

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Studijní program: Postgraduální doktorské studium biomedicíny

Studijní obor: Fyziologie a patofyziologie člověka



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

Autor: MUDr. Andrea Němcová

**Název: Problematika kritické končetinové ischemie a buněčné léčby
u syndromu diabetické nohy, patogenetické aspekty Charcotovy
osteoartrózie**

**Title: Critical limb ischemia and autologous cell therapy in diabetic foot
disease, pathogenesis of Charcot osteoarthropathy**

Typ závěrečné práce: **Dizertační**

Školitel: **prof. MUDr. Alexandra Jirkovská, CSc.**

Praha, 2019

Prohlášení:

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

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

V Praze, dne

MUDr. Andrea Němcová

Podpis

Identifikační záznam:

NĚMCOVÁ, Andrea. *Problematika kritické končetinové ischemie a buněčné léčby u syndromu diabetické nohy, patogenetické aspekty Charcotovy osteoartropatie. [Critical limb ischemia and autologous cell therapy in diabetic foot disease, pathogenesis of Charcot osteoarthropathy]*. Praha, 2018. Počet stran 72, počet příloh 15. Dizertační práce (PhD). Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, Centrum diabetologie IKEM. Školitel Jirkovská, Alexandra.

Abstrakt

Syndrom diabetické nohy (SDN) je závažnou komplikací diabetu a spolu s kritickou končetinovou ischemií podstatně zhoršuje prognózu pacientů. Ischemická choroba dolních končetin u diabetiků má atypický klinický průběh, její diagnostika je obtížná a je jedním z hlavních faktorů zvyšujících morbiditu a mortalitu pacientů se SDN.

Cílem dizertační práce zaměřené na diagnostiku a terapii SDN bylo nalézt vhodnou metodu k posouzení terapeutické vaskulogeneze při hodnocení efektu autologní buněčné terapie (ACT), posoudit možnosti časně diagnostiky Charcotovy osteoartropatie (CHOAP) a najít spojitosti mezi výskytem kardiovaskulárních onemocnění a SDN.

Ve studiích zabývajících se terapeutickou vaskulogenezí patřil k nejzajímavějším výsledkům signifikantní vzestup antiangiogenního faktoru endostatinu po ACT na rozdíl od nezměněných hladin endostatinu po standardní perkutánní transluminální angioplastice; přechodný vzestup endostatinu se zdá být markerem terapeutické vaskulogeneze po ACT. Přínos perfuzní scintigrafie lýtkových svalů v hodnocení mikrocirkulace a efektu ACT nebyl jednoznačně prokázán. Naopak perspektivní metodou k posouzení mikrocirkulace a efektu revaskularizace po ACT byla MR spektroskopie lýtkových svalů.

V další studii zabývajících se CHOAP jsme prokázali přínos kvantitativní ultrasonometrie patní kosti v časně diagnostice tohoto onemocnění v porovnání se standardní denzitometrií páteře a kyčle.

Ve studii zkoumající vztah kardiovaskulárních onemocnění k riziku vysokých amputací u pacientů se SDN jsme prokázali mnohonásobně vyšší riziko amputací u pacientů s anamnézou infarktu myokardu a cévní mozkové příhody.

Klíčová slova: syndrom diabetické nohy, kritická končetinová ischemie, revaskularizace, autologní buněčná terapie, vaskulogeneze, angiogenní faktory, endostatin, Charcotova osteoartropatie, kardiovaskulární onemocnění, amputace, mortalita

Abstract

Diabetic foot disease (DFD) is a serious complication of diabetes and, along with critical limb ischemia, significantly exacerbates the prognosis of patients. Peripheral arterial disease in patients with diabetes has an atypical clinical course, its diagnosis is challenging and is one of the most common causes of morbidity and mortality of patients with DFD.

The aim of this dissertation focused on the diagnosis and treatment of DFD was to identify a suitable method for evaluating the effect of autologous cell therapy (ACT), to assess options for early diagnosis of Charcot osteoarthropathy (COA) and, possibly, to establish the association between the incidence of cardiovascular disease and amputation and mortality in patients with DFD.

In our studies concerning therapeutic vasculogenesis, we observed a significant increase in the antiangiogenic factor endostatin after ACT in contrast to its unchanged levels after standard percutaneous transluminal angioplasty; the transient increase in endostatin seems to be a marker of therapeutic vasculogenesis after ACT. A benefit of using calf muscle perfusion scintigraphy in the assessment of microcirculation and ACT effect was not clearly demonstrated. By contrast, a promising method for the evaluation of microcirculation and the effect of revascularization after ACT was MR spectroscopy of calf muscles.

In another study focused on COA we proved the benefit of calcaneal quantitative ultrasound in the early diagnosis of this complication compared to standard densitometry of the spine and femur.

In yet another study investigating the relationship between cardiovascular disease and the risk of major amputation in patients with DFD, we observed a significantly higher risk of amputation in patients with a history of myocardial infarction and stroke.

Key words: diabetic foot disease, critical limb ischemia, revascularization, autologous cell therapy, vasculogenesis, angiogenic factors, endostatin, Charcot osteoarthropathy, cardiovascular disease, amputation, mortality

Obsah

1	Úvod dizertační práce a literární přehled k její problematice	8
1.1	Syndrom diabetické nohy	8
1.2	Patogeneze syndromu diabetické nohy.....	8
1.3	Ischemická choroba dolních končetin u diabetiků	10
1.3.1	Specifika ischemické choroby dolních končetin u diabetiků	10
1.3.2	Patogeneze ischemické choroby dolních končetin u diabetiků	10
1.3.3	Mikrocirkulace a její poruchy u diabetiků	11
1.3.4	Diagnostika ischemické choroby dolních končetin.....	12
1.3.5	Standardní léčba ischemické choroby dolních končetin	15
1.3.6	Terapeutická vaskulogeneze pomocí autologních buněk.....	16
1.4	Charcotova osteoartropatie	18
1.4.1	Definice a epidemiologie	18
1.4.2	Patogeneze.....	18
1.4.3	Diagnostika.....	20
1.5	Kardiovaskulární onemocnění a syndrom diabetické nohy.....	21
2	Cíle dizertační práce	22
3	Vybrané metodiky jednotlivých studií	23
3.1	Izolace autologních buněk z kostní dřeně.....	23
3.1.1	Izolace autologních buněk z kostní dřeně pomocí systému Harvest Technologies Corporation.....	23
3.1.2	Izolace autologních buněk z kostní dřeně sedimentací s Gelofusinem	23
3.2	Aplikace suspenze autologních buněk.....	23
3.3	Měření TcPO ₂ – standardní metoda pro hodnocení efektu buněčné léčby.....	24
3.4	MR spektroskopie lýtkových svalů při hodnocení efektu buněčné léčby (studie 1). 24	
3.5	Perfuzní scintigrafie lýtkových svalů při hodnocení efektu buněčné léčby (studie 2)	25
3.6	Stanovení sérových hladin angiogenních faktorů a CD34+ buněk	26
3.6.1	Stanovení sérových hladin angiogenních faktorů (studie 3)	26
3.6.2	Stanovení počtu CD34+ buněk	27

3.7	Kvantitativní ultrasonometrie patní kosti v časně diagnostice Charcotovy osteoartropatie (studie 4).....	27
4	Přehled studií.....	28
4.1	Terapeutická vaskulogeneze pomocí autologních buněk	28
4.1.1	Studie 1: Význam MR spektroskopie lýtkových svalů pro hodnocení končetinové ischemie a efektu revaskularizace u syndromu diabetické nohy (Přílohy 1-3) 28	
4.1.2	Studie 2: Význam perfuzní scintigrafie lýtkových svalů pro hodnocení efektu buněčné terapie u pacientů s kritickou končetinovou ischemií (Přílohy 4, 5)	31
4.1.3	Studie 3: Endostatin jako potenciální marker vaskulogeneze po buněčné terapii (Přílohy 6-8)	33
4.1.4	Studie 4: Význam kvantitativní ultrasonometrie patní kosti v diagnostice CHOAP u pacientů s diabetickou neuropatií (Přílohy 9, 10).....	36
4.1.5	Studie 5: Asociace vysokých amputací a mortality s kardiovaskulárními onemocněními a jejich rizikovými faktory u pacientů se syndromem diabetické nohy (Přílohy 11-15)	39
5	Závěry a shrnutí dizertační práce	45
6	Poděkování	47
7	Seznam použitých zkratk.....	48
8	Literatura	50
9	Přehled vlastních publikací	58
10	Přílohy dizertační práce.....	71

1 Úvod dizertační práce a literární přehled k její problematice

1.1 Syndrom diabetické nohy

Syndrom diabetické nohy (SDN) je jedna z nejzávažnějších komplikací diabetu, která zahrnuje ulceraci nebo destrukci tkáně nohy na podkladě neuropatie a/nebo různého stupně ischemické choroby dolních končetin, často bývá přítomna infekce (The International Consensus and Practical Guidelines on the Management and Prevention of the Diabetic Foot 2015) a postihuje téměř 6 % diabetiků (Zhang P. et al., 2017). Předchozí studie ukázaly, že pouze 2/3 diabetických ulcerací se nakonec zhojí (Jeffcoate W.J. et al., 2006, Prompers L. et al., 2008) a téměř 28 % defektů může skončit určitou formou amputace (Armstrong D.G. et al., 1998); každých 30 vteřin je ve světě v důsledku diabetu provedena amputace dolní končetiny (Boulton A.J. et al., 2005). Diabetické ulcerace vyžadují dlouhou a intenzivní léčbu, mají významný dopad na kvalitu života pacienta a v neposlední řadě představují i značnou zdravotně-ekonomickou zátěž (Ragnarson Tennvall G. et al., 2004). Včasnou a účinnou léčbou SDN je možné zabránit vysokým amputacím až v 80 % případů, z čehož jasně vyplývá nutnost zahájit okamžitou intenzivní léčbu již v akutním stadiu s cílem zhojení a zachování funkční končetiny a s cílem předejít chronicitě a recidivám tohoto onemocnění. Z těchto důvodů je velmi aktuální výzkum faktorů, které mohou SDN ovlivnit.

1.2 Patogeneze syndromu diabetické nohy

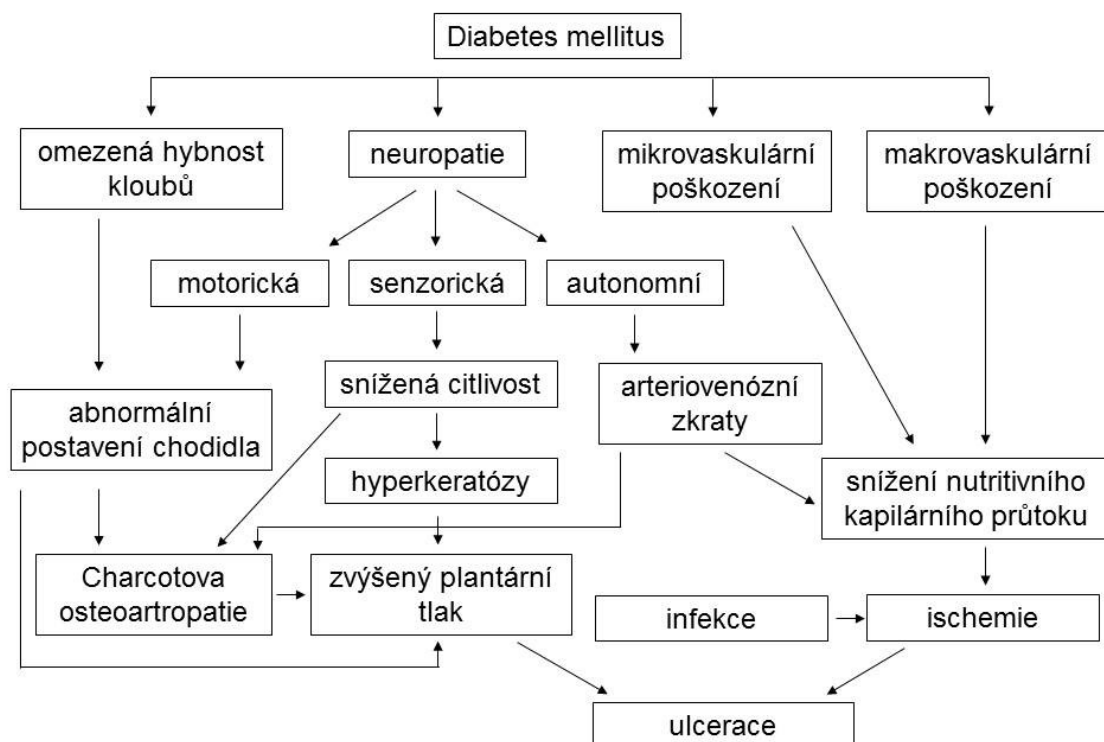
Na vzniku diabetických ulcerací se podílí řada rizikových faktorů, z nichž hlavní roli hraje přítomnost **periferní senzoricko-motorické neuropatie**, která způsobuje ztrátu citlivosti chodidel, svalovou atrofii a slabost. Neuropatie sama o sobě nevede k ulceraci; necitlivost chodidel spolu s vnějšími faktory (např. nošení nevhodné obuvi či dokonce chození naboso, drobné úrazy, ragády apod.) predisponují ke vzniku deformit a spolu s omezenou pohyblivostí kloubů vedou k abnormálnímu zatížení chodidel, ke vzniku mikrotraumat, hyperkeratóz a následně defektů (Schaper N.C. et al., 2016). Pacienti s periferní neuropatií mají až 7x vyšší riziko vzniku diabetických ulcerací v porovnání s diabetiky bez neuropatie (Abbott C.A. et al., 2002). Zároveň se uplatňuje i vliv autonomní neuropatie, jejímž důsledkem je změna struktury a napětí kůže – suchost a tendence k prasklinám, a dále hypercirkulace na úrovni mikrocirkulace, která způsobuje oslabení kostní struktury nohou a změny v mikrocirkulaci. „Autosympatektomie“ vede k hyperemii při poruše inervace shuntové cirkulace – noha je zdánlivě dobře prokrvená, teplá, často i oteklá, ale průtok nutritivními kapilárami je snížený, což má za následek tkáňovou ischemii (Tuttolomondo A. et al., 2015).

Dalším rizikovým faktorem pro vznik diabetických defektů je **ischemická choroba dolních končetin**, kterou trpí až 50 % pacientů se SDN (Hinchliffe R.J. et al., 2016). Ischemická choroba dolních končetin, zejména ve stadiu kritické končetinové ischemie, významně zhoršuje perfuzi tkáně a hojení diabetických ulcerací a je rizikovým faktorem amputace. Pouze menšina diabetických ulcerací je čistě ischemické etiologie (tyto ulcerace jsou často bolestivé a způsobené malým traumatem), většinou se jedná o ulcerace neuro-ischemického původu (Schaper N.C. et al., 2016).

Rizikovým faktorem pro vznik syndromu diabetické nohy je rovněž anamnéza diabetické ulcerace či předchozí amputace nohy nebo dolní končetiny (Bus S.A. et al., 2016).

Významný podíl v patogenezi SDN má také **infekce**. Sama o sobě je málokdy přímou příčinou vzniku diabetické ulcerace, nicméně je-li ulcerace komplikována infekcí, riziko následné amputace je mnohonásobně zvýšeno, zejména v případě ischemických a neuroischemických ulcerací, které jsou vstupní branou infekce (Peters E.J., 2016). Infekce u SDN se podílí až na 60 % amputací dolních končetin ve vyspělých zemích (Prompers L. et al., 2008, Peters E.J., 2016). Rizikovými faktory pro vznik infekce u SDN je délka trvání diabetické ulcerace (více než 30 dní), recidivující defekty, defekty způsobené traumatem, defekty s kostí na spodině, předchozí amputace či přítomnost ischemické choroby dolních končetin (Lavery L.A. et al., 2006). Infekce u SDN může postupovat velmi rychle, z povrchu defektu do subkutánních tkání, přes fascie, šlachy a svaly až do kostí. Anatomie nohy, která je rozdělena do několika oddělených, ale vzájemně komunikujících kompartmentů, umožňuje proximální šíření infekce (Peters E.J. et al., 2013). Systémové projevy infekce u SDN jako jsou teploty, třesavky, zimnice nebo leukocytóza nemusí být vyjádřeny; pokud jsou přítomny, většinou se již jedná o těžké končetinu či život ohrožující infekce (Lavery L.A. et al., 2007). Schéma patogeneze diabetických ulcerací je uvedeno na Obrázku 1.

Obrázek 1. Patogeneze syndromu diabetické nohy



1.3 Ischemická choroba dolních končetin u diabetiků

1.3.1 Specifika ischemické choroby dolních končetin u diabetiků

Kritická končetinová ischemie (critical limb ischemia, CLI), nejzávažnější forma ischemické choroby dolních končetin (ICHDK), je u diabetiků nejčastěji definována jako chronická ischemická klidová bolest nebo jako přítomnost vředů či gangrén způsobených objektivně prokázanou arteriální okluzí (Norgren L. et al., 2007). Klinická manifestace, diagnóza i léčba ICHDK u pacientů s diabetem je odlišná v porovnání s ICHDK u pacientů bez diabetu. Diabetes navíc zvyšuje riziko ICHDK dvakrát až čtyřikrát (Luscher T.F. et al., 2003). Diagnostika ICHDK, resp. CLI u diabetiků je obtížná, protože tyto pacienti často postrádají typické symptomy, jako jsou klaudikace nebo klidové bolesti v důsledku neuropatie. Rovněž šelesty nad arteria femoralis communis nebo palpáce periferních pulzací nejsou spolehlivou známkou ICHDK, protože převažuje infrapopliteální nebo víceúrovňové postižení cév dolních končetin (Prompers L. et al., 2007). CLI je u diabetiků často komplikována infekcí a špatnou kompenzací diabetu (Jirkovska A., 2006). Přítomnost mediokalcinózy nebo edému, které jsou u diabetiků rovněž velmi časté, může dále negativně ovlivnit diagnostiku ICHDK, resp. CLI (Tabulka 1). Diagnóza ICHDK není pouze rizikovým faktorem pro vznik diabetické ulcerace nebo následné amputace končetiny, ale zároveň zvyšuje riziko kardiovaskulární i celkové mortality (Golomb B.A. et al., 2006).

Tabulka 1. Kritická končetinová ischemie (CLI) u diabetiků ve srovnání s pacienty bez diabetu (upraveno podle International Working Group on the Diabetic Foot, 2015)

CLI u pacientů s diabetem	CLI u pacientů bez diabetu
Difuzní postižení	Lokalizované postižení
Lokalizace hlavně na bérce	Postižení zejména femorální oblasti
Absence bolesti vzhledem k přítomnosti neuropatie	Často přítomny klaudikace či klidové bolesti
Zhoršená formace kolaterál, mediokalcinóza - rigidní arterie, pulzace mohou být hmatné	Pulzace nehmatné
Klasifikace Rutherford/PEDIS/Wifi	Klasifikace Fontaine/Rutherford

1.3.2 Patogeneze ischemické choroby dolních končetin u diabetiků

Patofyziologie makroangiopatie u pacientů s diabetem zahrnuje endoteliální dysfunkci, abnormality ve funkci hladkého svalstva cév a krevních destiček (Paneni F. et al., 2013). Metabolické abnormality neodmyslitelně spjaté s diabetem, mezi které patří hyperglykémie, inzulinová rezistence, dyslipidémie a zvýšené hladiny volných mastných kyselin, negativně ovlivňují vznik vaskulární dysfunkce a potencují progresi aterosklerózy (Brownrigg J.R. et al., 2015).

Spouštěcím mechanismem endoteliální dysfunkce a prozánětlivého stavu je nerovnováha mezi biologickou dostupností oxidu dusnatého a nadprodukce volných

kyslíkových radikálů (Creager M.A. et al., 2003), které cestou dalších reakcí vedou k poškození cévní stěny (Paneni F. et al., 2013). Endoteliální dysfunkci u diabetu rovněž potencuje deregulace tvorby dalších vazokonstrikčně a vazodilatačně působících látek (Hink U. et al., 2001). Z patofyziologických mechanismů makroangiopatie se uplatňuje také alterace koagulačních faktorů a zvýšená agregace destiček vedoucí k prokoagulačnímu stavu. Inzulinová rezistence a hyperglykémie zvyšují hladiny fibrinogenu a inhibitoru aktivátoru plasminogenu (PAI-1) a snižují hladiny tkáňového aktivátoru plasminogenu (tPA). Vysoké hladiny PAI-1 a nízké hladiny tPA potencují přeměnu fibrinogenu na fibrin, a tím prohlubují protrombotický stav (Paneni F. et al., 2013). Mikročástice z poškozeného endotelu spolu s cirkulujícími destičkami potencují vznik trombu (Tsimmerman G. et al., 2011); následná ruptura poškozené endoteliální vrstvy s aktivací destiček vedou k vaskulární trombóze. Tento prokoagulační stav u pacientů s diabetem je dle předchozích studií z velké části zodpovědný za zvýšený výskyt kardiovaskulárních příhod a zvýšenou kardiovaskulární mortalitu (Vazzana N. et al., 2012).

Předchozí studie také poukázaly na roli zvýšeného C-reaktivního proteinu (CRP) v patogenezi ICHDK. CRP se váže na receptory endoteliálních buněk vedoucích k apoptóze, podporuje průnik oxidovaných lipoproteinových (LDL) částic do aterosklerotických plátů a stimuluje produkci endoteliálních prokoagulačních faktorů (American Diabetes A., 2003).

Endoteliální dysfunkce spolu s aktivací receptoru pro pozdní produkty glykace vedou k lokálnímu zánětu cévní stěny prostřednictvím produkce transkripčních faktorů, např. nukleárního faktoru kappa B, a spolu se zvýšeným oxidativním stresem způsobují transformaci leukocytů v pěnové buňky, které tvoří aterosklerotický plát (American Diabetes A., 2003).

1.3.3 Mikrocirkulace a její poruchy u diabetiků

U pacientů se SDN je téměř vždy přítomna porucha mikrocirkulace. Pod pojmem mikrocirkulace rozumíme nepulzatilní arterioly, prekapilární svěrače, arteriovenózní zkraty, kapiláry a venuly. Porucha mikrocirkulace hraje významnou roli v patogenezi syndromu diabetické nohy (Flynn M.D. et al., 1992, Chao C.Y. et al., 2009), zhoršuje hojení ulcerací a může vést až k amputaci dolní končetiny. Podkladem poruchy mikrocirkulace na dolních končetinách u diabetiků není podle řady autorů typická mikroangiopatie (Schaper N.C. et al., 2016).

Hemodynamická hypotéza poruchy mikrocirkulace u diabetiků předpokládá, že hyperglykémie v časných fázích diabetu vede k deregulaci krevního průtoku. Důsledkem je zvýšení průtoku, zvýšení permeability kapilár a mikrovaskulární hypertenze (Sandeman D.D. et al., 1992). Tyto změny vedou ke ztluštění bazální membrány a mikrovaskulární skleróze. Transportní funkce a migrace leukocytů přes kapilární membránu může být rovněž porušena (Flynn M.D. et al., 1992). Snížená elasticita cév v důsledku výše uvedených změn ovlivňuje vazodilataci a v kombinaci s dysfunkcí endotelu, která způsobuje predispozici k vazokonstrikci, snižuje nutritivní kapilární cirkulaci.

Jiná hypotéza, „capillary steal syndrome“, předpokládá vliv autonomní neuropatie u pacientů s diabetem vedoucí v důsledku poruchy sympatické inervace cév k dilataci arteriovenózních shuntů a prekapilární vazokonstrikci s kapilární ischemií. Studie podporující

tuto teorii prokazují zvýšenou venózní oxygenaci u pacientů se syndromem diabetické nohy a periferní neuropatií (Boulton A.J. et al., 1982). Dochází rovněž k chronickým zánětlivým změnám.

Porušená postischemická hyperemická reakce, abnormální průtok cévou a zhoršená vaskulární reaktivita na podkladě neuropatie charakterizují poruchu mikrocirkulace u pacientů s CLI a syndromem diabetické nohy.

1.3.4 Diagnostika ischemické choroby dolních končetin

Jak již bylo zmíněno výše, diagnostika ICHDK a CLI může být u pacientů s diabetem obtížná, ale časná stanovení tíže postižení s následnou adekvátní léčbou jsou nezbytné pro zachování funkční končetiny. Fyzikální vyšetření má své limity (vzhledem k časté přítomnosti edému, neuropatie nebo infekce) a nemusí poskytnout spolehlivou informaci o přítomnosti či závažnosti ICHDK u diabetiků. Ani přítomnost hmatných periferních pulzací u diabetiků nemusí znamenat, že ischemie dolních končetin není přítomna. Vzhledem k distálním stenózám tepen nebývají přítomny ani typické šelesty v tříselech.

1.3.4.1 Diagnostika makrocirkulace

Mezi nejčastější vyšetřovací metody ICHDK patří dopplerovské vyšetření a stanovení indexu kotník-paže, měření palcového tlaku, duplexní ultrasonografie tepen, digitální subtrakční angiografie, MR angiografie nebo CT angiografie. Tyto vyšetřovací a zobrazovací metody slouží k orientačnímu vyšetření perfuze dolních končetin nebo poskytují přímé anatomické zobrazení zejména velkých cév.

Použití **indexu kotník-paže** (ankle-brachial index, ABI) může být u pacientů s diabetem problematické vzhledem k časté přítomnosti mediokalcinózy, která způsobuje nekompresibilitu arterií a tím prakticky znemožňuje hodnocení vyšetření až u jedné třetiny pacientů (Hiatt W.R. et al., 1995, Potier L. et al., 2011). Hodnoty ABI > 1,3 svědčí pro významnou mediokalcinózu a neposkytují spolehlivou informaci o přítomnosti nebo absenci ICHDK, ale jsou asociovány se zvýšeným kardiovaskulárním rizikem u pacientů s diabetem (O'Hare A.M. et al., 2006). Pacienti s diabetem a mediokalcinózou mohou mít ABI v normálním rozmezí (0,9 – 1,3), a přesto mají ICHDK (Brownrigg J.R. et al., 2015).

Vedle ABI je možno analogicky použít **měření palcového tlaku** (toe-brachial index), neboť drobné arterie prstů jsou kalcifikovány méně často. Nicméně u pacientů s ulceracemi na prstech či po nízkých amputacích je toto vyšetření problematické a opět zde hraje roli mediokalcinóza.

Duplexní ultrasonografie (DUS) tepen slouží k odhalení hemodynamicky významných stenóz. U pacientů s diabetem může být přesnost a kvalita vyšetření opět ovlivněna přítomností mediokalcinózy, zejména v oblasti bércevého řečiště. Samotné vyšetření DUS tepen bércevého řečiště není dostačující pro plánování chirurgické intervence, ale může napomoci v indikaci dalších invazivnějších zobrazovacích vyšetření (Schaper N.C. et al., 2012).

Digitální subtrakční angiografie (DSA) je považována za zlatý standard v diagnostice a posouzení ICHDK. DSA poskytuje dobrý přehled arteriálního řečiště, zejména velkých cév, její výhodou je možnost provedení endovaskulární intervence v jedné době

(Schaper N.C. et al., 2012). Limitací je riziko vzniku kontrastní nefropatie, především u pacientů s preexistující renální insuficiencí (Pomposelli F., 2010). Vzhledem k invazivitě vyšetření se doporučuje ji provádět až při indikaci endovaskulárního výkonu.

CT angiografie je další neinvazivní zobrazovací metodou, umožňující 3D rekonstrukci cévního řečiště. Vyšetření může být opět výrazně ovlivněno artefakty způsobenými přítomností kalcifikací, které omezují posouzení zejména bércevého řečiště (Brownrigg J.R. et al., 2015). Další nevýhodou je použití ionizujícího záření a potenciálně nefrotoxicky působících kontrastních látek (Met R. et al., 2009).

Neinvazivní zobrazovací metodou je rovněž **MR angiografie**, jejíž výhodou je minimální vliv kalcifikací na interpretaci angiografického nálezu, ačkoli v porovnání s CT angiografií může být vyšetření negativně ovlivněno artefakty z implantovaných stentů (Brownrigg J.R. et al., 2015) nebo „kontaminováno“ signálem z přilehlých vén (Pomposelli F., 2010). Další nevýhodou v porovnání s CT angiografií je nižší prostorové rozlišení a kontraindikace, například přítomnost kardiostimulátoru či některých kovových materiálů.

1.3.4.2 Diagnostika mikrocirkulace

Výše uvedené diagnostické a zobrazovací metody slouží především k vyšetření makroangiopatie. Mezi nejpoužívanější metody testující mikrocirkulaci patří především měření transkutánní tenze kyslíku, dále laser Doppler flowmetrie (Hsiu H. et al., 2018), měření kožního perfuzního tlaku, kapilaroskopie (Tomesova J. et al., 2013) nebo světelná spektrofotometrie (Weber K. et al., 2014).

Měření transkutánní tenze kyslíku (TcPO₂) je neinvazivní metoda standardně využívaná k posouzení periferní kožní perfuze na úrovni mikrocirkulace. Jedná se o vyšetření stanovující polarografickou Clarkovou sondou parciální tlak kyslíku difundujícího přes pokožku. Oddělíme-li pokožku hermeticky od okolního prostředí, dojde difuzí k postupnému vyrovnání tlaku kyslíku v sondě s tlakem kyslíku v pokožce. Tento tlak je úměrný měřené intenzitě elektrického proudu vznikajícího elektrochemickou reakcí mezi elektrodami v přiložené sondě. Získaná hodnota TcPO₂ je celkovým obrazem prokrvení kůže, metabolické tkáňové aktivity, disociace oxyhemoglobinu a tkáňové perfuze kyslíku. Z toho plynou případná omezení metody, kdy výsledné naměřené tlaky mohou být ovlivněny jak systémovými faktory (plicní onemocnění, anémie, chronická ischemická choroba srdeční), lokálními faktory v místě měření sondou (edém, zánět či lokální vazokonstrikce), tak i technickými faktory (dodržení podmínek měření). Případnou nevýhodou může být i časová náročnost vyšetření, které s přípravou místa měření a s kalibrací trvá přibližně 30-45 minut.

