

MASARYKOVA UNIVERZITA

Lékařská fakulta



**NEUROPATICKÁ BOLEST:
SOUČASNÁ KLASIFIKACE A DIAGNOSTIKA**

Habilitační práce

(Komentovaný soubor prací)

MUDr. Eva Vlčková, Ph.D. (roz. Moravcová)

Neurologická klinika LF MU a FN Brno

Brno 2018

OBSAH:

PŘEDMLUVA A PODĚKOVÁNÍ	7
ABSTRAKT	9
ABSTRACT	11
I. PŘEHLED PROBLEMATIKY	13
1. Definice neuropatické bolesti a její klinický význam	13
1.1. Definice bolesti a jejích základních typů	13
1.2. Rozdíly v klinické manifestaci neuropatické a nociceptivní bolesti a význam jejich odlišení	15
1.3. Epidemiologie neuropatické bolesti	16
2. Klasifikace neuropatické bolesti	17
2.1. Původní klasifikační systém vycházející z IASP/ NeuPSIG definice	17
2.2. Revidovaný (a v současnosti doporučovaný) klasifikační systém	18
<i>Schéma 1: Blokový diagram zobrazující klasifikační systém využitelný ke stanovení míry pravděpodobnosti neuropatické bolesti</i>	<i>19</i>
2.2.1. Stanovení diagnózy „možné neuropatické bolesti“	20
2.2.2. Stanovení diagnózy „pravděpodobné neuropatické bolesti“	22
2.2.3. Stanovení diagnózy „potvrzené (jisté) neuropatické bolesti“	23
2.2.4. Specifické typy diagnóz nesplňující kritéria neuropatické bolesti v rámci současného diagnosticko-klasifikačního schématu	25
3. Diagnostika neuropatické bolesti	27
3.1. Anamnéza vč. specializovaných škál a dotazníků	28
3.1.1. Senzitivní symptomy	28
3.1.2. Hodnocení senzitivních symptomů diagnostice neuropatické bolesti ...	32
3.1.3. Kvantifikace intenzity bolesti a dalších senzitivních symptomů	34
3.1.4. Hodnocení změn klinického stavu pacienta a vývoje intenzity bolesti..	35
3.1.5. Dotazníky využívané v diagnostice a bližší specifikaci neuropatické bolesti	36
3.1.5.1. Screeningové dotazníkové nástroje určené pro identifikaci pacientů s neuropatickou bolestí	37
3.1.5.2. Dotazníky umožňující detailnější hodnocení přítomnosti a/nebo intenzity jednotlivých symptomů neuropatické bolesti	40

3.1.5.3. Hodnocení symptomových profilů pomocí dotazníkových nástrojů	41
3.2. Klinické neurologické vyšetření zaměřené na vyšetření senzitivity	43
3.2.1. Základní klinické vyšetření senzitivity	43
3.2.2. Kvantitativní testování senzitivity	43
3.2.2.1. Limitace kvantitativního testování senzitivity	47
3.2.2.2. Komplexní protokol kvantitativního testování senzitivity	48
3.2.2.3. Kvantitativní testování senzitivity jako podklad pro hodnocení senzitivních profilů	49
3.2.2.3.1. Přístupy k hodnocení senzitivních profil pomocí QST metod	51
3.2.2.4. Dynamické metody kvantitativního testování senzitivity	55
3.2.3. Doporučení pro využití testování senzitivity vč. QST v diagnostice neuropatické bolesti	57
3.3. Diagnostické testy potvrzující lézi nebo onemocnění somatosenzitivního nervového systému	60
3.3.1. Zobrazovací vyšetření v diagnostice neuropatické bolesti	61
3.3.1.1. Nové možnosti zobrazovacích metod periferních nervů	61
3.3.1.2. Funkční zobrazení mozku	61
3.3.2. Kožní biopsie zaměřená na průkaz morfologických změn intraepidermálních tenkých nervových vláken	64
3.3.2.1. Odběr vzorků kožní biopsie	64
3.3.2.2. Zpracování a hodnocení vzorků kožní biopsie	65
3.3.2.3. Méně obvyklé markery umožňující vizualizaci specifických populací nervových vláken	67
3.3.2.4. Vztah nálezů kožní biopsie k dalším diagnostickým metodám	67
3.3.2.5. Specificita kožní biopsie pro hodnocení neuropatie tenkých vláken	68
3.3.2.6. Kožní biopsie u jednotlivých diagnostických jednotek	68
3.3.2.6.1. Neuropatie tenkých vláken	68
3.3.2.6.2. Postherpetická neuralgie	70
3.3.2.6.3. Nálezy u méně obvyklých diagnostických jednotek	70

3.3.2.7. Doporučení pro využití kožní biopsie v diagnostice neuropatické bolesti	71
3.3.3. Korneální konfokální mikroskopie	72
3.3.4. Neurofyziologické testy v diagnostice neuropatické bolesti	74
3.3.4.1. Elektromyografické vyšetření	74
3.3.4.2. Evokované potenciály	76
3.3.4.2.1. Laserem-evokované potenciály	77
3.3.4.2.2. Další modalitty nociceptivních evok. potenciálů	78
3.3.4.3. Elektrofyzilogické reflexy	80
3.3.4.3.1. Trigemínové reflexy	80
3.3.4.3.2. Další reflexy zvažované pro účely diagnostiky neuropatické bolesti	81
3.3.4.4. Mikroneurografie	83
3.3.4.5. Testování funkce autonomního nervového systému	84
3.3.4.5.1. Hodnocení lokálních mikrocirkulačních změn	85
3.3.4.5.2. Testy sudomotorických funkcí	85
3.3.4.5.3. Testy kardiovaskulárních autonomních funkcí	86
3.3.4.5.4. Souhrn a doporučení v souvislosti s využitím testů autonomního nervového systému v diagnostice neuropatické bolesti	87
3.3.5. Molekulárně-genetická diagnostika u pacientů s neuropat. bolestí	89

II. KOMENTOVANÝ SOUBOR VLASTNÍCH PRACÍ

1. Moravcová E, Bednařík J. Počítačem asistované stanovení termického prahu. <i>Cesk Slov Neurol N</i> 2003; 66/99: 263-269.	95
2. Moravcová E, Bednařík J, Feit J, Sommer C. Hodnocení intraepidermální hustoty tenkých nervových vláken z kožní biopsie u pacientů s polyneuropatií. <i>Cesk Slov Neurol N</i> 2005a; 68/101: 219-226.	103
3. Moravcova E, Bednařík J, Svobodník A, Dušek L. Reproducibility of thermal threshold assessment in small-fibre neuropathy patients. <i>Scripta medica (Brno)</i> 2005b; 78(3): 177-184.	112
4. Vlckova-Moravcova E, Bednarik J, Belobradkova J, Sommer C. Small-fibre involvement in diabetic patients with neuropathic foot pain. <i>Diabet Med</i> 2008;25(6):692-699.	120
5. Vlckova-Moravcova E, Bednarik J, Dušek L, Toyka KV, Sommer C. Diagnostic validity of epidermal nerve fiber densities in painful sensory neuropathies. <i>Muscle and Nerve</i> 2008a; 37: 50-60.	129

6. *Bednarik J, Vlckova-Moravcova E, Bursova S, et al. Etiology of small-fiber neuropathy. J Peripher Nerv Syst 2009;14:177-183. 141*
7. *Vlčková-Moravcová E, Bednařík J. Painful sensory neuropathies in the elderly. Scripta medica (Brno) 2009;82(1):16-24. 149*
8. *Scherens A, Maier C, Haussleiter IS, et al. Painful or painless lower limb dysesthesias are highly predictive of peripheral neuropathy: comparison of different diagnostic modalities. Eur J Pain 2009;13(7):711-8. 159*
9. *Vlčková E, Bednařík J, Buršová E, Šajgalíková K, Mlčáková L. Spektrální analýza variability srdeční frekvence – normativní data. Cesk Slov Neurol N 2010; 73/106(6): 663-672. 168*
10. *Buršová Š, Vlčková E, Hnojčíková M, et al. Validita a prediktivní hodnota skriningových testů u prediabetické a časně diabetické polyneuropatie. Cesk Slov Neurol N 2012a; 75/108(5):562-572. 179*
11. *Buršová Š, Vlčková E, Hnojčíková M, et al. Vyšetření hustoty intraepidermálních nervových vláken z kožní biopsie – normativní data. Cesk Slov Neurol N 2012b; 75/108(4):455-459. 191*
12. *Buršová Š, Vlčková E, Hnojčíková M, et al. Přístrojově asistované kvantitativní testování senzitivity - normativní data. Cesk Slov Neurol N 2012c; 75/108(4):444-453. 197*
13. *Bursova S, Dubovy P, Vlckova-Moravcova E, et al. Expression of growth-associated protein 43 in the skin nerve fibers of patients with type 2 diabetes mellitus. J Neurol Sci 2012d;315(1-2):60-63. 208*
14. *Divisova S, Vlckova-Moravcova E, Hnojčíková M, et al. Prediabetes/early diabetes-associated neuropathy predominantly involves sensory small fibres. J Peripher Nerv Syst 2012;17:341-350. 213*
15. *Vlčková E, Šrotová I. Vyšetření senzitivity (minimonografie). Cesk Slov Neurol N 2014; 77/110(4): 402-418. 225*
16. *Škorňa M, Kopacik R, Vlckova E, Adamova B, Kostalova M, Bednarik J. Small nerve fiber pathology in critical illness documented by serial skin biopsies Muscle Nerve 2015;52(1):28-33. 241*
17. *Šrotová I, Vlčková E, Straková J, et al. Validace české verze komplexního protokolu kvantitativního testování senzitivity. Cesk Slov Neurol N 2015a; 78/111(4): 442-452. 248*
18. *Šrotová I, Vlčková E, Straková J, et al. Validace české verze Neuropathic Pain Symptom Inventory (NPSI_{cz}). Cesk Slov Neurol N 2015b; 78/111: 45-56. 260*
19. *Šrotová I, Vlčková E, Bednařík J. Autonomní dysfunkce a její diagnostika u roztroušené sklerózy. Cesk Slov Neurol N 2016; 79/ 112(2): 188-198. 273*
20. *Divisova S, Vlckova E, Srotova I, et al. Intraepidermal nerve-fibre density as a biomarker of the course of neuropathy in patients with type 2 diabetes mellitus. Diabet Med 2016; 33(5): 650-654. 285*
21. *Kincová S, Vlčková E, Šrotová I, Raputová J, Bednařík J. Dynamické metody kvantitativního testování senzitivity (QST). Cesk Slov Neurol N 2016; 79/ 112: 68-76. 291*

22. Kovalova I, Vlckova E, Bednarik J. Broadening the spectrum of controls for skin biopsy in painful neuropathies: spondylotic cervical myelopathy patients with painful feet. *Brain Behav* 2016; 6(3): e00444. DOI: 10.1002/brb3.444. ... 301
23. Vlčková E, Šrotová E, Bednařík J. Sympatická kožní odpověď v diagnostice neuropatie tenkých vláken. *Cesk Slov Neurol N* 2016; 79/ 112(1): 52-60. 307
24. Kovařová I, Chmelíková M, Vlčková E, et al. Hodnocení rohovkové inervace pomocí konfokální mikroskopie. *Cesk Slov Neurol N* 2017; 80/113(1): 49-57... 317
25. Raputova J, Srotova I, Vlckova E, et al. Sensory phenotype and risk factors for painful diabetic neuropathy: a cross-sectional observational study. *Pain* 2017;158(12):2340-2353. 327
26. Vlčková E, Bednařík J. Současný pohled na kontraindikace a komplikace elektromyografie. *Cesk Slov Neurol N* 2017; 80/113(1): 43-48. 342
27. Srotova I, Vlckova E, Dusek L, Bednarik J. A-waves increase the risk of developing neuropathy. *Brain Behav* 2017;7(8):e00760. 349
28. Raputová J, Vlčková E, Kočica J, et al. Evokované potenciály vyvolané kontaktním teplem – vliv fyziologických proměnných. *Cesk Slov Neurol N: submitováno*.... 357

III. SOUHRN: Přínos autorky k jednotlivým diagnostickým modalitám využívaným u pacientů s neuropatickou bolestí	376
1. Dotazníkové nástroje	376
2. Testování senzitivity vč. QST	377
3. Kožní biopsie	378
4. Konfokální mikroskopie rohovky (CCM)	380
5. Elektromyografie (vč. kondukčních studií periferních nervů)	380
6. Nociceptivní evokované potenciály	381
7. Testování autonomních funkcí	381
IV. LITERATURA	383
V. POUŽITÉ ZKRATKY	404

PŘEDMLUVA A PODĚKOVÁNÍ

Předkládaná habilitační práce je komentovaným souborem 28 publikací autorky vztahujících se k problematice neuropatické bolesti. V úvodu obsahuje komplexní přehled problematiky současné klasifikace a diagnostiky neuropatické bolesti zahrnující v relevantních místech odkazy na jednotlivé komentované publikace. Druhou část představují vlastní komentované práce. Závěr habilitační práce pak tvoří souhrn přínosu autorky k jednotlivým krokům diagnostického procesu neuropatické bolesti, resp. metodám využívaným v této diagnostice.

Autorka práce děkuje:

- vedoucím pracovníkům Neurologické kliniky LF MU a FN Brno, především panu prof. MUDr. Josefu Bednaříkovi, CSc. a také panu prim. MUDr. Stanislavu Voháňkovi, CSc. a panu prof. MUDr. Zdeňku Kadaňkovi, CSc. za mnohaletou mimořádnou podporu a spolupráci, vytvoření vysoce nadstandartních podmínek pro vědeckou činnost i podnětnou diskuzi k jejím výsledkům a cenné profesionální rady
- spolupracujícím kolegům a svým doktorandům z Neurologické kliniky LF MU a FN Brno (zejm. MUDr. Ivě Šrotové, MUDr. Šárce Divišové – Buršové, Ph.D., doc. MUDr. Blance Adamové, Ph.D., MUDr. Janě Raputové, MUDr. Anetě Rajdové, MUDr. Ivaně Kovalové, Ph.D., MUDr. Soně Kincové, MUDr. Marii Hnojčikové, MUDr. Miroslavu Škorňovi, MUDr. Davidovi Kecovi a MUDr. Romanovi Kopáčíkovi) za produktivní spolupráci při přípravě a realizaci projektů, podíl na náborech a vyšetřování pacientů a zpracování výsledků v jednotlivých dílčích projektech
- panu prof. RNDr. Petru Dubovému, DrSc. z Anatomického ústavu LF MU Brno za spolupráci na problematice kožních biopsií
- paní prof. Claudii Sommer, MD a prof. Nurcan Üçeyler, MD z Neurologické kliniky Univerzitní nemocnice ve Würzburgu (Německo) za zaučení v metodice kožních biopsií a následnou intenzivní, vstřícnou a podnětnou spolupráci na navazujících mezinárodních projektech.
- zdravotním sestřám a laborantkám Neurologické kliniky FN Brno a především její elektrofyziologické laboratoře (zejm. paní Janě Novohradské, Marii Šestákové, Melánii

- Švestkové, Martině Špičákové a Marii Voborné) za spolupráci při vyšetřeních pacientů, pomoc s organizací projektů a zavádění jednotlivých diagnostických metod
- laborantkám Ústavu patologie FN Brno (paní Haně Rychtecké a Janě Zaorálkové), Anatomického ústavu LF MU Brno (paní Bc. Jitce Mikuláškové a Daně Kutějové) a Neurologické kliniky Univerzitní nemocnice ve Würzburgu (Německo) (paní Barbaře Gado, Barbaře Broll, Barbaře Dekant a Hiltrude Klüpfel) za pomoc při zpracování vzorků kožních biopsií.

 - institucím, poskytujícím finanční podporu pro jednotlivé dílčí projekty, tedy:
 1. Interní grantové agentuře Fakultní nemocnici Brno (grant Neuropatie tenkých vláken č. 15/2000 + institucionální podpora FN Brno z MZ ČR – RVO: FNBr - 65269705)
 2. Ministerstvu školství, mládeže a tělovýchovy a Lékařské fakultě Masarykovy univerzity (Výzkumný záměr MSMT 0021622404 + projekt Specifického výzkumu z programu podpory studentských projektů na Masarykově univerzitě v letech 2011 a 2014 -2017)
 3. Evropské neurologické společnosti (výzkumný grant European Neurological Society pro účely půlroční zahraniční stáže na Neurologické klinice Univerzitní nemocnice v německém Würzburgu)
 4. Interní grantové agentuře Ministerstva zdravotnictví ČR (grantové projekty č. NS 9667-4 „Bolestivá diabetická neuropatie“, řešitel prof. MUDr. Josef Bednařík, CSc., a NT 13823-4 „Specifické charakteristiky neuropatické bolesti centrálního a periferního typu“, řešitel Eva Vlčková)
 5. Evropské unii (mezinárodní kolaborativní projekt vzniklý v rámci 7. rámcového programu EU - FP7 Health.2013.2.2.1-5: Understanding and controlling pain: „Non-coding RNAs in neurogenic and neuropathic pain mechanisms and their application for risk assessment, patient stratification and personalised pain medicine (ncRNAPain)“, řešitel prof. Michaela Kress, MD, PhD.)
 6. Středoevropskému technologickému institutu (CEITEC, interní zdroje)

 - v neposlední řadě všem pacientům a zdravým dobrovolníkům, participujícím na jednotlivých projektech

 - největší poděkování patří rodině (zejména mojí mamince) za obdivuhodnou trpělivost a její celoživotní maximální podporu mé vědecké i klinické práce.

ABSTRAKT

Neuropatická bolest je v souladu s aktuální definicí bolest vznikající důsledkem léze nebo nemoci postihující somatosenzitivní nervový systém. Jedná se o závažný klinický syndrom, jehož prevalence dosahuje podle epidemiologických studií v Evropské populaci kolem 7-8 %. Neuropatická bolest může být projevem řady neurologických onemocnění, kromě toho je neuropatická komponenta bolesti přítomna také u významné části pacientů s bolestí vertebrogenní a nádorovou. V rámci diagnostiky neuropatické bolesti lze v souladu s recentně revidovaným klasifikačním schématem stanovit pravděpodobnost, s níž je bolest u příslušného pacienta bolestí neuropatickou. Správná diagnostika neuropatické bolesti je přitom velmi významná mj. s ohledem na terapii, která je zásadně odlišná od jiných algických stavů.

Základní podmínkou pro stanovení diagnózy „možné neuropatické bolesti“ podle výše popisovaného schématu je anamnéza odpovídajících klinických obtíží. Za odpovídající anamnestická data jsou považovány relevantní deskriptory (popisné charakteristiky bolesti), k jejichž hodnocení je kromě základní anamnézy možné (a zejména pro nespecialisty vysoce doporučené) využít specializované dotazníky.

Diagnóza „pravděpodobné neuropatické bolesti“ vyžaduje (kromě naplnění podmínek pro stanovení „možné neuropatické bolesti“) zhodnocení klinického nálezu s průkazem poruchy citlivosti v identické neuroanatomicky plauzibilní distribuci a to pomocí běžného jednoduchého klinického (bedside) vyšetření nebo (v řadě případů přesněji) pomocí metod kvantitativního testování senzitivity.

Pro stanovení „potvrzené (jisté) neuropatické bolesti“ je navíc požadován průkaz léze nebo onemocnění somatosenzitivního nervového systému, které má potenciál vysvětlit bolest (a to i z hlediska anatomické distribuce a charakteru léze/onemocnění), pomocí odpovídajícího diagnostického paraklinického testu. Takovým testem mohou být zobrazovací metody, kožní biopsie prokazující redukci intraepidermální hustoty tenkých nervových vláken, neurofyziologické testy (např. elektromyografie, evokované potenciály a to zejména v modalitách vedených spinothalamickými trakty, reflexy asociované s bolestí a nepřímo také testy autonomního nervového systému) či molekulárně-biologické metody.

Předkládaná habilitační práce je souborem 28 komentovaných autorských či spoluautorských prací autorky, zaměřených na jednotlivé výše zmíněné metody, nezbytné pro diagnostický proces neuropatické bolesti, na jejich zavedení v českém jazykovém prostředí a v řadě případů i v mezinárodním měřítku, tvorbu normativních dat (většinou věkově stratifikovaných) a/nebo

jejich aplikaci v praktické diagnostice tohoto klinického syndromu. Jednotlivé práce jsou zaměřeny na problematiku dotazníků založených na výskytu typických deskriptorů a využívaných v diagnostice neuropatické bolesti, vyšetření senzitivity včetně jeho kvantitativních a dynamických aplikací, kožní biopsii a řadu neurofyziologických metod umožňujících hodnocení funkce periferního nervového systému, somatosenzitivních drah i autonomního nervového systému. Presentovaný soubor publikací tak reflektuje téměř všechny diagnostické metody, užívané v této souvislosti a významným způsobem přispívá k problematice diagnostiky neuropatické bolesti.

ABSTRACT

Neuropathic pain is currently defined as „pain arising as a direct consequence of a lesion or disease affecting the somatosensory system“. Based on the epidemiological studies, the prevalence of this clinical syndrome ranges between 7 and 8% of the European population. Neuropathic pain represents an important symptom of many neurological diseases. Furthermore, neuropathic pain component is frequently confirmed in spondylogenic and cancer pain syndromes. Recently revised grading system allows the classification of patients into the categories of possible, probable, and definite neuropathic pain. The level “probable” should usually be sufficient to initiate treatment according to neuropathic pain guidelines, which is markedly different from the nociceptive pain treatment.

The diagnosis of possible neuropathic pain is based on history, including pain descriptors and the presence of non-painful sensory symptoms suggestive of pain being related to lesion of somatosensory nervous system. Several focused questionnaires were developed for the purpose of this step and should be used mainly by non-specialists.

The sensory signs in the same neuro-anatomically plausible distribution are required for the diagnosis of probable neuropathic pain. This step is thus based on the clinical examination and eventually on so-called quantitative sensory testing, which allows more precise evaluation of most of the sensory modalities.

The diagnosis of definite neuropathic pain means the probable neuropathic pain with confirmed lesion or disease of somatosensory nervous system, which is able to explain the pain. Imaging methods, skin biopsy with the evaluation of intra-epidermal nerve fiber density, genetic tests or several neurophysiological methods (e.g. nerve conduction studies, pain-related evoked potentials, pain reflexes or microneurography) may serve as confirmatory tests for the purpose of this step.

This habilitation thesis represents a collection of 28 previously published scholarly papers published by the author (as a main or corresponding author or co-author) with commentary, all of them focused on particular methods used for the diagnosis of neuropathic pain. Each of the commented papers reflects the introduction of particular diagnostic test in Czech and/or even international conditions, the setting of normal limits (mostly age-stratified) and/or their application in diagnostic process of this syndrome in clinical practice. Particular papers are focused on the diagnostic questionnaires based on typical neuropathic pain descriptors, sensory examination including quantitative sensory testing and its dynamic applications, skin biopsy

with the evaluation of intra-epidermal nerve fiber density and several neurophysiological tests reflecting the function of peripheral nervous system, somatosensory pathway and autonomic nervous system (closely related to neuropathic pain). This collection of papers therefore reflects almost all the diagnostic modalities used for the diagnosis of neuropathic pain and thus represents an important contribution to the neuropathic pain diagnostic process both in Czech, and international conditions.

I. PŘEHLED PROBLEMATIKY

1. DEFINICE NEUROPATICKÉ BOLESTI A JEJÍ KLINICKÝ VÝZNAM

1.1. Definice bolesti a jejích základních typů

Bolest je podle platné definice Mezinárodní asociace pro studium bolesti (International Association for the Study of Pain, IASP) „nepříjemný smyslový a emoční prožitek spojený se skutečným či potenciálním poškozením tkáně, nebo popisovaný výrazy pro takové poškození“ (Bednařík 2008, Rokyta 2017, Rokyta 2018, Merskey et al. 1979, Loeser a Treede 2008). U akutních stavů má bolest většinou signální význam (brání dalšímu poškození tkáně) a jde tedy v zásadě o ochranný fenomén. Chronická bolest naopak ztrácí biosignální význam a jedná se o příznak významně negativně ovlivňující kvalitu života pacienta. Chronická bolest přitom postihuje průměrně 30 % obyvatelstva, ve vyspělých zemích je udáván dokonce až 50% výskyt (Rokyta 2017).

Z patofyziologického hlediska je rozlišována bolest neuropatická a nociceptivní (Merskey et al. 1979, Loeser a Treede 2008, Treede et al. 2015). U některých diagnostických jednotek může docházet ke kombinaci obou typů bolesti (typickým příkladem jsou vertebrogenní onemocnění s kompresí nervových struktur) (Baron a Binder, 2004). V tomto případě je některými autory používán termín smíšená bolest (mixed pain). K rozvoji bolesti dochází u těchto pacientů kombinací postižení různých struktur (např. vazů, kloubů, svalů a současně nervových kořenů) a různých patofyziologických mechanismů, z nichž některé vedou především k rozvoji nociceptivní komponenty bolesti a jiné k rozvoji bolesti neuropatické. Všechny zmíněné mechanismy jsou však vyvolány stejným typem onemocnění (např. degenerativním onemocněním páteře).

Specifickou kategorií pak představují některé hraniční diagnózy, nesplňující kritéria pro žádný z těchto typů bolesti. Jedná se např. o pacienty s fibromyalgií, syndromem dráždivého tračnicku či chronickou difúzní bolestí (chronic widespread pain) (Treede et al. 2015).

Oba základní typy bolesti (neuropatická a nociceptivní) se liší mechanismem vzniku, klinickou manifestací a také možnostmi terapeutického ovlivnění (Finnerup et al. 2016, Treede et al. 2015).

Nociceptivní bolest je fyziologickou odpovědí na stimulaci nociceptorů (receptorů pro bolest) při poškození tkání (např. zánětem, traumatem apod.). Generátorem nociceptivní bolesti je tedy

primární poškození neneuronálních tkání a podmínkou jejího rozvoje je intaktní funkce nociceptivních drah somatosenzitivního nervového systému. Při kontinuální stimulaci nociceptorů dochází nicméně k určitým změnám funkce těchto drah na úrovni zadních rohů míšních případně mozku v rámci tzv. centrální senzitivace, což usnadňuje rozvoj chronických bolestivých stavů. Kromě této skutečnosti může být klasifikace bolesti na výše uvedené základní typy komplikována také skutečností, že pacienti mohou mít současně různé druhy bolesti.

Aktuálně platná definice **neuropatické bolesti** (neuropathic pain, NeuP) byla vytvořena v rámci konsenzu odborníků v rámci IASP a její speciální skupiny zaměřené na neuropatickou bolest (Special Interest Group on Neuropathic Pain, NeuPSIG). Podle této definice je NeuP vymezena jako bolest, vznikající důsledkem léze nebo nemoci postihující somatosenzitivní nervový systém (Treede et al. 2008). Jedná se tedy o typ bolesti, která vzniká jako přímý důsledek poškození somatosenzitivního nervového systému a aktivace nociceptorů není podmínkou jejího rozvoje, i když jejich současná stimulace může bolest zdůrazňovat (např. v rámci hyperalgie, tedy klinického příznaku, při němž dochází ke zvýšené bolestivosti percipovaných algických podnětů). Zmíněná aktuální definice (Treede et al. 2008) nahradila původní definici neuropatické bolesti jako bolesti vyvolané či způsobené lézí či dysfunkcí nervového systému (Merskey a Bogduk 1994). Důvodem pro úpravu definice byla snaha o její maximální zpřesnění, usnadňující identifikaci pacientů s neuropatickou bolestí v klinické praxi i vědeckých či klinických studiích.

Změnou oproti původní definici je především:

(1) *akcent na poškození somatosenzitivního (a nikoli obecně nervového) systému.*

Podkladem této změny je skutečnost, že poškození mnoha drah a oblastí nervového systému (např. mozečku nebo frontálního kortexu) nevede k rozvoji neuropatické bolesti (Jensen et al. 2012, Treede et al. 2008). Podobně např. muskuloskeletální bolest u diagnostických jednotek, postihujících výhradně motorický systém (např. onemocnění motoneuronu), je podmíněna nefyziologickou zátěží pohybového systému při základním onemocnění a/nebo spasticitou a nesplňuje tedy kritéria bolesti neuropatické (Finnerup et al. 2016).

(2) *nahrazení termínu „dysfunkce“ konkrétnějšími termíny „léze nebo nemoc“.* Tato změna vychází ze zlepšujících se patofyziologických poznatků. Prakticky u všech klinických jednotek, které se projevují neuropatickou bolestí, je v současnosti možné definovat konkrétní onemocnění či lézi vedoucí k poškození určitých částí somatosenzitivního

nervového systému. Řada těchto patofyziologických poznatků přitom v minulosti k dispozici nebyla známa, a proto byl používán zastřešující termín „dysfunkce“. Navíc v současnosti narůstá úroveň poznání o patofyziologii bolesti nociceptivní včetně výše zmíněných neuroplastických změn nociceptivního nervového systému, které vznikají při jeho excesivní stimulaci. Tyto změny jsou pak podkladem určité změny funkce somatosenzitivního nervového systému i u bolesti nociceptivní. Z těchto důvodů není termín dysfunkce v definici neuropatické bolesti optimální, protože neumožňuje její exaktní vymezení vůči bolesti nociceptivní (Jensen et al. 2012, Treede et al. 2008). Jako neuropatická tak podle současné definice nemůže být označena bolest provázející onemocnění, která nevedou k prokazatelnému poškození somatosenzitivního nervového systému (Jensen et al. 2012, Treede et al. 2015, Finnerup et al. 2016). Typickým příkladem je fibromyalgie nebo komplexní regionální bolestivý syndrom I. typu.

1.2. Rozdíly v klinické manifestaci neuropatické a nociceptivní bolesti a význam jejich odlišení

Neuropatická a nociceptivní bolest se liší charakterem bolesti, který je reflektován tzv. **deskriptory** (tedy popisnými charakteristikami, které pacienti užívají pro bližší popis a specifikaci algických symptomů – tyto deskriptory budou níže uvedeny podrobně v samostatné kapitole). Odlišné jsou mezi oběma typy bolesti také **faktory, které bolest vyvolávají** a/nebo naopak vedou ke zmírnění obtíží: u pacientů s nociceptivní bolestí je např. častá akcentace bolesti pohybem a úleva v klidu a zejména ve spánku. Naopak bolest neuropatická je typicky klidová, noční a tedy více interferující s odpočinkem a spánkem pacientů. V neposlední řadě se oba typy bolesti zásadně se liší z hlediska možného **terapeutického ovlivnění**: u nociceptivní bolesti je častý efekt nesteroidních antirevmatik či běžných analgetik. U pacientů s bolestí neuropatickou jsou tyto léky neúčinné a k ovlivnění bolesti je nutné využít preparáty ze skupiny tzv. adjuvantních analgetik (kam patří zejména některá antiepileptika a antidepresiva), případně opioidy (Finnerup et al. 2015, Attal et al. 2010, Bednařík et al. 2012).

Odlišení bolesti neuropatické od bolesti nociceptivní je proto velmi významné jak na úrovni experimentální (vzhledem k odlišnému patofyziologickému podkladu obou typů bolesti) tak zejména v běžné klinické praxi (s ohledem na odlišnou klinickou manifestaci a především zásadně jiný terapeutický přístup k pacientům s nociceptivní a neuropatickou bolestí). Striktní rozlišení obou typů bolesti je přitom v řadě případů nesnadné a za určitých okolností může dokonce docházet k jejich určitému **překryvu či kombinaci obou typů bolesti u téhož**

pacienta (Treede et al. 2008). V případě dostatečně silné nociceptivní stimulace (např. u pacientů se zánětlivou bolestí) může totiž docházet k výše popsaným sekundárním neuroplastickým změnám v nociceptivních drahách somatosenzitivního nervového systému v rámci mechanismu tzv. centrální senzitivizace. U pacientů s řadou neurologických onemocnění manifestujících se mj. neuropatickou bolestí může naopak docházet i k rozvoji muskuloskeletální či jiné nociceptivní bolesti (Treede et al. 2008). Příkladem mohou být pacienti s centrální neuropatickou bolestí po iktech či při roztroušené skleróze, kdy je v důsledku současně přítomných paréz či poruchy koordinace pohybový systém vystaven nefyziologickému typu zátěže, který může vést k rozvoji sekundárního poškození muskuloskeletálního systému a s ním související bolesti nociceptivní.

1.3. Epidemiologie neuropatické bolesti

Podle epidemiologických studií dosahuje prevalence neuropatické bolesti v Evropské populaci kolem 7-8 % (Torrance et al. 2006, Bouhassira et al. 2008). Podobné prevalenční údaje jsou k dispozici i pro populaci mimoevropskou (6-10 %) (Harifi et al. 2013, de Moraes Vieira et al. 2012). Neuropatická bolest je součástí klinické manifestace širokého spektra neurologických onemocnění postihujících centrální či periferní nervový systém (Finnerup et al. 2016) a její prevalence u pacientů s různými neurologickými onemocněními významně převyšuje prevalenci populační. Recentně publikovaná práce, která zahrnovala přibližně 1,5 milionu pacientů s různými neurologickými jednotkami v rámci velkého epidemiologického šetření provedeného v kanadské populaci, uvádí výskyt neuropatické bolesti až u 36 % těchto pacientů (Cragg et al. 2018). Významná neuropatická komponenta je často přítomna u onemocnění vertebrogenních a také u bolesti nádorové: podle recentních studií jsou symptomy neuropatické bolesti prokazatelné u více než 40 % pacientů se středně silnou či silnou nádorovou bolestí a jejich výskyt zvyšuje negativní vnímání bolesti i její vliv na běžné denní aktivity u těchto pacientů (Oosterling et al. 2016). U většiny zmíněných pacientů přitom není tato skutečnost zohledněna v terapii.

Neuropatická bolest tedy představuje velmi významný, poměrně častý a potenciálně dobře terapeuticky ovlivnitelný klinický syndrom, což akcentuje nutnost její správné diagnostiky.

2. KLASIFIKACE NEUROPATICKÉ BOLESTI

2.1. PŮVODNÍ KLASIFIKAČNÍ SYSTÉM VYCHÁZEJÍCÍ Z IASP/NEUPSIG DEFINICE

Definice neuropatické bolesti, která byla publikovaná v r. 2008 a vychází z konsenzu odborníků v rámci IASP a NeuPSIG (Treede et al. 2008), je dosud platná a v klinické i experimentální praxi široce přijímaná. Autoři tohoto konsenzu navrhli také klasifikační systém, umožňující stratifikaci pacientů s NeuP na bolest možnou, pravděpodobnou a jednoznačnou (potvrzenou).

Pro stanovení míry diagnostické jistoty neuropatické bolesti je v rámci tohoto klasifikačního systému u každého pacienta nutné stanovit přítomnost následujících kritérií:

1. *Anatomicky plauzibilní distribuce bolesti* (tedy bolest v oblasti korespondující s inervačním teritoriem periferního nervu/kořene/plexu, případně kombinace těchto struktur nebo v místě s topografickou reprezentací odpovídající příslušné oblasti centrálního nervového systému, kde je lokalizována léze).
2. *Anamnéza odpovídající léze nebo onemocnění periferního či centrálního somatosenzitivního nervového systému* (příslušná léze nebo onemocnění by měla být známá možnou asociací s neuropatickou bolestí a anamnesticky by měla být přítomna i časová souvislost mezi vznikem potíží a příslušnou lézí, typická pro daný typ onemocnění či léze).
3. *Průkaz postižení somatosenzitivního nervového systému v oblasti bolesti* pomocí alespoň jednoho konfirmačního testu: v rámci klinického neurologického vyšetření jde o průkaz příznaků senzitivní dysfunkce (pozitivních či negativních) v anatomické oblasti bolesti. Klinické vyšetření senzitivity může být doplněno o laboratorní vyšetření a další objektivní testy k ozřejmění subklinických abnormit.
4. *Průkaz odpovídající léze nebo onemocnění somatosenzitivního nervového systému nejméně jedním konfirmačním testem*. Tento test prokazuje lézi nebo onemocnění centrálního nebo periferního nervového systému, zvažovanou jako pravděpodobná etiologie v bodě 2 této klasifikace, a jeho volba závisí na typu této léze či onemocnění.

Pacienti splňující všechna 4 kritéria pak splní podmínky pro diagnózu jednoznačné (potvrzené) neuropatické bolesti.

Při splnění kritérií 1 + 2 a současně 3 nebo 4 jde o pravděpodobnou neuropatickou bolest.

Pacienti splňující kritéria 1 + 2 (ale nikoli 3 ani 4) jsou klasifikováni jako jedinci s možnou neuropatickou bolestí (Treede et al. 2008).

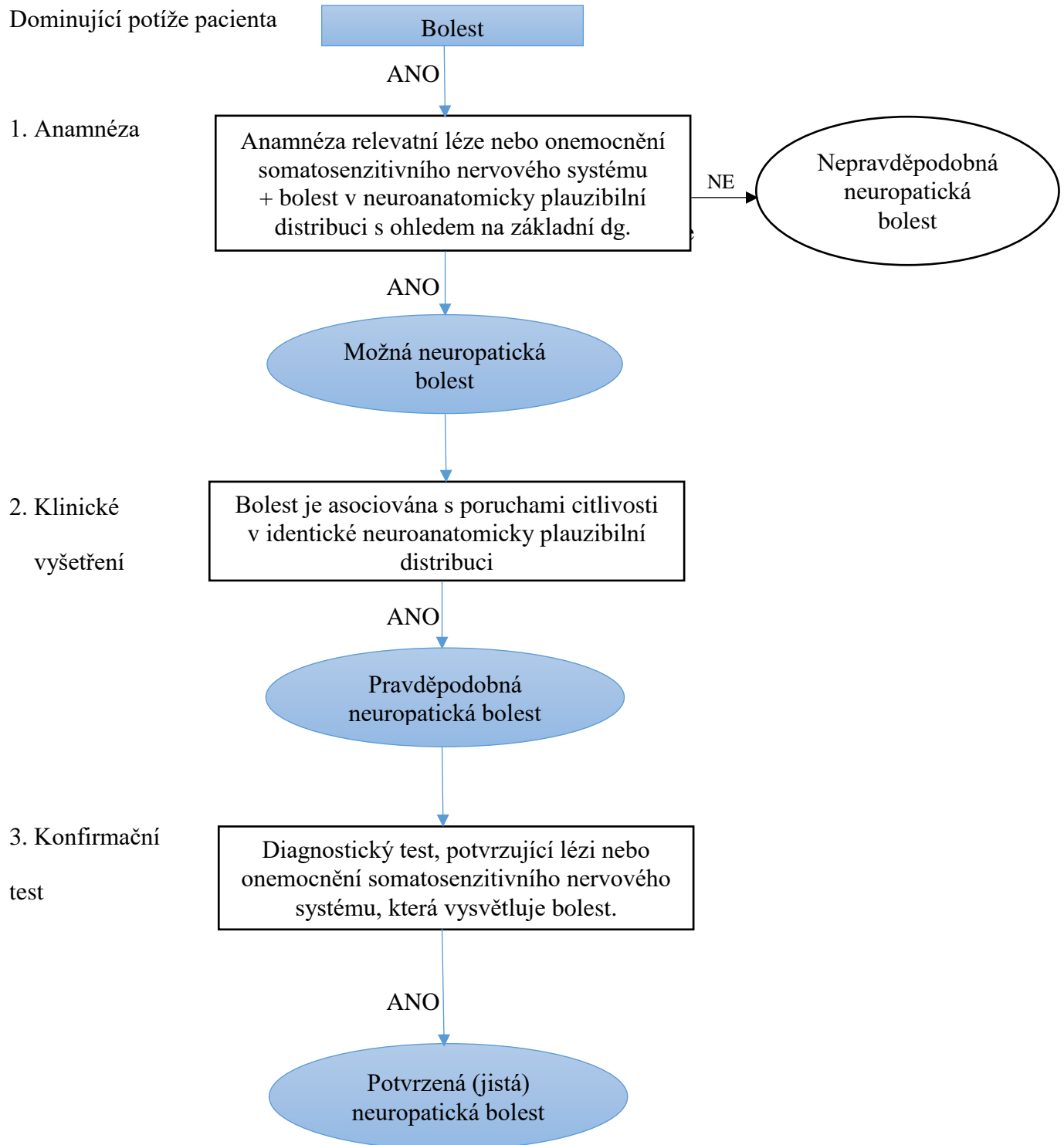
Na rozdíl od vlastní definice nebyl tento klasifikační systém tak široce akceptován a byl užíván jen v menším rozsahu (Finnerup et al. 2016). Z celkem 731 publikací citujících Treedeho práci, které byly publikovány v rozmezí let 2008 a 2015, byla výše zmíněná klasifikace použita pouze v 9 % (Finnerup et al. 2016).

2.2 REVIDOVANÝ (A V SOUČASNOSTI DOPORUČOVANÝ) KLASIFIKAČNÍ SYSTÉM

Z výše uvedených důvodů byl systém stratifikace pacientů s neuropatickou bolestí v r. 2016 revidován s cílem zajištění lepší praktické použitelnosti klasifikačního schématu (Finnerup et al. 2016). Tato revize představuje určitou úpravu z předchozího klasifikačního systému, z jehož logiky nadále vychází. Jejím cílem je určit míru pravděpodobnosti, s níž je bolest u příslušného pacienta bolestí neuropatickou, a to zejména jako podklad pro případnou úpravu terapie této bolesti. Míra pravděpodobnosti neuropatické etiologie bolesti u daného pacienta je stanovena to na úrovni „možné“, „pravděpodobné“ a „potvrzené (jisté)“ diagnózy. Splnění kritérií „pravděpodobné neuropatické bolesti“ by přitom mělo být ve většině případů dostačující pro zahájení terapie neuropatické bolesti v souladu s aktuálně platnými doporučeními (Attal et al. 2010, Bednařík et al. 2012, Finnerup et al. 2015). Diagnóza „potvrzené (jisté) neuropatické bolesti“ je důležitá především pro specialisty pro potřeby klinických studií a dalších výzkumných projektů a má klíčový význam také v situacích, kdy je známa kauzální léčba základního onemocnění, které je podkladem rozvoje bolesti.

Stratifikace pacientů v rámci tohoto systému vychází z blokového diagramu, který je uvedené ve Schématu 1, a probíhá v postupných následujících krocích od možné přes pravděpodobnou až po jistou diagnózu.

Schéma 1: Blokovaný diagram zobrazující klasifikační systém využitelný ke stanovení míry pravděpodobnosti neuropatické bolesti (Finnerup et al. 2016).



2.2.1. Stanovení diagnózy „možné neuropatické bolesti“

Základní podmínkou pro stanovení diagnózy „možné neuropatické bolesti“ podle popisovaného schématu je *anamnéza odpovídajících klinických obtíží* (Finnerup et al. 2016). Pro potřeby této klasifikace jsou za odpovídající anamnestická data považovány relevantní deskriptory bolesti, přítomnost nebolestivých senzitivních symptomů (brnění, mravenčení) a faktory zmírňující nebo naopak zhoršující bolest, které odpovídají postižení nervového systému a nikoli jiným možným příčinám bolesti, jako jsou zánět nebo postižení neneuronálních tkání. Relevantními deskriptory bolesti jsou např. bolest pálivá, bolest charakteru elektrických šoků či vystřelující nebo bodavá a/nebo bolest vyvolaná chladem či dotekem. Zmíněné deskriptory jsou charakteristické, ale nikoli specifické pro neuropatickou bolest. Vysokou diskriminační hodnotu v odlišení neuropatické a nociceptivní bolesti má pak zejména jejich kombinace, což je využíváno širokým spektrem dotazníků, vytvořených cíleně za účelem diagnostiky neuropatické bolesti. Tyto dotazníky jsou explicitně zmíněny jako jedna z možných cest hodnocení deskriptorů bolesti i v rámci tohoto diagnosticko-klasifikačního schématu. Podrobnější informace k deskriptorům neuropatické bolesti a dotazníkům, využívaným pro její diagnostiku a/nebo detailnější fenotypizaci pacientů s neuropatickou bolestí, včetně jejich výčtu jsou dále uvedeny v samostatné kapitole.

Pro stanovení „možné neuropatické bolesti“ je dále nutné naplnění dvou následujících kritérií:

A. Anamnéza léze nebo onemocnění somatosenzitivního nervového systému, které je známé možnou asociací s neuropatickou bolestí (orientační přehled takových onemocnění/ lézí je uveden v bodu 2 těchto kritérií). Podmínkou naopak není *časová souvislost* vzniku této léze/onemocnění s rozvojem bolesti. Průkaz úzké časové souvislosti mezi těmito okolnostmi však velmi významně zvyšuje klinické podezření na relevanci této léze v rozvoji bolesti a tedy její potenciální neuropatický charakter. Bolest se nejčastěji objevuje bezprostředně po vzniku neurogenního postižení a/nebo během několika týdnů poté, její rozvoj však může být opožděn i o několik měsíců (např. u pacientů s poiktovou bolestí) či dokonce mnoho let (typicky u bolestivé diabetické neuropatie). V některých případech mohou být právě subjektivní senzitivní symptomy včetně bolesti prvním a/nebo jediným příznakem ukazujícím na rozvoj onemocnění somatosenzitivního nervového systému: tato klinická situace je častá např. u pacientů s diabetickou polyneuropatií nebo s paroxysmální bolestí v rámci neuralgie trigeminu.

B. Distribuce bolesti, odpovídající očekávané anatomické oblasti postižení v rámci známé nebo suspektní léze/onemocnění somatosenzitivního nervového systému, zvažované jako potenciální příčina neuropatické bolesti (tj. bolest v anatomicky plauzibilní distribuci). Na individuální úrovni může bolest poněkud přesahovat inervační kritérium příslušného periferního nervu nebo nervového kořene a/nebo somatotopickou reprezentaci postižené oblasti centrálního nervového systému, nebo může postihovat menší oblast uvnitř tohoto inervačního teritoria. V každém případě by však bolest měla být v distribuci typické pro onemocnění /lézi, která je předpokládaným podkladem bolesti, tedy:

- a. *u bolestivých polyneuropatií v ponožkové/podkolenkové distribuci (s možným šířením proximálněji na oblast stehen a/nebo na HKK, kde je typické postižení v rukavicové distribuci).*
- b. *u lézí periferních nervů v inervačním teritoriu příslušného nervu (typicky distálně od místa traumatu, chirurgického zákroku či komprese).*
- c. *u bolestivých radikulopatií v pruhovité distribuci na některé z končetin nebo na trupu v dermatomu zásobeném příslušným nervovým kořenem.*
- d. *u pacientů s neuralgií trigeminu v distribuci některé z větví n. trigeminus na tváři či sliznici dutiny ústní.*
- e. *u pacientů s postherpetickou neuralgií jednostranně v distribuci jednoho či více dermatomů a/nebo v distribuci n. trigeminus (nejčastěji n. ophthalmicus), kde anamnesticky došlo k výsevu pásového oparu*
- f. *u fantomové (postamputační) bolesti v chybějící části končetiny a/nebo v zachovalém zbytkovém segmentu této končetiny.*
- g. *u pacientů s bolestí po míšních traumatech v a/nebo pod úrovní míšní léze.*
- h. *u centrální poiktové bolesti u oblasti kontralaterální míšního úseku somatosenzitivní dráhy (s výjimkou laterálních medullárních infarktů, kde může distribuce zahrnovat i ipsilaterální stranu obličeje).*
- i. *u pacientů s centrální neuropatickou bolestí asociovanou s roztroušenou sklerózou je možná analogická distribuce, jako je popisovaná u centrální poiktové bolesti a/nebo u bolesti po traumatech míchy (případně jejich kombinace).*

Specifický typ postižení z hlediska distribuce představují poruchy iontových kanálů, manifestující se neuropatickou bolestí (tzv. kanalopatie) – u těchto pacientů může být distribuce bolesti atypická, měla by však odpovídat příslušnému onemocnění. Příkladem může být familiární epizodický bolestivý syndrom, u něhož je bolest obvykle lokalizována na hrudi a/nebo proximálně na pažích.

2.2.2. Stanovení diagnózy „pravděpodobné neuropatické bolesti“

Pro diagnózu „pravděpodobné neuropatické bolesti“ je (kromě naplnění podmínek pro stanovení „možné neuropatické bolesti“) nutné zhodnocení *klinického nálezu s průkazem poruchy citlivosti v identické neuroanatomicky plauzibilní distribuci*. Senzitivní změny mohou (a nemusejí) být v rámci klinického vyšetření doprovázeny alterací motorických a vegetativních funkcí.

Pro průkaz senzitivních změn je možné využít nejen běžné jednoduché klinické (bedside) vyšetření, které je pro řadu senzitivních modalit méně spolehlivým způsobem hodnocení, ale také metody kvantitativního testování senzitivity (Quantitative Sensory Testing, QST) (Rolke et al. 2006a, Rolke et al. 2006b, *Vlčková a Šrotová 2014*) umožňující podrobné a kvantitativní či alespoň semikvantitativní zhodnocení percepce řady senzitivních a algických modalit a je blíže uvedeno v samostatné kapitole. Detailní přehled informací o vyšetření senzitivity byl publikován v časopise Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie formou minimonografie a je přílohou této práce (*Vlčková a Šrotová 2014*).

Oblast prokazatelných senzitivních změn nemusí být zcela identická s oblastí, v níž pacient pociťuje bolest. Může ji přesahovat nebo být naopak prokazatelná pouze v užším anatomickém regionu uvnitř bolestivé oblasti. Toto klinické kritérium obecně předpokládá průkaz ztráty či snížení senzitivní percepce některé ze senzitivních modalit (tedy negativní senzitivní symptomy, abnormalita typu „loss“). Tyto symptomy mohou být do určité míry patrné i u pacientů s bolestí nociceptivní, kde však nemají zřetelné neuroanatomické hranice a jsou omezeně reprodukovatelné (Geber et al. 2008).

Pozitivní senzitivní abnormality (typu „gain“, zvýšení percepce některé senzitivní modality, především modalit algických a/nebo alodyníe) mají v průkazu neuropatického typu bolesti menší diagnostickou validitu a to zejména pokud nejsou prokazovány pouze v anatomicky plauzibilní distribuci. V rámci jednoduchého klinického vyšetření (tzv. bedside vyšetření, vyšetření u lůžka pacienta) však mohou být jedinou prokazatelnou abnormalitou (např.

mechanická či termická alodynie). Podobně jako negativní senzitivní symptomy nejsou ani pozitivní symptomy specifické pro neuropatickou bolest a jsou v rámci klinického vyšetření prokazovány i u řady dalších klinických stavů a onemocnění. Časté jsou např. u pacientů s bolestí zánětlivou, u jedinců s fibromyalgií, úzkostí a spánkovou deprivací (Schuh-Hofer et al. 2013). Zejména algická percepce může být ovlivněna také stresem a negativními emocemi obecně.

Specifickými jednotkami z hlediska průkazu senzitivních abnormit jsou:

1. **Neuralgie trigeminu**, u níž nejsou v rámci běžného (bedside) klinického vyšetření obvykle žádné změny senzitivní percepce patrné. Mezi senzitivní abnormity lze proto u těchto pacientů zařadit i anamnesticky zjištěný trigger fenomén (existenci spouštěvé zóny bolesti). Trigger fenomén je klinický příznak odpovídající alodynii, kdy nebolestivé podněty (obvykle jemná taktilní stimulace, např. dotek oděvu nebo stravy při kousání, případně dokonce ovanutí větrem) vyvolají záchvat bolesti. U některých jedinců je jeho existence objektivizovatelná během klinického vyšetření, kdy lze příslušnou nebolestivou stimulací vyvolat u pacienta bolestivou grimasu.
2. **Poruchy iontových kanálů**, manifestující se neuropatickou bolestí, která je často paroxysmální a vyšetření senzitivity může být v mezidobí mezi jednotlivými atakami zcela v normě. U těchto pacientů je ke stanovení diagnózy „pravděpodobné neuropatické bolesti“ postačující typická anamnéza a současně průkaz léze nebo nemoci somatosenzitivního nervového systému pomocí příslušných diagnostických testů (viz následující bod 3).
3. **Fantomová bolest**, u níž není možné provést senzitivní testování v místě bolesti. V tomto případě je pro stanovení diagnózy „pravděpodobné neuropatické bolesti“ postačující sama anamnéza bolesti v distribuci chybějící končetiny.

Hodnocení senzitivních funkcí je obtížné také v oblasti vnitřních orgánů a hlubokých tkání – bolest v této distribuci je proto obvykle možné klasifikovat maximálně jako „možnou neuropatickou bolest“.

2.2.3. Stanovení diagnózy „potvrzené (jisté) neuropatické bolesti“

Posledním krok klasifikačního schématu se vztahuje k *paraklinickým diagnostickým metodám*. Pro stanovení „potvrzené (jisté) neuropatické bolesti“ je tak u pacienta s pravděpodobnou neuropatickou bolestí požadován průkaz léze nebo onemocnění somatosenzitivního nervového

systému, které má potenciál vysvětlit bolest (a to i z hlediska anatomické distribuce a charakteru léze/onemocnění), pomocí odpovídajícího diagnostického testu. Příkladem takového testu mohou být:

- a. Zobrazovací metody: počítačová tomografie (Computer Tomography, CT), magnetická resonance (Magnetic Resonance, MR) a další techniky, užívané k potvrzení cévních mozkových příhod v relevantní distribuci, roztroušené sklerózy či míšního traumatu, případně k verifikaci lézí periferních nervů (kde je možné využít také ultrazvuk).
- b. Kožní biopsie prokazující redukci intraepidermální hustoty tenkých nervových vláken
- c. Neurofyziologické testy, jako jsou např.:
 - i. elektromyografie vč. kondukčních studií periferních nervů
 - ii. evokované potenciály a to:
 1. somatosenzorické evokované potenciály (Sensory Evoked Potentials, SEP)
 2. evokované potenciály se vztahem k bolesti (Pain-Related Evoked Potentials, PREPs), tedy vyvolané kontaktním teplem (Contact Heat Evoked Potentials, CHEPs) nebo laserem (Laser Evoked Potentials, LEPS), případně povrchovou elektickou stimulací umožňující preferenční aktivaci kožních nociceptorů (Surface Electrode Pain-Related Evoked Potentials, SE-PREPs)
 - iii. reflexy asociované s bolestí (např. R1 blink reflex)
 - iv. mikroneurografie
- d. Molekulárně-biologické metody, umožňující např. potvrzení geneticky podmíněných forem erytromelalgie (autozomálně-dominantně dědičného onemocnění, jehož podkladem je mutace, vedoucí ke změně funkce sodíkového kanálu).
- e. U pacientů po amputaci a/nebo v případě chirurgem jednoznačně potvrzené léze periferního nervu v rámci operace/traumatu jsou tyto informace postačující pro stanovení diagnózy „potvrzené (jisté) neuropatické bolesti“ a jiné konfirmační texty nejsou požadovány.

Dosažení úrovně průkazu „potvrzené (jisté) neuropatické bolesti“ však nemusí vždy jednoznačně znamenat kauzální souvislost a nevylučuje jiný typ bolesti u daného

pacienta. Pacienti mohou mít v teritoriu postiženého periferního nervu (nebo v oblasti jejíž reprezentace odpovídá místu léze centrálního nervového systému) i bolest nociceptivní. Příkladem může být bolest v důsledku spasticity pod místem inkompletní míšní léze nebo bolest při postižení rotátorové manžety ramene u pacienta s postižením centrálních senzitivních drah pro tuto oblast v rámci cévní mozkové příhody, případně zánětlivá bolest v oblasti léze periferních nervů po thorakotomii či herniotomii. V těchto (a dalších) případech tak bolest může splnit všechna výše zmiňovaná kritéria, přesto se však nejedná o bolest neuropatickou. Ani splnění kritérií „potvrzené (jisté) neuropatické bolesti“ proto spolehlivě nevylučuje možnost, že bolest může být (alespoň částečně) podmíněna jinými okolnostmi, např. zánětlivým postižením příslušných tkání, a není tedy nezpochybnitelným průkazem kauzality. U každého pacienta by tak (navzdory splnění kritérií) měly být zvažovány jiné příčiny bolesti, které mohou potenciálně vysvětlit obtíže pacienta, nebo se na nich částečně podílet.

2.2.4. Specifické typy diagnóz nesplňující kritéria neuropatické bolesti v rámci současného diagnosticko-klasifikačního schématu

Popsaná definice neuropatické bolesti a na ni navazující klasifikační systém neumožňují klasifikovat jako neuropatickou takovou bolest, která provázejí onemocnění nevedoucí k prokazatelnému postižení somatosenzitivního nervového systému (Jensen et al. 2012, Treede et al. 2015, Finnerup et al. 2016), i když klinická manifestace některých z těchto jednotek neuropatickou bolest velmi připomíná.

Za typický příklad takové klinické jednotky byla považována **fibromyalgie**. Podle některých novějších studií je však u části pacientů, zahrnovaných aktuálně pod tuto diagnostickou jednotku, prokazována neuropatie tenkých vláken jako možný podklad klinické symptomatiky (Uceyler et al. 2013b, Uceyler et al. 2013c). Tito pacienti by pak v zásadě diagnostická kritéria neuropatické bolesti splnili. Popsaná úroveň průkazu však není podle recentních doporučení dostatečná k jednoznačné klasifikaci bolesti u fibromyalgie jako bolesti neuropatické (Finnerup et al. 2016).

Další podobnou jednotkou s komplikovanou klasifikací je **komplexní regionální bolestivý syndrom** (Complex Regional Pain Syndrome, CRPS). Toto onemocnění zahrnuje dva odlišné typy postižení. Podmínkou pro dg. CRPS II. typu je postižení periferního nervu a pacienti s touto dg. tedy splňují předpoklady pro diagnózu neuropatické bolesti. U pacientů s CRPS I.

typu nejsou na základě definice této jednotky periferní nervy postiženy a tito pacienti tak kritéria neuropatické bolesti nesplní, i když tato bolest vykazuje řadu charakteristik, které jsou pro neuropatickou bolest typické. Možným vysvětlením této skutečnosti je fakt, že klinické symptomy jsou u CRPS I. typu podmíněny především zánětlivými změnami, které mohou významně poškodit i nociceptory. Průkaz postižení terminálních zakončení periferních nervů je však u těchto pacientů dosud pouze omezený a výsledky publikovaných studií nejsou konzistentní, takže neopравňují klasifikovat bolest u pacientů s CRPS I. typu jako neuropatickou.

Také bolest u pacientů s **Parkinsonovou nemocí** představuje z klasifikačního hlediska hraniční jednotku. Stejně jako v případě fibromyalgie bylo recentně publikováno několik studií, prokazujících redukci intraepidermální inervace u pacientů s tímto onemocněním (Nolano et al. 2008, Kass-Iliyya et al. 2015, Nolano et al. 2017a), které poukazují na možnost neuropatie tenkých vláken jako podkladu potíží u těchto pacientů. Ani tento průkaz však není sám o sobě dostatečný, aby umožnil spolehlivou klasifikaci bolesti u těchto pacientů jako bolesti neuropatické (Finnerup et al. 2016).

Podobně zatím není prokázáno postižení somatosenzitivního nervového systému u pacientů s **cluster headache a migrénou**. Ani bolest u těchto jednotek tak také nelze považovat za neuropatickou (Finnerup et al. 2016).

3. DIAGNOSTIKA NEUROPATICKÉ BOLESTI

V souladu s aktuální definicí a klasifikačním schématem se v diagnostice neuropatické bolesti uplatňují především:

1. *anamnéza zaměřená na:*
 - a. *typické deskriptory neuropatické bolesti.* Pro usnadnění diagnostiky a/nebo bližší popis a specifikaci těchto symptomů a případně hodnocení jejich intenzity je možné využít některé ze specializovaných dotazníků, cíleně vytvořených pro tento účel.
 - b. *anamnestický průkaz léze nebo onemocnění somatosenzitivního nervového systému.*

2. *klinické neurologické vyšetření, zahrnující mj. detailní vyšetření různých senzitivních funkcí, které umožní prokázat poruchy citlivosti v oblasti bolesti.* Tyto změny lze prokázat:
 - a. *orientačně v rámci běžného klinického vyšetření (kdy jsou však možnosti hodnocení řady modalit poměrně omezené).*
 - b. *pomocí metod tzv. kvantitativního testování senzitivity, které poskytují podrobný a kvantifikovaný přehled o citlivosti pro široké spektrum testovaných modalit.*

3. *diagnostické testy, potvrzující lézi nebo onemocnění somatosenzitivního nervového systému, která vysvětluje bolest.* Příkladem takových testů mohou být:
 - a. *zobrazovací metody*
 - b. *kožní biopsie*
 - c. *neurofyzilogické testy*
 - d. *genetické testy*

Jednotlivé diagnostické modalilty budou v následující části práce zmíněny podrobněji.

3.1. ANAMNÉZA VČ. SPECIALIZOVANÝCH ŠKÁL A DOTAZNÍKŮ

Klíčovým krokem v diagnostice neuropatické bolesti je anamnéza, zaměřená zejména na rozbor subjektivních senzitivních obtíží pacienta. V rámci aktuálně doporučeného klasifikačního schématu se jedná o základní podmínku, nutnou již pro splnění prvního klasifikačního stupně (tedy diagnózy „možné neuropatické bolesti“) (Finnerup et al. 2016).

3.1.1. Senzitivní symptomy

Senzitivní symptomy lze obecně dělit na 2 základní velké skupiny, t.j. na symptomy negativní a pozitivní (Bednařík 2004). Podkladem obou typů senzitivních symptomů je postižení somatosenzitivních drah a to na kterékoli jejich úrovni.

I. *Negativní senzitivní symptomy* představují ztrátu senzitivní funkce pro některou ze senzitivních modalit. Jedná se o:

a. **Hypestezii** = snížení percepce příslušné senzitivní modality, tedy zvýšení senzitivního prahu pro příslušnou modalitu. Senzitivní práh je definován jako nejnižší intenzita podnětů daného typu, kterou je již pacient schopen vnímat.

b. **Anestezii** = úplnou ztrátu citlivosti pro příslušnou modalitu.

Při popisu negativních senzitivních symptomů je nutné specifikovat, pro kterou konkrétní senzitivní modalitu je citlivost snížena (např. termická či algická hypestezie, taktilní hypestezie, pallypstezie – tedy porucha vibračního čítí apod.). Specifikace senzitivních modalit pak poukáže na dysfunkci konkrétní somatosenzitivní dráhy: pro postižení tractus spino-thalamicus je typická alterace termické a algické percepce, zatímco pro léze tractus spino-bulbo-thalamicus (dráha zadních provazců) je charakteristické postižení vibrační citlivosti a také polohocitu, pohybecitu a diskriminačních funkcí.

Negativní senzitivní symptomy mohou být subjektivní i objektivní:

A. **Subjektivně** pacienti často popisují ztrátu citlivosti v postižené distribuci. Příkladem jsou distální polyneuropatie manifestující se neuropatickou bolestí, u kterých řada pacientů zmiňuje současně ztrátu citlivosti a to nejčastěji akrálně na končetinách (zejména dolních). Pacienti mohou upozornit vyšetřujícího např. na skutečnost, že nerozpoznají teplotu vody na některých částech těla nebo si nejsou vědomi cizího předmětu (kamínku) v botě, což může být podkladem rozvoje

nebolestivých poranění, rizikových např. z hlediska rozvoje ulcerací u pacientů s diabetickou polyneuropatií.

V řadě případů si však pacienti nejsou subjektivně poruch citlivosti vědomi.

- B. Hodnocení **objektivních** negativních senzitivních příznaků v rámci klinického neurologického vyšetření (a případně kvantitativního testování senzitivity) je součástí navazujícího kroku v rámci diagnostiky neuropatické bolesti a umožňuje její zpřesnění na úroveň „pravděpodobnou“ (Finnerup et al. 2014) (viz kapitoly Klinické neurologické vyšetření a Kvantitativní testování senzitivity). Rozvoj negativních senzitivních symptomů je však relativně pozdním indikátorem dysfunkce somatosenzitivních drah (Bednařík 2004).

Podrobné informace o možnostech vyšetření citlivosti pro jednotlivé senzitivní modalitty jsou uvedeny v minimonografii *Vyšetření senzitivity (Vlčková a Šrotová 2014)* a v publikaci s názvem *Validace české verze komplexního protokolu kvantitativního testování senzitivity (Šrotová et al. 2015a)*, které jsou přílohami této práce.

II. Pozitivní senzitivní symptomy se v rámci rozvoje dysfunkce senzitivních drah objevují časněji (Bednařík 2004). Jedná se o symptomy, generované v rámci somatosenzitivních drah „navíc“, nad rámec jejich běžné funkce. Podkladem jejich rozvoje je zejména abnormální spontánní generování elektrické aktivity v místě poškození senzitivní dráhy (kompresí, ischemií, traumatem apod.) a vznik tzv. ektopických impulzů. Podílet se mohou i další mechanismy, např. centrální senzitivizace či tzv. efaptická transmise, při níž dochází k přenosu vzruchů mezi různými typy vláken v rámci periferního nervu v místě poškození (typicky jde o přenos vzruchu mezi vlákny nebolestivými a bolestivými, který je jedním z předpokládaných mechanismů, podílejících se na rozvoji alodynie).

Podobně jako symptomy negativní lze i pozitivní senzitivní symptomy dělit na:

- b. subjektivní symptomy, k nimž patří spontánní bolest, parestezie či dysestezie
- c. objektivní příznaky, jako jsou alodynie či hyperalgezie

Jiné (i když do určité míry související) hledisko je mechanismus vzniku pozitivních senzitivních symptomů. Podle tohoto kritéria se pozitivní senzitivní symptomy dělí na:

- A. spontánní
- B. evokované

Mezi typické **subjektivní** senzitivní symptomy patří (modifikováno z Bednařík 2004):

Parestezie = nebolestivé abnormální senzitivní vjemy (většinou charakteru brnění, píchání či mravenčení), vznikající spontánně nebo vyvolané stimulem (obvykle nebolestivým, např. dotykem příkrývky či oděvu, případně tlakem či chladem).

Dysestezie = abnormální senzitivní vjemy podobné paresteziím, avšak nepříjemné až bolestivé

Bolest = která může být:

- Vyvolaná a to většinou podnětem potenciálně poškozujícím tkáň (např. píchnutím špendlíkem či podnětem vysoké teploty) a tedy sloužící jako fyziologický fenomén k ochraně organismu před poškozením. Může však jít i o fenomén patologický (např. v rámci alodynii)
- Spontánní, tedy vznikající bez zřejmé zevní stimulace. Tato bolest je pozitivním senzitivním fenoménem analogickým paresteziím a podle mechanismu vzniku se dále dělí na bolest:
 - *Nociceptivní* (vyvolanou stimulací nociceptorů za předpokladu intaktní funkce somatosenzitivního nervového systému)
 - *Neuropatickou* (vznikající v důsledku léze nebo onemocnění somatosenzitivního nervového systému – bližší viz výše v kapitolách zaměřených na definici a klasifikaci neuropatické bolesti).

K **objektivním** senzitivním symptomům jsou řazeny následující symptomy:

Hyperestezie = zvýšení citlivosti vůči některé ze senzitivních modalit (tedy snížení senzitivního prahu pro tuto modalitu). Jedná se o příznak, který je v klinické praxi málo častý a je obtížně identifikovatelný. Spolehlivější diagnostiku tohoto symptomu poskytuje kvantitativní testování senzitivity: ve většině případů je však vzhledem k široké populační normě obtížné stanovit jednoznačnou abnormitu v tomto smyslu.

Hyperalgezie = zvýšení bolestivé percepce některé z algických modalit. Jedná se tedy o snížení algického prahu (pacient vnímá příslušnou modalitu jako bolestivou již při nižší intenzitě podnětu, než je populačně běžné) či zvýšení senzitivity pro danou algickou modalitu (pacient udává abnormálně zvýšenou bolestivost algických podnětů nízké intenzity, běžně percipovaných jen jako nepříjemné či mírně bolestivé).

Alodyníe = bolestivá percepce podnětu, který bolest běžně nevyvolává (např. dotyku, chladu atd.) – typicky po kontaktu s příkrývkou či oděvem apod.

Hyperpatie = kombinace hypestezie pro některou ze senzitivních modalit a hyperalgezie pro tuto modalitu (typicky je u těchto pacientů zvýšený senzitivní práh pro dotykové, bolestivé či tepelné stimuly, po překročení prahu je podnět od počátku vnímán velmi nepříjemně až bolestivě).

Aloestezie = vzácný jev, vyskytující se zejména u centrálních senzitivních dysfunkcí, tedy např. u pravostranné putaminální léze či anterolaterálních spinálních cervikálních postižení. Podstatou fenoménu je, že taktilní či bolestivý stimulus aplikovaný v oblasti jednostranné ztráty citlivosti je vnímán na korespondujícím místě opačné poloviny těla.

Z výše uvedených definic vyplývá určitý překryv mezi jednotlivými senzitivními symptomy a poněkud neostré hranice, jimiž jsou tyto symptomy navzájem vymezeny. Je např. obtížné rozlišit alodynii od dysestezií vyvolaných stimulem. V terminologii pozitivních senzitivních symptomů panuje navíc určitá nejednotnost – jako parestezie jsou v některých případech označovány jen spontánní pozitivní symptomy, nebo jsou pod tento termín naopak zahrnovány všechny abnormální senzitivní vjemy, ať už bolestivého či nebolestivého charakteru. Výše uvedené definice jsou však v současnosti nejčastěji používány a poměrně široce akceptovány (Bednařík 2004, Moravcová a Bednařík 2006, Bednařík et al. 2012).

3.1.2. Hodnocení senzitivních symptomů v diagnostice neuropatické bolesti

Detailní rozbor senzitivních symptomů představuje klíčový krok v diagnostice neuropatické bolesti. Výskyt relevantních senzitivních symptomů je **základní podmínkou pro její stanovení a to již na základní úrovni, umožňující stanovit „možnou neuropatickou bolest“** (a pochopitelně i na všech vyšších stupních diagnostické jistoty, které představují určitou nadstavbu na tuto základní úroveň).

