

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

**Teze dizertační práce na téma:
Imunologické abnormality a infekční
komplikace u pacientů se syndromem
diabetické nohy a terapie syndromu
diabetické nohy odlehčením.**

MUDr. Vladimíra Fejfarová

Centrum diabetologie, IKEM, Praha

Dizertační práce byla vypracována v rámci postgraduálního doktorského studia v Centru diabetologie, IKEM.

Autor: MUDr. Vladimíra Fejfarová

Školitel: Doc. MUDr. Alexandra Jirkovská, CSc.

Adresa: Centrum diabetologie IKEM
Václavská 1958/9
Praha 4 Krč, 140 28

Oborová rada: Fyziologie a patofyziologie člověka
(předseda Prof. MUDr. Stanislav Trojan, DrSc.)

Oponenti:
.....
.....

Autoreferát byl rozeslán dne:

Obhajoba dizertační práce se koná dne v
.....hodin před komisí pro obhajoby doktorských dizertací.

S dizertační prací je možno se seznámit na děkanátě 1. lékařské fakulty, Kateřinská 32, Praha 2, 12108.

OBSAH:

1. ÚVOD DIZERTAČNÍ PRÁCE	5
1.1 Imunitní systém a jeho poruchy související s diabetem.....	5
1.2 Vliv vitamínů a vybraných prvků na imunitní funkce.....	7
1.3 Infekční komplikace u pacientů se syndromem diabetické nohy	7
1.4 Terapie syndromu diabetické nohy odlehčením.....	9
2. CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE.....	10
3. METODIKA A HLAVNÍ VÝSLEDKY STUDIÍ:	
3.1 Abnormality imunitních funkcí ve vztahu k diabetu a jeho komplikacím, zejména syndromu diabetické nohy	11
- <i>Studie 1:</i> Vliv akutní hyperglykémie a/nebo hyperinzulinémie na funkce polymorfonukleárních buněk u zdravých dobrovolníků	
- <i>Studie 2:</i> Vliv akutní hyperglykémie a hyperinzulinémie na funkce polymorfonukleárních buněk u pacientů s diabetes mellitus 1. typu	
- <i>Studie 3:</i> Nespecifický imunitní systém u pacientů se syndromem diabetické nohy	
- <i>Studie 4:</i> Změny imunitního systému a zánětlivých parametrů u pacientů se syndromem diabetické nohy	
- <i>Studie 5:</i> Vitamíny a vybrané prvky u pacientů se syndromem diabetické nohy a jejich vztah k funkcím polymorfonukleárních buněk	
3.2 Infekční komplikace syndromu diabetické nohy.....	18
- <i>Studie 6:</i> Výskyt patogenů a jejich rezistence na antibiotika u transplantovaných, dialyzovaných a ostatních pacientů se syndromem diabetické nohy	
- <i>Studie 7:</i> Vliv antibiotické rezistence bakteriálních agens na četnost amputací dolních končetin u pacientů se syndromem diabetické nohy	
- <i>Studie 8:</i> Mykotické infekce u pacientů se syndromem diabetické nohy se zaměřením na jejich diagnostiku a sledování rizikových faktorů	
3.3 Terapie syndromu diabetické nohy odlehčením.....	22
- <i>Studie 9:</i> Vliv léčby snímatelnými kontaktními fixacemi na hojivost syndromu diabetické nohy	
- <i>Studie 10:</i> Komplikace léčby snímatelnými kontaktními fixacemi se zaměřením na osteomyelitidu	
- <i>Studie 11:</i> Srovnání efektu léčby snímatelnými kontaktními fixacemi a ortézami typu Removable Cast Walker na hojení syndromu diabetické nohy	

4. SOUHRN a SUMMARY.....	26
5. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	37
6. POUŽITÁ LITERATURA.....	38
7. SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORA.....	44

1. ÚVOD DIZERTAČNÍ PRÁCE

Jednou z nejčastějších komplikací diabetu, ovlivňující podstatně kvalitu života pacientů, jejich morbiditu a mortalitu, je syndrom diabetické nohy (SDN). Podle WHO je definován jako destrukce tkání nohy pod úrovní kotníku spojená s neurologickými abnormalitami a s různým stupněm ischemické choroby dolních končetin (ICHDK; 1). V České republice se v roce 2005 vyskytoval u 5.6% všech nemocných s diabetes mellitus.

K hlavním faktorům, které mohou přispět k rozvoji SDN řadíme diabetickou neuropatii, angiopatii a infekci tkání. V neposlední řadě přispívají k rozvoji SDN i poruchy imunitních funkcí zpomalující proces hojení ran (2). Diabetická neuropatie vedoucí k alteraci autonomních, motorických a sensorických nervových vláken, způsobuje poruchu fyziologické distribuce tlaku lokalizovaného na plantě. Tyto abnormality vedou k rozvoji deformit, např. ke kladívkovým prstům, k prominencím metatarsálních hlaviček a ke ztrátě podélné či příčné klenby (1). Zmíněné změny 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 popsanych mechanismů až u 10% všech pacientů s diabetem (1).

Další formou SDN je tzv. Charcotova osteoarthropatie (CHaO). Existuje mnoho teorií jejího vzniku, např. mechanická, neurovaskulární, apod. (3-5).

Proces hojení SDN je velmi často zdlouhavý. Jednou z příčin zpomaleného hojení je přítomnost infekce. Obvykle je nutno infekci léčit rychle a radikálně, jelikož může ohrozit rychlou progresí nejen končetinu pacienta, ale i celkový stav organismu zejména u některých rizikových skupin nemocných (př. transplantovaní a dialyzovaní). Typickým rysem diabetických ulcerací je jejich chronicita, na níž se podílí přetrvávající infekce v raně nedostatečně eradikovaná imunitním systémem. Vlastní obrana organismu, zajištěná imunitním systémem, může být porušena vlivem různých faktorů, mimo jiné i vlivem diabetu.

1.1 Imunitní systém a jeho poruchy související s diabetem

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

V rámci převážně specifického imunitního systému byly popsány u diabetiků změny jak ve spektru imunoglobulinů (6, 7), tak v hladinách komplementu (6, 8-10) a v subpopulacích lymfocytů (11-13). Jiné literární zdroje ovšem uvádějí normální hodnoty zmíněných parametrů imunity (7, 8).

Součástí nespecifického imunitního systému jsou tzv. profesionální fagocyté - polymorfonukleární (PMN) buňky. Fagocytóza PMN buněk, která hraje jednu z nejdůležitějších rolí v obraně hostitele, je rozdělena do několika kroků: chemotaxe, adherence, ingesce a intracelulárního zabíjení pomocí kyslík-dependentních mechanismů (tzv. oxidativního vzplanutí) a kyslík-independentních mechanismů (14, 15).

Oxidativní vzplanutí se skládá z navzájem na sebe navazujících metabolických dějů aktivovaných kontaktem membrány PMN buněk s cizorodou částicí. Vlivem metabolické kaskády zpracovávající NADPH, H₂O a O₂ dochází k produkci reaktivních kyslíkových intermediátů (ROI; 16-19). Produkce ROI v PMN buňkách je podporována oxidací glukózy cestou hexózomonofosfátového zkratu, což představuje úzké spojení mezi metabolismem glukózy a funkcemi PMN buněk.

Abnormální fagocytóza se může objevit u řady klinicky závažných onemocnění (20, 21). Některé studie prokázaly u diabetiků s chronickými hyperglykémiami funkční změny PMN buněk jako např. poruchy chemotaxe (22, 23), adherence (24) a ingesce (22, 25). V literatuře byla popsána signifikantní redukce oxidativního vzplanutí PMN buněk jak u pacientů s diabetes mellitus 1. (25, 26), tak i 2. typu (27).

V literatuře ale nalezneme kontroverzní vztahy mezi defekty leukocytárních funkcí a metabolickými abnormalitami přítomnými u diabetu (28, 29). Několik studií prokázalo zmíněné abnormality imunitního systému u těch nemocných, kteří měli vyšší glykovaný hemoglobin (HbA_{1c}; 25, 29, 30). V jiných studiích byla ale popsána normální nebo dokonce vyšší funkční odpověď PMN buněk diabetických pacientů spojená s akcelerací aterosklerózy (31- 35).

Vliv akutních metabolických změn na funkce PMN buněk byl dosud zkoumán především *in vitro* (36-38). *In vivo* studie byly prováděny zejména u chronicky dekompenzovaných diabetiků (30, 39). Akutní metabolický vliv *in vivo* na aktivitu PMN buněk se doposud vyšetřoval pouze za hyperinzulinemických nikoli hyperglykemických podmínek (40, 41).

V naší práci jsme se proto zaměřili na výzkum vlivu akutní hyperlykémie a/nebo hyperinzulinémie na funkci PMN buněk in vivo u zdravých dobrovolníků a u pacientů s diabetes mellitus 1. typu během clampových studií. Další studie byly zaměřeny na změny specifického i nespecifického imunitního systému u pacientů se SDN, u nichž může být imunita ovlivněna nejen diabetem, ale i přítomností chronické infekce rány.

1.2 Vliv vitamínů a vybraných prvků na imunitní funkce

Imunitní dysfunkce a rozvoj makroangiopatií mohou u diabetiků souviset nejen s hyperglykémiami, ale i s poruchami mikronutrientů, které zasahují do imunitních procesů organismu. Vitamín C, E a vybrané stopové prvky – magnesium (Mg), měď (Cu), zinek (Zn), železo (Fe) jsou zapojeny v glukózovém, lipidovém, proteinovém a energetickém metabolismu. Tyto mikronutrienty ovlivňují i oxidační stres a mohou ovlivnit imunitní funkce PMN buněk, jelikož jsou zapojeny např. v redoxních systémech a v produkci ROI (42). Např. Cu a Zn jsou hlavními kofaktory Cu, Zn-superoxiddismutázy (43, 44) a ovlivňují proliferaci imunitních buněk (43, 45, 46); snížená hladina Fe a Mg zhoršuje funkce PMN buněk (46, 47). Byl popsán vztah mikronutrientů ke změnám glukózového metabolismu a k diabetu (48-52).

V naší práci jsme se zabývali vztahem mikronutrientů k diabetu a k imunitnímu systému u pacientů se SDN, u nichž je dlouhodobě přítomna chronická infekce.

1.3 Infekční komplikace u pacientů se SDN

Mezi typické lokální projevy infekce SDN řadíme flegmónu dolní končetiny, edém, absces, nadměrnou sekreci z rány, zápach rány a zvýšenou kožní teplotu (1). Infekce měkkých tkání může resultovat v infekční postižení hlubších struktur, např. fasciitidu, tendinitidu, arthritidu a osteomyelitidu (OM).

Infekce v rámci SDN může být způsobena jak bakteriálními, tak mykotickými agens. Byla provedena celá řada studií zkoumající výskyt infekčních agens bakteriálního původu v diabetických ulceracích (53-55). Většina z nich prokázala, že diabetické ulcerace bývají častěji infikovány větším počtem patogenů než nediabetické rány (56, 57).