TcPO₂ se využívá při stanovení stupně ICHDK (Urbanova R. et al., 2001). Za fyziologické považujeme hodnoty TcPO₂ v rozmezí 50–80 mmHg, TcPO₂ pod 30 mmHg je považována za hranici pro kritickou končetinovou ischemií s nízkou prognostickou hodnotou hojení (Schaper N.C. et al., 2012).

Měření je výhodné zejména u diabetiků s mediokalcinózou, kde je diagnostika ICHDK pomocí např. dopplerovského ultrazvukového vyšetření nespolehlivá. U pacientů s chronickými ulceracemi lze využít měření TcPO₂ ke zvažení indikace k revaskularizaci. Po již provedené revaskularizaci je možno sledovat pomocí TcPO₂ její efekt s časným rozpoznáním případné restenózy (Caselli A. et al., 2005). Mezi další využití patří stanovení

pravděpodobnosti hojení, kdy při hodnotách TcPO₂ pod 25-30 mmHg je hojení defektu bez cévní intervence nepravděpodobné. Měření TcPO₂ lze stanovit optimální výši amputace končetiny (Wutschert R. et al., 1997). Měření TcPO₂ se ve většině studií zabývajících se buněčnou terapií používá jako standardní metoda pro hodnocení efektu (Dubsky M. et al., 2017), proto jsme TcPO₂ zvolili jako hlavní parametr hodnocení efektu ACT i v našich studiích.

Laser Doppler flowmetrie je neinvazivní metoda vyšetření mikrocirkulace laserovým paprskem. Na základě tzv. Dopplerova jevu zaznamenává odraz záření od pohybujících se krevních elementů a na základě frekvenčního posunu určuje průtok krevním řečištěm. Měření průtoku se udává pomocí relativní veličiny, tzv. perfuzních jednotek (Tomesova J. et al., 2013).

Měření kožního perfuzního tlaku (skin perfusion pressure, SPP) představuje další neinvazivní metodu, která poskytuje informaci o reaktivitě mikrocirkulace. Laserový senzor v okluzní manžetě snímá obnovený průtok končetinou. Perfuzní tlak pod 30 mmHg svědčí podobně jako TcPO₂ pro CLI. Toto vyšetření není ovlivněno lokálními faktory, např. otokem, lokalizací defektu apod. (Tomesova J. et al., 2013). Recentně publikovaná metaanalýza naznačuje, že SPP s vysokou senzitivitou a specificitou predikuje hojení ulcerací u pacientů s CLI (Pan X. et al., 2018).

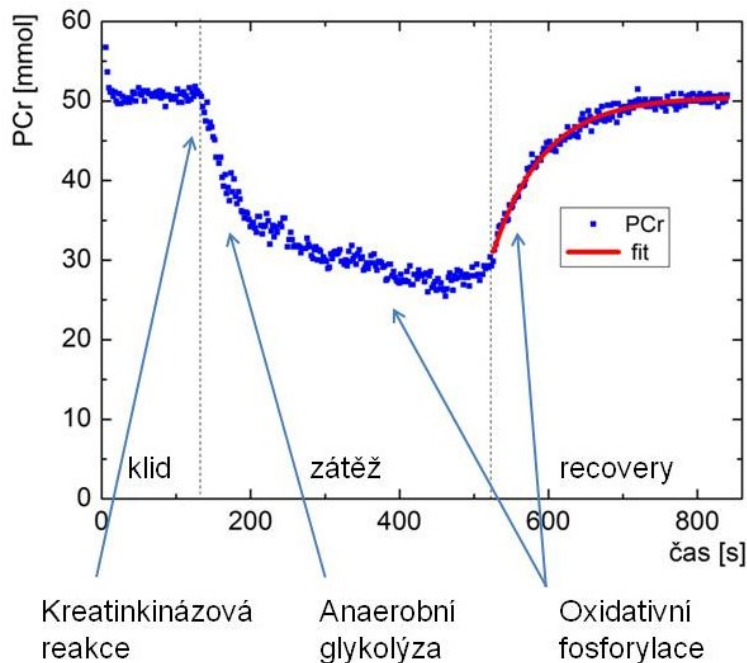
Perspektivními výzkumnými metodami pro vyšetření mikrocirkulace u diabetiků, kterými jsme se zabývali v našich studiích, byly perfuzní scintigrafie lýtkových svalů a MR spektroskopie.

Perfuzní scintigrafie s technecium-99-methoxy-isobutyl-isonitrilem (^{99m}Tc-MIBI) je dnes běžně využívána k diagnostice ischemické choroby srdeční (Gropler R.J. et al., 2010, Gaemperli O., 2014). Principem je rychlé vychytávání radiofarmaka v membráně mitochondrií myokardu, akumulace je závislá jak na perfuzi svalu, tak na aktivitě vychytávání v mitochondriích. Zkušenosti s jejím použitím v diagnostice ICHDK jsou však zatím velmi omezené. Přínos ^{99m}Tc-MIBI lýtkových svalů v diagnostice ICHDK byl posuzován pouze v několika studiích (Sayman H.B. et al., 1991, Celen Y.Z. et al., 2000, Kusmierk J. et al., 2006). Perfuzní scintigrafii lýtkových svalů jsme proto testovali jako potenciálně vhodnou metodu pro posouzení efektu buněčné terapie na úrovni mikrocirkulace.

Fosforová (³¹P) MR spektroskopie umožňuje detekci a relativní kvantifikaci některých energetických metabolitů ve svalu in vivo, zejména fosfokreatinu (PCr), anorganického fosfátu (Pi), adenosintrifosfátu (ATP), fosfomonoesterů a fosfodiesterů (PDE), a tím poskytuje informaci o energetickém metabolismu svalu jak v klidu, tak při zátěži (Sedivy P. et al., 2015). Spektra též umožňují vyhodnotit intramyocelulární pH a mitochondriální kapacitu svalu. Kinetika fosfokreatinu v lýtkovém svalu sledovaná pomocí MR spektroskopie byla posuzována v klinické studii u pacientů s CLI při hodnocení revaskularizace pomocí perkutánní transluminální angioplastiky (West A.M. et al., 2012). U pacientů s ICHDK byl pozorován prodloužený recovery time PCr, který je známkou zpožděného obnovení zásob energeticky bohatého fosfokreatinu (Greiner A. et al., 2006, Isbell D.C. et al., 2006), Obrázek 2. Nejen ICHDK, ale také diabetes a jeho komplikace negativně ovlivňují svalový metabolismus; pacienti s diabetem mají např. sníženou mitochondriální kapacitu (Cree-Green M. et al., 2015) a vyšší výskyt poškození

mitochondriální DNA (Fetterman J.L. et al., 2016). MR spektroskopie lýtkových svalů by rovněž mohla být vhodnou metodou k posouzení efektu revaskularizace po buněčné léčbě.

Obrázek 2. Kinetika fosfokreatinu (PCr) během klidu, zátěže a recovery fáze při zátěžové MR spektroskopii



1.3.5 Standardní léčba ischemické choroby dolních končetin

Standardními léčebnými metodami CLI jsou endovaskulární výkony, zejména perkutánní transluminální angioplastika (PTA) a případný stenting, nebo chirurgická revaskularizace bypassem (Benitez E. et al., 2014). Podle předchozích studií jsou krátkodobé i dlouhodobé výsledky obou metod prakticky srovnatelné, nicméně endovaskulárním metodám se dává v poslední době přednost z důvodu nižších perioperačních rizik a nákladů (Bradbury A.W. et al., 2010, Hinchliffe R.J. et al., 2012); o konkrétním revaskularizačním postupu rozhoduje vždy cévní nález a zkušenosti pracoviště (Hinchliffe R.J. et al., 2016). Navzdory pokrokům v revaskularizační léčbě není u více než 30 % pacientů standardní revaskularizace možná z důvodu rozsáhlé nebo distálně lokalizované arteriální okluze (Collinson D.J. et al., 2004), opakovaných technických neúspěchů nebo přítomnosti vysoce rizikových komorbidit (Compagna R. et al., 2015). Tito pacienti s tzv. no-option CLI mohou profitovat z nových revaskularizačních metod, mezi něž patří léčba autologními kmenovými buňkami (Fadini G.P. et al., 2010, Lawall H. et al., 2010). Otázkou ale zůstává ovlivnění životní prognózy těchto pacientů i po úspěšné revaskularizaci, která bývá závislá na komorbiditách, především kardiovaskulárních onemocněních.

1.3.6 Terapeutická vaskulogeneze pomocí autologních buněk

Terapeutická vaskulogeneze pomocí autologních buněk patří mezi nadějně metody ve fázi klinického výzkumu. Léčba pomocí autologních kmenových buněk aplikovaných do postižené končetiny dle předchozích studií byla dobře tolerována a měla příznivý klinický efekt (Liu Y. et al., 2015, Ai M. et al., 2016). Buněčná léčba může potenciálně ovlivnit těžkou ICHDK redukcí zánětu, remodelací tkáně a zvýšenou perfuzí (Bartel R.L. et al., 2013). Dle výsledků rozsáhlých metaanalýz buněčná léčba no-option CLI zlepšila ischemii, vedla k rychlejšímu hojení ran, redukovala subjektivní symptomy a snížila výskyt vysokých amputací (Fadini G.P. et al., 2010, Lawall H. et al., 2010, Zhang Y. et al., 2017, Xie B. et al., 2018, Gao W. et al., 2019).

1.3.6.1 Autologní buněčná léčba a mechanismus účinku

Autologní buněčná léčba (autologous cell therapy, ACT) je založena na intramuskulární aplikaci buněčné suspenze, kterou tvoří heterogenní populace mononukleárních buněk obsahujících subpopulaci progenitorových vaskulárních buněk (Aghi M. et al., 2005). Tato buněčná suspenze se získává trepanobiopsií kostní dřeně (bone marrow-derived mononuclear cells, BMMNC) nebo separací z periferní krve (peripheral blood progenitor cells) po aplikaci faktoru stimulujícího kolonie granulocytů (Aghi M. et al., 2005). V jedné z našich předchozích studií jsme prokázali, že klinický efekt aplikovaných buněčných suspenzí získaných oběma separačními metodami hodnocený změnami TcPO₂ a výskytem vysokých amputací byl srovnatelný a byl signifikantně lepší v porovnání s konzervativní léčbou (Dubsky M. et al., 2013).

Pravděpodobně nejvýznamnější buněčnou subpopulací ve vaskulární regeneraci jsou buňky s povrchovým znakem CD34+, které jsou tvořeny převážně hematopoetickými buňkami, menší část tvoří endoteliální progenitorové buňky (EPC) (Zubair A.C. et al., 2010, Fadini G.P. et al., 2017). EPC jsou schopné migrovat z kostní dřeně a v ischemických oblastech se diferencovat ve zralý endotel (Hristov M. et al., 2009).

Přesný mechanismus účinku injikovaných autologních buněk na tkáňové úrovni není zcela objasněn, předpokládá se však jejich role ve vaskulogenezi. Existují dva hlavní mechanismy vaskulogeneze – angiogeneze a arteriogeneze (Buschmann I. et al., 1999). Angiogeneze je silně indukována hypoxií, následkem které dochází k růstu nových kapilár z původních cév, zatímco arteriogeneze je indukována fyzikálními silami, především střížným napětím vzniklým zvýšeným hydrostatickým tlakem tekutin při okluzi cévy, které vede k remodelaci a maturaci preexistujících kolaterál. Proces arteriogeneze je na rozdíl od angiogeneze schopen lépe kompenzovat tkáňovou ischemii (Lawall H. et al., 2010, Cooke J.P. et al., 2015).

Jedním z možných vysvětlení mechanismu účinku ACT v procesu vaskulogeneze je inkorporace aplikovaných autologních buněk do vznikajících cév; alternativou může být uvolnění růstových faktorů těmito buňkami, které přímo stimulují endogenní vaskulární prekurzory, nebo ovlivnění hostitelských buněk k produkci angiogenních růstových faktorů (Aranguren X.L. et al., 2009).

1.3.6.2 Angiogenní faktory

Důležitým modulátorem vaskulogeneze je uvolnění jak proangiogenních, tak i antiangiogenních faktorů. Mezi nejvýznamnější **proangiogenní růstové faktory** produkované jak endotelovými buňkami, tak i dalšími buňkami monocytární řady, patří vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF), bazický fibroblastový růstový faktor (bFGF), angiopoietin-1 (Ang-1), destičkové růstové faktory (PDGF-AA, PDGF-BB), hepatocytární růstový faktor (HGF) a hypoxia inducibilní faktor 1 alfa (Kinnaird T. et al., 2004, Di Vita G. et al., 2005). HGF a bFGF mají pomocnou úlohu při tvorbě kolaterál, potencují účinek VEGF (Van Belle E. et al., 1998). VEGF je endoteliální buněčně-specifický mitogen indukující proliferaci a diferenciaci endotelových buněk. Bazický FGF je protein indukující angiogenezi přímým účinkem na proliferaci endoteliálních buněk. Stromální buněčně-derivovaný růstový faktor 1 je významný chemokin přispívající k migraci EPC a angiogenezi. Dle experimentálních studií došlo po injekční aplikaci k akceleraci angiogeneze a hojení ran (Velazquez O.C., 2007).

Mezi **antiangiogenní faktory** patří endostatin, angiostatin, arresten, canstatin, tumstatin nebo trombospondiny (Ribatti D., 2009).

Jedním z nejsilnějších inhibitorů angiogeneze je **endostatin**, c-terminální fragment kolagenu XVIII, který je součástí vaskulárních bazálních membrán (Poluzzi C. et al., 2016). Endostatin inhibuje VEGF-dependentní migraci endotelových prekursorových buněk a indukuje jejich apoptózu (Schuch G. et al., 2003). Dalším předpokládaným mechanismem účinku endostatinu je inhibice matrix-metaloproteináz, které usnadňují migraci a invazi endoteliálních buněk během angiogeneze proteolytickou degradací extracelulární matrix (Poluzzi C. et al., 2016). Biologický efekt endostatinu je zřejmě zprostředkován jeho vazbou na receptory buněčného povrchu, což vede k ovlivnění celé intracelulární signalizační kaskády a k interakci s množstvím proteinů, např. s integriny, tropomyosiny, glypikany nebo lamininem, které zodpovídají za antiangiogenní vlastnosti endostatinu (Fu Y. et al., 2009). V současné době probíhá intenzivní výzkum ohledně potenciálního klinického využití endostatinu, např. v onkologické či protizánětlivé léčbě, v léčbě diabetické retinopatie nebo obezity; perspektivní je použití endostatinu jako prognostického biomarkeru (Walia A. et al., 2015, Wang H. et al., 2015). Nicméně dosud není objasněno, jakým mechanismem probíhá regulace sérových hladin endostatinu (Ruge T. et al., 2017). V naší studii jsme sledovali hladiny endostatinu v souvislosti s posouzením vaskulogeneze po ACT.

Hladiny angiogenních faktorů po buněčné terapii byly sledovány ve studiích jen ojedinele; např. Kajiguchi (Kajiguchi M. et al., 2007) ve své studii ukázal, že intramuskulárně aplikované BMMNC secernují angiogenní faktory jako jsou VEGF, bFGF a Ang-1 v místě vpichu, které mohou pomoci mobilizaci progenitorových buněk do ischemické tkáně. Hladiny angiogenních faktorů byly vyšší u responderů (u pacientů klinicky zlepšených) oproti non-responderům a nelišily se 2 týdny po terapii ve srovnání s hodnotami před terapií.

V jiné studii (Dubsky M. et al., 2014) byly porovnávány sérové hladiny angiogenních faktorů s ohledem na jejich roli v lokální a potenciálně nežádoucí systémové vaskulogenezi. Sérové hladiny proangiogenních (VEGF, bFGF, Ang-1, PDGF-AA, PDGF-BB) a antiangiogenních (endostatin) faktorů byly stanoveny před buněčnou léčbou a následně během 6 měsíců po výkonu. Sérové hladiny endostatinu signifikantně stouply za 1 a 3 měsíce

po buněčné terapii, zatímco hladiny ostatních proangiogenních faktorů se signifikantně nezměnily. Zároveň nebyly pozorovány nežádoucí systémové účinky, a to na základě vyšetření očního pozadí, kdy nebyla pozorována novotvorba cév na sítnici.

1.4 Charcotova osteoartropatie

1.4.1 Definice a epidemiologie

Charcotova osteoartropatie (CHOAP) je poměrně častá komplikace diabetické neuropatie s potenciálně devastujícími následky. Dle definice se jedná o neinfekční progresivní destrukci kostí, kloubů a měkkých tkání nohy na podkladě neuropatie, nejčastěji diabetické; v akutním stadiu je charakterizována známkami zánětu a zvýšenou kostní remodelací (Rogers L.C. et al., 2011). CHOAP je spojena s vysokou morbiditou a mortalitou (Fabrin J. et al., 2000). Akutní fáze CHOAP často nebývá včas diagnostikována, což oddálí zahájení adekvátní terapie a ve svém důsledku může vést ke vzniku deformit chodidla, sekundárním ulceracím, osteomyelitidě a nakonec k amputaci (Wukich D.K. et al., 2011, Jeffcoate W.J., 2015). Skutečná prevalence CHOAP není známa, zejména kvůli vysoké incidenci nesprávné nebo pozdní diagnostiky a léčby, dle populačních studií se však prevalence odhaduje na 0,4-13 % diabetiků (Frykberg R.G. et al., 2008). Predisponující faktory pro vznik CHOAP zahrnují neuropatii (senzoricko-motorickou i autonomní), zvýšené mechanické zatížení, zvýšenou kostní resorpci, mikrofraktury, trauma a zánět (Petrova N.L. et al., 2016).

1.4.2 Patogeneze

Jak již bylo naznačeno výše, neexistuje jedna jasná příčina vzniku CHOAP; toto onemocnění vzniká na podkladě celé řady predisponujících faktorů (Rogers L.C. et al., 2011), z nichž nejzásadnější je přítomnost neuropatie a opakovaných mikrotraumat. Předpokládá se, že v počátcích onemocnění hraje klíčovou roli zánětlivý proces, který vede k osteolýze a tím nepřímo ke vzniku fraktur a dislokací (Jeffcoate W.J. et al., 2005). Při frakturách dochází k uvolnění prozánětlivých cytokinů, např. $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, což vede ke zvýšené expresi RANKL (tj. ligandu, který se váže na aktivační receptor nukleárního faktoru kappa B) na celé řadě buněk. RANKL spouští syntézu nukleárního transkripčního faktoru ($\text{NF-}\kappa\beta$), který je zodpovědný za maturaci osteoklastů způsobujících osteolýzu. Zvýšená produkce RANKL zároveň stimuluje produkci osteoprotegerinu (OPG) z osteoblastů nebo aktivovaných T-lymfocytů; OPG působí jako antagonist RANKL – tzv. decoy receptor, který kompetitivně vyvažuje jeho excesivní produkci (Boyce B.F. et al., 2008). Tento proces aktivace osteoklastů probíhá i fyziologicky při hojení fraktur, nicméně je krátkodobý (Jeffcoate W.J., 2015). U pacientů s neuropatií, kteří často necítí bolest a nadále došlapují na postiženou končetinu, však dochází k opakovaným mikrotraumatům, kontinuální produkci prozánětlivých cytokinů a nekontrolovanému zánětu s následnou lokální osteolýzou (Jeffcoate W.J. et al., 2005). Bylo prokázáno, že osteoklasty pacientů v akutní fázi CHOAP jsou agresivnější a mají vyšší resorpční aktivitu ve srovnání s kontrolní skupinou; tyto změny jsou však pouze částečně inhibovány OPG, což svědčí pro vliv i dalších cytokinů v tomto procesu (Mabilleau G. et al., 2008). Dalším faktorem, který se potenciálně uplatňuje při vzniku CHOAP, je zvýšení

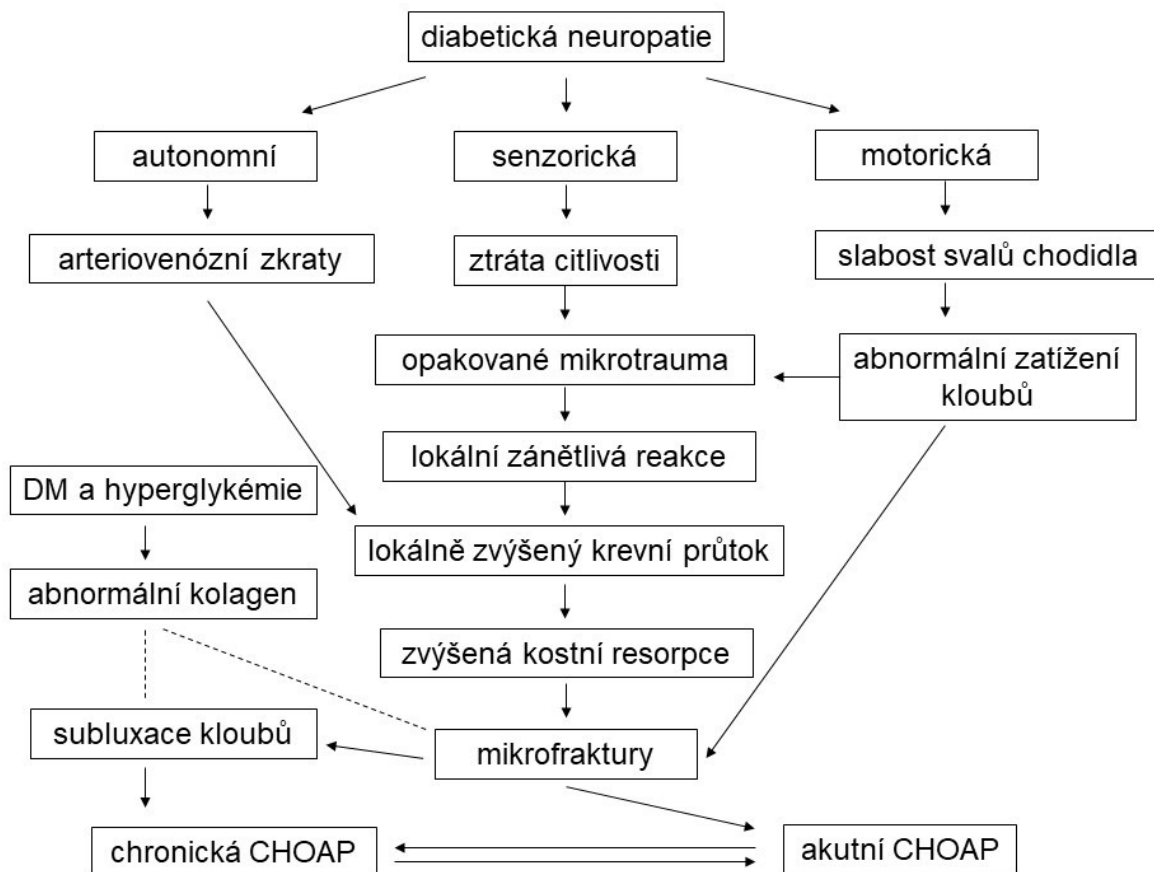
krevního průtoku a arteriovenózní zkraty v důsledku autonomní neuropatie, které stimulují kostní resorpci aktivací osteoklastů u pacientů s neuropatií (Edmonds M.E. et al., 1982).

Predisponujícím faktorem vzniku CHOAP je snížená kostní minerální denzita (bone mineral density – BMD), která v kombinaci s neuropatií a abnormálním mechanickým stresem může vést ke vzniku fraktur. U pacientů s CHOAP byly prokázány snížené hodnoty BMD v kostech nohy ve srovnání s kontrolní skupinou pacientů s neuropatií (Young M.J. et al., 1995, Jirkovska A. et al., 2001). Dalším patogenetickým mechanismem vzniku CHOAP je zvýšená glykace a změna měkkých tkání nohy v důsledku diabetu vedoucí k sublucacím kloubů i při drobných traumatech.

Mezi rizikové faktory predisponující ke vzniku CHOAP patří užívání imunosupresiv po transplantaci ledviny a/nebo slinivky (Matricali G.A. et al., 2007), renální insuficience (Samann A. et al., 2012), deficiencie kalcia a vitamínu D (Rogers L.C. et al., 2011) a v neposlední řadě rovněž metabolické důsledky diabetu, především hyperglykémie (Milne T.E. et al., 2013), pozdní produkty glykace a oxidační stres, které mohou zvyšovat expresi RANKL (Rogers L.C. et al., 2011).

Kombinace několika výše uvedených faktorů vede k lokálnímu zánětlivému procesu, jehož důsledkem jsou různé stupně kostní destrukce, sublucace, dislokace nebo deformity (Rogers L.C. et al., 2011). Schéma patogeneze CHOAP shrnuje Obrázek 3.

Obrázek 3. Patogeneze Charcotovy osteoartropatie (CHOAP), upraveno podle Rajbhandari et al., Diabetologia 2002



1.4.3 Diagnostika

V důsledku neuropatie mohou být prvotní známky a symptomy onemocnění minimální, proto je nezbytné na diagnózu CHOAP vůbec pomyslet (Petrova N.L. et al., 2016). V současné době nemáme k dispozici biochemické markery, které by napomohly k diagnóze či monitoraci průběhu onemocnění (Petrova N.L. et al., 2016). V akutní fázi může být postižená noha zarudlá, oteklá, proteplená a je třeba včas odlišit flegmónu, dnu či hlubokou žilní trombózu (Jeffcoate W.J., 2015). U CHOAP bývá přítomný výrazný rozdíl kožních teplot (McGill M. et al., 2000), postižená noha může být i o více než 2 °C teplejší než nepostižená noha (Armstrong D.G. et al., 1997). Zánět většinou probíhá lokálně a obvykle nebývá spojen se systémovým vzestupem zánětlivých parametrů (Petrova N.L. et al., 2007). Na RTG vyšetření mohou být přítomny fraktury či dislokace kostí, ovšem v počátcích onemocnění nemusí být patrné žádné patologické změny, a pokud v této fázi není onemocnění odhaleno a není zahájena adekvátní léčba, důsledkem mohou být ireverzibilní destrukce kostí a kloubů (Chantelau E., 2005). Vhodnějším zobrazovacím vyšetřením je magnetická rezonance, která již v časně fázi CHOAP dokáže odhalit změny v měkkých tkáních a kostech, ale rozlišení CHOAP od osteomyelitidy může být obtížné (Jeffcoate W.J., 2015). Třífázová dynamická scintigrafie skeletu využívající ^{99m}Tc s vysokou senzitivitou odhalí aktivitu kostní patologie, nevýhodou je však nízká specifita pro osteoartropatii. Scintigrafie s radioaktivně značenými leukocyty zvyšuje specifitu pro infekci, ale hůře odliší měkké tkáně od kostí, proto se toto vyšetření kombinuje s třífázovou scintigrafií skeletu (Palestro C.J. et al., 1998). Izotopové metody se s výhodou používají v monitoraci aktivity kostního procesu. Zkušenosti s pozitronovou emisní tomografií zůstávají především kvůli dostupnosti této metody omezené (Jeffcoate W.J., 2015).

Perspektivní metodou pro časnou diagnostiku kostní nemoci u CHOAP je **kvantitativní ultrasonometrie (QUS)** patní kosti. Jedná se o neinvazivní metodu, jejímž principem je šíření ultrazvukové (UZ) vlny strukturou kosti. Pro kvantitativní posouzení BMD, 3D architektiky patní kosti a její fragility se používají 2 parametry: rychlost šíření UZ vlny (speed of sound, SOS) a širokopásmové zeslabení UZ vlny (broadband ultrasound attenuation, BUA). Studie hodnotící přínos QUS v diagnostice CHOAP prokázala signifikantně sníženou hodnotu BMD patní kosti postižené končetiny u pacientů s CHOAP v porovnání se zdravými dobrovolníky (Jirkovska A. et al., 2001). V této studii nebyl mezi pacienty s CHOAP a kontrolní skupinou pozorován signifikantní rozdíl v BMD páteře hodnocený standardní denzitometrií, což naznačuje přínos QUS patní kosti v časně diagnostice CHOAP.

K dalším perspektivním možnostem časně diagnostiky CHOAP patří markery kostní remodelace, a to osteoplastické markery (kostní alkalická fosfatáza, osteokalcin), markery kostní resorpce odvozené od kolagenu (carboxy-terminal cross-linked telopeptides of type 1 collagen), osteoklastické enzymy (tartarát-rezistentní kyselá fosfatáza) a nověji také markery kostní remodelace jako RANKL, OPG a sklerostin (Leibbrandt A. et al., 2008).