Anamnestické vyšetření je pro tento účel zaměřené především na charakter bolesti popisovaný pomocí tzv. deskriptorů (popisných charakteristik, které pacienti používají k bližšímu popisu obtíží) a přítomnost nebolestivých pozitivních senzitivních symptomů. Současně jsou zohledňovány faktory vyvolávající či zhoršující bolest a/nebo naopak bolest zmírňující.

- **Deskriptory** typickými pro spontánní neuropatickou bolest jsou: bolest pálivá, bolest charakteru elektrických výbojů, bodavá, vystřelující nebo lancinující (t.j. krutá bolest, „trhající“ či „rvoucí“ příslušnou část těla). Někteří pacienti s neuropatickou bolestí popisují také bolest vyvolanou (alodynii) a to především chladem či dotekem. Velmi časté jsou doprovodné senzitivní symptomy, jako jsou parestezie či dysestezie (nejčastěji popisované jako mravenčení nebo brnění).

Uvedené deskriptory jsou charakteristické, ale nikoli specifické pro neuropatickou bolest. Podobný charakter může mít v řadě aspektů např. bolest zánětlivá či další typy nociceptivní bolesti. Přítomnost žádného z popsaných deskriptorů proto sama o sobě neposkytuje s dostatečnou diagnostickou jistotou oporu pro stanovení diagnózy neuropatické bolesti. Vysokou diskriminační hodnotu v odlišení neuropatické a nociceptivní bolesti má však jejich kombinace, což je využíváno např. v rámci některých dotazníků, používaných v diagnostice neuropatické bolesti (viz dále) (Attal et al. 2018, Bouhassira et al. 2004, Bouhassira et al. 2005, Buršová et al. 2012a, Šrotová et al. 2015b).

- Mezi **faktory typicky zhoršujícími neuropatickou bolest** a další pozitivní senzitivní symptomy patří zejména jejich výskyt či akcentace v klidu, při odpočinku a ve večerních či nočních hodinách, kdy pacientovi brání usnout a/nebo jej často probouzejí. Popsaná interference se spánkem patří k velmi významným komorbiditám neuropatické bolesti. Současně jde o komorbiditu, na niž je cílena i terapeutická intervence (prvním krokem při zvládnutí bolesti je právě snaha o odstranění nočních obtíží a zajištění uspokojivého odpočinku). Studie, zaměřené na hodnocení efektu preparátů ovlivňujících neuropatickou

bolest se proto v rámci sekundárních cílů často zaměřují právě na ovlivnění poruch spánku. Na základě těchto studií je v současnosti přesvědčivě prokázáno, že řada těchto látek signifikantně zlepšuje poruchy spánku a upravuje spánkovou architekturu (typicky např. gabapentin či pregabalin i některá antidepresiva) a to s velmi vysokou kvalitou průkazu a silou doporučení (doporučení úrovně IA či IB) (Dworkin et al. 2007, Attal et al. 2010, Bednařík et al. 2012, Colloca et al. 2017).

U pacientů s alodynii zhoršuje bolest také dotyk (kontakt s příkrývkou či obuví nebo oblečením), chlad, ev. tlak. Tuto skutečnost často pacienti spontánně popisují a zdůrazňují nutnost vyhnout se zmíněným provokačním faktorům.

- Neuropatická bolest se naopak často **zmírňuje** pohybem (u bolestivých distálních polyneuropatií obvykle chůzí), takže pacienti mohou popisovat nutnost „projít“ se po místnosti při probuzení v nočních hodinách nebo „protřepat“ a rozhýbat postiženou končetinu, což obvykle uleví potížím.

Popsané provokační/ulevující faktory tak představují diferenciatně-diagnosticky významné informace oproti bolesti nociceptivní, která se naopak častěji zhoršuje pohybem a zmírňuje v klidu, při odpočinku a v nočních hodinách. Ani tento rozdíl však není specifický a noční a klidové bolesti popisuje i řada pacientů s bolestí nociceptivní (zejména zánětlivou). Na skupinové úrovni je však výskyt klidových a nočních obtíží, stejně jako výskyt poruch spánku (i dalších komorbidit, jako jsou poruchy nálady – zejména úzkost nebo deprese) významně častější a závažnost těchto symptomů je vyšší u pacientů s neuropatickou bolestí oproti jedincům s bolestí nociceptivní (Colloca et al. 2017). Vztah bolesti a psychických změn obecně je nicméně komplikovaný. Příkladem může být vzájemná vazba bolesti a deprese, které mají řadu společných patogenetických mechanismů a podle různých teorií může být bolest příčinou i důsledkem deprese (Štětkařová a Horáček 2016).

Výskyt a závažnost všech popsanych komorbidit narůstá také s intenzitou neuropatické bolesti, což potvrdily i výsledky naší studie *Sensory phenotype and risk factors for painful diabetic neuropathy: a cross-sectional observational study* (Raputova et al. 2017), která je jednou z příloh této práce.

3.1.3. Kvantifikace intenzity bolesti a dalších senzitivních symptomů

Vedle přítomnosti jednotlivých deskriptorů bolesti a zhoršujících/ulevujících faktorů jsou pacienti v rámci anamnézy rutinně dotazováni také na intenzitu bolesti, která je obvykle hodnocena pomocí jednoduchých kvantitativních či semikvantitativních škál. Hodnocení intenzity bolesti není krokem přímo zavzatým do její diagnostiky či klasifikace, jedná se však o zcela klíčovou informaci pro klinický management pacientů s bolestí (včetně bolesti neuropatické). Údaj o intenzitě bolesti poskytuje ošetřujícímu lékaři zásadní informaci o závažnosti subjektivních potíží pro konkrétního pacienta a tedy vhodnosti zahájení terapeutické intervence, cílené právě na ovlivnění bolesti. Nezastupitelná je pak tato informace pro longitudinální sledování pacienta a hodnocení efektu případných terapeutických intervencí (Dworkin et al. 2005, Haanpää et al. 2011).

Mezi nejčastěji využívané jednoduché škály umožňující kvantifikaci neuropatické bolesti patří:

- **numerická škála bolesti** (Numeric Rating Scale, NRS). Při jejím použití pacient hodnotí intenzitu svojí bolesti tak, že sdělí vyšetřujícímu hodnotu na škále od 0 („žádná bolest“) do 10, případně 100 (v obou případech jde o „nejhorší představitelnou bolest“, pacient je v úvodu použití škály instruován o jejím rozsahu a významu krajních hodnot), která nejlépe popisuje intenzitu jeho bolesti. Tento způsob hodnocení je jednoduchý a pro pacienty obvykle bezproblémově použitelný. Pro určitý segment pacientů je však použití numerické škály obtížné a tito pacienti jeví tendenci nahradit číselný údaj slovním popisem. Pro tyto pacienty je pak vhodnější použití škál verbálních nebo škál využívajících změn výrazu obličej (viz níže) (Dworkin et al. 2005).
- **vizuální analogová škála** (Visual Analogue Scale, VAS). U této škály pacient hodnotí svoji bolest umístěním kurzoru na úsečce, jejíž začátek představuje „žádnou bolest“ a konec „nejhorší představitelnou bolest“. Na rubové straně škály jsou pak uvedeny odpovídající číselné hodnoty odpovídající NRS v typickém rozmezí 0 až 100 (s identickým významem, jako je uveden výše) (Dworkin et al. 2005, Haanpää et al. 2011)
- **verbální škály** (Verbal Rating Scales, VRS). U těchto škál pacient volí z výběru definovaných verbálních deskriptorů intenzity bolesti (každému z deskriptorů je následně často přiřazena numerická hodnota, takže škála umožňuje současně určité semikvantitativní hodnocení, vhodnější pro statistické zpracování). Příkladem je pětibodová Lickertova škála, kde 0 = žádná bolest, 1 = mírná bolest, 2 = středně silná bolest, 3 = silná bolest, 4 = extrémně silná bolest. Existují však i škály patnáctibodové.

(Dworkin et al. 2005, Frank et al. 1982, Haanpää et al. 2011). Škály toho typu jsou pro řadu pacientů jednodušší než škály čistě numerické a to zejména s ohledem na slovní popis intenzity potíží, s nímž se mnohdy identifikují lépe než s čistě numerickou škálou. Výhodou je přitom možnost určité kvantifikace obtíží převodem na přiřazené číselné hodnoty.

- **škály bolesti založené na hodnocení změn výrazu obličeje** při narůstající bolesti (Faces Pain Scale, FPS) – pacient má na výběr z několika emotikonů („smajlíků“) s různými výrazy od usmívajícího se až po velmi „trpícího“ a má určit výraz obličeje nejlépe odpovídající závažnosti jeho bolesti. Výhodou této škály je především její lepší využitelnost i u mladších dětí, pro které může být obtížné použití numerických či verbálních škál (Bieri et al. 1990, Hicks et al. 2001).

Pro všechny uvedené jednoduché škály platí, že interindividuální srovnatelnost jejich výstupů mohou do jisté míry limitovat individuální rozdíly v percepci bolesti a citlivosti vůči bolestivým vjemům. Různí pacienti tedy mohou intenzitu podobné bolesti hodnotit různě v závislosti na své individuální vnímavosti. Na úrovni jednotlivce je však spolehlivost hodnocení bolesti pomocí těchto škál tradičně pokládána za uspokojivou a intraindividuální variabilita hodnocení bolesti pomocí výše popsaných škál je obvykle považována za poměrně nízkou. Předpokládá se tedy, že stejný pacient používá škálu vždy podobným způsobem a srovnatelnou intenzitu bolesti hodnotí obvykle podobně, i když existují určité výjimky z tohoto pravidla (viz následující kapitola, zaměřená na hodnocení vývoje klinického stavu mj. pomocí opakovaného použití těchto škál).

Zmíněné vizuální, numerické či verbální škály mohou být užívány samy o sobě, nebo jsou pro hodnocení intenzity bolesti či dalších symptomů využívány v rámci komplexnějších screeningových dotazníkových testů, které kombinují hodnocení přítomnosti typických deskriptorů s kvantifikací jejich intenzity (např. v rámci dotazníků Pain Detect nebo Neuropathic Pain Symptom Inventory - viz příslušná kapitola níže).

3.1.4. Hodnocení změn klinického stavu pacienta a vývoje intenzity bolesti

Pro hodnocení změny intenzity bolesti u téhož pacienta (např. v rámci longitudinálního sledování či hodnocení efektu terapeutických intervencí) je možné využít **opakované vyšetření výše popsaných jednoduchých škál** a/nebo škály cíleně zaměřené právě na popis vývoje klinického stavu oproti předchozí situaci.

Jednoduché škály typu NRS, VAS, VRS či FPS jsou pro hodnocení bolesti při longitudinálním sledování běžně využívány a jejich výsledky jsou tradičně považovány za vcelku spolehlivé. Relativně recentně však byly prokázány výrazné interindividuální rozdíly ve spolehlivosti jejich použití. Určitá část populace tedy používá popsané škály předpokládaným konzistentním způsobem („accurate pain reporters“), zatímco někteří jedinci vykazují při opakované použití škály výrazně nekonzistentní výsledky („non-accurate pain reporters“). Právě nekonzistentní použití škál kvantifikujících bolest u určitého segmentu pacientů pak bylo identifikováno jako jeden z nejdůležitějších faktorů limitujících výstupy klinických i vědeckých studií zaměřených na neuropatickou bolest (Dworkin et al. 2010). Aktuálně proto panuje snaha o nalezení identifikátorů, umožňujících rozlišit pacienty využívající tyto škály s různou spolehlivostí, resp. vybrat jedince hodnotící bolest konzistentním způsobem („accurate pain reporters“) a tedy vhodnější pro případné klinické studie (Treister et al. 2017).

Alternativním způsobem hodnocení změn klinického stavu je pak **využití verbálních/numerických škál s různým počtem stupňů označujících změnu**. Nejčastěji je užívána škála pětibodová (s deskriptory změny typu: výrazné zlepšení – zlepšení – beze změn – zhoršení – výrazné zhoršení), sedmibodová (s hodnocením změny na úrovni výrazné – střední – mírné zlepšení – beze změn – mírné – střední – výrazné horšení) nebo patnáctibodová (kdy pacient přiřadí změně číselnou hodnotu v rozmezí od -7 = velmi výrazné zhoršení přes 0 = žádná změna po +7 = velmi výrazné zlepšení).

3.1.5. Dotazníky využívané v diagnostice a bližší specifikaci neuropatické bolesti

Kombinace výše popsaných deskriptorů, používaných typicky pro popis subjektivních senzitivních symptomů, je poměrně specifickým ukazatelem neuropatického charakteru bolesti a je v současnosti rutinně využívána v rámci komplexnějších dotazníkových nástrojů. Tyto dotazníky usnadňují diagnostiku neuropatické bolesti a/nebo umožňují její bližší hodnocení a diagnostiku tedy zpřesňují. Jejich rozšíření v posledních letech proto významně přispělo ke zlepšení managementu a terapie neuropatické bolesti v obecné populaci (Attal et al. 2018). Výhodou jejich použití je mj. možnost získání standardizovaného (a většinou kvantifikovaného) výstupu, který je možné využít zejména pro účely klinických studií lépe než běžné anamnestické a klinické vyšetření pacienta.

Podmínkou používání jakéhokoli dotazníku v klinické praxi je právě jeho standardizace. V rámci standardizace dotazníkových nástrojů je hodnocena jejich validita (tj. senzitivita a

specifická nástroje v diagnostice konkrétní klinické jednotky) a reprodukovatelnost a také náročnost jejich provedení (např. časová, případně nutnost specializovaného vybavení či zácvičku osob, provádějících hodnocení). Při použití dotazníků původně vyvinutých pro jiné jazykové oblasti je nutno převod do mateřského jazyka provést metodou zpětného překladu („forward-backward translation“) (Wild et al. 2005). V rámci tohoto systému je dotazník nejprve přeložen z cizího jazyka do jazyka mateřského. Tato jazyková mutace je následně jiným překladatelem převedena zpět do původního jazyka a následně jsou obě verze (původní a tato zpětně přeložená) porovnány a zjištěné rozdíly jsou využity při optimalizaci finální verze dotazníku v novém jazyce. Překlady dotazníků pro potřeby jejich standardizace by měly být provedeny rodilým mluvčím.

Užívané dotazníky lze obecně rozdělit do dvou základních skupin (Attal et al. 2018) a to na:

1. screeningové dotazníkové nástroje určené pro identifikaci pacientů s neuropatickou bolestí (zejména pro nespecialisty).
2. dotazníky umožňující detailnější hodnocení přítomnosti a/nebo intenzity jednotlivých symptomů neuropatické bolesti.

3.1.5.1 Screeningové dotazníkové nástroje určené pro identifikaci pacientů s neuropatickou bolestí

Tyto dotazníky jsou primárně koncipovány pro účely správné identifikace pacientů s neuropatickou bolestí a jsou tedy určeny především pro nespecialisty. Správné rozpoznání neuropatického charakteru bolesti (resp. neuropatické komponenty bolesti smíšené) u daného pacienta následně umožní volbu adekvátní terapie, protože léčba neuropatické a nociceptivní bolesti se navzájem výrazně liší (Attal et al. 2018, Bouhassira a Attal 2011, Haanpää et al. 2011).

Mezi screeningové dotazníky patří např.:

- The LANSS Pain Scale: the Leeds assessment of neuropathic symptoms and signs (Bennett 2001, Bennett et al. 2005)
- Neuropathic Pain Questionnaire (NPQ) (Krause a Backonja 2003)
- Zkrácená verze Neuropathic Pain Questionnaire (Backonja a Krause 2003)
- DN 4 (Douleur Neuropathique en 4 Questions) (Bouhassira et al. 2005)
- ID Pain (Portenoy 2006)
- Pain Detect (Freynhagen et al. 2006)

Jmenované dotazníky byly v posledních letech cíleně vyvinuty jako screeningové testy za účelem rychlé a objektivní identifikace neuropatické bolesti na podkladě přítomnosti jejich typických deskriptorů (v některých případech v kombinaci s hodnocením tíže bolesti s použitím výše zmíněných jednoduchých numerických či verbálních škál, případně s jednoduchým klinickým testováním). Jedná se o časově nenáročné (v průměru do 3 minut) a snadno použitelné diagnostické nástroje i pro nespecialisty. Všechny zmíněné dotazníky jsou jednoduché a dobře srozumitelné. Většina z nich je validována i pro použití ve formě „self-reported“ dotazníků (pacient je tedy může po iniciální instruktaži vyplnit samostatně).

Dotazníky obsahující kombinaci s kvantitativními či semikvantitativními škálami (např. VAS, NRS, VRS) umožňují nejen identifikaci přítomnosti jednotlivých deskriptorů, ale také posouzení intenzity bolesti příslušného charakteru (případně dalších hodnocených symptomů). Představují tak určitý přechod ke druhé skupině dotazníků, používaných pro bližší hodnocení bolesti.

Všechny výše uvedené screeningové dotazníky vykazují vysokou a vzájemně srovnatelnou validitu v diskriminaci neuropatické a nociceptivní bolesti (Bennett et al. 2007). Pro každý z nich je stanovena limitní (cut-off) hodnota, rozlišující nejlépe pacienty s neuropatickou a nociceptivní bolestí. V provedených originálních validačních studiích vykazaly tyto screeningové dotazníky senzitivitu 67-85 % a specificitu 74-90 % a to většinou vůči „názoru experta“ jako zlatému standardu pro identifikaci tohoto typu bolesti (Bennet et al. 2007, Attal et al. 2018). Při jejich použití je tedy cca 10-20% riziko chybně určené diagnózy a to zejména u pacientů se smíšenou bolestí (např. vertebrogenní či nádorovou). Tyto screeningové dotazníky nejsou také vhodné u pacientů s difuzními bolestivými syndromy (fibromyalgie) ani s paroxysmální neuropatickou bolestí (např. neuralgie trigeminu) (Bouhassira a Attal 2010).

Podle aktuálních doporučení (Haanpää et al. 2011, Finnerup et al. 2016, Attal et al. 2018) je použití screeningových dotazníků vhodné jako první krok v diagnostickém algoritmu neuropatické bolesti a mělo by být následováno dalšími kroky v rámci tohoto algoritmu za účelem dosažení vyšší diagnostické jistoty průkazu neuropatického charakteru bolesti. Řada studií přitom prokazuje dobrou až vynikající pozitivní korelaci mezi průkazem pravděpodobné či potvrzené (jisté) neuropatické bolesti podle aktuálního klasifikačního schématu (Finnerup et al. 2016) a výsledky screeningových dotazníků (např. pro Pain Detect viz Themistocleous et al. 2016).

Všechny výše uvedené dotazníky byly z původních jazykových verzí přeloženy do řady dalších jazyků. V českém jazyce jsou k dispozici následující dotazníky:

- a. **Pain Detect** - nevalidovaná česká verze dotazníku je komerčně distribuovaná jednou z farmaceutických firem, do jejíhož portfolia patří i léky cílené na ovlivnění neuropatické bolesti – k dispozici na https://www.pfizerpro.cz/sites/default/files/lyr-2017.02.007_pain_detect_cz.pdf.
- b. **DN4** – částečná validace české verze dotazníku (resp. jeho plné i zkrácené verze) u pacientů s časnou diabetickou polyneuropatií byla provedena naší pracovní skupinou v rámci publikace *Validita a prediktivní hodnota skriningových testů u prediabetické a časně diabetické polyneuropatie (Buršová et al. 2012a)*, která je přílohou této práce.
- c. Schopnost diskriminace pacientů s neuropatickou a nociceptivní bolestí mohou mít i některé dotazníky z následující skupiny, primárně vytvořené za účelem hodnocení přítomnosti a/nebo intenzity jednotlivých symptomů neuropatické bolesti. Příkladem takového dotazníku je Neuropathic Pain Symptom Inventory (**NPSI**) (Bouhassira et al. 2004). Tento dotazník je v originální verzi nemá cut-off hodnotu, která by umožnila rozlišit pacienty s neuropatickou a nociceptivní bolestí. V rámci validace některých jazykových verzí se však autoři těchto validačních studií pokusili zaměřit m.j. i na otázku využití dotazníku v diskriminaci obou typů bolesti. Německá validační studie prokázala na skupinové úrovni dobrou diskriminační schopnost mezi neuropatickou a nociceptivní bolestí již v základní verzi dotazníku (Sommer et al. 2011). Tato schopnost se dále výrazně zlepšila při navržené úpravě způsobu výpočtu dotazníku (zařazením specifických koeficientů, derivovaných pro jednotlivé položky na základě provedené diskriminační analýzy). Takto modifikovaný dotazník prokázal velmi uspokojivou diagnostickou validitu v diskriminaci pacientů s neuropatickou a nociceptivní bolestí a to i na individuální úrovni (Sommer et al. 2011). Podobné výsledky přinesla v rámci validace české verze dotazníku i naše studie (Šrotová et al. 2015b), která je jednou z komentovaných příloh této práce.

3.1.5.2. Dotazníky umožňující detailnější hodnocení přítomnosti a/nebo intenzity jednotlivých symptomů neuropatické bolesti.

Tyto dotazníky jsou využívány mj. pro účel klinických studií, kde napomáhají monitoraci odpovědi na terapii. Umožňují posoudit selektivní vliv terapie na různé symptomy (např. taktilní alodynii) či dimenze bolesti (např. bolest povrchovou, hlubokou, vyvolanou apod.). Jejich hodnocení poskytne tedy přesnější informaci pro monitoraci efektu terapeutických intervencí než hodnocení celkové intenzity bolesti (Baron et al. 2012).

V rámci výzkumných projektů pak tyto dotazníky poskytují podklad pro detailní fenotypizaci pacientů (umožní vytvořit profil neuropatických symptomů). Hledání vztahů mezi symptomovými profily a objektivními známkami tíže a charakteru neurogenní léze pak může pomoci rozkrýt patofyziologické mechanismy, podílející se na vzniku bolesti (např. centrální senzitivace) (Baron et al. 2012, Attal et al. 2018). Tyto informace mohou být také podkladem pro cílenější výběr pacientů pro potřeby klinických studií (viz níže).

K dotazníkům z této skupiny patří např.:

- Neuropathic Pain Scale (Galer a Jensen 1997)
- Neuropathic Pain Symptom Inventory (Bouhassira et al. 2004)
- Pain Quality Assessment Scale (Jensen et al. 2006)
- Revidovaná a rozšířená verze krátké formy McGillova dotazníku (Short-form McGill Pain Questionnaire, SF-MPQ-2) (Dworkin et al. 2009)
- Podle recentních poznatků je pro bližšího hodnocení neuropatické bolesti využitelný i dotazník PainDetect, vyvinutý primárně jako dotazník screeningový, ale obsahující údaje o sedmi deskriptorech bolesti hodnocených na kategoriální verbální šestibodové škále a to především v revidované verzi s vynecháním položek zaměřených na distribuci bolesti a její časový průběh (Packham et al. 2017).

První dva ze jmenovaných dotazníků byly vyvinuty cíleně pro účel bližší specifikace neuropatické bolesti, druhé dva jsou využitelné pro hodnocení bolesti neuropatické i nociceptivní (Attal et al. 2018).

Podobně jako dotazníky screeningové jsou i tyto dotazníky založeny na kombinaci typických deskriptorů bolesti, které mohou být dále rozděleny do různých kombinací, představujících odlišné dimenze bolesti, tedy bolest vyvolanou, povrchovou, hlubokou apod. (typicky např. v rámci dotazníku NPSI - Bouhassira et al. 2004, Šrotová et al. 2015b). Na rozdíl od dotazníků

screeningových však dotazníky zaměřené na hodnocení bolesti neobsahují položky, které se vztahují ke klinickému neurologickému vyšetření ani k negativním senzitivním symptomům. Důvodem je obtížná subjektivní kvantifikace těchto symptomů. Hypestezie pro různé senzitivní modalities je proto lépe hodnotitelná v rámci kvantitativního testování senzitivity.

V českém jazykovém prostředí je dosud k dispozici validovaná verze jediného dotazníku z této skupiny: jedná se o dotazník Neuropathic Pain Symptom Inventory, jehož validace byla provedena naší pracovní skupinou v období 2012-2014. Výsledky této studie byly publikovány v rámci práce *Validace české verze Neuropathic Pain Symptom Inventory (NPSI_{cz})* (Šrotová et al. 2015b), která je komentovanou přílohou tohoto textu.

3.1.5.3. Hodnocení symptomových profilů vycházející z popsaných dotazníkových nástrojů.

Hodnocení symptomových profilů je velmi aktuálním tématem v oblasti výzkumných i klinických studií zaměřených na neuropatickou bolest. Obecně lze říci, že určité charakteristické symptomové profily jsou patrné **napříč spektrem onemocnění, které se mohou projevat neuropatickou bolestí**. Tyto profily tedy nejsou přímo spojeny s konkrétní vyvolávající příčinou bolesti (polyneuropatie, mononeuropatie, radikulopatie, roztroušená skleróza, míšní trauma apod.), ale spíše s patofyziologickými mechanismy, které se na rozvoji konkrétního fenotypu podílejí. Spontánní hluboká či pálivá bolest tak v souladu s tímto konceptem reflektuje poškození nociceptivních drah v periferním či centrálním úseku, zatímco bolest evokovaná (např. dynamická mechanická alodynies) je důsledkem přetrvávající aktivity zachovaných (a v důsledku postižení senzitivizovaných) nociceptivních terminál a/nebo centrálních drah, které na ně navazují (Attal et al. 2018). Současně však platí, že se určité symptomy či symptomové profily vyskytují častěji u určitých konkrétních klinických jednotek a naopak pro jednotlivé klinické jednotky (diabetická polyneuropatie, bolestivá radikulopatie apod.) je již popsáno spektrum typických symptomových profilů, odpovídajících různým patofyziologickým mechanismům, které se na rozvoji bolesti u dané jednotky obvykle podílejí.

V současnosti panuje snaha o využití těchto poznatků v optimalizaci terapie neuropatické bolesti a to na individuální úrovni i v designu nově koncipovaných klinických studií. Předpokládá se totiž, že právě odlišné symptomové profily (reflektující odlišné patofyziologické mechanismy rozvoje neuropatické bolesti) by mohly rozlišit různé skupiny pacientů z hlediska odpovědávosti na potenciální terapii lépe než zohlednění vlastních vyvolávajících příčin. Jedná se tak zřejmě o nový koncept „personalizované medicíny“,

umožňující cílenější volbu optimální terapie neuropatické bolesti u jednotlivých pacientů a současně specifičtější výběr pacientů pro potřeby klinických studií.

Zařazení některého z hodnotících dotazníků do protokolu klinických studií s preparáty určenými k ovlivnění neuropatické bolesti proto aktuálně doporučuje i Evropská léková agentura (European Medicines Agency, EMA) (European Medicines Agency 2015) a to dokonce jako primární endpoint studií s preparáty a postupy cílenými k ovlivnění neuropatické bolesti.

Hodnocení symptomových profilů v souladu s aktuálními trendy obsahuje i zmiňovaná validační studie NPSI dotazníku (*Šrotová et al. 2015b*) a to na poměrně velké skupině pacientů s neuropatickou bolestí periferního a centrálního typu (při diabetické polyneuropatii a roztroušené skleróze). Práce prokázala překryv symptomových profilů mezi oběma jednotkami, manifestujícími se neuropatickou bolestí.

3.2. *KLINICKÉ NEUROLOGICKÉ VYŠETŘENÍ ZAMĚŘENÉ NA VYŠETŘENÍ SENZITIVITY*

Klinické neurologické vyšetření zaměřené zejména na hodnocení senzitivity (a na něj navazující kvantitativní aplikace umožňující detailní hodnocení citlivosti pro jednotlivé senzitivní modalit) představuje další klíčový krok v diagnostickém procesu neuropatické bolesti. Klinické vyšetření navazuje na detailní anamnézu a *umožňuje prokázat poruchu citlivosti v neuroanatomicky plauzibilní distribuci* (odpovídající oblasti bolesti), což je podmínkou pro stanovení diagnózy „pravděpodobné neuropatické bolesti“ v souladu s aktuálně platným diagnostickým schématem (Haanpää et al. 2011, Finnerup et al. 2016).

3.2.1. *Základní klinické vyšetření senzitivity*

V běžné klinické praxi je hodnocení senzitivity obvykle založené pouze na základních kvalitativních metodách. Dle doporučení NeuPSIG (Haanpää et al. 2011) by mělo zahrnovat následující modalit: taktilní cití, vibrační cití, ostrá mechanicky vyvolaná bolest (evokovaná píchnutím špendlíkem), chlad a teplo. Dosud přitom nejsou k dispozici studie hodnotící přínos rutinního klinického vyšetření senzitivity v diagnostice neuropatické bolesti, tedy např. srovnávající, jak přesné je stanovení diagnózy neuropatické bolesti na základě klinického vyšetření ve srovnání s podrobnějšími vyšetřovacími metodami. Obecně lze říci, že klinické vyšetření mj. přispívá k diagnostice základního onemocnění, které je příčinou léze nebo onemocnění senzitivního nervového systému. Současně poskytuje orientační informaci (typu norma/abnormita) o přítomnosti senzitivního postižení pro testované senzitivní modalit a umožní tedy odhalit zřetelně vyjádřené poruchy citlivosti. Nediagnostikuje však jemnější změny senzitivní percepce a je pouze omezeně využitelné také pro longitudinální sledování pacientů, protože detekuje až velmi výrazně vyjádřené změny klinického nálezu (*Vlčková a Šrotová 2014*). Z uvedených důvodů vzrůstá v posledních letech trend k přesnějšímu vyšetření jednotlivých senzitivních modalit v rámci tzv. kvantitativního testování senzitivity (Quantitative Sensory Testing, QST).

3.2.2. *Kvantitativní testování senzitivity*

Kvantitativní testování senzitivity představuje skupinu psychofyzikálních metod umožňujících komplexně hodnotit funkční stav somatosenzitivního nervového systému (Backonja et al.

2013). Svým psychofyzikálním charakterem je tedy QST blízké diagnostickým metodám jako jsou audiometrie či přístrojové vyšetření perimetru nebo vyšetření zrakové ostrosti pomocí optotypů, které jsou v klinické praxi rutinně používané a široce akceptované jako validní a spolehlivé diagnostické testy (Backonja et al. 2013).

Ve srovnání s běžným klinickým vyšetřením senzitivity poskytuje QST řadu výhod: tyto metody jsou přesnější a umožní odhalit i méně klinicky vyjádřené abnormality. Navíc jsou kvantifikované a postup vyšetření je standardizovaný, což poskytuje lepší oporu pro inter- i intraindividuální srovnání pacientů a jejich longitudinální sledování (Backonja et al. 2013, *Vlčková a Šrotová 2014*).

Metody QST jsou využívány pro diagnostické účely a monitoraci pacientů s některými neurologickými onemocněními. V klinické praxi dominuje využití QST u senzitivních neuropatií a to zejména těch, které nejsou prokazatelné běžnými elektrofyziologickými testy, tedy především u neuropatie tenkých vláken (Lacomis et al. 2002, *Vlčková-Moravcová 2008a, Vlčková-Moravcová 2008b, Vlčková-Moravcová a Bednařík 2009, Vlčková 2011, Haanpää et al. 2011, Divišová et al. 2012, Backonja et al. 2013, Potočková et al. 2016*).

Klíčovou rolí hraje QST také v diagnostice a klasifikaci pacientů s neuropatickou bolestí (Cruccu et al. 2009, Haanpää et al. 2011, Backonja et al. 2013, Finnerup et al. 2016). Průkaz senzitivních abnormalit pomocí detailního vyšetření senzitivity v oblasti bolesti je podmínkou pro stanovení diagnózy „pravděpodobné neuropatické bolesti“ podle aktuálně užívaného klasifikačního schématu (viz výše) (Finnerup et al. 2016). Významnou aplikací QST je možnost fenotypizace pacientů s neuropatickou bolestí (tedy určení jejich senzitivního profilu založeného na změnách citlivosti pro jednotlivé modality detekovatelných pomocí QST metod) (viz samostatná kapitola níže). Opakované hodnocení senzitivních profilů během terapie poskytne mj. možnost cíleně odlišit vliv terapie na konkrétní symptomy (např. na alodynii, hyperalgezií apod.). Klasifikace pacientů podle jednotlivých senzitivních fenotypů poskytuje také podklad pro jejich cílenější výběr pro účely klinických studií. Recentně bylo také prokázáno, že QST metody a zejména jejich tzv. dynamické aplikace (viz samostatná kapitola níže) mohou mít u pacientů s bolestí i význam prognostický a umožní např. predikci odpovědi pacienta na určitý typ terapie či pravděpodobnosti rozvoje pooperačních bolestí (Arendt-Nielsen a Yarnitsky 2009, Backonja et al. 2013, *Kincová et al. 2016*).

V minulosti byly pomocí kvantitativních (obvykle přístrojově asistovaných) metod testovány zejména modality termického čítí (které jsou jinak obtížně klinicky hodnotitelné) a to v rámci

tzv. testování termického prahu (Thermal Threshold Testing, TTT) (Dyck et al. 1993, Yarnitsky 1997, *Moravcová a Bednařík 2003, Moravcová et al. 2005b, Buršová et al. 2012c*). Spektrum senzitivních modalit vyšetřitelných v rámci QST se však následně výrazně rozrůstalo (Yarnitsky 1997, Rolke et al. 2006a) a v současnosti lze tímto způsobem testovat všechny typy senzitivních nervových vláken (Backonja et al. 2013, Rolke et al. 2006a, *Vlčková a Šrotová 2014*).

Orientační přehled senzitivních modalit včetně typu nervových vláken, která danou modalitu zprostředkují a možností jejich vyšetření pomocí klinických, QST a paraklinických metod poskytuje tabulka 1). Podrobný výčet kvalitativních, semikvantitativních i kvantitativních metod hodnocení jednotlivých senzitivních modalit včetně dostupných normativních dat byl publikován formou minimonografie (*Vlčková a Šrotová 2014*) a je přílohou této práce.

Tabulka 1. Sumarizace metod testování funkce jednotlivých typů nervových vláken

TYP VLÁKEN	MODALITA CITLIVOSTI	ZPŮSOB TESTOVÁNÍ		
		Jednoduché klinické testy (kvalitativní či semikvantitativní)	QST	Laboratorní testy
Aβ	Dotyk	Smotek vaty, štětka	Freyova filamenta	Kondukční studie senzitivních nervů, SEP
	Vibrace	Nekalibrovaná ladička	Vibrometrie, graduovaná ladička	
Aδ	Bodnutí	Neuroopen, špendlík	Algometrie, kalibrované špendlíky	LEPs, CHEPs
	Chlad	Tip-therm, zkumavky	Termické testování	
C	Bolest (pálení)		Termické testování	Kožní biopsie, CCM
	Teplo	Zkumavky	Termické testování	

Použité zkratky:

QST - kvantitativní testování senzitivity (Quantitative Sensory Testing)

LEPs - laserem evokované potenciály (Laser Evoked Potentials)

CHEPs - evokované potenciály vyvolatelné kontaktním teplem (Contact-Heat Evoked Potentials)

CCM - korneální mikroskopie rohovky (corneal confocal microscopy).

Modifikováno z Cruccu G, Sommer C, Anand P, Attal N, Baron R, Garcia-Larrea L, Haanpaa M, Jensen TS, Serra J, Treede RD. EFNS guidelines on neuropathic pain assessment: revised 2009. Eur J Neurol 2010;17:1010-1018 a Vlčková 2011.

3.2.2.1. Limitace kvantitativního testování senzitivity

Podobně jako každá psychofyzikální metoda má i QST řadu omezení, k nimž patří zejména:

1. *Nutnost spolupráce pacienta:* Vyšetření senzitivity obecně (včetně QST) patří k poměrně náročným součástem klinického neurologického vyšetření vyžadujícím aktivní spolupráci pacienta: vyšetření tedy nelze provádět u pacientů v bezvědomí či u jedinců nespolupracujících. Obtížné je také testování velmi malých dětí. U těchto skupin pacientů tak nelze stanovit diagnózu pravděpodobné neuropatické bolesti.

Výsledky vyšetření mohou být také významně ovlivněny únavou, poruchami koncentrace, motivací pacienta, úrovní kognitivních funkcí, sugestibilitou pacienta a jeho tendencí k simulaci či agravaci obtíží. Tyto fenomény, resp. obecně úroveň spolupráce, jsou během QST vyšetření testovány (mj. hodnocením variability odpovědí na podněty identické intenzity a/nebo zařazením tzv. nulových stimulů, kdy není aplikován žádný podnět, což by měl pacient spolehlivě rozpoznat, aby mohlo být jeho testování hodnocené jako validní) (Yarnitsky 1997, Moravcová a Bednařík 2003, Vlčková a Šrotová 2014, Backonja et al. 2013)

2. *Subjektivní charakter testování:* Hodnocení senzitivních vjemů vyvolaných odpovídající stimulací v rámci klinického či QST vyšetření je vždy subjektivní. U fyziologicky a anatomicky konzistentních nálezů jsou však výstupy QST (podobně jako např. audiometrie, perimetrie či hodnocení zrakové ostrosti) pokládány za validní, spolehlivé a do značné míry za objektivní test (Backonja et al. 2013, Vlčková a Šrotová 2014).
3. *Absence přesné topizační hodnoty.* Pokud je vyšetření prováděno pouze v jednom místě, nelze s jeho pomocí určit rozsah postižení (což však lze zpřesnit testováním více oblastí). Neumožňuje rozlišit ani segment postižení senzitivního nervového systému (centrální x periferní nervový systém) či přesné určení místa léze (míšň, kmenová, subkortikální či kortikální dysfunkce apod.)
4. *Průkaz abnormit i u bolesti jiného původu (neneuropatické)* v řadě publikovaných studií. Průkaz abnormit na QST vyšetření není automaticky průkazem neuropatické bolesti a QST vyšetření tedy samo o sobě neumožňuje odlišit pacienty s neuropatickou u bolestí od jedinců s bolestí jiné etiologie (Cruccu et al. 2010).
5. *Nutnost tréninku* vyšetřujícího (a před vlastním začátkem testování orientačně i vyšetřovaného).

3.2.2.2. Komplexní protokol kvantitativního testování senzitivity

Velmi významným mezníkem ve využití QST pro klinické i experimentální účely bylo vytvoření a následná validace komplexního protokolu kvantitativního testování senzitivity německou pracovní skupinou pro výzkum neuropatické bolesti (Der Deutsche Forschungsverbund Neuropathischer Schmerz (DFNS), The German Research Network on Neuropathic Pain) (Rolke et al. 2006a, Rolke et al. 2006b). Tento komplexní protokol zahrnuje vyšetření řady senzitivních modalit a reflektuje funkci různých typů nervových vláken a obou základních senzitivních drah (tedy spinothalamické dráhy i tractus spino-bulbo-thalamicus, t.j. dráhy lemniskální). Aktuálně je celý protokol téměř bezvýhradně využíván pro hodnocení senzitivity ve studiích, zaměřených na fenotypizaci pacientů s neuropatickou bolestí různého původu (aktuální počet citací článku Rolke et al. 2006a na WOS k VII/2018 je přes 1000) (Finnerup et al. 2016, Backonja et al. 2013). Publikována byla i validovaná česká verze protokolu (Šrotová et al. 2015a) obsahující detailní výčet hodnocených modalit včetně způsobu jejich testování, která je přílohou této práce.

DFNS protokol poskytuje informace o:

1. *ztrátě cití* pro některou ze senzitivních či algických modalit (hypestezie či hypoalgezie, označované také jako „abnormity typu loss“, tedy představující sníženou funkci receptorů či navazujících struktur periferního či centrálního nervového systému, zúčastněných v percepci příslušného typu senzitivních nebo algických podnětů)
2. *abnormálně zvýšené algické percepci či bolesti evokované podněty, které jsou za běžných okolností nebolestivé* (hyperalgezie či alodynie, označované jako „abnormity typu gain“, tedy poukazující na abnormálně zvýšenou funkci nociceptorů či navazujících periferně neurogenních struktur či centrálních senzitivních drah). Tyto fenomény přitom obvykle nemají korelát v elektrofyziologických metodách, užívaných pro hodnocení alterace senzitivního systému (např. indukční studie periferních nervů prováděné v rámci elektromyografického vyšetření či somatosenzitivní evokované potenciály).
3. *časové sumaci percepce bolestivých podnětů* (jako jednom z centrálních nocicepčních mechanismů, jehož abnormální zvýšení se může podílet na rozvoji řady bolestivých stavů – viz také níže sekce o dynamických QST metodách).

Klíčovými výhodami DFNS QST protokolu jsou:

1. *široké spektrum hodnocených modalit*
2. možnost *rozlišení pozitivních („gain“) a negativních („loss“)* senzitivních fenoménů.
3. *standardizace metodiky* vyšetření (a to z hlediska vybavení pro vyšetření jednotlivých senzitivních modalit, slovních instrukcí, poskytovaných pacientům v rámci hodnocení, i použití validovaných algoritmů testování)
4. *věkově stratifikovaná normativní data* dostupná pro řadu lokalizací a to odděleně pro muže a ženy (Rolke et al. 2006a, Magerl et al. 2010, Pfau et al. 2014).
5. *kvantifikace výstupů* jako podklad pro interindividuální srovnání na úrovni individuální i skupinové i pro srovnání intraindividuální v rámci *longitudinálního sledování* pacientů (a to pro monitoraci pozitivních i negativních fenoménů včetně diferencovatelné odpovědi jednotlivých senzitivních symptomů na aplikovanou terapii).
6. *uspokojivá reprodukovatelnost nálezů a jejich poměrně nízká intraindividuální variabilita* u většiny pacientů, kterou potvrzují nálezy řady studií (Yarnitsky et al. 1997, Rolke et al. 2006a, Rolke et al. 2006b, Backonja et al. 2013) včetně prací publikovaných naší pracovní skupinou (Moravcová et al. 2005b, Šrotová et al. 2015a).

Protokol tak splňuje všechny podmínky doporučované pro QST vyšetření v rámci širokého konsenzu speciální skupiny zaměřené na neuropatickou bolest (Special Interest Group on Neuropathic Pain (NeuPSIG) při Mezinárodní asociaci pro studium bolesti (International Association for the Study of Pain, IASP) (Backonja et al. 2013).

3.2.2.3. *Kvantitativní testování senzitivity jako podklad pro hodnocení senzitivních profilů*

Jednou z nejperspektivnějších aplikací QST metod je jejich využití pro fenotypizaci pacientů s neuropatickou bolestí na základě změny senzitivní percepce detekovaných v rámci objektivního vyšetření senzitivity. Jedný se o přístup analogicky jako v případě výše zmíněných symptomových profilů založených na subjektivních senzitivních potížích. Důvodem pro tento způsob využití QST dat je snaha o cílenější a „patofyziologicky orientovaný“ přístup k terapii neuropatické bolesti. Tento postoj vychází ze skutečnosti, že řada pacientů s neuropatickou bolestí není dostatečně úspěšně léčena a řada slibných preparátů není v klinických studiích účinná, a to navzdory zlepšujícímu se porozumění komplexní neurobiologii bolesti (Backonja et al. 2013, Baron et al. 2017). Neoptimální výsledky klinických studií jsou přitom pravděpodobně podmíněny spíše nižším podílem responderů (tedy skutečností, že na terapii

odpovídá pouze určitá část léčených pacientů) než nedostatečným efektem podávané terapie. Proto trvá snaha o nalezení způsobu přesnější klasifikace pacientů založené na patofyziologických mechanismech rozvoje bolesti a tedy poskytující lepší možnosti predikce odpovědi na konkrétní terapii. Tato klasifikace by pak představovala podklad pro cílený výběr vhodných pacientů, potenciálně profitujících z konkrétního typu léčby, a to jak v rámci klinického managementu těchto pacientů, tak pro potřeby experimentálních i klinických studií. Pacienty lze pro tento účel klasifikovat pomocí výše uvedených dotazníkových nástrojů zaměřených na přítomnost/intenzitu určitého spektra subjektivních senzitivních symptomů (Attal et al. 2018, viz výše) a/nebo právě na podkladě různých senzitivních profilů vycházejících z klinického vyšetření a/nebo QST metod.

Hodnocení senzitivních profilů vychází z faktu, že se na rozvoji bolesti podílí několik různých patofyziologických mechanismů (Campbell a Meyer 2006), k nimž patří např. blok vedení, generování ektopických impulzů v poškozených a/nebo zachovalých aferentních nervových vláknech a periferní či centrální senzitivizace (Campbell a Meyer 2006, Baron et al. 2017, Vollert et al. 2017, Vollert et al. 2018). Výskyt těchto mechanismů se liší mezi různými příčinami rozvoje bolesti, ale i mezi různými pacienty s neuropatickou bolestí stejné etiologie. Současně naopak platí, že obdobné patofyziologické mechanismy se mohou podílet na rozvoji neuropatické bolesti způsobené různými příčinnými faktory (Baron et al. 2017). Zmíněné patofyziologické mechanismy nelze většinou u pacientů testovat přímo, předpokládá se však, že jsou asociovány s určitými změnami senzitivních funkcí (Baron et al. 2017, Vollert et al. 2017, Vollert et al. 2018). Příkladem může být tepelná hyperalgezie, která je spojena s periferní senzitivizací, nebo hyperalgezie vůči ostré mechanicky vyvolané bolesti (pinprick hyperalgesia), která je naopak asociována se senzitivizací centrální (Baron et al. 2017). Senzitivní profily, které poskytují komplexní informaci o celém spektru senzitivních funkcí (hyperalgezie, alodynie, hypestezie pro různé senzitivní modality), tak představují určité vodítko, reflektující dysfunkci patofyziologických mechanismů zpracování senzitivní aferentace (Baron et al. 2010, Baron et al. 2017, Maier et al. 2010). Stratifikace pacientů podle zmíněných senzitivních profilů se jeví jako vhodnější než dříve používaná klasifikace dle příčinných faktorů neuropatie a to jak z hlediska výběru vhodné terapie pro příslušného pacienta, tak i z hlediska výběru vhodných responderů pro potřeby klinických studií. Zařazení QST metod do studií zaměřených na ovlivnění neuropatické bolesti proto aktuálně doporučuje i Evropská léková agentura (European Medicines Agency, EMA) (European Medicines Agency 2015).

Tento přístup je podkladem pro narůstající využití hodnocení senzitivních profilů u pacientů s neuropatickou bolestí různé etiologie. Recentně bylo publikováno několik velkých studií zaměřených na tuto problematiku (Baron et al. 2017, Vollert et al. 2018, Uceyler et al. 2018, Themistocleous et al. 2016) včetně prací naší pracovní skupiny zaměřené na určení senzitivních profilů u pacientů s bolestivou diabetickou polyneuropatií (*Raputová et al. 2017*) a/nebo u širší skupiny klinických jednotek (tedy u pacientů s periferní neuropatickou bolestí při diabetické polyneuropatii a jedinců s centrální neuropatickou bolestí u roztroušené sklerózy) (*Šrotová et al. 2015a*). Obě práce jsou komentovanými přílohami tohoto textu.

3.2.2.3.1. Přístupy k hodnocení senzitivních profilů pomocí QST metod

Senzitivní profily založené na metodách QST mohou být hodnoceny dvěma možnými způsoby. První možností je empirické předdefinování určitých profilů na základě očekávaných QST nálezů při určitých patofyziologických mechanismech a následně rozčlenění pacientů sledované skupiny podle těchto předdefinovaných profilů. Druhým přístupem je pak clusterová analýza QST nálezů v hodnocené kohortě pacientů.

Příkladem *prvního přístupu* je hodnocení výskytu dvou klasicky popisovaných profilů, tzv. deaferentačního profilu a profilu označovaného jako „iritabilní nociceptor“ (Fields et al. 1998, Demant et al. 2014, Themistocleous et al. 2016, *Raputová et al. 2017*). U pacientů **s deaferentačním profilem** dominuje snížení až ztráta senzitivních funkcí zprostředkovaných různými typy nervových vláken (ukazující na sníženou senzitivní aferentaci). Pacienti **s profilem typu „iritabilního nociceptoru“** mají naopak zachovalou funkci tenkých nervových vláken (tedy intaktní termickou a algickou percepci) a současně známky hypersenzitivity (tedy termickou či mechanickou hyperalgezií a/nebo alodynii) (Fields et al. 1998, Demant et al. 2014). Tyto profily lze spolehlivě rozlišit např. u pacientů s postherpetickou neuralgií (Fields et al. 1998) a jejich využitelnost byla prokázána i ve větších souborech pacientů s neuropatickou bolestí variabilní etiologie (Demant et al. 2014). Recentně byly publikovány 2 práce zaměřené na výskyt zmíněných profilů u pacientů s bolestivou diabetickou neuropatií a to v obou případech v rámci velkých průřezových observačních studií (Themistocleous et al. 2016, *Raputová et al. 2017*). Obě práce shodně prokázaly dominující výskyt deaferentačního profilu, který je prokazatelný u nadpoloviční většiny pacientů této skupiny. Podíl pacientů s profilem „iritabilního nociceptoru“ byl naopak v obou hodnocených souborech poměrně nízký, což naznačuje poněkud odlišné patofyziologické mechanismy

rozvoje neuropatické bolesti u většiny pacientů s bolestivou diabetickou neuropatií ve srovnání např. s postherpetickou neuralgií (a tedy pravděpodobně i nutnost odlišné terapie neuropatické bolesti u těchto jednotek) (Themistocleous et al. 2016, Raputova et al. 2017). Při tomto způsobu hodnocení zůstává vždy také část pacientů nezařazena, protože nespadá do žádné z výše zmíněných jasně definovaných kategorií.

Druhý přístup hodnocení senzitivních profilů využívají v recentně publikované práci např. Baron et al. (2017). Tato velká průřezová studie je zaměřená na hodnocení senzitivních profilů ve skupině více než 900 pacientů s neuropatickou bolestí různé etiologie a to pomocí clusterové analýzy hodnot 13 základních senzitivních parametrů DFNS QST protokolu. Validita stanovených senzitivních profilů a jejich replikovatelnost byly následně ověřeny na menší nezávislé skupině více než 200 pacientů z jiné kohorty. Analýza umožnila vytvoření 3 základních charakteristických senzitivních profilů:

1. **profil „sensory loss“** (vyskytující se přibližně u poloviny pacientů s neuropatickou bolestí) je charakterizovaný snížením funkce tenkých a silných nervových vláken. Tito pacienti mají tedy sníženou citlivost pro teplo a chlad a současně pro vibrační cití, pro dotyk hodnocený pomocí vonFreyových filament i pro ostrou bolest vyvolanou mechanicky, tedy píchnutím špendlíkem. Uvedené změny jsou ve všech případech reflektovány zvýšením senzitivních prahů pro tyto modalitty a jsou často kombinovány s paradoxním vnímáním chladných podnětů jako teplých až horkých (Paradoxical Heat Sensation, PHS). PHS fenomén je tedy v tomto klasifikačním schématu řazen mezi negativní senzitivní fenomény podmíněné ztrátou funkce nervových vláken.

Předpokládaným patofyziologickým mechanismem rozvoje spontánní bolesti u pacientů s tímto profilem je ektopická aktivita generovaná v proximálních segmentech poškozených nociceptorů (tedy např. v neuronech senzitivních ganglií zadních míšních kořenů) a/nebo v navazujících neuronech centrálního nervového systému, které v důsledku poškození nociceptorů ztratily aferentaci.

2. **profil „thermal hyperalgesia“** (asi třetina pacientů) je typický zachovalými senzitivními funkcemi (tedy fyziologickými senzitivními prahy pro teplo, chlad a mechanické modalitty) a současně hyperalgezií pro teplo a chlad a mírnou mechanickou dynamickou alodynii.

Na rozvoji hyperalgie se u jedinců s tímto profilem zřejmě podílí zejména periferní senzitivace (podmíněná nadměrnou expresí iontových kanálů a některých receptorů v přežívajících periferních neuronech). Spontánní bolest je pak u pacientů tohoto clusteru podmíněna především abnormálně zvýšenou spontánní aktivitou v těchto zachovalých funkčních nociceptorech. Tato spontánní hyperaktivita může současně vést k určité centrální senzitivaci na úrovni zadních rohů míšních, v jejímž důsledku získají taktilní podněty (vedené A-beta vlákna) schopnost aktivovat centrální nociceptivní neurony. Tento mechanismus je pak podkladem mírné mechanické dynamické alodynie, detekovatelné u významné části pacientů s tímto profilem.

3. **profil „mechanical hyperalgesia“** (nejvýše čtvrtina pacientů, ve validační kohortě pak jen asi šestina pacientů) je charakteristický snížením funkce tenkých nervových vláken (t.j. zvýšením senzitivních prahů pro teplé a chladné podněty, většinou však méně výrazným než v profilu 1) a současně výskytem mechanické dynamické alodynie a hyperalgií pro ostrou mechanicky vyvolanou bolest (evokovanou pomocí špendlíku).

Hyperalgie je u pacientů tohoto profilu pravděpodobně podmíněna především centrální senzitivací (pro kterou je i v experimentálních animálních modelech typická hypersenzitivita pro mechanické, ale nikoli termické podněty). Podkladem spontánní bolesti je ektopická aktivita generovaná v nocicepčním systému (a to na periferní a/nebo centrální úrovni).

Z pravděpodobných patofyziologických mechanismů, podílejících se na rozvoji bolesti u jednotlivých profilů, a předchozích studií (animálních i humánních) zaměřených na ovlivnění jednotlivých mechanismů pomocí různých preparátů užívaných v terapii bolesti, pak autoři studie dovozují potenciální rozdíly v reakci pacientů s jednotlivými profily na možnou terapii neuropatické bolesti. Pacienti s profilem typu „sensory loss“ tak podle retrospektivních studií vykazují vyšší účinnost perorálních opioidů. Naopak oxkarbazepin má u této skupiny pacientů pravděpodobně efektivitu nižší a to dokonce v rámci studií prospektivních (Demant et al. 2014). Jedinci s profilem typu „thermal hyperalgesia“ vykazují vyšší účinnost oxkarbazepinu, lokálně aplikovaného kapsaicinu a botulotoxinu A a nižší účinnost topického lidokainu. U pacientů s mechanickou hyperalgií je pak v retrospektivních studiích prokazována vyšší účinnost léčby topickým i intravenózním lidokainem, pregabalinem a lamotriginem (Baron et al. 2017).

Všechny popsané clustery se v uvedené studii (Baron et al. 2017) vyskytovaly napříč různými etiologickými jednotkami, které byly podkladem rozvoje bolesti, ale jejich proporcionální výskyt byl u různých příčinných faktorů odlišný. Např. poslední profil („mechanical hyperalgesia“) byl nejčastější u pacientů s postherpetickou neuralgií (kde byl prokázán téměř u poloviny všech hodnocených pacientů), zatímco u jiných jednotek byl jeho výskyt velmi významně nižší (např. u radikulopatií a polyneuropatií nedosahoval ani 20 %). Rozdíly v proporcionálním zastoupení jednotlivých profilů u různých etiologických jednotek jsou tak zcela v souladu s výše zmíněným odlišným zastoupením empiricky stanovených profilů (v rámci prvního jmenovaného přístupu) u pacientů s diabetickou neuropatií a postherpetickou neuralgií.

Profily v Baronově studii (vytvořené pomocí clusterové analýzy) obecně vykazují značnou podobnost s empiricky nastavenými profily z prvního jmenovaného přístupu. Profil „sensory loss“ odpovídá deafferentaci, kdežto profil „thermal hyperalgesia“ je v zásadě v souladu s profilem „iritabilního nociceptoru“ (čemuž odpovídá i jeho poměrně nízký výskyt ve skupině pacientů s neuropatickou bolestí variabilní etiologie). Poslední z hodnocených profilů označovaný jako „mechanical hyperalgesia“ pak představuje určitý přechod mezi těmito krajními možnostmi, v němž se kombinuje mechanická hyperalgie jako iritační příznak s určitou ztrátou senzitivních funkcí tenkých (a méně i silných) vláken (t.j. příznakem charakteru „loss“). Tento poslední profil tak v čisté formě neodpovídá žádnému z profilů předchozího schématu.

Výhodou druhého přístupu k tvorbě symptomových profilů je skutečnost, že každý pacient je přiřazen k určitému profilu na základě nejvyšší míry podobnosti – k některému z profilů jsou tak přiřazeni i pacienti, kteří nevykazují žádné absolutní QST abnormality a jejich percepce všech senzitivních modalit se tedy pohybuje v rozmezí $\pm 2SD$ hodnot normativního souboru pro příslušnou věkovou kategorii. Tato skutečnost však současně představuje i určitou nevýhodu tohoto přístupu – jednotlivé profily obsahují širší spektrum pacientů než u prvního jmenovaného přístupu, což může být podkladem menší uniformity terapeutické odpovědi v takto vybrané skupině pacientů. Naopak při přiřazování pacientů k empiricky stanoveným profilům na základě jasného výskytu abnormalit jsou takto vytvořené skupiny pacientů homogennější (a mají tedy potenciál k uniformnější terapeutické odpovědi) a všichni v nich zařazení jedinci vykazují jasné abnormality. Část pacientů však není možné přiřadit žádnému z hodnocených profilů (Rapatova et al. 2017).

3.2.2.4. Dynamické metody kvantitativního testování senzitivity

Relativně novou aplikaci QST metod představuje také problematika tzv. dynamického kvantitativního testování senzitivity (Dynamic methods of Quantitative Sensory Testing, dQST). Při tomto způsobu vyšetření je bolest percipující systém stimulován způsobem, který odhalí určité fyziologické mechanismy fungující v percepci bolesti (Arendt-Nielsen a Yarnitsky 2009). Metody dynamického QST tak umožňují objektivizovat funkci tzv. centrálních modulačních mechanismů algické percepce, jejichž individuální výkonnost odráží „pronociceptivní“ či „antinociceptivní“ nastavení daného jedince a pravděpodobně hraje roli v rozvoji akutní bolesti i chronických bolestivých stavů a má vliv i na efekt analgetické terapie (Arendt-Nielsen a Yarnitsky 2009, Yarnitsky 2010).

K metodám dQST patří zejména testování mechanismů centrální integrace, jako je časová sumace (temporal summation, TS), případně sumace prostorová (spatial summation) a testy descendních kontrolních mechanismů, zejména podmíněné modulace bolesti (conditioned pain modulation, CPM), označované i jako „difuzní inhibice nociceptivních podnětů“ či „endogenní analgézie“ (Arendt-Nielsen a Yarnitsky 2009, Yarnitsky 2010).

Principem **fenoménu časové sumace percepce bolestivých podnětů** (také označovaného jako tzv. wind-up fenomén) je nárůst intenzity bolesti při opakované (rychle po sobě následující) stimulaci podnětem identické modality a intenzity. Tento fenomén zřejmě odráží především centrální integraci percepce algických podnětů v oblasti zadních rohů míšních. Abnormitou, reflektující zvýšené pronociceptivní nastavení vyšetřeného jedince, je v tomto případě akcentace mechanismu s výraznějším nárůstem algického vnímání opakovaných podnětů oproti běžným nálezům (Nie et al. 2005, Arendt-Nielsen a Yarnitsky 2009, *Kincova et al. 2016*).

Podstatou **podmíněné modulace bolesti** je skutečnost, že bolestivý podnět, aplikovaný na určitou část těla („podmiňující“ - conditioned stimulus), vyvolá difuzní inhibici algické percepce jiné bolestivé stimulace (testovacích podnětů) na téže i jiné části těla (Arendt-Nielsen a Yarnitsky 2009, Yarnitsky 2010, Eisenberg et al. 2010, *Kincova et al. 2016*). Pokud tedy během podmiňující modulace nedojde ke snížení bolestivosti testovacích podnětů, jedná se o pronociceptivní abnormitu CPM testu. Tento mechanismus odráží descendní inhibiční modulační složku percepce bolesti a zejména funkci spino-medullo-spinálních mechanismů.

Abnormální funkce těchto mechanismů byla opakovaně prokázána především u pacientů tzv. idiopatickými chronickými bolestivými stavy (např. fibromyalgií či idiopatickou temporomandibulární bolestí), ale také u řady typů bolestí hlavy (t.j. u tenzní bolesti hlavy,

migrény či cluster headache), některých chronických nociceptivních bolestí (např. u osteortrózy nebo chronických svalových bolestí) a také některých jednotek manifestujících se bolestí neuropatickou (tedy u postherpetické neuralgie, centrální poiktové bolesti či bolesti při polyneuropatii indukované chemoterapií) (Yarnitsky 2010, Yarnitsky et al. 2014). U většiny zmíněných stavů bylo přitom testování provedeno v oblastech nepostižených bolestí (či základním onemocněním). Abnormální funkce centrálních modulačních mechanismů v těchto studiích tedy odráží spíše celkové nastavení nocicepce u daného jedince než změny algické percepce vznikající přímo v oblasti bolesti nebo z této oblasti přenesené (Yarnitsky et al. 2014). Výše uvedené studie u pacientů s chronickými bolestivými stavy však neumožňují rozlišit, zda jsou zachycené změny centrálních modulačních mechanismů algické percepce v příčinné souvislosti s bolestí (i když lze takový vztah předpokládat). V případě zvažované kauzální souvislosti pak nelze spolehlivě rozhodnout, zda je dQST verifikovaná dysfunkce centrálních modulačních mechanismů příčinou nebo následkem chronického bolestivého stavu (Yarnitsky et al. 2014). Plauzibilní jsou pravděpodobně obě zmiňované možnosti.

Podporu první z uvedených hypotéz (tedy ***dysfunkce modulačních mechanismů bolesti jako příčina rozvoje bolestivých stavů***) přináší studie testující centrální modulační mechanismy algické percepce ještě před rozvojem bolesti. Z těchto studií vyplývá, že funkce zmíněných modulačních mechanismů umožňuje např. predikovat rozvoj chronické pooperační bolesti, a to při testování v předoperačním období, kdy pacient ještě žádné bolesti nemá. Pacienti, kteří mají při předoperačním testování méně efektivní podmíněnou modulaci bolesti, tak mají vyšší pravděpodobnost rozvoje chronických bolestí po thorakotomii (Yarnitsky 2008), břišní chirurgii (Wilder-Smith et al. 2010) či v návaznosti na císařský řez. Vstupní pronociceptivní nastavení se tedy zdá být předpokladem pro následný rozvoj bolestí různého typu.

Systém modulující percepci nociceptivních podnětů však vykazuje i plastické změny, což naopak podporuje druhou zvažovanou hypotézu, tedy ***změny těchto mechanismů jako důsledek chronické bolesti***. Také pro tuto hypotézu svědčí několik provedených studií. Pacienti s osteoartrózou kyčelního (a/nebo kolenního) kloubu, kteří podstoupili náhradu postiženého kloubu endoprotézou a v této souvislosti u nich došlo k redukci intenzity původních chronických bolestí nebo k jejich vymizení, vykazovali signifikantní zlepšení funkce modulačních mechanismů bolesti (např. zvýšení efektivity podmíněné modulace bolesti) (Kosek a Ordeberg 2000, Graven-Nielsen et al. 2012). Podobný efekt byl prokázán u pacientů s polyneuropatií v návaznosti na farmakologické zmírnění jejich bolestí (Yarnitsky et al. 2012).

Mechanismy dQST jsou také potenciálně využitelné v predikci terapeutické odpovědi na léčbu preparáty používanými v terapii bolesti (a tedy pravděpodobně i při volbě vhodné metody léčby u daného pacienta či při výběru vhodných pacientů pro potřeby farmakologických studií). Provedené studie např. prokazují, že s využitím dQST metod je možné předvídat analgetický efekt opioidů (Eisenberg et al. 2010) nebo duloxetinu (Yarnitsky et al. 2012).

3.2.3. Doporučení pro využití testování senzitivity vč. QST v diagnostice neuropatické bolesti

Podle aktuálních doporučení NeuPSIG (Haanpää et al. 2011, Finnerup et al. 2016) and EFNS (Cruccu et al. 2010) je klinické vyšetření klíčovou součástí diagnostického procesu neuropatické bolesti. Jeho cílem je nalezení případných senzitivních abnormit vztahujících se k lézi somatosenzitivního nervového systému, která je anatomickým podkladem neuropatické bolesti.

Nejdůležitější částí klinického vyšetření je vyšetření senzitivity, které by mělo zahrnovat hodnocení taktilního cití, vibračního cití, ostré mechanicky vyvolané bolesti (evokované píchnutím špendlíkem), chladu a tepla (Haanpää et al. 2011). Vyšetření senzitivních funkcí by se mělo vždy řídit diagnózou základního onemocnění, které zvažováno jako příčina postižení somatosenzitivního nervového systému a tedy i rozvoje bolesti u daného pacienta (v rámci diagnostického procesu neuropatické bolesti jde často pouze o pracovní diagnózu, která je však nejpravděpodobnějším vysvětlením na základě do té doby zjištěných informací)(Haanpää et al. 2011). K vlastnímu hodnocení senzitivních funkcí by měl vyšetřující přistupovat otevřeně a trpělivě a se snahou získat plný rozsah informací o testovaných senzitivních modalitách a funkcích. Vyšetření je totiž často komplikováno skutečností, že pacientům s neuropatickou bolestí nejsou některé senzitivní abnormity zjišťované během vyšetření dosud známé a je pro ně obtížné je popsat nebo vysvětlit. Základní klinické vyšetření používající jednoduché nástroje by mělo vždy předcházet komplikovanějším neurofyzilogickým či psychofyzikálním technikám včetně QST. V současnosti však není definován žádný zlatý standard senzitivních abnormit, které by měly být prokázány v oblasti bolesti, aby mohla být označena jako neuropatická. Pro stanovení diagnózy neuropatické bolesti je proto nadále doporučeno spoléhat se především na expertní hodnocení založené na komplexním klinickém vyšetření a provedených paraklinických metodách (Haanpää et al. 2011).

Kvantitativní testování senzitivity může být v diagnostice neuropatické bolesti využito vedle klinického neurologického vyšetření především za účelem stanovení senzitivního profilu

(Cruccu et al. 2010, Haanpää et al. 2011). Nemá však topizační hodnotu a neumožní tedy stanovit úroveň postižení nervového systému. QST abnormality byly navíc v řadě studií prokázány i u pacientů s jinou než neuropatickou bolestí. Záchyt abnormalit při QST vyšetření tedy nepředstavuje automaticky průkaz neuropatické etiologie obtíží pacienta (Cruccu et al. 2010). QST vyšetření proto není spolehlivou metodou využitelnou v diferenciální-diagnostice bolesti neuropatické a jiné etiologie (doporučení na úrovni správné klinické praxe – good practice point) (Cruccu et al. 2010). Přesto jde o vyšetření vysoce přínosné a to zejména z důvodu možnosti detekce senzitivních profilů, která je vysoce perspektivní oblastí v rámci problematiky výzkumu neuropatické bolesti. Pro budoucí studie využívající QST vyšetření platí doporučení, že by měly optimálně používat komplexní protokoly QST vyšetření (jako např. DFNS protokol) umožňující stanovení kompletního QST profilu. Obecně je pro hodnocení mechanické alodynie/hyperalgezie doporučeno využívat jednoduchý štětec a alespoň jeden kalibrovaný špendlík a/nebo vlákno vyšší tloušťky (a tedy vyšší intenzity aplikovaného podnětu – např. 128 mN). Pro hodnocení termické alodynie či hyperalgezie je nejvhodnější využít počítačově asistovaných metod testování termického cití. Rutinní měření termických prahů (mimo klinické či výzkumné studie) však není obligátní součástí diagnostického procesu neuropatické bolesti v běžné klinické praxi. Jednoduchý a senzitivní nástroj pro hodnocení termické alodynie/hyperalgezie, který by byl široce dostupný, prozatím není k dispozici (Cruccu et al. 2010).

QST testování by mělo být prováděno vyšetřujícím zaslepeným vůči klinickému stavu pacienta. Na základě zjištěných nálezů by pacienti měli být kategorizováni do skupiny pravděpodobné či potvrzené (po zohlednění výsledků dalších konfirmačních testů, výjimečně i bez nich – např. u pacientů po amputaci) neuropatické bolesti v souladu s aktuálně platným stratifikačním systémem (Finnerup et al. 2016). QST může být užitečné také pro účely farmakologických studií a to zejména pro dokumentaci vlivu léčby na jednotlivé typy či komponenty bolesti (zejména evokované – tedy alodynii a hyperalgezi) a další senzitivní symptomy (doporučení stupně A) (Cruccu et al. 2010, Haanpää et al. 2011). Zvažovanou aplikací QST je také jeho možný přínos v predikci terapeutické účinnosti různých typů preparátů, který však ještě musí být potvrzen prospektivními studiemi (Haanpää et al. 2011).

V souladu s výše uvedenými doporučeními jsou klinické vyšetření (a s jedinou výjimkou, kdy byli vyšetřováni pacienti v kritickém stavu v rámci jednotky intenzivní péče (*Škorna et al. 2015*)) i QST obligátní součástí všech publikovaných studií naší pracovní skupiny zaměřených na problematiku neuropatické bolesti a/nebo bolestivých periferních neuropatií (*Vlčková-*

Moravcová et al. 2008a, Vlčková-Moravcová et al. 2008b, Bednařík et al. 2009, Vlčková-Moravcová a Bednařík 2009, Scherens et al. 2009, Divišová et al. 2012, Škorna et al. 2015, Divišová et al. 2016, Raputová et al. 2017).

3.3. DIAGNOSTICKÉ TESTY POTVRZUJÍCÍ LÉZI NEBO ONEMOCNĚNÍ SOMATOSENZITIVNÍHO NERVOVÉHO SYSTÉMU

Potvrzení léze nebo onemocnění somatosenzitivního nervového systému, která vysvětluje bolest, je posledním krokem v aktuálním diagnosticko-klasifikačním schématu neuropatické bolesti. Tento krok umožní stanovení diagnózy „potvrzené (jisté) neuropatické bolesti“ (Finnerup et al. 2016).

Ve specifických případech nemusí být pro stanovení této diagnostické úrovně nutný žádný specifický diagnostický test. Jedná se o pacienty po amputaci končetin a/nebo po chirurgických zákrocích či traumatech, u nichž byla chirurgem jasně objektivizována léze periferního nervu. Tyto informace jsou považovány za postačující pro stanovení diagnózy „potvrzené (jisté) neuropatické bolesti“ a jiné konfirmační texty nejsou u těchto pacientů požadovány (Finnerup et al. 2016).