Infekce a mikrobiální rezistence u rizikových skupin diabetiků

Infekci v rámci SDN je vždy nutné zaléčit antibiotiky (ATB). Výběr ATB terapie je postaven především na empirických zkušenostech, v pozdějších fázích léčby se řídí mikrobiální citlivostí nalezených patogenů. Empirická ATB terapie by měla obsahovat terapeutika zaměřená zejména proti stafylokokům, kteří převažují v kultivačních nálezech především z povrchovějších ran, ale i z hlubokých struktur (53, 54). Širokospektrá agens používáme, pokud předpokládáme v diabetických ulceracích také výskyt Gram negativních patogenů či anaerobů (58).

Jiný empirický výběr ATB můžeme očekávat u rizikových skupin nemocných, mezi něž řadíme pacienty s chronickou renální insuficiencí, dialyzované a transplantované nemocné. Tito pacienti mají vysoké riziko rozvoje infekce, diabetických ulcerací a následně amputací dolních končetin (59, 60).

Stanovení rozdílů v mikrobiálních nálezech a mikrobiální rezistenci k ATB mezi rizikovými nemocnými a ostatními pacienty se SDN by mohlo přispět k určení racionální ATB léčebné strategie.

V naší práci jsme se proto zabývali výskytem mikrobiální rezistence a rozdílů v mikrobiálních nálezech u transplantovaných, dialyzovaných a ostatních pacientů se SDN.

Infekce a amputace

SDN často vede k amputacím a invalidizaci pacienta. V literatuře byla popsána řada faktorů, které zvyšují riziko amputací dolních končetin u diabetiků. Mezi ně řadíme např. kompenzaci a trvání diabetu (61), porušenou biomechaniku nohy a omezenou pohyblivost kloubů (62), kostní deformity (63), renální insuficienci (64, 65), předchozí hospitalizace (64), hloubku ulcerace (66) a v neposlední řadě ICHDK a diabetickou neuropatii (67-69). K nejzávažnějším faktorům ale patří ranná infekce, která je příčinou amputací dolních končetin u 25-50% diabetiků (1, 70, 71). Infekci je možno zaléčit pomocí ATB terapie. Léčba infekce SDN s sebou přináší řadu problémů. Ne všechny pacienty je možné léčit parenterální aplikací ATB do úplné eradikace infekčního agens vzhledem k možným vedlejším účinkům léčby, nedostatku hospitalizačních míst, sociálním a ekonomickým aspektům apod. Proto se pokoušíme většinu pacientů léčit ambulantně perorálními ATB. Mikrobiální rezistence k perorálním ATB podstatně limituje možnosti ambulantní léčby ulcerací a mohla by ovlivnit i výskyt amputací dolních končetin u pacientů se SDN.

V naší práci se zabýváme vlivem mikrobiální rezistence k perorálním ATB na výskyt amputací dolních končetin u pacientů se SDN.

Mykotické infekce

Pacienti s diabetes mellitus bývají postiženi zejména onychomykózou, která se vyskytuje mezi 7-21% (72-74), a tineaou pedis, která byla popsána u 20-40% případů (75). Tyto abnormality mohou přispět k rozvoji SDN a vést ke zpomalení hojení diabetických ulcerací (76).

Výskyt mykotických agens je ovlivněn rizikovými faktory, mezi něž řadíme věk pacienta, dekompenzaci diabetu, pozdní komplikace diabetu (diabetickou retinopatii a neuropatii), ICHDK, obezitu, imunosupresiva a imunodeficitní choroby (77).

Otázka výskytu mykotických infekcí v diabetických ulceracích a jejich diagnostiky zůstávají nedořešeny a je jim věnováno jen málo studií (78). Proto jsme analyzovali mykotické nálezy u pacientů se SDN z hlediska použití vhodných diagnostických metod a z hlediska rizikových faktorů.

1.4 Terapie SDN odlehčením

Standardní léčba SDN zahrnuje lokální terapii, terapii infekčních komplikací SDN, terapii ischemie a metabolickou kompenzaci. Nedílnou součástí léčby SDN je i odlehčení ulcerace, které zlepšuje tvorbu granulací a epitelizaci. Opakovaný mechanický stres při ztrátě protektivního čítí u diabetické neuropatie končetinu ischemizuje a porušuje normální reparační mechanismy (2).

U každého pacienta je nutné najít vhodnou formu odlehčení dolní končetiny, ať již pomocí preventivní obuvi se speciálně upravenou vložkou, pomocí terapeutické obuvi, speciálních diabetických ortopedických bot, ortéz typu „Removable Cast Walker“ (RCW), plastických ortéz nebo pomocí speciálních kontaktních fixací (Total Contact Cast - TCC).

Snímatelné (removable) r-TCC se obvykle indikují u pacientů s chronickými ulceracemi, s akutní ChaO a s neuropatickými frakturami v terénu ChaO nebo OM (1). Fixace není možné indikovat u pacientů s kritickou ICHDK, patologickou konfigurací hlezenních či metatarzálních kloubů, se závažnými známkami zánětu, bérčovým

vředem, přítomností pregangrény nebo gangrény dolní končetiny a u nespoupracujících diabetiků (2).

Aplikace TCC má několik nesporných předností před ostatními typy odlehčení. Jednou z nich je rovnoměrné rozložení vertikálního tlaku působícího na plantu dolní končetiny a vyloučení maximálních tlaků na exponovaná místa (79). Dále jsou TCC schopné redukovat rozvoj edémů dolních končetin a stabilizovat dolní končetinu v požadované poloze. Dle dostupných studií urychluje terapie TCC hojení diabetických ulcerací; obvykle dochází ke zhojení 70-100% vředů již během 1-2 měsíců (79-81). TCC jsou schopny zlepšit jak klinické známky ChaO, tak i parametry zobrazovacích metod (82). Léčba pomocí r-TCC může mít své nevýhody, např. finanční nákladnost, časovou náročnost, omezení pacienta při chůzi, mytí a ve spánku, zvýšený výskyt mykóz, omezení hybnosti talokrurálního skloubení a rozvoj otlakových defektů. Klinicky nejzávažnějšími komplikacemi léčby mohou být progresse lokálního nálezu a rozvoj OM.

V naší republice se zatím terapie SDN pomocí TCC začíná rozvíjet a je s ní jen málo zkušeností. Ve světě je sice považována za „zlatý standard“ léčby odlehčením, přesto je jen málo prací zaměřených např. na komplikace této léčby a na vhodné indikace. Proto jsme se zaměřili na zhodnocení vlastních zkušeností s tímto typem terapie.

2. CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE

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

Imunologické abnormality jsme zkoumali v 5 studiích. Cílem první a druhé studie bylo zjistit vliv krátkodobě působící akutní hyperglykémie a/nebo hyperinzulinémie na fagocytózu a oxidativní vzplanutí PMN buněk u zdravých dobrovolníků a u pacientů s diabetes mellitus 1. typu. Tento model může lépe korespondovat s patofyziologickými podmínkami přítomnými v praxi u pacientů s diabetes mellitus v porovnání s dosud publikovanými in vitro testy.

Cílem třetí studie bylo zjistit funkční stav PMN buněk (fagocytózy a oxidativního vzplanutí) u pacientů se SDN a cílem čtvrté studie bylo sledovat změny zánětlivých markerů a vybraných parametrů zejména specifického systému u nemocných s neuspokojivým hojením diabetických ulcerací a chronickou infekcí.

Cílem páté studie bylo porovnat možné rozdíly v sérových hladinách vitamínů a vybraných stopových prvků u pacientů se SDN, pacientů s diabetes mellitus 2. typu bez komplikací a zdravých dobrovolníků a určit jejich vztah k nespecifickému imunitnímu systému.

Infekční komplikace SDN jsme analyzovali ve 3 studiích. V šesté studii bylo cílem posoudit rozdíly ve výskytu jednotlivých bakteriálních agens ve stěrech z diabetických ulcerací a rozdíly v ATB rezistenci mezi transplantovanými, dialyzovanými a ostatními pacienty se SDN. V sedmé studii jsme posuzovali vliv rezistentních patogenů na výskyt amputací u pacientů se SDN. V následující studii bylo cílem sledovat výskyt mykotických agens a zhodnotit rizikové faktory mykóz a diagnostiku mykotických agens mikroskopickými a kultivačními metodami ze vzorků ulcerací a hyperkeratóz pacientů se SDN.

Terapii SDN odlehčením jsme zkoumali ve 3 studiích. Cílem deváté studie bylo porovnat hojivost SDN pomocí aplikace r-TCC v různých indikacích - diabetické ulcerace, ChaO a neuropatické fraktury. V posledních dvou studiích bylo cílem zjistit výskyt komplikací léčby r-TCC a porovnat jej s komplikacemi při léčbě speciální ortézou RCW. Ve studii jsme se zaměřili na výskyt OM.

3. METODIKA A HLAVNÍ VÝSLEDKY STUDIÍ

3.1 Abnormality imunitních funkcí ve vztahu k diabetu a jeho komplikacím, zejména SDN (studie 1-5)

Hypotézy

- Akutně navozené metabolické změny jak u dobrovolníků, tak u pacientů s diabetem 1. typu, mohou ovlivnit funkce nespecifického imunitního systému.
- Chronické metabolické změny v rámci dekompenzace diabetu v kombinaci s chronickou infekcí diabetických ulcerací mohou ovlivnit funkce specifického i nespecifického imunitního systému.
- Pacienti s chronickou infekcí v rámci SDN mohou mít ve srovnání se zdravými osobami a pacienty s diabetem 2. typu bez pozdních komplikací změny sérových hladin vitamínů a vybraných stopových prvků a tyto změny mohou ovlivnit imunitní funkce.

Vybrané metody

Clampové techniky u zdravých dobrovolníků

4 hodinové clampové studie byly provedeny u 12 zdravých dobrovolníků (**studie 1**). Jako první byl proveden **hyperglykemický hyperinzulinový clamp (HHC)**. Design studie byl koncipovaný obdobně jako clampové studie provedené v minulosti de Fronzem (83, 84). Pro aplikaci všech intravenózních infuzí bylo nutné zavést teflonovou braunylu antegrádně do jedné z žil v kubitální jamce. Druhá braunyla sloužící k odběrům krve byla umístěna retrográdně do jedné z žil na zápěstí. 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 (83). Po jeho podání byla stanovována glykémie v pravidelných 5-10 minutových intervalech. Hyperglykémie 17 mmol/l byla nadále udržována pomocí kontinuální infuze 15% glukózy různými rychlostmi verifikovanými dle aktuálních glykemií. Krevní vzorky určené ke stanovení volného inzulínu (IRI) 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 **hyperinzulinový euglykemický clamp (HEC; 83-85)**. Během clampové studie byl inzulín podáván rychlostí 1 mU.kg⁻¹.min⁻¹ k udržení konstantní inzulínémie cca 60 mU/l. Plasmatická koncentrace glukózy byla udržována na hladině výchozí lačné glykémie (glykémie 4-6 mmol/l) pomocí kontinuální infuze 15% glukózy. K dodržení volumové zátěže dosažené během HHC byl zbylý objem tekutin substituován pitnou vodou.

