diabetu (roky)	14,6 ± 10,5	NS
HbA1c (%) dle IFCC	6,1 ± 2,1	NS
BMI (kg.m ⁻²)	30,3 ± 3,8	NS
Závažnost diabetické ulcerace dle Wagnera	Wagner 2,2 ± 0,7	NS
Trvání ulcerace (měsíce)	14,0 ± 19,0	NS
Délka předchozí ATB terapie (měsíce):	5,0 ± 4,6	NS

Většina studií zabývajících se přítomností mykotických agens u pacientů s diabetes mellitus se zaobírá přítomností onychomykózy či tinea pedis (93-96, 99, 186). Kožní infekce, která je způsobena mykotickými agens, může přispět k rozvoji diabetických ulcerací; např. onychomykóza může vést k rozvoji abrazí a ulcerací vzhledem k traumatům způsobeným nevhodnými úpravami nehtů a nebo nehtovými změnami samotnými (94). Dostupná literatura se pouze okrajově dotýká problematiky spojení mykóz a SDN (96, 97, 100, 103, 187, 188), proto jsme se v naší studii zaměřili na zjištění přítomnosti mykotických agens u pacientů se SDN. Mikroskopicky jsme prokázali přítomnost mykotických agens v diabetických ulceracích téměř u všech pacientů se SDN, avšak pozitivita kultivačních vyšetření byla výrazně nižší (pozitivita u 48% hyperkeratóz a u 28% ulcerací). Podobně Chincholikar a spol. našli ve své studii pacientů s diabetickými ulceracemi 55 mykotických agens ve 265 vzorcích odebraných z ulcerací (20,7%; 96).

Nejčastějšími mykotickými agens přítomnými v diabetických ulceracích a v jejich okolí byly v naší studii jak mikroskopicky, tak kultivačně, kandidy a dermatofyta. Mlinarić a spol. prokázali v diabetických ulceracích podobné spektrum mykotických patogenů (189).

Řada faktorů zahrnujících kompenzaci diabetu, pozdní komplikace diabetu, BMI apod. může napomoci rozvoji mykotických infekcí u diabetických pacientů. V naší studii ale nekorespondovaly sledované potenciální rizikové faktory s výskytem mykotických agens u pacientů se SDN.

Diskrepance mezi procenty mikroskopicky a kultivačně pozitivních vzorků nás vedla k posouzení shody nálezů mezi těmito diagnostickými metodami. Nenalezli jsme shodu mezi mikroskopickými a kultivačními nálezy u téhož pacienta jak u vzorků odebraných z hyperkeratóz, tak u vzorků odebraných ze spodin ulcerací. Pro snažší diagnostiku mykotické infekce u pacientů se SDN jsme se pokusili zjistit, zda-li je shoda mezi vzorky odebranými z různých lokalizací planty u téhož pacienta. Ovšem kultivační nálezy z hyperkeratóz se statisticky významně neshodovaly s nálezy ze spodin ulcerací.

Podle našich dat víme, že každá z uvedených metod diagnostiky má své výhody a nevýhody. Výhodou mikroskopie je okamžitý průkaz agens, nevýhodou nepřesnost stanovení daného patogena. Přesnější údaje o kauzálním agens způsobujícím mykotickou infekci dostaneme pouze pomocí kultivačního vyšetření vzorků tkání. Nevýhodou kultivační metody je její trvání, které se obvykle pohybuje okolo 4 týdnů.

Denning a spol. udávají, že pro započetí léčby mykotické infekce je dostačující mikroskopický průkaz pozitivity vzorků (103). Nicméně podle našich výsledků nedoporučujeme začít systémovou léčbu antimykotiky pouze na základě mikroskopického průkazu mykotických agens u pacientů se SDN a doporučujeme indikovat kultivační vyšetření, a to nejen ze vzorků z hyperkeratóz, ale i ze spodiny ulcerace.

Další otázkou do budoucnosti zůstává efekt antimykotické terapie na hojivost chronických diabetických ulcerací. V odborné literatuře se objevují zmínky o úspěchu léčby systémovými antimykotiky. Studie Healdla byla provedena na 17 pacientech s nehojícími se diabetickými ulceracemi, které byly infikovány mykotickými agens. Po systémové léčbě antimykotiky došlo téměř u všech nemocných ke zlepšení ulcerací (zmenšení plochy a hloubky) nebo k jejich zhojení (97).

4.3 Terapie syndromu diabetické nohy odlehčením (studie 9-11)

Studie 9- Vliv léčby snímatelnými kontaktními fixacemi na hojivost SDN (přílohy 24-30):

Cílem naší prospektivní studie bylo posoudit efekt terapie r-TCC u pacientů s akutní ChaO, chronickými neuropatickými ulceracemi a patologickými frakturami v terénu ChaO nebo OM.

Charakteristika souborů pacientů a definice jednotlivých diagnóz

Do studie bylo konsektivně zařazeno 74 pacientů, kteří byli léčeni v podiatrické ambulanci IKEM pro SDN pomocí r-TCC. Sledování pacientů probíhalo do doby zhojení SDN nebo maximálně 12 měsíců od začátku léčby r-TCC. Vylučovací kritéria pro aplikaci r-TCC jsou popsána v úvodu dizertační práce (str. 19).

Pacienti byli rozděleni podle diagnózy do tří skupin. Do 1. skupiny bylo zařazeno 27 pacientů s chronickými diabetickými ulceracemi (2 nemocní s ulcerací stupně 1 dle Wagnera, 12 se stupněm Wagner 2 a 13 pacientů-Wagner 3; průměrný věk $53,5 \pm 8$ roku, trvání diabetu $14,8 \pm 7$ roku, HbA1c dle DCCT $8,2 \pm 2\%$). Do 2. skupiny bylo zavzato 35 nemocných s nově vzniklou akutní ChaO (průměrný věk $53,9 \pm 8$ roku, trvání diabetu $16,6 \pm 10$ roku, HbA1c $8,4 \pm 2\%$). 3. skupinu tvořilo 12 pacientů s neuropatickými frakturami (průměrný věk $52,8 \pm 10$ roku, trvání diabetu $14,8 \pm 12$ roku, HbA1c $8,9 \pm 2\%$). Patologické fraktury byly lokalizovány v oblasti phalang v 16,5%, metatarzálních kostí v 67% a v oblasti tarzálních kostí v 16,5% případů. Sledované skupiny se vzájemně nelišily v popsaných charakteristikách.

Mezi **nehojící se diabetické ulcerace** byly zařazeny neuropatické nebo neuroischemické vředy, které byly neúspěšně léčeny po dobu alespoň 3 měsíců standardními metodami (1; lokální terapie, odlehčení dolní končetiny pomocí terapeutické poloviční boty a podávání ATB při známkách lokální či systémové infekce). Během terapie r-TCC byla ATB podávána pacientům pouze v případě známek lokální infekce.

Akutní ChaO byla definována klinickým nálezem: asymetrickým otokem nohy, zvýšením lokálních kožních teplot o 2°C proti kontralaterální končetině, někdy zarudnutím nebo bolestivostí. V některých případech byly u nemocných přítomny deformity (190). Diagnostika byla upřesněna vyšetřením distální sensomotorické neuropatie, RTG vyšetřením a dynamickou scintigrafií kostí. Těžší distální sensomotorická neuropatie byla

diagnostikována pomocí biothesiometru. Za patologické hodnoty byl pokládán práh vibračního cití $> 25V$. RTG vyšetření může přispět k diagnostice akutní ChaO (zaniklé kloubní štěrbiny, fraktury kostí, lokální osteoporóza), ale mnohdy bývá RTG obraz v akutních stádiích ještě fyziologický. Během dynamické scintigrafie kostí byla sledována perfuze, parametry intenzity kostního metabolismu a akumulace radiofarmaka ve skeletu po aplikaci methylen bifosfonátu značeného ^{99}Tc (191). Kontrolní scintigrafické vyšetření bylo provedeno vždy při klinických známkách přechodu akutní ChaO do chronického stádia, nejdříve však za 3-6 měsíců.

Neuropatické fraktury byly definovány jako fraktury u pacientů s těžkou neuropatií, které vznikly bez výrazného zevního násilí. RTG obraz přitom neodpovídal typické lokalizaci ChaO.

r-TCC byly zhotoveny dle postupu popsaného v metodické části (kap. 3). Ve stejné kapitole byly také uvedeny postupy ošetření pacientů a četnost jejich kontrol během terapie r-TCC.

Schéma studie 9 a statistické zpracování nalezených dat

Ve studii 9 byly posuzovány rozdíly v hojení (doba hojení, procento zhojených pacientů) mezi sledovanými skupinami. Byla určena kritéria hojení pro jednotlivé skupiny; pro pacienty s neuropatickými ulceracemi bylo kritériem zhojení úplná epitelizace rány, u pacientů s akutní ChaO bylo kritériem hojení zlepšení lokálního nálezu - ústup otoku i zarudnutí dolní končetiny, pokles kožních teplot (rozdíl kožních teplot $\leq 1,5^{\circ}C$) a/nebo redukce kostní aktivity dle dynamické scintigrafie kostí a pro nemocné s neuropatickými frakturami bylo kritériem RTG zhojení fraktury-úplná osifikace kosti.

Uváděná data jsou prezentována formou průměrných hodnot \pm SD. Statistické porovnání výsledků mezi sledovanými skupinami pacientů bylo provedeno pomocí ANOVA testu. Sledované parametry v rámci jednotlivých skupin byly porovnány pomocí párového t-testu a Wilcoxonova testu. Kolmogorov-Smirnovův test nezamítl předpoklad normality. Statisticky signifikantní byly hodnoty $p < 0,05$.

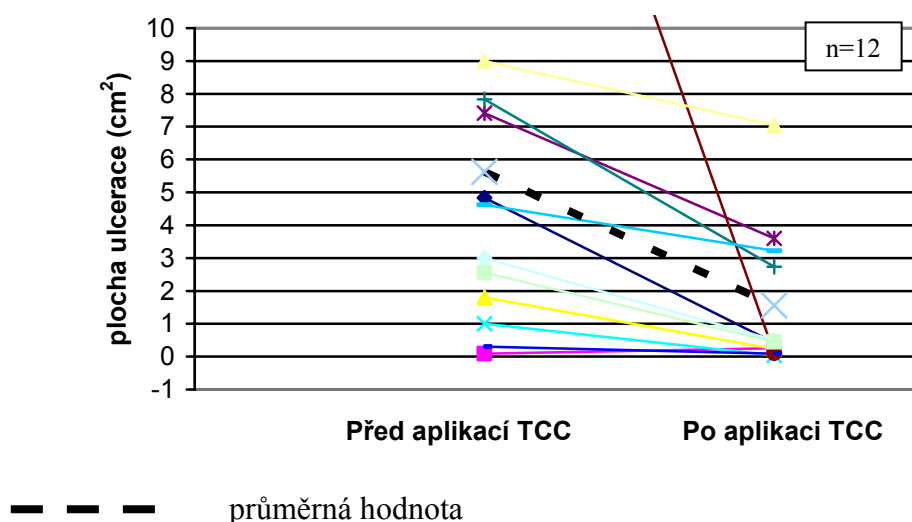
Výsledky studie 9

Pacienti s diabetickými ulceracemi byli během sledovaného období léčeni r-TCC v průměru $6 \pm 4,2$ měsíce, nemocní s akutní ChaO $5,1 \pm 4$ měsíce a pacienti s patologickými frakturami $3,9 \pm 2,6$ měsíce (NS). Signifikantně nejvyšší procento zhojených během sledovaného období bylo nalezeno ve skupině pacientů s neuropatickými frakturami

v porovnání s pacienty léčenými pro neuropatické ulcerace a akutní ChaO (83% vs. 30% vs. 37%; $p < 0,01$). Nejkratší dobu byli do úplného zhojení léčeni r-TCC pacienti s neuropatickými frakturami v porovnání se skupinou pacientů s neuropatickými ulceracemi a akutní ChaO ($4,2 \pm 2,8$ vs. $6,25 \pm 3,8$ vs. $7,9 \pm 3,5$ měsíce; $p < 0,01$).

Z 19 pacientů (70% pacientů s neuropatickými ulceracemi) s nezhojenými neuropatickými ulceracemi došlo během sledovaného období u 12 nemocných ke zlepšení lokálního nálezu, a to k signifikantnímu zmenšení velikosti defektu ($5,6 \pm 6,8$ vs. $1,56 \pm 2$ cm^2 ; $p < 0,01$; graf 7). U 3 pacientů došlo ke zhoršení lokálního nálezu a u 4 nemocných se lokální nálezu výrazně nezměnil.

Graf č. 7: Vývoj plochy diabetické ulcerace během terapie r-TCC u nezhojených pacientů s neuropatickými ulceracemi.



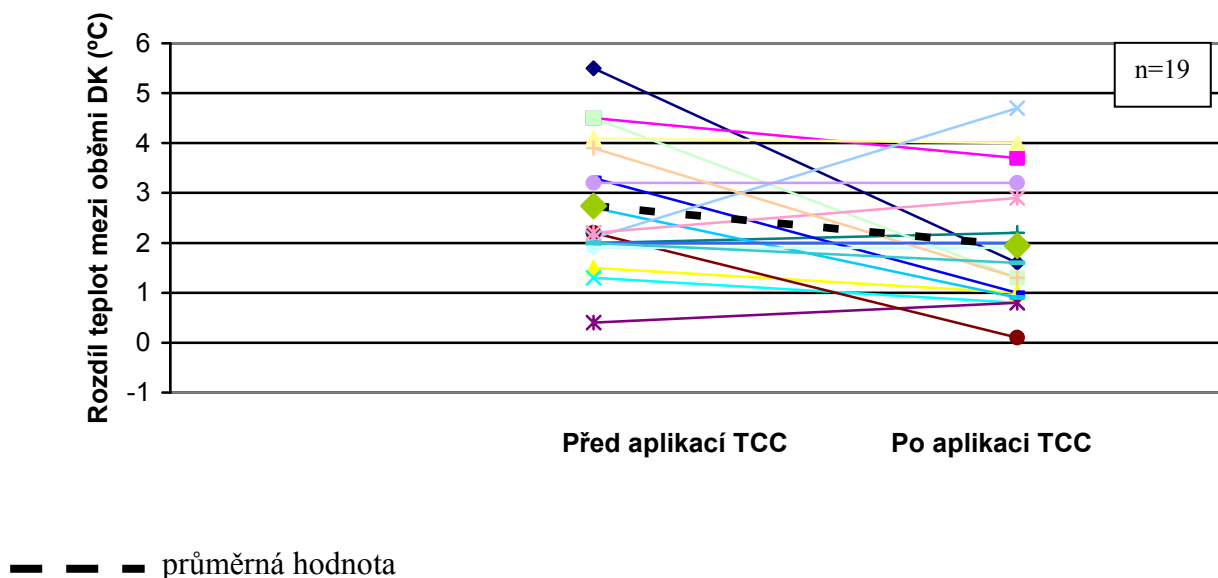
Z 22 pacientů s nezhojenou akutní ChaO (63% pacientů s akutní ChaO) došlo během sledovaného období u 19 nemocných ke zlepšení klinického stavu a k signifikantní redukci rozdílu kožních teplot na dolních končetinách ($2,74 \pm 1,3$ vs. $2 \pm 1,3^\circ\text{C}$; $p < 0,05$; graf 8). Pouze u 3 pacientů došlo během terapie r-TCC ke zhoršení lokálního nálezu.

Ve skupině neuropatických fraktur nedošlo během sledovaného období ke zhojení 2 pacientů - u 1 bylo zaznamenáno zlepšení patologického nálezu a u 1 pacienta došlo ke zhoršení nálezu.

Diskuze ke studii 9

TCC se využívají v zahraničí již řadu let v terapii diabetických ulcerací a akutní ChaO (105, 192), v naší republice však zkušenosti s touto léčbou doposud publikovány nebyly.

Graf č. 8: Vývoj rozdílů kožních teplot u nezhojených pacientů s akutní ChaO během terapie r-TCC.



V naší studii jsme posuzovali dobu hojení jednotlivých abnormalit i počet zhojených pacientů pomocí r-TCC. Doba léčby TCC se signifikantně nelišila mezi sledovanými skupinami, avšak individuální doba sledování byla ve studii variabilní.

V naší studii došlo ke zhojení 30% pacientů s neuropatickými ulceracemi průměrně během 6 měsíců. Laing a spol. prokázali ve své studii zhojení více než 80% ulcerací během dvouměsíční terapie (104). Faktorem, který mohl zapříčinit v naší studii nízké procento zhojení diabetických ulcerací oproti Laingově studii, byl závažnější stupeň ulcerace i infekce (104). Zatímco ve studii Lainga a spol. byla většina pacientů s ulceracemi stupně 1 a 2 dle Wagnera, v naší studii měla většina pacientů ulcerace stupně Wagnera 2 a 3.

Ve studii Armstronga a spol. porovnávali hojení diabetických ulcerací pomocí r-TCC, speciálně upravených ortéz (aircast) a polovičních terapeutických bot. Během 12 týdnů došlo k signifikantně nejvyššímu procentu zhojení diabetických ulcerací u pacientů léčených TCC v porovnání s pacienty léčenými speciálně upravenými ortézami a polovičními botami (89,5% vs. 65% vs. 58,3%, respektive; 193). Nicméně i v této práci byli pomocí TCC léčeni pacienti s povrchovějšími ulceracemi oproti naší studii. Hojení diabetických ulcerací posuzovali také polští autoři, u nichž došlo během 2 měsíců ke zhojení 90% nemocných, nicméně velikost ulcerací byla podstatně menší v porovnání s naší studií (plocha ulcerací 2 cm²; 194).

V Laveryho studii autoři porovnávali hojivost ulcerací u pacientů s diabetickými ulceracemi bez a se současnou akutní ChaO (195). Signifikantně kratší dobu se hojily ulcerace u pacientů s ChaO, přestože plocha jejich ulcerací byla signifikantně větší v porovnání se skupinou pacientů léčených pouze pro neuropatické ulcerace. Nicméně tito

pacienti měli kratší anamnézu neuropatických defektů v porovnání s pacienty léčenými pouze pro neuropatické ulcerace (18 dní vs. 89 dní). Chronicita ulcerace tady zřejmě hrála, podobně jako v naší studii, podstatnou roli. V naší studii byli hodnoceni pacienti s ChaO bez ulcerací, pacienti s ChaO a ulceracemi byli zařazeni do skupiny ulcerací a ne ChaO.

V naší studii se podařilo zhojit během sledovaného období 37% pacientů s akutní ChaO v průměru za 8 měsíců. Sinacore a spol. uvedli ve své studii 100% zhojení ChaO během průměrně $2,9 \pm 1,5$ měsíců, medián byl 6,7 měsíce (192). Podle lokalizace ChaO se lišila v Sinacorově studii i doba hojení pomocí TCC. Delší dobu se hojily arthropatie lokalizované v oblasti střední části nohy, paty a kotníku v porovnání s lokalizací v přední části nohy, což jsme pozorovali i v naší studii. Hojení ChaO bylo signifikantně ovlivněno a prodlouženo u pacientů, u kterých došlo k pozdnímu stanovení diagnózy. Rozdíl v době hojení ChaO v naší studii a studii Sinacora může spočívat především v jiných kritériích hojení osteoarthropatie - Sinacore používal jako kritérium hojení pouze klinický obraz (ústup erytému, pokles kožních teplot), my jsme používali také scintigrafická kritéria (192).

Hojení neuropatických fraktur bylo v naší studii rychlejší v porovnání s délkou hojení pacientů s neuropatickými ulceracemi nebo akutní ChaO. Přesto bývá hojení neuropatických fraktur obtížnější nežli u běžných zlomenin (196).

Po ukončení terapie r-TCC má pacient používat preventivní obuv pro diabetiky nebo speciálně upravené ortopedické boty. Převod by měl být pozvolný, abychom zamezili reulceracím. Rekurenci neuropatických ulcerací prokázal Helm a spol. ve své studii u 20% nemocných během následujících 25 měsíců po ukončení terapie TCC (197). Příčinami nových ulcerací byly non-compliance pacienta, porucha biomechaniky, výskyt osteofytů nebo sekvestrů kosti, OM a výskyt deformit v rámci ChaO (197). V naší studii jsme rekurenci abnormalit nesledovaly.

Závěrem můžeme shrnout, že výsledky naší studie podporují koncepci, že r-TCC je vhodnou formou odlehčení dolních končetin u pacientů se SDN. Urychluje hojení jak u pacientů s akutní ChaO, tak s neuropatickými frakturami a s diabetickými ulceracemi. Před aplikací r-TCC je ovšem nutno zvážit indikaci této formy léčby u pacientů s OM a u infikovaných diabetických ulcerací s klinicky závažným nálezem. Proto jsme následně provedli studii 10.

Studie 10- Komplikace léčby r-TCC se zaměřením na OM (přílohy 31-35):

Cílem prospektivní studie bylo zjistit počet komplikací léčby r-TCC se zaměřením na výskyt nové OM a její hojení.

Charakteristika souboru pacientů

Do naší studie bylo konsektivně zařazeno 61 pacientů se SDN, kteří byli léčeni pro nehojící se neuropatické ulcerace, akutní ChaO a neuropatické fraktury v podiatrické ambulanci IKEM. Tito pacienti byli obdobně jako v předchozí studii před zařazením do studie neúspěšně léčeni po dobu alespoň 3 měsíců standardními metodami odlehčení dolních končetin (1, 52). Vylučovací kritéria aplikace r-TCC byla zmíněna v kapitole 3. Průměrný věk pacientů zařazených do studie byl $54 \pm 9,2$ roku, průměrná doba trvání diabetu byla $15,6 \pm 9$ roku a průměrný HbA1c dle DCCT činil $8,3 \pm 1,8\%$.

Diagnostika OM, posouzení závažnosti ulcerací a ATB rezistence

OM byla stanovena pomocí RTG vyšetření dolních končetin, které bylo prováděno vždy před započítím a po ukončení léčby r-TCC. K diagnóze přispěly i elevované parametry zánětu (CRP, FW, leukocytóza) a nález na dolní končetině (otok a/nebo flegmóna a/nebo hluboká ulcerace dolní končetiny Wagner 3, či chronická fistula s kostí na spodině v oblasti dolní končetiny). Všichni pacienti s diagnostikovanou OM byli léčeni po dobu trvání OM perorálními ATB.

Kritériem zhojení OM bylo posouzení lokálního nálezu - ústup otoku a flegmóny dolní končetiny a pokles rozdílu kožních teplot dolních končetin, pokles laboratorních známek zánětu (leukocyty, CRP) a dále RTG potvrzené zhojení OM v dané lokalitě.

V souvislosti s možnými faktory spojenými s rizikem OM byly posuzovány závažnost diabetické ulcerace (Wagnerovskou klasifikací) a ATB rezistence patogenů nalezených v diabetických ulceracích. Za rezistentní byly považovány patogeny necitlivé k perorálním ATB, která lze využít v léčbě infekce u ambulantních pacientů.

Schéma studie 10 a statistické zpracování nalezených dat

V kapitole 3 byly popsány metody aplikace r-TCC, postup ošetření a harmonogram pravidelných kontrol nemocných se SDN, kteří byli zařazeni do studie. U pacientů zařazených do studie byly aplikovány r-TCC metodou popsanou v kapitole 3. Diagnostika jednotlivých patologií v rámci SDN byla shodná s údaji uvedenými ve studii 9.

Mezi sledované komplikace léčby TCC byly zařazeny technické komplikace (zlomeniny fixací), nové otlakové ulcerace, fraktury kostí na léčené dolní končetině nebo na kontralaterální končetině způsobené nošením r-TCC a v neposlední řadě mykózy v oblasti nohy (tinea pedis) nebo v oblasti interdigitálních prostor. Mezi klinicky nejzávažnější komplikace léčby TCC patřila progresse lokální infekce charakterizovaná flegmónou, zhoršením lokálního nálezu, edémem dolní končetiny a dále rozvoj OM. Zmíněné abnormality vedly vždy k přerušení léčby r-TCC.

V naší studii byly sledovány počty jednotlivých komplikací léčby r-TCC a dále byl porovnán výskyt nové OM během terapie r-TCC (tzv. riziko) s počtem zhojených nemocných s OM během léčby r-TCC (tzv. benefit).

Uváděná data jsou prezentována formou průměrných hodnot \pm SD. Výskyt komplikací léčby r-TCC byl sledován po dobu alespoň 2, maximálně však 12 měsíců. Výskyt komplikací mezi jednotlivými skupinami byl posuzován Fisherovým testem. Frekvence výskytu OM, procento zhojených OM a procento nově vzniklých OM byly porovnány před započítáním a po skončení léčby r-TCC pomocí McNemarova testu, který statisticky zhodnotil risk vs. benefit terapie. Za statisticky signifikantní byly považovány hodnoty $p < 0,05$.

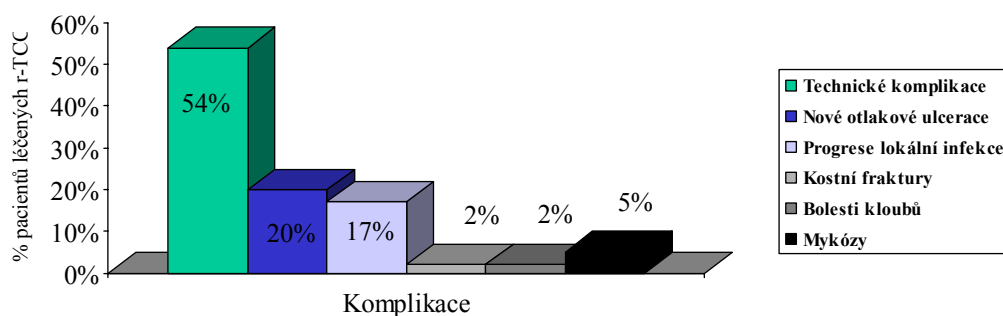
Výsledky studie 10:

Pacienti se SDN byli léčeni pomocí r-TCC v průměru $5,4 \pm 4,5$ měsíce. Celkově se komplikace léčby vyskytly u 41 pacientů (67% nemocných). Výskyt jednotlivých komplikací léčby r-TCC během sledovaného období je zobrazen v grafu 9. Nejčastěji se jednalo o zlomeninu fixace (u 54% všech nemocných), druhou nejčastější komplikací byl rozvoj otlakové ulcerace, a to u 20% nemocných. Mezi nejméně frekventované komplikace patřily bolesti kloubů (2%) a mykózy (5% pacientů). Klinicky nejzávažnější komplikací léčby TCC, byla progresse lokální infekce, jež byla nalezena u 17% nemocných.

Před započítáním léčby r-TCC mělo 21 pacientů se SDN diagnostikovanou OM. Nejčastěji se OM vyskytovala v oblasti metatarsálních kostí (13/21- 62% nemocných s OM), dále v oblasti tarsálních kostí (7/21- 33% pacientů) a phalang (1/21- 5% pacientů). Zbýlých 40 nemocných nevykazovalo známky OM před aplikací r-TCC.

r-TCC měly příznivý vliv na hojivost OM u pacientů se SDN. Z 21 nemocných s OM detekovanou před započítáním léčby došlo ke zhojení u 11/21 pacientů (52% nemocných). Ze 40 pacientů bez OM před léčbou r-TCC došlo pouze u 3 (7,5%) nemocných k rozvoji nové OM po aplikaci r-TCC.

Graf č. 9: Výskyt komplikací léčby SDN pomocí r-TCC.



Podle statistiky byla nalezena signifikantně vyšší frekvence pacientů se zhojenou OM v porovnání s počtem nemocných s nově rozvinutou OM ($p < 0.01$); benefit léčby r-TCC tedy výrazně převyšoval riziko rozvoje nové OM u pacientů léčených touto metodou.

Dále byly podrobněji zkoumány příčiny neuspokojivého hojení OM. Závažnost diabetické ulcerace hodnocená dle Wagnera a mikrobiální rezistence patogenů nalezených v diabetických ulceracích se signifikantně nelišily mezi skupinou pacientů se zhojenou a nezhojenou OM. Pacienti s nezhojenou OM byli charakterizováni lokalizací OM v oblasti tarsálních kostí. Nová OM se rozvinula během studie u nemocných s hlubokou ulcerací (Wagner 3) a s infekcí způsobenou multirezistentními patogeny (*Pseudomonas sp.* nebo MRSA).

Studie 11- Srovnání efektu léčby r-TCC a RCW na hojení SDN (příloha 36)

Cílem studie bylo porovnat dlouhodobé výsledky terapie odlehčením pomocí r-TCC a pomocí speciální ortézy RCW, zejména výskyt komplikací terapie se zaměřením na OM.

Charakteristika souborů pacientů

Do prospektivní 4-leté studie bylo zařazeno 99 pacientů s chronickými neuropatickými ulceracemi, akutní ChaO a neuropatickými frakturami, kteří byli léčeni r-TCC a srovnatelná skupina 23 nemocných léčená pro stejné indikace pomocí RCW. Základní charakteristiky obou skupin jsou uvedeny v tabulce 28.

Schéma studie 11 a statistické zpracování nalezených dat

Jednotlivé diagnózy byly stanoveny stejným způsobem jako ve studii 9. Aplikace kontaktních fixací, ošetření pacientů a jejich následné sledování bylo již popsáno v kapitole 3.

Tabulka č. 28: Základní charakteristiky souborů pacientů léčených různými odlehčovacími prostředky.

Sledované parametry	Pacienti léčení r-TCC (n=99)	Pacienti léčení RCW (n=23)	P
Průměrný věk (roky)	53,3 ± 10	57,4 ± 12	NS
Trvání diabetu (roky)	16 ± 10,2	19,6 ± 10	NS
HbA1c dle IFCC (%)	6,5 ± 1,8	7,3 ± 2	NS
CRP (mg/l)	15 ± 34	24 ± 64	NS
Trvání patologie (měsíce)	10,1 ± 13,6	6,1 ± 7	NS

Ve studii byli sledováni během 4 let procenta hojení SDN, délky hojení různých diagnóz (kritéria hojení byla definována ve studii 9) a počty komplikací léčby rozličnými odlehčovacími pomůckami (výčet komplikací a jejich diagnostika včetně OM byly uvedeny v předešlé studii). Dále byly porovnány počty nemocných s OM, která byla zhojena během aplikace r-TCC nebo RCW (tzv. benefit), s počty nemocných s nově rozvinutou OM během dané terapie r-TCC nebo RCW (tzv. risk). Poměr risk vs. benefit léčby r-TCC a RCW byl vypočten jako poměr počtu nemocných s nově rozvinutou OM/počtu zhojených pacientů s OM během léčby r-TCC nebo RCW, respektive.

Uváděná data jsou prezentována formou průměrných hodnot ± SD. Sledované parametry byly zhodnoceny pomocí t-testů, χ^2 -testu, Fisherova testu a Mc Nemarova testu. Za statisticky signifikantní byly považovány hodnoty $p < 0,05$.

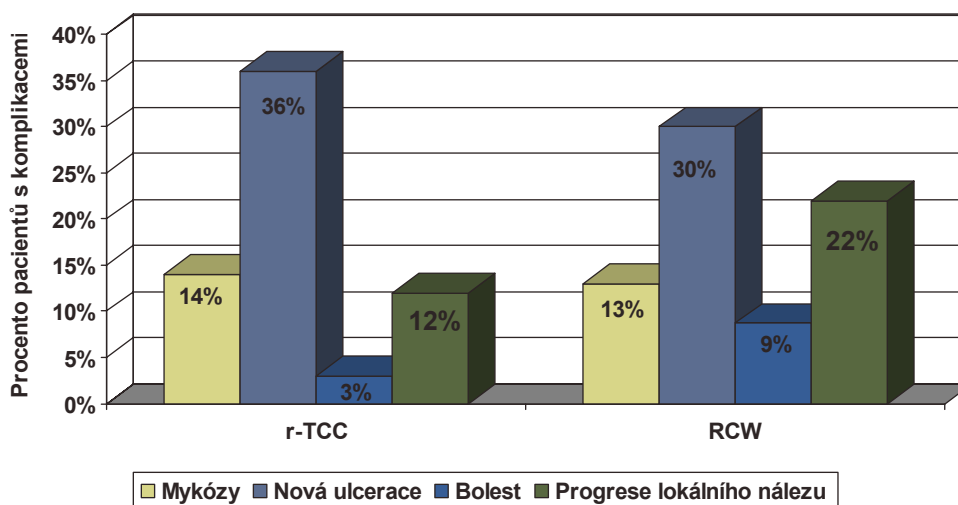
Výsledky studie 11

Větší počet pacientů léčených r-TCC se zhojil během sledovaného období oproti pacientům, kteří byli léčeni pro SDN pomocí RCW, ovšem výsledek nebyl signifikantní (52/99- 52,5% vs. 8/23- 34,8% nemocných; NS). Taktéž se vzájemně signifikantně nelišily průměrné délky terapií SDN a počet amputací u pacientů léčených r-TCC a RCW (8,3 ± 5,4 vs. 6,2 ± 4,2 měsíce; 10/99-10,1% amputovaných vs. 4/23-17,4%; vše NS).

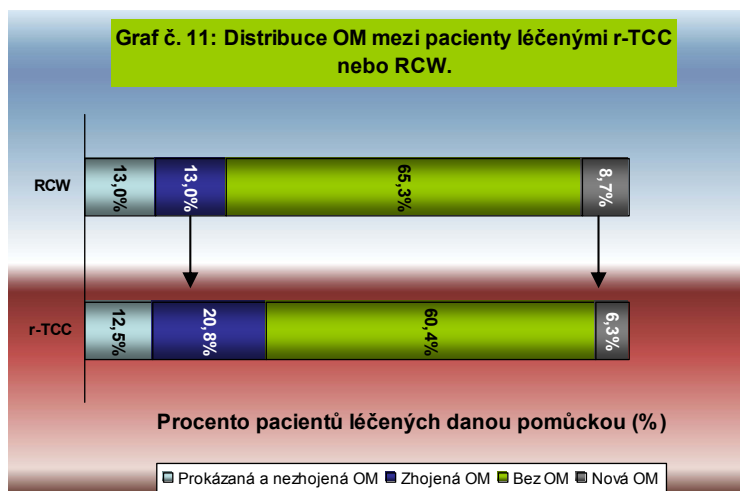
Obě skupiny pacientů se signifikantně nelišily v incidenci všech sledovaných komplikací terapie r-TCC nebo RCW (graf 10). Nejzávažnější komplikace terapie odlehčovacími pomůckami, progrese lokálního nálezu, se vyskytovala ve vyšším procentu ve skupině pacientů léčených RCW oproti r-TCC, nicméně výsledky nebyly signifikantní (22% vs. 12%; NS).

K signifikantně vyšší úspěšnosti hojení již prokázané OM a nižšímu rozvoji nové OM docházelo během naší studie ve skupině pacientů léčených r-TCC: 20 nemocných (62,5%) z 32 pacientů s prokázanou OM a nová OM u 6 nemocných (9,4%) z 64 pacientů bez OM

Graf č. 10: Výskyt komplikací terapie u pacientů léčených r-TCC (n=99) a speciální ortézou RCW (n=23).



(3 pacienti neměli údaje o OM; $p < 0,01$) oproti nemocným s RCW: zhojení 3 pacienti (50%) z 6 nemocných s prokázanou OM a nová OM u 2 pacientů (11,8%) ze 17 pacientů bez OM (NS). Risk vs. benefit ratio byl tedy signifikantně nižší ve skupině nemocných léčených pomocí r-TCC (0,3) oproti pacientů léčeným RCW (0,67; $p < 0,01$; graf 11).



Diskuze ke studii 10 a 11

Jednou z nejvhodnějších metod odlehčení dolních končetin je již zmíněná aplikace TCC. Většina studií zabírajících se léčbou TCC je zaměřena na zjištění úspěšnosti a délky hojení SDN (105, 107, 116, 118, 197-199).

Komplikace léčby r-TCC byly doposud zkoumány pouze okrajově. Nejčastěji byla v publikovaných studiích sledována rekurence diabetických ulcerací po ukončení terapie TCC

(116, 197, 200), která se obvykle pohybovala okolo 20%, ovšem byl popsán i 67% výskyt (200). Příčinnou rekurencí byly nedostatky v oblasti péče o dolní končetiny, biomechanické vady, kostní fragmenty, OM nebo ChaO (197). V naší studii nebyly rekurence diabetických ulcerací či reaktivace ChaO po ukončení terapie r-TCC sledovány.

Doposud se vyskytly pouze dvě studie zkoumající podrobněji komplikace a bezpečnost TCC, které byly aplikovány u rizikových pacientů s periferní neuropatií (194, 201). Wukich a spol. prokázali komplikace, např. kožní iritaci nebo přílišnou těsnost fixace, pouze u 17% nemocných (201) a Dzieciucowicz a spol. popsali ve své studii nové otlakové ulcerace na stejné končetině u 40% nemocných s nově nasazenou TCC (194).

Naše studie sledovala komplexněji výskyt všech komplikací terapie r-TCC. Prokázali jsme progresi lokálního nálezu, která vedla k ukončení terapie r-TCC, v 17 % případů. Technické komplikace, jakými byly zlomeniny fixací, byly v naší studii nejčastějším problémem. Tento vysoký výskyt byl pravděpodobně zapříčiněn poměrně dlouhou dobou aplikace jedné TCC u jednoho pacienta - zatímco Wukich a spol. měnili fixace po 4 dnech a následně jednou týdně (201), v naší studii byly TCC měněny pouze při výrazném poškození fixace nebo při výrazné redukci edému dolní končetiny. Nové ulcerace se objevily v naší studii u 20% nemocných léčených r-TCC. Jejich příčinou, podle našich zkušeností, mohla být špatná compliance pacienta spočívající např. v nevhodném používání podpažních berlí, nošení ponožek či obvazů uvnitř r-TCC a vlastních opravách r-TCC. Nově vzniklé ulcerace, zvláště jsou-li včas zachyceny, nebývají příčinou závažných komplikací, protože bývají obvykle povrchové a jsou nejčastěji lokalizované v nezatěžovaných místech, mezi něž řadíme pretibiální oblast nebo oblast nártu.

Podle guidelines určených k léčbě SDN je OM absolutní kontraindikací aplikace TCC (105, 202). Na druhé straně existují dobré klinické zkušenosti s aplikací klasické sádry u pacientů s OM, protože dochází ke znehybnění končetiny a snížení rizika šíření infekce. Doposud nebyla provedena studie zkoumající vliv léčby TCC na OM. **Dle našich výsledků nemusí být OM řazena mezi absolutní kontraindikace aplikace r-TCC, jelikož benefit léčby r-TCC signifikantně převyšuje riziko nového vzniku OM během této terapie.** V naší studii se OM objevila nově pouze u 7,5% nemocných. Podobné výsledky našel i Ha Van ve své studii (7,1%; 203). Jelikož se ale nová OM v naší studii rozvinula u pacientů s hlubokou ulcerací Wagner 3 infikovanou multirezistentními patogeny, nelze u těchto pacientů doporučit terapii ulcerací pomocí TCC. Podobně je sporná aplikace TCC u pacientů s OM v oblasti tarsálních kostí, jelikož u nich aplikace TCC nemusí nález výrazně zlepšit.

Kromě aplikace r-TCC je možné ve stejných indikacích použít RCW. RCW dovede obdobně jako TCC redukovat plantární tlaky působící na plošku dolní končetiny, nicméně délka hojení pomocí RCW je delší oproti TCC (204). Nevýhodou aplikace této pomůcky je horší compliance (pacienti nosí RCW maximálně 60% denní doby; 205). Doposud byla provedena pouze jedna studie srovnávající vliv terapie TCC a RCW na hojení diabetických ulcerací. Armstrong a spol. našli jednoznačně vyšší procento zhojených pacientů léčených TCC (89,5%) oproti nemocným léčeným ortézou typu Aircast (65%; 105). Podobný účinek jako TCC má dle studie Katza a spol. i tzv. iTCC (instant Total Contact Cast) vytvořená imobilizací RCW sádrovým obvazem (206, 207). Tento typ odlehčení spojuje výhody ortézy RCW ve srovnání s TCC, tj. rychlejší a méně náročnou přípravu a aplikaci a výhody TCC proti ortéze RCW – lepší compliance pacienta, který iTCC obvykle nemůže sám snímat. My jsme v naší studii nezaznamenali rozdíl v hojení všech abnormalit v rámci SDN mezi pacienty léčenými r-TCC a RCW. K lepším výsledkům zmíněných studií oproti naší mohlo přispět několik faktorů- týdenní pravidelné kontroly a výměny pomůcek, zařazení nekomplikovaných pacientů s malými povrchovými ulceracemi, poměrně častá aplikace ATB i u ne příliš komplikovaných a zjevně neinfikovaných nemocných a vyřazení pacientů s prokázanou infekcí včetně OM. Limitem naší studie může být malý počet nemocných ve skupině léčené RCW.

V naší studii jsme se snažili kromě rozdílů v době a úspěšnosti hojení zaměřit i na zjištění rozdílů v počtu komplikací a na vliv odlehčovacích pomůcek na hojení a rozvoj nové OM u pacientů léčených r-TCC a RCW. Incidence komplikací nebyla signifikantně odlišná mezi oběma skupinami léčenými r-TCC a RCW. Prokázali jsme ale signifikantně vyšší procento zhojených OM a nižší procento nově rozvinutých OM ve skupině nemocných léčených r-TCC v porovnání s pacienty léčenými RCW.

I přes některé nevýhody aplikace r-TCC, zmíněné již v úvodu dizertační práce, je terapie pomocí r-TCC z hlediska dosažených výsledků lepší alternativou v léčbě SDN v porovnání s ostatními odlehčovacími pomůckami. Na základě zkušeností z našich studií lze závěrem shrnout, že je nezbytně nutné pravidelně kontrolovat lokální a RTG nálezy u pacientů se SDN léčenými r-TCC nebo i RCW a terapii oběma pomůckami racionálně indikovat.

5. Závěry a zhodnocení cílů jednotlivých studií

Závěrem můžeme shrnout výsledky jednotlivých studií v rámci tří sledovaných okruhů následovně:

Abnormality imunitních funkcí ve vztahu k diabetu a jeho komplikacím (SDN):

1. Akutně navozená hyperglykémie a/nebo hyperinzulinémie během clampových studií významně neovlivnily funkce nespecifického imunitního systému ani u zdravých dobrovolníků, ani u pacientů s diabetes mellitus 1. typu.

Tento model korespondoval lépe s reálnými podmínkami u pacientů s diabetes mellitus nežli dosud publikované in vitro testy.

2. Pacienti s chronickou infekcí při SDN měli z hlediska imunitních funkcí:

- Mírně snížené procento fagocytujících PMN buněk po stimulaci E.coli ve srovnání se zdravými kontrolami.
- Signifikantně vyšší hladiny IgA a IgG ve srovnání se zdravými kontrolami.
- Vyšší počet CD8+T-lymfocytů a signifikantně nižší imunoregulační index ve srovnání se zdravými kontrolami.
- Pouze mírnou elevaci typických zánětlivých markerů (CRP a leukocytů), v 69% a 83% případů v rámci normy.

Na podkladě těchto nálezů je možné předpokládat, že aktivace imunitního systému a zánětlivá reakce u těchto pacientů není dostatečná, přestože nebyly zjištěny významnější imunodeficity.

3. Pacienti s chronickou infekcí při SDN měli následující změny mikronutrientů spojených s imunitními funkcemi:

- Signifikantně nižší hladinu vitamínu C v porovnání se zdravými kontrolami a pacienty s diabetem 2. typu bez pozdních komplikací.
- Signifikantně vyšší hladiny Cu a nižší hladiny Mg v porovnání se zdravými kontrolami. Tytéž nálezy byly přítomny i u pacientů s diabetes mellitus 2. typu bez pozdních komplikací.

Tyto změny mohou mít vztah k imunitním funkcím především ve smyslu ovlivnění redox potenciálu, diferenciaci imunitních buněk a produkce ROI.

Infekční komplikace SDN:

1. Byl nalezen vyšší výskyt mikrobiální ATB rezistence, především u transplantovaných pacientů ve srovnání s dialyzovanými a ostatními pacienty se SDN. Na základě těchto nálezů je možné modifikovat empirickou ATB terapii u rizikových skupin nemocných se SDN.
2. U pacientů se SDN byly posouzeny rizikové faktory pro amputace dolních končetin – dle regresní analýzy k nim patřily nejen OM a ICHDK, ale také mikrobiální rezistence k perorálním ATB. Proto doporučujeme tento fakt vzít v úvahu a ATB terapii provádět zejména u rizikových skupin nemocných dostatečně účinně.
3. Nebyla prokázána shoda mikroskopických a kultivačních mykotických nálezů z hyperkeratóz a z diabetických ulcerací. Kultivační nálezy ze vzorků z hyperkeratóz a z ulcerací byly u téhož pacienta odlišné.

Proto doporučujeme provádět ke stanovení mykotických agens u SDN kultivační vyšetření spíše než mikroskopické a vyšetřovat jak vzorky z ulcerace, tak vzorky z jejího okolí.

Terapie SDN odlehčením:

1. Potvrdili jsme dobrý efekt terapie speciální kontaktní fixací (r-TCC), především u pacientů s neuropatickými frakturami, ale i u pacientů s ChaO a diabetickými ulceracemi. Během studie jsme zjistili poměrně vysoký počet především technických komplikací, proto jsme původní metodu modifikovali.
2. Na rozdíl od „tradičních indikací“ jsme ověřili, že lze tuto metodu úspěšně použít i u pacientů s OM, jelikož benefit této terapie je vyšší nežli riziko rozvoje nové OM u pacientů se SDN, ovšem za předpokladu jejich pečlivé kontroly (! OM v tarzálních kostech a ulcerace W3 infikované multirezistentními patogeny).
3. U pacientů s OM se jeví pro léčbu odlehčením vhodnější použití r-TCC než-li speciální ortézy RCW.

6. Souhrn

SDN vzniká na základě komplexu patofyziologických pochodů, které nalézáme u pacientů s pozdními komplikacemi diabetu, významně zvyšuje morbiditu i mortalitu nemocných a výrazně zhoršuje kvalitu života těchto pacientů.

Téma dizertační práce, patofyziologické aspekty SDN se zaměřením na imunologické abnormality, infekční komplikace a možnosti terapeutického ovlivnění biomechanických poruch, bylo dále rozděleno do 3 celků:

- abnormality imunitních funkcí ve vztahu k diabetu a jeho komplikacím, zejména SDN
- infekční komplikace SDN
- terapie SDN odlehčením.

Problematika poruch imunitních funkcí ve vztahu k diabetu a SDN byla řešena v 5 studiích, infekční komplikace SDN ve 3 studiích a terapie SDN odlehčením rovněž ve 3 studiích.

Abnormality imunitních funkcí ve vztahu k diabetu a jeho komplikacím, zejména SDN

První studie se zabývala efektem akutní hyperglykémie a/nebo hyperinzulinémie na funkce PMN buněk u zdravých osob. Cílem studie bylo posoudit účinek krátkodobých akutních metabolických změn na fagocytózu a oxidativní vzplanutí PMN buněk in vivo u zdravých dobrovolníků. Akutní hyperglykémie a/nebo hyperinzulinémie byly navozeny třemi clampovými studiemi- HHC, HEC a HGC s endogenní blokadou sekrece inzulínu somatostatinem. PMN fagocytóza a respirační vzplanutí byly stanoveny průtokovou cytometrií za bazálních podmínek a po stimulaci E.coli. Výsledky nalezené během clampových studií byly porovnány s daty získanými během kontrolního clampu. Imunitní funkce PMN buněk nebyly během clampových studií u zdravých dobrovolníků podstatně ovlivněny krátkodobou hyperglykémií a/nebo hyperinzulinémií ve srovnání s kontrolním clampem.

Druhá studie byla zaměřena na zjištění možných abnormalit PMN funkcí způsobených krátkodobými metabolickými změnami navozenými in vivo u pacientů s diabetes mellitus 1.typu. Akutní hyperglykémie a hyperinzulinémie byly indukovány čtyřhodinovým HHC. Stanovení PMN funkcí bylo provedeno obdobně jako ve studii 1. Krátkodobá hyperglykémie s hyperinzulinémií indukovaná in vivo u pacientů s diabetes mellitus 1.typu neovlivnila významně imunitní funkce PMN buněk.

Následující dvě studie zkoumaly potencionální vliv dekompenzace diabetu a chronického zánětu přítomného u pacientů se SDN na funkce nespecifického i specifického imunitního systému.

Mezi pacienty se SDN a zdravými dobrovolníky nebyly nalezeny signifikantní rozdíly v parametrech oxidativního vzplanutí PMN buněk detekovaných za bazálních a stimulovaných podmínek, pouze procento fagocytujících PMN buněk detekované po stimulaci E.coli bylo u nemocných se SDN signifikantně nižší v porovnání se zdravými kontrolami.

U pacientů se SDN byly nalezeny signifikantně vyšší hodnoty markerů zánětu (CRP, počet leukocytů a neutrofilů) ve srovnání se zdravými kontrolami, avšak toto zvýšení bylo ve většině případů v rámci normy nebo jen lehce nad normou. Z imunologických abnormalit byly nalezeny u pacientů se SDN vyšší procento cytotoxických (CD8+) T-lymfocytů a nižší imunoregulační index, který pozitivně koreloval s HbA1c. U diabetiků se SDN byly prokázány také signifikantně vyšší hladiny IgA, IgG a CIK, zatímco hodnoty IgM, C3 a C4 složek komplementu se signifikantně nelišily od hodnot zdravých dobrovolníků.

V páté studii jsme posuzovali změny mikronutrientů a jejich možný vliv na nespecifický imunitní systém u pacientů se SDN. Významně redukované hladiny vitamínu C byly nalezeny u pacientů se SDN oproti pacientům s diabetem 2.typu bez komplikací a zdravým kontrolám. Signifikantně vyšší hladiny Cu a nižší hladiny Mg byly prokázány u obou skupin diabetiků ve srovnání se zdravými kontrolami. Sérové hladiny ostatních mikronutrientů (vitamín E, jeho izomery, Zn a Fe) se signifikantně nelišily mezi sledovanými skupinami. Ze sledovaných mikronutrientů signifikantně korelovaly s parametry oxidativního vzplanutí PMN buněk u všech subjektů pouze Cu a Mg.

Infekční komplikace SDN

V šesté studii jsme se zabývali infekčními komplikacemi u různých skupin pacientů se SDN. Cílem bylo zjistit možné rozdíly ve výskytu mikrobiálních agens v diabetických ulceracích a rozdíly jejich ATB rezistence mezi transplantovanými, dialyzovanými a ostatními pacienty se SDN. Výskyt jednotlivým mikrobiálních agens se významně nelišil mezi sledovanými skupinami, avšak sledované skupiny pacientů se signifikantně lišily ve výskytu bakteriální ATB rezistence. Transplantovaní pacienti měli signifikantně více kmenů stafylokoků rezistentních k oxacilinu, imipenemu, kotrimoxazolu a erytromycinu a enterokoků rezistentních k ampicilinu, piperacilinu v porovnání s ostatními skupinami.

Pseudomonádové bakterie byly u dialyzovaných nemocných se SDN rezistentnější k piperacilinu a cefpiromu oproti zbylým dvěma skupinám.

Cílem sedmé studie bylo zjistit, zda-li rezistence k perorálním ATB může být riziková pro výskyt amputací dolních končetin. Do studie byli konsekutivně zařazeni všichni pacienti léčení během 1 roku v podiatrické ambulanci IKEM pro diabetické ulcerace a měli alespoň jeden pozitivní stěr z rány. V postupné regresní analýze byla spolu s OM a ICHDK signifikantním rizikovým faktorem rezistence k perorálním ATB, její asociace s amputacemi byla signifikantní zejména u nemocných bez OM.

Mykotická agens mohou přispět ke vzniku diabetických ulcerací a mohou zpomalit proces jejich hojení. Cílem osmé studie bylo zpřesnit diagnostiku mykóz u pacientů se SDN. Byly porovnány výskyty mykotických agens z oblasti hyperkeratóz a spodin ulcerací, shoda mikroskopických a kultivačních vyšetření mykóz a shoda kultivačních mykotických nálezů z hyperkeratóz a spodin ulcerací. Kultivační a mikroskopické nálezy si u pacientů vzájemně neodpovídaly, konkordance kultivačních nálezů mykóz z ulcerací a z hyperkeratóz u téhož pacienta byla pouze 56%.

Terapie SDN odlehčením

Jedním z faktorů, který přispívá k hojení SDN je vhodně zvolená metoda odlehčení dolních končetin. Cílem deváté studie bylo zhodnotit účinnost léčby SDN pomocí r-TCC u pacientů s neuropatickými ulceracemi, akutní ChaO a neuropatickými frakturami. Signifikantně kratší dobu se hojili pacienti s neuropatickými frakturami oproti zbylým dvěma skupinám, rovněž počet zhojených pacientů byl v této skupině nejvyšší. Terapie pomocí r-TCC byla ale úspěšná i u nemocných s neuropatickými ulceracemi (došlo ke zmenšení ulcerací) a s akutní CHaO (došlo k redukci aktivity onemocnění).

Cílem desáté studie bylo stanovit četnost komplikací léčby r-TCC a sledovat vliv TCC na hojení OM a na riziko rozvoje nové OM u pacientů se SDN. Nejčastějšími komplikacemi terapie r-TCC byly technické komplikace a rozvoj nových ulcerací. Progrese lokálního nálezu byla nalezena u 17% nemocných léčených r-TCC. Ostatní komplikace včetně mykotických infekcí a bolestí kloubů se vyskytovaly jen zřídka. Počet pacientů se zhojenou OM byl signifikantně vyšší v porovnání s počtem nemocných s nově rozvinutou

OM. Pacienti s nezhojenou OM byli charakterizováni zejména lokalizací OM v tarzálních kostech a pacienti s nově vzniklou OM hlubšími ulceracemi s rezistentními patogeny.

Cílem jedenácté studie bylo porovnat terapii odlehčením pomocí r-TCC a speciální ortézy RCW. Signifikantně vyšší počet zhojených pacientů s OM a nižší počet nemocných s nově rozvinutou OM byl nalezen u pacientů léčených r-TCC oproti nemocným léčeným RCW. Risk/benefit ratio byl signifikantně nižší u nemocných léčených r-TCC oproti nemocným léčeným RCW.

Výsledky dizertační práce přispěly jak k objasnění některých patogenetických souvislostí SDN, především v oblasti imunologických poruch a infekčních komplikací, tak ke zlepšení terapie především v oblasti speciálních forem odlehčovacích metod. Prioritou bylo zejména posouzení akutního vlivu hyperglykémie a hyperinzulinémie in vivo na imunologické parametry, zjištění souvislostí ATB rezistence s komplikacemi SDN a možnou modifikací empirické terapie, zejména u rizikových skupin nemocných a zavedení metody odlehčení pomocí r-TCC v České republice.

7. PODĚKOVÁNÍ:

Jednotlivé studie byly provedeny za velkého přispění Mgr. J. Skibové, MUDr. J. Kalanina, Doc. MUDr. I. Stříže, MUDr. J. Lupínkové, CSc., J. Purrové, B. Vodičkové, D. Lapešové, D. Šišákové, MUDr. V. Petkova, MUDr. P. Boučka., Ing. L. Kazdové., Mgr. M. Malinské.

Zvláštní poděkování patří:

Prof. MUDr. T. Pelikánové, DrSc. za zacvičení v metodice clampových studií.

Kolektivu podiatrických sester, jmenovitě M. Křížové, V. Šindelářové, P. Fexové a L. Řezaninové, za vstřícnost a přátelskou pomoc při provádění jednotlivých studií a uvádění nových postupů do klinické praxe.

MUDr. R. Bémovi za přátelskou a kolegiální spolupráci na probíhajících studiích, dále za psychickou podporu a optimismus nutný v běžné podiatrické praxi.

Největší poděkování patří mé školitelce Doc. MUDr. Alexandře Jirkovské, CSc., které vděčím za uvedení do problematiky onemocnění diabetes mellitus, zejména do problematiky péče o pacienty se SDN a za odborný dohled nad vědeckou činností, zpracováním získaných dat a přípravou odborných publikací. Dokázala mne nadchnout pro danou problematiku, která vyžaduje velký entusiasmus a psychickou sílu, zvláště setkávali se člověk pravidelně se smutnými osudy pacientů léčených v podiatrické ambulanci.

V neposlední řadě chci poděkovat i mému manželovi a rodičům, kteří mě po celou dobu studia podporovali v mnohdy nesnadných chvílích, které se při spojení rodiny, lékařské praxe a vědeckého výzkumu mohou vyskytnout v životě každého z nás.

8. Seznam použitých zkratek:

- ATB - Antibiotika, antibiotický
- CC - Kontrolní clamp
- CIK - Cirkulující imunokomplexy
- CRP - C-reaktivní protein
- Cu - Měď
- DHA - Dehydroaskorbová kyselina
- Fe – Železo
- fMLP – formyl-methionyl-leucyl-fenylalanin
- FW - sedimentace erytrocytů
- HbA1c - glykovaný hemoglobin
- HEC - Hyperinzulinový euglykemický clamp
- HGC - Izolovaný hyperglykemický clamp
- HHC - Hyperglykemický hyperinzulinový clamp
- ChaO - Charcotova osteoarthropatie
- Ig - Imunoglobulin
- ICHDK - Ischemická choroba dolních končetin
- IRI - Imunoreaktivní inzulin
- MFI - Mean fluorescent intensity- průměrná fluorescenční intenzita
- Mg - Magnesium
- MIC - Minimální inhibiční koncentrace
- MP - Mean percentage- průměrné procento
- MRSA - Methicillin rezistentní S.Aureus
- n - počet
- NADP - Nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
- NADPH - Hydrogen nikotinamid adenin dinukleotidfosfát
- NS – nesignifikantní
- obr- obrázek
- OM - Osteomyelitida
- P – Signifikance
- PMA – phorbol 12-myristát 13-acetát
- PMN - Polymorfonukleární
- RCW - Removable Cast Walker
- ROI - Reaktivní kyslíkové intermediáty
- r-TCC - removable Total Contact Cast- snímatelná kontaktní fixace
- RTG - Rentgenologický
- SD - Standard deviation
- SDN - Syndrom diabetické nohy
- SE - Standard Error
- tab- tabulka
- TcPO2 - Tenze transkutánního kyslíku
- Zn - Zinek

9. Seznam použité literatury

1. International Working Group on the The diabetic foot: The diabetic foot Infections. In *International Consensus on the Diabetic*, 1999
2. Jirkovská A. Diabetická noha. In Bartoš V, Pelikánová T (ed). *Praktická diabetologie*, 2nd edit., Maxdorf, Praha, 2000; 305-325
3. Rajbhandari SM, Jenkins RC, Davies C, Tesfaye S. Charcot neuroarthropathy in diabetes mellitus. *Diabetologia* 45(8): 1085-1096, 2002
4. Sommer TC, Lee TH. Charcot foot: The Diagnostic Dilemma. *Am Fam Physician* 4(9): 1591-1598, 2001
5. Bower AC, Allman RM. Pathogenesis of the neuropathic joint: neurotraumatic vs. neurovascular. *Radiology* 139: 349-354, 1981
6. Eichenholtz SN. Charcot joints. Springfield, Ill., Thomas, 1966
7. Sanders LJ, Fryberg RG. Diabetic neuropathic osteoarthropathy: The Charcot foot. In: Frykberg RG (ed). *The high risk foot in diabetes mellitus*. Churchill Livingstone, New York, 1991; 297-338
8. Čechurová D, Lacigová S, Rušavý Z, Horáková N, Jankovec Z, Žourek M. Ekonomické aspekty syndromu diabetické nohy. *Vnitřní lékařství* 49(6): 439-441, 2003
9. Calle-Pascual AL, Duran A, Benedi A, Calvo MI, Charro A, Diaz JA, Calle JR, Gil E, Ibarra J, Maranes JP, Cabezas-Cerrato J. Reduction in Foot Ulcer Incidence; Relation to compliance with a prophylactic foot care program. *Diabetes Care* 2: 405-407, 2001
10. Pittet D, Wyssa B, Herter-Clavel C, Kursteiner K, Vaucher J, Lew PD. Outcome of The diabetic foot Infections Treated Conservatively. A retrospective Cohort Study with Long –term Follow-up. *Arch Intern Med* 159: 851-856, 1999
11. Urbancic-Rovan V, Gubina M. Bacteria in superficial diabetic foot ulcers (Letter). *Diabetic Med* 17: 814-815, 2000
12. Roitt IM, Brostoff J, Male DK. *Immunology*, 4th edit., Gower Medical Publishing Ltd., London, 1996
13. Sawyer DW, Donowitz GR, Mandell GL. Polymorphonuclear Neutrophils: An effective antimicrobial force. *Rev Infect Dis* 11: S1532-S1544, 1989
14. Miller ME. Phagocytic Cell Functions in Diabetes Mellitus. In Gupta S. *Immunology of clinical and experimental diabetes*, Plenum Publishing Corporation, New York, 1984; 369-383
15. Johnson RB, Newman SL. Chronic granulomatous disease. *Pediatr Clin North Am* 24: 365-376, 1977
16. Reeves WG, Wilson RM. Infection, Immunity and Diabetes. In Alberti KGMM, DeFronzo RA, Keen H, Zimmet P. *International Textbook of Diabetes Mellitus*, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, 1992; 1165-1171
17. Clark RA, Szot S. Chemotactic factor inactivation by stimulated human neutrophils mediated by myeloperoxidase- catalyzed methionine oxidation. *J Immunol* 128(4): 1507-1513, 1982
18. Fialkow L, Chan CK, Grinstein S, Downey GP. Regulation of tyrosine phosphorylation in neutrophils by the NADPH oxidase. Role of reactive oxygen intermediates. *J Biol Chem* 268: 17131-7, 1993
19. Murray HW, Spitalny GL, Nathan CF. Activation of mouse peritoneal macrophages in vitro and in vivo by interferon-gamma. *J Immunol* 134(3): 1619-1622, 1985
20. Walrand S, Guillet C, Boirie Y, Vasson MP. In vivo evidence that insulin regulates human polymorphonuclear neutrophil functions. *Journal of Leukocyte Biology* 76: 1-7, 2004

21. Esmann V, Solling H, Juhl H. Allosteric and covalent control of glycogen synthase from leukocytes. *Int J Biochem* 13: 1123-1126, 1981
22. Sentochnik DE, Eliopoulos GM. Infection and diabetes. In *Joslin 's Diabetes*, 13th edit., Lea&Febiger, Philadelphia, 1994; 867-888
23. Pozzilli P, Leslie RDG. Infections and Diabetes: Mechanisms and Prospects for Prevention. *Diabetic Medicine* 11: 935-941; 1994
24. Bessman AN, Sapico FL. Infections in Diabetic Patients: The Role of Immune Dysfunction and Pathogen Virulence Factors. *J Diab Compl* 6: 258-262, 1992
25. Marhoffer W, Stein M, Maeser E, Federlin K. Impairment of Polymorphonuclear Leukocyte Function and Metabolic Control of Diabetes. *Diabetes Care* 15: 256-260, 1992
26. Sato N, Shimizu H, Suwa K, Shimomura Y, Kobayashi I, Mori M. MPO Activity and Generation of Active O₂ Species in Leukocytes from Poorly Controlled Diabetic Patients. *Diabetes Care* 15: 1050-1052, 1992
27. Boland OM, Blackwell CC, Clarke BF, Ewing DJ. Effects of ponalrestat, an aldose reductase inhibitor, on neutrophil killing of *Escherichia coli* and autonomic function in patients with diabetes mellitus. *Diabetes* 42(2): 336-340, 1993
28. Llorente L, De La Fuente H, Richaud –Patin Y, Alvarado-De La Barrera C, Diaz-Borjon A, Lopez-Ponce A, Lerman-Garber I, Jakez-Ocampo J. Innate immune response mechanisms in non-insulin dependent diabetes mellitus patients assessed by flow cytoenzymology. *Immunol Lett* 74(3): 239-244, 2000
29. Cendoroglo M, Sundaram S, Jaber BL, Pereira BJ. Effect of glucose concentration, osmolality, and sterilization process of peritoneal dialysis fluids on cytokine production by peripheral blood mononuclear cells and polymorphonuclear cell functions in vitro. *Am J Kidney Dis* 31: 273-282, 1998
30. Lin X, Candlish JK, Thai AC. Superoxide production by neutrophils from diabetics and normal subjects in response to glucose and galactose. *Exp Mol Pathol* 58(3): 229-236, 1993
31. Tebbs SE, Lumbwe CM, Tesfaye S, Gonzalez AM, Wilson RM. The influence of aldose reductase on the oxidative burst in diabetic neutrophils. *Diabetes Res Clin Pract* 15: 121-130, 1992
32. Thomson GA, Fisher BM, Gemmel CG, MacCuish AC, Gallacher SJ. Attenuated neutrophils respiratory burst following acute hypoglycemia in diabetic patients and normal subjects. *Acta Diabetol* 34: 253-256, 1997
33. Johnston CLW. Infection and Diabetes mellitus. In *Pickup&Williams Textbook of Diabetes*, Blackwell Science, Londýn 1997; Vol.2: 70.1-70.3
34. Andersen B, Goldsmith GH, Spagnuolo PJ. Neutrophil adhesive dysfunction in diabetes mellitus; the role of cellular and plasma factors. *J Lab Clin Med* 111(3): 275-285, 1988
35. Uchimura K, Nagasaka A, Hayashi R, Makino M, Nagata M, Kakizava H, Kobayashhi T, Fujiwara K, Kato T, Iwase K, Shinohara R, Kato K, Itoh M. Changes in Superoxide Dismutase Activities and Concentrations and Myeloperoxidase Activities in Leukocytes from Patients with Diabetes Mellitus. *J Diabet Compl* 13: 264-270, 1999
36. Babior BM. The respiratory burst of phagocytes. *J Clin Invest* 73: 599-601, 1984
37. Tan JS, Anderson JL, Watanakunakorn C, Phair JP. Neutrophil dysfunction in diabetes mellitus. *J Lab Clin Med* 85: 26-33, 1975
38. Chang FY, Shaio MF. Decreased cell-mediated immunity in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 28(2): 137-146, 1995
39. Bagdade JD, Root RK, Bulger RJ. Impaired leukocyte function in patients with poorly controlled diabetes. *Diabetes* 23(1): 9-15, 1974

40. Delamaire M, Magendre D, Moreno M, Le Goff M-C, Allanic H, Genetet B. Impaired leukocytes functions in diabetic patients. *Diabetic Medicine* 14: 29-34, 1997
41. Marhoffer W, Stein M, Schleinkofer L, Federlin K. Evidence of ex vivo and in vitro impaired neutrophil oxidative burst and phagocytic capacity in type 1 diabetes mellitus. *Diab Res Clin Pract* 19: 183-188, 1993
42. Tater D, Tepaut B, Bercovici JP, Youinou P. Polymorphonuclear cell derangements in type 1 diabetes. *Horm Metab Res* 19: 642-647, 1987
43. Wilson RM. Neutrophil function in diabetes. *Diabetes Med* 3: 509-512, 1986
44. Tebbs SE, Gonzales AM, Wilson RM. The role of aldose reductase inhibition in diabetic neutrophil phagocytosis and killing. *Clin Exp Immunol* 84: 482-487, 1991
45. Naghibi M, Smith RP, Baltch AL, Gates SA, Wu DH, Hammer MC, Michelsen PB. The effect of diabetes mellitus on chemotactic and bactericidal activity of human polymorphonuclear leukocytes. *Diabetes Res Clin Pract* 4: 27-35, 1987
46. Wierusz-Wysocka B, Wysocki H, Siekierka H, Wykretowicz A, Szczepanik A, Klimas R. Evidence of polymorphonuclear neutrophils (PMN) activation in patients with insulin dependent diabetes mellitus. *J Leukoc Biol* 42: 519-523, 1987
47. Aleksandrovskii YA. Antithrombin III, C1 inhibitor, methylglyoxal, and polymorphonuclear leukocytes in the development of vascular complications in diabetes mellitus. *Thrombosis Res* 67: 179-189, 1992
48. World Health Organization Expert Committee. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Reports of WHO consultation: Part 1. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Geneva (Switzerland), WHO; 1999
49. Grzybowski J, Janiak MK, Oidak E, Lasocki K, Wrembel-Wargocka J, Cheda A, Antos-Bielska M, Pojda Z. New cytokine dressings: II. Stimulation of oxidative burst in leukocytes in vitro and reduction of viable bacteria within an infected wound. *Int J Pharm* 184: 179-184, 1999
50. Shalekoff S, Tiemessen CT, Gray CM, Martin DJ. Depressed phagocytosis and oxidative burst in polymorphonuclear leukocytes from individuals with pulmonary tuberculosis with or without human immunodeficiency virus type 1 infection. *Clin Diagn Lab Immunol* 5: 41-44, 1998
51. Koarada S, Wu Y, Olshansky G, Ridgway WM. Increased nonobese diabetic Th1:Th2 (IFN- γ :IL-4) ratio is CD4+ T cell intrinsic and independent of APC genetic background. *J Immunol* 169(11): 6580-6587, 2002
52. Jirkovská A. Aktuální problematika syndromu diabetické nohy. In Perušičová J. *Trendy soudobé diabetologie*, Svazek 5., 1. vydání, Galén, Praha, 2001; 51-87
53. Biesalski HK, Frank J. Antioxidants in nutrition and their importance in the anti-oxidative balance in the immune system (in german). *Immun Infekt* 23(5): 166-173, 1995
54. Fejfarová V, Jirkovská A, Kazdová L, Malinská H, Stříž I. Certain vitamins and elements with a relation to immune system in patients with diabetes mellitus (in czech). *DMEV* 6(1): 23-29, 2003
55. Burkitt MJ. A critical overview of the chemistry of copper-dependent low density lipoprotein oxidation: roles of lipid hydroperoxides, alpha-tocopherol, thiols, and ceruloplasmin. *Arch Biochem Biophys* 394(1): 117-135, 2001
56. Davis MA, Johnson T, Briske-Anderson M. Lymphoid cell functions during copper deficiency. *Nutr Res* 7: 211-222, 1987
57. Beisel WR. Single nutrients and immunity. *Am J Clin Nutr* 35: 417-468, 1982
58. Bussiere FI, Gueux E, Rock E, Girardeau JP, Tridon A, Mazur A, Rayssiguier Y. Increased phagocytosis and production of reactive oxygen species by neutrophils

- during magnesium deficiency in rats and inhibition by high magnesium concentration. *Br J Nutr* 87: 107-113, 2002
59. Packer L. The role of anti-oxidative treatment in diabetes mellitus. *Diabetologia* 36: 1212-1213, 1993
 60. Patterson RA, Horsley ET, Leake DS. Prooxidant and antioxidant properties of human serum ultrafiltrates toward LDL. Important role of uric acid. *J Lipid Res* 44: 512-521, 2003
 61. Kontush A, Meyer S, Finckh B, Kohlschutter A, Beisiegel U. α -Tocopherol as a reductant for Cu (II) in human lipoproteins- triggering role in the initiation of lipoprotein oxidation. *J Biol Chem* 271: 11106-11112, 1996
 62. Lynch SM, Frei B. Reduction of copper, but not iron, by human low density lipoprotein (LDL)- implications for metal ion-dependent oxidative modification of LDL. *J Biol Chem* 270: 5158-5163, 1995
 63. Park JH, Grandjean CJ, Hart MH, Erdman SH, Pour P, Vanderhoof JA. Effect of pure zinc deficiency on glucose tolerance and insulin and glucagons levels. *Am J Physiol* 251: E273-278, 1986
 64. Paolisso G, Sgambato S, Pizza G, Passariello N, Varricchio M, D'Onofrio F. Improved insulin response and action by chronic magnesium administration in aged NIDDM subjects. *Diabetes Care* 12: 265-269, 1989
 65. Baly DL, Curry DL, Keen CI, Hurley LS. Effect of manganese deficiency on insulin secretion and carbohydrate homeostasis in rats. *J Nutr* 114: 1438-1446, 1984
 66. Havivi E, Bar OnH, Reshef A, Stein P, Raz I. Vitamins and trace metals status in non insulin dependent diabetes mellitus. *Int J Vitam Nutr Res* 61: 328-333, 1991
 67. Noto R, Alicata R, Sfogliano L, Neri S, Bifarella M. A study of cupremia in a group of elderly diabetics. *Acta Diabetol Lat* 20: 81-85, 1983
 68. Wang P, Yang Z. Influence of insufficient zinc on immune functions in NIDDM patients (in Chinese). *Hunan Yi Ke Xue Xue Bao* 23(6): 599-601, 1998
 69. Rohn RD, Pleban P, Jenkins LL. Magnesium, zinc and copper in plasma and blood cellular components in children with IDDM. *Clin Chim Acta* 215(1): 21-28, 1993
 70. Armstrong DG, Lipsky BA. Diabetic foot infection: stepwise medical and surgical management. *Int Wound J* 1(2): 123-132, 2004
 71. Jude EB, Unsworth PF. Optimal treatment of infected diabetic foot ulcers. *Drugs Aging* 21(13): 833-850, 2004
 72. Cavanagh PR, Lipsky BA, Bradbury AW, Botek G. Treatment for diabetic foot ulcers. *Lancet* 366: 1725-1735, 2005
 73. Hunt JA. Foot infection in diabetes is rarely due to a single microorganism. *Diabetic Med* 9: 749-752, 1992
 74. Wheat LJ, Allen SD, Henry M, Kernek CB, Siders JA, Kuebler T, Fineberg N, Norton J. The diabetic foot infections, Bacteriologic Analysis. *Arch Intern Med* 146: 1935-1940, 1986
 75. Lavery LA, Walker SC, Harkless LB, Felder-Johnson K. Infected Puncture Wounds in Diabetic and Nondiabetic Adults. *Diabetes Care* 18(12): 1588-1591, 1995
 76. Kleinveld HA, Hak-Lemmers HLM, Stalenhoef AFH, Demacker PNM. Improved Measurement of Low-Density-Lipoprotein Susceptibility to Copper-Induced Oxidation: Application of a Short Procedure for Isolating Low-Density Lipoprotein. *Clin Chem* 38: 2066-2072, 1992
 77. Kalker AJ, Pirsch JD, Heisey D, Sollinger HW, Belzer FO, Knechtle SJ, Alessandro AM. Foot problems in the diabetic transplant recipient. *Clin Transplant* 10: 503-510, 1996

78. Sung RS, Althoen M, Howell TA, Merion RM. Peripheral vascular occlusive disease in renal transplant recipients: risk factors and impact on kidney allograft survival. *Transplantation* 70(7): 1049-1054, 2000
79. Morrissey PE, Shaffer D, Monaco AP, Conway P, Madras PN. Peripheral vascular disease after kidney –pancreas transplantation in diabetic patients with end-stage renal disease. *Arch Surg* 132(4): 358-61, 1997
80. Bartoš V, Jirkovská A, Kožnarová R. Risk factors for diabetic foot in recipients of renal and pancreatic transplants. *Časopis lékařů českých* 136: 527-529, 1997
81. Lipsky BA. Evidence-based antibiotic therapy of diabetic foot infections. *FEMS Immunol Med Microbiol* 26(3-4): 267-276, 1999
82. Pell JP, Donnan PT, Fowkes FG, Ruckley CV. Quality of life following lower limb amputation for peripheral arterial disease. *Eur J Vasc Surg* 7: 448-451, 1993
83. Selby JV, Zhang D. Risk factors for lower extremity amputation in persons with diabetes. *Diabetes Care* 18(4): 509-516, 1995
84. American Diabetes Association: Preventive foot care in people with diabetes. *Diabetes Care Suppl. 1*: S 54-S55, 1999
85. Bauer E. Sumpio. Foot Ulcers. *N Engl J Med* 343(11): 787-793, 2000
86. Fernando DJ, Hutchison A, Veves A, Gokal R, Boulton AJ. Risk factors for nonischaemic foot ulceration in diabetic nephropathy. *Diabet Med* 8: 223-225, 1991
87. Grayson ML, Gibbons GW, Balogh K, Levin E, Karchmer AW. Probing to bone infected pedal ulcers: a clinical sign of underlying osteomyelitis in diabetic patients. *JAMA* 273: 721-723, 1995
88. Armstrong DG, Lavery LA, Quebedeaux TL, Walker SC. Surgical morbidity and the risk of amputation due to infected puncture wounds in diabetic versus nondiabetic adults. *J Am Podiatr Med Assoc* 7: 321-326, 1997
89. Bild DE, Selby JV, Sinnock P, Browner WS, Braveman P, Showstack JA. Lower extremity amputation in people with diabetes: epidemiology and prevention. *Diabetes Care* 12: 24-31, 1989
90. Wagner FW jr. The diabetic foot. *Orthopedics* 1: 163-172, 1987
91. Criado E, De Stefano AA, Keagy BA, Upchurch GR, Johnson G. The course of severe foot infection in patients with diabetes. *Surgery, Gynecology & Obstetrics* 175(2): 135-140, 1992
92. Apelqvist J, Larsson J. What is the most effective way to reduce incidence of amputation in the diabetic foot? *Diabetes Metabolism Research Reviews* S 16(1): S75-83, 2000
93. Gupta AK, Konnikov N, McDonald P, Rich P, Roger NW, Edmonds MW, McManus R, Summerbell RC. Prevalence and epidemiology of toenail onychomycosis in diabetic subjects: a multicenter survey. *British Journal of Dermatology* 139: 665-671, 1998
94. Rich P. Special patient population: Onychomycosis in the diabetic patient. *J Am Acad Dermatol* 35: S10-S12, 1996
95. Lugo-Somolinos A, Sanchez JL. Prevalence of dermatophytosis in patients with diabetes. *Journal of the American Academy of Dermatology* 26: 408-410, 1992
96. Chincholikar DA, Pal RB. Study of fungal and bacterial infections of the diabetic foot. *Indian J Pathol Microbiol* 45(1): 15-22, 2002
97. Heald AH, O'Halloran DJ, Richards K, Webb F, Jenkins S, Hollis S, Denning DW, Young RJ. Fungal infection of the diabetic foot: two distinct syndromes. *Diab Med* 18: 567-572, 2001

98. Buxton PK, Milne LJ, Prescott RJ, Proudfoot MC, Stuart FM. The prevalence of dermatophyte infection in well-controlled diabetics and the response to Trichophyton antigen. *Br J Dermatol* 134(5): 900-903, 1996
99. Mayser P, Hensel J, Thoma W, Podobinska M, Geiger M, Ulbricht H, Haak T. Prevalence of fungal infections in patients with diabetes mellitus type 1- underestimation of moccasin-type tinea. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 112(5): 264-268, 2004
100. Robbins JM. Treatment of onychomycosis in the diabetic patient population. *J Diab Compl* 17: 98-104, 2003
101. Boyko W. Abstrakt na 4th Annual International Meeting of the International Society for Pharmacoeconomics and Outcomes Research, Arlington, USA.
102. Kod'ousek R. Dermatomykózy. In Kod'ousek R. *Mykózy*, Univerzita Palackého, Olomouc, 2003; 55-60
103. Denning DW, Evans EGV, Kibbler CC, Richardson MD, Roberts MM, Rogers TR, Warnock DW, Warren RE. Fortnightly review: Fungal nail disease: a guide to good practice (report of Working group of the British Society for Medical Mycology). *BMJ* 311: 1277-1281, 1995
104. Laing P. Diabetic foot ulcers. *The American Journal of Surgery* 167: 31S-36S, 1994
105. Armstrong DG, Nguyen HC, Lavery LA, van Schie CH, Boulton AJ, Harkless LB. Off-loading the diabetic foot wound. *Diabetes Care* 24: 1019-1022, 2001
106. Helm PA, Walker SC, Pullium G. Total contact casting in diabetic patients with neuropathic foot ulcerations. *Arch Phys Med Rehabil* 65: 691-693, 1984
107. Lavery LA, Baranoski S, Ayello EA. Options for Off-Loading the Diabetic Foot. *Advances in Skin&Wound Care* 17: 181-186, 2004
108. Gill G, Benbow S, Tesfaye S, Kaczmarczyk E, Kaye L. Painless stress fractures in diabetic neuropathic feet. *Postgrad Med J* 73: 241-242, 1997
109. DeFronzo RA, Tobin JD, Andres R. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol* 237(3): 214-223, 1979
110. Pelikánová T, Kazdová L, Chvojková Š, Baše J. Serum Phospholipid Fatty Acid Composition and Insulin Action in Type 2 Diabetic Patients. *Metabolism* 50: 1472-1478, 2001
111. Beatty OL, Harper R, Sheridan B, Atkinson AB, Bell PM. Insulin resistance in offspring of hypertensive parents. *BMJ* 307: 92-96, 1993
112. Isenberg HD. Section 1: General. In Lennette EH, Balows A, Hausler WJ jr., Shadomy HJ. *Manual of Clinical Microbiology*, 4th edit., American Society for Microbiology, Washington D.C., 1985; 1-99
113. Courvalin P. Interpretive reading of in vitro antibiotic susceptibility tests (the antibiogramme). *Clin Microbiol Infect* S1: 26-34, 1996
114. Reese RE, Betts RF. Antibiotic use. In Reese RE, Betts RF (ed). *A practical approach to infectious diseases*, 4th edit., Little, Brown and Company, Boston, London, 1996; 1059-1395
115. Urbášková P. Rezistence baktérií k antibiotikům. In Urbášková P. *Vybrané metody*, 1st edition, Trios s.r.o., Praha, 1999; 74-85
116. Myerson M, Papa J, Eaton K, Wilson K. The total-contact cast for management of neuropathic plantar ulceration of the foot. *J Bone Joint Surg Am* 74: 261-269, 1992
117. Lavery LA, Vela SA, Lavery DC, Quebedeaux TL. Reducing dynamic foot pressures in high-risk diabetic subjects with foot ulcerations. A comparison of treatments. *Diabetes Care* 19: 818-821, 1996
118. Caravaggi C, Faglia E, De Giglio R, Mantero M, Quarantiello A, Sommariva E, Gino M, Pritelli C, Morabito A. Effectiveness and safety of a nonremovable fiberglass off-

- bearing cast versus a therapeutic shoe in the treatment of neuropathic foot ulcers: a randomized study. *Diabetes Care* 23(12): 1746-51, 2000
119. Procházka B. *Biostatistika pro lékaře. Principy základních metod a jejich interpretace*. Karolinum, Praha, 1999; 1-186
 120. Rosse W, Bunn HF. Hemolytic anemias and acute blood loss. In Fauci AS, Braunwald E, Isselbacher KJ, Wilson JD, Martin JB, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL. *Harrison's Principles of Internal Medicine*, McGraw-Hill Companies, Inc., New York, USA, 1998; 659-672
 121. Wilson RM, Tomplinson DR, Reeves WG. Neutrophil Sorbitol Production Impairs Oxidative Killing in Diabetes. *Diabetic Med* 4: 37-40, 1987
 122. Liberek T, Topley N, Jorres A, Coles GA, Gahl GM, Williams JD. Peritoneal dialysis fluid inhibition of phagocyte function: effect of osmolarity and glucose concentration. *J Am Soc Nephrol* 3(8): 1508-1515, 1993
 123. Nielson CP, Hindson DA. Inhibition of Polymorphonuclear Leukocyte Respiratory Burst by Elevated Glucose Concentrations in Vitro. *Diabetes* 38: 1031-1035, 1989
 124. Safronova VG, Gabdoulkhakova AG, Miller AV, Kosarev IV, Vasilenko RN. Variations of the effect of insulin on neutrophil respiratory burst. The role of tyrosine kinases and phosphatases. *Biochemistry* 66: 840-849, 2001
 125. Cavalot F, Anfossi G, Russo I, Mularoni E, Massucco P, Bursacca S, Mattiello L, Trovati M. Insulin, at physiological concentrations, enhances the polymorphonuclear leukocyte chemotactic properties. *Horm Metab Res* 24: 225-228, 1992
 126. Spagnoli A, Spadoni GL, Sesti G, Del Principe D, Germani D, Boscherini B. Effect of insulin on hydrogen peroxide production by human polymorphonuclear leukocytes. Studies with monoclonal anti-insulin receptor antibodies, and an agonist and an inhibitor of protein kinase C. *Horm Res* 43(6): 286-293, 1995
 127. Hu H, Hjendahl P, Li N. Effects of insulin on platelet and leukocyte activity in whole blood. *Tromb Res* 107(5): 209-215, 2002
 128. Stites DP, Terr AI. *Basic and Clinical Immunology*. 8th edit., Appleton & Lange, Stamford, USA, 1994
 129. Furukawa S, Saito H, Matsuda T, Inoue T, Fukatsu K, Han I, Ikeda S, Hidemura A, Muto T. Relative effects of glucose and glutamine on reactive oxygen intermediate production by neutrophils. *Shock* 13: 274-278, 2000
 130. Munroe JF, Shipp JC. Glucose metabolism in leukocytes from patients with diabetes mellitus, with and without hypercholesterolemia. *Diabetes* 14: 584-590, 1965
 131. Esmann V. The polymorphonuclear leukocyte in diabetes mellitus. *J Clin Chem Clin Biochem* 21: 561-567, 1983
 132. Fardon NJ, Wilkinson R, Thomas TH. Abnormalities in primary granule exocytosis in neutrophils from type 1 diabetic patients with nephropathy. *Clin Sci* 102: 69-75, 2002
 133. Ohmori M, Harada K, Kitoh Y, Nagasaka S, Saito T, Fujimura A. The functions of circulatory polymorphonuclear leukocytes in diabetic patients with and without diabetic triopathy. *Life Sciences* 66(19): 1861-1870, 2000
 134. Alexiewicz JM, Kumar D, Smogorzewski M, Klin M, Massry SG. Polymorphonuclear leukocytes in non-insulin-dependent diabetes mellitus: Abnormalities in metabolism and function. *Ann Intern Med* 123: 919-924, 1995
 135. Dhindsa S, Tripathy D, Mohanty P, Ghani H, Syed T, Aljada A, Dandona P. Differential effects of glucose and alcohol on reactive oxygen species generation and intranuclear nuclear factor-kappa B in mononuclear cells. *Metabolism* 53: 330-334, 2004

136. Gallacher SJ, Thomson G, Fraser WD, Fisher BM, Gemmel CG, Mac Cuish AC. Neutrophil bactericidal function in diabetes mellitus: Evidence for association with blood glucose control. *Diabet Med* 12: 916-620, 1995
137. Ortmeyer J, Mohsenin V. Inhibition of phospholipase D and superoxide generation by glucose in diabetic neutrophils. *Life Sciences* 59: 255-262, 1996
138. Perner A, Nielsen SE, Rask-Madsen J. High glucose impairs superoxide production from isolated blood neutrophils. *Intensive Care Med* 29: 642-645, 2003
139. Sato N, Kashima K, Shimizu H, Shimomura Y, Mori M. Hypertonic glucose impairs glucose-induced increases in cytosol Ca²⁺ concentration and insulin secretion by HIT-T 15 cells. *Cell Calcium* 20: 273-278, 1996
140. Oldenborg PA, Sundqvist IM, Sehlin J. Different effects of glucose on extracellular and intracellular respiratory burst response in normal human neutrophils activated with the soluble agonist fMet-Leu-Phe. *Diabetes Med* 17: 532-537, 2000
141. Ihm SH, Yoo HJ, Park SW, Park ChJ. Effect of Tolrestat, an Aldose Reductase Inhibitor, on Neutrophil Respiratory Burst Activity in Diabetic Patients. *Metabolism* 46: 634-638, 1997
142. Wilson RM, Reeves WG. Neutrophil phagocytosis and killing in insulin-independent diabetes. *Clin Exp Immunol* 63: 478-484, 1986
143. Dziatkowiack H, Kowalska M, Denys A. Phagocytic and bactericidal activity of granulocytes in diabetic children. *Diabetes* 31: 1041-1043, 1982
144. Kantar A, Wilkins G, Swoboda B, Littarru GP, Bertoli E, Catassi C, Coppa G, Giorgi PL. Alterations of the respiratory burst of polymorphonuclear leukocytes from diabetic children. A chemiluminiscence study. *Acta Paediatr Scand* 79: 535-541, 1990
145. Balasoju D, van Kessel KC, van Kats-Renaud HJ, Collet TJ, Hoepelman AI. Granulocyte function in women with diabetes and asymptomatic bacteriuria. *Diabetes Care* 20: 392-395, 1997
146. Nolan CM, Beaty HN, Bagdade JD. Further characterization of the impaired bactericidal function of granulocytes in patients with poorly controlled diabetes. *Diabetes* 27: 889-894, 1978
147. Serlenga E, Garofalo AR, De Pergola G, Ventura MT, Tortorella C, Antonaci S. Polymorphonuclear cell-mediated phagocytosis and superoxide anion release in insulin-dependent diabetes mellitus. *Cytobiosis* 74: 189-195, 1993
148. Peck KR, Son DW, Song JH, Kim S, Oh MD, Choe KW. Enhanced neutrophil functions by recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in diabetic patients with foot infection in vitro. *Journal of Korean Medical Science* 1: 39-44, 2001
149. Mason J, Keefet CO, Hutchinson A, McIntosh A, Young R, Booth A. A systematic review of foot ulcer in patients with type 2 diabetes mellitus. II: treatment. *Diab Med* 16: 889-909, 1999
150. Eneroth M, Larsson J, Apelquist J. Deep foot infections in patients with diabetes and foot ulcer: an entity with different characteristics, treatment characteristics, treatments and prognosis. *J Diab Comp* 13: 254-263, 1999
151. Jirkovská A, Fejfarová V, Hosová J, Stříž I, Kalanin J, Skibová J. Analýza zánětlivé odpovědi a vybraných ukazatelů imunity u pacientů s infikovanými diabetickými ulceracemi. *Časopis lékařů českých* 141 (15): 483-486, 2002
152. Hořejší V, Bartůňková J. *Základy imunologie*, Trion, Praha, 1998
153. Rodriguez- Segade S, Camiña MF, Paz JM, DelRio R. Abnormal serum immunoglobulin concentrations in patients with diabetes mellitus. *Clinica Chimica Acta* 203: 135-142, 1991