1.5 Kardiovaskulární onemocnění a syndrom diabetické nohy

Předchozí studie prokázaly, že mortalita pacientů s diabetem a defekty na nohou je 2x vyšší než u diabetiků bez ulcerací (Pinto A. et al., 2008, Iversen M.M. et al., 2009). Celková mortalita pacientů se SDN v průběhu 5 let je 50 % (Hinchliffe R.J. et al., 2012). Přítomnost SDN je spojena rovněž s vyšší kardiovaskulární morbiditou a mortalitou (Ghanassia E. et al., 2008). Dle metaanalýzy kardiovaskulární (KV) a celkové mortality u pacientů se SDN (Brownrigg J.R. et al., 2012) byla anamnéza diabetických ulcerací spojena se zvýšeným rizikem celkové mortality (RR 1,89, 95 % CI 1,60-2,23), se zvýšeným rizikem fatálního infarktu myokardu (RR 2,22, 95 % CI 1,09-4,53) a fatální cévní mozkové příhody (RR 1,41, 95 % CI 0,61-3,24).

Amputace dolní končetiny u pacientů se SDN je také spojena s vysokou mortalitou (Young M.J. et al., 2008), nejčastěji na kardiovaskulární onemocnění; prognóza pacientů po vysoké amputaci v důsledku SDN je srovnatelná s pacienty s maligním onemocněním (Hoffmann M. et al., 2015).

Z těchto výsledků vyplývá spojitost KV onemocnění a jejich rizikových faktorů se SDN. Young prokázal zlepšené 5leté přežívání pacientů s diabetickou ulcerací po zavedení agresivní léčby KV rizikových faktorů (Young M.J. et al., 2008). V této studii poklesla 5letá mortalita z 48 % na 26,8 % ($p < 0,001$) po zavedení protokolu, který zahrnoval screening KV rizikových faktorů a úpravu pomocí antiagregancií, statinů a inhibitorů angiotenzin-konvertujícího enzymu \pm β -blokátorů u pacientů s hypertenzí. Zlepšené přežívání bylo pozorováno jak u pacientů s neuroischemickými, tak neuropatickými ulceracemi.

Předmětem našeho výzkumu bylo proto posouzení asociace vysokých amputací a KV onemocnění u pacientů hospitalizovaných pro SDN.

2 Cíle dizertační práce

Problematika kritické končetinové ischemie a buněčné léčby u pacientů se syndromem diabetické nohy a patogenetické aspekty Charcotovy osteoartropatie byly rozděleny do tří okruhů výzkumu:

1) Terapeutická vaskulogeneze pomocí autologních buněk

Problematiku **terapeutické vaskulogeneze při buněčné léčbě syndromu diabetické nohy** jsme zkoumali ve 3 studiích.

Cílem jednotlivých studií bylo:

- posoudit možnosti hodnocení efektu buněčné terapie na tkáňovou ischemii a mikrocirkulaci pomocí nových diagnostických metod – MR spektroskopie (**studie 1**) a perfuzní scintigrafie lýtkových svalů (**studie 2**) v porovnání se standardním měřením transkutánní tenze kyslíku
- posoudit význam změn sérových hladin antiangiogenního faktoru endostatinu pro hodnocení efektu revaskularizace po buněčné léčbě (**studie 3**)

2) Kostní nemoc u Charcotovy osteoartropatie

Patogenetické aspekty kostní nemoci u pacientů s Charcotovou osteoartropatií jsme analyzovali v jedné studii.

Cílem studie bylo:

- posoudit senzitivitu a specifitu kvantitativní ultrasonometrie patní kosti v časně diagnostice Charcotovy osteoartropatie ve srovnání se standardní denzitometrií páteře a kyčle (**studie 4**)

3) Kardiovaskulární onemocnění u syndromu diabetické nohy

Vztah mezi výskytem **kardiovaskulárních onemocnění a jejich rizikových faktorů a amputacemi** u pacientů se syndromem diabetické nohy jsme posuzovali v jedné studii.

Cílem studie bylo:

- posoudit asociaci kardiovaskulárních onemocnění a jejich rizikových faktorů s vysokými amputacemi u pacientů hospitalizovaných pro syndrom diabetické nohy v dlouhodobém sledování (**studie 5**)

3 Vybrané metodiky jednotlivých studií

3.1 Izolace autologních buněk z kostní dřene

Odběr autologních buněk k buněčné léčbě ischemie u syndromu diabetické nohy byl prováděn dvěma metodami.

3.1.1 Izolace autologních buněk z kostní dřene pomocí systému Harvest Technologies Corporation

Kostní dřev byla odebrána na operačním sále nejčastěji v epidurální nebo celkové anestezii trepanobiopsií z obou stran lopaty kosti kyčelní standardní Jamshidiho technikou. Celkový objem 250 ml odebrané kostní dřene byl v infuzním vaku promíchán s antikoagulačním činidlem (ACD-A, heparin) a přes infuzní set s filtrem aspirován do 4 stříkaček. Z nich byla kostní dřev aplikována do separačních nádobek centrifugačního zařízení Smart PReP2 (Harvest Technologies Corporation, Plymouth, MA, USA) a během 14minutové gradientní denzitní centrifugace byla kostní dřev separována. Po této centrifugaci byla ze separačních nádobek aspirována plazma a následně odebrán finální koncentrát kostní dřene o celkovém objemu cca 40 ml.

3.1.2 Izolace autologních buněk z kostní dřene sedimentací s Gelofusinem

Kostní dřev byla odebrána stejným způsobem jako u předchozí metody. Celkový objem odebrané kostní dřene 350-400 ml byl spolu s přidáním antikoagulačním činidlem za sterilních podmínek zpracován v laminárním boxu. Ke kostní dřeni byla přidána sukcinylovaná želatina (Gelofusin; B. Braun, Melsungen, Německo), která urychluje sedimentaci erytrocytů, přičemž jaderné buňky zůstávají v supernatantu. Sedimentace trvá 40-60 minut, dokud se nevytvoří rozhraní mezi erytrocyty a plazmou. Následně byla plazma s leukocyty přenesena do transferového vaku o objemu 600 ml a 15 minut centrifugována rychlostí 1600 otáček za minutu. Po centrifugaci byla část plazmy pomocí plazma-extraktoru přenesena zpět k erytrocytům a sedimentované buňky v celkovém objemu 40-90 ml byly připraveny k aplikaci.

3.2 Aplikace suspenze autologních buněk

Celkový objem 40-90 ml buněčné suspenze získaný některou z výše uvedených metod byl na operačním sále po dezinfekci končetiny aplikován intramuskulárně do svalů lýtky a nohy v průběhu bérkových tepen a do okolí defektu postižené končetiny. Pomocí 2 ml injekčních stříkaček bylo provedeno celkem 40-50 vpichů o objemu 1-2 ml buněčné suspenze. Po aplikaci byla končetina šetrně omyta fyziologickým roztokem a zabandážována; pacient byl následně na lůžkovém oddělení sledován většinou 3-7 dní po výkonu dle klinického stavu.

3.3 Měření TcPO₂ – standardní metoda pro hodnocení efektu buněčné léčby

Měření TcPO₂ bylo provedeno standardizovanou metodou pomocí přístroje TCM400 (Radiometer Medical ApS, Aarhus, Dánsko) před revaskularizací a následně ve stanovených intervalech po revaskularizaci. Při měření TcPO₂ byla jedna elektroda po řádném odmaštění kůže standardně umístěna na referenční místo pod klíček, další jedna či více elektrod byly přiloženy na požadovaná místa měření na dolních končetinách. Elektrody byly upevněny do fixačního kroužku s kontaktním roztokem.

Přístroj se před použitím automaticky kalibroval na aktuální barometrický tlak. Měření se provádělo vleže. Elektroda byla přiložena na dorzum nohy, nejčastěji mezi prvním a druhým metatarzem, případně do okolí defektu, referenční elektroda byla umístěna cca 5 cm pod levým klíčkem v medioklavikulární čáře. Měření TcPO₂ bylo hodnoceno po 15-20 minutách ustáleného stavu po kalibraci.

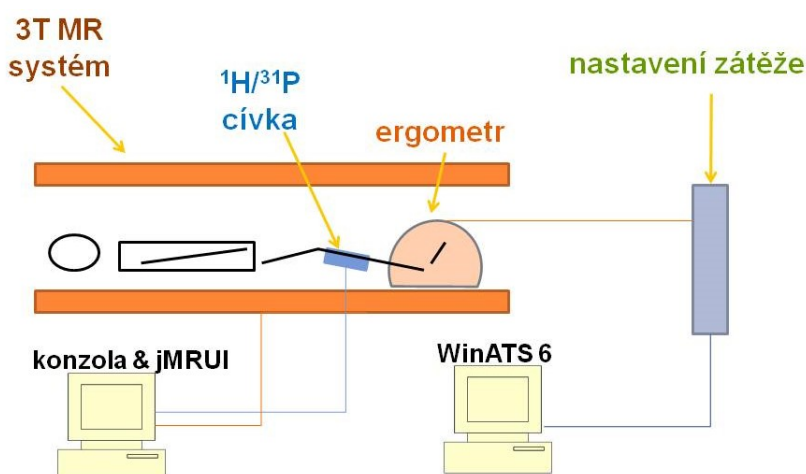
3.4 MR spektroskopie lýtkových svalů při hodnocení efektu buněčné léčby (studie 1)

MR spektroskopie (MRS) lýtkových svalů byla provedena 1 den před revaskularizací (pomocí autologní buněčné léčby i standardních metod) a následně 3 měsíce po výkonu za použití celotělového 3T MR systému (TRIO, Siemens, Erlangen, Německo) vybaveného pedálním ergometrem, s ¹H/³¹P cívkou (Rapid Biomedical, Německo). Pacienti byli vyšetřeni v poloze na zádech s cívkou fixovanou pod musculus gastrocnemius (Obrázek 4). MRS vyšetření bylo rozděleno na fázi klidovou (2 minuty), fázi zátěžovou (6 minut) a tzv. recovery fázi (6 minut). Během zátěžové fáze vyšetřovaný subjekt prováděl plantární flexi 1x za 2 s se standardizovanou zátěží 7,3 kg. Celková doba vyšetření byla zhruba 30 minut.

Analýza ³¹P spekter: ³¹P MR spektra byla měřena pomocí nelokalizované sekvence FID (free induction decay). Lokalizace byla realizována pouze umístěním vysokofrekvenční cívkou. MRS vyšetření umožňuje snímat spektra v průběhu fyzické zátěže i průběh zotavování po skončení cvičení (recovery fáze). Vykonaná práce byla zaznamenávána pomocí počítače připojeného na ergometr a vyhodnocena pomocí softwaru (jMRUI, MATLAB program) (Sedivy P. et al., 2015). MRS parametry charakterizující metabolismus lýtkového svalu v klidu byly definovány jako poměry intenzity signálu PCr, Pi, PDE a ATP k celkové sumě intenzit signálu fosforových metabolitů ve ³¹P MR spektru. Dále byla stanovena hodnota pH na základě chemického posunu PCr a Pi. Zátěžové MRS parametry (pokles PCr, mitochondriální kapacita Q_{max}, recovery time PCr) a pH na konci zátěže byly vypočítány ze spekter změřených na konci zátěže a v recovery fázi.

MRS parametry lýtkových svalů byly porovnány s hodnotami TcPO₂ měřeními ve stejných časových intervalech.

Obrázek 4. Zařízení pro zátěžovou MR spektroskopii lýtkových svalů



3.5 Perfuzní scintigrafie lýtkových svalů při hodnocení efektu buněčné léčby (studie 2)

Perfuzní scintigrafie lýtkových svalů s radioizotopem $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI byla provedena před buněčnou léčbou a následně 3 měsíce po ní, a to jak v klidu, tak po zátěži. Radiofarmakum bylo aplikováno intravenózně. Po injekci komplexu $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI aktivity 4 MBq/kg byl v klidové fázi proveden časný celotělový scan rychlostí 10 cm/min. Poté bylo provedeno SPECT/CT lýtkových svalů a svalů nohy za použití gamma kamery Infinia Hawkeye 4 (GE Healthcare, Wisconsin, USA) vybavené nízkoenergetickým kolimátorem s vysokým rozlišením a 128x128 matrix. Snímky byly získány v zadopřední projekci. Gamma kamera byla připojena k počítači se softwarem Xeleris (Xeleris, GE Healthcare, USA).

Po skončení klidové fáze pacient prováděl plantární flexi a extenzi 60x či do vzniku subjektivních symptomů (únava, bolest). Na konci zátěže byl aplikován bolus 8 MBq/kg $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI a byl opět proveden celotělový scan a SPECT/CT svalů lýtka a nohy.

Klidové a zátěžové scintigrafické parametry byly hodnoceny v symetricky zvolené oblasti zájmu zahrnující svaly lýtka a nohy obou dolních končetin, tedy léčené i neléčené (kontrolní) končetiny. Scintigrafické parametry jako klidová četnost (rest count, RC) a četnost při zátěži (exercising count, EC) byly měřeny ve dvou oblastech; v celém lýtku a na chodidle v závislosti na pozadí celotělového scanu. Scintigrafické parametry (RC, EC) byly následně porovnány mezi léčenou a neléčenou končetinou k posouzení symetrie vychytávání $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI.

Ze scintigrafických parametrů byla vypočítána tzv. perfuzní rezerva (PR) na základě vztahu:

$$\text{PR} = (\text{EC} - \text{RC})/\text{RC} \times 100 [\%]$$

Dalším parametrem k posouzení změn ve svalu v klidu a po zátěži v porovnání těchto změn mezi léčenou (T) a neléčenou (C) končetinou byl poměr zátěž/klid (stress/rest ratio, $\text{SR}_{\text{TClimb}}$) před a po buněčné léčbě (ACT)

$$SR_{T_{Climb}} = \frac{T/C \text{ after ACT after stress} / T/C \text{ before ACT after stress}}{T/C \text{ after ACT at rest} / T/C \text{ before ACT at rest}}$$

$SR_{T_{Climb}} > 1$ značilo zlepšení zátěžového testu po ACT, $SR_{T_{Climb}} \leq 1$ znamenalo stav bez změny nebo zhoršení zátěžového testu po ACT.

Poměr posuzující změny po ACT v klidu a po zátěži pouze na léčené (T) končetině (stress/rest ratio, SR) byl vypočten dle vzorce

$$SR = \frac{T \text{ after ACT after stress} / T \text{ after ACT at rest}}{T \text{ before ACT after stress} / T \text{ before ACT at rest}}$$

$SR > 1$ značilo zlepšení zátěžového testu po ACT, $SR \leq 1$ znamenalo stav bez změny nebo zhoršení zátěžového testu po ACT.

Scintigrafické parametry byly rovněž porovnány s hodnotami TcPO₂ měřeními ve stejném období.

3.6 Stanovení sérových hladin angiogenních faktorů a CD34+ buněk

3.6.1 Stanovení sérových hladin angiogenních faktorů (studie 3)

Sérové hladiny proangiogenních a antiangiogenních faktorů byly stanoveny v pravidelných intervalech před revaskularizací a následně za 1, 3 a 6 měsíců po výkonu; změny v sérových hladinách angiogenních faktorů byly porovnány se změnami TcPO₂ ve stejném období.

Sérové vzorky na stanovení angiogenních faktorů byly skladovány při teplotě -80 °C, dokud nebyly analyzovány. Tyto vzorky byly zředěny v poměru 1:4; hladiny jednotlivých proangiogenních (VEGF, bFGF, Ang-1, PDGF-AA a PDGF-BB) a antiangiogenních (endostatin) faktorů byly stanoveny pomocí komerčního kitu (Fluorokine MAP Human Angiogenesis Custom Premix Kit A; R&D Systems, Minnessota, MN, USA) a metodou Luminex (Luminex Corporation, Austin, TX, USA). Minimální detekční hladina pro jednotlivé angiogenní faktory byla: pro VEGF 11,5 pg/ml, bFGF 11,8 pg/ml, Ang-1 185,2 pg/ml, PDGF-AA 10,2 pg/ml, PDGF-BB 28,4 pg/ml a pro endostatin 123,5 pg/l. Naředěné vzorky séra o objemu 50 µl byly promíchány s analyt-specifickými mikropartikulemi pokrytými protilátkami a inkubovány 3 h při pokojové teplotě za mírného, stálého promíchávání. K těmto vzorkům byla poté přidána detekční protilátka na stanovení jednotlivých analytů; vzorky byly inkubovány při pokojové teplotě další hodinu v horizontálním vortexu. Následně byl ke vzorkům přidán phycoerythrin-konjugovaný streptavidin (obsažený v komerčním kitu) a vzorek byl inkubován dalších 30 minut ve vortexu při pokojové teplotě. Ihned poté byly vzorky analyzovány metodou Luminex. Výsledky ze vzorků byly vypočítány na základě interpolace z příslušných standardních křivek.

3.6.2 Stanovení počtu CD34+ buněk

Stanovení počtu CD34+ buněk bylo provedeno za použití průtokového cytometru FC500 (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) metodou FACS (fluorescence-activated cell sorting). Počet CD34+ buněk v aplikované buněčné suspenzi byl vypočítán na základě detekované koncentrace CD34+ buněk a objemu aplikované buněčné suspenze.

3.7 Kvantitativní ultrasonometrie patní kosti v časně diagnostice Charcotovy osteoartropatie (studie 4)

Kvantitativní ultrasonometrie (QUS) patní kosti byla provedena za použití přístroje Achilles Lunar (Madison, WI, USA). Parametr tuhosti kosti byl vypočítán na základě vztahu: $\text{tuhost} = 0,67 \times \text{BUA} + 0,28 \times \text{SOS} - 420$. Výsledky tuhosti byly vyjádřeny pomocí T-skóre, které udává standardní odchylku výsledku vyšetření od průměrné tuhosti zdravých mladých jedinců stejného pohlaví. T-skóre dle QUS mezi $-0,5$ a $-1,8$ značilo osteopenii, T-skóre $\leq -1,8$ znamenalo osteoporózu. T-skóre získané měřením tuhosti patní kosti bylo porovnáno s BMD páteře a kyčle měřenými standardní denzitometrií (dual-energy X-ray absorptiometry, DEXA). Hodnoty BMD bederní páteře (obratel L2 – L4) a krčku femuru byly měřeny přístrojem DEXA (Lunar Prodigy, Madison, WI, USA). T-skóre dle DEXA $\leq -2,5$ značilo osteoporózu, T-skóre mezi -1 a $-2,5$ znamenalo osteopenii.

4 Přehled studií

4.1 Terapeutická vaskulogeneze pomocí autologních buněk

4.1.1 Studie 1: Význam MR spektroskopie lýtkových svalů pro hodnocení končetinové ischemie a efektu revaskularizace u syndromu diabetické nohy (Přílohy 1-3)

Standardní metodou pro hodnocení závažnosti ischemie a efektu revaskularizace u pacientů se syndromem diabetické nohy a kritickou končetinovou ischemií je měření TcPO₂, které odráží tkáňovou perfuzi a oxygenaci. Perspektivní metodou pro hodnocení efektu revaskularizace je ³¹P MR spektroskopie (MRS) lýtkových svalů, která poskytuje informaci o změnách energetického svalového metabolismu zahrnujícího mitochondriální oxidativní fosforylaci, anaerobní glykolýzu a kreatinkinázovou aktivitu.

Cílem naší studie bylo porovnat MRS parametry lýtkových svalů pacientů se SDN a CLI se zdravými kontrolami a posoudit přínos této metody při hodnocení efektu revaskularizace.

Hypotéza: MRS je vhodnou metodou pro posouzení mikrocirkulace a změn po revaskularizaci u pacientů se SDN a CLI.

Charakteristika souboru a schéma studie

Do studie bylo konsekutivně zařazeno 34 pacientů se SDN a CLI, z nichž 27 podstoupilo revaskularizační výkon na našem pracovišti (ACT bylo léčeno 15 pacientů, u 12 pacientů byla provedena PTA) v období od ledna 2013 do ledna 2017. Do kontrolní skupiny bylo zařazeno 19 zdravých dobrovolníků bez diabetu (průměrný věk 57,6 ± 9,9 let).

MRS lýtkových svalů byla provedena před revaskularizací a 3 měsíce po ní a analýza ³¹P MR spekter byla provedena jak v klidu, tak po zátěži (viz Vybrané metodiky). Hodnoty MRS parametrů byly porovnány se standardním měřením TcPO₂.

Výsledky studie

Efekt revaskularizace byl potvrzen signifikantním vzestupem hodnot TcPO₂ za 3 měsíce po revaskularizaci (z 26,4 ± 11,7 na 39,7 ± 17,7 mmHg, p < 0,005). Nepozorovali jsme však signifikantní korelaci mezi MRS parametry a hodnotami TcPO₂.

Pacienti se SDN a CLI měli v klidu před léčbou signifikantně nižší poměr PCr/Pi (p < 0,001) ve srovnání se zdravými dobrovolníky (Tabulka 2); tento výsledek ukazuje na významné poškození klidového metabolismu svalových buněk u pacientů se SDN a CLI. Dále jsme u těchto pacientů pozorovali signifikantně vyšší pH (p = 0,005) v porovnání se zdravými kontrolami.

Tabulka 2. Porovnání klidových parametrů MRS lýtkových svalů pacientů se SDN a CLI se zdravými dobrovolníky

Klidové MRS parametry	Pacienti se SDN a CLI (n = 34)	Zdravé kontroly (n = 19)	p
PCr/Pi	5,5 ± 2,1	8,4 ± 1,8	<0,001
PCr/celkový signál P metabolitů	0,44 ± 0,07	0,51 ± 0,020	<0,001
Pi/celkový signál P metabolitů	0,089 ± 0,033	0,062 ± 0,012	0,002
PDE/celkový signál P metabolitů	0,077 ± 0,022	0,067 ± 0,019	0,118
ATP/celkový signál P metabolitů	0,075 ± 0,020	0,089 ± 0,014	0,012
Klidové pH	7,079 ± 0,081	7,022 ± 0,026	0,005

Počet pacientů s hodnotitelným zátěžovým MRS vyšetřením byl redukován z důvodu obtíží při cvičení kvůli přítomnosti rozsáhlých defektů, nízkých amputací nebo rychlé únavě. U podskupiny pacientů, kteří byli schopni cvičit, jsme pozorovali signifikantně menší mitochondriální kapacitu a prodloužený návrat PCr k výchozím klidovým hodnotám ve srovnání se zdravými kontrolami (Tabulka 3).

Tabulka 3. Porovnání zátěžových parametrů MRS lýtkových svalů pacientů se SDN a CLI se zdravými dobrovolníky

Zátěžové MRS parametry	Pacienti se SDN a CLI (n = 15)	Zdravé kontroly (n = 19)	p
Pokles PCr (%)	37 ± 14	26 ± 13	0,021
Recovery time PCr (s)	170 ± 140	45 ± 18	<0,001
Q _{max} (mmol/s)	0,29 ± 0,14	0,60 ± 0,25	<0,001
pH na konci zátěže	6,85 ± 0,23	7,02 ± 0,06	0,003

Klidové MRS parametry se však u pacientů se SDN a CLI před a po revaskularizaci signifikantně nezměnily (Tabulka 4). V individuálních případech došlo po revaskularizaci ke zlepšení zátěžových MRS parametrů (Q_{max}, recovery time PCr).

Tabulka 4. Porovnání MRS parametrů pacientů se SDN a CLI před a po revaskularizaci

Klidové MRS parametry	Pacienti se SDN a CLI (n = 15)		p
	před revaskularizací	3 měsíce po revaskularizaci	
PCr/Pi	5,9 ± 2,6	5,7 ± 1,9	NS
PCr/celkový signál P metabolitů	0,44 ± 0,09	0,44 ± 0,07	NS
Pi/celkový signál P metabolitů	0,089 ± 0,04	0,084 ± 0,028	NS
PDE/celkový signál P metabolitů	0,077 ± 0,025	0,070 ± 0,024	NS
ATP/celkový signál P metabolitů	0,074 ± 0,023	0,078 ± 0,021	NS
Klidové pH	7,078 ± 0,023	7,060 ± 0,020	NS

Diskuze ke studii

Výsledky naší pilotní studie ukazují porušený energetický metabolismus lýtkových svalů u pacientů se SDN a CLI ve srovnání se zdravými kontrolami již v klidové fázi.

K porušenému svalovému metabolismu přispívá přítomnost diabetu, který vede ke snížené mitochondriální kapacitě, svalové atrofii, chronickému prozánětlivému stavu a vyššímu oxidačnímu stresu, dále chronická hypoperfuze dolních končetin, jejímž důsledkem je získaná myopatie charakterizovaná porušenou funkcí mitochondriálních enzymů a častějšími mutacemi mitochondriální DNA. Při hodnocení zátěžových MRS parametrů jsme u pacientů se SDN a CLI pozorovali prodloužený recovery time PCr a významně sníženou mitochondriální kapacitu ve srovnání se zdravými kontrolami. Produkce ATP v buňkách byla nedostatečná a návrat PCr k výchozímu stavu byl u pacientů se SDN a CLI prodloužen. Snížená mitochondriální kapacita je odrazem porušené funkce mitochondrií, resp. aktivity jejich enzymů a nedostatečného zásobení svalu kyslíkem, které se při zátěži ještě zdůrazní.

Efekt revaskularizace byl v naší studii potvrzen signifikantním zvýšením hodnot TcPO₂, se kterými však sledované MRS parametry nekorelovaly. Nepozorovali jsme signifikantní rozdíly klidových MRS parametrů před a po revaskularizaci, a to ani ve skupině léčené ACT, ani v PTA skupině; pouze v individuálních případech jsme zaznamenali zlepšení zátěžových MRS parametrů po revaskularizaci. Tyto výsledky svědčí pravděpodobně pro přetrvávající porušený svalový energetický metabolismus v důsledku přítomnosti myopatie u diabetiků, který poměrně časně po revaskularizaci nereflektuje aktuální změny mikro- a makrocirkulace. Limitací zátěžové studie je velký počet pacientů se SDN, kteří nemohli v důsledku ulcerace a CLI dosáhnout požadované zátěže.

Přínos MRS v hodnocení efektu revaskularizace je nutné ověřit v dlouhodobějších studiích.

4.1.2 Studie 2: Význam perfuzní scintigrafie lýtkových svalů pro hodnocení efektu buněčné terapie u pacientů s kritickou končetinovou ischemií (Přílohy 4, 5)

Přestože předchozí studie prokázaly pozitivní výsledky buněčné terapie v léčbě ischemie u syndromu diabetické nohy, pro hodnocení efektu ACT není k dispozici dostatek vhodných zobrazovacích metod.

Perfuzní scintigrafie s ^{99m}Tc -MIBI je dynamická metoda standardně využívaná v hodnocení perfuze myokardu; principem je vychytávání radiofarmaka v mitochondriích v závislosti na svalové perfuzi a metabolismu myokardu. Analogicky je možné posuzovat perfuzi lýtkových svalů, chybí však dostatek zkušeností s hodnocením v této oblasti.

Cílem naší studie bylo posoudit přínos perfuzní scintigrafie lýtkových svalů s ^{99m}Tc -MIBI pro hodnocení efektu buněčné terapie.

Hypotéza: Perfuzní scintigrafie lýtkových svalů s ^{99m}Tc -MIBI je vhodnou metodou pro posouzení efektu buněčné terapie na základě zlepšení perfuze a oxygenace na buněčné úrovni.

Charakteristika souboru a schéma studie

Klidová a zátěžová perfuzní scintigrafie lýtkových svalů s ^{99m}Tc -MIBI byla provedena před a 3 měsíce po ACT u 24 pacientů se SDN a no-option CLI (průměrný věk $66,3 \pm 11,1$ let, průměrné trvání diabetu $21,2 \pm 13,9$ let). Před aplikací autologních buněk (viz Vybrané metodiky) byli pacienti komplexně vyšetřeni na našem pracovišti.

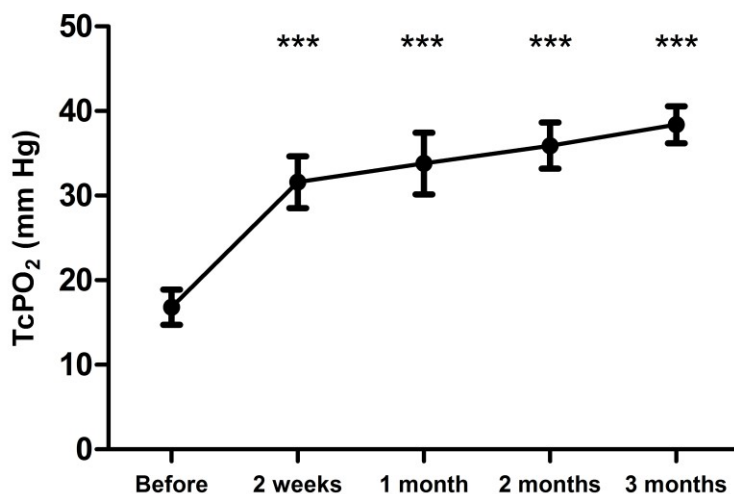
Scintigrafické parametry vyšetřených lýtkových svalů (RC, EC, PR, $\text{SR}_{\text{Tclimb}}$, SR, viz Vybrané metodiky) byly porovnány mezi léčenou a neléčenou (kontrolní) končetinou v klidu a po zátěži. Scintigrafické parametry byly rovněž korelovány s měřením TcPO_2 , standardní metodou pro hodnocení klinického efektu buněčné terapie.

Výsledky studie

Klinický efekt buněčné terapie byl potvrzen signifikantním vzestupem hodnot TcPO_2 z výchozích $16,8 \pm 10,6$ na $38,4 \pm 11,1$ mmHg ($p < 0,001$) 3 měsíce po buněčné léčbě (Obrázek 5).