Izolovaný vliv hyperglykémie na funkce imunitních funkcí in vivo byl otestován **izolovaným hyperglykemickým clampem (HGC)** s blokádou endogenní produkce inzulínu. Postup byl obdobný jako u HHC. Endokrinní sekrece inzulínu byla zablokována kontinuální infuzí somatostatinu rychlostí 500 ug.hod⁻¹. Doplnkový perorálním příjmem pitné vody zajistil časovou a volumovou kompatibilitu HGC s HHC.

Kontrolní clamp (CC) spočíval v kontinuální infuzi fyziologického roztoku rychlostí 20 ml/min a adekvátního příjmu pitné vody tak, aby CC odpovídal časově i volumově HHC. Kontrolní

clampová studie odlišila vliv volumové a časové zátěže i dalších stresujících faktorů od vlivu působící hyperglykémie a/nebo hyperinzulinémie.

Clampové techniky u pacientů s diabetes mellitus 1. typu

U 10 nemocných s diabetes mellitus 1. typu byly provedeny dvě čtyřhodinové clampové studie. První clampovou studií byl čtyřhodinový **hyperglykemický hyperinzulinový clamp (HHC)** vedoucí k navození akutní hyperglykémie a hyperinzulinémie. Design studie byl modifikován dle clampových studií prováděných v minulosti (83, 84) a na základě zkušeností ze studie 1. Postup při HHC spolu se schématem odběrů byl obdobný jako ve studii 1. Rozdílem byla nutnost intravenózní aplikace inzulínu k dosažení hyperinzulinémie, jejíž množství bylo kalkulováno podle IRI nalezeného během HHC ve studii 1. Hyperinzulinémie průměrně 253 mU/l byla navozena infuzí inzulínu rychlostí 4 mU. kg⁻¹.min⁻¹.

Pacienti s diabetes mellitus 1. typu dále absolvovali jako druhou clampovou studii **kontrolní izoinzulinový 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 konstantní množství inzulínu rychlostí 0,3 mU. kg⁻¹.min⁻¹ k udržení konstantní inzulinémie (20 mU/l) a malé množství 10% glukózy k udržení euglykémie. Rychlost podávání glukózy byla verifikována podle aktuálních glykemií zjištěných v pravidelných 5-10 minutových intervalech. Zbýlý objem tekutin, který byl intravenózně aplikován během HHC, byl nahrazen pitím vody.

Stanovení funkcí PMN buněk

Fagocytóza PMN buněk byla stanovena průtokovou cytometrií za použití komerčně dostupného kvantitativního testu (PHAGOTEST) podle metod již dříve popsanych v odborné literatuře (7, 8). 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 bakterií na jednu PMN buňku).

Oxidativní vzplanutí PMN buněk bylo stanoveno pomocí průtokové cytometrie použitím komerčně dostupného testu

BURSTTEST. Test je schopen detekovat procento a enzymatickou aktivitu PMN buněk (průměrnou fluorescenční intenzitu aktivních PMN buněk produkujících ROI). BURSTTEST používá ke stimulaci PMN buněk neznačené opsonizované bakterie *E. coli*. V naší studii jsme k detekci aktivity PMN buněk využili tyto bakterie jako stimulans, jelikož jsou fyziologičtějším stimulantem a mají bližší vztah k infekci jako takové v porovnání s fMLP (formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine) a PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate). Oxidativní vzplanutí PMN buněk bylo analyzováno podle postupu popsáno v odborné literatuře (7, 8).

Analýza PMN funkcí pomocí průtokové cytometrie- Procento a průměrná fluorescenční intenzita značených fagocytujících PMN buněk a procento a průměrná fluorescenční intenzita aktivních PMN buněk (probíhající oxidativní vzplanutí) byly stanoveny ze vzorků krve za použití FACSCalibur průtokového cytometru (Becton-Dickinson). Analýza leukocytů ze vzorku krve (obsahujícího cca 10 000 buněk) byla provedena pomocí Cellquest™ softwaru.

Schéma studií

Studie 1 a 2

U každého dobrovolníka (n=12) byly provedeny 4 clampové studie - HHC, HEC, HGC a CC. Pacienti s diabetes mellitus 1.typu (n=10) absolvovali pouze HHC a CC. PMN funkce (fagocytóza a oxidativní vzplanutí) byly detekovány za bazálních podmínek a po stimulaci *E. coli* vždy před příslušnou clampovou studií a po ní. Byly vypočteny fagocytární indexy a respirační indexy (odrážející aktivitu buněk a produkci ROI) jako poměry průměrné fluorescenční intenzity fagocytujících nebo aktivních PMN buněk a průměrné fluorescenční intenzity nefagocytujících nebo neaktivních PMN buněk. Použití indexů na rozdíl od absolutních hodnot parametrů snižuje variabilitu výsledků. Všechny rozdíly v parametrech před a po clampech, které byly nalezeny během HHC, HEC a HGC u zdravých dobrovolníků nebo během HHC u diabetiků, byly porovnány se změnami parametrů detekovanými během časově i volumově kompatibilního CC, čímž byl odlišen vliv stresu a hemodiluce na sledované imunologické parametry.

Studie 3 a 4

Během studie 3 byly mezi pacienty se SDN (n=19) a zdravými kontrolami (n=20) porovnány parametry nespecifické imunity a během

čtvrté studie byly sledovány především změny specifického imunitního systému a zánětlivých markerů mezi pacienty se SDN (n=35) a zdravými dobrovolníky (n=28). V těchto studiích byly sledovány z faktorů nespecifické imunity fagocytóza a oxidativní vzplanutí PMN buněk, CIK a části komplementu – C3, C4; z faktorů specifické imunity byly sledovány sérové hladiny imunoglobulinů (IgA, IgM, IgG) a subpopulace T-lymfocytů. Ze zánětlivých markerů byly posuzovány počty leukocytů a sérové hladiny CRP.

Studie 5

Během studie 5 byly porovnány sérové hladiny vitamínů (vitamin C, vitamín E, α - a γ - tokoferol) a vybraných prvků (Cu, Zn, Fe, Mg) mezi pacienty se SDN (n=42), pacienty s diabetem bez pozdních komplikací (n=29) a zdravými kontrolami (n=31). Hladiny celkového vitamínu E a jeho izomerů byly přepočítány na hladiny triacylglycerolů, aby byl odstraněn vliv hyperlipoproteinémie. Dále byly posouzeny korelace mezi sledovanými mikronutrienty a parametry imunitních funkcí PMN buněk.

Hlavní výsledky studií

Studie 1

Rozdíly v parametrech bazálních i stimulovaných hodnot fagocytózy PMN buněk nalezené během jednotlivých clampových studií (HHC, HEC, HGC) se významně nelišily od rozdílů detekovaných během CC. Parametry oxidativního vzplanutí PMN buněk měřené jak za bazálních podmínek, tak po stimulaci E.coli, nebyly ovlivněny akutně navozenou hyperglykemií a/nebo hyperinzulinémií během jednotlivých clampových studií. Jediným významným nálezem bylo u zdravých dobrovolníků snížení procenta fagocytujících PMN buněk za bazálních podmínek po HHC ($12,1 \pm 4,4$ vs. $6,7$ vs. $1,3\%$; $p < 0,05$) a po HGC ($9,9 \pm 2,1$ vs. $4,5 \pm 1,8\%$; $p < 0,05$).

Indexy posuzující fagocytózu a oxidativní vzplanutí PMN buněk nebyly po jednotlivých clampových studiích statisticky odlišné za bazálních podmínek a po stimulaci E.coli oproti hodnotám před clampovými studiemi a ve srovnání s indexy detekovanými během CC. Signifikantně vyšší fagocytární index ($35,8 \pm 18,6$ vs. $115,1 \pm 65$; $p < 0,05$) a index oxidativního vzplanutí byl nalezen za bazálních podmínek po HEC ve srovnání s hodnotami před HEC ($10,1 \pm 1,4$ vs. $16,5 \pm 3$; $p < 0,05$). Zmíněné významné rozdíly parametrů nalezených

před a po jednotlivých clampových studiích se významně nelišily oproti hodnotám detekovaným během CC. **Výsledky byly publikovány v článku Fejfarová et al., Metabolism 2006, 55: 811-818 a řadě abstrakt (publikace autora č. 64, 65, 97).**

Studie 2

U pacientů s diabetes mellitus 1. typu nebyly nalezeny signifikantně rozdílné parametry fagocytózy i oxidativního vzplanutí PMN buněk detekované po HHC za bazálních podmínek a po stimulaci E.coli oproti výsledkům nalezeným před HHC. Jak parametry fagocytózy, tak parametry oxidativního vzplanutí nalezené během HHC, se signifikantně nelišily od parametrů nalezených během CC. Rozdíly parametrů PMN fagocytózy a oxidativního vzplanutí během HHC nebyly významně rozdílné od změn detekovaných během CC. Fagocytární indexy se signifikantně nezměnily během obou clampových studií. Pouze index oxidativního vzplanutí nalezený za bazálních podmínek po HHC byl významně vyšší ve srovnání s indexem nalezeným před danou clampovou studií ($10,4 \pm 0,9$ vs. $14,8 \pm 1,7$; $p < 0,05$), ale taktéž se nelišil oproti CC. **Výsledky byly prezentovány formou abstrakt (publikace autora č. 100, 101).**

Studie 3

U pacientů se SDN byla nalezena pouze signifikantně redukováná procenta fagocytujících PMN buněk po stimulaci E.coli v porovnání se zdravou populací ($66,4 \pm 24$ vs. $81,8 \pm 10\%$; $p < 0,05$). Ostatní parametry nespecifické imunity (fagocytózy a oxidativního vzplanutí PMN buněk) se mezi sledovanými skupinami signifikantně nelišily jak za bazálního stavu, tak po stimulaci E.coli. **Výsledky byly prezentovány formou abstraktu (publikace autora č. 62).**

Studie 4

V naší studii byly prokázány signifikantně zvýšené hladiny zánětlivých markerů – CRP ($5,8 \pm 10,7$ vs. $1,6 \pm 1,8$ mg/l; $p < 0,05$), počty leukocytů ($7,7 \pm 2,1$ vs. $6,6 \pm 2,1 \times 10^9/l$; $p < 0,05$), neutrofilů ($4,7 \pm 1,9$ vs. $3,9 \pm 1,7 \times 10^9/l$; $p < 0,05$) a CIK (43 ± 29 vs. 28 ± 18 ; $p < 0,05$) u pacientů se SDN v porovnání s kontrolní skupinou. Výsledky se ve většině případů pohybovaly v normě nebo jen lehce nad normou – 69% nemocných mělo CRP v normě a 83% pacientů mělo počty leukocytů v normě.