154. Eguchi K, Yagame M, Suzuki D, Jinde K, Naka R, Yano N, Nomoto Y, Sakai H, Miyazaki M. Significance of high levels of serum IgA and IgA-class circulating immune complexes (IgA-CiC) in patients with non- insulin-dependent diabetes mellitus. *J Diab Comp* 9: 42-48, 1995
155. Bouter KP, Meyling FH, Hoekstra JB, Masurel N, Erkelens DW, Diepersloot RJ. Influence of blood glucose levels on peripheral lymphocytes in patients with diabetes mellitus. *Diabetes Res* 19(2): 77-80, 1992
156. Cooper JD, Thadwal R, Cooper MJ. Determination of vitamin E in human plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 690(1-2): 355-358, 1997
157. Nakagawa K, Kanno H, Miura Y. Detection and analyses of ascorbyl radical in cerebrospinal fluid and serum of acute lymphoblastic leukemia. *Analytical Biochemistry* 254: 31-35, 1997
158. Ali SM, Chakraborty SK. Role of plasma ascorbate in diabetic microangiopathy. *Bangladesh Med Res Counc Bull* 15: 47-59, 1989
159. Stankova L, Riddle M, Larned J, Burry K, Menashe D, Hart J, Bigley R. Plasma ascorbate concentrations and blood cell dehydroascorbate transport in patients with diabetes mellitus. *Metabolism: Clinical & Experimental* 33: 347-353, 1984
160. Yue DK, McLennan S, McGill M, Fisher E, Heffernan S, Capogreco C, Turtle JR. Abnormalities of ascorbic acid metabolism and diabetic control: differences between diabetic patients and diabetic rats. *Diabetes Res Clin Pract* 9: 239-244, 1990
161. Sinclair AJ, Taylor PB, Lunec J, Girling AJ, Barnett Ah. Low plasma ascorbate levels in patients with type 2 diabetes mellitus consuming adequate dietary vitamin C. *Diab Med* 11: 893-898, 1994
162. Raz I, Havivi E. Trace elements in blood cells of diabetic subjects. *Diabetes Research* 10: 21-24, 1989
163. Williams NR, Rajput-Williams J, West JA, Nigdikar SV, Foote JW, Howard AN. Plasma, granulocyte and mononuclear cell copper and zinc in patients with diabetes mellitus. *Analyst* 120: 887-890, 1995
164. Karahan SC, Deger O, Orem A, Ucar F, Erem C, Alver A, Onder E. The effects of impaired trace elements status on polymorphonuclear leukocyte activation in the development of vascular complication in type 2 diabetes mellitus. *Clin Chem Lab Med* 39: 109-115, 2001
165. Fox C, Ramsomair D, Carter C. Magnesium: Its proven and potential clinical significance. *South Med J* 94: 1195-1201, 2001
166. Djurhuus MS, Klitgaard NA, Pedersen KK, Blaabjerg O, Altura BM, Altura BT, Henriksen JE. Magnesium reduces insulin-stimulated glucose uptake and serum lipid concentrations in type 1 diabetes. *Metabolism* 50: 1409-1417, 2001
167. Schnack C, Bauer I, Pregant P, Hopmeier P, Schernthaner G. Hypomagnesemia in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus is not corrected by improvement of long-term metabolic control. *Diabetologia* 35: 77-79, 1992
168. Rodriguez -Moran M, Guerrero-Romero F. Low serum magnesium levels and foot ulcers in subjects with type 2 diabetes. *Arch Med Res* 32: 300-303, 2001
169. Rosolova H, Mayer O, Reaven G. Effect of variations in plasma magnesium concentration on resistance to insulin-mediated glucose disposal in nondiabetic subjects. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 82: 3783-3785, 1997
170. Wilhelm Z. Klinický význam hořčíku. *DMEV* 2: 97-103, 2003
171. Girodon F, Galan P, Monget AL, Boutron-Rualt MC, Brunet-Lecomte P, Preziosi P, Arnaud J, Manuguerra JC, Herchberg S. Impact of Trace Elements and Vitamin

- Supplementation on Immunity and Infections in Institutionalized Elderly Patients. *Arch Intern Med* 159: 748-754, 1999
172. Caputo GM, Cavanagh PR, Ulbrecht JS, Gibbons GW, Karchmer AW. Assessment and management of foot disease in patients with diabetes. *N Engl J Med* 331: 854-860, 1994
173. Joshi N, Caputo GM, Weitekamp MR, Karchmer AW. Infections in Patients with Diabetes Mellitus. *N Engl J Med* 16: 1906-1912, 1999
174. Jones EW, Edwards R, Finch R. A microbiologic study of the diabetic foot lesions. *Diabetic Med* 2: 213-215, 1984
175. Lipsky BA, Berendt AR. Principles and practice of antibiotic therapy of diabetic foot infections. *Diabetes Metab Res Rev* 16 Suppl 1: S42-6, 2000
176. Chantelau E, Tanudjaja T, Altenhofer F, Ersanli Z, Lacigova S, Metzger C. Antibiotic treatment for uncomplicated forefoot ulcers in diabetes: a controlled trial. *Diabetic Med* 13: 156-159, 1996
177. Lipsky BA, Berendt AR, Embil J, De Lalla F. Diagnosis and treating diabetic foot infections. *Diabetes Metab Res Rev* 20 (suppl 1): S56-S64, 2004
178. Jirkovská A, Wosková V, Bartoš V, Skibova J. Význam neinvazivní diagnostiky angiopatie a neuropatie při screeningovém vyšetření syndromu diabetické nohy. *Vnitřní Lékařství* 5: 269-273, 1998
179. Oyibo SO, Jude EB, Tarawneh I, Nguyen HC, Harkless LB, Boulton AJ. A Comparison of two diabetic foot ulcer classification systems: the Wagner and the University of Texas wound classification systems. *Diabetes Care* 24(1): 84-88, 2001
180. Van der Meer JWM, Koopmans PP, Lutterman JA. Antibiotic Therapy in Diabetic Foot Infection. *Diabet Med* 13: S48-51, 1996
181. Hartemann-Heurtier A, Marty L, Ha Van G, Grimaldi A. Role of antibiotic therapy in diabetic foot management [in French]. *Diabetes Metab* 26(3): 219-224, 2000
182. Sanders LJ. Diabetes Mellitus: prevention of amputations. *J Am Podiatr Med Assoc* 84: 322-328, 1994
183. Larsson J, Apelqvist J, Agardh CD, Stenstrom A. Decreasing incidence of major amputation in diabetic patients: a consequence of a multidisciplinary foot care team approach? *Diabet Med* 12: 770-776, 1995
184. Litzelman DK, Slemenda CW, Langefeld CD, Hays LM, Welch MA, Bild DE, Ford ES, Vinicor F. Reduction of lower extremity clinical abnormalities in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus: a randomized, controlled trial. *Ann Intern Med* 119: 36-41, 1993
185. Bross J, Talbot GH, Maislin G, Hurwitz S, Strom BL. Risk factors for nosocomial candidemia: a case-control study in adults without leukemia. *Am J Med* 87: 614-620, 1989
186. Ungpakorn R, Lohaprathan S, Reangchainam S. Prevalence of foot disease in outpatients attending the Institute of Dermatology, Bangkok, Thailand. *Clin Exp Dermatology* 29: 87-90, 2004
187. Dorriego B, Cameli AM, Trapani M, Raspanti D, Torri M, Mosconi G. Efficacy of femoral intra-arterial administration of teicoplanin Gram positive diabetic foot infections. *Angiology* 46: 1115-1122, 1995
188. Kajetan M, Konkoly (TM), Jermendy G. Experience with microbiological studies for the diabetic foot. *Orv Hetil* 136: 1261-1264, 1995
189. Mlinaric Missoni E, Vukelict M, de Soyt D, Belicza M, Vazic Babic V, Missoni E. Fungal infection in diabetic foot ulcers. *Diabet Med* 22: 1124-1125, 2005
190. Jirkovská A, Kasalický P, Bouček P, Hosová J, Skibová J. Calcaneal ultrasonometry in patients with Charcot osteoarthropathy and its relationship with densitometry in the

- lumbal spine and femoral neck and with markers of bone turnover. *Diab Med* 18: 495-500, 2001
191. Jirkovská A, Hosová J, Wosková V. Diagnostika akutní a subakutní Charcotovy osteoarthropatie u diabetiků. *Praktický Lékař* 12: 661-664, 1998
 192. Sinacore DR. Acute Charcot arthropathy in patients with diabetes mellitus: healing times by foot location. *J Diabetes Complications* 12(5): 287-293, 1998
 193. Armstrong DG, Todd WF, Lavery LA, Harkless LB, Bushman TR. The natural history of acute Charcot's arthropathy in a diabetic foot specialty clinic. *Diabetic Med* 14: 357-363, 1997
 194. Dzieciuchowicz L, Checinski P, Waliszewski K, Zapalski S. The value of total contact casting in treatment of neuropathic foot ulcers in diabetic patients. *Pol Merkuriusz Lek* 3(15): 132-134, 1997
 195. Lavery LA, Armstrong DG, Walker SC. Healing rates of diabetic foot ulcers associated with midfoot fractures due to Charcot's arthropathy. *Diabet Med* 14(1): 46-49, 1997
 196. Bém R. Neuropatické fraktury u pacientů s diabetem. *HPB Bulletin* 11: 8-10, 2003
 197. Helm PA, Walker SC, Pullium GF. Recurrence of neuropathic ulceration following healing in a total contact cast. *Arch Phys Med Rehabil* 72(12): 967-970, 1991
 198. Armstrong DG, Stacpoole-Shea S. Total contact casts and removable cast walkers. mitigation of plantar heel pressure. *J Am Podiatr Med Assoc* 89(1): 50-53, 1999
 199. Mueller MJ, Diamond JE, Sinacore DR, Delitto A, Blair VP, Drury DA, Rose SJ. Total contact casting in treatment of diabetic plantar ulcers. Controlled clinical trial. *Diabetes Care* 12(6): 384-388, 1989
 200. Matricali GA, Deroo K, Dereymaeker G. Outcome and recurrence rate of diabetic foot ulcers treated by a total contact cast: short-term follow-up. *Foot Ankle Int* 24: 680-684, 2003
 201. Wukich DK, Motko J. Safety of total contact casting in high-risk patients with neuropathic foot ulcers. *Foot Ankle Int* 25: 556-560, 2004
 202. Fejfarová V, Jirkovská A, Křížová M, Fexová P. Léčba syndromu diabetické nohy kontaktní fixací. *HPB Bulletin* 1: 39-40, 2003
 203. Ha Van G, Siney H, Hartmann-Heutier A, Jacqueminet S, Greau F, Grimaldi A. Nonremovable, windowed, fiberglass část boot in the treatment of diabetic planta ulcers: efficacy, safety and compliance. *Diabetes Care* 26(10): 2848-52, 2003
 204. Armstrong DG, Short B, Espensen EH, Abu-Rumman OL, Bizon BP, Boulton AJ. Technique for fabrication of an „instant total-contact část“ for treatment of neuropathic diabetic foot ulcers. *J Am Podiatr Med Assoc* 92(7): 405-408, 2002
 205. Armstrong DG, Lavery LA, Kimbriel HR, Nixon BP, Boulton AJM. Activity Patterns of Patients with Diabetic Foot ulceration. *Diabetes Care* 26(9): 2595-2597, 2003
 206. Armstrong DG, Lavery LA, Wu S, Boulton AJM. Evaluation of Removable and Irremovable Cast Walker in the Healing of Diabetic Foot Wounds. *Diabetes Care* 28(3): 551-554, 2005
 207. Katz IA, Harlan A, Miranda-Palma B, Prieto-Sanchez L, Armstrong DG, Bowker JH, Mizel MS, Boulton AJM. A Randomized Trial of Two Irremovable Off-loading Devices in the Management of Plantar Neuropathic Diabetic Foot Ulcers. *Diabetes Care* 28(3): 555-559, 2005

Přehled vlastních publikací 1999-12/2006:

Články publikované v zahraničních časopisech:

- ❖ V. Fejfarová, A. Jirkovská, V. Petkov, P. Bouček, J. Skibová: **Comparison of microbial findings and resistance to antibiotics between transplant patients, patients on hemodialysis, and other patients with the diabetic foot. J Diabetes Complications 2004, 18(2):108-112.....IF 1,9**
- ❖ V. Fejfarová, A. Jirkovská, J. Lupínková, J. Kovář, J. Kalanin, I. Stríž, J. Skibová, P. Bouček, T. Pelikánová: **Effect of acute hyperglycemia and/or hyperinsulinemia on polymorphonuclear functions in healthy subject. Metabolism 2006, 55: 811-818.....IF 2,3 (r.2005)**

Spoluautor:

- ❖ J. Kovář, V. Fejfarová, T. Pelikánová, R. Poledne: **Hyperglycemia downregulates total lipoprotein lipase activity in humans. Physiol Res 2004, 53(1): 61-68**
- ❖ A. Jirkovská, P. Bouček, S. Wu, J. Hosová, R. Bém, V. Fejfarová, J. Skibová: **Power Spectral Analysis of Heart Rate Variability in Patients with Charcot's Neuroarthropathy. JAPMA 2006, 96(1): 1-8**
- ❖ R. Bém, A. Jirkovská, V. Fejfarová, J. Skibová, E. Jude: **Intranasal calcitonin in the treatment of acute Charcot neuroosteoarthropathy: a randomized controlled trial. Diabetes Care 2006, 29: 1392-1394**

Participace na článku:

- ❖ L. Prompers, M. Huijberts, J. Apelqvist, E. Jude, A. Piaggese, K. Bakker, M. Edmonds, P. Holstein, A. Jirkovská, D. Mauricio, G. Ragnarson Tennvall, H. Reike, M. Spraul, L. Uccioli, V. Urbancic, K. Van Acker, J. van Baal, F. van Merode, N. Schaper: **High prevalence of ischemia, infection and serious comorbidity in patients with diabetic foot disease in Europe. Baseline results from the Eurodiale study. Diabetologia 2007, 50(1):18-25**

Spoluautor kapitoly:

- ❖ A. Jirkovská, V. Fejfarová: **Léčba speciálními kontaktními fixacemi. In A. Jirkovská: Syndrom diabetické nohy, 1.vydání, Maxdorf, Praha, 2006: 121-133**

Články publikované v tuzemských časopisech:

- ❖ V. Fejfarová, A. Jirkovská, V. Havlová: **Léčba inzulinovou pumpou- její výhody a rizika z pohledu pacientů. Dia život 2000, 2: 30-31**
- ❖ V. Fejfarová, A. Jirkovská, J. Skibová, V. Petkov: **Vliv rezistentních patogenů a ostatních rizikových faktorů na četnost amputací dolních končetin u pacientů se syndromem diabetické nohy. Vnitřní Lékařství 2002, 4: 302-306**

- ❖ V. Fejfarová, A. Jirkovská, M. Křížová, P. Fexová: Léčba syndromu diabetické nohy kontaktní fixací. HPB Bulletin 2003, 1: 39-40
- ❖ V. Fejfarová, A. Jirkovská, L. Kazdová, H. Malinská, I. Stříž: Vybrané vitamíny a prvky se vztahem k imunitnímu systému u pacientů s diabetes mellitus. DMEV 2003, 1: 23-29
- ❖ V. Fejfarová, A. Jirkovská, R. Bém, M. Křížová, V. Šindelářová, P. Fexová, J. Skibová: Komplikace léčby syndromu diabetické nohy pomocí snímatelných kontaktních fixací se zaměřením na osteomyelitidu. Praktický lékař 2005, 85(6): 348-352
- ❖ V. Fejfarová: Selfmonitoring u pacientů s diabetes mellitus 1. a 2. typu. Sestra 2005, 7-8: 33-34
- ❖ V. Fejfarová, A. Jirkovská, M. Křížová, J. Skibová: Účinnost léčby snímatelnými kontaktními fixacemi u pacientů s neuropatickými ulceracemi, akutní Charcotovou osteoarthropatií a neuropatickými frakturami. Vnitřní Lékařství 2005, 51: 988-994
- ❖ V. Fejfarová: III. celostátní kongres s mezinárodní účastí na téma "Mezioborová spolupráce při léčbě ran a kožních defektů" 26.-27. 11. 2004, Pardubice. J Diabetes Complications (CZ) 2005, 3(1): 58-59
- ❖ V. Fejfarová, M. Křížová, A. Jirkovská, R. Bém, J. Pavlů: Moderní prostředky k fixaci a odlehčení diabetické nohy. Diagnóza 2005, 1(1): 13-15
- ❖ V. Fejfarová: Zpráva z 5. mezinárodního symposia DFSG. J Diabetes Complications (CZ) 2005, 3(4): 260-262
- ❖ V. Fejfarová, A. Jirkovská, M. Křížová, J. Pavlů: Použití fixačních materiálů k tvorbě fixačních dlah, rigidních a snímatelných fixací. HPB Bulletin 2005: 13 (3-4): 107-110
- ❖ V. Fejfarová, A. Jirkovská: Bakteriální a mykotické infekce u pacientů se syndromem diabetické nohy. In I. Bureš. Léčba rány, Florance Galén, Praha, 2006; 45-49
- ❖ V. Fejfarová: Syndrom diabetické nohy. Dia život 2006, 17(5): 7-9
- ❖ V. Fejfarová: Cukr v kostce. Diastyl 2006, 6: 18-19
- ❖ V. Fejfarová, M. Skořepová, A. Jirkovská, R. Bém, M. Křížová, I. Mášová, J. Skibová: Diagnostika a léčba mykotických infekcí. HPB Bulletin 2006, 14(4): 147-150

Spoluautor:

- ❖ A. Jirkovská, V. Havlová, T. Hrachovinová, V. Fejfarová, J. Hosová, J. Mašková, J. Skibová: Léčebný účinek ambulantního edukačního kurzu na metabolický syndrom u diabetiků 2. typu. Praktický lékař 2000, 2: 95-98

- ❖ B. Sixta, P. Herdegen, R. Bém, V. Fejfarová: Léčení osteomyelitidy u syndromu diabetické nohy. HPB Bulletin 2001, 4: 150-152
- ❖ A. Jirkovská, V. Fejfarová, J. Hosová, J. Kalanin, I. Stříž, J. Skibová: Nespecifické mechanismy imunity u pacientů se syndromem diabetické nohy s chronickou bakteriální infekcí. Vnitřní Lékařství 2002, 2: 142-146
- ❖ A. Jirkovská, V. Fejfarová, J. Hosová, I. Stříž, J. Kalanin, J. Skibová: Analýza zánětlivé odpovědi a vybraných ukazatelů imunity u pacientů s infikovanými diabetickými ulceracemi. Časopis lékařů českých 2002, 15: 483-486
- ❖ A. Jirkovská, V. Fejfarová: Problematika podiatrických ambulancí v České republice. HPB Bulletin 2004, 12(Supl. 1): 62-66
- ❖ J. Šedivý, V. Petkov, A. Jirkovská, A. Štambergová, Z. Ulbrichová, J. Lupínková, V. Fejfarová, R. Bém: Optimalizace léčby amoxicilín/klavulanátem na základě PK/PD parametrů u nemocných s infekcí při syndromu diabetické nohy. Klinická mikrobiologie a infekční lékařství 2004, 10(4): 167-175
- ❖ R. Bém, A. Jirkovská, V. Fejfarová: Neuropatické defekty- diagnostika a léčba. Diagnóza 2005, 1(1): 7-9
- ❖ R. Bém, V. Fejfarová, A. Jirkovská: Terapie syndromu diabetické nohy pomocí řízeného podtlaku. Praktický lékař 2006, 86: 268-270
- ❖ A. Jirkovská, V. Fejfarová: Zpráva z 16. konference European Wound Management Association. J Diabetes Complications (CZ) 2006, 4(3): 187-188
- ❖ R. Bém, V. Fejfarová, A. Jirkovská: Neuropatické fraktury v oblasti kolenního kloubu u pacientů s diabetem. DMEV 2006, 9(2): 63-67
- ❖ R. Bém, A. Jirkovská, V. Fejfarová: Aktuality v diagnostice a léčbě Charcotovy osteoartrózie. HPB Bulletin 2006, 14(4): 156-159

Přednášky s publikovanými abstrakty v zahraničí:

- ❖ V. Fejfarová, A. Jirkovská, V. Petkov, J. Skibová: Comparison of microbiologic findings, antibiotic therapy and resistance among transplant patients, patients on hemodialysis and other patients with the diabetic foot. Přednáška na 1st Joint Meeting Neurodiab Diabetic Foot Study Group of the EASD, Fiuggi, Itálie 9/2000. Abstrakt v Abstract Book DFSG 2000
- ❖ V. Fejfarová, A. Jirkovská, H. Malinská, L. Kazdová, J. Kalanin, I. Stříž: The comparison of vitamin and trace element concentrations between patients with the diabetic foot and healthy subjects. Is there any relation of these „micronutrients“ to the immune functions of polymorphonuclear cells and LDL oxidability? Přednáška na 2nd Joint Meeting of the Neurodiab and 3rd Meeting of Diabetic Foot Study Group, Balatonfüred, Maďarsko 8/2002. Abstrakt v Abstract Book DFSG 2002: 113

- ❖ V. Fejfarová, A. Jirkovská, M. Křížová, J. Skibová: Comparison of effects of the treatment by the total contact cast on various types of indications in foot clinic. Přednáška na 4th International Symposium on The diabetic foot, Noordwijkerhout, Nizozemí, 5/2003. Abstrakt v Abstractbook of 4th International Symposium on The diabetic foot, Noordwijkerhout, Nizozemí, 5/2003, str. 64
- ❖ V. Fejfarová, A. Jirkovská, R. Bém, K. Čechová, L. Řezaninová, J. Skibová: Podiatry in the Czech Republic. Přednáška na 16. kongresu EWMA, Praha, 5/2006. Abstrakt uveřejněn v Abstract Book EWMA 2006: 67
- ❖ V. Fejfarová, A. Jirkovská, M. Křížová, R. Bém: Total Contact Cast in the treatment of the diabetic foot- its risk and benefit with focus on osteomyelitis. Přednáška na 16. kongresu EWMA, Praha, 5/2006. Abstrakt uveřejněn v Abstract Book EWMA 2006: 58

Spoluautor:

- ❖ T. Hrachovinová, V. Fejfarová, L. Czémy, I. Solcová: Relationship between resilience to stress, depression, anxiety and diabetes control. Přednáška na 38th Annual Meeting of the EASD, Budapešť, Maďarsko 9/2002. Abstrakt publikován v Diabetologia 2002 Suppl. 2: 51
- ❖ A. Jirkovská, V. Fejfarová, J. Hosová, J. Kalanin, I. Stříž, J. Skibová, P. Bouček: Is the respiratory bursts of polymorphonuclear leukocytes related to low-density lipoprotein oxidation? Přednáška na 38th Annual Meeting of the EASD, Budapešť, Maďarsko 9/2002. Abstrakt publikován v Diabetologia 2002, Suppl. 2: 116
- ❖ A. Jirkovská, V. Fejfarová, I. Stříž, J. Skibová, T. Pelikánová: Comparison of Immune Functions of Polymorphonuclear Leukocytes between Patients with Diabetic Foot and Diabetic Patients without Late Complication and Healthy Persons. Přednáška na 63. kongresu American Diabetes Association, New Orleans, USA. Abstrakt uveřejněn v Diabetes 2003 Vol. 52(6), Suppl. 1: A64
- ❖ R. Bém, A. Jirkovská, V. Fejfarová, J. Skibová: Intranasal calcitonin in the treatment of Acute Charcot neuroosteoarthropathy including patients with renal insufficiency: a randomized controlled trial. Přednáška na 41st Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes, Athény, Řecko 9/2005. Abstrakt v Diabetologia 2005, Suppl.1: A82
- ❖ A. Jirkovská, V. Fejfarová, R. Bém, J. Skibová: Calcium regulating hormone and vitamins in patients with Charcot osteoarthropathy. Přednáška na 5th Scientific Meeting of the DFSG, Chalkidiki, Řecko 9/2005. Abstrakt v Abstract Book DFSG 2005: 31
- ❖ R. Bém, A. Jirkovská, V. Fejfarová, J. Skibová, B. Sixta: Determinants and estimation of wound healing achievement after minor amputation in patients with diabetic foot. Přednáška na 16. kongresu EWMA, Praha 5/2006. Abstrakt uveřejněn v Abstract Book EWMA 2006: 58

- ❖ A. Jirkovská, V. Fejfarová, R. Bém, J. Skibová: Diabetic foot care teams in the Czech republic. Přednáška na 16. kongresu EWMA, Praha 5/2006. Abstrakt uveřejněn v Abstract Book EWMA 2006: 67
- ❖ A. Jirkovská, V. Fejfarová, R. Bém, J. Skibová: Vitamin D deficiency and its dependence on renal insufficiency in patients with Charcot neuroosteoarthropathy. Přednáška na 6th Meeting of the DFSG, Elsinore, Dánsko, 9/2006. Abstrakt v Abstract Book DFSG 2006: 26
- ❖ R. Bém, A. Jirkovská, V. Fejfarová, J. Skibová: Effect of intranasal calcitonin on healing times in patients with acute Charcot foot: A randomized controlled trial. Přednáška na 6th Meeting of the DFSG, Elsinore, Dánsko, 9/2006. Abstrakt v Abstract Book DFSG 2006: 27
- ❖ R. Bém, A. Jirkovská, V. Fejfarová, J. Skibová: Long-term effects of intranasal calcitonin on healing times and recurrence of acute Charcot foot. A randomized controlled trial. Přednáška na 42nd EASD Annual Meeting, Copenhagen-Malmoe, Dánsko-Švédsko, 9/2006. Abstrakt v Diabetologia 2006, Suppl. 1: 99

Postery s publikovanými abstrakty v zahraničí:

- ❖ V. Fejfarová, A. Jirkovská, J. Kalanin, J. Skibová, I. Stříž: Functional changes of polymorphonuclear cells in patients with chronic diabetic foot infection. Poster na 14th European Immunology Meeting EFIS, Poznaň, Polsko, 9/2000. Publikováno v Immunol Lett 2000, 2/3: 262
- ❖ V. Fejfarová, A. Jirkovská, V. Havlová, J. Hosová, J. Mašková, J. Skibová: The long-term efficacy of an educational program for patients with type 2 diabetes mellitus. Poster na 17th IDF Congress, Mexico City, Mexiko, 11/2000
- ❖ V. Fejfarová, J. Hosová, A. Jirkovská, J. Kalanin, T. Pelikánová, I. Stříž, J. Skibová: Effect of hyperglycemia and hyperinsulinemia on phagocytosis and respiratory burst of polymorphonuclear cells in healthy subjects. Poster na 11th International Congress of Immunology, Stockholm, Švédsko, 7/2001. Abstrakt publikován v Scand J Immunol 2001, Suppl. 1(Friday): 83
- ❖ V. Fejfarová, J. Hosová, A. Jirkovská, J. Kalanin, T. Pelikánová, I. Stříž, P. Bouček, J. Skibová: Effect of acutely induced hyperglycemia and hyperinsulinemia on phagocytosis and oxidative burst of polymorphonuclear cells in healthy subjects. Poster na 37th Annual Meeting of the EASD, Glasgow, Skotsko, 9/2001. Abstrakt publikován v Diabetologia 2001, Suppl. 1: 151
- ❖ V. Fejfarová, A. Jirkovská, P. Bouček, J. Skibová: Association between the presence of resistant pathogens and frequency of amputations in patients with diabetic foot. Poster na symposiu Diabetic foot Study Group of the EASD, Crieff, Skotsko, 9/2001. Abstrakt v Abstract Book DFSG 2001: 43
- ❖ V. Fejfarová, A. Jirkovská, H. Malinská, L. Kazdová, J. Kalanin, I. Stříž: The relationship of vitamin and trace element concentrations with the immune functions of polymorphonuclear cells and LDL oxidability in patients with the diabetic foot and

in healthy subjects. Poster na 15th European Immunology Congress (EFIS 2003), Rhodos, Řecko, 6/2003. Abstrakt v Immunol Lett 2003, 87: 35-36

- ❖ V. Fejfarová, A. Jirkovská, V. Havlová, J. Mašková, R. Bém, J. Skibová: The short and long-lasting effect of structured educational program for patients with Type 2 diabetes. Poster na 18th International Diabetes Federation Congress (IDF), Paříž, Francie, 8/2003. Abstrakt publikován v Diabetes Metab 2003, 29, 4S: 392
- ❖ V. Fejfarová, A. Jirkovská, M. Křížová, R. Bém: Complications of TCC treatment with the focus on osteomyelitis. Poster na 3rd Joint Meeting of the DFSG and Neurodiab, Regensburg, Německo, 9/2004. Abstrakt v Abstract Book DFSG, 2004: 118
- ❖ V. Fejfarová, A. Jirkovská, R. Bém, I. Mášová, J. Skibová: Is there any difference between microscopic and culture mycotic findings from hyperkeratosis and diabetic foot ulcers? Poster na 5th Scientific Meeting of the DFSG, Chalkidiki, Řecko, 9/2005. Abstrakt v Abstract Book 2005: 125
- ❖ V. Fejfarová, A. Jirkovská, R. Bém, I. Mášová, J. Skibová: Is there any difference between microscopic and culture mycotic findings from hyperkeratosis and diabetic foot ulcers? Poster na 5th Scientific Meeting of the DFSG treatment of the diabetic foot related to osteomyelitis. Poster na 41st Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes, Atény, Řecko, 9/2005. Abstrakt v Diabetologia 2005, Suppl.1: A 354
- ❖ V. Fejfarová, A. Jirkovská, R. Bém, M. Křížová: Comparison of Complications of off-loading methods (Total Contact Cast vs. removable cast Walker) with focus on osteomyelitis. Poster na 6th Scientific Meeting of the DFSG, Elsinore, Dánsko 9/2005. Abstrakt v Abstract Book 2005: 62
- ❖ V. Fejfarová, A. Jirkovská, R. Bém, J. Skibová: Risk and benefit of total contact cast Jirkovská, J. Skibová, V. Petkov: The association of resistant staphylococcus aureus and the rate of lower limb amputations in patients with the diabetic foot. Poster na 42. EASD Annual Meeting, Copenhagen-Malmoe, Dánsko-Švédsko, 9/2006. Abstrakt v Diabetologia 2006, Suppl. 1: 685-686
- ❖ V. Fejfarová, A. Jirkovská, R. Bém, J. Skibová, V. Petkov: The relation of bacterial antibiotic resistance to lower limb amputations in patients with the diabetic foot. Poster na 19. kongresu IDF, 12/2006. Abstrakt uveden v Diabetic Medicine 2006, 23 (Suppl. 4): 498

Spoluautor:

- ❖ J. Kovář, V. Fejfarová, T. Pelikánová, R. Poledne: Acute hyperinsulinemia and/or hyperglycemia affect the rate of triacylglyceride clearance from circulation. Poster na 24th Meeting European Lipoprotein Club, Tutzing, Německo, 9/2001
- ❖ A. Jirkovská, V. Fejfarová, L. Kazdová, J. Skibová, A. Žák: Composition and oxidability of lipoproteins in patients with diabetic foot without overt

macroangiopathy. Poster na 1st Joint Meeting Neurodiab and Diabetic Foot Study Group of the EASD, Fiuggi, Itálie, 9/2000. Abstrakt v Abstract book DFSG 2000

- ❖ A. Jirkovská, V. Fejfarová, J. Hosová, J. Kalanin, I. Stříž, J. Skibová: Impairment of polymorphonuclear leukocyte function and diabetes control in patients with diabetic foot. Poster na 17th IDF Congress, Mexico City, Mexiko, 11/2000
- ❖ J. Kovář, V. Fejfarová, T. Pelikánová, R. Poledne: Effect of hyperinsulinemia and/or hyperglycemia on the rate of triacylglyceride clearance from circulation. Poster na 72nd Congress of the European Atherosclerosis Society, Glasgow, Skotsko, 5/2001. Abstrakt uveden v Atherosclerosis 2001, Suppl: 138
- ❖ A. Jirkovská, V. Fejfarová, J. Hosová, J. Kalanin, I. Stříž, J. Skibová: Assessment of non-specific immune response to infection in patients with diabetic foot. Poster na 37th Annual Meeting of the EASD, Glasgow, Skotsko, 9/2001. Abstrakt publikován v Diabetologia 2001, Suppl. 1: 278
- ❖ A. Jirkovská, V. Fejfarová, J. Hosová, J. Kalanin, I. Stříž, J. Skibová: Assessment of specific resistance to infection in patients with diabetic foot. Poster na Symposiu Diabetic foot Study group of the EASD, Crieff, Skotsko, 9/2001. Abstract v Abstract Book DFSG 2001: 40
- ❖ J. Kovář, V. Fejfarová, T. Pelikánová, R. Poledne: Hyperinsulinemia and hyperglycemia downregulate lipoprotein lipase activity. Poster na 73rd Congress of the European Atherosclerosis Society, Salzburg, Rakousko, 7/2002. Abstrakt publikován v Atherosclerosis 2002, 2: 144
- ❖ A. Jirkovská, V. Fejfarová, D. Hačkajlo, P. Bouček, J. Skibová, S. Lacigová, L. Trešlová, A. Adamíková, I. Stolarová: Comparison of management strategies of diabetic foot disease in five Diabetes Centers in Czech Republic. Poster na 2nd Joint Meeting of the Neurodiab and 3rd Meeting of Diabetic Foot Study Group, Balatonfüred, Maďarsko, 8/2002. Abstrakt v Abstract book DFSG 2002
- ❖ A. Jirkovská, V. Fejfarová, R. Bém, D. Hačkajlo, J. Skibová, S. Lacigová, L. Trešlová: The differences in the type of foot ulcers and related amputation rate among three foot centers. Poster na 4th International Symposium on The diabetic foot, Noordwijkerhout, Nizozemí, 5/2003. Abstrakt v Abstractbook of 4th International Symposium on The diabetic foot 2003: 112
- ❖ R. Bém, B. Sixta, P. Herdegen, A. Jirkovská, V. Fejfarová: Usefulness of transcutaneous oxygen tension measurement to predict the healing after amputation in patients with osteomyelitis in diabetic foot. Poster na 4th International Symposium on The diabetic foot, Noordwijkerhout, Nizozemí, 5/2003. Abstrakt v Abstractbook of 4th International Symposium on The diabetic foot 2003: 118
- ❖ A. Jirkovská, V. Fejfarová, R. Bém, D. Hačkajlo, J. Skibová: Differences in diabetes control and self-monitoring between diabetic patients who have undergone amputation and those with diabetic foot without amputation. Poster na 18th International Diabetes Federation Congress (IDF), Paříž, Francie, 8/2003. Abstrakt publikován v Diabetes Metab 2003, 29, 4S: 395

- ❖ R. Bém, B. Sixta, A. Jirkovská, P. Herdegen, V. Fejfarová: Evaluation of transcutaneous oxygen tension measurement for predicting the wound healing after amputation in patients with osteomyelitis in diabetic foot. Poster na 18th International Diabetes Federation Congress (IDF), Paříž, Francie, 8/2003. Abstrakt publikován v Diabetes Metab 2003, 29, 4S: 294
- ❖ J. Šedivý, A. Jirkovská, M. Hatala, A. Štambergová, Z. Ulbrichová, J. Lupínková, V. Fejfarová, R. Bém: The importance of minimal inhibition concentration and pharmacokinetic parameters of antibiotics used in the treatment of diabetes foot infections. Poster na 18th International Diabetes Federation Congress (IDF), Paříž, Francie, 8/2003. Abstrakt publikován v Diabetologia 2003,46, Suppl. 2: 320
- ❖ R. Bém, A. Jirkovská, V. Fejfarová: Rare case reports of Charcot osteoarthropathy of the knee complicated by severe fractures in patients with diabetes. Poster na 3rd Joint Meeting of the DFSG and Neurodiab, Regensburg, Německo, 9/2004. Abstrakt v Abstract Book DFSG, 2004: 105
- ❖ A. Jirkovská, V. Fejfarová, R. Bém, D. Hačkajlo, J. Skibová, S. Lacigová: Differences in patient characteristics and outcomes of therapy between a regional and non-regional foot center. Poster na 3rd Joint Meeting of the DFSG and Neurodiab, Regensburg, Německo, 9/2004. Abstrakt v Abstract Book DFSG, 2004: 101
- ❖ E. Krušinová, P. Wohl, V. Fejfarová, L. Kazdová, M. Klementová, J. Skibová, T. Pelikánová: Effect of acute hyperinsulinaemia on plasma concentrations of selected cytokine antagonists in Type 1 diabetes mellitus. Poster na 40th Annual meeting of EASD, Mnichov, Německo, 9/2004. Abstrakt uveřejněn v Diabetologia 2004, 47 (Suppl.1): A461
- ❖ T. Hrachovinová, V. Fejfarová, L. Csémy: Gender differences in hardness, degree of depression and anxiety in patients with diabetes mellitus. Poster na 40th Annual meeting of EASD, Mnichov, Německo, 9/2004. Abstrakt uveřejněn v Diabetologia 2004, 47 (Suppl.1): A86
- ❖ R. Bém, A. Jirkovská, V. Fejfarová, J. Skibová, B. Sixta: Risk factors for unsuccessful healing after minor amputation in patients with diabetic foot. Poster na 5th Scientific Meeting of the DFSG, Chalkidiki, Řecko 9/2005. Abstrakt v Abstract Book DFSG 2005: 83
- ❖ B. Sixta, R. Bém, A. Jirkovská, V. Fejfarová, J. Skibová: Risk factors for unsuccessful healing after minor amputation in patients with diabetic foot. Poster na 19. kongresu IDF, Kapské město, JAR, 12/2006. Abstrakt publikován v Diabetic Medicine 2006, 23 (Suppl. 4): 494
- ❖ A. Jirkovská, R. Bém, V. Fejfarová, J. Skibová: Vitamin D deficiency and its association with osteoclastic activity in patients with Charcot osteoarthropathy. Poster na 19. kongresu IDF, Kapské město, JAR, 12/2006. Abstrakt publikován v Diabetic Medicine 2006, 23 (Suppl. 4): 496

- ❖ R. Bém, A. Jirkovská, M. Buncová, V. Fejfarová, J. Skibová: The role of quantitative bone scanning in the assessment of bone turnover activity in patients with Charcot foot. Poster na 19. kongresu IDF, Kapské město, JAR, 12/2006. Abstrakt publikován v Diabetic Medicine 2006, 23 (Suppl. 4): 499

Přednášky i s publikovanými abstrakty v tuzemsku:

- ❖ V. Fejfarová: Léčba inzulinovou pumpou – její výhody a rizika z pohledu pacientů. Přednáška na workshopu „Léčba diabetiků inzulinovými pumpami“, Teplá, 10/2000
- ❖ V. Fejfarová: Co by měla vědět dietní sestra v diabetologické ambulanci. Přednáška na workshopu „Diabetes a dieta“, Nymburk, 6/2002
- ❖ V. Fejfarová: Fyzická aktivita a diabetes mellitus. Přednáška na workshopu „Diabetes a dieta“, Nymburk, 6/2002
- ❖ V. Fejfarová: Akutní komplikace při léčbě inzulinovou pumpou- kasuistiky. Přednáška na workshopu „Léčba diabetiků inzulinovými pumpami“, Žinkovy 10/2002
- ❖ V. Fejfarová: Léčba diabetické nohy sádrovou fixací. Přednáška na I. Celostátním symposiu hojení ran ČSLR, Pardubice, 11/2002
- ❖ V. Fejfarová: Léčba syndromu diabetické nohy speciální kontaktní fixací. Přednáška na symposiu Syndrom diabetické nohy, Praha, 3/2003
- ❖ V. Fejfarová, A. Jirkovská, M. Křížová, P. Fexová, P. Veselá: Vliv léčby snímatelnými kontaktními fixacemi na hojivost syndromu diabetické nohy. Přednáška na II. Celostátním symposiu hojení ran ČSLR, Pardubice, 11/2003
- ❖ V. Fejfarová, A. Jirkovská, M. Křížová, R. Bém, J. Skibová: Srovnání léčby pacientů s neuropatickými ulceracemi, akutní Charcotovou osteoarthropatií a neuropatickými frakturami pomocí kontaktních fixací. Přednáška na XXXX. Diabetologických dnech v Luhačovicích, 4/2004. Abstrakt publikován v DMEV 2004, Suppl. 1: 15
- ❖ V. Fejfarová, A. Jirkovská, M. Křížová, R. Bém, J. Pavlů: Nové metody v odlehčení končetin u pacientů se syndromem diabetické nohy. Přednáška na III. Celostátním symposiu hojení ran ČSLR, Pardubice, 11/2004
- ❖ V. Fejfarová, M. Křížová, A. Jirkovská, R. Bém, J. Pavlů: Moderní prostředky k fixaci a odlehčení diabetické nohy. Přednáška na Mezioborovém kongresu Hojení ran ve Střešovicích, Praha, 4/2005
- ❖ V. Fejfarová, A. Jirkovská, M. Křížová, R. Bém: Komplikace léčby snímatelnými kontaktními fixacemi se zaměřením na osteomyelitidu. Přednáška na XLI. Diabetologických dnech v Luhačovicích, 4/2005. Abstrakt publikován v DMEV 2005, Suppl. 1: 17

- ❖ V. Fejfarová: Patofyziologie rozvoje syndromu diabetické nohy a možnosti jeho terapeutického ovlivnění. Přednáška na konferenci „Diagnostika a monitoring v terapii ran“, Olomouc, 6/2005
- ❖ V. Fejfarová, A. Jirkovská, R. Bém, I. Mášová, J. Skibová: Srovnání mikroskopických a kultivačních nálezů získaných z tkáňových vzorků hyperkeratóz a ulcerací. Přednáška na 2. symposiu mladých odborníků v diabetologii, endokrinologii a metabolismu, Praha, 10/2005
- ❖ V. Fejfarová: Zavedení terapie CSII u pacienta se syndromem diabetické nohy. Přednáška na 9. workshopu „Technologie v léčbě diabetu“, Žinkovy, 9/2005
- ❖ V. Fejfarová, A. Jirkovská, M. Křížová, J. Pavlů: Použití fixačních materiálů k tvorbě fixačních dlah, rigidních a snímatelných fixací. Přednáška na symposiu „Diabetická noha- současné poznatky v terapii“. Střešovice, 11/2005
- ❖ V. Fejfarová, A. Jirkovská: Bakteriální a mykotické infekce u pacientů se syndromem diabetické nohy. Přednáška na IV. Celostátním symposiu hojení ran ČSLR, Pardubice, 11/2005
- ❖ V. Fejfarová, A. Jirkovská, R. Bém, M. Křížová, V. Šindelářová, I. Mášová, J. Skibová: Mykotické infekce u pacientů se syndromem diabetické nohy. Přednáška na XLII. Diabetologických dnech v Luhačovicích, 4/2006. Abstrakt publikován v DMEV 2006, Suppl. 2: 21
- ❖ V. Fejfarová, M. Křížová: Workshop on diabetic foot assessment. Přednáška na 16. kongresu EWMA, Praha 5/2006
- ❖ V. Fejfarová, M. Skořepová, A. Jirkovská, R. Bém, M. Křížová, I. Mášová, J. Skibová: Diagnostika a léčba mykotických infekcí. Přednáška na symposiu Syndrom diabetické nohy, Praha 11/2006.
- ❖ V. Fejfarová: Diabetická makroangiopatie. Přednáška na Konferenci diabetologických sester: Diabetická makroangiopatie. Praha, 12/2006

Spoluautor:

- ❖ V. Havlová, A. Jirkovská, J. Mašková, V. Fejfarová, J. Skibová: Zavedení a hodnocení ambulantního edukačního programu pro diabetiky 2. typu. Přednáška na XXXV. Diabetologických dnech v Luhačovicích, 4/1999
- ❖ B. Sixta, P. Herdegen, R. Bém, V. Fejfarová: Léčení osteomyelitidy u syndromu diabetické nohy, přednáška na jednodenním symposiu s mezinárodní účastí „Diabetická noha“, Praha, 11/2001
- ❖ A. Jirkovská, J. Hosová, V. Havlová, V. Fejfarová, J. Mašková, J. Skibová: Dlouhodobá efektivita edukačního programu pro diabetiky 2. typu v diabetologickém centru. Přednáška na XXXVI. Diabetologických dnech v Luhačovicích, 4/2000. Abstrakt uveřejněn v DMEV 2000, Suppl. 1: 16-18

- ❖ A. Jirkovská, V. Fejfarová, J. Hosová, J. Kalanin, I. Stříž, J. Skibová: Poruchy imunologických funkcí polymorfonukleárních leukocytů u pacientů se syndromem diabetické nohy. Přednáška na XXXVII. Diabetologických dnech v Luhačovicích, 4/2001. Abstrakt publikován v DMEV 2001, Suppl 1: 24-25
- ❖ T. Hrachovinová, V. Fejfarová, L. Czémy, J. Vítová, A. Jirkovská: Míra deprese, úzkosti a úzkostnosti u nemocných DM 1. a 2. typu. Přednáška na XXXVII. Diabetologických dnech v Luhačovicích, 4/2001. Abstrakt publikován v DMEV 2001, Suppl. 1: 20-21
- ❖ M. Křížová, V. Fejfarová, A. Jirkovská, P. Veselá: Léčba diabetických ulcerací speciální kontaktní fixací – zkušenosti ze zahraniční stáže. Přednáška na 9. pracovním dni Sekce sester ČDS při XXXVIII. Diabetologických dnech v Luhačovicích, 4/2002
- ❖ A. Jirkovská, V. Fejfarová: Problematika podiatrických ambulancí v ČR, zkušenosti z IKEM. Přednáška na Symposiu Efektivita péče o pacienty se syndromem diabetické nohy. Praha, 5/2004
- ❖ R. Bém, A. Jirkovská, V. Fejfarová: Neuropatické defekty-diagnostika a léčba. Přednáška na Mezioborovém kongresu Hojení ran ve Střešovicích, Praha, 4/2005.
- ❖ A. Jirkovská, S. Lacigová, V. Fejfarová, R. Bém, D. Hačkajlo, J. Skibová, Z. Rušavý: Srovnání péče o pacienty se syndromem diabetické nohy ve spádové a v neregionální podiatrické ambulanci. Přednáška na XLI. Diabetologických dnech v Luhačovicích, 4/2005. Abstrakt publikován v DMEV 2005, Suppl. 1: 24
- ❖ T. Hrachovinová, E. Svitáková, L. Csémy, V. Fejfarová: Sledování kvality života nemocných v souvislosti s typem diabetu, pozdními komplikacemi a pohlavím. Přednáška na XLI. Diabetologických dnech v Luhačovicích, 4/2005. Abstrakt publikován v DMEV 2005, Suppl. 1: 22
- ❖ A. Jirkovská, R. Bém, V. Fejfarová, J. Skibová: Regulace kalciového metabolismu u pacientů s Charcotovou osteoartrózi. Přednáška na XLII. Diabetologických dnech v Luhačovicích. Abstrakt uveřejněn v DMEV 2006, 9(Suppl. 2): 27
- ❖ R. Bém, A. Jirkovská, V. Fejfarová: Aktuality v diagnostice a léčbě Charcotovy osteoartróze. Přednáška na symposiu Syndrom diabetické nohy, Praha 11/2006. Abstrakt uveřejněn v HPB Bulletin 2006, 14(4): 156-159

Postery s publikovanými abstrakty v tuzemsku:

- ❖ V. Fejfarová, A. Jirkovská, J. Hosová, J. Kalanin, I. Stříž, Z. Vlasáková, J. Skibová: Vliv akutní hyperglykémie na imunologické parametry u zdravých dobrovolníků. Poster na XXXVI. Diabetologických dnech v Luhačovicích, 4/2000. Abstrakt publikován v DMEV 2000, Suppl 1: 10-11
- ❖ V. Fejfarová, A. Jirkovská, L. Kazdová, A. Žák, J. Skibová: Ukazatele lipidových parametrů a oxidability lipoproteinů u pacientů se syndromem diabetické nohy. Poster na 3. Metabolických dnech, Třešť 5/2000. Abstrakt uveřejněn ve Sborníku prací- 3. Metabolické dny-Tuky ve výživě. Sborník prací, Plzeň, 2000: 12

- ❖ V. Fejfarová, A. Jirkovská, J. Kalanin, I. Stříž, J. Skibová: Imunologické abnormality u pacientů se syndromem diabetické nohy a jejich vztah k chronickému zánětu. Poster na XXXVII. Diabetologických dnech v Luhačovicích, 4/2001. Abstrakt publikován v DMEV 2001, Suppl. 1: 16
- ❖ V. Fejfarová, A. Jirkovská, J. Kalanin, T. Pelikánová, I. Stříž, J. Skibová: Vliv akutní hyperglykémie a hyperinzulinémie na fagocytózu a oxidativní vzplanutí u pacientů s diabetes mellitus 1. typu. Poster na XXXVIII. Diabetologických dnech v Luhačovicích, Abstrakt publikován v DMEV 2002, Suppl. 1: 16
- ❖ V. Fejfarová, A. Jirkovská, J. Kalanin, T. Pelikánová, I. Stříž, J. Skibová: Vliv akutní hyperglykémie a hyperinzulinémie na fagocytózu a oxidativní vzplanutí PMN u pacientů s diabetes mellitus 1. typu. Poster na 19. Sjezdu českých a slovenských alergologů a klinických imunologů, Karlovy Vary, 10/2002. Abstrakt publikován v Alergie 2002, Suppl. 3: 78
- ❖ V. Fejfarová, A. Jirkovská, H. Malinská, L. Kazdová, J. Kalanin, I. Stříž: Porovnání hladin vitamínů a vybraných prvků mezi pacienty se syndromem diabetické nohy a zdravými dobrovolníky a jejich vztah k imunitním funkcím polymorfonukleárních buněk. Poster na XXXIX. Diabetologických dnech v Luhačovicích, 4/2003. Abstrakt publikován v DMEV 2003, Suppl. 1: 22
- ❖ V. Fejfarová, A. Jirkovská, J. Kalanin, I. Stříž, L. Kazdová, H. Malinská, J. Skibová: Abnormality sérových hladin vybraných vitamínů a prvků u pacientů se syndromem diabetické nohy. Poster na 1. symposiu mladých odborníků v diabetologii, endokrinologii a metabolismu, Praha, 9/2004. Abstrakt publikován v DMEV 2004, 7(3): 147-148
- ❖ V. Fejfarová, A. Jirkovská, J. Kalanin, I. Stříž, L. Kazdová, H. Malinská, J. Skibová: Abnormality sérových hladin vybraných vitamínů a prvků u pacientů se syndromem diabetické nohy a jejich vztah k imunitním funkcím. Poster na 21. sjezdu českých a slovenských alergologů a klinických imunologů, Brno 11/2004. Abstrakt uveřejněn v Alergie 2004, 6(suppl. 2): 35

Spoluautor:

- ❖ J. Kovář, V. Fejfarová, R. Poledne, T. Pelikánová: Vliv hyperinzulinémie a hyperglykémie na rychlost intravazálního katabolismu triacylglycerolu. Poster na XXXVII. Diabetologických dnech v Luhačovicích, 4/2001. Abstrakt publikován v DMEV 2001, Suppl. 1: 27
- ❖ J. Hosová, A. Jirkovská, V. Fejfarová, T. Pelikánová, J. Kalanin, I. Stříž, J. Skibová: Vliv akutní hyperglykémie na funkci polymorfonukleárních leukocytů u zdravých osob. Poster na XXXVII. Diabetologických dnech v Luhačovicích, 4/2001. Abstrakt publikován v DMEV 2001, Suppl. 1: 23
- ❖ J. Kovář, V. Fejfarová, T. Pelikánová, R. Poledne: Clearance triacylglycerolů in vivo je regulována hyperinzulinémií a hyperglykémií. Poster na 5. kongresu o

ateroskleróze, Špindlerův Mlýn, 12/2001. Abstrakt publikován v DMEV 2001, Suppl 4: 14-15

- ❖ R. Bém, A. Jirkovská, V. Fejfarová: Patologické fraktury na podkladě diabetické neuropatie. Poster na XXXIX. Diabetologických dnech v Luhačovicích, 4/2003. Abstrakt uveřejněn v DMEV 2003, Suppl. 1: 17
- ❖ T. Hrachovinová, K. Weigertová, V. Fejfarová, L. Csémy: První zkušenost se zjišťováním kvality života diabetiků léčených inzulinovou pumpou . Poster na XXXIX. Diabetologických dnech v Luhačovicích, 4/2003. Abstrakt uveřejněn v DMEV 2003, Suppl. 1: 25
- ❖ T. Hrachovinová, K. Weigertová, E. Dragomirecká, V. Fejfarová, L. Csémy: Sledování kvality života diabetiků 2.typu v porovnání se souborem zdravých osob. Poster na XXXIX. Diabetologických dnech v Luhačovicích, 4/2003. Abstrakt uveřejněn v DMEV 2003, Suppl. 1: 25-26
- ❖ A. Jirkovská, V. Fejfarová, D. Hačkajlo, J. Skibová, S. Lacigová, L. Trešlová, A. Adamírová, I. Stolařová, R. Motl: Srovnání podiatrické péče v šesti diabetologických centrech. Poster na XXXIX. Diabetologických dnech v Luhačovicích, 4/2003. Abstrakt uveřejněn v DMEV 2003, Suppl. 1: 31
- ❖ J. Šedivý, A. Jirkovská, M. Hatala, A. Štambergová, Z. Ulrichová, J. Lupínková, V. Fejfarová, R. Bém: Předpoklad úspěšnosti antibiotické léčby nemocných se syndromem diabetické nohy Poster na XXXIX. Diabetologických dnech v Luhačovicích, 4/2003. Abstrakt uveřejněn v DMEV 2003, Suppl. 1: 52-53
- ❖ R. Bém, A. Jirkovská, V. Fejfarová, M. Klementová: Využití lokálního podtlaku v léčbě pacientů se syndromem diabetické nohy - první zkušenosti s V.A.C. terapií. Poster na XXXX. Diabetologických dnech v Luhačovicích, 4/2004. Abstrakt uveřejněn v DMEV 2004, Suppl. 1: 11
- ❖ T. Hrachovinová, V. Fejfarová, L. Csémy, A. Jirkovská: Gender rozdíly v odolnosti ke stresu, depresi a úzkosti u nemocných diabetem. Poster na XXXX. Diabetologických dnech v Luhačovicích, 4/2004. Abstrakt uveřejněn v DMEV 2004, Suppl. 1: 17-18
- ❖ R. Bém, A. Jirkovská, V. Fejfarová, J. Skibová, B. Sixta, P. Herdegen: Rizikové faktory neúspěšného hojení rány po nízké amputaci u pacientů se syndromem diabetické nohy. Poster na XLI. Diabetologických dnech v Luhačovicích, 4/2005. Abstrakt publikován v DMEV 2005, Suppl. 1: 11
- ❖ R. Bém, A. Jirkovská, V. Fejfarová, J. Skibová, EB. Jude: Nasální kalcitonin v léčbě akutní Charcotovy osteoarthropatie: randomizovaná kontrolovaná studie. Poster na XLII. Diabetologických dnech v Luhačovicích. Abstrakt uveřejněn v DMEV 2006, 9(Suppl. 2): 16

Příloha č. 1: V. Fejfarová, A. Jirkovská, J. Lupínková, J. Kovář, J. Kalanin, I. Stříž, J. Skibová, P. Bouček, T. Pelikánová: Effect of acute hyperglycemia and/or hyperinsulinemia on polymorphonuclear functions in healthy subject. Metabolism 2006, 55: 811-818.....IF 2,3 (r.2005)

Příloha č. 2: V. Fejfarová, J. Hosová, A. Jirkovská, J. Kalanin, T. Pelikánová, I. Stříž, J. Skibová: Effect of hyperglycemia and hyperinsulinemia on phagocytosis and respiratory burst of polymorphonuclear cells in healthy subjects. Poster na 11th International Congress of Immunology, Stockholm, Švédsko, 7/2001. Abstrakt publikován v Scand J Immunol 2001, Suppl. 1(Friday): 83

Příloha č. 3: V. Fejfarová, J. Hosová, A. Jirkovská, J. Kalanin, T. Pelikánová, I. Stříž, P. Bouček, J. Skibová: Effect of acutely induced hyperglycemia and hyperinsulinemia on phagocytosis and oxidative burst of polymorphonuclear cells in healthy subjects. Poster na 37th Annual Meeting of the EASD, Glasgow, Skotsko, 9/2001. Abstrakt publikován v Diabetologia 2001, Suppl. 1: 151

Příloha č. 4: V. Fejfarová, A. Jirkovská, J. Hosová, J. Kalanin, I. Stříž, Z. Vlasáková, J. Skibová: Vliv akutní hyperglykémie na imunologické parametry u zdravých dobrovolníků. Poster na XXXVI. Diabetologických dnech v Luhačovicích, 4/2000. Abstrakt publikován v DMEV 2000, Suppl 1: 10-11

Příloha č. 5: V. Fejfarová, A. Jirkovská, J. Kalanin, T. Pelikánová, I. Stříž, J. Skibová: Vliv akutní hyperglykémie a hyperinzulinémie na fagocytózu a oxidativní vzplanutí u pacientů s diabetes mellitus 1.typu. Poster na XXXVIII. Diabetologických dnech v Luhačovicích, Abstrakt publikován v DMEV 2002, Suppl. 1: 16

Příloha č. 6: V. Fejfarová, A. Jirkovská, J. Kalanin, T. Pelikánová, I. Stříž, J. Skibová: Vliv akutní hyperglykémie a hyperinzulinémie na fagocytózu a oxidativní vzplanutí PMN u pacientů s diabetes mellitus 1.typu. Poster na 19. Sjezdu českých a slovenských alergologů a klinických imunologů, Karlovy Vary, 10/2002. Abstrakt publikován v Alergie 2002, Suppl. 3: 78

Příloha č. 7: V. Fejfarová, A. Jirkovská, J. Kalanin, J. Skibová, I. Stříž: Functional changes of polymorphonuclear cells in patients with chronic diabetic foot infection. Poster na 14th European Immunology Meeting EFIS, Poznaň, Polsko, 9/2000. Publikováno v Immunol Lett 2000, 2/3: 262

Příloha č. 8: A. Jirkovská, V. Fejfarová, J. Hosová, I. Stříž, J. Kalanin, J. Skibová: Analýza zánětlivé odpovědi a vybraných ukazatelů imunity u pacientů s infikovanými diabetickými ulceracemi. Časopis lékařů českých 2002, 15: 483-486

Příloha č. 9: A. Jirkovská, V. Fejfarová, J. Hosová, J. Kalanin, I. Stříž, J. Skibová: Assessment of specific resistance to infection in patients with diabetic foot. Poster na symposiu Diabetic foot Study Group of the EASD, Crieff, Skotsko, 9/2001. Abstrakt v Abstract Book DFSG 2001: 40

Příloha č. 10: V. Fejfarová, A. Jirkovská, J. Kalanin, I. Stříž, J. Skibová: Imunologické abnormality u pacientů se syndromem diabetické nohy a jejich vztah k chronickému

zánětu. Poster na XXXVII. Diabetologických dnech v Luhačovicích, 4/2001. Abstrakt publikován v DMEV 2001, Suppl. 1: 16

Příloha č. 11: V. Fejfarová, A. Jirkovská, L. Kazdová, H. Malinská, I. Stříž: Vybrané vitamíny a prvky se vztahem k imunitnímu systému u pacientů s diabetes mellitus. DMEV 2003, 1: 23-29

Příloha č. 12: V. Fejfarová, A. Jirkovská, H. Malinská, L. Kazdová, J. Kalanin, I. Stříž: The comparison of vitamin and trace element concentrations between patients with the diabetic foot and healthy subjects. Is there any relation of these „micronutrients“ to the immune functions of polymorphonuclear cells and LDL oxidability? Přednáška na 2nd Joint Meeting of the Neurodiab and 3rd Meeting of Diabetic Foot Study Group, Balatonfüred, Maďarsko 8/2002. Abstrakt v Abstract Book DFSG 2002: 113

Příloha č. 13: V. Fejfarová, A. Jirkovská, H. Malinská, L. Kazdová, J. Kalanin, I. Stříž: The relationship of vitamin and trace element concentrations with the immune functions of polymorphonuclear cells and LDL oxidability in patients with the diabetic foot and in healthy subjects. Poster na 15th European Immunology Congress (EFIS 2003), Rhodos, Řecko, 6/2003. Abstrakt v Immunol Lett 2003, 87: 35-36

Příloha č. 14: V. Fejfarová, A. Jirkovská, H. Malinská, L. Kazdová, J. Kalanin, I. Stříž: Porovnání hladin vitamínů a vybraných prvků mezi pacienty se syndromem diabetické nohy a zdravými dobrovolníky a jejich vztah k imunitním funkcím polymorfonukleárních buněk. Poster na XXXIX. Diabetologických dnech v Luhačovicích, 4/2003. Abstrakt publikován v DMEV 2003, Suppl. 1: 22

Příloha č. 15: V. Fejfarová, A. Jirkovská, J. Kalanin, I. Stříž, L. Kazdová, H. Malinská, J. Skibová: Abnormality sérových hladin vybraných vitamínů a prvků u pacientů se syndromem diabetické nohy. Poster na 1. symposiu mladých odborníků v diabetologii, endokrinologii a metabolismu, Praha, 9/2004. Abstrakt publikován v DMEV 2004, 7(3): 147-148

Příloha č. 16: V. Fejfarová, A. Jirkovská, V. Petkov, P. Bouček, J. Skibová: Comparison of microbial findings and resistance to antibiotics between transplant patients, patients on hemodialysis, and other patients with the diabetic foot. J Diabetes Complications 2004, 18(2):108-112.....IF 1,9

Příloha č. 17: V. Fejfarová, A. Jirkovská, V. Petkov, J. Skibová: Comparison of microbiologic findings, antibiotic therapy and resistance among transplant patients, patients on hemodialysis and other patients with the diabetic foot. Přednáška na 1st Joint Meeting Neurodiab Diabetic Foot Study Group of the EASD, Fiuggi, Itálie 9/2000. Abstrakt v Abstract Book DFSG 2000

Příloha č. 18: V. Fejfarová, A. Jirkovská, J. Skibová, V. Petkov: Vliv rezistentních patogenů a ostatních rizikových faktorů na četnost amputací dolních končetin u pacientů se syndromem diabetické nohy. Vnitřní Lékařství 2002, 4: 302-306

Příloha č. 19: V. Fejfarová, A. Jirkovská, P. Bouček, J. Skibová: Association between the presence of resistant pathogens and frequency of amputations in patients with

diabetic foot. Poster na symposiu Diabetic foot Study Group of the EASD, Crieff, Skotsko, 9/2001. Abstrakt v Abstract Book DFSG 2001: 43

Příloha č. 20: V. Fejfarová, A. Jirkovská, J. Skibová, V. Petkov: The association of resistant staphylococcus aureus and the rate of lower limb amputations in patients with the diabetic foot. Poster na 42. EASD Annual Meeting, Copenhagen-Malmoe, Dánsko-Švédsko, 9/2006. Abstrakt v Diabetologia 2006, Suppl. 1: 685-686

Příloha č. 21: V. Fejfarová, A. Jirkovská, R. Bém, I. Mášová, J. Skibová: Is there any difference between microscopic and culture mycotic findings from hyperkeratosis and diabetic foot ulcers? Poster na 5th Scientific Meeting of the DFSG, Chalkidiki, Řecko, 9/2005. Abstrakt v Abstract Book DFSG 2005: 125

Příloha č. 22: V. Fejfarová, A. Jirkovská, R. Bém, M. Křížová, V. Šindelářová, I. Mášová, J. Skibová: Mykotické infekce u pacientů se syndromem diabetické nohy. Přednáška na XLII. Diabetologických dnech v Luhačovicích, 4/2006. Abstrakt publikován v DMEV 2006, Suppl. 2: 21

Příloha č. 23: V. Fejfarová, A. Jirkovská: Bakteriální a mykotické infekce u pacientů se syndromem diabetické nohy. In I. Bureš. Léčba rány, Florance Galén, Praha, 2006; 45-49

Příloha č. 24: V. Fejfarová, A. Jirkovská, M. Křížová, J. Skibová: Účinnost léčby snímatelnými kontaktními fixacemi u pacientů s neuropatickými ulceracemi, akutní Charcotovou osteoartrózi a neuropatickými frakturami. Vnitřní Lékařství 2005, 51: 988-994

Příloha č. 25: V. Fejfarová, M. Křížová, A. Jirkovská, R. Bém, J. Pavlů: Moderní prostředky k fixaci a odlehčení diabetické nohy. Diagnóza 2005, 1(1): 13-15

Příloha č. 26: V. Fejfarová, A. Jirkovská, M. Křížová, J. Pavlů: Použití fixačních materiálů k tvorbě fixačních dlah, rigidních a snímatelných fixací. HPB Bulletin 2005: 13 (3-4): 107-110

Příloha č. 27: V. Fejfarová, A. Jirkovská, M. Křížová, P. Fexová: Léčba syndromu diabetické nohy kontaktní fixací. HPB Bulletin 2003, 1: 39-40

Příloha č. 28: A. Jirkovská, V. Fejfarová: Léčba speciálními kontaktními fixacemi. In A. Jirkovská: Syndrom diabetické nohy, 1.vydání, Maxdorf, Praha, 2006: 121-133

Příloha č. 29: V. Fejfarová, A. Jirkovská, M. Křížová, J. Skibová: Comparison of effects of the treatment by the total contact cast on various types of indications in foot clinic. Přednáška na 4th International Symposium on The diabetic foot, Noordwijkerhout, Nizozemí, 5/2003. Abstrakt v Abstractbook of 4th International Symposium on The diabetic foot, Noordwijkerhout, Nizozemí, 5/2003, str. 64

Příloha č. 30: V. Fejfarová, A. Jirkovská, M. Křížová, R. Bém, J. Skibová: Srovnání léčby pacientů s neuropatickými ulceracemi, akutní Charcotovou osteoartrózi a neuropatickými frakturami pomocí kontaktních fixací. Přednáška na XXXX.

Diabetologických dnech v Luhačovicích, 4/2004. Abstrakt publikován v DMEV 2004, Suppl. 1: 15

Příloha č. 31: V. Fejfarová, A. Jirkovská, R. Bém, M. Křížová, V. Šindelářová, P. Fexová, J. Skibová: Komplikace léčby syndromu diabetické nohy pomocí snímatelných kontaktních fixací se zaměřením na osteomyelitidu. Praktický lékař 2005, 85(6): 348-352

Příloha č. 32: V. Fejfarová, A. Jirkovská, M. Křížová, R. Bém: Komplikace léčby snímatelnými kontaktními fixacemi se zaměřením na osteomyelitidu. Přednáška na XLI. Diabetologických dnech v Luhačovicích, 4/2005. Abstrakt publikován v DMEV 2005, Suppl. 1: 17

Příloha č. 33: V. Fejfarová, A. Jirkovská, M. Křížová, R. Bém: Complications of TCC treatment with the focus on osteomyelitis. Poster na 3rd Joint Meeting of the DFSG and Neurodiab, Regensburg, Německo, 9/2004. Abstrakt v Abstract Book DFSG, 2004: 118

Příloha č. 34: V. Fejfarová, A. Jirkovská, R. Bém, J. Skibová: Risk and benefit of total contact cast treatment of the diabetic foot related to osteomyelitis. Poster na 41st Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes, Atény, Řecko, 9/2005. Abstrakt v Diabetologia 2005, Suppl.1: A 354

Příloha č. 35: V. Fejfarová, A. Jirkovská, M. Křížová, R. Bém: Total Contact Cast in the treatment of the diabetic foot- its risk and benefit with focus on osteomyelitis. Přednáška na 16. kongresu EWMA, Praha, 5/2006. Abstrakt uveřejněn v Abstract Book EWMA 2006: 58

Příloha č. 36: V. Fejfarová, A. Jirkovská, R. Bém, M. Křížová: Comparison of Complications of off-loading methods (Total Contact Cast vs. removable cast Walker) with focus on osteomyelitis. Poster na 6th Scientific Meeting of the DFSG, Elsinore, Dánsko 9/2005. Abstrakt v Abstract Book 2005: 62



Effect of acute hyperglycemia and/or hyperinsulinemia on polymorphonuclear functions in healthy subjects

Vladimíra Fejfarová*, Alexandra Jirkovská, Jana Lupínková, Jan Kovář, Ján Kalanin, Ilja Stríž, Jelena Skibová, Petr Bouček, Terezie Pelikánová

Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague 140 21, Czech Republic

Received 25 August 2004; accepted 23 February 2006

Abstract

Abnormal immune functions of polymorphonuclear (PMN) cells occur in a variety of pathophysiological conditions. There exists a close link between glucose metabolism and PMN functions. The aim of this study was to assess the effect of short-term hyperglycemia and/or hyperinsulinemia on phagocytosis and respiratory burst of PMN cells in healthy subjects *in vivo*. The study was performed on 12 healthy subjects (mean age, 26.9 ± 1.6 years; body mass index, 24.4 ± 0.84 kg/m²). Acute hyperglycemia and/or hyperinsulinemia was induced by three 4-hour-long clamp studies—hyperglycemic hyperinsulinemic clamp (HHC), hyperinsulinemic euglycemic clamp (HEC), and isolated hyperglycemic clamp with insulin secretion blockade (HGC). Polymorphonuclear cell phagocytosis and PMN cell respiratory burst (mean percentage and mean fluorescent intensity of phagocytosing/activated PMN cells, phagocytic, and respiratory burst indexes) were evaluated by flow cytometry under basal and stimulated conditions. Results detected during clamp studies were compared with those found during a control study with saline infusion. Significant reductions in the mean percentage of phagocytosing cells measured under basal conditions after the HHC ($6.7\% \pm 1.3\%$ vs $12.1\% \pm 4.3\%$; $P < .05$) and HGC ($4.5\% \pm 1.8\%$ vs $9.9\% \pm 2.1\%$; $P < .05$) were found in comparison with the preclamp study period; however, these results did not differ significantly from those detected during the control clamp (CC) study. Significantly higher phagocytic (115.1 ± 65 vs 35.8 ± 18.6 ; $P < .05$) and respiratory burst indexes (16.5 ± 3 vs 10.1 ± 1.4 ; $P < .05$) measured under basal conditions were found after HEC in comparison with the preclamp data. However, these data did not differ significantly from those found after the CC study. No significant differences in other parameters of detected PMN cell immune functions were found after HHC, HEC, and HGC. In conclusion, immune functions of PMN cells were not significantly influenced by short-lasting hyperglycemia and/or hyperinsulinemia induced *in vivo* by clamp techniques in healthy subjects compared to changes induced by the CC study. Further studies on the short-term effect of glucose metabolism on PMN functions in diabetic patients should be considered necessary. © 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Phagocytosis by polymorphonuclear (PMN) cells constitutes an essential tool of host defense against bacterial and fungal infections. The phagocytic process can be separated into several major steps: chemotaxis, attachment of particles to the cell surface of phagocytes, ingestion, and intracellular killing by oxygen-dependent and -independent mechanisms [1,2]. These PMN functions require energy derived from glucose [3]. There may exist close links between glucose

metabolism and PMN functions based on metabolic and pathophysiological conditions.

The oxygen-dependent intracellular killing of infectious agents in PMN cells, known as the respiratory burst, consists of a sequence of metabolic events activated after contact of foreign particles with the PMN membrane. The respiratory burst includes the generation of reactive oxygen intermediates (ROI) [4–7]. The generation of ROI relates to the oxidation of glucose via the hexose-monophosphate shunt. The microbicidal activity of activated macrophages against certain intracellular and extracellular pathogens is correlated with their production of ROI [8,9].

Abnormal phagocytosis occurs in a variety of clinical disorders and may be associated with the neutrophil itself or with immunoglobulin or complement defects [6,10–17]. In

* Corresponding author. Diabetes Center, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague 140 21, Czech Republic. Tel.: +42 2 61362150; fax: +42 2 61362820.

E-mail address: vlfe@medicon.cz (V. Fejfarová).

diabetic patients, a 50% reduction in PMN glucose use and glycolysis was found [18]; however, a significant increase in glucose use and glycogen formation was observed in leukocytes after treatment of diabetic patients with insulin [18,19]. Some studies showed functional PMN cell abnormalities such as the impairment of chemotaxis [20,21], adherence [22], and ingestion [20,23], which were associated with chronic hyperglycemia [20,23,24]. The respiratory burst of stimulated PMN cells was significantly reduced in both type 1 [23,25] and type 2 diabetic patients [26] with poor metabolic control. It is unclear how the acute changes in short-lasting high glucose and insulin serum levels could impact the potential for infection in a clinical setting.

The effect of acute hyperglycemia on PMN functions was still predominantly assessed during *in vitro* studies. There were described significant changes in immune functions up to high glucose medium levels. Reduced PMN functions such as phagocytosis and respiratory burst with reduced superoxide production were shown in several reports [27–29].

To date, the influence of hyperinsulinemia on PMN cell activities was assessed *very rarely* *in vivo* [18,30]. Nevertheless, the effect of acute hyperglycemia on PMN functions has not been studied yet.

The aim of our study was to assess the effect of combined short-lasting hyperglycemia and hyperinsulinemia, isolated hyperinsulinemia, and isolated hyperglycemia on phagocytosis and respiratory burst of PMN cells in healthy subjects during clamp techniques. These models of conditions correspond far more with the pathophysiological status in patients with diabetes mellitus.

2. Materials and methods

2.1. Subject characteristics

Twelve healthy subjects without any concomitant disease were included into the study. They had a mean age of 26.9 ± 1.6 years and body mass index of 24.4 ± 0.84 kg/m². Each of the healthy subjects had to have normal blood counts, normal glucose tolerance according to the 1999 World Health Organization diagnostic criteria [31] (mean fasting glycemia, 4.6 ± 0.12 mmol/L), and normal glycosylated hemoglobin (mean HbA_{1c}, $4.8\% \pm 0.09\%$). Normal glucose tolerance was confirmed by an oral glucose tolerance test. None of the study subjects took medications known to influence plasma glucose or insulin concentrations or had pathological levels of erythrocyte sedimentation rate and routine biochemical laboratory tests (creatinine, urea, electrolytes, lipid concentrations, urine analysis). Immune defects were excluded by laboratory tests of physiological parameters related to immune functions.

The exclusion criteria included respiratory, renal, hepatic, gastrointestinal, immune, infectious or other diseases, alcoholism, and drug abuse. Acute and chronic diseases were excluded based on medical history, physical examination, and routine laboratory tests of blood counts, biochemical

parameters, etc. None had a defined immune defect and a history of acute infectious disease during the last 3 months.

All subjects provided written informed consent before participation in this study, which was reviewed and approved by the local ethics committee.

2.2. Experimental design

All subjects were examined after an overnight fast. They were instructed to adhere to their ordinary lifestyle and avoid alcohol consumption, strenuous exercise, and major changes in food intake for 3 days before the clamp study. The study procedures in each healthy subject consisted of 4 consecutive clamp studies, each of 4 hours duration performed in 14-day intervals.

2.2.1. Study 1

The hyperglycemic hyperinsulinemic clamp (HHC) study was performed as described previously [32,33]. Briefly, a new Teflon cannula (Venflon; Ohmeda, Helsingborg, Sweden) was inserted into an antecubital vein for the infusion of all test substances. A second cannula (Venflon; Becton-Dickinson, Helsingborg, Sweden) was inserted retrogradely into a wrist vein for blood sampling, and the hand was placed in a warming device to achieve venous blood arterialization. The aim of the HHC was to raise the plasma glucose concentration acutely to a fixed hyperglycemic plateau of 17 mmol/L and to maintain it at that level for 4 hours. The high plasma glucose level was achieved with a bolus of 40% glucose in a previously calculated dose (dose [mL] = weight [kg] × [17 – plasma glucose concentration] × 0.0855). Thereafter, blood glucose levels were measured in blood samples obtained at 5- or 10-minute intervals. Plasma glucose concentrations throughout the study periods were maintained at the hyperglycemic level by a continuous 15% glucose infusion at variable rates adjusted according to glucose levels.

Blood samples for immunoreactive insulin (IRI) determination were taken before (0 minutes) and at 60, 120, 180, 210, 225, and 240 minutes of each clamp study. Blood counts, parameters of phagocytosis, and respiratory burst of PMN cells were determined from blood samples taken at 0 and 240 minutes of each clamp study.

2.2.2. Study 2

The hyperinsulinemic euglycemic clamp (HEC) procedure was described previously [32–34]. A primed constant insulin infusion (1 mU/kg per minute of Actrapid HM; NovoNordisk, Copenhagen, Denmark) was administered to raise and maintain the plasma insulin concentration at approximately 60 mU/L. The whole blood glucose levels were measured in blood samples obtained at 5- or 10-minute intervals. Glycemia was maintained at fasting level (4–6 mmol/L) by a continuous infusion of 15% glucose at variable rates adjusted according to glucose measurements. Addition of saline was infused to match the liquid volume applied during the HHC in study 1.

2.2.3. Study 3

To test the effect of isolated hyperglycemia in vivo, the isolated hyperglycemic clamp (HGC) with insulin secretion blockade was performed. A hyperglycemic plateau of 17 mmol/L was achieved with a 40% glucose bolus in a previously calculated dose (dose [mL] = weight [kg] × [17 – glycemic level] × 0.0855) followed by a continuous intravenous 15% glucose infusion at variable rates adjusted according to glucose level measurements as in study 1. The endocrine insulin secretion was blocked by continuous somatostatin infusion at the rate of 500 µg/h (somatostatin injection power, 1 × 3 mg + solvents; UCB SA Pharma, Braine, L'Alleut, Belgium). To ensure time and volume compatibility with the HHC, the rest of the liquid volume applied throughout the first clamp study was substituted by an adequate amount of drinking water.

2.2.4. Study 4

The control clamp (CC) study consisted of infusion of saline and drinking of water time- and volume-matched to the HHC.

The mean plasma glucose concentration during study 1 was 17 ± 0.35 mmol/L with coefficients of variation lower than 5%. Because of the physiological stimulation of endogenous insulin secretion, the mean reactive plasma insulin concentration was 352.3 ± 66 µU/mL. Euglycemia (mean plasma glucose concentration, 4.7 ± 0.09 mmol/L with coefficients of variation <5%) and hyperinsulinemia (mean plasma insulin concentration, 57 ± 5 µU/mL) were maintained throughout study 2. Stable hyperglycemia (mean plasma glucose concentration, 16.4 ± 0.7 mmol/L with coefficients of variation <5%) was achieved in study 3 with endocrine insulin secretion blockade by somatostatin, resulting in a mean plasma insulin value of 23.8 ± 3.6 µU/mL. During the CC study (study 4), the mean plasma glucose concentration and mean plasma insulin value were 4.8 ± 0.12 mmol/L with coefficients of variation lower than 5% and 3.4 ± 0.5 µU/mL, respectively.

2.3. Analytical methods

The plasma glucose concentrations were measured on a Beckman Analyzer (Beckman Instruments, Fullerton, CA) using the glucose oxidase method. HbA_{1c} was evaluated by the Bio-Rad Haemoglobin A_{1c} Column Test (Bio-Rad Laboratories, Munich, Germany). Immunoreactive insulin was determined by radioimmunoassay using Immunotech Insulin IRMA kit (Immunotech, Prague, Czech Republic).

Phagocytosis of PMN cells was evaluated by flow cytometry using a commercially available quantitative test (Phagotest; Orpegen Pharma, Heidelberg, Germany). Phagocytosis of PMN cells was analyzed as described previously [35,36]. Phagotest measures the overall percentage of granulocytes showing phagocytosis—the ingestion of one or more bacteria per cell—as well as the individual cellular phagocytic activity (number of bacteria per cell).

One half of a heparinized whole-blood sample (100 µL per test) was incubated in an ice bath for 10 minutes as a negative control sample. The second half of the blood sample was incubated with fluorescein-labeled opsonized (with immunoglobulin and complement) bacteria *Escherichia coli* (*E coli* FITC opsonized 1×10^9 bacteria per milliliter) in a water bath at 37°C for 10 minutes. At the end of the incubation time, phagocytosis was stopped by placing all samples on ice and adding 100 µL of quenching solution. After washing with the washing solution, the erythrocytes were disrupted by adding 2 mL of the lysing solution to the blood samples. Finally, 200 µL of the staining solution was added to the samples, and the percent of the phagocytosing cells, as well as the intensity of the fluorescence per cell, was evaluated as described below.

Respiratory burst of PMN cells was evaluated by flow cytometry using a commercially available test (Bursttest; Orpegen Pharma, Heidelberg, Germany). The test measures the percentage and the enzymatic activity of the ROI-producing PMN cells. Bursttest uses unlabelled opsonized *E coli* (a particulate stimulants) for PMN stimulation. *Escherichia coli* was chosen as a more physiological stimulants with closer relation to infection.

Respiratory burst of the PMN cells was analyzed as described previously [35,36]. Briefly, mixed heparinized blood (100 µL per test) was incubated in an ice bath for 10 minutes to cool the blood samples to 0°C. Half of the whole blood was mixed with 20 µL of precooled *E coli*. The nonstimulated sample served as a negative background control. Next, 20 µL of washing solution was added. After mixing, the samples were incubated in a water bath at 37°C for 10 minutes. After that, 20 µL of substrate solution (dihydrorhodamine 123; DHR123) was added and incubated for another 10 minutes at 37°C. At the end of the incubation, the blood samples were lysed and fixed with 2 mL lysing solution, then washed and supplemented with 200 µL DNA staining solution. Measurements of the cell suspensions were done using the flow cytometer, as described below, within 30 minutes after 10 minutes of incubation with the staining solution.

Comparisons of blood count changes found after each clamp study with those detected during the CC study showed significantly reduced amounts of leukocytes after the HHC (Δ leukocytes after the HHC vs after the CC, 1.17 vs 0.19; $P < .05$) and after the HGC (Δ leukocytes after the HGC vs after the CC, 1.12 vs 0.19; $P < .05$). These results did not influence the percentage and mean fluorescent intensity of phagocytosing and active PMN cells measured by flow cytometry, as approximately 10 000 PMN cells from each blood sample were taken to perform the measurement of activity of PMN phagocytosis and respiratory burst.

2.4. Analysis of PMN functions by flow cytometry

Percentage of phagocytic PMN cells, mean fluorescent intensity of the labeled phagocytosing PMN cells, and percentage and mean fluorescent intensity of cells with

Table 1

The phagocytosis of PMN cells measured under basal conditions before and after HHC, HEC, isolated HGC, and CC studies

Phagocytic parameters	A. Basal phagocytic parameters before and after individual clamp studies							
	Type of clamp							
	HHC		HEC		HGC		CC	
	Before clamp (n = 12)	After clamp (n = 12)	Before clamp (n = 12)	After clamp (n = 12)	Before clamp (n = 12)	After clamp (n = 12)	Before clamp (n = 12)	After clamp (n = 12)
MP of phagocytosing PMN cells (%)	12.1 ± 4.4	6.7 ± 1.3*	7.3 ± 1.7	7.5 ± 1.5	9.9 ± 2.1	4.5 ± 1.8*	7.8 ± 2.2	5.8 ± 1.8
MFI of phagocytosing PMN cells	389 ± 121	392 ± 70	214 ± 122	341 ± 152	177 ± 98	167 ± 93	418 ± 142	427 ± 139
Phagocytic indexes	14.6 ± 1.2	13.2 ± 1.1	35.8 ± 18.6	115.1 ± 65*	65.5 ± 40.6	65 ± 40.8	176 ± 67.3	122.5 ± 37

B. A comparison of the changes in phagocytic parameters assessed during clamp studies with those found during the CC study

Changes of parameters	Type of clamp			
	HHC	HEC	HGC	CC
ΔMP of phagocytosing PMN cells	-5.4 ± 4	0.27 ± 1.8	-5.1 ± 2	-1.1 ± 2.3
ΔMFI of phagocytosing PMN cells	2.84 ± 96	126.5 ± 150	3.3 ± 6	-27 ± 151
ΔPhagocytic indexes	1.5 ± 0.83	-87.2 ± 68.8	0.1 ± 0.7	18.5 ± 32

Results are means ± SE. MFI indicates mean fluorescent intensity; MP, mean percentage; Δ, change in parameters before and after the clamp study.

* $P < .05$; statistically significant changes after HHC and HGC clamps in comparison with parameters found before HHC and HGC clamps, respectively; other parameters are not significant.

oxidative burst were measured in the blood samples with the use of the FACSCalibur (Becton-Dickinson, San Jose, CA) flow cytometer equipped with a laser beam emitting 488 nm of blue-green light. For the analyses of blood leukocytes from the samples (at least 10000 cells per sample), the CellQuest software (BDIS, CA) was used. The fluorescence was estimated using histograms from the FL2 channel. The power of the study was less than 80%.

2.5. Data analysis

Polymorphonuclear functions (phagocytosis and respiratory burst) under basal conditions (activity of negative samples) and after *E. coli* stimulation in the pre- and postclamp periods were compared. Phagocytic and respiratory burst indexes related to PMN functions were calculated (mean fluorescent intensity of phagocytosing or active PMN

Table 2

The phagocytosis of PMN cells measured after *E. coli* stimulation before and after HHC, HEC, isolated HGC, and CC studies

Stimulated parameters	A. Stimulated phagocytic parameters before and after individual clamp studies							
	Type of clamp							
	HHC		HEC		HGC		CC	
	Before clamp (n = 12)	After clamp (n = 12)	Before clamp (n = 12)	After clamp (n = 12)	Before clamp (n = 12)	After clamp (n = 12)	Before clamp (n = 12)	After clamp (n = 12)
MP of phagocytosing PMN cells (%)	81.9 ± 3.9	81.6 ± 4.5	59.4 ± 9.6	56.4 ± 7.7	66 ± 8.8	69.5 ± 4.5	60 ± 6.8	57.3 ± 7.4
MFI of phagocytosing PMN cells	1268 ± 214	1333 ± 247	1018 ± 219	638 ± 196	1159 ± 445	653 ± 215	1129 ± 198	1240 ± 145
Phagocytic indexes	104.4 ± 28.8	78.7 ± 21.7	362 ± 98	349.5 ± 92	451 ± 87	429 ± 38.2	417 ± 84.2	410.3 ± 81.1

B. A comparison of the changes in phagocytic parameters assessed during clamp studies with those found during the CC study

Changes in parameters	Type of clamp			
	HHC	HEC	HGC	CC
ΔMP of phagocytosing PMN cells	-0.3 ± 1.1	4.8 ± 5	-3.1 ± 0.5	-2.4 ± 1.7
ΔMFI of phagocytosing PMN cells	65.4 ± 113	-156 ± 57	-193.8 ± 27	-26.9 ± 59
ΔPhagocytic indexes	31.1 ± 41.6	16.6 ± 11.1	21.3 ± 48.1	13.4 ± 40.7

Results are means ± SE. No parameters are significant.

Table 3

The respiratory burst of PMN cells measured under basal conditions before and after HHC, HEC, isolated HGC, and CC studies

Basal parameters	A. Basal parameters of respiratory burst before and after individual clamp studies							
	Type of clamp							
	HHC		HEC		HGC		CC	
	Before clamp (n = 12)	After clamp (n = 12)	Before clamp (n = 12)	After clamp (n = 12)	Before clamp (n = 12)	After clamp (n = 12)	Before clamp (n = 12)	After clamp (n = 12)
MP of active PMN cells (%)	4.5 ± 1.4	2.5 ± 0.4	2.9 ± 0.7	2.1 ± 0.6	3.9 ± 1	6.8 ± 2.6	3.4 ± 1.1	3.1 ± 1.1
MFI of active PMN cells	288 ± 53	300 ± 66	501 ± 95	678 ± 156	475 ± 116	494 ± 173	516 ± 128	684 ± 175
Respiratory burst indexes	14.6 ± 1.2	13.2 ± 1.1	10.1 ± 1.4	16.5 ± 3*	14.6 ± 3.1	17.3 ± 3.5	10.1 ± 1.3	11.9 ± 2.3

B. A comparison of the changes in respiratory burst parameters assessed during clamp studies with those found during the CC study

Changes in parameters	Type of clamp			
	HHC	HEC	HGC	CC
ΔMP of active PMN cells	-2 ± 1.4	-0.8 ± 0.7	2.8 ± 1.7	-0.3 ± 1
ΔMFI of active PMN cells	12.1 ± 60	177.5 ± 104	6.6 ± 92	168.2 ± 106
ΔRespiratory burst indexes	1.7 ± 0.9	-5.0 ± 3.3	0.7 ± 3.8	-2.9 ± 2.1

Results are means ± SE. No parameters are significant.

cells divided by mean fluorescent intensity of nonphagocytosing or nonactive PMN cells). The HHC, HIC, and HGC studies were also compared with the time- and volume-controlled saline infusion.

The statistical data analysis was performed by the BMDP PC 90 statistical software (Los Angeles, CA). The comparison of data and indexes evaluated before and after each clamp study was performed by paired Wilcoxon test in each healthy subject, and the comparison of data changes among clamp studies was performed by Kruskal-Wallis test in each healthy subject. The Spearman rank correlation coefficient

was used to determine any significant correlation between assessed data. All data are expressed as means ± SE. All results including indexes were also analyzed after logarithmic transformation of non-Gaussian distributed data. *P* values of less than .05 were considered significant.

3. Results

We found significant reductions in the mean percentage of phagocytosing PMN cells measured under basal conditions after the HHC (*P* < .05) and after the HGC (*P* < .05;

Table 4

The respiratory burst of PMN cells measured after *E. coli* stimulation before and after HHC, HEC, isolated HGC, and CC studies

Stimulated parameters	A. Stimulated parameters of respiratory burst before and after individual clamp studies							
	Type of clamp							
	HHC		HEC		HGC		CC	
	Before clamp (n = 12)	After clamp (n = 12)	Before clamp (n = 12)	After clamp (n = 12)	Before clamp (n = 12)	After clamp (n = 12)	Before clamp (n = 12)	After clamp (n = 12)
MP of active PMN cells (%)	89.6 ± 5.3	89.8 ± 4.8	91.1 ± 3.3	79.4 ± 8.9	82.6 ± 7	91.2 ± 2.7	90 ± 3.5	89.4 ± 2.5
MFI of active PMN cells	2850 ± 508	2620 ± 476	2487 ± 353	2407 ± 307	1906 ± 358	1662 ± 287	3045 ± 344	2886 ± 393
Respiratory burst indexes	104.4 ± 28.8	78.7 ± 21.7	52.9 ± 25.4	45 ± 14.5	36.9 ± 14.8	38.3 ± 14.2	37 ± 9.6	40.1 ± 12.5

B. A comparison of respiratory burst parameters assessed during clamp studies with those found during the CC study

Changes in parameters	Type of clamp			
	HHC	HEC	HGC	CC
ΔMP of active PMN cells	0.7 ± 4.4	-11.7 ± 8.8	10.3 ± 7.1	-0.5 ± 2.4
ΔMFI of active PMN cells	-107 ± 212	-80.3 ± 83	-238 ± 198	-158.5 ± 389
ΔRespiratory burst indexes	29.7 ± 35.3	-1.8 ± 21.5	1.3 ± 9.1	-7.1 ± 9.4

Results are means ± SE. No parameters are significant.