RC a EC se signifikantně nelišily mezi léčenou a kontrolní končetinou před a za 3 měsíce po buněčné léčbě (Tabulka 5). Nepozorovali jsme žádné signifikantní změny mezi léčenou a kontrolní končetinou před a po léčbě; nebyla pozorována asymetrie v perfuzi dolních končetin. Průměrná perfuzní rezerva (PR) léčené končetiny se významně nelišila před a po léčbě ($268,4 \pm 77,8$ a $258,6 \pm 77,9$ %, NS), rovněž PR na neléčené končetině byla bez změny. Průměrná hodnota $\text{SR}_{\text{Tclimb}}$ byla $1,49 \pm 1,79$; 12 pacientů se zlepšilo, 12 zůstalo bez změny či se zhoršilo. Průměrná hodnota SR byla $1,07 \pm 0,48$; opět u 12 pacientů došlo ke zlepšení, 12 se nezměnilo či zhoršilo. Nebyla pozorována ani korelace mezi scintigrafickými parametry a změnami hodnot TcPO_2 .

Obrázek 5. Změny hodnot TcPO₂ po buněčné léčbě; hodnoty signifikantně vzrostly ve všech sledovaných intervalech (***) $p < 0,001$)



Tabulka 5. Perfuzní scintigrafie lýtkových svalů: porovnání klidové (RC) a námahové (EC) četnosti mezi léčenou (T) a kontrolní (C) končetinou před a po buněčné léčbě

Limb	Mean RCs			Mean ECs		
	Before ACT	After ACT		Before ACT	After ACT	
Treated (T)	31680.9±10328.1	28567.9±6955.7	NS	112120.0±33026.3	104347.7±36939.9	NS
	PR before ACT (%)			PR after ACT (%)		NS
	268.4±77.8			258.6±77.9		
Control (C)	31009.4±9747.7	29370.7±9670.8	NS	110095.0±38490.9	109949.3±44929.1	NS
	PR before ACT (%)			PR after ACT (%)		NS
	257.3±81.6			275.1±84.3		
Difference between T and C	671.5	-802.8	NS	2025.0	-5601.6	NS

Data are expressed as mean ± SD. ACT, autologous cell therapy; PR, perfusion reserve; NS, non-significant.

Diskuze ke studii

Výsledky naší studie ukázaly významné zlepšení končetinové ischemie po ACT dle vzestupu hodnot TcPO₂. Nepozorovali jsme však signifikantní změny žádného ze sledovaných scintigrafických parametrů v klidu ani při zátěži; nepozorovali jsme ani korelaci mezi scintigrafickými parametry a hodnotami TcPO₂. Jedním z vysvětlení pro diskrepanci mezi scintigrafickými parametry a hodnotami TcPO₂ je pravděpodobně rozdíl v principu měření obou metod; TcPO₂ poskytuje informaci o mikrocirkulaci na základě lokální tkáňové perfuze a kožní oxygenace na rozdíl od perfuzní scintigrafie, která posuzuje svalovou metabolickou aktivitu na subcelulární úrovni. Podstatnou roli může hrát i odlišná vyšetřovaná oblast dolní končetiny – změny po ACT měřené pomocí TcPO₂ na dorzu nohy mohou být výraznější než změny v lýtkové oblasti vyšetřované scintigrafii, protože ischemické změny na dolních končetinách diabetiků jsou největší distálně.

Schopnost mitochondrií vychytávat ^{99m}Tc -MIBI je závislá na mnoha faktorech; endoteliální dysfunkce a abnormality metabolismu myocytů negativně ovlivňují schopnost mitochondrií akumulovat ^{99m}Tc -MIBI na základě změn jejich membránového potenciálu (Matsuo S. et al., 2013). Předchozí studie rovněž prokázaly přítomnost získané metabolické myopatie u pacientů s chronickou hypoperfuzí dolních končetin, která může přetrvávat i po úspěšné revaskularizaci (Brass E.P. et al., 2000, Makris K.I. et al., 2007, Pipinos, II et al., 2008). U pacientů s ICHDK se kromě sníženého krevního zásobení dolních končetin uplatňují i metabolické abnormality v utilizaci kyslíku v ischemickém svalu; byly prokázány mutace mitochondriální DNA, porucha jejich enzymů a v konečném důsledku poruchy oxidativního metabolismu (Pipinos, II et al., 2008). Dalšími faktory ovlivňujícími akumulaci ^{99m}Tc -MIBI v mitochondriích může být svalová atrofie v důsledku dlouhodobé inaktivity či přítomnost chronického zánětu, které jsou u pacientů se SDN a ICHDK velmi časté.

Výše uvedené výsledky neprokázaly přínos perfuzní scintigrafie lýtkových svalů v hodnocení efektu buněčné léčby CLI u pacientů se SDN na rozdíl od vyšetření myokardu.

4.1.3 Studie 3: Endostatin jako potenciální marker vaskulogeneze po buněčné terapii (Přílohy 6-8)

Proangiogenní a antiangiogenní faktory působí jako modulátory vaskulogeneze. Jejich účinek je pravděpodobně parakrinní, nicméně jejich sérové hladiny by mohly reflektovat vaskulogenezi. V našich předchozích studiích jsme pozorovali zvýšené hladiny antiangiogenního faktoru endostatínu po buněčné terapii u pacientů se SDN a CLI, zatímco hladiny proangiogenních faktorů zůstaly bez signifikantní změny (Dubsky M. et al., 2014).

Cílem naší studie bylo posoudit změny sérových hladin endostatínu u diabetiků s CLI po buněčné terapii a porovnat je s pacienty léčenými PTA. Dále jsme posuzovali asociaci endostatínu s počtem aplikovaných prekursorových CD34+ buněk. Změny sérových hladin endostatínu jako markeru vaskulogeneze jsme porovnali se změnami TcPO_2 .

Hypotéza: Antiangiogenní faktor endostatin je potenciálním markerem lokální vaskulogeneze po buněčné terapii.

Charakteristika souboru a schéma studie

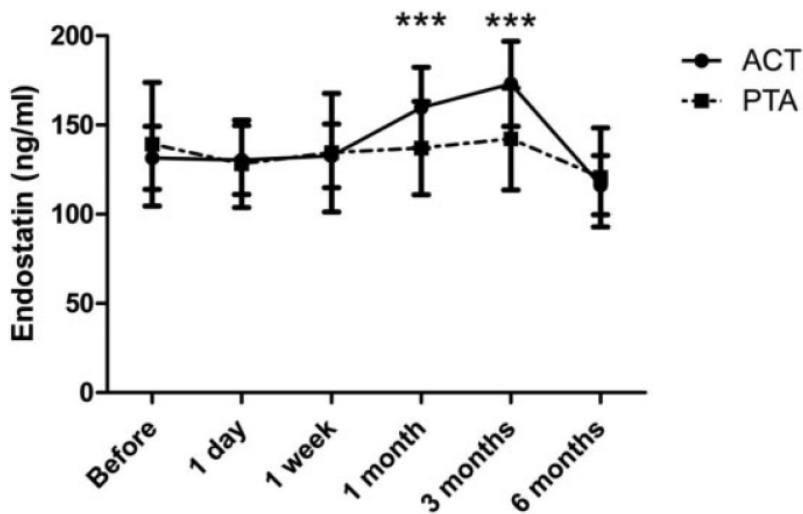
Do studie bylo zařazeno celkem 25 pacientů se SDN a no-option CLI (průměrný věk $65 \pm 8,8$ let, průměrné trvání diabetu $21,3 \pm 13,4$ let, vstupní hodnota TcPO_2 $18 \pm 10,4$ mmHg) konsekutivně léčených buněčnou terapií (viz Vybrané metodiky) na našem pracovišti v období 2008-2014. Do kontrolní skupiny bylo zařazeno 14 pacientů, kteří na našem pracovišti ve stejném intervalu podstoupili PTA (průměrný věk $63,7 \pm 7,5$ let, průměrné trvání diabetu 28 ± 12 let, vstupní hodnota TcPO_2 $27,5 \pm 15,2$ mmHg).

Sérové hladiny endostatínu byly stanoveny před a následně 1, 3 a 6 měsíců po revaskularizaci jak autologní buněčnou terapií (ACT), tak PTA, a byly porovnány s hodnotami TcPO_2 ve stejných intervalech. Hladiny endostatínu byly stanoveny za použití komerčního kitu a metodou Luminex (viz Vybrané metodiky). Počet aplikovaných CD34+ prekursorových buněk byl stanoven pomocí průtokové cytometrie (viz Vybrané metodiky).

Výsledky studie

Pacienti v obou skupinách se významně nelišili ve vstupních hodnotách endostatínu. Zatímco u pacientů po ACT došlo k významnému vzestupu endostatínu za 1 a 3 měsíce po terapii (z $131,6 \pm 88,3$ na $159,7 \pm 113,1$ a $173,1 \pm 119,3$ ng/ml, obě $p < 0,001$), u pacientů po PTA jsme nepozorovali významné změny endostatínu ve sledovaných intervalech (Obrázek 6).

Obrázek 6. Srovnání sérových hladin endostatínu u pacientů po ACT a po PTA; hladiny endostatínu významně stouply za 1 a 3 měsíce po ACT ($*** p < 0,001$); u pacientů po PTA nedošlo k významné změně hladin endostatínu



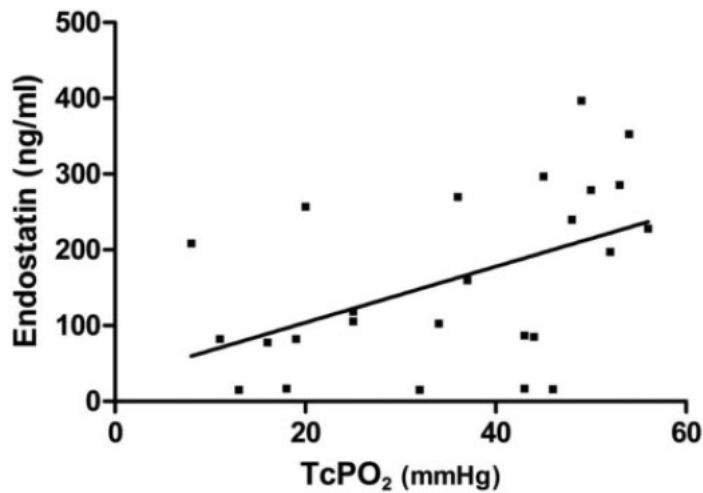
Klinický efekt revaskularizace byl potvrzen významným vzestupem TcPO₂ za 1, 3 a 6 měsíců jak po ACT (z $18 \pm 10,4$ na $35,1 \pm 14,9$, $38,4 \pm 11,2$ a $41,5 \pm 10,4$ mmHg, všechny změny $p < 0,001$), tak po PTA (z $27,5 \pm 15,2$ na $47 \pm 13,8$, $43,1 \pm 20,6$ a $48,4 \pm 18,8$ mmHg, všechny změny $p < 0,01$).

Zatímco u pacientů po ACT jsme pozorovali významnou korelaci mezi hladinou endostatínu a hodnotou TcPO₂ 1 měsíc po buněčné léčbě ($r = 0,557$, $p < 0,001$, Obrázek 7), u pacientů po PTA nebyla pozorována žádná obdobná korelace.

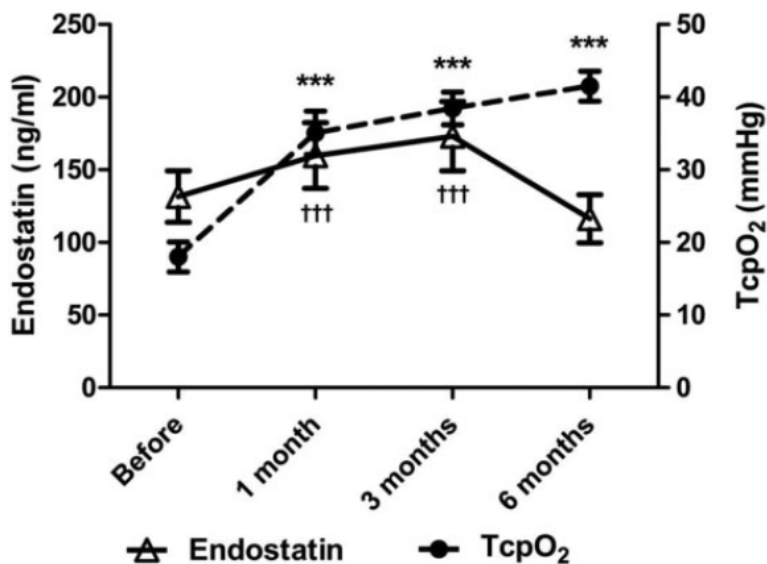
Vztah mezi změnami hladin endostatínu a hodnot TcPO₂ po buněčné léčbě ukazuje Obrázek 8.

Průměrné množství aplikovaných CD34+ prekurzorových buněk v buněčné suspenzi bylo $12,9 \pm 10,8 \times 10^6$; nepozorovali jsme významnou korelaci mezi počtem těchto buněk a hladinami endostatínu.

Obrázek 7. Korelace mezi sérovou hladinou endostatinu a TcPO₂ 1 měsíc po ACT ($r = 0,557$, $p < 0,001$)



Obrázek 8. Srovnání kinetiky sérových hladin endostatinu a TcPO₂ po buněčné léčbě; hodnoty TcPO₂ signifikantně stouply z výchozí hodnoty a zůstaly zvýšené i 6 měsíců po ACT (***) $p < 0,001$), zatímco hladiny endostatinu po přechodném vzestupu 1 a 3 měsíce po buněčné léčbě (††† $p < 0,001$) klesly po 6 měsících k výchozím hodnotám



Diskuze ke studii

Pozorovali jsme signifikantní vzestup sérových hladin endostatinu za 1 a 3 měsíce po buněčné léčbě na rozdíl od PTA, po níž se hladiny endostatinu signifikantně neměnily. Tyto výsledky podporují naši hypotézu, že vzestup hladin endostatinu může být kompenzační reakcí na ACT-indukovanou přechodnou vaskulogenezi, zatímco po PTA nedochází k formaci nových cév, tudíž ani ke vzestupu endostatinu.

Dosud známý mechanismus antiangiogenního působení endostatínu zahrnuje inhibici migrace a proliferace endotelových buněk a indukci jejich apoptózy. Endostatin rovněž blokuje matrix-metaloproteinázy, které usnadňují migraci a invazi endoteliálních buněk během vaskulogeneze proteolytickou degradací extracelulární matrix.

Klinický efekt obou revaskularizačních metod byl potvrzen signifikantním vzestupem TcPO₂ ve všech sledovaných intervalech. Korelace mezi hladinou endostatínu a hodnotou TcPO₂ byla pozorována pouze 1 měsíc po ACT, nejspíše v důsledku rozdílné kinetiky endostatínu a hodnot TcPO₂ – zatímco neovaskularizace pravděpodobně probíhá během 4-6 týdnů po ACT a endostatin proto stoupá pouze dočasně, vzestup TcPO₂ po zlepšení mikrocirkulace je dlouhodobý. Kinnaird (Kinnaird T. et al., 2004) uvádí, že proces remodelace kompletně průchodné kolaterály po buněčné léčbě vede k obnovení krevního průtoku během 4-6 týdnů, což je v souladu s našimi výsledky.

V naší studii jsme nepozorovali signifikantní korelaci endostatínu s množstvím aplikovaných CD34+ prekurzorových buněk ani korelaci CD34+ buněk se vzestupem TcPO₂. Předpokládaný klinický efekt ACT je zřejmě zprostředkovan interakcí autologních buněk v buněčné suspenzi a ovlivněn spíše viabilitou těchto buněk než jejich absolutním počtem. Podobně Kawamoto (Kawamoto A. et al., 2009) nepozoroval vztah mezi klinickým efektem buněčné terapie a množstvím aplikovaných CD34+ buněk.

Na základě výsledků naší studie předpokládáme, že endostatin je potenciálním markerem vaskulogeneze po buněčné léčbě u pacientů se SDN a CLI.

4.1.4 Studie 4: Význam kvantitativní ultrasonometrie patní kosti v diagnostice CHOAP u pacientů s diabetickou neuropatií (Přílohy 9, 10)

Denzitometrie páteře a kyčle patří mezi standardní metody pro posouzení BMD a diagnostiku osteoporózy. Předchozí studie prokázaly poruchy kostní remodelace a osteopenii i osteoporózu v oblasti patní kosti u pacientů s CHOAP (Jirkovska A. et al., 2001). Kvantitativní ultrasonometrie (QUS) patní kosti není standardně používána pro diagnostiku osteoporózy, ale je perspektivní metodou v časně diagnostice CHOAP. Na etiologii CHOAP se podílí především neuropatie, která postihuje distální části dolních končetin, kde jsou také nejvýraznější kostní změny na rozdíl od involuční nebo postmenopauzální osteoporózy. Proto se liší i diagnostické metody posuzující morfologii kostí u „klasické“ osteoporózy a CHOAP.

Cílem studie bylo posoudit senzitivitu a specifitu QUS patní kosti v časně diagnostice CHOAP ve srovnání se standardní denzitometrií páteře a kyčle.

Hypotéza: Kostní nemoc u pacientů s diabetem a neuropatií je prediktorem CHOAP a lze ji diagnostikovat pomocí QUS patní kosti lépe než standardní denzitometrií páteře a kyčle.

Charakteristika souboru a schéma studie

Do průřezové studie bylo konsekutivně zařazeno 64 pacientů s diabetickou neuropatií, kteří podstoupili QUS patní kosti a denzitometrii (DEXA) páteře a kyčle na našem pracovišti v průběhu roku 2013. Pacienti byli rozděleni do 2 skupin; 27 pacientů s diabetickou neuropatií bez přítomnosti CHOAP (průměrný věk 61,7 ± 11,2 let, průměrné trvání diabetu 22,5 ± 10,7 let) a 37 pacientů s neaktivní CHOAP (průměrný věk 50,8 ± 11,4 let, průměrné trvání diabetu

22,9 ± 10,9 let). Neaktivní fáze CHOAP byla definována anamnézou akutních atak CHOAP, rozdílem kožních teplot < 2 °C, ev. přítomností typických deformit nebo radiologických změn (známky hojení fraktur, kostní remodelace).

Kostní minerálová denzita (BMD) byla hodnocena pomocí DEXA bederní páteře a proximálního femuru a pomocí QUS patní kosti (viz Vybrané metodiky); výsledek byl vyjádřen pomocí T-skóre. T-skóre dle DEXA ≤ -2,5 značilo osteoporózu, T-skóre mezi -1 a -2,5 definovalo osteopenii; T-skóre dle QUS mezi -0,5 a -1,8 značilo osteopenii, T-skóre ≤ -1,8 definovalo osteoporózu.

Byla posuzována senzitivita a specifická osteologických vyšetření v různých lokalizacích (páteř, kyčel, pata) z hlediska průkazu osteoporózy a osteopenie u pacientů s CHOAP ve srovnání s pacienty s neuropatií bez CHOAP.

Výsledky studie

Nález jednotlivých osteologických vyšetření pacientů v obou skupinách shrnuje Tabulka 6. Žádný z pacientů s CHOAP neměl normální nález dle QUS patní kosti; více než polovina pacientů s CHOAP měla však normální nález dle DEXA páteře a kyčle. Pouze 14,8 % pacientů s neuropatií mělo normální nález dle QUS patní kosti.

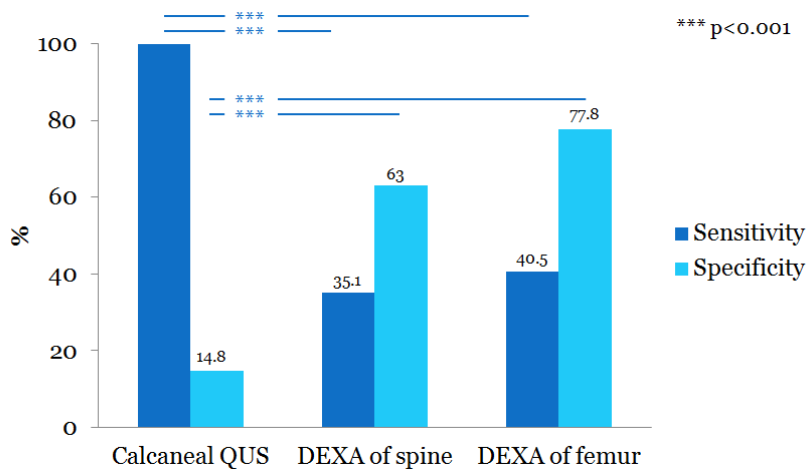
Tabulka 6. Přehled jednotlivých osteologických vyšetření u pacientů s CHOAP a u pacientů s diabetickou neuropatií (DN) bez CHOAP

	Pacienti s CHOAP n = 37			Pacienti s DN bez CHOAP n = 27		
	norma	osteopenie	osteoporóza	norma	osteopenie	osteoporóza
	%			%		
QUS patní kosti	0	18,9	81,1	14,8	29,6	55,6
DEXA páteře	64,9	24,3	10,8	63	33,3	3,7
DEXA kyčle	59,5	24,3	16,2	77,8	22,2	0

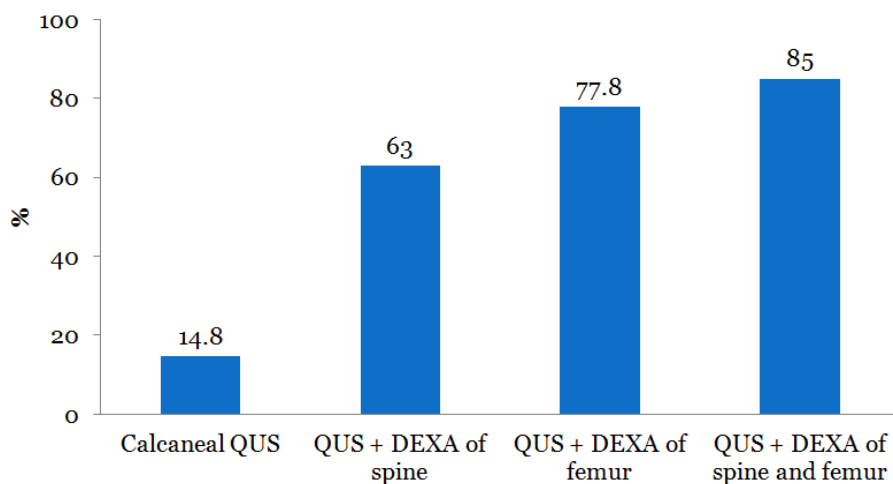
Senzitivita (= počet skutečně pozitivních s CHOAP) a specifická (= počet skutečně negativních bez CHOAP) osteologických vyšetření je znázorněna na Obrázku 9. Senzitivita QUS patní kosti (100 %) byla signifikantně vyšší ($p < 0,001$) než senzitivita DEXA páteře (35,1 %) a kyčle (40,5 %). Naopak specifická QUS patní kosti (14,8 %) byla signifikantně nižší ($p < 0,001$) než specifická DEXA páteře (63 %) a kyčle (77,8 %).

Ke zvýšení specificity vyšetření QUS patní kosti přispěla kombinace s vyšetřením DEXA páteře a kyčle; nejvyšší specificku vyšetření měla kombinace QUS s DEXA páteře i kyčle (85 %) (Obrázek 10).

Obrázek 9. Senzitivita a specifická osteologických vyšetření v diagnostice CHOAP na základě zjištění osteoporózy a osteopenie



Obrázek 10. Zvýšení specifickosti QUS patní kosti kombinací s vyšetřením DEXA páteře a kyčle v diagnostice CHOAP



Diskuze ke studii

Senzitivita QUS patní kosti v diagnostice CHOAP byla 100 %, tedy významně vyšší než senzitivita DEXA páteře a kyčle. Naopak specifická samotné QUS patní kosti byla 14,8 %, tedy významně nižší než specifická DEXA páteře a kyčle. Vysoká senzitivita QUS patní kosti ve srovnání s DEXA svědčí pro její přínos v časné neinvazivní diagnostice CHOAP. Nízká specifická tohoto vyšetření v diagnostice CHOAP byla významně zvýšena její kombinací s vyšetřením DEXA páteře a kyčle.

Osteopenie a osteoporóza patní kosti charakterizovaná nízkou hodnotou BMD v přítomnosti diabetické neuropatie může být časnou známkou rizika CHOAP. Proto časná detekce změn v patní kosti může napomoci ve stanovení rizika CHOAP a cílenou edukací tak zlepšit prognózu pacientů s touto devastující komplikací.

Z výsledků naší studie vyplývá, že pacienti s těžkým mnohočetným úbytkem kostní hmoty (pata, páteř, kyčel) jsou celkově ve vyšším riziku vzniku CHOAP.

4.1.5 Studie 5: Asociace vysokých amputací a mortality s kardiovaskulárními onemocněními a jejich rizikovými faktory u pacientů se syndromem diabetické nohy (Přílohy 11-15)

Předchozí studie posuzující rizikové faktory vysokých amputací u pacientů se SDN se obvykle zabývají zejména lokálními rizikovými faktory jako je hloubka a velikost defektu, přítomnost infekce, edému, případně ischemie končetin a neuropatie. Vztah vysokých amputací k přítomnosti kardiovaskulárních onemocnění a jejich rizikových faktorů se posuzuje zřídka.

Cílem naší studie bylo posoudit asociaci vysokých amputací a mortality u pacientů hospitalizovaných pro SDN s kardiovaskulárními onemocněními a jejich rizikovými faktory v dlouhodobém sledování.

Hypotéza: Existuje vazba mezi výskytem kardiovaskulárních onemocnění a jejich rizikových faktorů a amputacemi u pacientů se SDN.

Charakteristika souboru a schéma studie

Celkem 270 pacientů hospitalizovaných pro SDN na našem pracovišti od ledna 2009 do prosince 2012 bylo konsektivně zařazeno do observační studie. Důvodem hospitalizace bylo významné zhoršení lokálního nálezu, přítomnost závažné infekce nebo ischemie či endovaskulární nebo chirurgické výkony na nohou. Diabetické ulcerace byly hodnoceny pomocí Wagnerovy klasifikace (Sun J.H. et al., 2012). Indikací pro vysokou amputaci byla přítomnost závažné infekce a CLI.

Kardiovaskulární (KV) rizikové faktory zahrnovaly dyslipidémii (celkový cholesterol > 4,5 mmol/l), vysoký krevní tlak (TK > 140/90 mmHg), obezitu (BMI > 30 kg/m²), neuspokojivou kompenzaci diabetu (HbA_{1c} > 60 mmol/mol), diabetické onemocnění ledvin (diabetic kidney disease – DKD) stadium ≥ 3 (definované glomerulární filtrací 30–59 ml/min/1,73 m² nebo nižší), (Bauer C. et al., 2008)) a aktivní kouření.

Mezi KV onemocnění byly zařazeny chronická ischemická choroba srdeční (ICHS), anamnéza infarktu myokardu (IM), ICHDK, cévní mozková příhoda (CMP) a hypertenze.

Chronická ICHS bez anamnézy IM byla definována na základě elektrokardiografických nebo echokardiografických abnormalit, dokumentované anginy pectoris, případně dle předchozích revaskularizací myokardu. ICHDK byla diagnostikována na základě nehmatných pulzací, ABI ≤ 0,9 a/nebo přítomnosti stenóz či okluzí tepen objektivně prokázaných na angiogramu, případně dle anamnézy předchozích revaskularizačních výkonů na tepnách dolních končetin. CMP (transientní ischemická ataka nebo ischemická CMP) byla definována na základě vyšetření neurologem, přítomnosti změn na CT nebo MR, případně dle neurologické anamnézy.

Pacienti byli po propuštění pravidelně sledováni na naší podiatrické ambulanci do prosince 2013 či do úmrtí pacienta; průměrná doba sledování byla 32 ± 14,5 měsíce, minimálně 1 rok.

Výsledky studie

Vstupní charakteristiky všech hospitalizovaných pacientů se SDN jsou shrnuty v Tabulce 7. Prevalenci KV rizikových faktorů u hospitalizovaných pacientů rozdělených do 3 skupin (pacienti po vysoké amputaci, zemřelí pacienti a pacienti přeživší bez amputace) ukazuje Tabulka 8.