V ostatních případech je nezbytné doplnění specifických diagnostických testů, k nimž patří:

1. Zobrazovací metody užívané především k potvrzení léze nebo onemocnění centrálního segmentu senzitivních nervových drah.
2. Kožní biopsie prokazující redukci intraepidermální hustoty tenkých nervových vláken
3. Korneální konfokální mikroskopie
4. Neurofyziologické testy, např.:
 - a. elektromyografie vč. kondukčních studií periferních nervů
 - b. evokované potenciály
 - c. některé reflexy asociované s bolestí
 - d. mikroneurografie
 - e. testy autonomních nervových funkcí
5. Genetické testy

Uvedené diagnostické testy budou v dalším textu zmíněny podrobněji.

3.3.1. Zobrazovací vyšetření v diagnostice neuropatické bolesti

Zobrazovací vyšetření představují velmi významnou skupinu diagnostických metod zejména u pacientů s centrální neuropatickou bolestí, kde jsou metodou volby pro průkaz léze nebo onemocnění centrálního úseku senzitivních nervových drah. Nejčastěji je pro tento účel využívána magnetická resonance (MR) nebo počítačová tomografie (CT), případně další techniky umožňující zobrazení cévních mozkových příhod v relevantní distribuci, roztroušené sklerózy či míšních lézí traumatické nebo jiné etiologie (Finnerup et al. 2016, Haanpää et al. 2011).

3.3.1.1. Nové možnosti zobrazovacích metod periferních nervů

Zobrazovací vyšetření je možné využít také k verifikaci některých typů postižení periferního nervového systému. Tato diagnostika je v současnosti klicky relevantní především u mononeuropatií (ultrazvuk) a plexopatií či radikulopatií (MR nebo CT). MR techniky mají relativně nově narůstající význam i pro účely zobrazování periferních nervů. Tato tzv. MR neurografie využívá standardní sekvence (např. T2) i některé specializované sekvence, jako např. zobrazení tenzorů difuze (Diffusion Tensor Imaging, DTI) (Rangavajla et al. 2014). Specifické sekvence v rámci MR zobrazení poskytují morfologické informace o studované anatomické oblasti i určité histologické informace o struktuře vyšetřovaného nervu. Umožní např. vizualizovat imunitní aktivitu v oblasti poraněného nervu a monitorovat ji v průběhu jeho regeneračního procesu. DTI metody poskytnou i určité kvantitativní charakteristiky reflektující tíži poranění příslušného nervu. Nově jsou k dispozici také publikace zaměřené na nálezy pozitronové emisní tomografie (Positron Emission Tomography, PET) zobrazující v nevelkých souborech pacientů periferní nervy prostřednictvím metabolických změn, které v nich po poranění či poškození probíhají (Rangavajla et al. 2014). Tyto metody jsou však zatím spíše výzkumnou aplikací a nejsou pro morfologickou diagnostiku postižení periferních nervů rutinně využívány v běžné klinické praxi, kde je zlatým standardem nadále elektrofyziologická diagnostika, zejména elektromyografie (Rangavajla et al. 2014).

3.3.1.2. Funkční zobrazení mozku

Specifickou kapitolu v diagnostice neuropatické bolesti představují metody funkčního zobrazování mozku. PET a funkční magnetická resonance (Functional Magnetic Resonance Imaging, fMRI) umožňují měřit různými způsoby průtok krve mozkiem a/nebo metabolické

změny, které odráží lokální synaptickou aktivitu v definovaných oblastech mozku. Takzvané „aktivační“ PET či fMRI studie vyšetřují odchylky v lokálním průtoku krve vyvolané určitým úkolem nebo specifickým typem stimulace. Interpretace dat je v rámci funkčního zobrazování založena na statistickém srovnání signálu měřeného v různých klinických či experimentálních situacích, označovaných většinou jako „aktivační“ a „kontrolní“ podmínky. U experimentální bolesti odhalily fMRI a PET studie síť oblastí mozku aktivovaných v rámci reakce na algickou stimulaci, které jsou označovány jako **matrice bolesti (pain matrix)**. K těmto oblastem patří zejména sekundární somatosenzitivní kortex (S II), inzulární kortex, přední cingulární kortex a méně konstantně i kontralaterální thalamus a primární senzitivní kortex (Apkarian et al. 2005, Peyron et al. 2000). Všechny oblasti mozku aktivované algickými podněty však odpovídají také na podněty nebolestivé a aktivační vzorce jsou podobné při nociceptivní i nenociceptivní stimulaci. PET i fMRI odpovědi na algické podněty tak musejí být interpretovány s opatrností. Aktuální interpretace těchto dat rozlišuje 2 samostatné a do určité míry nezávislé sítě: Aktivace laterálního thalamu, primárního a sekundárního senzitivního kortexu (oblast SI a S II) a zadní inzuly je spojena se senzitivně-diskriminačními aspekty percepce bolesti, zatímco přední a střední cingulum a zadní parietální a prefrontální kortex se podílejí na afektivní složce bolestivého vjemu (Apkarian et al. 2005, Peyron et al. 2000).

Jedním z nejkonzistentnějších nálezů dosud provedených studií je asociace jednostranné **chronické spontánní neuropatické bolesti** s poklesem klidové perfuze v kontralaterálním thalamu, která může být upravena různými typy analgetických intervencí. Uvedené perfuzní změny byly popsány u periferní i centrální neuropatické bolesti. Zmírnění periferní neuropatické bolesti (a s ním související úpravy perfuze kontralaterálního thalamu) bylo v příslušných studiích dosaženo periferní nervovou bloádou pomocí lokálních anestetik. U centrální neuropatické bolesti byla ke zmírnění bolesti (reflektovanému zvýšením průtoku krve protilehlým thalamem) využita thalamická stimulace, intravenózní aplikace lidokainu nebo stimulace motorického kortexu. Tyto nálezy jsou však zatím popisovány pouze v rámci menších případových studií s méně než 20 vyšetřenými pacienty (Haanpää et al. 2011, Cruccu et al. 2010). Vzestup perfuze v oblasti thalamu byl navíc prokázán i v případě, že použitá terapeutická intervence nebyla účinná ve smyslu zmírnění bolesti. Tyto výsledky naznačují, že úprava thalamické perfuze je pravděpodobně nezbytnou podmínkou pro úlevu bolesti, ale nikoli podmínkou jedinou (a samostatně dostačující).

Určité změny průtoku krve u pacientů se spontánní neuropatickou bolestí byly v některých studiích prokázány také v dalších oblastech (včetně předního cingulárního kortexu, parietálního

kortexu, přední inzuly a mozečku). Konzistence těchto nálezů však není na úrovni, která by opodstatňovala jejich využití v diagnostice či monitoraci pacientů s neuropatickou bolestí.

U pacientů s *provokovanou neuropatickou bolestí* (tedy alodynii či hyperalgezií) dosud nejsou výsledky publikovaných studií jednotné a konkluzivní. Některé studie popisují nárůst perfuze v oblasti thalamu, inzuly a primárního a sekundárního senzitivního kortexu (ale nikoli v oblasti předního cingula). Jiné naopak popisují snížení aktivity v oblasti matrix bolesti zodpovědných za senzitivně-diskriminační složku algické percepce, tedy v oblasti sekundárního senzitivního kortexu a inzuly (a současně aktivaci předního cingulárního kortexu u pacientů s alodynii) (Haanpää et al. 2011). Tyto rozporné nálezy poukazují na obtíže s interpretací funkčního významu PET a fMRI odpovědí na algickou stimulaci u zdravých subjektů i pacientů s neuropatickou bolestí, zejména při zohlednění nejednotných experimentálních designů provedených studií a heterogenity skupin pacientů, u nichž byla tato problematika studována.

Podle doporučení NeuPSIG proto funkční zobrazení mozku není v současné době metodou využitelnou na individuální úrovni pro účely diagnostiky neuropatické bolesti v klinické praxi. Jedná se však o zajímavý nástroj pro výzkum této problematiky (Haanpää et al. 2011). Jedním z nejkonzistentnějších nálezů v provedených studiích je záchyt snížené aktivity v oblasti kontralaterálního thalamu u pacientů s chronickou spontánní jednostrannou neuropatickou bolestí (průkaz úrovně B) (Haanpää et al. 2011). Tento nález je vhodné potvrdit vyšetřením větších souborů pacientů, protože je jedním z možných biomarkerů neuropatické bolesti. Úprava thalamické perfuze by pak v rámci analgetické terapie mohla být využívána pro monitoraci terapeutické odpovědi (Cruccu et al. 2010).

3.3.2. Kožní biopsie zaměřená na průkaz morfologických změn intraepidermálních tenkých nervových vláken

Další konfirmační metodou, využitelnou pro potvrzení klasifikačního stupně „potvrzené (jisté) neuropatické bolesti“ u pacientů s bolestivými periferními neuropatiemi, je hodnocení intraepidermální hustoty tenkých nervových vláken (IntraEpidermal Nerve Fiber Density, IENFD) z kožní biopsie. Tato problematika je velmi podrobně zpracována v dizertační práci autorky (Vlčková 2011) a v řadě publikací naší pracovní skupiny, reflektujících metodickou stránku vyšetření, tvorbu normativních dat a využití kožní biopsie v diagnostice neuropatie tenkých vláken či bolestivých neuropatií obecně (Moravcová et al. 2005a, Vlčková-Moravcová et al. 2008a, Vlčková-Moravcová et al. 2008b, Bednařík et al. 2009, Vlčková-Moravcová a Bednařík 2009, Scherens et al. 2009, Buršová et al. 2012b, Buršová et al. 2012d, Divišová et al. 2012, Škorna et al. 2015, Divišová et al. 2016, Kovalova et al. 2016). Všechny zmíněné publikace jsou komentovanými přílohami této práce. Problematika kožních biopsií bude proto v následujícím textu zmíněna spíše orientačně s důrazem na recentní poznatky v této problematice.

Podkladem pro využití kožní biopsie v diagnostice neuropatické bolesti je skutečnost, že periferní neuropatická bolest je asociována s poruchou funkce tenkých nervových vláken typu A-delta a C. Vlákná typu C pak mohou být vizualizována v kožní biopsii. Jedná se o jediný typ nervových vláken, který prochází přes dermo-epidermální junkci až do oblasti epidermis (Haanpää et al. 2011). Jejich morfologie je snadno hodnotitelná pomocí imunohistochemického či imunofluorescenčního barvení řezů drobných kožních vzorků.

3.3.2.1. Odběr vzorků kožní biopsie

Vzorky kožní biopsie jsou odebírány pomocí speciálního nástroje označovaného jako „průbojník“. Jedná se o kruhový nástroj s ostrým okrajem o průměru 2-7 (nejčastěji 3-5) mm. Odběr je nejčastěji prováděn z oblasti distálního lýtka, vzorky je ale možné odebírat prakticky z jakékoli lokalizace a běžně jsou vyšetřovány např. oblast stehna, trupu ev. konečků prstů na HKK (Lauria et al. 2010b).

Biopsie představuje minimálně invazivní a bezpečnou proceduru a to dokonce i u pacientů s diabetem mellitem, těžšími periferními neuropatiemi či polyneuropatií kriticky nemocných, což potvrzují četné publikace včetně mnoha studií z našeho pracoviště (Moravcová et al. 2005a,

Vlčková-Moravcová et al. 2008a, Vlčková-Moravcová et al. 2008b, Bednařík et al. 2009, Vlčková-Moravcová a Bednařík 2009, Scherens et al. 2009, Buršová et al. 2012b, Buršová et al. 2012d, Divišová et al. 2012, Škorna et al. 2015, Divišová et al. 2016, Kovalova et al. 2016). Za více než 15 let zkušeností s touto metodikou a více než 1000 zpracovaných vzorků pro účely výše uvedených vědeckých projektů i klinické diagnostiky neuropatie tenkých vláken jsme na našem pracovišti zaznamenali lehčí komplikace s hojením jen u jedné pacientky a jednoho zdravého dobrovolníka a to v obou případech v důsledku nedodržení instrukcí pro péči o ránu v prvních dnech po vlastním odběru.

3.3.2.2. Zpracování a hodnocení vzorků kožní biopsie

Nervové struktury jsou v rámci histologického zpracování barveny pomocí protilátky proti panneuronálnímu markeru PGP 9.5 a následně vizualizovány pomocí metod nepřímé imunofluorescence či imunohistochemie. Tímto způsobem je proto možné vizualizovat nervová vlákna v oblasti epidermis a povrchových vrstev dermis (včetně vláken zásobujících cévní struktury a kožní potní žlázy v této oblasti). Pro účely hodnocení postižení tenkých nervových vláken je využívána především kvantifikace intraepidermálních nervových vláken (IntraEpidermal Nerve Fibers, IENF). Pro určení počtu těchto vláken v oblasti epidermis byla stanovena přesná pravidla, zajišťující uspokojivou reprodukovatelnost těchto nálezů a to i mezi různými laboratořemi a hodnotiteli (Lauria et al. 2005, Sommer a Lauria 2007, *Vlčková-Moravcová et al. 2008a*, Lauria et al. 2010b, Lauria et al. 2015, Škorňa et al. 2015). Pravidla pro hodnocení IENFD byla publikovaná i formou doporučení Evropské federace neurologických společností (European Federation of Neurological Societies, EFNS) (Lauria et al. 2005 s následnou revizí v rámci práce Lauria et al. 2010b). Redukce IENFD představuje spolehlivý morfologický korelát neuropatie tenkých vláken (doporučení úrovně A) (Lauria et al. 2010b).

Kromě IENFD je ve vzorcích kožních biopsií možné hodnotit hustotu inervace také subepidermálně (*Vlčková-Moravcová et al. 2008a*, Nolano et al. 2008, Lauria et al. 2011, Nolano et al. 2014) či v oblasti kožních potních žláz (Nolano et al. 2000, Donadio et al. 2006), kde však neexistuje široký konsenzus na metodice hodnocení, jako je tomu v případě intraepidermální inervace.

Při hodnocení IENFD je nutné vždy zohledňovat věk a testovanou lokalizaci (Lauria et al. 2010b). Pro nejčastěji hodnocené lokalizace byla během posledních 20 let postupně vytvořena validní normativní data a to včetně publikací naší pracovní skupiny. První publikované normy (McArthur et al. 1998, Kennedy et al. 1996) nebyly věkově stratifikované a vycházely z poněkud odlišné metodiky než je v současnosti nejčastěji používaná (např. jiný způsob fixace vzorků či jiná tloušťka řezů a ne zcela jednotná pravidla hodnocení). Proto jsme v rámci našeho pracoviště vytvořili při zavedené metodiky vlastní normativní data pro způsob zpracování vzorků užívaný v naší laboratoři (Moravcová et al. 2005a), který je shodný se způsobem aktuálně doporučeným EFNS (Lauria et al. 2010b). Tato data byla využívána v dalších publikacích naší pracovní skupiny (Vlčková-Moravcová et al. 2008a, Vlčková-Moravcová et al. 2008b, Bednařík et al. 2009, Vlčková-Moravcová a Bednařík 2009), nebyla však věkově stratifikovaná. Následně bylo publikováno několik souborů normativních dat (Umapathi et al. 2006, Bakkers et al. 2009) a to včetně dat věkově stratifikovaných, derivovaných v rámci multicentrické studie ze širokého souboru zdravých dobrovolníků (Lauria et al. 2010a). Tato data však byla vesměs vytvořena pro hodnocení pomocí světelné (a nikoli fluorescenční) mikroskopie, přičemž se dlouhodobě předpokládalo, že se nálezy při použití obou typů zpracování mohou mírně lišit. V naší laboratoři jsou vzorky zpracovávány pomocí imunofluorescence a pro tento způsob barvení normativní data nadále nebyla k dispozici. Proto jsme rozšířili soubor zdravých dobrovolníků vyšetřený na našem pracovišti, což umožnilo vytvoření věkově stratifikovaných normativních dat pro imunofluorescenční metodiku (Buršová et al. 2012b). Tato data byla využívána v dalších publikacích naší pracovní skupiny (Buršová et al. 2012d, Divišová et al. 2012, Škorna et al. 2015, Divišová et al. 2016, Kovalova et al. 2016). Tato data jsou nicméně při orientačním srovnání velmi blízká publikovaným datům pro vzorky zpracované pomocí imunohistochemie (a hodnocené pomocí světelné mikroskopie) (Bakkers et al. 2009, Lauria et al. 2010a). V souladu s tím byla recentně publikována práce srovnávající hodnoty IENFD hodnocené pomocí imunofluorescenčních a imunohistochemických metod (Nolano et al. 2015a). Práce prokázala minimální rozdíly mezi oběma způsoby hodnocení a tedy vzájemnou zaměnitelnost normativních dat při obou způsobech hodnocení. Současně byla stejnou pracovní skupinou publikována normativní data specificky určená pro vzorky hodnocené fluorescenční mikroskopii (Provitera et al. 2016). Pro potřeby hodnocení vzorků lze tedy v současnosti využít několik setů normativních dat (která jsou však velmi blízká a zásadě vzájemně zaměnitelná) (Umapathi et al. 2006, Bakkers et al. 2009, Lauria et al. 2010a, Buršová et al. 2012b, Provitera et al. 2016).

3.3.2.3. Méně obvyklé markery umožňující vizualizaci specifických populací nervových vláken

Kromě standardně hodnocených parametrů kožní biopsie (tedy zejména IENFD při zobrazení pomocí PGP 9.5) je možné hodnotit imunotypizačně i přítomnost jiných proteinů a tedy počet určitých specifických typů nervových vláken a to častěji subepidermálně, případně i intraepidermálně. Hodnotit lze takto např. autonomní nervová vlákna a to adrenergní (pomocí protilátek proti dopamin beta hydroxyláze jako specifickému markeru noradrenergních vláken) či cholinergní (prostřednictvím protilátek proti vasoaktivnímu intestinálnímu peptidu). Autonomní vlákna jsou prokazatelná zejména subepidermálně, kde zásobují cévní struktury, kožní potní žlázy a mm. arrectores pilorum (Donadio et al. 2006, Nolano et al. 2015a, Nolano et al. 2017a).

Dalším perspektivním markerem je protein asociovaný s regenerací nervových vláken (Growth-Associated Protein 43, GAP-43). Tento marker je za fyziologických okolností přítomen ve všech intra- i subepidermálních nervových vláknech. U pacientů s diabetickou neuropatií však některá PGP 9.5 pozitivní vlákna nevykazují imunofluorescenci při použití protilátek proti GAP-43, což poukazuje na snížený regenerační potenciál těchto vláken jako marker velmi časného periferně neurogenního poškození u těchto pacientů (Buršová et al. 2012d).

3.3.2.4. Vztah nálezů kožní biopsie k dalším diagnostickým metodám

Nálezy IENFD z kožní biopsie korelují s funkčními testy, jako jsou evokované potenciály vyvolané kontaktním teplem (Contact-Heat Evoked Potentials, CHEPs), laserem (Laser-Evoked Potentials, LEPs) a specifickou povrchovou elektrickou stimulací (Surface Electrode Pain-Related Evoked Potentials, SE-PREPs) (Chao et al. 2010, Wu et al. 2017, Casanova-Molla et al. 2011, LaCesa et al. 2018). Metoda koreluje i s nálezy kvantitativního testování senzitivity, neurofyziologickými testy a některými diagnostickými škálami užívanými u pacientů s polyneuropatiemi (Shun et al. 2004, Vlčková-Moravcová et al. 2008a, Vlčková-Moravcová et al. 2008b). U pacientů s neuropatií tenkých vláken je kožní biopsie pravděpodobně senzitivnějším testem než QST či LEPs.

3.3.2.5. *Specificita kožní biopsie pro hodnocení neuropatie tenkých vláken*

Kožní biopsie představuje podle současné úrovně poznání jednotku specifickou pro periferní neuropatie. Poslední doporučení EFNS k problematice kožních biopsií (Lauria et al. 2010b) však zdůrazňuje potřebu ověření specificity metodiky prostřednictvím vyšetření pacientů s podobnými klinickými symptomy, vznikajícími v důsledku jiných onemocnění (která tedy mohou imitovat neuropatii tenkých vláken). V souladu s tímto doporučením byly následně publikovány studie, prokazující normální nálezy kožní biopsie u pacientů s pozitivní senzitivní symptomatikou na DKK při roztroušené skleróze (Herrmann et al. 2010) a spondylogenní cervikální myelopatii (Kovalova et al. 2016).

3.3.2.6. *Kožní biopsie u jednotlivých diagnostických jednotek*

3.3.2.6.1. *Neuropatie tenkých vláken*

Hodnocení intraepidermální inervace z kožní biopsie je diagnosticky přínosná zejména u pacientů s neuropatií tenkých vláken (Small Fiber Neuropathy, SFN), resp. polyneuropatií obecně. V detekci SFN metoda v současnosti představuje zlatý standard. Je využitelná u pacientů s postižení **diabetické etiologie** (Kennedy et al. 1996, Lauria et al. 1998, Sumner et al. 2003, Shun et al. 2004, *Vlčková-Moravcová et al. 2008b*, Loseth et al. 2008, Tesfaye et al. 2010, *Buršová et al. 2012c*, *Divišová et al. 2012*, *Divišová et al. 2016*), kde je možné metodu při longitudinálním sledování využít i jako biomarker průběhu postižení (*Divišová et al. 2016*). Velmi vhodným diagnostickým markerem reflektujícím periferně neurogenní postižení je tato metoda i u pacientů s prediabetem či časným diabetem mellitem, kdy je postižení tenkých nervových vláken často první známkou periferně neurogenní dysfunkce (Sumner et al. 2003, *Divišová et al. 2012*). Kromě standardně hodnocené intraepidermální hustoty tenkých nervových vláken obarvených pomocí panneuronálního markeru PGP 9.5 je v kožní biopsii možné dokumentovat např. i regenerační potenciál nervových vláken při barvení pomocí tzv. growth-associated protein 43 (GAP-43), který je markerem regenerujících nervových vláken a ukazuje na jejich trvalou remodelaci v kůži zdravých osob (*Buršová et al. 2012d*). Zatímco u zdravých kontrol jsou prakticky všechna intraepidermální nervová vlákna imunoreaktivní s GAP-43 i PGP 9.5, u pacientů s časným diabetem mellitem je podíl intraepidermálních nervových vláken exprimujících GAP-43 protein nižší. Tyto výsledky naznačují možnost narušené regenerační kapacity intraepidermálních nervových vláken jako jednu z prvních změn

v rámci rozvoje časně diabetické polyneuropatie (a potenciální možnost využití GAP-43 jako biomarkeru tohoto postižení) (*Buršová et al. 2012d*).

Stejně tak je IENFD přínosná v diagnostice **idiopatické neuropatie tenkých vláken** (Holland et al., 1998, Periquet et al., 1999, Gorson a Ropper, 1995, Gibbons et al., 2006, *Moravcová et al., 2005, Vlčková-Moravcová et al., 2008a*, Devigili et al., 2008, Koskinen et al., 2005, Lauria et al., 2010) či u pacientů s postižením tenkých nervových vláken **variabilní etiologie** (*Vlčková-Moravcová et al. 2008b*). Popisované změny intra- i subepidermální inervace jsou u těchto pacientů analogické jako neuropatie diabetické (Holland et al., 1998, Periquet et al., 1999, Gorson a Ropper, 1995, Gibbons et al., 2006, *Vlčková-Moravcová et al., 2008a*). Vysokou diagnostickou validitu metodiky v diagnostice neuropatie tenkých vláken obecně potvrzuje i recentní metaanalýza s doporučením EFNS/PNS (Lauria et al., 2010).

Postižení tenkých (senzitivních i autonomních) nervových vláken bylo prostřednictvím kožních biopsií prokázáno např. i u pacientů s **hereditárními** neuropatiemi (Nolano et al. 2015b).

Výrazná redukce počtu tenkých nervových vláken byla prokázána i v kožních biopsiích pacientů se **syndromem Guillain-Barré** (Pan et al., 2003, Martinez et al., 2010, Ruts et al. 2012) a to napříč variantami tohoto onemocnění včetně čistě motorických postižení (Ruts et al. 2012). U pacientů se syndromem Guillain-Barré obecně rozvoj postižení tenkých vláken predikuje vznik neuropatické bolesti (Martinez et al., 2010, Ruts et al. 2012) a dlouhodobé disability (Ruts et al. 2012).

Recentně byly změny tenkých nervových vláken, reflektované poklesem intraepidermální hustoty tenkých nervových vláken ve vzorcích kožní biopsie, prokázány i u pacientů s **polyneuropatií (resp. polyneuromyopatií) kriticky nemocných** (Latronico et al. 2013., *Skorna et al. 2015*). V menším souboru pacientů v kritickém stavu, vyšetřeném v úvodu postižení (v době těžkého iktu) a sledovaném v dalším průběhu postižení, který byl u většiny pacientů komplikován rozvojem sepse či multiorgánového selhání, byly změny IENFD prokazatelné u většiny jedinců. S výjimkou 3 pacientů (z nichž u 2 nebyl stav komplikován sepsí či multiorgánovým selháním) došlo u všech pacientů k vysoce signifikantnímu tj. více než 50% poklesu IENFD při kontrolním vyšetření s přibližně dvoutýdenním odstupem. Tyto nálezy prokazují, že postižení tenkých nervových vláken je frekventní součástí multisystémového postižení v rámci polyneuromyopatie kriticky nemocných (*Skorna et al. 2015*).

3.3.2.6.2. Postherpetická neuralgie

Podle současných doporučení (Haanpää et al. 2011) je hodnocení IENFD jednoznačně užitečným testem také u pacientů s postherpetickou neuralgií, kde vykazuje velmi vysokou diagnostickou validitu (Rowbotham et al. 1996, Oaklander 2001, Petersen et al. 2010). U pacientů s postherpetickou neuralgií jsou hodnoty IENFD signifikantně nižší než u pacientů, kteří prodělali pásový opar, ale nerozvinula se u nich následně neuropatická bolest v postižené distribuci (Oaklander 2010). V souladu s tímto zjištěním koreluje IENFD negativně s intenzitou bolesti (Petersen et al. 2010). Míra poklesu IENFD u pacientů s postherpetickou neuralgií však vykazuje signifikantní inverzní korelaci s alodynii, což naznačuje, že je alodynie je u pacientů s postherpetickou neuralgií pravděpodobně alespoň částečně podmíněna funkcí zachovalých kožních nociceptorů (Rowbotham et al. 1996).

3.3.2.6.3. Nález u méně obvyklých diagnostických jednotek

Signifikantní redukce hodnot IENFD (a současně poruchy termického a algického čítí objektivizovatelné pomocí QST metod) byly prokázány i u pacientů s **Parkinsonovou nemocí** (Nolano et al. 2008, Kass-Iliyya et al. 2015, Haga et al. 2015, Nolano et al. 2017a). Tyto změny byly více vyjádřeny v oblastech s více klinicky patrnou senzitivní symptomatikou (Nolano et al. 2008, Nolano et al. 2017a). Změny byly patrné nejen intraepidermálně, ale také subepidermálně. V oblasti subepidermis byla redukována inervace kožních potních žláz, cévních struktur, hladkých svalů a Meissnerových tělísek (Wang et al. 2013, Nolano et al. 2017a). Podle autorů popsané změny pravděpodobně vysvětlují časté senzitivní symptomy u pacientů s Parkinsonovou nemocí a mohou se částečně podílet i na rozvoji vegetativních symptomů u pacientů s touto diagnózou. Podle současných doporučení (Finnerup et al. 2016) však není míra průkazu prozatím dostatečná, aby mohla být bolest u Parkinsonovy nemoci označena jako neuropatická.

Recentní práce prokazují v subepidermálních nervových strukturách pacientů s Parkinsonovou nemocí zvýšenou *depozici alfa-synucleinu* (který představuje hlavní komponentu tzv. Levyho tělísek, prokazovaných centrálních neuronech u pacientů s tímto onemocněním). Tyto změny jsou patrné ve vasomotorických nervech i v nervových vláknech zprostředkujících inervaci kožních potních žláz (Wang et al. 2013, Doppler et al. 2014, Haga et al. 2015). Autoři proto dovozují, že průkaz depozit synucleinu by mohl být zajímavým biomarkerem Parkinsonovy nemoci s vysokou specificitou, ale poměrně nízkou senzitivitou.

Popsané změny intraepidermální inervace (ani depozita synucleinu v kožních strukturách) naopak překvapivě nebyly prokázány u pacientů s **multisystémovou atrofií** (Haga et al. 2015). I u této jednotky jsou však prokazatelné změny v periferně neurogenních strukturách, vyjádřené zejména v sudomotorických nervech v subepidermální oblasti (Provitera et al. 2014).

Redukce intraepidermální inervace (stejně jako subepidermálních nervových struktur včetně cholinergních a adrenergických) byla prokázána také u pacientů s **amyotrofickou laterální sklerózou** (Dalla Bella et al. 2016, Nolano et al. 2017b).

Zajímavou problematikou je také postižení tenkých nervových vláken u **fibromyalgie**. Podle některých novějších studií je u části pacientů, zahrnovaných aktuálně pod tuto diagnostickou jednotku, prokazována neuropatie tenkých vláken jako možný podklad klinické symptomatiky (Uceyler et al. 2013b, Uceyler et al. 2013c). Úroveň průkazu tohoto postižení se však prozatím nejeví jako dostatečná, aby byla možná jednoznačná klasifikace bolesti u fibromyalgie jako bolesti neuropatické.

3.3.2.7. Doporučení pro využití kožní biopsie v diagnostice neuropatické bolesti

Podle současných doporučení EFNS (Cruccu et al. 2010) a NeuPSIG (Haanpää et al. 2011) je kožní biopsie s hodnocením IENFD doporučena u pacientů s distálními senzitivními symptomy a klinický podezřením na neuropatii tenkých vláken (doporučení úrovně B). Metoda je užitečná také v diagnostice postherpetické neuralgie, kde je IENFD obecně redukována, ale vysoký počet zachovalých vláken je u těchto pacientů asociován s alodynii (doporučení úrovně B). Hodnoty IENFD vykazují pouze slabou negativní korelaci s intenzitou bolestí a nemohou být na individuální úrovni využity k hodnocení přítomnosti jako takové. Slouží tedy pouze k průkazu základní diagnózy, která se neuropatickou bolestí manifestuje, tedy SFN či postherpetická neuralgie (doporučení třídy C).

3.3.3. Korneální konfokální mikroskopie

Konfokální mikroskopie rohovky (Corneal Confocal Microscopy, CCM) je nová perspektivní vyšetřovací morfologická metoda zobrazení tenkých nervových vláken v oblasti rohovky (Tavakoli et al. 2010a), jejíž využití v posledních letech progresivně narůstá.

Rohovka je nejhustěji inervovaná tkáň lidského těla (až 400krát více než lidská kůže) (Ferrari et al. 2010). Současně je velmi dobře dostupná a jako jediná struktura lidského těla umožňuje neinvazivní morfologické vyšetření terminálních nervových větví (Tavakoli et al. 2010a, Tavakoli et al. 2010b). V době tvorby aktuálních EFNS a NeuPSIG doporučení pro diagnostiku neuropatické bolesti (Cruccu et al. 2010, Haanpää et al. 2011) nebyla CCM ještě dostatečně dobře prozkoumána a etablována, takže v těchto doporučeních není zahrnuta. Metoda je však svojí podstatou blízká kožní biopsii a může být využita pro průkaz postižení tenkých nervových vláken u pacientů s periferní neuropatickou bolestí při difuzních polyneuropatiích (podobně jako právě kožní biopsie, jejíž využití je však poněkud širší). Bude proto v následujícím textu krátce zmíněna a to navzdory skutečnosti, že nefiguruje z výše uvedených důvodů v doporučeních EFNS/NeuPSIG.

Metodické detaily vyšetření CCM byly recentně publikovány naší pracovní skupinou (Kovalova et al. 2017). Výhodou CCM oproti biopsii je neinvazivita vyšetření a tedy možnost zásadě neomezeného opakování vyšetření (což pochopitelně není možné v případě kožní biopsie). Určitou nevýhodu naopak představuje skutečnost, že většina bolestivých polyneuropatií vykazuje tzv. vzorec postižení závislosti na délce („length dependent pattern“). U pacientů s touto distribucí postižení jsou nejdříve postižena nejdelší nervová vlákna a klinický i neuropatologický nálezn je nejvýrazněji vyjádřen v distálních segmentech končetin. Některé z publikovaných studií tak sice uvádějí v diagnostice senzomotorické diabetické polyneuropatie podobnou senzitivitu CCM vyšetření a kožní biopsie (Chen et al. 2015), naše zkušenosti však svědčí spíše pro nižší senzitivitu CCM a to zejména u lehčích forem diabetické polyneuropatie (Kovalová et al. 2017). Otázku korelace CCM a IENFD a srovnání senzitivity a specificity obou metod bude proto nutné ještě zpřesnit pomocí dalších studií.

CCM lze využít v diagnostice celého spektra polyneuropatií. Nejčastější zkoumanou diagnostickou jednotkou je diabetická polyneuropatie. Konfokální mikroskopie prokazuje signifikantní redukci rohovkové inervace u pacientů s polyneuropatií při **diabetes mellitus** 1. i 2. typu či prediabetu a také u diabetické SFN i autonomní diabetické periferní neuropatie

(Papanas a Ziegler 2015, Tavakoli et al. 2010b, Kovalová et al. 2017). Podle dosud publikovaných informací jsou však nálezy abnormální u pacientů s bolestivou i nebolestivou formou diabetické polyneuropatie (Papanas a Ziegler 2015, Tavakoli et al. 2010b). Signifikantní morfologické změny korneální inervace byly prokázány také u pacientů s **idiopatickou SFN** (Tavakoli et al. 2010a), polyneuropatií indukovanou chemoterapií (Ferrari et al. 2010) či hereditární neuropatií **Charcot Marie Tooth, typ 1A** (Tavakoli et al. 2012). Změny inervace rohovky jsou však prokazovány také u některých **neurodegenerativních** onemocnění, a to poněkud odlišného charakteru než v případě periferních neuropatií. Například u Parkinsonovy nemoci bylo sice zjištěno snížení hustoty nervových vláken, ale zároveň zvýšení hustoty jejich větví i celkové délky nervových vláken, což je jedinečný a klinicky determinantní nález (Kass-Iliyya et al. 2015).

Pro hodnocení nálezů je nutné využívat věkově stratifikovaná data pro jednotlivé parametry. Recentně byla publikována multicentrická studie poskytující takový typ normativních dat pro obě pohlaví (Tavakoli et al. 2015). Platnost těchto normativních dat pro českou populaci byla ověřena v rámci jedné ze studií naší pracovní skupiny a to prostřednictvím vyšetření většího souboru zdravých dobrovolníků a menší skupiny pacientů s diabetickou neuropatií (Kovalová et al. 2017). U pacientů s diabetickou neuropatií byla na skupinové úrovni prokázána signifikantní redukce počtu korneálních nervových vláken i jejich délky a počtu jejich větví a nárůst vinutosti (tortuozity) korneálních vláken, což podporuje možnost využití metody v diagnostice diabetické neuropatie. Na individuální úrovni však byla senzitivita vyšetření poměrně nízká (Kovalová et al. 2017).

V souhrnu je korneální konfokální mikroskopii možné využít jako alternativní konfirmační metodu neuropatie tenkých vláken (izolovanou či v rámci smíšeného postižení vláken tenkých a silných). Nálezy jsou však abnormální i u pacientů s nebolestivou formou polyneuropatie, takže abnormální CCM nález není specifický pouze pro pacienty s bolestivou formou postižení a není přímým průkazem bolesti (ale pouze průkazem základní diagnózy, která je podkladem bolesti u daného pacienta – tedy neuropatie tenkých vláken).

3.3.4. Neurofyziologické testy v diagnostice neuropatické bolesti

Významnou skupinou testů, užívanou pro confirmaci postižení somatosenzitivního nervového systému představují neurofyziologické testy.

3.3.4.1. Elektromyografické vyšetření

Elektromyografické (EMG) vyšetření a zejména kondukční studie periferních nervů jsou široce dostupnou diagnostickou metodou, umožňující hodnocení funkce silných nervových vláken (motorických typu A-alfa a senzitivních typu A-beta) (Haanpää et al. 2011). Tyto metody naopak standardně netestují funkci tenkých nervových vláken (A-delta a C) a to s ohledem na odlišnou excitabilitu uvedených typů nervových vláken (Cruccu et al. 2004). Obecně totiž platí, že silná (nenociceptivní) nervová vlákna mají nižší práh excitability při elektrické stimulace než vlákna tenká (nociceptivní). Běžná elektrická stimulace periferních nervů tak primárně vždy aktivuje silná nervová vlákna (pokud nejsou užívány speciální techniky, jako např. experimentální bloky vedení, nebo nejsou vyšetřovány specifické orgány, jako např. rohovka) (Cruccu et al. 2004).

Podle doporučení EFNS a NeuPSIG k diagnostice neuropatické bolesti (Cruccu et al. 2004, Cruccu et al. 2010, Haanpää et al. 2011) jsou kondukční studie periferních nervů (resp. elektromyografické vyšetření obecně) neužitečnějším nástrojem pro objektivizaci periferních neuropatií (doporučení třídy A) (Cruccu et al. 2004). Umožní potvrdit, lokalizovat a kvantifikovat dysfunkci periferních nervů a tedy diagnostikovat onemocnění, které je podkladem vzniku neuropatické bolesti u významné části pacientů. Příkladem může být diagnostika diabetické polyneuropatie, kde je přínosné především hodnocení senzitivního neurogramu. V této indikaci vykazuje vysokou diagnostickou validitu zejména vyšetření n. plantaris medialis (Kurča a Kučera 2002).

EMG je proto využitelné jako konfirmační test postižení somatosenzitivního nervového systému v rámci aktuálního klasifikačního schématu neuropatické bolesti a umožní stanovit diagnózu „potvrzené (jisté) neuropatické bolesti“ (Finnerup et al. 2016). Nehodnotí však funkci nociceptivních nervových vláken (doporučení třídy A) (Cruccu et al. 2004). U určitého segmentu pacientů (např. u jedinců s neuropatií tenkých vláken) je tak nález kondukčních studií v normě a to navzdory skutečnosti, že se jedná o pacienty s periferní neuropatickou bolestí. U těchto jedinců je proto při negativním EMG nález nutně pro stanovení diagnózy „potvrzené (jisté) neuropatické bolesti“ využít jiné konfirmační metody (např. kožní biopsii a/nebo QST),

kteří potvrdí postižení tenkých nervových vláken (*Vlčková-Moravcová et al. 2008a, Vlčková-Moravcová et al. 2008b, Haanpää et al. 2011*).

V souladu s výše uvedeným doporučením EFNS a NeuPSIG je EMG vyšetření využíváno rutinně využíváno k průkazu/vyloučení polyneuropatie silných vláken ve všech studiích naší pracovní skupiny, zaměřených na problematiku periferní neuropatické bolesti či neuropatie tenkých vláken (*Vlčková-Moravcová et al. 2008a, Vlčková-Moravcová et al. 2008b, Bednařík et al. 2009, Vlčková-Moravcová a Bednařík 2009, Scherens et al. 2009, Divišová et al. 2012, Škorna et al. 2015, Divišová et al. 2016, Kovalová et al. 2016, Raputová et al. 2017*).

Významnou výhodou EMG je možnost jeho využití pro účel monitorace vývoje postižení v čase (a sledování případného reinervačního procesu) a to pomocí opakovaných vyšetření (*Haanpää et al. 2011*). Některé parametry kondukčních studií mohou mít při longitudinálním sledování dokonce i prognostický význam pro další vývoj periferně neurogenního postižení, jak bylo recentně prokázáno v rámci jedné ze studií naší pracovní skupiny (*Šrotová et al. 2017*), která je komentovanou přílohou této práce.

Elektromyografie je přitom metodou široce dostupnou, bezpečnou, s minimem kontraindikací (*Vlčková a Bednařík 2017*). Kondukční studie lze vyšetřovat prakticky u všech pacientů, výjimkou je pouze stimulace v bezprostřední blízkosti kardiostimulátoru (z důvodu možné interference s jeho funkcí) či přímo v místě trofických kožních defektů či otevřených poranění (z důvodu možného zavlečení infekce do těchto ran a také zvýšené bolestivosti stimulace). Přímo kontraindikováno je pak vyšetření pouze ve zcela raritních situacích dočasné zevní kardiostimulace, kdy jsou elektrody stimulatoru zavedeny přes kůži přímo do srdce nebo jeho blízkosti. Omezeně hodnotitelné je vyšetření také u pacientů s výraznými otoky vyšetřované oblasti (*Vlčková a Bednařík 2017*). Při vyšetření jehlovou EMG je vhodné zohledňovat případné poruchy srážlivosti krve (a to i iatrogeně vyvolaných v rámci antikoagulační případně antiagregační léčby) z důvodu rizika vzniku intramuskulárních hematomů. Toto riziko je však obecně velmi nízké a EMG jako celek je obecně považována za bezpečnou diagnostickou metodu (*Vlčková a Bednařík 2017*). Podrobnější informace ke kontraindikacím a komplikacím EMG vyšetření byly publikovány formou přehledného článku (*Vlčková a Bednařík 2017*), který je jednou z komentovaných příloh této práce.

3.3.4.2. Evokované potenciály

Podobně jako v případě kondukčních studií periferních nervů platí i pro evokované potenciály, že běžnou elektrickou stimulací jsou vždy preferenčně aktivována nociceptivní vlákna a na ně navazující centrální senzitivní nervové dráhy. V případě evokovaných potenciálů pak navíc aktivovaná nociceptivní silná vlákna inhibují v oblasti zadních rohů míšních (tedy v oblasti centrální synapse senzitivních neuronů) input u případných nociceptivních aferentů aktivovaných elektrickou stimulací a blokují tak aktivaci nociceptivních drah (Cruccu et al. 2004, Cruccu et al. 2008a).

Běžné **somatosenzorické evokované potenciály** (Somatosensory Evoked Potentials, SEP) tedy představují snadnou a spolehlivou metody umožňující objektivizaci, topizaci a kvantifikaci postižení somatosenzitivních nervových drah. Netestují však funkci nociceptivní dráhy (tedy tractus spinothalamicus) a reflektují tak pouze tzv. dráhu zadních provazců (tractus spino-bulbo-thalamicus) (doporučení třídy A) (Cruccu et al. 2004, Cruccu et al. 2010, Haanpää et al. 2011).

Pro testování nociceptivních nervových drah je proto nutné využít jiné modality, označované souhrnnými termíny „**nociceptivní evokované potenciály**“, „evokované potenciály zprostředkované tenkými nervovými vlákny (small-fiber evoked potentials)“ nebo „evokované potenciály se vztahem k bolesti“ (Pain-Related Evoked Potentials, PREPs). Tyto zastřešující termíny jsou používány jako souhrnné označení pro několik modalit evokovaných potenciálů, které umožňují selektivní aktivaci nociceptorů a navazujících spino-thalamických drah (Haanpää et al. 2011, Baumgärtner et al. 2012, LaCesa et al. 2018). Jedná se o evokované potenciály vyvolané:

- laserem (Laser Evoked Potentials, **LEPs**)
- kontaktním teplem (Contact Heat Evoked Potentials, **CHEPs**)
- specifickou elektrickou stimulací nízké intenzity, umožňující preferenční aktivaci povrchových kožních nervových zakončení (t.j. tenkých nervových vláken) pomocí povrchové koncentrické elektrody (označované termínem Surface Electrode Pain-Related Evoked Potentials, **SE-PREPs**, tedy nociceptivní evokované potenciály vyvolané povrchovou elektrickou stimulací, případně se pro tuto modalitu používá termín PREPs v užším slova smyslu) (Katsarava et al. 2006, Uceyler et al. 2013a)

Na experimentální úrovni byly dále vyvinuty evokované potenciály vyvolané:

- chladem (contact-cold evoked potentials, cCEPs)
- mechanickou algickou stimulací a to:
 - pomocí speciální sondy evokující píchnutí špendlíkem (pinprick-evoked potentials, PEPs)
 - pomocí krátce působícího silného lokálního tlaku (pressure-evoked potentials)
- chemicky (Baumgärtner et al. 2012).

Jednotlivé modalitty umožňují testovat různé podtypy A-delta vláken a v některých případech (např. při stimulaci chladem) i nociceptivní senzitivní dráhu pro používaný typ podnětů. Narozdíl od CHEPs či LEPs a případně SE-PREPs však ostatní modalitty nejsou komerčně dostupné a nejsou zatím širěji využívány ani v experimentální praxi (Baumgärtner et al. 2012), i když by pravděpodobně umožnily selektivně reflektovat určité senzitivní symptomy (např. chladovou či mechanickou alodynii) a objektivizovat jejich reakci na terapii.

3.3.4.2.1. Laserem-evokované potenciály

Z uvedených metod je jednoznačně nejvíce zkušeností s laserem-evokovanými potenciály (LEPs). Možnost selektivní aktivace volných nervových zakončení (typu A-delta a C) v povrchových vrstvách kůže pomocí laterového paprsku byla poprvé publikována již před více než 30 lety (Bromm a Treede 1984) a do současnosti bylo publikováno téměř 1300 studií, zaměřených na tuto problematiku. Běžně hodnocené komponenty LEPs reflektují funkci tenkých málo myelinizovaných vláken A-delta (late LEPs). Ojedinelé publikované studie jsou zaměřeny i na velmi pozdní komponenty LEPs odpovědi, reflektující funkce nemyelinizovaných (a tedy ještě pomaleji vedoucích) vláken C (ultra-late LEPs), které jsou technicky náročnější a pravděpodobně jen omezeně použitelné v klinické praxi (Cruccu et al. 2004, Cruccu et al. 2010, Haanpää et al. 2011).

Řada publikovaných studií prokázala diagnostickou validitu LEPs v hodnocení postižení periferního či centrálního segmentu nociceptivních nervových drah, kdy dochází k redukci amplitudy LEPs. Tyto nálezy byly potvrzeny u širokého spektra onemocnění periferního i centrálního nervového systému (např. u periferních neuropatií, neuralgie trigeminu, roztroušené sklerózy, syringomyelie a kmenových cévních lézí – např. u Wallenbergova syndromu) (studie třídy I a II) (Cruccu et al. 2004). Recentně bylo prokázáno, že LEPs odpověď zcela vymizí po kožní denervaci vyvolané lokální aplikací capsaicinu (u pacientů, u nichž byla před aplikací

capsaicinu odpověď normálně výbavná) (LaCesa et al. 2018). Tento nálezn je plně v souladu s výsledky předchozích studií, prokazujících určitou korelaci mezi amplitudou LEPs a počtem intraepidermálních tenkých nervových vláken.

Vymizení LEP odpovědi je také testem objektivizujícím neuropatickou bolest. V této indikaci mají LEPs lepší diagnostickou validitu než jakýkoli jiný použitelný test a to u pacientů s periferní i centrální neuropatickou bolestí (studie třídy I a II) (Cruccu et al. 2004).

Naopak u pacientů s fibromyálií, myofasciálními syndromy, chronickou únavou, chronickou bolestí zánětlivé etiologie a psychogenní bolestí jsou LEPs odpovědi facilitovány a mají většinou zvýšenou amplitudu (studie třídy II a III) (Cruccu et al. 2004).

Podle současných doporučení EFNS (Cruccu et al. 2004, Cruccu et al. 2010) a NeuPSIG (Haanpää et al. 2011) a také podle doporučení Mezinárodní federace pro klinickou neurofyziologii (International Federation of Clinical Neurophysiology, IFCN) (Cruccu et al. 2008a) jsou proto LEPs nejsnazší a nejspolehlivější metodou hodnocení funkce A-delta asociovaných nociceptivních nervových drah (doporučení úrovně A). Všechny provedené studie prokazují vysokou specifitu LEPs abnormit, ale poměrně nízkou senzitivitu metodiky (cca 60-70%, pokud je jako abnormita zohledňována pouze absence odpovědi). Metoda je však ekonomicky poměrně náročná, což limituje její využití v širší klinické praxi.

Pro hodnocení nocicepce zprostředkované C vlákny není dosud k dispozici dostatek podkladů.

3.3.4.2.2. Další modalit nociceptivních evokovaných potenciálů

Pro hodnocení dalších modalit evokovaných potenciálů (CHEPs a SE-PREPs) byly v době tvorby výše popsaných doporučení k dispozici jen omezené počty studií (3 studie třídy III/IV pro každou z těchto modalit), které neumožňovaly stanovení validního závěru (Haanpää et al. 2011, Cruccu et al. 2010).

V následujícím období však publikováno několik dalších studií, potvrzujících přínos uvedených modalit evokovaných potenciálů v diagnostice neuropatické bolesti.

Evokované potenciály vyvolané kontaktním teplem jsou odpovědi na krátce trvající aplikaci velmi teplého podnětu produkovaného termosondou, přiloženou na kůži pacienta (Baumgärtner et al. 2012). Podobně jako LEPs odrážejí funkci málo myelinizovaných A-delta vláken, což bylo potvrzeno nálezy recentní studie, prokazující vymizení CHEPs odpovědi po denervaci kůže vyvolané lokální aplikací capsaicinu (LaCesa et al. 2018).

Význam metodiky podporuje i skutečnost, že za poslední 4 roky byly publikovány čtyři práce, zaměřené na vytvoření normativních dat pro hodnocení CHEPs (Lagerburg et al. 2015, Jutzeler et al. 2016, Granovsky et al. 2016, Rosner et al. 2018), v jednom případě dokonce v rámci multicentrické studie (Granovsky et al. 2016). Využitelnost těchto normativních dat pro českou populaci byla ověřena v rámci jedné z prací naší pracovní skupiny (*Raputová et al., submitováno*). Jako abnormální lze tedy hodnotit nejen chybění odpovědi, ale také prolongaci latence a/nebo nízkou amplitudou odpovědi (tedy hodnoty mimo normální rozmezí pro příslušný parametr v rámci publikovaných normativních dat).

V souladu s tímto přístupem byla opakovaně prokázána alterace parametrů CHEPs u pacientů s periferní neuropatickou bolestí. V menší studii byla abnormita odpovědi CHEPs (většinou snížená amplituda nebo prolongovaná latence) prokázána u 81,3 % pacientů s bolestivou diabetickou polyneuropatií (a objektivizovanou výraznou redukcí intraepidermální hustoty tenkých nervových vláken v kožní biopsii) (Chao et al. 2010). Recentně byla publikována práce, zaměřená na nálezy CHEPs u velké skupiny 188 pacientů s distální senzitivní polyneuropatií různé etiologie klinicky se manifestující distálními pozitivními senzitivními symptomy (u 144 pacientů z této skupiny byly potíže hodnoceny jako neuropatická bolest) (Wu et al. 2017). Také tito pacienti vykazovali většinou signifikantní redukcí intraepidermální inervace v kožních biopsiích. Abnormita CHEPs (ve smyslu redukce amplitudy a/nebo prolongace latence) byla na DKK prokázána u 61,2 % těchto pacientů a to bez ohledu na přítomnost bolesti. Velmi podobnou diagnostickou validitu uvádí i dříve publikovaná studie, zaměřená na pacienty s bolestivou distální senzitivní polyneuropatií s postižením tenkých vláken (izolovaným nebo kombinovaným postižením vláken silných) a jasnou abnormitou v kožní biopsii (Casanova-Molla et al. 2011). Abnormita CHEPs (podobně jako LEPs) byla v tomto souboru prokázána u 60 % pacientů. Amplituda CHEPs přitom ve všech jmenovaných studiích prokázala signifikantní pozitivní korelaci s počtem intraepidermálních nervových vláken (Chao et al. 2010, Wu et al. 2017, Casanova-Molla et al. 2011).

Popsané studie tedy prokazují, že jsou CHEPs perspektivním diagnostickým testem funkce tenkých nervových vláken. Validita metodiky je v této indikaci pravděpodobně podobná jako validita alternativně využitelných a dosud podrobněji testovaných LEPs, které jsou doporučovány EFNS, NeuPSIG a IFCN jako vhodná metoda testování nociceptivních funkcí (Cruccu et al. 2004, Cruccu et al. 2008a, Cruccu et al. 2010, Haanpää et al. 2011). Nálezy CHEPs korelují s kožní biopsií jako současným zlatým standardem diagnostiky tohoto typu postižení. Metoda je pravděpodobně využitelná i pro hodnocení navazujících centrálních

senzitivních drah, pro validní hodnocení přínosu metodiky v této indikaci je však dosud poměrně málo dat (Baumgärtner et al. 2012, Wu et al. 2018, *Raputová et al., submitováno*).

V rámci České republiky byla metoda poprvé zavedena na našem pracovišti a recentně byla k publikaci submitována práce, která ověřila možnost použití publikovaných normativních dat v české populaci, poskytla podklady pro volbu optimálního algoritmu vyšetření a verifikovala technickou správnost používané metodiky (*Raputova et al., submitováno*). Práce byla zaměřena také a na možnost diagnostického využití CHEPs u pacientů se smíšenou polyneuropatií s postižením tenkých nervových vláken (bez ohledu na případnou přítomnost neuropatické bolesti a dalších pozitivních symptomů). Na skupinové úrovni byly nálezy CHEPs u těchto jedinců signifikantně odlišné od souboru zdravých kontrol, na individuální úrovni se však CHEPs v uvedené indikaci jeví jako málo senzitivní test (*Raputova et al., submitováno*). Zmíněná studie je jednou z komentovaných přílohou této práce.

Evokované potenciály vyvolané specifickou elektrickou stimulací nízké intenzity, umožňující preferenční aktivaci povrchových kožních nervových zakončení pomocí povrchové koncentrické elektrody (**SE-PREPS**) byly v několika studiích využity jako alternativní diagnostický test reflektující nocicepci (Katsarava et al. 2006, Uceyler et al. 2013a). Recentně však bylo prokázáno, že narozdíl od LEPs a CHEPs odpověď při SE-PREPs nevymizí po denervaci kůže pomocí kapsaicinu (LaCesa et al. 2018). Tyto nálezy tak naznačují, že SE-PREPs nereflektují pravděpodobně izolovanou funkci tenkých nervových vláken, což relativizuje jejich přínos v této indikaci ((LaCesa et al. 2018).

3.3.4.3. *Elektrofyzilogické reflexy*

3.3.4.3.1. *Trigeminové reflexy*

Specializované reflexy jsou využívány především v diagnostice obličejových bolestí (Haanpää et al. 2011), nejčastěji u neuralgie trigeminu. V této indikaci jsou diagnosticky přínosné zejména trigeminové reflexy zprostředkované A-beta vlákny, tedy blink reflex a masseterový inhibiční reflex.

Blink reflex (prakticky neužívaným českým ekvivalentem názvu je „mrkací reflex“) je elektrofyziologickým korelátém korneálního reflexu (Mazanec 2007). Aferentní část reflexního oblouku představuje n. trigeminus, eferentní pak n. facialis. Reflex lze využít pro objektivizaci funkce obou zmíněných nervů a současně segmentu kmene, v němž dochází

k přepojení z aferentní na eferentní část reflexního oblouku. Hodnocena je časná komponentou R1 a pozdní komponenta R2 výbavná ipsi- i kontralateriálně (R2i a R2c) (Mazanec 2007).

Masseterový inhibiční reflex je do jisté míry elektrofyzilogickým korelátem níže popisované kožní periody útlumu v oblasti hlavových nervů (Cruccu a Ongerboer de Visser 1999). Podstatou reflexu je přechodná reflexní inhibice aktivovaných svěračů čelisti (tedy m. masseter a m. temporalis) vyvolaná aplikací mechanických či elektrických podnětů do oblasti sliznice dutiny ústní. Tato inhibice je detekovatelná na elektromyografickém (EMG) vyšetření jako časná a pozdní fáze suprese svalové aktivity označovaná jako silent period 1 a 2 (SP1 a SP2) (Cruccu a Ongerboer de Visser 1999). Obě komponenty jsou výbavné při aplikaci podnětů smíšených (tedy takových, které mají bolestivou i nebolestivou komponentu) i zcela nebolestivých a bylo prokázáno, že aferentní část reflexního oblouku je zprostředkována středně myelinizovanými vlákny A-beta (Cruccu a Ongerboer de Visser 1999).

U pacientů se symptomatickou neuralgií trigeminu jsou prokazovány především abnormality časné R1 komponenty blink reflexu a časné SP1 komponenty masseterového inhibičního reflexu. Dle doporučení Americké neurologické akademie (American Academy of Neurology, AAN) a Evropské federace neurologických společností (European Federation of Neurological Societies, EFNS) (Cruccu et al. 2008b) jsou tyto dva reflexy účinnými nástroji v detekci symptomatických (sekundárních) forem neuralgie trigeminu a to s vysokou senzitivitou i specificitou (kolem 90 %). Časná komponenta blink reflexu vykazuje vysokou diagnostickou validitu i u pacientů s postherpetickou neuralgií v distribuci n. ophthalmicus (Truini et al. 2008). Podle aktuálních doporučení NeuPSIG (Haanpää et al. 2011) jsou tedy trigeminální reflexy zprostředkované A-beta vlákny užitečným diagnostickým nástrojem u trigeminálních bolestí (doporučení třídy A). Tyto metody prokazují abnormální nález u pacientů s prokazatelným strukturálním postižením v distribuci n. trigeminus (v rámci symptomatické neuralgie trigeminu, trigeminálních neuropatií a postherpetické neuralgie v obličejové distribuci). U pacientů s klasickou (primární) neuralgií trigeminu jsou naopak nálezy těchto reflexů v normě.

3.3.4.3.2. Další reflexy zvažované pro účely diagnostiky neuropatické bolesti

Význam dalších reflexů v diagnostice neuropatické bolesti dosud přesvědčivě potvrzen nebyl (doporučení třídy C) (Cruccu et al. 2004), Jedna studie testovala význam **kožní periody útlumu** (Cutaneous Silent Period, CSP) v rozlišení pacientů s bolestivou a nebolestivou periferní

neuropatií na HKK (Truini et al. 2009). Kožní perioda útlumu je fyziologický ochranný míšňí inhibičňí reflex, při kterém dochází během volňí kontrakce svalu k přechodnému snížení až vymizení EMG aktivity v důsledku určitého typu stimulace (Šťětkářová et al. 2017, Stetkarova a Kofler 2009). Odpověď je vybavitelná drážděňím smíšeného nervu, kožňích aferentňích vláken či transkraniální stimulací kortexu. Abnormity CSP jsou prokazovány zejména u pacientů s míšňí dysfunkcí (např. s cervikální myelopatií, syringomyelií a také u dalších intramedulárních lézích) (Šťětkářová et al. 2017). Metoda je pravděpodobně vhodňým testem umožňujícím odlišení myelopatie a radikulopatie (Leis et al. 2011). Aferentňí část reflexňího oblouku je tvořena tenkými málo myelinizovanými vláknými A-delta, která zprostředkují nocicepci. Z těchto důvodů bylo zvažováno využití metodiky v diagnostice neuropatické bolesti. V Truiniho práci (2009) však nebylo trvání kožňí periody útlumu výzňamně odlišné mezi jedinci s bolestivou a nebolestivou formou periferní neuropatie (na rozdíl od amplitudy laserem evokovaných potenciálů, která dokázala obě skupiny pacientů spolehlivě odlišit) (Truini et al. 2009). Trvání CSP nekorelovalo ani s intenzitou bolesti u pacientů s bolestivou neuropatií. Uvedené výsledky jsou zcela v souladu s nálezy jiné studie (Leis et al. 2011) prokazující dobře vybavňnou kožňí periodu útlumu u těžkých krčňích radikulopatií s prokázanou abnormální spontáňní aktivitou v kořenových svalech. V recentňí práci (Vaško et al. 2017) byla prokázána zachovalá CSP také u většiny pacientů s brachiální plexopatií a to dokonce i při avulzi nervových kořenů. Uvedené studie tedy svědčí proti možnosti využití CSP v diagnostice neuropatické bolesti a v tomto smyslu jsou fomulována i aktuální doporučení EFNS a NeuPSIG, podle nichž není pravděpodobně kožňí perioda útlumu adekváťním nástrojem pro hodnocení nocicepce ani neuropatické bolesti (doporučení třídy B)(Cruccu et al. 2010, Haanpää et al. 2011).

Nocicepňí flekňí reflex (Nociception Flexion Reflex, NFR, R III reflex) (Skljarevski et al. 2002) je fyziologický polysynaptický reflex, zprostředkující úhybňou reakci na algické podněty. Jedná se o snadno měřitelný reflex, využitelný v klinických i experimentálních podmínkách jako spolehlivý a objektivňí nástroj pro hodnocení percepce bolesti na individuální úrovňi (Skljarevski et al. 2002). NFR byl široce studován v rámci hodnocení nocicepce a jejího ovlivňění širokou škálou farmakologických a nefarmakologických intervencí, nikoli však u pacientů s neuropatickou bolestí (Haanpää et al. 2011, Cruccu et al. 2004, Cruccu et al. 2010).

3.3.4.4. Mikroneurografie

Mikroneurografie je již téměř padesát let známá minimálně invazivní vyšetřovací technika umožňující záznam elektrické aktivity z jednotlivých axonů periferního nervu u bdělého pacienta (Hagarth a Vallbo 1969). Metoda může poskytnout informace o funkci kteréhokoli z typů nervových vláken včetně tenkých nervových vláken typu A-delta a C. Umožní odlišit akční potenciály v jednotlivých vláknech periferního nervu, jedná se tedy v současnosti o jedinou techniku, která umožňuje zaznamenat a kvantifikovat pozitivní senzitivní fenomény zprostředkované silnými nervovými vlákny (parestezie a dysestezie) i málo myelinizovanými a nemyelinizovanými tenkými nervovými vlákny (spontánní bolest). V rámci vyšetření je současně možné provést intraneurální mikrostimulaci jednotlivých vláken, což může pravděpodobně napomoci objektivizovat přímou asociaci mezi aktivitou v příslušném nervovém vlákne a vnímáním bolesti (Rice a Casale 1994).

Pokud je mikroneurografie prováděna zkušeným vyšetřujícím, je považována za relativně bezpečnou a provedené prospektivní studie neprokázaly žádné zjevné ani přetrvávající postižení vyšetřovaného periferního nervu (Eckberg et al. 1989).

Metoda je však technicky i časově náročná a předpokladem pro její využití je zkušený vyšetřující a spolupracující pacient. V současné době jde o vyšetření prováděné jen v několika centrech na světě (a – podle znalostí autorky – rutinně ani na žádném pracovišti v rámci České republiky). Širší využití metodiky limituje také skutečnost, že dosud nebyla publikována normativní data a provedené studie mají pouze charakter nezaslepených srovnání skupin (studie třídy IV). Nález mikroneurografie u pacientů s neuropatickou bolestí byly dosud publikovány jen ojediněle (do současné doby jde o méně než 100 publikovaných pacientů) (Haanpää et al. 2011, Cruccu et al. 2004, Cruccu et al. 2010). V novějších studiích je metoda nově využívána v některých zajímavých aplikacích – např. umožní odlišení různých funkčních subtypů C vláken (tedy např. rozlišení receptorů citlivých na mechanickou stimulaci a receptorů na tuto mechanickou stimulaci necitlivých). Další novější aplikací je možnost simultánního záznamu aktivity ve více nervových vláknech, což zlepšuje diagnostické možnosti metodiky v hodnocení abnormální spontánní aktivity vycházející z periferních nociceptorů (která je považována za možnou příčinu spontánní bolesti u pacientů s periferními neuropatiemi) (Haanpää et al. 2011).

Podle současných doporučení EFNS a NeuPSIG nelze mikroneurografii doporučit jako rutinní metodiku využitelnou v běžné klinické praxi pro diagnostické účely u pacientů s neuropatickou bolestí (doporučení pouze na úrovni správné klinické praxe - good practice point). V rámci experimentálních studií má však tato metoda potenciál přispět k pochopení patofyziologické

role spontánní ektopické aktivity při vzniku symptomů neuropatické bolesti. Perspektivně by také bylo zajímavé využití mikroneurografie v rámci farmakologických studií, kde by umožnila hodnotit efektivitu testovaných preparátů na snížení či vymizení ektopické spontánní aktivity, generované v periferních nociceptorech (Haanpää et al. 2011, Cruccu et al. 2010).

3.3.4.5. Testování funkce autonomního nervového systému

Kromě výše zmíněných elektrofyziologických metod reflektujících funkci senzitivních tenkých nervových vláken (a navazujících centrálních nociceptivních drah) lze v diagnostice neuropatické bolesti do jisté míry využít i testy autonomních funkcí.

Podkladem pro takový postup je řada anatomických a funkčních souvislostí a interakcí mezi autonomním a nociceptivním systémem a to na úrovni periferní i centrální (Haanpää et al. 2011, Nahman-Averbuch a Coghill 2017):

1. Autonomní nervová vlákna patří k *tenkým nervovým vláknům* – vegetativní funkce jsou zprostředkovány velmi nízce myelinizovanými vlákny typu B (eferentní pregangliová nervová vlákna s průměrem 3 μm a rychlostí vedení 5 - 15 m/s) a nemyelinizovanými vlákny typu C (eferentní postgangliová nervová vlákna s průměrem 0,5 - 1 μm a rychlostí vedení 0,5 – 2,5 m/s). U periferních neuropatií s postižením tenkých nervových vláken lze tedy předpokládat poškození nejen senzitivních tenkých nervových vláken A-delta a C, ale i vláken autonomních.
2. Existuje jasná *anatomická souvislost mezi strukturami centrálního nervového systému, regulujícími bolest a autonomní funkce*: periakveduktální šed', insulární a přední cingulární kortex, hypothalamus a amygdala se podílejí na řízení obou systémů.
3. *Bolestivá stimulace vede ke změnám aktivity autonomního nervového systému* (Koenig et al. 2014).
4. *Změny autonomní aktivity mohou ovlivňovat reakci na bolest*: zvýšení či naopak snížení aktivace vagu má např. vliv na redukci nebo naopak nárůst vnímání experimentální bolesti (Nahman-Averbuch a Coghill 2017).
5. Některé teorie naznačují *roli autonomního nervového systému v rozvoji či udržování spontánní bolesti*. Podkladem pro takové úvahy jsou mj. nálezy biopsií n. suralis prokazující zvýšenou hustotu eferentních sympatických axonů u pacientů s periferní neuropatickou bolestí ve srovnání s pacienty s nebolestivou periferní neuropatií (Bickel

et al. 2000). Aplikace norepinefrinu navíc evokuje bolest u animálních modelů traumatických neuropatií (Kurvers et al. 1998). Klinickou jednotkou, která představuje model signifikantní asociace (a pravděpodobně i patofyziologické interakce) mezi autonomním nervovým systémem a spontánní i evokovanou bolestí je komplexní regionální bolestivý syndrom.

V souladu s uvedenými skutečnostmi jsou v řadě studií, zaměřených na neuropatickou bolest, prokazovány i abnormality autonomních nervových funkcí a to při různých způsobech jejich testování. Přehled autonomních testů, využitelných u pacientů s předpokládanou centrální autonomní dysfunkcí při roztroušené skleróze (podobně jako při dalších onemocněních mozku či míchy, která se mohou manifestovat neuropatickou bolestí) byl publikován formou přehledného článku (*Šrotová et al. 2016*) a je jednou z komentovaných příloh této práce. V tomto přehledu je vysvětlena i podstata většiny používaných testů, která proto nebude podrobněji zmíněna v následujícím textu.

Spektrum diagnostických testů využitelných u pacientů s periferní neuropatickou bolestí je velmi podobné. V rámci studií zaměřených na neuropatickou bolest jsou nejčastěji využívány testy reflektující mikrocirkulační a sudomotorické změny, zejména u pacientů s neuropatií tenkých vláken jsou pak relevantní i testy kardiovaskulárních autonomních funkcí.

3.3.4.5.1. Hodnocení mikrocirkulačních změn v místě bolesti

Pro hodnocení mikrocirkulačních změn (tkáňové perfuze) v postižené oblasti je nejčastěji využívána laserová doplerometrie (Low et al. 1983b, González-Darder a Segura-Pastor 1994). Určité informace k této problematice poskytuje i měření kožní teploty (Brelsfold et al. 1986).

3.3.4.5.2. Testy sudomotorických funkcí

Z testů sudomotorických funkcí se jako nejsenzitivnější jeví **kvantitativní sudomotorický test** (Quantitative Sudomotor Axon Reflex Test, QSART) (Low et al. 1983a), který má potenciál prokázat abnormality u významného podílu pacientů s neuropatickou bolestí či periferními neuropatiemi obecně. V jedné z provedených studií byla např. u pacientů s bolestivými polyneuropatiemi prokázána abnormalita QSART prokázána u 69 % pacientů s čistým postižením tenkých nervových vláken dokonce u 85 % pacientů s kombinovaným postižením vláken tenkých a silných (Killian et al. 2011). Test však sám o sobě samozřejmě neodliší

bolestivou a nebolestivou formu neuropatie a je abnormální u pacientů s polyneuropatiemi postihujícími příslušný typ nervových vláken bez ohledu na přítomnost bolesti.

Z dalších sudomotických testů mohou být využity např. termoregulační potní test, **sympatická kožní odpověď** (Sympathetic Skin Response, SSR, Kucera et al. 2004), případně ninhydrinový test (Haanpää et al. 2011). Senzitivita těchto metod je však nižší, což prokazují i nálezy naší studie (Vlčková et al. 2016) hodnotící nálezy SSR u většího souboru zdravých dobrovolníků a pacientů s polyneuropatií, která je jednou z komentovaných příloh této práce. Nezopochybnitelný abnormální nález testu (tedy nevybavnost odpovědi) jsme v této studii prokázali pouze u necelých 10 % pacientů s neuropatií s izolovaným postižením tenkých nervových vláken a u 33 % pacientů s kombinovaným postižením vláken silných a tenkých. V rámci zmíněné práce (Vlčková et al. 2016) jsme také vytvořili vlastní věkově stratifikovaná normativní data pro hodnocení amplitud a latencí na HKK i DKK. Při zohlednění těchto parametrů byl alespoň jeden z nich abnormální u 33 % pacientů s neuropatií s kombinovaným postižením obou typů nervových vláken a u 15 % pacientů s čistým postižením vláken tenkých (počet abnormit ve skupině pacientů s izolovaným postižením tenkých nervových vláken se statisticky nelišil od souboru zdravých kontrol). Celkově tak senzitivita SSR vyšetření v průkazu dysfunkce autonomních tenkých nervových vláken dosáhla přibližně 66 % u pacientů s kombinovaným postižením silných a tenkých vláken, ale pouze 25 % u pacientů s izolovaným postižením vláken tenkých. Hodnocena byla také reprodukovatelnost testu jako důležitý faktor pro longitudinální sledování.