Table 1A). Other phagocytic parameters of PMN cells assessed after individual clamp studies under basal conditions were not significantly different from those found before the clamp studies (Table 1A). However, the changes in basal phagocytic PMN parameters evaluated during individual clamp studies did not differ significantly from those of the CC study (Table 1B).

Other parameters of phagocytosing PMN cells measured after *E coli* stimulation (Table 2A) were not influenced by acutely induced hyperglycemia and/or hyperinsulinemia during provided clamp studies. Similar to differences in basal PMN phagocytic parameters, the changes in PMN phagocytic parameters before and at the end of the HHC, HEC, HGC, and the CC studies measured after *E coli* stimulation were not statistically different as shown in Table 2B.

The measurements of respiratory burst of PMN cells under basal conditions before and after each clamp study did not differ significantly (Table 3A); their respective changes during the HHC, HEC, and HGC were not significantly different from the results of the CC study (Table 3B). The mean percentage and mean fluorescent intensity of active PMN cells measured after *E coli* stimulation before and after each clamp study did not differ significantly (Table 4A), and their differences under stimulated conditions were not statistically different either from those detected during CC (Table 4B).

Significantly higher phagocytic indexes and respiratory burst indexes evaluated under basal conditions were found after the HEC ($P < .05$). However, these indexes were not significantly different from those found after the CC study (Tables 1 and 3).

All indexes elucidating the activity of phagocytosis and respiratory burst measured after *E coli* stimulation were not statistically different before and after each study clamp. Moreover, their comparison with indexes detected during CC did not differ significantly, even after logistic transformation (Tables 2 and 4).

4. Discussion

The aim of our study was to determine whether short-lasting hyperglycemia and/or hyperinsulinemia induced under defined conditions during clamp studies could influence the immune functions of PMN cells in healthy subjects *in vivo*. The design of our study was based on theoretical pathophysiological presumptions and on results of previous experimental *in vitro* studies. To the best of our knowledge, studies performing under exactly defined conditions during clamp studies have not been published yet.

Based on pathophysiological aspects, we presumed a prevailing negative effect of hyperglycemia on phagocytosis and especially on respiratory burst of PMN cells. There exist some hypotheses of pathophysiological action of higher glucose and insulin concentrations on metabolism and activity of PMN cells. They are, in some aspects, controversial.

Physiologically, superoxide radicals are formed during the respiratory burst from oxygen and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) molecules under catalyzed of NADPH oxidase [6]. Normally, 40% of glucose is metabolized through hexose monophosphate shunt in PMN cells. Hyperglycemia could induce the several-fold increase in glucose amounts metabolized via hexose monophosphate shunt. Reactive oxygen intermediate production increases proportionally with NADPH production increase [37]. Conversely, during severe hyperglycemia, saturation of hexokinase enzyme could appear. Afterwards, glucose is converted to sorbitol by an NADPH-dependent aldose reductase enzyme in the polyol pathway, in which NADPH is consumed by the aldose reductase enzyme and therefore ROI production decreases [17].

Based on experimental *in vitro* studies performed on PMN cells from healthy subjects after short-term exposition to hyperglycemia, we suspected various impairments of PMN functions. Cendoroglo et al [27] proved that incubation of PMN cells from healthy subjects in media with high glucose concentrations, comparable to concentrations in dialysis fluids, inhibited phagocytosis and respiratory burst after 30 minutes of incubation. An inhibition of phagocytosis and unaffected activity of respiratory burst (irrespective of glucose concentration or fluid osmolality) after exposition of PMN cells from healthy subjects to high glucose concentrations (25 mmol/L) and hyperosmolality of peritoneal fluids has been shown by Liberek et al [38]. Nielson and Hindson [39] showed an impairment of respiratory burst of preincubated PMN cells from healthy subjects in dependence on increasing glucose concentration (11–56 mmol/L) during 30 minutes of incubation *in vitro*.

In our study, we have not found any significant effect of acute short-lasting hyperglycemia (17 mmol/L) on PMN functions, neither on phagocytosis or on respiratory burst of PMN cells. Compensatory effect of both the abovementioned pathophysiological mechanisms participating in ROI production might be involved.

Similarly to hyperglycemic conditions, we did not find any significant effect of short-lasting hyperinsulinemia on immune functions of PMN cells in healthy subjects.

Based on previously reported studies, we supposed that insulin could activate the main PMN functions through specific binding of insulin to its PMN membrane receptor [40,41]. Moreover, as described earlier, insulin was able to increase *in vitro* glucose consumption of PMN cells from nondiabetic human subjects without influencing the permeability of the plasma membrane to glucose [42]. Spagnoli et al [43] confirmed the activation of PMN functions induced by high insulin concentrations. On the other hand, Hu et al [44] showed that insulin attenuated PMN respiratory burst.

Similar to our results, Safronova et al [40] showed that insulin did not change the basal PMN production of ROI after 60 minutes of PMN cell incubation in different insulin concentrations in the medium. However, the authors reported that insulin could modulate the stimulated respiratory burst

parameters via tyrosine phosphorylation in dependence on temperature and pretreatment of PMN cells with insulin.

A recent study performed by Walrand et al [18] assessed, as in our clamp study, the effect of hyperinsulinemia on PMN cells from healthy subjects in vivo. In contrast to our study, increased chemotaxis, phagocytosis, and bactericidal capacities were found after 4 hours of HEC in healthy subjects [18]. We also found significantly higher phagocytic and respiratory burst indexes after HEC; however, these data did not differ from those detected after the CC study. The differences between Walrand's study and ours consisted in the lower plasma insulin levels used during Walrand's study in comparison with our HEC (46 vs 60 mU/L) and in the different methods assessing PMN functions. In contrast to our study, Walrand et al did not perform a comparison of detected data with data evaluated after the CC study with saline infusion; the effect of time and volume expansion was not excluded. *Escherichia coli*, which serves as a stimulant in our study, is more physiological than formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP) and phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) used in Walrand's study [18].

There are many differences between studies performed in vivo evaluating the effect of short-lasting hyperglycemia and/or hyperinsulinemia and experimental in vitro studies. Experimental in vitro studies used considerably higher glucose concentrations (11–56 mmol/L) for testing, in comparison with high glucose levels typical in human medicine. In our study, we tested a high glucose serum level (17 mmol/L), which is more realistic in clinical practice. Moreover, the evaluations performed in vitro do not correspond to physiological regulation mechanisms compensating for the effect of acute hyperglycemia and hyperinsulinemia on PMN functions in humans such as mechanisms mediated by secondary messengers, that is, intracellular calcium, tyrosine kinase, enzymes of hexosomonophosphate shunt, scavenger system represented by, for example, superoxidizedismutase and at least by cytokines.

Limitations of our study include variations of detected parameters of phagocytosis and respiratory burst, which have been corrected by adequate statistical methods. We cannot exclude less evident changes in PMN functions with short-term changes in glucose or insulin, which can be detectable in more study subjects. The degree of PMN function decreased unambiguously, which is considered as being of clinical importance as it occurs very rarely. It is represented by chronic granulomatous disease, lazy-leukocyte syndrome, myeloperoxidase deficiency, deficiency of leukocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase, and by genetically transferred metabolic diseases. All mentioned diseases are demonstrated usually by repeated serious infections and have obvious pathological results based on Phagotest and Bursttest. Such abnormalities were not found in any of the volunteers from our clamp study [45].

In summary, we did not find any significant alteration of phagocytosis and respiratory burst of PMN cells in the healthy subjects during acutely induced short-lasting hyperglycemia

and/or hyperinsulinemia in vivo in comparison with the CC with saline infusion. Although there were found elevated phagocytic and respiratory burst indexes after short-lasting isolated hyperinsulinemia and reduced percentages of phagocytosing PMN cells after short-lasting hyperglycemia and hyperinsulinemia or isolated hyperglycemia measured under basal conditions, these abnormalities were not proved in comparison with the CC study with saline infusion.

In conclusion, the main benefit of our study is the fact that the effect of acute hyperglycemia and/or hyperinsulinemia on immune functions of PMN cells was studied in healthy subjects in vivo under conditions that may reflect diabetes-related mechanisms better than in vitro experiments. We believe that our results encourage further studies to evaluate possible mild changes in immune functions of PMN cells.

Acknowledgment

This study was supported by grant MZO 00023001 from the Ministry of Health, Czech Republic. The assistance of Mrs Lapešová and Mrs Šišáková in performing all clamp studies is gratefully acknowledged.

References

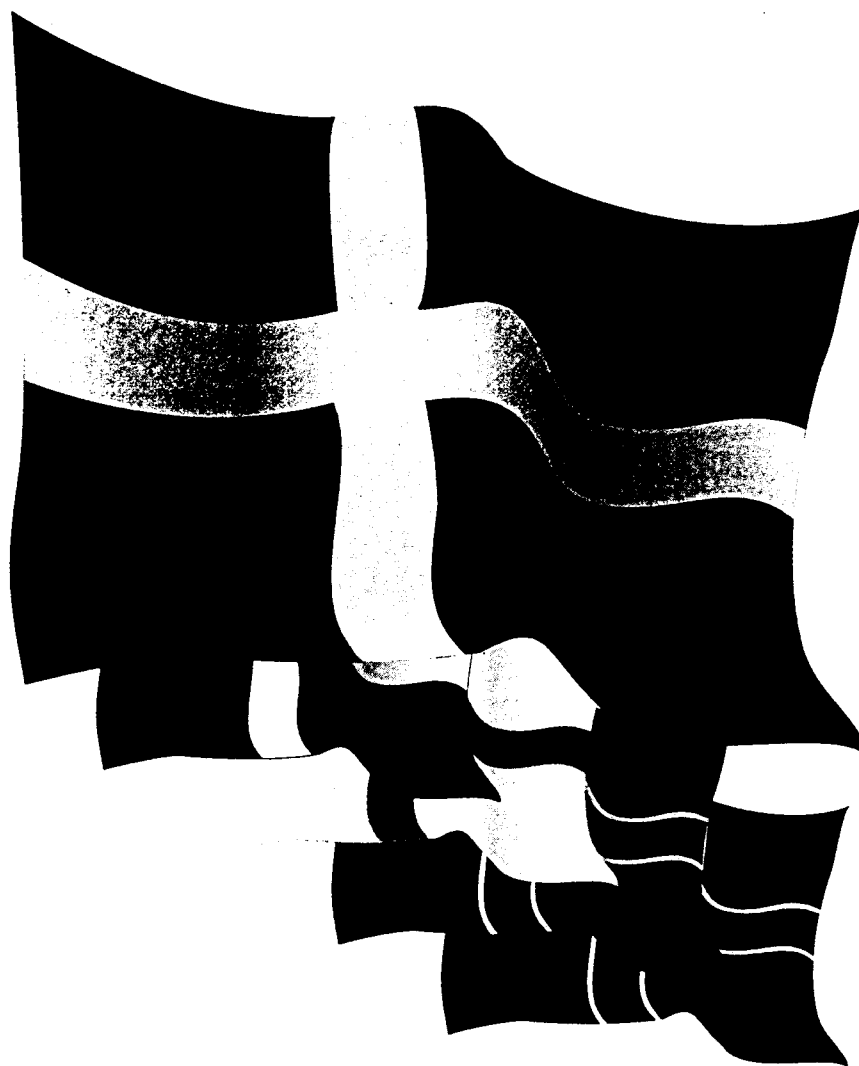
- [1] Roitt IM, Brostoff J, Male DK. Immunology. 4th ed. London: Gower Medical Publishing Ltd; 1996.
- [2] Sawyer DW, Donowitz GR, Mandell GL. Polymorphonuclear neutrophils: an effective antimicrobial force. *Rev Infect Dis* 1989; 11:S1532–44.
- [3] Furukawa S, Saito H, Matsuda T, et al. Relative effects of glucose and glutamin on reactive oxygen intermediate production by neutrophils. *Shock* 2000;13:274–8.
- [4] Miller ME. Phagocytic cell functions in diabetes mellitus. In: Gupta S, editor. Immunology of clinical and experimental diabetes. New York: Plenum; 1984. p. 369–83.
- [5] Johnson RB, Newman SL. Chronic granulomatous disease. *Pediatr Clin North Am* 1977;24:365–76.
- [6] Reeves WG, Wilson RM. Infection, immunity and diabetes. In: Alberti KGMM, DeFronzo RA, Keen H, Zimmet P, editors. International textbook of diabetes mellitus. Chichester (UK): Wiley; 1992. p. 1165–71.
- [7] Clark RA, Szot S. Chemotactic factor inactivation by stimulated human neutrophils mediated by myeloperoxidase-catalyzed methionine oxidation. *J Immunol* 1982;128:1507–13.
- [8] Fialkow L, Chan CK, Grinstein S, et al. Regulation of tyrosine phosphorylation in neutrophils by the NADPH oxidase. Role of reactive oxygen intermediates. *J Biol Chem* 1993;268:17131–7.
- [9] Murray HW, Spitalny GL, Nathan CF. Activation of mouse peritoneal macrophages in vitro and in vivo by interferon-gamma. *J Immunol* 1985;134:1619–22.
- [10] Donadebian HD. Congenital and acquired neutrophil abnormalities. In: Klempner MS, editor. Phagocytes and disease. Dordrecht: Kluwer; 1989. p. 103–18.
- [11] Robinson JP, Carter WO. Flow cytometric analysis of granulocytes. In: Bauer KD, editor. Clinical flow cytometry, principles and applications. Baltimore: Williams and Wilkins; 1993. p. 405–33.
- [12] Mowat AG, Baum J. Chemotaxis of polymorphonuclear leukocytes from patients with diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1971;284:621–7.
- [13] Bagdade JD, Stewart M, Walters E. Impaired granulocyte adherence. A reversible defect in patients with poorly controlled diabetes mellitus. *Diabetes* 1978;27:677–81.

- [14] Shah SV, Wallin JD, Eilen SD. Chemiluminescence and superoxide anion production by leukocytes from diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab* 1983;57:402-9.
- [15] Delamaire M, Maugendre D, Moreno M, et al. Impaired leukocyte functions in diabetic patients. *Diabet Med* 1997;14:29-34.
- [16] Vučić M, Gavella M, Božikov V, et al. Superoxidedismutase activity in lymphocytes and polymorphonuclear cells of diabetic patients. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1997;35:517-21.
- [17] Wilson RM, Tomplinson DR, Reeves WG. Neutrophil sorbitol production impairs oxidative killing in diabetes. *Diabet Med* 1987;4:37-40.
- [18] Walrand S, Guillet C, Boirie Y, et al. In vivo evidences that insulin regulates human polymorphonuclear neutrophil functions. *J Leukoc Biol* 2004;76:1104-10.
- [19] Esmann V, Solling H, Juhl H. Allosteric and covalent control of glycogen synthase from leukocytes. *Int J Biochem* 1981;13:1123-6.
- [20] Sentochnik DE, Eliopoulos GM. Infection and diabetes. In: Zahn CR, Weir GC, editors. *Joslin's diabetes*. 13th ed. Philadelphia: Lea and Febiger; 1994. p. 867-88.
- [21] Pozzilli P, Leslie RDG. Infections and diabetes: mechanisms and prospects for prevention. *Diabet Med* 1994;11:935-41.
- [22] Bessman AN, Sapico FL. Infections in diabetic patients: the role of immune dysfunction and pathogen virulence factors. *J Diabetes Complications* 1992;6:258-62.
- [23] Marthoffer W, Stein M, Maeser E, et al. Impairment of polymorphonuclear leukocyte function and metabolic control of diabetes. *Diabetes Care* 1992;15:256-9.
- [24] Sato N, Shimizu H, Suwa K, et al. MPO activity and generation of active O₂ species in leukocytes from poorly controlled diabetic patients. *Diabetes Care* 1992;15:1050-2.
- [25] Boland OM, Blackwell CC, Clarke BF, Ewing DJ. Effects of ponalrestat, an aldose reductase inhibitor, on neutrophil killing of *Escherichia coli* and autonomic function in patients with diabetes mellitus. *Diabetes* 1993;42:336-40.
- [26] Llorente L, De La Fuente H, Richaud-Patin Y, et al. Innate immune response mechanisms in non-insulin dependent diabetes mellitus patients assessed by flow cytometry. *Immunol Lett* 2000;74:239-44.
- [27] Cendoroglo M, Sundaram S, Jaber BL, et al. Effect of glucose concentration, osmolality, and sterilization process of peritoneal dialysis fluids on cytokine production by peripheral blood mononuclear cells and polymorphonuclear cell functions in vitro. *Am J Kidney Dis* 1998;31:273-82.
- [28] Lin X, Candlish JK, Thai AC. Superoxide production by neutrophils from diabetics and normal subjects in response to glucose and galactose. *Exp Mol Pathol* 1993;58:229-36.
- [29] Tebbs SE, Lumbwe CM, Tesfaye S, et al. The influence of aldose reductase on the oxidative burst in diabetic neutrophils. *Diabetes Res Clin Prac* 1992;15:121-30.
- [30] Thomson GA, Fisher BM, Gemmel CG, et al. Attenuated neutrophils respiratory burst following acute hypoglycemia in diabetic patients and normal subjects. *Acta Diabetol* 1997;34:253-6.
- [31] World Health Organization Expert Committee. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Report of WHO consultation: Part 1. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Geneva (Switzerland): WHO; 1999.
- [32] DeFronzo RA, Tobin JD, Andres R. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol* 1979;237:214-23.
- [33] Pelikánová T, Kazdová L, Chvojková Š, et al. Serum phospholipid fatty acid composition and insulin action in type 2 diabetic patients. *Metabolism* 2001;50:1472-8.
- [34] Beatty OL, Harper R, Sheridan B, et al. Insulin resistance in offspring of hypertensive parents. *BMJ* 1993;307:92-6.
- [35] Grzybowski J, Janiak MK, Oidak E, et al. New cytokine dressings: II. Stimulation of oxidative burst in leukocytes in vitro and reduction of viable bacteria within an infected wound. *Int J Pharm* 1999;184:179-87.
- [36] Shalekoff S, Tiemessen CT, Gray CM, et al. Depressed phagocytosis and oxidative burst in polymorphonuclear leukocytes from individuals with pulmonary tuberculosis with or without human immunodeficiency virus type 1 infection. *Clin Diagn Lab Immunol* 1998;5:41-4.
- [37] Rosse W, Bunn HF. Hemolytic anemias and acute blood loss. In: Fauci AS, editor. *Harrison's principles of internal medicine*. USA: McGraw-Hill; 1998. p. 659-72.
- [38] Liberek T, Topley N, Jorres A, et al. Peritoneal dialysis fluid inhibition of phagocyte function: effect of osmolality and glucose concentration. *J Am Soc Nephrol* 1993;3:1508-15.
- [39] Nielson CP, Hindson DA. Inhibition of polymorphonuclear leukocyte respiratory burst by elevated glucose concentrations in vitro. *Diabetes* 1989;38:1031-5.
- [40] Safronova VG, Gabdoulkhakova AG, Miller AV, et al. Variations of the effect of insulin on neutrophil respiratory burst. The role of tyrosine kinases and phosphatases. *Biochemistry* 2001;66:840-9.
- [41] Cavalot F, Anfossi G, Russo I, et al. Insulin, at physiological concentrations, enhances the polymorphonuclear leukocyte chemotactic properties. *Horm Metab Res* 1992;24:225-8.
- [42] Esmann V. The polymorphonuclear leukocyte in diabetes mellitus. *J Clin Chem Clin Biochem* 1983;21:561-7.
- [43] Spagnoli A, Spadoni GL, Sesti G, et al. Effect of insulin on hydrogen peroxide production by human polymorphonuclear leukocytes. Studies with monoclonal anti-insulin receptor antibodies, and an agonist and an inhibitor of protein kinase C. *Horm Res* 1995;43:286-93.
- [44] Hu H, Hjendahl P, Li N. Effects of insulin on platelet and leukocyte activity in whole blood. *Thromb Res* 2002;107:209-15.
- [45] Stites DP, Terr AI. *Basic and clinical immunology*. 8th ed. Stamford: Appleton and Lange; 1994.



11th International Congress of Immunology

Abstracts for Friday 27 July, 2001



Published as a supplement to the
Scandinavian Journal of Immunology
Volume 54, Supplement 1, July/August 2001

A6.Fri.4.10/783 ACUTE INFLAMMATION MODULATES RESISTANCE TO SALMONELLA TYPHIMURIUM IN MICE BEARING NRAMP1 S ALLELE.

Andrea Borrego¹, Marcelo De Franco¹, Orlando Ribeiro Filho¹, Maria Siqueira¹, Wafa Cabrera¹, Nancy Starobinas¹, Michel Seman², Olga Ibañez¹. ¹Instituto Butantan, Sao Paulo, Brazil, ²Universite Paris 7. Two lines of mice genetically selected for maximal (AIRmax) or minimal (AIRmin) acute inflammatory reaction (AIR) differ significantly in susceptibility to Salmonella typhimurium (S. tm.) infection. In AIRmax the LD50 of the bacteria is 1000 times greater than in AIRmin mice and Nramp1 alleles frequencies were different in these lines. In order to evaluate the effect of the Quantitative Trait Loci (QTL) fixed in AIR selective process on S. tm. susceptibility dependent on Nramp1, AIR sublines for Nramp1 alleles were produced: AIRmax RR, AIRmax SS, AIRmin RR and AIRmin SS. No changes in AIR parameters were observed between AIRmax RR and SS, or AIRmin RR and SS, indicating that Nramp1 gene cannot modulate AIR. However, a significant modulation of Nramp1 S effect on S. tm. susceptibility was observed. AIRmax SS mice present LD50 800-times higher than AIRmin SS. These results show that AIR QTL can act as modifiers of a major susceptibility gene as Nramp1 S, evidencing these sublines as an interesting experimental model to approach protocols of intracellular infection diseases. Acknowledgement to FAPESP and CNPq.

A6.Fri.4.10/786 EFFICACY OF DNA VACCINES ENCODING Toxoplasma gondii SAG1 AND ROP2 PROTEINS IN PROTECTION AGAINST TOXOPLASMOSES IN BALB/c AND HLA B7 TRANSGENIC MICE

Michael J. Kirisits¹, Elaine O. Petrof¹, Ernest J. Mui¹, Rima McLeod¹. ¹University of Chicago, IL, USA.

Toxoplasma gondii is a protozoan parasite that causes neurologic damage, blindness, and mortality in immunocompromised and congenitally infected individuals. Studies are being performed to characterize immunologic mechanisms protective against *T. gondii* infection and to identify *T. gondii* proteins that will be useful as vaccine components. DNA sequences encoding the SAG1 or ROP2 proteins of *T. gondii* were cloned into an expression vector plasmid and Northern blot analysis demonstrated that transcripts of interest could be detected following *in vitro* transfection of mouse myoblasts. The results of Western blot studies and agglutination assays revealed that antibodies specific to SAG1 or ROP2 were elicited in BALB/c mice that were immunized with DNA constructs encoding these *T. gondii* proteins. Using our recently developed competitive PCR assay system, it was determined that immunization of BALB/c mice with the SAG1 or ROP2 DNA constructs conferred some protection against *T. gondii* as measured by reduced parasitemia following peroral infection with *T. gondii* cysts. The effect of immunization of HLA B7 transgenic mice with the DNA constructs encoding the SAG1 and ROP2 proteins of *T. gondii* is being analyzed. The ability of the vaccinated mice to resist peroral infection with *T. gondii* cysts is being tested by measuring parasitemia, cyst number in the brain, and survival time.

A6.Fri.4.10/784 EXPRESSION OF THE 47kDa GTPASE IIGP IN INFECTION SUGGEST A ROLE IN THE NON-ADAPTIVE PHASE OF AN IMMUNE RESPONSE

Jens Zerrahn¹, Ulrich Schaible¹, Frank Brinkmann¹, Frank Kaiser¹, Stefan H.E. Kaufmann¹. ¹Max-Planck-Inst. for Infectionbiol, Berlin, Germany.

It is becoming increasingly clear that non-adaptive immune mechanisms contribute to the resistance against viral and bacterial infections. Members of the 47kDa GTPase-family seem to exert innate immune functions against intracellular pathogens. Mice deficient for IGTP are susceptible to infection with *Toxoplasma gondii*. However, the definitive function of these GTPases is not known. A member of the 47kDa GTPase family, namely IIGP, was cloned from a cDNA library, representative of genes that are upregulated in the immediate early phase of infection of mice with *Listeria monocytogenes*. In macrophages IIGP mRNA expression is induced by IFN α , IFN γ , and bacterial constituents. An anti-IIGP monoclonal antibody was raised and confocal microscopy revealed a predominant association of IIGP with the Golgi apparatus. This is in contrast to the predominant ER association of IGTP and suggests a distinct regulatory role in protein processing or trafficking governed by these GTPases upon interferon mediated cellular stimulation. Analysis of splenic sections from *L. monocytogenes* infected mice revealed maximal expression of IIGP at day 3, predominantly in cells of the marginal zone, presumably macrophages, and in endothelial cells. Unexpectedly, the majority of resident red pulp macrophages remain negative for IIGP expression. Currently we are trying to identify interacting proteins to gain more insights into the mechanistic aspects of IIGP function.

A6.Fri.4.10/787 INVOLVEMENT OF CD5 (B-1) CELLS IN MICE VACCINATED WITH CL-14 CLONE OF Trypanosoma cruzi.

M.A. Silva¹, C.N. Paiva², H.L. Lenzi³, C.R. Gattass², M.T.L. Castelo-Branco¹. ¹ICB-UFRJ, ²IBCCF-UFRJ, ³IOC-Brazil.

Mice inoculated with trypomastigotes of CL-14 clone developed "milky spots" (MS) (coelom associated lymphomieloid tissue) reactivity. We studied the activation of peritoneal and MS cells investigating T and B population and their subsets. The cellular composition of the MS was investigated on peripancreatic omentum removed from BALB/c mice inoculated with CL-14 clone. Most of the cells were B lymphocytes with diffuse localization. We found IgM and IgG positive cells in the periphery while IgA and CD5+ cells were concentrated in the central area of MS. CD3+, CD4+ and CD8+ were also present. Peritoneal cells were analysed by FACS and confocal microscopy. As shown by others we found that B-1 cells typically constitute > 80% of the peritoneal B cells. In BALB/c mice vaccinated with CL-14 clone, peritoneal B1a and B1b cells were characterized as CD5+ or CD5-, respectively, B220lo, IgMhi, IgDlo, CD23-, and Mac1+. The proportion of CD5+ (B1a) cells were reduced as compared with controls. As described for BALB.Xid mice which lacks CD5 B cells, the disappearance of B1 cells in mice inoculated with CL-14 clone suggests the involvement of these cells on parasite clearance. The role of the omentum milky spots as a defence mechanism remains open to discussion, but the MS activation in the absence of tissue parasitism suggests that these structures could be involved in parasite removal. Supported by PRONEX-MCT, FUJB, CNPq and FAPERJ.

A6.Fri.4.10/789 DIFFERENT REQUIREMENTS FOR IL-4 BY TWO INBRED STRAINS OF MICE IN CONTROL OF Cryptosporidium parvum INFECTION

Clare Notley¹, Stuart McDonald¹, John O'Grady², James Alexander³, Frank Brombacher⁴, Vincent McDonald¹. ¹St Barts Royal London School of Medicine, UK, ²University of Strathclyde, Dept Immunology, UK, ³University of Strathclyde, Dept Immunology, UK, ⁴University of Cape Town School of Medicine, Dept Immunology, South Africa.

Cryptosporidium parvum, the causative agent of cryptosporidiosis, reproduces within gut epithelial cells. In murine infection models, immunity involves a Th1 response, but the role of the Th2 pathway is unclear. The role of IL-4 in immunity to *C. parvum* was examined using as hosts newborn mutant mice lacking functional IL-4 (IL-4 KO) or the IL-4 receptor chain α (IL-4R α KO) which produces a deficiency in IL-4 and IL-13 function. The patterns of oocyst excretion measured in colonic contents of C57BL/6 IL-4 KO and C57BL/6 wild-type (WT) mice differed little throughout the infection. However, BALB/c WT mice differed significantly fewer oocysts than BALB/c IL-4 KO or IL-4R α KO mice during the acute phase of infection. In addition, oocyst excretion was detected at an earlier stage in IL-4R α KO mice than in WT mice. WT BALB/c and C57BL/6 strains had similar patterns of oocyst excretion. The results suggest that in BALB/c, but not in C57BL/6, the early control of infection involves IL-4, and possibly IL-13. Further studies are necessary to determine whether these cytokines interact with the required Th1 response.

A6.Fri.4.10/785 EFFECT OF HYPERGLYCEMIA AND HYPERINSULINEMIA ON PHAGOCYTOSIS AND RESPIRATORY BURST OF POLYMPHONUCLEAR CELLS (PMN) IN HEALTHY SUBJECTS.

Fejfarová V.¹, Hosová J.¹, Jirkovská A.¹, Kalanin J.¹, Pelikánová T.¹, Striz I.¹, Skibová J.¹. ¹Inst. for Clinical and Exp. Medicine, Prague, Czech.

High medium concentration of glucose impairs some functions of PMN *in vitro*. Aim of our study was to evaluate effect of hyperglycemia and hyperinsulinemia on phagocytosis and respiratory burst of PMN *in vivo*. Methods: Our study was performed on 10 healthy subjects (mean age 27 years, mean BMI 24 kg/m²). 4 hours acute hyperglycemia (17 mmol/l) was induced by hyperglycemic hyperinsulinemic clamp (HHC) or by hyperglycemic clamp with insulin secretion blockade (HC). For isolated 4 hours hyperinsulinemia (60mU/l) was employed hyperinsulinemic euglycemic clamp (HEC). PMN phagocytosis (mean percentage (MP) of phagocytosing PMN, mean fluorescent intensity (MFI) of phagocytosing PMN) and respiratory burst (MP of activated PMN, MFI of activated PMN) were evaluated by flow cytometry under basal conditions and after *E. coli* stimulations (PHAGOTEST, BURSTTEST, Orpegen Pharma). Results were compared with control values found during time and volume compatible saline infusion. Results: No significant differences were found in observed parameters of PMN phagocytosis and respiratory burst before and after HHC, HC and HEC compared with control values. Conclusion: Immune functions of PMN from healthy subjects were not influenced by short-time hyperglycemia with hyperinsulinemia, by short-time isolated hyperglycemia or by short-time isolated hyperinsulinemia induced *in vivo*.

Visionary Commitment to Diabetes



The European Association for the Study of Diabetes

**Abstract Volume
of the 37th
Annual Meeting**

Hosted by



Glasgow

9-13 September
2001



GlaxoSmithKline

575

Effect of acutely induced hyperinsulinemia and hyperglycemia on phagocytosis and oxidative burst of polymorphonuclear cells in healthy subjects.

V. Fejfarova, J. Hosova, A. Jirkovska, J. Kalanin, T. Pelikanova, I. Striz, P. Boucek, J. Skibova

Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic

Background and Aims: High medium concentration of glucose impairs some functions of polymorphonuclear cells (PMN) in studies realized in vitro. The effect of in vitro induced hyperinsulinemia on immune functions has not been well documented yet. The aim of our study was to assess the effect of acutely induced hyperinsulinemia and/or hyperglycemia on phagocytosis and oxidative burst of PMN in vivo.

Materials and Methods: Our study was performed on 10 healthy subjects (mean age 27±6 years, mean BMI 24±3 kg/m²). Healthy subjects underwent four different 4 hours lasting clamp studies. Acute hyperinsulinemia and/or hyperglycemia (17 mmol/l) were induced by 1. hyperinsulinemic (60 mU/l) euglycemic clamp (HEC), 2. by hyperglycemic hyperinsulinemic clamp (HHC), 3. by hyperglycemic clamp with insulin secretion blockade (HC) following somatostatin application. As a control clamp study (4.), we used time and volume controlled saline infusion. PMN phagocytic activity (mean percentage of phagocytosing PMN, mean fluorescent intensity of phagocytosing PMN) and oxidative burst (mean percentage of active PMN, mean fluorescent intensity of active PMN) were measured before and after clamp studies by flow cytometry under basal condition and after *Escherichia Coli* stimulation (PHAGOTEST, BURSTEST, Orpegen Pharma, Heidelberg, Germany).

Results: No significant differences in PMN functions as parameters of PMN phagocytosis (mean percentage of phagocytosing PMN 5.1±4.9% vs 5.6±5.2% (NS) and mean fluorescent intensity of phagocytosing PMN 171±457 vs 282±573 (without unit) (NS) under basal condition, before vs after clamp study, respectively) and parameters of PMN oxidative burst (mean percentage of active PMN 3.7±2.5% vs 2.7±2.3% (NS) under basal condition and 93.6±12.3% vs 86.5±28.4% (NS) after *E. Coli* stimulation; mean fluorescent intensity of active PMN 329±166 vs 433±350 (NS) under basal condition and 2362±1282 vs 1960±1321 (NS) after *E. Coli* stimulation, before vs after clamp study, respectively) were found during HEC. Similarly, values of these parameters before and after the HHC and HC clamp studies did not differ significantly and were not different from control values found during controlled saline infusion as well.

Conclusions: The nonspecific immune functions of PMN (phagocytosis and oxidative burst) were not influenced by short-time isolated hyperinsulinemia, by simultaneous hyperglycemia and hyperinsulinemia or by isolated hyperglycemia during in vivo clamp studies in healthy subjects. Supported by IGA grant No. NB/5323-3 of the Czech Ministry of Health

576

CYTOKINE PROFILES AND IgG-1A SUBCLASSES RESPONSE IN TYPE 1 DIABETIC PATIENTS TREATED WITH ORAL INSULIN.

L. Monetini*, MG. Cavallo***, F. Sentinelli**, L. Stefanini**, E. Bonifacio†, E. Saruger†, E. Bosi†, P. Pozzilli** and the IMDIAB group. Universities of Campus Bio-Medico*, La Sapienza**, Tor Vergata*, Rome and San Raffaele Hospital†, Milan, Italy.

Background and Aims: Tolerance to oral administered antigens may be generated through the induction of Th2/Th3 regulatory cells. We recently reported that oral insulin administration (5 mg daily for one year) starting at the time of diagnosis in Type 1 diabetic patients had no effect on residual beta cell function. The aims of this study was to evaluate whether the above treatment determined the induction of regulatory T cells as measured by cytokine profiles and a Th2-like antibody response. **Materials and Methods:** IFN γ , IL-4, IL-5 and TGF β cytokines were measured in insulin and PHA stimulated lymphocytes supernatants by ELISA every 3 months. IgG subclasses of insulin antibody were measured by RIA. **Results:** TGF β production was statistically higher in patients treated with oral insulin (n=11) compared with patients receiving placebo (n=9) at 12 months from diagnosis (p=0.01 and p=0.004 for lymphocytes challenged with insulin or PHA, respectively). Levels of IL4, IL-5 and IFN-g were similar between the two treated patient's groups both at baseline and after stimulus with the antigens. IgG1 and IgG3 insulin antibody subclasses were statistically lower in patients treated with oral insulin compared to placebo control group after 12 months (p=0.02 and p=0.01, respectively). **Conclusions:** The higher level of TGF β in patients treated with oral insulin showed that immunoregulatory T cells are induced by this treatment. The lower IgG1 and IgG3 antibody response in oral insulin treated-patients is consistent with a Th2 deviation of the immune response. The failure to achieve any measurable clinical benefit may be due to the timing of treatment implementation.

577

GALACTOSYL CERAMIDE (GAL-CER) INCREASES AND SULFATIDE DECREASES CYTOKINE PRODUCTION OF WHOLE BLOOD CELLS.

A. Roeske-Nielsen, K. Bendtsen, P. Fredman, and K. Buschard, Bartholin Institutet; Institute for Inflammation Research, Rigshospitalet, Denmark; and Sahlgrenska Universitetssjukhuset, Mölndal, Sweden.

Aim: To test the effect of sulfatide and its precursor gal-cer (galactosylceramide) on cytokine production of whole blood culture from healthy donors. In β -cells sulfatide and gal-cer are present in similar amounts, but sulfatide is known to be secreted together with insulin.

Methods: PHA or LPS stimulated diluted whole blood cells were incubated with 30 μ mol/l of sulfatide or gal-cer. Furthermore, competition assays with both sulfatide and gal-cer in various concentrations were performed. After 24 hrs supernatants from the cultures were harvested and the levels of IL-1 β , IL-6, Interferon- γ (INF- γ), and TNF- α were determined using ELISA.

Results: Sulfatide decreased production of the investigated cytokines (all data in percentage of control levels): IL-6: 42 %, and INF- γ : 65 %. In contrast, gal-cer stimulated cytokine production as compared to control levels: IL-1 β : 371 %, IL-6: 312 %, INF- γ : 489 %, and TNF- β : 1528 %.

When sulfatide and gal-cer were present simultaneously in concentrations of 30 μ mol/l the cytokine productions were: IL-1 β : 340 %, IL-6: 272 %, INF- γ : 288 %, and TNF- β : 1040 %. Sulfatide in concentrations of 120 μ M reduced the effect of 30 μ mol/l gal-cer to: IL-1 β : 278 %, IL-6: 222 %, INF- γ : 194 %, and TNF- α : 1010 % of control levels.

Conclusion: We have demonstrated that gal-cer increases and that sulfatide decreases the production of cytokines known to be toxic to β -cells. Furthermore, gal-cer seems to overrule the effect of sulfatide. We speculate that leakage of gal-cer in the islet environment might be potentially harmful to the β -cells.

578

IMMUNE RESPONSES AGAINST RAT CYTOMEGALOVIRUS IN DIABETES PRONE AND DIABETES RESISTANT BB RATS

N. van der Werf, J.L. Hillebrands, W.M. Bos, G. Leunk, B.W.A. van der Strate, F.A. Klatter, C.A. Bruggeman & J. Rozing. Dept. Cell Biology, Immunology Section, Faculty of Medical Sciences, University of Groningen, Groningen, The Netherlands

Background and Aims: Recently, we showed that infection with RatCytomegalovirus (RCMV) of Diabetes Prone (DP) BB rats resulted in significantly accelerated development of diabetes. The mechanism by which RCMV accelerates the development of diabetes is still unknown, however cytolytic infection of beta-cells is unlikely. Stimulatory effects of RCMV on the T cell repertoire of DP BB rats might influence the diabetogenic process. To further characterize the immune response against RCMV, in vitro as well as in vivo experiments were performed after RCMV infection of DR and DP BB rats.

Materials and Methods: The in vivo immune response against RCMV was studied in immunocompetent DR BB rats. Rats were left untreated or i.p. infected with 1x10⁶ pfu RCMV (Maastricht strain). Animals were sacrificed 6, 12 and 18 days p.i. and flowcytometry was performed on splenocytes and PBMCs using the following mAb's: R73 (TCR), OX35 (CD4) and OX8 (CD8). To further analyze T cell responses in BB rats after RCMV infection, in vitro proliferative responses of DR and DP splenocytes were measured 21 days p.i. and compared to the responses observed after ConA stimulation. Finally, the presence of anti-RCMV antibodies in serum of DP and DR BB rats after RCMV infection was determined.

Results: Although not significant, RCMV infection resulted in an increase in the percentage CD8+ T cells 12 and 18 days p.i. Three weeks p.i., DR splenocytes showed RCMV specific proliferation after stimulation with fixed autologous infected fibroblasts (686±176 dpa), whereas stimulation with uninfected fibroblasts did not result in T cell proliferation (49±7 dpa, background levels). DP BB derived splenocytes did not show RCMV specific T cell proliferation. The magnitude of RCMV specific T cell proliferation in DR BB rats was about 40-50% of the proliferation observed after polyclonal ConA stimulation. These results indicate that a high proportion of the T lymphocytes is responsive to stimulation with RCMV in vitro, suggesting polyclonal activation of T cells by RCMV. Infection with RCMV resulted in generation of significant titres of RCMV specific antibodies in both DP and DR BB rats.

Conclusions: RCMV infection of DR BB rats resulted in the generation of strong proliferative T cells responses in vitro, suggesting polyclonal T cell stimulation. Although not detectable in DP BB rats in vitro, such activation of (autoreactive) T cell might be involved in the accelerated development of diabetes in DP BB rats after RCMV infection.

DIABETOLOGIE METABOLISMUS ENDOKRINOLOGIE VÝŽIVA

ČASOPIS PRO POSTGRADUÁLNÍ VZDĚLÁVÁNÍ
ROČNÍK 3 • SUPPLEMENTUM 1 • 2000

XXXVI. DIABETOLOGICKÉ DNY
Luhačovice, 13.-15. dubna 2000

ABSTRAKTA

INŠTITUT
A. ŠTĚPÁNEK

EXCERPOVÁNO V BIBLIOGRAPHIA MEDICA ČECHOSLOVACA

www.tigis.cz/dmev/Index.htm

ISSN 1211-9326

Tigis

Při hodnocení dvouleté etapy intervence jsme nezjistili signifikantní změny v hodnotě KPE zubů [KPE 3,36 (SE 0,58) v r.1997 resp. 4,29 (SE 0,64) v r. 1999]. Statisticky významné zlepšení bylo zjištěno ve stavu gingivy a v úrovni ústní hygieny, tj. odstraňování zubního mikrobiálního povlaku. Hodnota indexu zánětu gingivy klesla z 0,25 (SE 0,06) na 0,14 (SE 0,08) a index přítomného zubního povlaku klesl z hodnoty 0,30 (SE 0,05) na 0,12 (SE 0,04).

Orální mikrobiologické vyšetření bylo zaměřeno na frekvenci záchytu kvasinkovitých mikroorganismů a st. epidermidis, markerů diabetu v orálním mikrobiálním spektru. Po dvou letech intervence nebyly v jejich záchytu zaznamenány změny, ale jejich přítomnost v dutině ústní signifikantně pozitivně korelovala s hladinami glykohemoglobinu.

Výsledky studie prokázaly účinnost intenzivní individuální motivace dětí s diabetem k péči o chrup a měly by být motivačním podnětem pro tým diabetologa k soustavné orientaci pacientů a jejich rodičů k pozitivním postojům k orálnímu zdraví.

Práce vznikla za finanční podpory IGA MZ ČR, grant.č.4085-3 a výzkumný záměr VÚS 1999-2003.

16.

DLOUHODOBÉ SLEDOVÁNÍ ČASNÝCH STADIÍ CUKROVKY U OSOB S GENETICKOU PREDISPOZICÍ KE VZNIKU DIABETU

L. Dvořáková, H. Přibyllová, I. Kubínová, K. Mudra, E. Ivašková, Š. Figar, Z. Vorlová, L. Šinová
KlinLab, s.r.o., ÚPMD, Lacomed, s.r.o., IKEM, ČSAV, ÚHKT, Edukační centrum pro diabetiky, Praha

Cílem této práce bylo sledovat vývoj metabolických odchylek u osob se silnou genetickou zátěží diabetem 1. a 2. typu, snažit se o prevenci cukrovky a jejích komplikací a možnost použití výsledků v genetickém poradenství.

V r. 1973 jsme začali sledovat stav glukózové tolerance (GT) pomocí oGTT se současným určováním hladin inzulínu, lipidů, kyseliny močové a fibrinogenu a s měřením TK. U části souboru jsme provedli klinické neurologické vyšetření, vyšetření vazomotorických reakcí, HLA antigenů, orgánově specifických protilátek a protilátek proti GAD a IA2.

Vyšetřené soubory tvořili prvostupňoví příbuzní NIDDM-pacientů (potomci obou diabetických rodičů = PDR - skupina A) a prvostupňoví příbuzní IDDM-pacientů (skupina B: rodiče a sourozenci diabetických dětí = RDD, SDD a děti IDDM-matek = DDM). Přehled vyšetřovaných souborů a stav jejich GT uvádí tabulka.

Výsledky opakovaných vyšetření u PDR ukázaly relativně homogenní vývoj odchylek již po 30. roce věku:

Soubor	n	M / Ž	Věk	PGT	NIDDM	IDDM
RDD	230	107 / 123	50,1 ± 7,9	9,6 %	14,3 %	3,5 %
SDD	80	45 / 35	25,4 ± 7,9	1,3 %	2,5 %	10,0 %
DDM	200	102 / 98	24,9 ± 4,2	11,9 %	4,5 %	4,5 %
PDR	70	30 / 40	48,7 ± 6,8	24,1 %	19,0 %	-

kolísavý rozvoj PGT a NIDDM s opožděnou a zvýšenou sekrecí inzulínu, se zvýšenou hladinou lipidů, kyseliny močové, fibrinogenu a TK. Glykémie při původně normálním oGTT u PDR s pozdějším vznikem PGT a NIDDM byly významně vyšší než u PDR s benigním vývojem ($p < 0,01$). Upozorňujeme na závažnost dg. hraniční GT, která ve 33 % přešla v PGT a ta ve 47 % v NIDDM. Prioritní jsou nálezy pozitivní korelace hladin fibrinogenu se stavem GT a zjištění časného postižení autonomní nervové soustavy.

U části osob skupiny B je vývoj podobný jako u PDR, u menší části jsou opakovaně nízké glykémie při subnormální sekreci inzulínu (vysoká biologická citlivost tkání). Je patrná silná asociace s HLA antigeny, zejména s rizikovými alelami DQB1. Výskyt orgánově specifických protilátek i protilátek proti GAD a IA2 je nízký. Rodinná anamnéza je chudší než u PDR, významně převládá NIDDM nad IDDM ($p < 0,001$). Výsledky podporují teorii o genetické heterogenitě IDDM.

Pro vznik IDDM u dítěte je podstatný výskyt diabetu obou typů současně v rodině otce i matky, samotný IDDM u 1 z rodičů není příliš rizikový. Přínos studia DDM spočívá v délce sledování dětí i IDDM-matek. Je dokumentováno dramatické zlepšení životní perspektivy dnešních IDDM-pacientů. Je analyzován genetický vliv diabetu otců a diabetické zátěže v rodině IDDM-matek.

Příznaky inzulinové rezistence jsou závažným nálezem z hlediska vývoje aterosklerózy, proto vyžadují intenzivní léčbu.

Je podán přehled vývoje diabetu v jednotlivých kauzistikách.

Literatura:

L. Dvořáková: Časná stadia cukrovky. Univerzita Karlova, Praha 1991.

17.

VLIV AKUTNÍ HYPERGLYKÉMIE NA IMUNOLOGICKÉ PARAMETRY U ZDRAVÝCH DOBROVOLNÍKŮ

V. Fejfarová, A. Jirkovská, J. Hosová, J. Kalanin, I. Štříž, Z. Vlasáková, J. Skibová

Institút klinické a experimentální medicíny, Praha

Cílem práce bylo stanovit vliv akutní hyperglykémie při hyperglykemickém clampu na imunologické parametry u zdravých dobrovolníků.

Metodika: Byla vyšetřena skupina 10 zdravých dobrovolníků (mužů, nekuřáků) ve věku 27 ± 5 let, s BMI 24 ± 2 kg/m². Akutní hyperglykémie 12 mmol/l byla navozena infuzí 15% glukózy při 10hodinovém hyperglykemickém clampu. Z imunologických parametrů byla testována funkce polymorfonukleárních leukocytů Phagoburst testem měřícím oxidativní vzplanutí polymorfonukleárů (PMN) pomocí průtokové cytometrie. Před hyperglykemickým clampem a po něm jsme hodnotili celkovou průměrnou fluorescenční intenzitu (CPFI), dále procento aktivních polymorfonukleárů (PAG), průměrnou fluorescenční intenzitu aktivova-

ných polymorfonukleárů (PFIAG) v nestimulovaném stavu a po stimulaci *E. coli*.

Výsledky: Hyperglykémie 12 mmol/l při 10hodinovém hyperglykemickém clampu nevedla k významným změnám vyšetřovaných imunologických parametrů v nestimulovaném stavu: CPFI před clampem 159,45±43,26, po clampu 154,33±37,13, PAG před clampem 6,71±3,81, po clampu 5,19±4,66. Signifikantní byla pouze změna PFIAG, kde byla PFIAG před clampem 799,57±443,1, po clampu 689,78±227,39 ($p < 0,01$). Stimulace PMN pomocí *E. coli* vedla k významnému zvýšení vyšetřovaných imunologických parametrů před clampem i po něm, výsledné hodnoty nebyly výrazněji ovlivněny akutní hyperglykemií (tyto nálezy svědčí o zachování funkční rezervy PMN i při hyperglykémii 12 mmol/l).

Závěr: Z našich výsledků vyplývá, že akutní hyperglykémie 12 mmol/l in vivo nevede k ovlivnění oxidativního vzplanutí PMN ani k ovlivnění jejich funkční rezervy.

Práce podporovaná grantem IGA MZČR č. NB/5323-3.

18. PRŮBĚH HOSPITALIZAČNÍ FÁZE AKUTNÍHO INFARKTU MYOKARDU U PACIENTŮ S DIABETES MELLITUS

L. Heribanová, M. Anděl

II. interní klinika 3. LF UK a FN KV, Praha

V naší studii porovnáváme průběh hospitalizační fáze akutního infarktu myokardu u pacientů se současně přítomným diabetes mellitus a pacientů bez diabetes mellitus. Zde uvedená data byla získána v rámci probíhající retrospektivní studie zaměřené na dlouhodobou prognózu pacientů s diabetes mellitus po infarktu myokardu, zejména na identifikaci rizikových faktorů náhlé srdeční smrti u těchto pacientů.

Do studie byly zařazeni pacienti hospitalizovaní na koronární jednotce II. interní kliniky FN KV pro akutní infarkt myokardu v letech 1992/1993. Celkem jsme hodnotili 200 pacientů, ve skupině bez diabetes mellitus (nonDM) 131 pacientů (*průměrný věk 65,9±11,91 roku*), z toho 89 mužů (*průměrný věk 63,8±12,51 roku*) a 42 žen (*průměrný věk 70,5±8,84 roku*), ve skupině pacientů s diabetes mellitus (DM) 69 pacientů (*průměrný věk 70,8±9,88 roku*), z toho 33 mužů (*průměrný věk 70±7,4 roku*) a 36 žen (*průměrný věk 73,9±8,86 roku*). Ke statistickému zhodnocení rozdílů mezi jednotlivými skupinami pacientů byl použit dvouvýběrový t-test s nerovností rozptýlů a pro kategoriální proměnné test chí-kvadrát.

U pacientů zařazených do skupiny DM byl statisticky nevýznamně vyšší výskyt hypertenze (43 % nonDM vs. 55 % DM) a méně kuřáků (38 % nonDM vs. 19 % DM). Obě skupiny se významně nelišily v počtu dříve proběhlých infarktů myokardu ani v typu a lokalizaci sledovaného infarktu myokardu. Obě skupiny se nelišily významně v době od vzniku prvních příznaků IM do přijetí na koronární jednotku, přesto podání trombolýzy bylo ve skupině DM méně časté (29 % nonDM vs. 23 % DM, ns). Během hospitalizace byl výskyt levostranné kardiální insuficience zaznamenán častěji u pacientů s diabetes mellitus (30 % nonDM vs. 43 % DM, ns), nevýznamně

vyšší byl v této skupině také výskyt závažných komorových arytmií (11,5 % nonDM vs. 17 % DM, ns) a recidivy infarktu myokardu během hospitalizace (4,5 % nonDM vs. 10 % DM, ns). Během hospitalizace zemřelo 16 % pacientů (15 % nonDM vs. 17 % DM, ns), nejčastější příčinou smrti u pacientů bez diabetu bylo srdeční selhání (10 % nonDM vs. 4,3 % DM, ns), ve skupině pacientů s diabetes mellitus arytmiie (0,75 % nonDM vs. 5,7 % DM, ns). Celková doba hospitalizace u obou skupin nebyla významně odlišná (17 dnů±7,8 vs. 18 dnů±7,1). U pacientů s diabetes mellitus byla statisticky významně nižší echokardiograficky zjištěná ejekční frakce (51±13,6 % nonDM vs. 45±16,5 % DM, $p < 0,05$) a vyšší klidová tepová frekvence (67±14,5 nonDM vs. 74±15,7 DM, $p < 0,05$) v době propuštění.

U pacientů s diabetes mellitus byl zjištěn v porovnání s pacienty bez diabetes mellitus vyšší výskyt sledovaných komplikací po dobu hospitalizace pro infarkt myokardu, rozdíly mezi oběma skupinami však nebyly statisticky významné. V době propuštění z nemocniční péče byla u pacientů s diabetes mellitus přítomna významně nižší ejekční frakce levé komory, jejíž pokles je jedním z rizikových faktorů náhlé smrti.

19. VÝVOJ LIPIDOVÝCH A GLYCIDOVÝCH PORUCH U GENETICKY HYPERTENZNÍCH OBÉZNÍCH A HYPERTRIGLYCERIDEMICKÝCH POTKANŮ

J. Hilgertová¹, L. Kazdová², V. Golda³

¹III. interní klinika 1. LF UK, Praha

²Institut klinické a experimentální medicíny, Praha

³Ústav experimentální neurochirurgie LF, Hradec Králové

Metabolické abnormality u Koletského SHR obézních a HHTg potkanů mohou být považovány za model pro diabetes 2. typu. Chceme informovat o několika základních ukazatelích těchto poruch u obou kmenů mezi 2. a 3. měsícem stáří, kdy přírůstek hmotnosti obézních potkanů je více než dvojnásobný, zatímco u jejich štíhlých sourozenců a u HHTg potkanů jen poloviční. Opakovanými odběry byl vývoj porovnáván u pěti skupin zvířat. U obou kmenů je geneticky fixovaná hypertenze, hypertriglyceridémie a hyperinzulinémie, provázená poruchou glukózové tolerance. Narozdíl od jiných kmenů obézních myší a potkanů nemají zvýšenou bazální glykémii a jen mírně zvýšený cholesterol. Již ve stáří 2 měsíců mají Koletského obézní potkani oproti štíhlým vyšší plazmatické triglyceridy u samců o 184 % a u samic o 152 %. Zatímco u štíhlých zvířat se hladina během dalšího měsíce významně nezmění, u obézních dojde k dalšímu nárůstu s rozdílem mezi samci (o 21 %) a samicemi (o 152 %). U HHTg samců se v tomto časovém rozmezí triglyceridy zvýší o 41 %. Obdobně u hladin inzulínu. Ve 2 měsících je inzulinémie u obézních samců oproti štíhlým vyšší o 168 %, u samic o 200 %, ale u HHTg samců o 32 %. Během 3. měsíce vzroste u štíhlých zvířat o 19 a 23 %, ale u obézních samců o 80 % a u samic o 144 %, u HHTg samců o 51 %. Porucha glukózové tolerance (určovaná jako AUC) se objevuje u obézních SHR

DIABETOLOGIE METABOLISMUS ENDOKRINOLOGIE VÝŽIVA

ČASOPIS PRO POSTGRADUÁLNÍ VZDĚLÁVÁNÍ
ROČNÍK 5 • SUPPLEMENTUM 1 • 2002

XXXVIII. DIABETOLOGICKÉ DNY
Luhačovice, 18.-20. dubna 2002

ABSTRAKTA

UDĚLOVÁNÍ
DOKTORSKÉHO TITULU
V ČESKÉ REPUBLICE
V OBLASTI VĚDE
A UČEBNÍ PRÁCE
V OBLASTI VĚDE
A UČEBNÍ PRÁCE
WWW.CASOPIS.CS
WWW.CASOPIS.CS

Učis



nalezena pro genotyp I/I predispozice s frekvenci genotypu I/I 74 % ($P_{\text{corr.}} = 0,027$). U těchto pacientů byl nalezen heterozygotní genotyp ve 22 % ($P_{\text{corr.}} = 0,101$) a genotyp III/III ve 4 % ($P_{\text{corr.}} = 0,58$).

Závěr: U pacientů s autoimunitním diabetes se homozygotní genotyp I/I vyskytl významně častěji než u standardní kavkazoidní populace (74 % vs. 49 %). Zdá se tedy, že je spojen s větším rizikem onemocnění. Naproti tomu genotyp III/III a heterozygotní genotyp I/III se u nemocných vyskytl významně méně častěji než u standardní kavkazoidní populace (26 % vs. 51 %), lze tedy uvažovat o jejich protektivním charakteru. Naše výsledky jsou ve shodě s nálezy v britské populaci. Dalším statistickým rozborom nebyla nalezena vazba HLA antigenů a INS-VNTR alel. Oba rizikové faktory jsou tedy nezávislé.

14.

VLIV AKUTNÍ HYPERGLYKÉMIE A HYPERINSULINEMIE NA FAGOCYTÓZU A OXIDATIVNÍ VZPLANUTÍ PMN U PACIENTŮ S DIABETES MELLITUS 1. TYPU

V. Fejfarová¹, A. Jirkovská¹, J. Kalanin², T. Pelikánová¹, I. Stříž², J. Skibová¹

¹Klinika diabetologie Centra diabetologie, IKEM, Praha

²Imunologické pracoviště, IKEM, Praha

Imunologické funkce PMN buněk mohou být poškozeny u pacientů s diabetes mellitus. Dle studií in vitro byly imunologické funkce PMN buněk ovlivněny zvýšenou koncentrací glukózy v médiu. Sami jsme v předchozí studii neprokázali toxický vliv akutní hyperglykémie a/nebo hyperinsulinemie na fagocytózu a oxidativní vzplanutí PMN buněk u zdravých dobrovolníků.

Cílem studie bylo zjistit vliv akutní hyperglykémie a hyperinsulinemie na fagocytózu a oxidativní vzplanutí PMN buněk u pacientů s diabetes mellitus 1. typu in vivo.

Metodika: Do studie bylo zařazeno 10 pacientů s diabetes mellitus 1. typu, bez pozdních komplikací (průměrný věk $28,4 \pm 5,9$ let, trvání diabetu $9,1 \pm 4,9$ let, HbA1c $8,1 \pm 0,8\%$, BMI $23,5 \pm 2,4$ kg/m²), u nichž nebyl prokázán imunologický deficit či infekční onemocnění. Akutní hyperglykémie (17 mmol/l) a hyperinsulinemie byly navozeny 4 hodiny trvajícím hyperglykemickým hyperinsulinovým clampem, s infuzí 15% glukózy k dosažení hyperglykémie 17 mmol/l a s podáním inzulínu perfuzorem (rychlostí 4 IU · kg⁻¹ · min⁻¹) k dosažení hyperinsulinemie (průměrně 253 uU/ml). Fagocytóza a oxidativní vzplanutí PMN buněk byly stanoveny průtokovou cytometrií pomocí komerčně dostupných testů Phagotestu a Bursttestu (Orpegen Pharma, Heidelberg, Germany). Pomocí testů byla stanovena procenta fagocytujících či aktivních (produkcující reaktivní oxidativní intermediáty) PMN buněk a jejich průměrné fluorescenční intenzity za bazálních podmínek a po stimulaci PMN buněk *Escherichia coli*. Statisticky byly zhodnoceny tyto imunologické parametry před a po hyperglykemickém hyperinsulinovém clampu a srovnány se změnami nalezenými před a po kontrolním isoinsulinovém (průměrná insulinémie 19 uU/ml) euglykemickém clampu (průměrná glykémie 5,1 mmol/l), který odpovídal časově i volumově hyperglykemickému hyperinsulinovému clampu.

Výsledky: Nebyly nalezeny signifikantní změny fagocytózy před a po hyperglykemickém hyperinsulinovém clampu: za bazálního stavu byly četnost fagocytujících PMN buněk $9,1 \pm 5,1$ vs. $13,2 \pm 10$ % a jejich průměrná fluorescenční intenzita 438 ± 216 vs. 370 ± 227 ; po stimulaci *Escherichia coli* byl výskyt fagocytujících PMN buněk $53,7 \pm 19,6$ vs. $57,5 \pm 17,6$ % a jejich průměrná fluorescenční intenzita byla 1184 ± 407 vs. 1198 ± 437 . Při zhodnocení oxidačního vzplanutí PMN buněk nebyly rovněž nalezeny signifikantní změny před a po hyperglykemickém hyperinsulinovém clampu: za bazálního stavu byla četnost aktivních PMN buněk $0,7 \pm 0,8$ vs. $0,5 \pm 0,3$ % a jejich průměrná fluorescenční intenzita 1313 ± 633 vs. 1392 ± 499 ; po stimulaci *Escherichia coli* byl výskyt aktivních PMN buněk $56,7 \pm 21,8$ vs. $50,7 \pm 20,6$ % a jejich průměrná fluorescenční intenzita 2730 ± 1470 vs. 2509 ± 962 . Výsledky sledování změn fagocytózy a oxidačního vzplanutí PMN buněk během hyperglykemického hyperinsulinového clampu se signifikantně nelišily od změn nalezených během kontrolního clampu.

Závěr: Imunitní funkce PMN buněk (fagocytóza a oxidativní vzplanutí) nebyly signifikantně ovlivněny hyperglykemií 17 mmol/l s hyperinsulinemií u pacientů s diabetes mellitus 1. typu během 4 hodinových clampových studií.

Práce byla podporována VZ/CEZ: L17/98:00023001.

15.

N-3 POLYENASÝTENÉ MASTNÉ KYSELINY ZVYŠUJÍ V HEPATOCYTOCH MNOŽSTVO FOSFORYLOVANÉHO ERK1/2 PROTEÍNU

D. Gašperiková¹, I. Klimeš¹, E. Šeböková¹, S. D. Clarke²

¹Ústav experimentálnej endokrinológie SAV, Bratislava, Slovensko

²University of Texas at Austin, Texas, USA

Úvod: Mechanizmus prenosu signálu sprostredkovaného polonenasýtenými mastnými kyselinami (PNMK) na výsledný metabolický efekt, je neznámy. Prenos signálu pomocou MAP-kinázovej kaskády patrí medzi najdôležitejšie spojenie medzi receptormi (vrátane inzulínových receptorov) na bunkovom povrchu a reguláciou génov v bunkovom jadre. Účinok PNMK na reguláciu génov sa uskutočňuje pomocou transkripčných faktorov ovplyvňujúcich ako syntézu (SREBP), tak aj oxidáciu (PPAR) mastných kyselín. Je známe, že aktivácia PPAR vedie k aktivácii ERK/MAP kinázy.

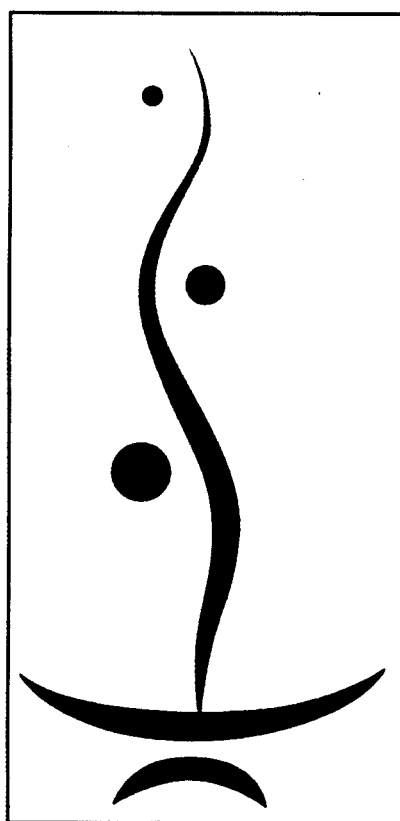
Cieľ: Vzhľadom to, že PNMK sú ligandmi pre PPAR zaujímal nás priamy efekt PNMK (typ n-3 a n-6) v porovnaní s mononenasýtenými mastnými kyselinami (typ n-9) na fosforyláciu (ERK1/2 je posledná kináza v kaskáde ERK/MAP kináz).

Metódy: Primárna kultúra hepacytov potkana sa nechala usadiť 4-6 hodín vo Waymouthovom médiu, ktoré obsahovalo sérum. Po výmene média a 12hodinovej inkubácii sa v rozličných časových intervaloch (0, 5, 10, 20, 30, 60 min) pridalo 200 μM na albumín naviazaných mastných kyselín: kyselina eicosapenténová 20:5 (n-3), kyselina arachidónová 20:4 (n-6) a kyselina olejová 18:1 (n-9). V druhej časti sa sledovala koncentračná závislosť kyseliny eicosapentaénovej. Použili sme rôzne koncentrácie (0, 10,

AALERGIE

ČASOPIS PRO KONTINUÁLNÍ VZDĚLÁVÁNÍ V ALERGOLOGII
A KLINICKÉ IMUNOLOGII

ABSTRAKTA



19. SJEZD ČESKÝCH A SLOVENSKÝCH ALERGOLOGŮ
A KLINICKÝCH IMUNOLOGŮ

6. – 9. října 2002 Karlovy Vary

ROČNÍK 4, SUPPLEMENTUM 3, 2002
www.tigis.cz/alergie/Index.htm

EXCERPOVÁNO V BIBLIOGRAPHIA MEDICA ČECHOSLOVACA

ISSN 1212-3536

TIGIS!

carinii, *Candida albicans*... Po chirurgickom odstránení nádoru nedochádza k úprave imunitného stavu pacientov.

Na našej ambulancii je sledovaný 62ročný pacient s touto diagnózou, primárne odoslaný pre chronickú glositídu.

Pri vstuňnom imunologickom vyšetrení popri agamaglobulinémii IgG, IgA, sú prítomné normálne hodnoty IgM, IgE. V periférnej krvi 34 % lymfocytov, z toho 83 % CD3+, 22 % CD3+CD4+, 59%CD3+CD8+, CD4+/CD8+ 0,37, 0 % CD19+, 17 % CD16+CD56+.

DEFICIT PRODUKCE CYTOKINŮ U PACIENTŮ S CVID

O. Kopecký, C. Andrýs, E. Burešová, K. Ettlerová, J. Krejsek, Š. Lukešová, D. Vokurková

Ústav klinické imunologie a alergologie, FN, Hradec Králové

Úvod: Diagnóza běžní variabilní imunodeficiencie (CVID), nejčastější primární hypogamaglobulinémie, vychází i přes současné diagnostické možnosti z výskytu opakovaných a závažných bakteriálních infekcí při nálezů nízkých sérových hladin imunoglobulinů. Snížení IgG a IgA je pravidlem, pokles hladiny IgM je pozorován asi v polovině případů. Příčina hypogamaglobulinémie není známá. Uvažováno je např. o změně cytokinového prostředí a z ní vyplývající porucha přenosu signálu mezi imunokompetentními buňkami.

Cíl: Porovnat produkci IL-2, sIL-2R, INF γ , IL-5 u pacientů s CVID a dárci krve.

Metoda: Neseparovaná suspenze periferních krevních buněk byla naředěna na 10^5 mononukleárních buněk. Ke stimulaci bylo použito phytohemaglutininu (PHA), concavalinu A (ConA) a pokeweed mitogenu (PWM). Po 72 hodinách kultivace a v případě PWM po 120 hodinách byl stažen supernatant a stanoveny hladiny IL-2, sIL-2R, INF γ , IL-5. Statistické zpracování bylo provedeno Studentovým t-testem, párovým t-testem a Wilcoxonovým testem.

Výsledky: Porovnáním naměřených hodnot byly zjištěny statisticky významně snížené koncentrace IL-2 a sIL-2R u pacientů po stimulaci PHA, ($P = 0,004$ a $P = 0,003$), rozdíly v hodnotách po stimulaci ConA a PWM nebyly statisticky významné. V případě IL-5 bylo zjištěno statisticky významné snížení po stimulaci PHA ($P = 0,001$), ne však po stimulaci ConA a PWM. Hodnoty INF γ nevykazovaly po stimulaci PHA, ConA statisticky významné rozdíly.

Závěr: Porucha produkce IL-2 a IL-2R byla u CVID již popsána řadou autorů, přesto její příčina zůstává stále neobjasněna. IL-5 je cytokin s řadou různých biologických aktivit, k nejvýznamnějším patří diferenciální vliv na eosinofily a jejich prekurzory. Důležitou roli hraje IL-5 při diferenciaci B lymfocytů. Sekvencí proteínu zesilujícího syntézu IgA bylo prokázáno, že se jedná o IL-5. IL-5 ovlivňuje pozdní fázi diferenciace B lymfocytů v plazmatickou buňku. Naproti tomu nebyla prokázána proliferativní aktivita na lymfoblastické buňky vycházející z B lymfocytů. K objasnění příčiny poruchy vedoucí k CVID bude zapotřebí dalších genomových a proteomových studií.

VLIV AKUTNÍ HYPERGLYKÉMIE A HYPERIN-SULINÉMIE NA FAGOCYTÓZU A OXIDATIVNÍ VZPLANUTÍ PMN U PACIENTŮ S DIABETES MELLITUS 1. TYPU

V. Fejfarová¹, A. Jirkovská¹, J. Kalanin², T. Pelikánová¹, I. Stríž², J. Skibová¹

¹Klinika diabetologie Centra diabetologie, IKEM, Praha, ²Imunologické pracoviště, IKEM, Praha:

Imunologické funkce PMN buněk mohou být poškozeny u pacientů s diabetes mellitus. Dle studií in vitro byly imunologické funkce PMN

buněk ovlivněny zvýšenou koncentrací glukózy v médiu. Sami jsem v předchozí studii neprokázali toxický vliv akutní hyperglykémie a/nebo hyperinsulinémie na fagocytózu a oxidativní vzplanutí PMN buněk u zdravých dobrovolníků.

Cílem studie bylo zjistit vliv akutní hyperglykémie a hyperinsulinémie na fagocytózu a oxidativní vzplanutí PMN buněk u pacientů s diabetes mellitus 1. typu in vivo.

Metodika: Do studie bylo zařazeno 10 pacientů s diabetes mellitus 1. typu, bez pozdních komplikací (průměrný věk $28,4 \pm 5,9$ let, trvání diabetu $9,1 \pm 4,9$ let, HbA1c $8,1 \pm 0,8$ %, BMI $23,5 \pm 2,4$ kg/m²), u nichž nebyl prokázán imunologický deficit či infekční onemocnění. Akutní hyperglykémie (17 mmol/l) a hyperinsulinémie byly navozeny 4 hodiny trvajícím hyperglykemickým hyperinzulinovým clampem, s infuzí 15% glukózy k dosažení hyperglykémie 17 mmol/l a s podáním inzulínu perfuzorem (rychlostí 4 IU. kg⁻¹.min⁻¹) k dosažení hyperinzulinémie (průměrně 253 uU/ml). Fagocytóza a oxidativní vzplanutí PMN buněk byly stanoveny průtokovou cytometrií pomocí komerčně dostupných testů Phagotestu a Bursttestu (Orpegen Pharma, Heidelberg, Germany). Pomocí testů byly stanoveny procenta fagocytujících či aktivních (produkujících reaktivní oxidativní intermediáty) PMN buněk a jejich průměrné fluorescenční intenzity za bazálních podmínek a po stimulaci PMN buněk *Escherichia coli*. Statisticky byly zhodnoceny tyto imunologické parametry před a po hyperglykemickém hyperinzulinovém clampu a srovnány se změnami nalezenými před a po kontrolním isoinzulinovém (průměrná insulínémie 19 uU/ml) euglykemickém clampu (průměrná glykémie 5,1 mmol/l), který odpovídal časově i volumově hyperglykemickému hyperinzulinovému clampu.

Výsledky: Nebyly nalezeny signifikantní změny fagocytózy před a po hyperglykemickém hyperinsulinovém clampu: za bazálního stavu byly četnost fagocytujících PMN buněk $9,1 \pm 5,1$ vs. $13,2 \pm 10$ % a jejich průměrná fluorescenční intenzita 438 ± 216 vs. 370 ± 227 ; po stimulaci *Escherichia coli* byl výskyt fagocytujících PMN buněk $53,7 \pm 19,6$ vs. $57,5 \pm 17,6$ % a jejich průměrná fluorescenční intenzita byla 1184 ± 407 vs. 1198 ± 437 . Při zhodnocení oxidačního vzplanutí PMN buněk nebyly rovněž nalezeny signifikantní změny před a po hyperglykemickém hyperinsulinovém clampu: za bazálního stavu byly četnost aktivních PMN buněk $0,7 \pm 0,8$ vs. $0,5 \pm 0,3$ % a jejich průměrná fluorescenční intenzita 1313 ± 633 vs. 1392 ± 499 ; po stimulaci *Escherichia coli* byl výskyt aktivních PMN buněk $56,7 \pm 21,8$ vs. $50,7 \pm 20,6$ % a jejich průměrná fluorescenční intenzita 2730 ± 1470 vs. 2509 ± 962 . Výsledky sledování změn fagocytózy a oxidativního vzplanutí PMN buněk během hyperglykemického hyperinzulinového clampu se signifikantně nelišily od změn nalezených během kontrolního clampu.

Závěr: Imunitní funkce PMN buněk (fagocytóza a oxidativní vzplanutí) nebyly signifikantně ovlivněny hyperglykemií 17 mmol/l s hyperinzulinémií u pacientů s diabetes mellitus 1. typu během 4hodinových clampových studií.

Práce byla podporována VZ/CEZ: L17/98:00023001.

DERMATITIS HERPETIFORMIS A IGA LINEÁRNA DERMATÓZA

J. Jautová¹, K. Martinásková²

¹Kožná klinika LF UPJŠ, Košice, SR,

²Kožná klinika FNŠP, Košice, SR

Autorky diagnostikovali u 43 dětí imunohistologickým vyšetřením kůže dermatitis herpetiformis, kedy detekovali imunokomplexy hrudkovitého charakteru pod bazálnou membránou v papilách kória s IgA protilátkami a C3 zložkou komplementu. IgA lineárnu dermatózu dia-

Special Issue:
Abstracts of the 14th European
Immunology Meeting EFIS 2000
23-27 September 2000

Volume 73, Numbers 2,3
73 (2,3) 75-302
ISSN 0165-2478

Immunology Letters



The official journal of the
European Federation of
Immunological Societies **EFIS**

ELSEVIER

764

Serum oxidase activity of ceruloplasmin and concentrations of copper in patients with various types of cancer

Zowczak M^a, Iskra M^a, Wysocka E^a, Torliński L^a, Mańczak M^b and Paszkowski J^c. ^aChair of Clinical Biochemistry, ^bChair of Oncology, ^cDepartment of Surgery III, Karol Marcinkowski University of Medical Sciences, Poznań, Poland

A contribution of ceruloplasmin (Cp), one of acute phase protein, to antioxidant defence can be of great importance in regard to its oxidase activity, and its plasma location, as well. Cp can also cause oxidative damage to macromolecules due to specific prooxidant sites found on this protein surface. The enzyme activity of Cp is closely related to copper ions bound to this protein. This study presents the relationship between the Cp oxidase activity (Cp-OA) and the copper concentrations (Cu-c) in serum of patients with breast (BC), lung (LC), gastrointestinal (GIC) and gynecological (GYNC) cancer in comparison to the control group. This study have demonstrated significant increase in the mean serum Cp-OA and Cu-c in all patient groups compared to the controls. The only significant difference among cancer patient groups was observed in the mean Cu-c between GIC and GYNC (higher). The significant difference in the Cp-OA and the Cu-c between groups with different stages of cancer advance and the control group was found. The significant positive correlation coefficients were calculated for the Cp-OA and the Cu-c in the control group and all patient groups, also according to the cancer progress. It suggests, that the increase in the Cp-OA and the Cu-c is related to the carcinogenesis on itself rather than its primary location or the progress of the disease.

765

CD4 and CD8 lymphocytes in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) during efferent phase of lung delayed type hypersensitivity (DTH) reaction induced single antigen inhalation

Grubek-Jaworska H^a, Hoser G^b, Droszcz P^a and Chazan R^a. *The University Medical School, Department of Pneumology*

Delayed type hypersensitivity (DTH) is clinically implicated in many pulmonary disorders: tuberculosis, silicosis, berylliosis, histoplasmosis and chronic hypersensitivity pneumonia. The DTH cascade is possible to be involved in the development of occupational asthma. Our knowledge of the cellular influx, concentration of cytokines and mediators in the bronchoalveolar space during efferent phase of DTH induced with specific antigen inhalation is still incomplete.

In previous study performed on guinea pig model we showed massive cell influx into alveolar space between 1 and 72 h after antigen provocation, time dependent cellular composition of BALF and participation of TNF- α and IL-8 and IL-5 in cascade of DTH.

In present experiments we characterized the lymphocytes infiltrating alveolar space at the time of max. lymphocyte influx - 24 h after inhalation challenge (flow-cytometry examination). The study, as previously, was performed on guinea pigs sensitized with BCG vaccine and inhaled with tubercle bacilli antigen. The control consisted of non-sensitized animals inhaled with this same antigen.

We observed T (but not B) cell influx. Intensity of CD8 and T helper/inducer cell infiltration into alveolar space was similar.

766

Effect of the degree of lower limb ischaemia on the activity of Ceruloplasmin in serum

Iskra M^a, Majewski W^b, Łaciak M^c, Mackiewicz A^c. ^aChair of Clinical Biochemistry, ^bDepartment of General and Vascular Surgery, ^cDepartment of Cancer Immunology at Great Poland Cancer Center, USOMS Poznań, Poland

Inflammatory reaction accompanies ischaemia and results in the synthesis of cytokines followed by an increase in the activity of ceruloplasmin (Cp) in serum.

The aim of the study was to investigate the effect of different degree of chronic ischaemia on the activity of Cp and its relationship to the concentration of interleukin-6 (IL-6), oncostatin (OSM), C-reactive protein (CRP), alpha-1-acid glycoprotein (AGP) in serum of patients with ischaemia of lower limbs. The studied group consisted of 12 patients with moderate ischaemia (MI) and 28 patients with critical ischaemia (CI).

The oxidase activity of Cp in serum was measured spectrophotometrically after incubation with *O*-dianisidine as a substrate. Concentrations of IL-6 and OSM were measured by ELISA, and those of CRP and AGP by rocket immunoelectrophoresis.

The mean oxidase activity of Cp (U/l) and the medians of IL-6 (pg/ml), OSM (pg/ml), CRP (mg/l) and AGP (mg/l) were found significantly higher in serum of patients with CI (193.7, 62.6, 9.5, 37.5, 1160, respectively), ($P < 0.05$), in comparison with MI (101.3, 21.4, 2.7, 0.5, 580, respectively). Positive correlation ($r = 0.73$) was established between Cp activity and AGP concentration.

The results have shown an impact of critical ischaemia of lower limbs on the activity of Cp and the levels of all studied cytokines and acute phase proteins in serum.

767

Immunological aspects of the injuries of pelvis and replacement of hip

Berdyugina OV, Basarnyi VV, Kutepov CM, Pollak MN, Stelmach KK, Petrovich NS, Kudryavtseva IP and Runkov AV. *Ural Scientific Research Institute of Traumatology and Orthopaedics*

The participation of lymphocytes and monocytes in regulation of long tubular bone regeneration has been recognized in our previously studies. In this paper we present our results of immunological exam in 45 patients with mechanical and surgical injuries of pelvis, hip joint and acetabulum, 90 patients with replacement of the hip joint after injuries degenerative diseases. We demonstrated the typical acute phase reaction in early post-traumatic period. Then changes of immunocompetent cell and serum immunoglobulin level were noted. The content of lymphocytes and monocytes number correlates with serum optical parameters, which reflects humor disturbances in blood. In some cases we registered the immune inflammation in tissues around metallic construction which were used in operative treatment. These general and local immunological reaction influenced activity of repair processes. Therefore damage and reparative processes in pelvis and hip joint closely connected with immune system.

768

Functional changes of polymorphonuclear cells (PMN) in patients with chronic diabetic foot infection

Fejfarová V, Jirkovská A, Kalanin J, Skibová J and Stříž I. *Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic*

Introduction: Chronic infections may contribute to unhealing chronic

diabetic foot ulcers, which often lead to patient's immobility. Decreased phagocytosis and impaired respiratory burst of PMN were described in patients with insufficient control of diabetes mellitus (DM).

Aim: To assess phagocytosis and respiratory burst of PMN in patients with chronic diabetic foot infection (DFI).

Methods: Nineteen patients with chronic DFI (mean age 55.5 ± 10.6 years, four patients Type 1, 15 patients Type 2 DM of mean duration 20 ± 9 years), with acceptable control of DM (mean HbA1c $8.5 \pm 1.6\%$) were matched with 20 healthy controls. Phagocytosis and respiratory burst of PMN were determined by flow cytometry employing commercially available tests (PHAGOTEST, BURSTTEST, Orpogen Pharma, Heidelberg, Germany).

Results: We didn't find any significant differences in PMN respiratory burst in basal and stimulated conditions between groups of patients and controls: mean fluorescent intensity (MFI) of activated PMN in stimulated state was 4568 ± 1559 vs. 5217 ± 1363 (NS). The patients with chronic DFI revealed significantly decreased percentage of phagocytosing PMN in stimulated state ($66.4 \pm 24\%$ vs. $81.8 \pm 10.3\%$, P -value lower than 0.05) and increased MFI of non-phagocytosing PMN in basal and stimulated states compared to control subjects (P -value lower than 0.05). Other parameters of phagocytosis didn't differ between groups.

Conclusion: Decreased percentage of phagocytosing PMN and no increase of PMN respiratory burst in patients with chronic diabetic foot infection may indicate impaired immunological functions in these patients.

769

Blood levels of interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-6 after surgical trauma

Słotwiński R^a, Lech G^a, Gomuła J, Zaleska M^b and Szczygieł B^a.
^aDepartment of General, Gastrointestinal Surgery and Nutrition, The Warsaw Medical University, Warsaw, Poland, ^bDepartment of Surgical Research and Transplantation, Medical Research Center, Polish Academy of Sciences, Poland

The clinical implications of the changes in cytokine production following the operative trauma still remain unclear. The objective of the study was to investigate the alterations in systemic production of IL-1ra and IL-6 following the major abdominal operations in oncological patients and in patients after minor surgical trauma due to laparoscopic (LC) or open (OC) cholecystectomy. The level of IL-1ra in oncological patients (865 ± 1021 pg/ml) was significantly higher ($P = 0.042$) in comparison with cholecystolithiasis group (LC: 360 ± 302 pg/ml, OC: 466 ± 389 pg/ml). The IL-1ra values were significantly lower on the first day after OC ($P = 0.0005$) and LC ($P = 0.0008$) if compared with patients after major surgery and remained significantly lower also on postoperative day 3, 7 and 10. The significantly lower level of IL-6 was seen after cholecystectomy (OC + LC) if compared to major surgery. The highest IL-6 level was observed in oncological patients with severe complications (384 ± 484 pg/ml). The lowest IL-1ra and IL-6 levels were observed after LC. We conclude that plasma levels of IL-1ra and IL-6 following surgery represent two sensitive markers of surgical trauma for routine postoperative management.

770

The markers of systemic inflammation in cerebral ischemia

Tarnačka B^a, Gromadzka G^a and Członkowska A^b. ^aInstitute of Psychiatry and Neurology, Sobieskiego 1/9, Warsaw, Poland, ^bDepartment of Experimental and Clinical Pharmacology, Medical Academy, Warsaw, Poland

There is increasing evidence that atherosclerosis is accompanied by low-grade inflammatory response. The aim of study was to analyze the inflam-

matory parameters in ischemic stroke. In 179 stroke patients we studied: serum levels of immune complexes (IC) (precipitation method), C3 and C4 complement (CP) components (nephelometric method), fibrinogen (Fb) (Claus clotting assay) and C reactive protein (CRP) (nephelometric method); the presence of chlamydial antigens and anti-CMV antibodies in isolated IC (ELISA). The mean IC concentration in patients was significantly higher compared with controls and the highest at day 1 compared with 7th and 30th days of study. The elevated levels of anti-CMV IgG have been found in IC in 69.4% of patients and in 11.3% of controls. Chp antigen has been found in IC in 52.2% of patients and 27.1% of controls. Mean CP levels in serum were constant during hospitalization, did not differ from control subjects. The levels of Fb and CRP in patients were significantly higher than in controls and were positively correlated with patients neurological state. The higher level of CRP was observed in the patients with history of myocardial infarction ($P < 0.05$). Fb was higher in smokers and was positively correlated with levels of WBC and ESR ($P < 0.05$). CIC, CRP and Fb concentrations in multiple logistic regression analysis were independent risk factors for ischemic stroke.

Chronic humoral immune response represented by CIC containing Chp and CMV antigens could be an important link between infection and acute vascular events. CIC, CRP and Fb are independent risk factors for ischemic stroke.

771

MRP8/14 and soluble CD14 in kidney transplantation

Stríž I, Jarešová M, Lácha J, Čermáková J and Vítko Š. *Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic*

The soluble forms of myeloid membrane antigens MRP8/14 (calprotectin, 27E10 antigen) and CD14 (a receptor for bacterial endotoxin) were tested as postoperative markers to monitor patients after kidney transplantation together with traditional inflammatory markers C-reactive protein (CRP) and procalcitonin (PCT). In 38 control subjects, serum MRP8/14 levels were 542 ± 422 ng/ml, in kidney transplant patients with sepsis the values varied from 1140 to 6230 ng/ml, variable results were obtained in patients with CMV infection and allograft rejection. In infectious complications of kidney transplantation, MRP8/14 levels were closely related to serum PCT concentrations. In some cases of CMV infections and allograft rejection, serum MRP8/14 and CRP levels increased while PCT concentrations stayed within the normal range. The serum level of sCD14 showed relatively high variability and did not allow distinguishing of postoperative complications (range 1160–9770 ng/ml) from normal outcome of kidney transplantation (range 2460–9000 ng/ml).

We conclude from our data that (1) MRP8/14 determination might be a useful marker in monitoring of patients after kidney transplantation, particularly in combination with PCT and (2) serum levels of sCD14 does not correlate with the clinical status of patients. Supported by IGA MZCR grant 4907-3.

772

The indicators of inflammatory reaction in patients following the hip and knee total replacement

Wierusz-Kozłowska M^a, Markuszewski J^a, Szczepanik A^b, Woźniak W^a and Wysocki H^b. ^aDepartment of Orthopaedics, ^bIntensive Care Clinic, University School of Medical Sciences, Poznań, Poland/ul. 28 czerwca 1956 r. nr 135 50-545 Poznań

The aseptic loosening of endoprosthesis results from the mechanical instability of the components of the endoprosthesis or is a direct reaction of tissues through a foreign-body reaction to the wear molecules. During the process of endocytosis the production of reactive oxygen species is

MK ČR E 77
ISSN 0008 - 7335
141 - 2002
Kč 33,-

VYDÁVÁ ČESKÁ
LÉKAŘSKÁ
SPOLEČNOST
J. E. PURKYNĚ

časopis lékařů českých



15/2002

PŮVODNÍ PRÁCE

ANALÝZA ZÁNĚTLIVÉ ODPOVĚDI A VYBRANÝCH
UKAZATELŮ IMUNITY U PACIENTŮ S INFIKOVANÝMI
DIABETICKÝMI ULCERACEMIJirkovská A., Fejfarová V., Hosová J., ¹Stříž I., ¹Kalanin J., ²Skibová J.

Centrum diabetologie IKEM, Praha

¹Imunologické pracoviště IKEM, Praha²Pracoviště lékařské statistiky IKEM, Praha

ABSTRAKT

Východisko. Pacienti s diabetem tvoří 50–70 % pacientů, u nichž byla nutná amputace dolních končetin, která je v řadě případů podmíněná infekcí a nekrózou měkkých tkání spojených s osteomyelitidou. Infekce diabetických ulcerací, které jsou součástí syndromu diabetické nohy (DN), nemusí být doprovázena klasickými laboratorními známkami zánětu, její průběh a následky mohou ovlivňovat poruchy imunitního systému. Cílem práce bylo posoudit zánětlivou reakci a specifickou humorální i buněčnou imunitní odpověď u pacientů s chronickou infekcí diabetických ulcerací.

Metody a výsledky. 34 pacientů léčených více než měsíc antibiotiky pro infekci diabetických ulcerací v podiatrické ambulanci (průměrného věku 54±8 let, průměrného trvání diabetu 20±9 let, s průměrným glykovaným hemoglobinem 8,8±1,5 %) bylo porovnáno s kontrolní skupinou 27 zdravých osob odpovídajícího věku a pohlaví. Pacienti neměli známky hluboké infekce ani kritické ischémie dolních končetin. Zánětlivá reakce byla posouzena počtem leukocytů a hladinou C-reaktivního proteinu (CRP), humorální imunitní odpověď byla hodnocena podle hladin imunoglobulinů (Ig) a buněčně zprostředkovaná imunita především podle subpopulací T lymfocytů. Pacienti se syndromem DN měli ve srovnání s kontrolním souborem laboratorní známky infekce – signifikantní vzestup leukocytů (7,6±2,1, vs. 6,4±1,3.10⁹/l, p<0,01), zvláště neutrofilních (4,6±1,8, vs. 3,8±0,9.10⁹/l, p<0,05) a signifikantní vzestup hladiny CRP (7±12 vs. 2±6 mg/l, p<0,01). Pacienti se syndromem DN měli dále i signifikantně vyšší hladiny IgA (3,5±1,6 vs. 2,7±1,1, g/l, p<0,05) a signifikantně více CD3+ T lymfocytů (76±8 vs. 71±10 %, p<0,05) a supresorových/cytotoxických CD8+ T lymfocytů (32±11 vs. 26±10 %, p<0,05) než kontrolní soubor. Ostatní sledované parametry, imunoglobuliny IgG, IgM a celkový počet lymfocytů a monocytů i subpopulace pomocných T lymfocytů CD4+ a poměr CD4+/CD8+ T lymfocytů se signifikantně nelišily od zdravých kontrolních osob.

Závěry. U pacientů s chronickou infekcí diabetických ulcerací nepředpokládáme výraznější sekundární imunodeficit v oblasti sledovaných buněčných a humorálních imunitních parametrů. Vzhledem k chronicitě infekce a obtížnému hojení diabetických ulcerací je třeba v další fázi výzkumu posoudit, zda je aktivace imunitního systému a zánětlivá reakce u těchto pacientů dostatečná srovnáním se zánětlivou reakcí u osob s ulceracemi bez diabetu.

KLÍČOVÁ SLOVA: diabetická noha, infekce, imunita.