Tabulka 7. Vstupní charakteristiky pacientů hospitalizovaných se SDN ($n = 270$)

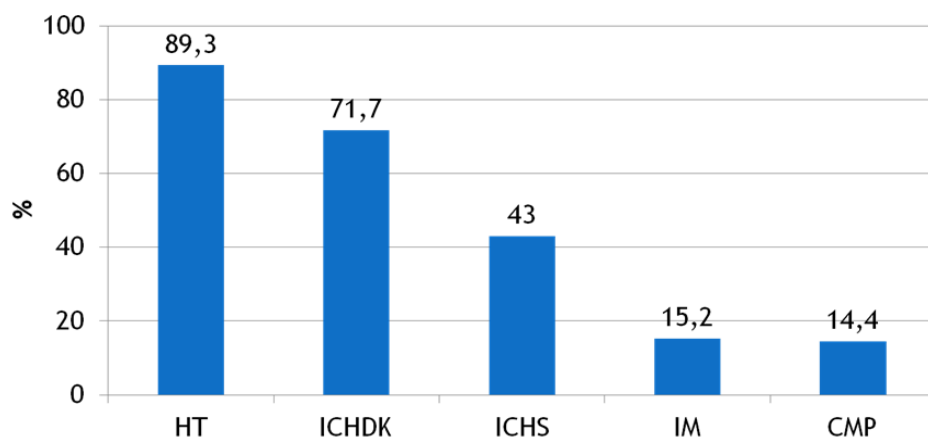
Věk (roky)	62 ± 11,1
Pohlaví (% mužů)	78,5
Typ diabetu 2. typu (%)	79,6
Doba trvání diabetu (roky)	20,7 ± 11,7
BMI (kg/m^2)	28,9 ± 5,2
HbA _{1c} (mmol/mol)	63,8 ± 19,7
Celkový cholesterol (mmol/l)	4,16 ± 0,97
LDL cholesterol (mmol/l)	2,46 ± 0,76
TK > 140/90 mmHg (%)	51,5
DKD stadium ≥ 3 (%)	46
Wagner stadium ≥ 3 (%)	70,3

Tabulka 8. Charakteristika pacientů ve 3 skupinách (po vysoké amputaci, zemřelí a přeživší bez amputace) a prevalence KV rizikových faktorů v jednotlivých skupinách

Parametr	Pacienti po vysoké amputaci n = 35	Zemřelí pacienti n = 28	Přeživší pacienti bez amputace n = 207	p
Věk (roky)	61,3 ± 10,8	68,5 ± 8,4	61,3 ± 11,2	0,0047
Pohlaví (muži)	26 (67,9%)	19 (78,5%)	167 (80,7%)	NS
Typ diabetu (DM 2. typu)	26 (74,3%)	22 (78,6%)	167 (80,7%)	NS
Trvání diabetu (roky)	24,1 ± 15,9	23,5 ± 15,9	19,8 ± 10,7	NS
Ulcerace (stupeň dle Wagnera)	3,4 ± 0,7	3,1 ± 0,8	2,8 ± 0,7	0,0001
Aktivní kouření	20 (57,1%)	14 (50%)	109 (52,7%)	NS
HbA _{1c} > 60 mmol/mol	15 (42,8%)	12 (42,8%)	106 (53,3%)	NS
Celkový cholesterol > 4,5 mmol/l	12 (38,7%)	5 (18,5%)	70 (37,4%)	NS
LDL > 2,5 mmol/l	14 (46,7%)	6 (23,1%)	82 (45,3%)	NS
Triglyceridy > 1,7 mmol/l	11 (35,5%)	8 (29,6%)	73 (39,2%)	NS
HDL < 1 mmol/l	22 (71%)	18 (66,7%)	117 (63,2%)	NS
BMI > 30 kg/m ²	9 (30%)	10 (43,5%)	84 (41,6%)	NS
Systolický TK > 140 mmHg	14 (40%)	8 (28,6%)	84 (41,2%)	NS
Diastolický TK > 90 mmHg	4 (11,4%)	1 (3,6%)	25 (12,3%)	NS
DKD stadium ≥ 3	14 (46,7%)	18 (75%)	78 (42,2%)	0,0099

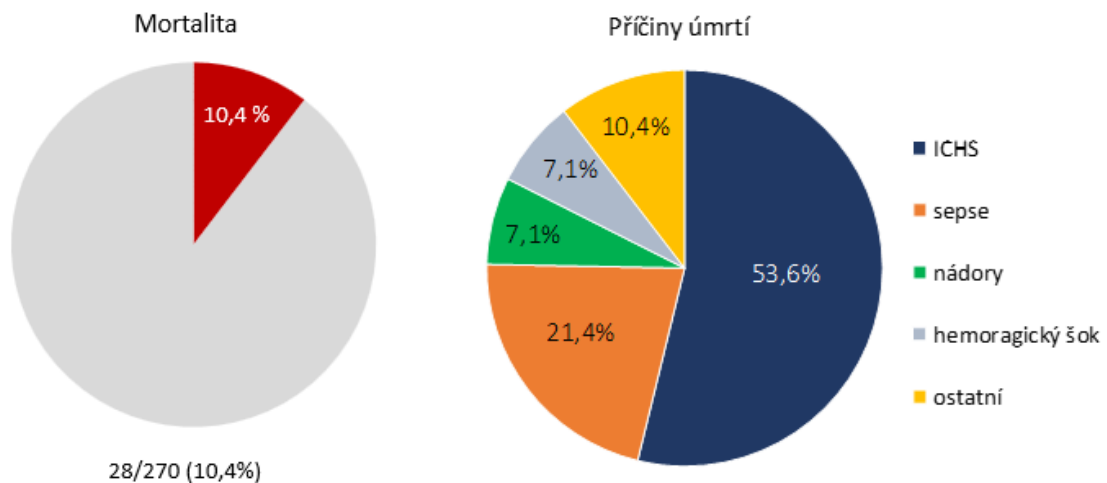
Obrázek 11 znázorňuje vysokou prevalenci jednotlivých KV onemocnění u pacientů hospitalizovaných se SDN.

Obrázek 11. Prevalence kardiovaskulárních onemocnění u pacientů hospitalizovaných pro SDN (n = 270)



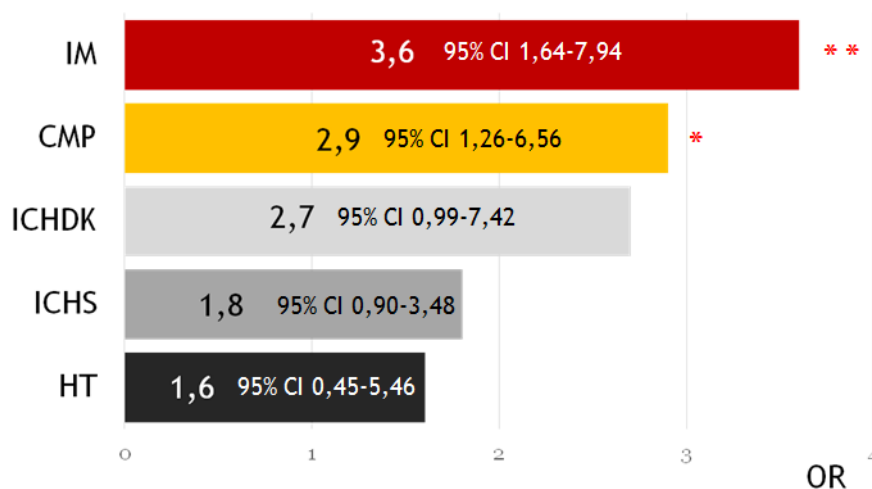
Incidence následných vysokých amputací ve sledovaném období byla 40/270 (14,8 %); v průběhu sledování zemřelo 28 pacientů z 270 (10,4 %). Příčinou úmrtí byly nejčastěji kardiovaskulární onemocnění (53,6 %), dále sepse (21,4 %), nádorová onemocnění (7,1 %), hemoragický šok (7,1 %) a nezjištěné příčiny (10,7 %), Obrázek 12.

Obrázek 12. Mortalita hospitalizovaných pacientů se SDN v průběhu sledování a příčiny úmrtí



V postupné logistické regresi zvyšovala riziko následné vysoké amputace během doby sledování anamnéza IM (OR 3,6, 95 % CI 1,64-7,94) a CMP (OR 2,9, 95 % CI 1,26-6,56), Obrázek 13. Kombinace anamnézy jak IM, tak CMP byla spojena s 10x vyšším rizikem vysoké amputace.

Obrázek 13. Asociace KV onemocnění s rizikem vysoké amputace (OR – odds ratio, CI – confidence interval, ** $p = 0,0016$, * $p = 0,013$)



Asociace ostatních KV onemocnění (ICHHS, ICHDK, hypertenze) s vysokými amputacemi ve sledovaném období nebyla statisticky významná. Prediktorem mortality v postupné logistické regresi byla anamnéza chronické ICHHS (OR 2,6, 95 % CI 1,17-5,99); asociace s ostatními KV onemocněními nebyla statisticky významná.

Sledované KV rizikové faktory nebyly signifikantně asociovány s vysokými amputacemi a mortalitou u pacientů hospitalizovaných pro SDN s výjimkou těžké renální insuficience. Pacienti se SDN a DKD stadia ≥ 3 měli signifikantně vyšší mortalitu než pacienti s DKD stadia 1-2 (16 % vs 4,7 %, $p = 0,0027$). Nebyl pozorován signifikantní rozdíl ve výskytu KV rizikových faktorů u pacientů rozdělených do 3 skupin (po amputaci, zemřelí a přeživší bez amputace).

Diskuze ke studii

Naše studie prokázala vyšší riziko vysokých amputací u pacientů se SDN a anamnézou infarktu myokardu a cévní mozkové příhody; u pacientů s oběma těmito komorbiditami bylo riziko vysokých amputací desetkrát vyšší než u pacientů bez této anamnézy. Anamnéza IM nebo CMP nepatří k „typickým“ rizikovým faktorům vysoké amputace jako je např. hloubka ulcerace, infekce či ischemie. Dle výsledků naší studie však byla tato anamnéza spojena s mnohonásobně zvýšeným rizikem vysoké amputace. Pacienti po IM či CMP mohou být ve vyšším riziku amputace také z dalších důvodů – snížené mobility, horší compliance s odlehčením, neuspokojivé sociální situace či deprese. Proto je nutné těmto pacientům věnovat zvláštní pozornost.

Na rozdíl od jiných studií (Martins-Mendes D. et al., 2014, Pemayun T.G. et al., 2015) jsme nepozorovali signifikantní asociaci ICHDK a hypertenze s vysokými amputacemi. Možným vysvětlením tohoto zjištění je vysoká prevalence těchto komorbidit u všech pacientů hospitalizovaných pro SDN. Rovněž jsme nepozorovali signifikantní vztah mezi výskytem KV rizikových faktorů a vysokými amputacemi během sledovaného období; důvodem je pravděpodobně vysoká prevalence aterosklerózy u hospitalizovaných pacientů, která progreduje s délkou trvání diabetu, a je přítomna u většiny pacientů se SDN.

Přítomnost DKD stadia ≥ 3 byla signifikantně asociována s mortalitou, což je v souladu s předchozími studiemi; pokročilá stadia chronického postižení ledvin v důsledku diabetu jsou významným prediktorem KV i celkové mortality (Herzog C.A. et al., 2011). Proto je včasná terapie DKD také podmínkou přežití pacientů se SDN a může ovlivnit dnes nejčastěji používaný parametr efektivity léčby SDN – tzv. amputation-free survival, tedy přežívání pacientů bez amputace za určité období.

Chronická ICHHS byla dle našich výsledků rovněž asociována s vyšší mortalitou pacientů se SDN, zatímco ostatní KV onemocnění (hypertenze, CMP, IM, ICHDK) nebyla se zvýšenou mortalitou asociována. Z tohoto zjištění vyplývá nutnost časně diagnostiky KV abnormalit a léčba zejména chronické ICHHS u pacientů se SDN s cílem snížit riziko KV mortality.

Prevalence KV rizikových faktorů u všech pacientů hospitalizovaných se SDN byla vysoká, pravděpodobně proto jsme v naší studii nepozorovali signifikantní asociaci KV rizikových faktorů s vysokými amputacemi a mortalitou (s výjimkou signifikantní asociace DKD ≥ 3 s mortalitou).

Posouzení přítomnosti KV onemocnění a jejich rizikových faktorů u pacientů s rizikem SDN již v časných stádiích jsou klíčové pro zlepšení přežívání těchto pacientů a prevenci vysokých amputací.

5 Závěry a shrnutí dizertační práce

1) Terapeutická vaskulogeneze pomocí autologních buněk

Ve studiích zabývajících se problematikou terapeutické vaskulogeneze po buněčné léčbě (ACT), především hodnocením efektu této terapie pomocí biochemických vyšetření a zobrazovacích metod, byl nejzajímavějším nálezem signifikantní přechodný vzestup hladin antiangiogenního faktoru endostatinu po buněčné léčbě na rozdíl od standardní perkutánní transluminální angioplastiky, po níž nedošlo ke změně endostatinu v žádném ze sledovaných intervalů. Tento nálezní svědčí o potenciálním přínosu endostatinu jako markeru lokální vaskulogeneze, pravděpodobně na základě zpětnovazebné regulace.

Při hodnocení efektu revaskularizace pomocí MR spektroskopie (MRS) lýtkových svalů jsme prokázali porušený energetický metabolismus lýtkových svalů u pacientů se SDN a CLI ve srovnání se zdravými kontrolami jak v klidu, tak po zátěži. Nepozorovali jsme však signifikantní rozdíly klidových MRS parametrů před a po revaskularizaci, a to ani ve skupině léčené ACT, ani ve skupině po PTA; pouze v individuálních případech jsme zaznamenali zlepšení zátěžových MRS parametrů po revaskularizaci. Přínos MRS v hodnocení efektu revaskularizace je nutné ověřit v dlouhodobějších studiích vzhledem k možnosti přetrvávání myopatických změn ovlivňujících svalový energetický metabolismus.

Přínos perfuzní scintigrafie lýtkových svalů s ^{99m}Tc -MIBI v hodnocení efektu buněčné terapie v porovnání se standardními metodami nebyl dle našich výsledků jednoznačně prokázán. Důvodem může být poměrně vysoká variabilita tohoto vyšetření a, podobně jako u předchozí metody, přetrvávající myopatické změny v důsledku ischemie i diabetu, které mohou ovlivňovat akumulaci ^{99m}Tc -MIBI i po úspěšné revaskularizaci.

2) Kostní nemoc u Charcotovy osteoartropatie

Při hodnocení přínosu kvantitativní ultrasonometrie (QUS) patní kosti v diagnostice Charcotovy osteoartropatie (CHOAP) jsme prokázali vysokou senzitivitu tohoto vyšetření v porovnání se standardní denzitometrií (DEXA) páteře a kyčle, což může přispět k časné neinvazivní diagnostice i ke stanovení rizika CHOAP. Stanovení rizika a časná diagnóza CHOAP jsou zásadní pro edukaci pacientů, zahájení adekvátní terapie a prevenci vzniku těžkých deformit či vysokých amputací. Nižší specifitu tohoto vyšetření lze zvýšit kombinací se standardní denzitometrií páteře a kyčle.

3) Kardiovaskulární onemocnění u syndromu diabetické nohy

Při zkoumání vztahu mezi výskytem kardiovaskulárních (KV) onemocnění a jejich rizikových faktorů s vysokými amputacemi jsme pozorovali vyšší riziko následných vysokých amputací u pacientů hospitalizovaných pro SDN, pokud měli anamnézu infarktu myokardu nebo cévní mozkové příhody; u pacientů s oběma těmito komorbiditami bylo riziko následných vysokých amputací desetkrát vyšší.

Protože byl výskyt KV rizikových faktorů u všech těchto pacientů vysoký, nepozorovali jsme jejich signifikantní asociaci s vysokými amputacemi a mortalitou. Agresivní ovlivnění

KV rizikových faktorů a léčba KV onemocnění je však zásadní pro zlepšení přežívání těchto pacientů.

6 Poděkování

Ráda bych vyjádřila poděkování kolegům z výzkumného týmu MUDr. Michalovi Dubskému, Ph.D., MUDr. Robertovi Bémovi, Ph.D., MUDr. Vladimíře Fejfarové, Ph.D. a MUDr. Veronice Woskové za velkou pomoc při výzkumné práci i náročné klinické péči o pacienty v jednotlivých studiích.

Poděkování patří také kolektivu podiatrických sester – Jitce Niklové, Haně Tibenské, Jitce Bielikové, Markétě Kopecké, Martě Křížové, Kamile Stachové a edukační sestře Kateřině Čechové za velkou pomoc při organizaci a realizaci výzkumných projektů.

Velké poděkování patří též pracovníkům z Oddělení výpočetní tomografie, magnetické rezonance a klinické a experimentální spektroskopie IKEM (Mgr. Petr Šedivý, Ph.D., Mgr. Miloslav Drobný, Ing. Milan Hájek, DrSc., Mgr. Monika Dezortová, Ph.D.), MUDr. Marii Buncové, CSc. z Oddělení nukleární medicíny IKEM a RNDr. Liborovi Kolesárovi, Ph.D. z Oddělení imunogenetiky IKEM, bez jejichž práce a cenných připomínek by žádná ze studií nemohla vzniknout.

Zvláštní poděkování patří mé školitelce prof. MUDr. Alexandře Jirkovské, CSc. za umožnění doktorandského studia a zajištění výborných podmínek pro vědeckou práci, za velkou podporu při realizaci uvedených studií a při publikaci všech uvedených prací.

Poděkování patří také celé mojí rodině za podporu a pochopení v mém postgraduálním studiu i klinické práci.

Studie byly podporovány následujícími granty: Grantovou agenturou Univerzity Karlovy v Praze, projekt č.16415, Ministerstvem zdravotnictví ČR s reg. č. 16-27262A a MZ ČR – RVO („Institut klinické a experimentální medicíny“ – IKEM, IČ00023001).

7 Seznam použitých zkratk

ABI – index kotník-paže (ankle-brachial index)
ACD-A – antikoagulační činidlo (anticoagulant citrate dextrose solution, solution A)
ACT – autologní buněčná léčba (autologous cell therapy)
Ang-1 – angiotensin-1
ATP – adenosintrifosfát
bFGF – bazický fibroblastový růstový faktor
BMD – kostní minerální denzita (bone mineral density)
BMI – body mass index
BMMNC – mononukleární buňky izolované z kostní dřene (bone marrow-derived mononuclear cells)
BUA – broadband ultrasound attenuation
CD34+ – povrchový znak (cluster of differentiation) 34+
CI – konfidenční interval (confidence interval)
CLI – kritická končetinová ischemie
CMP – cévní mozková příhoda
CRP – C-reaktivní protein
CT – počítačová tomografie
DEXA – dual-energy X-ray absorptiometry
DKD – diabetické onemocnění ledvin (diabetic kidney disease)
DSA – digitální subtrakční angiografie
DUS – duplexní sonografie
EPC – endotelové prekurzorové buňky
EC – námahová četnost (exercising count)
HbA_{1c} – glykovaný hemoglobin
HGF – hepatocytární růstový faktor
CHOAP – Charcotova osteoartropatie
ICHDK – ischemická choroba dolních končetin
ICHS – ischemická choroba srdeční
IL-1 β – interleukin 1 β
IM – infarkt myokardu
KV – kardiovaskulární
LDL – low density lipoprotein
MIBI – methoxy-isobutyl-isonitril
MR – magnetická rezonance
MRS – magnetická rezonanční spektroskopie
NF- κ β – nukleární faktor kappa β
OPG – osteoprotegerin
OR – odds ratio
PAI-1 – inhibitor aktivátoru plasminogenu
PCr – fosfokreatin
PDE – fosfodiester
PDGF-AA – destičkový růstový faktor AA
PDGF-BB – destičkový růstový faktor BB
PEDIS – klasifikace ulcerace (perfusion, extent, depth, infection, sensation)
Pi – anorganický fosfát

PR – perfuzní rezerva
PTA – perkutánní transluminální angioplastika
QUS – kvantitativní ultrasonometrie
RANK – receptorový aktivátor nukleárního faktoru kappu β
RANKL – ligand receptorového aktivátoru nukleárního faktoru kappu β
RC – klidová četnost (rest count)
RR – risk ratio
RTG – rentgenové vyšetření
SDN – syndrom diabetické nohy
SOS – speed of sound
SPECT – single photon emission computer tomography
SPP – kožní perfuzní tlak (skin perfusion pressure)
Tc – technecium
TcPO₂ – transkutánní tenze kyslíku
TK – krevní tlak
TNF α – tumor necrosis factor α
tPA – tkáňový aktivátor plasminogenu
UZ – ultrazvuk
VEGF – vaskulární endoteliální růstový faktor

8 Literatura

- Abbott, C. A., A. L. Carrington, H. Ashe, S. Bath, L. C. Every, J. Griffiths, A. W. Hann, A. Hussein, N. Jackson, K. E. Johnson, C. H. Ryder, R. Torkington, E. R. Van Ross, A. M. Whalley, P. Widdows, S. Williamson, A. J. Boulton and S. North-West Diabetes Foot Care. *The North-West Diabetes Foot Care Study: incidence of, and risk factors for, new diabetic foot ulceration in a community-based patient cohort*. Diabet Med 2002; 19(5):377-384.
- Aghi, M. and E. A. Chiocca. *Contribution of bone marrow-derived cells to blood vessels in ischemic tissues and tumors*. Mol Ther 2005; 12(6):994-1005.
- Ai, M., C. F. Yan, F. C. Xia, S. L. Zhou, J. He and C. P. Li. *Safety and efficacy of cell-based therapy on critical limb ischemia: A meta-analysis*. Cytotherapy 2016; 18(6):712-724.
- American Diabetes, A. *Peripheral arterial disease in people with diabetes*. Diabetes Care 2003; 26(12):3333-3341.
- Aranguren, X. L., C. M. Verfaillie and A. Luttun. *Emerging hurdles in stem cell therapy for peripheral vascular disease*. J Mol Med (Berl) 2009; 87(1):3-16.
- Armstrong, D. G., L. A. Lavery and L. B. Harkless. *Validation of a diabetic wound classification system. The contribution of depth, infection, and ischemia to risk of amputation*. Diabetes Care 1998; 21(5):855-859.
- Armstrong, D. G., W. F. Todd, L. A. Lavery, L. B. Harkless and T. R. Bushman. *The natural history of acute Charcot's arthropathy in a diabetic foot specialty clinic*. Diabet Med 1997; 14(5):357-363.
- Bartel, R. L., E. Booth, C. Cramer, K. Ledford, S. Watling and F. Zeigler. *From bench to bedside: review of gene and cell-based therapies and the slow advancement into phase 3 clinical trials, with a focus on Aastrom's Ixmyelocel-T*. Stem Cell Rev 2013; 9(3):373-383.
- Bauer, C., M. L. Melamed and T. H. Hostetter. *Staging of chronic kidney disease: time for a course correction*. J Am Soc Nephrol 2008; 19(5):844-846.
- Benitez, E., B. J. Sumpio, J. Chin and B. E. Sumpio. *Contemporary assessment of foot perfusion in patients with critical limb ischemia*. Semin Vasc Surg 2014; 27(1):3-15.
- Boulton, A. J., J. H. Scarpello and J. D. Ward. *Venous oxygenation in the diabetic neuropathic foot: evidence of arteriovenous shunting?* Diabetologia 1982; 22(1):6-8.
- Boulton, A. J., L. Vileikyte, G. Ragnarson-Tennvall and J. Apelqvist. *The global burden of diabetic foot disease*. Lancet 2005; 366(9498):1719-1724.
- Boyce, B. F. and L. Xing. *Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling*. Arch Biochem Biophys 2008; 473(2):139-146.
- Bradbury, A. W., D. J. Adam, J. Bell, J. F. Forbes, F. G. Fowkes, I. Gillespie, G. Raab and C. V. Ruckley. *Multicentre randomised controlled trial of the clinical and cost-effectiveness of a bypass-surgery-first versus a balloon-angioplasty-first revascularisation strategy for severe limb ischaemia due to infrainguinal disease. The Bypass versus Angioplasty in Severe Ischaemia of the Leg (BASIL) trial*. Health Technol Assess 2010; 14(14):1-210, iii-iv.
- Brass, E. P. and W. R. Hiatt. *Acquired skeletal muscle metabolic myopathy in atherosclerotic peripheral arterial disease*. Vasc Med 2000; 5(1):55-59.
- Brownrigg, J. R., J. Davey, P. J. Holt, W. A. Davis, M. M. Thompson, K. K. Ray and R. J. Hinchliffe. *The association of ulceration of the foot with cardiovascular and all-cause mortality in patients with diabetes: a meta-analysis*. Diabetologia 2012; 55(11):2906-2912.
- Brownrigg, J. R., N. C. Schaper and R. J. Hinchliffe. *Diagnosis and assessment of peripheral arterial disease in the diabetic foot*. Diabet Med 2015; 32(6):738-747.
- Bus, S. A., J. J. van Netten, L. A. Lavery, M. Monteiro-Soares, A. Rasmussen, Y. Jubiz, P. E. Price and F. International Working Group on the Diabetic. *IWGDF guidance on the*

prevention of foot ulcers in at-risk patients with diabetes. Diabetes Metab Res Rev 2016; 32 Suppl 1:16-24.

Buschmann, I. and W. Schaper. *Arteriogenesis Versus Angiogenesis: Two Mechanisms of Vessel Growth*. News Physiol Sci 1999; 14:121-125.

Caselli, A., V. Latini, A. Lapenna, S. Di Carlo, F. Pirozzi, A. Benvenuto and L. Uccioli. *Transcutaneous oxygen tension monitoring after successful revascularization in diabetic patients with ischaemic foot ulcers*. Diabet Med 2005; 22(4):460-465.

Celen, Y. Z., S. Zincirkeser, I. Akdemir and M. Yilmaz. *Investigation of perfusion reserve using ⁹⁹Tc(m)-MIBI in the lower limbs of diabetic patients*. Nucl Med Commun 2000; 21(9):817-822.

Collinson, D. J. and R. Donnelly. *Therapeutic angiogenesis in peripheral arterial disease: can biotechnology produce an effective collateral circulation?* Eur J Vasc Endovasc Surg 2004; 28(1):9-23.

Compagna, R., B. Amato, S. Massa, M. Amato, R. Grande, L. Butrico, S. de Franciscis and R. Serra. *Cell Therapy in Patients with Critical Limb Ischemia*. Stem Cells Int 2015; 2015:931420.

Cooke, J. P. and D. W. Losordo. *Modulating the vascular response to limb ischemia: angiogenic and cell therapies*. Circ Res 2015; 116(9):1561-1578.

Creager, M. A., T. F. Luscher, F. Cosentino and J. A. Beckman. *Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: Part I*. Circulation 2003; 108(12):1527-1532.

Cree-Green, M., B. R. Newcomer, M. S. Brown, A. D. Baumgartner, B. Bergman, B. Drew, J. G. Regensteiner, L. Pyle, J. E. Reusch and K. J. Nadeau. *Delayed skeletal muscle mitochondrial ADP recovery in youth with type 1 diabetes relates to muscle insulin resistance*. Diabetes 2015; 64(2):383-392.

Di Vita, G., R. Patti, P. D'Agostino, F. Arcoledo, G. Caruso, M. Arcara, V. Davi and E. Cillari. *Serum VEGF and b-FGF profiles after tension-free or conventional hernioplasty*. Langenbecks Arch Surg 2005; 390(6):528-533.

Dubsky, M., A. Jirkovska, R. Bem, V. Fejfarova, L. Pagacova, B. Sixta, M. Varga, S. Langkramer, E. Sykova and E. B. Jude. *Both autologous bone marrow mononuclear cell and peripheral blood progenitor cell therapies similarly improve ischaemia in patients with diabetic foot in comparison with control treatment*. Diabetes Metab Res Rev 2013; 29(5):369-376.

Dubsky, M., A. Jirkovska, R. Bem, V. Fejfarova, M. Varga, L. Kolesar, L. Pagacova, E. Sykova and E. B. Jude. *Role of serum levels of angiogenic cytokines in assessment of angiogenesis after stem cell therapy of diabetic patients with critical limb ischemia*. Cell Transplant 2014; 23(12):1517-1523.

Dubsky, M., A. Jirkovska, R. Bem, A. Nemcova, V. Fejfarova and E. B. Jude. *Cell therapy of critical limb ischemia in diabetic patients - State of art*. Diabetes Res Clin Pract 2017; 126:263-271.

Edmonds, M. E., V. C. Roberts and P. J. Watkins. *Blood flow in the diabetic neuropathic foot*. Diabetologia 1982; 22(1):9-15.

Fabrin, J., K. Larsen and P. E. Holstein. *Long-term follow-up in diabetic Charcot feet with spontaneous onset*. Diabetes Care 2000; 23(6):796-800.

Fadini, G. P., C. Agostini and A. Avogaro. *Autologous stem cell therapy for peripheral arterial disease meta-analysis and systematic review of the literature*. Atherosclerosis 2010; 209(1):10-17.

Fadini, G. P., M. Rigato, R. Cappellari, B. M. Bonora and A. Avogaro. *Long-term Prediction of Cardiovascular Outcomes by Circulating CD34+ and CD34+CD133+ Stem Cells in Patients With Type 2 Diabetes*. Diabetes Care 2017; 40(1):125-131.

Fetterman, J. L., M. Holbrook, D. G. Westbrook, J. A. Brown, K. P. Feeley, R. Breton-Romero, E. A. Linder, B. D. Berk, R. M. Weisbrod, M. E. Widlansky, N. Gokce, S. W. Ballinger and N. M. Hamburg. *Mitochondrial DNA damage and vascular function in patients with diabetes mellitus and atherosclerotic cardiovascular disease*. Cardiovasc Diabetol 2016; 15:53.

Flynn, M. D. and J. E. Tooke. *Aetiology of diabetic foot ulceration: a role for the microcirculation?* Diabet Med 1992; 9(4):320-329.

Frykberg, R. G. and R. Belczyk. *Epidemiology of the Charcot foot*. Clin Podiatr Med Surg 2008; 25(1):17-28, v.

Fu, Y., H. Tang, Y. Huang, N. Song and Y. Luo. *Unraveling the mysteries of endostatin*. IUBMB Life 2009; 61(6):613-626.

Gaemperli, O. *New insights from major prospective cohort studies with cardiac nuclear imaging*. Curr Cardiol Rep 2014; 16(5):482.

Gao, W., D. Chen, G. Liu and X. Ran. *Autologous stem cell therapy for peripheral arterial disease: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials*. Stem Cell Res Ther 2019; 10(1):140.

Ghanassia, E., L. Villon, J. F. Thuan Dit Dieudonne, C. Boegner, A. Avignon and A. Sultan. *Long-term outcome and disability of diabetic patients hospitalized for diabetic foot ulcers: a 6.5-year follow-up study*. Diabetes Care 2008; 31(7):1288-1292.

Golomb, B. A., T. T. Dang and M. H. Criqui. *Peripheral arterial disease: morbidity and mortality implications*. Circulation 2006; 114(7):688-699.