Při studiu ostatních parametrů imunity byly nalezeny signifikantně vyšší sérové hladiny imunoglobulinů 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; $p < 0,05$) u pacientů se SDN v porovnání se zdravými kontrolami. Hladiny komplementu (C3 a C4) a IgM se významně nelišily mezi studovanými populacemi. Při rozboru subpopulací T lymfocytů mezi sledovanými skupinami bylo nalezeno vyšší procento CD8+T⁻ lymfocytů u pacientů se SDN v porovnání s kontrolami (33 ± 13 vs. $25 \pm 10\%$; $p < 0,01$) a nižší imunoregulační index (CD4/CD8 - $1,6 \pm 0,8$ vs. $2,1 \pm 0,9$; $p < 0,05$).

Ve studii jsme hodnotili i korelace nalezených imunologických parametrů s kompenzací diabetu. Pouze HbA1c pozitivně koreloval s imunoregulačním indexem CD4/CD8 ($r = 0,447$, $p < 0,001$). Ostatní imunologické parametry neměly významný vztah ke kompenzaci diabetu. **Výsledky byly prezentovány v článku Jirkovská a spol., Časopis lékařů českých 2002, 15: 483-486 a ve formě abstrakt (publikace autora č. 79, 99).**

Studie 5

Při studiu sérových hladin vitamínů byla nalezena 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. $67,6 \pm 19,3$ a vs. $72,2 \pm 23,6$ umol/l; obojí $p < 0,01$). Hladiny α - a γ -tokoferolu ani po korekci na hladiny triacylglycerolů nevykazovaly signifikantní změny mezi studovanými skupinami.

V naší studii byly nalezeny významně zvýšené sérové hladiny Cu ($17,4 \pm 5$ vs. $17,8 \pm 3,4$ vs. $15,4 \pm 3,5$ umol/l; $p < 0,05$) a snížené hladiny Mg ($0,75 \pm 0,1$ vs. $0,76 \pm 0,09$ vs. $0,81 \pm 0,07$ mmol/l; $p < 0,05$) u pacientů se SDN a pacientů s diabetes mellitus 2. typu bez komplikací ve srovnání se zdravými kontrolami. Sérové koncentrace ostatních vybraných prvků, jako byl Zn a Fe, se významně nelišily mezi sledovanými skupinami.

U všech sledovaných jedinců byla nalezena signifikantní korelace sérových hladin Cu a Mg s průměrnou fluorescenční intenzitou stimulovaných aktivních PMN buněk odrážející oxidativní vzplanutí ($r = 0,24$, $p < 0,05$ a $r = 0,25$, $p < 0,05$). **Výsledky byly prezentovány v článku Fejfarová a spol., DMEV 2003, 1: 23-29 a v řadě abstrakt (publikace autora č. 32, 67, 102, 103).**

3.2 Infekční komplikace SDN (studie 6-8)

Hypotézy

- Mohou existovat rozdílné výskyty bakteriálních patogenů a jejich ATB rezistencí mezi rizikovými skupinami pacientů (transplantovaní, dialyzovaní) a ostatními nemocnými se SDN.
- Rezistentní patogeny k perorálním ATB, které infikují diabetické ulcerace, mohou ovlivnit počet amputací dolních končetin u pacientů se SDN.
- Nehojící se diabetické ulcerace mohou být infikovány i mykotickými agens. Nemusí existovat shoda mezi mikroskopickým vyšetřením a kultivačním a mezi nálezy z hyperkeratóz a ulcerací.

Vybrané metody

Stanovení bakteriálních agens a ATB rezistence

Stěry z diabetických ulcerací byly odebrány ze spodiny defektu nebo z hlubokých tkání ulcerace po lokálním debridementu. Tyto stěry byly ihned transportovány na mikrobiologické pracoviště v Amiensově transportním mediu. Část materiálu byla aplikována na pevné půdy, zbylý materiál byl vložen do živného bujónu. Za 24 hodin po pomnožení bylo provedeno opětné rozočkování na pevné půdy. Jednotlivé bakteriální kmeny byly stanoveny standardními mikrobiologickými metodami (86).

Mikroorganismy byly rozděleny dle Gramma do dvou základních skupin. První skupina obsahovala 5 subpopulací Gram pozitivních patogenů- *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus koaguláza negativní*, *Streptococcus*, *Enterococcus* a *Corynebacterium species*. Do druhé skupiny byly zařazeny Gram negativní patogeny obsahující druh *Enterobacteriaceae*, kam patří *E. coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Proteus species*, a druh oxidativních mikroorganismů jakými jsou *Pseudomonas* a *Acinetobacter species*.

Mikrobiální citlivost k rozličným ATB byla stanovena semikvantitativně pomocí diskové difúzní metody (87, 88).

Mykologické vyšetření

U každého nemocného byly odebrány vzorky ke stanovení přítomnosti mykóz z hyperkeratózy a ze spodiny ulcerace. Mykotická agens byla stanovena 2 metodami – mikroskopicky a kultivačně. Během **mikroskopického stanovení** byly vzorky tkání vyšetřeny

imunofluorescenčně za použití blankoforu. **Kultivačně** byly vzorky detekovány 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 trvá přibližně 4 týdny.

Schéma studií

Studie 6

U 21 transplantovaných, 22 dialyzovaných a 164 ostatních pacientů se SDN bez renálního postižení byla v průřezové studii provedena bakteriologická vyšetření ze stěrů odebraných z diabetických ulcerací. Nalezené bakterie 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 ve stěrech z diabetických ulcerací, rozdíly ve výskytu jednotlivých patogenů a jejich ATB rezistence.

Studie 7

Do studie bylo konsektivně zařazeno 181 pacientů léčených v podiatrické ambulanci IKEM pro SDN během období 12/1998-11/1999. Pacienti byli následně sledováni do doby zhojení nebo po dobu minimálně 12 a maximálně 24 měsíců. Během studie byly posuzovány faktory asociované s amputacemi, mezi něž jsme zařadili vedle již dříve sledovaných rizikových faktorů jako je ICHDK a OM také rezistenci k perorálním ATB, která může ovlivnit výsledek terapie a dosud nebyla v této souvislosti studována.

Studie 8

Do studie bylo zařazeno 27 pacientů s chronickými diabetickými ulceracemi. U těchto nemocných byl posuzován výskyt jednotlivých mykotických agens a shoda mikroskopických a kultivačních vyšetření ze vzorků z hyperkeratóz nebo spodin ulcerací u každého pacienta.

Byly sledovány i vybrané potenciální rizikové faktory pro výskyt mykotických agens, např. věk pacienta, trvání diabetu, kompenzace diabetu, BMI, závažnost a trvání diabetické ulcerace, délka předchozí ATB terapie apod.

Hlavní výsledky studií

Studie 6

Nebyly prokázány signifikantní rozdíly v průměrném počtu patogenů ve stěru na 1 pacienta mezi transplantovanými, dialyzovanými a ostatními pacienty se SDN (2,8 vs. 2,0 vs. 3, respektive; NS).

U dialyzovaných pacientů 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 ($p<0,05$). Zastoupení jednotlivých bakteriálních agens se signifikantně nelišilo mezi sledovanými skupinami. Nejčastějšími patogeny nalezenými ve všech diabetických ulceracích byly *S. Aureus* (21%), *Staphylococcus koaguláza negativní* (21%) a *Enterococcus sp.* (13%). Prevalence kliniky závažných Gram negativních patogenů nepřesáhla 9% ve sledovaných skupinách.

Během studie byla zjištěna signifikantně vyšší rezistence *S.Aureus* k oxacilinu, imipenemu, kotrimoxazolu ($p<0,01$) a erythromycinu ($p<0,05$) u transplantovaných pacientů v porovnání s dalšími dvěmi sledovanými skupinami. Signifikantně vyšší ATB rezistence byla nalezena také u enterokoků k piperacilinu ($p<0,001$), ampicilinu a tikarcilin/kys.klavulanové ($p<0,01$) u transplantovaných pacientů a k ampicilin/sulbaktamu, tikarcilin/ kys. klavulanové ($p<0,01$) u dialyzovaných pacientů v porovnání s ostatními skupinami. Z klinicky nejzávažnějších patogenů, které se vyskytovaly pouze do 10% v diabetických ulceracích, se stanovovala ATB rezistence u *Pseudomonas sp.* Všechny pseudomonády nalezené u dialyzovaných pacientů byly signifikantně rezistentnější k piperacilinu (100% vs. 33% vs. 19%, respektive; $p<0,05$) a cefpiromu (100% vs. 0% vs. 16%, respektive; $p<0,05$) v porovnání s transplantovanými a ostatními pacienty se SDN. **Výsledky byly prezentovány v článku Fejfarová et al., J Diabetes Complications 2004, 18(2):108-112 a abstraktu (publikace autora č. 31).**

Studie 7

Klinicky významný kultivační nález svědčící pro infekci rány mělo 181 nemocných. Amputováno bylo 42 nemocných. 88% (37/42) pacientů absolvovalo nízkou amputaci a 12% (5/42) pacientů podstoupilo vysokou amputaci; 139 nemocných bylo bez amputace.

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. Methicillin rezistentní S.Aureus (MRSA) byl přítomen u 16% všech nemocných.

Během studie jsme prokázali významně vyšší výskyt rezistentních patogenů na perorální ATB u pacientů po amputaci oproti nemocným bez amputace (57 vs. 21%; $p < 0,001$). Při analýze jednotlivých druhů rezistentních mikrobus jsme zjistili, že před výkonem měli amputovaní pacienti signifikantně více jak rezistentních kmenů všech stafylokoků (43 vs. 14%; $p < 0,001$), tak MRSA (33 vs. 11%; $p < 0,001$) oproti neamputovaným nemocným.

ICHDK se vyskytovala u 81% amputovaných pacientů oproti 58% neamputovaným nemocným ($p < 0,01$). Signifikantně vyšší výskyt OM byl nalezen u amputovaných v porovnání s neamputovanými nemocnými (67% vs. 13% pacientů; $p < 0,001$).

Postupná regresní analýza sledovaných skupin nemocných prokázala, že přítomnost všech rezistentních patogenů (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 riziko amputace dolních končetin u pacientů se SDN. V regresní analýze byly významnými prognostickými faktory pro amputace dolních končetin ICHDK (OR 4,4; CI 1,3 – 14,9) a OM (OR 16,7; CI 6,1 – 45,8). U pacientů bez OM byl vliv mikrobiální rezistence na amputace výraznější než u pacientů s OM. Amputovaní pacienti bez OM měli podstatně vyšší výskyt všech rezistentních patogenů (80 vs. 20,5%; $p < 0,001$) i MRSA (46,2 vs. 10,7%; $p < 0,01$) než neamputovaní bez OM. **Výsledky byly uvedeny v článku Fejfarová a spol., Vnitřní Lékařství 2002, 4: 302-306 a řadě abstrakt (publikace autora č. 66, 73).**

Studie 8

Mikroskopickým vyšetřením byla prokázána přítomnost mykotických agens ze vzorků hyperkeratóz u 95% nemocných a ze vzorků ze spodin ulcerací u 100% pacientů. Nejčastějšími mikroskopicky prokázanými mykotickými agens na spodině ulcerací byly kvasinky (100%), druhými v pořadí byla dermatofyta (46%).