ABSTRACT

Jirkovská A., Fejfarová V., Hosová J. et al.: Analysis of the Inflammation Response and of the Selected Parameters of Immunity in Patients with Infected Diabetic Ulcers

Background. Patients with diabetes represent 50 to 70 % of patients who undergo nontraumatic foot or leg amputation, caused mostly by infection and necrosis of soft tissues accompanied with osteomyelitis. Signs and symptoms of infections may often be absent in patients with infected foot ulcers – the syndrome of „diabetic foot“ (DF). The course and consequences of the infection may be influenced by the immune system dysfunction. The aim of our study was to assess presence of the chronic inflammation and specific immune responses, both humoral and cellular in patients with diabetic foot infection.

Methods and Results. 34 patients treated over one month for an infected DF in our foot clinic (mean age 54±8 years, mean duration of diabetes 20±9 years, mean HbA1c 8.8±1.5 %), were matched with 27 healthy subjects. All patients were without clinical signs of acute deep foot infection and without critical leg ischemia. The inflammatory response was assessed by white blood cells count and C-reactive protein (CRP), humoral immune response was assessed by immunoglobulins (Ig) and cellular immunity was evaluated by T lymphocytes subpopulations. Patients with DF compared with healthy controls exhibited the laboratory signs of infection – significantly increased white blood cells count (7.6±2.1 vs. 6.4±1.3.10⁹/l, p<0.01) and neutrophil count (4.6±1.8 vs. 3.8±0.9.10⁹/l, p<0.05) and significantly increased CRP (7±12 vs. 2±6 mg/l, p<0.01). Patients with DF had also significantly higher IgA levels (3.5±1.6 vs. 2.7±1.1 g/l, p<0.05) and significantly more CD3+ T cells (76±8 vs. 71±10 %, p<0.05) and suppressor/cytotoxic CD8+ T cells (32±11 vs. 26±10 %, p<0.05). Other followed parameters, IgG, IgM and serum monocyte and lymphocyte counts, CD4+ helper T cells and CD4+/CD8+ T-cell ratio did not differ between patients with DF and healthy controls.

Conclusions. We did not anticipate a severe secondary immunodeficiency in followed cellular and humoral immune parameters in patients with chronic bacterial foot infection. It is necessary to assess the sufficiency of immune system activation with respect to chronic inflammation in next research.

Key words: diabetic foot, infection, immunity.

Jl.

Čas. Lék. čes., 141, 2002, No. 15, p. 483–486.

Syndrom diabetické nohy (DN) je příčinou 40–60 % netraumatických amputací dolních končetin, kterým bezprostředně předchází ve 25–50 % infekční komplikace jako flegmóna nebo osteomyelitida. Infekce je také nejčastější příčinou obtíž-

ného hojení ulcerací a hospitalizace pacientů s DN. Vyšetření infekce u diabetických ulcerací spočívá především v pečlivém stěru provedeném po mechanickém lokálním ošetření ulcerace (debridementu). Na výsledek stěru ale nemůžeme spoléhat např. při léčbě osteomyelitidy, která je nejčastěji způsobena zlatými stafylokoky (1). Až 66 % hlubších diabetických ulcerací bývá s osteomyelitidou spojeno (2).

Terapie infekce, nejčastěji dlouhodobě antibiotiky, je nezbytnou podmínkou hojení diabetických ulcerací. Užívají se antibiotika širokospektrá, nejlépe podle kultivace a citlivosti. Parenterální léčbu antibiotiky vyžaduje osteomyelitida, rozsáhlejší flegmóna, infikovaná ulcerace s celkovými laboratorními či klinickými projevy zánětu a infekce rány mikroorganismy necitlivými na perorální antibiotika (3–7). Dlouhodobá léčba infekce diabetické nohy antibiotiky má i své stinné stránky – kromě známých vedlejších účinků antibiotik a ekonomické náročnosti je to i problém efektivity této léčby, která je v některých případech sporná (8). Za racionální se považuje antibiotická léčba lokálních nebo celkových projevů infekce nebo hlubších ulcerací či osteomyelitidy. Antibiotická léčba pouhé kolonizace povrchových ulcerací není nutná, avšak za předpokladu, že bude rána dobře mechanicky lokálně ošetřena a že pacient bude dobře spolupracovat při odlehčení ulcerací, nejlépe speciálním kontaktním sádrovým obvazem (9, 10). Infekční komplikace syndromu DN u pacientů z naší podiatrické ambulance jsme sledovali v retrospektivní studii a zjistili jsme, že pacienti měli hluboké ulcerace infikované závažnými patogeny a byli dlouhodobě léčeni antibiotiky, přičemž pacienti po transplantaci měli hlubší ulcerace i jiný výskyt patogenů (11). Proto jsme se začali zajímat o faktory, které mohou průběh infekce u syndromu DN modifikovat.

Příčinou zvýšené náchylnosti k infekci u pacientů s diabetem mohou být dysfunkce imunitního systému (12, 13). Patří mezi ně např. poruchy nespecifické imunity, zejména poruchy fagocytárních funkcí polymorfonukleárních leukocytů (14–17). Faktory nespecifické imunity u pacientů s syndromem DN jsme sledovali v jiné studii (18). U pacientů s diabetem byly popsány i změny faktorů specifické imunity, a to jak humorálních, tak buněčných (13). Specifické (adaptivní) imunitní mechanismy na rozdíl od nespecifických reagují na antigeny prostřednictvím vysoce specifických molekul (protilátek, antigenně specifických receptorů T lymfocytů) a aktivují se až po setkání s daným antigenem; k úplnému rozvoji imunitní reakce je zapotřebí několika dní až týdnů (19). T lymfocyty (20) mohou působit přímo cytotoxicky (CD8+ T lymfocyty) na buňky exprimující specifické antigeny, a to zejména na buňky prezentující virové antigeny ve spojení s HLA I. třídy, nebo mohou uvolňovat cytokiny, které potencují zánětlivou reakci (pomocné CD4+ T lymfocyty). Pomocné T lymfocyty se aktivují při prezentaci antigenu ve spojení s HLA II. třídy, jejich podskupina Th1 secernuje především interferon gama a tumor necrosis factor a stimuluje makrofágy k zneškodnění intracelulárních antigenů (vyvolává opožděnou buněčnou imunitní reakci), Th2 buňky secernují interferony IL-4, IL-5, IL-10 a IL-13 a stimuluje B buňky k produkci protilátek. Mezi jednotlivými subpopulacemi T lymfocytů dochází k řadě interakcí. Funkcí CD3 membránového proteinu na T lymfocytech, který je asociován s T cell receptorem, je intracelulární přenos signálu o rozpoznání antigenu (transdukce).

Cílem naší práce bylo posouzení zánětlivé odpovědi a vybraných imunitních faktorů, především protilátek a subpopulací T lymfocytů, u pacientů léčených dlouhodobě antibiotiky pro nehojící se ulcerace s chronickou bakteriální infekcí.

SOUBOR NEMOCNÝCH A POUŽITÉ METODY

Do studie jsme zařadili pacienty do 65 let věku léčené v naší podiatrické ambulanci, u kterých přetrvávala infekce v diabetických ulceracích po nejméně měsíční terapii antibiotiky. Stěry z ulcerací byly u pacientů prováděny po předchozím mechanickém očištění rány ze spodiny ulcerace, za pozitivní byl považován bakteriologický nálezy významných patogenů. Nebyli zařazeni pacienti s akutní hlubokou infekcí vyžadující hospitalizaci, pacienti po transplantaci orgánů nebo s defektem imunity nebo s kritickou ischemií dolních končetin. Nezařadili jsme rovněž pacienty s kreatininem nad 300 μmol/l nebo léčené hemodialýzou. Výzkumný soubor tvořilo 34 pacientů s diabetem 2. typu průměrného věku 54±8 let, s trváním diabetu 20±9 let, s průměrným glykovaným hemoglobinem HbA1c 8,8±1,5 %. Kontrolní skupinu tvořilo 27 zdravých osob odpovídajících věkem a pohlavím pacientům.

Zánětlivou reakci jsme hodnotili počtem leukocytů a jejich diferenciálním rozpočtem a hladinou C-reaktivního proteinu (CRP), humorální imunitní odpověď byla hodnocena podle hladin imunoglobulinů IgA, IgG a IgM a buněčně zprostředkovaná imunita podle celkového počtu monocytů a lymfocytů a podle subpopulací T lymfocytů CD3+, CD4+ a CD8+ a pomocí poměru indexu CD4/CD8. Subpopulace T lymfocytů byly stanoveny průtokovou cytometrií, která je založená na cytofluorometrickém měření četnosti buněk s určitou hodnotou fluorescenční aktivity po označení buněk protilátkami s fluoresceinem proti CD membránovým znakům na přístroji FACS CALIBUR, Becton Dickinson, USA. Imunoglobuliny i CRP byly stanoveny turbidimetricky na přístroji COBAS Mira (Roche, SRN). Statistické zpracování bylo provedeno v programu BMDP-PC90 za použití dvouvýběrového a párového t-testu a jejich neparametrických modifikací (Mann-Whitneův test), výsledky jsou vyjádřeny jako průměr a směrodatná odchylka.

VÝSLEDKY

Pacienti se syndromem DN měli ve srovnání s kontrolním souborem zdravých osob mírně, avšak signifikantně zvýšené markery zánětlivé reakce, a to celkový počet leukocytů a počet neutrofilů v krvi a hladinu CRP (tab. 1).

Tab. 1. Laboratorní známky infekce u pacientů se syndromem diabetické nohy (DN) a v kontrolním souboru zdravých osob

Ukazatel	pacienti se syndromem DN (n=34)	kontrolní soubor (n=27)	statistická významnost P
počet leukocytů ($\cdot 10^9/l$)	7,6±2,1	6,4±1,3	<0,01
počet neutrofilů ($\cdot 10^9/l$)	4,6±1,8	3,8±0,9	<0,05
C-reaktivní protein (mg/l)	7±12	2±6	<0,01

Humorální imunitní odpověď byla u pacientů se syndromem DN signifikantně zvýšená ve třídě imunoglobulinů IgA, ostatní třídy (IgG, IgM) se signifikantně mezi oběma skupinami nelišily (tab. 2).

Tab. 2. Ukazatelé humorální imunitní odpovědi u pacientů se syndromem diabetické nohy (DN) a v kontrolním souboru zdravých osob

Ukazatel	pacienti se syndromem DN (n=34)	kontrolní soubor (n=27)	statistická významnost P
immunoglobulin IgA (g/l)	3,5±1,6	2,7±1,1	<0,05
immunoglobulin IgG (g/l)	13,1±5,2	11,2±2,5	NS
immunoglobulin IgM (g/l)	1,2±0,8	1,3±0,7	NS

Ani v buněčné složce specifické imunitní odpovědi jsme nezaznamenali ve sledovaných parametrech u pacientů se syndromem DN významný imunitní deficit ve srovnání se zdravými osobami bez známek chronického zánětu, CD3+ T lymfocyty a CD8+ T lymfocyty byly u pacientů signifikantně zvýšeny (tab. 3).

Tab. 3. Ukazatelé specifické buněčné imunity u pacientů se syndromem diabetické nohy (DN) a v kontrolním souboru zdravých osob

Ukazatel	pacienti se syndromem DN (n=34)	kontrolní soubor (n=27)	statistická významnost P
počet lymfocytů ($\cdot 10^9/l$)	2,25 \pm 0,75	2,01 \pm 0,68	NS
počet monocytů ($\cdot 10^9/l$)	0,46 \pm 0,18	0,40 \pm 0,22	NS
CD3+ T lymfocyty (%)	76 \pm 8	71 \pm 10	p<0,05
CD4+ T lymfocyty (%)	44 \pm 8	44 \pm 8	NS
CD8+ T lymfocyty (%)	32 \pm 11	26 \pm 10	p<0,05
poměr CD4+/CD8+ T lymfocytů	1,61 \pm 0,67	1,98 \pm 0,85	NS

DISKUZE

Cílem práce bylo posoudit zánětlivé markery a vybrané ukazatele buněčné i humorální imunitní odpovědi u pacientů s chronickou bakteriální infekcí diabetických ulcerací ve srovnání s kontrolním souborem zdravých osob.

U pacientů se syndromem DN jsme ve srovnání s kontrolním souborem zjistili mírné, avšak významné zvýšení laboratorních známek zánětu. Podle literárních údajů ani závažná infekce diabetické nohy nemusí být doprovázena klasickými klinickými a laboratorními známkami zánětu, jako je horečka, zvýšený počet leukocytů, vysoká sedimentace nebo vysoký C-reaktivní protein, může ale vést k hyperglykémii (4, 21, 22). Výsledky tyto nálezy v podstatě potvrzují – zvýšení zánětlivých markerů je většinou na horní hranici normy. Pacienti se syndromem DN mívají prodloužený průběh hojení ulcerací, který se počítá často v měsících či letech. Jedním z faktorů, který se na tomto dlouhém průběhu podílí, by mohla být i oslabená systémová odpověď na zánět. Za normálních podmínek (19) pod vlivem cytokinů produkovaných v místě zánětu dochází ke stimulaci produkce proteinů akutní fáze v játrech (např. CRP). Funkcí CRP je opsonizace, aktivace komplementu a vazba na nukleoproteiny, které se uvolňují při rozpadu tkání, a podpora odstraňování poškození tkáně fagocytózou. Další cytokiny uvolňované v místě zánětu stimulují kostní dřeň, kde dochází k novotvorbě leukocytů. Nedostatečná systémová odpověď organismu na zánět může mít za následek poruchu reparace poškozené tkáně, a to nejen poruchu eliminace poškozených buněk fagocyty, ale i poruchu aktivace fibroplastických mechanismů, poruchu angiogeneze, regenerace a remodelace tkání. Přímým klinickým následkem pak může být obtížné hojení ulcerací.

Produkcí zánětlivých cytokinů jsme se v práci nezabývali, hodnotili jsme ale vybrané ukazatele imunitní odpovědi, z nichž některé se systémovou odpovědí na zánět souvisejí. V oblasti humorální imunity jsme u pacientů s bakteriální infekcí syndromu DN zjistili zvýšenou produkci IgA ve srovnání se zdravými osobami, hladiny IgG a IgM se v obou skupinách významně nelišily. IgA se vyskytuje ve formě slizniční a sérové, funguje jako opsonin a neutralizuje antigeny na slizničních površích (19). Produkci imunoglobulinů u pacientů s diabetem se zabývala řada prací. Např. Rodriguez-Segade (23) zjistil, že 33 % pacientů s diabetem 1. typu a 56 % pacientů s diabetem 2. typu mělo významně zvýšenou sérovou hladinu IgA, IgG byly zvýšeny méně často a IgM byly sníženy. Za možnou příčinu abnormálních hladin imunoglobulinů pokládají autoři neenzymatickou glykaci imunoglobulinů, která může ovlivnit jejich funkce a metabolický obrat. Podobně zjistil vyšší hladiny IgA u pacientů s diabetem 2. typu i Eguchi (24), který tento jev vysvětluje častou subklinickou

slizniční infekcí nebo poruchou clearance IgA. K podobným nálezům jako předchozí studie dospěl i Ardawi (25), který zjistil u pacientů s diabetem obojího typu nejvýraznější zvýšení IgA, které korelovalo s vyšší glykovaného hemoglobinu jako ukazatele dlouhodobé kompenzace diabetu. Koncentrace IgG byla v této studii u pacientů zvýšena, koncentrace IgM byla nižší ve srovnání s kontrolním souborem zdravých osob. Rovněž Cheta (26) zjistil u pacientů s diabetem 1. i 2. typu zvýšení IgA, který však nevykazoval kvalitativní změny na rozdíl od IgG, který u části pacientů měl omezenou schopnost inhibovat aktivitu „přirozených zabíječů“ – NK buněk. Na druhé straně ale byly publikovány práce, ve kterých byla koncentrace sérových imunoglobulinů u pacientů s diabetem v normě (27).

V oblasti buněčné imunitní odpovědi jsme zjistili u pacientů se syndromem DN ve srovnání se zdravými kontrolními osobami významně vyšší počet CD3+ a CD8+ T lymfocytů, celkový počet lymfocytů a monocytů v krvi ani subpopulace CD4+ a poměr CD4+/CD8+ se mezi oběma skupinami významně nelišily. Poruchu buněčné imunity u pacientů s diabetem 2. typu zjistil např. Chang (28) – pacienti měli sníženou expresi receptoru pro interleukin 2 (IL-2) na T lymfocytech. Další abnormalitou byla snížená exprese receptoru pro C3 komplement na monocytech. Ostatní ukazatele buněčné imunity – CD3+, CD4+, CD8+ i poměr CD4+/CD8+ T lymfocytů se nelišily u pacientů a zdravých kontrol. Produkce cytokinu tumor-necrosis factoru, který stimuluje další imunitní odpověď, byla u pacientů zvýšená. Tato studie ukazuje, že porucha funkčních vztahů mezi monocyto-makrofágovým systémem a T lymfocyty může být příčinou snížené imunitní odpovědi u pacientů s diabetem i při normálních počtech T lymfocytů a jejich subpopulací. Tento typ imunitní odpovědi se však uplatňuje především u intracelulárních patogenů, jako jsou mykobakteria, plísňe apod.

Za jednu z možných příčin snížené buněčné imunitní odpovědi u pacientů s diabetem je pokládána i autooxidace monocytů při zvýšené produkci volných kyslíkových radikálů polymorfonukleárními leukocyty (12). Problematikou funkce polymorfoneukleárních leukocytů u pacientů s diabetem a syndromem DN jsme se zabývali v jiné práci, kde jsme ale zvýšenou produkci volných kyslíkových radikálů měřenou pomocí oxidativního vzplanutí nezjistili (18).

Poruchou imunitních funkcí u pacientů s diabetem se zabývala řada studií v souvislosti s periodontidou – např. Fontana (29) zjistil vyšší poměr CD4+/CD8+ u pacientů s diabetem a periodontidou než u zdravých kontrol, ostatní vyšetřované parametry – produkce volných kyslíkových radikálů polymorfonukleárními leukocyty, subpopulace T lymfocytů a imunoglobuliny se v obou skupinách nelišily. Studie upozorňuje na možnost změn imunologických buněčných funkcí na lokální tkáňové úrovni – v periodontálních lézích. Podobnou úvahu lze aplikovat i na situaci ve studii, kde pacienti i při nehojících se lézích na nohou nevykazovali výrazné změny ve smyslu deficitu buněčné či protilátkové imunity v krvi.

Závěrem můžeme shrnout, že naše studie neprokázala výrazný deficit ve sledované buněčné a protilátkové imunitní odpovědi u pacientů s chronickou bakteriální infekcí diabetických ulcerací. Systémová odpověď na zánět ale u těchto pacientů nebyla příliš výrazná, což může souviset s nedostatečnou aktivací imunitních mechanismů, a odpovídá chronicitě infekce a obtížnému hojení ulcerací u těchto pacientů. V další fázi výzkumu je vhodné porovnat adekvátnost imunitní odpovědi u pacientů se syndromem DN a srovnat ji se skupinou osob s ulceracemi bez diabetu, a posoudit podrobněji funkční vztahy mezi imunitními a zánětlivými parametry.

Zkratky

CRP	- C-reaktivní protein
DN	- diabetická noha
Ig	- imunoglobulin
IgA	- imunoglobulin A
IgG	- imunoglobulin G
IgM	- imunoglobulin M

LITERATURA

- Lew, D. P., Waldvogel, F. A.: Osteomyelitis. *N. Engl. J. Med.*, 336, 1997, s. 999-1007.
- Grayson, M. L., Gibbons, G. W., Balogh, K. et al.: Probing to bone in infected pedal ulcers. *JAMA*, 273, 1995, s. 721-723.
- Caputo, G., Cavanagh, P. R., Ulbrecht, J. S. et al.: Assessment and management of foot disease in patients with diabetes. *N. Engl. J. Med.*, 331, 1994, s. 854-860.
- Mezinárodní pracovní skupina pro syndrom diabetické nohy. Syndrom diabetické nohy. Mezinárodní konsenzus. České vydání: Ed. Jirkovská, A., Galén, Praha 2000.
- Jirkovská, A.: Diabetická noha. In: *Praktická diabetologie*. Ed. Bartoš, V., Pelikánová, T., Maxdorf, Praha 2000, s. 305-325.
- Bartoš, V., Záhumenský, E., Jirkovská, A., Rybka, J.: Standardy péče o diabetickou nohu. *Vnitř. Lék.*, 42, 1996, s. 54-56.
- Rušavý, Z. et al.: Diabetická noha. Galén, Praha 1998.
- Chantelau, E., Tanudjaja, T., Altenhofer, F. et al.: Antibiotic treatment for uncomplicated forefoot ulcers in diabetes: a controlled trial. *Diabet. Med.*, 13, 1996, s. 156-159.
- Caputo, G. M.: The rationale use of antimicrobial agents in diabetic foot infection. In: *The foot in diabetes*, ed. Boulton, A. J. M., Connor, H., Cavanagh, P. R., John Wiley and sons, LTD, Chichester 2000, s. 143-151.
- Mueller, M. J., Diamond, J. E., Sinacore, D. R. et al.: Total contact casting in treatment of diabetic plantar ulcers: controlled clinical trial. *Diabetes Care*, 12, 1989, s. 384-388.
- Hosová, J., Jirkovská, A., Wosková, V., Skibová, J.: Infekční komplikace syndromu diabetické nohy u pacientů po transplantaci orgánů a bez transplantace. *Prakt. Lék.*, 81, 2001, s. 438-440.
- Bessman, A. N., Sapico, F. L.: Infections in the diabetic patients: the role of immune dysfunction and pathogen virulence factors. *J. Diab. Comp.*, 6, 1992, s. 258-262.
- Geerlings, S. E., Hoepelman, A. I. M.: Immune dysfunction in patients with diabetes mellitus. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 26, 1999, s. 259-265.
- Marhoffer, W., Stein, M., Maeser, E., Federlin, K.: Impairment of polymorphonuclear leukocyte function and metabolic control of diabetes. *Diabetes Care*, 15, 1992, s. 256-260.
- Musclow, C. E., Farkas-Himsley, H., Durbahn, G., Spragg, L.: Fluorescence assay to monitor phagocytosis by blood-clot derived polymorphonuclear leukocytes. 1. Study of patients with diabetes and phagocytosis of different staphylococcal species. *Cytobios*, 65, 1991, s. 15-24.
- Nolan, C. M., Beaty, H. N., Bagdade, J. D.: Further characterization of the impaired bactericidal function of granulocytes in patients with poorly controlled diabetes. *Diabetes*, 27, 1978, s. 889-894.
- Serlenga, E., Garofalo, A. R., De Pergola, G. et al.: Polymorphonuclear cell-mediated phagocytosis and superoxide anion release in insulin-dependent diabetes mellitus. *Cytobios*, 74, 1993, s. 189-195.
- Jirkovská, A., Fejfarová, V., Hosová, J. et al.: Nespecifické mechanismy imunity u pacientů se syndromem diabetické nohy s chronickou bakteriální infekcí. *Vnitř. Lék.* (v tisku).
- Hořejší, V., Bartůňková, J.: *Základy imunologie*. Triton, Praha 1998.
- Chapel, H., Haeney, M., Misbah, S., Snowden, N.: *Essential of clinical immunology*. 4th edition, Blackwell Science, Oxford 1999.
- Mason, J., Keefet, C. O., Hutchinson, A. et al.: A systematic review of foot ulcer in patients with type 2 diabetes mellitus. II: treatment. *Diabet. Med.*, 16, 1999, s. 889-909.
- Eneroth, M., Larsson, J., Apelqvist, J.: Deep foot infections in patients with diabetes and foot ulcer: an entity with different characteristics, treatment characteristics, treatments, and prognosis. *J. Diab. Comp.*, 13, 1999, s. 254-263.
- Rodriguez-Segade, S., Camiña, M. F., Paz, J. M., DelRio, R.: Abnormal serum immunoglobulin concentrations in patients with diabetes mellitus. *Clinica Chimica Acta*, 203, 1991, s. 135-142.
- Eguchi, K., Yagame, M., Suzuki, D. et al.: Significance of high levels of serum IgA and IgA-class circulating immune complexes (IgA-CIC) in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Diab. Complications*, 9, 1995, s. 42-48.
- Ardawi, M. S., Nasrat, H. A., Bahnassy, A. A.: Serum immunoglobulin concentrations in diabetic patients. *Diabetič. Med.*, 11, 1994, s. 384 až 387.
- Cheta, D., Manciulea, M., Santu, E. et al.: Not only quantitative but also qualitative changes of serum immunoglobulins in diabetes. *Romanian Journal of Internal Medicine*, 29, 1991, s. 181-187.
- Beam, T. R. J., Crigler, E. D., Goldman, J. R., Schiffmann, G.: Antibody response to polyvalent pneumococcal polysaccharide vaccine in diabetics. *J. Am. Med. Assoc.*, 244, 1980, s. 2641-2644.
- Chang, F., Šhalo, M.: Decreased cell-mediated immunity in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Res. Clin. Pract.*, 28, 1995, s. 137-146.
- Fontana, G., Lapolla, A., Sanzari, M. et al.: An immunological evaluation of Type II diabetic patients with periodontal disease. *J. Diab. Comp.*, 13, 1999, s. 23-30.

Práce byla podpořena grantem IGA MZ ČR č. 5223-3.

*doc. MUDr. Alexandra Jirkovská, CSc.
Centrum diabetologie IKEM
140 21 Praha 4-Krč, Vídeňská 1958/9
fax: 02/61 36 28 20
e-mail: alji@medicon.cz*



*Rozumím lidem – ale stále mám maličkou naději,
že se přece jen mylím.*

HORTON CHARLES COOLEY



Diabetic Foot Study Group of the EASD

**September 7th-9th 2001
Crieff**

**CRIEFF HYDRO HOTEL
CRIEFF (SCOTLAND)**

DIABETIC FOOT STUDY GROUP OF THE EASD

CRIEFF September 7th-9th 2001

0. ASSESSMENT OF SPECIFIC RESISTANCE TO INFECTION IN PATIENTS WITH DIABETIC FOOT

A. Jirkovská, V. Fejfarová, J. Hosová, J. Kalanin, I. Stříž, and J. Skibová. Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic

The immune system, evolved as a defense against bacterial infection, may be an important factor for the outcome of a foot infection. **Aims:** To assess the presence of chronic inflammation and specific immune responses, both humoral and cellular in patients with diabetic foot (DF) infection. **Patients and methods:** 34 patients treated over one month for an infected DF in our foot clinic (mean age 54 ± 8 years, mean duration of diabetes 20 ± 9 years, mean HbA1c $8.8 \pm 1.5\%$) were matched with 27 healthy subjects. All patients were without clinical signs of acute deep foot infection and without critical leg ischemia. The inflammatory response was assessed by white blood cells count and C-reactive protein (CRP), humoral immune responses were assessed by immunoglobulins (Ig) and cellular immunity was evaluated by monocyte and lymphocyte counts and T lymphocytes subpopulations. **Results:** Patients with DF compared with healthy controls exhibited the laboratory signs of infection – significantly increased serum white blood cells count (7.6 ± 2.1 vs $6.4 \pm 1.3 \cdot 10^9/l$, $p < 0.01$) and neutrophil count (4.6 ± 1.8 vs $3.8 \pm 0.9 \cdot 10^9/l$, $p < 0.05$) and significantly increased CRP (7 ± 12 vs 2 ± 6 mg/l, $p < 0.01$). Patients with DF did not differ significantly from healthy controls in IgG and IgM levels, only IgA was significantly higher in the group of patients (3.5 ± 1.6 vs 2.7 ± 1.1 g/l, $p < 0.05$). No difference in serum monocyte and lymphocyte counts was present. The patients with DF compared with healthy controls had significantly more CD3+ T cells responsible for taking the antigen recognition signal inside the cell (76 ± 8 vs 71 ± 10 %, $p < 0.05$) and suppressor/cytotoxic CD8+ T cells (32 ± 11 vs 26 ± 10 %, $p < 0.05$). Other populations of lymphocytes (CD4+ helper T cells), CD4+ /CD8+ T-cell ratio and natural killer (NK) cells did not differ between patients with DF and healthy controls. **Conclusions:** Patients with chronic bacterial foot infection and laboratory signs of inflammation exhibited only small changes in the specific immune response in comparison with healthy subjects. *Supported by grant of Ministry of Health IGA No. 5223-3*

DIABETOLOGIE METABOLISMUS ENDOKRINOLOGIE VÝŽIVA

ČASOPIS PRO POSTGRADUÁLNÍ VZDĚLÁVÁNÍ
ROČNÍK 4 • SUPPLEMENTUM 1 • 2001

XXXVII. DIABETOLOGICKÉ DNY
Luhačovice, 19.-21. dubna 2001

ABSTRAKTA

INDEXOVÁNO V EMBASE EXCERPTA MEDICA
EXCERPOVANO V BIBLIOGRAPHIA MEDICA CEECHOSLOVACA

www.tigis.cz/dmev/Index.htm
www.casopis-dmev.cz/dmev/Index.htm

ISSN 1211-9326

TIGIS

výkonu bylo pozorováno zvýšení inzulínemie v periferní krvi ve srovnání s výchozími hodnotami ($p=0,002$). Statisticky významná HI přetrvávala i měsíc po TIPS ($p=0,005$). Hodnoty C-peptidu se významně neměnili ani v jaterní žíle ani v periferní krvi v čase. Při vyšetřování IR nedošlo k statisticky významným změnám 1 týden a 1 měsíc po TIPS. 1. den po TIPS došlo ke zvýšení IR ($p=0,01$). Při hodnocení jednotlivých skupin diabetiků a nediabetiků byla výraznější IR u nemocných s DM (prům. $M=1,7\text{ mg/kg/min}$) než u nemocných bez DM ($3,7\text{ mg/kg/min}$) ($p=0,03$). Nezaznamenali jsme signifikantní změny IR v čase u jednotlivých skupin. Kompenzace DM nebyla ovlivněna TIPS. Hodnoty glykémie nalačno před TIPS a 1 měsíc po TIPS byly srovnatelné.

Závěr: Po TIPS došlo ke zvýšení hladiny inzulínu v periferní krvi, díky snížené inzulínové clearance v játrech. I přes hyperinzulinémii, která přetrvávala 1 měsíc po výkonu nedošlo ke zhoršení inzulínové rezistence. Kompenzace diabetu nebyla ovlivněna TIPS.

Podporováno grantem IGA MZ CR NA 4558-3 a CEZ:J13/98: 111500003.

19. SYMPTOMATOLOGIE DIABETES MELLITUS U NEJMENŠÍCH DĚTÍ

M. Dvořáčková, Š. Průhová, V. Rákosníková, J. Lebl
Klinika dětí a dorostu 3. LF UK a FN Královské Vinohrady, Praha

Cíl: Recentní analýzy prokázaly, že v České republice stoupá podíl dětí, u kterých se diabetes mellitus 1. typu projeví již v prvních letech života (Cinek et al, Diabet Med, 2000, 17 [1], 64-9). U těchto dětí nemusí být manifestace diabetu spojena s klasickým příznakovým souborem, obvyklým u školáků a adolescentů. Podcenění některých projevů nemoci může být důvodem opožděné diagnózy, a tím také těžšího iniciálního metabolického rozvratu. Formou dotazníkové akce mezi rodiči pacientů jsme proto analyzovali primární symptomatologii diabetu u nejmenších dětí.

Charakteristika souboru a metodika: Rodiče 37 dětí s diabetem mellitus 1. typu, který se manifestoval ve věku 0-6 let, byli požádáni o vyplnění strukturovaného dotazníku. Do souboru nebyly zařazeny děti s náhodným (presymptomatickým) nálezem hyperglykémie. Vyplněný dotazník vrátili rodiče 33 dětí (19 chlapců, 14 dívek; návratnost dotazníku 89 %). U 11 z nich se diabetes manifestoval ve věku kojeneckém či batolecím (0-3 roky; medián 2,1), u 22 dětí ve věku předškolním (3-6 let; medián 4,6). Dotazník byl zaměřen na údaje o prvních příznamech nemoci, o časové prodlevě mezi prvními projevy a stanovením diagnózy a o počtu lékařů, kteří dítě vyšetřili před rozpoznáním nemoci.

Výsledky: U dětí ve věku 0-3 roky si rodiče nejčastěji všimli nápadně polydipsie (91 %), děti se většinou hlásily o pití i v noci (64 %). Projevy polyurie zaznamenalo 73 % rodičů, z nich polovina v podobě nápadně často mokřých plenek (děti ve věku do 18 měsíců) a polovina ve formě sekundární enurézy (děti ve věku 1,5-3 roky). Pouze u 36 % dětí rodiče registrovali úbytek hmotnosti. U 27 % dětí došlo před stanovením diagnózy k projevům Kussmaulova dýchání a u 18 % ke zvracení, u těchto dětí byla tedy diagnóza stanovena až ve fázi klinicky významné ketoacidózy.

Ve věkové skupině 3-6 let se již soubor iniciálních příznaků více podobal klinickému obrazu u starších dětí. Mezi prvními projevy diabetu dominovala polyurie (95 %), doprovázená u 50 % dětí sekundární noční nebo i denní enurézou. Projevy polydipsie registrovalo 91 % rodičů, u 68 % dětí spojené s pitím v noci. 77 % dětí bylo nápadně únavných, u 68 % dětí rodiče registrovali úbytky hmotnosti. 45 % dětí si stěžovalo na bolesti břicha a odmítalo jídlo. 32 % dětí před stanovením diagnózy zvracelo a 9 % namáhavě dýchalo, tyto děti tedy dosáhly klinicky významného stupně ketoacidózy.

Časová prodleva mezi prvními příznaky a rozpoznáním nemoci činila ve skupině 0-3 roky 14 dní (medián; rozmezí 1-45), ve skupině 3-6 let 18,5 dne (medián; rozmezí 1-150). Děti viděli před rozpoznáním cukrovky nejčastěji 2 lékaři (medián; rozmezí 1-5).

Závěry: Díky úzkému kontaktu s dítětem rodiče nejmenších dětí spolehlivě rozpoznávají některé příznaky, obvykle je však nevnímají jako možné projevy diabetu. Pro lékaře prvního kontaktu je důležitý poznatek, že projevem polyurie může být nápadně častá potřeba měnit mokré plenky (ve věku do 18 měsíců), resp. sekundární noční, případně i denní enuréza (mezi 18 měsíci a 6 roky). Polydipsie se nejčastěji projevuje noční touhou dítěte po pití. Úbytky hmotnosti a nápadná únavnost jsou častěji patrné až u předškolních dětí. Téměř u třetiny dětí ve věku 0-6 let je diagnóza stanovena až ve fázi klinicky významné ketoacidózy.

Studie byla podpořena výzkumným záměrem MSM 111200001.

Autoři děkují za spolupráci rodinám diabetických dětí, které pomohly shromáždit analyzované údaje.

20. IMUNOLOGICKÉ ABNORMALITY U PACIENTŮ SE SYNDROMEM DIABETICKÉ NOHY A JEJICH VZTAH K CHRONICKÉMU ZÁNĚTU

V. Fejfarová, A. Jirkovská, J. Kalanin, I. Střž, J. Skibová
Institút klinické a experimentální medicíny, Praha

Diabetes mellitus je řazen podle WHO k sekundárním imunodeficitním onemocněním.

Cílem práce bylo posoudit kvantitativní i kvalitativní změny vybraných imunologických parametrů u pacientů se syndromem diabetické nohy a posoudit jejich vztah k parametrům chronického zánětu.

Metody: Do studie bylo zařazeno 35 pacientů s diabetem mellitus (1. typ - 4 pacienti, 2. typ - 31 pacientů) s průměrným věkem 56 ± 9 let, HbA1c $8,7 \pm 1,6$ %, BMI 30 ± 7 kg/m². Kontrolní skupinu tvořilo 28 zdravých dobrovolníků se srovnatelným věkem i pohlavím. Z imunologických a zánětlivých parametrů jsme sledovali následující ukazatele - krevní obraz a diferenciální rozpočet, FW, CRP, hladiny imunoglobulinů IgA, IgG, IgM, C3 a C4 složky komplementu, hladiny cirkulujících imunokomplexů (CIK), subpopulace lymfocytů. Výsledky studie byly statisticky zhodnoceny pomocí nepárového t-testu a neparametrického Mannova-Whitneyova testu.

Výsledky: U pacientů se syndromem diabetické nohy byly nalezeny signifikantně vyšší hodnoty markerů zánětu: FW (41/72 vs. 9/22 mm, $p < 0,001$), CRP (6 ± 11 vs. 2 ± 2

ng/l, $p < 0,05$), leukocytů ($7,7 \pm 2,1$ vs. $6,6 \pm 2,1 \times 10^9 / l$, $p < 0,05$) a neutrofilů ($4,7 \pm 1,9$ vs. $3,9 \pm 1,7 \times 10^9 / l$, $p < 0,05$) oproti kontrolní skupině. Hladiny lymfocytů a monocytů se mezi skupinami signifikantně nelišily. Z imunologických abnormalit jsme našli u pacientů se syndromem diabetické nohy signifikantně vyšší procento CD8+ T (cytotoxických) lymfocytů (33 ± 13 % vs. 25 ± 10 %, $p < 0,01$). Jednotlivé subpopulace lymfocytů CD3+, CD4+, CD16,56+ (NK buňky), CD3/69, CD69+ se významně nelišily mezi sledovanými skupinami. Imunoregulační index CD4+/CD8+ byl u pacientů signifikantně nižší ($1,6 \pm 0,8$ vs. $2,1 \pm 0,9$, $p < 0,05$), což může svědčit pro určitou poruchu obranných schopností, či pouze pro přítomnost chronického zánětu. Byla nalezena pozitivní korelace CD4+/CD8+ imunoregulačního indexu s HbA1c. Při hodnocení hladin imunoglobulinů jsme našli u diabetiků signifikantně vyšší hladiny IgA ($3,5 \pm 1,6$ vs. $2,4 \pm 0,9$ g/l, $p < 0,01$) a IgG ($12,9 \pm 5,2$ vs. $10,8 \pm 2,8$ g/l, $p < 0,05$), zatímco hladiny IgM se u pacientů se syndromem diabetické nohy výrazně nelišily od hodnot zdravých dobrovolníků. Nebyly prokázány změny v koncentracích C3 a C4 složek komplementu (C3: $1,2 \pm 0,3$ vs. $1,1 \pm 0,2$ g/l, NS; C4: $0,2$ vs. $0,2$ g/l, NS) mezi sledovanými skupinami. Hladiny CIK byly u pacientů signifikantně elevovány (43 ± 29 vs. 28 ± 18 U, $p < 0,05$). **Závěr:** Stanovené imunologické parametry u pacientů se syndromem diabetické nohy byly spíše modifikovány chronickým zánětem nežli výraznou poruchou imunitního systému.

Práce podporována grantem IGA MZČR č. NB/5323-3.

21. DIAGNOSTIKA DIABETICKEJ ENDOTELOPATIE POMOUCOU MOLEKULOVÝCH MARKEROV

P. Galajda, A. D. Blann¹, L. Šutarík, L. Dulfková, M. Ochodnický, M. Mokáň

*1. interná klinika, JLF UK Martin, Slovenská republika
1Haemostasis Thrombosis Vascular Biology Unit, University of Birmingham, England*

Diabetická endotelopatia sa rozdeľuje na včasnú aktiváciu endotelu, ktorá predchádza vzniku cievnych komplikácií a pozdné poškodenie endotelu, prítomné pri zlej metabolickej kompenzácií alebo mikroangiopatii. Tieto štádiá endotelopatie môžeme rozlíšiť pomocou endotelových markerov, ktoré zahrňujú markery aktivácie endotelu ako von Willebrandov faktor (vWF) a markery poškodenia endotelu ako trombomodulín (TM). Vzťah vWE a TM k aktivácii, resp. poškodeniu endotelu sme overovali na novom modeli vyšetovania funkcie endotelu, kde sme použili celý pupočník ako ľahko dostupnú kultúru. Použili sme dve približne rovnako dlhé časti pupočníka získané ho ihneď po pôrode. Kanylovali sme umbilikálnu vnu, ktorú sme prepláchli 150 ml fyziologického roztoku (FR) za účelom odstránenia zvyškov krvi v cieve. Do uzavretého venózneho systému sme aplikovali aktivačný roztok trombinu (10 IU/ml) alebo poškodzujúce roztoky detergentu (Tween 2 %) alebo elastázy v rôznych koncentráciách, ako kontrolný roztok sme použili FR. Systém bol inkubovaný 30 minút pri 37 st. C, potom sme merali koncentráciu vWF a TM v supernatante a počítali ich celkové množstvo na cm pupočníka. Každý experiment bol vykonaný na 10 pupo-

čnícach. V týchto experimentoch sme zistili, že k zvýšeniu hladín vWF dochádza pri aktivácii endotelu trombínom ($5,85 \pm 1,67$ vs. $4,21 \pm 1,39$ mlU/cm, $p < 0,01$), ako aj pri jeho poškodení detergentom ($5,06 \pm 1,79$ vs. $3,37 \pm 1,29$ mlU/cm, $p = 0,0023$). Celkové množstvo TM v supernatante sa významne zvýšilo len pri použití detergentu ($69,0 \pm 39,1$ vs. $3,08 \pm 1,42$ ng/cm, $p = 0,0005$). Hladiny vWF však rôzne reagovali na poškodenie endotelu elastázou. Tento experiment sme konfrontovali s našimi klinickými štúdiami. U chorých s DM2 bez cievnych komplikácií s normálnymi hladinami TM a dobrou metabolickou kontrolou ($n = 22$) sme potvrdili významne zvýšené hladiny vWF oproti kontrolnému súboru ($n = 17$) ($1,33 \pm 0,39$ vs. $1,01 \pm 0,27$ IU/ml, $p = 0,006$), ktoré korelovali s hladinami C-peptidu, markerom sekrécie inzulínu ($r = 0,680$, $p < 0,01$). U týchto chorých sme potvrdili aj inverznú koreláciu medzi hladinami vWF a TM ($r = -0,32$, $p < 0,01$), čo je typické pre aktiváciu endotelu zápalovými cytokínmi. Obdobne ako v našej experimentálnej štúdii sme u časti chorých (33 %) s mikroangiopatiou a zvýšenými hladinami TM potvrdili normálne hladiny vWF.

Záver: Pri rozlišovaní včasnej a pozdnej diabetickej endotelopatie doporučujeme použiť kombináciu endotelových markerov, kde zvýšené hladiny vWF pri normálnych hodnotách TM svedčia pre aktiváciu endotelu, vzostup hladín TM je charakteristický pre poškodenie endotelu.

22.

LEPTIN A VÝVOJ KETOGENEZE V PRŮBĚHU DLOUHODOBÉHO HLADOVĚNÍ U OBÉZNÍCH DIABETIKŮ 2. TYPU

J. Hilgertová, Š. Svačina, M. Matoulek, T. Haas, M. Haluzík, J. Škrha

III. interní klinika 1. LF UK, Praha

Úloha leptinu v etiologii obezity a úspěšného hubnutí není doposud jasná. Je však známo, že množství plazmatického leptinu koreluje se stupněm adipozity, a že leptin je částečně regulován inzulínem.

Cílem naší studie bylo monitorovat snižování hladin leptinu a inzulínu během dlouhodobého totálního hladovění ve vztahu k tvorbě ketolátů a poklesu hmotnosti obézních osob s diabetem 2. typu oproti obézním bez diabetu a hledat asociaci mezi změnami sledovaných parametrů.

Soubor pacientů tvořilo 9 kontrolních obézních osob (5 žen a 4 muži) s počátečním BMI $39,9 \pm 8,2$ kg.m⁻² a 9 osob s kompenzovaným diabetem 2. typu (7 žen a 2 muži) s BMI $44,46 \pm 7,6$ kg.m⁻² na počátku hladovky. Oba soubory se signifikantně nelišily věkem (52 vs. 48 let), počáteční sérovou hladinou leptinu ($33,2 \pm 12,0$ vs. $33,7 \pm 17,4$ ng.ml⁻¹), inzulínu ($25,4 \pm 11$ vs. $33,7 \pm 15,5$ μU.ml⁻¹) ani β-hydroxybutyrátu ($0,26 \pm 0,14$ vs. $0,31 \pm 0,20$ mmol.l⁻¹). Pacienti podstoupili 14denní pobyt na klinice za účelem kontrované redukce váhy při totálním hladovění. Jednotlivé parametry byly sledovány 1., 2., 3., 6. a 12. den pobytu.

Metody: Sérový leptin byl stanoven ELISA kitem firmy BioVendor, inzulín RIA kitem firmy Cis, ketolátky reprezentované β-hydroxybutyrátem (BOHB) fluorimetrickou metodou a paralelně elektrochemickým senzorem Precision Xtra firmy MediSense.

DIABETOLOGIE METABOLISMUS ENDOKRINOLOGIE VÝŽIVA

ČASOPIS PRO POSTGRADUÁLNÍ VZDĚLÁVÁNÍ

ROČNÍK 6 • ČÍSLO 1 • 2003

Z OBSAHU:

Alexandra Jirkovská

Klinický význam klasifikace syndromu diabetické nohy

Yvona Pospíšilová

Prevence diabetes mellitus 2. typu (výsledky některých dokončených prospektivních studií)

Robert Staffa, Radim Holub, Jiří Jeřábek

Pedální bypass v léčbě nejtěžších stadií syndromu diabetické nohy - kazuistika

Vladimíra Fejfarová, Alexandra Jirkovská, Lída Kazdová, Hana Malinská, Ilja Stříž

Vybrané vitaminy a prvky se vztahem k imunitnímu systému u pacientů s diabetes mellitus

Luboslav Stárka

Jak je to s riziky hormonální náhradní terapie (hrt) u postmenopauzálních žen?

Dana Hauerová, Ondřej Topolčan, Richard Pikner, Daniela Mrázová

Vliv těhotenství na metabolismus štítné žlázy matky

František Duška, Bohumil Bakalář, Michal Anděl

Historie a perspektivy používání růstového hormonu jako anabolika u kriticky nemocných

POŠTOVÁNÍ V KRAJINĚ ČR ČERTA MEDICA
POŠTOVÁNÍ V BIBLIOGRAPHIA MEDICA CZECHOSLOVACIA

www.tigis.cz/dmcy/Inco.html

ISSN 1013-3321

TIGIS

k rozvoji vaskulárních komplikací u pacientů s diabetes mellitus (Karahana et al. 2001). Jiní autoři ve svých studiích prokázali poruchu inzulínové sekrece, inzulínovou rezistenci a glukózovou intoleranci vlivem přítomné alterace metabolismu Mg, Mn, Cu a Zn (Park et al. 1986, Baly et al. 1984, Paolisso et al. 1989).

Existuje řada studií, které zkoumaly stav a metabolismus „mikronutrientů“ u pacientů s diabetes mellitus. Rema a spol. prokázal, že oxidační stres, jenž může být také způsoben nedostatkem antioxidantů (vitaminu C a E) u pacientů s diabetem, působil chronické poškození tkání oxidačním stresem. Prokázal sníženou aktivitu antioxidačního systému zejména u pacientů s pozdními komplikacemi diabetu. Tomuto poškození je možné zabránit vhodnou suplementací vitamínem C a E (Rema 1995). U pacientů s diabetes mellitus 2. typu byl v jiné studii prokázán deficit vitamínu B6 a relativní zvýšení hladin vitamínu A a C oproti zdravým kontrolám; celkové procento pacientů s deficiencemi vitamínů (B1, B2, B6, A) a vybraných prvků (Zn, Fe) bylo vyšší oproti zdravé populaci (Havivi 1991). Dle Nota a spol. (Nota et al. 1983) byla prokázána vyšší koncentrace Cu a nižší koncentrace Zn v séru pacientů s diabetes mellitus v porovnání se zdravými kontrolami. Pacienti s pozdními komplikacemi diabetu měli signifikantně vyšší hladiny Cu v porovnání s pacienty bez pozdních komplikací. Autoři studie vyslovili hypotézu, že při poruše metabolismu mastných kyselin potencují po několika letech vysoké hladiny mědi výskyt diabetických mikro i makrovaskulopatií. Koncentrace Mg se ve studii Nota a spol. významně nelišily mezi skupinou pacientů s diabetem a kontrolní skupinou. Studované parametry nekorelovaly signifikantně ani s kompenzací diabetu (HbA1c, glykemií), ani s dávkami inzulínu. Studie Karahana a spol. taktéž prokázala snížené sérové koncentrace zinku u pacientů s diabetes mellitus. Ovšem poměr Cu/Zn byl zvýšený u studované skupiny pacientů a hladiny sérové Cu se signifikantně nelišily oproti parametrům zdravých dobrovolníků. U diabetických pacientů s vaskulárními komplikacemi pozitivně koreloval poměr Cu/Zn s aktivitou Cu,Zn superoxididismutázy. Dle autorů může deficit zinku iniciovat aktivaci PMN buněk, a tím přispívat k rozvoji vaskulárních komplikací (Karahana 2001).

Cu a Zn jsou součástí antioxidačního systému, jenž je tvořen mimo jiné enzymy Cu, Zn- superoxididismutázou, Zn,Se- glutathionperoxidázou. Tyto enzymy zprostředkovávají odstraňování ROI a snižují tak riziko rozvoje aterosklerózy (Diplock AT 1988, Uchimura K et al. 1999). Studované aktivity obou enzymů se významně nelišily mezi skupinou pacientů s diabetem a kontrolní skupinou (Walter et al. 1991). Avšak Nath (Nath et al. 1984) ve své studii popsal redukce aktivit cytoplasmatické i mitochondriální superoxididismutázy, které vedly ke zvýšení hladin superoxidových aniontů produkovaných PMN buňkami u pacientů s diabetes mellitus ve srovnání se zdravými kontrolami. Snížená aktivita těchto enzymů byla spojena s poklesem koncentrací Cu a Zn v PMN buňkách.

Na imunitní funkci má z prvků největší vliv Se, Cu, Zn a Fe, z vitamínů pak vitamíny A, C, E, B6, B12 a kyselina listová (Beisel 1982). Nedostatek nebo i nadbytek stopových prvků (Mn, Cu, Zn, Se) a Fe může redukovat

imunitní funkce. Deficit některých vitamínů, především vitamínu C a E, vede dle studií provedených in vitro k poškození syntézy proteinů a DNA, k poškození regulace buněčné proliferace a k poruše zrání imunitních buněk (Gross et al. 1980).

Malnutrice vitamínů a stopových prvků může vést k poruchám imunity na několika úrovních (Chandra 1997). Při deficitu zmíněných látek nacházíme poruchy proliferace lymfocytů. Bylo pozorováno zpomalení vyzrávání T-lymfocytů, snížení počtu subpopulací CD4+ a CD8+ T-lymfocytů, dále byla nalezena i redukce B-lymfocytů produkujících protilátky. Byly zaznamenány i změny nespecifického imunitního systému, a to snížené koncentrace a aktivity většiny částí komplementu a poruchy fagocytózy (Chandra 1997). Ke zlepšení imunitních funkcí jako např. testu pozdní přecitlivělosti, proliferace lymfocytů při odpovědi na antigeny a mitogeny dochází po suplementaci pacientů některými vitamíny a stopovými prvky (Bogden et al. 1995).

Imunologické abnormality závisejí na typu deficitního nutrientu, na interakci s ostatními nutrienty, na tíži deficitu daného nutrientu, na přítomnosti infekce a na věku pacienta. Poruchy imunitních funkcí při změně metabolismu vitamínů a stopových prvků byly zkoumány i v souvislosti s diabetem.

VÝZNAM VYBRANÝCH VITAMÍNŮ A PRVKŮ S ÚZKÝM VZTAHEM K IMUNITNÍMU SYSTÉMU U DIABETES MELLITUS

Vitamin E:

Vitamin E, známý jako tokoferol, patří mezi hydrofobní vitamíny. Tento vitamin je složen z α , β , γ subfrakcí, z nichž nejrozšířenější je alfa tokoferol. Vitamin E se resorbuje z gastrointestinálního traktu, lymfou je přenášen do organismu chylomikrony. V krvi je vázán na beta-proteiny. Vitamin E je obvykle skladován ve všech tkáních, což zabraňuje rozvoji hypovitaminózy po dlouhou dobu. Fyziologická sérová koncentrace je 16-36 $\mu\text{g}/\text{dl}$, denní potřeba vitamínu E je 10-20 mg. Je známý svým antioxidačním účinkem - zabraňuje stárnutí a nádorovému bujení inhibicí oxidace základních buněčných struktur toxickými ROI. Kromě antioxidačních účinků má i účinky roborativní - podporuje růst a metabolické pochody organismu. Rozpoznání deficitu vitamínu E je umožněno určením poměru sérové koncentrace vitamínu E a sérové koncentrace lipidů, protože při hyperlipoproteinemii se falešně zvyšuje koncentrace vitamínu E, který se ve zvýšené míře váže na lipoproteiny.

Nedostatek vitamínu E vede k neurologickým obtížím typu areflexie, zhoršení propriocepce a zhoršení vibračního cití. Dále dochází k poruše permeability cév a k poruchám plodnosti.

Deficit vitamínu E způsobuje v imunitním systému redukci buňkami zprostředkované imunity - snižuje se odpověď B a T lymfocytů na mitogeny. Taktéž dochází k redukci produkce imunoglobulinů (Gross et al. 1980). Suplementace vitamínem E zlepšuje stav imunity, a tím vede k redukci infekčních komplikací (Girodon et al. 1999).

Pacienti s diabetem 2. typu mají větší sklon k rozvoji předčasné aterosklerózy, proto je u nich studium defi-

citu vitamínu E předmětem zájmu řady studií. Suplementace alfa tokoferolem snižuje LDL oxidabilitu, ale neovlivňuje glykaci LDL částic (Devaraj et al. 2000-a.). Po suplementaci alfa-tokoferolem klesala monocytární produkce ROI a interleukinu 1, dále klesaly cirkulující solubilní buněčné adhezivní molekuly u pacientů s diabetem 2. typu (Devaraj et al. 2000-a). Suplementace alfa tokoferolem vedla u pacientů s diabetem 2. typu ke snížení hladin CRP a interleukinu-6 produkovaného monocytů (Devaraj et al. 2000-b).

Snížení zánětlivých parametrů po suplementaci vitamínem E u pacientů s diabetem by se mohlo uplatnit v prevenci předčasné aterosklerózy (Devaraj et al. 2000-b).

V naší studii nebyly prokázány u pacientů se syndromem diabetické nohy signifikantní změny v koncentracích vitamínu E ani v hladinách jeho subfrakcí v porovnání s kontrolní skupinou zdravých osob ($40,1 \pm 13,8$ vs. $35,5 \pm 11$ ug/dl; NS) (Fejfarová et al. 2002).

Vitamin C:

Hlavní úlohou vitamínu C, který řadíme mezi hydrofilní vitamíny, je antioxidační role. Vitamin C má schopnost redukovat prvky v mnoha enzymech a odstraňovat volné radikály. Dále hraje velmi důležitou roli v metabolismu pojiva - kolagenu (Yue 1990). Celkový obsah vitamínu C v těle je 1,5-3 g, normální sérová hladina je 29-86 mg/dl, přičemž denní dávka by měla činit zhruba 75 mg. Zdrojem vitamínu C je čerstvá zelenina, ovoce, játra, ledviny.

Deficit vitamínu C je určen poklesem sérových hladin vitamínu pod hodnoty nižší než 11,4 mmol/l (Johnston 1998). Nedostatek vitamínu vede k poruše endotelu, jejímž výsledkem je zvýšená fragilita kapilár. Ta se klinicky projevuje hemoragickými komplikacemi, např. perifolikulární hemoragií, hemoragií retrobulbární, subarachnoidální a intracerebrální. Dále se deficit projevuje poškozením hydroxylace prokolagenu. Nehydroxylovaný kolagen poté nemůže tvořit prostorovou konfiguraci trojitého helixu, která je nutná pro vytvoření normální struktury pojiva. Setkáváme se s poruchou chrupavek a vaziva, která vede ke zhoršenému hojení ran, kostním abnormalitám a artralgiím. Nejmarkantnější jsou patrně

příznaky deficitu kyseliny askorbové u skorbutu a Möeller-Barlowovy choroby. Skorbut je provázen vypadáváním zubů, zvýšenou krvácivostí, únavou, psychózami a sníženou odolností vůči infekcím. Möeller-Barlowova choroba se manifestuje v dětství krvácením do epifyzárních chrupavek a poruchami růstu kostí, což vede k trpasličímu vzrůstu postižených.

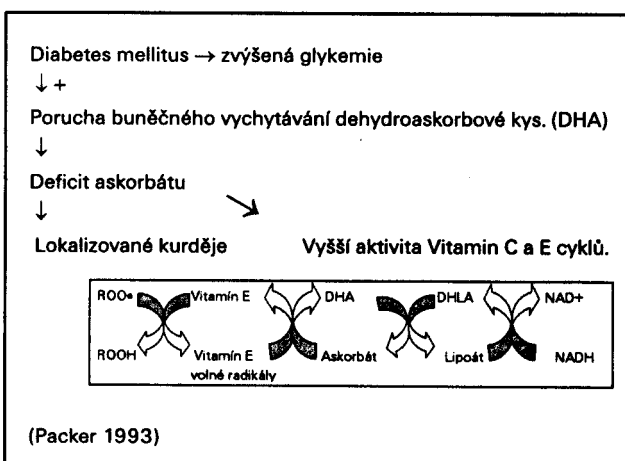
Vitamin C ovlivňuje významně i imunitní funkce. Při deficitu vitamínu C dochází k redukcí hladin vitamínu v makrofázích a PMN buňkách, kde dochází ke snížení fagocytární kapacity. Úpravu imunologických abnormalit lze vidět po suplementaci vitamínem C (Gross et al. 1980). Mezi glukózou a askorbovou kyselinou dochází ke kompetici při membránovém transportu, což může ovlivňovat i produkci volných kyslíkových radikálů viz obr. č.1 (Pecoraro et al. 1987, Packer 1993). Při déletrvajícím hyperglykemii navozené clampovými technikami byly nalezeny signifikantní změny chemotaxe mononukleárních i PMN buněk, které korelovaly s poklesem vitamínu C v buňkách. Tento výsledek prokazuje, že akutní hyperglykemie může vést k intracelulárnímu deficitu kyseliny askorbové v leukocytech a poškozovat tak akutní zánětlivou reakci u pacientů s diabetem (Pecoraro et al. 1987).

V naší studii jsme prokázali signifikantně sníženou koncentraci vitamínu C u pacientů se syndromem diabetické nohy v porovnání se zdravými kontrolami (57 ± 21 vs. 74 ± 22 mg/dl; $p < 0,01$) (Fejfarová et al. 2002). Akkus a spol. popsali ve své studii snížené hladiny vitamínu C a zvýšené poškození leukocytů oxidačním stresem u pacientů s diabetes mellitus 2. typu v porovnání se zdravými kontrolami (Akkus et al. 1996). Taktéž Stankova a spol. prokázali i nižší hladiny vitamínu C u pacientů s diabetem 1. i 2. typu v porovnání se zdravými kontrolami. Hladiny vitamínu C nekorelovaly signifikantně s HbA1c či glykemií na lačno (Stankova et al. 1984). Ve studii Sinclaira a spol. byly prokázány nižší plazmatické hladiny vitamínu C u pacientů s diabetes mellitus v důsledku přítomnosti diabetu nikoli v důsledku sníženého příjmu vitamínu C potravou (Sinclair 1994). Nižší hladiny vitamínu C u pacientů s diabetes mellitus potvrdil i Ali a spol., přičemž pacienti s již manifestovanými pozdními komplikacemi měli nižší hladiny než pacienti bez komplikací. Včasná suplementace pacientů vitamínem C podle autorů studie může zpomalit rozvoj mikrovaskulárních komplikací (Ali 1989).

V jiné studii bylo prokázáno, že dekompenzovaní pacienti s diabetem mohou mít vyšší riziko rozvoje deficiencie vitamínu C než pacienti dobře kompenzovaní, jelikož hladiny vitamínu C negativně korelovaly s HbA1c (Yue 1990). Schorah et al. nenalezl signifikantní rozdíly v koncentracích vitamínu C mezi pacienty s diabetes mellitus 1. a 2. typu (Schorah et al. 1988).

Selen:

V buňkách hraje selen roli při odstraňování volných kyslíkových radikálů, jelikož je součástí enzymu glutathionperoxidázy, který se podílí na rozkladu H_2O_2 (Falachuk 1998). Selen je důležitou komponentou účastnící se růstu buněk. Selen pomáhá ochraňovat živočichy před karcinogenními látkami a viry. Zdrojem selenu bývají pro lidský organismus obiloviny a mořské produkty.



Obr. 1: Vliv diabetu na metabolismus vitamínu C a tvorbu volných kyslíkových radikálů.

Nízké koncentrace selenu vedou k redukcí aktivity buňkami zprostředkované imunity, k potlačení odpovědi T buněk na mitogeny a antigeny. Deficit selenu způsobuje snížení fagocytární aktivity monocytů a makrofágů. Suplementace tímto prvkem zlepšuje stav imunity, a tím vede k redukcí infekčních komplikací (Girodon et al. 1999).

Magnezium:

Mg je intracelulární prvek, který je součástí více než tří set enzymatických systémů, kde se účastní tvorby ATP (Fox et al. 2001). Mg se obvykle vyskytuje v kostech (asi 50 %) a ve svalech, kde působí jako relaxans, působí antiarytmicky na myokard, ovlivňuje i koagulační kaskády (Iannello et al. 2001). Magnezium na celulární úrovni ovlivňuje draselný a vápníkový transport, energetický metabolismus a buněčnou proliferaci (Saris et al. 2000). Deficit magnezia vede ke zvýšené reaktivitě hladkého svalstva a trombocytů (Fox et al. 2001).

Zásoby magnezia v organismu jsou regulovány gastrointestinální absorpcí a renální exkrecí (Iannello et al. 2001). Denní doporučená dávka hořčíku je 100-500 mg, fyziologické hladiny jsou 0,8 -1,2 mmol/l. Přírodním zdrojem magnezia jsou zelené části rostlin, mléčné výrobky, luštěniny a tvrdá voda.

Magnezium hraje důležitou roli v imunitním systému, jelikož je kofaktorem enzymů při syntéze imunoglobulinů, enzymu C3 konvertázy (ovlivňuje aktivaci komplementu), dále ovlivňuje buněčnou adhezi a odpovědi makrofágů na lymfokiny. Deficit Mg se projevuje v imunitním systému abnormální aktivací komplementu, nadměrnou produkcí protilátek a zvýšenou citlivostí na alergické stimuly. U lidí s hypomagnezemií byl pozorován zvýšený výskyt chronických plísňových a virových onemocnění (Galland 1988). Při deficitu Mg došlo k významně vyšší bazální aktivitě neutrofilů (zvýšené produkce ROI) u potkanů s deplecí Mg, zvýšená produkce ROI byla inhibována vysokými extracelulárními koncentracemi Mg (Bussiere et al. 2002).

U pacientů s diabetem je popisován deficit magnezia poměrně často, přičemž bývá sdružen s inzulinovou rezistencí a výskytem pozdních komplikací (Fox et al. 2001). K deficitu tohoto prvku přispívají zejména hypermagneziurie při glykosurii a hyperinzulinemii (De Walk 1999). Suplementace magnezium vedla ke zlepšení inzulinové citlivosti a inzulinové sekrece u pacientů s diabetes mellitus 2. typu (De Walk 1999).

Hypomagnezemie se může podílet na rozvoji neuropatie a abnormální aktivity trombocytů. Tyto abnormality jsou rizikovými faktory pro progresi ulcerací dolních končetin u pacientů s diabetem. V naší studii jsme neprokázali významné změny sérových hladin hořčíku u pacientů se syndromem diabetické nohy v porovnání se zdravými kontrolami ($0,76 \pm 0,1$ vs. $0,81 \pm 0,07$ mmol/l; NS) (Fejfarová et al. 2002). V jiné studii (Rodriguez et al. 2001) prokázali snížené hladiny magnezia u pacientů se syndromem diabetické nohy v porovnání se zdravými kontrolami.

Djurhuus a Schnack prokázali deficienci Mg u pacientů s diabetes mellitus 1. typu, zejména hůře kompenzovaných (Djurhuus et al. 2001). Suplementace Mg vedla

ke zlepšení kompenzace diabetu (Schnack et al. 1992). Djurhuus dále popsal po suplementaci Mg snížení hladin celkového i LDL cholesterolu a apolipoproteinu B u pacientů s diabetes mellitus 1. typu (Djurhuus et al. 2001).

Měď:

Více než 90 % mědi je vázáno na ceruloplasmin. Spolu se Zn je Cu vázána v enzymu Cu, Zn-superoxiddismutáze, který katalyzuje přeměnu ROI na peroxid vodíku a molekulu kyslíku (Uchimura K et al. 1999). Měď je dále součástí enzymů, které se účastní Krebsova cyklu. Tento stopový prvek je důležitý pro tvorbu pigmentů, vlasů, pro správný vývoj skeletu a pro krvetvorbu. Při krvetvorbě napomáhá měď železu při vstupu do prostetické skupiny hemu. Fyziologická sérová koncentrace je 11-22 umol/l, denní potřeba je 5 mg. Zdrojem mědi jsou obvykle maso, luštěniny.

Snížené sérové hladiny mědi byly nalezeny u pacientů s nefrotickým syndromem, kwashiorkorem, hepatolentikulární degenerací, Wilsonovou chorobou, u pacientů s průjmovitým onemocněním a s malabsorbci. Lehčí deficit mědi se projevuje poruchou růstu nehtů a vlasů, těžší pak anémií, psychomotorickou retardací a osteoporózou.

V imunitním systému se nedostatek mědi projevuje redukcí proliferace a funkce monocytů, snižuje se počet neutrofilů a T-lymfocytů (Davis et al. 1987). V T-lymfocyttech pak dochází k abnormalitám jejich funkcí - snížené proliferaci T-lymf a produkci IL-2 (Kelley 1995). Dále deficit mědi způsobuje redukcí antioxidační kapacity organismu (ovlivněním aktivity Cu, Zn-superoxiddismutázy), která může vést ke zvýšení oxidace LDL cholesterolových partikulí (Burkitt 2001).

V naší studii nebyly prokázány významné změny hladin mědi u pacientů se syndromem diabetické nohy v porovnání s kontrolní skupinou zdravých dobrovolníků ($17,4 \pm 4,9$ vs. $15,4 \pm 3,5$ umol/l; NS) (Fejfarová et al. 2002). Taktéž Williams neprokázal ve své studii významné změny hladin mědi u pacientů s diabetes mellitus (Williams et al. 1995). Nicméně Raz a spol. našli u pacientů s diabetem 1. typu vyšší koncentrace mědi v krevním séru i v leukocytech (Raz et al. 1989).

Zinek:

Zinek je jedním z důležitých prvků pro udržení funkční a strukturální integrity buněk a tkání (Rudolf et al. 2001). Zinek je přítomen ve větším množství v pojivových tkáních, sítnici, pankreatu a prostatě (Chai et al. 1999).

Zinek je intracelulární prvek. Jeho plazmatická koncentrace činí pouze 100 ug/dl, přičemž 70 % prvku je vázáno na albumin a α_2 -makroglobulin. Denní doporučená dávka činí 15 mg. Zdrojem zinku je maso, žloutek.

Zinek ovlivňuje reprodukční, imunologický a gastrointestinální systém (Prasad 1998). V neurologickém systému zinek inhibuje vazbu peptidů na neuroreceptory, podporuje dlouhodobou paměť a napomáhá správnému zpracování optických signálů (Frederickson et al. 2000). Tento prvek je nepostradatelný pro správný vývoj a fungování mužských pohlavních orgánů a pro normální embryonální vývoj. Zn může v organismu ochraňovat

arachidonovou kyselinu proti oxidaci Fe komplexy, a tím regulovat metabolismus prostaglandinů a leukotrienů. Dále je zinek schopen zabránit interakci redox-aktivních elementů (Fe, Cu) s aktivními místy proteinů, a tím snižovat oxidační poškození (Powell 2000).

Z diabetologického hlediska je zinek důležitý pro rozpustnost inzulínu (Pelikánová, Bartoš 2000). Dále je zinek důležitým kofaktorem velkého počtu metaloenzymů spojených se syntézou DNA - s replikací, reparací a transkripcí (Garfinkel 1986). Apoptózu buněk vyvolanou zevními vlivy blokuje interakcí s transkripčními faktory, kinázami anebo svými antioxidačními vlastnostmi (Rudolf et al. 2001).

Nedostatek zinku se může projevit akumulací odpadních či toxických částic, sníženou produkcí proteinů, neoplastickými změnami buněk, urychlením apoptotické kaskády a následně buněčnou smrtí mnoha buněk (Garfinkel 1986, Rudolf et al. 2001). V dermatologickém systému se nedostatek Zn projevuje hyperkeratózami, alopecií, acrodermatitis enteropathica. Snížená koncentrace zinku se projevuje poruchami růstu, hojení ran, poruchami funkce pohlavních orgánů, malformacemi mozku, očí, kostí, srdce.

V imunitním systému se projevuje nedostatek zinku sníženou reakcí pozdní přecitlivělosti, nižším počtem CD4+, vyšším počtem CD8+ T lymf, redukcí aktivity NK buněk (natural killers) (Beisel 1982). Byla pozorována snížená chemotaxe a ingesce monocytů a PMN buněk (Beisel 1982).

V naší studii jsme neprokázali významný pokles sérových hladin tohoto stopového prvku u pacientů se syndromem diabetické nohy (intracelulární koncentrace nebyly zkoumány) - $12,7 \pm 3,6$ vs. $12,7 \pm 2,7$ umol/l; NS (Fejfarová et al. 2002). Naproti tomu Raz a spol. našli významně snížené hladiny zinku v séru a v leukocytech pacientů s diabetes mellitus 1. typu, které ale nebyly prokázány u pacientů s diabetes mellitus 2. typu. Sérové koncentrace mědi a magnezia byly u pacientů s diabetes mellitus 1. typu zvýšené (Raz et al. 1989). Williams a spol. ve své studii prokázali významnou redukci hladin zinku v séru u pacientů s diabetes mellitus oproti kontrolní skupině, ovšem sérové koncentrace mědi nebyly odlišné (Williams et al. 1995). Pai et al. prokázali nízké koncentrace Zn v lymfocytech, granulocytech i trombocytech u pacientů s diabetes mellitus 1. a 2. typu (Pai et al. 1988). Po suplementaci Zn došlo k významnému zlepšení reaktivity T lymfocytů u pacientů s DM 2. typu (Niewoehner et al. 1986). Normalizace extracelulárních hladin zinku ovšem nevedla v jiné studii (Kajanachumpol et al. 1995) k ovlivnění jeho intracelulárních hladin. U pacientů s diabetes mellitus bylo pozorováno po suplementaci Zn zvýšení CD4+ buněk; počet CD8+ lymfocytů se ovšem nezměnil (Kajanachumpol et al. 1995).

Ve studii Gavella a spol. bylo prokázáno, že při fyziologických koncentracích zinku (20 umol/l) in vitro produkují PMN buňky o 20 % méně superoxidových aniontů, nežli bez přítomnosti zinku v médiu. Pokud se zvýšila koncentrace zinku až na hodnoty 200 umol/l, zaznamenali autoři nárůst produkce superoxidových aniontů o 40 % oproti kontrolním PMN buňkám bez zinku v médiu. Suprese a stimulace produkce superoxidových

aniontů PMN buňkami byla v této studii závislá na extracelulární koncentraci zinku, vztah však nebyl lineární (Gavella et al. 2000).

Železo:

Celkové zásoby železa v organismu jsou podle pohlaví od 50-70 mmol tzn. 3-4 g (Šulc 2000). Z tohoto množství přibližně 60-70 % železa je vázáno v hemoglobinu, 10-20 % tvoří tzv. funkční železo. Mezi tzv. „funkční železo“ řadíme myoglobin a enzymy obsahující Fe - např. kataláza. Zbytek železa v organismu (16-30 %) tvoří zásobní formu železa (ferritin, hemosiderin). Sérová koncentrace má činit 9-27 umol/l. Celková denní potřeba Fe (cca 10-20 mg) se řídí ztrátami tohoto prvku organismem. Zdrojem železa pro organismus je maso, játra, žlutky, zelenina. Z imunologického hlediska je důležité, že lymfoidní buňky vyžadují železo pro metabolickou aktivitu, a to pro buněčné dělení, přenos elektronů a pro reakce oxidační a redukční.

Nedostatek železa se typicky projevuje sideropenickou anémií, dochází ale také ke snížení obranyschopnosti organismu. V imunitním systému se snižuje reakce pozdní přecitlivělosti, snižuje se odpověď T lymfocytů na mitogeny, dále se snižuje produkce lymfokinů v aktivovaných T lymfocytech; vlivem nedostatku Fe se redukuje produkce protilátek a taktéž fagocytóza PMN buněk (Beisel 1982).

V naší studii nebyly prokázány významné změny koncentrací sérového železa u pacientů se syndromem diabetické nohy v porovnání se zdravými kontrolami - $15 \pm 5,4$ vs. $17,8 \pm 4,8$; NS (Fejfarová et al. 2002). V jiné studii byly nalezeny u pacientů s diabetes mellitus 2. typu vyšší hladiny železa v lymfocytech v porovnání s kontrolní skupinou zdravých osob; koncentrace železa nekorelovaly s HbA1c (Ekmekcioglu et al. 2001).

ZÁVĚR

Řada studií prokázala, že diabetes mellitus může ovlivnit metabolismus vitaminů a stopových prvků. V naší studii pacientů se syndromem diabetické nohy měli nemocní významně nižší hladinu vitaminu C v porovnání se zdravými kontrolami. Ostatní stanovené hladiny vitaminu E a jeho subfrakcí a vybraných prvků (hořčík, měď, zinek, železo) se u studované skupiny pacientů významně nelišily v porovnání se zdravou populací.

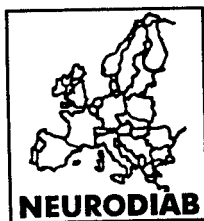
U pacientů s diabetes mellitus by bylo výhodné stanovovat celkové hladiny vitaminů C, E a vybraných prvků (Mg, Cu, Zn, Fe), abychom odhalili případné deficity těchto látek. Následná suplementace by mohla ovlivnit progresi aterosklerózy i mikrovaskulárních komplikací či poškození imunitního systému. Na základě našich výsledků můžeme doporučit pouze suplementaci vitaminem C u pacientů s diabetes mellitus a s chronickou infekcí v rámci syndromu diabetické nohy. Tato suplementace by mohla pozitivním způsobem ovlivnit imunitní systém, zejména pak fagocytární schopnost makrofágů a PMN buněk, které se nejvíce uplatňují v boji proti infekčním agens.

LITERATURA

1. Akkus I, Kalak S, Vural H, Caglayan O, Menekse E, Can G, Durmus B. Leukocyte lipid peroxidation, superoxide dismutase, glutathione peroxidase and serum and leukocyte vitamin C levels of patients with type II diabetes mellitus. *Clinica Chimica Acta* 1996; 244: 221-227.
2. Ali SM, Chakraborty SK. Role of plasma ascorbate in diabetic microangiopathy. *Bangladesh Med Res Counc Bull* 1989; 15: 47-59.
3. Baly DL, Curry DL, Keen CI, Hurley LS. Effect of manganese deficiency on insulin secretion and carbohydrate homeostasis in rats. *J Nutr* 1984; 114:1438-1446.
4. Beisel WR. Single nutrients and immunity. *Am J Clin Nutr* 1982; 35: 417-468.
5. Bogden JD. Studies on Micronutrients Supplements and Immunity in Older People. *Nutrition Reviews* 1995; 53 : S59-S65.
6. Burkitt MJ. A critical overview of the chemistry of copper-dependent low density lipoprotein oxidation: roles of lipid hydroperoxides, alpha-tocopherol, thiols, and ceruloplasmin. *Arch Biochem Biophys* 2001; 394(1):117-135.
7. Bussiere FI, Gueux E, Rock E, Girardeau JP, Tridon A, Mazur A, Rayssiguier Y. Increased phagocytosis and production of reactive oxygen species by neutrophils during magnesium deficiency in rats and inhibition by high magnesium concentration. *Br J Nutr* 2002; 87: 107-113.
8. Davis MA, Johnson T, Briske-Anderson M. Lymphoid cell functions during copper deficiency. *Nutr Res* 1987; 7:211-222.
9. De Walk HW. Magnesium in diabetes mellitus. *Neth J Med* 1999; 54:139-146.
10. a.-Devaraj S, Jialal I. Low-density lipoprotein postsecretory modification, monocyte function, and circulating adhesion molecules in type 2 diabetic patients with and without macrovascular complications: the effect of alpha-tocopherol supplementation. *Circulation* 2000; 102: 191-196.
11. b.-Devaraj S, Jialal I. Alpha tocopherol supplementation decreases serum C-reactive protein and monocyte interleukin-6 levels in normal volunteers and type 2 diabetic patients. *Free Radic Biol Med* 2000;29: 790-792.
12. Diplock AT. Oxygen free Radicals and Protection by Vitamin E and Selenium. *Medical Biology* 1988; 62: str. 78.
13. Djurhuus MS, Klitgaard NA, Pedersen KK, Blaabjerg O, Altura BM, Altura BT, Henriksen JE. Magnesium reduces insulin-stimulated glucose uptake and serum lipid concentrations in type 1 diabetes. *Metabolism* 2001; 50: 1409-1417.
14. Ekmekcioglu C, Prohaska C, Pomazal K, Steffan I, Schernthaner G, Marktl W. Concentrations of seven trace elements in different hematological matrices in patients with type 2 diabetes as compared to healthy controls. *Biol Trace Elem Res* 2001; 79:205-219.
15. Falchuk KH. Disturbances in Trace Elements. In Fauci, Braunwald et al.: *Harrison's Principles of Internal Medicine 14th Edition*, USA: The McGraw-Hill Companies, 1998; 489-492.
16. Fejfarová V, Jirkovská A, Malinská H, Kazdová L, Kalanin J, Stříž I. The comparison of vitamin and trace elements concentrations between patients with the diabetic foot and healthy subjects. Is there any relation of these "micronutrients" to the immune functions of polymorphonuclear cells and LDL oxidability? (Abstract) In *Sborník II. Joint Meeting of the Neurodiab and DFSG. Balatonfüred, Maďarsko, 2002; str.113.*
17. Fox C, Ramsomair D, Carter C. Magnesium: Its proven and potential clinical significance. *South Med J* 2001; 94: 1195-1201.
18. Frederickson CJ, Suh SW, Silva D, Frederickson CJ, Thompson RB. Importance of zinc in the central nervous system: The zinc-containing neuron. *J Nutr* 2000; 130: 1471-1483.
19. Galland L. Magnesium and immune function: an overview. *Magnesium* 1988; 7:290-299.
20. Garfinkel D. Is aging inevitable ? The intracellular zinc deficiency hypothesis of aging. *Medical Hypotheses* 1986; 19: 117-137.
21. Gavella M, Lipovac V, Car A. In vitro effect of zinc on superoxide anion production by polymorphonuclear leucocytes of diabetic patients. *Acta Diabetol* 2000; 37:135-137.
22. Girodon F, Galan P, Monget AL, Boutron-Rualt MC, Brunet-Lecomte P, Preziosi P, Arnaud J, Manuguerra JC, Herchberg S. Impact of Trace Elements and Vitamin Supplementation on Immunity and Infections in Institutionalized Elderly Patients. *Arch Intern Med* 1999; 159 (12): 748-754.
23. Gross RL, Newberne PM. Role of nutrition in immunologic function. *Physiol Rev* 1980; 60:188.
24. Havivi E, Bar OnH, Reshef A, Stein P, Raz I. Vitamins and trace metals status in non insulin dependent diabetes mellitus. *Int J Vitam Nutr Res* 1991; 61: 328-333.
25. Chai F, Truong-Tran AQ, Ho LH, Zalewski PD. Regulation of caspase activation and apoptosis by cellular zinc fluxes and zinc deprivation: A review. *Immunol Cell Biol* 1999; 77: 171-178.
26. Chandra RK. Nutrition and the immune system: an introduction. *Am J Clin Nutr* 1997; 66: 460S-463S.
27. Iannello S, Belfiore F. Hypomagnesemia. A review of pathophysiological, clinical and therapeutical aspects. *Panminerva Med* 2001; 43: 177-209.
28. Johnston CS, Thompson LL. Vitamin C status of an outpatient population. *J Am Coll Nutr* 1998; 17(4): 366-370.
29. Kajanachumpol S, Srisurapanon S, Supanit I, Roongpisuthipong C, Apibal S. Effect of zinc supplementation on zinc status, copper status and cellular immunity in elderly patients with diabetes mellitus. *J Med Assoc Thai* 1995; 78: 344-349.
30. Karahan SC, Deger O, Orem A, Ucar F, Erem C, Alver A, Onder E. The effects of impaired trace elements status on polymorphonuclear leukocyte activation in the development of vascular complication in type 2 diabetes mellitus. *Clin Chem Lab Med* 2001; 39:109-115.
31. Kelley DS, Daudu PA, Taylor PC. Effects of low-copper diets on human immune response. *AmJ Clin Nutr* 1995; 62: 412-416.
32. Nath N, Chari SN, Rathi AB. Superoxide dismutase in diabetic polymorphonuclear leukocytes. *Diabetes* 1984; 33: 586-589.
33. Niewoehner CB, Allen JI, Boosalis M, Levine AS, Morley JE. Role of Zinc supplementation in type II diabetes mellitus. *Am J Med* 1986; 81:63-68.
34. Noto R, Alicata R, Sfogliano L, Neri S, Bifarella M. A study of cupremia in a group of elderly diabetics. *Acta Diabetol Lat* 1983; 20: 81-85.
35. Packer L. The role of anti-oxidative treatment in diabetes mellitus. *Diabetologia* 1993; 36: 1212-1213.
36. Pai LH, Prasad AS. Cellular zinc in patients with diabetes mellitus. *Nutr Res* 1988; 8: 889-897.

37. Paolisso G, Sgambato S, Pizza G, Passariello N, Varricchio M, D'Onofrio F. Improved insulin response and action by chronic magnesium administration in aged NIDDM subjects. *Diabetes Care* 1989; 12:265-269.
38. Park JH, Grandjean CJ, Hart MH, Erdman SH, Pour P, Vanderhoof JA. Effect of pure zinc deficiency on glucose tolerance and insulin and glucagons levels. *Am J Physiol* 1986; 251: E273-278.
39. Pecoraro RE, Chen MS. Ascorbic acid metabolism in diabetes mellitus. *Ann N Y Acad Sci* 1987; 498: 248-258.
40. Pelikánová T, Bartoš V. Sekrece inzulinu. In : Bartoš V, Pelikánová T et al.: *Praktická diabetologie*, 2. ed., Praha: Maxdorf Jessenius, 2000; 21-32.
41. Powell S. The antioxidant properties of zinc. *J Nutr* 2000; 130: 1447-1454.
42. Prasad AS. Zinc and immunity. *Mol Cell Biochem* 1998; 188: 63-69.
43. Raz I, Havivi E. Trace elements in blood cells of diabetic subjects. *Diabetes Research* 1989; 10: 21-24.
44. Rema M, Mohan V, Bhaskar A, Shanmugasundaram KR. Does oxidant stress play a role in diabetic retinopathy? *Indian J Ophthalmol* 1995; 43: 17-21.
45. Rodriguez -Moran M, Guerrero-Romero F. Low serum magnesium levels and foot ulcers in subjects with type 2 diabetes. *Arch Med Res* 2001; 32:300-303.
46. Rudolf E, Peychl J, Radocha J, Červinka M. Zinek a jeho role při regulaci buněčné smrti. *Československá fyziologie* 2001; 4: 201-210.
47. Saris NE, Mervaala E, Karppinen H, Khawaja JA, Lewenstam A. Magnesium. An update on physiological, clinical and analytical aspects. *Clin Chim Acta* 2000; 294: 1-26.
48. Schnack C, Bauer I, Pregant P, Hopmeier P, Schernthaner G. Hypomagnesemia in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus is not corrected by improvement of long-term metabolic control. *Diabetologia* 1992; 35: 77-79.
49. Schorah CJ, Bishop N, Wales JK, Hansbro PM, Habibzadeh N. Blood vitamin C concentrations in patients with diabetes mellitus. *International Journal for Vitamin & Nutrition Research* 1988; 58: 312-318.
50. Sinclair AJ, Taylor PB, Lunec J, Girling AJ, Barnett AH. Low plasma ascorbate levels in patients with type 2 diabetes mellitus consuming adequate dietary vitamin C. *Diab Med* 1994; 11: 893-898.
51. Stankova L, Riddle M, Larned J, Burry K, Menashe D, Hart J, Bigley R. Plasma ascorbate concentrations and blood cell dehydroascorbate transport in patients with diabetes mellitus. *Metabolism: Clinical & Experimental* 1984; 33: 347-353.
52. Šulc K. Poruchy metabolismu mikronutrientů a stopových prvků a jejich důsledky. *Železo*. In: E. Nečas eds. *Obecná patologická fyziologie*, 1. vydání. Praha: Nakl. Karolinum, 2000; 335-340.
53. Uchimura K, Nagasaka A, Hayashi R, Makino M, Nagata M, Kakizava H, Kobayashi T, Fujiwara K, Kato T, Iwase K, Shinohara R, Kato K, Itoh M. Changes in Superoxide Dismutase Activities and Concentrations and Myeloperoxidase Activities in Leukocytes from Patients with Diabetes Mellitus. *Journal of Diabetes and Its Complications* 1999; 13: 264-270.
54. Walter RM, Uriu-Hare JY, Olin KL. Copper, Zinc, Manganese and Magnesium Status and Complications of Diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1991; 14(11):1050-1056.
55. Williams NR, Rajput-Williams J, West JA, Nigdikar SV, Foote JW, Howard AN. Plasma, granulocyte and mononuclear cell copper and zinc in patients with diabetes mellitus. *Analyst* 1995; 120:887-890.
56. Yue DK, McLennan S, McGill M, Fisher E, Heffernan S, Capogreco C, Turtle JR. Abnormalities of ascorbic acid metabolism and diabetic control: differences between diabetic patients and diabetic rats. *Diabetes Res Clin Pract* 1990; 9: 239-244.

MUDr. Vladimíra Fejfarová
Klinika diabetologie Centra diabetologie
Institut klinické a experimentální medicíny
Václavská 1958/9,
140 21 Praha-4
E-mail: vife@medicon.cz



II. JOINT MEETING OF THE

NEURODIAB

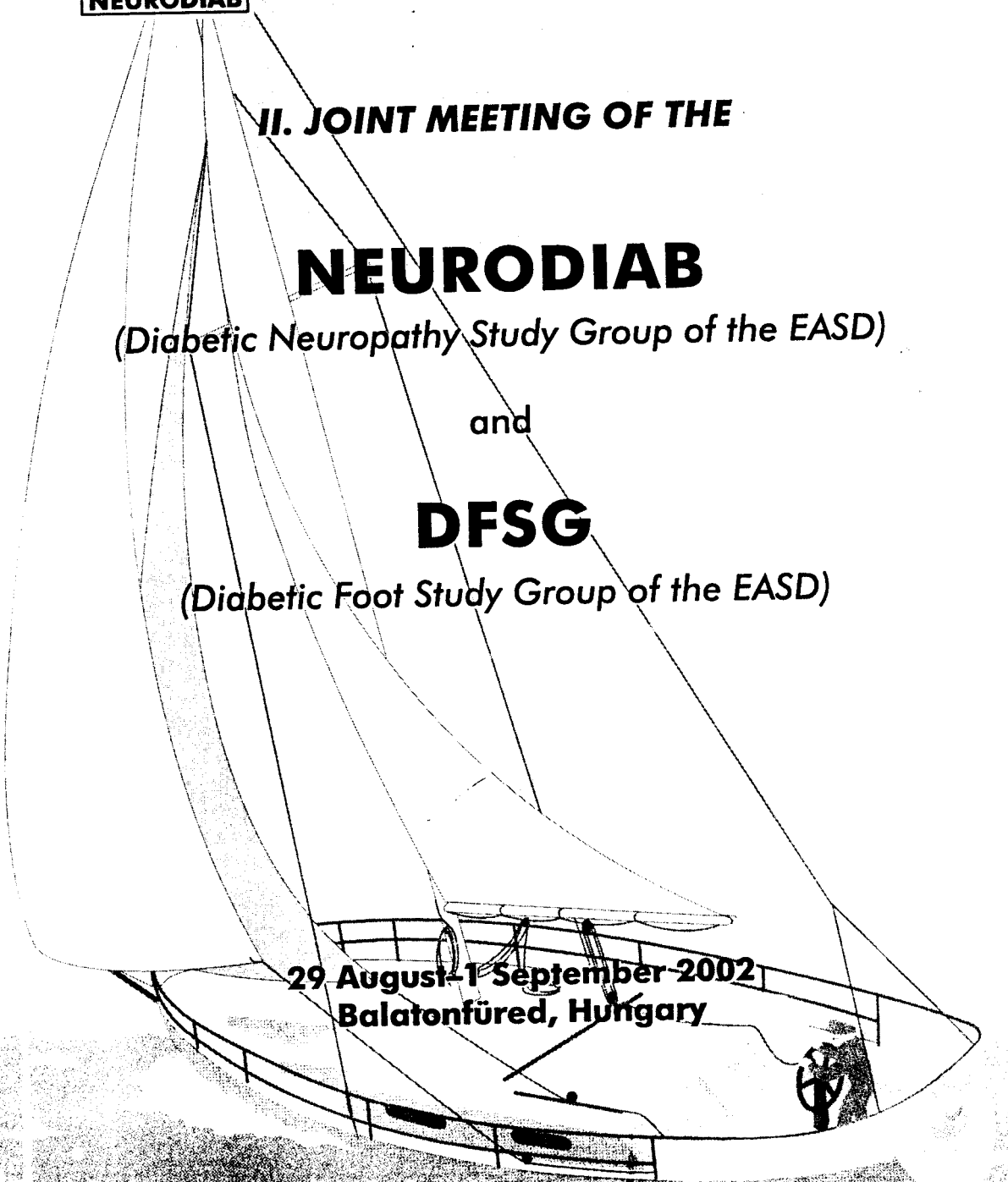
(Diabetic Neuropathy Study Group of the EASD)

and

DFSG

(Diabetic Foot Study Group of the EASD)

29 August-1 September 2002
Balatonfüred, Hungary



A6

The comparison of vitamin and trace element concentrations between patients with the diabetic foot and healthy subjects. Is there any relation of these „micronutrients“ to the immune functions of polymorphonuclear cells and LDL oxidability?