Sympatická kožní odpověď byla hodnocena u pacientů i v řadě dalších studií naší pracovní skupiny (Vlčková-Moravcová et al. 2008a, Vlčková-Moravcová et al. 2008b, Vlčková-Moravcová a Bednařík 2009). I tyto nálezy potvrzují využitelnost metodiky v diagnostice polyneuropatie/neuropatie tenkých vláken, ale s nižší diagnostickou validitou.

3.3.4.5.3. Testy kardiovaskulárních autonomních funkcí

V řadě studií (zejména zaměřených na bolestivé polyneuropatie či právě neuropatie tenkých vláken) jsou pro hodnocení vegetativního nervového systému využívány také testy reflektující kardiovaskulární autonomní funkce. Nejčastěji hodnoceným parametrem, odrážejícím vliv autonomních nervových funkcí na kardiovaskulární systém, je **variabilita srdeční frekvence** (Ewing a Clarke 1986, Task Force of the European Society of Cardiology 1996). Pro její testování lze využít metody **časové analýzy**, označované jako *Ewingovy testy* (Ewing a Clarke, 1986). Software pro tento typ hodnocení je standardní součástí řady elektromyografických

přístrojů. Alternativně lze tento parametr hodnotit prostřednictvím **analýzy frekvenční** v rámci metody označované jako *spektrální analýza variability srdeční frekvence* (Spectral Analysis Of Heart Rate Variability, SAHRV) (Task Force of the European Society of Cardiology 1996), vyžadující speciální analyzátor. Podkladem metodiky (bez ohledu na typ analýzy použitý k jejímu hodnocení) je skutečnost, že srdeční frekvence vykazuje při hodnocení v delších časových úsecích fyziologickou variabilitu, která se mění při dysfunkci autonomního nervového systému. Testování lze provádět v klidových podmínkách (vleže, při spontánním dýchání) nebo při aktivaci s použitím standardizovaných zkoušek se známým vlivem na aktivitu autonomního nervového systému, jako jsou hluboké dýchání, Valsalvův manévr, statický zátěžový test („handgrip“) a zejména aktivní vertikalizace (tzv. ortostatická zkouška), resp. ortoklinostatický test (zkouška leh-stoj-leh) (Ewing a Clarke 1986, Task Force of the European Society of Cardiology, 1996). Oba způsoby hodnocení, stejně jako přínos a limitace vyšetření HRV a faktory, které je nutné zohledňovat při interpretaci nálezů, jsou podrobně popsány v přehledné práci, zaměřené na možnosti testování autonomního nervového systému u pacientů s roztroušenou sklerózou (Šrotová *et al.* 2016).

Testy kardiovaskulárních autonomních funkcí využívá řada studií naší pracovní skupiny a to zejména v projektech zaměřených na periferní neuropatie. Využívány jsou metody časové (Vlčková-Moravcová *et al.* 2008a, Vlčková-Moravcová *et al.* 2008b, Vlčková-Moravcová a Bednařík 2009) i frekvenční analýzy (Divišová *et al.* 2012, Škorňa *et al.* 2015).

Pro druhý z uvedených způsobů hodnocení jsme vytvořili i věkově stratifikovaná normativní data a hodnotili jsme také reprodukovatelnost metodiky (jako klíčový faktor při posuzování event. změn nálezu, daných vývojem základního onemocnění či jeho terapeutickým ovlivněním) (Vlčková *et al.* 2010). Všechny zmíněné studie jsou komentovanými přílohami této práce.

3.3.4.5.4. Souhrn a doporučení v souvislosti s využitím testů autonomního nervového systému v diagnostice neuropatické bolesti

Obecnou nevýhodou testů vegetativního nervového systému je jejich nižší senzitivita v diagnostice neuropatické bolesti (viz níže), která svědčí proti využití některé z těchto metod jako izolovaného diagnostického testu konfirmujícího diagnózu neuropatické bolesti. Tyto testy však rozhodně mají svůj význam jako doplňková vyšetření a mohou napomoci objektivizovat změny autonomních nervových funkcí u těchto pacientů.

Podle aktuálních doporučení NeuPSIG (Haanpää et al. 2011) prokazuje několik studií, že laserová doplerometrie je spolehlivou metodou hodnocení změn autonomních nervových funkcí u periferní neuropatické bolesti (doporučení úrovně B). Podobně se v této indikaci ukázal jako užitečný kvantitativní sudomotorický test (doporučení úrovně B). Hodnocení kožní teploty a sympatická kožní odpověď mohou být v této indikaci také vyhovující (doporučení úrovně B).

3.3.5. Molekulárně-genetická diagnostika u pacientů s neuropatickou bolestí

Prozatím spíše okrajovým diagnostickým testem u pacientů s neuropatickou jsou molekulárně-genetické metody. V klinické praxi je toto vyšetření (pokud je indikováno) zaměřené na **průkaz genetického podkladu některých onemocnění manifestujících se neuropatickou bolestí** (Finnerup et al. 2016), tedy především u dědičných forem erytromelalgie, ale také z některých bolestivých hereditárních senzitivních a autonomních neuropatií, familiární amyloidózy či Fabryho choroby.

Primární (hereditární) elektromelalgie je vzácné autozomálně dominantně dědičné onemocnění charakterizované kombinací rekurentních epizod pálivé bolesti končetin s jejich zarudnutím a zvýšením lokální teploty v postižené oblasti (Waxman et al. 2014, Tang et al. 2015). Jedná se o velmi vzácné onemocnění s incidencí kolem 1 na 100.000. Klinická manifestace začíná obvykle již v první dekádě života. Dominujícím symptomem je intenzivní pálivá bolest, často provokovaná fyzickou aktivitou či teplem. Příznaky se v průběhu života obvykle zhoršují a jsou jen obtížně terapeuticky ovlivnitelné. Komplikujícím faktorem jsou časté ulcerace či gangrény v postižené oblasti, které si pacienti obvykle přivodí sami v důsledku excesivní expozice chladu ve snaze ulevit intenzivní bolesti. Genetickým podkladem onemocnění je mutace v genu SCN9A, který kóduje Nav1.7 podtyp napětově řízeného sodíkového kanálu. Diagnostika je kromě typické klinické manifestace a případné pozitivní rodinné anamnézy založena právě zejména na genetickém průkazu popsané mutace, protože ostatní konfirmační metody užívané u pacientů s periferní neuropatickou bolestí neprokáží u pacientů s tímto onemocněním abnormální nález (Waxman et al. 2014, Tang et al. 2015). V případě této vzácné jednotky je tak genetické vyšetření jediným možným konfirmačním testem, umožňujícím stanovení diagnózy „potvrzené (jisté) neuropatické bolesti“ (Finnerup et al. 2016).

U ostatních dědičně podmíněných jednotek, které se manifestují neuropatickou bolestí (tedy např. u **hereditárních senzitivních a autonomních neuropatií, familiární amyloidózy či Fabryho choroby**), je možné použít i jiné konfirmační testy poskytující průkaz postižení senzitivního nervového systému (např. elektromyografii a další elektrofyziologické testy nebo kožní biopsii). Genetické vyšetření zde tedy nehraje roli testu klíčového pro konfirmaci neuropatického charakteru bolesti, ale je spíše doplňkovou metodou při pátrání po příčině periferně neurogenního postižení, což je však v současnosti vzhledem k novým terapeutickým možnostem u některých z těchto diagnostických jednotek (familiární amyloidóza, Fabryho nemoc) velmi aktuální otázka.

Perspektivním využitím molekulárně-genetických metod u pacientů s neuropatickou bolestí je také možnost stanovení **genetických profilů predikujících terapeutickou odpověď** pacienta na určitý typ analgetické terapie. Tento přístup by byl velmi přínosný jednak pro účely klinických studií, ale také pro běžnou klinickou praxi, kde by bylo možné vybrat pacientovi nejvhodnější terapii „na míru“ na základě jeho genetického profilu. Prozatím však není k dispozici dostatek informací pro využití těchto poznatků v klinické ani experimentální praxi.

II. KOMENTOVANÝ SOUBOR VLASTNÍCH PRACÍ

SEZNAM KOMENTOVANÝCH PRACÍ je seřazený podle roku vydání. Podtržení vyznačuje korespondenčního autora (pokud je jím autorka habilitační práce). *Počet citací v Science Citation Index (SCI) je uveden dle údajů na Web of Science (WoS) ke dni 7.8.2018.* Pokud není uveden IF, jedná se o neimpaktovaný časopis. Pokud není uveden počet citací, nebyla práce dle WoS dosud citována.

1. Moravcová E, Bednařík J. Počítačem asistované stanovení termického prahu. *Cesk Slov Neurol N* 2003; 66/99: 263-269. *IF: 0,047. Počet citací v SCI: 6.*
2. Moravcová E, Bednařík J, Feit J, Sommer C. Hodnocení intraepidermální hustoty tenkých nervových vláken z kožní biopsie u pacientů s polyneuropatií. *Cesk Slov Neurol N* 2005a; 68/101: 219-226. *IF: 0,070.*
3. Moravcova E, Bednařík J, Svobodník A, Dušek L. Reproducibility of thermal threshold assessment in small-fibre neuropathy patients. *Scripta medica (Brno)* 2005b; 78(3): 177-184.
4. Vlckova-Moravcova E, Bednarik J, Belobradkova J, Sommer C. Small-fibre involvement in diabetic patients with neuropathic foot pain. *Diabet Med* 2008;25(6):692-699. *IF: 3,172. Počet citací v SCI: 56.*
5. Vlckova-Moravcova E, Bednarik J, Dušek L, Toyka KV, Sommer C. Diagnostic validity of epidermal nerve fiber densities in painful sensory neuropathies. *Muscle and Nerve* 2008a: 37: 50-60. *IF: 2,594. Počet citací v SCI: 81.*
6. Bednarik J, Vlckova-Moravcova E, Bursova S, Belobradkova J, Dusek L, Sommer C. Etiology of small-fiber neuropathy. *J Peripher Nerv Syst* 2009;14:177-183. doi: 10.1111/j.1529-8027.2009.00229.x. *IF: 3,623. Počet citací v SCI: 41.*
7. Vlčková-Moravcová E, Bednařík J. Painful sensory neuropathies in the elderly. *Scripta medica (Brno)* 2009;82(1):16-24.
8. Scherens A, Maier C, Haussleiter IS, Schwenkreis P, Vlckova-Moravcova E, Baron R, Sommer C. Painful or painless lower limb dysesthesias are highly predictive of peripheral neuropathy: comparison of different diagnostic modalities. *Eur J Pain* 2009;13(7):711-8. *IF = 3,612. Počet citací v SCI: 37.*

9. Vlčková E, Bednařík J, Buršová E, Šajgalíková K, Mlčáková L. Spektrální analýza variability srdeční frekvence – normativní data. *Cesk Slov Neurol N* 2010; 73/106(6): 663-672. *IF = 0,393. Počet citací v SCI: 9.*
10. Buršová Š, Vlčková E, Hnojčíková M, Němec M, Dubový P, Dušek L, Jarkovský J, Bělobrádková J, Bednařík J. Validita a prediktivní hodnota skriningových testů u prediabetické a časně diabetické polyneuropatie. *Cesk Slov Neurol N* 2012a; 75/108(5):562-572. *IF = 0,372*
11. Buršová Š, Vlčková E, Hnojčíková M, Němec M, Dubový P, Mičánková Adamová B, Bednařík J. Vyšetření hustoty intraepidermálních nervových vláken z kožní biopsie – normativní data. *Cesk Slov Neurol N* 2012b; 75/108(4):455-459. *IF = 0,372. Počet citací v SCI: 5.*
12. Buršová Š, Vlčková E, Hnojčíková M, Němec M, Mičánková Adamová B, Bednařík J. Přístrojově asistované kvantitativní testování senzitivity - normativní data. *Cesk Slov Neurol N* 2012c; 75/108(4):444-453. *IF = 0,372. Počet citací v SCI: 6.*
13. Bursova S, Dubovy P, Vlckova-Moravcova E, Nemec M, Klusakova I, Belobradkova J, Bednarik J. Expression of growth-associated protein 43 in the skin nerve fibers of patients with type 2 diabetes mellitus. *J Neurol Sci* 2012d;315(1-2):60-63. doi: 10.1016/j.jns.2011.11.038. *IF = 2,243. Počet citací v SCI: 17.*
14. Divisova S, Vlckova-Moravcova E, Hnojčíkova M, Skorna M, Nemec M, Dubovy P, Dusek L, Jarkovsky J, Belobradkova J, Bednarik J. Prediabetes/early diabetes-associated neuropathy predominantly involves sensory small fibres. *J Peripher Nerv Syst* 2012;17:341-350. doi: 10.1111/j.1529-8027.2012.00420.x. *IF = 2,570. Počet citací v SCI: 23.*
15. Vlčková E, Šrotová I. Vyšetření senzitivity (minimonografie). *Cesk Slov Neurol N* 2014; 77/110(4): 402-418. *IF = 0,165. Počet citací v SCI: 1.*
16. Škorňa M, Kopacik R, Vlckova E, Adamova B, Kostalova M, Bednarik J. Small nerve fiber pathology in critical illness documented by serial skin biopsies. *Muscle Nerve* 2015;52(1):28-33. *IF = 2,713. Počet citací v SCI: 11.*

17. Šrotová I, Vlčková E, Straková J, Kincová S, Adamová B, Dušek L, Jarkovský J, Bednařík J. Validace české verze komplexního protokolu kvantitativního testování senzitivity. *Cesk Slov Neurol N* 2015a; 78/111(4): 442-452. *IF* = 0,209. *Počet citací v SCI*: 3.
18. Šrotová I, Vlčková E, Straková J, Kincová S, Ryba L, Dušek L, Bednařík J. Validace české verze Neuropathic Pain Symptom Inventory (NPSI_{cz}). *Cesk Slov Neurol N* 2015b; 78/111: 45-56. *IF* = 0,209.
19. Šrotová I, Vlčková E, Bednařík J. Autonomní dysfunkce a její diagnostika u roztroušené sklerózy. *Cesk Slov Neurol N* 2016; 79/ 112(2): 188-198. *IF* = 0,368.
20. Divisova S, Vlckova E, Srotova I, Kincova S, Skorna M, Dusek L, Dubovy P, Bednarik J. Intraepidermal nerve-fibre density as a biomarker of the course of neuropathy in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med* 2016; 33(5): 650-654. doi: 10.1111/dme.12890. *IF* = 3,054. *Počet citací v SCI*: 4.
21. Kincová S, Vlčková E, Šrotová I, Raputová J, Bednařík J. Dynamické metody kvantitativního testování senzitivity (QST). *Cesk Slov Neurol N* 2016; 79/ 112(1): 68-76. *IF* = 0,368.
22. Kovalova I, Vlckova E, Bednarik J. Broadening the spectrum of controls for skin biopsy in painful neuropathies: spondylotic cervical myelopathy patients with painful feet. *Brain Behav* 2016; 6(3): e00444. DOI: 10.1002/brb3.444. *IF* = 2,157
23. Vlčková E, Šrotová E, Bednařík J. Sympatická kožní odpověď v diagnostice neuropatie tenkých vláken. *Cesk Slov Neurol N* 2016; 79/ 112(1): 52-60. *IF* = 0,368
24. Kovařová I, Chmelíková M, Vlčková E, Michalec M, Raputová J, Bednařík J. Hodnocení rohovkové inervace pomocí konfokální mikroskopie. *Cesk Slov Neurol N* 2017; 80/113(1): 49-57. DOI: 10.14735/amcsnn201749. *IF* = 0,507
25. Raputova J, Srotova I, Vlckova E, Sommer C, Üçeyler N, Birklein F, Rittner HL, Reborn C, Adamova B, Kovalova I, Kralickova Nekvapilova E, Forer L, Belobradkova J, Olsovsky J, Weber P, Dusek L, Jarkovsky J, Bednarik J. Sensory phenotype and risk factors for painful diabetic neuropathy: a cross-sectional observational study. *Pain* 2017;158(12):2340-2353. doi: 10.1097/j.pain.0000000000001034. *IF* = 5,559. *Počet citací v SCI*: 2.

26. Vlčková E, Bednařík J. Současný pohled na kontraindikace a komplikace elektromyografie. *Cesk Slov Neurol N* 2017; 80/113(1): 43-48. *IF* = 0,508
27. Srotova I, Vlckova E, Dusek L, Bednarik J. A-waves increase the risk of developing neuropathy. *Brain Behav* 2017;7(8):e00760. doi: 10.1002/brb3.760. *IF* = 2,219
28. Raputová J, Vlčková E, Kočica J, Skutil T, Rajdová A, Kec D, Bednařík J. Evokované potenciály vyvolané kontaktním teplem – vliv fyziologických proměnných. *Cesk Počet citací v SCI: 2. Slov Neurol N* 2018: submitováno. *IF* = 0,508.

1. *Moravcová E, Bednařík J. Počítačem asistované stanovení termického prahu. Cesk Slov Neurol N 2003; 66/99: 263-269. IF: 0,047. Počet citací v SCI: 6.*

Práce je zaměřena na počítačem asistované stanovení termického prahu (TTT) jako jednu z metod kvantitativního testování senzitivity (QST). Metoda je v současnosti nezastupitelnou součástí komplexních protokolů kvantitativního testování senzitivity (např. DFNS-QST protokolu), které jsou velmi široce využívány pro fenotypizaci pacientů s neuropatickou bolestí. TTT je také obligátní součástí diagnostického procesu neuropatie tenkých vláken (SFN) jako jedné z klinických jednotek, manifestujících se typicky neuropatickou bolestí.

Přestože je TTT široce rozšířená a akceptovaná metoda, bylo v době publikace práce k dispozici jen velmi málo studií, poskytujících srovnání aktuálně dostupných algoritmů testování (protože většina publikovaných prací srovnávala starší algoritmy, které již nejsou součástí aktuálních komerčně dostupných software). Dostupná nebyla ani normativní data pro tyto algoritmy.

Komentovaná studie je vůbec první prací zaměřenou na problematiku kvantitativního testování senzitivity, publikovanou v rámci ČR. V rámci studie byla vytvořena normativní data pro jednotlivé aktuálně užívané algoritmy TTT, které byly současně srovnány z hlediska časové náročnosti, výšky zjištěného termického prahu a vlivu fyziologických proměnných na výsledky testování. Práce tedy poskytla podklady pro volbu optimálního algoritmu, přizpůsobenou potřebám jednotlivých klinických studií či rutinní diagnostiky a to včetně normativní dat, která byla využívána v řadě navazujících studií (např. *Vlčková-Moravcová et al. 2008, Vlčková-Moravcová et al. 2008 a, Vlčková-Moravcová a Bednařík 2009, Bednařík et al. 2009*).

Počítačem asistované stanovení termického prahu – normativní data a zdroje variability

Moravcová E., Bednařík J.

II. neurologická klinika FN Brno – Bohunice

Souhrn

Úvod: Počítačem asistované stanovení termického prahu je psychofyzikální semikvantitativní metoda testování funkce tenkých nervových vláken. V současnosti není k dispozici dostatek údajů o vlivu fyziologických proměnných na hodnotu prahu a na intraindividuální variabilitu testu. **Metodika:** Termický práh pro teplo a chlad byl stanoven ve skupině 50 zdravých dobrovolníků (25 žen a 25 mužů), a to ve dvou lokalizacích (thenar LHK a dorzum PDK). Každý jedinec byl vyšetřen třemi různými algoritmy: dvěma metodami reakčního času (reaction time inclusive – nerandomizovaná a randomizovaná varianta metody Limity) a jednou metodou konstantního stimulu – randomizovaná varianta metody Úrovně. Pro stanovení intraindividuální variability byly u 30 jedinců všechny testy zopakovány v průběhu jednoho týdne a byl stanoven horní normální limit pro fyziologickou intraindividuální změnu každého testu. **Výsledky:** Hodnoty termického prahu pro chlad se významně snižovaly a hodnoty pro teplo naopak zvyšovaly při vyšetření DKK, u mužů a při použití metod reakčního času. Vliv věku na hodnoty termického prahu nebyl statisticky významný. Intraindividuální variabilita hodnot prahu vyjádřená jako medián koeficientů intraindividuální variability se pohybovala mezi 15 a 30 % a nebyla závislá na typu testu, vyšetřované oblasti, věku ani pohlaví. **Závěry:** Normální limity je nutno stanovit s ohledem na pohlaví, typ algoritmu a lokalizaci termosondy. Intraindividuální variabilita hodnot prahu je přijatelná s ohledem na psychofyzikální charakter testu, srovnatelná s dalšími kvantitativními testy senzitivního čítí a není významně ovlivněna typem provedeného testu ani fyziologickými proměnnými.

Klíčová slova: testování termického prahu, tenká nervová vlákna, metody reakčního času, metody konstantního stimulu

Summary

Moravcová E., Bednařík J.: Computer-assisted thermal threshold testing – normative data and sources of variability.

Computer-assisted thermal threshold testing is a psychophysical semi-quantitative method of testing the function of small nerve fibres. At present, there is not enough data available on the effect of physiological variables on the threshold value and on the intra-individual variability of the test. **Methods:** Thermal threshold for heat and cold was determined in a group of 50 healthy volunteers (25 males and 25 females) in two localizations (thenar of the left upper extremity and dorsum of the right lower extremity). Each individual was examined with three different algorithms: two reaction time methods (reaction time inclusive – non-randomised and randomised variant of the Limits method) and one constant stimulus method (reaction time exclusive – randomised variant of the Levels method). To determine intra-individual variability, all tests were repeated in 30 individuals within one week and the upper normal limit of physiological intra-individual change of each test was determined. **Results:** Values of thermal threshold for cold decreased significantly whereas values for heat increased in examination of lower extremities, in men, and when using reaction time. The effect of age on thermal threshold was not significant. Intra-individual variability of threshold values expressed as the median of coefficients of intra-individual variability fell between 15 and 30% and was independent of test type, examined location, age or gender. **Conclusions:** Normal limits have to be determined with respect to gender, algorithm type and localization of the thermal element. Intra-individual variability of threshold values is acceptable, considering the psychophysical character of the test, is comparable to other quantitative tests of sensory perception and is not significantly influenced by test type or by physiological variables.

Key words: thermal threshold testing, small nerve fibres, reaction time methods, constant stimulus methods

Úvod

Počítačem asistované stanovení termického a algického prahu (TAP, z anglického Thermal Threshold Testing – TTT) je psychofyzikální semikvantitativní metoda umožňující testování funkce tenkých senzitivních málo myelinizovaných a nemyelinizovaných nervových vláken třídy A-delta a C.

Vedle laserem evokovaných SEP (1) jde v současnosti o jedinou klinicky dostupnou neinvazivní metodu stanovení funkce tohoto typu nervových vláken, neboť standardně používané elektrodiagnostické metody (elektromyografie, kondukční studie) zachytí pouze postižení silných myelinizovaných vláken třídy A. Společně s metodami testujícími autonomní nervový systém (např. sympatická kožní odpověď, testování variability srdeční frekvence) tak toto vyšetření hraje důležitou roli v diagnostice tzv. neuropatie tenkých vláken (tedy izolovaného postižení tenkých málo myelinizovaných a nemyelinizovaných senzitivních a autonomních nervových vláken).

Metoda je založena na psychofyzických principech prahu, tolerance a vztahu nadprahového stimulu a odpovědi (poznatky Fechnerovy, Stevensovy, von Freyovy) a Peltierově principu umožňujícím kontaktní termickou stimulaci (2, 3, 4).

Vyšetření se provádí pomocí termosondy umístěné na povrchu těla. Teplota termosondy je konstantně nastavena na 32 °C, tedy na indiferentní teplotu, při níž většina vyšetřovaných subjektů po krátkém kontaktu necítí teplo ani chlad.

Dále je možno stanovit:

- práh pro vnímání tepla („*warm sensation*“ – WS): obvykle 1–2 °C nad adaptační teplotou (zprostředkovaný C vláknky);
- práh pro vnímání chladu („*cold sensation*“ – CS): obvykle 1–2 °C pod adaptační teplotu (A-delta vláknka);
- algický práh pro obě tepelné modalities, jehož hodnocením jsme se v této práci podrobněji nezabývali.

Abnormálním výsledkem testu je překročení hodnoty termického prahu pro jednu či obě testované tepelné modalities, u části vyšetřených jedinců může být jedinou abnormalitou porucha diskriminace termických podnětů, tedy obvykle paradoxní vnímání chladných podnětů jako tepla (5).

Metody stanovení termického prahu je možno rozdělit do dvou skupin: metody používající reakční čas (MRČ) a metody nepoužívající reakční čas, tedy metody konstantního stimulu (MKS).

U metod reakčního času se intenzita aplikovaného stimulu postupně zvyšuje nebo snižuje z výchozí adaptační teploty a vyšetřovaný subjekt reaguje (např. stisknutím tlačítka myši) v okamžiku, kdy stimulus ucítí. Reakční čas je zpoždění mezi okamžikem působení stimulu na kožní receptory a reakcí subjektu; během této doby intenzita podnětu dále narůstá,

takže pro metodu je typická vyšší hodnota zjištěného prahu ve srovnání s metodami KS. Používány jsou různé rychlosti změny intenzity stimulu. K metodám reakčního času patří např. Limity (obr. 1a, 1b) včetně její randomizované varianty.

U metod konstantního stimulu je aplikován stimulus předem určené intenzity a subjekt po jeho skončení označí, zda jej vnímal. Další podněty jsou aplikovány na základě reakce na stimulus předchozí podle předem určeného algoritmu (Pokud vyšetřovaný udá „ano“, je následující stimulus nižší intenzity, pokud udá „ne“, následuje podnět vyšší intenzity). Existuje několik metod, které se liší způsobem změny intenzity stimulu, kalkulace prahu a ukončení testu (např. metoda Úrovně, Staircase, 4-2-1 stepping algorithm, forced choice algorithm). Používány jsou také randomizované varianty testů, kdy se nezávisle na sobě kombinují 2 sekvence podnětů; tento postup zabrání vyšetřovanému subjektu odhadovat intenzitu následujícího stimulu, což přispívá ke zvýšení spolehlivosti testu (obr. 2a, 2b).

Určení prahu je subjektivní test, vyžadující spolupráci, kterou je třeba testovat. Mimo již zmíněné kombinace dvou nezávislých sekvencí podnětů u metod konstantního stimulu je jednou z možností zařazení nulových (slepých) podnětů. Pokud vyšetřovaný subjekt na tyto stimuly reaguje, test je přerušen a subjekt znovu instruován, při opakované reakci je z testování vyřazen. Další metodou testování spolupráce je měření variability 4 následných měření, kdy Yarnitski (10) našel malou variabilitu u zdravých, větší u nemocných, ale podstatně vyšší u jedinců, jejichž úkolem bylo předstírat hypestezii.

Test může být dále ovlivněn řadou vnějších parametrů (pohodlí pacienta, rušivé vlivy prostředí, optimální tepelná pohoda, způsob instrukcí, konkrétní místo připevnění termosondy), pro každou laboratoř je tedy vhodné ověřit použitelnost doporučených normativních dat.

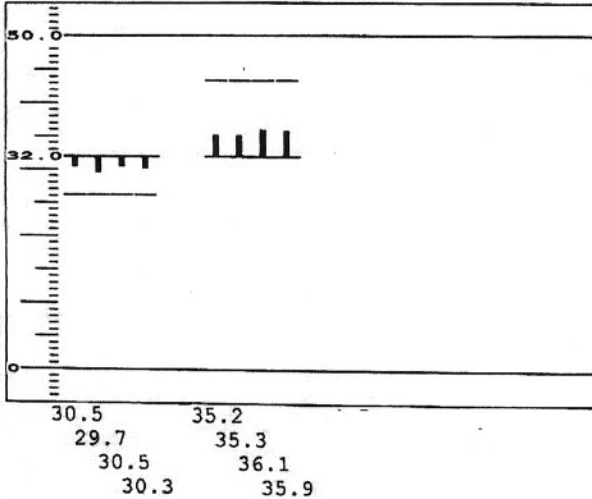
Jednotlivé algoritmy určení TAP se liší navzájem senzitivitou, specifitou, reprodukovatelností, časovou náročností a nároky na spolupráci vyšetřovaného subjektu (7–10). V současné době neexistuje shoda v tom, který z navrhovaných algoritmů je vhodnější. Existují i názory (11), že testování TAP není u nemocných s NTV užitečné.

Cílem naší studie bylo

- stanovení normálních limitů termického prahu při použití několika vybraných algoritmů,
- srovnání jednotlivých algoritmů vyšetření z hlediska časové náročnosti,
- ověření vlivu některých fyziologických proměnných na hodnotu termického prahu.

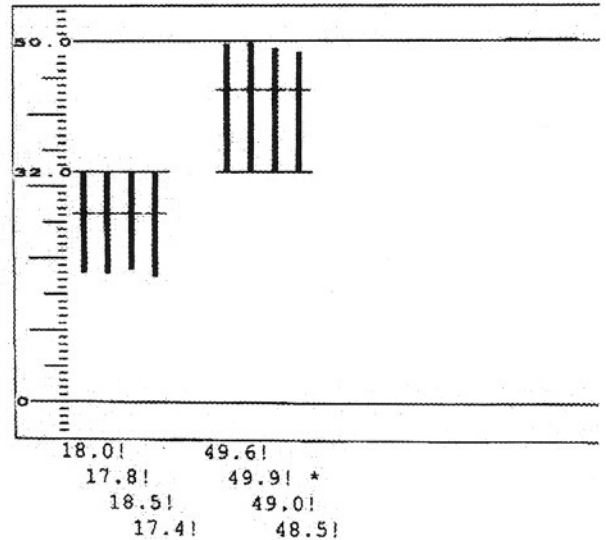
Method:		Site:	
Limits		Right Foot Dorsal medial	
Date:	Time:	Physician:	
13/Dec/1999	13:24:11		

Mod COLD SEN. WARM SEN.
 Del 1.7 3.6
 Rslt 30.3 35.6
 Var 0.1 0.1
 Norm 26.4 43.5
 Rate 1.0 1.0



Method:		Site:	
Limits		Left Foot Dorsal medial	
Date:	Time:	Physician:	
3/Jan/2000	13:33:55		

Mod COLD SEN. WARM SEN.
 Del 14.0 17.3
 Rslt 18.0 49.3
 Var 0.1 0.3
 Norm 26.3 43.6
 Rate 1.0 1.0



Soubor

Do souboru bylo zařazeno 50 zdravých dobrovolníků (25 žen, 25 mužů) průměrný věk $44,2 \pm 11,9$ let (rozmezí 20–74 let), z toho 19 osob bylo mladších 40 let, 31 osob starších do 40 let. Vylučujícím kritériem zařazení do souboru byly:

- anamnestické či klinické známky difuzního postižení periferního nervového systému,
- známky léze centrálního nervového systému, které by mohly vést k poruše citivosti ve vyšetřované oblasti či užívání medikace, ovlivňující pozornost a soustředění pacienta,
- přítomnost některého z rizikových faktorů, vedoucího potenciálně k periferně neurogenní lézi – tedy zejména diabetu mellitu, chronického abuzu ethanolu, hepatopatie, nefropatie či zánětlivého onemocnění pojiva.

Metodika

Všichni jedinci zařazení do souboru byli podrobně klinicky a anamnesticky vyšetřeni se zaměřením na přítomnost vylučujících kritérií uvedených výše a dále u nich bylo provedeno detailní vyšetření termického čítí pomocí elektrodiagnostické jednotky Nicolet Viking IV a termosondy a softwaru Thermal Sensory Analyser 2001 firmy Medoc. Z řady algoritmů, které uvedené software nabízí, byly v korelaci s literárními údaji (7–10, 12) vybrány následující algoritmy: 2 metody používající reakční čas (metoda Limity a její randomizovaná varianta Limity 2) a 1 metoda konstantního stimulu (Úrovně).

U nerandomizované (NR) varianty metody Limity jsou aplikovány 4 podněty dané tepelné modalitě a práh je určen jako průměrná hodnota z těchto 4 pokusů (obr. 1a, b).

Randomizovanou (R) variantou je metoda Limity 2, při níž se teplé a chladné podněty náhodně střídají, a úkolem pacienta je

Obr. 1a, b. Ukázka protokolu vyšetření TAP nerandomizovanou variantou metody reakčního času (Limity NR).

Každý ze sloupců grafu představuje jeden aplikovaný podnět, výška sloupce odpovídá teplotě, při níž subjekt daný stimulus percipoval – čím nižší jsou tedy jednotlivé sloupce, tím lépe vyšetřovaný subjekt vnímá danou tepelnou modalitu. Horizontální linie uprostřed sloupcového grafu představuje neutrální adaptační teplotu 32 °C, sloupce pod touto linií odpovídají chladným podnětům, sloupce nad linií naopak podnětům teplým. Zleva doprava jsou graficky zobrazeny naměřené individuální hodnoty prahu pro vnímání chladu (CS) a tepla (WS) ve °C, pro každou modalitu jsou aplikovány vždy 4 podněty, jejichž průměr je brán jako termický práh. V horní části obrázku jsou pak u každé modalitě na jednotlivých řádcích uvedeny:

- hodnoty absolutního rozdílu vypočítaného průměrného prahu oproti neutrální teplotě 32 °C („Del“);
- absolutní hodnota prahu v °C vypočtená jako průměrná hodnota ze 4 naměřených hodnot („Rslt“);
- variabilita 4 naměřených hodnot (optimálně $\leq 0,3$) („Var“);
- hodnota normálního prahu, udávaná výrobcem („Norm“); hodnota normálního limitu je rovněž vyjádřena graficky formou horizontální linie nad či pod vertikálním sloupcovým grafem znázorňujícím naměřené individuální hodnoty.

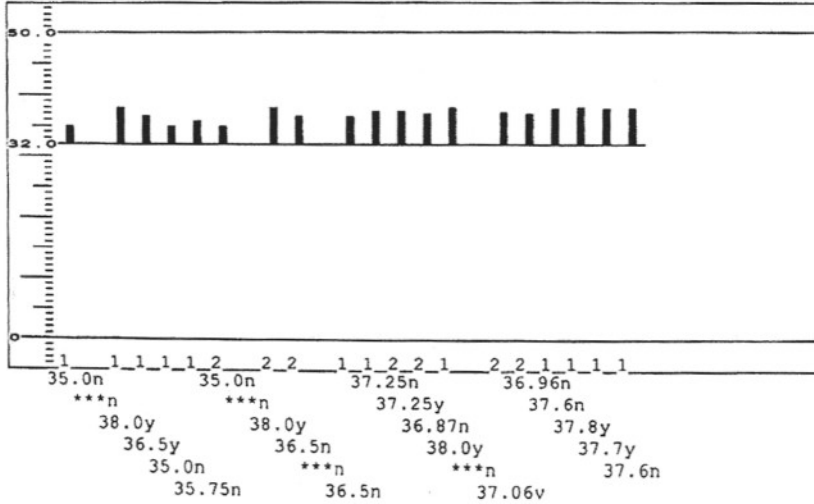
Obr. 1a je ukázkou optimálního výsledku při vyšetření zdravého jedince, výsledek testu uvedeného na obrázku 1b je abnormální s překročením limitních hodnot termického prahu pro obě tepelné modalitě.

kromě stanovení okamžiku percepce určit tepelnou modalitu.

Metoda Úrovně je randomizovanou variantou metody konstantního stimulu kombinující 2 nezávislé sekvence podnětů se zařazením slepých podnětů. U této metody má iniciální stimulus předem určenou intenzitu, intenzita následujícího podnětu je pak buď dvojnásobná (je-li odpověď na předcházející stimulus záporná), nebo poloviční (v případě kladné odpovědi). Velikost změny mezi následnými podněty se tak po kladné odpovědi vždy

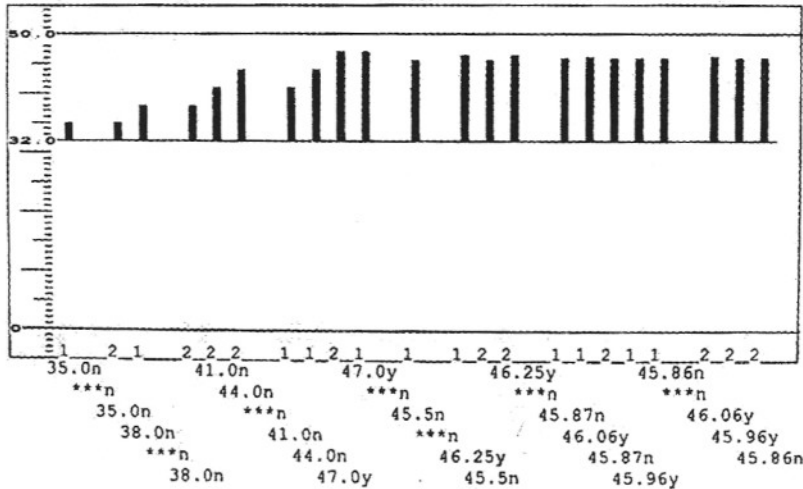
Method:		Site:	
Levels		Right Foot Dorsal medial	
Date:	Time:	Physician:	Examiner:
25/Dec/1999	15: 2:16		

Adaptation temperature: 32.0
Rate: 1.0, Steps: 3.0, 0.1
Normal: 41.1
Turns: 1
Avg: 37.3, Var: 0.1
Thresholds: 1) 37.7 2) 37.0



Method:		Site:	
Levels		Right Foot Dorsal medial	
Date:	Time:	Physician:	Examiner:
17/Jan/2000	15:35:59		

Adaptation temperature: 32.0
Rate: 1.0, Steps: 3.0, 0.1
Turns: 1
Avg: 45.9, Var: 0.0
Thresholds: 1) 45.9 2) 45.9



Obr. 2. Ukázka protokolu vyšetření TAP metodou konstantního stimulu (Úrovně) pro teplé podněty. Graficky jsou znázorněny aplikované podněty ve formě jednotlivých sloupců sloupcového grafu. V dolní části obrázku je teplota jednotlivých stimulů uvedena numericky. Mezery v jinak pravidelném sloupcovém grafu představují tzv. nulové neboli slepé podněty. V horní části obrázku jsou u obou modalit na jednotlivých řádcích uvedeny:

- Normální hodnota prahu („Normal“).
- Hodnoty průměrného prahu v 1. a 2. sekvenci („Thresholds“) a průměr těchto dvou průměrných hodnot („Avg“).

Zobrazen je opět optimální výsledek testu (2a) ve srovnání s abnormálním protokolem (2b).

Podrobný popis grafické podoby protokolu viz obrázek 1.

sníží na polovinu. Test je ukončen při poklesu změny na předem určenou úroveň, průměr poslední odpovědi „ano“ a „ne“ představuje práh (obr. 2).

Všemi testy byl stanoven práh termického čítí pro teplo i chlad, a to na horní i dolní končetině, termosonda byla konstantně umístěna na thenaru levé ruky a dorzu pravé nohy (v oblasti nad m. extensor digitorum brevis). Rychlost vzestupu teploty stimulu byla ve všech testech 1 stupeň za sekundu.

Vyšetření bylo prováděno v tichém, klidném prostředí a při maximálním pohodlí pro vyšetřovaný subjekt, tak aby byla co nejméně narušena schopnost jeho koncentrace. Před provedením každého testu byli vyšetřovaní jedinci vždy podrobně instruuováni.

Statistické zpracování bylo provedeno pomocí softwaru Statistica 6.0 firmy Statsoft. Normální distribuce hodnot byla testována pomocí testů χ^2 -kvadrát a Kolmogorof-Smirnov. Ke zviditelnění rozložení hodnot byla použita robustní sumární statistika (medián, kvantily). Stanovení korelací a rozdílů mezi jednotlivými testy bylo provedeno pomocí neparametrických statistických testů.

Výsledky

Hodnoty termického prahu neměly ve většině provedených testů normální distribuci, soubor tedy nespĺňuje kritéria pro práci s normálním rozložením jako modelem.

Na základě zjištěných hodnot termického prahu jsme stanovili normální limity prahu pro jednotlivé testy na úrovni 95. percentilu hodnot termického prahu pro teplo a 5. percentilu v testech pro chlad (tab. 1). Pro všechny testy byly hodnoty prahu na horních končetinách statisticky vysoce významně blíže indiferentní teplotě než na končetinách dolních ($p < 0,001$).

Prahy zjištěné MKS byly ve srovnání s MRČ pro obě lokalizace termosondy a pro obě tepelné kvality vždy blíže neutrální teplotě (tedy práh pro teplo byl nižší a práh pro chlad vyšší). Tyto rozdíly byly pro všechny testy obou tepelných modalit na HKK i DKK vysoce statisticky významné ($p < 0,001$).

Rozdíly hodnot termického prahu stanoveného pomocí randomizované a nerandomizované varianty MRČ nebyly na HKK statisticky významné, na DKK byly prahey stanovené nerandomizovanou metodou obecně blíže neutrální teplotě, rozdíly však nepřekročily jednaprocentní hladinu statistické významnosti (pro CS $p = 0,03$, pro WS $p = 0,01$).

Hodnoty termického prahu pro teplo byly u žen nižší a hodnoty pro chlad vyšší než u mužů. Tyto rozdíly byly statisticky významné ve všech testech na HKK (kromě testu Úrovně pro teplo, $p = 0,14$) i DKK (s výjimkou randomizované varianty testu Limity pro chlad a testu Úrovně pro teplo, $p = 0,06$).

Statisticky signifikantní vliv věku na hodnoty termického prahu se naopak ve většině testů prokázat nepodařilo, přestože ve všech provedených testech byl přítomen očekávaný trend zvýšení hodnoty prahu s věkem. U mužů jsme významnou korelaci prokázali pouze u nerandomizované varianty metody Limity pro teplo na DKK ($p = 0,001$), kde se také významně

Tab. 1. Normální limity vyšetření TAP.

Test	Normální limit* vyjádřený jako absolutní teplota v °C (rozdíl vůči adaptační teplotě 32 °C)	
	Muži	Ženy
HKK: Limity CS NR	28,4 (– 3,6)	29,0 (– 3,0)
Limity CS R	29,1 (– 2,9)	29,9 (– 2,1)
Úrovně CS	30,6 (– 1,4)	30,9 (– 1,1)
Limity WS NR	35,9 (+ 3,9)	35,8 (+ 3,8)
Limity WS R	34,9 (+ 2,9)	34,8 (+ 2,8)
Úrovně WS	33,9 (+1,9)	33,8 (+ 1,8)
DKK: Limity CS NR	25,2 (– 6,8)	27,5 (– 4,5)
Limity CS R	23,8 (– 8,2)	25,4 (– 6,6)
Úrovně CS	27,3 (– 4,7)	27,4 (– 4,6)
Limity WS NR	42,5 (+ 10,5)	41,9 (+ 9,9)
Limity WS R	43,7 (+ 11,7)	40,9 (+ 8,9)
Úrovně WS	40,05 (+ 8,05)	39,0 (+ 7,0)

TAP – vyšetření termického a algického prahu, WS („warm sensation“) – test pro teplo, CS („cold sensation“) – test pro chlad, R – randomizovaná varianta testu, NR – nerandomizovaná varianta testu.

* Normální limit je stanoven jako 95. percentil individuálních hodnot prahu v testech pro teplo a 5. percentil v testech pro chlad.

lišila hodnota termického prahu ve skupině jedinců do a nad 40 let. U žen s věkem významně korelovaly prahey zjištěné všemi metodami hodnotícími práh pro teplo na HKK ($p = 0,0001–0,02$) a dále randomizovaná varianta metody Limity pro chlad na DKK ($p = 0,01$). V ostatních testech byl u obou pohlaví zaznamenán trend nárůstu hodnot termického prahu pro teplo a jeho poklesu v testech pro chlad s rostoucím věkem na hranici statistické významnosti.

Testy reakčního času byly na horních i dolních končetinách významně kratší ve srovnání s metodami konstantního stimulu ($p < 0,001$), v rámci MRČ je pak randomizovaná varianta časově náročnější oproti variantě nerandomizované ($p = 0,006$ na HKK, $P < 0,001$ na DKK). Pro obě skupiny testů a tedy i pro celkovou dobu vyšetření pak bylo vyšetření na horní končetině vždy méně časově náročné ve srovnání s končetinou dolní ($p < 0,001$) (tab. 2).

Diskuse

I při standardizaci testovacích podmínek včetně způsobu instruování vyšetřovaných subjektů existuje řada faktorů, které mohou ovlivnit zjištěnou hodnotu termického prahu. Jde jak o parametry vlastního testovacího algoritmu – hodnota adaptační teploty, typ provedení testu (7–10, 13, 14), rychlost růstu teploty (9, 13, 15), lokalizace termosondy (9, 13, 14, 16)

Tab. 2. Trvání jednotlivých testů.

Test	Medián (maximum) trvání na HKK v minutách	Medián (maximum) trvání na DKK v minutách
Limity NR*	1,5 (3)	2,0 (6)
Limity R	2,0 (5)	2,5 (7)
Úrovně CS	4,0 (8)	4,25 (10)
Úrovně WS	4,0 (8)	5,25 (12)
Celkové trvání vyšetření	11,5 (19)	15,25 (27)

* Metody reakčního času kombinují v 1 testu teplé i chladné podněty, proto je pro tyto metody uvedena v tabulce pouze 1 hodnota v níž je zahrnuto vyšetření termického prahu pro teplo i chlad. V testu konstantního stimulu je naopak vyšetřována vždy jedna z obou tepelných modalit.

a její velikost (9), tak také o podmínky prostředí, v němž testování probíhá. Vzhledem k tomu, že uvedené charakteristiky testování se mezi jednotlivými laboratořemi liší a v rámci dostupné literatury není řada parametrů u některých studií vůbec uvedena, nelze jednoduchým způsobem převzít normální limity stanovené v rámci studie prováděné jinou laboratoří, aniž by podmínky vyšetření byly zcela identické. Proto jsme stanovili vlastní normální limity hodnot termického prahu platné pro vybrané parametry.

Hodnoty termického prahu se liší pro různé lokalizace termosondy, což lze vysvětlit rozdílnou prostorovou distribucí a hustotou receptorů, odlišnou tloušťkou vmezežené tkáňové vrstvy a pravděpodobně také rozdíly v přenosu impulzu a jeho centrálním zpracování (13). Obecně jsou nejnižší hodnoty prahu zjišťovány v oblasti tváře, lehce vyšší na HKK a nejvyšší na DKK (9, 13, 16). V souladu s těmito poznatky jsme v naší studii našli významné rozdíly termických prahů mezi HKK a DKK ve všech provedených testech, na základě těchto hodnot byly pak pro obě lokalizace termosondy stanoveny odlišné normální limity.

Prahy zjištěné metodami reakčního času byly vždy významně vyšší ve srovnání s hodnotami prahu stanovenými metodami konstantního stimulu. Příčinou uvedeného jevu je závislost hodnoty prahu zjištěné MRČ na reakční době, která u metod konstantního stimulu odpadá. Obdobné rozdíly hodnot prahů mezi jednotlivými algoritmy pro identické rychlosti růstu teploty podnětu uvádějí i další autoři (7–9). Tyto rozdíly vedou k nutnosti oddělených normálních limitů prahu pro obě metody, zatímco absence významných rozdílů mezi randomizovanou a nerandomizovanou variantou MRČ umožňuje použití identických norem pro obě varianty testu.

Variabilní literární údaje jsou k dispozici také o vlivu pohlaví na hodnotu termického prahu. V naší studii byly hodnoty prahu u žen téměř ve všech testech významně blíže neutrální adaptační teplotě (tedy senzitivita pro termické podněty je u žen pravděpodobně

lepší než u mužů), což dokazuje potřebu odlišných normativních dat pro obě pohlaví. Obdobné rozdíly v hodnotách termického prahu mezi pohlavími našel také Doeland (17), trend bez statistické významnosti byl prokázán i v dalších studiích (14). Naopak řada autorů vliv pohlaví na hodnotu prahu neprokazuje (7, 18, 19).

S ohledem na psychofyzikální charakter metody lze předpokládat mírný vzestup hodnot termického prahu se vzrůstajícím věkem (10, 13), neboť ve vyšším věku může být snížena pozornost a koncentrace pacientů a také zpomalena jejich reaktivita a s ní související prolongace reakčního času. Přestože někteří autoři našli předpokládanou korelaci prahů s věkem (17, 18), řada studií statisticky významný vliv věku na hodnoty termického prahu neprokazuje (13, 14, 19) nebo jej připouští pouze pro některé parametry a lokalizace (20). V žádné z publikovaných studií není uveden rozdílný vliv věku u mužů a žen ani odlišné ovlivnění percepce jednotlivých tepelných modalit. V našem souboru jsme ve většině testů také neprokázali statisticky významnou korelaci hodnot termického prahu s věkem, očekávaný trend zvýšení prahu ve vyšších věkových skupinách byl však patrný prakticky ve všech provedených testech. Hodnoty termického prahu s věkem lehce narůstaly zejména u žen, a to více v testech hodnotících prah pro vnímání tepla. K definitivnímu posouzení vlivu tohoto parametru je tedy vhodné ověřit uvedený trend vyšetřením rozsáhlejšího souboru, zaměřeného zejména na vyšší věkové skupiny pacientů. V případě potvrzení trendu by pak pro testy s prokázaným významným rozdílem bylo nutno používat odlišné limity pro jednotlivé věkové skupiny, a to především u žen, u nichž byly nalezené rozdíly v závislosti na věku vyšší.

Z praktického hlediska je při výběru algoritmů nutno přihlížet také k časové náročnosti jednotlivých metod. Testy reakčního času byly v obou vyšetřených lokalizacích významně kratší než metody konstantního stimulu, obdobné výsledky prokázali i další autoři (7–9, 21). Dlouhé trvání testu může způsobit pokles koncentrace vyšetřovaného subjektu a jeho zvýšenou unavitelnost a může tedy vést ke zkreslení výsledných hodnot termického prahu. Z hlediska časové náročnosti je tedy výhodnější použití metod reakčního času.

Metody konstantního stimulu jsou časově náročnější a kladou také větší nároky na spolupráci vyšetřovaného subjektu. Jimi zjištěný prah se však více blíží reálné hodnotě termického prahu a lze je proto považovat za přesnější. Jako vhodný kompromis mezi náročností a spolehlivostí testů se tedy prozatím jeví použití kombinace jednoho testu z každé z obou skupin algoritmů, v případě diskrepance mezi výsledky obou metod doplněné dalšími testy.

Práce je podporována grantem Interní grantové agentury Fakultní nemocnice Brno-Bohunice č. 15/2000.

Výsledky studie byly částečně prezentovány ve formě přednášky na 48. Společném sjezdu slovenské a české společnosti pro klinickou neurofyzilogii v Nových Zámcích, 25.–27. 10. 2001.

Literatura

1. Kakigi R, Shibasaki H, Tanaka K, Ikeda T, Oda K, Endo C, et al. CO₂ laser-induced pain-related somatosensory evoked potentials in peripheral neuropathies: correlation between electrophysiological and histopathological findings. *Muscle Nerve* 1991;14(5):441–50.
2. Fruhstorfer H, Lindblom U, Schmidt WC. Method for quantitative estimation of thermal thresholds in patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1976;39(11):1071–5.
3. Dyck PJ, Zimmerman JR, O'Brien PC. Introduction of autonomic systems to evaluate touch, pressure, vibration and thermal cutaneous sensation in man. *Ann Neurol* 1978;4:502–10.
4. Jamal GA, Weir AI, Hansen S, Ballantyne JP. An improved automated method for the measurement of thermal threshold. 2. Patients with peripheral neuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1985;48:361–6.
5. Angus-Leppan H, Burke D. The function of large and small nerve fibers in renal failure. *Muscle Nerve* 1992;15(3):288–94.
6. Yarnitski D, Sprecher E, Tamir A, Zaslansky R, Hemli JA. Variance of sensory threshold measurements: discrimination of feigners from trustworthy performers. *J Neurol Sci* 1994;125:189–1996.
7. Claus D, Hilz MJ, Neundorfer B. Thermal discrimination thresholds: a comparison of different methods. *Acta Neurol Scand* 1990;81(6):533–40.
8. Dyck PJ, O'Brien PC, Kosanke JL, Gillen DA, Karnes JL. A 4,2, and 1 stepping algorithm for quick and accurate estimation of cutaneous sensation threshold. *Neurology* 1993; 43:1508–12.
9. Dyck PJ, Zimmerman I, Gillen DA, Johnson D, Karnes JL, O'Brien PC. Cool, warm, and heat-pain detection thresholds: testing methods and inferences about anatomic distribution of receptors. *Neurology* 1993;43(8):1500–8.
10. Yarnitsky D. Quantitative sensory testing. *Muscle Nerve* 1997;20(2):198–204.
11. Smith SJ, Ali Z, Fowler CJ. Cutaneous thermal thresholds in patients with painful burning feet. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1991;54:877–81.
12. Quantitative sensory testing: a consensus report from the Peripheral Neuropathy Association. *Neurology* 1993;43(5):1050–2.
13. Claus D, Hilz MJ, Hummer I, Neundorfer B. Methods of measurement of thermal thresholds. *Acta Neurol Scand* 1987;76(4):288–96.
14. Navarro X, Kennedy WR. Evaluation of thermal and pain sensitivity in type I diabetic patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1991;54(1):60–4.
15. Hilz MJ, Zimmermann P, Claus D, Neundorfer B. Thermal threshold determination in alcoholic polyneuropathy: an improvement of diagnosis. *Acta Neurol Scand* 1995;91(5):389–93.
16. Hagander LG, Midani HA, Kuskowski MA, Parry GJ. Quantitative sensory testing: effect of site and skin temperature on thermal thresholds. *Clin Neurophysiol* 2000;111(1):17–22.
17. Doeland HJ, Nauta JJ, van Zandbergen JB, van der Eerden HA, van Diemen NG, Bertelsmann FW, et al. The relationship of cold and warmth cutaneous sensation to age and gender. *Muscle Nerve* 1989;12(9):712–5.
18. de Neeling JN, Beks PJ, Bertelsmann FW, Heine RJ, Bouter LM. Sensory thresholds in older adults: reproducibility and reference values. *Muscle Nerve* 1994; 17(4):454–61.
19. Gelber DA, Pfeifer MA, Broadstone VL, Munster EW, Peterson M, Arezzo JC, et al. Components of variance for vibratory and thermal threshold testing in normal and diabetic subjects. *J Diabetes Complications* 1995; 9(3):170–6.
20. Bravenboer B, van Dam PS, Hop J, vd Steenhoven J, Erkelens DW. Thermal threshold testing for the assessment of small fibre dysfunction: normal values and reproducibility. *Diabet Med* 1992;9(6):546–9.
21. Yarnitsky D, Sprecher E. Thermal testing: normative data and repeatability for various test algorithms. *J Neurol Sci* 1994;125(1):39–45.

Nabídno 29. 7. 2002

Přijato v definitivní verzi 18. 12. 2002

MUDr. E. Moravcová
Neurologická klinika FN Brno
Jihlavská 20
625 00 Brno
e-mail: emoravcova@fnbrno.cz

2. *Moravcová E, Bednařík J, Feit J, Sommer C. Hodnocení intraepidermální hustoty tenkých nervových vláken z kožní biopsie u pacientů s polyneuropatií. Cesk Slov Neurol N 2005a; 68/101: 219-226. IF: 0,070.*

Práce je zaměřena na hodnocení intraepidermální hustoty tenkých nervových vláken (IENFD) z kožní biopsie jako zcela klíčovou diagnostickou metodu neuropatie tenkých vláken (SFN), resp. bolestivých neuropatií obecně. V diagnostice SFN představuje metoda v současnosti zlatý standard, je však využívána také u polyneuropatií s kombinovaným postižením vláken tenkých a silných či pacientů s postherpetickou neuralgií a nově také u některých neurodegenerativních onemocnění.

V současném diagnosticko-klasifikačním schématu je kožní biopsie s hodnocením IENFD jednou z objektivních metod, umožňujících potvrzení postižení somatosenzitivního nervového systému u pacientů s neuropatií tenkých vláken či postherpetickou neuralgií. U těchto jednotek tak metoda představuje podklad pro stanovení diagnózy „jisté (definitivní) neuropatické bolesti“.

Komentovaná práce byla první publikací zaměřenou na problematiku kožních biopsií v rámci ČR. Prokázala vysoce signifikantní rozdíly v počtu IENFD mezi zdravými kontrolami a pacienty s neuropatií tenkých nervových vláken a poskytla (v té době dosud nepublikovaná) normativní data pro imunofluorescenční hodnocení IENFD. Při použití těchto dat metoda prokázala uspokojivou využitelnost v diagnostice neuropatie tenkých vláken, i když se její senzitivita jeví nižší ve srovnání s TTT.

Normativní data, derivovaná v rámci této studie, byla následně využívána v řadě dalších publikovaných studií (např. *Vlčková-Moravcová et al. 2008, Vlčková-Moravcová et al. 2008 a, Vlčková-Moravcová a Bednařík 2009, Bednařík et al. 2009*).

Hodnocení intraepidermální hustoty tenkých nervových vláken z kožní biopsie u pacientů s polyneuropatií

Moravcová E.¹, Bednařík J.¹, Feit J.², Sommer C.³

¹Neurologická klinika LF MU a FN Brno, ²II. patologicko-anatomický ústav LF MU a FN Brno,

³Neurologische Universitätsklinik Würzburg, Germany

Souhrn

Diagnostika polyneuropatie tenkých nervových vláken (NTV) je v současnosti založena na přítomnosti pozitivních subjektivních senzitivních symptomů a abnormálního nálezu testování termického prahu (TTT). Histologickým korelátém postižení tenkých nervových vláken je redukce intraepidermální inervace, resp. její morfologické abnormality. Nově zaváděnou metodou diagnostiky NTV je kvantifikace intraepidermální hustoty tenkých nervových vláken pomocí kožní biopsie. Cílem práce bylo zavedení metody kožní biopsie, stanovení normativních dat a korelace s nálezy TTT v souboru nemocných s NTV. Kožní biopsie průbojníkem z oblasti distálního lýtka byla provedena u 17 zdravých kontrol a 76 pacientů s NTV. Intraepidermální tenká nervová vlákna byla vizualizována pomocí nepřímé imunofluorescence s použitím rhodaminem značených protilátek proti panneuronálnímu markeru PGP 9.5. Průměrný počet nervových vláken na mm epidermis byl ve skupině zdravých dobrovolníků významně vyšší oproti pacientům s NTV ($11,54 \pm 2,87$ oproti $5,98 \pm 3,81$, $p < 0,0001$). Z hodnot zjištěných ve skupině zdravých dobrovolníků byl stanoven dolní normální limit počtu tenkých nervových vláken na úrovni 6,69/mm epidermis. Redukce počtu intraepidermálních nervových vláken byla prokázána u 69 % pacientů s klinicky a elektrofyziologicky definovanou NTV. Abnormity kožní biopsie odrážejí strukturální postižení tenkých nervových vláken a jsou vhodnou metodou k verifikaci diagnózy NTV založené na subjektivních symptomech a nálezech TTT. Vzhledem k nižší senzitivitě (ve srovnání s TTT) a invazivnímu charakteru je kožní biopsie méně vhodná jako screeningová metoda. Vyšší senzitivita TTT (pravděpodobně podmíněná schopností TTT reflektovat abnormální funkci tenkých nervových vláken dříve než se rozvinou signifikantní strukturální změny) spolu s neinvazivním charakterem předurčuje tuto metodu k použití při screeningu NTV.

Klíčová slova: neuropatie tenkých vláken, kožní biopsie, testování termického prahu, intraepidermální nervová vlákna, protein genový produkt 9.5

Summary

Moravcová E., Bednařík J., Feit J., Sommer C.: The Intraepidermal Nerve Fibers Density Assessment in Skin Biopsies in Polyneuropathy patients

The diagnosis of small fiber neuropathy (SFN) is currently based on the presence of positive sensory symptoms and abnormal findings in thermal threshold testing (TTT). Decreased density of intraepidermal innervation (or its structural abnormalities) seems to be a morphological correlate of small fiber dysfunction. Therefore, the assessment of intraepidermal nerve fibers (IENFs) density in skin punch biopsies as a new method for SFN diagnosis is introduced in this study. The aim of this work was to adopt a method of skin biopsy, to establish the reference values of IENFs density, and to correlate the skin biopsy results with TTT findings in a group of SFN patients. Methods: Skin punch biopsies were obtained from the distal calf of 17 healthy individuals and 76 SFN patients. IENFs were stained with antibodies to panneuronal marker PGP 9.5. The correlation between the skin biopsy findings and TTT results was calculated. Mean IENFs density was significantly higher in healthy volunteers if compared with SFN patients. Intraepidermal nerve fibers counts per millimeter of epidermis were $11,54 \pm 2,87$ (mean \pm SD) and $5,98 \pm 3,81$, respectively ($p < 0,0001$). The reference value for IENFs density was calculated from the healthy volunteers findings and set at a value of 6.69 fibers per millimeter of epidermis (95. percentile). Using this normal limit, decreased intraepidermal nerve fibers density was found in 69% SFN patients. Skin biopsies reflect the structural changes of small sensory fibers and prove to be useful in the algorithm of SFN diagnosis, based on subjective sensitive symptoms and abnormal TTT findings at present. With respect to lower sensitivity (compared to TTT) and invasiveness of this method, the application of skin biopsy as a screening method is not convenient. Higher

sensitivity of TTT (probably caused by the ability of TTT to reflect abnormal small fiber neuropathy function before the development of structural changes) together with its noninvasive character predetermine this method for the small fiber neuropathy screening.

Key words: small fiber neuropathy, skin biopsy, thermal threshold testing, intraepidermal nerve fibers, protein gene product 9.5

Úvod

Periferní neuropatie mohou predilekčně či výhradně postihovat tenká, málo myelinizovaná a nemyelinizovaná nervová vlákna typu A-delta a C, a to vlákna somatická zprostředkující percepci tepelných modalit a bolestí, i vlákna autonomní. Postižení somatických vláken je označováno jako neuropatie tenkých vláken (NTV) a klinicky se manifestuje pozitivními senzitivními symptomy charakteru bolestí, parestezií, pálení či dysestezií lokalizovanými predilekčně distálně na dolních eventuálně i horních končetinách. Postižení autonomních a somatických tenkých vláken bývá často asociováno, u části pacientů s NTV však nemusí být autonomní vlákna postižena. Pokud nejsou současně postižena myelinizovaná (silná) vlákna, vykazují pacienti s izolovaným postižením tenkých nervových vláken jen minimální abnormality při klinickém neurologickém vyšetření a normální nálezy kondukčních studií i jehlové EMG. Základní diagnostickou metodou při evaluaci funkce somatických tenkých nervových vláken je v současnosti kvantitativní testování termického prahu (thermal threshold testing - TTT) (1, 2). Jedná se senzitivní a reprodukovatelnou metodu (2), jejíž užití je však vzhledem k psychofyzikálnímu charakteru testu u části pacientů limitováno.

V posledních deseti letech se objevily studie prokazující, že u pacientů s bolestivou neuropatií lze detekovat signifikantní změny kožní inervace korelující s přítomností, případně i klinickou tíží postižení tenkých nervových vláken (3, 4). Proto je do diagnostiky NTV zaváděna metodika hodnocení hustoty intraepidermálních nervových vláken (intraepidermal nerve fibers, IENF) pomocí kožní biopsie (5).

O existenci nervových vláken v epidermis se zmiňuje již Langerhans před více než 130 lety (6). Arthur a Shelley později publikovali ilustrace intraepidermálních nervových vláken obarvených pomocí methylenové modři a popsali jejich bohaté větvení při průběhu epidermis (7). Přesto byla při užívání klasických histologických technik epidermální nervová vlákna jen velmi obtížně vizualizovatelná a inervace epidermis byla považována za velmi řídkou či téměř neexistující a nebyl jí přikládán funkční význam (8). Tradiční představa kožní inervace tedy zahrnovala především dvě nervové pleteně v oblasti dermis a to ve stratum reticulare a povrchověji lokalizovaném stratum papillare.

Zásadní změnu uvedené představy znamenal až rozvoj imunohistologických technik s možností vizualizace řady neuronálních markerů. Pomocí těchto metod bylo umožněno zobrazení velkého počtu nervových vláken,

penetrujících přes bazální membránu až do povrchových vrstev epidermis a to jak u zvířecích modelů, tak v biopsických vzorcích lidské kůže (9, 10). Iniciálně byly k barvení epidermálních nervových vláken využívány protilátky proti známým antigenům nervových buněk, jako např. substanci P (11), neurofilamentům (12), CGRP (calcitonin-gene related peptide) (11, 13), VIP (vasoaktivnímu intestinálnímu peptidu) (14), či NSE (neurospecifické enoláze) (12). Uvedené neuronální markery však nejsou ubikvitární a umožňují zobrazení pouze určitých populací nervových vláken. Významným přínosem pro možnosti klinického i experimentálního využití vyšetření kožní inervace byl proto objev panneuronálního markeru označovaného jako protein gene product 9.5 (PGP 9.5) (13, 15). Jedná se o cytoplazmatický protein, enzym karboxy-hydrolázu, vyskytující se prakticky ve všech neuronech, jejich výběžcích a také neuroendokrinních buňkách (13, 15). Ve srovnání s dříve užívanými markery, jako jsou neurofilamenta nebo NSE, lze prostřednictvím protilátek proti PGP 9.5 vizualizovat daleko více nervových vláken v oblasti epidermis i dermis (12, 16).

Imunohistologické metody využívající protilátky proti PGP 9.5 tedy prokázaly, že kůže je orgánem s poměrně bohatým nervovým zásobením. Největší hustota nervových vláken je v retikulární a subpapilární dermis, kde tvoří husté nervové pleteně, a dále v epidermis (16). Vlákna v subpapilární vrstvě dermis leží většinou paralelně s povrchem kůže ve svazcích (bundles) a inervují specializované orgány v dermis a jejich papilách (Meissnerova tělíska, Merkelovy disky a vlasové folikuly). Část těchto vláken zatáčí směrem k povrchu kůže, proráží dermo-epidermální junkci a vstupuje do epidermis. Nejpozději v místě průchodu přes bazální membránu epidermis ztrácí nervová vlákna myelinový obal, takže v oblasti pokožky jsou již všechna vlákna nemyelinizovaná (16). V epidermis vlákna prorůstají mezi keratinocyty k povrchu kůže ve směru kolmém k dermo-epidermální junkci. V oblasti mezi stratum corneum a hlubšími vrstvami pokožky část vláken opět změni směr a dále probíhají paralelně s povrchem kůže pod její rohovou vrstvou. Řada vláken dosahuje až ke stratum corneum (9, 10), resp. krátce probíhá i v této vrstvě kde obvykle končí volným, cibulovitě rozšířeným zakončením. V průběhu celou epidermis dokonce až k terminálním zakončením vláken dochází k jejich častému větvení (16) (obr. 1).

Počet intraepidermálních nervových vláken významně závisí na lokalizaci. U zdravých jedinců je nejvyšší v oblasti trupu a proximálně na končetinách a signifikantně klesá směrem distálním (5, 17). Nejčastějším místem odběru kožních biopsií je distální lýtko v oblasti nad maleolus lateralis. Průměrný počet IENFs v této

Tab. 1. Průměrný počet IENF u zdravých jedinců v oblasti distálního lýtky asi 10 cm nad maleolus lateralis v některých publikovaných studiích. Ve všech případech se jednalo o zpracování zmrazených řezů o síle 40-50 mm barvených prostřednictvím nepřímé imunofluorescence využívající protilátky proti PGP-9.5 s drobnými varietami konkrétního histologického postupu.

Studie	N (*)	x (†)	SD (§)	ND (§)	Poznámky
McArthur	98	13,8	6,7	3,8	
Herrmann	10	14,7	4,86		
Holland	20	16,3			SD neuvedena
Chien	55	12,9	5,3	4,46	
Hirai	12	11,9	3,2		
McCarthy	7	17,84	3,03		
Lauria	5	11,29	0,89		Věk do 45 let
Lauria	5	10,63	1,53		Věk nad 70 let
Prezentovaná studie	17	11,54	2,87	6,69	

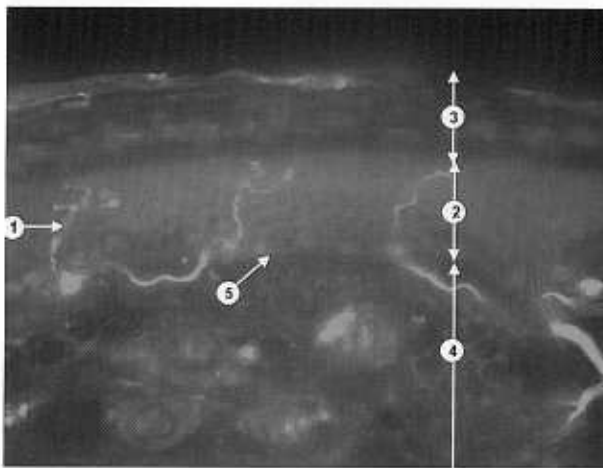
Legenda:

N (*) - počet jedinců zařazených do studie

x (†) - průměrný počet vláken na 1 milimetr epidermis

SD (§) - směrodatná odchylka počtu vláken

ND (§) - odvozená norma počtu vláken na 1 mm epidermis a to vždy na úrovni 5. percentilu (v ostatních studiích 5. percentil hodnot ani jinak odvozená norma neuvedeny)



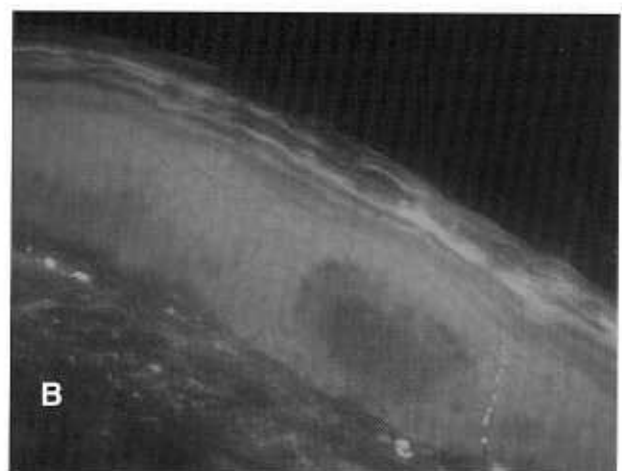
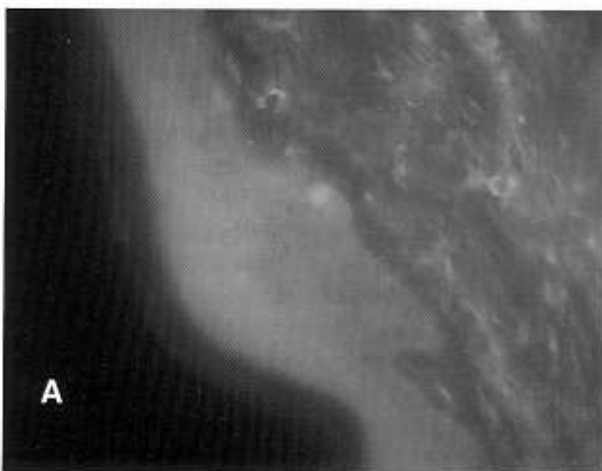
Obr. 1. Normální nález kožní biopsie u zdravého jedince (zvětšení 40x).