Oproti tomu kultivačně byly vzorky hyperkeratóz pozitivní pouze u 48% nemocných a vzorky odebrané ze spodin ulcerací ve 28% případech. Nejčastějšími kultivačně zjištěnými mykotickými agens v hyperkeratózách i v ulceracích byly kvasinky (19% vs. 24% pacientů) a dermatofyta reprezentovaná např. *Trichophyton rubrum* (22% vs. 12% nemocných).

Nebyla prokázána shoda mezi mikroskopickými a kulturačními nálezy ani mezi vzorky odebranými z hyperkeratóz ani ze spodin ulcerací u téhož pacienta. Taktéž nebyla prokázána shoda mezi kulturačními nálezy z obou typů vzorků tkání, konkordance obou nálezů činila pouze 56% (CI 0,37-0,75; NS).

Nebyla nalezena signifikantní asociace sledovaných rizikových faktorů pro výskyt mykóz s kulturačními nálezy z odebraných vzorků hyperkeratóz a spodin ulcerací. **Výsledky byly prezentovány v článku Fejfarová a spol., Léčba rány. Florance, Galén, Praha, 2006; 45-49 a řadě abstrakt (publikace autora č. 52, 70).**

3.3 Terapie SDN odlehčením (studie 9-11)

Hypotézy

- TCC může zlepšovat hojení jak u pacientů s ulceracemi, tak u pacientů s ChaO a s neuropatickými frakturami.
- Předpokládáme, že pacienti s OM mohou také profitovat z léčby r-TCC a že profit z této léčby je vyšší nežli případné komplikace.
- Léčba TCC může být úspěšnější oproti léčbě speciální ortézou (RCW).

Vybrané metody

Zhotovení snímatelných kontaktních fixací (r-TCC)

Tato technika byla vyvinuta speciálně pro odlehčení ulcerací na noze diabetiků a k terapii ChaO a neuropatických fraktur. Zhotovení r-TCC probíhá v několika etapách. V prvé řadě je nutné u pacientů s diabetickými ulceracemi ošetřit vřed pomocí lokálního debridementu a na povrch ulcerace vložit vhodné lokální krytí. Abychom docílili maximálního odlehčení dané ulcerace, aplikujeme do okolí defektu silné filcové vypodložení, které vytváříme podle plošky nohy, velikosti a pozice defektu. Na takto připravenou dolní končetinu se aplikuje bavlněný elastický materiál a následně speciální filcové krytí. Na plantu dolní končetiny se aplikuje klasický sádrový obvaz. Stabilitu r-TCC je docíleno přiložením rigidních materiálů ve formě L- nebo U-dlahy. Nejdůležitější fází při zhotovení r-TCC je aplikace semirigidního plastického materiálu. Ten musí kopírovat povrch dolní končetiny a zafixovat jej v požadované poloze. Ke konci zhotovení fixace je upravována prstová oblast tak, aby se vytvořil dostatečný prostor pro prsty nohy a aby bylo možné je vizuálně kontrolovat. Poté je TCC

rozstřížena. Posledním krokem 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 vzniknout časným nebo nepřipustným pohybem hlezna při došlapu. Konečné úpravy fixace spočívají v oblepení r-TCC náplastí a tenkým podkladovým filcovým materiálem.

Před aplikací r-TCC byli pacienti řádně poučeni o rizicích terapie TCC. Kontroly byly prováděny s odstupem jednoho týdne po aplikaci r-TCC a dále dle klinického nálezu na dolní končetině. Nové r-TCC byly aplikovány v případech výrazné redukce otoku dolní končetiny nebo při výrazném poškození r-TCC.

Schéma studií

Studie 9

Do studie bylo zařazeno 74 pacientů se SDN. Byl posuzován efekt terapie TCC (doba hojení, procento zhojených pacientů) mezi nemocnými s neuropatickými ulceracemi (n=27), akutní CHaO (n=35) a neuropatickými frakturami (n=12). Kritéria hojení byla následující: úplná epitelizace rány u pacientů s neuropatickými ulceracemi, zlepšení lokálního nálezu (ústup otoku i zarudnutí dolní končetiny, pokles kožních teplot) a/nebo redukce aktivity dle dynamické scintigrafie kostí u pacientů s akutní CHaO a úplná osifikace kosti dle RTG u pacientů s neuropatickými frakturami.

Studie 10

Ve studii byly hodnoceny komplikace léčby TCC. Do studie bylo zařazeno 61 pacientů se SDN. Sledovány byly technické komplikace (zlomeniny fixací), výskyt nových otlakových ulcerací a mykózy v oblasti nohy (tinea pedis) nebo v oblasti interdigitálních prostor a progresu lokální infekce (flegmóna, zhoršení lokálního nálezu, edém dolní končetiny) včetně rozvoje OM. Progresu lokální infekce vedla vždy k přerušení léčby r-TCC. Byl porovnán výskyt nové OM během léčby r-TCC (tzv. riziko) se zhojením stávající OM během léčby r-TCC (tzv. benefit).

Studie 11

Ve studii byly porovnány dlouhodobé výsledky terapie odlehčením pomocí r-TCC a pomocí speciální ortézy RCW. Zařazeno

bylo 122 nemocných léčených v podiatrické ambulanci po dobu 4 let, z nichž r-TCC bylo léčeno 99 pacientů a RCW 23 nemocných. Ve studii byly porovnány počty nemocných s OM, která byla zhojena během aplikace r-TCC nebo RCW, s počty nemocných s nově rozvinutou OM během dané terapie. Poměr rizika a přínosu léčby r-TCC a RCW byl vypočten jako poměr počtu nemocných s nově rozvinutou OM k počtu zhojených pacientů s OM během léčby r-TCC nebo RCW, podobně jako v předchozí studii.

Hlavní výsledky studií

Studie 9

Pacienti s diabetickými ulceracemi byli během sledovaného období léčeni r-TCC v průměru $6 \pm 4,2$ měsíce, pacienti s akutní ChaO $5,1 \pm 4$ měsíce a pacienti s patologickými frakturami $3,9 \pm 2,6$ měsíce (NS). Signifikantně nejvyšší procento zhojených bylo nalezeno během sledovaného období ve skupině pacientů s neuropatickými frakturami v porovnání s pacienty léčenými pro neuropatické ulcerace a pro akutní ChaO (83% vs. 30% a 37%; obojí $p < 0,01$). 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. $6,25 \pm 3,8$ a $7,9 \pm 3,5$ měsíce; obojí $p < 0,01$).

Z 19 pacientů s nezhojenými neuropatickými ulceracemi došlo během sledovaného období u 12 pacientů (63%) ke zlepšení lokálního nálezu (zmenšení velikosti defektu $5,6 \pm 6,8$ vs. $1,56 \pm 2$ cm²; $p < 0,01$), u 3 pacientů došlo k jeho zhoršení (16%) a u 4 nemocných (21%) se lokální nález výrazně nezměnil. Z 22 pacientů s nezhojenou akutní ChaO došlo během sledovaného období u 19 nemocných (86%) ke zlepšení klinického stavu (redukce rozdílu kožních teplot na dolních končetinách $2,74 \pm 1,3$ vs. $2 \pm 1,3$ °C; $p < 0,05$) a u 3 pacientů (14%) došlo ke zhoršení lokálního nálezu. Ve skupině neuropatických fraktur nedošlo během sledovaného období ke zhojení u 2 pacientů- u 1 bylo zaznamenáno zlepšení nálezu a u 1 pacienta došlo ke zhoršení. **Výsledky byly publikovány v článku Fejfarová a spol., Vnitřní lékařství 2005, 51: 988-994 a v řadě abstrakt a kapitole (publikace autora č. 9, 14, 15, 30, 33, 46).**

Studie 10

Celkově se komplikace léčby pomocí r-TCC vyskytly u 67% (41/61) nemocných. U 41 nemocných s komplikacemi se nejčastěji

jednalo o zlomeninu fixace (54%), druhou nejčastější komplikací byl rozvoj otlakové ulcerace (20% nemocných). Mezi nejméně frekventované komplikace patřily bolesti kloubů (2%), kostní fraktury (2%) a mykózy (5% pacientů). Klinicky nejzávažnější komplikací léčby TCC byla progresse lokální infekce nalezená u 17% nemocných.

21 pacientů se SDN mělo před započítím léčby r-TCC diagnostikovanou OM. U nich došlo ke zhojení v 52% případů. Ze 40 pacientů bez OM před léčbou r-TCC došlo pouze u 3 (7,5%) k rozvoji nové OM po aplikaci r-TCC.

Dle statistického zhodnocení byla 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. Pacienti s nezhojenou OM byli charakterizováni lokalizací OM v oblasti tarzálních kostí. Riziko rozvoje nové OM bylo vysoké u nemocných s hlubokou ulcerací (Wagner 3) a s infekcí způsobenou multirezistentními patogeny (*Pseudomonas sp.* nebo MRSA). **Výsledky byly prezentovány v článku Fejfarová a spol., Praktický lékař 2005, 85(6): 348- 352 a řadě abstrakt (publikace autora č. 35, 48, 69, 71).**

Studie 11

Větší počet pacientů se zhojil během terapie r-TCC ve srovnání s léčbou RCW během sledovaného období, ovšem výsledek nebyl signifikantní (52,5% vs. 34,8% nemocných; NS). Taktéž se vzájemně signifikantně nelišily průměrná doba aplikace r-TCC nebo RCW ($8,3 \pm 5,4$ vs. $6,2 \pm 4,2$ měsíce; NS) a počty amputací u pacientů léčených r-TCC a RCW (10,1% vs. 17,4%; NS).

Obě skupiny pacientů se signifikantně nelišily ani v celkové incidenci všech sledovaných komplikací terapie. Nejzávažnější komplikace, progresse lokálního nálezu, se vyskytovala ve vyšším procentu ve skupině pacientů léčených RCW oproti r-TCC (22% vs. 12%). Avšak ani tento výsledek nebyl signifikantní.