V. Fejfarova, A. Jirkovska, H. Malinska, L. Kazdova, J. Kalanin, I. Striz
Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic

Malnutrition of some vitamins (e.g. vitamin E, C), trace elements (Copper-Cu, Zinc-Zn), Iron-Fe and Magnesium-Mg could result in the impairment of the immune functions and antioxidant capacity.

Aims: The aim of our study was to assess the concentrations of vitamin C, subfractions of vitamin E, trace elements (Cu, Zn), Fe, Mg and their relation to the immune functions and the LDL oxidability.

Methods: 42 patients with the diabetic foot were included into the study (mean age 54.9 ± 8 years, diabetes duration 18 ± 8 years, HbA1c 8.8 ± 1.5 %). A control group consists of age- and sex- matched 31 healthy subjects. The amounts of vitamin C, E and its subfractions, of the trace elements- Cu, Zn and Fe, Mg were determined by standard methods. The PHAGOTEST and BURSTEST (Orpegen Pharma, Heidelberg, Germany) were used for a determination of the phagocytosis and the respiratory burst of polymorphonuclear (PMN) cells. The LDL oxidability corresponded inversely to a Lag-time, which was assessed by a spectrophotometric measurement of conjugated diens.

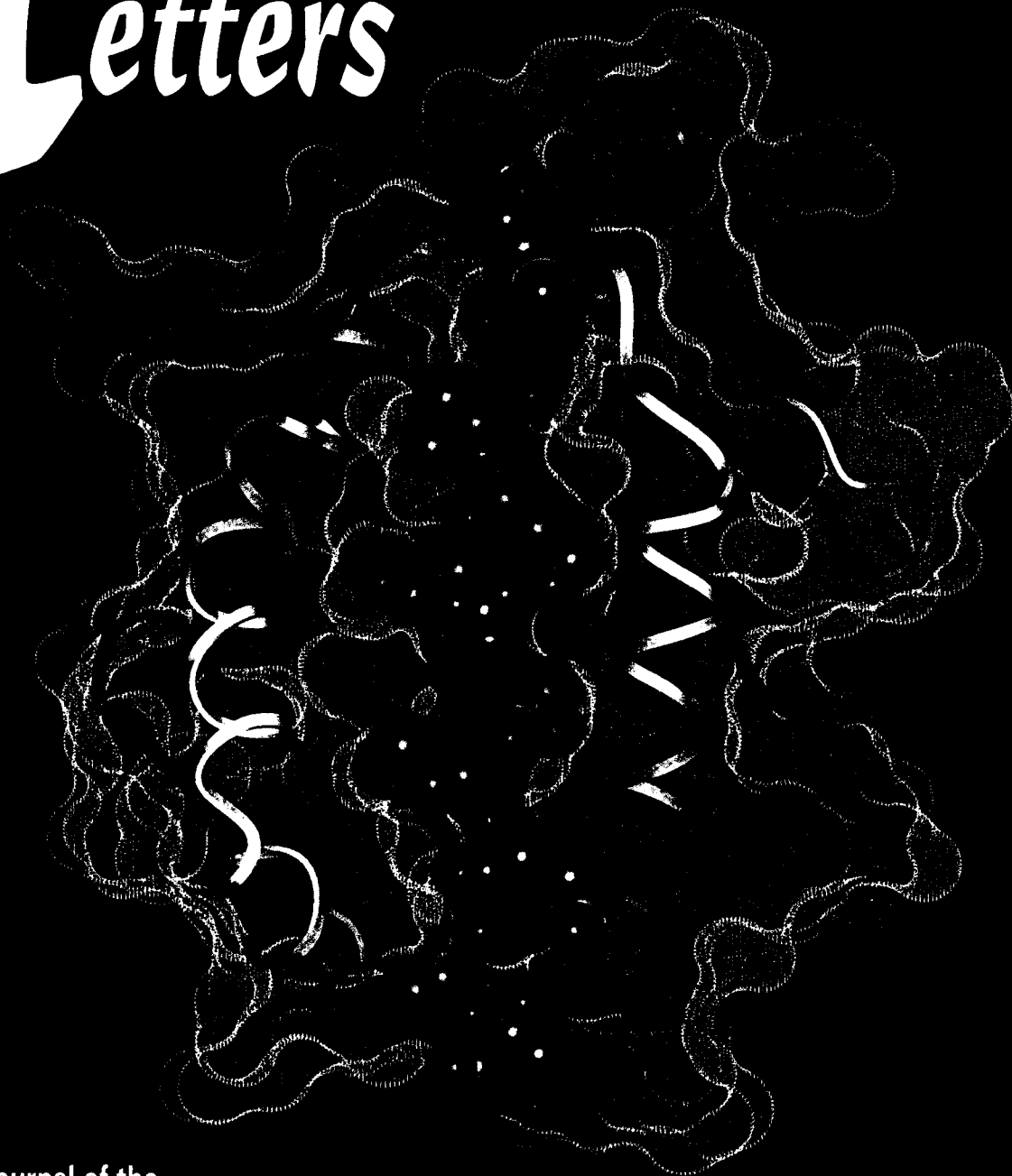
Results: Significant decrease of vitamin C concentration was found in patients with the diabetic foot in comparison with the healthy subjects (57 ± 21 vs. 74 ± 22 mg/dl; $p < 0.01$). The concentrations of the total vitamin E and it's subfractions did not differ significantly from the control subjects (total vitamin E concentrations 40.1 ± 13.8 vs. 35.5 ± 11 ug/dl; NS). No significant differences in concentrations of trace elements, Fe and Mg were found in patients with the diabetic foot in comparison with healthy subjects (Cu 17.4 ± 4.9 vs. 15.4 ± 3.5 umol/l, NS; Zn 12.7 ± 3.6 vs. 12.7 ± 2.7 umol/l, NS; Fe 15.0 ± 5.4 vs. 17.8 ± 4.8 umol/l, NS; Mg 0.76 ± 0.1 vs. 0.81 ± 0.07 mmol/l; NS). No significant correlations between the vitamins and parameters of PMN phagocytosis and respiratory burst were found in the study groups. There was found only a significant correlation of LDL oxidability (correlation with Lag-time) and total vitamin E ($r = 0.415$; $p < 0.05$) in healthy subjects.

Conclusions: Vitamins, trace elements, Fe and Mg concentrations (with exception of lower vitamin C levels) in patients with the diabetic foot did not differ significantly from those found in healthy subjects. No relations of „micronutrient“ concentrations to phagocytic or killing activity of PMN cells were observed. The association of vitamin E level and LDL oxidability was confirmed also in the study groups. *This study was supported by grant of Ministry of Health No. L 17/98:00023001*

Special Issue:
Abstracts of the 15th European
Immunology Congress
(EFIS 2003)
June 8–12, 2003

Volume 87, Numbers 1–3
June 2, 2003
87 (1–3) 1–352
ISSN 0165–2478

Immunology Letters



The official journal of the
European Federation of
Immunological Societies **EFIS**

ELSEVIER

c peptide libraries are a powerful tool for identifying the recognized by antibodies and T cells. Choosing the library for a particular epitope mapping project is not always

ster illustrates the process of choosing peptide length, and format (capping groups, tagging) to obtain a peptide optimized for antibody, helper T cell or cytotoxic T cell epitope or a combination of these applications.

Regulation of exon 6 interactions of the transcription factor Ikaros

la, K.-P. Nera, O. Lassila. *Department of Medical Microbiology, Turku Graduate School of Biomedical Sciences, Turku University, Myllynkatu 13, 20500 Turku, Finland*

an essential regulator of lymphopoietic system in which it functions by both repressing and activating gene expression. It encodes seven exons which can be alternatively spliced to give isoforms with different DNA binding capacities mediated by alternatively spliced N-terminal zinc finger domain. In particular, N-terminal zinc fingers isoforms differ in expression of which contains a highly conserved region of unknown function. Patients with acute lymphoblastic leukemia express mutant isoforms with specific 30 bp in-frame deletion partially overlapping the fully conserved core of the exon 6. Ikaros is implicated in chromatin remodelling and can interact with CtBP, Mi-2, class I histone deacetylase and Sin3 proteins. We used immobilized metal affinity chromatography to separate labelled exon 6 variants from 293 cells and to study the possible role of differentially spliced exon 6 in Ikaros

Characterization of mono-ADP-ribosyltransferases in human macrophages

*, M. Friedrich^a, F. Haag^b, F. Koch-Nolte^b, S. Hauschildt^a. *Institute of Immunobiology, Institute of Zoology, University of Göttingen, Germany; ^bInstitute for Immunology, University of Göttingen, Germany*

is not only a coenzyme but it also serves as a substrate for a number of enzymes such as NAD-glycohydrolases (e.g. CD38) and ADP-ribosyltransferases. We recently showed that CD38 and ADP-ribosyltransferase activity decreased during differentiation of monocytes into macrophages. This might influence substrate availability for other ectoenzymes such as mono-ADP-ribosyltransferases. ADP-ribosyltransferases (ARTs) mediate post-translational modification by transferring the ADP-ribose moiety from NAD to specific amino acids on target proteins. So far five ARTs are known in mammals four of them (ART1-4) as GPI-anchored ectoenzymes.

We measured ADP-ribosyltransferase-activity of human monocytes and macrophage derived human macrophages and found ART-activity in macrophages. This could point to changes in the use of NAD favouring post-translational modification instead of degradation of NAD⁺. Measuring mRNA expression of the ARTs in macrophages by nested RT-PCR analyses only ART3 and ART5 mRNA were present. In response to LPS, distinct regulation of the ART3 mRNA expression was observed. The regulation was time-dependent and reached a maximum after 24h incubation. In contrast to ART3 mRNA, ART4 mRNA was not regulated after incubation and was not regulated by LPS. This suggests different functions of the two enzymes especially at sites

of inflammation. In search of potential extracellular targets of ADP-ribosyltransferases in vitro labelling with [³²P]NAD and FACS-analyses were carried out. ADP-ribosylated proteins were only detected by the labelling technique, indicating that enzyme activity may be very low in macrophages.

W01.15

Monitoring of immune biomarkers in workers occupationally exposed to glass fibres

E. Jahnova^a, J. Tulinska^a, S. Ilavska^a, M. Horvathova^a, A. Liskova^a, M. Kuricova^a, M. Dusinska^a, L. Fuortes^b, S.A. Kyrtopoulos^c. *^aDepartment of Immunology, Institute of Preventive and Clinical Medicine, Bratislava, Slovakia; ^bCollege of Public Health, University of Iowa, Iowa City, Iowa, USA; ^cInstitute of Biological Research and Biotechnology, National Hellenic Research Foundation, Athens, Greece*

The aim of the study was biological monitoring of the effects on immune system in workers occupationally exposed to glass fibres. Immune and haematological parameters were examined in workers chronically exposed to glass fibres and factory unexposed control.

Methods: Cellular immunity was determined by phenotypic analysis of PBMC (CD3, CD4, CD8, CD16+56, CD19 and CD3/HLADR). Immune function assays-proliferative response of lymphocytes and phagocytic activity of leukocytes were evaluated in exposed and unexposed populations. Humoral immunity was evaluated by levels of immunoglobulins IgG, IgA, IgM, IgE, C3 and component of complement. Concentrations of interleukins 1, 6, and 8 and soluble adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, and E-selectin were determined. Also expression of adhesion molecules CD11b, CD18, DC54, CD62L and CD49d on leukocytes were measured by flow cytometry. Expression of activation markers on eosinophils CD25, CD66b, CD81, HLA DR was assessed.

Results: Phenotypic analysis of PBMC showed significantly decreased expression of markers CD16+56 (NK cells) in people exposed to glass fibres in comparison with factory control. Functional immune assays displayed significantly elevated proliferative capacity of T cells basal proliferation of PBMC in people exposed to glass fibres. We found increased level of soluble adhesion molecule E-selectin and IL-8 in sera of people who manipulated with glass fibres. Exposed population had significantly increased expression of activation marker CD66b on eosinophils.

Conclusion: Chronic exposure to glass fibres had immunomodulatory effects in occupationally exposed workers. Changes in lymphocyte subpopulation of natural killer cells in peripheral blood and altered proliferative activity of lymphocytes indicated possible immune dysregulation. Findings of increased levels of soluble adhesion molecule E-selectin, proinflammatory cytokine IL-8 and enhanced expression activation marker on eosinophils refer to hypersensitivity and inflammatory status in exposed workers.

This work was supported by the European Union (project no QLK4-1999-01629).

W01.16

The relationship of vitamin and trace element concentrations with the immune functions of polymorphonuclear cells and LDL oxidability in patients with the diabetic foot and in healthy subjects

V. Fejfarova, A. Jirkovska, H. Malinska, L. Kazdova, J. Kalanin, I. Striz. *Institute for Clinical and Experimental Medicine, Czech Republic*

Malnutrition of some vitamins (e.g. vitamin E, C), trace elements (Copper—Cu, Zinc—Zn), Iron—Fe and Magnesium—Mg could

result in the impairment of the immune functions and antioxidant capacity.

Aims: The aim of our study was to assess the concentrations of vitamin C, subfractions of vitamin E, trace elements (Cu, Zn), Fe, Mg and their relation to the immune functions and the LDL oxidability.

Methods: 42 patients with the diabetic foot were included into the study (mean age 54.9 ± 8 years, diabetes duration 18 ± 8 years, HbA_{1c} $8.8 \pm 1.5\%$). A control group consists of age- and sex-matched 31 healthy subjects. The amounts of vitamin C, E and its subfractions, of the trace elements—Cu, Zn and Fe, Mg were determined by standard methods. The PHAGOTEST and BURSTEST (Orpegen Pharma, Heidelberg, Germany) were used for a determination of the phagocytosis and the respiratory burst of polymorphonuclear (PMN) cells. The LDL oxidability corresponded inversely to a Lag-time, which was assessed by a spectrophotometric measurement of conjugated diens.

Results: Significant decrease of vitamin C concentration was found in patients with the diabetic foot in comparison with the healthy subjects (57 ± 21 vs. 74 ± 22 mg/dl; $P < 0.01$). The concentrations of the total vitamin E and its subfractions did not differ significantly from the control subjects (total vitamin E concentrations 40.1 ± 13.8 vs. 35.5 ± 11 ug/dl, NS). No significant differences in concentrations of trace elements, Fe and Mg were found in patients with the diabetic foot in comparison with healthy subjects (Cu 17.4 ± 4.9 vs. 15.4 ± 3.5 umol/l, NS; Zn 12.7 ± 3.6 vs. 12.7 ± 2.7 umol/l, NS; Fe 15.0 ± 5.4 vs. 17.8 ± 4.8 umol/l, NS; Mg 0.76 ± 0.1 vs. 0.81 ± 0.07 mmol/l, NS). No significant correlations between the vitamins and parameters of PMN phagocytosis and respiratory burst were found in the study groups. There was found only a significant correlation of LDL oxidability (correlation with Lag-time) and total vitamin E ($r = 0.415$; $P < 0.05$) in healthy subjects.

Conclusions: Vitamins, trace elements, Fe and Mg concentrations (with exception of lower vitamin C levels) in patients with the diabetic foot did not differ significantly from those found in healthy subjects. Vitamin concentrations could influence a development of atherosclerosis, but vitamins as selected elements did not influence immune parameters.

W01.17

Earthworm coelomocytes possess antimicrobial and cytotoxic effects against certain microorganisms and eukaryotic cells

P. Engelmann^a, J. Kiss^a, B. Kocsis^b, E.L. Cooper^c, P. Németh^a.
^aDepartment of Immunology and Biotechnology, Faculty of Medicine, University of Pécs, Hungary; ^bDepartment of Medical Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, University of Pécs, Hungary; ^cLaboratory of Comparative Immunology, Department of Neurobiology, David Geffen School of Medicine, University of California, USA

Background: Invertebrate animals exhibited different defence mechanisms against environmental pathogens during the phylogenesis. Invertebrate immunity—similarly to the vertebrates—is composed of cellular and humoral elements. In earthworms, the cellular functions of the innate immunity are maintained by different coelomocytes located in the coelomic cavity. This compartment also contains coelomic fluid which has many biologically active molecules (lysenin, fetidin, eiseniapore, coelomic cytolytic factor, cytokines) in it.

Aim: During the last decades the interest was increased in the invertebrate innate immunity concerning on the humoral factors by theoretical and practical reason. These natural "antibiotics" (anti microbial peptides) from different animals can replace some therapeutically used antibiotics to solve the pathogen resistance. Therefore, we have taken attention to new animal models (like earthworms) with possible biomedical applications.

According to the literature earthworm coelomocytes are involved the antimicrobial defence through humoral factors. In our previous experiments earthworm defence cells were characterised by different immunological techniques (flow cytometry, confocal microscopy immunoserology) using monoclonal antibodies against conserved mammalian antigen. For the characterisation of the coelomocyte humoral defence molecules some different functional assays were used.

Materials and methods: Coelomocytes were isolated from mature *Eisenia foetida* earthworms, followed by mechanic and detergent extraction the supernatants were used for antimicrobial and cytotoxicity assays. In our experimental system the effect of the coelomocyte extract against the growth of different microorganisms (*Escherichia coli*, *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*) was tested by tube dilution and on mammalian cell lines with MTT assay were measured.

Results: Antibacterial effect (bacteriostatic) were identified on Gram+ and Gram- bacteria. The growth of *B. subtilis* and *E. coli* strains were inhibited by earthworm extract, in contrast extract were not showed any effect against *C. albicans*. Using Re mutant strains (*E. coli* D31m4, *Salmonella minnesota* Re 595, *Shigella sonnei* Re 435) the activity was more effective because their membrane is defective renders them more permeable for a variety of compounds such as antimicrobial agents. By native and SDS-PAGE a fraction was isolated from the extract which could responsible for this activity. The cytotoxicity of samples against eukaryotic cell lines was shown with different kinetics between coelomocyte extract compared with short term coelomocyte culture supernatant (1–2 vs. 24–36 h). Against L929 cell line were measured a high sensibility, however, HeLa and HEp-2 cell lines showed high toxicity, the effect was slower.

Conclusion: Our data indicate that antibacterial and cytotoxic activity is present in earthworms connected to coelomocytes. Antimicrobial activity were measured on different microorganisms and were found bacteriostatic effect and could not detected antifungal activity. Using Re mutant bacteria strains may can characterise the exact molecular mechanisms of the coelomocyte bacteriostatic activity. Cytotoxic activities were also found against eukaryotic cell lines, which indicate high sensibility of the cell lines to the earthworm extract. Identification of molecules responsible for bacteriostatic and cytotoxic effect are in progress.

W01.18

Adhesion of macrophages during inflammatory phases of wound healing in rats

B. Bozic, B. Draskovic-Pavlovic, P. Popovic, M. Colic, M. Katanovskii. Institute of Medical Research, Military Medical Academy, Yugoslavia

Wound healing is one of essential biological processes in which macrophages have different roles including effector, proinflammatory and immunoregulatory. In this study some features and proinflammatory activities of cell population from granulation tissue of 3- and 7-day full-thickness excisional wound in rats (enriched in macrophages content by enzyme digestion and density gradient centrifugation) were described. In population of macrophages isolated from granulation tissue (WM) we detected lower spontaneous and PMA stimulated adhesion to plastic compared with peritoneal macrophages (PM). The same results were noted with fibronectin coated plastic. Cytofluorometry analysis of CD11b expression on monocytes (MO), WM and PM showed lower CD11b expression on WM compared with PM and lower expression on MO compared with WM. Lower expression of CD11b molecule on WM compared with PM is probably the basis for lower WM adhesion to plastic and component of extracellular matrix fibronectin. These results indicate the influence of microenvironmental factors on the expression of CD11b molecule, as well as lower maturation

DIABETOLOGIE METABOLISMUS ENDOKRINOLOGIE VÝŽIVA

ČASOPIS PRO POSTGRADUÁLNÍ VZDĚLÁVÁNÍ
ROČNÍK 6 • SUPPLEMENTUM 1 • 2003

XXXIX. DIABETOLOGICKÉ DNY
Luhačovice, 24.-26. dubna 2003

ABSTRAKTA

INDEXOVÁNO V EMBASE EXCERPTA MEDICA
EXCERPOVÁNO V BIBLIOGRAPHIA MEDICA CECOSLOVACA
www.tigis.cz/dmzv/index.htm

TIGIS

2. Zjistit, zda-li se inzulinová senzitivita během hladovění zvyšuje nebo snižuje.

Metody: Pacienti: 10 obézních diabetiků 2. typu (6 mužů, 4 ženy; BMI 36.98 ± 7.50 kg/m²; věk 54.5 ± 5.02 let) léčeni PAD nebo inzulinem. Vyloučeni byli pacienti s endokrinopatií, léčbou betablokátory či ACE-inhibitory nebo pokud měli jiné onemocnění, kontraindikující hladovění. Po přijetí do nemocnice byl proveden dvoustupňový (60 and 120 mIU/kg/m²) izoglykemický hyperinzulinový clamp. Potom byli probandi vystaveni 60 hodinám úplné hladovky, pouze neslazené tekutiny ad libitum. Během hladovky byly à 2 hod. sledovány hladiny energetických substrátů (glukóza, laktát, mastné kyseliny, 3-hydroxybutyrát), každých 12 hod. byl sledován energetický výdej a oxidované živiny nepřímou kalorimetrií, hladiny hormonů a aminokyselin à 24 hod. Po 60 hodinách úplného hladovění byl k posouzení změny citlivosti k inzulinu proveden druhý clamp uspořádaný stejně a na stejné glykemii jako clamp před hladověním.

Výsledky: Pacienti ztratili v průměru 2.2 ± 0.47 kg tělesné hmotnosti. Z toho 1.10 ± 0.46 kg tukové hmoty. Inzulinemie klesla z 18.46 ± 8.40 k 8.5 ± 5.12 IU/l ($P < 0.01$), zatímco glykemie zůstala nezměněna (9.49 ± 2.34 vs. 9.84 ± 3.03 mM, NS). Hladiny volných mastných kyselin se významně nezměnily, zatímco hladiny 3-hydroxybutyrátu stouply z 0.17 ± 0.16 na 0.90 ± 0.30 mM ($P < 0.05$). Celkový odsun glukózy při clampu byl po hladovění významně menší při obou inzulinemiích (pro 60 mIU/m²/min: 2.62 ± 1.11 vs. 1.91 ± 0.73 mg/kg/min, $P < 0.05$), zejména díky snížení oxidace glukózy (0.24 ± 0.12 vs. 0.00 ± 0.01 mg/kg/min, $P < 0.01$). Neoxidativní komponenta odsunu glukózy při 120 mIU/m²/min fázi clampu byla po hladovění nesignifikantně větší.

Závěry: Akutní hladovění zhoršuje u diabetiků 2. typu oxidaci glukózy, zřejmě díky Randleově mechanismu. Naopak arteficiální hyperinzulinemií navozená syntéza glykogenu má tendenci po vyčerpání zásob glykogenu hladověním být větší než před hladověním.

14.

POROVNÁNÍ HLADIN VITAMINŮ A VYBRANÝCH PRVKŮ MEZI PACIENTY SE SYNDROMEM DIABETICKÉ NOHY A ZDRAVÝMI DOBROVOLNÍKY A JEJICH VZTAH K IMUNITNÍM FUNKCÍM POLYMERFONUKLEÁRNÍCH LEUKOCYTŮ

V. Fejfarová, A. Jirkovská, H. Malinská, L. Kazdová, J. Kalanin, I. Stříž

Institut klinické a experimentální medicíny, Praha

Deficity některých mikronutrientů jsou popisovány u pacientů s diabetes mellitus 1. i 2. typu. Malnutrice částí vitaminů (např. vitaminu C, E), stopových prvků (Cu, Zn) a Fe a Mg může vést k poškození imunitních funkcí.

Cílem studie bylo porovnat nalezené koncentrace vitaminu C, vitaminu E a jeho subfrakcí, stopových prvků (Cu, Zn), Fe a Mg u pacientů se syndromem diabetické nohy a u zdravých dobrovolníků a dále porovnat vztah „mikronutrientů“ k imunitním funkcím polymorfonukleárních buněk.

Metody: Do studie bylo zařazeno 42 pacientů se syndromem diabetické nohy (průměrný věk 54.9 ± 8 let, trvání diabetu 18 ± 8 let, HbA_{1c} 8.8 ± 1.5 %). Kontrolní skupina

byla tvořena 31 zdravými dobrovolníky, kteří byli srovnatelní věkem i pohlavím. Sérové koncentrace vitaminů C, E a subfrakcí vitaminu E a koncentrace vybraných prvků (Cu, Zn, Fe a Zn) byly stanoveny standardními metodami. K určení fagocytózy a respiračního vzplanutí polymorfonukleárních buněk byly použity testy založené na principu průtokové cytometrie (Fagotest, Bursttest).

Výsledky: Signifikantně redukováné hladiny vitaminu C byly nalezeny ve skupině pacientů se syndromem diabetické nohy v porovnání se skupinou zdravých dobrovolníků (57 ± 21 vs. 74 ± 22 mg/dl; $p < 0.01$). Koncentrace vitaminu E a jeho subfrakcí se významně nelišily mezi studovanými skupinami (celkový vitamin E 40.1 ± 13.8 vs. 35.5 ± 11 ug/dl; NS). Nebyly nalezeny ani signifikantní odchylky v sérových koncentracích vybraných prvků mezi skupinou pacientů se syndromem diabetické nohy a skupinou zdravých dobrovolníků (Cu 17.4 ± 4.9 vs. 15.4 ± 3.5 umol/l, NS; Zn 12.7 ± 3.6 vs. 12.7 ± 2.7 umol/l, NS; Fe 15.0 ± 5.4 vs. 17.8 ± 4.8 umol/l, NS; Mg 0.76 ± 0.1 vs. 0.81 ± 0.07 mmol/l, NS). Mezi studovanými skupinami nebyly nalezeny signifikantní asociace mezi hladinami vitaminů, vybraných prvků a parametry fagocytózy a respiračního vzplanutí polymorfonukleárních buněk.

Závěr: U pacientů se syndromem diabetické nohy byly nalezeny významně snížené sérové hladiny vitaminu C, avšak hladiny vitaminu E a jeho subfrakcí a dalších sledovaných prvků se významně nelišily od zdravých dobrovolníků. U pacientů s diabetem lze předpokládat vzájemně propojené defekty antioxidantních systémů. Pro podrobnější analýzu by bylo vhodné sledovat tkáňové koncentrace některých sledovaných parametrů.

Práce byla podporována výzkumným záměrem Ministerstva zdravotnictví č. g. 17/98:00023001.

15.

VLIV AKUTNÍ REJEKCE NA FUNKCI TRANSPLANTOVANÉHO PANKREATU

T. Havrdová, F. Saudek, P. Bouček, L. Voska, R. Kožnarová, M. Adamec, T. Jedináková

Centrum diabetologie IKEM, Praha

Úvod: Akutní rejekce (AR) je spolu s chirurgickými komplikacemi nejčastější příčinou ztráty pankreatického štěpu v časném potransplantačním období. Cílem naší práce bylo zjistit, do jaké míry se AR projeví na pozdější funkci transplantovaného pankreatu.

Metody: V období 1994-2002 jsme u 122 dlouhodobě normoglykemických příjemců pankreatu (glykemie nalačno ≤ 6 mmol/l) vyšetřili standardní intravenózní glukózový toleranční test ($0,33g$ glukózy/kg hmotnosti) s výpočtem koeficientu asimilace glukózy (K_G). Akutní rejekce byla diagnostikována na základě klinických projevů (které byly ve všech případech doplněny histologickým nálezem) nebo pouze na základě histologického nálezu protokolárně prováděných biopsií pankreatických štěpů. K hodnocení byla použita klasifikace AR dle Drachenbergové.

Výsledky: V prvním roce po transplantaci jsme IVGTT vyšetřili u 105 příjemců, z nichž 20 bylo léčeno pro rejekční epizodu. Navzdory normoglykémii nalačno a normálním

INSTITUT
KLINICKÉ A EXPERIMENTÁLNÍ MEDICÍNY
informační a komunikační úsek
VĚDECKÁ LÉKAŘSKÁ KNIHOVNA
140 21 Praha 4-Křc. Videňská 1958/9
- 5 -

DIABETOLOGIE METABOLISMUS ENDOKRINOLOGIE VÝŽIVA

ČASOPIS PRO POSTGRADUÁLNÍ VZDĚLÁVÁNÍ
ROČNÍK 7 • ČÍSLO 3 • 2004

Z OBSAHU:

**Jiří Charvát, František Kölbl,
Kateřina Michalová, Milan Kvapil**

Asymptomatická ischemická choroba
srdeční u nemocných s diabetes mellitus

**Michal Anděl, František Duška, Ludmila
Trešlová, Pavel Kraml**

Metformin a další biguanidy: klasika při me-
dikamentózní léčbě obézních diabetiků

Zdeňka Límanová, Václav Zamrazil

Má být zaveden screening funkčních tyreoi-
dálních onemocnění u dospělých
v České republice?

**Miloslav Hronek, Jana Nekvindová, Pavel
Jandík**

Probiotika v prevenci kolorektálního karcino-
mu I

**Pavel Dlouhý, Jan Pokorný, Jana Dostálová,
Jiří Brát, Marek Doležal, Pavel Hanzlík,
Dana Kubisová, Michal Anděl**

Trans izomery mastných kyselin ve výživě
- máme ještě problém ?

ABSTRAKTA

1. Symposium mladých odborníků v diabeto-
logii, endokrinologii a metabolismu

INDEXOVÁNO V EMBASE - EXCERPTA MEDICA
EXCERPOVÁNO V BIBLIOGRAPHIA MEDICA ČECHOSLOVACA

www.tigis.cz/dmev/Index.htm

ISSN 1211-9326

Tigis
med.ica

1. SYMPOZIUM MLADÝCH ODBORNÍKŮ V DIABETOLOGII, ENDOKRINOLOGII A METABOLISMU

koná se: 24.–25. září 2004 v Praze (hotel Krystal)
pod záštitou předsedů výborů: ČDS a ČES

*hlavní odborný organizátor: Prof. MUDr. J. Perušičová, DrSc.
Diabetologické centrum VFN, 3. interní klinika 1. LF UK Praha*

PRŮBĚH TĚHOTENSTVÍ SKUPINY ŽEN S DIABETEM 1. TYPU

Bartášková D.

Diabetologické centrum, Interní klinika FN Motol, Praha

Úvod: Těhotenství žen s diabetem 1. typu je rizikové. Perinatální mortalita je srovnatelná se zdravou populací, přesto perinatální morbidita dosahuje 50–85 %. Dítě je ohroženo diabetickou fetopatií nebo vznikem embryopatie. Vývoj plodu je ovlivněn dlouhotrvající hyperglykemií, zdá se ale, že etiologie fetopatie a embryopatie je multifaktoriální. Podílí se na ní též hypoglykemie, ketonurie, osmolalita. Práce přináší výsledky terapie diabetu 1. typu skupiny žen během gravidity.

Soubor nemocných a metodika: Soubor tvořilo 15 těhotných žen s diabetem 1. typu, které porodily v roce 2002. Průměrný věk 29,6 (25–37) let, průměrná doba trvání diabetu 17,3 (7–27) let. V jednotlivých trimestrech těhotenství byl sledován způsob terapie diabetu, stupeň kompenzace, přítomnost pozdních komplikací a jejich vývoj v průběhu gravidity. Stabilita diabetu byla kontrolována častým monitoringem glykemií, vyšetřováním ketonurie a ketonemie. Ketonemie byla stanovena pomocí hladiny beta hydroxybutyrátu v krvi. Dále byly hodnoceny komplikace těhotenství, způsob porodu a stav novorozence (přítomnost fetopatie či embryopatie). Ženy byly vyšetřovány v poradně pro rizikové těhotenství a vývoj plodu byl kontrolován pomocí ultrazvuku. Statistické hodnocení z důvodu malého souboru nebylo provedeno.

Výsledky: Žádný z novorozenců neměl vrozenou vývojovou vadu. Diabetická fetopatie byla zaznamenána v 86,6 %, průměrná váha plodu 3 349 g (1970 g – 4260 g), porod proběhl průměrně v 37. týdnu gestačního věku. 26,6 % porodů bylo ukončeno plánovanou sekci, urgentní sekce bylo zapotřebí v 13,3 %, 40 % porodů bylo indukováno a 20,1 % žen rodilo spontánně. Pozdní komplikace diabetu nemělo 46,6 % žen. 53,3 % bylo sledováno pro diabetickou retinopatii, která zůstala v těhotenství stabilní. Nefropatie s mikroalbuminurií byla přítomna u 13,3 % žen, u 6,6 % z nich přešla do proteinurie. Nově vznikla nefropatie s mikroalbuminurií u 6,6 % žen. Průměrné hladiny HbA1C byly před těhotenstvím 6,9 % (4,9–8,5), v prvním trimestru 6,1 % (4,5–7,5), ve druhém 5,7 % (4,8–7,3) a ve třetím 5,9 % (4,3–7,9). Žádná žena neprodělala závažnou hypoglykémii ani ketoacidosu. Jedna pacientka (6,6 %) měla lehčí ketonemii, u 13,3 % žen se v průběhu celého těhotenství vyskytovala ketonurie.

Závěr: velké procento novorozenců má známky diabetické fetopatie, při terapii rychle odeznívají (nejčastěji hypoglykemie a hyperbilirubinemie). Přesto je třeba intenzivněji komplexní a individuální péči o pacientku normalizovat vnitřní prostředí ke zmírnění frekvence fetopatie. Před graviditou přítomná diabetická nefropatie je nejvíce ohrožena progresí. Domníváme se, že je třeba graviditu pečlivě plánovat a doporučit ji pacientkám ve fázi, kdy komplikace diabetu dosud nejsou přítomny.

VÝZNAM SEBEKONTROLY U NOVĚ ZJIŠTĚNÉHO DIABETIKA 2. TYPU

Benešová R., Kolářová M.

Diabetologické centrum Interní klinika FN sP Ostrava

ÚVOD: O nutnosti sebekontroly diabetiků 1. typu či 2. typu na inzulinoterapii nikdo nepochybuje. Se vzrůstajícím významem postprandiálních glykemií jako rizikového faktoru kardiiovaskulárních onemocnění je diskutována také sebekontrola diabetiků 2. typu. Při edukaci jsme zjistili, že pokud se pacient sám monitoruje, lépe pochopí vztah dieta - glykemie - fyzická zátěž. Pro nás je pak jeho monitorování vodítkem k další léčbě, která ovlivňuje jak glykemie nalačno, tak postprandiální glykemie.

METODIKA: sledovali jsme 19 diabetiků 2. typu, z toho 10 mužů a 9 žen ve věku 48–80 let, z toho 14 s nově zjištěným diabetem a 5 již dříve léčených (v těchto případech si až při sebekontrolě pacienti uvědomili nutnost režimových opatření). Ze 14 nově zjištěných diabetiků jich bylo 7 dále léčeno dietou, u dalších 5 byla zahájena léčba PAD, 1 pacientka byla dále z PAD převedena na inzulin a 1 pacientovi bylo naopak na základě sebekontroly umožněno převedení z inzulinoterapie na terapii PAD. Po 2 měsících dietní či medikamentózní léčby došlo ke zlepšení kompenzace u všech sledovaných pacientů (snížení jak glykemie nalačno tak i postprandiální glykemie).

ZÁVĚR: Sebekontrola má význam u diabetiků 2. typu, kdy pomůže k lepšímu pochopení režimových a léčebných opatření. Tuto 19 člennou skupinu budeme nadále sledovat, zda compliance bude lepší než v kontrolní skupině diabetiků bez možnosti sebekontroly. Pomocí dotazníku chceme také vyhodnotit kvalitu života z pohledu pacienta a zpětně ověřit nabyté znalosti.

ABNORMALITY SÉROVÝCH HLADIN VYBRANÝCH VITAMÍNŮ A PRVKŮ U PACIENTŮ SE SYNDROMEM DIABETICKÉ NOHY

Fejfarová V., Jirkovská V., Kalanin J., Stříž I., Kazdová L., Malínská H., Skibová J.

Klinika diabetologie, Praha

U pacientů s diabetes mellitus byly popsány abnormality sérových koncentrací vybraných vitaminů (vitamin C, E: α - and γ -tokoferol) a vybraných prvků (Cu, Fe, Mg, Zn). Tyto mikronutrienty mohou ovlivnit oxidativní děje a imunologické funkce u pacientů s přítomnou infekcí. Cílem studie bylo porovnat sérové koncentrace těchto faktorů u pacientů s diabetes mellitus 2. typu a se syndromem diabetické nohy, u pacientů bez pozdních komplikací a zdravých dobrovolníků. Do studie bylo zařazeno 42 pacientů se syndromem diabetické nohy, 29 pacientů bez pozdních komplikací a 31 zdravých dobrovolníků. Hladiny vitamínu C byly významně sníženy u pacientů se syndromem diabetické nohy v porovnání s pacienty bez kom-

plikací a zdravými dobrovolníky (57.1±21.3 vs. 67.6±19.3 vs. 72.2±23.6 umol/l; p<0.01). Signifikantně vyšší sérové hladiny Cu byly nalezeny u pacientů se syndromem diabetické nohy (17.4±5 vs. 15.4±3.5 umol/l; p<0.05) a u pacientů s diabetem 2. typu bez pozdních komplikací (17.8±3.4 vs. 15.4±3.5 umol/l; p<0.05) v porovnání se zdravými dobrovolníky. Sérové hladiny Mg byly signifikantně nižší ve skupině pacientů se syndromem diabetické nohy (0.75±0.1 vs. 0.81±0.07 mmol/l; p<0.05) a pacientů bez komplikací (0.76±0.09 vs. 0.81±0.07 mmol/l; p<0.05) v porovnání s kontrolní skupinou. Sérové hladiny Zn, Fe, α- a γ- tokoferolu se signifikantně nelišily mezi studovanými skupinami. Závěr: U pacientů s diabetes mellitus, zejména u pacientů se syndromem diabetické nohy, byly nalezeny nižší hladiny vitamínu C a Mg a vyšší sérové hladiny Cu. Tyto změny mohou mít vztah k oxidoredukčním pochodům a k imunitním funkcím organismu.

VLIV PPAR-α A INZULÍNOVÁ SENZITIVITA

¹Haluzík M., ²Gavrilova O., ¹LeRoith D.

¹3. interní klinika 1. LF UK a VFN, Praha, ² Mouse Metabolism Laboratory a 3 Diabetes Branch, NIDDK, National Institutes of Health, Bethesda, USA

Receptory aktivované peroxizomovými proliferátory (PPAR) jsou intranukleární receptory, které ovlivňují řadu dějů včetně regulace metabolismu lipidů a sacharidů. Aktivace PPAR-α zvyšuje v experimentu inzulínovou senzitivitu, zároveň však byly publikovány práce svědčící pro podobný účinek úplného chybění tohoto receptoru. Cílem naší práce bylo sledovat vliv diety s vysokým obsahem tuků (HFD) na parametry inzulínové senzitivity u transgenických myší s úplným chyběním PPAR-α (PR-KO).

Podávání HFD vedlo jak u kontrolních, tak u PR-KO myší k významnému vzestupu obsahu tuku v organismu ke zvýšení sérových koncentrací inzulínu a snížení hladin adiponektinu ve srovnání se skupinami krmenými standardní dietou. Hyperinzulinemickým-euglykemickým clampem bylo prokázáno, že podávání HFD vedlo ke snížení celkové inzulínové senzitivity (RD – vyjádřené jako celkové vychytávání radioaktivní glukózy) i inzulínové senzitivity tkáňové vyjádřené jako vychytávání radioaktivní glukózy ve svalové (IS sval) a tukové tkáni (IS tuk). Rovněž jaterní inzulínová senzitivita byla u obou skupin krmených HFD významně snížena. Míra poklesu inzulínové senzitivity ve všech tkáních u PR-KO myší krmených HFD byla srovnatelná s kontrolní skupinou krmenou HFD.

	WT	WT+HFD	PR-KO	PR KO+HFD
RD (μmol/kg/min)	240±6	148±8	250±7	166±4
IS sval (μmol/kg/min)	274±27	175±18	288±20	183±11
IS tuk (μmol/kg/min)	20.7±2.8	6.5±1.8	26.3±5.3	10.2±1.6

Úplné chybění PR-KO neovlivňuje významným způsobem inzulínovou senzitivitu, ani vznik inzulínové rezistence vyvolané podáváním diety s vysokým obsahem tuků. Chybění PPAR-α však významným způsobem ovlivňuje reakci organismu na hladovění, a tak může ovlivnit všechny testy k měření inzulínové senzitivity, pokud jsou prováděny po delším lačnění.

Poděkování: Studie byla podpořena grantem IGA MZ ČR 7429-3.

SÉROVÉ HLADINY VYBRANÝCH ADIPOCYTOKINŮ U PACIENTEK S MENTÁLNÍ ANOREXIÍ, MENTÁLNÍ BULIMIÍ A OBEZITOU

Housová J., Křížová J., Anderlová K., Kunešová M.*, Haluzík M.

3. interní klinika VFN a 1. LF UK, Praha

* Endokrinologický ústav, Praha

Úvod: Cílem naší práce bylo porovnat sérové hladiny leptinu, solubilního leptinového receptoru (S-LEPR), adiponektinu,

rezistinu, inzulínu a HOMA indexu u pacientek s poruchami příjmu potravy a pacientek s obezitou.

Metodika: Sérové hladiny adiponektinu, rezistinu, leptinu, S-LEPR a inzulínu byly měřeny komerčními ELISA a RIA kity u 10 obézních žen (BMI >40 kg/m), u 10 pacientek s restriktivním typem mentální anorexie (BMI <17,5 kg/m), u 10 pacientek s mentální bulimií (BMI >17,5 kg/m) a 10 zdravých žen odpovídajícího věku (KS).

Výsledky: U obézních pacientek byly ve srovnání s KS zjištěny zvýšené hladiny leptinu a inzulínu, naopak byly zjištěny snížené sérové hladiny adiponektinu (17,65±3,20 vs. 30,03±4,42 ng/μl, p<0,01). U pacientek s mentální anorexií byly zjištěny snížené sérové koncentrace leptinu a inzulínu ve srovnání s KS, skupinou mentálních bulimiček a obézních. Sérové koncentrace adiponektinu byly u pacientek s mentální anorexií zvýšené jak ve srovnání s KS, tak se skupinou mentálních bulimiček, tak se skupinou obézních. Nebyly nalezeny signifikantní rozdíly v sérových hladinách rezistinu u jednotlivých sledovaných skupin. Sérové koncentrace leptinu pozitivně korelovaly s BMI u všech sledovaných skupin, sérové hladiny adiponektinu negativně korelovaly s BMI u všech sledovaných skupin. Nenalezli jsme žádný vztah mezi sérovými koncentracemi rezistinu a BMI.

Závěr: Sérové koncentrace leptinu a adiponektinu úzce souvisí s tělesnou hmotností resp. % tělesného tuku. U sérových hladin rezistinu jsme tuto závislost neprokázali. Naše výsledky svědčí proti přímému vztahu mezi sérovými hladinami rezistinu a inzulínovou rezistencí.

Podpořeno granty IGA MZČR č. 7031-3

PREVALENCE TYREOPATIÍ U PACIENTŮ S TUMORY A HYPERPLAZIEMI NADLEDVIN - RETROSPEKTIVNÍ STUDIE

Jiskra J., Smutek D., Límanová Z., Štrauch B., Zelinka T.

3. interní klinika 1. LF UK a VFN, Praha

Úvod: V literatuře byly opakovaně popsány případy asociace tyreopatií s tumory či hyperplaziemi nadledvin. Sonograficky byla popsána nodulizace tyreoidy u 60 % osob s primárním hyperaldosteronismem oproti 27 % zdravých kontrol (p<0.0001). Podobně na III. interní klinice 1. LF UK bylo pozorováno několik případů náhodného záchytu karcinomu štítné žlázy u pacientů s primárním hyperaldosteronismem.

Soubor a metodika: Tyto skutečnosti daly podnět k provedení retrospektivní analýzy výskytu tyreopatií u pacientů s chorobami nadledvin. Do studie bylo zařazeno 165 osob, u kterých byly během hospitalizace na III. interní klinice 1. LF UK od 1.1.1999 do 6.2.2004 diagnostikovány afunkční nebo hormonálně aktivní tumory, resp. hyperplazie nadledvin. U pacientů byl sledován výskyt různých forem tyreopatií, diagnostikovaných laboratorně a sonograficky. Výsledky byly porovnány s kontrolní (věkově srovnatelnou) skupinou pacientů s esenciální hypertenzí, u kterých byla patologie nadledvin vyloučena. Rozdíly byly hodnoceny statistickými testy (χ2 test, Fisherův přesný test).

Výsledky: U pacientů s tumory nadledvin bez ohledu na hormonální produkci byla některá z forem tyreopatií zjištěna u 26,5 % případů oproti 13,3 % v kontrolní skupině (p=0,028), u afunkčních tumorů dokonce u 29,7 % případů oproti 13,3 % v kontrolní skupině (p=0,027). U pacientů s tumory a hyperplaziemi nadledvin byla zjištěna i vyšší prevalence tumorů štítné žlázy (4,85 %) oproti kontrolní skupině (0,56 %) (p=0,036).

Závěr: Retrospektivně získaná data naznačila vyšší výskyt tyreopatií u pacientů s tumory a hyperplaziemi nadledvin ve srovnání s osobami s esenciální hypertenzí. K ověření této hypotézy bude nutná prospektivní studie s kompletním sonografickým a laboratorním vyšetřením štítné žlázy.

Práce byla podpořena grantem IGA MZ ČR NR/8130-3.



ELSEVIER

Journal of Diabetes and Its Complications 18 (2004) 108–112

JOURNAL OF
Diabetes
AND ITS
Complications

Comparison of microbial findings and resistance to antibiotics between transplant patients, patients on hemodialysis, and other patients with the diabetic foot

Vladimíra Fejfarová^{a,*}, Alexandra Jirkovská^a, Vladimír Petkov^b, Petr Bouček^a, Jelena Skibová^a

^aDiabetes Center, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Vdeňská 1958/9, Prague, 140 21, Czech Republic

^bDepartment of Microbiology, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic

Received 10 June 2002; received in revised form 5 November 2002; accepted 27 November 2002

Abstract

Infectious complications of the diabetic foot may be influenced by impaired renal function and by immunosuppression therapy. **Aims:** To assess differences in microbial findings and resistance to antibiotics between transplant recipients, hemodialysis patients, and other patients with the diabetic foot. **Methods:** 207 patients treated in the foot clinic for diabetic ulcers from 12/1998 to 12/1999 were included into this retrospective study. Patients were divided into three groups (transplant, dialysis, and other patients). Occurrence of individual bacterial species and resistance to antibiotics was compared between study groups. **Results:** Study groups did not differ significantly in ulcer grades defined by the Wagner classification or in the mean number of pathogens per patient. The prevalence of individual microorganisms did not differ between the study groups. However, the study groups differed significantly in the occurrence of microbial resistance to antibiotics. Transplant patients had more frequently *Staphylococcus aureus* resistant to oxacillin ($P < .01$), imipenem ($P < .01$), co-trimoxazole ($P < .01$), *Enterococcus* species resistant to ampicillin ($P < .01$), piperacillin ($P < .01$), and dialysis patients had more frequently *Pseudomonas* species resistant to piperacillin ($P < .05$) and ceftiofur ($P < .05$) in comparison with the other two groups. **Conclusions:** Transplant patients had significantly more resistant microorganisms in comparison with dialysis and other patients with the diabetic foot. Empiric antibiotic selection based on general population data should be modified in transplant patients with diabetic foot according to actual susceptibility to antibacterial drugs. © 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Diabetic foot infection; Resistance to antibiotics; Transplantation

1. Introduction

Infectious complications of the diabetic foot represent one of the most common reasons for the hospitalization of diabetic patients (Urbancic-Rovan & Gubina, 2000). Infection caused by various bacterial agents impairs vessel blood flow and leads to tissue ischemia through septic thrombotisation or mechanic compression of microcirculation by edema (Jirkovská, 2000). Diabetic ulcerations are infected more frequently by a variety of pathogens than nondiabetic ulcerations (Hunt, 1992; Lavery, Walker, Harkless, & Felder-Johnson, 1995; Wheat et al., 1986). Infection present

in the diabetic foot must be treated aggressively and promptly, since it can be limb threatening and in special groups of patients (e.g. transplant and dialysis patients), even life-threatening. Infection is the main cause of amputations in 25–50% of diabetic patients (Criado, De Stefano, Keagy, Upchurch, & Johnson, 1992; International Working Group, 1999).

Impaired immune functions, especially polymorphonuclear functions, may increase infection incidence in diabetic patients. Some factors such as inadequate metabolic control, presence of diabetic complications (diabetic nephropathy, especially end-stage renal failure), or immunosuppressive drugs have a negative influence on immune functions (Delamaire et al., 1997; Fishman & Rubin, 1998; Johnston, 1997).

Diabetic patients suffering from end-stage renal failure and those treated by transplantation represent groups at

* Corresponding author. Tel.: +420-2-61362150; fax: +420-2-61362820.

E-mail address: vlfe@medicon.cz (V. Fejfarová).

particular risk of infection, foot ulcers, and lower extremity amputation (Rith Najarian & Gohdes, 2000). The transplanted (Bartoš, Jirkovská, & Kožnarová, 1997) and dialysis patients are predisposed to foot ulcers due to neuropathy, impaired immune functions, associated coronary artery disease (Manske, Wilson, Wang, & Thomas, 1997), peripheral vascular disease (Morrissey, Shaffer, Monaco, Conway, & Madras, 1997; Sung, Althoen, Howell, & Merion, 2000), and risk factors such as advanced age and smoking (Kalker et al., 1996; Sung et al., 2000). Kalker et al. (1996) have shown that transplanted diabetic patients were at high risk for foot pathology frequently leading to amputation. Sinacore (1999) have found a longer healing time of diabetic foot ulcers in immunosuppressed/transplanted patients in comparison with nonimmunocompromised patients. Increased incidence of infection is one the main causes of the increased mortality of dialysis patients (Ruiz, Gomez, & Schreiber, 1990).

Patients with end-stage renal failure on hemodialysis and transplant patients are frequently treated for the diabetic foot at our foot clinic. The evaluation of differences in microbial findings and in resistance to antibiotics between these risk groups and other patients with the diabetic foot may be important for the selection of an appropriate antibiotic therapy strategy. The aims of our study were to determine the differences in the occurrence of individual bacterial species in swabs from diabetic foot ulcers and in the resistance to antibiotics between transplant patients, patients on hemodialysis, and other patients with the diabetic foot treated at our foot clinic.

2. Patients and methods

2.1. Study population

All outpatients who were treated at our foot clinic for diabetic foot ulcers over a period of one year (12/1998–12/1999) and had at least one positive microbial finding from swabs taken from a diabetic ulcer, were included into this retrospective study. The first swab was obtained from each patient during the first visit to our foot clinic; later swabs were repeated according to the clinical state. They were taken, if redness, purulent ulcer secretion, and other signs of infection appeared during treatment. The total number of patients treated at our foot clinic during the study period was 507, of whom 207 fulfilled the given inclusion criteria. The remaining 300 patients, who were excluded from our study, were being treated for another condition, e.g., Charcot osteoarthropathy, skin mycosis, diabetic neuropathy, angiopathy, or underwent a preventive examination only.

Patients with the diabetic foot were divided into three groups: 21 transplant patients (12 with a kidney and 9 with a combined kidney and pancreas transplantation; of mean age 50 ± 12 years, with diabetes duration of 23 ± 11 years, 67% were Type 1 diabetics), 22 patients on hemodialysis (mean

age 61 ± 12 years, diabetes duration 21 ± 9 years, 27% Type 1 diabetics), and 164 other patients (without end-stage renal failure; mean age 63 ± 13 years, diabetes duration 17 ± 10 years, 15% Type 1 diabetics) with foot ulcers. There was a significantly longer mean diabetes duration ($P < .001$) and a higher number of Type 1 diabetic patients ($P < .01$) in the group of transplant recipients in comparison with the other two groups.

The Wagner classification was used for the comparison of the diabetic foot ulcer characteristics (Pittet et al., 1999). The following distribution of Wagner grades was found: Wagner 1—22%, Wagner 2—48%, Wagner 3—24%, and Wagner 4—6% of patients with the diabetic foot. No significant differences in the occurrences of Wagner grades were found between the study groups.

2.2. Evaluation of microbial findings and resistance to antibiotics

Swabs were obtained from lower layers or deep tissue of the ulceration after local debridement. They were put immediately into transport media and sent to the Department of Microbiology. The individual bacterial species in positive swabs were determined by standard microbiological methods (Isenberg, 1985). Microorganisms were categorized by Gram staining: gram-positive microorganisms included *Staphylococcus aureus*, coagulase-negative staphylococci, *Streptococcus*, *Enterococcus*, and *Corynebacterium* species, while gram-negative microorganisms included Enterobacteriaceae (fermentative microorganisms) such as *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, and *Proteus* species, and gram-negative oxidative microorganisms such as *Acinetobacter* and *Pseudomonas* species.

Microbial resistance to antibiotics was tested by sets of antibiotics composed on the basis of previous analysis of resistance at the Institute for Clinical and Experimental Medicine and upon the recommendations of the National Reference Laboratory on Antibiotics, National Institute of Health, Prague, Czech Republic. Microbial resistance to different types of antibiotics was determined semiquantitatively by disc diffusion susceptibility (Courvalin, 1996; Reese & Betts, 1996). Minimum inhibitory concentration (MIC) was evaluated only in special cases by microdilution testing in microplates or by using the I-test with various antibiotic concentrations (Urbášková, 1999). For the comparison of microbial resistance to antibiotics between the study groups, we tested the pathogens occurring most frequently, i.e., *Staphylococci*, *Enterococcus* species, and the pathogen most important clinically, the *Pseudomonas* species, which generally require intravenous antibiotic treatment.

Testing for an individual microorganism in a patient was considered positive, if it had been found at least once in swabs from the diabetic ulcer during the observation period. Similarly, the pathogen was considered resistant to the antibiotic, if there was a proof of resistance at least

once during the study period. Microbial findings and bacterial resistance were assessed in all patients. The average number of pathogens per person was compared between the study groups.

2.3. Statistical analyses

Data analyses were performed using BMDP software (PC 90). Descriptive data are presented as mean \pm S.D.; differences between transplant recipients, dialysis, and other patients with the diabetic foot were determined using one-way ANOVA test and the chi-square test in contingency tables. $P < .05$ was considered as statistically significant.

3. Results

Parameter of metabolic control (HbA1c) did not differ significantly between transplant patients, patients on hemodialysis, and other patients with the diabetic foot ($7.93 \pm 3.02\%$ vs. $7.93 \pm 2.07\%$ vs. $8.19 \pm 1.97\%$, respectively; NS).

A total of 593 microorganisms were found in all positive swabs taken from all diabetic patients. No significant difference in the mean number of pathogens per one patient was found between the transplanted, dialysis, and other patients with the diabetic foot (2.8 vs. 2.0 vs. 3, respectively; NS).

The study groups differed significantly in the occurrence of gram-positive bacteria, which were 80% (35) in dialysis patients compared with 62% (36) in transplant patients and 63% (310) in other patients with the diabetic foot ($P < .05$).

Table 1 compares the occurrences of individual pathogens in the study groups. We did not find significant differences in

Table 1

A comparison of incidence of evaluated pathogens between transplant recipients, patients on hemodialysis, and other patients with the diabetic foot

Prevalence of evaluated pathogens in the observed groups				
Evaluated pathogens	Transplant patients (n = 21)	Dialysis patients (n = 22)	Other patients (n = 164)	P
Total number of detected pathogens	58	44	491	
<i>S. aureus</i>	21%	25%	21%	NS
Staphylococcus coagulase negative	22%	27%	20%	NS
<i>Enterococcus</i> species	10%	21%	12%	NS
<i>Streptococcus</i> species	4%	5%	7%	NS
<i>Corynebacterium</i> species	5%	2%	3%	NS
<i>Escherichia coli</i>	5%	9%	9%	NS
<i>Klebsiella</i> species	9%	2%	6%	NS
<i>Enterobacter</i> species	9%	2%	6%	NS
<i>Citrobacter</i> species	2%	–	2%	NS
<i>Proteus</i> species	5%	2%	6%	NS
<i>Acinetobacter</i> species	3%	–	3%	NS
<i>Pseudomonas</i> species	5%	5%	5%	NS

n: number; NS: not significant.

Table 2

A comparison of *S. aureus* antibiotic resistance between transplant recipients, patients on hemodialysis, and other patients with the diabetic foot

Prevalence of <i>S. aureus</i> resistance to selected antibiotics in the observed groups				
Different types of antibiotics	Transplant patients (n = 21)	Dialysis patients (n = 22)	Other patients (n = 164)	P
Number of detected <i>S. aureus</i>	12	11	102	
Oxacillin	75%	55%	32%	< .01
Amoxicillin/clavulanate	58%	36%	29%	NS
Imipenem	60%	9%	16%	< .01
Piperacillin	56%	33%	35%	NS
Cefpirom	60%	27%	26%	NS
Co-trimoxazole	82%	22%	29%	< .01
Erythromycin	75%	36%	38%	< .05
Ciprofloxacin	55%	36%	36%	NS
Clindamycine	67%	27%	37%	NS
Gentamycine	58%	27%	28%	NS
Ticarcillin/clavulanic acid	38%	17%	26%	NS
Vancomycin	0%	0%	0%	NS

n: number; NS: not significant.

their occurrence between the groups. An almost identical spectrum of bacterial species was found in transplant and dialysis patients as in patients with the diabetic foot without end-stage renal failure. *S. aureus* (21%), coagulase negative *Staphylococci* (21%) and *Enterococcus* species (13%) were the most prevalent bacterial species in all study groups. The prevalence of clinically relevant gram-negative bacteria did not exceed 9% in the study groups. *Citrobacter* and *Acinetobacter* were the least prevalent species.

The resistance of *S. aureus* (isolated in 21% of all positive swabs) to antibiotics is shown in Table 2. It shows a significantly higher resistance of *S. aureus* to oxacillin, imipenem, co-trimoxazole, and erythromycin in transplant patients in comparison to the dialysis and other patients with the diabetic foot.

The second most frequent pathogen appearing in all groups of patients with diabetic ulcers was the coagulase negative *Staphylococcus*. Its resistance to antibiotics did not differ significantly between transplant patients, patients on hemodialysis, and other patients with the diabetic foot.

Table 3 shows a significantly higher resistance of the *Enterococcus* species to ampicillin, piperacillin, and ticarcillin/clavulanic acid in transplant patients and to ampicillin/sulbactam and ticarcillin/clavulanic acid in dialysis patients in comparison with the other two study groups.

The resistance to antibiotics of the *Pseudomonas* species was high in all patients with the diabetic foot, especially resistance to gentamycine (26% of all *Pseudomonas* species), piperacillin (26%), ciprofloxacin (32%), cefoperazon (31%), and cefpirom (23%). All *Pseudomonas* bacteria in dialysis patients were significantly more resistant to piperacillin (100% vs. 33% vs. 19%; $P < .05$) and cefpirom (100% vs. 0% vs. 16%; $P < .05$) compared with the transplanted or other patients with the diabetic foot, respectively.

Table 3

A comparison of *Enterococcus* species antibiotic resistance between transplant recipients, patients on hemodialysis, and other patients with the diabetic foot

Prevalence of *Enterococcus* species resistance to selected antibiotics in the observed groups

Different types of antibiotics	Transplant patients (n = 21)	Dialysis patients (n = 22)	Other patients (n = 164)	P
Number of detected <i>Enterococcus</i> species	6	9	61	
Ampicillin	40%	25%	2%	< .01
Ampicillin/sulbactam	0%	33%	0%	< .01
Amoxicillin/clavulanate	0%	0%	2%	NS
Piperacillin	50%	0%	2%	< .0001
Ticarcillin/clavulanic acid	50%	60%	12%	< .01
Ciprofloxacin	83%	67%	56%	NS
Vancomycin	0%	0%	2%	NS
Tetracycline	50%	43%	71%	NS

n: number; NS: not significant.

Analysis of statistical data concerning the incidence and resistance to antibiotics of other gram-negative pathogens such as *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, or *Acinetobacter* was not performed due to the small number of isolates in the study groups.

4. Discussion

The aim of our study was to compare microbial findings in diabetic ulcers and their resistance to antibiotics in transplant recipients, patients on hemodialysis, and other patients with the diabetic foot.

Infection of diabetic ulcers was frequently caused by mixed flora. On average, 2.9 pathogens were isolated from the diabetic foot ulcers in the observed group. However, no significant differences in the mean number of microorganisms per patient were found between transplanted, dialyzed, and other patients with the diabetic foot. The study of Lavery et al. (1995) has shown the presence of a higher number of bacterial organisms in diabetic ulcers in comparison with nondiabetic wounds: on average, 2.6 pathogens were found in their study in infected soft tissue lesions of patients with diabetes mellitus and only 1.3 pathogens were found in nondiabetic patients. As has been shown by Wheat et al. (1986), the presence of several microbial agents might cause a rapid progression of soft tissue infection, even if the ulcers are infected by pathogens considered to be opportunistic bacteria under physiological circumstances.

The majority of diabetic ulcers are superficial ulcers, which are usually colonized by aerobic gram-positive microorganisms (Caputo, Cavanagh, Ulbrecht, Gibbons, & Karchmer, 1994). Deeper foot lesions, especially those which are limb-threatening, are infected by polymicrobial flora including gram-positives, anaerobes, and gram-negatives (Jones, Edwards, & Finch, 1984; Joshi, Caputo, Weitekamp, & Karchmer, 1999; Lipsky & Berendt, 2000).

Gram-positive bacteria predominated in the swabs from diabetic ulcers in our study. *S. aureus*, coagulase-negative *Staphylococcus* and *Enterococcus* species were the microorganisms found most frequently in all groups of patients. Similarly to our data, Pittet et al. (1999) have shown that Gram-positive microorganisms were the most frequently isolated pathogens from diabetic ulcers.

The basis of therapy of infected diabetic ulcers is antibiotic treatment, which arrests or reverses the progression of infection (Pecoraro, Reiber, & Burgess, 1990). However, the results of studies evaluating antibiotic usage in the treatment of the diabetic foot are inconsistent, even Chantelau et al. (1996) did not find any significant difference in the ulcer healing time of similar diabetic foot ulcers in patients treated by antibiotics in comparison with those treated without antibiotics.

The choice of antibiotic therapy is empirical or is guided by the sensitivity of the encountered bacterial microorganisms. Empirical antibiotic therapy should be consisted from antibiotics active against staphylococci and streptococci or from broader-spectrum agents if gram-negatives or anaerobes are expected in diabetic ulcers (Lipsky, 1999). In our study, no significant differences were found in the occurrence of individual microorganisms between transplanted, dialyzed, and other patients with the diabetic foot. On the other hand, our results showed significant differences in microbial susceptibility to antibiotics tested between the study groups. Higher resistances to antibiotics of the *S. aureus* and *Enterococcus* species were demonstrated in the transplant recipients. A significantly higher resistance to antibiotics of the *Pseudomonas* species was found in the dialysis patients compared to the other two groups.

Day et al. (1997) and Tentolouris et al. (1999) have shown a higher risk of developing a methicillin-resistant *S. aureus* infection in patients with the diabetic foot. This resistant pathogen was present especially in patients after repeated or prolonged hospitalizations. Wood (2000) demonstrated that the *Enterococcus* species was a frequent finding in patients who had been repeatedly treated with antibiotics. *Enterococcus* species are considered to be antibiotic-resistant opportunistic pathogens.

Prolonged hospitalization and long-term or repeated antibiotic treatment of other infectious complications (e.g., respiratory or urinary infection) may lead to a selective antibiotic pressure. This mechanism could be a possible cause of the high bacterial resistance of some pathogens, especially *S. aureus*, in the transplant recipients in our study.

In conclusion, a similar occurrence of different bacterial agents was found in transplanted, dialysis, and other patients with the diabetic foot in our study, but a higher bacterial resistance to the tested antibiotics was observed in the transplant recipients in comparison with the other two groups. Our data showed that oxacillin, co-trimoxazole, erythromycin, and piperacillin are not suitable for the antibiotic treatment of diabetic foot ulcers in the transplant

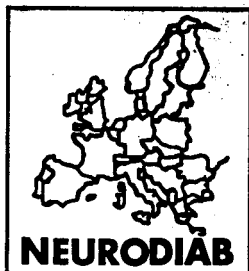
recipients. However, ciprofloxacin and ticarcillin/clavulanic acid could be recommended for the therapy due to the lower resistance to these antibiotics in transplant patients. Vancomycin is indicated in serious infections. Our data suggest that empiric antibiotic treatment based on data from the general diabetic population should be modified in transplanted patients with the diabetic foot due to the higher occurrence of resistant bacteria in these patients. It requires that antibiotic therapy should be more frequently guided by actual swab findings and microbial susceptibility to antibiotics.

Acknowledgments

This study was supported by Ministry of Health Grant No. L17/98:00023001, Czech Republic.

References

- Bartoš, V., Jirkovská, A., & Kožnarová, R. (1997). Risk factors for diabetic foot in recipients of renal and pancreatic transplants. *Časopis Lékařů Českých*, 136, 527–529.
- Caputo, G. M., Cavanagh, P. R., Ulbrecht, J. S., Gibbons, G. W., & Karchmer, A. W. (1994). Assessment and management of foot disease in patients with diabetes. *New England Journal of Medicine*, 331, 854–860.
- Chantelau, E., Tanudjaja, T., Altenhofer, F., Ersanli, Z., Lacigova, S., & Metzger, C. (1996). Antibiotic treatment for uncomplicated forefoot ulcers in diabetes: a controlled trial. *Diabetic Medicine*, 13, 156–159.
- Courvalin, P. (1996). Interpretive reading of in vitro antibiotic susceptibility tests (the antibiogramme). *Clinical Microbiology and Infection*, 51, 26–34.
- Criado, E., De Stefano, A. A., Keagy, B. A., Upchurch, G. R., & Johnson, G. (1992). The course of severe foot infection in patients with diabetes. *Surgery, Gynecology and Obstetrics*, 175 (2), 135–140.
- Day, M. R., & Armstrong, D. G. (1997). Factors associated with methicillin resistance in the diabetic foot infections. *Journal of Foot and Ankle Surgery*, 36 (4), 322–325.
- Delamare, M., Maugendre, D., Moreno, M., Le Goff, M.-C., Allanic, H., & Genetet, B. (1997). Impaired leukocyte functions in diabetic patients. *Diabetic Medicine*, 14, 29–34.
- Fishman, J. A., & Rubin, R. H. (1998). Medical progress infection in organ transplant recipients. *New England Journal of Medicine*, 338 (24), 1741–1751.
- Hunt, J. A. (1992). Foot infection in diabetes is rarely due to a single microorganism. *Diabetic Medicine*, 9, 749–752.
- International Working Group on the diabetic foot. (1999). The diabetic foot infections. In: *International Consensus on the Diabetic* (pp. 55–60). Amsterdam, The Netherlands.
- Isenberg, H. D. (1985). Section I: General. In: E. H. Lennette, A. Balows, W. J. Hausler Jr., & H. J. Shadomy (Eds.), *Manual of clinical microbiology* (4th ed., pp. 1–99). Washington, DC: American Society for Microbiology.
- Jirkovská, A. (2000). Diabetická noha. In: V. Bartoš, & T. Pelikánová (Eds.), *Praktická diabetologie* (2nd ed., pp. 305–325). Praha: Maxdorf.
- Johnston, C. L. W. (1997). Infection and diabetes mellitus. In: J. Pickup, & G. Williams (Eds.), *Textbook of diabetes*, 2nd ed., (vol. 70, pp. 1–13). Oxford: Blackwell.
- Jones, E. W., Edwards, R., & Finch, R. (1984). A microbiologic study of the diabetic foot lesions. *Diabetic Medicine*, 2, 213–215.
- Joshi, N., Caputo, G. M., Weitekamp, M. R., & Karchmer, A. W. (1999). Infections in patients with diabetes mellitus. *New England Journal of Medicine*, 16, 1906–1912.
- Kalker, A. J., Pirsch, J. D., Heisey, D., Sollinger, H. W., Belzer, F. O., Knechtle, S. J., & Alessandro, A. M. (1996). Foot problems in the diabetic transplant recipient. *Clinical Transplantation*, 10 (6 Pt 1), 503–510.
- Lavery, L. A., Walker, S. C., Harkless, L. B., & Felder-Johnson, K. (1995). Infected puncture wounds in diabetic and nondiabetic adults. *Diabetes Care*, 18 (12), 1588–1591.
- Lipsky, B. A. (1999). Evidence-based antibiotic therapy of diabetic foot infections. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 26 (3–4), 267–276.
- Lipsky, B. A., & Berendt, A. R. (2000). Principles and practice of antibiotic therapy of diabetic foot infections. *Diabetes, Metabolism Research and Reviews*, 16 (Suppl. 1), S42–S46.
- Manske, C. L., Wilson, R. F., Wang, Y., & Thomas, W. (1997). Atherosclerotic vascular complications in diabetic transplant candidates. *American Journal of Kidney Diseases*, 29 (4), 601–607.
- Morrissey, P. E., Shaffer, D., Monaco, A. P., Conway, P., & Madras, P. N. (1997). Peripheral vascular disease after kidney–pancreas transplantation in diabetic patients with end-stage renal disease. *Archives of Surgery*, 132 (4), 358–361.
- Pecoraro, R. E., Reiber, G. E., & Burgess, E. M. (1990). Pathways to diabetic limb amputation: basis for prevention. *Diabetes Care*, 13, 513–521.
- Pittet, D., Wyssa, B., Herter-Clavel, C., Kursteiner, K., Vaucher, J., & Lew, P. D. (1999). Outcome of the diabetic foot infections treated conservatively. A retrospective cohort study with long-term follow-up. *Archives of Internal Medicine*, 159, 851–856.
- Reese, R. E., & Betts, R. F. (1996). Antibiotic use. In: R. E. Reese, & R. F. Betts (Eds.), *A practical approach to infectious diseases* (4th ed., pp. 1059–1395). Little, Brown and Company.
- Rith Najarian, S., & Gohdes, D. (2000). Preventing amputations among patients with diabetes on dialysis (Letter). *Diabetes Care*, 9, 1445–1446.
- Ruiz, P., Gomez, F., & Schreiber, A. D. (1990). Impaired function of macrophage Fc gamma receptors in end stage renal disease. *New England Journal of Medicine*, 322 (1), 717–722.
- Sinacore, D. R. (1999). Healing times of pedal ulcers in diabetic immunosuppressed patients after transplantation. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*, 80, 935–940.
- Sung, R. S., Althoen, M., Howell, T. A., & Merion, R. M. (2000). Peripheral vascular occlusive disease in renal transplant recipients: risk factors and impact on kidney allograft survival. *Transplantation*, 70 (7), 1049–1054.
- Tentolouris, N., Jude, E. B., Smirnof, I., Knowles, E. A., & Boulton, A. J. M. (1999). Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: an increasing problem in a the diabetic foot clinic. *Diabetic Medicine*, 16, 767–771.
- Urbancic-Rovan, V., & Gubina, M. (2000). Bacteria in superficial diabetic foot ulcers (Letter). *Diabetic Medicine*, 17, 814–815.
- Urbášková, P. (1999). Rezistence baktérií k antibiotikům. In: P. Urbášková (Ed.), *Výbrané metody* (1st ed., pp. 74–85). Praha: Trios s.r.o.
- Wheat, L. J., Allen, S. D., Henry, M., Kernek, C. B., Siders, J. A., Kuebler, T., Fineberg, N., & Norton, J. (1986). The diabetic foot infections, bacteriologic analysis. *Archives of Internal Medicine*, 146, 1935–1940.
- Wood, A. J. J. (2000). Vancomycin-resistant Enterococcal infections. *New England Journal of Medicine*, 342 (10), 710–721.



Neurodiab
Diabetic Foot Study Group
of the EASD

JOINT MEETING

September 14th-16th 2000

FIUGGI (ITALY)

**HOTEL SILVA SPLENDID.
FIUGGI (ITALY)**

NEURODIAB AND DFSG OF THE EASD
JOINT MEETING
FIUGGI September 14th-16th 2000

Comparison of Microbiologic Findings, Antibiotic Therapy and Resistance among Transplant Patients, Patients on Hemodialysis and other Patients with the Diabetic Foot.

V.Fejfarová, A.Jirkovská, V.Petkov, J.Skibová, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic

Infectious complications of the diabetic foot may be influenced by impaired renal function and by immunosuppression. **AIM:** To establish differences in microbiologic findings (MF), duration of antibiotic therapy (AT) and resistance (AR) among transplant recipients, hemodialysis patients, and other patients treated for the diabetic foot in our foot clinic. **METHODS:** MF (identification by species), number of pathogens, AR, duration of AT were evaluated in all patients treated in a foot clinic over a period of 1 year and had positive swabs. The patients were divided into 3 groups: transplant patients (n=21, mean age 50.1±12.2 years, diabetes mellitus duration 23.4±10.5 years), dialysis patients (n=22, 61±12.2 years, 21.1±8.8 years) and other patients (n=164, 63.4±12.9 years, 17±9.9 years). MF were compared among the three patient groups. **RESULTS:** A significant difference among groups was only found in diabetes mellitus duration, while the other evaluated characteristics such as HbA1c, occurrence of Charcot's osteoarthropathy, ischemic foot, previous defects and ulcer depth did not reveal any significant differences. The most frequent MF occurring in swabs of all studied groups were *S. aureus* (21.1%), *S. epidermidis* (21.1%) and *Enterococcus* species (12.8%); we did not find any differences in the incidence of MF among groups. A significantly higher occurrence of Gram-positive organisms, and a significantly lower occurrence of Gram-negative organisms only were found in dialysis patients compared with other groups. AT duration did not differ among the patient groups. We observed significant differences in the AR of pathogens among the studied groups: transplant patients had higher AR in *S. aureus*, *Enterococcus* species, *Enterobacter* species and in *Proteus* species; dialysis patients showed higher AR in *Enterococcus* species and in *Pseudomonas* species compared with the other patient groups. **CONCLUSION:** No significant differences were demonstrated both in the incidence of organisms and in the duration of antibiotic treatment among transplant recipients, dialysis patients, and other patients with the diabetic foot. Significant differences among the studied groups were observed in the antibiotic resistance of pathogens, with the most resistant organisms found in the group of transplant patients.



VNITŘNÍ LÉKAŘSTVÍ

ČASOPIS ČESKÉ INTERNISTICKÉ SPOLEČNOSTI
A SLOVENSKEJ INTERNISTICKEJ SPOLOČNOSTI

VYDÁVÁ
ČESKÁ LÉKAŘSKÁ SPOLEČNOST J. E. PURKYNĚ

ISSN 0042-773X
INDEXED IN EMBASE/Excerpta Medica,
MEDLINE/Index Medicus,
CHEMICAL ABSTRACTS
Bibliographia medica čechoslovaca

ROČNÍK 48 DUBEN / 2002 Kč 71,-

4

Vliv rezistentních patogenů a ostatních rizikových faktorů na četnost amputací dolních končetin u pacientů se syndromem diabetické nohy

Fejfarová V.¹, Jirkovská A.¹, Skibová J.¹, Petkov V.²

¹Klinika diabetologie Centra diabetologie Institutu klinické a experimentální medicíny Praha, přednostka prof. MUDr. T. Pelikánová, DrSc.

²Oddělení klinické mikrobiologie Institutu klinické a experimentální medicíny Praha, přednostka MUDr. V. Petkov

Souhrn

Amputace u pacientů s diabetes mellitus tvoří většinu netraumatických amputací v České republice. Vyšší počet amputací u pacientů s diabetes mellitus je způsoben nejen vyšším výskytem ischemické choroby dolních končetin a diabetické neuropatie, ale jednou z hlavních příčin amputací je i přítomnost infekce. Cílem naší studie bylo stanovit vliv rezistentních patogenů ve stěrech z ulcerací na četnost amputací dolních končetin u pacientů s diabetes mellitus. *Metody:* Ve dvouleté retrospektivní studii bylo hodnoceno 191 pacientů se syndromem diabetické nohy léčených v podiatrické ambulanci IKEM. Byl stanoven výskyt ischemické choroby dolních končetin, osteomyelitidy a přítomnost všech gram pozitivních i gram negativních rezistentních patogenů ve stěrech z ulcerace. Rezistence byla definovaná jako necitlivost ke všem orálním antibiotikům. Byl porovnán výskyt rezistentních patogenů (zejména rezistentních stafylokoků) u pacientů po amputaci s výskytem těchto patogenů u pacientů bez amputace. *Výsledky:* 50/191 (26 %) pacientů ve sledovaném období podstoupilo amputaci, z nichž 44/50 (88 %) mělo nízkou amputaci, tj. pod tarzometatarzální úroveň, a 6/50 (12 %) mělo vysokou amputaci, tj. nad tarzometatarzální úroveň. U 53/181 (29 %) pacientů s diabetickými ulceracemi byly nalezeny ve stěrech rezistentní patogeny. Pacienti po amputacích měli signifikantně více rezistentních mikroorganismů oproti pacientům bez amputací - 24/42 (57 %) vs. 29/139 (21 %); $p < 0,001$. Rezistentní kmeny stafylokoků byly nalezeny u 38/181 (21 %) pacientů, přičemž amputovaní pacienti měli v porovnání s neamputovanými pacienty signifikantně více rezistentních kmenů stafylokoků ve stěrech z ulcerací - 18/42 (43 %) vs. 20/139 (14 %); $p < 0,001$. Signifikantně vyšší procento ischemické choroby dolních končetin - 79 % (38/48) vs. 60 % (81/136); $p < 0,05$ a osteomyelitidy - 69 % (33/48) vs. 13 % (18/140); $p < 0,001$ - bylo nalezeno u pacientů po amputaci oproti neamputovaným pacientům. *Závěr:* Přítomnost patogenů rezistentních k perorálním antibiotikům v diabetických ulceracích, zvláště přítomnost rezistentních kmenů stafylokoků, byla signifikantně vyšší u amputovaných pacientů se syndromem diabetické nohy v porovnání s pacienty bez amputace.

Klíčová slova: Syndrom diabetické nohy - Amputace - Infekce diabetických ulcerací

Summary: Fejfarová V., Jirkovská A., Skibová J., Petkov V.: Association Between the Presence of Resistant Pathogens, other Risk Factors and Frequency of Amputations in Patients with the Diabetic Foot

Patients with diabetes mellitus undergo more amputations due to peripheral vascular disease, neuropathy and especially to infection requiring long-lasting antibiotic therapy than non diabetic patients. The aim of our study was to assess the association between the presence of resistant pathogens presented in diabetic ulcers and the frequency of lower limb amputations. *Methods:* 191 diabetic patients consecutively treated for the diabetic foot in our foot clinic were included into two years retrospective study. Peripheral ischemia, the presence of osteomyelitis and the incidence of all Gram positive and negative resistant pathogens (defined as resistance to all oral antibiotics) especially of resistant Staphylococcus species presenting in diabetic foot ulcers were determined. *Results:* 50/191 (26 %) patients underwent amputation, of whom 44/50 (88 %) had minor and 6/50 (12 %) had major amputations. 53/181 (29 %) patients with diabetic foot ulcers had resistant pathogens in their defects. Amputated patients had significantly more resistant microorganisms than patients without amputations - 24/42 (57 %) vs. 29/139 (21 %); $p < 0.001$. Resistant Staphylococcus species were found in 21 % (38/181) of all patients. Patients with amputations had significantly more resistant Staphylococcus species in comparison with patients without amputations - 18/42 (43 %) vs. 20/139 (14 %); $p < 0.001$. Significantly higher incidence of peripheral vascular disease - 79 % (38/48) vs. 60 % (81/136); $p < 0.05$ and osteomyelitis - 69 % (33/48) vs. 13 % (18/140); $p < 0.001$ - were found in patients with amputations in comparison with patients without amputations. *Conclusion:* The presence of pathogens resistant to all oral antibiotics and especially of resistant Staphylococcus species was significantly higher in diabetic patients with lower limb amputations in comparison with patients without amputations.

Key words: Diabetic foot - Amputation - Diabetic foot infection

Úvod

Syndrom diabetické nohy je definován dle WHO jako infekce, ulcerace a/nebo destrukce hlubokých tkání nohy spojená s neurologickými abnormalitami a s různým stupněm ischemické choroby dolních končetin (2). Syndrom diabetické nohy je jednou z nejzávažnějších příčin morbidit u pacientů s diabetem a velmi často vyžaduje dlouhodobou hospitalizaci (8, 24). Navzdory intenzivní terapii dochází často u těchto pacientů k amputacím dolních končetin (8).

Z řady studií víme, že u pacientů s diabetes mellitus dochází častěji k amputacím v porovnání s pacienty bez diabetu právě vlivem vyššího výskytu diabetické neuropatie a vyššího výskytu ischemické choroby dolních končetin (5, 7, 32). Nízké amputace dolních končetin jsou indikovány u pacientů s diabetes mellitus k odstranění gangrény, k odstranění infikované tkáně a ke korekci deformit nohou (2). Vysoké amputace jsou indikovány u pacientů pro progredující ischemickou nekrózu, septický stav při syndromu diabetické nohy, který nelze zvrátit konzervativní terapií, nebo pro výrazné progredující klidové bolesti, které nelze řešit cévním revascularizačním zákrokem, které neodpovídají na analgetickou terapii a které nelze řešit nízkou amputací (2). Vysoké amputace u pacientů s diabetes mellitus jsou sdruženy s vysokou morbiditou a mortalitou a se sníženou kvalitou života (2, 23). Existuje mnoho rizikových faktorů, jež predisponují pacienta k amputacím, k nejzávažnějším patří infekce ran (4, 10). Rezistence patogenů na perorální antibiotika zhoršuje podstatně možnost ambulantní léčby ulcerací a mohla by proto ovlivnit i výskyt amputací dolních končetin u pacientů se syndromem diabetické nohy.

Cílem naší studie bylo posoudit vliv přítomnosti všech gram pozitivních i gram negativních rezistentních patogenů, zejména rezistentních stafylokoků, na výskyt amputací u pacientů se syndromem diabetické nohy.

Soubor nemocných a metodika

Soubor nemocných

Ve dvouleté průřezové retrospektivní studii bylo hodnoceno 191 pacientů, kteří byli ošetřeni na

podiatrické ambulanci IKEM v období 12/1998 - 11/1999 pro syndrom diabetické nohy a kteří měli pozitivní kultivační nálezy ze stěru z diabetických ulcerací. Charakteristiku souboru zobrazuje tabulka 1. U těchto pacientů byl dále sledován výskyt amputací v období 1/1999 - 12/2000.

Metodika

U všech pacientů léčených pro syndrom diabetické nohy v podiatrické ambulanci IKEM byl sledován výskyt rezistentních gram pozitivních i gram negativních patogenů, zejména pak rezistentních stafylokoků ze stěrů z diabetických ulcerací. Za rezistentní mikroorganismy byly považovány ty, které byly necitlivé ke všem perorálním antibiotikům. Citlivost či rezistence k perorálním antibiotikům je v klinické praxi důležitá z důvodu určení ambulantní antibiotické terapie syndromu diabetické nohy. Rezistence patogenů k perorálním antibiotikům omezuje možnost ambulantní léčby pacientů se syndromem diabetické nohy.

V rámci dvouleté studie jsme sledovali vliv přítomnosti rezistentních patogenů na četnost amputací u pacientů se syndromem diabetické nohy.

Pacienti zařazení do studie byli rozděleni do dvou skupin - na skupinu pacientů bez amputace ve sledovaném období a na skupinu pacientů s amputacemi dolních končetin. Výskyt rezistentních patogenů, zejména rezistentních stafylokoků, u pacientů bez amputací byl porovnán s výskytem těchto bakterií u pacientů s amputacemi. Dále byly ve studii hodnoceny nálezy ischemické choroby dolních končetin a osteomyelitidy u sledovaných pacientů.

Mikrobiální nálezy:

U pacientů zařazených do studie byly odebrány stěry z hlubokých tkání ulcerací dolních končetin po lokálním debridementu. Stěry byly odebrány do Amiensova transportního média a ihned byly dopraveny do mikrobiologické laboratoře IKEM. Materiál ze stěrů byl aplikován na pevné půdy (př. Endova půda, krevní agar, Sabouraudova půda) pro určení přítomnosti mikroorganismů. Poté byl zbylý materiál vložen do živného bujónu. Za 24 hodin po pomnožení bylo provedeno opětné rozočkování na pevné půdy. Specifikace patogenů byla provedena standardními metodami (17).

Tab. 1. Základní charakteristika souboru.

Počet pacientů zařazených do studie	191 (21 % pacientů - Diabetes mellitus 1. typu)
Věk (roky)	62 ± 13
HbA1c (%)	8,1 ± 2,2
Trvání diabetes mellitus (roky)	18 ± 10
Závažnost diabetické ulcerace hodnoceno stupněm dle Wagnera*	2,1 ± 0,9

- *1. stupeň - povrchová ulcerace v epidermis, dermis
2. stupeň - diabetická ulcerace dosahující vaziva, šlachy
3. stupeň - hluboká diabetická ulcerace - postihuje hluboké měkké tkáně, často přítomna osteomyelitida
4. stupeň - gangréna prstů, části nohy
5. stupeň - gangréna celé nohy

Kultivační nálezy jsme rozdělili do 2 velkých skupin - na grampozitivní a gramnegativní bakterie. Grampozitivní či gramnegativní bakterie byly dále rozčleněny do jednotlivých subpopulací patogenů. U jednotlivých mikroorganismů se hodnotily citlivosti k danému spektru antibiotik, které byly určeny dle výskytu antibiotické rezistence v IKEM a dle doporučení Národní referenční laboratoře antibiotik Státního zdravotního ústavu, Praha. Citlivost mikroorganismů byla stanovena diskovou difuzní metodou (9, 25). U některých patogenů byla stanovena minimální inhibiční koncentrace pomocí dilučních mikrometod (30).

Detekce ischemické choroby dolních končetin:

Ischemická choroba dolních končetin byla diagnostikována pomocí neinvazivních metod [dopplerovské vyšetření tepenného řečiště nebo měření transkutánního kyslíku (TcPO₂) na dolních končetinách (18)] nebo invazivních metod (angiografie). Ischemická choroba dolních končetin byla definována jako přítomnost dopplerovských indexů nižších než 0,8 nebo hodnot TcPO₂ nižších než 30 mm Hg či závažných aterosklerotických nálezů při angiografii dolních končetin.

Osteomyelitis:

Osteomyelitidu jsme prokázali dle klinických nálezů (defekt Wagner 3, flegmóna, píštěl jdoucí ke kosti) a rentgenologického vyšetření (23).

Amputace:

Amputace byly rozděleny do 2 skupin - na nízké (pod tarzometatarzální úroveň) a vysoké (nad tarzometatarzální úroveň).

Statistické zpracování:

Data byly zpracovány pomocí T-testu a párového Mann-Whitneyova testu v programu BMDP.

Výsledky

Ze 191 pacientů se syndromem diabetické nohy došlo k amputaci dolních končetin u 50 nemocných (26 %). U 44 pacientů byly provedeny nízké amputace (88 %), 6 pacientů (12 %) z 50 amputovaných pacientů podstoupilo vysokou amputaci [pouze u 2 pacientů došlo k amputaci ve stehně (1 %)]. Před

provedením amputace měli pacienti defekt dolních končetin v průměru 7,7 ± 7,5 měsíce a pozitivita stěrů byla před amputací v průměru 7,1 ± 7,4 měsíce.

U pacientů se syndromem diabetické nohy, kteří byli ošetřeni během sledovaného období v naší podiatrické ambulanci, byly nalezeny rezistentní patogeny (rezistentní ke všem perorálním antibiotikům) alespoň v 1 případě u 29 % (53/181) všech pacientů. Rezistentní kmeny stafylokoků byly nalezeny u 21 % (38/181) všech pacientů se syndromem diabetické nohy.

Zjistili jsme rovněž vysoký výskyt grampozitivních patogenů rezistentních na Oxacillin, kteří byli nalezeni u 64 % (109/171) pacientů se syndromem diabetické nohy.

Prokázali jsme signifikantně vyšší výskyt rezistentních patogenů u pacientů po amputaci (tab. 2). U 57 % amputovaných pacientů byly nalezeny rezistentní patogeny oproti 21 % neamputovaných pacientů ($p < 0,001$).

Amputovaní pacienti měli před výkonem signifikantně více polyrezistentních kmenů stafylokoků v diabetických ulceracích nežli pacienti bez amputace - ve 43 % vs. ve 14 %; $p < 0,001$.

Porovnali jsme taktéž i vliv přítomnosti grampozitivních patogenů rezistentních na Oxacillin na incidenci amputací u pacientů se syndromem diabetické nohy. Prokázali jsme signifikantně vyšší výskyt Oxacillin rezistentních grampozitivních mikroorganismů u amputovaných pacientů oproti neamputovaným pacientům.

Ze všech pacientů s amputacemi mělo 46,5 % pacientů zhojenou jizvu po amputaci na konci sledovaného období, u 53,5 % pacientů ještě nedošlo ve sledovaném období k úplnému zhojení amputačního pahýlu. Ze všech amputovaných pacientů muselo 69 % pacientů podstoupit reamputaci - většinou pro neuspokojivé hojení po amputaci či pro nově vzniklou diabetickou ulceraci. Převážná většina reamputací byla provedena pod tarzometatarzální úroveň.

Kromě přítomnosti jednotlivých patogenů infikujících diabetické ulcerace jsme sledovali i jiné faktory, které mohou ovlivnit výskyt amputací u pacientů se syndromem diabetické nohy.