1. Intraepidermální nervové vlákno. 2. + 3. Epidermis (2. stratum basale, spinosum, granulosum a lucidum, 3. stratum corneum), 4. Dermis, 5. Dermo-epidermální junctce.

lokalizaci u zdravých jedinců v několika publikovaných studiích je uveden v tabulce 1.

Většina dosud provedených studií neprokázala významný vliv věku na hustotu intraepidermální inervace vyjma vyššího počtu IENFs u nejmladších jedinců (10-19 let) (17, 18). Obdobně nebyl prokázán vliv pohlaví, výšky, hmotnosti či rasy (18).

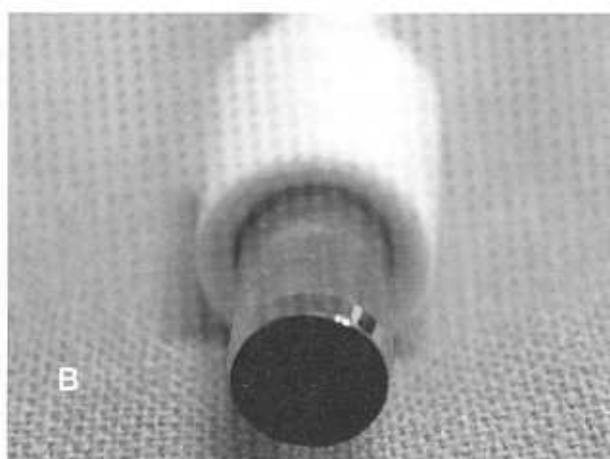
Spolehlivá možnost vizualizace intraepidermálních nervových vláken vedla v posledním desetiletí k rozšířenému využití kožních biopsií v experimentální praxi i v klinickém hodnocení pacientů s periferní neuropatií. Byly prokázány významné změny density epidermálních ev. dermálních nervových vláken u řady diagnostických jednotek, manifestujících se neuropatickou bolestí, především u diabetické senzitivní neuropatie (4, 11, 14, 19), polyneuropatie asociované s AIDS či aplikací antiretrovirových preparátů (16, 20), lepry (12), bolestivé neuropatie při Fabryho chorobě (21), postherpetické neuralgie (22) diabetické trunkální neuropatie (23) a také u idiopa-



Obr. 2. Abnormální nálezy kožní biopsie (zvětšení 40x).

2a) absence intraepidermálních vláken + redukce density subepidermálního plexu

2b) výrazná redukce počtu intraepidermálních vláken (zachyceno pouze jedno vlákno s patrnými „predegenerativními změnami“).



Obr. 3. Nástroj užívaný při odběru vzorků (průbojník) (3a) a detail jeho řezné hrany (3b).

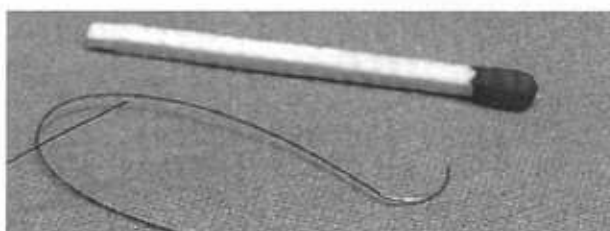
tické bolestivé senzitivní neuropatie (5). Až na některé recentní práce (5) se však většinou nejednalo o pacienty s izolovaným postižením tenkých nervových vláken.

Dominující abnormalitou prokazovanou v kožních biopsiích pacientů s bolestivými periferními neuropatiemi je redukce počtu nervových vláken procházejících přes dermoepidermální junkci na milimetr povrchu epidermis (3, 4, 16-18, 24) (obr. 2a,b). Tento parametr je nejlépe kvantifikovatelný a koreluje s přítomností a podle některých studií také s klinickou tíží postižení tenkých nervových vláken u neuropatických pacientů (3, 4). Méně často bývají popisovány další abnormality intraepidermální inervace, jako jsou změny celkové délky IENFs (4, 16), abnormální prostorová distribuce vláken (4), snížení denzity subepidermálního plexu (4, 16), redukce inervace kožních potních žláz (14, 16), či snížení nebo naopak zvýšení počtu větviček se intraepidermálních vláken a z něj odvozené parametry (např. poměr počtu IENF k počtu míst, kde dochází k jejich větvení – tzv. branching ratio) (4, 17). Řada popsanych parametrů vykazuje vzájemnou souvislost a většina z nich koreluje se základním hodnoceným markerem, tj. s počtem IENFs (4).

Cílem prezentované studie bylo zavést a ověřit správnost metodiky stanovení hustoty intraepidermálních nervových vláken pomocí kožní biopsie a stanovit normativní data vyšetřením kontrolního souboru zdravých dobrovolníků. Vyšetřením souboru nemocných s neuropatií tenkých vláken diagnostikovaných na základě klinického obrazu a abnormálního termického prahu pak stanovit senzitivitu kožní biopsie a korelovat její nálezy s výsledky TTT a tak optimalizovat diagnostický algoritmus u tohoto onemocnění.

Soubor

V rámci této studie byla provedena kožní biopsie u kontrolní skupiny 17 zdravých dobrovolníků (zaměstnanců kliniky nebo pacientů hospitalizovaných pro vertebrogenní obtíže či bolesti hlavy: 7 mužů, 10 žen, průměrný věk 51,61 let, rozmezí 32-76 let) a u 76 pacientů se senzitivní polyneuropatií (42 mužů, 34 žen, průměrný



Obr. 4. Atraumatické nevstřebatelné šití (srovnání velikosti jehly s běžnou zápalkou).

věk 57,82 let, rozmezí 25-78 let).

Vylučujícím kritériem zařazení do kontrolního souboru byly anamnestické či klinické známky difuzního postižení periferního nervového systému a přítomnost některého z rizikových faktorů, vedoucích potenciálně k periferně neurogenní lézi – tedy zejména diabetu mellitu, chronického abuzu etanolu, onkologických onemocnění, hepatopatie, nefropatie či zánětlivého onemocnění pojiva. Všichni jedinci zařazení do studie podepsali informovaný souhlas a jejich spolupráce nebyla honorována.

Všichni pacienti se senzitivní neuropatií měli abnormální TTT nález korelující s dysfunkcí tenkých nervových vláken a udávali pozitivní subjektivní senzitivní příznaky typu parestézií, pálení či bolestivých dysestézií predilekčně akrálně na dolních končetinách. Podskupina 36 pacientů měla současně postižení silných nervových vláken verifikované abnormálním výsledkem EMG vyšetření z DKK, ostatní měli EMG nález normální a jednalo se u nich tedy o polyneuropatii s izolovaným postižením tenkých nervových vláken.

Projekt byl schválen etickou komisí FN Brno.

Metodika

Odběr vzorku: U všech pacientů obou souborů byl proveden odběr kožní biopsie z oblasti distálního lýtka. U jedné pacientky byla současně provedena biopsie n. suralis a vzorek byl odebrán z okraje řezu při neurochirurgickém výkonu. Všichni ostatní měli odběr proveden pomocí průbojníku o průměru 4 či 5 mm (obr. 3a,b) vždy ve standard-

ni lokalizaci a to z distálního lýtka cca 10 cm nad pravým maleolus lateralis. Výkon byl prováděn za aseptických kautel v lokální infiltrační anestezii 1% mesocainem. Po odběru byla provedena sutura 1 stehem pomocí atraumatického nevstřebatelného šití (obr. 4), steh byl ponechán cca 10-14 dní a po zhojení jizvy extrahován.

Histologické zpracování: Bezprostředně po odběru byl vzorek nejprve fixován ve 4% paraformaldehydu ve fosfátovém pufru po dobu 2-4 hodin při teplotě 4 °C. Po trojnásobném vymytí ve 0,15 M fosfátovém pufru byla následně provedena kryoprotekce vzorku v 10% sacharóze ve fosfátovém pufru při teplotě 4 °C přes noc. Následující den byl ze vzorku vytvořen zmražený tkáňový bloček. Při dalším zpracování byl vzorek v kryostatu při teplotě -20 °C nařezán na 40 mm silné řezy, které byly umístěny na podložní sklička. Z každé biopsie byly vytvořeny nejméně 3 preparáty vždy s několika řezy. Jeden preparát sloužil po obarvení hematoxylinem-eosinem ke kontrole správné orientace vzorku, druhý procházel dalším histologickým zpracováním a imunofluorescenčním barvením a poslední byl dále uchovávan při teplotě -20 °C jako rezervní pro případ znehodnocení barveného preparátu.

Preparát určený k dalšímu histologickému zpracování byl po rozmrazení ponořen na 10 min. do 100% acetonu, vysušen a poté umístěn do vlhké komůrky, v níž byl na vzorky aplikován 10% bovinní sérový albumin ve fosfátovém pufru. Po 30 minut trvající inkubaci byl albumin odstraněn a na preparáty byla ihned aplikována primární protilátka (polyklonální králičí proti panneuronálnímu markeru PGP 9.5 - polyclonal rabbit anti human PGP 9.5 IgG firmy UltraClone) v ředění 1:800. Preparáty s primární protilátkou byly poté ponechány k inkubaci ve vlhké komůrce přes noc při pokojové teplotě. Následující den byly po trojnásobném vymytí fosfátovým pufrům s NaCl umístěny opět do vlhké komůrky, kde byly po aplikaci sekundární, fluorescenčně značené protilátky (myši proti králičím imunoglobulinům značené rhodaminem - TAR TRITC mouse anti rabbit IgG firmy Dianova) v ředění 1:100 ponechány po dobu 2 hodin. Po opětovném vymytí fosfátovým pufrům a aplikací fixačního roztoku (DABCO) byly preparáty překryty krycím sklem a dále skladovány v tmavém prostředí při teplotě -20 °C.

Mikroskopické hodnocení: Preparáty byly hodnoceny pomocí epifluorescenčního mikroskopu firmy Leica a to s užitím filtru N21 při 40násobném zvětšení. Na každém z preparátů byla systematicky zhodnocena celá délka epidermis patrná na všech úspěšně obarvených řezech (pokud nebyly zachovány alespoň 2 řezy vhodné pro hodnocení, bylo doplněno obarvení záložního preparátu identickým způsobem - viz výše). Ve všech případech tak byly zhodnoceny nejméně 2 řezy epidermis. V každém zorném poli byl spočítán počet intraepidermálních nervových vláken v celé tloušťce preparátu a změřena délka epidermis z její zevní strany v oblasti pod stratum corneum. Při hodnocení preparátu byla průběžně pořizována fotodokumentace tak, aby bylo zdokumentováno každé zachycené vlákno, nejlépe v oblasti jeho přechodu přes dermoepidermální junctci (obr. 1, 2b).

Je-li v některé oblasti preparátu více vláken v lokalizovaných blízkostech sebe, jedná se většinou o více větví identického vlákna. Hodnocení počtu vláken se v takovém případě záviselo na místě větvení - pokud k němu docházelo v oblasti pod dermoepidermální junctci, byla každá z větví v epidermis počítána jako samostatné vlákno. Pokud bylo větvení umístěno až nad hranici dermis a epidermis, byly všechny větve hodnoceny jen jako jedno intraepidermální vlákno. Po zhodnocení všech úseků epidermis daného preparátu byl vypočten průměrný počet vláken na 1 mm její délky.

Výsledky

Všechny provedené biopsie proběhly bez komplikací, pacienti výkon hodnotili jako nebolestivý a hojení jizvy bylo ve všech případech uspokojivé.

Průměrně bylo zhodnoceno $8,47 \pm 2,7$ mm epidermis na jednu kožní biopsii (tedy na 1 pacienta) (rozmezí 5,6 až 18,7 mm).

Ve skupině zdravých dobrovolníků byl průměrný počet intraepidermálních nervových vláken na 1 mm epidermis $11,54 \pm 2,87$ (rozmezí 3,71-15,69). Z výsledků pacientů v tomto souboru byl stanoven dolní normální limit počtu intraepidermálních nervových vláken na

úrovni 5. percentilu získaných hodnot. Hodnota této normy je 6,69 vláken/mm.

Ve skupině pacientů se senzitivní neuropatií byl průměrný počet intraepidermálních vláken $5,98 \pm 3,81$ na 1 mm epidermis (rozmezí 0-14,85). Rozdíl oproti skupině zdravých dobrovolníků je vysoce statisticky významný ($p < 0,0001$) (obr. 2a, b).

Mezi oběma podskupinami pacientů se senzitivní neuropatií (tj. mezi pacienty s izolovaným postižením tenkých nervových vláken a jedinci s kombinací postižení vláken tenkých a silných) nebyly rozdíly statisticky významné ($p=0,55$). V první podskupině byl průměrný počet vláken $6,21 \pm 3,52$, ve druhé $5,69 \pm 4,12$. Při použití výše uvedeného normálního limitu byl abnormální nález zachycen celkem u 51 ze 76 zhodnocených vzorků pacientů se senzitivní neuropatií (senzitivita 67 %). Z toho u pacientů s izolovaným postižením tenkých vláken u 26 z 40 (65 %) a u pacientů s kombinací postižení obou typů vláken u 25 z 36 (69 %). V obou podskupinách neuropatických pacientů je tedy senzitivita metody prakticky identická.

Diskuse

Naše zkušenosti potvrzují, že vyšetření kožních biopsií průbojníkem je jednoduchá a pro pacienty bezpečná metoda. Výkon byl ve všech případech velmi dobře tolerován a pacienty hodnocen jako zcela nebolestivý. Nezaznamenali jsme žádné komplikace ani během vlastního odběru vzorku, ani v následném období a hojení proběhlo ve všech případech uspokojivě. Metodu lze tedy bez problémů zařadit do rutinního vyšetřovacího algoritmu pacientů s neuropatií tenkých vláken. Vzhledem k bezpečnosti vyšetření a jeho minimální invazivitě jej lze použít i opakovaně a posoudit tak změny nálezu v čase jak v souvislosti s případným terapeutickým ovlivněním, tak i v rámci spontánního průběhu onemocnění. Možnost provedení biopsie na různých místech umožňuje hodnocení prostorové distribuce postižení, a přeneseně tak přispívá k určitému „stagingu“, tj. hodnocení tíže polyneuropatie, u níž s progresí postižení dochází postupně k postižení proximálnějších oblastí.

Validita každé metody je ovlivněna použitými normálními limity. Prosté přejímání normativních dat z jiných studií je problematické, protože výsledky publikovaných souborů zdravých kontrol se navzájem významně liší (4, 18), (tab. 1). Důvodem je zřejmě do jisté míry variabilní postup při zpracování vzorků stejně jako ne zcela identický způsob jejich hodnocení. Jednotlivé studie se liší tloušťkou preparátů (která kolísá mezi 30 a 100 mm), konkrétním postupem barvení či fixací. Např. Mc Arthur a spol. (18) fixovali vzorky formolem, přičemž jiní autoři uvádějí, že tento způsob zpracování vzorků může vést k destrukci části vláken a preparáty je lépe fixovat v paraformaldehydu (19), který užíváme i v naší studii. Odlišný způsob fixace může být důvodem vyšší variabi-

lity počtu IENFs a následně nižšího odvozeného normálního limitu v McArthurově studii ve srovnání s jinými publikovanými soubory (tab.1). Obdobně se mohou lišit detaily pravidel hodnocení vzorků. Někteří autoři např. započítávají pouze vlákna, u nichž je spolehlivě detekovatelný průchod přes dermoepidermální junkci, zatímco jiné studie (včetně naší) zahrnují do hodnocení i vlákna jasně izolovaná, u nichž nelze předpokládat, že by byly intraepidermální větvi jiného vlákna, avšak průchod přes dermoepidermální junkci není u nich jednoznačně patrný. Naše dosavadní nálezy ve skupině zdravých jedinců korelují s literárními údaji o normální hustotě intraepidermálních nervových vláken v obdobné lokalizaci.

Ve srovnání s nálezy u zdravých jedinců jsme u pacientů se senzitivní neuropatií prokázali statisticky vysoce významnou redukci intraepidermální inervace. Počet IENFs byl však prakticky identický v obou podskupinách pacientů s neuropatií. Nálezy kožních biopsií tedy odrážely postižení tenkých nervových vláken a nebyly ovlivněny paralelním postižením vláken silných.

Při použití normálního limitu odvozeného z výsledků v souboru zdravých jedinců jsme zaznamenali signifikantní redukci intraepidermální inervace u většiny pacientů se senzitivní neuropatií. U části pacientů tohoto souboru byly však nálezy kožních biopsií v mezích normy a to i při jasně abnormálním nálezu TTT, přítomnosti výrazných pozitivních senzitivních příznaků a u některých pacientů i při abnormálním EMG nálezu korelujícím s postižením silných nervových vláken. Obdobně výsledky uvádí většina publikovaných studií (4, 16). Např. u některých diabetiků prvního typu před plánovanou transplantací pankreatu s jasně klinicky i paraklinicky definovanou polyneuropatií nalezl Kennedy (4) počet IENFs ještě v oblasti dolního rozmezí normálních hodnot. Popsaná nižší senzitivita metodiky může být ovlivněna řadou faktorů. Částečně k ní pravděpodobně přispívá ne zcela optimální nastavení normativních dat, falešně pozitivní nálezy paraklinických vyšetření (zejména TTT) či odchylky při histologickém zpracování a hodnocení vzorků. Metoda je závislá na subjektivním úsudku a přesnosti hodnotitele, což může být zdrojem chyb při hodnocení. McArthur a spol. však prokázali, že při kvalitní edukaci hodnotitelů a jejich dostatečné praxi v evaluaci kožních biopsií vykazuje metoda minimální intra- i interindividuální variabilitu výsledků mezi jednotlivými hodnotiteli (16, 18). Všechny naše vzorky byly hodnoceny stejným hodnotitelem (EM), část z nich byla následně nezávisle přehodnocena druhým hodnotitelem (JF) s prakticky identickými nálezy. Výsledky vyšetření byly tedy spolehlivé a případně drobné odchylky při hodnocení by neměly výsledky studie významněji ovlivnit.

Dalším důvodem nižší senzitivity metodiky může být příliš proximální místo odběru biopsie. Postižení tenkých vláken vykazuje obdobně jako jiné polyneuropatie vzorec postižení v závislosti na délce vláken („length-dependent“), připisovaný Wallerově denegraci alterovaných axonů („dying back degeneration“)

(25). Nejvýraznější abnormitu intraepidermální inervace lze tedy očekávat v distálních oblastech končetin, kam také většina pacientů lokalizuje senzitivní symptomy (maximum pacientů udávalo ponožkovou distribuci algoparestézií či bolestí od kolen případně od kotníků distálně). V souladu s tímto předpokladem prokázaly dříve provedené studie, že nálezy kožních biopsií korelují s anatomickou distribucí klinických symptomů. Intraepidermální inervace však byla významně redukována dokonce i v oblastech lokalizovaných proximálněji od míst s klinicky detekovatelným senzitivním deficitem (3, 5, 18). Pro naši studii jsme zvolili oblast cca 10 cm nad malleolus lateralis. Odběr je v tomto místě pro pacienty neobtěžující, místo odběru není většinou drážděno obuví ani jinak významněji mechanicky namáháno. Jedná se také o lokalizaci nejčastěji využívanou v klinických studiích a tedy nejlépe umožňující srovnání nálezů s výsledky jiných souborů. Distribuce příznaků u většiny našich pacientů v korelaci s výsledky popsanych studií dovoluje předpokládat, že v námi zvoleném místě odběru biopsie by již změny intraepidermální inervace měly být patrné. U malé části pacientů jsou senzitivní symptomy limitovány pouze akrální částí DKK (prsty či plošky nohou) – tito pacienti by případně mohli mít normální nálezy v kožních biopsiích prováděných v oblasti lýtky a bylo by u nich zřejmě výhodnější provést biopsii distálněji (např. na nártu či plošce nohy). Distálnější místo odběru vzorku je však pro pacienty podstatně méně komfortní a pro tuto lokalizaci nejsou k dispozici dostatečné údaje o nálezech u zdravých jedinců. V budoucnu bychom chtěli zhodnotit, zda se nálezy kožních biopsií u jedinců s čistě akrální lokalizací senzitivních symptomů odlišují od ostatních pacientů a zda může jejich zařazení do souboru případně měnit diagnostickou validitu metodiky.

Senzitivitu kožních biopsií v diagnostice postižení tenkých vláken může dále ovlivňovat neznalost exaktní klinicko-patologické korelace mezi histologickými nálezy a klinickými příznaky senzitivní neuropatie. Existují přesvědčivé důkazy, že IENFs jsou periferní výběžky senzitivních ganglií zadních kořenů (26, 27), jejich přiřazení ke konkrétnímu typu nervových vláken však není přesně známo. K bližší specifikaci původu IENFs přispívají v experimentální praxi zejména studie s capsaicinem (trans-8-methyl-N-vanillyl-6-nonenamidem), lipofilním alkaloidem obsaženým v paprice, po jehož opakované topické aplikaci dochází k signifikantní redukci, resp. úplnému vymizení IENFs a současně k alteraci senzitivity pro obě tepelné modalitě a bolest vyvolanou termickými i mechanickými stimuly a méně signifikantně též ke změnám percepce jemného dotyku (28). Typ alterovaných senzitivních modalit tedy svědčí pro dominantní podíl tenkých málo myelinizovaných a nemyelinizovaných vláken typu A-delta a C na inervaci epidermis, což potvrzují i nálezy klinických studií (24, 26). Alterace senzitivity pro jemný dotek však naznačuje, že část IENFs může mít původ i v jiných populacích nervových

vláken a absence jejich postižení u pacientů s izolovanou neuropatií tenkých vláken může snižovat senzitivitu kožních biopsií. V naší studii jsme nicméně závislost hustoty IENFs na paralelním postižení silných nervových vláken neprokázali a toto ovlivnění tak nebude pravděpodobně příliš významné.

Redukce počtu IENFs není také jedinou morfologickou změnou detekovatelnou v kožních biopsiích pacientů se senzitivní neuropatií. U části jedinců našeho souboru byly patrné určité změny nervových vláken ve smyslu jejich segmentace či varikozit (obr. 2b) či jejich nerovnoměrná distribuce s tvorbou shluků nervových vláken, kontrastujících s neinervovanými vmezenými oblastmi a to i při normálním celkovém počtu IENFs. Obdobné nálezy popisují i další autoři (5, 23) a jsou považovány za tzv. predegenerativní změny, podporující diagnózu neuropatie. Tento typ morfologických abnormalit je však (podobně jako popisované paralelní změny denzity subepidermálních nervových plexů) velmi obtížně kvantifikovatelný a významně závislý na subjektivním názoru hodnotitele a kvalitě histologického zpracování vzorků. Vzhledem k uvedeným omezením nebyly v naší studii (v souladu s dalšími publikovanými pracemi) popsány inervační abnormality hodnoceny jako validní známka periferně neurogenní léze, přestože by zřejmě dále zvýšily senzitivitu metodiky.

Je pravděpodobné, že za senzitivní příznaky u pacientů s NTV je zodpovědná již alterace funkce tenkých nervových vláken, která zřejmě předchází morfologické změny ve smyslu redukce jejich počtu. Optimálním histologickým korelátém subjektivních obtíží u pacientů se senzitivní neuropatií by tedy byla možnost vizualizace markerů zúčastněných současně v patofyziologii neuropatické bolesti. Nadějně se v tomto smyslu jeví právě receptor pro capsaicin (28), označovaný jako vaniloidový receptor typu 1 (VR1), resp. transient receptor potential V1 (TRPV1), který pravděpodobně přispívá k indukci a modulaci nocicepce a neurogenního zánětu. Změny hustoty či morfologie TRPV1-imunoreaktivních nervových vláken proto představují vhodnou oblast pro další výzkum.

V souhrnu naše studie prokázala bezpečnost vyšetření kožních biopsií a využitelnost hodnocení hustoty intracpidermálních nervových vláken v diagnostice neuropatie tenkých vláken. Senzitivita metodiky při současném způsobu hodnocení a zpracování vzorků je nižší než senzitivita TTT. Na rozdíl od TTT je to však metoda nevyžadující spolupráci pacienta a nezávislá na jeho psychických funkcích (jako je pozornost, rychlost reakce, nutnost přesného porozumění instrukcím, možné ovlivnění únavou, stresem, očekávaným výsledkem apod.). Optimální diagnostický algoritmus NTV tak zahrnuje TTT jako screeningovou metodu, jejíž výsledky by ve sporných případech (nespolupracující subjekt, negativní či nekonkluzivní nález TTT) bylo možné zpřesnit kožní biopsií. Objektivizace a kvantifikace postižení NTV pomocí kožní biopsie bude neocenitelná zejména u terapeutických studií.

Práce byla podpořena výzkumným záměrem MSM 0021622404 a grantem Interního grantového fondu Fakultní nemocnice v Brně 15/00 Neuropatie tenkých vláken.

Literatura

1. Dyck PJ, Karnes J, O'Brien PC, Zimmerman IR. Detection thresholds of cutaneous sensation in humans. In: Dyck PJ, Thomas P.K., editors. *Peripheral neuropathy*. Philadelphia: WB Saunders; 1993. p. 706-28.
2. Moravcová E, Bednarík J. Počítačem asistované stanovení termického prahu - normativní data a zdroje variability. *Ces a slov Neurol Neurochir* 2003; 66/99: 236-9.
3. Holland NR, Stocks A, Hauer P, Cornblath DR, Griffin JW, McArthur JC. Intracpidermal nerve fiber density in patients with painful sensory neuropathy. *Neurology* 1997; 48(3): 708-11.
4. Kennedy WR, Wendelschafer-Crabb G, Johnson T. Quantitation of epidermal nerves in diabetic neuropathy. *Neurology* 1996; 47(4): 1042-8.
5. Holland NR, Crawford TO, Hauer P, Cornblath DR, Griffin JW, McArthur JC. Small-fiber sensory neuropathies: clinical course and neuropathology of idiopathic cases. *Ann Neurol* 1998; 44(1): 47-59.
6. Langerhans P. Über die nerven in menschlichen haut. *Virchows Arch Pathol Anat* 1868; 44: 325-37.
7. Arthur RP, Shelley WB. The innervation of human epidermis. *J Invest Dermatol* 1959; 32: 397-411.
8. Winkelmann RK. Cutaneous sensory nerves. *Semin Dermatol* 1988; 7(4): 236-68.
9. Kennedy WR, Wendelschafer-Crabb G. The innervation of human epidermis. *J Neurol Sci* 1993; 115(2): 184-90.
10. Wang L, Hilliges M, Jernberg T, Wiegleb-Edstrom D, Johansson O. Protein gene product 9.5-immunoreactive nerve fibres and cells in human skin. *Cell Tissue Res* 1990; 261(1): 25-33.
11. Lindberger M, Schroder HD, Schultzberg M, Kristensson K, Persson A, Ostman J, et al. Nerve fibre studies in skin biopsies in peripheral neuropathies. I. Immunohistochemical analysis of neuropeptides in diabetes mellitus. *J Neurol Sci* 1989; 93(2-3): 289-96.
12. Karanth SS, Springall DR, Lucas S, Levy D, Ashby P, Levene MM, et al. Changes in nerves and neuropeptides in skin from 100 leprosy patients investigated by immunocytochemistry. *J Pathol* 1989; 157(1): 15-26.
13. Thompson RJ, Doran JF, Jackson P, Dhillon AP, Rode J. PGP 9.5-a new marker for vertebrate neurons and neuroendocrine cells. *Brain Res* 1983; 278(1-2): 224-8.
14. Levy DM, Terenghi G, Gu XH, Abraham RR, Springall DR, Polak JM. Immunohistochemical measurements of nerves and neuropeptides in diabetic skin: relationship to tests of neurological function. *Diabetologia* 1992; 35(9): 889-97.
15. Wilson PO, Barber PC, Hamid QA, Power BF, Dhillon AP, Rode J, et al. The immunolocalization of protein gene product 9.5 using rabbit polyclonal and mouse monoclonal antibodies. *Br J Exp Pathol* 1988; 69(1): 91-104.
16. McCarthy BG, Hsieh ST, Stocks A, Hauer P, Macko C, Cornblath DR, et al. Cutaneous innervation in sensory neuropathies: evaluation by skin biopsy. *Neurology* 1995; 45(10): 1848-55.
17. Lauria G, Holland N, Hauer P, Cornblath DR, Griffin JW, McArthur JC. Epidermal innervation: changes with aging, topographic location, and in sensory neuropathy. *J Neurol Sci* 1999; 164(2): 172-8.
18. McArthur JC, Stocks EA, Hauer P, Cornblath DR, Griffin JW. Epidermal nerve fiber density: normative reference range and diagnostic efficiency. *Arch Neurol* 1998; 55(12): 1513-20.
19. Kennedy WR, Wendelschafer-Crabb G. Utility of the skin biopsy method in studies of diabetic neuropathy. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol Suppl* 1999; 50: 553-9.
20. Cornblath DR, McArthur JC. Predominantly sensory neuropathy in patients with AIDS and AIDS-related complex. *Neurology* 1988; 38(5): 794-6.
21. Scott LJ, Griffin JW, Luciano C, Barton NW, Banerjee T, Crawford T, et al. Quantitative analysis of epidermal innervation in Fabry disease. *Neurology* 1999; 52(6): 1249-1254.

22. **Oaklander AL.** The density of remaining nerve endings in human skin with and without postherpetic neuralgia after shingles. *Pain* 2001; 92(1-2): 139-45.
23. **Lauria G, McArthur JC, Hauer PE, Griffin JW, Cornblath DR.** Neuropathological alterations in diabetic truncal neuropathy: evaluation by skin biopsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1998; 65(5): 762-6.
24. **Herrmann DN, Griffin JW, Hauer P, Cornblath DR, McArthur JC.** Epidermal nerve fiber density and sural nerve morphometry in peripheral neuropathies. *Neurology* 1999; 53(8): 1634-40.
25. **Said G, Slama G, Selva J.** Progressive centripetal degeneration of axons in small fibre diabetic polyneuropathy. *Brain* 1983; 106 (Pt 4): 791-807.
26. **Li Y, Hsieh ST, Chien HF, Zhang X, McArthur JC, Griffin JW.** Sensory and motor denervation influence epidermal thickness in rat foot glabrous skin. *Exp Neurol* 1997; 147(2): 452-62.
27. **Lauria G, Sghirlanzoni A, Lombardi R, Pareyson D.** Epidermal nerve fiber density in sensory ganglionopathies: clinical and neurophysiologic correlations. *Muscle Nerve* 2001; 24(8): 1034-9.
28. **Nolano M, Simone DA, Wendelschafer-Crabb G, Johnson T, Hazen E, Kennedy WR.** Topical capsaicin in humans: parallel loss of epidermal nerve fibers and pain sensation. *Pain* 1999; 81(1-2): 135-45.
29. **Chien HF, Tseng TJ, Lin WM, Yang CC, Chang YC, Chen RC, et al.** Quantitative pathology of cutaneous nerve terminal degeneration in the human skin. *Acta Neuropathol (Berl)* 2001; 102(5): 455-61.
30. **Hirai A, Yasuda H, Joko M, Maeda T, Kikkawa R.** Evaluation of diabetic neuropathy through the quantitation of cutaneous nerves. *J Neurol Sci* 2000; 172(1): 55-62.

Nabidnuto: 13. 1. 2005

Přijato v definitivní verzi: 25. 1. 2005

*MUDr. E. Moravcová
Neurologická klinika FN Brno
Jihlavská 20
625 00 Brno*

3. *Moravcova E, Bednařik J, Svobodník A, Dušek L. Reproducibility of thermal threshold assessment in small-fibre neuropathy patients. Scripta medica (Brno) 2005b; 78(3): 177-184.*

Tato práce rozšiřuje poznatky o výše uvedeném testování termického prahu jako jedné z metod kvantitativního testování senzitivity jako klíčového diagnostického testu neuropatie tenkých vláken. Studie je zaměřena především na reprodukovatelnost jednotlivých testů, jako velmi důležitý parametr pro hodnocení případných změn nálezu v rámci longitudinálního sledování pacientů. Hodnotí vliv algoritmu testování, testované lokalizace i klinického stavu pacienta na reprodukovatelnost vyšetření.

Práce prokázala inverzní vztah mezi reprodukovatelností vyšetření a výškou termického prahu a poskytla tak jako první publikovaná práce klinickými daty dokumentované doporučení pro volbu nejlépe reprodukovatelných parametrů TTT, optimálně využitelných pro účely longitudinálních studií. Současně prioritně popsala horší reprodukovatelnost TTT u pacientů s neuropatií tenkých vláken (oproti zdravým kontrolám), což je klíčová informace pro hodnocení případných změn nálezu v rámci dlouhodobého sledování pacientů.

REPRODUCIBILITY OF THERMAL THRESHOLD ASSESSMENT IN SMALL-FIBRE NEUROPATHY PATIENTS

MORAVCOVÁ E.¹, BEDNAŘÍK J.¹, SVOBODNÍK A.², DUŠEK L.²

¹Department of Neurology, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno

²Centre for Biostatistics and Analyses, Masaryk University, Brno

Received after revision August 2005

Abstract

To evaluate the test-retest reproducibility of thermal threshold testing (TTT) in small-fibre neuropathy (SFN) patients.

Methods: Thermal thresholds for cold (CP) and warm (WP) perception were repeatedly evaluated over a period of 1 week in a group of 58 SFN patients and in 30 healthy volunteers. Thermal thresholds were established in the hand and foot using 3 different algorithms.

The coefficients of repeatability (CR) (expressed as 2 multiple of SD_{diff} calculated as $\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} / n$, where n represents the number of all measurements) varied between 0.72° and 1.5°C in the hand and between 2.2 °C and 3.7 °C in the foot in healthy volunteers and SFN patients respectively. The reproducibility of all the tests in the hand and of CP tests in the foot was higher in healthy volunteers in comparison with SFN patients. Thermal threshold values in both SFN patients and healthy volunteers showed higher reproducibility in the hand compared with those in the foot. Cold threshold values obtained from the foot in the SFN group showed lower reproducibility compared to the warm threshold ones, while the opposite difference was found in healthy subjects. The method of levels displayed higher reproducibility of cold thresholds in both groups in comparison with the method of limits.

If TTT is intended for use as a method of longitudinal assessment of small-fibre nerve function, different limits for the incidental (i.e. non-significant) intraindividual change of thermal threshold should be used for patients with and without disturbed thermal perception. The modality tested, type of the test, and tested region may well display a significant impact on the reproducibility of thermal threshold values.

Key words

Sensory thresholds, Polyneuropathies, Reproducibility of results, Small fibre, Quantitative sensory testing

INTRODUCTION

The thermal threshold testing method (TTT) is a quantitative sensory test (QST) commonly used in the assessment of small A- δ and C-fibre function. Several published studies have addressed the comparison between various algorithms and the influence of physiological variables on the thermal threshold values (1-5).

Reproducibility is a major consideration when a choice between different tests has to be made, as it affects both the sensitivity and the specificity of the measurements

as well as the statistical power of clinical and epidemiological investigations (4). Moreover, high reproducibility is vital for longitudinal assessment of threshold changes resulting either from the natural course of the disease or through treatment. Several studies exist on the reproducibility of quantitative sensory threshold values, including thermal threshold tests (2-10). There are, however, only few investigations addressing the issue of the reproducibility of different testing algorithms in subjects with both normal and particularly abnormal thermal thresholds (10,11).

The aim of this study was to assess the reproducibility of thermal threshold assessment in patients with small-fibre neuropathy (SFN) in comparison with normal subjects, utilising different testing algorithms.

MATERIALS AND METHODS

Thermal thresholds for cold and warm perception were examined twice over a period of 1 week in 58 patients with pure or predominant small-fibre sensory polyneuropathy (37 men, 21 women, mean age 60.3 years, range 23-83) and in a group of 30 healthy volunteers (13 men, 17 women, mean age 54.5 years, range 20-73). The healthy subjects displayed no signs or symptoms of central or peripheral nerve system involvement, had no risk factors for peripheral nerve dysfunction and showed normal thermal thresholds in all the introductory tests performed. The reference values for the warm and cold perception thresholds were obtained from *Yarnitsky and Sprecher* (12). These authors employed the same apparatus with thermode size, baseline temperature, and rate of stimulus rise similar to the present study. All the neuropathic patients suffered from distal symmetrical subacute or chronic clinical symptoms of paresthesias and painful dysesthesias in the lower extremities, displayed a significant reduction of the number of intraepidermal PGP 9.5 immunoreactive small sensory nerve fibres in skin biopsy samples from the lateral aspect of the calf compared to the reference data published by *McArthur* (13), and showed abnormal thermal thresholds assessed by the first TTT examination.

Thermal thresholds were established using a Nicolet Viking IV electrodiagnostic unit, Thermal Sensory Analyser software (Medoc TSA 2001), and a rectangular constant thermal probe with a surface area of 5 x 2.5 cm. The starting (adaptation) temperature was 32 °C. In order to prevent thermal injury, the high temperature limit was set at 50 °C and the low one at 0 °C.

In all the subjects tested, thermal thresholds were examined at two locations: in the thenar of the left hand (TH) and in the dorsum of the right foot (DF).

At both locations, we used 3 different test algorithms: a random and a non-random variant of the method of limits (MLI), and one method of levels (MLE). We used the same settings of MLE and the non-random variant of the MLI, as previously described by other authors (10).

In the random variant of the MLI method, 5 cold and 5 warm stimuli alternated in random order and the subject was asked to indicate the onset of sensation and to decide which thermal modality was perceived to disclose any disturbance of thermal modality discrimination.

In each of the algorithms tested, both cold (CP) and warm (WP) perception thresholds were assessed. All the tests were performed in exactly the same manner and by the same examiner (EM) in a quiet room with no distractions.

STATISTICAL METHODS

As a quantitative measure of reproducibility, the standard deviation of the differences between pairs of repeated measurements of each test (SD_{dif}) was calculated as $\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - x_j)^2 / n}$, where n represents the number of all measurements (i.e. two times the

number of patients examined by the particular test). The coefficient of repeatability (CR) was expressed as 2 multiple of SD_{dif} (14). A variance ratio test (15) was used to disclose and quantify differences in the reproducibility of thermal threshold assessment between the different testing algorithms and groups of patients. The relationship between the threshold value and the differences between the repeated measurements was tested by means of Pearson's correlation test. A value of $p < 0.05$ was taken as the universal indicative limit for statistical significance.

RESULTS

The greater part of the neuropathic patients (70 %) exhibited disturbed perception of cold stimuli; they felt cold stimuli as warm or hot (paradoxical sensation), while warm stimuli were always perceived correctly as being warm. This type of perception was always presented in both of the repeated measurements and was never observed in the group of healthy volunteers. Some SFN patients were repeatedly and completely unable to perceive cold (12 %) and/or warm (9 %) stimuli during RTI tests in both examinations (they reached the maximum/minimum temperature of 50°/0°C without reporting any thermal perception at all). The data from patients with anaesthesia for cold and/or warm thermal stimuli were excluded from further computation.

We found a significant positive correlation between the thermal threshold values and the differences between repeated measurements in most of the tests, particularly in healthy subjects.

The coefficients of repeatability are summarised in *Table 1*. The comparison between tested groups showed better reproducibility of all tests in TH and in CP tests in DF in a group of healthy volunteers in comparison with neuropathic patients (<0.001). The differences in reproducibility of WP tests between healthy and neuropathic subjects in DF were not significant ($p = 0.27-0.38$).

In both groups, all the tests showed better reproducibility in the TH than in the DF ($p = 0.005- <0.001$).

The reproducibility of cold thresholds in both groups was higher in the method of levels in comparison with that of limits. In WP tests the differences between various algorithms were not significant. No differences were found between random and non-random variants of MLI.

As far as the influence of tested thermal modality on the reproducibility of the threshold values is concerned, cold threshold assessment in the DF showed significantly lower reproducibility in comparison with warm threshold assessment in neuropathic patients ($p < 0.001$). Surprisingly, in the group of healthy volunteers the differences were inverse: cold threshold values in this location (DF) were more reproducible ($p < 0.001$).

In the subgroup of patients who displayed the "paradoxical sensation" in DF, the reproducibility was not significantly different from those with normal discrimination between thermal modalities.

Table 1

Coefficients of repeatability (CR) expressed as 2 multiple of SD_{dif} . This parameter represents 95 % confidence that the second measurement will lie in the interval defined as the first measurement \pm CR and can be used as the upper normal limit for intraindividual change during repeated tests.

Algorithm and tested location	2 SD_{dif} (°C)		p values
	Healthy volunteers	Neuropathic group	
TH: MLI NR CP	1.06	2.18	<0.001
MLI NR WP	0.76	1.38	<0.001
MLI R CP	0.71	1.40	<0.001
MLI R WP	0.72	1.56	<0.001
MLE CP	0.48	1.22	<0.001
MLE WP	0.54	1.24	<0.001
Mean of all tests	0.72	1.50	
DF: MLI NR CP	1.16	5.74	<0.001
MLI NR WP	3.00	2.84	n.s.
MLI R CP	1.66	5.04	<0.001
MLI R WP	3.98	2.66	n.s.
MLE CP	0.90	3.12	<0.001
MLE WP	2.38	2.62	n.s.
Mean of all tests	2.18	3.68	

TH - thenar of the hand; DF - dorsum of the foot; CP - cold perception; WP - warm perception; R - random variant of the test; NR - non-random variant of the test; MLI - method of limits; MLE - method of levels; n.s. - non-significant; SD_{dif} - standard deviation of the differences - expressed in °C

DISCUSSION

This is the first study to show lower reproducibility of thermal threshold assessment in a group of small-fibre neuropathy patients compared with normal subjects and using different algorithms.

In general, there is little published data available to compare the reproducibility of different groups of subjects and different methods. Moreover, these studies have shown no general agreement on the issue of difference in the reproducibility of thermal thresholds between healthy individuals and patients with abnormal threshold values. Several authors (3) have reported similar reproducibility of thermal thresholds in healthy individuals and patients with diabetes mellitus, while others (8) found worse reproducibility of the method in diabetic patients. The discrepancy between the results in previous studies could be caused by different inclusion criteria in various study groups, especially by the different degree of thermal threshold abnormality. In our group, the involvement of small fibres was documented by skin biopsy in addition to abnormal thermal thresholds detected by TTT. Another cause of this discrepancy could be the lack of consensus as to how repeatability should be defined (3, 11). We used the coefficient of repeatability (14), also known as “the repeatability factor” by others (1, 11, 12). It represents 95 % confidence that the results of two examinations made on the same subject under the same conditions will differ less than CR and therefore can be used as a limit of the incidental (i.e. non-significant) intraindividual change of the thermal threshold on a longitudinal follow-up.

The CRs in our material varied substantially among the different tests, body regions, thermal modalities, and the two groups tested. In general, reproducibility was decreased by all factors increasing the value of threshold temperature. The threshold values were less reproducible in patients with abnormal thresholds in comparison with healthy individuals and in the foot in comparison with the hands.

Other possible causes of discrepancies between the various studies may lie in differences between the algorithms employed. *Yarnitski and Sprecher* (12) reported a lower reproducibility of the method of limits in comparison with the MLE. *Kemler* (10) confirmed this difference in reproducibility in the hands, but not in the feet. Others, however, reported no such difference (2, 9). In our study, the coefficients of repeatability of cold perception thresholds were significantly better for MLE than for MLI. The difference between the tested algorithms probably results from the influence of reaction time upon the threshold value.

The modality tested also seems to have some influence on the reproducibility of threshold values. In our group of polyneuropathy patients, we found a significantly lower reproducibility of cold thermal threshold values in comparison with warm threshold values. These results are similar to those in diabetic patients reported by *Hilz* (8) and *Valensi* (9) and might be explained by the disturbance of cold modality discrimination in a major part of our SFN patients. Many of these patients felt cold stimuli as warm or hot (paradoxical sensation), while warm stimuli were perceived

correctly as being warm. Similar findings of disturbed cold modality discrimination have previously been reported by other authors (4, 16). In contrast with the SFN results, the reproducibility of cold thresholds in our group of healthy volunteers was even better than of the warm sensation thresholds. Such a difference might be explained by the above-mentioned positive correlation between the absolute threshold value and the difference between repeated measurements. In healthy subjects, cold threshold values were significantly lower in comparison with warm sensation values. Similarly, no signs of worse reproducibility of cold thresholds in healthy subjects were found by *Doeland* (6) and *Hilz* (8).

In conclusion, the long-term follow-up of thermal threshold changes of small-fibre polyneuropathy patients should be interpreted carefully. If TTT is intended to be used as a method for longitudinal assessment of small nerve fibre function, the thermal threshold value of the patient, localisation of the thermode, and the algorithm tested should be taken into consideration. The limits for the significant intraindividual change from healthy individuals cannot be recommended for use in patients with polyneuropathy, because of significant differences in the reproducibility of threshold values between healthy subjects and patients with abnormal thermal thresholds.

From the repeatability point of view, the method of levels and warm sensation testing are to be preferred

Acknowledgement

The study was supported by the Research Plan of the Czech Ministry of Education MSM0021622404.

Moravcová E., Bednařík J., Svobodník A., Dušek L.

REPRODUKOVATELNOST HODNOCENÍ TERMICKÉHO PRAHU U NEMOCNÝCH S NEUROPATIÍ TENKÝCH VLÁKEN

Souhrn

Cílem bylo zhodnotit reprodukovatelnost stanovení termického prahu u nemocných s neuropatií tenkých vláken.

Metodika: Termický práh pro chlad a teplo byl opakovaně stanoven během 1 týdne ve skupině 58 nemocných s neuropatií tenkých vláken a u 30 zdravých dobrovolníků. Práh byl hodnocen na ruce a noze s pomocí 3 různých vyšetřovacích algoritmů.

Tzv. koeficient reprodukovatelnosti ("repeatability factor" vyjádřený jako dvojnásobek standardní odchylky rozdílů SD_{diff} vypočítané podle vzorce $SD_{diff} = \sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - x)^2 / n}$, kde n představuje počet všech měření) kolísal mezi 0,72° a 1,5 °C na ruce a mezi 2,2 °C a 3,7 °C na noze u zdravých dobrovolníků a nemocných s neuropatií tenkých vláken. Reprodukovatelnost všech testů na ruce a testů prahu pro chlad na noze byla vyšší u zdravých dobrovolníků ve srovnání s nemocnými s neuropatií tenkých vláken. Hodnoty termického prahu jak u nemocných s neuropatií tenkých vláken, tak u zdravých dobrovolníků vykazovaly vyšší reprodukovatelnost na ruce ve srovnání s nohou. Hodnoty prahu pro chlad ve skupině nemocných s neuropatií tenkých vláken na noze se vyznačovaly nižší reprodukovatelností ve srovnání s hodnotami prahu pro teplo, zatímco ve skupině zdravých dobrovolníků byla

nalezena opačná závislost. Hodnoty prahů získaných metodou Úrovně měly vyšší reprodukovatelnost ve srovnání s hodnotami získanými metodou Limity.

Při použití stanovení termického prahu pro longitudinální sledování funkce somatických tenkých vláken u nemocných s neuropatií tenkých vláken a poruchou termické percepce je třeba použít rozdílných limitů pro náhodné intraindividuální změny hodnot termického prahu než u zdravých jedinců. Testovaná modalita, testovací algoritmus a testovaná kožní oblast mají rovněž významný vliv na reprodukovatelnost hodnot termického prahu.

REFERENCES

1. *Yarnitsky D.* Quantitative sensory testing. *Muscle Nerve* 1997; 20(2): 198-204.
2. *Claus D, Hilz MJ, Neundorfer B.* Thermal discrimination thresholds: a comparison of different methods. *Acta Neurol Scand* 1990; 81(6): 533-40.
3. *De Neeling JN, Beks PJ, Bertelsmann FW, Heine RJ, Bouter LM.* Sensory thresholds in older adults: reproducibility and reference values. *Muscle Nerve* 1994; 17(4): 454-461.
4. *Dyck PJ, Zimmerman I, Gillen DA, Johnson D, Karnes JL, O'Brien PC.* Cool, warm, and heat-pain detection thresholds: testing methods and inferences about anatomic distribution of receptors. *Neurology* 1993; 43(8): 1500-1508.
5. *Navarro X, Kennedy WR.* Evaluation of thermal and pain sensitivity in type I diabetic patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1991; 54(1): 60-64.
6. *Doeland HJ, Nauta JJ, van Zandbergen JB, et al.* The relationship of cold and warmth cutaneous sensation to age and gender. *Muscle Nerve* 1989; 12(9): 712-715.
7. *Gelber DA, Pfeifer MA, Broadstone V, et al.* Components of variance for vibratory and thermal threshold testing in normal and diabetic subjects. *J Diabetes Complications* 1995; 9(3): 170-176.
8. *Hilz MJ, Claus D, Neundorfer B.* Early diagnosis of diabetic small fiber neuropathy by disturbed cold perception. *J Diabet Complications* 1988; 2(1): 38-43.
9. *Valensi P, Attali JR, Gagant S.* Reproducibility of parameters for assessment of diabetic neuropathy. The French Group for Research and Study of Diabetic Neuropathy. *Diabet Med* 1993; 10(10): 933-939.
10. *Kemler MA, Reulen JPH, van Kleef M, Barendse GAM, van den Wildenberg FAJM, Spaans F.* Thermal thresholds in complex regional pain syndrome type I: sensitivity and repeatability of the methods of limits and levels. *Clin Neurophysiol* 2000; 111: 1561-1568.
11. *Shy ME, Frohman EM, So YT, et al.* Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology. Quantitative sensory testing: report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 2003; 60(6): 898-904.
12. *Yarnitsky D, Sprecher E.* Thermal testing: normative data and repeatability for various test algorithms. *J Neurol Sci* 1994; 125(1): 39-45.
13. *McArthur JC, Stocks EA, Hauer P, Cornblath DR, Griffin JW.* Epidermal nerve fiber density: normative reference range and diagnostic efficiency. *Arch Neurol* 1998; 55(12): 1513-1520.
14. *Bland JM, Altman DG.* 1986. Statistical methods for assessing agreement between methods of clinical measurement. *Lancet* 1986; i: 307-310.
15. *Zar JH.* Biostatistical methods, 2nd ed. New York: Prentice Hall, 1982: p.125.
16. *Yosipovitch G, Yarnitsky D, Mermelstein V, et al.* Paradoxical heat sensation in uremic polyneuropathy. *Muscle Nerve* 1995; 18(7): 768-771.

4. *Vlckova-Moravcova E, Bednarik J, Belobradkova J, Sommer C. Small-fibre involvement in diabetic patients with neuropathic foot pain. Diabet Med 2008;25(6):692-699. IF: 3,172. Počet citací v SCI: 56.*

Studie je zaměřená na hodnocení postižení tenkých nervových vláken u pacientů s bolestivou senzitivní neuropatií při diabetu mellitu. Výsledky práce prokázaly redukcí kožní inervace prakticky u všech pacientů s bolestivou diabetickou neuropatií. Komentovaná publikace tak (jako jedna z prvních studií) poukázala na klíčový význam postižení tenkých nervových vláken v patofyziologii bolesti u diabetické neuropatie. Postižení tenkých vláken bylo v prezentovaném souboru diabetiků s neuropatickou bolestí na DKK prokázáno jak u pacientů se současným postižením vláken tenkých a silných, tak u pacientů s izolovanou abnormitou termického a algického cití při klinickém neurologickém vyšetření (a tedy s výhradním postižením tenkých nervových vláken) a dokonce i u jedinců s absencí klinických známek SFN (u nichž byla diagnóza SFN podpořena pouze nálezy laboratorních metod, t.j. kožní biopsie a TTT). Tyto nálezy podpořily význam postižení tenkých nervových vláken v patofyziologii neuropatické bolesti u různých typů diabetické distální polyneuropatie a současně zpochybnily koncept neuropatie tenkých vláken jako izolované diagnostické jednotky, vydělené ze spektra ostatních polyneuropatií. Komentovaná studie tak jako jedna z prvních prací nastínila prezentovanými daty podpořený a nyní všeobecně akceptovaný koncept plynulého kontinua postižení různých typů nervových vláken u diabetické periferní neuropatie (kdy postižení tenkých vláken je pravděpodobně iniciální abnormitou, často následovanou rozvojem postižení vláken silných). Míra postižení tenkých nervových vláken byla přitom nejvýraznější u pacientů s kombinovaným postižením silných a tenkých nervových vláken a byl obdobná u pacientů s diabetem mellitem i poruchou glukózové tolerance. Výsledky tak prokazují, že postižení tenkých nervových vláken (resp. redukce kožní inervace) je velmi časnou abnormitou v průběhu rozvoje bolestivé neuropatie u pacientů s diabetem mellitem či poruchou glukózové tolerance a tíže tohoto postižení dále narůstá u pacientů s progresí polyneuropatie ve smyslu rozvoje kombinovaného postižení silných a tenkých vláken. Tyto nálezy jsou tak plně v souladu s výsledky recentní studie naší pracovní skupiny (*Raputová et al. 2017*), která prokázala narůstající pravděpodobnost rozvoje a vyšší intenzitu bolesti s narůstající tíží polyneuropatie.

Original Article: Complications

Small-fibre involvement in diabetic patients with neuropathic foot pain

E. Vlckova-Moravcova, J. Bednarik, J. Belobradkova* and C. Sommer†

Department of Neurology and *Diabetologic Centre, Department of Internal Medicine and Gastroenterology, Faculty Hospital and Medical Faculty of the Masaryk University, Brno, Czech Republic and †Department of Neurology, University of Würzburg, Würzburg, Germany

Accepted 28 January 2008

Abstract

Aims To assess small-fibre involvement in diabetic patients with neuropathic pain.

Methods Peripheral nerve function was assessed in 30 patients with Type 2 diabetes mellitus (T2DM, $n = 24$) or impaired glucose tolerance (IGT, $n = 6$), and clinical symptoms of neuropathic pain in the feet, using nerve conduction studies, autonomic tests, thermal quantitative sensory testing (T-QST) and quantification of intra- and subepidermal nerve fibre densities in skin punch biopsies.

Results Clinical signs of isolated small-fibre sensory involvement were present in 13 patients [pure small-fibre neuropathy (pSFN)], seven patients had isolated positive sensory symptoms without neurological deficits (pSFN-). Ten patients had concomitant electrophysiological and/or clinical signs of large-fibre sensory involvement [mixed-fibre neuropathy (MFN)]. Twenty-seven patients (90%) had both reduced skin innervation and abnormalities of the T-QST parameters. Two other patients displayed either abnormal skin innervation or T-QST, and only one patient had normal findings on both tests. The criteria of small-fibre neuropathy (SFN) were met in all 20 patients without large-fibre involvement. Small-fibre involvement was also present in the 10 MFN patients. Both T-QST and skin biopsy parameters revealed significant differences between these clinical subgroups, with increased severity of small-fibre involvement in the MFN group. Autonomic dysfunction was found in 43% of patients and did not correlate with either clinical, T-QST or skin biopsy data.

Conclusions Although the exact mechanism of neuropathic pain in diabetic patients is not known, pain is almost invariably accompanied by small-fibre dysfunction and pathology irrespective of autonomic or large-fibre involvement.

Diabet. Med. 25, 692–699 (2008)

Keywords diabetic neuropathy, pain, skin biopsy, small-fibre, thermal threshold

Abbreviations IENFD, intra-epidermal nerve fibre density; IGT, impaired glucose tolerance; MFN, mixed-fibre neuropathy; PGP, protein gene product; pSFN, pure small-fibre neuropathy; pSFN-, without pure small-fibre neuropathy; SENPD, subepidermal nerve plexus density; T1DM, Type 1 diabetes mellitus; T2DM, Type 2 diabetes mellitus; T-QST, thermal quantitative sensory testing; VAS, visual analogue scale; WHO, World Health Organization

Introduction

Painful distal sensory polyneuropathy constitutes an important subset of the diabetic neuropathies and affects 7.5–24% of all patients with diabetes [1–3].

Although many theories have addressed the pathophysiology of neuropathic pain in diabetes, it remains unclear how the

pain is generated and maintained. Among others, involvement of the A δ and C-fibres mediating pain and temperature, and also serving autonomic functions, has repeatedly been shown to play an important role [4,5].

Neuropathies with pure or predominant abnormalities of these fibres are called ‘small-fibre neuropathy’ (SFN). As yet, there is no agreement in the literature about the amount of large-fibre dysfunction that can coexist and still allow a diagnosis of small-fibre neuropathy. According to current definitions [6,7], more significant indicators of large-fibre dysfunction exclude a diagnosis of SFN. Diabetes mellitus

Correspondence to: Eva Vlckova-Moravcova, MD, Department of Neurology, University Hospital Brno, Jihlavská 20, 602 00 Brno, Czech Republic. E-mail: evlckova@email.cz

(DM), including prediabetic states such as impaired glucose tolerance (IGT), is probably the most frequent cause of SFN. Patients suffering from SFN typically present with positive sensory symptoms, such as paraesthesias, painful dysaesthesias and spontaneous pain [7]. It has therefore been suggested that the involvement of small fibres is at least partly responsible for the development of these symptoms. In diabetic patients, however, both large and small-fibre dysfunction (including autonomic fibres) may frequently be encountered in the same patient, and pain is a common symptom in many subtypes and stages of diabetic neuropathies [8–11].

As patients with SFN may have normal results on a standard neurological examination, a definition has been proposed, based on the clinical picture with typical symptoms and signs (painful dysaesthesias, signs of small-fibre dysfunction on neurological examination) and abnormalities on specialized electrodiagnostic testing (e.g. quantitative sensory testing), or in pathological studies (quantification of intra-epidermal nerve-fibre density from skin biopsy samples). For research purposes, three levels of certainty of SFN diagnosis (possible–probable–definite) based on abnormality in one–two–three of these conditions have been suggested [7]. We used this definition to investigate the prevalence of SFN in patients with DM and painful feet. We further assessed whether large sensory fibres and autonomic fibres were involved.

Patients and methods

Patients

Between 2000 and 2005, consecutive patients with painful feet were screened in the Peripheral Neuropathy Outpatient Clinic of the Brno University Hospital, and those meeting the following inclusion criteria were included in the study:

1. Diagnosis of Type 2 DM (T2DM) or IGT according to World Health Organization (WHO) criteria [12].
2. Positive sensory symptoms (painful dysaesthesias or pain) in the feet for > 3 months with an intensity of at least 3 on a visual analogue scale (VAS) of 0–10. Other causes of pain in the feet (both neuropathic and non-neuropathic) such as plantar fasciitis, Charcot's joints, osteoarthritis, peripheral vascular disease, central nervous system dysfunction, tarsal tunnel syndrome and or peripheral mono- or polyneuropathies were excluded by history, clinical examination and biochemical, haematological and immunological blood tests including thyroid hormones, triglycerides, vitamin B12 and folate levels, serum protein electrophoresis, carbohydrate-deficient transferrin and auto-antibodies (antinuclear antibodies, anti-Ro, anti-La, anti-DNA). Quantification of alcohol consumption as well as further confirmation of harmful alcohol use and possible alcohol dependence were performed according to the WHO AUDIT manual.
3. Absence of any symptoms or signs of motor dysfunction in the feet.

Thirty patients were included (13 women, 17 men), with a median age of 58 years (range 41–77). Twenty-four patients had T2DM and six IGT. The median VAS score was 7 (range 3.5–9.5) at the time of enrollment in the study.

Data from 27 out of 30 patients included in the present study [those with abnormal thermal quantitative sensory testing (T-QST)] have been reported in part in a previous study examining in detail the diagnostic value of a skin biopsy (including a newly validated parameter—subepidermal nerve plexus density) in a larger group of patients with painful sensory neuropathy of diverse origin [13]. The previous study, however, dealt mainly with morphological findings, was not focused on clinical signs of neuropathy and included patients with heterogeneous aetiology of peripheral nerve disease. In contrast, the current study deals only with the diabetic population, which is more uniform and may display some characteristic features, at least some of which may be different from the general neuropathy population.

Methods

All patients underwent detailed neurological examination, including assessment of tendon reflexes, muscle strength, skin condition, sensation to touch, pinprick, warm and cold stimuli, proprioception and vibration sense.

DM was confirmed by fasting plasma glucose levels and oral glucose tolerance tests. The mean intensity of neuropathic pain during the week before clinical and electrophysiological testing was assessed using a 10-cm VAS, in which 0 cm represented 'no pain' and 10 cm 'the worst pain I can imagine'. All clinical and electrophysiological tests were performed at the time of admission to the clinic, and patients had not received specific treatment for neuropathic pain previously.

T-QST was performed using thermal sensory analyser software (Medoc TSA 2001; Medoc, Ramat Yishai, Israel). Thermal thresholds were examined on the dorsum of the right foot, using both the method of limits and levels. For analysis, we used our own normal limits [14]. The methodology has been described elsewhere in detail [13,14].

Electrophysiological examinations, sympathetic skin response and cardiovascular tests based on heart rate variability examination were performed using a Keypoint type II electromyograph system (Dantec, Skovlunde, Denmark), following the published recommendations [15]. The results were processed according to the reference values related to age and height at the Brno laboratory [16].

Skin punch biopsy specimens were taken from the distal calf. The details of skin specimen removal and further processing have previously been published [13,17] and follow standard recommendations [18]. Sections of 40 µm thickness were immunostained with rabbit polyclonal antibodies to human protein gene product (PGP) 9.5 (Ultraclone, Wellow, UK; 1 : 800) as a primary antibody and goat antirabbit IgG labelled with cyanine fluorescent probe as a secondary antibody (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA; 1 : 100). Using Image Pro Plus 4.0 software (Media Cybernetics, Leiden, the Netherlands), the intra-epidermal nerve fibre density (IENFD) was quantified by counting the nerve endings within an accurately measured length of epidermis [18,19].

Subepidermal nerve plexus density (SENPD) was measured using a density threshold for PGP 9.5 immunoreactive structures and expressed as a percentage of the whole subepidermal area analysed (200 × 50 µm adjacent to the dermo-epidermal junction in each optical field) [13]. The IENFD was defined as abnormal

if lower than the cut-off value of 8.8 fibres/mm [13]. Similarly, the SENPD was defined as abnormal if lower than the cut-off value of 7.25%. The normal limits used in the current study were derived from a group of normal individuals, presented in our previous publication [13].

The protocol was approved by the institutional ethics committee of the University of Brno, and written informed consent was obtained from all patients and volunteers.

Standard descriptive statistics were used to summarize the distribution of the data. Comparison between different subgroups was performed by univariate *t*-test or one-way analysis of variance (ANOVA) with a Tukey post-hoc correction. The value $\alpha < 0.05$ was taken as the universal limit for statistical significance.

Results

Clinical data

Duration of sensory symptoms ranged from 3 months to 9 years (median 2.75 years), and duration of DM or IGT ranged from 19 years before the onset of sensory symptoms to 5.5 years after the onset of symptoms (median 3 years before onset). In 11 cases (36.7%) the diagnosis of DM/IGT was made at the onset of sensory symptoms or after it. Mean fasting plasma glucose level was 8.7 ± 2.6 mmol/l and mean HbA_{1c} $7.4 \pm 1.9\%$ in the DM patients.

Spontaneous pain in the feet was present in all participants and was described in terms that are typical for neuropathic pain (burning, tingling, prickling, 'pins and needles' or throbbing). In six patients (20%), pain on light touch (allodynia) was also present and 13 patients (43%) reported pain on deep pressure.

Sensory signs that are considered to indicate large-fibre dysfunction and to exclude SFN according to the definitions of both Stewart and Lacomis [6,7] were present in six patients (impaired proprioception in six, knee areflexia in three, and vibratory loss at or above the ankle in two). All these six patients, and an additional four, displayed abnormalities on conventional sensory nerve conduction studies (mixed small- and large-fibre neuropathy—MFN subgroup). The remaining 20 patients had no or slight large-fibre sensory signs, compatible with small-fibre neuropathy (ankle areflexia, loss of vibratory sensation at the toes), and normal conduction studies. Thirteen patients had clinical symptoms and signs of small-fibre damage (pure small-fibre neuropathy—pSFN subgroup), whereas seven had isolated positive sensory symptoms including pain without any clinical signs of either small- or large-fibre damage (pSFN— subgroup, Table 1).

T-QST

Abnormal warm thresholds in at least one of the testing algorithms used were found in 86.7% of patients, and abnormal cold thresholds in 60%. Altogether, an abnormal thermal threshold for at least one thermal modality was found in 93.3% of patients (Table 1).

Skin biopsy

A reduced IENFD was found in 86.7% of patients and, similarly, abnormal SENPD was present in 86.7%. Altogether, at least one abnormal skin biopsy parameter was present in 93.3% of patients (Table 1).

Autonomic dysfunction

An abnormal sympathetic skin response was found in one patient (3.3%), and cardiovascular tests proved abnormal in 13 patients (43.3%).

Skin biopsy and T-QST data in the clinical subgroups

All 10 patients with additional clinical and/or electrophysiological signs of large-fibre involvement (MFN subgroup) showed abnormalities on both the skin biopsy and T-QST.

Twelve out of 13 patients with clinical signs of small-fibre involvement only (pSFN subgroup) showed abnormalities in both skin biopsy and T-QST findings, and thus met the criteria of definite SNF [7]. One patient had both normal skin biopsy and T-QST (possible SFN).

Seven patients had no clinical signs of small-fibre dysfunction (pSFN— subgroup): five of them had both abnormal skin biopsy and T-QST (probable SFN), one had normal T-QST but abnormal skin biopsy, and one showed a normal skin biopsy but abnormal T-QST (possible SFN) (Table 1).

Comparison of skin biopsy data between the three subgroups showed significant differences, with a trend towards an increase in the degree of abnormality from the pSFN— over the pSFN to the MFN subgroup (Table 2). A similar trend was found in thermal threshold data (Table 2). There were no significant differences in duration of sensory symptoms or diabetes among these subgroups.

Comparison of DM subtypes

No statistically significant differences in T-QST and skin biopsy data, or in the duration of T2DM/IGT, in the duration of sensory symptoms and in the rate of SFN/MFN patients, were found between the T2DM and IGT subgroups (Table 2).

Discussion

The principal finding of this prospective study is that a reduction of skin innervation is almost invariably present in painful sensory neuropathies in patients with IGT and T2DM. Beyond confirming and extending findings from earlier studies, we here add a further parameter, quantitative analysis of the subepidermal nerve fibre density, which gives additional information on skin innervation, and, similarly to IENFD, has high diagnostic validity. The degree of small nerve fibre involvement (assessed both by IENFD/SENPD and T-QST) increased in concert with the extent of clinical involvement

Table 1 Classification of cases with painful diabetic neuropathy based on clinical and laboratory (conduction study, quantitative sensory thermal threshold testing and skin biopsy) data

Case	Clinical signs of small-fibre involvement	Clinical signs of sensory large-fibre involvement	Nerve conduction studies	IENFD	SENPDP	Skin biopsy*	T-QST: CS	T-QST: WS	T-QST†	Clinical classification	SFN classification acc. to Lacomis‡	Types of glucose dysmetabolism
1	+	+	A	A	A	A	A	A	A	MFN	Excl.	IGT
2	+	+	A	A	A	A	A	A	A	MFN	Excl.	T2DM
3	+	+	A	A	A	A	A	A	A	MFN	Excl.	T2DM
6	–	–	A	A	A	A	A	A	A	MFN	Excl.	T2DM
19	–	–	A	A	A	A	A	A	A	MFN	Excl.	T2DM
25	+	–	A	A	A	A	N	A	A	MFN	Excl.	T2DM
27	+	+	A	A	A	A	A	A	A	MFN	Excl.	IGT
28	–	–	A	A	A	A	N	A	A	MFN	Excl.	T2DM
29	+	+	A	N	A	A	A	N	A	MFN	Excl.	T2DM
30	+	+	A	A	A	A	A	A	A	MFN	Excl.	T2DM
4	+	–	N	A	A	A	N	A	A	pSFN	Definite	IGT
5	+	–	N	A	A	A	N	A	A	pSFN	Definite	T2DM
8	+	–	N	A	N	A	A	A	A	pSFN	Definite	IGT
9	+	–	N	N	N	N	N	N	N	pSFN	Possible	T2DM
10	+	–	N	A	A	A	A	A	A	pSFN	Definite	T2DM
12	+	–	N	A	A	A	A	A	A	pSFN	Definite	T2DM
14	+	–	N	N	A	A	A	A	A	pSFN	Definite	T2DM
16	+	–	N	A	A	A	A	A	A	pSFN	Definite	T2DM
20	+	–	N	A	A	A	A	A	A	pSFN	Definite	T2DM
22	+	–	N	A	A	A	A	A	A	pSFN	Definite	T2DM
23	+	–	N	A	A	A	N	A	A	pSFN	Definite	T2DM
26	+	–	N	A	A	A	A	A	A	pSFN	Definite	T2DM
24	+	–	N	A	A	A	N	A	A	pSFN	Definite	IGT
7	–	–	N	A	A	A	N	A	A	pSFN–	Probable	IGT
11	–	–	N	A	A	A	N	A	A	pSFN–	Probable	T2DM
13	–	–	N	A	A	A	A	N	A	pSFN–	Probable	T2DM
15	–	–	N	A	A	A	N	N	N	pSFN–	Possible	T2DM
17	–	–	N	A	N	A	N	A	A	pSFN–	Probable	T2DM
18	–	–	N	A	A	A	N	A	A	pSFN–	Probable	T2DM
21	–	–	N	N	N	N	A	A	A	pSFN–	Possible	T2DM
Sensitivity (%)				86.7	86.7	93.3	60.0	86.7	93.3			

A, abnormal;

N, normal.