Greiner, A., R. Esterhammer, H. Messner, M. Biebl, H. Muhlthaler, G. Fraedrich, W. R. Jaschke and M. F. Schocke. *High-energy phosphate metabolism during incremental calf exercise in patients with unilaterally symptomatic peripheral arterial disease measured by phosphor 31 magnetic resonance spectroscopy*. J Vasc Surg 2006; 43(5):978-986.

Gropler, R. J., R. S. Beanlands, V. Dilsizian, E. D. Lewandowski, F. S. Villanueva and M. C. Ziadi. *Imaging myocardial metabolic remodeling*. J Nucl Med 2010; 51 Suppl 1(88S-101S).

Herzog, C. A., R. W. Asinger, A. K. Berger, D. M. Charytan, J. Diez, R. G. Hart, K. U. Eckardt, B. L. Kasiske, P. A. McCullough, R. S. Passman, S. S. DeLoach, P. H. Pun and E. Ritz. *Cardiovascular disease in chronic kidney disease. A clinical update from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO)*. Kidney Int 2011; 80(6):572-586.

Hiatt, W. R., S. Hoag and R. F. Hamman. *Effect of diagnostic criteria on the prevalence of peripheral arterial disease. The San Luis Valley Diabetes Study*. Circulation 1995; 91(5):1472-1479.

Hinchliffe, R. J., G. Andros, J. Apelqvist, K. Bakker, S. Friederichs, J. Lammer, M. Lepantalo, J. L. Mills, J. Reekers, C. P. Shearman, G. Valk, R. E. Zierler and N. C. Schaper. *A systematic review of the effectiveness of revascularization of the ulcerated foot in patients with diabetes and peripheral arterial disease*. Diabetes Metab Res Rev 2012; 28 Suppl 1:179-217.

Hinchliffe, R. J., J. R. Brownrigg, J. Apelqvist, E. J. Boyko, R. Fitridge, J. L. Mills, J. Reekers, C. P. Shearman, R. E. Zierler, N. C. Schaper and F. International Working Group on the Diabetic. *IWGDF guidance on the diagnosis, prognosis and management of peripheral artery disease in patients with foot ulcers in diabetes*. Diabetes Metab Res Rev 2016; 32 Suppl 1:37-44.

Hink, U., H. Li, H. Mollnau, M. Oelze, E. Matheis, M. Hartmann, M. Skatchkov, F. Thaiss, R. A. Stahl, A. Warnholtz, T. Meinertz, K. Griendling, D. G. Harrison, U. Forstermann and T. Munzel. *Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus*. Circ Res 2001; 88(2):E14-22.

Hoffmann, M., P. Kujath, A. Flemming, M. Pross, N. Begum, M. Zimmermann, T. Keck, M. Kleemann and E. Schloericke. *Survival of diabetes patients with major amputation is comparable to malignant disease*. *Diab Vasc Dis Res* 2015; 12(4):265-271.

Hristov, M. and C. Weber. *Progenitor cell trafficking in the vascular wall*. *J Thromb Haemost* 2009; 7 Suppl 1:31-34.

Hsiu, H., H. F. Hu and H. C. Tsai. *Differences in laser-Doppler indices between skin-surface measurement sites in subjects with diabetes*. *Microvasc Res* 2018; 115:1-7.

Chantelau, E. *The perils of procrastination: effects of early vs. delayed detection and treatment of incipient Charcot fracture*. *Diabet Med* 2005; 22(12):1707-1712.

Chao, C. Y. and G. L. Cheing. *Microvascular dysfunction in diabetic foot disease and ulceration*. *Diabetes Metab Res Rev* 2009; 25(7):604-614.

Isbell, D. C., S. S. Berr, A. Y. Toledano, F. H. Epstein, C. H. Meyer, W. J. Rogers, N. L. Harthun, K. D. Hagspiel, A. Weltman and C. M. Kramer. *Delayed calf muscle phosphocreatine recovery after exercise identifies peripheral arterial disease*. *J Am Coll Cardiol* 2006; 47(11):2289-2295.

Iversen, M. M., G. S. Tell, T. Riise, B. R. Hanestad, T. Ostbye, M. Graue and K. Midtjell. *History of foot ulcer increases mortality among individuals with diabetes: ten-year follow-up of the Nord-Trondelag Health Study, Norway*. *Diabetes Care* 2009; 32(12):2193-2199.

Jeffcoate, W. J. *Charcot foot syndrome*. *Diabet Med* 2015; 32(6):760-770.

Jeffcoate, W. J., F. Game and P. R. Cavanagh. *The role of proinflammatory cytokines in the cause of neuropathic osteoarthropathy (acute Charcot foot) in diabetes*. *Lancet* 2005; 366(9502):2058-2061.

Jeffcoate, W. J., S. Y. Chipchase, P. Ince and F. L. Game. *Assessing the outcome of the management of diabetic foot ulcers using ulcer-related and person-related measures*. *Diabetes Care* 2006; 29(8):1784-1787.

Jirkovska, A. [*Healing of skin lesions in diabetic foot syndrome during hospitalization*]. *Vnitr Lek* 2006; 52(5):459-464.

Jirkovska, A., P. Kasalicky, P. Boucek, J. Hosova and J. Skibova. *Calcaneal ultrasonometry in patients with Charcot osteoarthropathy and its relationship with densitometry in the lumbar spine and femoral neck and with markers of bone turnover*. *Diabet Med* 2001; 18(6):495-500.

Kajiguchi, M., T. Kondo, H. Izawa, M. Kobayashi, K. Yamamoto, S. Shintani, Y. Numaguchi, T. Naoe, J. Takamatsu, K. Komori and T. Murohara. *Safety and efficacy of autologous progenitor cell transplantation for therapeutic angiogenesis in patients with critical limb ischemia*. *Circ J* 2007; 71(2):196-201.

Kawamoto, A., M. Katayama, N. Handa, M. Kinoshita, H. Takano, M. Horii, K. Sadamoto, A. Yokoyama, T. Yamanaka, R. Onodera, A. Kuroda, R. Baba, Y. Kaneko, T. Tsukie, Y. Kurimoto, Y. Okada, Y. Kihara, S. Morioka, M. Fukushima and T. Asahara. *Intramuscular transplantation of G-CSF-mobilized CD34(+) cells in patients with critical limb ischemia: a phase I/IIa, multicenter, single-blinded, dose-escalation clinical trial*. *Stem Cells* 2009; 27(11):2857-2864.

Kinnaird, T., E. Stabile, M. S. Burnett and S. E. Epstein. *Bone-marrow-derived cells for enhancing collateral development: mechanisms, animal data, and initial clinical experiences*. *Circ Res* 2004; 95(4):354-363.

Kusmierek, J., J. Dabrowski, M. Bienkiewicz, R. Szuminski and A. Plachcinska. *Radionuclide assessment of lower limb perfusion using 99mTc-MIBI in early stages of atherosclerosis*. *Nucl Med Rev Cent East Eur* 2006; 9(1):18-23.

Lavery, L. A., D. G. Armstrong, D. P. Murdoch, E. J. Peters and B. A. Lipsky. *Validation of the Infectious Diseases Society of America's diabetic foot infection classification system*. *Clin Infect Dis* 2007; 44(4):562-565.

Lavery, L. A., D. G. Armstrong, R. P. Wunderlich, M. J. Mohler, C. S. Wendel and B. A. Lipsky. *Risk factors for foot infections in individuals with diabetes*. *Diabetes Care* 2006; 29(6):1288-1293.

Lawall, H., P. Bramlage and B. Amann. *Stem cell and progenitor cell therapy in peripheral artery disease. A critical appraisal*. *Thromb Haemost* 2010; 103(4):696-709.

Leibbrandt, A. and J. M. Penninger. *RANK/RANKL: regulators of immune responses and bone physiology*. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1143:123-150.

Liu, Y., Y. Xu, F. Fang, J. Zhang, L. Guo and Z. Weng. *Therapeutic Efficacy of Stem Cell-based Therapy in Peripheral Arterial Disease: A Meta-Analysis*. *PLoS One* 2015; 10(4):e0125032.

Luscher, T. F., M. A. Creager, J. A. Beckman and F. Cosentino. *Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: Part II*. *Circulation* 2003; 108(13):1655-1661.

Mabileau, G., N. L. Petrova, M. E. Edmonds and A. Sabokbar. *Increased osteoclastic activity in acute Charcot's osteoarthropathy: the role of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand*. *Diabetologia* 2008; 51(6):1035-1040.

Makris, K. I., A. A. Nella, Z. Zhu, S. A. Swanson, G. P. Casale, T. L. Gutti, A. R. Judge and Pipinos, II. *Mitochondriopathy of peripheral arterial disease*. *Vascular* 2007; 15(6):336-343.

Martins-Mendes, D., M. Monteiro-Soares, E. J. Boyko, M. Ribeiro, P. Barata, J. Lima and R. Soares. *The independent contribution of diabetic foot ulcer on lower extremity amputation and mortality risk*. *J Diabetes Complications* 2014; 28(5):632-638.

Matricali, G. A., B. Bammens, D. Kuypers, M. Flour and C. Mathieu. *High rate of Charcot foot attacks early after simultaneous pancreas-kidney transplantation*. *Transplantation* 2007; 83(2):245-246.

Matsuo, S., K. Nakajima and S. Kinuya. *Evaluation of Cardiac Mitochondrial Function by a Nuclear Imaging Technique using Technetium-99m-MIBI Uptake Kinetics*. *Asia Ocean J Nucl Med Biol* 2013; 1(1):39-43.

McGill, M., L. Molyneaux, T. Bolton, K. Ioannou, R. Uren and D. K. Yue. *Response of Charcot's arthropathy to contact casting: assessment by quantitative techniques*. *Diabetologia* 2000; 43(4):481-484.

Met, R., S. Bipat, D. A. Legemate, J. A. Reekers and M. J. Koelemay. *Diagnostic performance of computed tomography angiography in peripheral arterial disease: a systematic review and meta-analysis*. *JAMA* 2009; 301(4):415-424.

Milne, T. E., J. R. Rogers, E. M. Kinnear, H. V. Martin, P. A. Lazzarini, T. R. Quinton and F. M. Boyle. *Developing an evidence-based clinical pathway for the assessment, diagnosis and management of acute Charcot Neuro-Arthropathy: a systematic review*. *J Foot Ankle Res* 2013; 6(1):30.

Norgren, L., W. R. Hiatt, J. A. Dormandy, M. R. Nehler, K. A. Harris, F. G. Fowkes and T. I. W. Group. *Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II)*. *J Vasc Surg* 2007; 45 Suppl S:S5-67.

O'Hare, A. M., R. Katz, M. G. Shlipak, M. Cushman and A. B. Newman. *Mortality and cardiovascular risk across the ankle-arm index spectrum: results from the Cardiovascular Health Study*. *Circulation* 2006; 113(3):388-393.

Palestro, C. J., H. H. Mehta, M. Patel, S. J. Freeman, W. N. Harrington, M. B. Tomas and S. E. Marwin. *Marrow versus infection in the Charcot joint: indium-111 leukocyte and technetium-99m sulfur colloid scintigraphy*. *J Nucl Med* 1998; 39(2):346-350.

Pan, X., C. You, G. Chen, H. Shao, C. Han and L. Zhi. *Skin perfusion pressure for the prediction of wound healing in critical limb ischemia: a meta-analysis*. *Arch Med Sci* 2018; 14(3):481-487.

Paneni, F., J. A. Beckman, M. A. Creager and F. Cosentino. *Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: part I*. Eur Heart J 2013; 34(31):2436-2443.

Pemayun, T. G., R. M. Naibaho, D. Novitasari, N. Amin and T. T. Minuljo. *Risk factors for lower extremity amputation in patients with diabetic foot ulcers: a hospital-based case-control study*. Diabet Foot Ankle 2015; 6:29629.

Peters, E. J. *Pitfalls in diagnosing diabetic foot infections*. Diabetes Metab Res Rev 2016; 32 Suppl 1:254-260.

Peters, E. J. and B. A. Lipsky. *Diagnosis and management of infection in the diabetic foot*. Med Clin North Am 2013; 97(5):911-946.

Petrova, N. L. and M. E. Edmonds. *Acute Charcot neuro-osteoarthropathy*. Diabetes Metab Res Rev 2016; 32 Suppl 1:281-286.

Petrova, N. L., C. Moniz, D. A. Elias, M. Buxton-Thomas, M. Bates and M. E. Edmonds. *Is there a systemic inflammatory response in the acute charcot foot?* Diabetes Care 2007; 30(4):997-998.

Pinto, A., A. Tuttolomondo, D. Di Raimondo, P. Fernandez, S. La Placa, M. Di Gati and G. Licata. *Cardiovascular risk profile and morbidity in subjects affected by type 2 diabetes mellitus with and without diabetic foot*. Metabolism 2008; 57(5):676-682.

Pipinos, II, A. R. Judge, J. T. Selsby, Z. Zhu, S. A. Swanson, A. A. Nella and S. L. Dodd. *The myopathy of peripheral arterial occlusive disease: Part 2. Oxidative stress, neuropathy, and shift in muscle fiber type*. Vasc Endovascular Surg 2008; 42(2):101-112.

Poluzzi, C., R. V. Iozzo and L. Schaefer. *Endostatin and endorepellin: A common route of action for similar angiostatic cancer avengers*. Adv Drug Deliv Rev 2016; 97:156-173.

Pomposelli, F. *Arterial imaging in patients with lower extremity ischemia and diabetes mellitus*. J Vasc Surg 2010; 52(3 Suppl):81S-91S.

Potier, L., C. Abi Khalil, K. Mohammadi and R. Roussel. *Use and utility of ankle brachial index in patients with diabetes*. Eur J Vasc Endovasc Surg 2011; 41(1):110-116.

Prompers, L., 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 and N. Schaper. *High prevalence of ischaemia, infection and serious comorbidity in patients with diabetic foot disease in Europe. Baseline results from the Eurodiale study*. Diabetologia 2007; 50(1):18-25.

Prompers, L., N. Schaper, J. Apelqvist, M. Edmonds, E. Jude, D. Mauricio, L. Uccioli, V. Urbancic, K. Bakker, P. Holstein, A. Jirkovska, A. Piaggese, G. Ragnarson-Tennvall, H. Reike, M. Spraul, K. Van Acker, J. Van Baal, F. Van Merode, I. Ferreira and M. Huijberts. *Prediction of outcome in individuals with diabetic foot ulcers: focus on the differences between individuals with and without peripheral arterial disease. The EURODIALE Study*. Diabetologia 2008; 51(5):747-755.

Ragnarson Tennvall, G. and J. Apelqvist. *Health-economic consequences of diabetic foot lesions*. Clin Infect Dis 2004; 39 Suppl 2:S132-139.

Ribatti, D. *Endogenous inhibitors of angiogenesis: a historical review*. Leuk Res 2009; 33(5):638-644.

Rogers, L. C., R. G. Frykberg, D. G. Armstrong, A. J. Boulton, M. Edmonds, G. H. Van, A. Hartemann, F. Game, W. Jeffcoate, A. Jirkovska, E. Jude, S. Morbach, W. B. Morrison, M. Pinzur, D. Pitocco, L. Sanders, D. K. Wukich and L. Uccioli. *The Charcot foot in diabetes*. Diabetes Care 2011; 34(9):2123-2129.

Ruge, T., A. C. Carlsson, A. Larsson and J. Arnlov. *Endostatin: a promising biomarker in the cardiovascular continuum?* Biomark Med 2017; 11(10):905-916.

Samann, A., S. Pofahl, T. Lehmann, B. Voigt, S. Victor, F. Moller, U. A. Muller and G. Wolf. *Diabetic nephropathy but not HbA1c is predictive for frequent complications of Charcot feet -*

long-term follow-up of 164 consecutive patients with 195 acute Charcot feet. Exp Clin Endocrinol Diabetes 2012; 120(6):335-339.

Sandeman, D. D., A. C. Shore and J. E. Tooke. *Relation of skin capillary pressure in patients with insulin-dependent diabetes mellitus to complications and metabolic control.* N Engl J Med 1992; 327(11):760-764.

Sayman, H. B. and I. Urgancioglu. *Muscle perfusion with technetium-MIBI in lower extremity peripheral arterial diseases.* J Nucl Med 1991; 32(9):1700-1703.

Sedivy, P., M. C. Kipfelsberger, M. Dezortova, M. Krssak, M. Drobny, M. Chmelik, J. Rydlo, S. Trattnig, M. Hajek and L. Valkovic. *Dynamic 31P MR spectroscopy of plantar flexion: influence of ergometer design, magnetic field strength (3 and 7 T), and RF-coil design.* Med Phys 2015; 42(4):1678-1689.

Schaper, N. C., G. Andros, J. Apelqvist, K. Bakker, J. Lammer, M. Lepantalo, J. L. Mills, J. Reekers, C. P. Shearman, R. E. Zierler and R. J. Hinchliffe. *Diagnosis and treatment of peripheral arterial disease in diabetic patients with a foot ulcer. A progress report of the International Working Group on the Diabetic Foot.* Diabetes Metab Res Rev 2012; 28 Suppl 1:218-224.

Schaper, N. C., J. J. Van Netten, J. Apelqvist, B. A. Lipsky, K. Bakker and F. International Working Group on the Diabetic. *Prevention and management of foot problems in diabetes: a Summary Guidance for Daily Practice 2015, based on the IWGDF Guidance Documents.* Diabetes Metab Res Rev 2016; 32 Suppl 1:7-15.

Schuch, G., J. V. Heymach, M. Nomi, M. Machluf, J. Force, A. Atala, J. P. Eder, Jr., J. Folkman and S. Soker. *Endostatin inhibits the vascular endothelial growth factor-induced mobilization of endothelial progenitor cells.* Cancer Res 2003; 63(23):8345-8350.

Sun, J. H., J. S. Tsai, C. H. Huang, C. H. Lin, H. M. Yang, Y. S. Chan, S. H. Hsieh, B. R. Hsu and Y. Y. Huang. *Risk factors for lower extremity amputation in diabetic foot disease categorized by Wagner classification.* Diabetes Res Clin Pract 2012; 95(3):358-363.

Tomesova, J., J. Gruberova, P. Broz, S. Lacigova, M. Krcma and Z. Rusavy. *[Methods of skin microcirculation assessment].* Vnitr Lek 2013; 59(10):895-902.

Tsimerman, G., A. Roguin, A. Bachar, E. Melamed, B. Brenner and A. Aharon. *Involvement of microparticles in diabetic vascular complications.* Thromb Haemost 2011; 106(2):310-321.

Tuttolomondo, A., C. Maida and A. Pinto. *Diabetic foot syndrome as a possible cardiovascular marker in diabetic patients.* J Diabetes Res 2015; 2015:268390.

Urbanova, R., A. Jirkovska, V. Woskova and P. Wohl. *[Transcutaneous oximetry in the diagnosis of ischemic disease of the lower extremities in diabetics].* Vnitr Lek 2001; 47(5):330-332.

Van Belle, E., B. Witzenbichler, D. Chen, M. Silver, L. Chang, R. Schwall and J. M. Isner. *Potentiated angiogenic effect of scatter factor/hepatocyte growth factor via induction of vascular endothelial growth factor: the case for paracrine amplification of angiogenesis.* Circulation 1998; 97(4):381-390.

Vazzana, N., P. Ranalli, C. Cucurullo and G. Davi. *Diabetes mellitus and thrombosis.* Thromb Res 2012; 129(3):371-377.

Velazquez, O. C. *Angiogenesis and vasculogenesis: inducing the growth of new blood vessels and wound healing by stimulation of bone marrow-derived progenitor cell mobilization and homing.* J Vasc Surg 2007; 45 Suppl A:A39-47.

Walia, A., J. F. Yang, Y. H. Huang, M. I. Rosenblatt, J. H. Chang and D. T. Azar. *Endostatin's emerging roles in angiogenesis, lymphangiogenesis, disease, and clinical applications.* Biochim Biophys Acta 2015; 1850(12):2422-2438.

Wang, H., Y. Chen, X. A. Lu, G. Liu, Y. Fu and Y. Luo. *Endostatin Prevents Dietary-Induced Obesity by Inhibiting Adipogenesis and Angiogenesis.* Diabetes 2015; 64(7):2442-2456.

Weber, K., K. Gebauer, F. Luders, M. Meyborg, N. Malyar, T. Goerge and H. Reinecke. *Micro-lightguide spectrophotometry (O₂C(R)) as a predictor of intermediate outcome in patients with critical limb ischemia after percutaneous transluminal angioplasty (PTA)*. *Int Angiol* 2014; 33(6):518-529.

West, A. M., J. D. Anderson, F. H. Epstein, C. H. Meyer, K. D. Hagspiel, S. S. Berr, N. L. Harthun, A. L. Weltman, B. H. Annex and C. M. Kramer. *Percutaneous intervention in peripheral artery disease improves calf muscle phosphocreatine recovery kinetics: a pilot study*. *Vasc Med* 2012; 17(1):3-9.

Wukich, D. K., W. Sung, S. A. Wipf and D. G. Armstrong. *The consequences of complacency: managing the effects of unrecognized Charcot feet*. *Diabet Med* 2011; 28(2):195-198.

Wutschert, R. and H. Bounameaux. *Determination of amputation level in ischemic limbs. Reappraisal of the measurement of TcPo₂*. *Diabetes Care* 1997; 20(8):1315-1318.

Xie, B., H. Luo, Y. Zhang, Q. Wang, C. Zhou and D. Xu. *Autologous Stem Cell Therapy in Critical Limb Ischemia: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials*. *Stem Cells Int* 2018; 2018:7528464.

Young, M. J., A. Marshall, J. E. Adams, P. L. Selby and A. J. Boulton. *Osteopenia, neurological dysfunction, and the development of Charcot neuroarthropathy*. *Diabetes Care* 1995; 18(1):34-38.

Young, M. J., J. E. McCardle, L. E. Randall and J. I. Barclay. *Improved survival of diabetic foot ulcer patients 1995-2008: possible impact of aggressive cardiovascular risk management*. *Diabetes Care* 2008; 31(11):2143-2147.

Zhang, P., J. Lu, Y. Jing, S. Tang, D. Zhu and Y. Bi. *Global epidemiology of diabetic foot ulceration: a systematic review and meta-analysis (dagger)*. *Ann Med* 2017; 49(2):106-116.

Zhang, Y., H. Deng and Z. Tang. *Efficacy of Cellular Therapy for Diabetic Foot Ulcer: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Clinical Trials*. *Cell Transplant* 2017; 26(12):1931-1939.

Zubair, A. C., S. Malik, A. Paulsen, M. Ishikawa, C. McCoy, P. X. Adams, D. Amrani and M. Costa. *Evaluation of mobilized peripheral blood CD34(+) cells from patients with severe coronary artery disease as a source of endothelial progenitor cells*. *Cytotherapy* 2010; 12(2):178-189.

9 Přehled vlastních publikací

Publikace týkající se tématu dizertační práce

Články publikované v časopisech s IF

1. Nemcova A, Jirkovska A, Dubsky M, Kolesar L, Bem R, Fejfarova V, Pysna A, Woskova V, Skibova J, Jude EB. Difference in Serum Endostatin Levels in Diabetic Patients with Critical Limb Ischemia Treated by Autologous Cell Therapy or Percutaneous Transluminal Angioplasty. *Cell Transplant*. 2018 Sep;27(9):1368-1374. doi: 10.1177/0963689718775628. Epub 2018 Jun 4. **IF 2017 = 2,885**
2. Nemcova A, Jirkovska A, Dubsky M, Bem R, Fejfarova V, Woskova V, Pysna A, Buncova M. Perfusion scintigraphy in the assessment of autologous cell therapy in diabetic patients with critical limb ischemia. *Physiol Res*. 2018 Aug 16;67(4):583-589. Epub 2018 May 10. **IF 2018 = 1,324**

Spoluautor:

1. Dubský M, Jirkovská A, Bem R, Fejfarová V, Pagáčová L, Němcová A, Sixta B, Chlupac J, Peregrin JH, Syková E, Jude EB. Comparison of the effect of stem cell therapy and percutaneous transluminal angioplasty on diabetic foot disease in patients with critical limb ischemia. *Cytotherapy*. 2014 Oct 7 **IF 2014 = 3,26**
2. Dubský M, Jirkovská A, Bem R, Němcová A, Fejfarová V, Jude EB. Cell therapy of critical limb ischemia in diabetic patients - State of art. *Diabetes Res Clin Pract*. 2017 Apr;126:263-271. Doi 10.1016/j.diabres.2017.02.028. Epub 2017 Feb 27. **IF 2017 = 2,548**
3. Sedivy P, Drobny M, Dezortova M, Herynek V, Roztocil K, Cermakova H, Nemcova A, Dubsky M, Hajek M. 31P MR spectroscopy of patients with mild and serious lower limb ischemia. *Int Angiol*. 2018 Aug;37(4):293-299. doi: 10.23736/S0392-9590.18.03943-3. Epub 2018 Apr 11. **IF 2018 = 1,156**
4. Pyšná A, Bém R, Němcová A, Fejfarová V, Jirkovská A, Hazdrová J, Jude EB, Dubský M. Endothelial Progenitor Cells Biology in Diabetes Mellitus and Peripheral Arterial Disease and their Therapeutic Potential. *Stem Cell Rev*. 2018 Apr;15(2):157-165. doi: 10.1007/s12015-018-9863-4. Review. **IF 2018 = 3,612**
5. Dubský M, Jirkovská A, Bem R, Němcová A, Fejfarová V, Hazdrová J, Sutoris K, Chlupáč J, Skibová J, Jude EB. Impact of severe diabetic kidney disease on the clinical outcome of autologous cell therapy in people with diabetes and critical limb ischaemia. *Diabet Med*. 2019 Sep;36(9):1133-1140. doi: 10.1111/dme.13985. Epub 2019 Jun 13. **IF 2019 = 3,107**
6. Dubský M, Šedivý P, Němcová A, Drobny M, Hazdrová J, Fejfarová V, Bém R, Jirkovská A, Dezortová M, Hájek M. Clinical and (31)P magnetic resonance spectroscopy characterization of patients with critical limb ischemia before and after autologous cell therapy. *Physiol Res*. 2019 Aug 29;68(4):559-566. Epub 2019 Jun 6. **IF 2019 = 1,697**

Články publikované v časopisech bez IF

1. Němcová A, Dubský M, Jirkovská A, Šedivý P, Drobny M, Hájek M, Dezortová M, Bém R, Fejfarová V, Pyšná A. [Diabetic foot syndrome: importance of calf muscles MR spectroscopy in the assessment of limb ischemia and effect of revascularization]. *Vnitř Lek*. Spring 2017;63(4):236-241.