ICHDK byla prokázána celkem u 65 % (124/191) pacientů se syndromem diabetické nohy. ICHDK se vyskytla u 79 % (38/48) amputovaných

Tab. 2. Výskyt rezistentních mikroorganismů na perorální antibiotika u amputovaných a neamputovaných pacientů se syndromem diabetické nohy

Typ rezistentních patogenů	Výskyt rezistentních patogenů u amputovaných pacientů	Výskyt rezistentních patogenů u pacientů bez amputace	Statistická významnost
Rezistentní grampozitivní a gramnegativní patogeny	24/42 (57 %)	29/139 (21 %)	$p < 0,001$
Polyrezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>	18/42 (43 %)	20/139 (14 %)	$p < 0,001$
Oxacillin rezistentní grampozitivní patogeny	32/38 (84 %)	77/133 (58 %)	$p < 0,01$

pacientů oproti 60 % (81/136) neamputovaných pacientů ($p < 0,05$).

Ve studii jsme také sledovali výskyt osteomyelitidy, jež může být jednou z příčin amputací. Osteomyelitida byla nalezena u 27 % (51/188) všech pacientů se syndromem diabetické nohy. Signifikantně vyšší výskyt osteomyelitidy byl nalezen u amputovaných pacientů v porovnání s neamputovanými pacienty - u 69 % (33/48) oproti 13 % (18/140) pacientů; $p < 0,001$.

Diskuse

Syndrom diabetické nohy je často invalidizující komplikací onemocnění diabetes mellitus. Kvalita života pacientů s chronickými ulceracemi není uspokojivá, ale pokud u pacienta dojde k vysoké amputaci, je kvalita života výrazně snížena (23).

Infekce diabetických ulcerací může vážně ohrozit dolní končetiny pacientů s diabetes mellitus (10). Hluboká infekce diabetických ulcerací nebo gangréna části dolních končetin jsou jednou z hlavních příčin až 85 % amputací (4), přičemž zvýšený výskyt amputací byl pozorován hlavně u hlubokých infekcí způsobených gramnegativními patogeny, anaeroby nebo polymikrobiální flórou (14). Kromě již zmíněných patogenů jsou diabetické ulcerace často infikované *Staphylococcus aureus*, který může také zapříčinit vyšší výskyt amputací dolních končetin u pacientů se syndromem diabetické nohy (22). Doposud nebyl sledován výskyt antibiotické rezistence mikroorganismů u amputovaných diabetických pacientů.

V literatuře bylo popsáno několik faktorů, které zvyšují riziko amputací dolních končetin u pacientů s diabetes mellitus. Rizikovými faktory amputací dolních končetin jsou dle Selbyho úroveň kompenzace, trvání diabetu a systolický tlak (28). Poškozená nožní biomechanika, omezená kloubní pohyblivost a kostní deformity jsou rovněž často spojeny se zvýšeným rizikem ulcerací a amputací (1, 6). Dalším rizikovým faktorem je renální insuficience, která zhoršuje hojení diabetických ulcerací (12) a může vést ke zvýšenému výskytu amputací u pacientů s ledvinovou nedostatečností (24). Dalšími faktory, které predisponují pacienty k neúspěchu konzervativní terapie diabetických ulcerací, jsou předchozí hospitalizace pro syndrom diabetické nohy, hlubší ulcerace, vyšší tělesná teplota, která je známkou progresu infekce, dále přítomnost nízkých hodnot (< 30 mm Hg) transkutánního kyslíku (13, 15, 24, 27). Ischémie zhoršuje hojení redukcí dodávkou kyslíku, živin, solubilních mediátorů, které jsou zapojené v reparačních procesech (6).

V naší studii jsme prokázali, že rezistentní patogeny a zejména klinicky závažné infekce způsobené rezistentními stafylokoky významně ovlivňují incidenci amputací dolních končetin u pacientů se syndromem diabetické nohy. Zjistili jsme signifikantně vyšší výskyt rezistentních patogenů k pe-

rorálním antibiotikům, dále signifikantně vyšší výskyt polyrezistentních stafylokoků a Oxacillin rezistentních gram pozitivních patogenů u amputovaných pacientů v porovnání s neamputovanými pacienty se syndromem diabetické nohy.

Dle našich zkušeností je proto nutné u pacientů se syndromem diabetické nohy provádět stěry z diabetických ulcerací a zjišťovat citlivost patogenů k antibiotikům. Cílená antibiotická terapie je kauzální při léčbě syndromu diabetické nohy hlavně u pacientů s hlubšími diabetickými ulceracemi, které mohou být spojeny s výskytem flegmóny či osteomyelitidy a které nereagují na empirickou léčbu. Při adekvátní antibiotické terapii ve správném dávkování dochází k redukci lokálních a systémových projevů infekce dolních končetin, což vede ke zlepšení hojení diabetických ulcerací (29). Problémem je ovšem nejen rezistence patogenů k různým antibiotikům, ale i průnik antibiotik samotných do tkání dolních končetin zejména při ischémii, ischemické nekróze nebo při edému vzniklého infekcí měkkých tkání (31).

Dalšími faktory, které ovlivňovaly výskyt amputací u pacientů s diabetem v našem souboru, byly ischemická choroba dolních končetin a osteomyelitida. Prokázali jsme signifikantně zvýšený výskyt ischemické choroby dolních končetin a osteomyelitidy u amputovaných pacientů v porovnání s pacienty bez amputací.

Amputacím dolních končetin u pacientů s diabetes mellitus lze zabránit edukací a efektivní léčbou syndromu diabetické nohy (3, 26). Zlepšená péče o dolní končetiny a edukace diabetiků mohou snížit procento amputací až o 50 - 75 % (19, 20, 21). Důležitá z klinického hlediska je hlavně edukace rizikových skupin podiatrických pacientů, zejména pacientů s chronickou renální insuficiencí či po transplantaci (11). Při edukaci rizikových pacientů bylo prokázáno signifikantní snížení rizika rozvoje první diabetické ulcerace (8) a snížení rizika amputací dolních končetin.

Prevencí amputací je konservativní terapie diabetických ulcerací či osteomyelitidy založená na racionální parenterální či orální aplikaci antibiotik (24). Při léčbě diabetických ulcerací antibiotiky je nutné předcházet rozvoji rezistence patogenů. Vhodné je proto léčit antibiotiky spíše hlubší diabetické ulcerace - Wagner 3, 4, 5 (16), volit antibiotika účinná proti zjištěným patogenům a eventuálně včas rozhodnout o parenterální aplikaci antibiotik. Prevencí rozvoje rezistence patogenů k rozličným antibiotikům je omezení používání antibiotik umožňujících přenos rezistentních genů mezi patogeny, dále zabránění vyselektování rezistentních patogenů a zabránění odstranění přirozené mikrobiální flóry (33). K významným epidemiologickým opatřením, která zabraňují např. výskytu rezistentních stafylokoků, patří používání jednorázových pomůcek a materiálu při převazech diabetických ulcerací v oddělených prostorách. Omezení přenosu infekce personálem je umožněno zejména používáním jednorázových rukavic, důslednou ste-

rilizací nástrojů, odstraněním infikovaného odpadu apod.

Závěrem můžeme shrnout, že dle výsledků naší studie nejen známé faktory jako osteomyelitida a ICHDK, ale i přítomnost rezistentních patogenů, zejména rezistentních kmenů stafylokoků, může vést ke zvýšení incidence amputací u pacientů se syndromem diabetické nohy. Proto by pacienti měli

být včas převedeni na parenterální antibiotickou terapii dle citlivosti nalezených patogenů. Problémem však zůstává dlouhodobý klinický efekt této léčby. Proto z našeho hlediska je nejdůležitější prevence rozvoje bakteriální rezistence.

Práce byla podporována grantem IGA MZ ČR NB 5323-3/1999.

Literatura

1. American Diabetes Association: Preventive foot care in people with diabetes. *Diabetes Care*, 22, 1999; Suppl. 1: S54 - S55
2. International Working Group on the Diabetic Foot: International Consensus on the Diabetic Foot, May 1999 - český překlad Jirkovská, A.: Syndrom diabetické nohy, 1. vydání, Galén, Praha, 2000.
3. World Health Organization, International Diabetes Federation. Diabetes Care and research in Europe: The St. Vincent Declaration Action Program. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 1992.
4. Apelqvist, J., Larsson, J.: What is the most effective way to reduce incidence of amputation in the diabetic foot? *Diabetes Metabolism Research Reviews*, 2000; S 16 (1): S75 - S83
5. Armstrong, D. G., Lavery, L. A., Quebedeaux, T. L. et al.: Surgical morbidity and the risk of amputation due to infected puncture wounds in diabetic versus nondiabetic adults. *Journal of the American Podiatric Medical Association*, 87, 1997; 7: 321 - 326
6. Bauer, E. Sumpio, H.: Foot Ulcers. *N. Engl. J. Med.*, 343, 2000; 11: 787 - 793
7. Bild, D. E., Selby, J. V., Sinnock, P. et al.: Lower extremity amputation in people with diabetes: epidemiology and prevention. *Diabetes Care*, 1989; 12: 24 - 31
8. Calle-Pascual, A. L., Duran, A., Benedi, A. et al.: Reduction in Foot Ulcer Incidence; Relation to compliance with a prophylactic foot care program. *Diabetes Care*, 24, 2001; 2: 405 - 407
9. Courvalin, P.: Interpretive reading of in vitro antibiotic susceptibility tests (the antibiogramme). *Clin. Microbiol. Infect.*, 1996; Suppl. 1: S26 - S34
10. Criado, E., De Stefano, A. A., Keagy, B. A. et al.: The course of severe foot infection in patients with diabetes. *Surgery, Gynecology & Obstetrics*, 175, 1992; 2: 135 - 140
11. Dossa, C. D., Shepard, A. D., Amos, A. M. et al.: Results of lower extremity amputations in patients with end-stage renal disease. *J. Vasc. Surg.*, 20, 1994; 1: 14 - 19
12. Fernando, D. J., Hutchison, A., Veves, A. et al.: Risk factors for nonischemic foot ulceration in diabetic nephropathy. *Diabet. Med.*, 1991; 8: 223 - 225
13. Gibbons, G. W., Eliopoulos, G. M.: Infection of the diabetic foot. In Konzak, G. P., Hoar, C. S. J., Rowbotham, J. L. et al., eds.: *Management of Diabetic Foot Problems*. Campbell: London, England, 1984, 97 - 102
14. Gonzales, M. H., Bochar, S., Novotny, J. et al.: Upper extremity infections in patients with diabetes mellitus. *Journal of Hand Surgery - American Volume*, 24, 1999; 4: 682 - 686
15. Grayson, M. L., Gibbons, G. W., Balogh, K. et al.: Probing to bone infected pedal ulcers: a clinical sign of underlying osteomyelitis in diabetic patients. *JAMA*, 1995; 273: 721 - 723
16. Chantelau, E., Tanudjaja, T., Altenhofer, F. et al.: Antibiotic treatment for uncomplicated neuropathic forefoot ulcers in diabetes: a controlled trial. *Diabet. Med.*, 13, 1996; 2: 156 - 159
17. Isenberg, H. D.: Section 1: General. In: Lennette, E. H., Balows, A., Hausler, W. J. et al.: *Manual of Clinical Microbiology*. 4th Edition, American Society for Microbiology, Washington D.C.; 1985, 1 - 99
18. Jirkovská, A., Wosková, V., Bartoš, V. et al.: Význam neinvazivní diagnostiky angiopatie a neuropatie při screeningovém vyšetření syndromu diabetické nohy. *Vnitř. Lék.* 1998; 5: 269 - 273
19. Larsson, J., Apelqvist, J., Agardh, C. D. et al.: Decreasing incidence of major amputation in diabetic patients: a consequence of a multidisciplinary foot care team approach? *Diabet. Med.*, 1995; 12: 770 - 776
20. Litzelman, D. K., Slemenda, C. W., Langefeld, C. D. et al.: Reduction of lower extremity clinical abnormalities in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus: a randomized, controlled trial. *Ann. Intern. Med.*, 1993; 119: 36 - 41
21. Malone, J. M., Snyder, M., Anderson, G. et al.: Prevention of amputation by diabetic education. *Am. J. Surg.*, 1989; 158: 520 - 523
22. Mantey, L., Hill, R. L., Foster, A. V. et al.: Infection of foot ulcers with *Staphylococcus aureus* associated with increased mortality in diabetic patients. *Communicable Disease & Public Health*, 3, 2000; 4: 288 - 290
23. Pell, J. P., Donnan, P. T., Fowkes, F. G. et al.: Quality of life following lower limb amputation for peripheral arterial disease. *Eur. J. Vasc. Surg.*, 1993; 7: 448 - 451
24. Pittet, D., Wyssa, B., Herter-Clavel, C. et al.: Outcome of Diabetic Foot Infections Treated Conservatively; A Retrospective Cohort Study with Long-term Follow-up. *Arch. Intern. Med.*, 1999; 159: 851 - 856
25. Reese, R. E., Betts, R. F.: Antibiotic use. In: Reese, R. E., Betts, R. F. (eds.): *A practical approach to infectious diseases*, 4th ed. Little, Brown and Company; 1996, 1059 - 1395
26. Sanders, L. J.: Diabetes Mellitus: prevention of amputations. *J. Am. Podiatr. Med. Assoc.*, 1994; 84: 322 - 328
27. Sapico, F. L., Canawati, H. N., Witte, J. L. et al.: Quantitative aerobic and anaerobic bacteriology of infected diabetic feet. *J. Clin. Microbiol.*, 1980; 12: 413 - 420
28. Selby, J. V., Zhang, D.: Risk factors for lower extremity amputation in persons with diabetes. *Diabetes Care*, 18, 1995; 4: 509 - 516
29. Sharp, C. S., Bessmen, A. N., Wagner, F. W. et al.: Microbiology of superficial and deep tissues in infected diabetic gangrene. *Surgery, Gynecology & Obstetrics*, 149, 1979; 2: 217 - 219
30. Urbášková, P.: Rezistence bakterií k antibiotikům; Vybrané metody. 1. vyd. Trios, s. r. o., Praha, 1999.
31. Van der Meer, J. W. M., Koopmans, P. P., Lutterman, J. A.: Antibiotic Therapy in Diabetic Foot Infection. *Diabet. Med.*, 1996; 13: S48 - S51
32. Wagner, F. W. jr.: The diabetic foot. *Orthopedics*, 10, 1987; 1: 163 - 172
33. Williams, J. D., Sefton, A. M.: The prevention of antibiotic resistance during treatment. *Infection*, 27, 1999; Suppl. 2: 29 - 31

Došlo do redakce: 4. 10. 2001

Přijato: 14. 11. 2001

MUDr. Vladimíra Fejfarová
Klinika diabetologie Centra diabetologie IKEM
Videňská 1958/9
140 21 Praha 4



**Diabetic Foot Study Group
of the EASD**

**September 7th-9th 2001
Crieff**

**CRIEFF HYDRO HOTEL
CRIEFF (SCOTLAND)**

DIABETIC FOOT STUDY GROUP OF THE EASD

CRIEFF September 7th-9th 2001

43. Association between the presence of resistant pathogens and frequency of amputations in patients with diabetic foot.

V.Fejfarová, A.Jirkovská, P.Bouček, J.Skibová

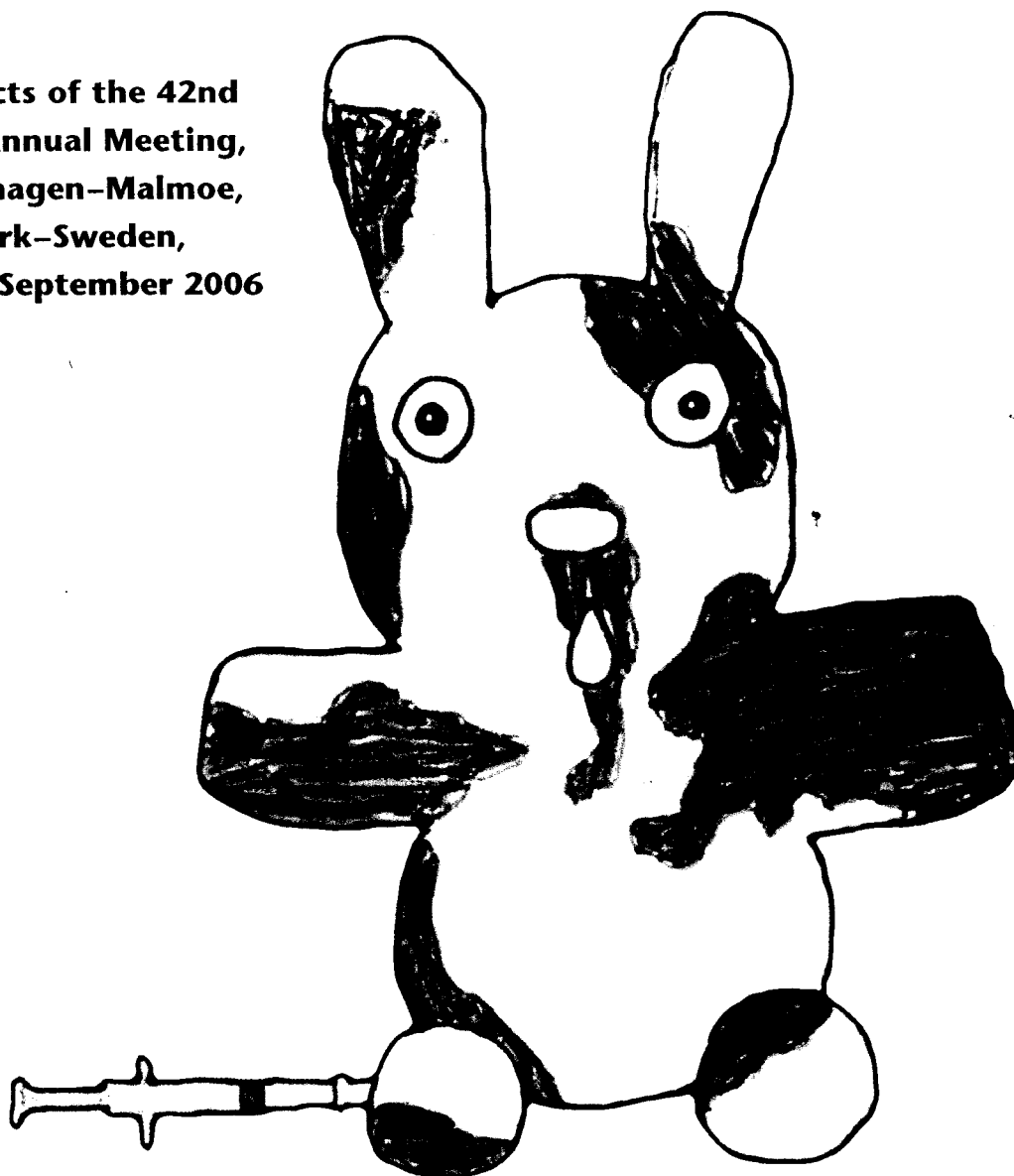
Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech republic

Patients with diabetes mellitus undergo more amputations due to peripheral vascular disease, neuropathy and infection requiring long-lasting antibiotic therapy than non diabetic patients. The aim of our study was to assess the association between the presence of resistant pathogens and the frequency of lower limb amputations. **Methods:** Our retrospective study included 191 diabetic patients consecutively treated for diabetic foot in a foot clinic from 12/1998 to 12/2000. Swabs were obtained from deep tissue after local debridement. Bacterial flora was examined by morphological and biochemical tests; antibiotic resistance was analyzed by disc diffusion susceptibility. The incidence of resistant pathogens (defined as resistance to all oral antibiotics) and especially of resistant *Staphylococcus* species presenting in diabetic foot ulcers and the frequency of new amputations during the study period was determined. Peripheral ischemia was assessed by clinical examination and by non-invasive vascular testing. Diagnosis of osteomyelitis was based on clinical signs, positive bacterial cultures from deep tissue and x-ray changes. **Results:** 50/191 (26%) patients underwent amputation, of whom 44/191 (23%) patients had minor and 6/191 (3%) had major amputations. 53/181 (29%) patients with diabetic foot ulcers had resistant pathogens in their defects. Amputated patients had significantly more resistant microorganisms in swabs from ulcers than patients without amputations (57% vs. 21%, $p < 0.001$). Resistant *Staphylococcus* species were found in 21% (38/181) of all patients. Patients with amputations had significantly more resistant *Staphylococcus* species in comparison with patients without amputations (43% vs. 14%, $p < 0.001$). Significantly higher incidence of peripheral vascular disease (79% vs. 60%, $p < 0.05$) and osteomyelitis (69% vs. 13%, $p < 0.001$) was found in patients with amputations in comparison with patients without amputations. **Conclusions:** The presence of pathogens resistant to all oral antibiotics and especially of the clinically important resistant *Staphylococcus* species was associated with amputations in patients with diabetic foot. *This study was supported by grant IGA No.5223-3 of The Czech Ministry of Health.*

Diabetologia

Journal of the European Association for the Study of Diabetes (EASD)

**Abstracts of the 42nd
EASD Annual Meeting,
Copenhagen–Malmö,
Denmark–Sweden,
14–17 September 2006**



I Dont feel Happy I feel Sad
Trapped in a cage and I cant get out
Is this my life ?

 Springer

The Abstract Volume of the 42nd
Annual Meeting of the Association is
supported by an educational grant from sanofi-aventis



Results: Compared with controls, diabetes caused a mean 27% decrease in epithelial closure rate. The delay in wound closure at day 6 and day 12 (shown in the table) was reversed by topical Propolis. Wound volume did not differ across the groups and the impaired tissue macrophage infiltration in diabetic wounds was not altered by Propolis. In contrast, persistent neutrophil infiltration observed at day 12 in diabetic rats, was abolished by Propolis.

	Epithelial closure (mm/day)	Wound volume (mm ³)	Macrophage (number/field)	Neutrophil (number/field)
Control	0.37±0.05	3.22±0.13	1.49±0.09	0.22±0.19
Diabetic	0.27±0.05*	3.86±0.21	0.25±0.14*	1.33±0.81*
Control +Propolis	0.43±0.06	3.36±0.71	0.89±0.39	0.17±0.17
Diabetic +Propolis	0.34±0.06	3.98±1.25	0.33±0.25*	0.23±0.19

* p<0.05 different from untreated control values

Conclusion: This data indicates for the first time that a single application of Propolis has utility in accelerating ulcer healing rate in diabetes. As neutrophil infiltration is normalised, its mechanism may be through anti-inflammatory actions. This result and the established safety profile of Propolis provide a rationale for studying topical application of this agent in a clinical setting.

Supported by Innovative grant from JDRFI

1128

Prospective randomized controlled study of non-ischaemic diabetic foot ulcers dressed with Hydrofiber® containing ionic silver or calcium alginate dressings

E. Jude¹, J. Apelqvist², M. Spraul³, J. Martini⁴;

¹Department of Diabetic Medicine, Tameside General Hospital, Ashton-Under-Lyne, United Kingdom, ²Department of Endocrinology, Malmo University Hospital, Malmo, Sweden, ³Diabetologie, Mathias Hospital, Rheine, Germany, ⁴Service Diabetologie & Endocrinologie, Hopital de Rangueil, Toulouse, France.

Background and Aims: Diabetic foot ulcers (DFU) risk infection and impaired healing, placing patients at risk of lower extremity amputation. Debridement and dressings are required for DFU care. Hydrofiber® dressings retain more absorbed wound fluid and bacteria than alginate dressings and with ionic silver, persistently kill local pathogens. A prospective, multi-center study compared clinical efficacy and safety of AQUACEL® Hydrofiber® dressings containing ionic silver (AQ*) to those of calcium alginate (CA**)

dressings used within regimens to manage out-patients with Type 1 or 2 diabetes and neuropathic or neuro-ischaemic Wagner Grade 1 or 2 DFU.

Materials and Methods: Patients were randomly assigned to similar protocols including off-loading, AQ or CA primary dressings and secondary foam dressings for 8 weeks or until healing. Assignment was stratified by baseline antibiotic use (Antibiotic) or non-use for the study ulcer, reflecting baseline clinical ulcer-related infection or its risk. Primary efficacy measures were healing outcomes. Safety was measured as adverse events.

Results: AQ and CA groups were comparable at baseline. Both groups improved on all ulcer healing outcomes. The time to healing was 53 days for AQ ulcers and 58 days for CA ulcers. AQ ulcers reduced in depth nearly twice as much as CA ulcers did (2.5 mm versus 1.3 mm; p=0.04). AQ subjects also experienced more overall ulcer improvement and less deterioration (p=0.06), accentuated in the Antibiotic subset (p=0.02). The safety profiles of both groups were similar.

Conclusion: A regimen including AQ significantly outperformed one using CA on ulcer depth reduction. This study reports the first significant clinical effects of a primary wound dressing containing silver on DFU healing.

Product Notations:

*AQ, AQUACEL® Hydrofiber® dressing with 1.2% ionic silver (AQUACEL and Hydrofiber are registered trademarks of E. R. Squibb & Sons, L.L.C., Princeton, NJ, USA)

**CA, Algosterile™ calcium alginate dressing (Algosterile is a trademark of Les Laboratoires Brothier, S.A., Paris-Nanterre, France); DFU, Diabetic foot ulcers

Supported by ConvaTec, a Bristol Myers Squibb company

1129

The association of resistant staphylococcus aureus and the rate of lower limb amputations in patients with the diabetic foot

V. Fejfarová¹, A. Jirkovská¹, J. Skibová¹, V. Petkov²;

¹Diabetes Center, ²Department of Microbiology, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic.

Background and Aims: The progression of infection may contribute to lower limb amputation (LLA) in risk patients with the diabetic foot. Microbial resistance complicates further outpatient treatment of diabetic foot infection and may accelerate the progression of infection leading to amputations even if patients could be treated by i.v. antibiotics during hospitalization. The aim of our study was to assess the association of resistant Staphylococcus

Aureus (*S.Aureus*) and the rate of LLA in patients with the diabetic foot.

Methods: A total of 191 patients with diabetic foot ulcers and positive swab cultivation, whose were treated in our foot clinic from 12/1998 to 11/1999, were consecutively included into our study. The frequency of amputation was observed during a two-year period. Bacterial findings were established by cultivation of swabs taken from diabetic foot ulcers after local debridement. Microbial sensitivity to antibiotics was tested by sets by sets/using panels/batteries of antibiotics composed composed/developed on the basis of previous analysis of resistance at IKEM and by the recommendations of the National Reference Laboratory on Antibiotics. Microbial sensitivity to different types of antibiotics was determined semi- quantitatively by disc diffusion susceptibility¹⁰,(10,Courvalin, 191196; Reese, 1996). The occurrence of *S.Aureus* resistant to betalactam antibiotics was observed. Osteomyelitis (OM) was diagnosed by X-ray and laboratory markers of infection. Peripheral arterial disease (PAD) was detected by non-invasive methods (Doppler indexes<0.8, TcPO₂ <30 mmHg) or angiography. Surgeons indicated LLA, if acute progression of infection or ischemia developed in the study patients.

Results: 50 patients (26%) underwent LLA (50/191; 44 patients had minor and 6 patients had major LLA) and 141 patients (74%) had no LLA during the observed period. 16.5% of all diabetic patients were shown to have resistant *S.Aureus*. Moreover, a higher occurrence of this pathogen was found in swabs of amputees*before LLA compared with patients not undergoing LLA (33% and 11%); $p<0.001$. Based on Stepwise Logistic Regression, resistant *S.Aureus* (OR 4.34; CI 1.6–12.1), together with other factors such as OM (OR 15.4; CI 6.2–38.0) and PAD (OR 3.21; 1.1–9.2) were independent important risk factors associated with the rate of LLA. In addition, resistant *S. Aureus* was significantly associated with LLA especially in patients without OM ($p=0.003$; OR 7.1).

We conclude that not only OM and PAD but also the presence of *S.Aureus* resistant to betalactams micro may species could increase the incidence of LLA in patients with the diabetic foot, particularly those without OM.

Supported by MZO 00023001

1130

Change in bacteriological analysis and in susceptibility to antimicrobial agents in diabetic foot infections

M. C. Collina¹, D. Pitocco¹, L. Mancini¹, T. Musella¹, A. Manto¹, F. Zaccardi¹, C. Fabiano¹, M. Galli², S. Caputo¹, G. Ghirlanda¹;

¹Internal Medicine, ²Orthopedics, Catholic University, Rome, Italy.

Background: Infection is the primary problem requiring hospital admission of the patients with diabetic foot and is the main reason of amputation. Aim of this study is to perform a bacteriologic analysis on lesions of diabetic outpatients with foot infections in order to characterize the pathogens more frequent, the variability of their prevalence in ten years (from 1995 to 2005) and to test their susceptibility to antimicrobial agents commonly used.

Methods: Were analyzed 100 cultures taken from the following sources: ulcers, abscesses, cutaneous bullae, bone or soft tissue specimens. They were placed in sterile transport containers Portagerm (Bio-Merieux) and promptly delivered to the clinical microbiology laboratory and were processed aerobically and anaerobically

Results: *Staphylococcus aureus* showed the highest prevalence (50%) and this was significantly increased compared to the prevalence observed ten years before (20.6%). *Pseudomonas aeruginosa* showed the same trend with a prevalence of 23.2% against 8.7% at the first observation. The prevalence of streptococci show a not significant decrease (18.7% vs 21%). Furthermore we found a significant increase of polymicrobial infections (56.2 vs 48.6%) Regarding the susceptibility to the antimicrobial agents tested teicoplanin, vancomycin, linezolid and cotrimoxazol showed a 100% of susceptibility against *staphylococcus aureus* infection but teicoplanin had a lower MIC (<1,4). Ciprofloxacin with a percentage of 80% seems to be the most active against gram-negative. Imipenem showed the higher appearance of resistance, it was active only in 50% of infections

Conclusion: This study show that in 10 years there is a change in the prevalence of pathogens and in their susceptibility to antimicrobial agents with a significant increase of polymicrobial infections linked to the appearance of multiresistant pathogens as *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. Furthermore teicoplanin seems to be an anti-microbial agent of first choice in the treatment of *Staphylococcus aureus* infections.

PS 100

Glycation and advanced glycation endproducts

1131

Cellular events and signaling pathways activated by AGE-albumin interaction with the aortic endothelium

L.-D. Popov, M. Simionescu;

Vascular Dysfunction in Diabetes, Institute of Cellular Biology and Pathology "N. Simionescu", Bucharest, Romania.



V. MEETING OF THE

DFSG

(Diabetic Foot Study Group of the EASD)

7.-10. SEPTEMBER 2005
Simantro Beach Hotel, Kassandra,
Chalkidiki, Greece

Is there any difference between microscopic and culture mycotic findings from hyperkeratosis and diabetic foot ulcers?

V. Fejfarová, A. Jirkovská, R. Bém, I. Mašová, J. Skibová

Diabetes Center, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic

Mycosis may influence development of ulcers in patients with the diabetic foot; however mycotic diagnostic procedure could be a problem. The **aims** of our study were to compare microscopic and culture mycotic findings taken from hyperkeratosis and ulcers in patients with the diabetic foot. **Methods:** Twenty patients with predominantly Type 2 diabetes mellitus (mean age 59 ± 7.6 years, diabetes duration 12.8 ± 10.3 years, HbA1c $5.5 \pm 2\%$, BMI $30.4 \pm 4 \text{ kg.m}^2$), whose were consecutively treated in foot clinic for chronic diabetic foot ulcers from 11-12/2004, were included into our study. Exclusion criteria were peripheral arterial disease, detected immunodeficit, and organ transplantation. Samples from hyperkeratosis and ulcers were taken to determine mycotic agents. Mycotic microscopic findings were determined by immunofluorescent microscopy with blanchophor, mycotic cultures were performed on Sabouraud agar with chloramphenicol to suppress bacterial growth. Sabouraud agar with chloramphenicol and cycloheximid was used for suppression of saprophytic flora growth; this method is designated for dermatophytes determinations. We compared match of microscopic and culture mycotic examinations performed in samples taken from hyperkeratosis and by the same way from foot ulcers in the same patient. Finally, matches of microscopic and culture mycotic findings from hyperkeratosis and ulcers were compared. **Results:** There was no significant match of microscopic and culture mycotic findings performed from both hyperkeratosis (95%CI=0.33-0.77; NS) and foot ulcers (95%CI=0.13-0.57; NS). Mycotic culture agents found in ulcers were different from those found in hyperkeratosis in the same patient; there was no significant match in both findings (NS). Positive microscopic mycotic findings were present in 19/20 (95%) and 20/20 (100%) patients from hyperkeratosis and foot ulcers, respectively. The most frequent mycotic agents microscopically determined both from hyperkeratosis and ulcers were candides (95% and 100%, respectively) and septate fibres (25% and 40%, respectively). Positive mycotic cultures were found in 10/20 (50%) patients in hyperkeratosis and only in 7/20 (35%) patients in ulcers. The most frequent mycotic agents detected by cultures as from hyperkeratosis as from neuropathic ulcers were candides (40% and 71%, respectively) and dermatophytes (30% and 43%, respectively). **In conclusion:** Based on our data, there is no agreement of microscopic and culture mycotic findings performed as from hyperkeratosis as from ulcers. Moreover mycotic culture agents found in ulcers differed from those detected in hyperkeratosis in the same patient. It is recommended to perform mycotic culture from both hyperkeratosis and ulcers in patient with the diabetic foot to plan optimal treatment.

This study was supported by the Institute for Clinical and Experimental Medicine (MZO 00023001).

DIABETOLOGIE
METABOLISMUS
ENDOKRINOLOGIE
VÝŽIVA

ČASOPIS PRO POSTGRADUÁLNÍ VZDĚLÁVÁNÍ

ROČNÍK 9 • SUPPLEMENTUM 2 • 2006

XLII. DIABETOLOGICKÉ DNY

Luhačovice, 20. - 22. dubna 2006

ABSTRAKTA

Ciel: Endoteliální dysfunkce patří mezi časné komplikace obezity a diabetu. Jedním z možných etiopatogenetických projojení těchto nemocí je porušená endokrinní funkce tukové tkáně. Cílem naší práce bylo zjistit vliv nízkokalorické diety (VLCD) na vybrané cirkulující parametry endoteliální dysfunkce u obézních žen a posoudit úlohu adipocytárních hormonů adiponektinu a rezistinu v tomto procesu.

Metody: Sérové koncentrace E-selektinu, sICAM-1, sVCAM-1, PAI-1, matrix metalloproteázy-9 (MMP-9), myeloperoxidázy (MPO), adiponektinu a rezistinu byly měřeny pomocí Lincoplex a ELISA kitů u dvanácti obézních žen (BMI 45,7 ± 6,7 kg/m²) před a po třítydenní nízkokalorické dietě (VLCD) a u dvanácti zdravých štíhlých žen (BMI 24 ± 4,3 kg/m²) odpovídajících věku.

Výsledky: BMI a sérové koncentrace E-selektinu, sICAM-1, PAI-1 a rezistinu byly signifikantně vyšší u skupiny obézních žen před VLCD než u kontrolní skupiny (23,74 ± 10,81 vs. 9,13 ± 4,7 ng/ml, 138,3 ± 71,99 vs. 77,79 ± 28,6 ng/ml, 42,87 ± 14,76 vs. 32,45 ± 6,23 ng/ml, 6,48 ± 2,42 vs. 4,26 ± 1,26, 45,7 ± 6,7 vs. 24 ± 4,3, p < 0,05). Sérové koncentrace adiponektinu byly naopak signifikantně nižší u skupiny obézních žen ve srovnání s kontrolní skupinou (14,23 ± 4,91 vs. 21,64 ± 9,42). Vlivem VLCD došlo k signifikantnímu poklesu BMI a E-selektinu, současně bylo zaznamenáno snížení hladiny celkového cholesterolu a nárůst hladiny HDL. Nebyl prokázán významný rozdíl sérových koncentrací VCAM-1, MPO a MMP-9 mezi skupinou obézních žen a skupinou zdravých kontrol ani ovlivnění hladin těchto parametrů VLCD. Stejně tak nebyly nízkokalorickou dietou ovlivněny koncentrace adiponektinu a rezistinu.

Závěr: Naše studie ukazuje, že i krátkodobá dietní intervence může pozitivně ovlivnit některé cirkulující parametry endoteliální dysfunkce. Toto ovlivnění není zprostředkováno změnami hladin adipocytárních hormonů adiponektinu a rezistinu.

Podporováno grantem 8302-5, 7782-4 a VZ MZČR 64165

17.

HYPERGLYKEMIE PRI KONTINUÁLNO MONTOROVANÍ GLUKÓZY, ICH HODNOTENIE A DIFERENCIÁLNA DIAGNOSTIKA

V. Doničová¹, M. Pallayová², V. Donič²

¹Interná a diabetologická ambulancia Košice

²Ústav fyziológie LF UPJŠ Košice

Pozadie problému: Zvýšené hodnoty glykemií namerané glukometrom neodrkadľujú ich skutočné vzostupy a trvanie. Metóda kontinuálneho monitorovania glukózy (CGMS) umožňuje odkryť glukometrom nepoznané vzostupy glykemií a zároveň dovoľuje vypočítaním plochy pod krivkou (AUC) kvantifikovať ich rozsah. Pri diferenciálnej diagnostike sa stretávame najčastejšie s hyperglykemiami zapríčinenými nedostatočným inzulínovým krytím sacharidov, posthypoglykemickou hyperglykemiou zapríčinenou rebound fenoménom, alebo nadmernou dávkou korekčných sacharidov. Ďalej stresovou hyperglykemiou, Dawn fenoménom a Somogyiho fenoménom. Pritom pre správnu liečbu je dôležité poznať príčinu a rozsah hyperglykemie. Ciel: Analýzou CGMS glykemických kriviek zistiť výskyt hyperglykemií, vyhodnotiť ich príčinu, vzťah k hypoglykemiám, ich cirkadiánne rozloženie a trvanie. Vyhodnotiť prínos CGMS pri úprave liečby posúdením zmeny HbA1c.

Pacienti a metódy: 43 zle kompenzovaných diabetikov (Øvek ± SD: 23,47 ± 11,33r.; ØHbA1c 8,91 ± 0,88% na intenzifikovanej inzulínovej liečbe (IIT) sme vyšetrili metódou CGMS (Ø trvania 97,67 ± 28,44h). Pacienti si viedli záznam o prijíme potravy, inzulínu, fyzickej aktivite, strese a príznakoch hypoglykemie. Získané údaje sme komplexne vyhodnotili, identifikovali

hyperglykemie (> 7,8mmol/l trvajúca > 10 min) a hypoglykemie (< 3,5mmol/l trvajúca > 10 min) a číselne vyhodnotili: počet hyperglykemií, ich trvanie, časové rozloženie, stupeň a návaznosť na hypoglykemie. Porovnali sme HbA1c pred a po 3 mesačnej liečbe modifikovanej na základe CGMS.

Výsledky: Pomocou CGMS sme získali 51 390 hodnôt glukózy u 43 pacientov. Z celkovej dĺžky monitorovania 4294,14 hodín pacienti strávili 1666 hodín v hyperglykémii (38,8 % času). Celkové trvanie hyperglykemie počas dňa (od 7-22. hodiny) tvorilo 33,7 % z denného monitorovania (5,5 hod/pac/deň), ale nočná hyperglykemia predstavovala až 49,8% z nočného 9hodinového monitorovania (4hod/pac/noc). Počet hyper- a hypoglykemických exkurzií bol 10406 (Ø242/pacient). Z nich počet hyperglykemií predstavoval 9761. Z toho bolo počas dňa 23 % a počas noci 15,8 %. Najviac denných hyperglykemií sa vyskytlo medzi 7. a 10. hod (18,2 %) a medzi 13. a 16. hod (15,9 %). Viac ako 85 % denných hyperglykemií bolo > 10 mmol/l, takmer 30 % hyperglykemií bolo > 15 mmol/l.

Najčastejšou príčinou hyperglykemií bola diétna chyba a nedodržanie časového odstupu podania inzulínu pred jedlom. 75 % posthypoglykemických hyperglykemií (> 15 mmol/l) bolo zapríčinených „nadlečením“ hypoglykemie a 20 % posthypoglykemických hyperglykemií „rebound“ efektom. U 4 pacientov sme zachytili Dawn fenomén. Po 3 mesiacoch od realizácie CGMS a úprave liečby klesol HbA1c z 9,56 % ± 1,48 na 8,86 % ± 1,38 (p=0,021).

Záver: V našom súbore 43 pacientov najčastejšou príčinou hyperglykemie bola diétna chyba a nedodržanie časového odstupu podania inzulínu pred jedlom a pri posthypoglykemických hyperglykemiách nadmerná dávka korekčných sacharidov. Počet hyperglykemií počas noci bol nižší, ale trvali až 50 % času spánku. „Stresová“ hyperglykemia mala tendenciu vracat sa k norme aj bez korekcie inzulínom. Každé meranie CGMS malo význam pre jednotlivého pacienta pri zmene jeho liečby, čo viedlo k signifikantnému poklesu HbA1c v celej skupine zle kompenzovaných diabetických pacientov.

18.

MYKOTICKÉ INFEKCE U PACIENTŮ SE SYNDROMEM DIABETICKÉ NOHY

V. Fejfarová, A. Jirkovská, R. Bém, M. Křížová, V. Šindelářová, I. Mášová, J. Skibová

Centrum diabetologie, IKEM, Praha

Mykotická agens mohou přispět ke vzniku diabetických ulcerací a mohou zpomalit proces jejich hojení. V literatuře existuje málo údajů týkajících se výskytu mykotických agens v diabetických ulceracích. Cílem naší studie bylo porovnat výskyt mykotických agens z oblasti hyperkeratóz a spodiny ulcerace, zjistit shodu mikroskopických a kultivačních vyšetření mykóz a porovnat kultivační mykotické nálezy z hyperkeratóz a spodin ulcerací. Metody: Do studie bylo zařazeno 27 pacientů s diabetickými ulceracemi stupně Wagner 2-3 (průměrný věk 58,1 ± 7,6 let, trvání diabetu 14,6 ± 10,5 let, průměrný HbA1c 6,1 ± 2,1% a BMI 30,3 ± 3,8 kg.m-2), kteří byli léčeni v podiatrické ambulanci IKEM v období 11/2004-5/2005. Při vstupu do studie byly odebrány od všech pacientů vzorky tkání z hyperkeratóz a spodiny ulcerace po lokálním debridementu. Mykózy byly mikroskopicky vyšetřeny pomocí imunofluorescence s blankoforem. Kultivace mykotických agens byly provedeny na Sabouraudově agaru s chloramfenikolem a cykloheximidem. Výsledky: Při statistickém zhodnocení mikroskopických a kultivačních nálezů si výsledky obou metod vzájemně neodpovídaly (p < 0,001). Kultivačně byly pozitivní vzorky přítomny u 48 % (13/27) hyperkeratóz a u 28 % (7/25) spodin ulcerací. Nejčastějšími kultivačně nalezenými agens byly jak

v hyperkeratózách, tak na spodině ulcerace *Candida* sp. (19 % a 24 %, respektive) a *Dermatophytes* sp (22 % a 12 %, respektive). Podobné nálezy byly zachyceny i s odstupem 1 měsíce. Nebyla nalezena signifikantní konkordance kulturačních nálezů z hyperkeratóz a ze spodiny ulcerace (95%CI=0,37-0,75;NS) u téhož pacienta. Závěrem lze shrnout, že jsme nezjistili shodné mykotické nálezy při mikroskopickém a kulturačním vyšetření ani shodné nálezy kultivací ze vzorků hyperkeratóz a spodiny ulcerací u téhož pacienta. Pro další terapeutický postup je proto vhodné hodnotit kulturační nálezy jak ze vzorků z hyperkeratóz, tak ze vzorků odebraných ze spodiny ulcerace.

Tato studie byl podporována grantem IKEM (MZO 00023001).

19. POLYMORFISMY GENŮ PRO ANTIOXIDAČNÍ ENZYMY PŘI DIABETES MELLITUS

M. Flekač, J. Škrha, J. Hilgertová, Z. Lacinová
3. interní klinika 1. LF UK a VFN v Praze

Úvod: Oxidační stres je jedním z patofyziologických pochodů, které jsou zapojeny do vzniku a rozvoje cévních komplikací. Významnou úlohu zde hrají antioxidační enzymy, jejichž geny jsou považovány za jedny z mnoha kandidátních genů pro rozvoj cévních komplikací diabetu. Cílem asociační retrospektivní studie případů a kontrol bylo dokázat vztah mezi mutacemi genů pro vybrané enzymy a diabetes mellitus a cévními komplikacemi. Sledovány byly paraoxonáza (PON1), superoxidismutázy (SOD1, SOD2) a kataláza (CAT).

Metodika: Do studie byli zařazeni nemocní s diagnózou DM 1. i 2. typu (dle WHO) z Diabetologického centra 3. interní kliniky v celkovém počtu 256 osob (63 DM 1. typu, 193 DM 2. typu, 178 DM bez diabetické angiopatie, 78 se diagnostikovanou angiopatií). Doba od stanovení diagnózy DM byla 13±7 let, věk 52±8 let, glykemie nalačno 9,6±2,8 mmol/l, HbA1c 7,1±1,5 %. Druhou skupinou byly zdravé kontroly v počtu 110 (věk 41±9 let, glykemie nalačno 4,85±0,56). Materiál byl získán odběrem periferní krve, určené k izolaci DNA z plně krve pomocí DNA izolátoru, následně byla provedena PCR a restrikční analýza. Fragmenty byly po elektroforetické separaci vizualizovány UV kamerou barvením etidium bromidem. Zároveň bylo získáno sérum ke spektrofotometrickému stanovení enzymové aktivity.

Výsledky: Sérová PON1 aktivita byla signifikantně nižší ve skupině s DM (114,8 nmol/min/ml séra (23,0-290,8)) v porovnání se zdravými jednotlivci (192,6 nmol/min/ml séra (80,1-414,5)), $P<0,05$, přičemž nebyl statisticky signifikantní rozdíl mezi DM 1. a 2. typu a diabetiky s/ bez cévních komplikací. Dále byla zjištěna asociace mezi genotypem PON1 v pozici L55M a Q192R a sérovou aktivitou PON1 u zdravých i diabetiků (vysoká u LL, nízká u MM v pozici 55 a vysoká u RR, nízká u QQ v pozici 192 genu pro PON1). Byly zjištěny statisticky signifikantní rozdíly v zastoupení jednotlivých alel kódující oblasti PON1 genu (nikoli promotorové) mezi zdravými a diabetiky a v kódující oblasti genu SOD2 ($P<0,05$), nikoli SOD1 a CAT. Dále bylo zjištěno, že u diabetiků 2. typu byla horší kontrola diabetu (posuzovaná dle HbA1c) asociována s genotypem MM v pozici 55 PON1 (tedy i nízkou PON1 aktivitou) a QQ v pozici 192 PON1, podobná zjištění nebyla nalezena u SOD ani CAT.

Závěr: Uvedené výsledky dokládají, že redoxní imbalance nalézáná u pacientů s diabetes mellitus, je kromě zvýšené produkce ROS (při hyperglykemii, hyperinzulinemii a zvýšené hladině volných mastných kyselin) také výsledkem snížené schopnosti některých komponent antioxidační obrany organismu (PON1), která může být geneticky determinována a být

jednou z příčin zodpovědných za neuspokojivou kompenzaci choroby a rozvoj cévních komplikací.

Práce byla podpořena VZ: MSM0021620807.

20. SPECIFICKÝ ZPŮSOB ZOBRAZENÍ INTRAHEPATÁLNĚ TRANSPLANTOVANÝCH PANKREATICKÝCH OSTRŮVKŮ

P. Girman, J. Kříž, Z. Berková, *D. Jiráček, E. Dovolilová, T. Koblas, K. Zacharová, *M. Hájek, F. Saudek

Laboratoř Langerhansových ostrůvků, Centrum diabetologie IKEM, Praha.

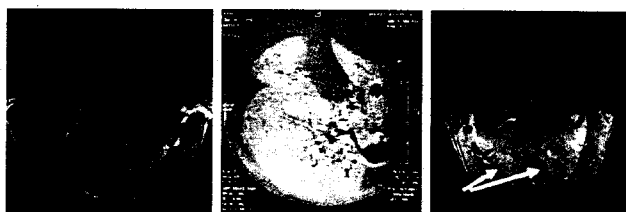
*Oddělení experimentální magnetické rezonance, IKEM, Praha

Úvod: Značení pankreatických ostrůvků superparamagnetickou látkou představuje dosud jediný efektivní způsob, jak neinvazivně zobrazit transplantované ostrůvky pomocí magnetické rezonance. Relativní nevýhodou zůstává delší kulturační doba a nízká specifita metodiky. Cílem práce bylo navrhnout alternativní způsob značení ostrůvků a zobrazit takto označené ostrůvky pomocí magnetické rezonance v podmínkách in vivo a in vitro.

Metodika: Tisíc vysoce purifikovaných ostrůvků získaných z potkana kmene Lewis bylo kultivováno s primární myší protilátkou proti nepolymorfni determinantě potkaních MHC antigenů 1. třídy (mouse IgG1 anti-rat RT1A antibody) v kulturačním médiu CMRL 1066 po dobu 1 hodiny a poté další hodinu v médiu obsahující paramagnetické mikročástice potažené protilátkou proti myšimu imunoglobulinu (rat anti-mouse IgG1 antibody). Takto označené ostrůvky byly transplantovány standardní technikou do portálního řečiště. Jako příjemce jsme použili syngenní potkany kmene Lewis s úmyslem vyloučit odhojení ostrůvků. V in vitro podmínkách byla játra příjemců do 5 min od transplantace explantována a vyšetřena pomocí magnetické rezonance ($n=5$). V kontrolní skupině byla vyšetřena játra zdravých zvířat ($n=4$). Příjemci v in vivo experimentu byly rozděleny do 2 skupin. První skupinu tvořila zdravá zvířata s transplantovanými neznačenými ostrůvkami ($n=6$). Potkanům ve druhé byly transplantovány ostrůvky značené paramagnetickými částicemi Dynabeads ($n=8$). MR vyšetření bylo provedeno na přístroji 4.7 T Bruker Biospec, příjemci byli vyšetřováni 1x týdně po dobu 6 týdnů. Zobrazení bylo provedeno pomocí gradientové echo sekvence, v osmi řezech o tloušťce 2 mm a rozlišení 256x256 pixelů.

Výsledky: Nativní ostrůvky nebylo možné odlišit od jaterní tkáně při in vivo experimentech obr. 1. Značené ostrůvky se zobrazily jako hypointenzivní plochy o velikosti 0.1-3 mm² difuzně v celých játrech, a to jak při in vitro (obr. 2), tak při in vivo experimentu (obr. 3).

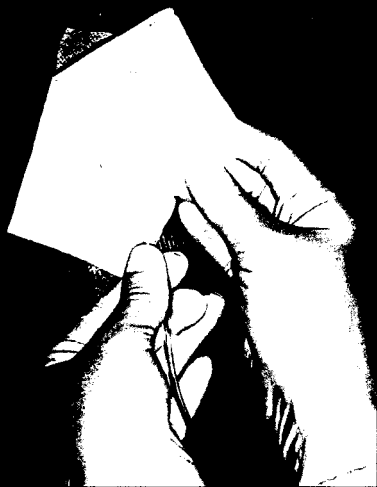
Obr. 1, 2 a 3



Závěr: Navržená metodika značení ostrůvků paramagnetickými mikročásticemi představuje více specifickou alternativu značení poskytující stejně kvalitní obraz při výrazně kratší době kultivace. K ověření metabolického efektu paramagnetických částic bude nutno doplnit stimulační testy a testy na diabetických zvířatech. Potencionální nevýhodou zůstává relativně větší rozměr částic a použití cizorodé bílkoviny.

LÉČBA RÁNY

Ivo Bureš, pořadatel



GALÉN



16. WAGNER, FW. *Orthopedic Rehabilitation of the Divascular Limb-Orthop.* Clin North Amer, 1978, 9, p. 325-349.
17. WHO/IDF Europe. *Diabetes Care and Researching Europe - the Saint Vincent Declaration.* Diab Med, 1990, 7, p. 360-362.
18. YOUNG, MJ., VEVES, A., BOULTON, AJM. *The Diabetic Foot: Aetiopathogenesis and Management.* Diab Metab Rew, 1993, 9, p. 109-127.

(dominikadiamantova@seznam.cz)

Ilustrační foto z archivu Vojenské nemocnice Olomouc



BAKTERIÁLNÍ A MYKOTICKÉ INFEKCE U PACIENTŮ SE SYNDROMEM DIABETICKÉ NOHY

MUDr. Vladimíra Fejfarová, doc. MUDr. Alexandra Jirkovská, CSc.
Centrum diabetologie, IKEM, Praha

U diabetických pacientů, kteří jsou léčeni pro syndrom diabetické nohy, se setkáváme s ulceracemi nebo s destrukcí tkání nohou spojenou s neuropatií a s různým stupněm ischemie. Velmi často je součástí syndromu diabetické nohy infekce,⁽¹⁾ která může v krajních případech vést až k hospitalizaci pacienta.⁽²⁾ Nejčastějšími důvody hospitalizací jsou flegmóna dolní končetiny (DK), progresivní infekce, vedoucí k rozvoji hluboké ulcerace, která je často spojena s osteomyelitidou, a vlhká gangréna nebo septický stav.

Infekce ovlivňuje zejména lokální nález na DK. Septické tromby jsou schopny poškodit průtok periferními cévami a vést tak k tkáňové ischemii. Vlivem infekce dále dochází k otoku periferních tkání, který následně způsobí mechanickou kompresi mikrocirkulace.⁽³⁾ Z uvedených důvodů je nutné začít léčbu pacientů se syndromem diabetické nohy vždy včas a razantně, abychom předešli ohrožení DK a v některých případech i ohrožení života, zejména u rizikových skupin pacientů (transplantovaní, dialyzovaní).

Infekce a ulcerace (obr. 1)

V diabetických ulceracích je velmi často přítomen větší počet patogenů ve srovnání s nediabetickými ranami.⁽⁴⁻⁶⁾ Doposud nebyly provedeny studie zkoumající výskyt patogenů v diabetických ulceracích u rizikové populace nemocných, a proto jsme uskutečnili studii, která se pokusila stanovit rozdíly ve výskytu jednotlivých mikrobiálních agens a určit rozdíly v jejich antibiotické rezistenci mezi transplantovanými, dialyzovanými a ostatními pacienty se syndromem diabetické nohy.⁽⁷⁾

Do studie bylo zařazeno 21 transplantovaných, 22 dialyzovaných pacientů a 164 ostatních nemocných se syndromem diabetické nohy. V naší studii nebyly mezi sledovanými skupinami nalezeny významné rozdíly v průměrném počtu patogenů na 1 pacienta. Signifikantně vyšší počet grampozitivních patogenů se vyskytoval ve skupině dialyzovaných nemocných v porovnání s transplantovanými a ostatními pacienty

se syndromem diabetické nohy (80 % vs 62 % vs 63 %, respektive $p < 0,05$). Převážná většina patogenů patřila do skupiny grampozitivních mikroorganismů, z nichž byly nejčastěji přítomny *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus koaguláza* negativní a skupina enterokoků (celkově 53–73 % patogenů). V menším procentu byly nalezeny gramnegativní agens zastoupené převážně *Escherichia coli*, klebsiellami a pseudomonádami (celkově 16–20 %).⁽⁷⁾

Blíže byla specifikována i citlivost bakterií k jednotlivým typům antibiotik. Mikroorganismy izolované u transplantovaných pacientů byly rezistentnější ke všem antibiotikům (zejména k oxacilinu, ampicilinu, imipenemu, piperacilinu, timentinu, cotrimoxazolu a erythromycinu) v porovnání s ostatními skupinami. Ve všech skupinách zůstávala většina patogenů citlivá k vancomycinu. Na základě našich výsledků nedoporučujeme u transplantovaných nemocných se syndromem diabetické nohy zmíněná antibiotika používat. Vhodnými léky jsou spíše chinolony nebo ticarcilin/klavulanát vzhledem k dobré citlivosti mikroorganismů k těmto látkám. Vancomycin zůstává lékem volby u těžkých septických stavů.⁽⁷⁾

Infekce a amputace

Vyšší výskyt amputací u pacientů se syndromem diabetické nohy v porovnání s nediabetiky je způsoben vyšším výskytem periferní neuropatie a ischemické choroby DK.^(8–10) Mezi nejrizikovější faktory amputací DK řadíme infekci rány^(11–13) a ischemickou chorobu DK.⁽¹⁴⁾

Ambulantně léčíme pacienty s infikovanými ulceracemi perorálními antibiotiky v monoterapii nebo pomocí jejich dvojkombinace. Rezistence mikroorganismů může vést k omezení preskripce, a tím k omezení možnosti ambulantní léčby pacienta.



Obr. 1. Flegmóna pravé dolní končetiny u pacienta se syndromem diabetické nohy

V další studii jsme se snažili retrospektivně zhodnotit vztah mezi přítomností rezistentních patogenů k perorálním antibiotikům a incidencí amputací DK u pacientů se syndromem diabetické nohy.⁽¹⁵⁾

Ze 191 nemocných zařazených do studie podstoupilo amputaci DK 50 pacientů se syndromem diabetické nohy (26 %). 88 % z nich mělo nízkou amputaci a 12 % nemocných absolvovalo vysokou amputaci. Signifikantně více rezistentních patogenů bylo nalezeno u amputovaných pacientů (57 %) v porovnání s pacienty bez amputace (21 %; $p < 0,001$). Zvýšená frekvence amputací DK byla signifikantně spojena s výskytem osteomyelitidy a ischemické choroby DK. Přítomnost rezistentních patogenů k perorálním antibiotikům zvyšovala téměř šestkrát počet amputací DK (koeficient 1,72, odds ratio 5,58).⁽¹⁵⁾

Infekce a mykózy (obr. 2)

Infekce může být způsobena různými patogeny, mezi něž řadíme jak grampozitivní, gramnegativní bakterie, anaeroby, tak i mykotické agens. U pacientů se syndromem diabetické nohy se poměrně často setkáváme s přítomností tinea pedis a onychomykózy. Tato spíše kožní onemocnění jsou nejčastěji způsobena dermatofytem *Trichophyton rubrum*,⁽¹⁶⁾ kandidami⁽¹⁷⁾ a *Microsporium* sp.⁽¹⁸⁾ Infekce, která je způsobena mykotickými agens, může však přispět také k rozvoji diabetických ulcerací. V literatuře existuje poměrně málo dat, která by zkoumala výskyt infekce způsobené mykotickými agens u pacientů se syndromem diabetické nohy. Z tohoto důvodu jsme se v naší studii snažili zkoumat výskyt mykotických agens v diabetických ulceracích a porovnat jejich mikroskopické a kulturační nálezy z tkáňových vzorků odebraných z hyperkeratóz a spodiny diabetických ulcerací u pacientů se syndromem diabetické nohy.⁽¹⁹⁾

Ve studii byly u každého pacienta porovnány mikroskopické a kulturační nálezy z hyperkeratózy a spodiny neuropatické ulcerace. V naší studii nebyly nalezeny signifikantní shody mikroskopických a kulturačních nálezů ze vzorků odebraných jak z hyperkeratóz, tak ze spodiny



Obr. 2. Mykotické změny u pacienta se syndromem diabetické nohy



neuropatických ulcerací. Zajímavým zjištěním byl pozitivní mykotický mikroskopický nálezy až u 95 % pacientů z oblasti hyperkeratóz a u 100 % nemocných z oblasti spodiny ulcerace. Nejčastějšími mikroskopickými nálezy byly kandidy (95–100 %) a septovaná vlákna (25–40 %).

U stejného pacienta byly často kultivačně nalezeny odlišné mykotické agens v hyperkeratózách a na spodině neuropatické ulcerace. V obou nálezech nebyla nalezena signifikantní shoda.

Positivní mykotické kultivační nálezy byly přítomny u 50 % pacientů z oblasti hyperkeratóz a pouze u 35 % nemocných z oblasti spodiny neuropatické ulcerace.

Nejčastějšími kultivačními mykotickými agens byly kandidy (40 až 71 %) a dermatofyta (30–43 %). Jak mikroskopické, tak kultivační mykotické nálezy nekorelovaly signifikantně s typem léčby diabetu, mikrobiálními nálezy a léčbou antibiotiky.⁽¹⁹⁾

Závěr

Závěrem lze shrnout, že na základě provedených studií je vhodné promptně zjistit u pacientů se syndromem diabetické nohy původ infekčních komplikací, ať již bakteriální či mykotické etiologie. Podle nalezených agens a jejich zjištěné citlivosti k antibiotikům či antimykotikům můžeme u pacientů se syndromem diabetické nohy včas zahájit kauzální terapii infekčních komplikací.

(Studie byly podpořeny výzkumným záměrem MZO: 00023001)

Literatura

1. Mezinárodní skupina pro syndrom diabetické nohy. *Syndrom diabetické nohy. Mezinárodní konsensus*. Praha : Galén, 2000.
2. URBANCIC-ROVAN, V., GUBINA, M. *Bacteria in superficial diabetic foot ulcers (Letter)*. *Diabetic Med*, 2000, 17, p. 814–815.
3. JIRKOVSKÁ, A. Diabetická noha. In BARTOŠ, V., PELIKÁNOVÁ, T. (Eds), *Praktická diabetologie*. 2. vyd. Praha : Maxdorf, 2000, s. 305–325.
4. HUNT, JA. *Foot infection in diabetes is rarely due to a single microorganism*. *Diabetic Med*, 1992, 9, p. 749–752.
5. WHEAT, LJ., ALLEN, SD., HENRY, M., et al. *The diabetic foot infections: Bacteriologic Analysis*. *Arch Intern Med*, 1986, 146, p. 1935–1940.
6. LAVERY, LA., WALKER, SC., HARKLESS, LB., et al. *Infected Puncture Wounds in Diabetic and Nondiabetic Adults*. *Diabetes Care*, 1995, 18, p. 1588–1591.



7. CRIADO, E., DE STEFANO, AA., KEAGY, BA., et al. *The course of severe foot infection in patients with diabetes*. *Surgery, Gynecology & Obstetrics*, 1992, 175, p. 135–140.
8. International Working Group on the The diabetic foot. *The diabetic foot Infections*. In *International Consensus on the Diabetic*. 1999, p. 55–60.
9. FEJFAROVÁ, V., JIRKOVSKÁ, A., PETKOV, V., et al. *Comparison of microbial findings and resistance to antibiotics between transplant patients, patients on hemodialysis, and other patients with the diabetic foot*. *J Diabetes Complications*, 2004, 18, p. 108–112.
10. ARMSTRONG, DG., LAVERY, LA., QUEBEDEAUX, TL., et al. *Surgical morbidity and the risk of amputation due to infected puncture wounds in diabetic versus nondiabetic adults*. *Journal of the American Podiatric Med Association*, 1997, 7, p. 321–326.
11. BILD, DE., SELBY, JV., SINNOCK, P., et al. *Lower extremity amputation in people with diabetes: epidemiology and prevention*. *Diabetes Care*, 1989, 12, p. 24–31.
12. WAGNER Jr., FW. *The diabetic foot*. *Orthopedics*, 1987, 1, p. 163–172.
13. LIPSKY, BA., BERENDT, AR., EMBIL, J., et al. *Diagnosis and treating diabetic foot infections*. *Diabetes Metab Res Rev*, 2004, 20 (suppl. 1), p. S56–S64.
14. SANDERS, LJ. *Diabetes Mellitus: prevention of amputations*. *J Am Podiatr Med Assoc*, 1994, 84, p. 322–328.
15. FEJFAROVÁ, V., JIRKOVSKÁ, A., SKIBOVÁ, J., PETKOV, V. *Pathogen resistance and other risk factors in the frequency of lower limb amputations in patients with the diabetic foot syndrome*. *Vnitr Lek*, 2002, 48, s. 302–306.
16. MAYSER, P., HENSEL, J., THOMA, W., et al. *Prevalence of fungal foot infections in patients with diabetes mellitus type 1 – underestimation of moccasin-type tinea*. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2004, 112, p. 264–268.
17. CHINCHOLIKAR, DA., PAL, RB. *Study of fungal and bacterial infections of the diabetic foot*. *Indian J Pathol Microbiol*, 2002, 45, p. 15–22.
18. UNGPAKORN, R., LOHAPRATHAN, S., REANGCHAINAM, S. *Prevalence of foot diseases in outpatients attending the Institute of Dermatology, Bangkok, Thailand*. *Clin Exp Dermatol*, 2004, 29, p. 87–90.
19. FEJFAROVÁ, V., JIRKOVSKÁ, A., BĚM, R., et al. *Srovnání mikroskopických a kultivačních nálezu získaných z tkáňových vzorků hyperkeratóz a neuropatických ulcerací*. Přednáška na 2. symposiu mladých diabetologů. Praha 10/2005.

(vlfe@medicon.cz)

ISSN 0042-773X

Ročník 51 9/září 2005

Vnitřní lékařství

časopis České internistické společnosti
a Slovenskej internistickej spoločnosti

Vnitř Lék 2005; 51(9)



Indexed in: EMBASE/Excerpta Medica,
MEDLINE/Index Medicus, CHEMICAL ABSTRACTS,
INIS Atomindex, Bibliographia medica czechoslovaca

MEDICA
PUBLISHING &
CONSULTING

Účinnost a komplikace léčby snímatelnými kontaktními fixacemi u pacientů s neuropatickými ulceracemi, akutní Charcotovou osteoartropatií a neuropatickými frakturami

V. Fejfarová, A. Jirkovská, M. Křížová, J. Skibová

Centrum diabetologie, IKEM, Praha přednosta prof. MUDr. Terezie Pelikánová, DrSc.

Souhrn: Snímatelná kontaktní fixace (Total Contact Cast – TCC) je vhodnou metodou odlehčení dolní končetiny při léčbě syndromu diabetické nohy. **Cíl:** Zhodnotit účinnost léčby syndromu diabetické nohy pomocí snímatelných TCC u pacientů s neuropatickými ulceracemi, akutní Charcotovou osteoartropatií a neuropatickými frakturami. **Metodika:** Během sledovaného období 20 měsíců byly snímatelné TCC aplikovány 27 pacientům pro chronické neuropatické ulcerace (skupina 1; průměrný věk $53,5 \pm 8$ roků, trvání diabetu $14,8 \pm 7$ roků, HbA_{1c} $8,2 \pm 2$ %), 35 pacientům pro akutní Charcotovu osteoartropatii (skupina 2; průměrný věk $53,9 \pm 8$ roků, trvání diabetu $16,6 \pm 10$ roků, HbA_{1c} $8,4 \pm 2$ %) a 12 pacientům pro neuropatické fraktury (skupina 3; průměrný věk $52,8 \pm 10$ roků, trvání diabetu $14,8 \pm 12$ roků, HbA_{1c} $8,9 \pm 2$ %). Kritérii hojení syndromu diabetické nohy byly pro skupinu 1 úplná epitelizace defektu, pro skupinu 2 klinické zlepšení lokálního nálezu včetně poklesu kožních teplot a/nebo úpravy scintigrafických parametrů a pro skupinu 3 úplné zhojení fraktury dle RTG. **Výsledky:** Pacienti s diabetickými ulceracemi byli léčeni snímatelnými TCC v průměru $6 \pm 4,2$ měsíce, pacienti s akutní Charcotovou osteoartropatií $5,1 \pm 4$ měsíce a pacienti s patologickými frakturami $3,9 \pm 2,6$ měsíce (NS). Signifikantně nejvyšší procento zhojení za sledované období 20 měsíců bylo nalezeno ve skupině pacientů s neuropatickými frakturami v porovnání se skupinou pacientů s neuropatickými ulceracemi a akutní Charcotovou osteoartropatií (83 % vs 30 % vs 37 %, resp. $p < 0,01$). Z 19 nezhojených pacientů s diabetickými ulceracemi (70 % pacientů s neuropatickými ulceracemi) došlo během léčby snímatelnou TCC k významnému zlepšení lokálního nálezu u 12 pacientů (velikost defektu $5,6 \pm 6,8$ vs $1,56 \pm 2$ cm²; $p < 0,01$), u 4 pacientů byl lokální nález stejný, u 3 došlo ke zhoršení. Z 22 nezhojených pacientů s akutní Charcotovou osteoartropatií (63 % pacientů s akutní Charcotovou osteoartropatií) došlo během sledovaného období ke zlepšení klinického stavu a významné redukci rozdílu kožních teplot obou dolních končetin u 19 pacientů ($2,74 \pm 1,3$ vs $2 \pm 1,3$ °C; $p < 0,05$), ke zhoršení lokálního nálezu u 3 nemocných. Ve skupině pacientů s neuropatickými frakturami nedošlo ke zhojení u 2 pacientů (17 %). Závažnější komplikace, které vedly k ukončení terapie TCC, byly nalezeny u 7 pacientů ze skupiny 1 (26 %), u 3 pacientů ze skupiny 2 (9 %) a u 1 pacienta ze skupiny 3 (8 %): NS. **Závěr:** Snímatelná TCC je vhodnou formou odlehčení dolních končetin u pacientů se syndromem diabetické nohy, jelikož urychluje hojení jak u pacientů s akutní Charcotovou osteoartropatií nebo neuropatickými frakturami, tak i u pacientů s diabetickými ulceracemi. U pacientů s diabetickými ulceracemi je vyšší riziko komplikací, proto je u nich nutná racionální indikace, edukace a pečlivé sledování.

Klíčová slova: syndrom diabetické nohy – snímatelné fixace – odlehčení

Úvod

Základem léčby syndromu diabetické nohy (neuropatických diabetických ulcerací, akutní Charcotovy osteoartropatie) je komplexní terapie spojená s účinnou formou odlehčení dolních končetin pomocí terapeutických

bot, podpažních berlí, pojízdných vozíků a v neposlední řadě i snímatelných kontaktních fixací (Total Contact Cast – TCC) [15,27].

Snímatelná TCC je v naší republice dosud nedostatečně rozšířená metoda léčby syndromu diabetické no-

hy, která je indikovaná u pacientů s nehojícími se neuropatickými ulceracemi, s akutní Charcotovou osteoartropatií a s neuropatickými frakturami. Nejčastěji se TCC používají při léčbě neuropatických ulcerací [18]. Hlavním mechanismem působení

The effect of removable total contact cast therapy on healing of patients with diabetic foot ulcers, acute Charcot osteoarthropathy and neuropathic fractures.

Summary: Removable total contact cast (TCC) is one of the appropriate methods used for lower limb off-loading in patients with the diabetic foot. *The aim of our study:* To assess the effect of TCC therapy on healing of patients with neuropathic foot ulcers, acute Charcot osteoarthropathy and neuropathic fractures. *Methods:* Removable TCC were applied for different indications during the observed period of 20 month: for chronic neuropathic ulcers in 27 patients (group 1; mean age 53.5 ± 8 years, mean diabetes duration 14.8 ± 7 years, mean HbA_{1c} $8.2 \pm 2\%$), for acute Charcot osteoarthropathy in 35 patients (group 2; mean age 53.9 ± 8 years, mean diabetes duration 16.6 ± 10 years, mean HbA_{1c} $8.4 \pm 2\%$) and for neuropathic fractures in 12 patients (group 3; mean age 52.8 ± 10 years, mean diabetes duration 14.8 ± 12 years, mean HbA_{1c} $8.9 \pm 2\%$). Healing criteria for the diabetic foot were: total epithelization for the group 1, clinical improvement of local findings as skin temperature decrease and/or improvement of scintigraphic parameters for the group 2 and total X-ray healing of fracture for the group 3. *Results:* Patients with diabetic foot ulcers were treated by removable TCC for 6 ± 4.2 months, patients with acute Charcot osteoarthropathy for 5.1 ± 4 months and patients with pathological fractures for 3.9 ± 2.6 months on average (NS). The significantly highest percentage of completely healed patients during the observed period was found in the group of patients with neuropathic fractures in comparison with the group of patients with the diabetic foot ulcers and acute Charcot osteoarthropathy (83% vs. 30% vs. 37%, respectively; $p < 0.01$). Significant improvement of foot ulcers was found in 12 patients from 19 non-healed patients with diabetic foot ulcers during TCC therapy (ulcer size 5.6 ± 6.8 vs. 1.56 ± 2 cm², $p < 0.01$), 4 patients had the same clinical finding and local worsening was seen in 3 patients with diabetic foot ulcers. 19 patients from 22 non-healed patients with acute Charcot osteoarthropathy had improved local findings and significantly reduced skin temperatures during the observed period (2.74 ± 1.3 vs. 2 ± 1.3 °C; $p < 0.05$), local findings were worsened in 3 patients. Non-healed neuropathic fractures were found only in 2 patients from this group (17%). TCC complications, which led to interruption of TCC therapy, were found in 7 patients from the group 1 (26%), in 3 patients from the group 2 (9%) and in 1 patient from the group 3 (8%); NS. *Conclusion:* Removable TCC is suitable method for lower limb off-loading in patients with the diabetic foot, since this therapy accelerates healing as of acute Charcot osteoarthropathy or neuropathic fractures as of diabetic foot ulcers. Rational indication, education and regular controls are essential for patients with neuropathic foot ulcers, whose have higher risk for development of complications.

Key words: diabetic foot – total contact cast – off-loading

TCC je snížení vertikálního plantárního tlaku jeho rozložením na celou plochu nohy i bérce a snížení tření. Kontaktní fixace může např. snížit plantární tlak (v oblasti hlaviček metatarzů až o 75 %). Dále je kontaktní fixace schopna snížit riziko šíření infekce při imobilizaci tkání a kloubů [14]. Pomocí aplikace TCC dochází k redistribuci vertikálních tlaků na plantě a k vyloučení maximálních tlaků na exponovaná místa [18].

Byly publikovány výsledky studií porovnávající účinnost terapie TCC v léčbě syndromu diabetické nohy; např. hojení diabetických ulcerací bylo pomocí TCC zlepšeno a urychleno v porovnání s léčbou prováděnou pomocí speciální terapeutické obuvi [7] či speciálně upravených dlah a polovičních bot [1].

Ke zhojení diabetických ulcerací může dojít klidovým režimem na lůžku nebo odstraněním působení hmotnosti těla na dolní končetiny u mobilizovaného pacienta pomocí jiných prostředků. TCC umožňuje ambulantní léčbu pacienta, která je podstatně lev-

nější nežli hospitalizace a přijatelnější pro pacienta. Hospitalizace je finančně náročná forma terapie syndromu diabetické nohy, jak bylo prokázáno např. ve 2 českých studiích [6,8].

Neuropatie je jako jedna z pozdních komplikací diabetu společnou příčinou neuropatických diabetických ulcerací, Charcotovy osteoartropatie i neuropatických fraktur [20]. Klinický obraz dvou posledně zmiňovaných onemocnění může být značně podobný – zarudnutí, otok dolní končetiny, abnormality v RTG obraze. Rozdíl spočívá především v lokalizaci a v míře destrukce kostních a kloubních struktur. Podstatou Charcotovy osteoartropatie jsou v počátečním stadiu mikrofraktury [14]. Stresové fraktury a občasné ruptury ligament se objevují při opakovaném zatěžování v kombinaci s demineralizací kostí, deformitami a rigiditou kloubů [11,22]. Akutní Charcotova osteoartropatie i neuropatické fraktury mohou vést k rozvoji deformací a k nestabilitě nohy, což může být často příčinou zvýšeného výskytu ul-

cerací. Ke stabilizaci procesu a zamezení rozvoje deformit může sloužit aplikace TCC či modifikované speciální obuvi [21], přičemž po léčbě TCC dochází ke zlepšení klinických známek Charcotovy osteoartropatie (pokles kožních teplot, redukce edémů) i dalších ukazatelů aktivity onemocnění [12]. Existuje pouze několik málo studií, které sledovaly účinnost terapie syndromu diabetické nohy, zejména neuropatických fraktur pomocí TCC [5,24,25].

Cílem naší studie bylo posoudit účinnost léčby syndromu diabetické nohy pomocí snímatelných TCC v nejčastějších indikacích používaných v podiatrické ambulanci u pacientů s neuropatickými ulceracemi, s akutní Charcotovou osteoartropatií a s neuropatickými frakturami a zhodnotit výskyt komplikací této terapie v jednotlivých skupinách.

Metodika

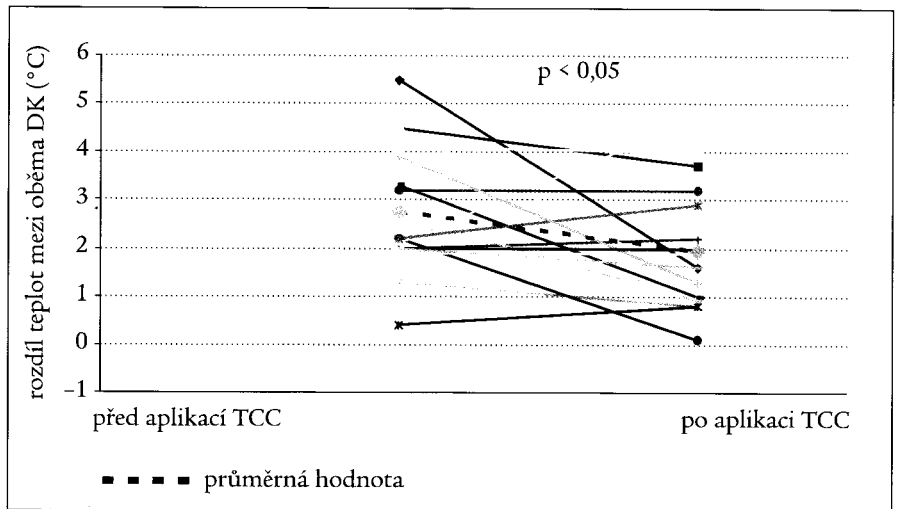
Soubor pacientů

Do studie bylo konsekutivně zařazeno 74 pacientů, kteří byli léčeni v po-

Z 22 pacientů s nezhojenou akutní Charcotovou osteoartropatií (63 % nemocných s akutní Charcotovou osteoartropatií) došlo během sledovaného období u 19 pacientů ke zlepšení klinického stavu a k signifikantní redukci rozdílu kožních teplot na dolních končetinách ($2,74 \pm 1,3$ vs $2 \pm 1,3$ °C; $p < 0,05$) (graf 3). Pouze u 3 pacientů došlo během terapie snímatelnou TCC ke zhoršení lokálního nálezu.

Ve skupině neuropatických fraktur nedošlo během sledovaného období ke zhojení 2 pacientů - u 1 pacienta bylo zaznamenáno zlepšení patologického nálezu a u 1 pacienta došlo během sledovaného období ke zhoršení patologického nálezu.

Terapii snímatelnými TCC jsme v jednotlivých skupinách posuzovali z hlediska výskytu komplikací této léčby (graf 4). Nejčastější komplikací byla zlomenina TCC, která se vyskytovala v 1. skupině u 44 % nemocných, ve 2. skupině u 57 % pacientů a ve 3. skupině u 58 % pacientů; rozdíl nebyl signifikantní. Otlakové ulcerace vzniklé z aplikace snímatelné TCC se vyskytovaly nejčastěji u pacientů léčených pro diabetické ulcerace v porovnání s pacienty léčenými pro akutní Charcotovu osteoartropatií a pro neuropatické fraktury (30 %



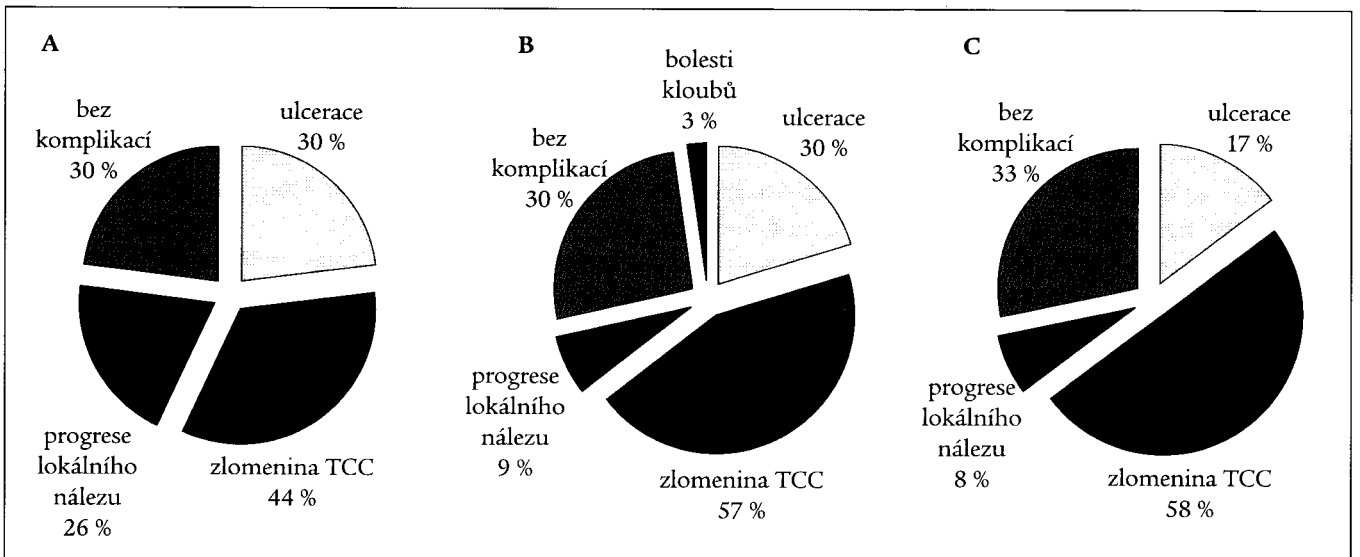
Graf 3. Vývoj rozdílů kožních teplot u 19 pacientů s akutní Charcotovou osteoartropatií nezhojených během terapie snímatelnou TCC ve sledovaném období.

vs 26 % vs 17 %; NS). Ojedinele se objevila u některých pacientů bolestivost kloubů, a to zejména SI skloubení (3 % nemocných z 2. skupiny).

Závažnější komplikace, mezi které patřila progresse osteomyelitidy nebo zvětšení hloubky ulcerace a které vedly k ukončení terapie TCC, byly nalezeny celkem u 7 pacientů s diabetickými ulceracemi (26 %), u 3 pacientů s akutní Charcotovou osteoartropatií (9 %) a u 1 pacienta ze skupiny nemocných s neuropatickými frakturami (8 %); rozdíly nebyly signifikantní.

Diskuse

V zahraničí se TCC využívají v terapii diabetických ulcerací a akutní Charcotovy steoartropatie již řadu let [8,25], v naší republice však zkušenosti s touto léčbou doposud publikovány nebyly. V naší studii jsme posuzovali dobu hojení jednotlivých lézí i počet zhojených pacientů pomocí TCC a komplikace této terapie. Doba léčby TCC se signifikantně nelišila mezi sledovanými skupinami ($6 \pm 4,2$ vs $5,1 \pm 4$ vs $3,9 \pm 2,6$; NS), avšak individuální doba sledování byla ve studii variabilní.



Graf 4. Výskyt komplikací při léčbě snímatelnou TCC u pacientů s neuropatickými ulceracemi (n = 27; A), s akutní Charcotovou osteoartropatií (n = 35; B) a s neuropatickými frakturami (n = 12; C).

V naší studii došlo ke zhojení 30 % pacientů s neuropatickými ulceracemi v průměru za 6 měsíců. Laing et al prokázali ve své studii zhojení více než 80 % ulcerací u diabetiků během 2měsíční terapie [18]. Faktorem, který mohl zapříčinit nízké procento zhojení diabetických ulcerací v naší studii ve srovnání se studií Lainga, byl závažnější stupeň ulcerace i infekce [18]. Zatímco ve studii Lainga et al byla většina pacientů s ulceracemi stupně 1 a 2 dle Wagnera, v naší studii měla většina pacientů ulcerace stupně Wagnera 2 a 3.

Ve studii Armstronga et al byla srovnávána hojivost diabetických ulcerací pomocí TCC v porovnání se speciálně upravenými ortézami (aircast) a polovičními terapeutickými botami. Během 12 týdnů došlo k významně nejvyššímu procentu zhojení diabetických ulcerací u pacientů léčených TCC v porovnání s pacienty léčenými speciálně upravenými ortézami a polovičními botami (89,5 % vs 65 % vs 58,3 %) [1]. V této studii byli ale pomocí TCC léčeni pacienti s povrchovějšími ulceracemi oproti naší studii. Hojivost diabetických ulcerací posuzovali také polští autoři ve své studii, podle které došlo během 2 měsíců ke zhojení 90 % nemocných. Nicméně rozsah jejich ulcerací byl podstatně menší v porovnání s naší studií (necelé 2 cm²) [10].

Jiné studie porovnávaly terapii ulcerací pomocí TCC s jinými způsoby odlehčení, což jsme v naší studii nesledovali. Např. ve studii Armstronga et al se porovnávala účinnost TCC, speciálních ortéz a terapeutické obuvi na redistribuci tlaků v oblasti paty pomocí pedobarografického vyšetření. TCC významně více redukovala tlaky v oblasti paty v porovnání s ostatními odlehčovacími prostředky [2]. Další studie zkoumající distribuci tlaků na plantě prokázala, že maximální plantární tlaky v přednoží byly viditelně redukovány pomocí TCC v porovnání s tlaky při chůzi v botách či naboso, a to o více

než 75 % [23]. Oproti Armstrongově studii tlak lokalizovaný v oblasti paty nebyl významně odlišný po aplikaci terapeutických bot či TCC. V naší studii jsme pedobarografické vyšetření neprováděli.

V Laveryho studii autoři porovnávali hojivost ulcerací u pacientů s diabetickými ulceracemi bez a se současnou akutní Charcotovou osteoartropatií [19]. Významně kratší dobu se hojily ulcerace u pacientů s Charcotovou osteoartropatií, přestože rozsah jejich ulcerací byl významně větší v porovnání se skupinou pacientů léčených pouze pro neuropatické ulcerace. Nicméně tito pacienti měli kratší anamnézu neuropatických defektů v porovnání s pacienty léčenými pouze pro neuropatické ulcerace (18 dní vs 89 dní). Chronicitu ulcerace tady hrála zřejmě podstatnou roli. V naší studii byli hodnoceni pouze pacienti s Charcotovou osteoartropatií bez ulcerací.

V naší studii se podařilo zhojit během sledovaného období 20 měsíců 37 % pacientů s akutní Charcotovou osteoartropatií v průměru za dobu 7,9 ± 3,5 měsíců. Sinacore et al uvedli ve své studii 100% zhojení Charcotovy osteoartropatie během průměrně 2,87 ± 1,5 měsíců, medián byl 6,73 měsíce [25]. Podle lokalizace Charcotovy artropatie se lišila v Sinacorevě studii i doba hojení pomocí TCC. Delší dobu se hojily artropatie lokalizované v oblasti střední části nohy, paty a kotníku v porovnání s lokalizací v přední části nohy. Hojivost Charcotovy osteoartropatie byla významně ovlivněna a prodloužena u pacientů, u kterých došlo k pozdnímu stanovení diagnózy. Rozdíl v době hojení Charcotovy osteoartropatie v naší studii a studii Sinacora může spočívat především v jiných kritériích hojení osteoartropatie – Sinacore používal jako kritérium hojení pouze klinický obraz (ústup erytému, pokles kožních teplot), my jsme používali také scintigrafická kritéria [25].

Hojení neuropatických fraktur bylo v naší studii rychlejší v porovnání s délkou hojení pacientů s neuropatickými ulceracemi nebo akutní Charcotovou osteoartropatií. Přesto bývá hojení neuropatických fraktur obtížnější nežli u běžných fraktur [4].

Problémem při použití TCC u pacientů se syndromem diabetické nohy může být zhoršená stabilita pacienta. V naší studii používáme na zhotovenou TCC speciálně upravenou obuv a ne podpatky jako u klasických sádrových obvazů. Lavery et al prokázali, že nestabilita pacienta byla významně větší u nemocného s TCC a podpatkem v porovnání s TCC a botou, se snímatelnou dlahou a s poloviční botou [20].

V naší studii se poměrně často vyskytovaly méně závažné mechanické komplikace, např. zlomeniny TCC, a to ve 49 %. Otlaky vznikající při léčbě snímatelnou TCC byly v naší studii nalezeny v průměru u 25 % nemocných. Tyto otlaky vznikají na podkladě zlomenin TCC či špatné compliance pacienta (nenošení podpažních berlí, aplikace ponožek či jiného krytí do TCC apod). Nově vzniklé otlaky na stejné dolní končetině byly nalezeny ve studii Dzieciuchowicze až u 40 % nemocných [10].

Závažné komplikace léčby snímatelnou TCC nebyly v naší studii příliš frekventované. Progrese lokálního nálezu vedoucí k ukončení terapie byla zaznamenána pouze v 11 % všech případů, většinou se jednalo o osteomyelitidu nebo progresi infekce a ulcerace. Laing nalezl jako vedlejší efekt TCC významné zvýšení počtu patogenů v diabetických ulceracích během terapie TCC [18]. Dalším vedlejším nálezem při léčbě TCC může být zhoršení mobility kloubů dolních končetin. Např. Diamondova studie prokázala, že pacienti s neuropatickými ulceracemi, kteří byli léčeni TCC v průměru 72 dní, neměli změnu hybnost v subtalárních kloubech, ale dorziflexe v talokrurálním skloubení byla snížena

o 1 stupeň [9]. Tuto komplikaci jsme v naší studii nesledovali.

Po ukončení terapie snímatelnými TCC má pacient používat preventivní obuv pro diabetiky nebo speciálně upravené ortopedické boty. Převod by měl být pozvolný, abychom zamezili reulceracím. Rekurenci neuropatických ulcerací prokázali Helm et al ve své studii u 20 % nemocných během následujících 25 měsíců po ukončení terapie TCC [13]. Příčinami nových ulcerací v této studii byly non-kompliance pacienta, porucha biomechaniky, výskyt osteofytů nebo sekvestrů kosti, osteomyelitidy a výskyt deformit v rámci Charcotovy osteoartropatie [13].

Závěr

Závěrem můžeme shrnout, že výsledky naší studie podporují koncepci, že snímatelná TCC je vhodnou formou odlehčení dolních končetin u pacientů se syndromem diabetické nohy. Urychluje hojení jak u pacientů s akutní Charcotovou osteoartropatií, tak s neuropatickými frakturami a diabetickými ulceracemi. Před aplikací snímatelné TCC je ovšem nutno zvážit indikaci této formy léčby u pacientů s osteomyelitidou a u infikovaných diabetických ulcerací s klinicky závažným nálezem. Léčbu syndromu diabetické nohy pomocí snímatelné TCC je vhodné řídit ze specializovaných podiatrických ambulancí pro diabetiky.

Práce vznikla za podpory výzkumného záměru MZ ČR č. vz.: L17/98:00023001.