+, present.

–, absent.

IENFD, intra-epidermal nerve fibre density;

SENPDP, subepidermal nerve plexus density;

T-QST, quantitative sensory thermal threshold testing;

CS, cold sensation thresholds;

WS, warm sensation thresholds;

MFN, mixed small- and large-fibre neuropathy;

pSFN, pure small-fibre sensory neuropathy (patients with clinical signs of somatic small-fibre involvement);

pSFN–, pure small-fibre sensory neuropathy ‘minus’ (patients with positive sensory symptoms but without clinical signs of somatic small fibre involvement);

Excl., large-fibre signs (clinical and/or electrophysiological) exclusionary for the diagnosis of small-fibre neuropathy according to Lacomis.

*Abnormal skin biopsy means at least one abnormal parameter (i.e. IENFD or SENPD).

†Abnormal T-QST means abnormal threshold of at least one thermal modality (i.e. cold or warm threshold).

‡Lacomis D. Small-fibre neuropathy. *Muscle Nerve* 2002; 26: 173–188.

Table 2 Comparison of selected biopsy, electrophysiological and clinical data between clinical SFN subgroups and subtypes of glucose dysregulation

	Comparison of clinical SFN groups				Comparison of subtypes of glucose dysregulation		
	MFN group (<i>n</i> = 10)	pSFN group (<i>n</i> = 13)	pSFN- group (<i>n</i> = 7)	ANOVA (<i>P</i>)	IGT (<i>n</i> = 6)	DM 2 (<i>n</i> = 24)	<i>t</i> -test (<i>P</i>)
IENFD (fibres/mm)	0.62 (0–14.7)	4.53 (0.1–14.6)	6.91 (3.9–9.8)	0.05	4.62 (0.08–7.91)	3.67 (0–14.66)	NS
SENPD (%)	1 (0.2–5.7)	5.0 (1.0–14.0)	5.1 (2.0–9.9)	0.001	4.54 (0.22–7.66)	4.5 (0.22–10.87)	NS
CS limits (°C)	13.9 (0–30.5)	24.4 (4.0–31.0)	28.7 (21.0–30.4)	0.009	18.7 (0–30.4)	24.2 (0.2–31)	NS
CS levels (°C)	19.9 (0–31.5)	26.8 (0–31.45)	28.5 (19.4–31.7)	0.04	26.8 (0–31)	26.4 (0–31.7)	NS
WS limits (°C)	49.0 (37.3–50.0)	46.2 (38.6–49.7)	44.7 (38.6–49.2)	NS	48.7 (45.9–50)	46.7 (37.3–50)	NS
WS levels (°C)	47.8 (36.4–50.0)	45.3 (34.2–49.0)	44.3 (34.2–48.3)	0.01	45.9 (43.3–50)	45.8 (34.2–50)	NS
Duration of sensory symptoms (years)	3 (1–9)	2 (0.25–8)	2.5 (2–6)	NS	4 (0.25–9)	2.75 (1–8)	NS
Duration of DM or IGT (years)	3 ([–5]–15)	3 ([–2.5]–14)	7 ([–5.5]–19)	NS	1.5 ([–5.5]–5)	5.0 ([–2.5]–19)	NS

Values are median (minimum/maximum).
 MFN, mixed small- and large-fibre neuropathy;
 pSFN, pure small-fibre sensory neuropathy;
 pSFN-, pure small-fibre sensory neuropathy 'minus';
 DM, diabetes mellitus;
 IGT, impaired glucose tolerance;
 IENFD, intra-epidermal nerve fibre density;
 SENPD, subepidermal nerve plexus density;
 CS, cold sensation;
 WS, warm sensation;
P, statistical significance;
 NS, non-significant (*P* > 0.05).

from pure small-fibre to mixed small and large nerve fibre dysfunction. Another important finding was that the severity of small nerve fibre disease was similar in patients with IGT and T2DM. Together with a lack of correlation of small nerve fibre loss with duration of disease, this indicates that loss of skin innervation is a very early pathological event in DM.

Despite the pivotal role played by small nerve fibres in the transmission of pain sensation, only a few studies have addressed the role of small-fibre damage in the pathophysiology of pain in diabetic neuropathy. Several studies have shown that people with diabetes have lower IENFD values in comparison with age-matched non-diabetic healthy control subjects [20–22]. Lauria *et al.* [23] showed lower IENFD values in a group of patients with painful neuropathy that included six with diabetes. In our cohort of 30 diabetic patients suffering from painful feet, signs of small-fibre involvement based on at least one laboratory method recommended for confirmation of SFN (T-QST or skin biopsy) were detected in all but one patient (96.7%), and both methods concomitantly confirmed small-fibre sensory involvement in 27 patients (90%). Our observation is in concordance with a similar study [24], which reported abnormal IENFD in all 25 diabetic subjects with painful neuropathy. Our study thus emphasizes the importance of small-fibre damage in the pathophysiology of pain in diabetic polyneuropathy.

Small-fibre damage, however, does not inevitably lead to the development of pain. Shun *et al.* [22] have investigated a group of 38 patients with T2DM and distal sensory signs and symptoms. Pain was present in only 23.7% of their patients, but the IENFD was abnormal in 81.6%, warm detection thresholds in 81.6% and cold thresholds in 57.9%. In another study, there was a large overlap in IENFD in patients with diabetic neuropathy with and without pain [24]. Small-fibre abnormalities detected by T-QST did not predict the presence of pain in diabetic neuropathy [25]. In a recent study, asymptomatic people with diabetes had a measurable, length-dependent reduction of distal epidermal nerves as an indicator of small-fibre involvement [26]. Therefore, factors additional to the loss of somatic small fibres must contribute to the development of clinically symptomatic pain in diabetic polyneuropathy.

It is obvious from our data that small-fibre sensory impairment detected by both T-QST and skin biopsy is almost invariably present in patients with diabetes and neuropathic pain, irrespective of the involvement of large sensory fibres and autonomic fibres, and even in cases without clinical signs of small-fibre damage. We can therefore assume that in individuals with little or no sign of neuropathy, abnormalities of small nerve fibres are very likely to play an important role in the genesis of pain.

On the other hand, pain may also be present in patients with severe objective signs of neuropathy, i.e. large-fibre neuropathy. One of the factors contributing to the development of pain in these patients could be the ratio between the involvement of fibres of different types and its time course. For example, in the study by Sorensen [24], patients with pain had lower IENFD compared with those without pain with the same degree of

large-fibre neuropathy. In our study, no group of patients without pain was available for comparison, but our patients with large-fibre neuropathy all had a high degree of small-fibre involvement (i.e. MFN), corresponding to the patients with pain in the study by Sorensen [24].

According to current definitions of SFN, the more significant clinical indicators of large-fibre dysfunction or abnormal findings on routine nerve conduction studies are considered exclusionary for its diagnosis [6,7]. The concept of SFN as a distinct subtype of neuropathy is based, among other things, on a high proportion of idiopathic cases compared with the large-fibre type of neuropathy. However, it is obvious that, at least in diabetic distal sensory neuropathy, both small- and large-fibre involvement frequently coincide [22]. The question arises as to whether any definition of SFN based on the exclusion of concomitant large-fibre involvement is well-founded. One could speculate as to whether small- and large-fibre sensory involvement represents a continuum of different stages of the same lesion (SFN as probable initial target, usually preceding involvement of large fibres) resulting from the same aetiology (such as diabetes, but probably also from other causes of large-fibre neuropathy), and the ratio between small- and large-fibre involvement could be one of the parameters critical for the development of pain.

Another factor in the development of neuropathic pain could be the sequence of dysfunction of different nerve fibre populations over time. In Sorensen's study [25], patients were much more likely to develop pain than sensory loss early after the onset of diabetes. In another study [27], patients with IGT had predominantly SFN, compared with patients with DM, who had more involvement of large nerve fibres. The authors concluded that small nerve fibres are predominantly affected in IGT, and their loss may be the earliest detectable sign of neuropathy in glucose dysregulation.

In our cohort, the number of patients with IGT was too small for statistical comparison, but the median duration of diabetes at the onset of pain was 3 years, which is much earlier than the usual onset of typical diabetic polyneuropathy in the general diabetic population, i.e. after 8 years [28]. Longitudinal studies are thus needed to establish the temporal relationship between IGT or DM and the development of pain and involvement of different nerve fibre subtypes.

Similar values of T-QST and skin biopsy findings in our patients with T2DM and IGT suggest that IGT can cause small nerve fibre loss of a similar extent as in T2DM. In contrast to our results, Sumner [27] found more severe small fibre dysfunction in their T2DM group, compared with IGT. However, patients both with and without pain were included in his study. According to Sorensen's results [24], IENFD counts are significantly lower in T2DM patients with painful neuropathies compared with painless ones. Even though no IGT patients were included in Sorensen's study [24], one may expect a similar relation between IENFD and presence of pain in IGT individuals. More severe disease of small nerve fibres in T2DM patients in Sumner's study [27] could thus have been

influenced by the trend to a higher proportion of patients without pain in the IGT group compared with T2DM (23.1 vs. 6.7%). Our results have extended both Sorensen's and Sumner's data and shown that the severity of small nerve fibre disease in patients with painful neuropathy is similar in both IGT and T2DM. Considering the results of the above-mentioned studies, the presence of pain seems to be a more important factor predicting the development of small-fibre neuropathy than the DM subtype. Our findings, however, cannot be automatically extrapolated to Type 1 diabetes mellitus (T1DM), because no patients with T1DM were included in our study. We only included patients with T2DM as we aimed to create a homogeneous population in which the pathophysiology, temporal relations between the diagnosis of diabetes and the beginning of clinical symptoms, as well as clinical and paraclinical characteristics of the neuropathy were more uniform than in a population where both types of diabetes were included.

We have shown that both functional (IENFD vs. SENPD, cold vs. warmth thresholds) and laboratory parameters (T-QST and skin biopsy) are complementary in detecting small-fibre involvement and could be useful in follow-up studies of painful diabetic neuropathy. These methods are sensitive enough to detect small-fibre involvement in the early 'preclinical' stage of painful diabetic neuropathy and could be very helpful in studying the role of small-fibre damage in the development of neuropathic pain in pre-diabetic states or diabetes over time. Warm detection threshold assessment had a higher sensitivity for small-fibre involvement than cold threshold values, which is in concordance with previous findings [22], as expected, because warmth is mediated predominantly by C-fibres. Subepidermal nerve-fibre density further increased the sensitivity of skin biopsy in detection of small-fibre involvement [13]. Despite the fact that it probably reflects dermal innervation by both unmyelinated and myelinated fibres, the frequency of abnormalities in painful diabetic neuropathy was comparable to that of the IENFD.

Finally, we conclude that:

- Neuropathic pain in patients with diabetes or impaired glucose tolerance is almost invariably accompanied by sensory small-fibre involvement, irrespective of the presence of signs of sensory large-fibre or autonomic small-fibre involvement.
- Isolated small-fibre involvement in painful diabetic neuropathy should be considered as an early stage of neuropathy and a prerequisite for the development of neuropathic pain.
- Quantitative sensory thermal threshold testing and skin biopsy are complementary in the detection of small-fibre involvement in diabetic patients, and both tests should optimally be included in the diagnostic algorithms of these patients, especially in research studies.

Competing interests

None to declare.

Acknowledgements

The study was supported by the Czech Ministry of Education Research Plan No. MSM0021622404 and intramural University of Würzburg research funds. E.V-M. was supported by a Fellowship from the European Neurological Society (ENS). The data were presented in part at the 11th Congress of European Federation of Neurological Societies (Brussels, Belgium, August 2007) and at the 7th International Symposium on Diabetic Neuropathy (Cape Town, South Africa, November 2006).

References

- 1 Nash TP. Treatment options in painful diabetic neuropathy. *Acta Neurol Scand* 1999; **173**: 36–42.
- 2 Schmäder KE. Epidemiology and impact on quality of life of post-herpetic neuralgia and painful diabetic neuropathy. *Clin J Pain* 2002; **18**: 350–354.
- 3 Daousi C, MacFarlane IA, Woodward A, Nurmikko TJ, Bundred PE, Benbow SJ. Chronic painful peripheral neuropathy in an urban community: a controlled comparison of people with and without diabetes. *Diabet Med* 2004; **21**: 976–982.
- 4 Kramer HH, Rolke R, Bickel A, Birklein F. Thermal thresholds predict painfulness of diabetic neuropathies. *Diabetes Care* 2004; **27**: 2386–2391.
- 5 Polydefkis M, Yiannoutsos CT, Cohen BA, Hollander H, Schifitto G, Clifford DB et al. Reduced intraepidermal nerve fiber density in HIV-associated sensory neuropathy. *Neurology* 2002; **58**: 115–119.
- 6 Stewart JD, Low PA, Fealey RD. Distal small fiber neuropathy: results of tests of sweating and autonomic cardiovascular reflexes. *Muscle Nerve* 1992; **15**: 661–665.
- 7 Lacomis D. Small-fiber neuropathy. *Muscle Nerve* 2002; **26**: 173–188.
- 8 Llewelyn JG, Gilbey SG, Thomas PK, King RH, Muddle JR, Watkins PJ. Sural nerve morphometry in diabetic autonomic and painful sensory neuropathy. A clinicopathological study. *Brain* 1991; **114**: 867–892.
- 9 Malik RA, Veves A, Walker D, Siddique I, Lye RH, Schady W et al. Sural nerve fibre pathology in diabetic patients with mild neuropathy: relationship to pain, quantitative sensory testing and peripheral nerve electrophysiology. *Acta Neuropathol (Berl)* 2001; **101**: 367–374.
- 10 Valk GD, Grootenhuys PA, van Eijk JT, Bouter LM, Bertelsmann FW. Methods for assessing diabetic polyneuropathy: validity and reproducibility of the measurement of sensory symptom severity and nerve function tests. *Diabetes Res Clin Pract* 2000; **47**: 87–95.
- 11 Orstavik K, Namer B, Schmidt R, Schmelz M, Hilliges M, Weidner C et al. Abnormal function of C-fibers in patients with diabetic neuropathy. *J Neurosci* 2006; **26**: 11287–11294.
- 12 World Health Organisation. *Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications*. 1999; WHO/NCD/NDS/99.2.
- 13 Vlckova-Moravcova E, Bednarik J, Dusek L, Toyka K, Sommer C. Diagnostic validity of epidermal nerve fiber densities in painful sensory neuropathies. *Muscle Nerve* 2008; **37**: 50–60.
- 14 Moravcova E, Bednarik J. [Computer-assisted thermal threshold testing—normative data and sources of variability]. *Cesk Slov Neurol N* 2003; **66/99**: 263–269.
- 15 Proceedings of a consensus development conference on standardized measures in diabetic neuropathy. Electrodiagnostic measures. *Muscle Nerve* 1992; **15**: 1150–1154.
- 16 Kadanka Z, Bednarik J, Vohanka S. [*Practical Electromyography*], 1st edn. Brno: IDPVZ, 1994.

- 17 Moravcova E, Bednarik J, Feit J, Sommer C. [The evaluation of intraepidermal nerve fiber density in skin biopsy of polyneuropathy patients]. *Cesk Slov Neurol N* 2005; **68/101**: 219–226.
- 18 Lauria G, Cornblath DR, Johansson O, McArthur JC, Mellgren SI, Nolano M *et al.* EFNS guidelines on the use of skin biopsy in the diagnosis of peripheral neuropathy. *Eur J Neurol* 2005; **12**: 747–758.
- 19 Kennedy WR, Wendelschafer-Crabb G, Polydefkis M, McArthur JC. Pathology and quantitation of cutaneous innervation. In Dyck PJ, Thomas PK eds. *Peripheral Neuropathy*. Philadelphia: Elsevier, 2005: 869–895.
- 20 Kennedy WR, Wendelschafer-Crabb G, Johnson T. Quantification of epidermal nerves in diabetic neuropathy. *Neurology* 1996; **47**: 1042–1048.
- 21 Polydefkis M, Hauer P, Sheth S, Sirdofsky M, Griffin JW, McArthur JC. The time course of epidermal nerve fibre regeneration: studies in normal controls and in people with diabetes, with and without neuropathy. *Brain* 2004; **127**: 1606–1615.
- 22 Shun CT, Chang YC, Wu HP, Hsieh SC, Lin WM, Lin YH *et al.* Skin denervation in type 2 diabetes: correlations with diabetic duration and functional impairments. *Brain* 2004; **127**: 1593–1605.
- 23 Lauria G, Morbin M, Lombardi R, Borgna M, Mazzoleni G, Sghirlanzoni A *et al.* Axonal swellings predict the degeneration of epidermal nerve fibers in painful neuropathies. *Neurology* 2003; **61**: 631–636.
- 24 Sorensen L, Molyneaux L, Yue DK. The relation among pain, sensory loss and small nerve fibers in diabetes. *Diabetes Care* 2006; **29**: 883–887.
- 25 Sorensen L, Molyneaux L, Yue DK. Insensate versus painful diabetic neuropathy: the effects of height, gender, ethnicity and glycaemic control. *Diabetes Res Clin Pract* 2002; **57**: 45–51.
- 26 Umapathi T, Tan WL, Loke SC, Soon PC, Tavintharan S, Chan YH. Intraepidermal nerve fiber density as a marker of early diabetic neuropathy. *Muscle Nerve* 2007; **35**: 591–598.
- 27 Sumner CJ, Sheth S, Griffin JW, Cornblath DR, Polydefkis M. The spectrum of neuropathy in diabetes and impaired glucose tolerance. *Neurology* 2003; **60**: 108–111.
- 28 Neuromuscular Homepage of the Washington University, St. Louis, MO, USA. Available at: <http://www.neuro.wustl.edu/neuromuscular/nother/diabetes.htm>.

5. Vlckova-Moravcova E, Bednarik J, Dušek L, Toyka KV, Sommer C. Diagnostic validity of epidermal nerve fiber densities in painful sensory neuropathies. Muscle and Nerve 2008a: 37: 50-60. IF: 2,594. Počet citací v SCI: 81.

Oceněno Hennerovu cenou České neurologické společnosti ČLS JEP pro mladé autory do 35 let za rok 2008.

Tato velká prospektivní studie byla zaměřena na přínos hodnocení kožních biopsií u pacientů s neuropatií s postižením tenkých nervových vláken (izolovaným a/nebo kombinovaným s postižením vláken silných) a korelaci nálezů této metodiky s řadou dalších klinických a elektrofyziologických parametrů. Vedle standardně hodnocené intraepidermální hustoty tenkých nervových vláken (IENFD) práce prioritně koncipovala metodiku hodnocení hustoty subepidermálního nervového plexu (SENPD) jako nového diagnostického markeru s přídatnou informativní hodnotou v rámci vyšetření kožní biopsie u pacientů s bolestivou neuropatií. Prokázala také vysokou diagnostickou validitu obou zmíněných parametrů (tedy intra- i subepidermální hustoty tenkých nervových vláken) v diagnostice bolestivých neuropatií a to prostřednictvím ROC analýzy jako nové unikátní statistické metody, do té doby v oblasti diagnostických metod periferních neuropatií neužívané (ale aktuálně velmi rozšířené).

Pomocí zmíněné analýzy pak studie prokázala, že intra- a subepidermální hustota nervových vláken jsou vzájemně komplementární parametry, jejichž výsledky úzce korelují s kvantitativním testováním senzitivity. Užití kombinace obou parametrů zvyšuje diagnostickou validitu hodnocení postižení tenkých nervových vláken, která je obdobná u všech pacientů s bolestivou neuropatií, bez ohledu na to, zda jde o jedince s čistým postižením tenkých nervových vláken či o pacienty s kombinovaným postižením vláken tenkých a silných.

ABSTRACT: In this prospective study, intraepidermal nerve fiber densities (IENFD) and subepidermal nerve plexus densities (SENPD) were quantified by immunostaining in skin punch biopsies from the distal calf in 99 patients with clinical symptoms of painful sensory neuropathy and from 37 age-matched healthy volunteers. The clinical diagnosis was based on history and abnormal thermal thresholds on quantitative sensory testing (QST). In patients with neuropathy, IENFD and SENPD were reduced to about 50% of controls. Elevated warm detection thresholds on QST correlated with IENFD but not with SENPD. Using receiver-operating characteristic (ROC) curve analysis of IENFD values, the diagnostic sensitivity for detecting neuropathy was 0.80 and the specificity 0.82. For SENPD, sensitivity was 0.81 and specificity 0.88. With ROC analysis of both IENFD and SENPD together, the diagnostic sensitivity was further improved to 0.92. The combined examination of IENFD and SENPD is a highly sensitive and specific diagnostic tool in patients suspected to suffer from painful sensory neuropathies but with normal values on clinical neurophysiological studies.

Muscle Nerve 37: 50–60, 2008

DIAGNOSTIC VALIDITY OF EPIDERMAL NERVE FIBER DENSITIES IN PAINFUL SENSORY NEUROPATHIES

EVA VLČKOVÁ-MORAVCOVÁ, MD,^{1,3} JOSEF BEDNAŘÍK, MD,¹ LADISLAV DUŠEK, MSc,²
KLAUS V. TOYKA, MD, FRCP,³ and CLAUDIA SOMMER, MD³

¹ Department of Neurology, University Hospital Brno, Jihlavská 20, 62500 Brno, Czech Republic

² Centre of Biostatistics and Analyses, Masaryk University, Brno, Czech Republic

³ Department of Neurology, Julius-Maximilians Universität, Würzburg, Germany

Accepted 20 July 2007

Painful sensory neuropathies with exclusive or preferential involvement of small sensory nerve fibers of the A-delta and C types are commonly encountered in clinical practice.³² Among the most prominent complaints of patients suffering from small-fiber neuropathy are burning pain and paresthesias, typically beginning distally in the feet and slowly progressing proximally in a length-dependent fashion.^{12,21,37} Unless there is associated large-fiber involvement, patients display few abnormalities on standard neurological examination and nerve conduction studies may remain within normal limits. The functional bedside tests most commonly used for the assessment of small fibers include the assess-

ment of thermal detection and pain thresholds, which can be corroborated by quantitative sensory testing (QST),^{13,32} and autonomic function tests, such as the quantitative sudomotor axon reflex test,^{29,32} sympathetic skin response,³ heart-rate variability, and other cardiovascular reflexes.²⁹ Further neurophysiological methods reflecting small-fiber function (e.g., laser-evoked sensory potentials)¹⁶ are valuable additions but less frequently available in clinical practice.

Morphological evaluation of the intraepidermal innervation in skin biopsies has proven to be both a useful^{14,18,25,32,34} and reproducible method^{7,25,40} for the diagnosis of small-fiber neuropathy and has now become a standard tool in the diagnostic evaluation of sensory neuropathies.^{20,22} However, data on the sensitivity, the correlation with clinical symptoms and signs,^{11,34,39} and the diagnostic validity of intraepidermal nerve fiber density (IENFD) examination have revealed variable results between studies.^{4,25} This also applies to the correlation between skin biopsy findings and neurophysiological and psychophysical examinations, which have shown a wide range of findings in different studies.^{10,14,23,30–33,39,41} Finally, although changes in the subepidermal nerve plexus have been described in patients with periph-

Abbreviations: ANOVA, analysis of variance; IENF, intraepidermal nerve fiber; IENFD, intraepidermal nerve fiber density; MFN, mixed-fiber neuropathy; MNSI, Michigan Neuropathy Screening Instrument Questionnaire (subscales 1 and 2); NDS, Neuropathy Disability Score; NSS, Neuropathy Symptom Score; pSFN, pure small-fiber neuropathy; QST, quantitative sensory testing; ROC, receiver-operating characteristic (curve); SENPD, subepidermal nerve plexus density; SFN, small-fiber neuropathy; VAS, visual analogue scale

Key words: epidermal nerve fiber density; painful neuropathy; quantitative sensory testing; skin biopsy; subepidermal nerve fiber density

Correspondence to: J. Bednarik; e-mail: jbednar@fnbrno.cz

© 2007 Wiley Periodicals, Inc.

Published online 30 August 2007 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI 10.1002/mus.20889

Table 1. Clinical characteristics of patients and controls.

Demographic characteristics	Neuropathy group		Controls
	pSFN	MFN	
Number of subjects studied	58	41	37
Male	33	25	20
Median (min/max) (years)	58 (25/81)	62 (38/83)	57 (27/86)
Symptom duration Median (min/max) (years)	2.00 (0.25/10)	2.00 (0.25/13)	
Associated relevant diseases (number of subjects)			
Diabetes mellitus or impaired glucose tolerance	19	12	
Alcohol abuse	7	8	
Others*	8	13	
Undetermined	24	8	

pSFN, pure small-fiber neuropathy; MFN, mixed-fiber neuropathy.

*Others: potential etiological factors or cofactors include toxins (anti-cancer chemotherapy or antituberculous drugs), paraneoplastic syndromes, monoclonal gammopathy, hyperlipidemia, and amyloidosis.

eral neuropathies,^{19,26} subepidermal nerve plexus density (SENPDP) has not been quantified before, and its relations to IENFD, to clinical symptoms, and to neurological and psychophysical findings have not been studied systematically. We therefore undertook a prospective study of patients with painful neuropathies with the main emphasis on investigating the diagnostic validity of a combined analysis of IENFD and SENPD quantification.

PATIENTS AND METHODS

Ninety-nine consecutive patients with painful sensory neuropathy and a prominent complaint of "burning feet" were included in the study (Table 1). These patients were prospectively recruited from the Peripheral Neuropathy Out-patient Clinic, Brno University Hospital, between September 1999 and March 2005. The protocol was approved by the institutional ethics committee, and written informed consent was obtained from all patients and volunteers before inclusion into the study. The following inclusion criteria had to be met: (1) chronic neuropathic pain, paresthesias, or dysesthesias (described as electric shock-like, burning, cold, prickling, tingling, or itching) in a distal symmetrical distribution in the lower extremities; and (2) abnormal thresholds for at least one thermal modality as assessed by QST. Exclusion criteria were: (1) signs of central (brain or spinal cord) involvement; (2) any overt clinical motor signs (weakness, distal muscle atrophy, fasciculations); and (3) other diseases or con-

ditions leading to foot pain (e.g., plantar fasciitis, tarsal tunnel syndrome, Charcot's joints, osteoarthritis, peripheral vascular disease). All patients underwent standard clinical examination, including semi-quantitative evaluation of the main sensory modalities of touch, pain, cold and warm, proprioception, and vibration, using hand-held devices.

A detailed medical history was taken from all patients, and they underwent a thorough clinical neurological examination. Associated diseases with potential etiological relevance were explored by history and routine biochemical, hematological, and immunological blood tests including thyroid hormones, triglycerides, vitamin B₁₂ and folate levels, serum protein electrophoresis, carbohydrate-deficient transferrin, and a set of autoantibodies (ANA, anti-Ro, anti-La, anti-DNA). Diabetes mellitus was confirmed by an abnormal oral glucose tolerance test and testing for elevated glycated hemoglobin levels (HbA_{1c}), which were done in all patients in the neuropathy group. Quantification of alcohol consumption as well as further confirmation of harmful alcohol use and possible alcohol dependence was performed according to the WHO audit manual.³⁸ For quantification of the presence and severity of clinical symptoms and neurological impairment, the Neuropathy Symptom Score (NSS),⁵ Neuropathy Disability Score (NDS),⁵ and the Michigan Neuropathy Screening Instrument Questionnaire (MNSI)⁶ were employed. The mean intensity of neuropathic pain during the week before clinical and electrophysiological testing was assessed using a 10-cm visual analogue scale (VAS) (0 cm = "no pain," 10 cm = "the worst pain I can imagine"). All the clinical and electrophysiological tests were performed at the time of admission to the clinic, and no specific treatment for neuropathic pain had been provided to these patients previously.

Thirty-seven healthy volunteers matched for age and body mass index were recruited at the Brno University Hospital, mainly from among hospital employees and their relatives (Table 1). These subjects displayed no signs or symptoms of central or peripheral nerve disease, had no risk factors for peripheral neuropathies in their medical histories (in particular, diabetes mellitus, alcohol abuse, uremia, thyroid disorders, malignancy, or exposure to toxins or medication associated with neuropathy), had normal fasting blood glucose (i.e., <5.6 mmol/L), and had normal results at clinical neurological examination and in QST. In 9 of the volunteers in this group, fasting plasma glucose was the only test performed to rule out diabetes mellitus, whereas the remaining 26 had additional tests performed: 16 had both the oral glucose

tolerance test and HbA_{1c} performed, 7 had the oral glucose tolerance test, and 5 had HbA_{1c} assessment. The results of these tests were normal in all volunteers.

Thermal threshold testing was performed using an electrodiagnostic unit (Viking IV; Nicolet, Madison, WI), thermal sensory analyzer software (TSA 2001; Medoc, Ramat Yishai, Israel), and a rectangular constant thermal probe with a surface area of 5 × 2.5 cm. Before the testing procedure started, standardized instructions were delivered to the patients and volunteers and they were familiarized with the test by undergoing several pilot trials. Thermal thresholds were examined on the dorsum of the right foot. Stable limb temperature was maintained by a heat lamp and monitored by a contact temperature sensor throughout the test. The starting (adaptation) temperature was 32°C. To prevent thermal injury, the high-temperature limit was set at 50°C and the low temperature at 0°C. At both locations, three different test algorithms were used: random and nonrandom variants of the method of limits and one method of levels. The main difference between the methods is that data gained by the method of levels, in contrast to the method of limits, are independent of reaction time. The principle of these algorithms has been described previously in detail.^{44,45} Details of the settings and testing parameters used in this study have also been published previously²⁸ and are principally the same as those described in an earlier study.¹⁷ In each of the algorithms tested, both cold and warm sensation thresholds were assessed. Age- and gender-related reference values were obtained from Yarnitsky and Sprecher.⁴⁶ These investigators employed a similar apparatus to that in the present study, and their thermode size, baseline temperature, and rate of stimulus rise were the same as those used here. Their published results are comparable to those observed in healthy individuals in our previous study.²⁸ All tests were performed in exactly the same manner and by the same examiner (E.M.) in a quiet room and with no distractions.

Electrophysiological examinations were performed using an electromyography system (Keypoint Type II; Dantec, Skovlunde, Denmark). Motor nerve conduction studies of the peroneal and tibial nerves, including 10 consecutive F-waves, antidromic sensory nerve conduction of the sural and superficial peroneal nerve with surface electrodes, and concentric needle electromyography from at least two distal lower extremity muscles, were performed in a standard manner, following published recommendations.³⁶ The results were processed according to reference values at the Brno laboratory with regard to age and height.¹⁵ Patients were classified as pure

small-fiber neuropathy (pSFN) if they had no clinical or nerve conduction signs of large-fiber dysfunction ($n = 58$). Those with electrophysiological signs of large-fiber sensory involvement (abnormal conduction study from at least two nerves corresponding with axonal loss, $n = 41$) were classified as having mixed-fiber neuropathy (MFN).

Autonomic tests included sympathetic skin responses and heart-rate variability examinations, which were performed using the Keypoint Dantec Type II electromyography system. Tests were performed in a quiet room with the ambient temperature maintained at 24°–26°C, with the patient relaxed, lying on a comfortable bed. Sympathetic skin response was recorded from the palm and sole. Standard silver–silver chloride electrodes were used, with the active electrode placed on the center of the palm or sole and the reference electrode on the dorsum of the hand or foot, respectively. Electrical stimulation of the median or medial plantar nerves was used to elicit the response. Five consecutive stimuli of 0.2-ms duration and 30-mA intensity were delivered at an irregular rate, at about 1/min. The shortest latencies and the largest amplitudes were used for further analysis, while the elicibility of responses obtained from the five successive stimuli was also recorded. Autonomic cardiovascular tests assessing heart-rate variability during resting and deep breathing, heart-rate response to the Valsalva maneuver, and immediate heart-rate response to fast standing were performed in a standard manner, following published guidelines.³⁵

Skin punch biopsies were taken from the distal calf, approximately 10 cm above the lateral malleolus, using a 4-mm disposable circular punch device (Stiefel GmbH, Offenbach, Germany). The biopsy was performed with a sterile technique following local anesthesia with 1% trimecain hydrochloride (Mesocain; Zentiva, Prague, Czech Republic). A single suture served for adaptation of the wound edges. Upon removal, the skin specimens were fixed in 4% phosphate-buffered paraformaldehyde (pH 7.4) for 3–4 hours and cryoprotected in 10% sucrose at 4°C overnight. Afterwards, the skin samples were embedded in Tissue Tek, frozen in 2-methylbutane cooled in liquid nitrogen, and stored at –70°C until further processing. Sections of 40- μ m thickness were cut on a sliding microtome and immunostained with rabbit polyclonal antibodies to human PGP-9.5 (1:800; Ultraclone, Wellow, UK) as a primary antibody and goat anti-rabbit IgG labeled with cyanine 3.18 fluorescent probe (Cy3) as a secondary antibody (1:100; Amersham Biosciences, Piscataway, New Jersey). The intraepidermal nerve fibers were counted manually at ×400 magnification using a microscope (Axio-

phot 2; Zeiss) equipped with a motorized scanning table (Märzhäuser, Wetzlar, Germany). Using ImagePro Plus 4.0 software (Media Cybernetics, Leiden, The Netherlands), epidermal length was accurately measured. The average intraepidermal nerve fiber density per millimeter of epidermal length was then calculated. Common counting rules were strictly followed.^{20,22,26} Individual fibers through the entire depth of the section were counted as they crossed the dermal–epidermal junction, while secondary branching within the epidermis was excluded from the quantification. Distinct individual fibers observed within the epidermis without apparent crossing of the dermal–epidermal junction were also counted, if a corresponding subepidermal fiber was seen. The entire epidermal length of three non-adjacent sections was evaluated in each patient. To assess the reliability of the results, 15 blinded samples were examined twice during 1 week.

Subepidermal nerve plexus density was measured using ImagePro Plus 4.0 software and a density threshold for PGP-9.5 immunoreactive structures. The threshold was derived from the brightness of intraepidermal nerve fibers in each section. All the structures of the area analyzed with the brightness equal to or higher than this pre-set threshold were marked as immunoreactive and their area expressed as a percentage of the whole subepidermal area analyzed ($200 \times 50 \mu\text{m}$ adjacent to the dermal–epidermal junction in each optical field; Fig. 1a,b). SENPD measurements were made from every third optical field along the entire epidermal length of each evaluated section (Fig. 1c) and the mean of all the obtained values was used for further analysis. Removal of the specimen and fixation procedures were performed in Brno, while further processing including cutting the samples, immunostaining, and viewing the sections were performed in Würzburg. All biopsy samples were first analyzed by a single observer unaware of the identity of the slides (E.M.) and samples were cross-checked by C.S. for internal consistency.

Statistical Analysis. Standard descriptive statistics and the variance ratio *F* test were used to summarize the distribution of the data. Both the IENFD and SENPD values showed a normal distribution of the data within the controls and the group of patients with neuropathy (variance *F* ratio 1.38; *P* = 0.333). These results justified the use of parametric testing for further analysis of the data. The univariate *t*-test was used to compare the various results obtained from the controls and the group of patients with neuropathy, whereas comparison between all three groups of individuals was performed by one-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey's post hoc correction. With re-

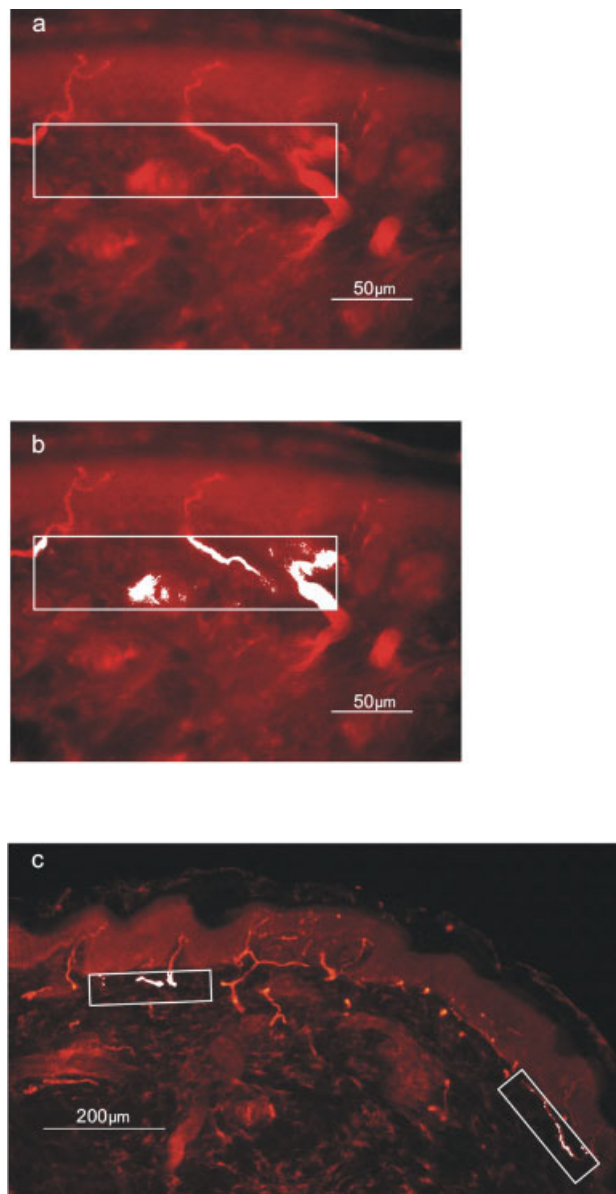


FIGURE 1. Images depicting the method for evaluation of the subepidermal nerve plexus on PGP-9.5-immunoreacted 40- μm cryosections of skin using a density threshold for PGP-9.5-immunoreactive structures and expressed as a percentage of the whole subepidermal area analyzed ($200 \times 50 \mu\text{m}$ adjacent to the dermal–epidermal junction in each third optical field). **(a)** Original digitized image. **(b)** Density threshold set for morphometric determination of the nerve fiber area (bar, $50 \mu\text{m}$). **(c)** An image with a lower magnification showing the subepidermal area used for assessment of the subepidermal nerve plexus (bar, $200 \mu\text{m}$).

spect to multiple comparisons, $\alpha < 0.01$ was taken as the universal limit for statistical significance (based on Bonferroni's correction for multiple testing)¹ to ensure an experiment-wide overall α -level of <0.05 for any individual parameter. The best maximum-likelihood estimates for IENFD and SENPD cut-off values

Table 2. Results of psychophysical, neurophysiological, and clinical tests in patients and controls and their correlation with IENFD and SENPD (Pearson's correlation).

Test	Neuropathy group			Correlation with nerve fiber densities			
	pSFN	MFN	Controls	IENFD		SENPD	
				<i>r</i>	<i>P</i> -value	<i>r</i>	<i>P</i> -value
Thermal thresholds (dorsum of the right foot; °C)							
MLI-R CS	23.1 ± 7.3	21.2 ± 8.6	30.0 ± 0.8	0.103	NS	0.125	NS
WS	46.6 ± 2.7	46.4 ± 3.2	38.2 ± 1.9	-0.348	0.001	-0.145	NS
Sural SNAP amplitude (μV)	10.6 ± 5.0	3.0 ± 2.5	12.0 ± 4.1	0.213	0.03*	0.634	<0.001
Sympathetic skin response (lower extremities)							
Mean latency (ms)	2.1 ± 0.23	2.2 ± 0.26	2.1 ± 0.2	-0.171	NS	-0.202	NS
Maximal amplitude (mV)	1.2 ± 1.1	0.9 ± 0.9	1.3 ± 0.9	0.044	NS	0.113	NS
Elicibility (%)	72 ± 24	53 ± 37	81 ± 22	0.036	NS	0.170	NS
Heart-rate variability to deep breathing (%)	17.7 ± 10.6	16.4 ± 9.9	24.5 ± 10.9	-0.058	NS	-0.098	NS
Clinical findings							
VAS	6.6 ± 1.8	5.9 ± 2.5		-0.220	0.03*	0.042	NS
MNSI 1	7.7 ± 2.4	8.0 ± 2.0		-0.382	<0.001	-0.231	0.02*
MNSI 2	0.8 ± 1.0	2.8 ± 1.1		-0.170	NS	-0.470	<0.001
NSS	1.9 ± 0.8	2.49 ± 1.1		-0.127	NS	-0.256	0.01
NDS	3.6 ± 3.5	17.0 ± 11.8		-0.204	0.04	-0.482	<0.001

Values are mean ± standard deviation; MLI, method of limits; R, random variant of the test; CS, cold sensation threshold; WS, warm sensation threshold; SNAP, sensory nerve action potential. Other abbreviations defined in text.
*Borderline significance with *P*-values between 0.01 and 0.05.

were obtained from computer-assisted receiver-operating characteristic (ROC) curve analysis.²⁷ With respect to optimal combination of sensitivity and specificity, three different cut-offs were explored for each IENFD and SENPD to find a value with maximum sensitivity accompanied by reasonable specificity, and vice versa. Criteria for pSFN or MFN were used as the “independent reference standard” when looking at diagnostic validity, ROC analysis, sensitivity, and specificity of IENFD and SENPD. Correlation analyses were carried out using Pearson's correlation coefficient.

To assess the reproducibility of IENFD/SENPD values, two independent evaluations of 15 randomly selected skin samples were performed and the reproducibility was evaluated according to the standard methodology proposed by Bland and Altman,² which is based on the standard deviation of the differences between pairs of repeated measurements (SD_{diff}). The test-retest reproducibility assessed by this method was expressed as confidence limits of agreement.² Additionally, a standard ANOVA was employed to assess the proportion of total variability of the IENFD/SENPD related to the differences between repeated measurements.

RESULTS

Demographic, Clinical, and Neurophysiological Data.

Demographic patient characteristics did not differ between groups. Prominent etiological factors of

neuropathy were impaired glucose metabolism (25 patients with overt diabetes mellitus and 6 with impaired glucose tolerance only) and chronic harmful alcohol use or possible alcohol dependence (15 patients). The incidence and proportion of particular etiological factors were similar in both subgroups of neuropathy patients (Table 1).

Clinical examination revealed signs of small-fiber dysfunction (i.e., abnormal thermal or pain perception) in 44 of the 58 pSFN patients. Considering the fact that all the included patients had subjective symptoms of small-fiber involvement and abnormal thermal QST findings, these 44 cases thus complied with the criteria of probable small-fiber neuropathy,²¹ whereas the others in the pSFN subgroup complied with the criteria of possible small-fiber neuropathy. Thirty-eight of the 41 patients with MFN also displayed clinical signs of large-fiber sensory involvement (decreased proprioception at the toes, vibratory loss at or above the ankle, and generalized areflexia) that are considered exclusionary for the diagnosis of small-fiber neuropathy according to established criteria.^{21,42}

A summary of data from the neurophysiological and psychophysiological tests is given in Table 2. Cold and warm detection thresholds were significantly increased in both neuropathic groups compared with healthy controls, whereas no significant differences were found between pSFN and MFN patients. The

Table 3. IENFD (fibers/mm) and SENPD (% of the subepidermal area of the size 200 × 50 μm adjacent to the dermal–epidermal junction): basic summary statistics.

Groups compared	N	Mean (SD)	Median (min/max values)	Statistical test (P-value)
IENFD (fibers/mm)				
Controls	37	11.3 (3.0)	10.7 (3.2/17.4)	<0.001
Neuropathy group	99	5.5 (3.9)	4.8 (0.0/14.8)	
pSFN	58	5.9 (3.5)	5.2 (0.1/14.8)	=0.263
MFN	41	5.0 (4.2)	4.5 (0.0/14.7)	
SENPD*				
Controls	37	9.3 (2.5)	9.4 (3.4/14.7)	<0.001
Neuropathy group	99	4.5 (2.7)	4.2 (0.2/14.0)	
pSFN	58	5.7 (2.4)	5.3 (1.2/14.0)	<0.001
MFN	41	2.7 (2.0)	2.0 (0.2/7.4)	

Abbreviations defined in text.

*Percent of the subepidermal area of the size 200 × 50 μm adjacent to dermal–epidermal junction.

results obtained by the three QST methods were consistent and values did not differ significantly between methods.

The reduction of sensory nerve action potential amplitudes was the most frequent and remarkable abnormality in the MFN group when compared with healthy individuals and pSFN patients.

The sympathetic skin response was obtained less often in patients with MFN compared with both other groups (no response in the lower extremities was obtained in 24% of MFN patients, but only in 5% of pSFN patients and 0% of healthy controls). The latencies and amplitudes of the sympathetic skin response were similar in all three subgroups of patients (Table 2). In both the neuropathy subgroups, the values of all the cardiovascular autonomic tests were significantly lower than in healthy controls (Table 2).

Reproducibility of IENFD/SENPD Values. Both statistical methods employed (based on standard deviation of differences between pairs of repeated measurements and analysis of variance) confirmed a sufficient level of reproducibility of both IENFD/SENPD values. The 95% confidence limits for differences between pairs of measurement (based on evaluation of SD_{diff}) varied in the range ± 0.50 unit for IENFD and ± 0.55 unit for SENPD (i.e., $\pm 10\%$ – 12% of mean of primary values). Considering the suggested values of cut-off levels, such results for reproducibility are fully acceptable and comparable with the reproducibility of IENFD recently published elsewhere.^{7,40}

Using standard ANOVA, the variability of repeated measurements represented up to 15%–17% of total variability of the values, which again shows a good reproducibility of both the parameters tested (data not shown).

Diagnostic Performance of Intra- and Subepidermal Fiber Counts. Comparison of the groups demonstrated a clear reduction in both intra- and subepidermal nerve fiber/plexus density in the patients with neuropathies compared with the healthy controls ($P < 0.001$; Table 3). Comparing the subgroups of patients with neuropathy (i.e., pSFN and MFN), SENPD values were more reduced in patients with MFN ($P < 0.001$; Table 3).

Considering a probable overlap of IENFD and SENPD values between healthy controls and the neuropathy groups, the data were further processed by exact ROC analysis, which allowed the estimation of optimized cut-off points associated with the maximum sensitivity and specificity for each of the variables. Using a cut-off value of 8.8 fibers/mm, the sensitivity of IENFD examination in discrimination between patients with painful neuropathy and normal controls was 0.80 and the specificity 0.82 (Fig. 2a and Table 4). The same validity of IENFD examination was found for the discrimination between normal controls and the pSFN and MFN subgroups (Table 4). Evaluation of SENPD values alone reached a sensitivity of 0.81 and a specificity of 0.88 to discriminate between normal controls and patients with painful neuropathy when using 7.25% (percentage of immunoreactive area in the entire subepidermal area analyzed) as a cut-off point (Fig. 2b and Table 4), and a slightly lower validity in discriminating between normal controls and pSFN patients (Table 4).

Despite the close correlation between subepidermal and intraepidermal nerve fiber densities, the ROC curve of the SENPD showed even higher validity in discrimination between normal controls and MFN patients and allowed discrimination between patients with and without additional large-fiber in-

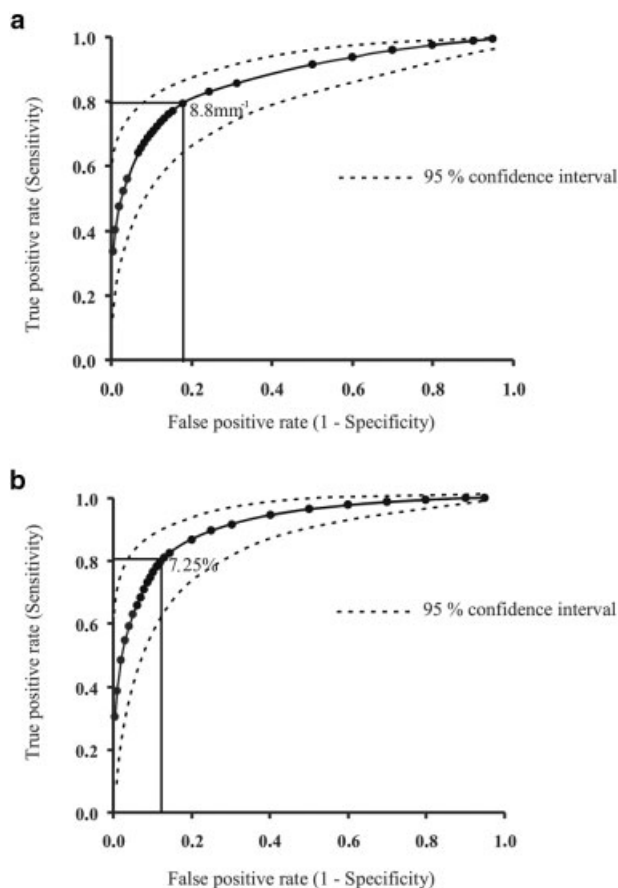


FIGURE 2. Receiver-operating characteristic (ROC) curves of IENFD (fibers/mm) (**a**) and SENPD (percent of the subepidermal area) (**b**) focused on discrimination between controls and patients with neuropathy. Chosen cut-off points are marked by the intersection of the horizontal and vertical lines.

involvement (Table 4). In some patients, SENPD was abnormal despite normal IENFD values, showing that SENPD may be an independent measure of SFN-associated pathology and thus increases the sensitivity of skin evaluation. This was the case for all of the 8 MFN patients and in 4 of 12 pSFN patients with normal IENFD values. When using both IENFD and SENPD in combination, the overall sensitivity of skin biopsy evaluation (defined as an abnormal result for at least one of the IENFD/SENPD values and using cut-offs with the highest validity expressed as the area under the curve obtained in ROC analysis; see Table 4) reached 1.00 in patients with MFN, 0.86 in patients with pSFN, and 0.92 in the whole painful neuropathy group.

Correlation of IENFD and SENPD with Clinical and Electrophysiological Data. Neither IENFD nor SENPD values were related to age or duration of clinical symptoms in the neuropathy group. Correlation

analysis of skin biopsy findings with psychophysical variables revealed an inverse correlation between IENFD values and warm sensation thresholds and lack of correlation with cold sensation thresholds (Table 2). In contrast, SENPD values correlated with most of the nerve conduction studies, but the correlations with thermal thresholds were not significant. The amplitude of the sural nerve sensory action potential yielded the best correlation with SENPD (Table 2), whereas its correlation with IENFD was weak with only borderline significance. The autonomic tests showed no significant correlation with IENFD and SENPD values (Table 2).

Correlation of IENFD and SENPD Values with Pain.

The intensity of neuropathic pain, assessed by the VAS, varied markedly within each group of neuropathy patients, without significant differences between the two groups. There was a trend toward an inverse correlation between VAS values and IENFD ($P = 0.03$; Table 2).

The values of the NSS and particularly the NDS were significantly higher in the MFN than pSFN group. Nevertheless, even in the MFN group the values were quite low, indicating predominantly sensory pathology in all patients. The scores reflecting large-fiber involvement often showed an absent, or at best a weak, correlation with IENFD values, whereas both the scores and most of their subscales correlated significantly with SENPD values (Table 2), again underscoring the usefulness of additional analysis of SENPD.

The MNSI 1 questionnaire more specifically reflects symptoms associated with small-fiber pathology. As expected, a closer correlation of the MNSI 1 sum score with IENFD compared with SENPD values was found (Table 2). The individual symptoms assessed by this score were therefore tested alone with respect to their possible correlation with IENFD. IENFD was significantly different between patients with and without a sensation of prickling, a feeling of numbness, and the presence of trophic skin changes in the lower extremities. For the items “worsening of symptoms at night” and “inability to differentiate between cold and hot water,” IENFD also differed in the presence or absence of these symptoms ($P = 0.03$ and 0.02 , respectively; Table 5). Taken together, these MNSI items therefore seem to have a high predictive value for small-fiber neuropathy.

DISCUSSION

The principal finding of this large, prospective study on intra- and epidermal nerve fiber densities in

Table 4. ROC analysis data.

	ROC curve		Critical test result value		
		(Maximum likelihood estimates)*	Cut-off point	Sensitivity at cut-off	Specificity at cut-off
IENFD (fibers/mm) Neuropathy vs. control group	Az	0.89 (0.81; 0.94)	≤8.80/mm	0.797	0.821
	a	1.36 (0.97; 1.75)			
	b	0.69 (0.39; 0.99)	≤7.77/mm [†]	0.686	0.95
IENFD (fibers/mm) pSFN vs. control group	Az	0.88 (0.78; 0.93)			
	a	1.40 (0.92; 1.88)	≤8.80/mm	0.772	0.796
	b	0.75 (0.39; 1.11)			
IENFD (fibers/mm) MFN vs. control group	Az	0.87 (0.77; 0.93)			
	a	1.31 (0.80; 1.84)	≤8.80/mm	0.766	0.811
	b	0.63 (0.29; 0.96)			
SENPD (%) Neuropathy vs. control group	Az	0.92 (0.85; 0.95)	≤7.25%	0.811	0.882
	a	1.81 (1.31; 2.32)			
	b	0.90 (0.51; 1.29)	≤6.30% [†]	0.780	0.95
SENPD (%) pSFN vs. control group	Az	0.90 (0.81; 0.95)			
	a	1.55 (0.99; 2.11)	≤7.25%	0.782	0.790
	b	1.02 (0.58; 1.46)			
SENPD (%) MFN vs. control group	Az	0.98 (0.93; 0.99)			
	a	3.10 (1.45; 4.74)	≤6.64%	0.950	0.892
	b	1.17 (0.12; 2.21)			
SENPD (%) pSFN vs. MFN	Az	0.85 (0.77; 0.93)			
	a	1.32 (0.82; 1.81)	≤3.76%	0.761	0.811
	b	0.69 (0.39; 0.99)			

ROC analysis of IENFD (fibers/mm) focused on discrimination between control data and data from patients with neuropathy, pSFN and MFN; ROC analysis of SENPD (% of the subepidermal area of the size 200 × 50 μm adjacent to the dermo-epidermal junction) between control data and data from patients with neuropathy, pSFN and MFN, and between pSFN and MFN.

*Parameters of binormal ROC curve: a, vertical of ROC curve; b, slope of the fitted ROC curve when plotted as a straight line on a normal deviate axis; both a and b given with 95% confidence intervals (in parentheses). Az, area under the ROC curve, given with asymmetric 95% confidence limits for binormal area estimate (in parentheses). Other abbreviations are defined in text.

[†]Values resulting from the traditional approach using the 5th percentile are given for comparison.

small-fiber neuropathy is that IENFD and SENPD are highly sensitive and specific diagnostic tools, particularly if used in combination. Beyond confirming and extending some earlier studies, we have added

an account of a quantitative analysis of SENPD and related these findings to clinical and neurophysiological parameters. SENPD values are reduced to a greater extent in patients with concomitant large-

Table 5. IENFD findings with relation to the presence or absence of particular symptoms and signs.

Symptom (in legs or feet)	Number of patients with symptom (%)		Mean IENFD with symptom		<i>t</i> -test (P-value)
	pSFN	MFN	Absent	Present	
Numbness	26 (45)	34 (83)	6.7	4.7	0.009
Burning pain	26 (45)	19 (46)	5.5	5.5	NS
Increased sensitivity to touch	17 (29)	15 (37)	5.6	5.2	NS
Muscle cramps	57 (98)	39 (95)	8.4	5.4	NS
Prickling	54 (93)	37 (90)	9.1	5.2	0.005
Allodynia	13 (22)	11 (27)	5.5	5.5	NS
Thermal sensory loss (hot/cold water)	28 (48)	19 (46)	6.3	4.6	0.03*
Open sore on foot	0 (0)	1 (2)	5.6	0.0	NS
Nocturnal worsening	55 (95)	31 (76)	7.9	5.1	0.02*
Painful feet when walking	45 (78)	26 (63)	5.8	5.4	NS
Insensitivity of feet when walking	11 (19)	24 (59)	6.0	4.6	NS
Skin changes (dryness, cracking)	18 (31)	9 (22)	6.3	3.4	<0.001
Amputation	0 (0)	1 (2)	5.6	0.0	NS

Abbreviations defined in text.

*Borderline significance with P-values between 0.01 and 0.05

fiber involvement and correlate better with nerve conduction study results, whereas IENFD is better correlated with warm detection thresholds and with the presence of certain neuropathy symptoms in the MNSI.

The evaluation of IENFD has recently become a standard tool in the diagnosis of small-fiber neuropathies. However, sensitivity and specificity of measuring IENFD or the diagnosis of small-fiber neuropathy are not yet clearly delineated, probably because of the lack of a clinical diagnostic "gold standard." Most studies used patients' complaints and symptoms for this purpose. If one sets these as 100%, the reported sensitivity of IENFD assessment for the diagnosis of small-fiber neuropathy ranges from 69% to 82%, with a specificity of 97%.^{20,22}

In the present study, we utilized a best-fit method, ROC curve analysis,^{8,9,27} to derive first the normal limits of IENFD values evaluated by fluorescence microscopy and then to assess exactly the diagnostic validity of this method. ROC curve analysis of our data demonstrated the high diagnostic validity of IENFD examination with immunofluorescence in the assessment of small-fiber sensory neuropathies, as has been reported previously using bright-field microscopy.^{4,25} Due to the different approach to setting cut-off values, the specificity of IENFD for the diagnosis of sensory neuropathies was slightly lower in our analysis than reported previously.^{4,25} To better illustrate the difference between these approaches, we supplied alternative cut-offs derived with a more traditional approach. The use of the 5th percentiles of the values obtained from the controls automatically constitutes a specificity of 95%. Using a cut-off at the level of the 5th percentile (precisely 7.78 fibers/mm), the specificity of IENFD in the present study reaches 95% with a sensitivity of 69% and, similarly, using the 6.3% cut-off (5th percentile of normal SENPD values) gives a sensitivity of SENPD of 78% (Table 4). The estimation of cut-offs from the ROC curve is, in our view, less dependent on the sample distribution, provides better control of both the sensitivity and specificity of the test, and allows both false-positive and false-negative values to be minimized. Furthermore, the ROC data can be better compared between studies and replicated.^{8,9,27}

IENFD and SENPD probably reflect an involvement of partly different subpopulations of nerve fibers prone to be involved at different stages and in different types of neuropathy. SENPD correlates more closely with large-fiber sensory involvement, and SENPD values were significantly lower in cases of mixed neuropathy compared with IENFD. Small myelinated fibers, which contribute to the subepider-

mal plexus, could possibly be the primary target of some causative factors. We cannot exclude the possibility that the SENPD abnormality in several IENFD-normal cases is explained simply by a type II statistical error.

A comparison of IENFD between the groups showed no significant difference between the patients with and without concomitant large-fiber involvement. This finding shows that intraepidermal nerve fiber (IENF) loss may occur independently of large-fiber loss, but it may also indicate that IENF loss is not specific for the small-fiber neuropathy as an independent entity according to the definition provided by Stewart et al.⁴² and Lacomis.²¹ As may have been expected, we found a weak or absent correlation of IENFD values with nerve conduction studies, including the sural nerve sensory action potential, and confirmed the predominantly small-fiber origin of IENFs. An absent or at most weak correlation between sural nerve sensory action potential and IENFD has also been found in previous studies.^{14,24,41} Furthermore, in those studies, a broader spectrum of individuals was studied than in the present investigation, including patients with severe clinical symptoms and absent sural nerve sensory action potentials, as well as those with normal sural nerve sensory action potentials and no clinical symptoms¹¹ or signs^{23,39} of small-fiber involvement. In general, the results of a correlation analysis are more clear-cut when data from individuals with minimal or no clinical symptoms or signs are included, because this usually increases the absolute values of correlation coefficients as well as their clinical significance. From the data reported herein, the diagnostic usefulness of standard nerve conduction studies for detecting SFN is again not substantiated.

Similarly, a correlation of IENFD values with thermal thresholds is more often found when both individuals with and without neuropathy are included in the analysis,^{30,33,39} than in strictly defined groups of neuropathy patients with clinical symptoms and signs of small-fiber neuropathy.^{14,32} When the first type of study is considered, closer correlations with heat pain and warm sensation thresholds are described rather than with cold sensation.^{30,33,39} In our neuropathy group, only weak correlations between IENFD with warm sensation thresholds and no significant correlations with cold perception were observed. These findings suggest that these methods are rather complementary and both of them are useful diagnostic tools in the evaluation of patients with SFN.

The lack of correlation between IENFD and age of patients or duration of symptoms is not surprising

given the heterogeneity of etiological factors, and the severity of involvement in our cohort. There is a considerable interindividual variability of nerve counts in normal humans, which may be the reason that a correlation of IENFD and age was more frequently described when the normal group was larger than in our study,^{7,43} although this was not the case in all such studies.²⁵

A poor or absent correlation between the autonomic tests (particularly the sympathetic skin response and heart-rate variability) and cutaneous nerve fiber density has been reported previously by Pan et al.³¹ in patients with Guillain-Barré syndrome, whereas a better correlation was reported with the quantitative sudomotor axon reflex test.²⁹ The reason for this finding could be that epidermal sensory nerve fibers and autonomic fibers represent different subpopulations of fibers that are involved independently by the disease process. Our population was restricted to patients with pain and signs of sensory small-fiber involvement, whereas autonomic clinical signs and symptoms were rare. Another reason could be a lower sensitivity of both the sympathetic skin response and heart-rate variability used for the assessment of autonomic dysfunction in our study.

Only a trend toward inverse correlation of IENFD with the global intensity of neuropathic pain, as assessed by VAS, was detected, with borderline statistical significance. Similar findings have been reported previously, such as in patients with human immunodeficiency virus infections,^{11,34} and might be explained by the complex origin of neuropathic pain, which includes a broad spectrum of changes at several levels in the sensory pathways, such that its intensity may not be directly related to intraepidermal C-nociceptor numbers.

In contrast to the relationships involved in the intensity of neuropathic pain, the presence of symptoms related mainly to small-fiber dysfunction (MNSI questionnaire) showed a close correlation with IENFD. Of the individual symptoms, prickling, feeling of numbness, the presence of trophic skin changes, and to a lesser extent worsening of symptoms at night and inability to differentiate between cold and hot water in the lower extremities, all showed a strong association with small-fiber loss and should be given particular weight in the evaluation of MNSI questionnaire results in patients with suspected SFN. In contrast to the first part of the questionnaire, the second part of the MNSI better reflects large-fiber function (sensation to touch and vibration, ankle reflexes). Similar to the neurophysiological findings, items from this part of the ques-

tionnaire correlated better with SENPD than IENFD. In our hands, the NSS and NDS did not prove useful in the evaluation of SFN patients, which underscores the fact that both of these scales relate mainly to large-fiber dysfunction.^{5,33}

In conclusion, we have demonstrated a high diagnostic validity of both intra- and subepidermal nerve fiber/plexus density values in patients with painful sensory neuropathies. These parameters appear to be complementary to each other and to QST, and the examination of both of them further increases the sensitivity and specificity of skin biopsy examination.

The data in this study were presented in part at meetings of the European Neurological Society (May 2006, Lausanne, Switzerland), Peripheral Nerve Society (July 2005, Tuscany, Italy), and European Federation of Neurological Sciences (September 2005, Athens, Greece, and September 2006, Glasgow, UK). The study was supported by the Czech Ministry of Education Research Plan No. MSM0021622404 and intramural University of Würzburg research funds. E. Vlckova-Moravcova performed the morphological studies at the University of Würzburg and was supported by a fellowship from the European Neurological Society (ENS). The authors thank B. Gado, B. Broll, B. Dekant, H. Klüpfel, M. Voborná, M. Šestáková, J. Rychtecká, J. Zaoralová, M. Koščálová, and A. Long for providing expert technical help and Z. Kadaňka and S. Vohánka for their support and critical discussions.

REFERENCES

1. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc B* 1995;57:125-133.
2. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1986;i:307-310.
3. Bril V, Nyunt M, Ngo M. Limits of the sympathetic skin response in patients with diabetic polyneuropathy. *Muscle Nerve* 2000;23:1427-1430.
4. Chien HF, Tseng TJ, Lin WM, Yang CC, Chang YC, Chen RC, et al. Quantitative pathology of cutaneous nerve terminal degeneration in the human skin. *Acta Neuropathol (Berl)* 2001;102:455-461.
5. Dyck PJ, Sherman WR, Hallcher LM, Service FJ, O'Brien PC, Grina LA, et al. Human diabetic endoneurial sorbitol, fructose, and myo-inositol related to sural nerve morphometry. *Ann Neurol* 1980;8:590-596.
6. Feldman EL, Stevens MJ, Thomas PK, Brown MB, Canal N, Greene DA. A practical two-step quantitative clinical and electrophysiological assessment for the diagnosis and staging of diabetic neuropathy. *Diabetes Care* 1994;17:1281-1289.
7. Goransson LG, Mellgren SI, Lindal S, Omdal R. The effect of age and gender on epidermal nerve fiber density. *Neurology* 2004;62:774-777.
8. Hajian-Tilaki KO, Hanley JA, Joseph L, Collet J-P. A comparison of parametric and nonparametric approaches to ROC analysis of quantitative diagnostic tests. *Med Decis Making* 1997;17:94-102.
9. Hanley JA. The robustness of the "binormal" assumptions used in fitting ROC curves. *Med Decis Making* 1988;8:197-203.
10. Herrmann DN, Griffin JW, Hauer P, Cornblath DR, McArthur JC. Epidermal nerve fiber density and sural nerve morphom-

- etry in peripheral neuropathies. *Neurology* 1999;53:1634–1640.
11. Herrmann DN, McDermott MP, Henderson D, Chen L, Akowuah K, Schifitto G. Epidermal nerve fiber density, axonal swellings and QST as predictors of HIV distal sensory neuropathy. *Muscle Nerve* 2004;29:420–427.
 12. Hoitsma E, Reulen JP, de Baets M, Drent M, Spaans F, Faber CG. Small fiber neuropathy: a common and important clinical disorder. *J Neurol Sci* 2004;227:119–130.
 13. Holland NR, Crawford TO, Hauer P, Cornblath DR, Griffin JW, McArthur JC. Small-fiber sensory neuropathies: clinical course and neuropathology of idiopathic cases. *Ann Neurol* 1998;44:47–59.
 14. Holland NR, Stocks A, Hauer P, Cornblath DR, Griffin JW, McArthur JC. Intraepidermal nerve fiber density in patients with painful sensory neuropathy. *Neurology* 1997;48:708–711.
 15. Kadaňka Z, Bednařík J, Vohánka S. Practical electromyography. Brno: IDPVZ; 1994. p 1–180.
 16. Kakigi R, Shibasaki H, Tanaka K, Ikeda T, Oda K, Endo C, et al. CO₂ laser-induced pain-related somatosensory evoked potentials in peripheral neuropathies: correlation between electrophysiological and histopathological findings. *Muscle Nerve* 1991;14:441–450.
 17. Kemler MA, Reulen JP, van Kleef M, Barendse GA, van den Wildenberg FA, Spaans F. Thermal thresholds in complex regional pain syndrome type I: sensitivity and repeatability of the methods of limits and levels. *Clin Neurophysiol* 2000;111:1561–1568.
 18. Kennedy WR, Wendelschafer-Crabb G. Utility of the skin biopsy method in studies of diabetic neuropathy. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1999;50(suppl):553–559.
 19. Kennedy WR, Wendelschafer-Crabb G, Johnson T. Quantitation of epidermal nerves in diabetic neuropathy. *Neurology* 1996;47:1042–1048.
 20. Kennedy WR, Wendelschafer-Crabb G, Polydefkis M, McArthur JC. Pathology and quantitation of cutaneous innervation. In: Dyck PJ, Thomas PK, editors. *Peripheral neuropathy*. Philadelphia: Elsevier; 2005. p 869–895.
 21. Lacomis D. Small-fiber neuropathy. *Muscle Nerve* 2002;26:173–188.
 22. Lauria G, Cornblath DR, Johansson O, McArthur JC, Mellgren SI, Nolano M, et al. EFNS guidelines on the use of skin biopsy in the diagnosis of peripheral neuropathy. *Eur J Neurol* 2005;12:747–758.
 23. Lauria G, Morbin M, Lombardi R, Borgna M, Mazzoleni G, Sghirlanzoni A, et al. Axonal swellings predict the degeneration of epidermal nerve fibers in painful neuropathies. *Neurology* 2003;61:631–636.
 24. Loseth S, Lindal S, Stalberg E, Mellgren SI. Intraepidermal nerve fibre density, quantitative sensory testing and nerve conduction studies in a patient material with symptoms and signs of sensory polyneuropathy. *Eur J Neurol* 2006;13:105–111.
 25. McArthur JC, Stocks EA, Hauer P, Cornblath DR, Griffin JW. Epidermal nerve fiber density: normative reference range and diagnostic efficiency. *Arch Neurol* 1998;55:1513–1520.
 26. McCarthy BG, Hsieh ST, Stocks A, Hauer P, Macko C, Cornblath DR, et al. Cutaneous innervation in sensory neuropathies: evaluation by skin biopsy. *Neurology* 1995;45:1848–1855.
 27. Metz CE. ROC methodology in radiologic imaging. *Invest Radiol* 1986;21:720–733.
 28. Moravcova E, Bednarik J. Computer-assisted thermal threshold testing—normative data and sources of variability. *Cesk Slov Neurol* 2003;66/99:263–269.
 29. Novak V, Freimer ML, Kissel JT, Sahenk Z, Periquet IM, Nash SM, et al. Autonomic impairment in painful neuropathy. *Neurology* 2001;56:861–868.
 30. Pan CL, Lin YH, Lin WM, Tai TY, Hsieh ST. Degeneration of nociceptive nerve terminals in human peripheral neuropathy. *Neuroreport* 2001;12:787–792.
 31. Pan CL, Tseng TJ, Lin YH, Chiang MC, Lin WM, Hsieh ST. Cutaneous innervation in Guillain-Barré syndrome: pathology and clinical correlations. *Brain* 2003;126:386–397.
 32. Periquet MI, Novak V, Collins MP, Nagaraja HN, Erdem S, Nash SM, et al. Painful sensory neuropathy: prospective evaluation using skin biopsy. *Neurology* 1999;53:1641–1647.
 33. Pittenger GL, Ray M, Burcus NI, McNulty P, Basta B, Vinik AI. Intraepidermal nerve fibers are indicators of small-fiber neuropathy in both diabetic and nondiabetic patients. *Diabetes Care* 2004;27:1974–1979.
 34. Polydefkis M, Yiannoutsos CT, Cohen BA, Hollander H, Schifitto G, Clifford DB, et al. Reduced intraepidermal nerve fiber density in HIV-associated sensory neuropathy. *Neurology* 2002;58:115–119.
 35. Proceedings of a consensus development conference on standardized measures in diabetic neuropathy. *Autonomic nervous system testing*. *Muscle Nerve* 1992;15:1158–1166.
 36. Proceedings of a consensus development conference on standardized measures in diabetic neuropathy. *Electrodiagnostic measures*. *Muscle Nerve* 1992;15:1150–1154.
 37. Said G. Small fiber involvement in peripheral neuropathies. *Curr Opin Neurol* 2003;16:601–602.
 38. Saunders JB, Aasland OG, Babor TF, de la Fuente JR, Grant M. Development of the Alcohol Use Disorders Identification Test (AUDIT): WHO Collaborative Project on Early Detection of Persons with Harmful Alcohol Consumption—II. *Addiction* 1993;88:791–804.
 39. Shun CT, Chang YC, Wu HP, Hsieh SC, Lin WM, Lin YH, et al. Skin denervation in type 2 diabetes: correlations with diabetic duration and functional impairments. *Brain* 2004;127:1593–1605.
 40. Smith AG, Howard JR, Kroll R, Ramachandran P, Hauer P, Singleton JR, et al. The reliability of skin biopsy with measurement of intraepidermal nerve fiber density. *J Neurol Sci* 2005;228:65–69.
 41. Smith AG, Ramachandran P, Tripp S, Singleton JR. Epidermal nerve innervation in impaired glucose tolerance and diabetes-associated neuropathy. *Neurology* 2001;57:1701–1704.
 42. Stewart JD, Low PA, Fealey RD. Distal small fiber neuropathy: results of tests of sweating and autonomic cardiovascular reflexes. *Muscle Nerve* 1992;15:661–665.
 43. Umapathi T, Tan WL, Tan NC, Chan YH. Determinants of epidermal nerve fiber density in normal individuals. *Muscle Nerve* 2006;33:742–746.
 44. Yarnitsky D. Quantitative sensory testing. *Muscle Nerve* 1997;20:198–204.
 45. Yarnitsky D, Ochoa JL. Warm and cold specific somatosensory systems. Psychophysical thresholds, reaction times and peripheral conduction velocities. *Brain* 1991;114:1819–1826.
 46. Yarnitsky D, Sprecher E. Thermal testing: normative data and repeatability for various test algorithms. *J Neurol Sci* 1994;125:39–45.