Poměr pacientů s nově vzniklou OM k pacientům se zhojenou OM během odlehčovací terapie byl významně nižší ve skupině nemocných léčených pomocí r-TCC (0,3) oproti pacientům léčeným RCW (0,67; $p < 0,01$). **Výsledky byly prezentovány v abstraktu (publikace autora č. 72).**

4. 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, imunologické abnormality a infekční komplikace u pacientů se SDN a terapie SDN odlehčením, 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 oxidativní 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 podstatně ovlivněny krátkodobou hyperglykemií a/nebo hyperinzulinémií u zdravých dobrovolníků v porovnání 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. Indexy oxidativního vzplanutí detekované po stimulaci E.coli a všechny fagocytární indexy se signifikantně nelišily během HHC oproti

kontrolnímu clampu. Krátkodobá hyperglykémie s hyperinzulinémií indukovaná in vivo u pacientů s diabetes mellitus 1. typu neovlivnila významně imunitní funkce PMN buněk.

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

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

U pacientů se SDN byly nalezeny významně 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 významně vyšší hladiny IgA, IgG a CIK, zatímco hodnoty IgM, C3 a C4 složek komplementu se významně 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 redukováné hladiny vitamínu C byly nalezeny u pacientů se SDN oproti pacientům s diabetem 2. typu bez komplikací a zdravým kontrolám. Významně vyšší hladiny Cu a nižší hladiny Mg byly prokázány u obou skupin diabetiků při porovnání se zdravými kontrolami. Sérové hladiny ostatních mikronutrientů (vitamín E, jeho izomery, Zn a Fe) se významně nelišily mezi sledovanými skupinami. Ze sledovaných mikronutrientů významně 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 studovanými 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 a ticarcilin/kys.klavulanové v porovnání s ostatními skupinami. Pseudomonádové bakterie byly rezistentnější k piperacilinu a cefpiromu u dialyzovaných nemocných se SDN oproti zbylým dvěma skupinám.

Cílem sedmé studie bylo zjistit, zda rezistence k perorálním ATB může být riziková pro výskyt amputací. 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 kultivační mykotické nálezy z hyperkeratóz a spodin ulcerací. Kultivační a mikroskopické nálezy si u pacientů neodpovídaly, konkordance kultivačních nálezů mykóz z ulcerací a z hyperkeratóz u téhož pacienta byla pouze 56%.

Terapie SDN odlehčením

Jedním z faktorům přispívajícím 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 nemocní 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 pacientů 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 nové otlakové ulcerace. Progrese lokálního nálezu byla nalezena u 17% nemocných léčených r-TCC. Ostatní komplikace včetně mykotické infekce 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 infikovanými 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.

Závěrem můžeme shrnout:

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

➤ Akutně navozená hyperglykémie a/nebo hyperinzulinémie během clampových studií neovlivnily významně 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.

➤ *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 elevací typických zánětlivých markerů (CRP a leukocytů), v 69% a 83% 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.

➤ *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

➤ Byl nalezen vyšší výskyt mikrobiální ATB rezistence, především u transplantovaných pacientů ve srovnání s dialyzovanými a ostatními nemocnými se SDN. Na základě těchto nálezů je možné modifikovat empirickou ATB terapii u rizikových skupin nemocných se SDN.

➤ 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.

➤ Nebyla prokázána shoda mikroskopických a kulturačních mykotických nálezů z hyperkeratóz a z diabetických ulcerací. Kulturační nálezy ze vzorků z hyperkeratóz a z ulcerací byly u téhož pacienta odlišné.

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

Terapie SDN odlehčením

➤ 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.

➤ 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).

➤ U pacientů s OM se jeví pro léčbu odlehčením vhodnější použití r-TCC než-li speciální ortézy RCW.

Výsledky dizertační práce přispěly jak k objasnění některých patogenetických souvislostí SDN, především v oblasti imunologických poruch a infekce, tak ke zlepšení terapie především v oblasti speciálních forem odlehčovacích metod. Prioritou je 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.

4. SUMMARY

The diabetic foot (DF) develops based on a complex of pathophysiological processes which are presented in patients with diabetic complications. DF significantly increases a patient morbidity and mortality and markedly impairs the quality of life of these patients. The theme of the dissertation “immunological abnormalities and infection complications in patients with the DF and therapy of the DF by off-loading” was divided into 3 parts:

- abnormalities of immune functions in connection with diabetes and its complications, especially with the DF
- infectious complications of the DF
- therapy of the DF by off-loading.

Problems concerning the impairment of immune functions in connection with diabetes and the DF were resolved in 5 studies, infectious complications of the DF in 3 studies and the therapy of the DF by off-loading similarly in 3 studies.

Abnormalities of immune functions in connection with diabetes and its complications, especially with the DF

The first study deals with the effect of acute hyperglycemia and/or hyperinsulinemia on function of PMN cells in healthy subjects. The aim of this study was to assess the effect of short lasting acute metabolic changes on phagocytosis and the respiratory burst of PMN cells in healthy subjects *in vivo*. Acute hyperglycemia and/or hyperinsulinemia were induced by three clamp studies – HHC, HEC and HGC with endogenic blockade of insulin secretion by somatostatin. PMN phagocytosis and respiratory burst were assessed by flow cytometry under basal conditions and after *E.coli* stimulation. The results found during clamp studies were compared to data detected during the control clamp. Immune functions of PMN cells were not significantly influenced by short lasting hyperglycemia and/or hyperinsulinemia in healthy subjects in comparison with the control clamp.

The second study was focused on the evaluation of possible abnormalities of PMN functions caused by short lasting metabolic changes induced *in vivo* in patients with Type 1 diabetes. Acute hyperglycemia and hyperinsulinemia were induced by four hours lasting HHC. PMN functions were assessed similarly as in the first study. Indexes of respiratory burst detected after *E.coli* stimulation and all phagocytic indexes found during HHC were not significantly different in contrast to the control clamp. Short lasting hyperglycemia with hyperinsulinemia induced *in vivo* in patients with Type 1 diabetes did not influence significantly the immune functions of PMN cells.

The following two studies examined the potential effects of diabetes decompensation and chronic inflammation on functions of nonspecific and specific immune systems in patients with the DF. No significant differences were found in the respiratory burst of PMN cells detected under basal and the stimulated conditions between patients with the DF and healthy subjects. There was found a significantly reduced percentage of phagocytosing PMN cells after *E.coli* stimulation in patients with the DF compared to healthy subjects.

Significantly higher values of markers of inflammation (CRP, leukocyte and neutrophil accounts) were found in patients with the DF compared to healthy controls. However, this increase oscillated in most

cases in normal values or was slightly above the norm. A higher percentage of cytotoxic (CD8+) T-lymphocytes and lower immunoregulatory index were found in patients with the DF. Immunoregulatory index correlated positively with HbA1c. Significantly higher serum levels of IgA, IgG and CIK were displayed in patients with the DF. Serum levels of IgM, C3 and C4 complement were not significantly different from the values detected in healthy subjects.

The fifth study assessed changes in the serum levels of micronutrients and their possible effect on the nonspecific immune system in patients with the DF. Significantly reduced serum levels of vitamin C were found in patients with the DF compared to patients with Type 2 diabetes without complications and healthy subjects. Significantly higher serum levels of Cu and lower levels of Mg were detected in both groups of diabetic patients compared to healthy controls. Serum levels of other micronutrients (vitamin E, its isomers, Zn and Fe) did not differ significantly among the study groups. Cu and Mg only correlated significantly with the parameters of respiratory burst of PMN cells in all study subjects.

Infectious complications of the DF

The sixth study referred to the infectious complications in different groups of patients with the DF. The aim was to assess possible differences in the occurrence of microbial agents in diabetic foot ulcers and differences in their ATB resistance among transplant, dialyzed and other patients with the DF. The occurrence of individual microbial agents did not differ significantly among study groups, but the observed groups of patients differed significantly in the ATB resistance. Transplant patients had significantly more *Staphylococcus* sp. resistant to Oxacillin, Imipenem, Co-trimoxazole and Erythromycin and *Enterococcus* sp. resistant to Ampicillin, Piperacilin and Ticarcillin/clavulanic acid compared to other groups. *Pseudomonas* sp. was more resistant to Piperacillin and Cefpirom in dialyzed patients with the DF in contrast to other two groups.

The aim of the seventh study was to evaluate whether resistance to oral ATB could form a risk factor for lower limb amputations. Consecutively included into the study were all patients

treated during one year for diabetic foot ulcers with at least one positive wound swab. According to logistic regression analysis were OM and peripheral arterial disease (PAD) together with resistance to oral ATB significant risk factors for lower limb amputations. It was shown that the association of resistance to lower limb amputations was significant especially in patients without OM.

Mycotic agents could contribute to the development of diabetic foot ulcers and could slow the healing process. The aim of the eighth study was to specify mycotic diagnosis in patients with the DF. There were compared the occurrences of mycotic agents found in hyperkeratosis and ulcers, the concordance of microscopic and culture mycotic assessments and culture mycotic findings from hyperkeratosis and ulcers. Culture and microscopic findings did not correspond in patients, the concordance of culture mycotic findings from ulcers and hyperkeratosis was only 56% in the same patient.

Therapy of the DF by off-loading

The appropriate method of lower limb off-loading is one of the factors contributing to the DF healing. The aim of the ninth study was to evaluate the effectiveness of the DF therapy by r-TCC in patients with neuropathic foot ulcers, acute ChaO and neuropathic fractures. Neuropathic fractures healed for a significantly shorter time in contrast to the other two groups as well the number of healed patients was the highest in this group. Therapy by r-TCC was also successful in patients with neuropathic foot ulcers (ulcer size reduction) and acute ChaO (decrease of disease activity).

The aim of the tenth study was to determine the incidence of complications of r-TCC therapy and to assess the effect of TCC on OM healing and risk of new OM development in patients with the DF. The most frequent complications of r-TCC therapy were technical complications and the development of a new contact ulcer. Progression of local finding was found in 17% of patients treated by r-TCC. Other complications such as mycotic infection or joint pain were rarely seen. The number of patients with healed OM was significantly higher compared to the number of patients with newly developed OM. Patients with unhealed OM were characterized by OM location in tarsal

bones and patients with newly developed OM by deeper foot ulcers infected by resistant pathogens.

The aim of the eleventh study was to compare the off-loading therapy performed by r-TCC and orthosis RCW. A significantly higher number of healed patients with OM and a lower number of patients with newly developed OM was found in patients treated by r-TCC in contrast to patients treated by RCW. A risk/benefit ratio was significantly lower in patients treated by r-TCC compared to patients treated by RCW.

In conclusion:

Abnormalities of immune functions in connection with diabetes and its complications, especially with the DF

- Acutely induced hyperglycemia and/or hyperinsulinemia did not influence significantly functions of nonspecific immune system as in healthy subjects as in patients with diabetes mellitus Type 1.

This model corresponds better with the real conditions present in patients with diabetes mellitus than to date published in vitro tests.

- *Patients with chronic infection within the DF had following changes of immune functions:*

- Slightly reduced percentage of phagocytosing PMN cells after E.coli stimulation compared to healthy controls.
- Significantly higher serum levels of IgA and IgG in contrast to healthy controls.
- Higher number of CD8+ T-lymphocytes and significantly lower immunoregulatory index in comparison with healthy controls.
- Only moderate elevation of typical markers of inflammation (CRP and leukocytes), in norm in 69% and 83% of patients.