Literatura

1. Armstrong DG, Nguyen HC, Lavery LA et al. Off-Loading the Diabetic Foot Wound. *Diabetes Care* 2001; 24: 1019-1022.
2. Armstrong DG, Stacpoole-Shea S. Total contact casts and removable cast walkers. mitigation of plantar heel pressure. *J Am Podiatr Med Assoc* 1999; 89: 50-53.
3. Armstrong DG, Todd WF, Lavery LA et al. The natural history of acute Charcot's arthropathy in a diabetic foot specialty clinic. *Diabetic Med* 1997; 14: 357-363.
4. Bém R. Neuropatické fraktury u pacientů s diabetem. *HPB* 2003; 11: 8-10.
5. Berg EE. Charcot arthropathy after acetabular fracture. *J Bone Joint Surg Br* 1997; 79: 742-745.
6. Brunerová L, Anděl M. Kalkulace nákladů na léky, zdravotní materiál, některé vybrané léčebné výkony a služby sociální oblasti u pacientů se syndromem diabetické nohy. *Vnitř Lék* 2003; 49(6): 457-464.
7. Caravaggi C, Faglia E, De Giglio R. Effectiveness and safety of a non-removable fiberglass off-bearing cast versus a therapeutic shoe in the treatment of neuropathic foot ulcers: a randomized study. *Diabetes Care* 2000; 23: 1746-1751.
8. Čechurová D, Lacigová S, Rušavý Z et al. Ekonomický pohled na syndrom diabetické nohy. *Vnitř Lék* 2003; 49(6): 453-456.
9. Diamond JE, Mueller MJ, Delitto A. Effect of total contact cast immobilization on subtalar and talocrural joint motion in patients with diabetes mellitus. *Phys Ther* 1993; 73: 310-315.
10. Dzieciuchowicz L, Checinski P, Waliszewski K et al. The value of total contact casting in treatment of neuropathic foot ulcers in diabetic patients. *Pol Merkuriusz Lek* 1997; 3: 132-134.
11. Fabrin J, Larsen K, Holstein PE. Long-Term Follow-Up in Diabetic Charcot Feet with Spontaneous Onset. *Diabetes Care* 2000; 23: 796-800.
12. Gill G, Benbow S, Tesfay S et al. Painless stress fractures in diabetic neuropathic feet. *Postgrad Med J* 1997; 73: 241-242.
13. Helm PA, Walker SC, Pullium GF. Recurrence of neuropathic ulceration following healing in a total contact cast. *Arch Phys Med Rehabil* 1991; 72: 967-970.
14. Jirkovská A. Aktuální problematika syndromu diabetické nohy. In: *Trendy soudobé diabetologie*. Praha: Galén 2001; 5. vol: 53-87.
15. Jirkovská A. Stěžejní otázky terapie syndromu diabetické nohy. *Vnitř Lék* 2002; 48(6): 542-548.
16. Jirkovská A, Hosová J, Wosková V. Diagnostika akutní a subakutní Charcotovy osteoartropatie u diabetiků. *Prakt Lék* 1998; 12: 661-664.
17. Jirkovská A, Kasalický P, Bouček P et al. Calcaneal ultrasonometry in patients with Charcot osteoarthropathy and its relationship with densitometry in the lumbar spine and femoral neck and with markers of bone turnover. *Diab Med* 2001; 18: 495-500.
18. Laing P. Diabetic foot ulcers. *The American Journal of surgery* 1994; 167: 31S-36S.
19. Lavery LA, Armstrong DG, Walker SC. Healing rates of diabetic foot ulcers associated with midfoot fractures due to Charcot's arthropathy. *Diabet Med* 1997; 14: 46-49.
20. Lavery LA, Fleishli JG, Laughlin TJ et al. Is postural instability exacerbated by off-loading device in high risk diabetics with foot ulcers? *Ostomy Wound Manage* 1998; 44: 26-32.
21. McGill M, Molyneaux L, Boulton T et al. Response of Charcot's arthropathy to contact casting: assessment by quantitative techniques. *Diabetologia* 2000; 43: 481-484.
22. Myerson MS, Edwards WH. Management of neuropathic fractures in the foot and ankle. *J Am Acad Orthop Surg* 1999; 7: 8-18.
23. Norman A, Robbins H, Milgram JE. The acute neuropathic arthropathy: a rapid, severe disorganizing form of arthritis. *Radiology* 1968; 90: 1159-1161.
24. Shaw JE, Hsi WL, Ulbrecht JS et al. The mechanism of plantar unloading in total contact casts: implications for design and clinical use. *Foot Ankle Int* 1997; 18: 809-817.
25. Sinacore DR. Acute Charcot arthropathy in patients with diabetes mellitus: healing times by foot location. *J Diabetes Complications* 1998; 12: 287-293.
26. Sinacore DR. TCC: An old therapy with new indications. *Biomechanics* 1996; 3: 71-74.
27. Syndrom diabetické nohy. Mezinárodní konsensus vypracovaný Mezinárodní pracovní skupinou pro syndrom diabetické nohy. Praha: Galén 2000.

MUDr. Vladimíra Fejfarová
www.ikem.cz
e-mail: vlfe@medicon.cz

Doručeno do redakce: 12. 7. 2004
Přijato po recenzi: 16. 2. 2005

diagnóza

odborný a informační časopis pro zdravotnické pracovníky



HOJENÍ RAN

Péče o nemocné s žilním a arteriálním onemocněním

Neuropatické defekty v ambulantní praxi

Moderní způsoby lokálního ošetření defektů

Diagnostika a léčba diabetické nohy

Výsledky průzkumu „Hojení ran“ – průzkum využití vlhké terapie, preferovaných prostředků a firem ve zdravotnictví v ČR

Moderní prostředky k fixaci a odlehčení diabetické nohy

MUDr. Vladimíra Fejfarová, Marta Křížová, doc. MUDr. Alexandra Jirkovská, CSc.,
MUDr. Robert Bém, Jaroslav Pavlů, Centrum diabetologie, IKEM, Praha

Souhrn ▶ Vhodně zvolená metoda odlehčení dolních končetin patří mezi základní faktory léčby syndromu diabetické nohy u pacientů s neuropatickými, neuroischemickými a ischemickými defekty, akutní Charcotovou osteoartropatií a s neuropatickými frakturami. Odlehčení dolních končetin je možno zajistit tradičními či alternativními moderními metodami. Mezi tradiční metody odlehčení dolních končetin řadíme speciální vložky do preventivních bot a dále terapeutické (poloviční) boty. Odlehčení dolních končetin moderními fixacemi lze provést pomocí ortéz „Walker“, „AirCast“, ortéz se speciálními vložkami a nebo pomocí klasických či modifikovaných kontaktních fixací.

Klíčová slova

- diabetická noha
- speciální obuv
- odlehčení
- ortézy
- kontaktní fixace

Syndrom diabetické nohy je definován podle WHO jako infekce, ulcerace a/nebo destrukce hlubokých tkání spojená s neurologickými abnormalitami a různým stupněm ischemické choroby dolních končetin (Jirkovská, 2000b). Do syndromu diabetické nohy řadíme neuropatické ulcerace na dolních končetinách, akutní Charcotovu osteoartropatii (odvápňení dolních končetin, zborcení kostních struktur a fraktury kostí dolních končetin) či neuropatické fraktury vzniklé na podkladě neuropatických změn na dolní končetině (konsensus). Mechanismus vzniku syndromu diabetické nohy zahrnuje několik faktorů, mezi něž řadíme zejména špatnou kompenzaci diabetu vedoucí k rozvoji diabetické mikro- a makroangiopatie. Na rozvoji diabetické nohy se pak podílí především diabetická neuropatie (motorická, sensorická a autonomní) a ischemická choroba dolních končetin. Dále ke vzniku syndromu diabetické nohy přispívá kouření, rozvoj snížené pohyblivosti kloubů a infekce. Vlivem zmíněných faktorů dochází ke zvýšení plantárního tlaku a k poruše kapilárního průtoku, což vede k ischemizaci tkání a k rozvoji ulcerace (Jirkovská, 2000a). Předpokládaný mechanismus rozvoje Charcotovy osteoartropatie zahrnuje kombinaci těžké periferní i autonomní neuropatie s opakovanými mikrofrakturami na základě lokální osteoporózy (Jirkovská, 2001).

Základem léčby syndromu diabetické nohy je kromě lokálního ošetření a léčby infekce vhodně zvolená forma odlehčení dolních končetin, která odstraní abnormální tlaky lokalizované na plantě dolních končetin. Odlehčení plosek dolních končetin vede k urychlení hojení diabetických ulcerací nebo k prevenci jejich rekurence (Calhoun et al., 2002). Určité formy odlehčení končetin jsou schopny dolní končetinu stabilizovat v požadované poloze a snížit tak riziko šíření infekce imobilizační tkání a kloubů (Jirkovská, 2001). Typ odlehčení dolní končetiny je ovšem nutné přizpůsobit jak věku, tak hmotnosti, aktivitě a domácímu prostředí pacienta (Calhoun et al., 2002).

Neuropatické, neuroischemické a ischemické ulcerace, akutní Charcotova osteoartropatie, chronická Charcotova osteoartropatie s ulcerací a neuropatické fraktury jsou léčeny různými metodami odlehčení, a to tradičními nebo alternativními moderními prostředky.

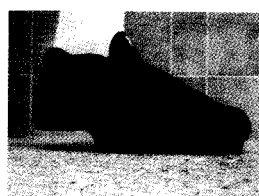
Mezi tradiční metody odlehčení dolních končetin řadíme aplikaci **speciálních vložek**, které slouží k lokálnímu odlehčení dolní končetiny v místě ulcerace. Vložky jsou složeny z několika vrstev

polyuretanových materiálů, přičemž některé z nich jsou zpevněné korfantem. Vložky jsou upraveny antibakteriálně a termomodulačně. Používají se v obuvi, která je protetikem zhotovena přímo na míru pacientovi.

V našich podmínkách se nejčastěji k odlehčení dolní končetiny používá **terapeutická, tzv. poloviční bota**. Poloviční boty jsou obvykle indikovány k léčbě neuropatických, neuroischemických i ischemických defektů dolních končetin spolu s podpažními berlemi, které pomohou zlepšit stabilitu pacienta. Existují dva základní typy polovičních bot. Rozdělujeme je podle typu podrážky na poloviční botu odlehčující přední část plošky a druhý typ, který odlehčuje oblast paty (obr. 1 a 2). Tyto boty mohou být vyrobeny z kůže, nicméně prefabrikované terapeutické boty jsou zhotovovány z měkkých látkových materiálů. Poloviční bota je obvykle dostatečně pohodlná, široká i pro obvazový krycí materiál. Výhodou poloviční boty je její snadná udržovatelnost a jednoduchá aplikace, nevýhodou pak brzké opotřebení, zhoršení stability těla, bolestivost páteře či kloubů kontralaterální končetiny.



Obr. 1



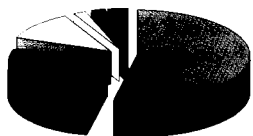
Obr. 2

Zkušenosti s používáním polovičních bot jsou poměrně rozsáhlé nejen v cizině, ale i u nás. V různých studiích bylo prokázáno, že poloviční boty jsou schopné zhojit 58–96 % diabetických ulcerací za cca 60–70 dní (Chantelau et al., 1993; Lavery et al., 2004). Chantelau a spol. srovnávali hojivost diabetických ulcerací pomocí polovičních terapeutických bot a preventivní obuvi. Medián doby hojení diabetických ulcerací byl kratší (70 dní) v porovnání s dobou hojení pomocí preventivní obuvi (118 dní). Pacienti léčení dia obuvi byli dokonce častěji hospitalizováni pro syndrom diabetické nohy v porovnání s pacienty léčenými poloviční botou (Chantelau et al., 1993). V naší republice máme také zkušenosti s aplikací polovičních bot u pacientů se syndromem diabetické nohy, nicméně léčebné výsledky nebyly doposud publikovány.

Syndrom diabetické nohy je definován podle WHO jako infekce, ulcerace a/nebo destrukce hlubokých tkání spojená s neurologickými abnormalitami a různým stupněm ischemické choroby dolních končetin. Do syndromu diabetické nohy řadíme neuropatické ulcerace na dolních končetinách, akutní Charcotovu osteoartropatii (odvápňení dolních končetin, zborcení kostních struktur a fraktury kostí dolních končetin) či neuropatické fraktury vzniklé na podkladě neuropatických změn na dolní končetině.

Základem léčby syndromu diabetické nohy je kromě lokálního ošetření a léčby infekce vhodně zvolená forma odlehčení dolních končetin, která odstraní abnormální tlaky lokalizované na plantě dolních končetin.

Graf 1
Výskyt komplikací u pacientů léčených snímatelnými kontaktními fixacemi v naší studii



- technické komplikace (zlomenina TCC) (54 %)
- mykózy (3 %)
- bolesti kloubů (2 %)
- zlomeniny kostí (2 %)
- progrese lokální infekce (12 %)
- nová otlaková ulcerace (27 %)

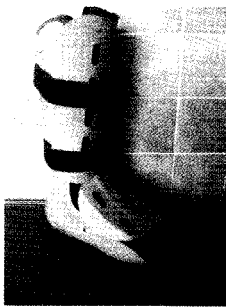
Další metodou odlehčení dolní končetiny je použití **ortézy Walker**, která je vyrobena z plastu vypodloženého měkkým molitanovým materiálem (obr. 3). Použití ortézy Walker je indikováno u pacientů s neuropatickými a neuroischemickými defekty a k doléčení akutní Charcotovy osteoartropatie. Ortézou Walker se léčí i akutní Charcotova osteoartropatie u pacientů, u kterých je léčba snímatelnými kontaktními fixacemi kontraindikována. Nicméně není vhodné léčit všechny pacienty s akutní Charcotovou osteoartropatií Walkerem, jelikož tato ortéza není schopna zaručit stabilitu kloubů a kostí dolní končetiny. Výhodou ortézy Walker je nízká cena v porovnání se zhotovením snímatelné kontaktní fixace a vyměnitelný vnitřní krycí materiál. Pacienti s Walkerem nepotřebují oproti pacientům s kontaktními fixacemi absolvovat obsáhlou edukaci o nošení ortézy. Nevýhodou je snadné snímání ortézy a tím horší compliance pacienta. Proto snahou některých autorů je zneškodnit snímání ortézy pomocí zasádrování povrchu Walkera.

V naší republice se ortézy Walker používají poměrně krátkou dobu. Větší zkušenosti s její aplikací mají v zahraničí. Armstrong a spol. sledovali ve své studii aktivitu pacientů léčených Walkerem. Pacienti byli poměrně aktivní (hodnoceno krokoměrem – průměrně 1219 kroků), zajímavým zjištěním byl i fakt, že pacienti nosili walkerovu ortézu pouze 60 % denní doby (Armstrong et al., 2003).

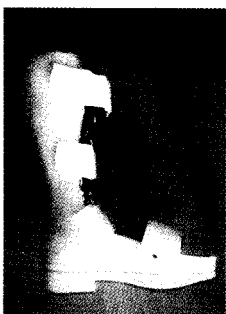
Další, méně obvyklou formou odlehčení dolní končetiny, je **ortéza Air-Cast** (obr. 4). Tato ortéza je stabilnější v porovnání s ortézou Walker, přičemž se používá ke stabilizaci dolních končetin u pacientů, kteří mají stejnou indikaci k odlehčení dolní končetiny jako pacienti léčení kontaktními fixacemi (viz níže). Na výrobu ortézy AirCast se používá plastový materiál. Uvnitř ortézy je měkké vypodložení a jsou zde umístěny i zásobníky vzduchu sloužící k ochraně celé končetiny a pulzatilní kompresi nohy působící léčebně například na edémy dolních končetin, žilní insuficienci. Nevýhodou ortézy AirCast je vysoká cena (vyšší než jsou náklady na kontaktní fixaci). Klinické zkušenosti s její aplikací u pacientů se syndromem diabetické nohy jsou v naší republice mizivé. Doposud pouze Lavery a spol. zveřejnili studii zkoumající účinnost odlehčení oblasti diabetických vředů pomocí kontaktních fixací v porovnání s komerčně vyráběnými prostředky.



Obr. 3



Obr. 4



Obr. 5

Odlehčení dolních končetin pomocí AirCast nedosahovalo takové účinnosti jako při nošení kontaktních fixací (Lavery et al., 1996).

Ortézy se speciálními vložkami (obr. 5) jsou indikovány u pacientů k dohojení diabetických ulcerací, dohojení jizev po nízké amputaci, k léčbě pacientů s akutní či subakutní Charcotovou osteoartropatií, kteří nespolupracují nebo kteří mají kontraindikaci aplikace kontaktní fixace. Ortézy jsou vyrobeny z tvrdých plastových materiálů (polyetylen nebo polypropylen vinylchlorid) a měkkého krytí; zapínání ortéz je na suché zipy (velcro). Výhodou je zlepšení mobility pacienta, nevýhodou je možný rozvoj otlakových ulcerací při nošení rigidních ortéz.

V naší republice dochází v poslední době k rozšiřování aplikace **kontaktních fixací**. Existují dva základní typy kontaktních fixací, a to rigidní (nesnímatelné) a semirigidní (snímatelné) fixace. Kontaktní fixace (TCC = Total Contact Cast) jsou indikovány u pacientů s neuropatickými a neuroischemickými ulceracemi, u akutní a subakutní Charcotovy osteoartropatie a neuropatických fraktur. TCC jsou vyrobeny z tvrdých a pružných materiálů, sádrovacího obvazu a měkkého filcového krytí (Fejfarová et al., 2005 v tisku). TCC umožňuje redistribuci vertikálních tlaků na plantě a vyloučení maximálních tlaků na exponovaná místa (Laing, 1997), např. snižuje tlak v oblasti hlavicek metatarzů až o 75 %. TCC redukuje aktivitu pacienta (měřeno krokoměrem; Armstrong et al., 2001). Nevýhodou TCC je komplikovanější aplikace a vyšší hmotnost fixace v porovnání s poloviční botou. Dále může TCC omezovat pacienta při chůzi, mytí a ve spánku. Největší nevýhodou TCC je možný rozvoj otlakových defektů, zvýšený výskyt mykóz, zhoršení pohyblivosti talokurálního skloubení, progrese defektu a zejména rozvoj infekce a osteomyelitidy. Nicméně podle našich zkušeností nejsou závažné komplikace léčby TCC tak časté (graf 1; Fejfarová et al., 2004).

V zahraniční literatuře se můžeme setkat s poměrně bohatými zkušenostmi s léčbou TCC. Řada autorů prokázala zhojení 70–100 % diabetických ulcerací pomocí kontaktních fixací během 28–68 dní (Myerson et al., 1992; Helm et al., 1984; Lavery et al., 1997; Armstrong et al., 2001; Lavery et al., 2004). Caravaggi a spol. prokázali zlepšení a urychlení hojení diabetických ulcerací pomocí TCC v porovnání s léčbou prováděnou speciální terapeutickou obuví (Caravaggi et al., 2000). Podobné výsledky našli i Armstrong a spol. při léčbě pacientů s neuropatickými ulceracemi v oblasti přednoží a paty pomocí TCC v porovnání se speciálně upravenými dlahami a polovičními botami (zhojení 90 % vs. 65 % vs. 58 % pacientů, respektive; Armstrong et al. 2001; Armstrong et al., 1999).

Některé studie dokonce prokázaly, že hojivost diabetických ulcerací je při použití TCC vyšší v porovnání s lokálním použitím různých agens (např. růstových faktorů, náhradních bioinženýrsky zpracovaných tkání, speciálního krytí (Veves et al., 2001; Veves et al., 2002; Gentzkow et al., 1996; Wieman et al., 1998).

Jak bylo zmíněno, TCC se využívají i v léčbě akutní Charcotovy osteoartropatie. Gill a spol. prokázali, že pomocí TCC dochází ke zlepšení klinických známek Charcotovy osteoartropatie (pokles kožních teplot a redukce edémů) i parametrů zobrazovacích metod (Gill et al., 1997). Rozdíly

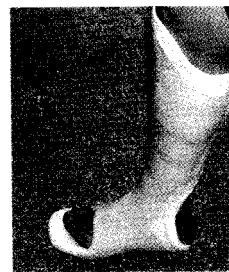
v době hojení Charcotovy osteoartropatie ovšem závisí i na lokalitě patologického procesu, jelikož Charcotova osteoartropatie lokalizovaná v oblasti středonoží, paty a hlezna se hojí déle v porovnání s přední částí nohy (Sinacore, 1998).

V naší praxi jsme modifikovali aplikaci snímatelných kontaktních fixací podle různých protetických metod. Jednou z atypických forem kontaktních fixací je **fenestrovaná kontaktní fixace**, která je indikována u pacientů s neuropatickými ulceracemi ke snazšímu lokálnímu ošetřování (obr. 6). Nověji se používá v naší klinické praxi i **kontaktní fixace modifikovaná podle Sarmienteho**. Tento



Obr. 6

typ fixace je určen k odlehčení neuropatických ulcerací v terénu výrazných deformit při chronické Charcotově osteoartropatii, k odlehčení dolních končetin s osteomyelitidou tarzálních nebo hlezenních kostí (obr. 7). Výhodou této fixace je změna těžiště příslušné končetiny, které se přeusouává z oblasti plosky do oblasti kolenního kloubu. Poslední modifikovanou fixační metodou určenou k odlehčení neuropatických ulcerací zejména v oblasti přednoží je tvorba **plastové fixační obuvi**. Některé z typů obuvi (Mabel shoe, scotch cast boot apod.) se používají v omezené míře v zahraničí.



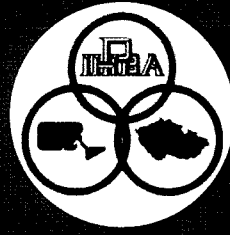
Obr. 7

V poslední době u nás dochází k rozšiřování aplikace kontaktních fixací (fenestrovaná kontaktní fixace, kontaktní fixace modifikovaná podle Sarmienteho, plastová fixační obuv).

Odlehčení dolních končetin u pacientů s neuropatickými a neuroischemickými ulceracemi, akutní a subakutní Charcotovou osteoartropatií a neuropatickými frakturami je jedním z nejdůležitějších faktorů léčby syndromu diabetické nohy. Vždy je ovšem nutno při výběru vhodné metody odlehčení dolní končetiny zohledňovat indikace, ekonomické aspekty, věk a možnosti pacienta. Velmi důležité jsou pravidelné kontroly pacienta v podiatrické ambulanci. Kontroly by měly být zaměřené nejen na zhodnocení lokálního stavu dolní končetiny, ale i spolupráce pacienta.

LITERATURA

- Armstrong DG, Lavery LA, Kimbriel HR, et al. Activity patterns of patients with diabetic foot ulceration: patients with active ulceration may not adhere to a standard pressure off-loading regimen. *Diabetes Care* 2003;26: 2595–2597.
- Armstrong DG, Nguyen HC, Lavery LA, et al. Off-loading the diabetic foot wound. *Diabetes Care* 2001;24: 1019–1022.
- Armstrong DG, Stackpoole-Shea S. Total contact casts and removable cast walkers. Mitigation of plantar heel pressure. *J Am Podiatr Med Assoc* 1999;89:50–53.
- Caravaggi C, Faglia E, De Giglio R. Effectiveness and safety of a nonremovable fiberglass off-bearing st versus a therapeutic shoe in the treatment of neuropathic foot ulcers: a randomized study. *Diabetes Care* 2000;23:1746–1751.
- Calhoun JH, Overgaard KA, Stevens CM, et al. Diabetic foot ulcers and infections: current concepts. *Adv Skin Wound Care* 2002;15:31–42.
- Fejfarová V, Jirkovská A, Křížová M, Bém R. Complications of TCC treatment with the focus on osteomyelitis. In: Abstractbook of III. Joint Meeting of the DFSG. 2004; 118.
- Fejfarová V, Jirkovská A, Křížová M, Skibová J. Účinnost a komplikace léčby snímatelnými kontaktními fixacemi u pacientů s neuropatickými ulceracemi, akutní Charcotovou osteoarthropatií a neuropatickými frakturami. *Vnitř Lék* 2005 (v tisku).
- Gentzkow GD, Iwasaki SD, Hershon KS, et al. Use of dermagraft, a cultured human dermis, to treat diabetic foot ulcers. *Diabetes Care* 1996;19:350–354.
- Gill G, Benbow S, Tesfay S, et al. Painless stress fractures in diabetic neuropathic feet. *Postgrad Med J* 1997; 73:241–242.
- Helm PA, Walker SC, Pullium G. Total contact casting in diabetic patients with neuropathic foot ulcerations. *Arch Phys Med Rehabil* 1984;65:691–693.
- Chantelau E, Breuer U, Leisch AC, et al. Outpatient treatment of unilateral diabetic foot ulcers with „half shoes“. *Diabet Med* 1993;10:267–270.
- Jirkovská A. Aktuální problematika syndromu diabetické nohy. In: *Trendy soudobé diabetologie*. Svazek 5. Praha: Galén, 2001; 53–87.
- Jirkovská A. Diabetická noha. In: Bartoš V, Pelikánová T. *Praktická Diabetologie*. 2. vyd. Praha: Maxdorf, 2000(a); 305–325.
- Jirkovská A. Syndrom diabetické nohy. Mezinárodní konsenzus vypracovaný Mezinárodní pracovní skupinou pro syndrom diabetické nohy. Praha: Galén, 2000b; 1–103.
- Laing P. Diabetic foot ulcers. *Amer J Surgery* 1997;167:315–365.
- Lavery LA, Armstrong DG, Walker SC. Healing rates of diabetic foot ulcers associated with midfoot fracture due to Charcot's arthropathy. *Diabet Med* 1997; 14:46–49.
- Lavery LA, Baranoski S, Ayello EA. Options for off-loading the diabetic foot. *Advances in Skin & Wound Care* 2004;17:181–186.
- Lavery LA, Vela SA, Lavery DC, Quebedeaux TL. Reducing dynamic foot pressures in high-risk diabetic subjects with foot ulcerations. A comparison of treatments. *Diabetes Care* 1996;19: 818–821.
- Myerson M, Papa J, Eaton K, Wilson K. The total-contact cast for management of neuropathic plantar ulceration of the foot. *J Bone Joint Surg Am* 1992; 74:261–269.
- Sinacore DR. Acute Charcot arthropathy in patients with diabetes mellitus: healing times by foot location. *J Diabetes Complications* 1998;12: 287–293.
- Veves A, Falanga V, Armstrong DG, Sabolinski ML. Apligraf Diabetic Foot Ulcer Study. Graftskin, a human skin equivalent, is effective in the management of non-infected neuropathic diabetic foot ulcers: a prospective randomized multicenter clinical trial. *Diabetes Care* 2001;24:290–295.
- Veves A, Sheehan P, Pham HT. A randomized, controlled trial of Promogran (a collagen/oxidized regenerated cellulose dressing) vs standard treatment in the management of diabetic foot ulcers. *Arch Surg* 2002; 137:822–827.
- Wieman TJ, Smiell JM, Su Y. Efficacy and safety of a topical gel formulation of recombinant human platelet-derived growth factor- BB (becaplermin) in patients with chronic neuropathic diabetic ulcers. A phase III randomized placebo-controlled double-blind study. *Diabetes Care* 1998;21:822–827.



ČASOPIS
ČESKÉ SPOLEČNOSTI
HEPATO-PANKREATO-BILIÁRNÍ CHIRURGIE

ROČNÍK 13 / 2005 / 3 – 4

Použití fixačních materiálů k tvorbě fixačních dlah, rigidních a snímatelných fixací

Fejfarová V, Jirkovská A, Křížová M, Pavlů J

Centrum diabetologie, IKEM Praha
Přednosta: Prof. MUDr. Tereza Pelikánová, DrSc.

V současné době přistupujeme komplexně k podiatrické péči o pacienty se syndromem diabetické nohy. Léčba syndromu diabetické nohy (1) zahrnuje kompenzaci diabetu, léčbu infekčních komplikací, chirurgické a radiologické intervence, lokální terapii a v neposlední řadě vhodnou metodu odlehčení dolních končetin (DK). Odlehčovací techniky napomáhají stabilizaci a léčbě abnormalit DK, jelikož odstraní abnormální tlaky působící na chodidla DK. Určité formy odlehčení jsou schopny stabilizovat DK v požadované poloze a snížit tak riziko šíření infekce imobilizací tkání a kloubů (2). Tento mechanismus odlehčení vede k urychlení hojení diabetických ulcerací nebo k prevenci jejich rekurence. Avšak vždy je nutné přizpůsobit typ odlehčení věku, hmotnosti, aktivitě a domácímu prostředí pacienta (3).

Různé metody odlehčení DK jsou indikovány podle přítomné patologie. U pacientů s neuropatickými či neuroischemickými ulceracemi indikujeme obvykle v první fázi onemocnění léčbu terapeutickou „poloviční“ botou s odlehčením příslušné části DK. V naší republice, podobně jako v zahraničí, je již tato metoda hojně používána. Avšak hojení syndromu diabetické nohy není v porovnání s ostatními metodami odlehčení DK tak úspěšné (4).

Pokud v první fázi léčby selže tato metoda terapie, volíme jako další možný prostředek odlehčení DK ortézu typu Walker, Aircast, „vakuovou ortézu“ VACODiaped nebo kontaktní fixaci (5).

V naší praxi se zabýváme především aplikací kontaktních fixací. V základních doporučeních mezinárodní skupiny pro výzkum a léčbu syndromu diabetické nohy (1) je kontaktní fixace metodou volby v léčbě neuropatických ulcerací, akutní a subakutní Charcotovy osteoartrózie. V naší republice je indikace léčby kontaktní fixací omezena zejména finanční dostupností metody, kvalifikací zdravotníků v podiatrické péči a časovou náročností aplikace.

V klinické praxi především z ekonomických důvodů používáme jak pro pacienty s neuropatickými ulceracemi, tak pro pacienty s akutní či subakutní Charcotovou osteoartrózi snímatelnou kontaktní fixaci. Její velkou výhodou je bezpečnější aplikace, možnost ošetření diabetických ulcera-



Obr. 1



Obr. 2

cí a dle klinických studií i urychlené hojení syndromu diabetické nohy (4, 6). U akutní či subakutní Charcotovy osteoartrózie je jednoznačně indikováno odlehčení DK pomocí kontaktní fixace, nejlépe rigidní. Ovšem nevýhodou terapie rigidními fixacemi je fakt, že tato léčba vyžaduje časté ambulantní kontroly a velký počet výměn fixací (při každé ambulantní návštěvě).

Mechanismus působení kontaktní fixace spočívá v redistribuci vertikálních tlaků působících na plantu DK a vyloučení maximálních tlaků na exponovaná místa (7). Kontaktní fixace napomáhá i omezení aktivity pacienta (4). Nevýhodou kontaktní fixace je komplikovanější aplikace a vyšší hmotnost fixace v porovnání s poloviční botou. Dále může kontaktní fixace omezovat pacienta při chůzi, mytí a ve spánku. Největší nevýhodou kontaktní fixace je možný rozvoj otlakových defektů, zvýšený výskyt mykóz, zhoršení pohyblivosti talokrurálního skloubení, progresse defektu a zejména rozvoj infekce a osteomyelitidy. V naší studii, která zkoumala vliv léčby snímatelnými kontaktními fixacemi na hojení syndromu diabetické nohy, se závažné komplikace vedoucí k ukončení této terapie vyskytovaly v 11% případů. Byl zaznamenán vyšší výskyt technických komplikací jakými byly zlomeniny fixací (49%). Druhou nejčastější komplikací (25%) léčby snímatelnými kontaktními fixacemi byly otlakové ulcerace (8).

Dalšími modifikovanými fixačními prostředky jsou fenestrována kontaktní fixace, která je indikována u pacientů s hlubšími neuropatickými ulceracemi (W3) ke snazšímu lokálnímu ošetření DK (obrázek 1) a kontaktní fixace modifikovaná dle Sarmienteho (5). Poslední typ fixace je určen k odlehčení neuropatických ulcerací v terénu výrazných deformit při chronické Charcotově osteoartrózi, k odlehčení DK s osteomyelitidou tarzálních nebo hlezenních kostí (obrázek 2). Výhodou této fixace je změna těžiště příslušné končetiny, které se přesouvá z oblasti plosky do oblasti kolenního kloubu.

Někteří pacienti přicházejí do naší ambulance již s velkou deformitou DK, u které nelze bez korekční ortopedické operace dospět k normalizaci defigurace kloubu. Abychom zabránili rozvoji ještě výraznějších deformit, doporučujeme



Obr. 3



Obr. 4



Obr. 5



Obr. 6

Tabulka 1: Typy materiálů používaných v tvorbě fixací

TYPY MATERIÁLŮ	NÁZEV MATERIÁLU	FIRMA
Krycí materiály	Stockinet	3M, Borken, Německo
	Cellona	Lohmann& Rauscher, Neuwid, Německo
Podkladové a začišť. materiály	Cellona	Lohmann& Rauscher, Neuwid, Německo
	Roltasoft	Hartmann, Heidenheim, Německo
Fixační materiály rigidní	Cellacast-Xtra	Lohmann&Rauscher, Neuwid, Německo
	Scotchcast	3M, Neuss, Německo
	Rhenacast	Hartmann, Heidenheim, Německo
Fixační materiály semirigidní	Softcast	3M, Santé, Francie

odlehčit DK pomocí pojízdného vozíku v kombinaci s fixační dlahou a elastickou bandáží (obrázek 3).

V případě pacientů s neuropatickými ulceracemi nebo s akutní Charcotovou osteoarthropatií a výraznou obezitou (BMI 33-35 kg/m²) doporučujeme místo kontaktních fixací aplikaci plastických ortéz zhotovených přímo na míru (5). Výhodou speciálních ortéz je zlepšení mobility pacienta. Nevýhodou je možný rozvoj otlakových ulcerací při nošení rigidních ortéz.

Američtí autoři modifikovali odlehčení DK pomocí ortězy Walker. Jelikož compliance pacientů léčených touto formou odlehčení nebyla příliš uspokojivá (pacienti nosili ortězu cca 60 % denní doby) (9), zvolili autoři nový způsob aplikace ortězy Walker, a to tzv. „Instant Contact Cast“ (ICC). ICC spočívá v aplikaci již zmíněné ortězy a v jejím následném zasádrování přímo na postižené DK (10).

Zhotovení fixačních prostředků (dlahy, kontaktní fixace):

Ke zhotovení výše zmíněných fixačních prostředků používáme materiály krycí, podkladové, začišťovací a samotné fixační materiály (tabulka 1).

Nejjednoduššími formami fixací jsou L nebo LU dlahy. Typ dlahy vybíráme podle míry nutnosti stabilizace deformity DK, která vznikla na podkladě osteomyelitidy či výrazně zprogreďované akutní Charcotovy osteoarthropatie.



Obr. 7



Obr. 8



Obr. 9



Obr. 10

Pokud chceme aplikovat L či LU dlahu, je nutné nejprve ošetřit DK, zejména pak neuropatickou či neuroischemickou ulceraci. Poté aplikujeme na DK punčochovitý materiál bavlněného charakteru (např. Stockinet, 3M, Borken, Německo). V další fázi se již přikládá speciální filcové krytí (Cellona, Lohmann & Rausher, Neuwid, Německo) (obrázek 4), které má v maximální míře zabránit rozvoji otlakových ulcerací v predispozičních místech deformit a prominencí kostních struktur (kotníky, nárt, event. přední hrana tibie). Dále vytváříme platformu ze sádrovacího obvazu. Následně se již přikládá L dlahu z rigidního materiálu (např. Scotchcast, 3M, Neuss, Německo), která se v některých případech pro zvýšené zpevnění dlahy doplňuje i U dlahou ze stejného materiálu. Vždy je nutné natvarovat DK do požadované polohy – fyziologická flexe v hleznu (90°) a navození fyziologického postavení kloubů DK. Dlahu se zafixuje v požadované poloze pomocí aplikace semirigidního materiálu (Softcast, 3M, Santé, Francie). Následně je nutné zvolit vhodné vykrojení dlahy tak, aby chom se vyhnuli přítomnému defektu a abychom neporušili stabilitu dlahy (obrázek 5). Ve finále upravíme prstovou oblast a okraj dlahy měkkým krycím materiálem tak, aby ostré okraje neporanily končetinu.

Dlahy je vždy nutné aplikovat přímo po lokálním ošetření na DK spolu s elastickou bandáží. Je nutné zdůraznit, že se nejedná o konečné řešení odlehčení postižené DK (konečným je plastická ortéza). Dlahu ve spojení s odlehčením

pomocí pojízdného vozíku je schopna zastabilizovat akutní fázi onemocnění a pomůže překlenout období přechodu nemoci do chronického stadia.

Zhotovení **rigidní kontaktní fixace** je poměrně rychlé a ne příliš složité (obrázek 6). Na již ošetřenou DK aplikujeme punčochovitý materiál (např. Stockinet, 3M, Borken, Německo). V další fázi se již přikládá speciální vatové vypodložení (např. Roltasoft, Hartmann, Heidenheim, Německo), které v maximální míře zabraňuje rozvoji otlakových ulcerací v predispozičních místech, která jsou charakteristická tenkou vrstvou kůže a podkoží a prominencí kostních struktur (viz výše). Na takto připravenou DK natočíme rigidní materiál (např. Scotchcast, 3M, Neuss, Německo) takovým způsobem, že okopírujeme přesně povrch těla. Tvar fixace se snažíme uzpůsobit fyziologickému postavení DK (fyziologické postavení kloubů DK a flexe v talokrurálním skloubení 90°). V poslední fázi se tvaruje prstová oblast fixace pomocí měkkého krycího vypodložení.

V naší republice se v poslední době nejčastěji rozšiřuje aplikace **snímatelných kontaktních fixací** (8, 11). Existuje již řada zahraničních studií jak amerických (4,12-14), tak evropských (15), které jednoznačně prokazují výrazný benefit léčby kontaktními fixacemi na hojení syndromu diabetické nohy.

Zhotovení snímatelné kontaktní fixace probíhá v několika etapách (11). V první řadě je nutné u pacientů s neuropatickými ulceracemi ošetřit vřed pomocí lokálního debri-

dementu a na povrch ulcerace vložit vhodné lokální krytí (obrázek 7; 11). Abychom docílili maximálního odlehčení dané ulcerace, aplikujeme do okolí defektu silné filcové vypodložení (Cellona, Lohmann and Rausher, Neuwid, Německo), které vytváříme podle plošky nohy, velikosti a pozice defektu (obrázek 8). Na takto připravenou DK se natahuje punčochovitý materiál (např. Stockinet, 3M, Borken, Německo) a následně speciální filcové krytí (Cellona, Lohmann and Rausher, Neuwid, Německo) (obrázek 9). Stabilitu snímatelné fixace je docíleno aplikací rigidních materiálů ve formě dlah. Na plantu DK se aplikuje klasický sádrový obvaz. Dále se přikládá k plošce DK a na zadní plochu lýtku dlaha z rigidního materiálu, která je ve tvaru písmene L (např. Scotchcast, 3M, Neuss, Německo). Nejdůležitější fází při zhotovení snímatelné TCC je aplikace semirigidního materiálu (Softcast, 3M, Santé, Francie). Ten musí kopírovat povrch DK a zafixovat jej v požadované poloze, a to v 90° dorzální flexi v hlezenním kloubu. Obvykle se materiál natáčí na DK ve 2-3 vrstvách. Ke konci zhotovení fixace je upravována prstová oblast fixace tak, aby se vytvořil dostatečný prostor pro prsty DK a aby bylo možné je vizuálně kontrolovat (obrázek 10). Po 20 minutách po zatvrdnutí materiálu je kontaktní fixace rozštířena. Posledním krokem v aplikaci snímatelné kontaktní fixace je vyrobení malé snímatelné rigidní dlaha, která se umísťuje do pretibiální oblasti. Tato dlaha má schopnost zabránit třecím pohybům uvnitř sádry. Taktéž brání tvorbě zlomenin fixace v oblasti kotníku, které mohou vznikát časným nebo nepřipustným pohybem hlezna při došlapu. Konečné úpravy fixace spočívají v oblepení TCC náplastí a tenkým podkladovým filcovým materiálem.

Závěrem lze shrnout, že různé metody fixací nám pomáhají zastabilizovat patologický proces na DK nebo vést k úspěšnému vyléčení pacientů s neuropatickými ulceracemi a akutní Charcotovou osteoartrózi. I přes poměrně velkou finanční a časovou náročnost aplikace fixací z kontaktních materiálů doufáme, že dojde k jejímu většímu rozšíření i v naší podiatrické péči.

Práce byla podporována grantem IKEM (MZO 00023001).

Literatura

1. Jirkovská A.: Syndrom diabetické nohy. Mezinárodní konsenzus vypracovaný Mezinárodní pracovní skupinou pro syndrom diabetické nohy, 1. vydání, Galén, Praha, str. 1-103

2. Jirkovská A.: Aktuální problematika syndromu diabetické nohy. In: Trendy soudobé diabetologie, Svazek 5, 1. vydání, Galén, Praha, 2001, str. 53-87

3. Calhoun JH., Overgaard KA., Stevens CM., Dowling JP., Mader JT.: Diabetic foot ulcers and infections: current concepts. *Adv Skin Wound Care*, 2002, 15: 31-42

4. Armstrong DG., Nguyen HC., Lavery LA., van Schie CH., Boulton AJ., Harkless LB.: Off-loading the diabetic foot wound. *Diabetes Care*, 2001, 24: 1019-1022

5. Fejfarová V., Křížová M., Jirkovská A., Bém R., Pavlů J.: Moderní prostředky k fixaci a odlehčení diabetické nohy. *Diagnóza*, 2005, 1(1): 13-15

6. Myerson M., Papa J., Eaton K., Wilson K.: The total-contact cast for management of neuropathic plantar ulceration of the foot. *J Bone Joint Surg Am*, 1992, 74: 261-269

7. Laing P.: Diabetic foot ulcers. *The American Journal of Surgery*, 1997, 167: 31S-36S

8. Fejfarová V., Jirkovská A., Bém R., Křížová M., Šindelářová V., Fexová P., Skibová J.: Komplikace léčby syndromu diabetické nohy pomocí snímatelných kontaktních fixací se zaměřením na osteomyelitidu. *Praktický lékař*, 2005, 85(6): 348-352

9. Armstrong DG., Lavery LA., Kimbriel HR., Nixon BP., Boulton AJ.: Activity patterns of patients with diabetic foot ulceration: patients with active ulceration may not adhere to a standard pressure off-loading regimen. *Diabetes Care*, 2003, 26: 2595-2597

10. Armstrong D., Lavery L., Wu S., Boulton A.: Evaluation of Removable and Irremovable Cast Walkers in the Healing of Diabetic Foot Wounds. *Diabetes Care*, 2005, 28(3): 551-554

11. Fejfarová V., Jirkovská A., Křížová M., Skibová J.: Účinnost léčby snímatelnými kontaktními fixacemi u pacientů s neuropatickými ulceracemi, akutní Charcotovou osteoartrózi a neuropatickými frakturami. *Vnitřní lékařství*, 2005, 51: 988-994

12. Lavery LA., Vela SA., Lavery DC., Quebedeaux TL.: Reducing dynamic foot pressures in high-risk diabetic subjects with foot ulcerations. A comparison of treatments. *Diabetes Care*, 1996, 19: 818-821

13. Lavery LA., Armstrong DG., Walker SC.: Healing rates of diabetic foot ulcers associated with midfoot fracture due to Charcot's arthropathy. *Diabet Med*, 1997, 14: 46-49

14. Lavery LA., Baranoski S., Ayello EA.: Options for Off-Loading the Diabetic Foot. *Advances in Skin & Wound Care*, 2004, 17: 181-186

15. Caravaggi C., Faglia E., De Giglio R.: Effectiveness and safety of a nonremovable fiberglass off-bearing cast versus a therapeutic shoe in the treatment of neuropathic foot ulcers: a randomized study. *Diabetes Care*, 2000, 23: 1746-1751

Adresa pro korepondenci:

MUDr. Vladimíra Fejfarová
Centrum diabetologie, IKEM Praha
Videňská 1958/9
140 21 Praha 4 – Krč



ČASOPIS
ČESKÉ SPOLEČNOSTI
HEPATO-PANKREATO-BILIÁRNÍ CHIRURGIE

ROČNÍK 11 / 2003 / 1

Léčba syndromu diabetické nohy kontaktní fixací

Fejfarová, V., Jirkovská, A., Křížová, M., Fexová, P.

Klinika diabetologie, IKEM, Praha

Přednostka: Prof. MUDr. Terezie Pelikánová, DrSc.

Souhrn

Syndrom diabetické nohy je jednou z pozdních komplikací onemocnění diabetes mellitus. Součástí syndromu diabetické nohy bývají ve většině případů neuropatické či neuroischemické ulcerace vyžadující dlouhodobou terapii, při které nedochází vždy k uspokojivému hojení. Kromě klasického postupu v léčbě diabetických ulcerací pomocí polovičních bot zavádíme v poslední době i novější metodu odlehčení ulcerací, a to metodu aplikace snímatelných kontaktních fixací. Tato metoda se zdá být účinnější oproti léčbě speciálně upravenými botami či poloviční botou, nicméně metoda je časově i personálně náročná.

Klíčová slova: kontaktní fixace, syndrom diabetické nohy

Summary

Total contact cast in the treatment of the diabetic foot

Prof. MUDr. Terezie Pelikánová, DrSc.

The diabetic foot is one of the late complications of diabetes mellitus. Neuropathic or neuroischemic ulcers represent the most cases of the diabetic foot. These ulcers require long-lasting therapy, which does not achieve always successful outcomes. Instead of classic principle of diabetic foot therapy by half shoes, we introduced a new off-loading method – application of removable total contact cast. This treatment seems to be more effective in comparison with the therapy by special shoes or half shoes. However this method is timely consuming and requires team approach.

Key words: total contact cast, diabetic foot

Syndrom diabetické nohy je jednou z pozdních komplikací diabetu. U 10 % pacientů s diabetem dojde k rozvoji diabetických ulcerací (Konsensus 1999), které jsou neuropatického, neuroischemického či ischemického původu. Ulcerace dolních končetin se objevují u pacientů s diabetem vlivem alterace autonomních, motorických a sensorických nervových vláken. Porušená inervace vede k rozvoji predispozičních faktorů a malformací, mezi něž řadíme vznik kladívkových prstů, rozvoj prominencí metatarsálních hlaviček a ztráty podélné či příčné klenby (Konsensus 1999). Výše jmenované faktory vedou ke zvýšení tlaku v určitých predominantních místech, kterými se stávají u pacientů s diabetem především hlavičky metatarsálních kostí a oblast calcaneu.

Další součástí syndromu diabetické nohy je tzv. Charcotova osteoartropatie, při které dochází ke zvýšené kostní resorpci,

kteřá je způsobena zvýšeným krevním průtokem v distálních partiích dolních končetin (AV shuntů) a dále zvýšenou osteoklastickou aktivitou. Tyto patofyziologické mechanismy často vedou k patologickým frakturám kostí. Charcotova osteoartropatie postihuje zejména tarsometatarsální a metatarsophalangeální klouby (Imhoff 1988).

Standardní léčba syndromu diabetické nohy se skládá z několika kroků. Prvním je lokální terapie syndromu diabetické nohy pomocí debridementu a odstranění hyperkeratóz. Součástí terapie syndromu diabetické nohy je antibiotická léčba infekce, jelikož většina diabetických ulcerací bývá velmi často infikována polygenní mikrobiální flórou (Lavery et al. 1995), která znesnadňuje hojivost ulcerace. Nedílnou součástí léčby syndromu diabetické nohy je i metabolická kontrola, tzn. kontrola kompenzace diabetu (HbA_{1c}), lipidového spektra, hmotnosti. U diabetických ulcerací je dále nutné najít vhodnou formu odlehčení dolních končetin ať již pomocí speciálně upravených bot, polovičních bot, nebo i nově kontaktních fixací (Konsensus 1999).

Charcotova osteoartropatie vyžaduje rekalcifikační terapii a odlehčení dolních končetin pomocí snímatelných či rigidních kontaktních fixací (Jirkovská 2001).

Aplikace kontaktních fixací má několik nesporných předností. Jednou z nich je rovnoměrné rozložení tlaku působícího na dolní končetinu, což lze vyšetřit pomocí distribuce tlaků rozložených v plantě dolní končetiny (podometr). Dále jsou kontaktní fixace schopny redukovat rozvoj edémů dolních končetin.

V literatuře již existuje celá řada studií zkoumajících účinek kontaktních fixací na hojivost diabetické nohy. Některé studie porovnávají zejména účinnost různých typů odlehčení dolních končetin včetně kontaktních fixací. Např. Caravaggi a spol. prokázali urychlené hojení ran při léčbě kontaktními fixacemi (TCC) v porovnání s ulceracemi léčenými speciálně upravenou terapeutickou obuví. Prokázali zhojení 50 % ulcerací při léčbě TCC oproti 21 % léčeným speciální obuví (Caravaggi et al. 2000). Při srovnání hojivosti diabetických ulcerací pomocí různých metod odlehčení prokázali američtí autoři výrazně vyšší procento hojivosti diabetických ulcerací při léčbě TCC v porovnání se snímatelnými dlahami a polovičními botami (90 % vs. 65 % vs. 58 %, respektive). Při hodnocení aktivity pacientů pomocí krokoměru byli pacienti léčení TCC méně aktivní ve srovnání s ostatními dvěma skupinami (Armstrong et al. 2001). Ve studii Lainga a spol. došlo u 80 % diabetických ulcerací léčených TCC ke zhojení během 2 měsíců. Infekční komplikace léčby TCC se objevily pouze u 2 % případů (Laing et al. 1994).

Kontaktní fixace, jak již bylo zmiňováno, se využívají i k terapii Charcotovy osteoartropatie. Pomocí TCC dochází k zlepšení klinických známek tohoto onemocnění (redukce kožní teploty, edémů) a ke zlepšení kostního nálezu při densitometrii již za 1 rok po léčbě TCC (McGill et al. 2000).

Kontaktní fixace

Existují základní 3 typy kontaktních fixací dolních končetin,

kteří se používají při léčbě syndromu diabetické nohy. Prvním typem je **rigidní kontaktní fixace**, která se používá zejména při léčbě Charcotovy osteoartropatie, diabetických ulcerací Wagner 1-2 zejména u hůře spolupracujících pacientů. Tento typ kontaktních fixací je kontraindikován u absolutně nespoupracujících pacientů, imobility talokurálního skloubení, výrazného edému dolních končetin, flegmony dolních končetin, u hlubších diabetických ulcerací (více než Wagner 2) a u ulcus cruris. Nevýhodou této terapie je finanční náročnost, jelikož je nutné rigidní TCC vyměňovat 1x týdně.

Snímatelná kontaktní fixace je indikována u hlubších diabetických ulcerací (W1-3), u Charcotovy osteoartropatie, patologických fraktur v terénu Charcotovy osteoartropatie či osteomyelitidy. U osteomyelitidy je nutné uváženě indikovat terapii snímatelnými TCC, jelikož dle klinických zkušeností u hlubších ulcerací s osteomyelitidou může dojít při nedostatečné drenáži ke zhoršení lokálních projevů infekce. Snímatelnou TCC není vhodné aplikovat u nespoupracujících pacientů, imobility talokurálního skloubení, u pacientů s výraznou flegmonou či edémem dolní končetiny a s ulcus cruris. Nevýhodou léčby snímatelnou TCC je opět finanční, časová a dále i personální náročnost, jelikož zhotovení jedné snímatelné TCC trvá obvykle 50-70 minut.

Poslední formou kontaktních fixací je **alternativní aplikace kontaktních materiálů** formou speciálně zhotovené obuvi. Jedním z prototypů je tzv. „Mabel“ shoe autorů Baal a Manning, kteří aplikují fixační materiál v podobě snímatelné boty s uzavřenou špičkou, která se nosí společně se speciální ortopedickou podložkou. Druhý typ boty, pracovní nazvaný „Rhoermond shoe“, autorů Droogmans a Boogers se liší od prvně zmiňované rovnou platformou, odepínatelnou podešví a speciální vyjímatelnou vložkou, která se při tepelném zpracování formuje dle plochy nohy. Tyto alternativní formy fixací se používají u ulcerací prstů a oblasti metatarsálních hlaviček. Není vhodné je aplikovat u pacientů se sníženou mobilitou talokurálního skloubení a u edému dolních končetin. Dle zkušeností z podiatrických pracovišť v Holandsku mají pacienti léčení alternativními formami fixací lepší compliance v porovnání s pacienty léčenými TCC.

Na našem pracovišti jsme zavedli nově modifikovanou metodu aplikace snímatelných kontaktních fixací. Zkušenosti s aplikací jsme načerpali během studijních stáží v Maastrichtu, Rhoermondu a Almelo. Před samostatnou aplikací snímatelné TCC provádíme lokální ošetření diabetické ulcerace pomocí debridementu a odstranění hyperkeratózy. Jako lokální terapeutika používáme moderní prostředky pro hojení ran, jakými jsou alginátové preparáty, silikonové adherentní krytí či absorbující materiály, zejména polyuretanovou matrix. Do okolí ošetřených ulcerací se často používají preparáty zabraňující maceraci pokožky v okolí ulcerace (akrylátový kopolymer). Po lokálním ošetření a filcovém vypodložení dolní končetiny aplikujeme fixační materiál. Nejprve začínáme s aplikací rigidních materiálů ve formě dlah. Rigidní materiály mají tu výhodu, že udržují formu dle tvaru a povrchu těla a mají vyšší odolnost vůči zátěži, nežli má klasická sádra. Poté aplikujeme semirigidní

materiál k formaci kontaktní fixace. Semirigidní materiál udržuje formu podle tvaru a povrchu těla, umožňuje pohyblivost svalů a tím zlepšuje venózní návrat a působí protiedémově. V konečné fázi provádíme rozstřížení a začištění nové TCC.

Na snímatelnou TCC aplikujeme speciálně upravenou botu a doporučujeme takto léčeným pacientům nošení podpažních berlí ke zvýšení účinnosti maximálního odlehčení. Důležitá je taktéž edukace pacienta, tzn. poučení pacienta o správné chůzi, péči o snímatelnou TCC a včasné podiatrické kontrole při objevení se jakýchkoli komplikací (flegmona, nová ulcerace, poškození TCC).

Při léčbě snímatelných TCC se mohou objevovat různé komplikace, mezi něž se řadí macerace kůže v okolí ulcerace, interdigitální mykózy, tinea pedis, nové ulcerace dolních končetin, bolesti kloubů dolní končetiny či kontralaterální končetiny nebo páteře. Ke komplikacím při léčbě kontaktními fixacemi dochází častěji u pacientů s horší compliancí.

Doposud bylo provedeno 38 kontaktních fixací pro diabetické ulcerace, osteomyelitidu, Charcotovu osteoartropatii, patologické fraktury v terénu osteomyelitidy či Charcotovy osteoartropatie.

Závěrem můžeme shrnout, že léčba syndromu diabetické nohy (diabetických ulcerací, Charcotovy osteoartropatie) snímatelnými kontaktními fixacemi vede ke zkrácení doby hojení, redukuje dobu pracovní neschopnosti a imobility pacienta. Tato léčba je materiálně i časově náročnější z hlediska zdravotního personálu. Finanční otázka nákladnosti této léčby zůstává zatím nezodpovězena, jelikož doposud nebyly provedeny srovnávací studie zkoumající finanční rozpočet léčby syndromu diabetické nohy klasickou metodou versus snímatelnou TCC.

Literatura

- 1 – Armstrong, D. et al.: Off-Loading the diabetic Foot Wound. *Diabetes Care*, 24, 2001: 1019-1022
- 2 – Caravaggi, C. et al.: Effectiveness and safety of a nonremovable fiberglass off-bearing cast versus a therapeutic shoe in the treatment of neuropathic foot ulcers: a randomized study. *Diabetes Care*, 23, 2000:1746-1751
- 3 - International Working Group on the The diabetic foot: The diabetic foot Infections. In *International Consensus on the Diabetic*, Holandsko, 1999
- 4 – Imhoff, A.: Diabetic Osteoarthropathy. Course and differential diagnosis. *Z Orthop Ihre Grenzgeb*, 126, 1988: 169-178
- 5 - Laing et al.: Diabetic foot ulcers. *The American Journal of Surgery*, 167, 1994: 30-35
- 6 – Lavery, L.A., Walker, S.C., Harkless, L.B., Felder-Johnson, K.: Infected puncture wounds in diabetic and nondiabetic adults. *Diabetes Care*, 18, 1995: 1588-1591

Adresa pro korespondenci:
MUDr. Vladimíra Fejfarová
Klinika diabetologie, IKEM
Videňská 1958/9
140 21 Praha 4

SYNDROM DIABETICKÉ NOHY

Alexandra Jirkovská a kolektiv



Literatura

1. Armstrong DG, Abu-Rumman PL, Nixon BP, Boulton AJ.: Continuous activity monitoring in persons at high risk for diabetes-related lower-extremity amputation. *J Am Podiatr Med. Assoc.* 2001;91:451–5
2. Bus SA, Yang QX, Wang JH, Smith MB, Wunderlich R, Cavanagh PR.: Intrinsic muscle atrophy and toe deformity in the diabetic neuropathic foot: a magnetic resonance imaging study. *Diabetes Care.* 2002;25:1444–50
3. Levin M, O'Neil LW, Bowker JH.: *The Diabetic Foot*, ed. 5 Mosby Year Book, 1993.
4. Veves A, Murray HJ, Young MJ, Boulton AJ.: The risk of foot ulceration in diabetic patients with high foot pressure: a prospective study. *Diabetologia.* 1992;35:660–3.
5. Young MJ, Cavanagh PR, Thomas G, Johnson MM, Murray H, Boulton AJ.: The effect of callus removal on dynamic plantar foot pressures in diabetic patients. *Diabet Med.* 1992; 9:55–7
6. van Schie CH, Whalley A, Armstrong DG, Vileikyte L, Boulton AJ.: The effect of silicone injections in the diabetic foot on peak plantar pressure and plantar tissue thickness: a 2-year follow-up. *Arch Phys Med Rehabil.* 2002;83:919–23.
7. Mueller MJ, Sinacore DR, Hastings MK, Strube MJ, Johnson JE.: Effect of Achilles tendon lengthening on neuropathic plantar ulcers. A randomized clinical trial. *J Bone Joint Surg Am.* 2003;85-A:1436–45
8. Záhumenský E, Hlaváček P.: Profylaktická a terapeutická obuv. In: Tošenovský P, Edmonds ME et al. *Moderní léčba syndromu diabetické nohy.* Galén 2004
9. Reiber GE, Smith DG, Wallace C, Sullivan K, Hayes S, Vath C, Maciejewski ML, Yu O, Heagerty PJ, LeMaster J.: Effect of therapeutic footwear on foot reulceration in patients with diabetes: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2002;287:2552–8
10. Armstrong DG, Peters EJ, Athanasiou KA, Lavery LA: Is there a critical level of plantar foot pressure to identify patients at risk for neuropathic foot ulceration? *J Foot Ankle Surg.* 1998;37:303–7
11. Český normalizační institut: Česká technická norma ČSN 79 5600,2004
12. Veves A, Masson EA, Fernando DJ, Boulton AJ.: Use of experimental padded hosiery to reduce abnormal foot pressures in diabetic neuropathy. *Diabetes Care.* 1989;12:653–5
13. Murray HJ, Veves A, Young MJ, Richie DH, Boulton AJ.: Role of experimental socks in the care of the high-risk diabetic foot. A multicenter patient evaluation study. *American Group for the Study of Experimental Hosiery in the Diabetic Foot. Diabetes Care.* 1993;16:1190–2
14. Busch K, Chantelau E.: Effectiveness of a new brand of stock 'diabetic' shoes to protect against diabetic foot ulcer relapse. A prospective cohort study. *Diabet Med.* 2003;20:665–9
15. Katz IA, Harlan A, Miranda-Palma B, Prieto-Sanchez L, Armstrong DG, Bowker JH, Mizel MS, Boulton AJ.: A randomized trial of two irremovable off-loading devices in the management of plantar neuropathic diabetic foot ulcers. *Diabetes Care.* 2005;28:555–9

7.3 LÉČBA SPECIÁLNÍMI KONTAKTNÍMI FIXACEMI

A. Jirkovská, V. Fejfarová

7.3.1 Mechanismus účinku speciální kontaktní fixace

Speciální kontaktní fixace (total contact cast – TCC) patří k neefektivnějším způsobům terapie diabetických ulcerací. **Hlavním léčebným účinkem speciální kontaktní fixace je snížení vertikálního plantárního tlaku jeho rozložení na celou plochu nohy i bérce a snížení horizontálního stříhového pnutí (tření).** Dalším příznivým efektem TCC je snížení rizika šíření infekce při imobilizaci tkání a kloubů. Plocha, na níž se rozkládá tlak, se může aplikací TCC zvýšit o 15–24 % a toto poměrně malé zvýšení plochy vede k dramatickému snížení plantárního tlaku v exponovaných místech [1]. Např. vertikální tlak byl pomocí kontaktní fixace snížen až o 75 %, jak bylo prokázáno pedobarometrickým měřením v oblasti hlaviček prvního a třetího metatarzu [2]. Relativně nejméně snižuje TCC plantární tlak v oblasti paty a nejvíce v oblasti přednoží [1]. Klinické studie prokázaly, že TCC je „zlatým standardem“ v odlehčení diabetických ulcerací. Nejde o metodu novou, již v roce 1930 ji použil k léčbě plantární ulcerace u pacienta s leprou Dr. Joseph Kahn a zkrátil tak výrazně dobu hospitalizace a imobilizace na lůžku [1].

Dříve se na kontaktní sádku používaly klasické rigidní materiály, v poslední době jsou ale nahrazovány novými méně rigidními nebo elastickými materiály (na bázi sklolaminátu). Novější materiály jsou charakteristické větší plasticitou, jsou lehčí a při jejich použití je menší riziko nežádoucích účinků, především poškození kůže třením.

7.3.2 Postup při zhotovení nesnímatelných i snímatelných kontaktních fixací a modifikované kontaktní fixace

TCC se nasazují pacientům s neuropatickými ulceracemi až po zvládnutí akutních lokálních i celkových projevů infekce (pacient by měl být vždy afebrilní, bez výrazné elevace CRP, bez flegmony či otoku a bez hnisavé sekrece z rány). U pacientů s akutní Charcotovou osteoartropatií či neuropatickými frakturami aplikujeme kontaktní fixaci po ústupu výrazných edémů dolní končetiny.

Kontaktní fixace je možno zhotovit dvěma základními postupy. První z metod slouží k aplikaci tzv. nesnímatelné kontaktní fixace a druhá ke snímatelné

kontaktní fixaci. **Nesnímatelná TCC** se zhotovuje pouze z měkkého podkladového materiálu (např. Cellona Synthetikwatte, Lohmann & Rausher, Rengsdorf, Německo; Roltasoft, Hartmann, Heidenheim, Německo) a z rigidních materiálů (např. Scotchcast, 3 M, Neuss, Německo; Cellacast Xtra, Lohmann & Rausher, Neuwid, Německo; Rhenacast, Hartmann, Heidenheim, Německo).

Postup při aplikaci nesnímatelné kontaktní fixace

Nejprve se u pacientů s neuropatickými ulceracemi, které chceme léčit TCC, provede ošetření vředu pomocí lokálního debridementu. Do okolí ulcerace se aplikuje např. Cavilon (3 M, St. Paul, USA), který svými vlastnostmi bariérového filmu zabrání maceraci kůže v okolí vředu. Poté se obvykle lokálně aplikuje vhodná desinficiens a polyuretanové krytí (např. Allevyn Copression, Smith & Nephew, Hull, Velká Británie), které se fixuje k ulceraci hypoalergenní náplastí. Abychom docílili maximálního odlehčení dané ulcerace, aplikujeme do okolí defektu silné filcové vypodložení (např. Cellona, Lohmann & Rausher, Neuwid, Německo), které vytváříme podle plošky nohy, velikosti a pozice defektu.

Po lokálním ošetření dolní končetiny se noha obváže do výše kolene jemnou podkladovou vatou, která má zabránit rozvoji otlakových ulcerací uvnitř nesnímatelné fixace. Podkladová vata je dále překryta tenkou polopropustnou membránou nebo impregnovaným krepovým papírem. Tyto materiály mají schopnost okopírovat povrch těla a zamezit možnému vytvoření překlada z vaty. Na takto připravenou a obvázanou dolní končetinu již aplikujeme ve 2–3 vrstvách rigidní obvazy, které přilnou těsně k povrchu končetiny. Vždy je nutné, aby pacient udržoval při zhotovení fixace fyziologickou dorzální flexi v hlezenním kloubu pod úhlem 90 stupňů. V poslední fázi zhotovení nesnímatelné TCC je nutné upravit prstovou část kontaktní fixace (otevření TCC a uvolnění oblastí prstů tak, aby bylo možno s prsty volně hýbat a pravidelně je vizuálně kontrolovat). Z bezpečnostních důvodů je vhodné okraje nesnímatelné fixace oblepit náplastí nebo tenkým filcovým podkladovým materiálem.

Postup při zhotovení snímatelné kontaktní fixace (obr. 7.14)

Zhotovení snímatelné TCC probíhá v několika etapách [3]. V první řadě je nutné u pacientů s neuropatickými ulceracemi ošetřit vřed pomocí lokálního debridementu. Podle typu ulcerace doporučujeme aplikovat do vředu vhodnou lokální desinficiens (např. chlorhexidin) nebo polyuretanové, silikonové krytí či alginát (např. Allevyn Compression, Allevyn Cavity, Smith & Nephew, Hull, Velká

Británie; Mepilex, Tendra, Göteborg, Švédsko; Ialugen Plus, IBSA, Lugano, Švýcarsko; Kaltostat, ConvaTec, Princeton, Velká Británie; Bactigras, Smith & Nephew, Hull, Velká Británie). Lokální terapeutikum se fixuje k ulceraci pomocí hypoalergenních náplastí (obr. 7.14 a). Podobně jako u nesnímatelných fixací se do okolí defektu přikládá silné filcové vypodložení, které se tvaruje podle plošky nohy, velikosti a pozice defektu (obr. 7.14 b).

Na takto připravenou dolní končetinu se natahuje punčochový materiál bavlněného charakteru (např. Stockinet, 3 M, Borken, Německo). V další fázi se již přikládá speciální filcové krytí (např. Cellona, Lohmann & Rausher, Neuwid, Německo; obr. 7.14 c), které má v maximální míře zabránit rozvoji otlakových ulcerací v predisponovaných místech, která jsou charakteristická tenkou vrstvou kůže a podkoží a prominencí kostních struktur (kotníky, přední hrana tibie, nárt).

Stabilita snímatelné fixace je docílena aplikací rigidních materiálů ve formě dlah. Na plantu dolní končetiny se aplikuje klasický sádrový obvaz. Dále se přikládá k plosce dolní končetiny a na zadní plochu lýtkva dlaha z rigidního materiálu, která je ve tvaru písmene L.



Obr. 7.14 a–e Postup při zhotovení snímatelné kontaktní fixace v léčbě diabetické nohy

Nejdůležitější fází během zhotovení snímatelné TCC je aplikace semirigidního materiálu. Ten musí kopírovat povrch dolní končetiny a zafixovat hlezenní kloub v požadované poloze a to v 90stupňové dorzální flexi (obr. 7.14 d), obvykle se materiál natáčí na dolní končetinu ve 2–3 vrstvách. Ke konci zhotovení fixace je upravována prstová oblast (viz výše). Po 20 minutách po zatvrdnutí materiálu je kontaktní fixace rozstřížena. Posledním krokem v aplikaci snímatelné TCC je vyrobení malé snímatelné rigidní dlaha, která se umísťuje do pretibiální oblasti (obr. 7.14 e). Tato dlaha má schopnost zabránit třecím pohybům uvnitř sádry. Taktéž brání tvorbě zlomenin fixace v oblasti kotníku, které mohou vznikat časným nebo nepřipustným pohybem hlezna při došlapu. Konečné úpravy fixace spočívají opět v oblepení TCC náplastí a tenkým podkladovým filcovým materiálem (vytvoření jazyka pretibiálně).

Modifikované kontaktní fixace

Na našem pracovišti se pokoušíme modifikovat metodiku aplikace kontaktních fixací. Zhotovujeme fenestrované snímatelné kontaktní fixace, fixace dle Sarmienteho a v poslední době i obuv z fixačního materiálu. Zhotovení prvně zmiňované fixace (obr. 7.15) je obdobné jako zhotovení klasické snímatelné TCC. Fe-



Obr. 7.15 Modifikovaná kontaktní fixace

Obr. 7.16 Plastová fixační obuv

nestrace fixace se provádí v místě defektu nožem nebo speciální pilou. Fenestrace zlepšuje možnost ošetření ulcerace a zabrání maceraci a uzavření hluboké rány v umělém prostoru, jakým kontaktní fixace bezesporu je.

Fixace dle Sarmienteho se zhotovuje speciálními protetickými technikami. Příprava dolní končetiny je prakticky shodná jako při zhotovení snímatelné TCC až do fáze aplikace tenkého filcového krytí na dolní končetinu. Následně se rigidní L dlaha aplikuje pretibiálně. Její přiložení je ještě doplněno o přiložení rigidního materiálu do oblasti kondylů tibie a patelly. Poslední zpevňovací komponentou je U dlaha, která se přikládá na dolní končetinu v oblasti obou kotníků, mediální a laterální strany bérce. Po správném vytvarování všech dlah se natáčí na dolní končetinu semirigidní materiál (ve dvou až třech vrstvách). Opět je nutné se při jeho natáčení snažit udržet dorzální flexi v hlezenním kloubu. V další fázi se upravuje prstová oblast kontaktní fixace (viz výše). TCC se po vytvrdnutí rozstříhuje ne pretibiálně, jak je obvyklé u snímatelné TCC, ale na zadní ploše lýtky. Finální úpravy jsou stejné jako u klasické snímatelné TCC.

Vhodnou modifikací TCC může být mechanická izolace oblasti rány pomocí pěnové hmoty aplikované na ránu a nejbližší okolí, která vytvoří při obtisku dutinu a odlehčí ještě více (až o 39 %) místo ulcerace ve srovnání s klasickou TCC [4]. Poslední modifikovanou fixační metodou určenou k odlehčení neuropatických ulcerací zejména v oblasti přednoží je tvorba **plastové fixační obuvi** (obr. 7.16). Některé z typů obuvi („Mabel shoe“, scotch cast boot apod.) se poměrně zřídka používají v zahraničí.

7.3.3 Indikace a kontraindikace speciální kontaktní fixace

Indikací pro TCC jsou především neuropatické diabetické ulcerace Wagnerovy klasifikace I a 2. Při použití novějších sklolaminátových materiálů, zvláště semirigidních, je možné aplikovat tuto léčbu i na ulcerace neuroischemické. Další indikací je akutní a subakutní Charcotova osteoartropatie a neuropatické fraktury.

Při dobré monitoraci pacienta je možné léčit pomocí TCC i hlubší ulcerace, případně ulcerace s chronickou osteomyelitidou. O vhodné indikaci tohoto způsobu léčby ale nerozhoduje pouze lokální nález, ale i celkový stav pacienta, jeho compliance a sociální situace.

Kontroverzním problémem je ovlivnění kostní hmoty při imobilizaci končetiny kontaktní fixací. Dříve se předpokládalo, že dochází ke kostní demineralizaci typu Sudeckovy atrofie, v poslední době však převládá názor, že dočasná imobilizace naopak pomáhá kostní remodelaci (omezuje aktivaci osteolýzy mikrotraumy i zatížením).

Mezi výhody léčby diabetických ulcerací speciální kontaktní sádrou patří:

- velké snížení plantárního tlaku i stříhových sil umožňující výrazné urychlení hojení ulcerace
- zajištění odlehčení ulcerace i při nespolupráci pacienta s jinými způsoby odlehčení
- možnost ambulantní léčby
- snížení rizika šíření infekce znehybněním tkání
- ochrana končetiny před dalším traumatem
- prevence edémů a léčba menších edémů
- léčba i prevence dalších fraktur a mikrofraktur kostí nohy u akutní a subakutní Charcotovy osteoartropatie
- cena léčby ulcerací kontaktní sádrou je obvykle nižší než cena převazového materiálu a topických prostředků při klasickém způsobu léčby

Mezi kontraindikace speciální kontaktní sádry patří:

- klinicky významná lokální nebo celková akutní infekce, protože nesnímatelná TCC neumožňuje denní převazy a kontrolu rány a hrozí riziko šíření infekce
- hluboká ulcerace, jejíž drenáž je nedostatečná (tuto ulceraci je nutné nejprve široce otevřít tak, aby předčasná uzavření nevedlo k aktivaci hluboké infekce)
- velký edém, který je nutné nejprve zmenšit tak, aby aplikovaná kontaktní sádra dobře přilnula a nedocházelo ke tření a poškození kůže v případě fluktuujícího edému
- výrazně fragilní kůže dolní končetiny (např. při chronické kortikoterapii nebo chronické žilní insuficienci s bérčovými ulceracemi nebo při výskytu neuropatické bullosis diabeticorum)
- non-compliance pacienta, především neochota pravidelně docházet na kontroly nebo nedodržování lékařských doporučení, neschopnost rozpoznat komplikace, nezáměr o tento způsob léčby
- opatrnosti je třeba u extrémně obézních pacientů, slepých diabetiků a pacientů s pohybovou nestabilitou (např. parézami či ataxií)
- relativní kontraindikací je i těžká ICHDK, protože hrozí zhoršení krevního průtoku a vznik dalších ulcerací

Mezi hlavní nevýhody a rizika léčby speciální kontaktní sádrou patří:

- aktivace hluboké infekce (nejčastěji chronické osteomyelitidy) při nedostatečné kontrole lokálního nálezu a nedostatečném zajištění léčby antibiotiky
- ztuhnutí kloubů a atrofie svalů při dlouhodobé aplikaci
- nové kožní léze při nesprávné aplikaci speciální kontaktní sádry nebo při její nedostatečné kontrole
- macerace okolní kůže nebo zápach při excesivní sekreci z rány
- mykotické infekce
- mechanické komplikace – zlomeniny fixace
- zlomeniny kostí dolní končetiny
- bolesti v oblasti páteře a nosných velkých kloubů
- omezení mobility pacienta, jeho denních aktivit, rovnováhy a koordinace pohybu
- potřeba kvalifikovaného personálu

7.3.4 Prevence komplikací při léčbě kontaktními fixacemi

Rizika TCC lze omezit dodržováním následujících doporučení:

- **Riziko zlomeniny fixace** – zhotovení dostatečně pevné fixace kombinací rigidních a semirigidních materiálů, hlavně pevné nášlapné plochy. Důsledně používání podpažních berlí, případně i pojízdného křesla. Omezené použití TCC u velmi obézních pacientů. Použití terapeutické sádrové obuvi s kolébkovitou podrážkou, umožňující odval a snižující tlak na flexi v talokrurálním kloubu při chůzi.
- **Riziko klinicky významné infekce** – při chronické osteomyelitidě nebo jiné infekci syndromu diabetické nohy zajišťujeme pacienta po celou dobu léčby TCC účinnými antibiotiky. V těchto případech je výhodnější používat snímatelnou kontaktní sádro, kterou kontrolujeme častěji v ambulanci, případně použijeme kontaktní sádro nesnímatelnou s fenestrací v místě defektu. Pacienta upozorníme na známky aktivace infekce. Při lokálních nebo celkových známkách klinicky významné infekce léčbu sádrou přerušujeme a pacienta hospitalizujeme k zajištění komplexní léčby infekce.
- **Riziko z imobilizace** – pacienta poučíme o cvičení při výměně sádry, riziko z imobilizace se snižuje také při použití semirigidních materiálů.
- **Riziko nových kožních lézí** – speciální kontaktní sádro smí diabetikovi aplikovat jen zaškolený zkušený pracovník. Pacienta je nutné poučit o omezení chůze a používání berlí tak, aby tření i zatížení končetiny byly minimální.

Nové kožní léze bývají nejčastěji na nezatížených místech a dobře se hojí po krátkodobém přerušení aplikace sádry.

- **Plísňe** – plísňové infekce se objevují asi u 15 % pacientů léčených TCC. Povrchové infekce léčíme topickými protiplísňovými prostředky a léčbu TCC většinou nepřerušujeme.
- **Zápach a kožní macerace** – zápach z nadměrné sekrece z rány může být společensky obtížný. Prevencí je snímatelný sádrový obvaz a častější převazy, případně fenestrace v kontaktním sádrovém obvazu. Při excesivní sekreci nebo při větší maceraci může léčbu sádrovou krátkodobě přerušujeme.

Před první aplikací sádry je nutné pečlivě zhodnotit lokální nález a provést debridement. Doporučujeme zhodnocení infekce pomocí stěru z hlubokých vrstev a zajištění příslušnými antibiotiky, rentgen nohy k vyloučení osteomyelitidy a eventuálně ještě laboratorní vyšetření známek akutního zánětu (především CRP). Lokální ošetření spočívá v odstranění okolních hyperkeratóz a povrchových nekrotéz, důkladném vyčištění ulcerace a jejím širším otevření, pokud je drenáž nedostatečná. Vhodné je také obkreslení ulcerace na fólii pro její další hodnocení během léčby.

Pacient má mít možnost být v **telefonickém kontaktu** s podiatrickým pracovištěm a konzultovat všechny problémy. Má používat podpažní berle, které zlepšují jeho stabilitu a lépe odlehčují ulceraci. Pacient s oboustrannými ulceracemi nebo oboustrannou Charcotovou osteoartropatií by měl používat pojízdné křeslo.

Pacientům s neuropatickými ulceracemi je doporučováno denně či obden snímat TCC a lokálně ošetřovat ulceraci. Bezprostředně po ošetření si pacient musí snímatelnou TCC opět sám nasadit.

Po první aplikaci sádry by měl být pacient zkontrolován nejpозději za 5–7 dní. Při této kontrole by měl být sádrový obvaz sejmут, končetina zkontrolována a zhodnocena velikost ulcerace nákresem na folii. Posuzujeme přítomnost infekce, lokální edém apod. Ulceraci důkladně lokálně ošetříme.

Další kontrola u pacientů s ulceracemi obvykle stačí po 2–3 týdnech, pacienti s Charcotovou osteoartropatií nebo s neuropatickými ulceracemi mohou být zkontrolováni i po 4 týdnech. Při edému nebo větší sekreci nebo při horší spolupráci pacienta je nutné sádrovou kontrolovat a případně měnit častěji. V zahraničních studiích se mění TCC často i po 7 dnech [5], což je z našeho pohledu v současné době ekonomicky náročné.

Před každou aplikací speciální kontaktní sádry i během této aplikace je nutné pacienta podrobně edukovat. **Pacient by měl obdržet písemné instrukce.** Osvědčuje se i podepsaný **informovaný souhlas pacienta**, který zajišťuje jeho lepší compliance. Proto každého nemocného před aplikací sádry edukujeme a předáváme mu i písemné instrukce, jejichž příklad dále uvádíme.

Instrukce pro pacienta léčeného TCC

Budete léčen speciální kontaktní sádrovou, která by měla urychlit hojení vředu (deformity) na noze. Vřed na noze se vám hůře hojí proto, že ho ve stoji a při chůzi zatěžujete. Noha se přitom špatně prokrvuje a dochází k poškození tkání. Speciální kontaktní sádra zmenšuje tlak na vřed a zlepšuje proto hojení. Pro úspěšnou léčbu je ale nezbytná Vaše spolupráce. Prosíme Vás proto o dodržování následujících instrukcí:

- **Během léčby sádrovou omezte svoji chůzi nebo stoj** (alespoň na jednu třetinu obvyklé aktivity). **Zásadně používejte podpažní berle, případně francouzské hole nebo pojízdný vozík dle instrukcí lékaře.**
- Chraňte sádrový obvaz před poškozením.
- **Chraňte sádrový obvaz před vlhkostí**, během koupání nebo sprchování používejte ochranný obal, tento obal používejte rovněž v dešti.
- **Sádrový obvaz vám může dělat menší obtíže při spaní.** Doporučujeme ho zabalit do ručníku nebo podložit plochým polštářem.
- **Pocení nebo nečistoty mohou způsobit svědění kůže v sádrovém obvazu.** Buďte opatrní, abyste se při škrábání neporanili.
- Prohlížejte si sádrovou denně. Pečlivě prohleďte, zda není sádra někde porušena. Pomocí zrcátka nebo za pomoci druhé osoby prohleďte i spodinu sádry.
- Nesnímejte sádrovou nikdy sami, pokud Vám to lékař výslovně nepovolí.
- Dostavte se ihned ke kontrole nebo zatelefonujte pokud:
 - je vám sádra příliš těsná pro otok dolní končetiny,
 - je vám sádra příliš volná a dochází ke tření dolní končetiny,
 - dochází k prosáknutí sádry sekretem,
 - máte zvýšenou teplotu nebo horečku,
 - máte bolest nebo nepříjemné pocity v místech sádry,
 - bolí vás uzliny v třísele,
 - sádrový obvaz se poškodí – např. zlomí.

Pokud máte některou z uvedených obtíží, nezatěžujete sádrovanou končetinu a použijte berle nebo pojízdné křeslo.

Po skončení aplikace sádry by měl pacient absolvovat vhodnou rehabilitaci a používat terapeutickou či preventivní obuv. Nezbytná je i další dispenzarizace pacientů se zhojenými ulceracemi, protože může dojít ke vzniku nové ulcerace (ve 30–50 %) [1].

7.3.5 Vlastní zkušenosti s léčbou speciálními kontaktními fixacemi

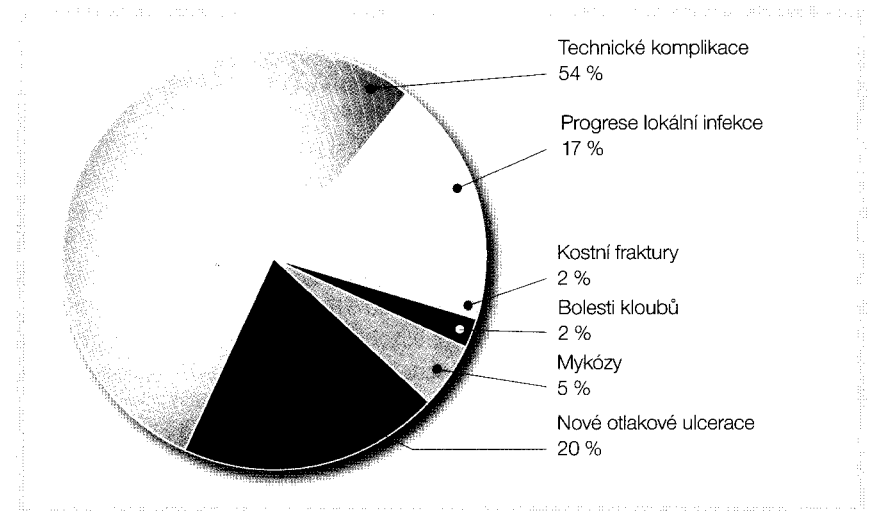
Na našem pracovišti byly provedeny 2 studie zkoumající vliv snímatelných TCC na hojení syndromu diabetické nohy. První spočívala v posouzení hojení diabetických neuropatických ulcerací, akutní Charcotovy osteoartropatie a neuropatických fraktur pomocí snímatelných TCC. Pacienti s neuropatickými frakturami byli léčeni pomocí TCC až do zhojení nejkratší dobu v porovnání se skupinou pacientů s neuropatickými ulceracemi a akutní Charcotovou osteoartropatií (4,2 vs. 6,3 vs. 7,9 měsíce) [3].

Při léčbě TCC se může na jedné straně rozvinout nová osteomyelitida vlivem šíření infekce z ulcerace, na druhé straně je možné pomocí TCC osteomyelitidu léčit, protože dochází k znehybnění a zklidnění infekce. Druhá studie zkoumala vliv snímatelných TCC na hojení již detegované osteomyelitidy či na rozvoj nové osteomyelitidy vlivem TCC. Dle statistického zhodnocení byla asi třikrát vyšší frekvence pacientů se zhojenou osteomyelitidou v porovnání s frekvencí pacientů s nově rozvinutou osteomyelitidou; benefit léčby osteomyelitidy snímatelnou TCC byl tedy signifikantně vyšší v porovnání s rizikem rozvoje nové osteomyelitidy [6]. Příčinou neuspokojivého hojení osteomyelitidy byla její lokalizace v oblasti tarzálních kostí. Typ ulcerace a mikrobiální rezistence neměly na hojení osteomyelitidy signifikantní vliv. Riziko rozvoje nové osteomyelitidy při léčbě TCC bylo vysoké u pacientů s hlubokou ulcerací (Wagner 3) a s infekcí způsobenou multirezistentními patogeny (*Pseudomonas* sp. nebo MRSA).

Klinicky nejzávažnější komplikací léčby TCC je progresse lokálního nálezu zahrnující rozvoj flegmony a otoku dolní končetiny, prohloubení ulcerace a rozvoj osteomyelitidy. V naší studii se komplikace léčby snímatelnou fixací vyskytly celkově u 67 % nemocných. Výskyt jednotlivých komplikací léčby snímatelnými TCC je zobrazen na obrázku 7.17. Nejčastěji se jednalo o zlomeninu fixace (54 %), druhou nejčastější komplikací byl rozvoj otlakové ulcerace (20 % všech nemocných). Mezi nejméně frekventované komplikace patřily bolesti kloubů (2 %), zlomeniny kostí (2 %) a mykózy (5 % pacientů). Progrese lokální infekce byla nalezena u 17 % nemocných [6].

7.3.6 Studie posuzující efektivitu terapie kontaktními fixacemi

Efektivita léčby ulcerací speciální kontaktní sádkou byla ověřena v mnoha studiích – např. v jedné z prvních došlo ke zhojení 21 (91 %) ulcerací průměrně za 42 dní ve srovnání se zhojením 19 (32 %) ulcerací za 65 dní v kontrolní skupině léčené tradičním způsobem [7]. Armstrong [8] zjistil signifikantně lepší hojení pomocí TCC ve srovnání se snímatelnými ortézami a s terapeutickou obuví



Obr. 7.17 Výskyt komplikací léčby syndromu diabetické nohy pomocí snímatelných kontaktních fixací

(89 % vs. 65 % vs. 58 %). Řada autorů prokázala zhojení diabetických ulcerací pomocí TCC během 28–68 dní [8–12]. Caravaggi prokázal zlepšení a urychlení hojení diabetických ulcerací pomocí TCC v porovnání s léčbou prováděnou speciální terapeutickou obuví [13]. Podobné výsledky nalezl i Armstrong při léčbě pacientů s neuropatickými ulceracemi v oblasti přednoží a paty pomocí TCC v porovnání se speciálně upravenými dlahami a polovičními botami (zhojení 90 % vs. 65 % vs. 58 % pacientů; [8, 14]). HaVan [5] prokázal, že nesnímatelné fenestrované plastické kontaktní fixace ve srovnání s terapeutickou obuví zlepšily nejen hojení ulcerací, ale také zkrátily čas hojení (68 vs. 134 dní), zlepšily compliance (98 vs. 10 %) a snížily riziko vzniku osteomyelitid. Některé studie dokonce prokázaly, že zhojení diabetických ulcerací je při použití TCC častější, než při použití různých lokálních agens (např. růstových faktorů, náhradních bioinženýrsky vyrobených kůží nebo speciálního krytí [15–18]). TCC redukuje aktivitu pacienta, jak bylo prokázáno měřením krokoměrem [8].

Podobně jako v léčbě ulcerací byl prokázán efekt TCC i v léčbě akutní Charcotovy osteoartropatie. Např. Gill a spol. prokázali, že pomocí TCC dochází ke zlepšení klinických známek Charcotovy osteoartropatie (poklesu kožních teplot a redukci edémů) i parametrů zobrazovacích metod [19]. Rozdíly v době hojení Charcotovy osteoartropatie ovšem závisí i na lokalitě patologického procesu,

déle se hojí Charcotova osteoartropatie lokalizovaná v oblasti středonoží, paty a hlezna v porovnání s přední částí nohy [20].

Studie Nabuurs-Franssen [21] hodnotila léčbu TCC u rizikovějších pacientů, tj. pacientů s lehčí PAD a s povrchovou infekcí (do stadia PEDIS 2). Celkem 69 % ulcerací s lehkou PAD a 36 % ulcerací s lehkou PAD a povrchovou infekcí se zhojilo v průměru do 34 dnů, zatímco většina ulcerací bez ischemie a infekce se zhojí v 76 % do 33 dnů. Nové ulcerace nebo preulcerózní léze se vyvinuly u 37 % pacientů, všechny se zhojily do 2 týdnů. Autoři uzavírají, že jak lehká ischemie, tak lehká infekce podstatně zhoršují prognózu hojení ulcerací pomocí TCC. U infikovaných ulcerací s hojnou sekrecí je nutno použít snímatelné TCC umožňující denní převazy. Stejní autoři [22] prokázali, že ani opakovaná léčba pomocí TCC u recidiv ulcerací, které se vyskytují až ve 39 %, neztrácí na účinnosti a má naopak méně komplikací.

Závěrem lze shrnout, že odlehčení dolních končetin u pacientů s neuropatickými a neuroischemickými ulceracemi, akutní a subakutní Charcotovou osteoartropatií a neuropatickými frakturami je jedním z nejdůležitějších faktorů léčby syndromu diabetické nohy. Vždy je ovšem nutno při výběru vhodné metody odlehčení dolní končetiny zohledňovat indikace, ekonomické aspekty, věk a spolupráci pacienta. Velmi důležité jsou pravidelné kontroly pacienta v podiatrické ambulanci.