Spoluautor:

1. Dubský M, Jirkovská A, Bém R, Fejfarová V, Němcová A, Wosková V, Pagáčová L, Sixta B, Navrátil K, Chlupáč J, Syková E. Dlouhodobé zkušenosti s autologní buněčnou terapií kritické končetinové ischemie u syndromu diabetické nohy. *Léčba ran* 2016; 1(1):25-26

2. Pyšná A, Bém R, Jirkovská A, Němcová A, Fejfarová V, Wosková V, Navrátil K, Sixta B, Dubský M. Dlouhodobý efekt buněčné terapie kritické končetinové ischemie u pacientky s diabetem 1. typu – kazuistika. *Kazuistiky v diabetologii* 2017; 15(2):15-18

Přednášky s publikovanými abstrakty v zahraničí

1. Němcová A, Jirkovská A, Bém R, Dubský M, Fejfarová V, Wosková V. Sensitivity and specificity of calcaneal quantitative ultrasonometry for diagnosis of Charcot foot in patients with diabetic neuropathy (Abstract). *DFSG Abstract Book 2014*; 12(1):27, 12th Scientific Meeting of Diabetic Foot Study Group, Bratislava, Slovensko, 12. - 14. 9. 2014
2. Němcová A, Jirkovská A, Dubský M, Bém R, Fejfarová V, Wosková V, Kolesar L, Skibová J. Endostatin as a potential marker of angiogenesis after autologous cell therapy in diabetic patients with critical limb ischemia. (Abstract). *Diabetes* 2016;65(Suppl. 1):A37 76th Scientific Sessions of American Diabetes Association, New Orleans, USA, 10.-14.6. 2016
3. Němcová A, Jirkovská A, Dubský M, Bém R, Fejfarová V, Wosková V, Petr Šedivý. MR spectroscopy in the assessment of effect of revascularization in diabetic patients with critical limb ischemia (Abstract). *DFSG Abstract Book 2016*; 13(1):50 13th Scientific Meeting of Diabetic Foot Study Group, Stuttgart, Německo, 9. - 11. 9. 2016
4. Němcová A, Jirkovská A, Dubský M, Bém R, Fejfarová V, Pyšná A, Skibová J. Comparison of long-term outcomes in diabetic patients with critical limb ischemia treated by autologous cell therapy, percutaneous transluminal angioplasty or conservative therapy (Abstract). *DFSG Abstract Book 2017*; 14(1):31 14th Scientific Meeting of Diabetic Foot Study Group, Porto, Portugalsko, 8. - 10. 9. 2017
5. Němcová A, Dubský M, Jirkovská A, Bém R, Fejfarová V, Skibová J. Long-term outcomes of bone-marrow mononuclear cell therapy, percutaneous angioplasty and conservative therapy in diabetic patients with critical limb ischemia (Abstract). *ADIT Abstract Book 2018*;10(1):16 10th Conference on Advances in Diabetes and Insulin Therapy, Dubrovnik, Chorvatsko, 15. – 17. 4. 2018 **Cena za abstrakt**

Spoluautor:

1. Dubský M, Jirkovska A, Nemcova A, Bém R, Fejfarová V, Pagacova L, Sixta B, Sykova E. Impact of foot infection on outcomes of stem cell therapy in diabetic patients with critical limb ischemia (Abstract). *EWMA Journal* 2014; 14(SMay):124 24th Conference of European Wound Management Association, Madrid, Španělsko, 14. - 16. 5. 2014
2. Dubský M, Jirkovská A, Bém R, Němcová A, Fejfarová V, Wosková V, Navrátil K, Sixta B. Is transcutaneous oxygen pressure suitable measurement method for assessment of the effect of cell therapy on critical limb ischemia in diabetic patients? (Abstract). *DFSG Abstract Book 2016*; 13(1):45 13th Scientific Meeting of Diabetic Foot Study Group, Stuttgart, Německo, 9. - 11. 9. 2016
3. Dubský M, Jirkovská A, Bem R, Nemcova A, Fejfarová V, Pagáčová L, Navrátil K, Syková E. Inherited thrombotic disorders may influence the effect of autologous cell therapy of critical limb ischaemia and diabetic foot (Abstract). *Diabetologia* 2016;59(Suppl1):S33 52nd Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes, Mnichov, Německo, 12. - 16. 9. 2016
4. Dubský M, Jirkovská A, Němcová A, Fejfarová V, Pyšná A, Navrátil K. Long-term effect of autologous cell therapy on critical limb ischemia and ulcer healing in patients with diabetic foot (Abstract). *EWMA Abstract Book 2017*;17(1):OP065 27th European Wound Management Association, Amsterdam, Nizozemí, 3. – 5. 5. 2017
5. Dubsky M, Bem R, Jirkovska A, Nemcova A, Fejfarova V, Pysna A, Navratil K. Characteristics of Cell Suspension and the Role of Angiogenic Cytokines in Cell Therapy of Critical Limb Ischemia in Diabetic Patients (Abstract). *WGC Abstract Book 2017*;8(1):118 BIT's 8th World Gene Convention 2017, Macau, 13. - 15. 11. 2017

6. Bém R, Buncová M, Dubský M, Fejfarová V, Němcová A, Wosková V. The role of quantitative bone scan parameters for diagnosis of Charcot foot (Abstract). DFSG Abstract Book 2018; 15(1):73 15th Scientific Meeting of Diabetic Foot Study Group, Berlin, Německo, 28. - 30. 9. 2018
7. Dubský M, Bem R, Jirkovská A, Nemcová A, Hazdrová J, Fejfarová V, Woskova V, Sutoris K, Thieme F, Skibova J. Impact of Severe Diabetic Kidney Disease on the Effect of Autologous Cell Therapy in Diabetic Patients with Chronic Limb-Threatening Ischemia (Abstract). ISDF Abstract Book 2019; 8(O7.1):16, 8th International Symposium on the Diabetic Foot, Haag, Holandsko, 22. - 25. 5. 2019
8. Hazdrová J, Bem R, Nemcová A, Fejfarová V, Jirkovská A, Woskova V, Sutoris K, Thieme F, Dubsky M. Assessment of Systemic Vasculogenesis After Autologous Cell Therapy of Ischemic Diabetic Foot (Abstract). ISDF Abstract Book 2019; 8(O7.2):15, 8th International Symposium on the Diabetic Foot, Haag, Holandsko, 22. - 25. 5. 2019

Postery s publikovanými abstrakty v zahraničí

1. Němcová A, Jirkovská A, Bem R, Dubský M, Fejfarová V, Wosková V. The association of cardiovascular diseases with major amputation and mortality in patients with diabetic foot syndrome (Abstract). ISDF Abstract Book 2015; 7(P22):17th International Symposium on the Diabetic Foot, Haag, Holandsko, 20. - 23. 5. 2015
2. Němcová A, Jirkovská A, Bém R, Fejfarová V, Wosková V, Pyšná A, Dubský M. Three-year mortality and amputation rates in diabetic with critical limb ischemia treated by autologous cell therapy (Abstract). EWMA Abstract Book 2017;17(1):EP014 27th European Wound Management Association, Amsterdam, Nizozemí, 3. - 5. 5. 2017
3. Němcová A, Jirkovská A, Dubský M, Bém R, Fejfarová V, Wosková V, Skibová J. Relation of lipid disorders to major amputation and mortality in patients with diabetic foot (Abstract). ADIT Abstract Book 2017;9(1):47 9th Conference on Advances in Diabetes and Insulin Therapy, Bělehrad, Srbsko, 11. - 13. 5. 2017
4. Němcová A, Jirkovská A, Dubský M, Bém R, Fejfarová V, Pyšná A, Skibová J. Serum levels of angiogenic cytokines in the assessment of vasculogenesis after autologous cell therapy in diabetic patients with critical limb ischemia (Abstract). Diabetologia 2017;60(Suppl1):S1013 53rd Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes, Lisabon, Portugalsko, 11. - 15. 9. 2017
5. Němcová A, Jirkovská A, Dubský M, Bém R, Fejfarová V, Pyšná A. Long-term outcomes of diabetic patients with critical limb ischemia treated by autologous cell therapy (Abstract). IDF Abstract Book 2017. 24(1):P-0710 24th International Diabetes Federation Congress, Abu Dhabi, Spojené arabské emiráty, 4. - 8. 12. 2017
6. Němcová A, Jirkovská A, Dubský M, Bém R, Fejfarová V, Wosková V. Transcutaneous oxygen pressure – a suitable parameter for assessing the effect of autologous cell therapy in patients with ischemic diabetic foot (Abstract). DFSG Abstract Book 2018; 15(1):152 15th Scientific Meeting of Diabetic Foot Study Group, Berlin, Německo, 28. - 30. 9. 2018

Spoluautor:

1. Dubsky M, Jirkovska A, Bem R, Pagacova L, Fejfarova V, Nemcova A, Sykova E. Comparison of two different methods of autologous bone marrow mononuclear cells in the treatment of diabetic patients with critical limb ischemia (Abstract). SCC Abstract Book 2014;5(1):32 5th International Congress on Stem Cells and Tissue Formation, Drážďany, Německo, 8. - 11. 7. 2014
2. Bem R, Jirkovská A, Dubský M, Němcová A, Fejfarová V, Wosková V, Skibová J. Comparison of angiogenic findings between patients with non-healing diabetic foot ulcers with and without Charcot foot (Abstract). EWMA Journal 2014; 14(SMay):291 24th Conference of European Wound Management Association, Madrid, Španělsko, 14. - 16. 5. 2014

3. Dubský M, Jirkovská A, Bém R, Němcová A, Fejfarová V, Wosková V, Pagáčová L, Navrátil K, Skibová J. Risk factors and indications for major amputation after autologous cell therapy of critical limb ischemia in diabetic patients. (Abstract). Diabetes 2016;65(Suppl. 1):A166. 76th Scientific Sessions of American Diabetes Association, New Orleans, USA, 10.-14.6. 2016
4. Bem R, Jirkovská A, Brunová J, Němcová A, Dubský M, Kratochvílová S, Fejfarová V, Wosková V, Saudek F. Role of calcaneal quantitative ultrasonometry for diagnosis of Charcot foot in patients after pancreas transplantation (Abstract). DFSG Abstract Book 2016; 13(1):83 13th Scientific Meeting of Diabetic Foot Study Group, Stuttgart, Německo, 9. - 11. 9. 2016
5. Bem R, Jirkovská A, Němcová A, Brunová J, Dubský M, Kratochvílová S, Wosková V, Fejfarová V, Saudek F. Calcaneal quantitative ultrasonometry is useful method for diagnosis of Charcot foot in patients after simultaneous after pancreas and kidney transplantation (Abstract). Diabetologia 2016;59(Suppl1):S985 52nd Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes, Mnichov, Německo, 12. - 16. 9. 2016
6. Dubský M, Jirkovská A, Bem R, Němcová A, Fejfarová V, Wosková V. Two-year mortality and amputation rates in diabetic patients with critical limb ischemia treated by cell therapy or angioplasty (Abstract). ISDF Abstract Book 2015; 7(O5):4 7th International Symposium on the Diabetic Foot, Haag, Holandsko, 20. - 23. 5. 2015
7. Bem R, Jirkovská A, Dubský M, Němcová A, Fejfarová V, Wosková V, Kožnarová R, Saudek F. 5-year incidence of active Charcot foot in relation to predictive risk factors in patients after pancreas transplantation (Abstract). ISDF Abstract Book 2015; 7(P19):3 7th International Symposium on the Diabetic Foot, Haag, Holandsko, 20. - 23. 5. 2015
8. Pyšná A, Bém R, Jirkovská A, Němcová A, Fejfarová V, Wosková V, Navrátil K, Skibová J, Dubský M. Comparison of three different isolation methods of cell therapy of critical limb ischemia in diabetic patients (Abstract). DFSG Abstract Book 2017; 14(1):77 14th Scientific Meeting of Diabetic Foot Study Group, Porto, Portugalsko, 8. - 10. 9. 2017
9. Dubský M, Němcová A, Jirkovská A, Bém R, Fejfarová V, Pyšná A, Wosková V, Navrátil K. Is it reasonable to indicate autologous cell therapy of critical limb ischemia in diabetic patients with chronic kidney disease? (Abstract). Diabetologia 2017;60(Suppl1):S1012 53rd Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes, Lisabon, Portugalsko, 11. - 15. 9. 2017
10. Dubský M, Bém R, Němcová A, Jirkovská A, Fejfarová V, Pyšná A, Navrátil K. Bone marrow-derived mononuclear cell therapy improves ischemia parameters and enhances wound healing in patients with diabetic foot ulcers (Abstract). IDF Abstract Book 2017. 24(1):OP-0136 24th International Diabetes Federation Congress, Abu Dhabi, Spojené arabské emiráty, 4. - 8. 12. 2017
11. Dubský M, Němcová A, Bém R, Fejfarová V, Jirkovská A, Sutoris K. The impact of chronic kidney disease on the outcome of autologous cell therapy of ischemic diabetic foot (Abstract). ADIT Abstract Book 2018;10(1):49 10th Conference on Advances in Diabetes and Insulin Therapy, Dubrovnik, Chorvatsko, 15. - 17. 4. 2018
12. Dubský M, Pyšná A, Němcová A, Jirkovská A, Bém R, Fejfarová V, Wosková V, Sutoris K. Impact of foot infection on the outcomes of cells therapy in diabetic patients with no-option critical limb ischemia (Abstract). DFSG Abstract Book 2018; 15(1):79 15th Scientific Meeting of Diabetic Foot Study Group, Berlin, Německo, 28. - 30. 9. 2018
13. Dubský M, Němcová A, Jirkovská A, Bém R, Fejfarová V, Hazdrová J, Sutoris K. Can inherited thrombophilia influence the effect of autologous cell therapy in patients with ischemic diabetic foot? (Abstract). IDF Complications Abstract Book 2018; 1(1):P-019 1st International Diabetes Federation Complications Congress, Hyderabad, Indie, 25. - 27. 10. 2018

Přednášky s publikovanými abstrakty v tuzemsku

1. Němcová A, Jirkovská A, Bém R, Dubský M, Fejfarová V, Wosková V, Skibová J. Asociace kardiovaskulárních onemocnění a jejich rizikových faktorů s amputacemi a mortalitou u pacientů se

syndromem diabetické nohy (Abstract). Vnitřní lékařství 2015;61(6, Supp 2):1 XXXIV. Dny mladých internistů, Olomouc, 4. – 5. 6. 2015

2. Němcová A, Jirkovská A, Bém R, Dubský M, Fejfarová V, Wosková V, Skibová J. Poruchy metabolismu lipidů u pacientů se syndromem diabetické nohy – efektivita terapie a vztah těchto poruch k amputacím a mortalitě (Abstract). Sborník abstrakt 2016;23(1):51 XXIII. Kongres České internistické společnosti ČLS J. E. Purkyně, 21. – 24. 9. 2016
3. Němcová A, Jirkovská A, Dubský M, Bém R, Fejfarová V, Šedivý P, Pyšná A. Hodnocení efektu revaskularizace u pacientů se syndromem diabetické nohy pomocí MR spektroskopie lýtkových svalů (Abstract) DMEV 2017;20(Suppl. 1):29-30 LIII. Diabetologické dny v Luhačovicích, 5. - 8. 4. 2017
4. Němcová A, Jirkovská A, Dubský M, Bém R, Fejfarová V, Wosková V. Význam měření transkutánní tenze kyslíku při hodnocení efektu buněčné terapie kritické končetinové ischemie u pacientů se syndromem diabetické nohy (Abstract) DMEV 2018; 20(Suppl. 1):26-27 54. Diabetologické dny v Luhačovicích, 25. - 28. 4. 2018

Spoluautor:

1. Bém R, Jirkovská A, Němcová A, Dubský M, Fejfarová V, Wosková V. Diagnostika lokální osteoporózy a léčba zevní fixací u Charcotovy osteoartropatie. (Abstract). Kasuistiky v diabetologii 2013;11(Suppl 2):S4-S5 Mezioborové sympozium s mezinárodní účastí, Syndrom diabetické nohy, Praha, 22. 11. 2013
2. Jirkovská A, Dubský M, Bém R, Fejfarová V, Wosková V, Němcová A. What are appropriate indication for stem cells therapy of diabetic foot syndrome? (Abstract). Kazuistiky v diabetologii 2014;1(1):13 39. Angiologické dny, Praha, 27. 2. – 1. 3. 2014
3. Dubský M, Jirkovská A, Němcová A, Bém R, Fejfarová V, Wosková V, Pagáčová L, Syková E. Buněčná léčba syndromu diabetické nohy v roce 2014 (Abstract). Kasuistiky v diabetologii 2014;12(Suppl 2):S14-16 Mezioborové sympozium s mezinárodní účastí, Syndrom diabetické nohy, Praha, 28. 11. 2014
4. Dubský M, Jirkovská A, Bém R, Fejfarová V, Němcová A, Pagáčová L, Sixta B, Navrátil K, Venerová J, Jirkovská J, Syková E. Faktory ovlivňující výsledky buněčné terapie kritické končetinové ischemie u syndromu diabetické nohy - kazuistiky (Abstract). Léčba ran 2015;1(1):25-26 XIII. celostátní kongres s mezinárodní účastí České společnosti pro léčbu a hojení ran, Pardubice, 22. - 23. 1. 2015
5. Dubský M, Jirkovská A, Bém R, Němcová A, Fejfarová V, Wosková V. Dlouhodobá mortalita a vysoké amputace u pacientů se syndromem diabetické nohy léčených autologní buněčnou terapií a PTA. (Abstract) DMEV 2015;18(Suppl. 1):25 LI. Diabetologické dny v Luhačovicích, 16. - 18. 4. 2015
6. Dubský M, Jirkovská A, Bém R, Pagáčová L, Fejfarová V, Němcová A, Syková E. Porovnání dvou rozdílných metod izolace autologních mononukleárních buněk kostní dřeně při léčbě kritické končetinové ischemie u diabetiků (Abstract). Sborník abstrakt 2015; 7:39 VII. mezinárodní konference Bioimplantologie 2015, Brno, 29. – 30. 4. 2015
7. Dubský M, Jirkovská A, Bém R, Němcová A, Fejfarová V, Wosková V, Pagáčová L, Navrátil K. Příčiny a rizikové faktory amputací u diabetiků s kritickou končetinovou ischemií léčených buněčnou terapií – ischemie, nebo infekce? (Abstract) DMEV 2016;19(Suppl. 1):22 LII. Diabetologické dny v Luhačovicích, 14. - 16. 4. 2016
8. Bém R, Jirkovská A, Dubský M, Kožnarová R, Girman P, Němcová A, Fejfarová V, Wosková V, Skibová J, Saudek F. Vysoké riziko Charcotovy neuropatické osteoartropatie u pacientů po transplantaci pankreatu v dlouhodobém sledování (Abstract) DMEV 2016;19(Suppl. 1):19-20 LII. Diabetologické dny v Luhačovicích, 14. - 16. 4. 2016
9. Dubský M, Jirkovská A, Bem R, Němcová A, Fejfarová V, Wosková V, Pagáčová L, Navrátil K. Buněčná terapie u syndromu diabetické nohy (Abstract). Vaskulárna medicína 2016;8(Suppl1):39 XXIII. Slovensko-česká konferencia o hemostáze a trombóze, Martin, Slovensko, 19. – 21. 5. 2016

10. Dubský M, Jirkovská A, Němcová A, Bém R, Fejfarová V, Navrátil K. Vliv pokročilé renální insuficience na klinický efekt buněčné terapie u diabetiků s kritickou končetinovou ischemií (Abstract). Sborník abstrakt 2016;23(1):40 XXIII. Kongres České internistické společnosti ČLS J. E. Purkyně, 21. – 24. 9. 2016
11. Bém R, Kratochvílová S, Němcová A, Fejfarová V, Dubský M, Wosková V, Pyšná A. Diagnostika a léčba poruch kostního metabolismu (Abstract). Kasuistiky v diabetologii 2016;14(Suppl 1):10-12 Mezioborové sympozium s mezinárodní účastí, Syndrom diabetické nohy, Praha, 25. 11. 2016
12. Dubský M, Jirkovská A, Fejfarová V, Bém R, Němcová A, Pyšná A, Navrátil K. Intramuskulární aplikace buněčné terapie kritické končetinové ischemie u diabetiků (Abstract). Léčba ran 2017;6(1):26 XV. celostátní kongres s mezinárodní účastí České společnosti pro léčbu a hojení ran, Pardubice, 26. - 27. 1. 2017
13. Pyšná A, Bém R, Jirkovská A, Němcová A, Fejfarová V, Wosková V, Navrátil K, Skibová J, Dubský M. Porovnání tří rozdílných metod izolace autologních prekurzorových buněk při léčbě kritické končetinové ischemie u diabetiků (Abstract). Vnitřní lékařství 2017;63(S1):14-15 XXXVI. Dny mladých internistů, Olomouc, 1. – 2. 6. 2017
14. Dubský M, Pyšná A, Němcová A, Bém R, Jirkovská A, Fejfarová V, Wosková V, Sutoris K, Chlupáč J. Dlouhodobý efekt buněčné léčby kritické končetinové ischemie (Abstract). Kazuistiky v diabetologii 2017;15(Suppl 1):S20-21 Mezioborové sympozium s mezinárodní účastí, Syndrom diabetické nohy, Praha, 24. 11. 2017
15. Dubský M, Bém R, Němcová A, Jirkovská A, Fejfarová V, Wosková V, Pyšná A, Pagáčová L, Sutoris K. Mohou vrozené trombofilie ovlivnit výsledky buněčné terapie diabetiků s kritickou končetinovou ischemií? (Abstract) DMEV 2018; 20(Suppl. 1):20 54. Diabetologické dny v Luhačovicích, 25. - 28. 4. 2018
16. Dubský M, Němcová A, Bém R, Pyšná A, Jirkovská A, Fejfarová V. Atypické diagnostické metody u ischemické choroby dolních končetin; Němcová A, Dubský M. Bém R, Pyšná A, Jirkovská A, Fejfarová V. Vlastní zkušenosti s MR spektroskopií u pacientů s kritickou ICHDK (Abstract). Léčba ran 2018;7(1):26-27 XVI. celostátní kongres s mezinárodní účastí České společnosti pro léčbu a hojení ran, Pardubice, 25. - 26. 1. 2018
17. Hazdrová J, Bém R, Němcová A, Fejfarová V, Jirkovská A, Wosková V, Dubský M. Posouzení systémové vaskulogeneze po autologní buněčné terapii diabetiků s těžkou ischemií dolních končetin (Abstract) DMEV 2019; 22(Suppl. 1):23-24 LV. Diabetologické dny v Luhačovicích, 10. – 13. 4. 2019
18. Hazdrová J, Bém R, Němcová A, Fejfarová V, Jirkovská A, Wosková V, Dubský M. Ovlivní infekce efekt autologní buněčné terapie syndromu diabetické nohy? (Abstract). Sborník abstrakt 2019;38(1):19-20, XXXVIII. Dny mladých internistů, Olomouc, 6. – 7. 6. 2019

Postery s publikovanými abstrakty v tuzemsku

1. Němcová, Jirkovská A, Bém R, Dubský M, Fejfarová V, Wosková V. Význam kvantitativní ultrasonometrie calcaneu pro diagnostiku Charcotovy neuropatické osteoartropatie ve srovnání s densitometrií páteře a kyčle (Abstract). DMEV 2014;17(Suppl 1):47 L. Diabetologické dny v Luhačovicích, 10. - 12. 4. 2014
2. Němcová A., Jirkovská A. Nerozpoznaná Charcotova osteoartropatie s flegmónou u mladé dialyzované diabetičky 1. typu. (Abstract). Kasuistiky v diabetologii 2013;11(Suppl 2):S18-S19 Mezioborové sympozium s mezinárodní účastí, Syndrom diabetické nohy, Praha, 22. 11. 2013
3. Němcová A, Jirkovská A, Bém R, Dubský M, Fejfarová V, Wosková V, Skibová J. Ovlivňují kardiovaskulární onemocnění amputace a mortalitu u pacientů se syndromem diabetické nohy? (Abstract). DMEV 2015;18(Suppl. 1):43 LI. Diabetologické dny v Luhačovicích, 16. - 18. 4. 2015
4. Němcová A, Jirkovská A, Dubský M, Bém R, Fejfarová V, Wosková V, Skibová J. Hodnocení efektu buněčné terapie syndromu diabetické nohy pomocí perfuzní scintigrafie lýtkových svalů (Abstract) DMEV 2016;19(Suppl. 1):51 LII. Diabetologické dny v Luhačovicích, 14. - 16. 4. 2016

- Němcová A, Jirkovská A, Bém R, Fejfarová V, Wosková V, Pyšná A, Dubský M. Je měření transkutánní tenze kyslíku spolehlivým parametrem posouzení efektu buněčné terapie kritické končetinové ischemie? (Abstract). Kazuistiky v diabetologii 2016;14(Suppl 1):32 Mezioborové sympozium s mezinárodní účastí, Syndrom diabetické nohy, Praha, 25. 11. 2016
- Němcová A, Jirkovská A, Dubský M, Bém R, Fejfarová V, Pyšná A. Dlouhodobý vliv buněčné léčby kritické končetinové ischemie na mortalitu a amputace u pacientů se syndromem diabetické nohy. (Abstract). Léčba ran 2017 XV. celostátní kongres s mezinárodní účastí České společnosti pro léčbu a hojení ran, Pardubice, 26. - 27. 1. 2017

Spoluautor:

- Dubský M, Jirkovská A, Bém R, Fejfarová V, Němcová A, Wosková V, Pagáčová L, Sixta B, Navrátil K, Chlupáč J, Syková E. Dlouhodobé zkušenosti s autologní buněčnou terapií kritické končetinové ischemie u diabetiků (Abstract). Kazuistiky v diabetologii 2015; 13(Suppl 1):21 Mezioborové sympozium s mezinárodní účastí, Syndrom diabetické nohy, Praha, 27. 11. 2015
- Pyšná A, Bém R, Jirkovská A, Němcová A, Fejfarová V, Wosková V, Navrátil K, Sixta B, Dubský M. Dlouhodobý efekt buněčné terapie kritické končetinové ischemie u pacientky s diabetem 1. typu – kazuistika (Abstract) DMEV 2017;20(Suppl. 1):53 LIII. Diabetologické dny v Luhačovicích, 5. - 8. 4. 2017
- Hazdrová J, Bém R, Fejfarová V, Němcová A, Wosková V, Jirkovská A, Sutoris K, Thieme F, Dubský M. Autologní buněčná terapie hemodialyzované pacientky se syndromem diabetické nohy a kritickou končetinovou ischemií bez možnosti revascularizace. (Abstract). Léčba ran 2019;4(1):38 XVII. celostátní kongres s mezinárodní účastí České společnosti pro léčbu a hojení ran, Pardubice, 24. - 25. 1. 2019

Publikace, které přímo nesouvisejí s tématem dizertační práce

Články publikované v časopisech s IF

Spoluautor:

- Dubský M, Jirkovská A, Pagáčová L, Bém R, Němcová A, Fejfarová V, Wosková V, Jude EB. Impact of Inherited Prothrombotic Disorders on the Long-Term Clinical Outcome of Percutaneous Transluminal Angioplasty in Patients with Diabetes. J Diabetes Res. 2015;2015:369758. doi: 10.1155/2015/369758. Epub 2015 Jul 13. **IF 2015 = 2,43**
- Fejfarová V, Roztočil K, Svědínková A, Čermáková H, Dubský M, Bém R, Jirkovská A, Wosková V, Němcová A, Skibová J. The relationship between chronic venous insufficiency and diabetes mellitus. Int Angiol. 2017;36(1):90-91 **IF 2017 = 1,156**
- Fejfarová V, Jirkovská A, Dubský M, Game F, Vydláková J, Sekerková A, Franeková J, Kučerová M, Stříž I, Petkov V, Bém R, Wosková V, Němcová A, Skibová J. An alteration of lymphocytes subpopulation and immunoglobulins levels in patients with diabetic foot ulcers infected particularly by resistant pathogens. J Diabetes Res. 2016 **IF 2016 = 2,717**
- Fejfarová V, Tibenská H, Niklová J, Bém R, Dubský M, Wosková V, Němcová A, Jirkovská A, Jude E, Lánská V. Benefits of Acidifying Agents in Local Therapy of Diabetic Foot Ulcers Infected by Pseudomonas sp: A Pilot Study. Int J Low Extrem Wounds. 2019 Sep;18(3):262-268. doi: 10.1177/1534734619848573. Epub 2019 Jun 3. **IF 2019 = 1,212**

Články publikované v časopisech bez IF

Spoluautor:

- Fejfarová V, Jirkovská A, Bém R, Dubský M, Wosková, W, Němcová A. Diagnostika a terapie infekce u pacientů se syndromem diabetické nohy. Remedia 2014;24(1):15-20

2. Bém R, Jirkovská A, Fejfarová V, Dubský M, Němcová A, Wosková V. Jaké jsou naše hranice na záchranu končetiny u pacientů se syndromem diabetické nohy? *Léčba ran* 2016; 1(1):19-20
3. Fejfarová V, Jirkovská A, Petkov V, Řezaninová L, Bém R, Dubský M, Wosková V, Němcová A, Skibová J. [Has been changed numbers and characteristics of patients with major amputations indicated for the diabetic foot in our department during last decade?]. *Vnitr Lek.* 2016;62(12):969-975.
4. Fejfarová V, Jirkovská A, Bém R, Dubský M, Wosková V, Němcová A, Křížová M, Niklová J, Caňkářová O. [Special contact splints in postoperative care for patients with the diabetic foot]. *Rozhl Chir.* Summer 2016;95(7):257-61. Review.