Based on these findings, it is possible to presume that the activation of immune system and the inflammatory reaction are not adequate despite the unproven significant immunodeficiency.

- *Patients with chronic infection within the DF had the following changes of micronutrients related to immune functions:*

- Significantly lower serum levels of vitamin C in comparison with healthy controls and patients with Type 2 diabetes without diabetic complications.

- Significantly higher serum levels of Cu and lower levels of Mg in contrast to healthy subjects. The same findings were presented in patients with Type 2 diabetes mellitus without diabetic complications.

These changes could be related to immune functions, especially to the impact of redox potential, differentiation of immune cells and ROI production.

Infectious complication of the DF

- There was found a higher occurrence of microbial ATB resistance especially in transplant patients compared to patients on hemodialysis and other patients with the DF. Based on these findings, it is possible to modify an empiric ATB treatment in risk groups of patients with the DF.

- The DF patients were compared for risk factors of lower limb amputations – not only OM and PAD but also microbial resistance to oral ATB belonged to risk factors according to logistic regression analysis. Therefore, we recommend to take this fact into consideration and perform ATB therapy adequately effectively especially in risk groups of patients.

- No concordance of microscopic and culture mycotic findings from hyperkeratosis and diabetic foot ulcers was proved. Culture findings from samples taken from hyperkeratosis and ulcers were different in the same patient.

Therefore, we recommend performing a culture evaluation to assess mycotic agents in the DF instead of microscopic assessment and to evaluate samples taken as from ulcers as from the surroundings.

Therapy of the DF by off-loading

- We confirmed the beneficial effect of therapy performed by r-TCC, especially in patients with neuropathic fractures and also in patients with ChaO and neuropathic foot ulcers. We found a relatively high number primarily of technical complications; therefore, we modified the original method.

- Unlike “the traditional indications”, we verified that this method is able to apply successfully in patients with OM since the benefit of this therapy is higher than the risk of new OM development in patients with the DF, however, provided that they will be controlled carefully (!OM in tarsal bones and ulcers of W3 infected by multiresistant pathogens).

- The therapy performed by r-TCC is more suitable than orthosis RCW in the off-loading treatment of patients with OM.

The results of dissertation contributed as to the clarification of some pathogenic consequences of the DF, especially in the field of immunological abnormalities and infection, as to the improvement of therapy primarily in the field of special forms of off-loading methods. Assessment of the effect of acute hyperglycemia and hyperinsulinemia in vivo on immunological parameters, evaluation of consequences of ATB resistance with the DF complications and possible empiric therapy modification, especially in risk groups of patients and introduction of off-loading method performed by r-TCC in the Czech Republic were particularly the priorities of this work.

5. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

- ATB- antibiotika, antibiotický
- CC-kontrolní clamp
- CIK- cirkulující imunokomplexy
- CRP- C-reaktivní protein
- Cu- měď
- Fe- železo
- fMLP- formyl-methionyl-leucyl-fenylalanin
- HbA1c- glykovaný hemoglobin
- HEC- izolovaný hyperinzulinový clamp
- HGC- izolovaný hyperglykemický clamp
- HHC- hyperglykemický hyperinzulinový clamp
- ChaO- Charcotova osteoartróza
- ICHDK- ischemická choroba dolních končetin
- Ig- imunoglobulin
- IRI- imunoreaktivní inzulin
- Mg- magnesium
- MRSA- Methicillin rezistentní S.Aureus
- NADPH- hydrogen nikotinamid adenin dinukleotidfosfát
- O₂- molekula kyslíku
- OM- osteomyelitida
- PMA- phorbol 12-myristát 13-acetát
- PMN- polymorfonukleární
- RCW- Removable Cast Walker- ortéza “Walker“
- ROI- reaktivní kyslíkové intermediáty

- r-TCC- removable Total Contact Cast- snímatelná kontaktní fixace
- SDN- syndrom diabetické nohy
- Zn- zinek

6. POUŽITÁ LITERATURA

1. International Working Group on the The diabetic foot: The diabetic foot Infections. In *International Consensus on the Diabetic*, 1999
2. Jirkovská A a kol. Syndrom diabetické nohy. 1.edit., Maxdorf , Praha, 2006
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. 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
7. 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: 179-187, 1999
8. 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
9. Jirkovská A, Kasalický P, Bouček P, Hosová J, Skibová J. 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* 18: 495-500, 2001
10. Jirkovská A, Hosová J, Wosková V. Diagnostika akutní a subakutní Charcotovy osteoarthropatie u diabetiků. *Praktický Lékař* 12: 661-664, 1998
11. 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
12. Jirkovská A. Aktuální problematika syndromu diabetické nohy. In Perušičová J. *Trendy soudobé diabetologie*, Svazek 5., Galén, Praha, 2001; 53-87.
 13. Jirkovská A. *Syndrom diabetické nohy. Mezinárodní konsensus vypracovaný Mezinárodní pracovní skupinou pro syndrom diabetické nohy*. Galén, Praha, 2000
 14. Roitt IM, Brostoff J, Male DK. *Immunology*, 4th edition, Gower Medical Publishing Ltd., London, 1996
 15. Sawyer DW, Donowitz GR, Mandell GL. Polymorphonuclear Neutrophils: An effective antimicrobial force. *Rev Infect Dis* 11: S1532-S1544, 1989
 16. 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
 17. Johnson RB, Newman SL. Chronic granulomatous disease. *Pediatr Clin North Am* 24: 365-376, 1977
 18. 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
 19. Clark RA, Szot S. Chemotactic factor inactivation by stimulated human neutrophils mediated by myeloperoxidase - catalyzed methionine oxidation. *J Immunol* 128(4): 1507-1513, 1982
 20. Donadebian HD. Congenital and acquired Neutrophil abnormalities. In Klempner MS, eds. *Phagocytes and Disease*, Kluwer, Dordrecht Boston, New York, 1989; 103-118
 21. Robinson JP, Carter WO. Flow cytometric analysis of granulocytes. In Bauer KD, eds. *Clinical Flow Cytometry, Principles and Applications*, Williams & Wilkins, Baltimore, 1993; 405-433
 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 Med* 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. 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
27. 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 cytometry. *Immunol Lett* 74(3): 239-244, 2000
28. Bagdade JD, Root RK, Bulger RJ. Impaired leukocyte function in patients with poorly controlled diabetes. *Diabetes* 23(1): 9-15, 1974
29. Delamaire M, Magendre D, Moreno M, Le Goff M-C, Allanic H, Genetet B. Impaired leukocytes functions in diabetic patients. *Diabetic Med* 14: 29-34, 1997
30. 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
31. 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
32. Tater D, Tepaut B, Bercovici JP, Youinou P. Polymorphonuclear cell derangements in type 1 diabetes. *Horm Metab Res* 19: 642-647, 1987
33. Wilson RM. Neutrophil function in diabetes. *Diabetes Med* 3: 509-512, 1986
34. 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
35. 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
36. 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
37. 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
 38. 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 Prac* 15: 121-129, 1992
 39. Nielson CP, Hindson DA. Inhibition of Polymorphonuclear Leukocyte Respiratory Burst by Elevated Glucose Concentrations in Vitro. *Diabetes* 38: 1031-1035, 1989
 40. 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
 41. 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
 42. 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
 43. Fejfarová V, Jirkovská A, Kazdová L, Malinská H, Stríž I. Certain vitamins and elements with a relation to immune system in patients with diabetes mellitus (in czech). *DMEV* 6(1): 23-29, 2003
 44. 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
 45. Davis MA, Johnson T, Briske-Anderson M. Lymphoid cell functions during copper deficiency. *Nutr Res* 7: 211-222, 1987
 46. Beisel WR. Single nutrients and immunity. *Am J Clin Nutr* 35: 417-468, 1982
 47. Bussiére 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
 48. 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

49. 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
50. 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
51. 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
52. 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
53. Armstrong DG, Lipsky BA. Diabetic foot infection: stepwise medical and surgical management. *Int Wound J* 1(2): 123-132, 2004
54. Jude EB, Unsworth PF. Optimal treatment of infected diabetic foot ulcers. *Drugs Aging* 21(13): 833-850, 2004
55. Cavanagh PR, Lipsky BA, Bradbury AW, Botek G. Treatment for diabetic foot ulcers. *Lancet* 366: 1725-1735, 2005
56. Hunt JA. Foot infection in diabetes is rarely due to a single microorganism. *Diabetic Med* 9: 749-752, 1992
57. 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
58. Lipsky BA. Evidence-based antibiotic therapy of diabetic foot infections. *FEMS Immunol Med Microbiol* 26(3-4): 267-276, 1999
59. Kleinveld HA, Hak-Lemmers HLM, Stalenhoe 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
60. Kalker AJ, Pirsch JD, Heisey D, Sollinger HW, Belzer FO, Knechtel SJ, Alessandro AM. Foot problems in the diabetic transplant recipient. *Clin. Transplant* 10: 503-510, 1996
61. Selby JV, Zhang D. Risk factors for lower extremity amputation in persons with diabetes. *Diabetes Care* 18(4): 509-516, 1995
62. American Diabetes Association: Preventive foot care in people with diabetes. *Diabetes Care* Suppl. 1: S54-S55, 1999
63. Bauer E. Sumpio. Foot Ulcers. *N Engl J Med* 343(11): 787-793, 2000

64. 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
65. 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
66. 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
67. 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
68. 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
69. Wagner FW jr. The diabetic foot. *Orthopedics* 1: 163-172, 1987
70. 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
71. 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
72. Lugo-Somolinos A, Sanchez JL. Prevalence of dermatophytosis in patients with diabetes. *Journal of the American Academy of Dermatology* 26: 408-410, 1992
73. Chincholikar DA, Pal RB. Study of fungal and bacterial infections of the diabetic foot. *Indian J Pathol Microbiol* 45(1): 15-22, 2002
74. 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
75. 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
76. Rich P. Special patient population: Onychomycosis in the diabetic patient. *J Am Acad Dermatol* 35: S10-S12, 1996
77. Robbins JM. Treatment of onychomycosis in the diabetic patient population. *J Diab Compl* 17: 98-104, 2003