Literatura

1. Sinacore D. R., Mueller M. J. Total-contact casting in the treatment of neuropathic ulcers. In: *The diabetic foot*. Ed. Levin M. E., O'Neal L. W., Bowker J. H., 5th Ed., Mosby Year Book 1993, St. Louis, p. 301–320
2. Laing P.: Diabetic foot ulcers. *The American Journal of Surgery*, 1997;167:31 S-36 S
3. Fejfarová, V., Jirkovská, A., Křížová, M., Skibová, J.: Účinnost léčby snímatelnými kontaktními fixacemi u pacientů s neuropatickými ulceracemi, akutní Charcotovou osteoartropatií a neuropatickými frakturami. *Vnitř Lék* 2005;51:988–994
4. Petre M., Kostar D., Topkar P., et al. Revisiting the total contact cast. maximizing off-loading by wound isolation. *Diabetes Care*, 2005;929–930
5. HaVan G., Siney H., Hartmann-Heurtier A., et al. Nonremovable, windowed, fiberglass cast boot in the treatment of diabetic plantar ulcers. *Diabetes Care* 2003;26:2848–2852
6. Fejfarová, V., Jirkovská, A., Bém, R., Křížová M., Šindelářová V., Fexová P., Skibová J.: Komplikace léčby syndromu diabetické nohy pomocí snímatelných kontaktních fixací se zaměřením na osteomyelitidu. *Praktický lékař* 2005, 85, 348–352
7. Mueller M. J., Diamond J. E., Sinacore D. R. et al.: Total contact casting in treatment of diabetic plantar ulcers: controlled clinical trial. *Diabetes Care*, 12, 1989, s. 384–388
8. Armstrong D. G., Nguyen H. C., Lavery I. A., Van Schie CHM, Boulton AJM, Harkless LB. Off-loading the diabetic foot wound a randomized clinical trial. *Diabetes care*, 2001;24:1019–1022
9. Myerson M., Papa J., Eaton K., Wilson K.: The total-contact cast for management of neuropathic plantar ulceration of the foot. *J Bone Joint Surg Am*, 1992;74:261–269
10. Helm PA., Walker SC., Pullium G.: Total contact casting in diabetic patients with neuropathic foot ulcerations. *Arch Phys Med Rehabil*, 1984;65:691–693
11. Lavery LA., Armstrong DG., Walker SC.: Healing rates of diabetic foot ulcers associated with midfoot fracture due to Charcot's arthropathy. *Diabet Med*, 1997;14:46–49
12. Lavery LA., Baranoski S., Ayello EA.: Options for Off-Loading the Diabetic Foot. *Advances in Skin&Wound Care*, 2004;17:181–186
13. Caravaggi C., Faglia E., De Giglio R.: Effectiveness and safety of a nonremovable fiberglass off-bearing cast versus a therapeutic shoe in the treatment of neuropathic foot ulcers: a randomized study. *Diabetes Care*, 2000;23:1746–1751
14. Armstrong DG.: Total contact casts and removable cast walkers. Mitigation of plantar heel pressure. *J Am Podiatr Med Assoc*, 1999;89:50–53
15. Veves A., Sheehan P., Pham HT.: A randomized, controlled trial of Promogran (a collagen/oxidized regenerated cellulose dressing) vs standard treatment in the management of diabetic foot ulcers. *Arch Surg*, 2002;137:822–827
16. Veves A., Falanga V., Armstrong DG., Sabolinski ML; Apligraf Diabetic Foot Ulcer Study.: Graftskin, a human skin equivalent, is effective in the management of noninfected neuropathic diabetic foot ulcers: a prospective randomized multicenter clinical trial. *Diabetes Care*, 2001;24:290–295
17. Gentzkow GD., Iwasaki SD., Hershon KS., Mengel M., Prendergast JJ., Ricotta JJ., Steed DP., Lipkin S.: Use of dermagraft, a cultured human dermis, to treat diabetic foot ulcers. *Diabetes Care*, 1996;19:350–354
18. Wieman TJ., Smiell JM., Su Y.: Efficacy and safety of a topical gel formulation of recombinant human platelet-derived growth factor – BB (becaplermin) in patients with chronic neuropathic diabetic ulcers. A phase III randomized placebo-controlled double – blind study. *Diabetes Care*, 1998;21:822–827
19. Gill G., Benbow S., Tesfay S., Kaczmarczyk E., Kaye L.: Painless stress fractures in diabetic neuropathic feet. *Postgrad Med J*, 1997;73:241–242
20. Sinacore DR.: Acute Charcot arthropathy in patients with diabetes mellitus: healing times by foot location. *J Diabetes Complications*, 1998, 12: 287–293
21. Nabuurs-Franssen M. H., Slegers R., Huijberts M., et al. Total casting of the diabetic foot in daily practice. *Diabetes Care*, 2005;28:243–247
22. Nabuurs-Franssen M. H., Slegers R., Huijberts M., et al. Casting of recurrent diabetic foot ulcers. *Diabetes Care*, 2005;28:1493–1494

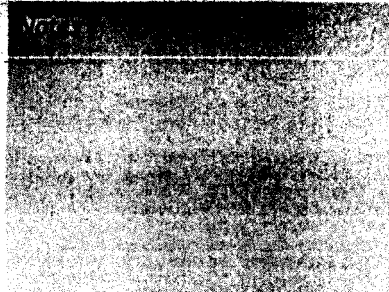
df

4th international Symposium on

22-24 May 2003, Noordwijkerhout, The Netherlands



PROGRAM AND ABSTRACTBOOK



An Evaluation of Screening Methods for the Arterial Component of Diabetic Foot Disease in the Community

D.T. Williams, P. Price, K.G. Harding
Wound Healing Research Unit, University of Wales College of Medicine, Cardiff, United Kingdom

Methods:

26 patients treated in our foot clinic during the observed period (2/2002-12/2002) were included into the study. The application of removable TCC was indicated in 10 patients for acute Charcot osteoarthropathy (group 1), in 11 patients for non-healing diabetic foot ulcers (group 2) and finally in 5 patients for pathological fractures caused by neuropathy or osteomyelitis (group 3). The mean age of all patients was 55.4 ± 11.6 years and mean HbA1c was $8.3 \pm 1.8\%$. Healing criteria for the group 1 were defined as decreased skin temperature of more than 2°C and/or reduction of bone activity on scintigraphy; for the group 2 completely healed skin and for the group 3 completely ossified bones on X-Ray.

Results:

The average time of the treatment by TCC was in the first group 5.8 ± 2.4 month, in the second group 5.1 ± 3.3 month and in the third group 3.4 ± 2.8 month during the observed period. No significant differences were found in the percentage of completely healed patients during the study period (90% vs. 45% vs. 100%, respectively; NS). In other 45% of patients with the diabetic foot ulcers was found a reduction of ulcer area of 7.8 square centimeters and a reduction of ulcer depth of 0.5 centimeters). The average healing time was not significantly different among the study groups (6.1 ± 2.1 month vs. 1.4 ± 2.9 month vs. 3.4 ± 2.8 month, respectively; NS).

Conclusion:

According to our first experiences, the application of removable TCC was effective in the therapy of pathological fractures and of acute Charcot osteoarthropathy, where the healing time was substantially longer. The treatment of diabetic foot ulcers was less successful in comparison with other two groups. We did not find serious complications more frequently in all study groups. The application of the TCC will extend in our podiatric practice.

045

The Efficacy of the Scotchcast Boot to Off-load the Diabetic Neuropathic Foot Ulcer.

*C.H.M. van Schie, S.C. Rowell, E.A. Knowles, A.J.M. Boulton
Manchester Diabetes Centre, Manchester Royal Infirmary, Manchester,
United Kingdom*

Introduction:

The Scotchcast boot (SCB) has been used successfully for many years to heal diabetic neuropathic plantar foot ulcers; however there is no data available of how effective the SCB offloads pressure. The purpose of this study was to compare pressure offloading between the SCB and the Aircast off-loading device.

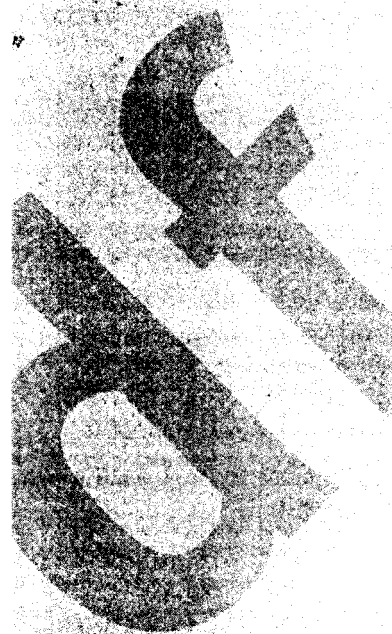
Materials and Methods:

Plantar pressures were measured (Novel in-shoe pressure system) in 22 (18 male and 4 female) diabetic patients with active or recently healed plantar neuropathic foot ulcers. A post-op sandal was used as the control condition.

Results:

Median (interquartile range) peak pressure at the ulcer sites was significantly lower in the SCB [155 (133-182) kPa] and Aircast [94 (79-108) kPa] compared to the control condition [258 (203-325) kPa] ($p < 0.0001$). Similarly, median pressure-time-integral was lower in the SCB [52 (40-74) kPa*sec] and Aircast [46 (30-66) kPa*sec] compared to the control condition [91 (64-121) kPa*sec] ($p < 0.0001$). The peak pressure and pressure-time-integral were lower in the Aircast compared to the SCB ($p < 0.05$).

Notes





INSTITUT
KLINICKÉ A EXPERIMENTÁLNÍ MEDICÍNY
Informační a komunikační úsek
VĚDECKÁ LÉKAŘSKÁ KNIHOVNA
140 21 Praha 4-Bc, Vítězská 1958/9
5. 6. 2004

DIABETOLOGIE METABOLISMUS ENDOKRINOLOGIE VÝŽIVA

ČASOPIS PRO POSTGRADUÁLNÍ VZDĚLÁVÁNÍ

ROČNÍK / • SUPPLEMENTUM 1 • 2004

XL. DIABETOLOGICKÉ DNY

Luhačovice, 22.-24. dubna 2004

ABSTRAKTA

INDEXOVÁNO V EMBASE - EXCERPTA MEDICA
EXCERPOVÁNO V BIBLIOGRAPHIA MEDICA ČECHOSLOVACA

www.tigis.cz/dmev/Index.htm

ISSN 1211-9326

Tigis

fází diabetes mellitus 1. typu (T1DM), s některým podtypem diabetu MODY a jedince bez prokazatelné poruchy metabolismu glukózy. Cílem studie bylo posoudit validitu intravenózního glukózového tolerančního testu jako jediného vyšetření při iniciálním posouzení příčiny náhodně zjištěné zvýšené glykemie.

Pacienti a metody: Pro náhodný záchyt hyperglykemie (glykemie vyšší než 5,4 mmol/l) bylo vyšetřeno 36 dětí a dospívajících (19 chlapců) ve věku 1,0-17,3 roku (medián 12,1). U všech byl proveden standardní i. v. GTT (glukóza v dávce 0,5 g/kg tělesné hmotnosti). Byla vyhodnocena glykemie v čase 0 a 60 minut a hladiny inzulínu a C-peptidu v čase 0 (lačná hodnota) a 1+3 minut (první fáze inzulínové sekrece; FPIR). Dle dalšího průběhu a/nebo molekulárně genetického nálezu byli pacienti rozděleni do tří diagnostických skupin: 1. časná fáze T1DM; 2. MODY2; 3. normální glukózová tolerance (NGT).

Výsledky shrnuje tab. (hodnoty uvedeny jako průměr +/- SEM; rozmezí)

parametr:	glykemie	glykemie	inzulin	inzulin	C-peptid	C-peptid
minuta:	0	60	0	1+3 (FPIR)	0	1+3
T1DM (n=9)	5,9+/-0,6 (3,2-9,2)	9,6+/-1,1 (5,9-13,9)	7,4+/-1,3 (2-13)	17,6+/-4,2 (6-47)	482+/-69 (211-874)	1036+/-87 (747-1565)
MODY2 (n=17)	6,1+/-0,2 (4,7-7,5)	8,3+/-0,6 (5,2-14,0)	9,4+/-1,4 (3-24)	131+/-19 (52-307)	583+/-56 (270-1063)	3223+/-303 (1110-5044)
NGT (n=10)	4,5+/-0,2 (3,3-4,9)	4,9+/-0,5 (2,8-7,6)	6,7+/-1,1 (2-13)	111+/-28 (21-322)	428+/-71 (148-723)	2713+/-317 (1066-4248)
p (one-way ANOVA)	0,003	0,0003	n.s.	0,002	n.s.	0,002

Závěry: Výsledky ukazují statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými diagnostickými skupinami v hladinách glykemie nalačno a v 60. minutě i. v. GTT stejně jako ve stimulovaných hladinách inzulínu a C-peptidu. Pro individuální posouzení jsou však možnosti i. v. GTT omezené:

Děti s presymptomatickou fází T1DM mají FPIR nižší než 48 mIU/l (senzitivita 100 %, specifická 92 %) a 8/9 z nich nižší než 27 mIU/l (senzitivita 89 %, specifická 97 %).

Děti s NGT mají v 60. minutě i. v. GTT glykemii nižší než 7,7 mmol/l (senzitivita 100 %, specifická 71 %) a 9/10 z nich nižší než 6,3 mmol/l (senzitivita 90 %, specifická 88 %).

Pacienti s MODY2 sice mají FPIR vyšší než 51 mIU/l a lze je tedy odlišit od T1DM, pro jejich spolehlivé odlišení od NGT však i. v. GTT nepostačuje. Pro odlišení MODY2 je třeba provést genealogickou a v indikovaných případech molekulárně-genetickou studii.

Posouzení hodnot lačných a stimulovaných hladin C-peptidu diagnostiku dále nezpřesňuje.

Studie je prováděna v rámci projektu IGA MZ ČR NB/7420-3.

8.

SROVNÁNÍ LÉČBY PACIENTŮ S NEUROPATICKÝMI ULCERACEMI, AKUTNÍ CHARCOTOVOU OSTEOARTHROPATÍ A NEUROPATICKÝMI FRAKTURAMI POMOCÍ KONTAKTNÍCH FIXACÍ

V. Fejfarová, A. Jirkovská, M. Křížová, R. Bém, J. Skibová
Centrum diabetologie, IKEM, Praha

Snímatelná kontaktní fixace (TCC) je vhodnou metodou odlehčení dolní končetiny při léčbě syndromu diabetické nohy.

Cílem studie bylo zhodnotit účinnost léčby syndromu diabetické nohy pomocí TCC u pacientů s neuropatickými ulceracemi, akutní Charcotovou osteoartrózi a neuropatickými frakturami.

Metodika: Celkově během sledovaného období bylo aplikováno 61 TCC pro rozličné indikace - 27 pacientům pro chronické neuropatické ulcerace (skupina 1; průměrný věk 53,5 ± 8 roku, trvání diabetu 14,8 ± 7 roku, HbA1c 8,2 ± 2 %), 35 pacientům pro akutní Charcotovu osteoartrózi (skupina 2; průměrný věk 53,9 ± 8 roku, trvání diabetu 16,6 ± 10 roku, HbA1c 8,4 ± 2 %) a 12 pacientům pro neuropatické fraktury (skupina 3; průměrný věk 52,8 ± 10 roku, trvání diabetu 14,8 ± 12

roku, HbA1c 8,9 ± 2 %). Kritéria hojení syndromu diabetické nohy byla následující: pro skupinu 1 úplná epitelizace defektu, pro skupinu 2 klinické zlepšení lokálního nálezu včetně poklesu kožních teplot a/nebo úpravy scintigrafických parametrů a pro 3. skupinu úplné zhojení fraktury dle RTG.

Výsledky: Pacienti s diabetickými ulceracemi byli léčeni TCC v průměru 6 ± 4,2 měsíce, pacienti s akutní Charcotovou

osteoartrózi 5,1 ± 4 měsíce a pacienti s patologickými frakturami 3,9 ± 2,6 měsíce (NS). Signifikantně nejvyšší procento hojivosti bylo nalezeno ve skupině pacientů s neuropatickými frakturami (30 % vs. 37 % vs. 83 %, respektive; p<0,01). U 44 % nezhojených pacientů s diabetickými ulceracemi došlo během sledovaného období k zlepšení lokálního nálezu (velikost defektu 5,6 ± 6,8 vs. 1,56 ± 2 cm², NS, hloubka defektu 0,53 ± 0,3 vs. 0,38 ± 0,4 cm, NS). U 54 % nezhojených pacientů s akutní Charcotovou osteoartrózi došlo ke zlepšení klinického stavu a signifikantní redukci kožních teplot (2,74 ± 1,3 vs 2 ± 1,3 °C; p<0,05). Závažnější komplikace (progrese osteomyelitidy, hloubky ulcerace), které vedly k ukončení terapie TCC, byly nalezeny u 7 pacientů ze skupiny 1 (26 %), u 3 pacientů ze skupiny 2 (9 %) a u 1 pacienta ze skupiny 3 (8 %).

Závěr: TCC je vhodnou formou odlehčení dolních končetin u pacientů se syndromem diabetické nohy, protože urychluje hojení jak u pacientů s akutní Charcotovou osteoartrózi, neuropatickými frakturami i diabetickými ulceracemi. Před aplikací TCC je ovšem nutno zvážit indikaci této formy léčby u pacientů s osteomyelitidou a u infikovaných ulcerací.

9.

DNA DIAGNOSTIKA MODY 3 NA SLOVENSKU: IDENTIFIKÁCIA PRVEJ RODINY

PRAKTICKÝ LÉKAŘ

25. 6. 2005

85 / 6

ČASOPIS PRO DALŠÍ VZDĚLÁVÁNÍ LÉKAŘŮ



Q-horečka – klinický obraz; vlastnosti původce ● Metody molekulárně cytogenetického vyšetření v klinické onkologii ● Jako je to s ochotou pacientů k režimovým opatřením ● Delirium v péči akutního gerontopsychiatrického oddělení ● Hornerův syndrom: topická diagnostika kauzální léze ● Praktický lékař očima svého pacienta ● Kontinuita péče ● Vzdělávací program v oboru praktické lékařství pro dospělé ● Respekt ke dříve vysloveným přáním nemocných

ČIHÁK R.

Anatomie 3

Druhé vydání upravili a doplnili:
prof. MUDr. Radomír Čihák, DrSc.,
prof. MUDr. Rastislav Druga, DrSc.,
prof. MUDr. Miloš Grim, DrSc.

Praha: Grada Publishing, a.s., 2004, 697 s.

Kniha je součástí řady základních publikací z oblasti anatomie. Tento díl obsahuje kapitoly: Angiologia – Nauka o cévách, Systema nervosum – Soustava nervová, Integumentum commune – Kůže a kožní orgány, Organa sensuum – Smyšlové orgány.

V předmluvě autor vysvětluje, že toto vydání si vyžádaly nové objevy, hlavně v oblasti anatomie mozku, ale bylo také nutno reagovat na některé změny v oblasti sjednocujícího se názvosloví.

Čtenář dostává do rukou pečlivě a systematicky sestavenou knihu anatomie s množstvím barevných schémat a obrázků. U některých obrázků pak nalezneme korespondující obrazy sonografických a CT vyšetření.

Ak. malíři Ivanu Halekalovi se podařilo zachovat jak věrnost anatomických struktur, tak nabídnout zjednodušení zaručující pochopení a didaktickou sdělnost. Právě množství a kvalita ilustrací dělají z knihy báječnou pomůcku a stávají se dobrým průvodem obsáhlou knihou (697 stran).

Pečlivě zpracovaný rejstřík nám dovolí nalézat žádaná hesla a kapitoly velmi snadno a usnadní naši orientaci.

Polygrafické zpracování je na profesionální úrovni, jak jsme si již u vydavatelství Grada – Avicenum, zvykli.

Systematickými čtenáři se jistě stanou studenti. Dovolím si, při vzpomínce na skromnou a chabou nabídku učebnic anatomie (i jiných oborů) svých lékařských studií před více než padesáti lety, vyjádřit jen docela malou závist. Současně však pocítuji uspokojení ze změn, které v této oblasti nastaly. Přeji našim následovníkům co nejdokonalejší učebnice a ještě k tomu učitele oddané medicíně i studentům. Učitele, kteří jsou ochotni je připravovat, doplňovat a vylepšovat. Za to autorům patří náš dík.

Pravděpodobně jen občasnými čtenáři budou ostatní lékaři, kteří budou nalézat nejen to nové, ale také si budou připomínat specifické znalosti potřebné pro jejich obor. Knize jich přeji co nejvíce.

20. 3. 2005

MUDr. František Krtička

Komplikace léčby syndromu diabetické nohy pomocí snímatelných kontaktních fixací se zaměřením na osteomyelitidu

FEJFAROVÁ V., JIRKOVSKÁ A., BÉM R., KRÍŽOVÁ M.,
ŠINDELÁŘOVÁ V., FEXO VÁ P., SKIBOVÁ J.

Centrum diabetologie, IKEM, Praha,
přednostka prof. MUDr. T. Pelikánová, DrSc.

SOUHRN

Jednou z nevhodnějších metod odlehčení dolních končetin v léčbě syndromu diabetické nohy je použití kontaktních fixací. Obvykle nebylo doporučováno aplikovat kontaktní fixace u pacientů s osteomyelitidou (OM).

Cílem naší studie bylo stanovit četnost komplikací léčby snímatelnými kontaktními fixacemi (total contact cast – TCC) a sledovat vliv TCC na hojení OM a na riziko rozvoje nové OM u pacientů se syndromem diabetické nohy. Do naší studie bylo zařazeno 61 pacientů se syndromem diabetické nohy, kteří byli léčeni snímatelnými TCC (průměrný věk 54 ± 9 let, trvání diabetu 15.6 ± 9 let, HbA1c 8.3 ± 1.8 %) pro neuropatické ulcerace, akutní Charcotovu osteoarthropatii a pro neuropatické fraktury. OM byla diagnostikována rtg vyšetřením a přítomností laboratorních známek zánětu. V průběhu 2–12 měsíců byla sledována četnost všech komplikací léčby TCC. Dále byl ve studii porovnán počet pacientů s OM detekovanou před aplikací TCC s počtem zhojených nemocných po aplikaci TCC a s počtem pacientů s nově rozvinutou OM během terapie TCC.

Výsledky: Všichni pacienti byli léčeni snímatelnými TCC v průměru 5.4 ± 5 měsíců. Nejčastější komplikací léčby TCC byla zlomenina TCC (49 %); druhou nejčastější komplikací byl rozvoj nové neuropatické ulcerace na léčené noze (25 %), tyto povrchové ulcerace však nebyly klinicky významné. Progrese lokální infekce, která vedla k přerušení léčby TCC, byla nalezena u 11 % nemocných. Velmi zřídka se vyskytovaly ostatní komplikace zahrnující bolesti kloubů (2 %) a mykózy (3 %). Celkem 21 ze 61 (34 %) všech pacientů mělo OM před zahájením léčby TCC, 11/21 (52 %) z nich se zhojilo během léčby TCC; 40/61 (66 %) všech pacientů nemělo diagnostikovanou OM před aplikací TCC, avšak OM se nově rozvinula u 3/40 (8 %) z nich během léčby TCC. Počet pacientů se zhojenou OM byl signifikantně vyšší v porovnání s počtem pacientů s nově rozvinutou OM ($p < 0.01$). Celkem 10 pacientů s nezhojenou OM během terapie TCC bylo charakterizováno především lokalizací OM (v tarzálních kostech). Ostatní faktory, jako je např. závažnost diabetické ulcerace a mikrobiální rezistence, neměly na hojení OM pomocí TCC signifikantní vliv.

Závěr: Léčba syndromu diabetické nohy speciální metodou odlehčení pomocí TCC má svá rizika, spočívají především ve vzniku nové ulcerace a v progresi lokální infekce. Přesto není OM absolutní kontraindikací léčby TCC, u pacientů je ale nutno pravidelně kontrolovat lokální i rentgenologický náález a zajistit terapii antibiotiky. Terapie syndromu diabetické nohy pomocí TCC by měla být řízena z podiatrických ambulancí.

Klíčová slova: osteomyelitida – syndrom diabetické nohy – kontaktní fixace.

SUMMARY

Fejfarová V., Jirkovská A., Bém R., Krížová M., Šindelářová V., Fexová P., Skibová J.: Complications in the treatment of diabetic foot syndrome using total contact cast, with a focus on osteomyelitis

One of the most suitable lower-limb off-loading methods used in diabetic foot treatment is total contact cast (TCC). TCC was not recommended in patients with osteomyelitis (OM).

The aims of our study were to assess the frequency of all complications and the effect of TCC therapy on healing of OM and on the risk of new OM development in patients with the diabetic foot. 61 patients with the diabetic foot treated for neuropathic foot ulcers, acute Charcot osteoarthropathy and neuropathic fractures by removable TCC were included into our study (mean age 54 ± 9 years, diabetes duration 15.6 ± 9 years, HbA1c 8.3 ± 1.8 %). OM was diagnosed by X-ray and laboratory markers of infection. The rates of all complications were recorded over the study period of at least 2 months, maximum 12 months. The number of patients with OM before therapy and healed after TCC application was compared with the number of patients with newly developed OM during TCC therapy.

Results: Removable TCC was applied for 5.4 ± 4.5 months on average in all patients. The most common complication of TCC therapy in the study group was broken cast (49 %), followed by the development of a new neuropathic ulcer on the same foot (25 %) however, these ulcers were not clinically important. Progression of local infection leading to discontinuation of TCC therapy was noted in 11 % of all patients. Other complications such as joint pain (2 %) and mycosis (3 %) were seen very rarely. 21/61 (34 %) of all patients had OM before TCC therapy, 11/21 (52 %) of them healed during TCC treatment. 40/61 (66 %) of all patients had no diagnosed OM before TCC application; however, 3/40 (8 %) developed new OM during

TCC treatment. The number of patients with healed OM was significantly higher compared with the number of patients with newly developed OM ($p < 0.01$). 10 patients with previously diagnosed non-healed OM were characterized primarily by OM location (in tarsal bones). Other factors such as the type of ulcer and microbial resistance had no significant effect on OM healing during TCC therapy.

Conclusion: Diabetic foot therapy with a special off-loading method using TCC has its inherent risks, particularly new ulcer development and progression of local infection. OM is not an absolute contraindication of TCC treatment, nevertheless local and X-ray findings must be monitored in these patients and antibiotic therapy instituted. Treatment of the diabetic foot by TCC should be managed by a foot clinic.

Key words: osteomyelitis – diabetic foot – total contact cast.

Prakt. Lék., 2005, 85, No. 6, p. 348–352

Snímatelné kontaktní fixace (total contact cast – TCC) jsou jednou z neúčinnějších forem odlehčení dolních končetin. Využívají se při léčbě pacientů se syndromem diabetické nohy (6, 20).

Snímatelná TCC je schopna redistribuovat tlak působící vertikálně na plošku nohy. Tato forma odlehčení dále umožňuje eliminovat nejvyšší tlaky na exponovaná místa dolních končetin (14). Z tohoto důvodu se snímatelné TCC používají v léčbě pacientů se syndromem diabetické nohy, nejčastěji v léčbě neuropatických ulcerací (1, 4), akutní Charcotovy osteoartropatie (17) a k léčbě neuropatických fraktur (19).

Předchozí studie doposud ve velkém počtu nesledovaly četnost komplikací léčby snímatelnými TCC. Několik málo studií prokázalo, že léčba TCC má určité výhody i nevýhody. Výhodou je vysoká účinnost a zkrácení doby hojivosti syndromu diabetické nohy. Nevýhodami terapie jsou některé z technických komplikací, např. zlomeniny fixací a nově se tvořící otlačkové ulcerace na dolních končetinách (5).

Nejzávažnější komplikací léčby snímatelnou TCC je osteomyelitida (OM). Nicméně doposud nebyla provedena studie, která by zkoumala úspěšnost léčby syndromu diabetické nohy sdruženého s OM pomocí TCC nebo vliv fixací na rozvoj nové OM. Proto cílem naší studie bylo posoudit frekvenci všech komplikací terapie snímatelnými TCC, dále vliv aplikace snímatelné TCC na léčbu OM a potenciální riziko rozvoje nové OM u pacientů se syndromem diabetické nohy léčenými touto metodou.

Soubor pacientů a metodika

Do naší studie bylo konsekutivně zařazeno 61 pacientů se syndromem diabetické nohy, kteří byli léčeni pro nehojící se neuropatické ulcerace, akutní Charcotovu osteoartropatii a neuropatické fraktury v podiatrické ambulanci IKEM. Tito pacienti byli před započítáním studie neúspěšně léčeni po dobu alespoň 3 měsíců standardními metodami odlehčení dolních končetin (11, 20). Vyřazovacími kritérii zařazení do studie byly kritická

ischémie dolních končetin (dopplerovské indexy $< 0,8$ nebo transkutánní kyslík ($TcPO_2$) < 30 mm Hg), poruchy mobility talokrurálního skloubení, bérčové vředy a/nebo masivní otok dolní končetiny. Průměrný věk pacientů zařazených do studie byl $54 \pm 9,2$ roku, průměrná doba trvání diabetes mellitus byla $15,6 \pm 9$ roku a průměrný glykovaný hemoglobin (HbA1c) činil $8,3 \pm 1,8$ % (normální hodnoty 4,2–6,2 %).

Aplikace snímatelné TCC

Pacientům zařazeným do studie byly aplikovány snímatelné TCC zhotovené z rigidních a semirigidních materiálů podle námi již dříve popsané metodiky (6). U pacientů s neuropatickými ulceracemi bylo nejprve nutné lokálně ošetřit ulceraci pomocí debridementu a poté aplikovat vhodné lokální dezinficiens či polyuretanové nebo silikonové krytí (obr. 1). Poté se aplikovalo bavlněné krytí (Stockinet, 3M, Borken, Německo), speciální filcové krytí (Cellona, Lohmann and Rausher, Neuwid, Německo) a dlahy ve tvaru písmene L z rigidního materiálu (Scotchcast, 3M, Neuss, Německo). Na daný materiál se přikládá semirigidní materiál (Softcast, 3M, Santé, Francie), který kopíroval povrch dolní končetiny a zafixoval jej v požadované poloze (obr. 2). Po 20 minutách po zatvrdnutí materiálu byla TCC rozstřížena. Nakonec byla upravena prstová oblast fixace a byla aplikována malá rigidní dlahy do pretibiální oblasti k zamezení třecích pohybů uvnitř snímatelné TCC (obr. 3). Pacienti s neuropatickými ulceracemi denně či obden snímali TCC a lokálně ošetřovali ulcerace. Bezprostředně po ošetření si ale pacient snímatelnou TCC opět nasadil.

U pacientů s akutní Charcotovou osteoartropatií či neuropatickými frakturami byla snímatelná TCC aplikována po ústupu výrazných edémů dolní končetiny. Pacientům s ulceracemi byla snímatelná TCC dána po zvládnutí akutních lokálních i celkových projevů infekce (pacient byl vždy afebrilní, bez výrazné elevace CRP, bez flegmóny či otoku a bez hnisavé sekrece z rány). Osteomyelitida ani hluboká ulcerace (Wagner 3) však nebyly kontraindikací této metody léčení.



OBR. 1. Ošetření neuropatické ulcerace



OBR. 2. Přiložení semirigidního materiálu na dolní končetinu



OBR. 3. Finální úpravy kontaktní fixace

Po aplikaci snímatelných TCC byli pacienti řádně poučeni o možných rizicích této terapie. Vždy byli kontrolováni s odstupem jednoho týdne po aplikaci fixace a dále podle klinického nálezu na dolní končetině – pacienti s neuropatickými ulceracemi po 2–3 týdnech, pacienti s akutní Charcotovou osteoartropatií či neuropatickými frakturami po 4 týdnech.

Nové snímatelné TCC byly aplikovány v případech výrazné redukce otoku dolní končetiny nebo při výrazném poškození fixace.

Diagnostika nehojících se neuropatických ulcerací

Mezi nehojící se diabetické ulcerace byly zařazeny neuropatické nebo neuroischemické vředy, které byly neúspěšně léčeny standardní metodou (lokální terapie, odlehčení dolní končetiny pomocí terapeutické poloviční boty a podávání antibiotik při známkách lokální či systémové infekce) po dobu více než 3 měsíců.

Během terapie snímatelnými TCC byla antibiotika podávána pacientům pouze v případě známek lokální infekce.

Diagnostika akutní Charcotovy osteoartropatie

Akutní Charcotova osteoartropatie byla diagnostikována podle klinického nálezu, a to asymetrického otoku nohy a/nebo zvýšených lokálních kožních teplot o 1–2 °C proti kontralaterální končetině. V některých případech se projevovala i zarudnutím, bolestivostí a nově vytvořenými deformitami (13). Přesnější diagnóza byla stanovena pomocí rtg vyšetření a pomocí dynamické scintigrafie kostí. Během scintigrafie byla sledována perfuze, parametry intenzity kostního metabolismu a akumulace radiofarmaka ve skeletu po aplikaci methylen bifosfonátu značeného ⁹⁹Tc (12). Kontrolní scintigrafické vyšetření bylo provedeno vždy při klinických známkách přechodu akutní Charcotovy osteoartropatie do chronického stadia, nejdříve však za 3–6 měsíců. Přítomnost těžší periferní diabetické polyneuropatie byla diagnostikována vyšetřením dolních končetin pomocí biothesiometru. Za patologické hodnoty byl pokládán práh vibračního čítí vyšší než 25 V (1).

Diagnostika neuropatických fraktur

Neuropatické fraktury byly definovány jako fraktury u pacientů s těžkou neuropatií (viz výše), které vznikly bez výrazného zevního násilí. Rtg obraz přitom neodpovídal typické lokalizaci Charcotovy osteoartropatie.

Nejvíce neuropatických fraktur bylo lokalizováno v oblasti metatarzálních kostí (67 %). Menší procento fraktur bylo lokalizováno v oblasti falang (16,5 %) a dále v oblasti tarzálních kostí (16,5 % pacientů).

Detekované komplikace léčby snímatelnými TCC

Mezi detekované komplikace byly zařazeny technické komplikace terapie TCC, jakými jsou zlomeniny fixací, nové otlakové ulcerace nebo fraktury kostí na léčené dolní končetině nebo na kontralaterální končetině způsobené nošením TCC a v neposlední řadě mykózy v oblasti nohy (tinea pedis) nebo v oblasti inter-

digitálních prostorů. Klinicky nejzávažnější komplikací léčby TCC byla progresse lokální infekce charakterizovaná flegmórou, edémem dolní končetiny a rozvojem OM. Tyto komplikace vedly k přerušení léčby snímatelnými TCC.

Diagnostika osteomyelitidy, posouzení závažnosti ulcerací a antibiotické rezistence

OM byla stanovena pomocí rtg vyšetření dolních končetin, které bylo prováděno vždy před započítím a po ukončení léčby snímatelnou TCC. K diagnóze přispívaly i elevované parametry zánětu (CRP, sedimentace erytrocytů, leukocytóza) a nález na dolní končetině (otok a/nebo flegmóna a/nebo hluboká ulcerace dolní končetiny – Wagner 3, či chronická fistula s kostí na spodině v oblasti dolní končetiny).

Všichni pacienti s diagnostikovanou OM byli léčeni po dobu trvání OM perorálními antibiotiky.

Kritériem zhojení OM bylo posouzení lokálního nálezu – ústup otoku a flegmóny dolní končetiny a pokles rozdílu kožních teplot dolních končetin, pokles laboratorních známek zánětu (leukocyty, CRP) a dále rentgenologicky potvrzené zhojení OM v dané lokalitě.

V souvislosti s možnými faktory spojenými s rizikem OM byly posuzovány závažnost diabetické ulcerace (Wagnerovská klasifikace, viz 20) a antibiotická rezistence patogenů nalezených v diabetických ulceracích. Za rezistentní byly považovány patogeny necitlivé k perorálním antibiotikům, která lze využít v léčbě infekce u ambulantních pacientů.

Statistické zhodnocení

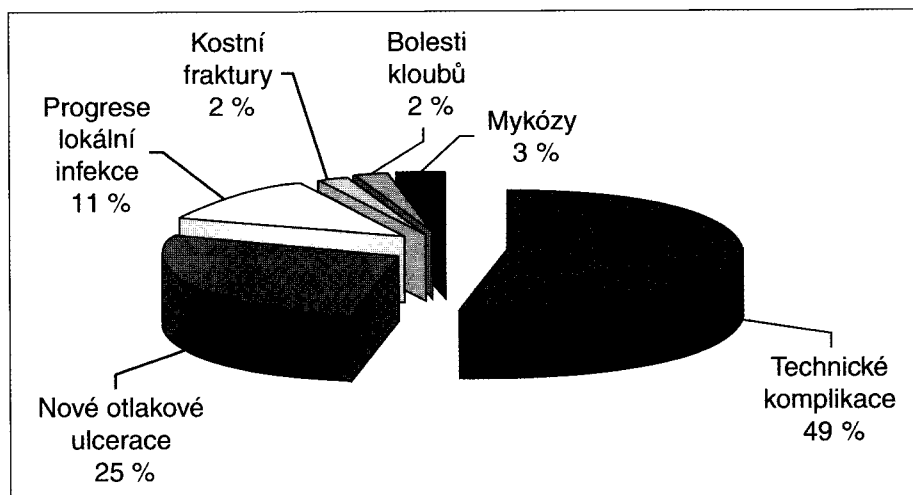
Analýza dat byla provedena pomocí BMDP softwaru (PC 90). Uváděná data jsou prezentována formou průměrných

hodnot ± směrodatných odchylek. Výskyt komplikací léčby syndromu diabetické nohy byl sledován po dobu alespoň 2, maximálně však 12 měsíců. Frekvence výskytu osteomyelitid, procento zhojených osteomyelitid a procento nově vzniklých osteomyelitid byly porovnány před započítím a po skončení léčby snímatelnými kontaktními fixacemi pomocí McNemarova testu, který statisticky zhodnotil risk vs. benefit terapie. Za statisticky signifikantní byly považovány hodnoty $p < 0,05$.

Výsledky

Pacienti se syndromem diabetické nohy byli léčeni v průměru $5,4 \pm 4,5$ měsíce pomocí snímatelných TCC. Celkově se komplikace léčby pomocí snímatelných fixací vyskytly u 41 pacientů (67 % nemocných). Výskyt jednotlivých komplikací léčby snímatelnými TCC během sledovaného období je zobrazen v grafu 1. Nejčastěji šlo o zlomeninu fixace (u 49 % všech nemocných), druhou nejčastější komplikací byl rozvoj otlakové ulcerace, a to u 25 % nemocných. Mezi nejméně frekventované komplikace patřily bolesti kloubů (2 %) a mykózy (3 % pacientů). Klinicky nejzávažnější komplikací léčby TCC, která vedla k přerušení aplikace fixace, byla progresse lokální infekce, jež byla nalezena u 11 % nemocných.

Celkem 21 pacientů se syndromem diabetické nohy mělo před započítím léčby snímatelnou TCC diagnostikovanou OM. Nejčastěji se OM vyskytovala v oblasti metatarzálních kostí (13/21, tj. 62 % nemocných s OM), dále v oblasti tarzálních kostí (7/21 = 33 % pacientů) a falang (1/21 = 5 % pacientů). Zbýlých 40 pacientů nevykazovalo známky OM před aplikací snímatelné TCC.



GRAF 1. Výskyt komplikací léčby syndromu diabetické nohy pomocí snímatelných kontaktních fixací

Snímatelné TCC měly příznivý vliv na hojivost OM u pacientů se syndromem diabetické nohy. Z 21 pacientů s OM detekovanou před aplikací snímatelných TCC došlo ke zhojení u 11/21 pacientů (52 % nemocných); 10 pacientů s OM nebylo během sledovaného období zhojeno.

Celkem 40 pacientů nemělo před léčbou TCC OM, z nich pouze u 3 (7,5 %) došlo po aplikaci snímatelné fixace k rozvoji nové OM.

Podle statistického zhodnocení byla významně vyšší frekvence pacientů se zhojenou OM v porovnání s frekvencí pacientů s nově rozvinutou OM ($p < 0,01$); benefit léčby snímatelnou TCC tedy výrazně převyšoval riziko rozvoje nové OM u pacientů léčených touto metodou.

Příčiny neuspokojivého hojení OM byly dále podrobněji zkoumány. Závažnost diabetické ulcerace hodnocená podle Wagnera a mikrobiální rezistence patogenů z diabetických ulcerací se významně nelišily mezi skupinou pacientů se zhojenou a nezhojenou OM. Pacienti s nezhojenou OM byli charakterizováni lokalizací OM v oblasti tarzálních kostí. Riziko rozvoje nové OM bylo vysoké u pacientů s hlubokou ulcerací (Wagner 3) a s infekcí způsobenou multirezistentními patogeny (*Pseudomonas* sp. nebo MRSA).

Diskuse

Rozvoj diabetických neuropatických ulcerací, Charcotovy osteoartropatie i neuropatických fraktur je ovlivněn celou řadou faktorů, mezi něž řadíme periferní a autonomní neuropatii, mikroangiopatii, cheiroartropatii, kouření a infekci. Tyto faktory vedou ke zvýšení plantárního tlaku a poruše kapilárního průtoku v dolní končetině (10). Abychom dosáhli odstranění abnormálních tlaků lokalizovaných na plantě dolních končetin a urychlení hojení ulcerací, Charcotovy osteoartropatie či neuropatických fraktur, je nutné zvolit vhodnou metodu odlehčení dolních končetin. Typ odlehčení dolní končetiny je nutné přizpůsobit věku, hmotnosti těla, aktivitě nemocného a domácímu prostředí pacienta (3).

Jednou z nevhodnějších metod odlehčení dolních končetin je TCC. TCC umožňuje redistribuci vertikálních tlaků na plantě a vyloučení působení maximálních tlaků na exponovaná místa (14). Fixace je schopna redukovat i riziko šíření infekce při imobilizaci tkání a kloubů (1). Celá řada studií popsala významné zlepšení hojení syndromu diabetické nohy při použití TCC v porovnání s použitím speciální terapeutické obuvi (4), speciálních dlah či polovičních bot (1, 2). Mnoho autorů pro-

kázalo zhojení 70–100 % diabetických ulcerací pomocí TCC během 28–68 dní (1, 8, 15, 18). Oproti tomu poloviční boty jsou schopné zhojit 58–96 % diabetických ulcerací asi za 60–70 dní (9, 15).

Komplikace léčby kontaktními fixacemi byly doposud zkoumány pouze okrajově. Nejčastěji byla v publikovaných studiích sledována recurence diabetických ulcerací po ukončení terapie TCC (8, 16, 18). Recurence byla nalezena asi ve 20 % případů. Příčinou byly nedostatky v oblasti péče o dolní končetiny, biomechanické vady, kostní fragmenty, OM nebo Charcotova osteoartropatie (8). Nicméně v Matricaliho studii našli nové ulcerace až u 67 % pacientů po ukončení terapie TCC (16). V naší studii nebyla sledována recurence diabetických ulcerací či reaktivace Charcotovy osteoartropatie po ukončení terapie snímatelnými TCC.

V literatuře se vyskytla jedna studie zkoumající podrobněji komplikace a bezpečnost TCC aplikovaných u rizikových pacientů s periferní neuropatií (21). Wukich a spol. prokázali komplikace, jakými byly kožní iritace nebo přílišná těsnost fixace (21), pouze u 17 % nemocných. Žádná z nalezených komplikací ovšem nevedla k ukončení terapie fixací (21). Naše studie prokázala progresi lokálního nálezu, která vedla k ukončení terapie snímatelnými TCC, v 11 % případů. Technické komplikace, jakými byly zlomeniny fixací, se staly v naší studii nejčastějším problémem. Tento vysoký výskyt je pravděpodobně způsoben poměrně dlouhou dobou aplikace jedné TCC u jednoho pacienta. Zatímco Wukich a spol. měnili fixace po 4 dnech a následně jednou týdně (21), v naší studii byly TCC měněny pouze při výrazném poškození fixace nebo při výrazné redukci edému dolní končetiny. V některých případech byla příčinou komplikací léčby TCC non-compliance pacienta (viz níže).

V naší studii byly nově vytvořené kontaktní ulcerace nalezeny u 25 % nemocných se snímatelnou TCC. Dzieciuchowicz a spol. popsali ve své studii nové otlakové ulcerace na stejné končetině až u 40 % nemocných s nově nasazenou kontaktní fixací (5). Příčinou nově vzniklých ulcerací v průběhu léčby TCC může být podle našich zkušeností špatná compliance pacienta např. při používání podpažních berlí. Dalším problémem může být nošení ponožek či obzavů uvnitř snímatelné fixace, neboť v TCC dochází k jejich shrnování. Vlastní opravy TCC mohou rovněž způsobit rozvoj otlakových defektů. Nově vzniklé ulcerace, zvláště jsou-li včas zachyceny, nebývají příčinou závažných komplikací, protože bývají obvykle povrchové a jsou nejčastěji lokalizované

v nezatěžovaných místech, mezi něž řadíme pretibiální oblast nebo oblast nártu.

Doposud nebyla provedena studie zkoumající vliv léčby snímatelnými fixacemi na terapii osteomyelitid. Na jedné straně se TCC nedoporučuje aplikovat u osteomyelitid (1, 7), na druhé straně existují dobré klinické zkušenosti s aplikací klasické sádry u pacientů s OM, protože dochází ke znehybnění končetiny a snížení rizika šíření infekce. Podle našich výsledků nemusí být OM řazena mezi absolutní kontraindikace aplikace snímatelné TCC, neboť benefit léčby snímatelnými kontaktními fixacemi významně převyšuje riziko nového vzniku OM během této léčby. Protože se ale nová OM rozvinula u pacientů s hlubokou ulcerací (Wagner 3) infikovanou multirezistentními patogeny, nelze u těchto pacientů doporučit terapii ulcerací pomocí TCC. Podobně sporná je aplikace TCC u pacientů s OM v oblasti tarzálních kostí, jelikož u nich aplikace TCC nemusí vést k výraznému zlepšení.

Na základě zkušeností z naší studie lze závěrem shrnout, že je nezbytně nutné pravidelně kontrolovat lokální klinický obraz a rtg nálezy u pacientů léčených snímatelnými TCC a terapii pomocí TCC racionálně indikovat.

Poděkování: Práce byla podpořena výzkumným záměrem MZ ČR, č. VZ MZO 00023001.

Literatura

1. Armstrong, D. G., Nguyen, H. C., Lavery, L. A., et al. Off-loading the diabetic foot wound. *Diabet. Care*, 2001, 24, 6, p. 1019–1022.
2. Armstrong, D. G., Stackpoole-Shea, S. Total contact casts and removable cast walkers. Mitigation of plantar heel pressure. *J. Am. Podiatr. Med. Assoc.*, 1999, 89, p. 50–53.
3. Calhoun, J. H., Overgaard, K. A., Stevens, C.M., et al. Diabetic foot ulcers and infections: current concepts. *Adv. Skin Wound Care*, 2002, 15, p. 31–42.
4. Caravaggi, C., Faglia, E., De Giglio, R. Effectiveness and safety of nonremovable fiberglass off-bearing cast versus a therapeutic shoe in the treatment of neuropathic foot ulcers: a randomized study. *Diabetes Care*, 2000, 23, 12, p. 1746–1751.
5. Dzieciuchowicz, L., Checinski, P., Waliszewski, K., et al. The value of total contact casting in treatment of neuropathic foot ulcers in diabetic patients. *Pol. Merkurusz. Lek.*, 1997, 15, 3, p. 132–134.
6. Fejfarová, V., Jirkovská, A., Křížová, M., a kol. Účinnost léčby snímatelnými kontaktními fixacemi u pacientů s neuropatickými ulceracemi, akutní Charcotovou osteoartropatií a neuropatickými frakturami. *Vnitř. Lék.*, 2005, v tisku.
7. Fejfarová, V., Jirkovská, A., Křížová, M., Fexová, P. Léčba syndromu diabetické nohy kontaktními fixacemi. *Bulletin HPB*, 2003, č. 1, s. 39–40.
8. Helm, P. A., Walker, S. C., Pallium, G. F. Recurrence of neuropathic ulceration following healing in a total contact cast. *Arch. Phys. Med. Rehabil.*, 1991, 72, p. 967–970.
9. Chantelau, E., Breuer, U.,

Krátká intervence u patologického hráčství

NEŠPOR K., CSÉMY L.

*Psychiatrická léčebna Bohnice, Praha,
ředitel MUDr. Z. Bašný*

SOUHRN

Práce shrnuje postupy, které lze použít při krátké intervenci pro problémy působené hazardní hrou. Vzhledem k rozšířenosti problémů s hazardní hrou v populaci je zásadně důležité, aby krátkou intervencí používali pracovníci různých oborů, tedy nejen lékaři, ale i psychologové, pedagogové atd.
Klíčová slova: patologické hráčství – závislosti – krátká intervence.

SUMMARY

Nešpor K., Csémy L.: Short-term intervention in pathological gambling
Summarized are procedures that can be used in short-term intervention for problems caused by gambling. In view of the extent of the problems with gambling in the population, it is fundamentally important that short-term intervention be used by workers from various disciplines, i.e. not only physicians, but also psychologists, educationalists, etc.
Key words: pathological gambling – addiction – short-term intervention.

Prakt. Lék., 2005, 85, No. 6, p. 352–353.

Rozšíření problémů působených hazardní hrou v populaci

Údaje o počtu patologických hráčů nejsou k dispozici, je ale znám výskyt zkušeností s hazardních hrou na automatech u dospívajících ve věku 16 let. Tato zkušenost činila celoživotně u chlapců 15,3 % a u dívek 7,2 %. Hraní na hazardních automatech jednou týdně či častěji se objevovalo u 2,4 % chlapců a 0,6 % dívek (1). Z uvedeného vyplývá, že vzhledem k dostupnosti hazardních her lze předpokládat další nárůst patologického hráčství i jiných problémů, které hazardní hra působí (kriminalita u dříve bezúhonných, homosexuální prostitute, rozvodovost apod.). Hazardní hry u dospívajících jsou také spojeny s vyšším rizikem problémů působených alkoholem i jinými látkami, jak o tom svědčí naše zkušenosti i zahraniční práce (5). Spolupráce patologických hráčů při léčbě má někdy krátkodobý charakter a mnoho z nich léčbu předčasně přeruší. Ze všech těchto důvodů je žádoucí, aby lékaři a další pracovníci různých oborů (adiktologie, psychiatrie, všeobecného lékařství, dorostového lékařství, psychologové, pedagogové apod.) uměli provádět krátkou intervenci pro problémy působené hazardní hrou.

Krátká intervence

Je pravděpodobné, že terapeut nepoužije v rámci krátké intervence všechny dále uvedené postupy, ale vybere z nich třeba i jen jeden nebo dva s ohledem na časové možnosti a situaci.

Prvky krátké intervence

- Posoudit stav pacienta, informovat o výsledku. V našich podmínkách budeme vycházet z Mezinárodní klasifikace nemocí (MKN-10) a rozhodovat mezi patologickým hráčstvím (F63.0) a hráčstvím a sázkařstvím (Z72.6). Pro patologické hráčství je typické 1. craving (bažení) po hazardní hře, 2. zhoršené sebeovládání ve vztahu k hazardní hře, 3. pokračování navzdory nepříznivým důsledkům. Jde tedy o podobné znaky, jaké najdeme v definici závislosti na psychoaktivních látkách. Naproti tomu u hráčství a sázkařství zůstává sebekontrola ještě zachována.

- Doporučit, aby pacient u sebe nenosil větší částky peněz, protože u mnoha patologických hráčů vyvolávají volné finanční prostředky craving (bažení) po hazardní hře. Ze stejných důvodů by výběr z pacientova bankovního konta měl být vázán dvěma podpisy (např. podpisy pacienta a jeho rodičů nebo manželky),

Leisch, A. C. Outpatient treatment of unilateral diabetic foot ulcers with 'half shoes'. *Diabet. Med.*, 1993, 10, 3, p. 267–270. – 10. Jirkovská, A. Diabetická noha. In Bartoš, V., Pelikánová, T. *Praktická diabetologie*, Praha: Maxdorf, 2000, s. 305–325. 11. Jirkovská A. Aktuální problematika syndromu diabetické nohy. In Perusičová, J. *Trendy soudobé diabetologie*, Svazek 5., Praha: Galén, 2001, s. 53–87. 12. Jirkovská, A., Hosová, J., Wosková, V. Diagnostika akutní a subakutní Charcotovy osteoarthropatie u diabetiků. *Prakt. Lék.*, 1998, 78, 12, s. 661–664. 13. Jirkovská, A., Kasalický, P., Bouček, P., et al. Calcaneal ultrasonometry in patients with Charcot osteoarthropathy and its relationship with densitometry in the lumbar spine and femoral neck and with markers of bone turnover. *Diabet. Med.*, 2001, 18, p. 495–500. – 14. Laing, P. Diabetic foot ulcers. *Amer. J. Surg.*, 1994, 167, 1A, p. 31S–36S. – 15. Lavery, L. A., Baranoski, S., Stello, E. A. Options for off-loading the diabetic foot. *Adv. Skin Wound Care*, 2004, 17, p. 181–186. – 16. Matricali, G. A., Deroo, K., Dereymaeker, G. Outcome and recurrence rate of diabetic foot ulcers treated by a total contact cast: short-term follow-up. *Foot Ankle Int.*, 2003, 24, p. 680–684. – 17. McGill, M., Molyneaux, L., Bolton, T., et al. Response of Charcot's arthropathy to contact casting: assessment by quantitative techniques. *Diabetologia*, 2000, 43, 4, p. 481–484. – 18. Myerson, M., Papa, J., Baton, K., Wilson, K. The total-contact cast for management of neuropathic plantar ulceration of the foot. *J. Bone Joint Surg. Am.*, 1992, 74, p. 261–269. – 19. Shaw, J. E., His, W. L., Ulbrecht, J. S., et al. The mechanism of plantar unloading in total contact casts: implications for design and clinical use. *Foot Ankle Int.*, 1997, 18, 12, p. 809–817. – 20. Syndrom diabetické nohy. Mezinárodní konsensus vypracovaný Mezinárodní pracovní skupinou pro syndrom diabetické nohy. Praha: Galén, 2000. – 21. Wukich, D. K., Motko, J. Safety of total contact casting in high-risk patients with neuropathic foot ulcers. *Foot Ankle Int.*, 2004, 25, p. 556–560.

10. 4. 2005

MUDr. Vladimíra Fejfarová
Centrum diabetologie, IKEM
Videňská 1958
140 21 Praha 4

DIABETOLOGIE METABOLISMUS ENDOKRINOLOGIE VÝŽIVA

ČASOPIS PRO POSTGRADUÁLNÍ VZDĚLÁVÁNÍ

ROČNÍK 8 • SUPPLEMENTUM 1 • 2005

XLI. DIABETOLOGICKÉ DNY

Luhačovice, 21.-23. dubna 2005

ABSTRAKTA

INDEXOVÁNO V EMBASE - EXCERPTA MEDICA
EXCERPOVÁNO V BIBLIOGRAPHIA MEDICA CECOSLOVACA

www.tigis.cz/dnev/Index.htm

ISSN 1211-9326

Tigis

Pacienti byli odesláni od praktických lékařů pro děti a dorost, od dětských diabetologů/endokrinologů nebo z jiných lůžkových zařízení. Glykemie nalačno při vyšetření u odesílajícího lékaře se pohybovala v rozmezí od 5,5 do 20,9 mmol/l (medián 7,1) a při prvním vyšetření u nás od 3,95 do 22,6 mmol/l (medián 5,9). U pacientů jsme vyhodnotili rodinnou anamnézu, věk, BMI, glykémii, hladinu inzulínu a C-peptidu nalačno, glukózovou toleranci pomocí oGTT, první fázi inzulínové sekrece (FPIR) pomocí ivGTT, známky ketoacidózy, závislost na léčbě inzulínem; u všech jsme analyzovali gen pro glukokinázu (MODY2) a pro HNF-1alfa (MODY3), u dětí do 2 let věku genu pro Kir6.2 (permanentní neonatální diabetes mellitus; PNDM) a u části pacientů gen pro HNF-4alfa (MODY1).

Výsledky: Presymptomatickou fází diabetes mellitus 1. typu (T1DM) jsme zjistili u 11 pacientů; u 35 byl příčinou defekt glukokinázy (MODY2), u dvou MODY3 a u jednoho pacienta MODY1. U jednoho chlapce byl zjištěn PNDM na podkladě defektu Kir6.2. U 9 pacientů s poruchou glukózové tolerance (PGT) a/nebo diabetes mellitus (DM) se etiologii prokázat nepodařilo. 23 dětí a dospívajících mělo glukózovou toleranci v normě, provedenými vyšetřeními jsme vyloučili poruchu metabolismu glukózy (NGT). Vybrané výsledky vyšetření shrnuje tabulka v dolní části strany (hodnoty uvedeny jako průměr a rozmezí).

Závěry: 1. Nález asymptomatické hyperglykemie umožňuje u převážné většiny pacientů prokázat etiologii poruchy regulace glykemie, případně poruchu vyloučit.

2. U dětí a dospívajících je nejčastější příčinou náhodně zjištěné hyperglykemie defekt glukokinázy (MODY2). Tito pacienti nevyžadují léčení.

3. U 13% pacientů je náhodně zjištěná hyperglykemie prvním projevem T1DM; těmto pacientům přináší včasná a exaktní diagnóza možnost zahájit inzulínovou léčbu před rozvojem klinických příznaků diabetu.

4. Vzhledem k probíhajícím pilotním studiím s léčbou deriváty sulfonylurey u dětí s PNDM na podkladě defektu Kir6.2, ale i u pacientů s MODY1 a MODY3, může přesná diagnostika těmto pacientům v budoucnu přinést atraktivnější možnost terapie ve srovnání s celoživotní léčbou inzulínem.

Studie byla provedena v rámci projektu IGA MZ ČR NB/7420-3.

18. KOMPLIKACE LÉČBY SNÍMATELNÝMI KONTAKTNÍMI FIXACEMI SE ZAMĚŘENÍM NA OSTEOMYELITIDU

V. Fejfarová, A. Jirkovská, M. Křížová, R. Bém

Klinika diabetologie, IKEM, Praha

Aplikace kontaktních fixací (TCC) je jednou z neúčinnějších metod odlehčení dolních končetin. Léčba TCC může být v některých případech provázána rozvojem komplikací, které zahrnují i osteomyelitidu (OM). Cílem naší studie bylo stanovit četnost komplikací léčby TCC a sledovat vliv TCC na hojení OM

a riziko rozvoje nové OM u pacientů se syndromem diabetické nohy. **Metody:** Do naší studie bylo zařazeno 61 pacientů se syndromem diabetické nohy, kteří byli léčeni snímatelnými TCC (průměrný věk 54 ± 9 let, trvání diabetu $15,6 \pm 9$ let, HbA_{1c} $8,3 \pm 1,8\%$). Snímatelné TCC byly indikovány pro neuropatické ulcerace, akutní Charcotovu osteoartrózu a pro neuropatické fraktury. OM byla diagnostikována RTG vyšetřením a přítomností laboratorních známek zánětu. V průběhu 20 měsíců byla sledována četnost komplikací léčby TCC. Ve studii byl vzájemně porovnán počet pacientů s OM detekovanou před aplikací TCC s počtem zhojených nemocných po aplikaci TCC a s počtem pacientů s nově rozvinutou OM během terapie TCC. Všichni pacienti s OM byli léčeni antibiotiky během TCC terapie. **Výsledky:** Všichni pacienti byli léčeni snímatelnými TCC v průměru $5,4 \pm 5$ měsíců. Nejčastější komplikací TCC léčby byla zlomenina TCC (49%); druhou nejčastější komplikací byl rozvoj nové neuropatické ulcerace na léčené noze (25%). Progrese lokální infekce, která vedla k přerušování léčby TCC, byla nalezena u 11% nemocných. Velmi zřídka se vyskytovaly ostatní komplikace zahrnující zlomeniny kostí (2%), bolesti kloubů (2%) a mykózy (3%). 21/61 (34%) všech pacientů mělo OM před zahájením léčby TCC, 11/21 (52%) z nich se zhojilo během léčby TCC. 40/61 (66%) všech pacientů nemělo diagnostikovanou OM před aplikací TCC, avšak OM se nově rozvinula u 3/40 (8%) z nich během léčby TCC. Počet pacientů se zhojenou OM byl signifikantně vyšší v porovnání s počtem pacientů s nově rozvinutou OM ($p < 0,01$). 10 pacientů s nezhojenou OM diagnostikovanou před aplikací TCC bylo charakterizováno především lokalizací OM (převaha OM v tarsálních kostech). Ani závažnost diabetické ulcerace ani mikrobiální rezistence se signifikantně nelišily mezi skupinou pacientů se zhojenou a nezhojenou OM po aplikaci TCC. **Závěr:** Osteomyelitida není absolutní kontraindikací aplikace kontaktní fixace, jelikož benefit léčby fixací je vyšší nežli riziko rozvoje nové osteomyelity u pacientů se syndromem diabetické nohy. U pacientů s osteomyelitidou, kteří jsou léčeni kontaktními fixacemi, je velmi důležité pravidelně kontrolovat lokální a RTG nálezy a dlouhodobě je léčit antibiotiky.

19. POLYMORFISMY PARAOXONÁZY 1 U PACIENTŮ S DIABETES MELLITUS 2. TYPU

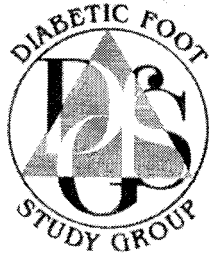
M. Flekač, J. Škrha

III. interní klinika 1. LF UK a VFN v Praze

Úvod: Paraoxonáza 1 (PON1) je kalcium-dependentní antioxidantní enzym vyskytující se v séru jako součást molekuly lipoproteinů o vysoké hustotě. U pacientů s diabetem byl opakovaně prokázán vystupňovaný oxidační stres a jednou z možných příčin se zdá být i snížená antioxidantní aktivita PON1. V lidské populaci je velmi široký interval sérových koncentrací a enzymové aktivity paraoxonázy, což může být z části podmíněno geneticky, řadou polymorfismů (SNP) jak v kódující, tak v promotorové oblasti genu.

Tabulka k 17. abstraktu - článek Analýza příčin asymptomatické hyperglykemie u dětí a dospívajících

	n (% souboru)	věk (let)	glykemie nalačno (mmol/l)	C-peptid nalačno (pmol/l)	inzulín nalačno (mIU/l)
T1DM	11 (13%)	9,9 (3,8-14,5)	9,5 (3,95-20,3)	374 (13-874)	7,3 (2,0-13,0)
MODY1	1 (1%)	14	8,4	342	?
MODY2 (defekt glukokinázy)	35 (43%)	11,2 (0,5-16,1)	6,4 (4,7-7,8)	703 (204-4315)	12,6 (2,0-75,0)
MODY3	2 (2%)	16,0 (15,9-16)	5,2 (5,2-5,2)	512 (254-770)	8,2
PNDM (defekt Kir6.2)	1 (1%)	0,2	22,6	183	2
nejasná PGT/DM	9 (11%)	11,2 (0,7-14,4)	6,2 (4,6-9,2)	605 (187-1060)	7,2 (3,4-17,0)
NGT	23 (28%)	9,7 (1,3-16,1)	4,8 (3,95-5,95)	528 (161-1109)	6,6 (2,0-11,0)



III. JOINT MEETING OF THE

DFSG

(Diabetic Foot Study Group of the EASD)

and

NEURODIAB

(Diabetic Neuropathy Study Group of the EASD)

2. – 5. SEPTEMBER 2004

University Clinic, Regensburg, Germany

Complications of TCC treatment with the focus on osteomyelitis.

V.Fejfarová, A.Jirkovská, M.Křížová, R.Bém Diabetes Center, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic

One of the recommended method of lower limb off-loading is the application of TCC, which could sometimes lead to some complications including osteomyelitis (OM). **The aims** of our study were to assess the frequency of all complications and the influence of TCC therapy on healing of OM and risk of new OM development in patients with the diabetic foot. **Methods:** 61 patients with the diabetic foot treated by removable TCC were included into our study (mean age 54 ± 9.2 years, diabetes duration 15.6 ± 9 years, HbA1c 8.3 ± 1.8 %). Removable TCC was indicated in 27 patients for neuropathic foot ulcers, in 35 patients for acute Charcot osteoarthropathy and in 12 patients for neuropathic fractures. OM was diagnosed by X-ray and laboratory parameters of infection. The frequency of all complications was detected during the observed period of 20 month. The frequency of patients with OM before therapy and healed after TCC application was compared with the frequency of patients with new developed OM during TCC therapy. All patients with OM were treated by antibiotics during TCC treatment. **Results:** Removable TCC was applied for 5.4 ± 4.5 month on average in all patients. The most common complication of TCC therapy in study group was the broken cast (49%), the second one was the development of a new neuropathic ulcer on the same foot (25%); progression of local infection, which leads to the interruption of TCC therapy, was found in 11% of all patients. Other complications such as bone fracture (2%), joint pain (2%) and mycosis (3%) were seen very rarely. 21/61 (34%) of all patients had OM before TCC therapy, 11/21 (52%) of them has healed during TCC treatment. 40/61 (66%) of all patients had no diagnosed OM before TCC application, however new OM developed in 3/40 (8%) of them during TCC treatment. The frequency of patients with healed OM was significantly higher in comparison with the frequency of patients with newly developed OM ($p < 0.01$). 10 patients with non-healed previously diagnosed OM were specified mostly by OM location (predominance of OM in tarsal bones). The distribution of type of ulcer and microbial resistance were similar in healed and non-healed patients with OM. **Conclusion:** Osteomyelitis does not form absolute contraindication of TCC application, since the benefit of TCC therapy is higher than risk of new OM development in patients with the diabetic foot. However, it is necessary to control regularly the local and X-ray findings of these patients and treat them by antibiotics for a long-time.

This study was supported by grant of Ministry of Health No VZ/CEZ:L 17/98:00023001

Diabetologia

INSTITUT
KLINICKÉ A EXPERIMENTÁLNÍ MEDICÍNY
Informační a komunikační úsek
VĚDECKÁ LÉKAŘSKÁ KNIHOVNA
140 21 Praha 4-Krč, Vídeňská 1958/9
- 5 -

Clinical and Experimental Diabetes and Metabolism

Journal of the European Association for the Study of Diabetes (EASD)

Volume 48 Supplement 1 August 2005

Editor-in-Chief

Edwin Gale

Managing Editor

Judy Naylor

Associate Editors

Polly Bingley
Knut Borch-Johnsen
Karsten Buschard
Michaela Diamant
Keith Frayn
Clemens Fürnsinn
Frans Gorus
Per-Henrik Groop
Torben Hansen
Chantal Mathieu
Mark McCarthy
Andreas Pfeiffer
Raphael Scharfmann
Len Storlien
Markus Tiedge
David Tomlinson
Nicholas Wareham
Juleen Zierath

Advisory Board

Mark Atkinson
Anne Clark
Helena Edlund
Mara Lorenzi
Ole Madsen
Giovanni Pacini
Wolfgang Patsch
Patrik Rorsman
Carani Sanjeevi
Werner Scherbaum
Jay Skyler
Bernat Soria
Emmanuel Van Obberghen
Hubert Vidal
Antonio Zorzano

Contents

Abstracts of the 41st Annual Meeting of the EASD
Athen, Greece, 10–15 September 2005

Minutes of the 40th General Assembly
of the European Association for the Study of Diabetes
Munich, Germany, 8 September 2004 I

Agenda for the 41st General Assembly
of the European Association for the Study of Diabetes
Athen, Greece, 14 September 2005 VII

Abstracts	A1
Author Index	A433
Organisation Section	A457

The Abstract Volume of the 41st Annual Meeting of the Association
is supported by an educational grant from Sanofi-Aventis

Indexed in/abstracted by the following service:
Current Contents – Index Medicus

Results: With a mean tissue/plasma ratios of 101.7% (95% CI: 55.9; 147.6) linezolid achieved good penetration into perinecrotic tissue. This corresponds to a mean tissue concentration of 9.6 mg/kg (95% CI: 7.4; 11.8 mg/kg), which is above the concentration predicted to be effective against clinically important cocci (MIC₉₀ for methicillin-resistant staphylococci 4 mg/L). Tissue/plasma ratios correlated with systemic inflammation (C-reactive protein: coefficient of correlation 0.73; $p < 0.01$; serum albumin: -0.68; $p < 0.05$; temperature: 0.6; $p < 0.05$).

Conclusions: Linezolid achieves adequate levels in perinecrotic areas of diabetic foot wound. The penetration is positively correlated with inflammation. The data presented suggest that linezolid could be successful in the treatment of DFI.

974

Does a diabetic foot infection (DFI) wound score correlate with the clinical response to antibiotic treatment?

Data from the SIDESTEP study

B. A. Lipsky¹, D. G. Armstrong², D. E. Morgenstern³, T. R. King³, M. A. Abramson³;

¹VA Puget Sound Health Care System, Seattle, ²Rosalind Franklin University of Medicine, Chicago, ³Merck & Co. Inc., West Point, United States.

Background and Aims: A variety of scoring systems have been promulgated for classifying diabetic foot ulcers, and some have shown benefit in guiding treatment or predicting clinical outcomes. While several of these systems take infection of the ulcer into consideration, none are specifically designed for scoring the infected foot. We developed a DFI wound scoring system incorporating grading of both specific wound parameters (local and systemic signs and symptoms of infection) and wound size measurements. We sought to determine if the resultant composite DFI wound score determined at baseline and during treatment predicted the clinical outcome.

Materials and Methods: The SIDESTEP study was a multicenter, randomized, double-blinded comparison of intravenous (IV) ertapenem (E) (1 g/d) and piperacillin/tazobactam (P/T) (3.375 g qid) for treatment of patients with moderate to severe DFI. Investigators graded each infection for the presence of purulent drainage, non-purulent drainage, erythema, induration, tenderness, pain, and local warmth for severity with a value ranging from 0 (absent) to 3 (severe). They also measured wound size, area, and undermining with scores ranging from 0 to 10 for size and depth, and 0 to 8 for undermining. The total DFI wound score, defined as the sum of the individual scores, was calculated at baseline, discontinuation of IV therapy (DCIV) and at a follow-up assessment (FUA) 10 days after cessation of antibiotic therapy.

Results: At baseline, DFI wound scores were calculated for 92.8% (373/402) of clinically evaluable patients; mean 16.1 ± 5.6 for E and 15.6 ± 5.7 for P/T. E treatment group: the favorable clinical response (infection improved or cured) at FUA ranged from 100% (52/52) in patients with a baseline wound score ≤ 12 to 81.8% (36/44) in patients with a baseline wound score > 19 . P/T: the favorable clinical response at FUA ranged from 90.6% (58/64) in patients with a baseline wound score ≤ 12 to 72.1% (31/43) in patients with a baseline wound score > 19 .

Conclusion: Mean DFI wound scores were similar for the two treatment groups in this study. Clinical response rates to antibiotic therapy were similar in both treatment groups at baseline, DCIV and FUA and the response rates generally decreased with an increase in baseline wound score. The DFI wound score may be a useful tool for assessing wound infection severity and in predicting treatment outcomes.

975

Type 1 diabetes associated with a high prevalence of low bone density

H. McDonald-Blumer¹, S. Elfassy², V. Van³, I. R. Blumer⁴;

¹Medicine, Mount Sinai Hospital, Toronto, ²University of Western Ontario, London, ON, Canada, ³University of Alberta, Edmonton, ⁴Charles H Best Diabetes Centre for Children & Youth, Ajax, Canada.

Background and Aims: Recent literature has suggested a possible association between type 1 diabetes (DM 1) and low bone mineral density (BMD). However, current diabetes guidelines (ADA, CDA) and osteoporosis guidelines (NOF, OSC) make no mention of this potential association despite the fact that some studies show up to a twelve fold increased risk of osteoporotic fractures. To expand upon the limited literature on this topic and to determine if such an association exists in adults, we surveyed adult patients with DM 1 from a large community diabetes practice.

Materials and Methods: All active patients aged 20 to 65 with DM 1 not meeting exclusion criteria (pregnancy or actively seeking pregnancy; known secondary cause of osteoporosis/low BMD; use of anti-resorptive medication, unable or unavailable to participate) were eligible for inclusion (267 patients). One hundred and thirty patients completed a standardized questionnaire and a BMD assessment.

Results: Of the 130 who completed the standardized questionnaire and BMD assessment, 52 (40%) had a T score of < -1.0 in at least one of three measured sites (femoral neck, total hip, lumbar spine). Men were more likely to be affected (29 of 63; 46%) than women (23 of 67; 34%), particularly in the quartile with the lowest BMD (21 men of 32 individuals; 65%). Low BMD was more common in older age groups (20 of 37 aged 50-65; 54%), but still notably high among younger age groups (11 of 30 aged 20-34; 37%). Traditional osteoporosis risk factors did not seem helpful in discriminating the quartile with the lowest BMD from that with the highest with the exception of prevalent fracture which was more common in those with the lowest BMD scores; however lower body mass index, longer duration of diabetes, and male gender were associated with lower BMD.

Conclusion: This data suggests a significant proportion of adults with DM 1 have low BMD with a disproportionate representation of men in the most severely affected group. Further study is needed to assess the mechanism behind both the increased prevalence of low BMD observed in persons with DM 1 and the factors leading to the over-representation of affected males.

976

In Charcot osteoarthropathy early offloading prevents bone mineral density falls not only in the Charcot foot but in the contralateral non-Charcot foot

N. L. Petrova, M. Bates, A. V. M. Foster, M. E. Edmonds;
Diabetic Foot Clinic, King's College Hospital, London, United Kingdom.

Background and Aims: The aim of this study was to measure prospectively calcaneal bone mineral density (BMD) in the Charcot and non-Charcot foot in the acute and chronic stages of Charcot osteoarthropathy.

Materials and Methods: We studied 31 patients with acute unilateral Charcot osteoarthropathy: 20 patients presenting with established x-ray changes and 11 patients with normal x-ray but abnormal bone scan. All patients were treated with offloading.

Results: In patients with x-ray changes, BMD was significantly reduced in the Charcot foot compared with the non-Charcot foot (0.391 ± 0.12 g/cm² versus 0.477 ± 0.13 g/cm², $p < 0.001$). On follow up over 10 ± 4 months despite offloading, there was significant reduction in BMD not only in the Charcot foot (0.353 ± 0.11 g/cm², $p = 0.034$) but also in the non-Charcot foot (0.456 ± 0.13 g/cm², $p = 0.008$).

In contrast, patients presenting with normal x-ray, had similar BMD between the Charcot foot and non-Charcot foot (0.412 ± 0.11 g/cm² versus 0.428 ± 0.1 g/cm², $p = 0.438$). On follow up over 8 ± 2 months, after offloading BMD did not fall either in the Charcot foot (0.416 ± 0.12 g/cm², $p = 0.795$) or in the non-Charcot foot (0.439 ± 0.1 g/cm², $p = 0.261$).

Conclusion: Offloading in Charcot osteoarthropathy may prevent falls in bone mineral density in the Charcot foot and non-Charcot foot if applied promptly before radiological changes have developed.

Supported by Diabetes UK: BDA RD01/002284

977

Risk and benefit of total contact cast treatment of the diabetic foot related to osteomyelitis

V. Fejfarova, A. Jirkovska, R. Bem, J. Skibova;
Diabetes Center, Institute for Clinical and Experimental Medicine,
Prague 4, Czech Republic.

Background and Aims: Total contact cast (TCC) is one of the most suitable lower-limb off-loading methods used in diabetic foot treatment. TCC therapy may improve healing of existing osteomyelitis (OM). On the other hand, the risk of this method is that it could also induce progression of infection and development of a new OM. The aims of our study were to assess risk vs. benefit of TCC treatment related to OM and factors influencing healing of OM and development of a new OM.

Materials and Methods: 61 unselected patients (mean age 54 ± 9 years, diabetes duration 15.6 ± 9 years, HbA_{1c} $8.3 \pm 1.8\%$) treated in our foot clinic for the diabetic foot by removable TCC from 2/2002 to 12/2003 were included into our study. Patients were observed and treated by TCC until healing of the diabetic foot or at least for 2 months and maximum for 12 months (removable TCC was applied for 5.4 ± 4.5 month on average in all patients). OM was diagnosed by X-ray and laboratory markers of infection

(CRP, Leukocytes). The frequency of patients with OM before therapy and healed after TCC application was compared with the frequency of patients with newly developed OM during TCC therapy (McNemar test). Factors influencing healing of OM such as OM location, the type of ulcer and microbial findings were assessed. The rates of all complications were recorded during the observed period.

Results: 21/61 (34%) of patients had OM before TCC therapy and 11/21 (52%) of them healed during TCC treatment. From 40 patients without OM before TCC application, 3 patients (8%) developed new OM during TCC therapy. The frequency of patients with healed OM was significantly higher compared with the frequency of patients with newly developed OM ($p < 0.01$), it means that the benefit of TCC therapy on healing of OM was 3.6 times higher in comparison with the risk of a newly developed OM during application of this off-loading method. 10 patients with previously diagnosed non-healed OM were characterized primarily by OM location in tarsal bones; other factors such as the type of ulcer and microbial resistance had no significant effect. Patients with a newly developed OM were specified by ulcer of Wagner 3 and infection caused by resistant pathogens. The most common other complication of TCC therapy in the study group was broken cast (49%), followed by the development of a new neuropathic ulcer on the same foot (25%). Progression of local infection leading to discontinuation of TCC therapy was noted in 11% of all patients. Other complications such as joint pain (2%) and mycosis (3%) were seen very rarely.

Conclusion: Our data showed that benefit of TCC therapy on healing of OM was significantly higher in comparison with the risk of a newly developed OM during this treatment. However, application of TCC in patients with OM located in tarsal bones and in patients with neuropathic foot ulcers of Wagner 3 and/or with infection caused by resistant pathogens is still controversial.

This study was supported by the Institute for Clinical and Experimental Medicine (MZO 00023001).

978

How long does it take to progress from cast to shoes in the management of Charcot osteoarthropathy?

M. Bates, N. L. Petrova, M. E. Edmonds;

King's College Hospital, London, United Kingdom.

Background and Aims: Charcot osteoarthropathy can be managed either with total contact cast or removable cast walker. However, the transition from cast to bespoke footwear is not well described. We report the duration of casting in the management of 46 patients with Charcot osteoarthropathy and we emphasize that over 30% of patients relapsed after coming out of a cast.

Materials and Methods: We studied 23 type 1 and 23 type 2 diabetes with acute Charcot osteoarthropathy. Mean age was 50 ± 13.1 years (mean \pm SD) and mean duration of diabetes was 20 ± 11.1 years. Total contact cast was applied in 34 patients as the primary treatment but when there were contraindications to it, a removable cast walker was used in 12 patients. Patients were changed either from total contact cast to bivalve cast and then bespoke shoes or from removable cast walker to shoes when foot skin temperature difference was less than 2°C and there was a radiographic evidence of consolidation. Relapse was defined as an increased foot skin temperature difference of greater than 2°C after the primary casting treatment had been concluded.

Results: The median duration of casting treatment for all patients was 11 (8–16.7) months [median (25th–75th percentile)]. Thirty-one patients (67%) progressed from the primary treatment to bespoke footwear without relapse and duration of casting was 9 (7–12) months. However, 15 patients (33%) relapsed after completing their primary casting treatment. They had to return to their casting treatment and the total duration of casting for these patients was 20 (15–21) months, ($p < 0.001$). Relapse of Charcot osteoarthropathy was not correlated with the type of primary casting treatment ($r = 0.220$, $p = 0.141$), age ($r = 0.082$, $p = 0.587$), duration of diabetes ($r = 0.182$, $p = 0.226$), type of diabetes ($r = 0.046$, $p = 0.76$), gender ($r = 0.016$, $p = 0.915$) and site of involvement ($r = 0.07$, $p = 0.627$).

Conclusion: This study has shown that the total duration of casting is longer than previously reported and emphasizes that over 30% of the patients relapse after completing their primary cast treatment. It is important that patients with Charcot osteoarthropathy should be observed very carefully to identify relapse early.

979

Nonremovable fiberglass off-loading walking cast versus aircast in the treatment of neuropathic foot ulcers: a controlled randomized clinical study

C. Caravaggi^{1,2}, A. Sganzeroli¹, I. Pogliaghi¹, P. Cavaiani¹, E. Sommariva¹, L. Ferrari¹, L. Sacchetto¹;

¹Center for the Study and Treatment of Diabetic Foot Pathology, Abbiategrasso Hospital, Milan, ²University Vita – Salute San Raffaele, Milan, Italy.

Background and Aims: Neuropathic plantar ulcers are the most frequent complication of sensitive motor diabetic neuropathy. The altered plantar bearing, consequent to articular rigidity and to the foot structural deformities, is responsible for the appearance of plantar peaks of pressure which condition the rise of non-painful areas of callosity, frequently evolving into ulcerative wounds. The treatment of choice of neuropathic plantar ulcers is given by the total off-loading of the ulcers, achieved with an off-loading device. Our group has recently shown the superiority of the nonremovable fiberglass off-loading walking cast (OWC) vs. a therapeutic shoe with off-loading insole. The complexity of preparing such an off-loading device has not allowed a mass usage of this technique. Purpose of the study is the comparison of efficacy and safety of a new removable off-loading device (AIRCASST).

Materials and Methods: We consecutively enrolled 36 patients affected by plantar ulcers with at least 3 months history, with an ulcer surface $\geq 1 \text{ cm}^2$ and TcP02 $\geq 40 \text{ mmHg}$. Exclusion criteria were: clinically infected wound, bone exposure, x-ray confirmed osteomyelitis, contra-indications to the use of the off-loading device (reduced visual acuity, impaired equilibrium, amputated contralateral limb). 19 patients were enrolled in the OWC group while 17 in the Aircast group. The ulcer surface was $370 \pm 340 \text{ mm}^2$ in the OCW group and 240 ± 170 in the AIRCAST group. The study lasted 90 days. The control visits were done every 12 days at the Center. During the visit the OCW or Aircast was removed, the wound was dressed (surgical curettage, cleansing with iv sodium solution, application of hyaluronic acid, polyurethane foam) and the OCW remade or the AIRCAST re-applied. The patients from the Aircast group were informed of the need to wear continuously the device in order to obtain ulcer healing.

Results: At the end of the 90-day observation period 16 patients (81%) in the OCW group healed, with an average time of 43.3 ± 19.5 days, while in the Aircast group 13 pts (76%) healed, with an average of 53.3 ± 20.5 days. In the OCW group there were 3 dropouts, while in the AIRCAST group there were 4.

Conclusion: Data coming out from our study demonstrated that there are not statistically differences between the two treatments both from efficacy and safety point of view. We can state that AIRCAST device can be considered a good off-loading system for the treatment of neuropathic plantar ulcers.

Final Programme · Abstracts

16th Conference of the
European Wound Management Association

Prague · Czech Republic · 18-20 May 2006

Innovation Education Implementation

Bi-lingual
English/Czech
Czech/English

EWMA 2006 · PRAGUE

WWW.EWMA.ORG/EWMA2006



Organised by the European Wound Management Association in
co-operation with the Czech Wound Management Association ČSLR

049

TOTAL CONTACT CAST IN THE TREATMENT OF THE DIABETIC FOOT – ITS RISK AND BENEFIT WITH FOCUS ON OSTEOMYELITIS.

Vladimíra Fejfarová, Alexandra Jirkovská, Marta Krížová, Robert Bém, Jelena Skibová

Diabetes Center, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic

Total contact cast (TCC) is one of the most suitable lower-limb off-loading methods used in diabetic foot treatment. TCC therapy has its own benefit lies in the improvement of healing of existing osteomyelitis (OM) and its risk lies in the possibility of infection progression and development of a new OM. The aims of our study were to assess risk vs. benefit of TCC treatment related to OM and factors influencing healing of OM and development of a new OM.

Methods: 61 unselected patients (mean age 54±9 years, diabetes duration 15.6±9 years, HbA1c 8.3±1.8%) treated in our foot clinic for the diabetic foot by removable TCC (from 2/2002 to 12/2003) were included into our study. Patients were observed and treated by TCC until healing of the diabetic foot or at least for 2 months and maximum for 12 months. OM was diagnosed by X-ray and laboratory markers of infection (CRP, Leukocytes). The frequency of patients with OM before therapy and healed after TCC application was compared with the frequency of patients with newly developed OM during TCC therapy. Factors influencing healing of OM and the rates of all treatment complications were assessed.

Results: Removable TCC was applied for 5.4 ± 4.5 months on average in all patients. 21/61 (34%) of all patients had OM before TCC therapy and 11/21 (52%) of them healed during TCC treatment. 3 patients (8%) from 40 patients without OM before TCC application developed new OM during TCC therapy. The frequency of patients with healed OM (11/21-52%) was significantly higher compared with the frequency of patients with newly developed OM (3/40-8%; p<0.01). The benefit of TCC therapy on healing of OM was 3.6 times higher in comparison with the risk of a newly developed OM during application of this off-loading method. 10 patients with non-healed OM were characterized primarily by OM location in tarsal bones; other factors such as type of ulcer and microbial resistance had no significant effect. Patients with a newly developed OM were specified by ulcer of Wagner 3 and infection caused by resistant pathogens. The most common other complication of TCC therapy in the study group was broken cast (49%), followed by the development of a new neuropathic ulcer on the same foot (25%). Progression of local infection leading to discontinuation of TCC therapy was noted in 11% of all patients.

Conclusions: Our data showed that benefit of TCC therapy on healing of OM was significantly higher in comparison with the risk of a newly developed OM during this off-loading treatment. However, application of TCC in patients with OM located in tarsal bones and in patients with neuropathic foot ulcers of Wagner 3 and/or with infection caused by resistant pathogens is still controversial.

This study was supported by the Institute for Clinical and Experimental Medicine (MZO 00023001).

050

DETERMINANTS AND ESTIMATION OF WOUND HEALING ACHIEVEMENT AFTER MINOR AMPUTATION IN PATIENTS WITH DIABETIC FOOT

Robert Bém, Alexandra Jirkovska, Vladimira Fejfarova, Jelena Skibova, Bedrich Sixta

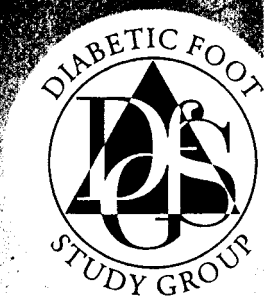
Institute for Clinical and Experimental Medicine, Diabetes Centre, Prague, Czech Republic

Aims: of our study was to assess risk factors for unsuccessful wound healing after minor amputation in patients with diabetic foot.

Methods: We evaluated 128 patients treated in our foot clinic and indicated for minor amputation during the period 4/2000- 7/2003. The healing was evaluated after 6 months since primary amputation. Criterion for successful healing after the amputation was healed wound below the metatarsal level; unsuccessful healing was assessed as non-healed wound or reamputation above the ankle. Potential risk factors for unsuccessful healing were selected from risk factors for foot ulcers and amputations.

Results: Unsuccessful healing was seen in 29/128 (22.7%) of patients - 10 (7.8%) of them were healed above the ankle and 19 (14.9%) patients were non-healed during the study period. Stepwise logistic regression has shown that low value of TcPO₂ (Odds ratio [OR] = 0.653, 95% CI 0.50-0.853), high value of CRP (OR = 1.07, 95% CI 1.02-1.13) and presence of cerebral ischemia in history (OR = 0.036, 95% CI 0.001-1.08) are significant risk factors for unsuccessful healing after minor amputation in patients with diabetic foot; other assessed potential risk factors were no significant.

Discussion: The results of our study support the premise that measurement of transcutaneous oxygen tension and CRP before minor amputation is helpful in predicting the prognosis of wound healing after minor amputation; aggressive therapy of infection and ischaemia before minor amputation is necessary to improve the prognosis of wound healing. Supported by the MZO00023001.



VI. MEETING OF THE DFSG

Diabetic Foot Study Group of the EASD)
www.dfsg.org

10. - 13. SEPTEMBER 2006
LO Skolen, Elsinore, Denmark

OP7

Comparison of Complications of off-loading methods (Total Contact Cast vs. removable cast Walker) with focus on osteomyelitis

V.Fejfarová, A.Jirkovská, R.Bém, M.Křížová

Diabetes Center, Institute for Clinical and Experimental Medicine
Prague, Czech Republic

The application of different off-loading methods used for treatment of the diabetic foot could lead in several cases to a development of some complications, e.g. progression of local findings leading to the interruption of selected off-loading therapy or development of a new osteomyelitis (OM). The aim of our study was to compare the incidence of complications with focus on OM, which developed during the therapy performed by removable Total Contact Cast (r-TCC) and Removable Cast Walker (RCW). **Methods:** 99 patients with chronic neuropathic foot ulcers, acute Charcot osteoarthropathy and neuropathic fractures treated by r-TCC (mean age 53.3 ± 9.9 years, mean diabetes duration 15.9 ± 10.2 years, mean HbA1c $6.5 \pm 1.8\%$) and comparable 23 patients treated for the same indications by RCW (mean age 57.4 ± 12 years, mean diabetes duration 19.6 ± 9.9 years and mean HbA1c $7.3 \pm 2\%$, NS) in our foot clinic during the last 4 years were included into our study. OM was diagnosed by X-ray and laboratory markers of infection. The incidence of complications such as mycosis, new ulceration, pain and progression of local findings were assessed during the off-loading therapy. The benefit/risk ratio was defined as a relationship between number of healed OM and number of newly developed OM during selected off-loading therapy and the effect of r-TCC on benefit/risk ratio was compared with those found in patients treated by RCW. **Results:** The mean durations of therapy by r-TCC or RCW did not differ significantly between each other (8.3 ± 5.4 vs. 6.2 ± 4.2 months; NS). The incidences of all complications were not significantly different between the two groups of patients treated by r-TCC and RCW (mycosis 14.1 vs. 13%; new ulceration 36.4% vs. 30.4%; pain 3% vs. 8.7%, all NS). The most important serious complications such as the progressions of local finding leading to the interruption of r-TCC or RCW therapy were seen very rarely in both groups (12% vs. 22%, NS). Significantly higher healing of OM and lower development of a new OM were found in patients treated by r-TCC (20 patients-62.5% from 32 patients with previous OM and 6 patients-9.4% from 64 patients without previous OM; $p < 0.01$) in contrast to those treated by RCW (3 patients- 50% from 6 patients with previous OM and 2 patients- 11.8% from 17 patients without previous OM; NS). The benefit/risk ratio of healing and new development of OM was significantly higher in patients treated by r-TCC (3.3) compared to those treated by RCW (1.5; $p < 0.01$). **In conclusion,** the incidences of complications, even those leading to the interruption of off-loading therapy, were not significantly different in both study groups treated by r-TCC and RCW. However there was significantly higher successful OM healing by r-TCC compared to the RCW therapy.

This study was supported by MZO 00023001.