6. Bednarik J, Vlckova-Moravcova E, Bursova S, Belobradkova J, Dusek L, Sommer C. *Etiology of small-fiber neuropathy. J Peripher Nerv Syst* 2009;14:177-183. doi: 10.1111/j.1529-8027.2009.00229.x. IF: 3,623. Počet citací v SCI: 41.

Oceněno cenou České neurologické společnosti ČLS JEP za vynikající originální práci roku 2009.

Jedná se o prioritní publikovanou prospektivní studii hodnotící prevalenci velkého množství etiologických faktorů neuropatie tenkých vláken v souboru pacientů s klinicky a paraklinicky přesvědčivě prokázanou SFN a poskytující srovnání výskytu těchto faktorů s také prospektivně hodnocenou skupinou kontrolních asymptomatických jedinců obdobného věku a pohlaví. Jako nejvýznamnější etiologické faktory SFN práce prokazuje diabetes mellitus a chronický abusus alkoholu. Práce také jako jedna z prvních poukázala na etiologický význam hyperlipidémie, který byl v následujícím období potvrzen řadou dalších studií a nyní je hyperlipidémie akceptována jako prokázaný etiologický faktor neuropatie tenkých vláken. Výskyt dalších etiologických faktorů, které byly zachyceny ve skupině pacientů se SFN, zde nebyl významně častější než ve skupině kontrolní. Výsledky práce dále naznačují, že spektrum a proporcionální zastoupení zjištěných etiologických faktorů SFN ani podíl idiopatických případů (cca ¼) se významně neliší od nálezů popisovaných u pacientů s neuropatií silných vláken. Obdobné nálezy navíc studie prokázala i u skupiny pacientů s kombinovaným postižením tenkých a silných nervových vláken, což spolu s výše uvedenými nálezy opět poskytlo argumenty proti konceptu neuropatie tenkých vláken jako izolovaného postižení a naopak podpořilo její začlenění do kontinuálního spektra polyneuropatií. Tento přístup je v současnosti v odborné veřejnosti plně akceptován.

RESEARCH REPORT

Etiology of small-fiber neuropathy

Josef Bednarik¹, Eva Vlckova-Moravcova¹, Sarka Bursova¹, Jana Belobradkova²,
Ladislav Dusek³, and Claudia Sommer⁴

¹Department of Neurology, University Hospital and Masaryk University, Brno; ²Department of Internal Medicine and Gastroenterology, Diabetologic Centre, University Hospital, Brno; ³Institute of Biostatistics and Analyses, Masaryk University, Brno, Czech Republic; and ⁴Department of Neurology, Julius-Maximilians University, Würzburg, Germany

Abstract The aim of this study was to evaluate the etiology in a group of 84 patients with painful sensory neuropathy with predominant small-fiber dysfunction (54 men and 30 women, median: 58; range: 25–83 years) recruited from a population of the South Moravian region of the Czech Republic. Involvement of small nerve fibers was verified by abnormal thermal thresholds and/or reduced intraepidermal nerve fiber densities. Motor signs or symptoms or significant clinical signs of sensory large-fiber involvement were exclusionary; 33 patients, however, had sensory nerve conduction abnormalities. For comparison, the prevalence of risk factors was assessed in a group of 47 asymptomatic age- and sex-matched controls (30 men and 17 women, median: 59; range: 29–85 years). The multivariate regression model disclosed that diabetes mellitus (odds ratio [OR] = 4.08), chronic alcoholism (OR = 5.31), and serum cholesterol levels (OR = 4.51) were the only parameters independently associated with small-fiber involvement. No possible etiology was detected in 19 patients (22.6%). In conclusion, the spectrum of risk factors and proportion of idiopathic cases in geographically defined small-fiber polyneuropathy sample is similar to that referred in large-fiber polyneuropathy.

Key words: etiology, painful sensory neuropathy, risk factors, small-fiber neuropathy

Introduction

Small-fiber neuropathy (SFN) typically presents with positive sensory symptoms including peripheral neuropathic pain and/or symptoms of autonomic dysfunction (Lacomis, 2002; Devigili et al., 2008) and is reported to be associated with a wide range of diseases or conditions (Lacomis, 2002; Hoitsma et al., 2004; Devigili et al., 2008). Only a few conditions have a potential causal relationship to SFN while, for most reported causal disorders, the association is based on case reports or case series. It is reported that no specific etiology can be identified in the majority of

SFN patients, especially in the elderly (Periquet et al., 1999; Lacomis, 2002; Hoitsma et al., 2004). The aim of the present study was to investigate the etiology of SFN in a well-defined group of patients with SFN with and without abnormalities in nerve conduction studies (NCS) compared with potential risk factors in control subjects.

Materials and Methods

Subjects

Patients were prospectively recruited from consecutive patients referred to the Peripheral Neuropathy Outpatient Clinic of the Brno University Hospital between September 1999 and March 2005 from a population of 1 million people in the South Moravian region of the Czech Republic. They reported

Address correspondence to: Josef Bednarik, Department of Neurology, University Hospital and Masaryk University, Jihlavská 20, Brno 625 00, Czech Republic. Tel: +420532232501; Fax: +420532232249; E-mail: jbednar@fnbrno.cz

at least 6 months of positive painful sensory symptoms in a distal symmetrical distribution in the lower limbs. After the exclusion of patients with (1) signs of central nervous system involvement, (2) other neuropathic and non-neuropathic diseases or conditions leading to foot pain, (3) motor nerve dysfunction, or (4) significant large-fiber sensory loss (decreased proprioception at the toes, vibratory loss at or above the ankles, and generalized areflexia), a group of patients with painful sensory polyneuropathy with predominant involvement of sensory small nerve fibers ($n = 110$) was identified. All underwent clinical examination including detailed history, semi-quantitative evaluation of touch, pain, cold and warm, proprioception, and vibration sensations using hand-held devices. All were evaluated with the neuropathy symptom score (NSS), neuropathy impairment score (NIS) (Dyck et al., 1987), and Michigan neuropathy screening instrument questionnaire (MNSI) (Feldman et al., 1994). The mean intensity of neuropathic pain during the week before clinical and electrophysiological testing was assessed using a 10-cm visual analog scale (VAS). NCS and needle electromyography, skin biopsy (Lauria et al., 2005), and quantitative sensory thermal threshold testing (Yarnitski, 1997) was performed using standard methodology. Those patients meeting the criteria of definite or probable SFN according to Lacomis (2002) were included. There were 84 subjects (54 men and 30 women) with a median age of 58.5 years (range: 25–83 years). Patients were further classified by NCS as SFN (those without sensory NCS abnormalities: $n = 51$, 31 men, 20 women, median age 58.0, range 38–83 years) and as mixed-fiber neuropathy (MFN) (with additional abnormalities on sensory NCS: $n = 33$, 23 men, 10 women, median age 64.0, range 25–81 years). The diagnostic aspects of this group and detailed correlations between laboratory and clinical signs of small- and large-fiber involvement in a subset of 30 patients with impaired glucose metabolism were described elsewhere (Vickova-Moravcova et al., 2008a; 2008b).

A group of 47 sex- and age-matched, healthy volunteers from the same region (30 men, 17 women, median age 58 years, range 29–85) was recruited, mainly among the hospital employees and their relatives and partly also from the individuals admitted to the Department of Neurology of the Brno University Hospital for headache and/or acute neck and/or low back pain. Controls had neither positive sensory symptoms nor signs of peripheral neuropathy.

The protocol was approved by the Ethics Committee of the University Hospital Brno, and written informed consent was obtained from all patients and volunteers before inclusion into the study.

Clinical data collection

All patients and controls were interviewed about past medical history, family history, past and present medications and exposure to environmental toxins, cigarettes, and alcohol drinking habits.

Quantification of alcohol consumption and confirmation of harmful alcohol use and possible alcohol dependence was performed according to the Alcohol Use Disorders Identification Test (AUDIT) manual (Saunders et al., 1993). A cut-off score of 8 or more was used as an indicator of harmful alcohol use. The alcohol intake was further quantified using standard drinks. According to the Czech version of AUDIT, a standard drink (s.d.) corresponds to 16 g of alcohol, whereas the original WHO AUDIT assumes that a s.d. equivalent is 10 g of alcohol and a UK s.d. is equal to 8 g of alcohol (Hughes et al., 2004). Furthermore, we used two cut-offs: 21/14 (men/women) s.d./per week (corresponding to 48/32 g of alcohol/per day, i.e., 3/2 Czech standard drinks) and 10.5/7 s.d./week (24/16 g/day, i.e., 3/2 UK standard drinks). Lastly, an abnormal AUDIT score or abnormal amount of s.d. was further combined with positivity of several tests providing a possible indication of recent excessive alcohol consumption or misuse: serum gamma-glutamyl transferase (GGT), carbohydrate deficient transferrin (CDT), mean corpuscular volume (MCV) of red blood cells and serum aspartate aminotransferase (AST).

The height and weight were used to calculate body mass index (BMI).

Blood and other auxiliary tests

Biochemical, hematological, and immunological tests in the neuropathy group included fasting glucose, oral glucose tolerance test (oGTT), glycosylated hemoglobin (HbA1C), liver (bilirubin, GGT, AST, alanine aminotransferase [ALT]), renal (urea and creatinine) and thyroid (free thyroxine [fT4] and thyroid stimulating hormone [TSH]) profiles; vitamin B12 and folate levels; cholesterol and triglycerides (triacylglycerole [TAG]) (both fasting), complete blood count, serum protein electrophoresis and immunofixation, antinuclear antibodies (ANA), antibodies against glycolipids and glycoproteins, paraneoplastic antibodies, serological tests (antibodies against *Borrelia burgdorferi*, *afzelii* a *garii* IgG and IgM, neuroviruses, HIV, hepatitis B and C viruses, rapid plasma reagin, and *Treponema pallidum* hemagglutination tests), urine analysis, chest radiogram, and abdominal ultrasound examination.

Cytological, biochemical, and serological examination of cerebrospinal fluid was performed in all patients with a history of tick bite or erythema migrans and/or with positive serum antiborrelia antibodies ($n = 30$).

The diagnosis of diabetes mellitus (DM), impaired glucose tolerance (IGT), and impaired fasting glucose

(IFG) was made according to the recommendation of the American Diabetes Association (*Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 2002*).

The control subjects underwent the same clinical and laboratory evaluation as the patients with the exception of lumbar puncture and chest radiogram and abdominal ultrasound examination. Four control subjects had cerebrospinal fluid examination performed in the past in order to exclude suspected neuroborreliosis—in two cases with positive results and followed by appropriate treatment. As some control subjects were not willing to undergo oGTT ($n = 17$), their results were not analyzed.

Statistical analyses

Quantitative parameters were summarized by standard parametric and rank statistics: median, 5–95% percentiles, mean, standard error, 95% confidence limits. Standard univariate statistics were used to examine the differences between subgroups of patients or the association between particular parameters (χ^2 test for categorical variables, t -test for continuous variables). The majority of included laboratory measures suffered from outlying values or revealed log-normal type of sample distribution, namely, when categorized into groups. That is why log transformation of primary values was adopted prior to any parametric comparisons of groups. Consequently, geometric mean supported by 95% confidence limits was estimated within the compared groups.

Both univariate and multivariate logistic regression strategy was applied to quantify the association of the examined etiological factors with neuropathy. Odds ratio (OR) with 95% confidence limits was estimated and tested in Wald chi-square test. Parameters with potential risk power (providing at least $p < 0.10$ in univariate logistic regression) were further examined for mutual correlation, and interaction terms were coded and tested for significantly correlated pairs of variables. The final set of potential prognostic factors and interaction terms (coded as binary variables according to the cut-off points) was subjected to backward stepwise selection algorithm in multivariate logistic regression (driven by maximum likelihood ratio test).

Results

The range and proportions of all evaluated demographic, clinical, and laboratory variables were similar in the SFN and MFN subgroups with the only exception of age that was higher in MFN (data not shown). Therefore, all presented results compare the entire group of neuropathy patients with controls.

DM was a significant risk factor for neuropathy (Tables 1 and 2) together with glycemia and HbA1C. All cases were of type 2 with the exception of two cases of type 1. The association between the presence of IFG and neuropathy was not significant. IGT detected by oGTT was found in 12 of 84 patients (14.3%) and in 2 of 30 controls (6.7%).

Hazardous drinking expressed as increased AUDIT score or increased number of standard drinks was significantly higher in the male patients only. Association with neuropathy, however, dramatically increased when these parameters were combined with laboratory indicators of alcohol misuse (Tables 1 and 2). CDT and MCV separately increased the risk of neuropathy.

Serum levels of cholesterol and uric acid occurred with increased prevalence in the neuropathy group (Table 1). There was a trend toward higher levels of triglycerides in the patient group, without statistical significance.

Multivariate analysis revealed that DM, hazardous drinking, and cholesterol were the only parameters independently and significantly associated with the painful sensory neuropathy group. The other laboratory parameters inter-correlated with either diabetes (glycemia, HbA1C, and TAG) or hazardous drinking (MCV, CDT, GGT, AST, and ALT), or both (uric acid). DM and hazardous drinking were mutually independent (χ^2 test: $p = 0.913$) and occurred mostly independently in the data set (only 3.8% of subjects had both conditions).

The multivariate logistic regression model revealed that diabetes, hazardous drinking, and increased serum cholesterol contributed independently to the risk of painful sensory neuropathy and constituted a very significant prediction model for this end-point (Table 3). Validation of this prediction model showed that it was able to correctly classify 89.3% cases with neuropathy and 67.9% of cases without neuropathy (Table 4).

We found several other possible etiological factors in individuals in our neuropathy group: monoclonal gammopathy (in six patients), malignancy (eight), chemotherapeutic agents (four), hypothyroidism (four), systemic auto-immune disease (two), neuroborreliosis (confirmed by cerebrospinal fluid examination according to *Halperin et al., 1996*) (eight), but without any statistically significant association compared with control group.

Cryptogenic cases: No possible etiology was detected in 19 patients (22.6%); 7 cases belonged to the MFN subgroup (21.2%) and 12 to the SFN subgroup (23.5%).

At least one of the possible etiological factors for neuropathy was present in 23 asymptomatic controls (48.9%).

Table 1. Demographic features of studied subgroups and prevalence of potential risk factors of sensory small-fiber neuropathy.

Parameter	Healthy controls and neuropathy patients		
	Controls (N = 47)	Patients (N = 84)	p level*
Demographic features and general medical conditions			
Age [†]	59 (2)	58 (1)	0.915
Male sex	63.8%	64.3%	0.958
BMI (kg/m ²)	25.8 (1.9)	26.3 (2.9)	0.282
DM	12.8%	34.5%	0.005
IFG	12.8%	10.7%	0.725
Arterial hypertension	59.6%	51.2%	0.354
Chronic lower limb ischemia	19.2%	23.8%	0.534
Alcohol intake			
AUDIT (standard drinks) [‡]			
Men (s.d.) [§]	1 (0; 10.5)	3 (0; 28)	0.048
Women (s.d.) [§]	0 (0; 2)	0 (0; 7.5)	0.303
Men: ≥10.5 s.d./week	10.0%	35.2%	0.007
Women: ≥7 s.d./week	5.9%	10.0%	0.618
AUDIT (score)			
Men (score) [§]	2 (1; 8)	4 (0; 17)	0.132
Women (score) [§]	1 (0; 4)	1 (0; 6)	0.101
Men: ≥8 (score)	16.7%	38.9%	0.029
Women: ≥8 (score)	5.9%	10.0%	0.618
Laboratory markers of alcohol misuse: 0	61.7%	63.1%	0.874
Laboratory markers of alcohol misuse: ≥2	8.5%	14.3%	0.321
AUDIT (10.5/7) + 1 [¶]	4.3%	19.1%	0.011
AUDIT (10.5/7) + 2 [¶]	0%	13.1%	0.001
AUDIT (21/14) + 1 [¶]	2.1%	10.7%	0.049
AUDIT (21/14) + 2 [¶]	0%	7.1%	0.019
Laboratory measures[†]			
CHOL	4.9 (0.2)	5.7 (0.2)	< 0.001
>5.1**	34.0%	70.2%	0.001
Glycemia	5.5 (0.3)	6.9 (0.4)	0.047
HbA1C	4.1 (0.2)	5.1 (0.3)	0.034
MCV	86.9 (0.5)	88.9 (0.6)	0.028
CDT	1.9 (0.1)	2.6 (0.3)	0.014
Uric acid	288.6 (10.6)	332.7 (12.0)	0.008

DM, diabetes mellitus; BMI, body mass index; IFG, impaired fasting glucose; s.d., standard drink; AUDIT, Alcohol Use Disorders Identification Test; CHOL, cholesterol; HbA1C, glycosylated hemoglobin; MCV, mean corpuscular volume; CDT, carbohydrate deficient transferrin.

*The groups were compared using ML goodness-of-fit test (binary and categorical variables) or by t-test for two independent samples. Absolute numbers of AUDIT scores were compared using Mann–Whitney *U* test.

[†]Quantitative variables are evaluated as mean supplied with standard error (in parentheses).

[‡]Standard drink corresponds to 16 g of alcohol.

[§]AUDIT score and standard drinks evaluated as median supplied with 5–95% percentiles (in parentheses).

[¶]Rate of patients exceeding 7/10.5 (men/women) s.d. or 14/21 s.d./week + at least one (two) positive laboratory marker of alcohol misuse (CDT, GGT, MCV, and AST). ** Percentage of patients with hypercholesterolemia.

Table 2. Significant risk factors of sensory small-fiber neuropathy found in univariate logistic regression models.

Parameter	Odds ratio	p-value
DM	3.60 (1.35; 9.56)	0.009
AUDIT (s.d.)*	1.06 (1.00; 1.13)	0.007
AUDIT (score)*	1.09 (1.01; 1.18)	0.043
AUDIT (10.5/7) + 1	5.29 (1.14; 24.49)	0.011
AUDIT (21/14) + 1	5.52 (1.01; 38.3)	0.048
CHOL*	1.90 (1.31; 2.77)	<0.001
Glycemia*	1.14 (1.01; 1.34)	0.048
HbA1C*	1.37 (1.01; 1.84)	0.021
MCV*	1.09 (1.03; 1.19)	0.027
CDT*	6.19 (1.62; 23.61)	0.001
Uric acid [†]	1.08 (1.02; 1.15)	0.005

DM, diabetes mellitus; AUDIT, Alcohol Use Disorders Identification Test; s.d., standard drink; CHOL, cholesterol; HbA1C, glycosylated hemoglobin; MCV, mean corpuscular volume; CDT, carbohydrate deficient transferrin; OR, odds ratio.

*OR calculated for increment +1 U.

[†]OR calculated for increment +10 U.

Discussion

This study prospectively evaluated the prevalence of a large list of possible etiological factors for SFN in a group of well-defined patients with painful sensory neuropathy and compared it with a prospectively recruited group of asymptomatic age- and sex-matched control group using very rigorous statistical methods. In a cohort of 51 SFN patients, we disclosed a spectrum of etiological factors and a proportion of cryptogenic cases similar to that reported in mixed-fiber polyneuropathy series. Moreover, etiological factors in a subgroup of 33 patients with additional large-fiber sensory involvement detected by NCS did not differ significantly from the SFN group.

We confirmed the importance of DM as the most frequent and powerful risk factor for SFN (OR = 3.6 in our study) (Smith et al., 2001; Sumner et al., 2003; Devigili et al., 2008). IGT is a well-identified condition increasing the risk of SFN (Smith et al., 2001; Sumner et al., 2003; Smith and Singleton, 2008). Hughes et al. (2004) found a high, but insignificant prevalence of IGT in painful cryptogenic polyneuropathy (8 out of 22 cases = 36.4%) and significantly higher 2-h glucose in patients with pain compared with controls. We found impaired oGTT in 12 patients (14.3%). If we, however, add cases with no other risk factor than impaired oGTT (9 cases) to cryptogenic cases (19 patients), the proportion of IGT cases will be similar (32.1%) to that reported by Hughes et al.

Chronic alcohol abuse is a well-recognized cause of both large- and small-fiber polyneuropathy. Among 98 alcohol-dependent subjects, Zambelis et al. (2006) found signs of SFN (either isolated or in combination with large-fiber neuropathy) in 37.7% of subjects; pain was present in 16.3%. Polyneuropathy was more

Table 3. Association of potential risk factors with neuropathy as risk end-point in multivariate logistic regression models.*

Parameters included in model	Coefficient (SE; p level)	Model log-likelihood [†]	Odds ratio [‡] (95% confidence limits)
Null model		–154.4	
Constant b_0	–0.94 (0.35; p = 0.006)		
Step 1. [CHOL > 5.1]	1.51 (0.44; p < 0.001)	–139.7**	4.51 (1.89; 10.8)
Step 2. [DM]	1.41 (0.56; p = 0.011)	–131.9**	4.08 (1.36; 12.3)
Step 3. +[AUDIT (10.5/7) + 1]	1.67 (0.81; p = 0.039)	–126.3**	5.31 (1.07; 26.44)

CHOL, cholesterol; DM, diabetes mellitus; AUDIT, Alcohol Use Disorders Identification Test; OR, odds ratio.

*Multivariate stepwise procedures are driven only by statistical measures (log-likelihood function).

[†]Log-likelihood ratio with global statistical test of the model: **p < 0.001.

[‡]Multivariate OR values adjusted for all variables entering the model.

Table 4. Validation of multivariate logistic regression model.

Model equation*: $Y = e^Z / (1 + e^Z)$	
Linear predictor Z: $-0.94 + 1.51 \times [\text{CHOL}] + 1.41 \times [\text{DM}] + 1.67 \times [\text{AUDIT} (7.10.5) + 1]$	
Cross-validation [†]	
Correctly classified patients with neuropathy (%)	89.3
Correctly classified patients without neuropathy (%)	67.9
Model residuals [‡]	
Patients without neuropathy	Mean: 0.32; median: 0.33; Min/Max: 0.18/0.81
Patients with neuropathy	Mean: 0.22; median: 0.22; Min/Max: 0.02/0.67

CHOL, cholesterol; DM, diabetes mellitus; AUDIT, Alcohol Use Disorders Identification Test.

*Dependent variable Y = probability of clinical manifestation of neuropathy.

[†]Cross-validation performed retrospectively on calibration data set (n = 131).

[‡]Quantitative residual summary in absolute values.

frequent in men and correlated significantly with liver dysfunction and macrocytosis. We also found an increased risk for SFN in men in the presence of liver and hematological abnormalities; symptomatic SFN in our series was found in 19.1% of subjects with increased intake of alcohol and at least one laboratory abnormality specific for chronic alcohol intake. The pathophysiology of SFN in alcoholics is complex. Some authors speculate on specific mechanisms of small and large fiber involvement with predominance of chronic sensory complaints in alcoholics without thiamine deficiency supporting the role of direct toxic effects of ethanol on small nerve fibers (Koike and Sobue, 2006).

Hyperlipidemia has been recently recognized as a significant risk factor for polyneuropathy. Hughes *et al.* (2004) found increased levels of triglycerides in chronic idiopathic axonal polyneuropathy in comparison with controls and an even more significant difference in a subset of painful cases. Similar findings were reported by Teunissen *et al.* (2002) for cholesterol levels. In our

patients, hypercholesterolemia proved to be an independent risk factor for SFN while hypertriglyceridemia correlated with DM. Smith *et al.* (2008) in a large series of idiopathic peripheral neuropathy patients found a significantly higher prevalence of metabolic syndrome (including hypercholesterolemia and hypertriglyceridemia) in neuropathy cases compared with a published normal population irrespective of the presence of impaired glucose metabolism. Moreover, normoglycemic neuropathy subjects had significantly more features of a metabolic syndrome (other than hyperglycemia) including hypertriglyceridemia and hypercholesterolemia than diabetics. These findings suggest that hyperlipidemia is a significant risk factor for neuropathy at least partly independent of impaired glucose metabolism. Further research is required to show whether specific lipid abnormalities have an impact on involvement of particular type of nerve fibers.

A predictive model based on impaired glucose metabolism, alcohol abuse, and hypercholesterolemia was able to correctly classify patients with and without painful sensory neuropathy in 89 and 68%, respectively. In spite of all the statistics, we cannot be sure about the causal relationship of our findings. For example, hypercholesterolemia or chronic alcohol abuse might be a marker of an unhealthy life, and some other factors inherent in this condition (not studied by us) might be underlying the neuropathy.

The other conditions or diseases with possible etiological impact on SFN development had a low prevalence in the general population. It is therefore not surprising that they showed no statistically significant association with SFN (compared with the asymptomatic group) and that there are differences in the prevalence of these rare etiological factors between published series.

Differences in reports on the spectrum of etiological factors in patients with SFN may be influenced by several methodological biases:

Any geographically limited and hospital-based cohort analysis (including ours) is not a true epidemiological study, and is prone to referral bias influencing possibly the spectrum and importance of potential risk factors, and should be taken into consideration when comparing with other studies (*McManis et al., 1994; Sorenson and Windebank, 2000*). The comparatively high proportion of hematological malignancies in our series influenced by the presence of a hematological center in our hospital referring patients to our Peripheral Neuropathy Center is an example of such a bias. Another pitfall could be the assessment of associated diseases, conditions, or risk factors based mainly on coincidence. This is well documented by the presence of at least one possible etiological factor for neuropathy in almost half of our control subjects.

The proportion of cryptogenic SFN cases reported in the literature varies widely. Periquet *et al.* (1999) in a group of 44 cases with burning feet and decreased intraepidermal nerve fiber density (IENFD) found associated conditions in 7% of cases only (i.e., 93% of cryptogenic cases) while De Sousa *et al.* (2006) in patients with sensory neuropathy and abnormal skin biopsy reported 50% of cryptogenic cases. In a group of 67 retrospectively analyzed patients with pure SFN, Devigili reported 41.8% of cryptogenic cases and additional follow-up decreased the proportion of cryptogenic cases to 31.4% (*Devigili et al., 2008*) (i.e., very close to our findings: 23.5% in the SFN subgroup and 21.2% in the MFN subgroup). Moreover, direct comparison with a subgroup with additional large-fiber sensory involvement did not change the prevalence of cryptogenic cases or the spectrum of possible etiological factors in our study. Our findings are thus in contrast to the frequently repeated belief that the etiological spectrum of SFN is specific and partly different from that of mixed-fiber neuropathies, and that most SFN cases are cryptogenic (*Lacomis, 2002; Hoitsma et al., 2004*).

In conclusion, the main risk factors for SFN in the South Moravian region of the Czech Republic are DM and chronic alcohol abuse. The possible role of elevated serum lipid levels requires further investigation. About one-quarter of the SFN cases remained cryptogenic. The spectrum of risk factors and proportion of cases with unknown etiology in SFN is similar to that reported in mixed-fiber polyneuropathy.

Acknowledgements

The data were presented in part at meetings of the European Neurological Society (2008, Nice, France) and European Federation of Neurological Sciences

(2006 Glasgow, UK). The study was supported by the Czech Ministry of Education Research Plan No. MSM0021622404, the Internal Grant Agency of the Czech Ministry of Health No. NS 9667–4, and intramural University of Würzburg research funds. E. V.-M. performed the morphological studies at the University of Würzburg supported by a Fellowship from the European Neurological Society (ENS). The authors also thank Prof. Klaus Toyka for his support.

References

- De Sousa EA, Hays AP, Chin RL, Sander HW, Brannagan TH 3rd (2006). Characteristics of patients with sensory neuropathy diagnosed with abnormal small nerve fibres on skin biopsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 77:983–985.
- Devigili G, Tugnoli V, Penza P, Camozzi F, Lombardi R, Melli G, Broglio L, Granieri E, Lauria G (2008). The diagnostic criteria for small fibre neuropathy: from symptoms to neuropathology. *Brain* 131:1912–1915.
- Dyck PJ, Melton J, O'Brien PC, Service FJ (1987). Approaches to improve epidemiological studies of diabetic neuropathy: insights from the Rochester Diabetic Neuropathy Study. *Diabetes* 46:S5–S8.
- Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus (2002). American Diabetes Association: clinical practice recommendations 2002. *Diabetes Care Suppl.* 1:S1–S147.
- Feldman EL, Stevens MJ, Thomas PK, Brown MB, Canal N, Greene DA (1994). A practical two-step quantitative clinical and electrophysiological assessment for the diagnosis and staging of diabetic neuropathy. *Diabetes Care* 17:1281–1289.
- Halperin JJ, Logigian EL, Finkel MF, Pearl RA (1996). Practice parameters for the diagnosis of patients with nervous system Lyme borreliosis (Lyme disease). Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 46:619–627.
- Hoitsma E, Reulen JP, de Baets M, Drent M, Spaans F, Faber CG (2004). Small fiber neuropathy: a common and important clinical disorder. *J Neurol Sci* 227:119–130.
- Hughes RA, Umapathi T, Gray IA, Gregson NA, Noori M, Pannala AS, Proteggente A, Swan AV (2004). A controlled investigation of the cause of chronic idiopathic axonal polyneuropathy. *Brain* 127:1723–1730.
- Koike H, Sobue G (2006). Alcoholic neuropathy. *Curr Opin Neurol* 19:481–486.
- Lacomis D (2002). Small-fiber neuropathy. *Muscle Nerve* 26:173–188.
- Lauria G, Cornblath DR, Johansson O, McArthur JC, Mellgren SI, Nolano M, Rosenberg N, Sommer C; European Federation of Neurological Societies (2005). EFNS guidelines on the use of skin biopsy in the diagnosis of peripheral neuropathy. *Eur J Neurol* 12:747–758.
- McManis P, Windebank A, Kiziltan M (1994). Neuropathy associated with hyperlipidemia. *Neurology* 44:2185–2186.
- Periquet MI, Novak V, Collins MP, Nagaraja HN, Erdem S, Nash SM, Freimer ML, Sahenk Z, Kissel JT, Mendell JR (1999). Painful sensory neuropathy: prospective evaluation using skin biopsy. *Neurology* 53:1641–1647.
- Saunders JB, Aasland OG, Babor TF, de la Fuente JR, Grant M (1993). Development of the Alcohol Use Disorders

- Identification Test (AUDIT): WHO Collaborative Project on Early Detection of Persons with Harmful Alcohol Consumption-II. *Addiction* 88:791–804.
- Smith AG, Ramachandran P, Tripp S, Singleton JR (2001). Epidermal nerve innervation in impaired glucose tolerance and diabetes-associated neuropathy. *Neurology* 57:1701–1704.
- Smith AG, Rose K, Singleton JR (2008). Idiopathic neuropathy patients are in increased risk for metabolic syndrome. *J Neurol Sci* 273:25–28.
- Smith AG, Singleton JR (2008). Impaired glucose tolerance and neuropathy. *Neurologist* 14:23–29.
- Sorenson EJ, Windebank AJ (2000). Hypertriglyceridemia in idiopathic painful small fiber neuropathy [abstract]. *Neurology* 54:A403.
- Sumner CJ, Sheth S, Griffin JW, Cornblath DR, Polydefkis M (2003). The spectrum of neuropathy in diabetes and impaired glucose tolerance. *Neurology* 60:108–111.
- Teunissen LL, Franssen H, Wokke JH, van der Graaf Y, Linssen WH, Banga JD, Laman DM, Notermans NC (2002). Is cardiovascular disease a risk factor in the development of axonal polyneuropathy? *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 72:590–595.
- Vlckova-Moravcova E, Bednarik J, Belobradkova J, Sommer C (2008a). Small-fiber involvement in diabetic patients with neuropathic foot pain. *Diabet Med* 25:692–699.
- Vlckova-Moravcova E, Bednarik J, Dusek L, Toyka K, Sommer C (2008b). Diagnostic validity of epidermal nerve fiber densities in painful sensory neuropathies. *Muscle Nerve* 37:50–60.
- Yarnitsky D (1997). Quantitative sensory testing. *Muscle Nerve* 20:198–204.
- Zambelis T, Karandreas N, Tzavellas E, Kokotis P, Liappas J (2006). Large and small fiber neuropathy in chronic alcohol-dependent subjects. *J Peripher Nerv Syst* 10:375–381.

7. Vlčková-Moravcová E, Bednařík J. *Painful sensory neuropathies in the elderly. Scripta Medica (Brno) 2009;82:16-24.*

Práce je zaměřena na charakteristiku bolestivé neuropatie u pacientů vyššího věku. Přes prokazatelně narůstající prevalenci bolestivé neuropatie ve vyšších věkových skupinách bylo dosud publikováno jen minimum prací, selektivně zaměřených na různé klinické a paraklinické aspekty bolestivé neuropatie u starších pacientů. Tyto nálezy byly proto zhodnoceny v této komentované studii. Prakticky u všech pacientů popisovaného souboru jedinců vyššího věku s bolestivou neuropatií bylo prokázáno postižení tenkých nervových vláken. Oproti mladším věkovým skupinám však byla u starších pacientů významně častější a těžší současná léze vláken silných, což v relaci s nálezy experimentálních studií zřejmě podporuje roli věkově podmíněných neurodegenerativních změn v rozvoji neuropatie u pacientů vyššího věku. Tyto nálezy tak podporují vzrůstající význam klinického vyšetření a kondukčních studií periferních nervů v diagnostice bolestivých neuropatií u starších pacientů, i když (vzhledem k průkazu izolovaného postižení tenkých nervových vláken u cca 1/3 hodnoceného souboru pacientů) nelze v diagnostickém algoritmu opomenout ani metody hodnotící postižení tenkých nervových vláken (tedy kožní biopsii a kvantitativní testování termické a algické senzitivity). Nálezy prezentované studie navíc prokazují použitelnost obou zmíněných metod u pacientů vyššího věku i jejich diagnostickou validitu obdobnou jako u mladších jedinců, i když současně zdůrazňují nutnost využití věkově stratifikovaných normativních dat pro většinu užívaných diagnostických metod.

PAINFUL SENSORY NEUROPATHIES IN THE ELDERLY

Vlčková-Moravcová E., Bednařík J.

Department of Neurology, Masaryk University and Faculty Hospital Brno

Received after revision February 2009



KEY WORDS

Elderly
Intraepidermal nerve fibre density
Painful neuropathy
Quantitative sensory testing
Small and large nerve fibres



CORRESPONDING AUTHOR

Vlčková-Moravcová E.
Department of Neurology
Faculty of Medicine
Masaryk University and Faculty Hospital Brno
Jihlavská 20
625 00 Brno
Czech Republic

ABSTRACT

Introduction: Painful sensory neuropathies are frequently encountered in elderly individuals. The pathophysiology of peripheral nerve dysfunction as well as the clinical picture and applicable diagnostic methods in senescence may be at least partly different from those in the general neuropathy population with respect to the potential role of age-related neurodegeneration as well as to some specific features of the elderly population in general.

Patients and methods: Thermal quantitative sensory testing (T-QST), evaluation of intra- (IENFD) and subepidermal nerve fibre densities in skin biopsy samples, nerve conduction studies, autonomic nervous system testing, and clinical neurological examination including detailed assessment of neuropathic symptoms and pain intensity were performed in a group of 25 elderly (≥ 65 years) and 74 non-elderly patients with painful sensory neuropathy. For comparison, data from 37 age-matched healthy individuals (10 elderly and 27 non-elderly) were used.

Results: The involvement of small nerve fibres documented by T-QST or IENFD was almost invariably found in both elderly and non-elderly patients and the sensitivity as well as applicability of both these methods was similar between the age groups. Nevertheless, an obvious trend to decrease in nerve fibre counts with age was observed in the healthy control group. The dysfunction of large nerve fibres (assessed by nerve conduction studies or clinical examination) as well as of the autonomic ones was significantly more frequent in elderly neuropathy patients compared to younger age groups. Moreover, evaluation of the autonomic nervous system could frequently not be performed in elderly patients with respect to associated heart diseases or medication.

Conclusions: Painful neuropathy patients almost invariably display involvement of small nerve fibres regardless of the patient's age. In elderly painful neuropathy patients, however, a more frequent and more extensive dysfunction of large myelinated fibres and autonomic fibres was found suggesting the increasing role of age-related neurodegeneration in the development of peripheral neuropathies in old age and

implying the need of age-stratified reference data of most of the diagnostic tests of small- and large-fibre dysfunction in peripheral neuropathies.

ABBREVIATIONS USED

AUDIT – alcohol use disorders identification test
 IENFD – intraepidermal nerve fibre density
 MNSI – Michigan neuropathy screening instrument questionnaire (subscales i and ii)
 NDS – neuropathy disability score
 NSS – neuropathy symptom score
 PGP – protein gene product
 T-QST – thermal quantitative sensory testing
 SENPD – subepidermal nerve plexus density
 SNAP – sensory nerve action potential
 VAS – visual analogue scale

INTRODUCTION

Painful sensory neuropathies are frequently encountered in elderly individuals and may have an important impact on their sleep and quality of life. Besides an increasing incidence of neuropathy risk factors in senescence, degeneration of the peripheral nervous system in old age has repeatedly been shown in humans as well as in animal models of nervous system aging, and seems to play a role in the development of peripheral neuropathies in the elderly [1, 2]. Both the age-related degeneration and the involvement of peripheral nerves by some pathological processes may involve various types of nerve fibres, and the pattern and proportion (and probably also the time sequence) of the fibres affected are crucial for the clinical picture of peripheral neuropathy. Experimental models [1, 2, 3] suggest that, in contrast to e.g. metabolic neuropathies, where initial and more pronounced involvement of so-called small non-myelinated and low myelinated nerve fibres of the classes A-delta and C is usually described, the age-related degeneration process affects predominantly large myelinated fibres of A-beta class. The suggested different pattern of the affected nerve fibres in the elderly therefore indicates that the resulting clinical picture and diagnostic methods of peripheral neuropathies in senescence may be at least partly different from those in younger age groups.

Besides more frequent affection of large nerve fibres in senescence, age-related loss of small nerve fibres has also been described in rodents [2, 3] as well as in some of the human studies on epidermal innervation reflecting the age-related changes of small nerve fibre status [4, 5]. The involvement of these fibres (mediating pain and temperature, and also serving autonomic functions) has repeatedly been shown to play an important role in the pathophysiology of neuropathic

pain [6, 7], and their dysfunction has been found in most of the painful neuropathies [8, 9, 10]. A-delta and C fibres can even be the only nerve fibres affected in some of the painful neuropathy patients (so-called small fibre neuropathies) [8, 9, 10]. Their involvement, however, is usually underdiagnosed in clinical practice, because common clinical examination and nerve conduction studies fail in the verification of their dysfunction [8], and special diagnostic methods (e.g. examination of thermal and/or pain sensation on quantitative sensory testing (T-QST) or quantification of intraepidermal nerve fibre density (IENFD)) have to be used for this purpose [8]. Both of these methods, however, may have some limitations, particularly in elderly patients. Together with some specific characteristics of senescence in general, all these facts point out the possibility that the pathophysiology, the clinical picture and applicable diagnostic methods of neuropathies in the elderly are at least partly different from the general neuropathy population, in particular when pain is a leading clinical symptom. Only few studies, however, deal with clinical, neurophysiological, and morphological characteristics of painful peripheral neuropathies in senescence.

The aim of our study was therefore to evaluate selected clinical, morphological, and electro- and psychophysical findings in older adults with painful sensory neuropathy compared to younger patients to reveal possible specific features of this diagnostic unit in the elderly and to assess the diagnostic validity of several methods used to confirm a peripheral nerve dysfunction in these patients.

PATIENTS AND METHODS

Twenty-five elderly patients (older than 65 years) with painful sensory neuropathy and a prominent complaint of “burning feet” were included in the study (Table 1). For comparison, data from seventy-four non-elderly individuals with painful neuropathy complying with the same inclusion and exclusion criteria (see below) were used (Table 1). All the patients from both these groups were prospectively recruited from the Peripheral Neuropathy Outpatient Clinic of the Brno Faculty Hospital between September 1999 and March 2005. The protocol was approved by the institutional ethics committee of the University of Brno; written informed consent was obtained from all patients and volunteers before inclusion into the study.

The following inclusion criteria had to be met: [1] Positive sensory symptoms (pain or painful dysesthesias described as electric shock-like, burning, cold, prickling, tingling, or itching) in a distal symmetrical distribution in the lower extremities for more than 3 months and with an intensity of at least 3 on a visual analogue scale (VAS) of 0–10. [2] Abnormal thresholds for at least one thermal modality as assessed by T-QST.

Table 1

Clinical characteristics of patients and controls. Abbreviations are defined in the text

Demographic characteristics	Neuropathy group		Controls	
	Elderly	Non-elderly	Elderly	Non-elderly
Number of subjects studied	25	74	10	27
Males	13	45	6	11
Signs of large fibre affection	17	24		
Age				
Median (min/max) (years)	71 (65/83)	55 (25/64)	70 (67/86)	54 (27/64)
Symptom duration				
Median (min/max) (years)	1.50 (0.25/6)	2.00 (0.25/13)		
Associated relevant diseases (number of subjects)				
Diabetes mellitus or impaired glucose tolerance	5	27		
Alcohol abuse	2	13		
Others ¹	7	14		
Undetermined	11	20		

¹Others: potential aetiological factors or co-factors include toxins (anticancer chemotherapy or antituberculous drugs), paraneoplastic syndromes, monoclonal gammopathy, hyperlipidaemia, and amyloidosis

Exclusion criteria were signs of central (brain or spinal cord) involvement and any overt clinical motor signs (weakness, distal muscle atrophy, fasciculations). Other diseases or conditions leading to foot pain (both neuropathic and non-neuropathic) such as plantar fasciitis, Charcot's joints, osteoarthritis, peripheral vascular disease, central nervous system dysfunction, tarsal tunnel syndrome, and other peripheral mononeuropathies were excluded by history and clinical examination.

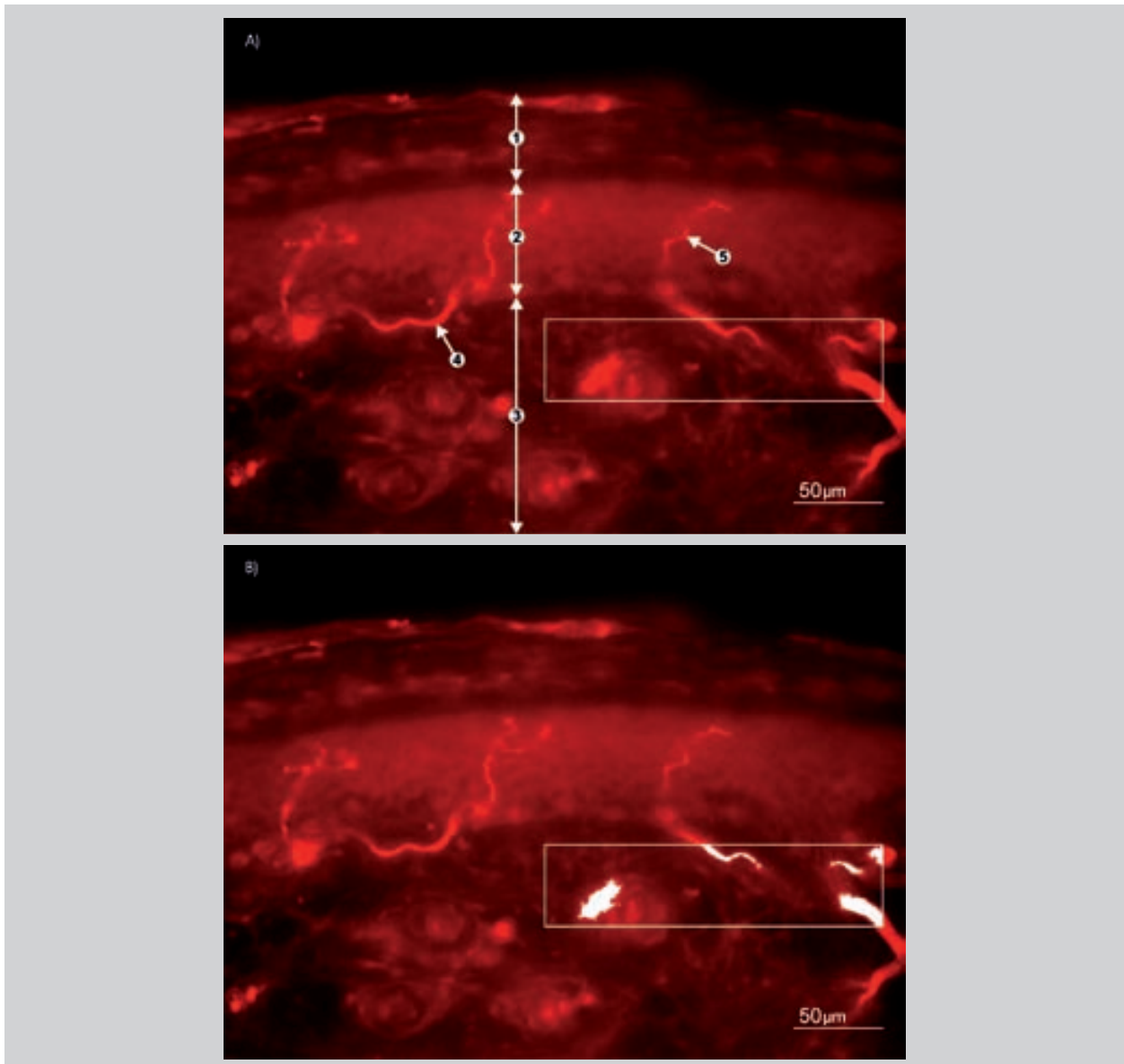
For comparison of skin nerve fibre densities with the non-neuropathy population, data from a group of thirty-seven healthy volunteers matched for age and body mass index (10 elderly and 27 non-elderly subjects) were used (Table 1). These individuals were recruited at the Brno Faculty Hospital, mainly from among hospital employees and their relatives, and the details about their history and clinical status as well as their laboratory findings of the parameters with a potential aetiological relation to peripheral neuropathies were published previously in detail [9, 10].

Data from the patients and controls included into the present study were reported in part in a previous study evaluating in detail the diagnostic value of skin biopsy (including a newly validated parameter – subepidermal nerve plexus density) [9]. The previous study, however, dealt mainly with morphological findings and was focused neither on the specifications of painful neuropathies in the elderly nor on the differences between elderly patients and those of younger age groups.

In contrast, the current study deals only with characteristic features of painful peripheral neuropathy in senescence, which are suggested to be partly different from the general neuropathy population.

A detailed medical history was taken from all patients, who underwent a thorough clinical neurological examination, including assessment of tendon reflexes, muscle strength, trophism, sensation to touch, pinprick, warm and cold stimuli, proprioception, and vibration sense. Associated diseases with potential aetiological relevance were explored by history and routine biochemical, haematological, and immunological blood tests including thyroid hormones, triglycerides, vitamin B₁₂ and folate levels, serum protein electrophoresis, carbohydrate-deficient transferrin, and a set of autoantibodies (ANA, anti-Ro, anti-La, anti-DNA). Diabetes mellitus was confirmed by fasting plasma glucose levels and oral glucose tolerance tests. Quantification of alcohol consumption as well as further confirmation of harmful alcohol use and possible alcohol dependence was performed according to the WHO AUDIT (Alcohol Use Disorders Identification Test) manual [11].

For quantification of the presence and severity of clinical symptoms and neurological impairment, the Neuropathy Symptom Score (NSS) [12], the Neuropathy Disability Score (NDS) [12], and the Michigan Neuropathy Screening Instrument Questionnaire (MNSI) [13] were employed. The mean intensity of neuropathic pain during the week before clinical



Figures 1a, b

Images depicting the method for evaluation of the intraepidermal nerve fibre density (IENFD) and subepidermal nerve plexus density (SENPD) on PGP 9.5 immunoreacted 40- μm cryosections of the skin. SENPD was measured using a density threshold for PGP 9.5 immunoreactive structures and expressed as a percentage of the whole subepidermal area analysed (200 x 50 μm adjacent to the dermoepidermal junction in each optical field)

A: Original digitised image. Bar = 50 μm

1 + 2 = epidermis (1 = stratum corneum, 2 = stratum basale, spinosum, granulosum, and lucidum)

3 = dermis

4 = subepidermal nerve plexus

5 = intraepidermal nerve fibre

B: Density threshold set for morphometric determination of nerve fibre area. Bar = 50 μm

and electrophysiological testing was assessed using a 10-cm VAS, in which 0 cm represented "no pain" and 10 cm "the worst pain I can imagine". All the clinical and electrophysiological tests were performed at the time of admission to the clinic and no specific treatment for neuropathic pain had been delivered to these patients previously.

Quantitative sensory thermal threshold testing (T-QST) was performed using thermal sensory analyser software (Medoc Thermal Sensory Analyser 2001). Thermal thresholds were examined on the dorsum of the right foot; both the method of limits and levels were used. For evaluation we used our own normal limits [14]. The methodology was described elsewhere in detail [9, 14].

Electrophysiological examinations, sympathetic skin response, and cardiovascular tests based on heart rate variability examination were performed using a Keypoint type II electromyograph system (Dantec, Skovlunde, Denmark), following the published recommendations [15]. The results were processed according to the reference values related to age and height at the Brno laboratory.

Skin punch biopsies were taken from the distal calf. The details of skin specimen removal and further processing were published previously [9, 16] and follow standard recommendations [17, 18]. Sections of 40 μm thickness were immunostained with rabbit polyclonal antibodies to human protein gene product (PGP) 9.5 (Ultraclone, Wellow, UK; 1:800) as a primary antibody and goat anti-rabbit IgG labelled with a cyanine fluorescent probe as a secondary antibody (Amersham, Biosciences, Piscataway, NJ; 1:100). Using Image-Pro Plus 4.0 software (Media Cybernetics, Leiden, The Netherlands), the intraepidermal nerve fibre density (IENFD) was quantified by counting the nerve endings within an accurately measured length of epidermis [17, 18] (Figure 1).

Subepidermal nerve plexus density (SENPD) was measured using a density threshold for PGP9.5 immunoreactive structures and expressed as a percentage of the whole subepidermal area analysed (200 x 50 μm adjacent to the dermoepidermal junction in each optical field) [9] (Figure 1). The IENFD was defined as abnormal if lower than the cut-off value of 8.8 fibres/mm [9]. Similarly, the SENPD was defined as abnormal if lower than the cut-off value of 7.25% [9]. The normal limits were established from the skin biopsy results in the group of normal individuals and the method settings were described in our previous publication [9].

Standard descriptive statistics were used to summarise the distribution of the data. Comparison of continuous data between both the subgroups was performed by a univariate t-test, while categorical data were compared using a chi-square test. The Pearson's correlation coefficient was used in correlation analyses. The value $\alpha < 0.05$ was taken as the universal limit for statistical significance.

RESULTS

As a matter of course, the age of elderly patients was higher in comparison with non-elderly ones ($p < 0.001$), while the other demographic characteristics (i.e. sex and duration of symptoms) did not differ between the groups (Table 1). Prominent aetiological factors of both groups represented impaired glucose metabolism and chronic harmful alcohol use or possible alcohol dependence. The incidence and proportion of the particular aetiological factors did not differ significantly between the groups, though a trend towards lower incidence of glucose dysmetabolism ($p = 0.12$) and a higher proportion of patients with undetermined (i.e. idiopathic) aetiology in elderly patients ($p = 0.11$) was found (Table 1).

Clinically, impaired proprioception and vibration sense as signs of large-fibre sensory dysfunction were significantly more frequent in elderly patients ($p = 0.001$ and 0.002 , respectively; data not shown). For other sensory modalities, a trend towards higher incidence of abnormalities in the elderly group was also found, though without statistical significance ($p = 0.07$, 0.05 , and 0.10 for sensation to pinprick and pain and thermal perception, respectively; data not shown). In accordance with these findings, higher values and higher sensitivity of NDS and a second part of the MNSI questionnaire (as the scales reflecting the presence of clinical abnormalities and in particular large-fibre function) were found in our group of elderly patients, while only less obvious and less significant differences were found in the Neuropathy Symptom Score values (reflecting both the small and large nerve fibre function) (Table 2).

The intensity of neuropathic pain as assessed by VAS as well as the presence of clinical symptoms of sensory dysfunction (evaluated either as particular items or as a summary score reflecting mainly the dysfunction of small nerve fibres, i.e. the first part of the MNSI questionnaire) were similar in both groups of neuropathy patients (Table 2). Accordingly, the sensitivity of this questionnaire was also comparable in elderly and non-elderly individuals.

Absolute values of cold and warm detection thresholds, the number of abnormalities of thermal sensation found by the particular testing algorithms using the age-related normal values, and also the variability of the responses did not differ significantly between the groups (Table 2). The results obtained by the three T-QST methods were consistent and values did not differ significantly between the methods.

The reduction of sensory nerve action potential (SNAP) amplitudes represented the most significant difference of nerve conduction studies between the groups (Table 2). In general, electrophysiological signs of large fibre sensory neuropathy were more frequent in elderly patients ($p = 0.002$) (data not shown). The elicibility of sympathetic skin response was similar in both groups of patients. In the elderly group, however, slightly

Table 2

Absolute values and number of abnormalities (if applicable) revealed by selected psychophysical, neurophysiological, and clinical tests in elderly and non-elderly neuropathy patients. Values are mean \pm standard deviation. Abbreviations are defined in the text

Test	Absolute values			Number of abnormalities revealed		
	Elderly	Non-elderly	p-value (t-test)	Elderly	Non-elderly	p-value (chi ² -test)
Thermal thresholds (dorsum of the right foot, °C)						
MLI – R CS	20.2 \pm 10.4	21.5 \pm 8.8	0.54	14	37	0.60
WS	47.0 \pm 3.4	46.8 \pm 2.8	0.73	22	56	0.19
MLE – CS	22.3 \pm 10.6	23.3 \pm 9.3	0.66	13	38	0.96
WS	44.4 \pm 4.1	44.2 \pm 3.5	0.76	22	67	0.72
Nerve conduction studies						
Sural SNAP amplitude (μ V)	3.7 \pm 3.3	8.7 \pm 5.5	< 0.001	16	20	< 0.001
Sympathetic skin response (lower extremities)						
Mean latency (ms)*	2.23 \pm 0.28	2.11 \pm 0.22	0.04			
Mean amplitude (mV) *	0.41 \pm 0.25	0.73 \pm 0.72	0.04			
Elicitability (%)	58	66	0.27	4	8	0.50
Heart rate variability						
Heart-rate variability to						
deep breathing (%)	11.9 \pm 5.8	18.8 \pm 10.3	0.04	8	22	0.04
Clinical findings						
VAS*	6.14 \pm 2.56	6.38 \pm 2.0	0.62			
MNSI 1	7.60 \pm 2.00	7.93 \pm 2.29	0.52	19	57	0.91
MNSI 2	2.48 \pm 1.41	1.35 \pm 1.33	< 0.001	20	26	< 0.001
NSS*	2.56 \pm 1.16	2.04 \pm 0.83	0.02			
NDS*	15.7 \pm 13.7	6.9 \pm 7.9	< 0.001			

*No limit data for discrimination of normal and abnormal findings of this parameter are available

MLI – Method of Limits, MLE – Method of Levels, CS – cold sensation, WS – warm sensation, R – random variant of the test); other abbreviations are defined in the text

higher latencies and lower amplitudes of the response were found in the lower extremities (Table 2).

The heart rate variability testing could not be performed or evaluated in more than a half of the elderly group because of associated heart disease or medication with potential influence on the heart rate (56% compared to 24% of non-elderly individuals, $p = 0.003$). From the evaluable tests, the vast majority was abnormal in elderly patients, while in the non-elderly group abnormal results were much less frequent (72 and 36%, respectively, $p = 0.02$). In most of the tests performed, significantly lower heart rate variability values were thus obtained in elderly individuals in comparison to younger ones (Table 2).

In the group of healthy individuals, a non-significant trend to the correlation of the IENFD and SENPD values with age as well as to higher values in the subgroup of elderly controls compared to non-elderly ones was found (Table 3). Comparison of healthy individuals and painful neuropathy patients demonstrated a clear reduction in both intra- and subepidermal nerve fibre/plexus density in both the elderly and non-elderly

subgroups of patients with neuropathies compared to the particular age-related subgroups of healthy controls (Table 3). In neuropathy patients, lower values of the SENPD were found in elderly patients than in non-elderly ones, while the IENFD values did not differ significantly between the age groups (Table 3). A clear correlation of the IENFD values with warm thresholds in T-QST examination and with the scales reflecting particularly small nerve fibre involvement (i.e. MNSI I) and lower intraepidermal nerve fibre counts in the presence of clinical signs of small fibre dysfunction were found in both the age subgroups of neuropathy patients, while the SENPD correlated better with SNAP amplitude and MNSI II and NDS (as the scales showing mainly large nerve fibre function) in both elderly and non-elderly individuals (p from 0.02 to <0.001; data not shown).

DISCUSSION

The principal finding of this prospective study is that the involvement of small nerve fibres is almost invariably present in elderly patients with painful neuropathies. Despite this fact,

Table 3

Skin biopsy findings. IENFD (fibres/mm) and SENPD (% of the subepidermal area of the size 200 x 50 µm adjacent to the dermoepidermal junction): basic summary statistics, comparison of the neuropathy and control groups and elderly and non-elderly individuals, and correlation with age in the control group of healthy individuals. Abbreviations are defined in the text

	Groups of patients		Comparison of the groups p ₁ -value	Correlation with age in control group	
	Elderly	Non-elderly		r	p-value
IENFD (fibres/mm)					
Group of patients	4.95 ± 3.02	5.69 ± 4.08	0.40		
Healthy individuals	9.81 ± 1.61	11.80 ± 3.30	0.08	-0.325	0.06
Comparison of the groups (p ₂ -value)	< 0.001	< 0.001			
SENPD (%)					
Group of patients	3.19 ± 1.91	4.88 ± 2.75	0.006		
Healthy individuals	8.20 ± 1.31	9.76 ± 2.76	0.10	-0.237	0.16
Comparison of the groups (p ₂ -value)	< 0.001	< 0.001			

p₁-value – comparison of nerve fibre density between elderly and non-elderly individuals in a group of patients (first row) or in a group of healthy individuals (second row)

p₂-value – comparison of nerve fibre density between elderly neuropathy patients and controls (first column) or non-elderly patients and controls (second column)

a partly different pattern of involvement of the particular nerve fibre types with a more severe and more frequent dysfunction of large nerve fibres compared to younger age groups was found in these individuals showing a probable role of age-related neurodegeneration in the development of peripheral neuropathies in the elderly. These findings imply an increasing significance of clinical examination and nerve conduction studies in the diagnostic algorithm of painful neuropathies in senescence. Almost all the elderly painful neuropathy patients however present an involvement of small nerve fibres and in a remarkable part of them (about 1/3) these fibres were shown to be the only affected ones. Appropriate diagnostic methods of small nerve fibre involvement (i.e. thermal quantitative sensory testing and examination of intraepidermal nerve fibre density) thus still play a pivotal role in the battery of diagnostic tests of painful neuropathies in the elderly, and our findings prove their applicability in older adults as well as their similar diagnostic validity compared to younger age groups, though some particularities (e.g. the need of age-related normal limit data) should be taken into account.

Painful sensory neuropathies are frequently encountered in older adults. As in the other types of peripheral nerve affections, both the clinical picture and applicable diagnostic methods of painful neuropathies in senescence depend in particular on the pattern and proportion of the affected types of nerve fibres. In accordance with the observations in the general painful neuropathy population [9, 19], dysfunction of small nerve fibres was almost invariably present in our group of elderly

painful neuropathy patients. A comparison of the age groups showed a similar extent of small-fibre affection (proved both by examination of IENFD and T-QST) as well as an almost identical spectrum of corresponding clinical symptoms and pain intensity (as assessed by VAS) in elderly and non-elderly patients in our study. These findings suggest that, regardless of the patients' age, a similar extent of small fibre damage leads to a similar clinical picture, and thus indirectly confirm the role of small nerve fibre dysfunction in the development of pain and appropriate clinical symptoms of painful neuropathies.

In contrast to these findings, most of the diagnostic methods (in particular clinical examination and nerve conduction studies) proved a more severe and more frequent affection of large myelinated nerve fibres in our group of elderly neuropathy patients compared to the younger ones. A similar pattern of nerve fibre involvement was repeatedly shown in animal models of age-related degeneration of the peripheral nervous system [1, 2]. In aging rats, more symptoms of disturbed mechanosensation compared to disturbed nociception were found [2], and a more severe loss of large and myelinated fibres compared to smaller ones was shown in sural nerve studies of peripheral nervous system aging [1]. Our data thus confirm the observation of more severe age-related degeneration of large and myelinated fibres compared to smaller ones and imply that neurodegeneration plays an important role in the development of painful peripheral neuropathies in the elderly.

Despite these facts, age-related loss of epidermal and dermal innervation, involving both sensory and autonomic

components, was also described in rodents [2, 3]. In humans, some of the studies [4, 5] suggest a similar decrease of intraepidermal innervation with age, but there is no clear agreement on this field and not all the studies show such a significant negative correlation [20], probably due to the considerable interindividual variability of epidermal nerve counts in normal humans. Despite such controversial findings, only few studies are focused on normal skin innervation in senescence and provide separated limit data of intraepidermal nerve fibre counts in the elderly [21], which may complicate the evaluation and the validity of skin biopsy examination in older adults.

In our control group of healthy individuals, an obvious trend to inversed correlation of IENFD/SENPD with age was observed, as well as a trend to lower fibre counts in the subgroup of elderly controls compared to the younger ones. Both of these trends were apparent, but none of them was statistically significant, probably with respect to the small size of our control group and in particular to the small number of elderly individuals among our healthy controls (10 out of 37). Our findings nevertheless seem to confirm the age-related degeneration of intra- and subepidermal nerve fibres and suggest the need of setting particular normal limits for elderly and non-elderly individuals. An increased number of healthy controls and in particular a higher proportion of elderly individuals are therefore needed in future studies.

In comparison with the age-related subgroups of healthy controls, a highly significant decrease in IENFD/SENPD values was found in both the elderly and non-elderly painful neuropathy patients, confirming the high sensitivity of this method, regardless of the patients' age. The examination was well tolerated by all the individuals and no complications of wound healing were observed in any one of the elderly or non-elderly patients. Together with a good correlation of the IENFD with warm thermal thresholds in T-QST examination and with MNSI I as the methods reflecting mainly small fibre dysfunction, these findings show that the examination of the IENFD from skin biopsy is an applicable method in the evaluation of small fibre damage in older adults, and we can recommend the inclusion of this method to the diagnostic algorithm of painful neuropathies in the elderly.

Another method of evaluation of the small nerve fibre dysfunction involved in our study was the examination of thermal thresholds on quantitative sensory testing [8, 22]. In contrast to the morphological character of the previous test, T-QST is a psychophysiological method and therefore requires concentration, attention, and the ability of fast response [22], which may be decreased in the elderly. However, when using the age-stratified reference data, the number of abnormalities revealed by the T-QST and the response variability of the methods used did not differ between younger and older

neuropathy patients and the results obtained by the three T-QST methods were consistent and values did not differ significantly between the particular algorithms. These findings suggest that when using the age-stratified reference data, psychophysiological methods are useful in elderly patients and provide reliable and reproducible results, fully comparable with younger individuals.

Besides the methods evaluating sensory small nerve fibres, assessment of autonomic nervous system functions can also be used for the evaluation of small nerve fibre status in polyneuropathy patients. Our previous findings [9], however, suggest that the autonomic nervous system testing is less sensitive compared to T-QST and skin biopsy in the evaluation of painful neuropathies in general. In elderly patients, the use of these methods (in particular examination of heart rate variability) is furthermore complicated by the increasing number of patients with coincidental heart rate abnormalities (e.g. atrial fibrillation) and those with implanted pacemakers or using antiarrhythmics (e.g. beta-blockers) in their regular medication. Due to these conditions, the heart rate variability testing could not be performed or evaluated in up to 60% of elderly patients in our study (but only in about 1/4 of younger individuals). Among the evaluable tests, a significantly higher proportion of abnormalities was found in older patients, suggesting that the autonomic nerves are more frequently involved in painful neuropathies in the elderly as compared with younger age groups. Despite this fact, the sensitivity of autonomic nervous system assessment did not reach the value of the T-QST or the IENFD examination and autonomic tests thus still remain only complementary methods in the diagnostic algorithm of painful neuropathies in senescence and we recommend their use in particular for the verification of autonomic dysfunction in patients with relevant clinical symptoms. The signs of more severe dysfunction of autonomic fibres in our elderly neuropathy patients compared to younger age groups are in agreement with the observation of a significant age-related degeneration of autonomic nerve fibres in experimental models of nervous system aging [3] and may again support the hypothesis of the important pathophysiological role of age-related degeneration in the development of peripheral neuropathies in the elderly, which is also corroborated by the diverse pattern of large and small nerve fibre affection and by the higher proportion of idiopathic neuropathies in senescence. Thus, in younger patients the development of peripheral nerve dysfunction seems to be in particular the result of peripheral nerve damage caused by various aetiological factors, while in the elderly, age-related nerve degeneration is suggested to play an increasing role in the development of peripheral neuropathies.

Finally we conclude that painful neuropathies in the elderly display a slightly different pattern of involvement of the

particular nerve fibre types with a more frequent and more extensive involvement of large myelinated fibres as well as of the autonomic ones in comparison with younger age groups, suggesting the increasing role of age-related neurodegeneration in the development of peripheral neuropathies in senescence. The involvement of small nerve fibres, however, represents the most frequent and most remarkable abnormality in elderly painful polyneuropathy patients, confirming the role of small nerve fibre dysfunction in the development of painful neuropathy symptoms regardless of the patient's age. The assessment of thermal thresholds on the T-QST and the examination of the IENFD on skin biopsy as methods of evaluation of small fibre status proved to be applicable and sensitive in older adults and continue to play a key role in the diagnostic algorithm of painful neuropathies in senescence, despite the increasing sensitivity of nerve conduction studies and autonomic nervous system testing in these age groups.

ACKNOWLEDGEMENTS

The study was supported by the Czech Ministry of Education Research Plan No. MSM0021622404. Dr. Vlčková-Moravcová performed the morphological studies at the University of Würzburg, supported by a Fellowship from the European Neurological Society (ENS).