Přednášky s publikovanými abstrakty v zahraničí

Spoluautor:

1. Dubský M, Jirkovská A, Pagáčová L, Bém R, Němcová A, Fejfarová V, Wosková V, Skibová J. Effect of inherited thrombophilia on the long-term outcome of percutaneous transluminal angioplasty in patients with diabetes (Abstract). *DFSG Abstract Book 2014*; 12(1):39, 12th Scientific Meeting of Diabetic Foot Study Group, Bratislava, Slovensko, 12. - 14. 9. 2014
2. Fejfarová V, Jirkovská A, Dragomirecka E, Bém R, Dubský M, Wosková V, Němcová A, Křížová M, Roztočil K, Svendíková A, Skibová J. Could the psychological characteristics of patients with peripheral arterial disease and diabetic foot influence the long-term outcomes of podiatric care? (Abstract). *The Hungarian Journal of Vascular Diseases* 2015; 22S(1):34 XXII. European Chapter Congress of the International Union of Angiology, Budapešť, Maďarsko, 6. - 9. 9. 2015
3. Fejfarová V, Jirkovská A, Polák J, Bém R, Dubský M, Wosková V, Němcová A, Křížová M, Skibová J. Screening of obstructive sleep apnea syndrome with respect to the incidence of macrovascular complications and impairment of microcirculation in patients with the diabetic foot (Abstract). *DFSG Abstract Book 2016*; 13(1):49 13th Scientific Meeting of Diabetic Foot Study Group, Stuttgart, Německo, 9. - 11. 9. 2016
4. Bém R, Dubský M, Voska L, Kříž J, Kočí Z, Kubinová Š, Němcová A, Turnovcová K, Fejfarová V, Pyšná A, Skibová J. Local application of human mesenchymal stromal cells from bone marrow or adipose tissue accelerated wound healing and neovascularization in diabetic rat (Abstract). *EWMA Abstract Book 2017*;17(1):OP050 27th European Wound Management Association, Amsterdam, Nizozemí, 3. - 5. 5. 2017
5. Fejfarová V, Polák J, Jirkovská A, Bém R, Dubský M, Wosková V, Němcová A, Křížová M, Skibová J, Klementová M. Macrovascular complications, microcirculation and healing status with relationship to the risk of obstructive sleep apnea syndrome in patients with the diabetic foot (Abstract). *EWMA Abstract Book 2017*;17(1):OP067 27th European Wound Management Association, Amsterdam, Nizozemí, 3. - 5. 5. 2017
6. Dubský M, Jirkovská A, Bém R, Němcová A, Wosková V, Fejfarová V, Pyšná A, Skibová J. The impact of inherited thrombophilia on the long-term outcome of percutaneous transluminal angioplasty in patients with diabetes (Abstract). *ADIT Abstract Book 2017*;9(1):29 9th Conference on Advances in Diabetes and Insulin Therapy, Bělehrad, Srbsko, 11. - 13. 5. 2017
7. Fejfarová V, Jirkovská A, Bém R, Dubský M, Wosková V, Němcová A, Křížová M, Niklová J, Tibenská H, Roztočil K, Čermáková H, Pyšná A, Vrátná E, Lánská V. Offloading in patients with the diabetic foot and peripheral arterial disease in postoperative care (Abstract). *Kazuistiky v angiologii* 2017;4(1):16-18 Angiologické dny, Praha, 22. 2. - 25. 2. 2017
8. Dubský M, Němcová A, Jirkovská A, Bém R, Fejfarová V, Pyšná A, Wosková V, Navrátil K, Skibová J. Recurrence of diabetic foot ulcers: 10-year follow-up analysis in Eurodiale subgroup (Abstract). *DFSG Abstract Book 2017*; 14(1):25 14th Scientific Meeting of Diabetic Foot Study Group, Porto, Portugalsko, 8. - 10. 9. 2017

Postery s publikovanými abstrakty v zahraničí

Spoluautor:

1. Bém R, Jirkovská A, Dubský M, Fejfarová V, Wosková V, Němcová A, Řezaninová L. 10 years' experience with negative pressure wound therapy in patients with diabetic foot – audit of indications and outcomes (Abstract). DFSG Abstract Book 2014; 12(1):92, 12th Scientific Meeting of Diabetic Foot Study Group, Bratislava, Slovensko, 12. - 14. 9. 2014
2. Wosková V, Jirkovská A, Bém R, Dubský M, Fejfarová V, Němcová A, Sixta B, Navrátil K. The first experience with outpatients foot surgery in diabetic patients (Abstract). DFSG Abstract Book 2014; 12(1):83, 12th Scientific Meeting of Diabetic Foot Study Group, Bratislava, Slovensko, 12. - 14. 9. 2014
3. Bém R, Dubský M, Kříž J, Kočí Z, Turnovcová K, Němcová A, Kubinová Š, Fejfarová V, Syková E, Skibová J, Jirkovská A. Local application of various types of human stem cells obtained from bone marrow and adipose tissue accelerated wound healing in diabetic rat model. (Abstract). Regen Med 2015;10(7s):248 World Congress on Regenerative Medicine, Leipzig Německo, 21.-23.10.2015
4. Bém R, Dubský M, Voska L, Kříž J, Kočí Z, Němcová A, Turnovcová K, Kubinová Š, Fejfarová V, Skibová J, Syková E, Jirkovská A. Human stem cells from bone marrow and adipose tissue accelerated neovascularization and wound healing in diabetic rat model. (Abstract). Diabetes 2016;65(Suppl 1):A164-5. 76th Scientific Sessions of American Diabetes Association, New Orleans, USA, 10.-14.6. 2016
5. Wosková V, Jirkovská A, Bém R, Dubský M, Fejfarová V, Němcová A, Navrátil K, Sixta B. Factors associated with positive bone cultures in patients with diabetic foot ulcers (Abstract). DFSG Abstract Book 2016; 13(1):65 13th Scientific Meeting of Diabetic Foot Study Group, Stuttgart, Německo, 9. - 11. 9. 2016
6. Wosková V, Jirkovská A, Bém R, Dubský M, Fejfarová V, Němcová A, Navrátil K. A negative bone culture may predict a lower incidence of major amputation in patients with the diabetic foot (Abstract). DFSG Abstract Book 2017; 14(1):82 14th Scientific Meeting of Diabetic Foot Study Group, Porto, Portugalsko, 8. - 10. 9. 2017
7. Vrátná E, Pyšná A, Bém R, Dubský M, Němcová A, Wosková V, Jirkovská A, Neškudla T, Girman P, Kožnarová R, Lánská V, Fejfarová V. Diabetic foot in patients after transplantation and its association with risk factors including education, prevention and physical activity (Abstract). DFSG Abstract Book 2017; 14(1):91 14th Scientific Meeting of Diabetic Foot Study Group, Porto, Portugalsko, 8. - 10. 9. 2017
8. Fejfarová V, Pavlů J, Bém R, Wosková V, Dubský M, Němcová A, Jirkovská A, Navrátil K, Sixta B, Křížová M, Niklová J, Pyšná A, Vrátná E, Lánská V. Removable contact splints in patients with diabetic foot under post-operative care (Abstract). DFSG Abstract Book 2017; 14(1):105 14th Scientific Meeting of Diabetic Foot Study Group, Porto, Portugalsko, 8. - 10. 9. 2017
9. Bem R, Dubský M, Kočí Z, Němcová A, Fejfarová V, Pyšná A, Šimůnková Z, Mrázová I, Kubinová Š. Local application of human mesenchymal stromal cells accelerated wound healing in diabetic porcine model (Abstract). DFSG Abstract Book 2017; 14(1):157 14th Scientific Meeting of Diabetic Foot Study Group, Porto, Portugalsko, 8. - 10. 9. 2017
10. Bem R, Dubsky M, Fejfarova V, Woskova V, Nemcova A, Rezaninova L, Skibova J, Pysna A. Identification of factors contributing to failure of ambulatory negative pressure wound therapy in patients with diabetic foot (Abstract). ATTD Abstract Book 2018;11(1):A110 11th Advances Technologies & Treatments for Diabetes Conference, Vídeň, Rakousko, 14. – 17. 2. 2018
11. Fejfarová V, Klementová M, Polák J, Bém R, Dubský M, Jirkovská A, Wosková V, Němcová A, Pyšná A, Vrátná E, Křížová M, Lánská V. The occurrence of obstructive sleep apnea syndrome in patients with diabetic foot and it's possible association with limb ischemia and wound healing (Abstract). DFSG Abstract Book 2018; 15(1):172 15th Scientific Meeting of Diabetic Foot Study Group, Berlin, Německo, 28. - 30. 9. 2018
12. Vrátná E, Němcová A, Bém R, Dubský M, Pyšná A, Tibenská H, Jirkovská A, Wosková V, Fejfarová V. Physical activity and it's relationship to the psychological status in patients with the diabetic foot (Abstract). DFSG Abstract Book 2018; 15(1):170 15th Scientific Meeting of Diabetic Foot Study Group, Berlin, Německo, 28. - 30. 9. 2018

13. Wosková V, Jirkovská A, Bém R, Dubský M, Fejfarová V, Navrátil K, Němcová A, Sutoris K. External fixation in the management of infected Charcot foot, 6-months follow-up results (Abstract). DFSG Abstract Book 2018; 15(1):74 15th Scientific Meeting of Diabetic Foot Study Group, Berlin, Německo, 28. - 30. 9. 2018
14. Woskova V, Jirkovska A, Bem R, Dubský M, Fejfarová V, Navratil K, Němcová A Sutoris K. One-Year Outcomes of External Fixation Treatment in Infected Charcot Foot Patients (Abstract). ISDF Abstract Book 2019; 8(O40.03):129, 8th International Symposium on the Diabetic Foot, Haag, Holandsko, 22. - 25. 5. 2019

Přednášky s publikovanými abstrakty v tuzemsku

Spoluautor:

1. Dubský M, Jirkovská A, Pagáčová L, Bém R, Fejfarová V, Němcová A, Skibová J. Mohou ovlivnit dědičné trombofilie restenózy po PTA u diabetiků? (Abstract). DMEV 2014;17(Suppl 1):21 L. Diabetologické dny v Luhačovicích, 10. - 22. 4. 2014
2. Bém R, Jirkovská A, Dubský M, Fejfarová V, Wosková V, Němcová A. Perspektivy léčby NPWT u syndromu diabetické nohy. (Abstract). Hojení ran 2014;8(1):10-11 XII. celostátní kongres s mezinárodní účastí České společnosti pro léčbu a hojení ran, Pardubice, 23. - 24. 1. 2014
3. Bém R, Jirkovská A, Dubský M, Fejfarová V, Wosková V, Němcová A, Řezaninová L. Dlouhodobé zkušenosti s ambulantní léčbou lokálním podtlakem u pacientů se syndromem diabetické nohy (Abstract). DMEV 2014;17(Suppl 1):20-21 L. Diabetologické dny v Luhačovicích, 10. - 12. 4. 2014
4. Fejfarová V, Jirkovská A, Bém R, Dubský M, Wosková V, Němcová A. Porucha biomechaniky nohy u pacientů s diabetem. (Abstract). Hojení ran 2014;8(1):14 XII. celostátní kongres s mezinárodní účastí České společnosti pro léčbu a hojení ran, Pardubice, 23. - 24. 1. 2014
5. Bém R, Jirkovská A, Dubský M, Němcová A, Bém R, Fejfarová V, Wosková V. Syndrom diabetické nohy a kalcifylaxe u dialyzovaných pacientů (Abstract). Kasuistiky v diabetologii 2014;12(Suppl 2):S7-8 Mezioborové sympozium s mezinárodní účastí, Syndrom diabetické nohy, Praha, 28. 11. 2014
6. Bém R, Jirkovská A, Dubský M, Fejfarová V, Wosková V, Němcová A, Skibová J. Příčiny selhání NPWT u syndromu diabetické nohy. (Abstract). Léčba ran 2015;1(1):26 XIII. celostátní kongres s mezinárodní účastí České společnosti pro léčbu a hojení ran, Pardubice, 22. - 23. 1. 2015
7. Fejfarová V, Jirkovská A, Bém R, Dubský M, Wosková V, Němcová A. Neobvyklé závažné komplikace syndromu diabetické nohy (Abstract). Léčba ran 2015;1(1):26-27 XIII. celostátní kongres s mezinárodní účastí České společnosti pro léčbu a hojení ran, Pardubice, 22. - 23. 1. 2015
8. Bém R, Dubský M, Kříž J, Kočí Z, Turnovcová K, Němcová A, Kubinová Š, Fejfarová V, Syková E, Jirkovská A. Lokální Aplikace lidských kmenových buněk vede k rychlejšímu hojení rány v potkaním modelu. (Abstract). DMEV 2015;18(Suppl. 1):24-5 LI. Diabetologické dny v Luhačovicích, 16. - 18. 4. 2015
9. Bém R, Dubský M, Kříž J, Kočí Z, Turnovcová K, Němcová A, Kubinová Š, Fejfarová V, Syková E, Jirkovská A. Zhodnocení efektu lokální aplikace humánních mononukleárních buněk kostní dřeně, mesenchymálních buněk kostní dřeně a mesenchymálních buněk z tukové tkáně na proces hojení rány v potkaním modelu (Abstract). Sborník abstrakt 2015; 7:44 VII. mezinárodní konference Bioimplantologie 2015, Brno, 29. - 30. 4. 2015
10. Dubský M, Jirkovská A, Bém R, Němcová A, Fejfarová V, Pagáčová L, Skibová J. Vliv vrozených trombofilních poruch na restenózy po perkutánní transluminální angioplastice u diabetiků (Abstract). Vnitřní lékařství 2015;61(6, Supp 2):4 XXXIV. Dny mladých internistů, Olomouc, 4. - 5. 6. 2015
11. Fejfarová V, Jirkovská A, Bém R, Dubský M, Wosková V, Němcová A, Křížová M. Sádrové dlahy v léčbě syndromu diabetické nohy (Abstract). Kasuistiky v diabetologii 2015;13(Suppl 1):9-11 Mezioborové sympozium s mezinárodní účastí, Syndrom diabetické nohy, Praha, 27. 11. 2015

12. Fejfarová V, Jirkovská A, Bém R, Dubský M, Wosková V, Němcová A, Křížová M, Skibová J. Zkušenosti s časným dlahováním končetin po operačních výkonech u pacientů se syndromem diabetické nohy (Abstract) DMEV 2016;19(Suppl. 1):22-23 LII. Diabetologické dny v Luhačovicích, 14. - 16. 4. 2016
13. Bém R, Dubský M, Němcová A, Fejfarová V, Kočí Z, Kubinová Š, Pyšná A. Lokální buněčná terapie ran v experimentálním modelu u prasete (Abstract). Léčba ran 2017;6(1):28 XV. celostátní kongres s mezinárodní účastí České společnosti pro léčbu a hojení ran, Pardubice, 26. - 27. 1. 2017
14. Fejfarová V, Wosková V, Bém R, Jirkovská A, Dubský M, Němcová A, Křížová M, Niklová J, Skibová J. Dlahování u syndromu diabetické nohy (Abstract). Léčba ran 2017;6(1):29 XV. celostátní kongres s mezinárodní účastí České společnosti pro léčbu a hojení ran, Pardubice, 26. - 27. 1. 2017
15. Dubský M, Jirkovská A, Bém R, Němcová A, Fejfarová V, Pyšná A, Wosková V. Recidiva syndromu diabetické nohy – desetileté sledování (Abstract) DMEV 2017;20(Suppl. 1):20 LIII. Diabetologické dny v Luhačovicích, 5. - 8. 4. 2017
16. Bém R, Dubský M, Kočí Z, Němcová A, Fejfarová V, Pyšná A, Kubinová Š. Lokální aplikace progenitorových buněk z kostní dřeně a tukové tkáně urychluje hojení rány u diabetických prasat (Abstract) DMEV 2017;20(Suppl. 1):17-18 LIII. Diabetologické dny v Luhačovicích, 5. - 8. 4. 2017
17. Wosková V, Jirkovská A, Bém R, Dubský M, Fejfarová V, Navrátil K, Němcová A. Analýza rizikových faktorů asociovaných s pozitivním kultivačním nálezem z kostní biopsie u pacientů se syndromem diabetické nohy (Abstract) DMEV 2017;20(Suppl. 1):38 LIII. Diabetologické dny v Luhačovicích, 5. - 8. 4. 2017
18. Fejfarová V, Pavlů J, Bém R, Wosková V, Dubský M, Němcová A, Jirkovská A, Křížová M, Niklová J. Problematika castování (tvorby speciálních kontaktních fixací) u syndromu diabetické nohy (Abstract) Kazuistiky v angiologii 2017;4(S1):13-14 IX. ročník Rány a Defekty – konference s mezinárodní účastí o hojení chronických ran, kožních defektů a reparaci tkání, Třinec, 1. - 2. 6. 2017
19. Bém R, Dubský M, Fejfarová V, Němcová A, Pyšná A, Wosková V. Moderní lokální léčba syndromu diabetické nohy – biologické kryty a buněčná terapie (Abstract). Kazuistiky v diabetologii 2017;15(Suppl 1):S18-19 Mezioborové sympozium s mezinárodní účastí, Syndrom diabetické nohy, Praha, 24. 11. 2017
20. Fejfarová V, Bém R, Dubský M, Wosková V, Němcová A, Pyšná A, Jirkovská A, Sixta B, Navrátil K, Niklová J, Křížová M, Tibenská H, Vrátná E, Lánská V. Zkušenosti se speciálními kontaktními dlahami a fixacemi (Abstract). Kazuistiky v diabetologii 2017;15(Suppl 1):S14-17 Mezioborové sympozium s mezinárodní účastí, Syndrom diabetické nohy, Praha, 24. 11. 2017
21. Fejfarová V, Pavlů J, Bém R, Wosková V, Dubský M, Němcová A, Jirkovská A, Sixta B, Sutoris K, Křížová M, Niklová J, Tibenská H, Pyšná A, Vrátná E, Lánská V. Účinnost odlehčovacích pomůcek v pooperační péči u pacientů se syndromem diabetické nohy se superioritou snímatelných kontaktních dlah (Abstract) DMEV 2018; 20(Suppl. 1):20 54. Diabetologické dny v Luhačovicích, 25. - 28. 4. 2018
22. Fejfarová V, Tibenská H, Niklová J, Bém R, Dubský M, Wosková V, Němcová A, Pyšná A, Jirkovská A. Možnosti ovlivnění extracelulární matrix při léčbě syndromu diabetické nohy – první zkušenosti (Abstract). Léčba ran 2018;7(1):25 XVI. celostátní kongres s mezinárodní účastí České společnosti pro léčbu a hojení ran, Pardubice, 25. - 26. 1. 2018
23. Pyšná A, Dubský M, Lovásová V, Němcová A, Fejfarová V, Wosková V, Navrátil K, Chlupáč J, Šimůnková Z, Bém R. Modely ischemických ran u diabetického prasete jako příprava k lokální buněčné terapii (Abstract). Léčba ran 2018;7(1):25-26 XVI. celostátní kongres s mezinárodní účastí České společnosti pro léčbu a hojení ran, Pardubice, 25. - 26. 1. 2018
24. Fejfarová V, Bém R, Dubský M, Wosková V, Němcová A, Jirkovská A, Pyšná A, Vrátná E, Křížová M, Niklová J, Tibenská H, Bieliková J. Filc-padding u syndromu diabetické nohy (Abstract). Léčba ran 2018;7(1):27 XVI. celostátní kongres s mezinárodní účastí České společnosti pro léčbu a hojení ran, Pardubice, 25. - 26. 1. 2018
25. Fejfarová V, Klementová M, Polák J, Bém R, Dubský M, Jirkovská A, Wosková V, Němcová A, Pyšná A, Vrátná E, Křížová M, Lánská V. Does obstructive sleep apnea syndrome play a key role in the prognosis of

- the diabetic foot? (Abstrakt) Kazuistiky v angiologii 2018; 5(1):26-27 Angiologické dny, Praha, 18. – 20. 3. 2018
26. Dubský M, Hazdrová J, Němcová A, Bém R. Implementation of good manufacturing practice for advanced therapy medicinal product – the clinical point of view (Abstract). Sborník přednášek Stem Cells and Cell Therapy 2018;7(1):11 7th Stem Cells and Cell Therapy: From research to Modern Applications, Černá Hora, 11. – 12. 10. 2018
 27. Fejfarová V, Bém R, Dubský M, Wosková V, Němcová A, Hazdrová J, Jirkovská A. Novinky v angiologii (Abstract). Kazuistiky v diabetologii 2018;16(Suppl 1):S23-28 Mezioborové sympozium s mezinárodní účastí, Syndrom diabetické nohy, Praha, 30. 11. 2018
 28. Dubský M, Fejfarová V, Bém R, Hazdrová J, Němcová A, Jirkovská A, Wosková V. Klasifikace syndromu diabetické nohy a jejich prediktivní hodnota v hojení ulcerací. (Abstract). Léčba ran 2019;4(1):26 XVII. celostátní kongres s mezinárodní účastí České společnosti pro léčbu a hojení ran, Pardubice, 24. - 25. 1. 2019
 29. Fejfarová V, Bém R, Dubský M, Wosková V, Němcová A, Hazdrová J, Jirkovská A, Bieliková J. Atypické rány u pacientů se syndromem diabetické nohy (Kazuistiky) (Abstract). Léčba ran 2019;4(1):26 XVII. celostátní kongres s mezinárodní účastí České společnosti pro léčbu a hojení ran, Pardubice, 24. - 25. 1. 2019
 30. Dubský M, Jirkovská A, Bém R, Němcová A, Hazdrová J, Fejfarová V, Icks A, Ogurtsova K, Morbach S. Porovnání recidiv syndromu diabetické nohy a jejich rizik během patnáctiletého sledování v českém a německém podiatrickém centru (Abstract) DMEV 2019; 22(Suppl. 1):23 LV. Diabetologické dny v Luhačovicích, 10. - 13. 4. 2019

Postery s publikovanými abstrakty v tuzemsku

1. Němcová A, Bém R, Dubský M, Fejfarová V, Wosková V, Jirkovská A. Chyby a omyly v terapii syndromu diabetické nohy - vybrané kazuistiky. (Abstract). Hojení ran 2014;8(1):32-33 XII. celostátní kongres s mezinárodní účastí České společnosti pro léčbu a hojení ran, Pardubice, 23. - 24. 1. 2014
2. Němcová A, Jirkovská A, Dubský M, Bém R, Fejfarová V, Wosková V. Neobvyklá etiologie ulcerace na lýtku u pacientky s diabetem (Abstract). Kazuistiky v diabetologii 2015; 13(Suppl 1):22-23 Mezioborové sympozium s mezinárodní účastí, Syndrom diabetické nohy, Praha, 27. 11. 2015
3. Němcová A, Jirkovská A, Dubský M, Bém R, Fejfarová V, Pyšná A, Wosková V. Rozvoj sepse u pacienta s „drobným“ plantárním defetem s osteomyelitidou (Abstract). Kazuistiky v diabetologii 2017;15(Suppl 1):S33 Mezioborové sympozium s mezinárodní účastí, Syndrom diabetické nohy, Praha, 24. 11. 2017

Spoluautor:

1. Wosková V, Jirkovská A, Bém R, Dubský M, Fejfarová V, Němcová A. Využití měření transkutánní tenze kyslíku u pacientů se syndromem diabetické nohy v diabetologickém centru. (Abstract). DMEV 2015;18(Suppl. 1):43 LI. Diabetologické dny v Luhačovicích, 16. - 18. 4. 2015
2. Fejfarová V, Jirkovská A, Dragomirecka E, Bém R, Dubský M, Wosková V, Němcová A, Křížová M, Skibová J. Ovlivňují psychologické charakteristiky dlouhodobé výsledky syndromu diabetické nohy? (Abstract). DMEV 2015;18(Suppl. 1):44 LI. Diabetologické dny v Luhačovicích, 16. - 18. 4. 2015
3. Fejfarová V, Jirkovská A, Polák J, Bém R, Dubský M, Wosková V, Němcová A, Křížová M, Skibová J. Syndrom obstrukční spánkové apnoe u pacientů se syndromem diabetické nohy (Abstract). Kazuistiky v diabetologii 2016;14(Suppl 1):26 Mezioborové sympozium s mezinárodní účastí, Syndrom diabetické nohy, Praha, 25. 11. 2016
4. Fejfarová V, Klementová M, Polák J, Jirkovská A, Bém R, Dubský M, Wosková V, Němcová A, Pyšná A, Vrátná E, Křížová M, Lánská V. Výskyt syndromu obstrukční spánkové apnoe a jeho možná asociace s makrovaskulárními komplikacemi, poruchou mikrocirkulace a hojením u pacientů se syndromem diabetické nohy (Abstract) DMEV 2017;20(Suppl. 1):41 LIII. Diabetologické dny v Luhačovicích, 5. - 8. 4. 2017

5. Vrátná E, Pyšná A, Bém R, Dubský M, Němcová A, Wosková V, Jirkovská A, Neškudla T, Girman P, Kožnarová R, Lánská V, Fejfarová V. Výskyt syndromu diabetické nohy u diabetiků recentně po orgánové transplantaci s ohledem na rizikové faktory včetně míry edukace, prevence a fyzické aktivity (Abstract). Kazuistiky v diabetologii 2017;15(Suppl 1):S35 Mezioborové sympozium s mezinárodní účastí, Syndrom diabetické nohy, Praha, 24. 11. 2017
6. Hazdrová J, Bém R, Fejfarová V, Němcová A, Wosková V, Jirkovská A, Sutoris K, Thieme F, Dubský M. Zhojení chronického defektu paty u transplantovaného pacienta pomocí metod moderní terapie (Abstract). Kazuistiky v diabetologii 2018;16(Suppl 1):S30-31 Mezioborové sympozium s mezinárodní účastí, Syndrom diabetické nohy, Praha, 30. 11. 2018
7. Vrátná E, Bém R, Dubský M, Němcová A, Wosková V, Jirkovská A, Hazdrová J, Lánská V, Fejfarová V. Pohybová aktivita a její vztah k psychosociálním změnám u pacientů se syndromem diabetické nohy (Abstract). Kazuistiky v diabetologii 2018;16(Suppl 1):S35 Mezioborové sympozium s mezinárodní účastí, Syndrom diabetické nohy, Praha, 30. 11. 2018

10 Přílohy dizertační práce

Příloha 1: Němcová A, Dubský M, Jirkovská A, Šedivý P, Drobný M, Hájek M, Dezortová M, Bém R, Fejfarová V, Pyšná A. [Diabetic foot syndrome: importance of calf muscles MR spectroscopy in the assessment of limb ischemia and effect of revascularization]. Vnitr Lek. Spring 2017;63(4):236-241.

Příloha 2: Němcová A, Jirkovská A, Dubský M, Bém R, Fejfarová V, Wosková V, Šedivý P. MR spectroscopy in the assessment of effect of revascularization in diabetic patients with critical limb ischemia (Abstract). DFSG Abstract Book 2016; 13(1):50 13th Scientific Meeting of Diabetic Foot Study Group, Stuttgart, Německo, 9. - 11. 9. 2016

Příloha 3: Němcová A, Jirkovská A, Dubský M, Bém R, Fejfarová V, Šedivý P, Pyšná A. Hodnocení efektu revaskularizace u pacientů se syndromem diabetické nohy pomocí MR spektroskopie lýtkových svalů (Abstract) DMEV 2017;20(Suppl. 1):29-30 LIII. Diabetologické dny v Luhačovicích, 5. - 8. 4. 2017

Příloha 4: Nemcova A, Jirkovska A, Dubsky M, Bem R, Fejfarova V, Woskova V, Pysna A, Buncova M. Perfusion scintigraphy in the assessment of autologous cell therapy in diabetic patients with critical limb ischemia. Physiol Res. 2018 Aug 16;67(4):583-589. Epub 2018 May 10. **IF 2018 = 1,324**

Příloha 5: Němcová A, Jirkovská A, Dubský M, Bém R, Fejfarová V, Wosková V, Skibová J. Hodnocení efektu buněčné terapie syndromu diabetické nohy pomocí perfuzní scintigrafie lýtkových svalů (Abstract) DMEV 2016;19(Suppl. 1):51 LII. Diabetologické dny v Luhačovicích, 14. - 16. 4. 2016

Příloha 6: Nemcova A, Jirkovska A, Dubsky M, Kolesar L, Bem R, Fejfarova V, Pysna A, Woskova V, Skibova J, Jude EB. Difference in Serum Endostatin Levels in Diabetic Patients with Critical Limb Ischemia Treated by Autologous Cell Therapy or Percutaneous Transluminal Angioplasty. Cell Transplant. 2018 Sep;27(9):1368-1374. doi: 10.1177/0963689718775628. Epub 2018 Jun 4. **IF 2017 = 2,885**

Příloha 7: Němcová A, Jirkovská A, Dubský M, Bém R, Fejfarová V, Wosková V, Kolesar L, Skibová J. Endostatin as a potential marker of angiogenesis after autologous cell therapy in diabetic patients with critical limb ischemia. (Abstract). Diabetes 2016;65(Suppl. 1):A37 76th Scientific Sessions of American Diabetes Association, New Orleans, USA, 10.-14.6. 2016

Příloha 8: Němcová A, Jirkovská A, Dubský M, Bém R, Fejfarová V, Pyšná A, Skibová J. Comparison of long-term outcomes in diabetic patients with critical limb ischemia treated by autologous cell therapy, percutaneous transluminal angioplasty or conservative therapy (Abstract). DFSG Abstract Book 2017; 14(1):31 14th Scientific Meeting of Diabetic Foot Study Group, Porto, Portugalsko, 8. - 10. 9. 2017

Příloha 9: Němcová A, Jirkovská A, Bém R, Dubský M, Fejfarová V, Wosková V. Sensitivity and specificity of calcaneal quantitative ultrasonometry for diagnosis of Charcot foot in patients with diabetic neuropathy (Abstract). DFSG Abstract Book 2014; 12(1):27, 12th Scientific Meeting of Diabetic Foot Study Group, Bratislava, Slovensko, 12. - 14. 9. 2014

Příloha 10: Němcová, Jirkovská A, Bém R, Dubský M, Fejfarová V, Wosková V. Význam kvantitativní ultrasonometrie calcaneu pro diagnostiku Charcotovy neuropatické osteoartropatie ve srovnání s denzitometrií páteře a kyčle (Abstract). DMEV 2014;17(Suppl 1):47 L. Diabetologické dny v Luhačovicích, 10. - 12. 4. 2014

Příloha 11: Němcová A, Jirkovská A, Bem R, Dubský M, Fejfarová V, Wosková V. The association of cardiovascular diseases with major amputation and mortality in patients with diabetic foot syndrome (Abstract). ISDF Abstract Book 2015; 7(P22):17th International Symposium on the Diabetic Foot, Haag, Holandsko, 20. - 23. 5. 2015

Příloha 12: Němcová A, Jirkovská A, Dubský M, Bém R, Fejfarová V, Wosková V, Skibová J. Relation of lipid disorders to major amputation and mortality in patients with diabetic foot (Abstract). ADIT Abstract Book 2017;9(1):47 9th Conference on Advances in Diabetes and Insulin Therapy, Bělehrad, Srbsko, 11. – 13. 5. 2017

Příloha 13: Němcová A, Jirkovská A, Bém R, Dubský M, Fejfarová V, Wosková V, Skibová J. Asociace kardiovaskulárních onemocnění a jejich rizikových faktorů s amputacemi a mortalitou u pacientů se syndromem diabetické nohy (Abstract). Vnitřní lékařství 2015;61(6, Supp 2):1 XXXIV. Dny mladých internistů, Olomouc, 4. – 5. 6. 2015

Příloha 14: Němcová A, Jirkovská A, Bém R, Dubský M, Fejfarová V, Wosková V, Skibová J. Poruchy metabolismu lipidů u pacientů se syndromem diabetické nohy – efektivita terapie a vztah těchto poruch k amputacím a mortalitě (Abstract). Sborník abstrakt 2016;23(1):51 XXIII. Kongres České internistické společnosti ČLS J. E. Purkyně, 21. – 24. 9. 2016

Příloha 15: Němcová A, Jirkovská A, Bém R, Dubský M, Fejfarová V, Wosková V, Skibová J. Ovlivňují kardiovaskulární onemocnění amputace a mortalitu u pacientů se syndromem diabetické nohy? (Abstract). DMEV 2015;18(Suppl. 1):43 LI. Diabetologické dny v Luhačovicích, 16. - 18. 4. 2015