78. 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
79. Laing P. Diabetic foot ulcers. *The American Journal of Surgery* 167: 31S-36S, 1997
80. 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
81. Helm PA, Walker SC, Pullium G. Total contact casting in diabetic patients with neuropathic foot ulcerations. *Arch Phys Med Rehabil* 65: 691-693, 1984
82. Gill G, Benbow S, Tesfaye S, Kaczmarczyk E, Kaye L. Painless stress fractures in diabetic neuropathic feet. *Postgrad Med J* 73: 241-242, 1997
83. 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
84. 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
85. Beatty OL, Harper R, Sheridan B, Atkinson AB, Bell PM. Insulin resistance in offspring of hypertensive parents. *BMJ* 307: 92-96, 1993
86. Isenberg HD. Section 1: General. In Lennette EH, Balows A, Hausler WJ jr., Shadomy HJ. *Manual of Clinical Microbiology*, 4th edition, American Society for Microbiology, Washington D.C., 1985; 1-99
87. Courvalin P. Interpretive reading of in vitro antibiotic susceptibility tests (the antibiogramme). *Clin Microbiol Infect* S1: 26-34, 1996
88. Reese RE, Betts RF. Antibiotic use. In Reese RE, Betts RF (ed). *A practical approach to infectious diseases*, 4th ed., Little, Brown and Company, Boston, London, 1996; 1059-395

7. SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORA:

Články publikované v zahraničních časopisech:

1. 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

2. 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
3. J. Kovář, V. Fejfarová, T. Pelikánová, R. Poledne: Hyperglycemia downregulates total lipoprotein lipase activity in humans. Physiol Res 2004, 53(1): 61-68
4. 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
5. 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:

6. L. Prompers, M. Huijberts, J. Apelqvist, E. Jude, A. Piaggese, K. Bakker, M. Edmonds, P. Holstein, A. Jirkovska, 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

Články publikované v tuzemských časopisech:

7. V. Fejfarová, A. Jirkovská, V. Havlová: Léčba inzulinovou pumpou- její výhody a rizika z pohledu pacientů. Dia život 2000, 2: 30-31
8. 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
9. V. Fejfarová, A. Jirkovská, M. Křížová, P. Fexová: Léčba syndromu diabetické nohy kontaktní fixací. HPB Bulletin 2003, 1: 39-40

10. V. Fejfarová, A. Jirkovská, L. Kazdová, H. Malinská, I. Stríž: Vybrané vitamíny a prvky se vztahem k imunitnímu systému u pacientů s diabetes mellitus. DMEV 2003, 1: 23-29
11. 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
12. V. Fejfarová: Selfmonitoring u pacientů s diabetes mellitus 1. a 2.typu. Sestra, 2005, 7-8: 33-34
13. 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
14. V. Fejfarová, M. Křížová, A. Jirkovská, R. Bém, J. Pavlů: Moderní prostředky k fixaci a odlehčení diabetické nohy. Diagnóza 2005, 1(1): 13-15
15. 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
16. 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.
17. V. Fejfarová: Syndrom diabetické nohy. Dia život 2006, 17(5): 7-9
18. V. Fejfarová: Cukr v kostce. Diastyl 2006, 6: 18-19
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
20. 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

21. B. Sixta, P. Herdegen, R. Bém, V. Fejfarová: Léčení osteomyelitidy u syndromu diabetické nohy. HPB Bulletin 2001, 4: 150-152
22. A. Jirkovská, V. Fejfarová, J. Hosová, J. Kalanin, I. Stríž, J. Skibová: Nespecifické mechanismy imunity u pacientů se syndromem diabetické nohy s chronickou bakteriální infekcí. Vnitřní Lékařství 2002, 2: 142-146
23. A. Jirkovská, V. Fejfarová, J. Hosová, I. Stríž, J. Kalanin, J. Skibová: Analýza zánětlivé odpovědi a vybraných ukazatelů imunity u pacientů s infikovanými diabetickými ulceracemi. Časopis lékařů českých 2002, 15: 483-486
24. A. Jirkovská, V. Fejfarová: Problematika podiatrických ambulancí v České republice. HPB Bulletin 2004, 12(Suppl. 1): 62-66
25. J. Šedivý, 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
26. R. Bém, A. Jirkovská, V. Fejfarová: Neuropatické defekty- diagnostika a léčba. Diagnóza 2005, 1(1): 7-9
27. R. Bém, V. Fejfarová, A. Jirkovská: Terapie syndromu diabetické nohy pomocí řízeného podtlaku. Praktický lékař 2006, 86: 268-270
28. R. Bém, V. Fejfarová, A. Jirkovská: Neuropatické fraktury v oblasti kolenního kloubu u pacientů s diabetem. DMEV 2006, 9(2): 63-67
29. R. Bém, A. Jirkovská, V. Fejfarová: Aktuality v diagnostice a léčbě Charcotovy osteoartrhopatie. HPB Bulletin 2006, 14(4): 156-159

Spoluautor kapitoly:

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

Přednášky s publikovanými abstrakty v zahraničí:

31. 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 Joint Meeting Neurodiab Diabetic Foot Study Group of the EASD, Fiuggi, Itálie 9/2000. Abstrakt v Abstract Book DFSG 2000

32. 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
33. 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- Abstractbook of 4th International Symposium on The diabetic foot 2003: 64
34. 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
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
36. 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
37. 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
38. 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 2003. Abstrakt uveřejněn v Diabetes 2003 Vol. 52(6), Suppl. 1: A64

39. 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
40. 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
41. 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
42. 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
43. 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
44. 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
45. 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

Přednášky i s publikovanými abstrakty v tuzemsku:

46. 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
47. 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
48. 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
49. V. Fejfarová: Patofyziologie rozvoje syndromu diabetické nohy a možnosti jeho terapeutického ovlivnění. Přednáška na konferenci „Diagnostika a monitoring v terapii ran“, Olomouc, 6/2005
50. V. Fejfarová, A. Jirkovská, R. Bém, I. Mášová, J. Skibová: Srovnání mikroskopických a kulturačních nálezů získaných z tkáňových vzorků hyperkeratóz a ulcerací. Přednáška na 2. sympoziu mladých odborníků v diabetologii, endokrinologii a metabolismu, Praha, 10/2005
51. V. Fejfarová, A. Jirkovská, M. Křížová, J. Pavlů: Použití fixačních materiálů k tvorbě fixačních dlah, rigidních a snímatelných fixací. Přednáška na sympoziu „Diabetická nohy- současné poznatky v terapii. Střešovice, 11/2005
52. 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. Abstrakt publikován v DMEV 2006, Suppl. 2: 21
53. V. Fejfarová, M. Skořepová, A. Jirkovská, R. Bém, M. Křížová, I. Mášová, J. Skibová: Diagnostika a léčba mykotických infekcí. Přednáška na sympoziu Syndrom diabetické nohy, Praha 11/2006. Abstrakt uveřejněn v HPB Bulletin 2006, 14(4): 147-150

54. 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
55. A. Jirkovská, V. Fejfarová, J. Hosová, J. Kalanin, I. Stríž, 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
56. 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
57. R. Bém, A. Jirkovská, V. Fejfarová: Neuropatické defekty-diagnostika a léčba. Přednáška na Mezioborovém kongresu Hojení ran ve Střešovicích, Praha, 4/2005.
58. A. Jirkovská, S. Lacigová, V. Fejfarová, R. Bém, D. Hačkejlo, 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
59. 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
60. 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
61. R. Bém, A. Jirkovská, V. Fejfarová: Aktuality v diagnostice a léčbě Charcotovy osteoartrózie. Přednáška na sympoziu Syndrom diabetické nohy, Praha 11/2006.

Postery s publikovanými abstrakty v zahraničí:

62. V. Fejfarová, A. Jirkovská, J. Kalanin, J. Skibová, I. Stríž: Functional changes of polymorphonuclear cells in patients with chronic diabetic foot infection. Poster na 14th European Immunology Meeting EFIS, Poznaň, Polsko, 9/2000. Abstrakt publikován v Immunol Lett 2000, 2/3: 262
63. 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
64. V. Fejfarová, J. Hosová, A. Jirkovská, J. Kalanin, T. Pelikánová, I. Stríž, 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
65. V. Fejfarová, J. Hosová, A. Jirkovská, J. Kalanin, T. Pelikánová, I. Stríž, 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
66. 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 sympoziu Diabetic foot Study Group of the EASD, Crieff, Skotsko, 9/2001. Abstrakt v Abstract Book 2001: 43
67. V. Fejfarová, A. Jirkovská, H. Malinská, L. Kazdová, J. Kalanin, I. Stríž: 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
68. 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

69. 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, 2004: 118
70. 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
71. 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
72. 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
73. 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
74. 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
75. 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
76. 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 Joint Meeting Neurodiab and Diabetic Foot Study Group of the EASD, Fiuggi, Itálie, 9/2000. Abstrakt v Abstract book DFSG 2000
77. A. Jirkovská, V. Fejfarová, J. Hosová, J. Kalanin, I. Stríž, 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
 78. 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
 79. A. Jirkovská, V. Fejfarová, J. Hosová, J. Kalanin, I. Stríž, 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
 80. 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
 81. A. Jirkovská, V. Fejfarová, J. Hosová, J. Kalanin, I. Stríž, 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
 82. 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
 83. 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

84. 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 byl publikován v Abstract Book 2003: 112
85. 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 byl publikován v Abstrakt Book 2003: 118
86. 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
87. 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
88. 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
89. 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, 2004: 105
90. 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, 2004: 101

91. 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
92. 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
93. 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 2005: 83
94. 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
95. 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
96. 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

Postery s publikovanými abstrakty v tuzemsku:

97. V. Fejfarová, A. Jirkovská, J. Hosová, J. Kalanin, I. Stríž, 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

98. 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
99. V. Fejfarová, A. Jirkovská, J. Kalanin, I. Stríž, 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
100. V. Fejfarová, A. Jirkovská, J. Kalanin, T. Pelikánová, I. Stríž, 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, 4/2002. Abstrakt publikován v DMEV 2002, Suppl. 1: 16
101. V. Fejfarová, A. Jirkovská, J. Kalanin, T. Pelikánová, I. Stríž, 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
102. V. Fejfarová, A. Jirkovská, H. Malinská, L. Kazdová, J. Kalanin, I. Stríž: 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
103. V. Fejfarová, A. Jirkovská, J. Kalanin, I. Stríž, 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. Abstrakt publikován v DMEV 2004, 7(3): 147-148
104. 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

105. J. Hosová, A. Jirkovská, V. Fejfarová, T. Pelikánová, J. Kalanin, I. Stríž, 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
106. J. Kovář, V. Fejfarová, T. Pelikánová, R. Poledne: Clearance triacylglycerolů in vivo je regulována hyperinzulinémií a hyperglykemií. Poster na 5. kongresu o ateroskleróze, Špindlerův Mlýn, 12/2001. Abstrakt publikován v DMEV 2001, Suppl 4: 14-15
107. 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
108. 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
109. T. Hrachovinová, K. Weigertová, E. Dragomírečká, 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
110. A. Jirkovská, V. Fejfarová, D. Hačkájo, 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
111. 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
112. 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

113. T.Hrachovinová, V.Fejfarová, L.Csémy, A.Jirkovská: Gender rozdíly v odolnosti ke stresu, depresi a úzkosti u nemocných diabetem. Poster na XXXX. Luhačovických dnech, Luhačovice 4/2004. Abstrakt uveřejněn v DMEV 2004, Suppl. 1: 17-18
114. 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
115. 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