REFERENCES

- Jeronimo A, Jeronimo CA, Filho OA, Sanada LS, Fazan VP. A morphometric study on the longitudinal and lateral symmetry of the sural nerve in mature and aging female rats. *Brain Res* 2008; 1222: 51–60.
- Ulfhake B, Bergman E, Fundin BT. Impairment of peripheral sensory innervation in senescence. *Auton Neurosci* 2002; 96(1): 43–49. Review.
- Fundin BT, Bergman E, Ulfhake B. Alterations in mystacial pad innervation in the aged rat. *Exp Brain Res* 1997; 117(2): 324–340.
- Goransson LG, Mellgren SI, Lindal S, Omdal R. The effect of age and gender on epidermal nerve fiber density. *Neurology* 2004; 62: 774–777.
- Umapathi T, Tan WL, Loke SC, et al. Intraepidermal nerve fiber density as a marker of early diabetic neuropathy. *Muscle Nerve* 2007; 35: 591–598.
- Kramer HH, Rolke R, Bickel A, Birklein F. Thermal thresholds predict painfulness of diabetic neuropathies. *Diabetes Care* 2004; 27: 2386–2391.
- Polydefkis M, Yiannoutsos CT, Cohen BA, et al. Reduced intraepidermal nerve fiber density in HIV-associated sensory neuropathy. *Neurology* 2002; 58: 115–119.
- Lacomis D. Small-fiber neuropathy. *Muscle Nerve* 2002; 26: 173–188.
- Vlčková-Moravcová E, Bednařík J, Dušek L, Toyka K, Sommer C. Diagnostic validity of epidermal nerve fiber densities in painful sensory neuropathies. *Muscle Nerve* 2008; 37: 50–60.
- Vlčková-Moravcová E, Bednařík J, Bělobrádková J, Sommer C. Small-fibre involvement in diabetic patients with neuropathic foot pain. *Diabet Med* 2008; 25: 692–699.
- Saunders JB, Aasland OG, Babor TF, de la Fuente JR, Grant M. Development of the Alcohol Use Disorders Identification Test (AUDIT): WHO Collaborative Project on Early Detection of Persons with Harmful Alcohol Consumption—II. *Addiction* 1993; 88: 791–804.
- Dyck PJ, Sherman WR, Hallcher LM, et al. Human diabetic endoneurial sorbitol, fructose, and myo-inositol related to sural nerve morphometry. *Ann Neurol* 1980; 8: 590–596.
- Feldman EL, Stevens MJ, Thomas PK, et al. A practical two-step quantitative clinical and electrophysiological assessment for the diagnosis and staging of diabetic neuropathy. *Diabetes Care* 1994; 17: 1281–1289.
- Moravcová E, Bednařík J. Computer-assisted thermal threshold testing – normative data and sources of variability. *Cesk Slov Neurol N* 2003; 66/99: 263–269.
- Proceedings of a consensus development conference on standardized measures in diabetic neuropathy. *Electrodiagnostic measures. Muscle Nerve* 1992; 15: 1150–1154.
- Moravcová E, Bednařík J, Feit J, Sommer C. The evaluation of intraepidermal nerve fiber density in skin biopsy of polyneuropathy patients. *Cesk Slov Neurol N* 2005; 68/101: 219–226.
- Lauria G, Cornblath DR, Johansson O, et al. EFNS guidelines on the use of skin biopsy in the diagnosis of peripheral neuropathy. *Eur J Neurol* 2005; 12: 747–758.
- Kennedy WR, Wendelschafer-Crabb G, Polydefkis M, McArthur JC. Pathology and quantitation of cutaneous innervation. In: Dyck PJ, Thomas PK, eds. *Peripheral neuropathy*. Philadelphia: Elsevier, 2005: 869–895.
- Sorensen L, Molyneaux L, Yue DK. The relation among pain, sensory loss and small nerve fibers in diabetes. *Diabetes Care* 2006; 29: 883–887.
- McArthur JC, Stocks EA, Hauer P, Cornblath DR, Griffin JW. Epidermal nerve fiber density: normative reference range and diagnostic efficiency. *Arch Neurol* 1998; 55: 1513–1520.
- Lauria G, Holland N, Hauer P, et al. Epidermal innervation: changes with aging, topographic location, and in sensory neuropathy. *J Neurol Sci* 1999; 164: 172–178.
- Yarnitsky D. Quantitative sensory testing. *Muscle Nerve* 1997; 20: 198–204. ■

8. Scherens A, Maier C, Haussleiter IS, Schwenkreis P, Vlckova-Moravcova E, Baron R, Sommer C. Painful or painless lower limb dysesthesias are highly predictive of peripheral neuropathy: comparison of different diagnostic modalities. *Eur J Pain* 2009;13(7):711-8. IF = 3,612. Počet citací v SCI: 37.

Práce je zaměřená na hodnocení funkce a/nebo morfologických změn silných i tenkých nervových vláken u pacientů s bolestivými dysesteziemi dolních končetin jako potenciálním biomarkerem postižení periferních nervů. Současně byl zhodnocen diagnostický přínos jednotlivých metod, využitelných pro průkaz periferně neurogenního postižení v této klinické situaci (tedy kondukčních studií periferních nervů, QST a hodnocení IENFD z kožní biopsie). U všech pacientů s bolestivými dysesteziemi DKK byla prokázána abnormita alespoň v jednom z uvedených diagnostických testů. Nejčastější abnormitou byl průkaz postižení či dysfunkce tenkých nervových vláken (u více než 90 % pacientů), přibližně v polovině případů byly patrné i známky postižení vláken silných. Tyto nálezy tak na odlišném souboru pacientů (u jedinců s postižením různé etiologie) v rámci jiné pracovní skupiny prokazují nálezy plně podporující závěry předchozí komentované práce (Vlčková-Moravcová et al. 2008b).

Daleko nejsenzitivnější diagnostickou metodou byla v testovaném souboru kožní biopsie, která prokázala snížení IENFD u 88,1 % pacientů (včetně některých jedinců s normálním QST). Abnormity QST a EMG byly zřetelně méně časté (35,7 a 54,8 %). Tyto nálezy poukazují na skutečnost, že normální termické prahy v rámci QST vyšetření nejsou spolehlivým ukazatelem absence postižení tenkých nervových vláken.

Ve skupině pacientů s bolestivými dysesteziemi bylo 38 % pacientů se SFN, největší skupina pacientů měla kombinované postižení silných a tenkých vláken a malá skupina jedinců měla izolované postižení vláken silných.

Klíčovým přínosem studie je tedy zjištění, že bolestivé dysestezie DKK jsou vysoce prediktivní pro přítomnost bolestivé polyneuropatie DKK a to většinou postihující tenká nervová vlákna (izolovaně nebo v kombinaci s postižením vláken silných). U menší části pacientů však může jít i o projev neuropatie silných vláken. Kožní biopsie, QST a EMG představují vzájemně se doplňující baterii diagnostických metod. Normální nález na kterékoli z těchto metod nevylučuje abnormitu v jiné, což je vhodné zohlednit v diagnostickém algoritmu (a zařadit při negativním nálezu jedné z těchto metod jiný konfirmační test).



Painful or painless lower limb dysesthesias are highly predictive of peripheral neuropathy: Comparison of different diagnostic modalities

Andrea Scherens^{a,*}, Christoph Maier^a, Ida Sybille Haussleiter^b, Peter Schwenkreis^b,
Eva Vlckova-Moravcova^e, Ralf Baron^d, Claudia Sommer^c

^a Department of Pain Therapy, Ruhr-University Bochum, BG-Kliniken Bergmannsheil, Bochum, Germany

^b Department of Neurology, Ruhr-University Bochum, BG-Kliniken Bergmannsheil, Bochum, Germany

^c Department of Neurology, University of Würzburg, Germany

^d Department of Neurology, University of Kiel, Germany

^e Department of Neurology, University Hospital Brno, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 April 2008

Received in revised form 19 June 2008

Accepted 29 July 2008

Available online 12 September 2008

Keywords:

Quantitative sensory testing
Epidermal nerve fiber density
Small-fiber neuropathy
Nerve conduction velocity
Dysesthesia

ABSTRACT

Dysesthesias of the lower limbs are a common complaint of patients and may be indicative of peripheral neuropathy. Here we investigated the prevalence and type of neuropathy in patients presenting with this complaint and compared the diagnostic performance of different diagnostic modalities. Forty-two patients were recruited prospectively and underwent a clinical examination, nerve conduction studies, quantitative sensory testing (QST), and skin biopsy at the dorsum of the foot. All patients had a correlate for their dysesthesias in at least one diagnostic modality. Most patients (>90%) had signs of small fiber loss or dysfunction. In about half of all patients large fibers were also affected. Nerve conduction studies were abnormal in 23/42 patients (54.8%). Cold or warm detection thresholds in QST were abnormal in 15/42 (35.7%) patients. Decreased intraepidermal nerve fiber density (IENFD) was found in 37 patients (88.1%), including some patients with normal QST findings. Nearly all patients with pathological QST had a reduced IENFD, indicating a high positive predictive value (93%) of QST in screening for reduced IENFD as correlate for neuropathy. Therefore in all patients with lower limb dysesthesias of unknown origin, the non-invasive methods of NCS and QST should be used and potentially complemented by skin biopsy.

© 2008 European Federation of Chapters of the International Association for the Study of Pain. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Dysesthesias (defined by the IASP as an unpleasant abnormal sensation, whether spontaneous or evoked) of the lower limbs are a common complaint and may be a symptom of peripheral neuropathy. Patients may experience sensations like tingling, pins and needles, numbness, burning or electric shocks. If a neuropathy cannot be positively diagnosed by the finding of corresponding neurological deficits and by nerve conduction studies (NCS), it may be difficult to arrive at a definite diagnosis in patients with dysesthesias. Small-fiber neuropathy is a subtype of axonal sensory neuropathy affecting distal unmyelinated and thin myelinated fibers, where NCS are typically normal (Stewart et al., 1992; Lacomis, 2002), and is thus a differential diagnosis in patients with dysesthesias.

Small-fiber neuropathy is defined as a sensory neuropathy with abnormal sensations that are typically unpleasant or painful (i.e. dysesthesias), along with abnormal findings of small fiber function in at least one of the following: neurological examination, specialized neurophysiological (e.g. recordings of distal nerve fibers) or psychophysical (e.g. quantitative sensory testing, QST) testing, or skin biopsy (Lacomis, 2002).

Here we investigated how many patients presenting with dysesthesias as their main complaint had a peripheral neuropathy, and in which percentage of these this was a neuropathy of the small fiber type. We prospectively recruited patients who presented to the Pain Clinic or to the Department of Neurology of the BG-Kliniken Bergmannsheil with bilateral dysesthesias of the feet or legs. We used standard neurophysiology, QST according to the protocol of the German Research Network of Neuropathic Pain (DFNS) (Rolke et al., 2006b) and quantification of intraepidermal nerve fiber density (IENFD) in skin punch biopsies (Lauria et al., 2005; Sommer and Lauria, 2007). Secondary aims were to compare the diagnostic sensitivity of the methods used for the detection of

* Corresponding author. Address: Abteilung für Schmerztherapie, Berufsgenossenschaftliche Kliniken Bergmannsheil – Universitätsklinik, Bürkle-de-la-Camp-Platz 1, D-44789 Bochum, Germany. Tel.: +49 234 302 3497; fax: +49 234 302 6367.
E-mail address: andrea.scherens@ruhr-uni-bochum.de (A. Scherens).

neuropathy and to obtain information on the correlation of these methods.

2. Material and methods

2.1. Patients

After approval by the regional ethics committees at the Universities of Bochum and Würzburg and after written informed consents, 42 patients (24 males) suffering from bilateral painful or painless dysesthesias (unpleasant abnormal sensations with burning, prickling or tingling feelings) in the feet or lower legs and therefore seen in the Pain Clinic or in the Department of Neurology of the BG-Kliniken Bergmannsheil were enrolled (61.5 ± 12.1 years; range: 37–82 years). Patients with severe dementia, diseases of the CNS, traumatic peripheral nerve lesions, systemic neurological disorders, skin lesions or coagulation disorders were excluded. No patients had pareses or total loss of tactile perception. In all cases pain characteristics, clinical findings, abnormalities in glucose metabolism, sensory profiles (QST), and the results of nerve conduction studies and of skin biopsy evaluation were documented. Pain was quantified using a numerical rating scale (NRS) at study inclusion.

According to the study results, patients were later divided into three groups (Stewart et al., 1992; Lacomis, 2002): group I with pure small fiber neuropathy (pSFN; normal NCS, reduction of IENFD, no clinical signs of large fiber dysfunction (loss of vibration sense at or above the ankles, generalized areflexia); group II with mixed fiber neuropathy (MFN; abnormal NCS or clinical signs of large fiber dysfunction, reduction of IENFD) and group III with large fiber neuropathy (LFN; abnormal NCS and normal IENFD). In one case normal NCS and normal IENFD were found.

2.2. Oral glucose tolerance tests (oGTT)

After determination of fasting blood glucose, an oral glucose tolerance test (oGTT) with 75 g glucose (Roche; ACCU-CHEK Sensor Comfort) was done. A 2-h glucose of <140 mg/dL was considered normal, 140–199 mg/dL indicated impaired glucose tolerance (IGT) and ≥ 200 mg/dL indicated diabetes (Criteria of the American Diabetes Association, 2002).

2.3. Neurophysiology

Neurophysiological examinations were performed using a Dantec Keypoint standard EMG device (Dantec Co, Skovlunde, Denmark). Motor nerve conduction of one tibial, one peroneal, and one median nerve, including ten repetitive F-wave examinations, and sensory nerve conduction of the sural and one ulnar nerve were performed in a standard manner (International Federation of Clinical Neurophysiology, IFCN, Recommendations, Stalberg, 1999). The results were processed according to the reference values at the Department of Neurology in Bochum. Neurophysiology was considered abnormal, if pathological findings were obtained in at least one out of five nerves. Pathological findings could be either reduction of a compound muscle action potential (CMAP) or amplitude sensory nerve action potential (SNAP) or changes in nerve conduction velocity (NCV), distal motor latency (DML) or F-wave-latency, which exceeded the range of normal values defined by mean ± 2.5 standard deviations of amplitudes, conduction velocities and latencies obtained in a collective of healthy subjects. Neuropathy was classified as demyelinating if sensory or motor NCV were reduced, or DML or F-wave-latencies were prolonged, or conduction blocks were present. Neuropathy was classified as axonal if CMAP after distal motor nerve stimulation or SNAP was

reduced or absent (Stalberg et al., 1999). If both electrophysiological features were present, neuropathy was classified as mixed.

2.4. Quantitative sensory testing (QST)

QST was performed at both feet (dorso-lateral) in accordance with the DFNS standards. A TSA-2001 II (MEDOC, Israel, thermode 3×3 cm²) was used for thermal sensory testing, modified von Frey filaments (Optihair 2-Set, Marstock Nervtest, Germany) for measuring the mechanical detection threshold and pinprick stimulators for the mechanical pain threshold. The standardized QST battery contained the following measurements:

- Thermal detection thresholds for the perception of cold (CDT), warm (WDT), number of paradoxical heat sensations (PHS) and the thermal sensory limen (TSL) for alternating cold and warm stimuli.
- Thermal pain thresholds for cold (CPT) and hot stimuli (HPT).
- Mechanical detection thresholds for touch (MDT) and vibration (VDT).
- Mechanical pain sensitivity (MPS) including thresholds for pinprick and pressure pain (PPT), stimulus/response-functions for pinprick sensitivity (MPS) and dynamic mechanical allodynia (DMA), and pain summation to repetitive pinprick stimuli (wind-up like pain, WUR).

All subjects were seated in a quiet laboratory with ambient temperature of 23–24 °C. After standardized information, clinical examination, QST, and a skin punch biopsy at the dorso-lateral foot were performed by the same investigator on the same day. All thermal tests were first demonstrated to the patients over an area that was not tested later during the QST sessions. Patients were unable to watch the computer screen throughout the test.

2.5. Skin biopsy

Skin biopsies were taken by a 3 mm biopsy punch (Stiefel GmbH, Offenbach, Germany) after subcutaneous administration of 2% lidocaine at the dorso-lateral right foot under sterile condition. This very distal biopsy site was chosen because all patients had complaints at this area, but not all had complaints at the lower leg, which would be our standard biopsy site. Tissue was fixed in 4% phosphate-buffered paraformaldehyde for 3–4 h and cryoprotected in 10% sucrose at 4 °C over night. The skin samples were then embedded in Tissue Tek[®], frozen in 2-methylbutane cooled in liquid nitrogen, and stored at 70 °C until further processing. Sections of 40 μ m thickness were cut on a sliding microtome and immunostained with rabbit polyclonal antibodies to human PGP 9.5 (Ultraclone, UK, 1:800) as primary antibody and goat anti-rabbit IgG labeled with cyanine 3.18 fluorescent probe (Cy3, Amersham, USA, 1:100) as secondary antibody. The intraepidermal nerve fibers were counted manually in three sections of approximately 3 mm length each by an examiner who was unaware of the identity of the slides at 400 \times magnification with a Zeiss Axiophot 2 microscope adhering to standard counting rules (Kennedy et al., 2005). Using Image Pro Plus 4.0 software (Media Cybernetics, Leiden, The Netherlands), the epidermal length was accurately measured. The average intraepidermal nerve fiber density (IENFD) per mm of epidermal length was then calculated. Thirty-two healthy controls from a previous study (Vlčková-Moravcová et al., 2008) with a mean age of 60 years (range: 36–86 years) who had biopsies at the distal leg (mean IENFD: 12 ± 3 fibers/mm) were used as control group. The IENFD values were in accordance with data in the literature (Walk et al., 2007), and according to published data, IENFD does not differ between lower leg and foot (Johansson et al., 1999; Walk et al., 2007). IENFD was rated

abnormal in case of reduction of one standard deviation below the mean.

2.6. Statistical analysis

All QST-data except the numbers of paradoxical heat sensations during the TSL procedure, cold pain thresholds, heat pain thresholds, and vibration detection thresholds were transformed logarithmically before statistical analysis (Rolke et al., 2006a). To avoid loss of zero-values, a small constant (0.1) was added to all pain ratings prior to log-transformation (Magerl et al., 1998). QST data profiles were transformed via Z-transformation (Rolke et al., 2006a,b) using the following equation:

$Z\text{-score} = (X_{\text{single patient}} - \text{mean}_{\text{controls}}) / \text{SD}_{\text{controls}}$. Z-values above "0" indicate a gain, Z-values below "0" a loss of sensory function.

Statistical comparison was made to a reference data base of healthy control subjects (Rolke et al., 2006b). All patient data were normalized to the respective gender and age group of the healthy controls [$Z = (\text{individual value} - \text{mean}_{\text{data base}}) / \text{SD}_{\text{data base}}$]. Significance of differences from healthy controls was estimated comparing the patients mean \pm SD obtained by Z-normalization vs. a standard normal distribution (i.e. mean \pm SD = 0 \pm 1) of an equal number of subjects using a probability calculator (STATISTICA for Windows, Statsoft, Tulsa, USA).

Unpaired *t*-test was used for comparing QST results and the IENF density between groups. Due to the small numbers in each group, particularly group III, variance analyses were not done. Data are presented as arithmetical mean \pm standard deviation. *P*-values < 0.05 were considered statistically significant.

3. Results

3.1. Patients

Forty-two patients with an average age of 61.5 \pm 12.1 years (range: 37–82 years) suffering from long lasting dysesthesias (painful, *n* = 31, painless, *n* = 11) at the feet or lower legs were recruited into the study. Median pain scores (NRS) in the patients with painful symptoms (*n* = 31) were 6.0 (range 1–10). Abnormalities in glucose metabolism were observed in 17 cases (40.5%, 10 painful, 7 painless) consisting of diabetes mellitus in 13 and impaired glucose tolerance (IGT) in four patients (Table 1). NCS were normal in 19 (45.2%) and abnormal in 23 (54.8%) patients. Twenty-six patients had clinical (*n* = 3, combined areflexia and abnormal vibration sense < 5/8) or electrophysiological (*n* = 23) signs of neuropathy that indicated large fiber dysfunction. Sixteen patients with dysesthesias had no further clinical or electrophysiological findings (Fig. 1).

Table 1
Demographic and clinical profile of patients, nerve conduction studies (NCS)

Patient	Sex	Age (years)	Glucose metabolism	NCS	Duration of disease, y	Pain (mean NRS)
1	Female	37	Diabetes, typ IIb	Normal	6	0
2	Female	76	Diabetes, typ II b	Normal	3.5	0
3	Female	45	Normal	Path.	1	10
4	Male	64	diabetes, typ I	Path.	3	10
5	Male	71	Normal	Normal	3.5	0
6	Male	61	Normal	Path.	4	4
7	Male	47	Normal	Normal	15	2
8	Male	52	Normal	Normal	10	7
9	Male	51	Diabetes, typ II a	Path.	2	9
10	Male	70	Diabetes, typ IIb	Path.	4	8
11	Male	59	Normal	Normal	4	10
12	Female	38	Pathological ogTT	Normal	1	0
13	Female	53	Diabetes, typ I	Path.	5	6
14	Male	72	Normal	Path.	2	2
15	Male	82	Normal	Path.	2	3
16	Male	64	Diabetes, typ II a	Normal	4	0
17	Female	58	Normal	Normal	6	7
18	Male	76	Diabetes, typ IIb	Path.	3	3
19	Female	63	Normal	Normal	14	I/i
20	Male	70	Normal	Normal	20	6
21	Male	65	Diabetes, typ IIb	Path.	2	10
22	Male	66	Normal	Path.	4	
23	Female	59	Normal	Normal	4	5
24	Female	59	Normal	Normal	6	1
25	Female	81	Diabetes, typ IIb	Path.	20	9
26	Male	55	Normal	Path.	I/i	0
27	Female	79	Diabetes, typ IIb	Path.	4	I/i
28	Female	63	Pathological ogTT	Normal		
29	Male	73	Normal	Path.	2	7
30	Female	63	Normal	Normal	5	8
31	Male	53	Normal	Normal	L/l	0
32	Male	52	Normal	Path.	4	0
33	Male	70	Normal	Path.	6	0
34	Male	36	Normal	Normal	2	
35	Male	73	Pathological ogTT	Path.	0.5	0
36	Male	67	Pathological ogTT	Normal	4	7
37	Male	56	Diabetes, typ IIb	Path.	5	9
38	Female	61	Normal	Path.	8	7
39	Female	63	Normal	Path.	0.5	4
40	Female	77	Diabetes, typ IIb	Path.	6	0
41	Female	37	Normal	Normal	2	L/l
42	Male	65	Normal	Path.	2	4

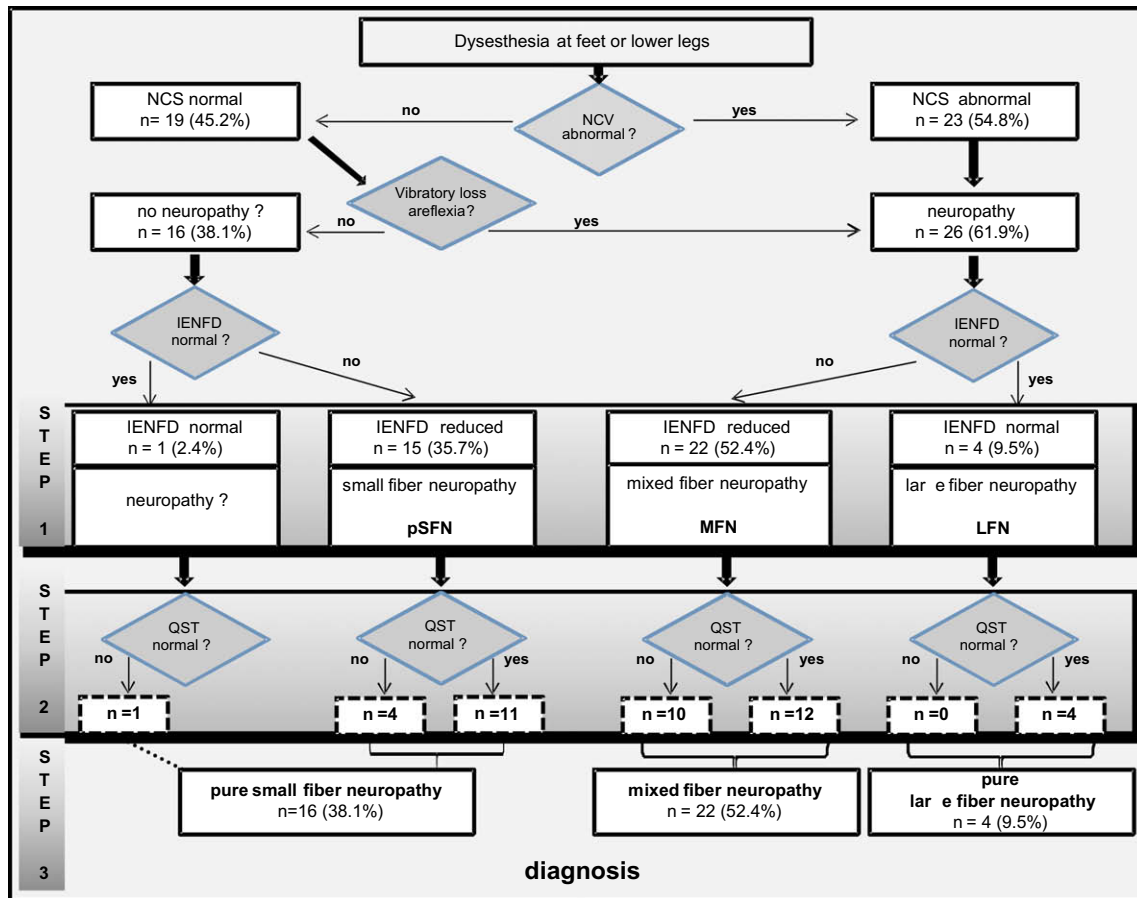


Fig. 1. Clinical findings of 42 patients suffering from lower limb dysesthesias. Diagram for classification of subgroups I–III (step 1) in consideration of clinical findings, nerve conduction studies (NCS) and results of skin biopsy (IENF, intraepidermal nerve fiber density and furthermore after QST (step 2), finally diagnosis showed in step 3. One patient with normal IENFD had abnormal QST values and was classified as 'probable pure small fiber neuropathy', dotted line. Details in text.

3.2. Skin biopsy

IENFD was reduced in 15 of the 16 patients with dysesthesias only, indicating pure small fiber neuropathy (group I, pSFN; 35.7% of all patients). One patient had no clinical or electrophysiological signs of neuropathy and normal IENFD. In 22/26 patients with large fiber dysfunction IENFD was reduced, indicating a mixed fiber neuropathy (group II, MFN, 52.4% of all patients). In 4/26 patients with large fiber dysfunction IENFD was normal (group III, large fiber neuropathy, LFN; 9.5% of all patients). Within the whole sample, IENFD was reduced in 37 patients (88.1%) and gave a mean of 3.97 ± 3.27 fibers/mm in group I and of 2.73 ± 3.93 fibers/mm in group II (n.s.). Thirteen patients (30.1%) had complete IENFD loss (group I $n=3$, group II $n=10$). IENFD in patients with an abnormal glucose metabolism (IGT or diabetes, $n=17$, abnormal NCS in 11 cases) was very low with a mean IENFD of 1.60 ± 2.69 fibers/mm.

3.3. QST

Compared to QST reference values, patients had a significant sensory deficit shown by increased thermal detection thresholds (CDT, WDT, TSL; Fig. 2a and b). Comparing mean QST data for temperature sensation (CDT, WDT) between our groups I to III, there were no significant differences. The trends of differences between the three groups are represented in sensory profiles after Z-transformation, with MDT and VDT being less affected in pSFN and more affected in LFN (Fig. 2a and b). Analyzing data on a single case level, 35.7% (15/42) of all patients had pathological WDT or CDT or both.

Alterations of thermal thresholds were found in 31.2% of pSFN (5/16) and 45.4% of MFN (10/22) patients. All LFN patients had normal thermal thresholds (Fig. 2b). The percentages of pathological QST findings in each group are demonstrated in Fig. 2b. PHS and allodynia, which are almost nonexistent in normal controls (Rolke et al., 2006b) were increased in nearly all patient groups (PHS: I: $n=8$; II $n=7$; III $n=1$; DMA: I: $n=6$; II $n=8$; III $n=0$, Table 2). The only patient with no clinical or electrophysiological signs of neuropathy and normal IENFD had pathological QST (CDT and WDT).

3.4. Correlation between QST, IENFD, and pain

IENFD showed an inverse correlation with WDT ($r = -0.373$; $P < 0.016$, Fig. 3). The highest correlation was found in the subgroup of patients with abnormalities in glucose metabolism ($r = -0.654$, $P < 0.004$). No correlations were found for other QST parameters. Neither a correlation between IENFD and age in the different three groups nor a correlation between recorded data (pain, glucose metabolism, duration of disease) and IENFD was found.

3.5. Diagnostic performance

QST detected a correlate for dysesthesias in 35.7% of patients, NCS in 55%, and skin biopsy in 88% of all patients. Only the combination of NCS, skin biopsy, and QST allowed identification of a possible correlate for the dysesthesias in all patients (Fig. 4). Thermal

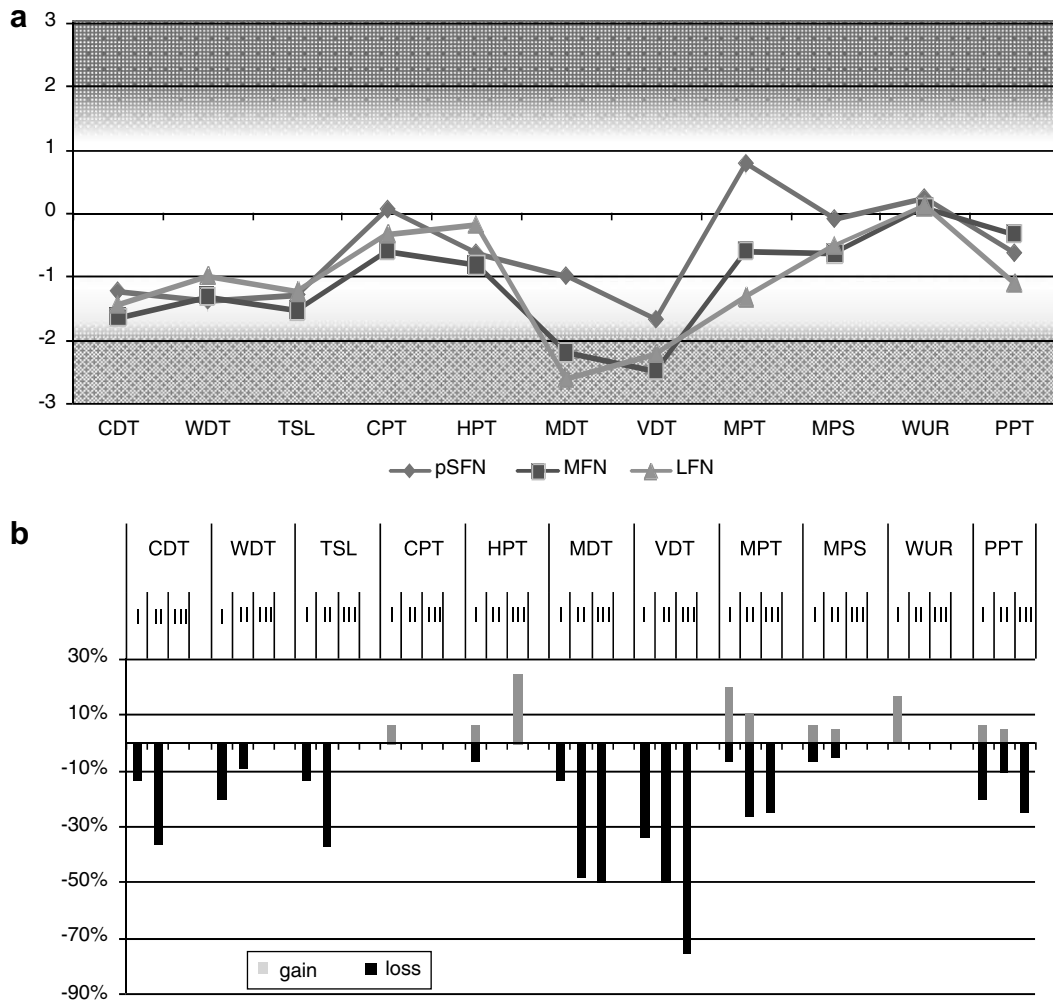


Fig. 2. Sensory profile of patients. Part (a) Sensory profile (Z-score) of patients groups (pSFN, group I, pure small fiber neuropathy; MFN, group II, mixed fiber neuropathy; LFN, group III, large fiber neuropathy). Profiles show a predominant loss of sensory function in terms of cold (CDT) and warm (WDT) detection threshold, thermal sensory limen (TSL), mechanical (MDT) and vibration (VDT) detection threshold, whereas only MDT and VDT were outside the normal range (95% confidence interval; white zone). Z-score: Numbers of standard deviations between patient data and group-specific mean value (absolute reference data; Rolke et al., 2006b). Part (b) Percentage of pathological test results (outside the 95% confidence interval) with gain or loss of sensory function in different patient groups (I–III).

Table 2
Data of quantitative sensory testing (QST) and IENFD of the patients (group I–III)

	Unit	Pure small fiber (pSFN)		Mixed fiber (MFN)		Large fiber (LFN)		Patients total*	
		Absolute	Log	Absolute	Log	Absolute	Log	Absolute	Log
Group:		I		II		III			
Number:		15		22		4		41	
CDT	°C	-7.9(6)	0.80(0.29)	-13.4(10.88)	0.8(0.36)	-8.1 (1.92)	0.9(0.12)	-10.9(9.09)	0.91 (0.32)
WDT	°C	10.8(3.46)	1.01 (0.15)	12.2(4.08)	1.06(0.18)	9.6(3.61)	0.95(0.21)	11.4(3.84)	1.02(0.17)
TSL	°C	19.2(8.84)	1.23(0.22)	27.3(13.51)	1.39(0.21)	19.6(5.99)	1.28(0.14)	23.3(11.74)	1.31 (0.21)
PHS	x/3	1.5(1.41)		1.0(1.15)		0.5(1.0)		1.1 (1.25)	
CPT	°C	11.1 (9.83)		4.6(7.26)		6.3(10.13)		7.1 (8.88)	
HPT	°C	47.4(2.86)		48.5(1.7)		46.9(4.02)		47.9(2.43)	
MDT	mN	26.0(69.06)	0.87(0.59)	140.5(244.48)	1.42(0.86)	134.9(207.45)	1.77	97.0(196.91)	1.25(0.79)
MPT	mN	109.4(190.17)	1.6(0.64)	232.0(243.14)	2.07(0.58)	297.95(330.382)	2.31 (0.4)	190.6(236.84)	1.92(0.63)
MPS	Rating	1.4(1.80)	-0.14(0.56)	1.4(3.81)	-0.41 (0.65)	0.4(0.20)	-0.35(0.22)	1.3(2.90)	-0.32 (0.6)
DMA	Rating	0.0(0.04)	-0.95(0.11)	0.4(1.71)	-0.86(0.45)	0	-1(0)	0.2(1.21)	-0.91 (0.32)
WUR	Ratio	3.7(3.26)	0.46(0.30)	3.0(1.50)	0.44(0.19)	2.7(1.50)	0.4(0.24)	3.3(2.33)	0.45(0.24)
VDT	x/8	5.6(1.22)		3.9(2.11)		3.6(2.13)		4.5(1.98)	
PPT	kPa	759.4(338.28)	2.82(0.28)	717.8(287.46)	2.75(0.5)	712.75(180.26)	2.84(0.11)	733.71 (294.24)	2.79(0.39)
IENFD	F/mm	3.0(2.74)		1.9(2.66)		10.4(0.94)		3.3(3.65)	

Data are presented as means for each group in absolute original units and as log 10 units (log), (mean, in brackets ± standard deviation). Because of normal findings in NCV and IENFD one patient was excluded from statistical analyses. Statistical analysis (unpaired *t*-test) shows no significant differences between the groups. CDT: Cold detection threshold; WDT: Warm detection threshold; PHS: Paradoxical heat sensation; TSL: Thermal sensory limen; CPT: Cold pain threshold; HPT: Heat pain threshold; MDT: Mechanical detection threshold; MPT: Mechanical pain threshold; MPS: Mechanical pain sensitivity; DMA: Dynamic mechanical allodynia; WUR: Wind-up ratio; VDT: Vibration detection threshold; PPT: Pressure pain threshold; IENFD: intraepidermal nerve fiber density.

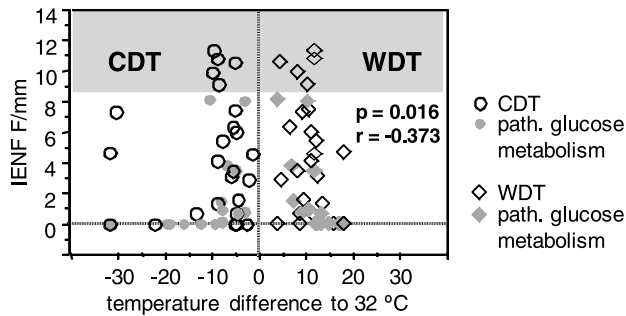


Fig. 3. Bivariate scatterplot with intraepidermal nerve fiber density (IENFD, f/mm) in correlation to cold (CDT) and warm (WDT) detection thresholds. Patients with pathological glucose metabolism (diabetes or impaired glucose tolerance, grey signs) had highly reduced IENFD.

4. Discussion

This study was designed to detect physiological and anatomical correlates of a neuropathy in patients with dysesthesias of the feet or lower legs. We combined three diagnostic methods that are able to detect small and large nerve fiber dysfunction, respectively, and compared their diagnostic efficacy.

In all patients suffering from dysesthesias, we identified one or more pathological correlates, most frequently decreased IENFD. About half of the patients had abnormal NCS and about one third had pathologically decreased thermal detection thresholds as assessed by QST (Figs. 1 and 4). We found that 38% of all patients had normal large fiber function, but loss of sensory function on QST and decreased IENFD, leading to the diagnosis of small fiber neuropathy. However, the largest subgroup including about half of all patients had signs of both large and small fiber dysfunction, and some patients only had pure large fiber neuropathy (Fig. 2 and Table 2). Thus, dysesthesias may occur in all three types of sensory neuropathy and are thus likely to be heterogeneous in pathophysiology.

Using NCS alone, normal values, i.e. no pathological correlates for the dysesthesias could be found in 45% of the patients. This is not unexpected, since we had no patients with pareses and major sensory loss, such that in this patient group we had a bias toward patients with small fiber neuropathy. NCS had a sensitivity of 40% and a specificity of only 42.1% for predicting reduced IENFD. The low diagnostic sensitivity of NCS for small fiber neuropathy is well known, as routine neurophysiological examinations evaluate large

thresholds (CDT/WDT; at least one abnormal parameter) showed low sensitivity (37.8%) but high specificity (80.0%) in the prediction of a reduced IENFD (Table 3). The positive predictive value of a pathological QST result (Z-score > -2) for reduced IENFD detection was 93.0%.

In case of rating QST as pathological at Z-score > -1, a correlate for dysesthesias was found in 90.5% with high sensitivity (89.1%) and low specificity (0%) in the prediction of reduced IENFD. The positive predictive value of a pathological QST (Z-score > -1) for detection of reduced IENFD was 86.8%.

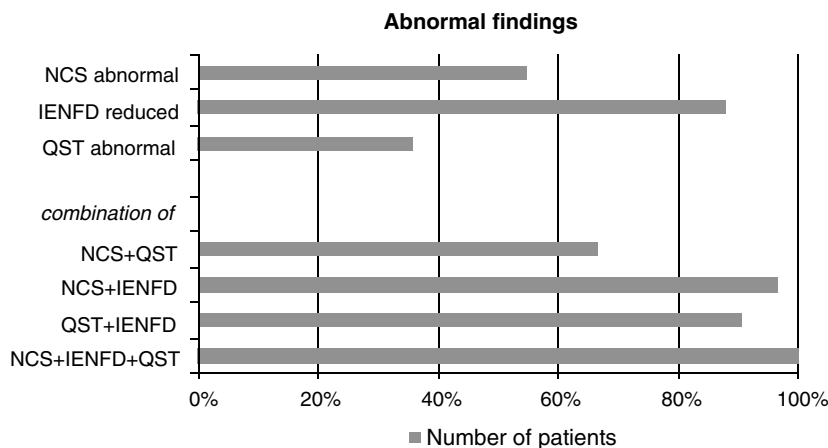


Fig. 4. Comparison of different methods and their combinations to detect neuropathy ($n = 42$). Combination of results of nerve conduction studies (NCS), intraepidermal nerve fiber density (IENFD) and quantitative sensory testing (QST) enables identification of a physiological correlate for dysesthesias in 42 patients (100%) and furthermore makes classification of small, mixed and large fiber neuropathy possible.

Table 3

Comparison of cold (CDT) and warm (WDT) detection thresholds, nerve conduction studies (NCS) and intraepidermal nerve fiber density (IENFD)

	Normal >9 f/mm	Reduced 4–9 f/mm	Highly reduced <4 f/mm	Total
Number	5	10	27	42
CDT/WDT Z-score > 2	1	5	9	15
CDT/WDT Z-score > 1	4	5	14	23
CDT/WDT Normal	0	0	4	4
MDT/VDT Z-score > 2	4	7	15	26
MDT/VDT Normal	1	3	12	16
NCS abnormal	3	6	14	23
NCS normal	2	4	13	19

Results of all patients ($n = 42$) were divided into different groups: IENFD: normal (>9 f/mm), reduced (4–9 f/mm) and highly reduced (<4 f/mm), CDT/WDT: normal (Z-score < 1), suspicious (CDT and/or WDT Z-score > -1 but < -2), pathological (Z-score > 2), NCS normal and abnormal. NCS had sensitivity 40% and specificity 42.5% for predicting reduced IENFD. QST based on Z-score -2 data of CDT and WDT had a high specificity (80.0%) but low sensitivity (37.8%) for predicting reduced IENFD.

myelinated fibers and do not detect small fiber function or dysfunction (Periquet et al., 1999; Lauria, 2005; Lacomis, 2002).

Using IENFD counts of the dorsum of the foot, almost 90% of our patients with dysaesthesias had a pathological finding. One caveat is the fact that we had to use normal values from a slightly more proximal area, 10 cm above the lateral malleolus, to compare to the patients' data. We decided to take the biopsies from a very distal site in the patients to assure that we covered a symptomatic area in all cases and could compare results to normative QST data base, which refer to a measuring point at dorso-lateral foot. Whereas fiber densities differ between thigh and lower leg (McArthur et al., 1998), available data show no differences between lower leg and foot (Johansson et al., 1999; Walk et al., 2007), such that it appears legitimate to make the comparison to this control group.

Only 35.7% of all patients had pathological QST findings (thermal thresholds), and CDT and WDT were normal in the majority of patients, even in some of those with greatly reduced IENFD. Pathological findings for CDT or WDT had a sensitivity of 37.8% and a specificity of 80.0% in the prediction of a reduced IENFD. At first sight, these data seem surprising. QST results can be pathological if the sensory pathway is disturbed at any level not only in the peripheral nervous system, and furthermore, they depend on attention and cooperation of the patient. Thus, in a patient with an undetected CNS pathology or in a less attentive or cooperative patient, the detection thresholds would be falsely increased, leading to more pathologic values. Furthermore, it has been suggested that pathological QST-values can easily be simulated (Freeman et al., 2003). While this is less easily done with the standardized QST protocol used here (Rolke et al., 2006b), it apparently was not to be the case in our cohort, which even produced an unexpected percentage of normal values.

IENFD was reduced in almost all cases with pathological WDT or CDT, leading to a positive predictive value of 93.0% for QST in predicting reduced IENFD. Thus, a person with reduced temperature sensation is very likely to have reduced skin innervation. On the other hand, a person with reduced skin innervation may still have temperature sensation that is within the limits of normal. Obviously, reduced IENFD must not immediately lead to increased warm thresholds. There are several possible explanations for this. There are several possible explanations for this. The sensation of warmth is highly dependent on spatial summation (Yarnitsky and Ochoa, 1991). Thus, central processing is essential in the detection of warmth, which makes it not unlikely that the central connectivity in some patients might compensate for reduced peripheral input. Further on, there is a large variability in normal temperature thresholds, in particular in the elderly population, which served as basis for our control data. Following the strict rule of judging a WDT or CDT pathological only when the Z-score difference to controls was $\geq \pm 2$ (two standard deviations), the number of pathological cases may be underestimated. In fact, if we regarded a Z-score difference of $\geq \pm 1$ as pathological (i.e. range of one standard deviation), QST results of 90.5% of our patients would be regarded as abnormal. Of these, IENFD was abnormal in 86.8% (positive predictive value). For clinical purposes, these findings should be classified as suspicious and further work up should follow in these patients. QST yields sensory profiles that are able to distinguish abnormalities in the different afferent nerve fiber types. Our patient groups differ in the frequency of pathological findings (Fig. 2b). Patients with MFN had pathological values more frequently than SFN patients. Consistent with the definition, large fiber involvement (MDT, VDT) was present more frequently in LFN with pathological values in 50% and 75%, respectively.

As seen in comparable studies (Lauria et al., 2005; Vlčková-Moravcová et al., 2008) we found a significant, but not very close correlation between warm detection thresholds and IENFD. This is in accordance with the findings that patients with reduced IENFD

may still have normal small fiber sensory function. In patients with diabetes or IGT, the correlation was closer than in the whole group. One might speculate that this is due to the more uniform pathophysiology in these patients, whereas the other patients form a heterogeneous group.

Together, our findings imply that the quality of sensory function is not only determined by IENFD, and that QST and skin biopsy provides complementary information about the distal sensory nervous system. Pathological QST is associated with reduced IENFD with high probability, but normal or marginally abnormal QST values do not exclude a decreased IENFD. Obviously, some patients are able to compensate a limited loss of skin innervation, by remaining intact fibers or by an improved central perception of the input, before loss of function will be uncovered even in standardized QST. Therefore, all three measures (NCS, QST and the quantification of IENFD in skin biopsy) are complementary tools for making the diagnosis of peripheral neuropathy in patients with dysesthesias and allow identification of subgroups with different pathophysiology. From a clinical point of view, NCS in combination with QST as non-invasive procedures will give sufficient information to suspect a neuropathy, but will miss the diagnosis in about one third of the patients. For clinical purposes, we therefore recommend to regard QST in case of borderline values (Z-score > -1 and < -2) as suspicious in patients with dysesthesias and to undertake further diagnostic work-up in these patients.

In cases with increased thermal detection thresholds, IENFD counts gave little further diagnostic information in our cohort, in which other causes for pathological QST were largely excluded. We suggest that in all patients with dysesthesias of the feet or lower legs of unknown origin, the non-invasive methods (NCS, QST) should be used first. Detecting SFN may be crucial in conditions where early intervention may alter the disease course, like in patients with diabetes or IGT (Smith et al., 2006), or with inflammatory causes (Dabby et al., 2006; Hoitsma et al., 2003). With the advent of neuroprotective therapies, early diagnosis of neuropathy will become even more important.

Acknowledgements

Authors would like to thank Walter Magerl and Helmut Richter for supporting statistical analysis. Barbara Gado and Hiltrud Klüpfel provided expert technical help. The authors' work was supported by BMBF Grants (German Research Network on Neuropathic Pain, DFNS) and intramural funds of the University of Würzburg.

References

- Dabby R, Gilad R, Sadeh M, Lampl Y, Waternberg N. Acute steroid responsive small-fiber sensory neuropathy: a new entity? *J Peripher Nerv Syst* 2006;11:47–52.
- Freeman R, Chase KP, Risk MR. Quantitative sensory testing cannot differentiate simulated sensory loss from sensory neuropathy. *Neurology* 2003;60(3):465–70.
- Hoitsma E, Drent M, Verstraete E, Faber CG, Troost J, Spaans F, et al. Abnormal warm and cold sensation thresholds suggestive of small-fibre neuropathy insarcoidosis. *Clin Neurophysiol* 2003;114:2326–33.
- IFCN Recommendations for the Practice of Clinical Neurophysiology. Deuschel, Eisen (Editors). *Electroencephalogr Clin Neurophysiology* 1999(Suppl 52).
- Johansson O, Wang L, Hilliges M, Liang Y. Intraepidermal nerves in human skin: PGP 9.5 immunohistochemistry with special reference to the nerve density in skin from different body regions. *J Peripher Nerv Syst* 1999;4:43–52.
- Kennedy WR, Wendelschafer-Crabb G, Polydefkis M, McArthur JC. Pathology and quantification of cutaneous innervation. In: Dyck PJ, Thomas PK, editors. *Peripheral neuropathy*. 4th ed. Philadelphia: Elsevier; 2005.
- Lacomis D. Small-fiber neuropathy. *Muscle Nerve* 2002;26:173–88.
- Lauria G. Small fibre neuropathies. *Curr Opin Neurol* 2005;18:591–7.
- Lauria G, Cornblath DR, Johansson O, McArthur JC, Mellgren SI, Nolano M, et al. European federation of neurological societies. EFNS guidelines on the use of skin biopsy in the diagnosis of peripheral neuropathy. *Eur J Neurol* 2005;12:747–58.
- Magerl W, Wilk SH, Treede RD. Secondary hyperalgesia and perceptual wind-up following intradermal injection of capsaicin in humans. *Pain* 1998;74:257–68.

- McArthur JC, Stocks EA, Hauer P, Comblath DR, Griffin JW. Epidermal nerve fiber density: normative reference range and diagnostic efficiency. *Arch Neurol* 1998;55(12):1513–20.
- Periquet MI, Novak V, Collins MP, Nagaraja HN, Erdem S, Nash SM, et al. Painful sensory neuropathy: prospective evaluation using skin biopsy. *Neurology* 1999;53:1641–7.
- Rolke R, Magerl W, Campbell KA, Schalber C, Caspari S, Birklein F, et al. Quantitative sensory testing: a comprehensive protocol for clinical trials. *Eur J Pain* 2006a;10:77–88.
- Rolke R, Baron R, Maier C, Tolle TR, Treede RD, Beyer A, et al. Quantitative sensory testing in the German research network on neuropathic pain (DFNS): standardized protocol and reference values. *Pain* 2006b;123:231–43.
- Smith AG, Russell J, Feldman EL, Goldstein J, Peltier A, Smith S. Lifestyle intervention for pre-diabetic neuropathy. *Diabet Care* 2006;29:1294–9.
- Sommer C, Lauria G. Skin biopsy in the management of peripheral neuropathy. *Lancet Neurol* 2007;6:632–42.
- Stalberg et al. Electroencephalogr Clin Neurophysiol 1999(Suppl 52):213–20.
- Stewart JD, Low PA, Fealey RD. Distal small fiber neuropathy: results of tests of sweating and autonomic cardiovascular reflexes. *Muscle Nerve* 1992;15:661–5.
- Vlčková-Moravcová E, Bednařík J, Dušek L, Toyka KV, Sommer C. Diagnostic validity of epidermal nerve fiber densities in painful sensory neuropathies. *Muscle Nerve* 2008;37:50–60.
- Walk D, Wendelschafer-Crabb G, Davey C, Kennedy WR. Concordance between epidermal nerve fiber density and sensory examination in patients with symptoms of idiopathic small fiber neuropathy. *J Neurol Sci* 2007;255:23–6.
- Yarnitsky D, Ochoa JL. Differential effect of compression-ischaemia block on warm sensation and heat-induced pain. *Brain* 1991;114:907–13.

9. *Vlčková E, Bednařík J, Buršová E, Šajgalíková K, Mlčáková L. Spektrální analýza variability srdeční frekvence – normativní data. Cesk Slov Neurol N 2010; 73/106(6): 663-672. IF = 0,393. Počet citací v SCI: 9.*

Práce hodnotí nálezy spektrální analýzy variability srdeční frekvence (SAHRV) na rozsáhlém souboru zdravých dobrovolníků. Jako jedna z minima publikovaných studií tak přes prokázanou velmi vysokou interindividuální variabilitu nálezů poskytuje validní věkově stratifikovaná normativní data pro všechny fáze uvedeného vyšetření, derivovaná pomocí různých statistických metod. Studie současně jako jedna z prvních poukazuje i na vysokou intraindividuální variabilitu vyšetření, přičemž námi zvolený způsob jejího hodnocení poskytuje (na rozdíl od dalších ojedinělých prací na toto téma) mimo jiné i informaci o běžné procentuální změně nálezu při opakovaném vyšetření, klíčovou při hodnocení významnosti případných změn výsledků při longitudinálním sledování pacientů. V neposlední řadě studie potvrzuje i významný vliv denní doby vyšetření na hodnoty spektrálního výkonu, což podporuje metodická doporučení o standardizaci denní doby pro provádění vyšetření SAHRV.

Takto vytvořená normativní data byla následně využívána v řadě dalších navazujících studií (*Buršová et al. 2012a, Divišová et al. 2012, Škorňa et al. 2015*).

Spektrální analýza variability srdeční frekvence – normativní data

Spectral Analysis of Heart Rate variability – in Quest of Normative Data

Souhrn

Úvod: Spektrální analýza variability srdeční frekvence umožňuje zachytit a kvantitativně vyjádřit regulační vlivy kardiálního autonomního nervového systému. Existuje však jen málo studií validně hodnotících variabilitu a reprodukovatelnost metodiky a použitá normativní data v dostupné literatuře široce kolísají. **Soubor a metodika:** Spektrální analýza variability srdeční frekvence byla vyšetřena u souboru 167 zdravých dobrovolníků (90 žen, 77 mužů, věk: medián 44 let, rozmezí 20–80 let), stratifikovaného podle věku do šesti skupin po jednotlivých dekádách. V každé z těchto podskupin byla vypočtena interindividuální variabilita hodnot jednotlivých parametrů a percentilovou metodou byla stanovena normativní data. U 21 jedinců bylo vyšetření provedeno opakovaně (3–5krát) během jednoho dne a/nebo ve stejnou denní dobu v různých dnech za účelem stanovení intra- a interday intraindividuální variability. **Výsledky:** Spektrální výkony nízkofrekvenčního pásma vykazovaly signifikantní negativní korelaci s věkem, jejich poměr byl naopak jediným parametrem signifikantně se odlišujícím u mužů (kde byl vyšší) a žen. Všechny hodnocené parametry vykazovaly shodně vysokou interindividuální variabilitu: interindividuální variační koeficienty byly obdobné i ve všech věkových podskupinách a pohybovaly se nejčastěji okolo 100 % (rozmezí 49–200 %). Zřetelně nižší, avšak také nezanedbatelná, byla variabilita intraindividuální variační koeficienty (stanovené z opakovaných vyšetření v různých dnech ve stejnou denní dobu) byly obdobné pro všechny vyšetřované parametry u mužů i žen a pohybovaly se nejčastěji okolo 35 % (rozmezí 1–100 %). Mírně vyšší hodnoty variačních koeficientů byly zjištěny při opakovaném vyšetření v průběhu stejného dne, bez statistické významnosti. **Závěr:** Normativní data pro jednotlivé parametry spektrální analýzy variability srdeční frekvence je nutno věkově stratifikovat. Extrémní fyziologická interindividuální variabilita nálezů však komplikuje jejich nastavení i diagnostickou validitu metodiky obecně. Při interpretaci výsledků a zejména event. změn nálezů při opakovaném vyšetření je nutno zohlednit také vysokou intraindividuální variabilitu.

Abstract

Introduction: Spectral analysis of heart rate variability enables the expression and quantification of regulatory influences within the cardiac autonomic nervous system. Only a few studies, however, have centred upon on the variability and reproducibility of the method, and the normal limit data recommended vary widely among the published studies. **Patients and methods:** Spectral analysis of heart rate variability was performed in a group of 167 healthy individuals (90 women, 77 men, median age 44 years, range 20–80) subdivided into 6 subgroups (according to respective age decades). In each of these subgroups, interindividual variability of the parameters evaluated was established and age-related normal limit data were established. In 21 of the individuals included, examination was repeated 3 to 5 times on the same day (intra-day intraindividual variability) or at about the same time on different days (inter-day intraindividual variability). **Results:** Low and high frequency settings showed significant negative correlation with age. Further, the ratio between them was the only parameter with significant sex-related differences (i.e. higher values in men). All the parameters evaluated exhibited high interindividual variability: coefficients of variation were similar in all age subgroups and reached values of around 100% (range 49–200%). Intraindividual variability was markedly lower, but also noteworthy. Inter-day intraindividual coefficients of

E. Vlčková, J. Bednařík,
Š. Buršová, K. Šajgalíková,
L. Mlčáková

Neurologická klinika LF MU a FN Brno



MUDr. Eva Vlčková
Neurologická klinika
LF MU a FN Brno
Jihlavská 20
625 00 Brno
e-mail: evlckova@email.cz

Přijato k recenzi: 12. 4. 2010
Přijato do tisku: 13. 7. 2010

Klíčová slova

spektrální analýza variability srdeční frekvence – normy – intraindividuální variabilita – interindividuální variabilita – zdraví jedinci – věk

Key words

spectral analysis of heart rate variability – normal data – intraindividual variability – interindividual variability – healthy individuals – age

Použité zkratky

ANS	autonomní nervový systém (autonomic nervous system)
CV	variační koeficient (coefficient of variation)
HF power	spektrální výkon vysokofrekvenčního pásma (high frequency power)
LF power	spektrální výkon nízkofrekvenčního pásma (low frequency power)
LF/HF ratio	poměr spektrálního výkonu nízkofrekvenčního pásma a vysokofrekvenčního pásma
SAHRV	spektrální analýza variability srdeční frekvence (spectral analysis of heart rate variability)
TP	celkový spektrální výkon (total power)

variation were similar in men and women and reached the values of about 35% (range 1–100%). Even slightly higher values were found when intra-day intraindividual variability was assessed. *Conclusions:* Normal data for particular parameters of spectral analysis of heart rate variability should be age-stratified. Their setting, however, is complicated, among other things, by extreme interindividual variability of values, something that involves the diagnostic validity of the method in general. High intraindividual variability should also be considered, in particular, in the evaluation of possible changes between repeated examinations.

Grantová podpora a poděkování

Práce byla podpořena výzkumným záměrem MSM0021622404 a grantovým projektem Interní grantové agentury Ministerstva zdravotnictví ČR č. NS 9667-4.

Autoři studie děkují všem jedincům zařazeným do prezentovaného souboru za ochotu a trpělivost, laborantkám elektrofyziologické laboratoře FN Brno, paní Marii Voborné, Marii Šestákové a Pavlině Jůzlové za technickou pomoc při získávání záznamů a prof. MUDr. Jaroslavu Opavskému, CSc., a doc. Ing. Jiřímu Salingerovi, CSc., za cenné připomínky a pomoc při zavádění metodiky a podnětnou diskuzi k výsledkům a jejich interpretaci.

Úvod

Dysfunkce autonomního centrálního systému (autonomic nervous system, ANS) je významná a často opomíjená součást řady patologických stavů periferního i centrálního nervového systému i mnoha interních onemocnění. Metody používané k hodnocení funkcí ANS (včetně nejčastěji užívaných kardiovagálních Ewingových testů zahrnujících klidové vyšetření variability RR intervalů a dále reakci na hluboké dýchání, Valsalvův manévra a ortostázu [1]) jsou často zatíženy nízkou validitou a reprodukovatelností a neumožňují detailněji odlišit vliv sympatické a parasympatické složky ANS na funkci testovaných fyziologických systémů (např. kardiovaskulárního).

Spektrální analýza srdeční variability srdeční frekvence je popisována jako spolehlivá a reprodukovatelná metoda citlivě reflektující nejen aktivitu parasympatiku, ale i balanci vagu a sympatiku [2,3]. Podstatou metodiky je skutečnost, že ukazatele kardiovaskulárních funkcí oscilují současně v různých rytmech, které mají z fyziologického hlediska odlišný význam. Jednotlivé frekvence, na nichž ke zmíněné oscilaci dochází, lze pomocí spektrální analýzy vzájemně odlišit a rozdělit do několika (obvykle čtyř) pásem [3], z nichž nejvýznamnější je pásmo nízkofrekvenční (low frequency – LF, v rozsahu 0,04–0,15 Hz), jež reflektuje současně aktivitu sympatiku i vagu (příčemž míra jejich zastoupení závisí na vyšetřované situaci, např. poloze těla). Souvisí zřejmě s periodickými změnami periferní cévní rezistence [4,5] a dále s baroreflexními mechanismy [6]. Dále je to pásmo vysokofrekvenční (high frequency – HF, v rozsahu 0,15–0,40 Hz), které odráží zejména aktivitu vagu spojenou s fyziologickou respirační arytmií [7]. Fyziologický podklad zbylých dvou frekvenčních pásem, tj. pásma

Tab. 1. Demografické charakteristiky souboru: počet pacientů, věková distribuce a zastoupení pohlaví v jednotlivých věkových podskupinách.

	20–30	30–40	40–50	50–60	60–70	70+
počet pacientů	32	35	31	42	17	10
počet mužů/žen	12/20	16/19	12/19	20/22	7/10	4/6
věk: medián (rozmezí)	26 (20–29)	33 (30–39)	44 (40–49)	54 (50–59)	64 (60–69)	72 (70–80)

ultranízkofrekvenčního (ultra low frequency – ULF, do 0,0033 Hz) a velmi nízkofrekvenčního (very low frequency – VLF, 0,0033–0,04 Hz), není dosud jednoznačně objasněn [3]. Tato frekvenční pásma většina autorů nezohledňuje.

V rámci vyšetření spektrální analýzy srdeční frekvence (spectral analysis of heart rate variability, SAHRV) se pak hodnotí intenzita oscilace srdeční frekvence na jednotlivých frekvencích (tzv. výkonová spektrální hustota – power spectral density). Součet výkonových spektrálních hustot na všech frekvencích určitého frekvenčního pásma se označuje jako spektrální výkon (power), který si lze představit jako plochu pod křivkou určenou výkonovými spektrálními hustotami v daném spektrálním pásmu. Nejčastěji hodnocenými parametry SAHRV tak bývají: spektrální výkon nízkofrekvenčního pásma (low frequency power, LF power), spektrální výkon vysokofrekvenčního pásma (high frequency power, HF power), jejich poměr (LF/HF ratio) a součet (celkový spektrální výkon, total power – TP).

Variabilitu srdeční frekvence lze hodnotit v klidovém stavu (při spontánním dýchání) nebo za standardizovaných zkoušek se známým vlivem na aktivitu ANS, jako jsou např. hluboké dýchání, Valsalvův manévra a zejména aktivní vertikalizace (tzv. ortostatická zkouška), resp. or-

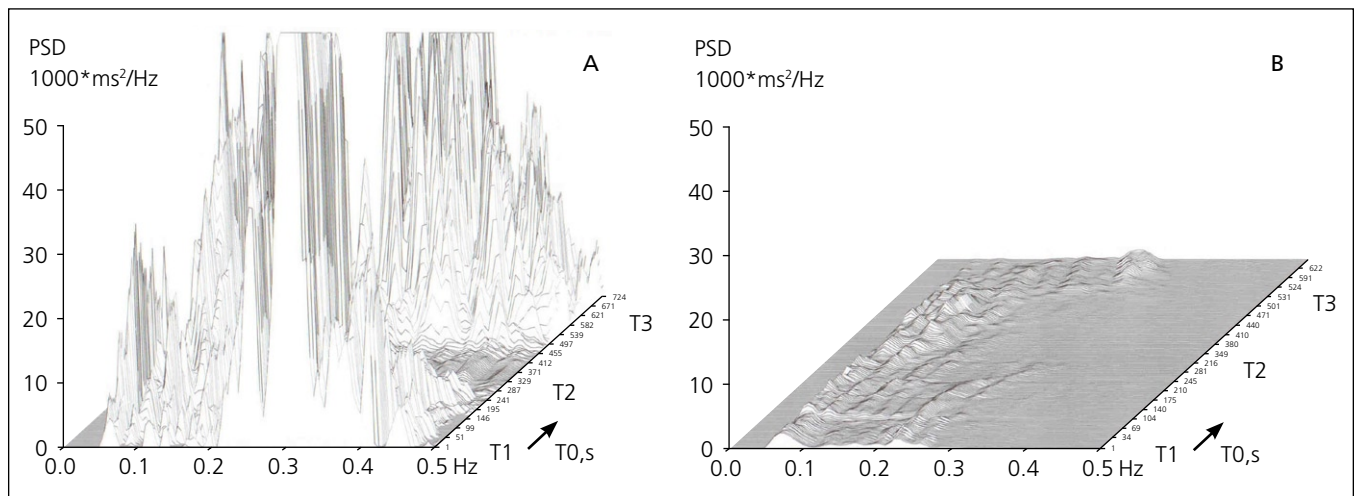
toklinostatický test (zkouška leh-stoj-leh) (graf 1a,b) [2,3].

Variabilita srdeční frekvence je významně ovlivněna řadou patologických stavů, farmakologických vlivů i fyziologických proměnných. Přestože je testování autonomních funkcí pomocí vyšetření SAHRV prováděno na řadě neurologických i interních pracovištích v České i Slovenské republice, existuje v naší literatuře pouze minimum původních prací, jež poskytují alespoň orientační normativní data využitelná pro hodnocení naší populace [8–10].

Cílem prezentované studie bylo proto vytvoření vlastních normativních dat pro hodnocení spektrální analýzy variability srdeční frekvence, ověření významnosti vlivu věku a pohlaví na hodnocené parametry a zhodnocení inter- a intraindividuální variability získaných hodnot.

Soubor a metodika

Do studie bylo zařazeno 167 zdravých dobrovolníků (90 žen, 77 mužů, věk: medián 44 let, rozmezí 20–80 let, tab. 1), především z řad zaměstnanců FN Brno a jejich příbuzných a známých. Vylučujícími kritérii byly klinické symptomy či objektivní známky polyneuropatie, přítomnost rizikových faktorů polyneuropatií včetně rizikové konzumace alkoholu (a to jak anamnestická, tak také zjištění korelujících abnormit zá-



Graf 1. Záznam vyšetření SAHRV při zkoušce leh – stoj – leh u zdravých osob v různých věkových kategoriích (graf 1a: 26 let, graf 1b: 74 let), demonstrující fyziologický pokles parametrů variability srdeční frekvence s věkem.

Na ose x jsou znázorněny jednotlivé frekvence, na nichž dochází k oscilaci záznamu, na ose y jsou pak hodnoty výkonové spektrální hustoty (tedy „míry kolísání záznamu“ na dané frekvenci) a osa z znázorňuje časový průběh záznamu, kde intervaly T1–3 představují jednotlivé fáze vyšetření s měnící se polohou pacienta (tedy Leh 1 – Stoj – Leh 2). Na záznamech jsou patrné fyziologické změny parametrů SAHRV v jednotlivých polohách – tedy iniciální vyšší aktivita v oblasti vysokofrekvenčního pásma při úvodní fázi vyšetření vleže (T1), následný pokles vysokofrekvenční a vzestup nízkofrekvenční složky při vyšetření vstoje (T2) a konečně opětovný vzestup vysokofrekvenční a pokles nízkofrekvenční složky v poslední fázi vyšetření (Leh 2: T3).

kladního biochemického vyšetření séra a vyšetření krevního obrazu), akutní infekt či rekonvalescence po něm, přítomnost kardiovaskulárních onemocnění a pravidelné užívání medikace s potenciálním vlivem na srdeční frekvenci a její variabilitu či na autonomní nervový systém obecně. Arteriální hypertenze nebyla považována za vylučující kritérium, jedinci s touto diagnostickou jednotkou však v naprosté většině případů nebyli do studie zařazeni právě vzhledem k účinkům antihypertenzní medikace. Vyšetřované osoby dále negovaly výraznější aktuální psychickou zátěž, stres či spánkovou deprivaci předcházející vyšetření. Zařazení jedinci byli podle věku rozděleni do šesti podskupin po jednotlivých dekádách (tab. 1).

U všech bylo provedeno krátkodobé testování variability srdeční frekvence při zkoušce leh-stoj-leh (graf 1a,b). Testování probíhalo v dopoledních hodinách (8–11 hod, s výjimkou vyšetření prováděných za účelem hodnocení intraday intraindividuální variability – viz dále) za standardizovaných podmínek: klidné, příjemné prostředí s minimalizací rušivých vlivů a optimalizací tepelné pohody, absence aktuální či bezprostředně předcházející výraznější psychické či fyzické zátěže (dle údajů pacienta), standardizované instrukce vyšetřovaným je-

dincům. Všichni vyšetření dobrovolníci negovali změny spánkového režimu (zejména výraznější nevyspání) v předcházející noci a byli informováni o vhodnosti lehké snídaně ráno před plánovaným vyšetřením. U každého z vyšetřovaných pacientů byla provedena zkouška leh-stoj-leh, přičemž v každé poloze setrval pacient 5 minut tak, aby bylo analyzováno alespoň 300 RR intervalů. Pro analýzu byl použit telemetrický diagnostický systém VarCor PF 7 (Dimea group, Olomouc, ČR), využívající pro zpracování dat variability srdeční frekvence rychlou Fourierovu transformaci, modifikovanou podle Yamamota (tzv. coarse-graining spectral analysis) [2]. Sledován byl spektrální výkon v oblasti nízkofrekvenčního pásma (LF a HF power), jejich poměr (LF/HF ratio) a celkový spektrální výkon (TP), a to v každé ze tří fází vyšetření. Vyhodnocen byl vliv věku a pohlaví na jednotlivé parametry a dále interindividuální variabilita hodnot jak sumárně v celém souboru, tak i v jednotlivých dekádách.

Za účelem posouzení intraindividuální variability parametrů SAHRV bylo testování u 21 zařazených jedinců provedeno opakovaně (3–5krát) v průběhu jednoho dne (a to s odstupem minimálně 3 hodin mezi jednotlivými vyšetřeními, intraday variabilita – za účelem posou-

zení významu standardizace denní doby při vyšetřování SAHRV) a/nebo ve stejnou denní dobu (dopoledne mezi 8–11 hod) v několika následujících dnech (interday variabilita).

Statistické zpracování bylo provedeno pomocí softwaru Statistica 6.0 firmy Statsoft. Ke zviditelnění rozložení hodnot jednotlivých testovaných parametrů a derivaci věkově stratifikovaných normativních dat byla použita robustní sumární statistika (medián, kvantily). Současně bylo provedeno testování distribuce základních dat pomocí testů chí-kvadrát a Kolmogorov-Smirnov. Vzhledem ke statisticky verifikované log-normální distribuci hodnot všech testovaných parametrů spektrálního výkonu byla následně provedena logaritmická transformace dat a pro popis rozložení hodnot i derivaci normativních dat byla současně použita i statistika parametrická (průměry, SD), odvozená z taktó transformovaných hodnot (s tím, že po provedení potřebných výpočtů byla data zpětně převedena na hodnoty spektrálního výkonu příslušnou exponenciální funkcí a jako taková jsou v práci prezentována). Srovnání hodnot mezi jednotlivými věkovými podskupinami bylo provedeno s použitím analýzy variance (ANOVA) s Tukeyho post-hoc korekcí. K vyjádření intra- i interindividuální variability byl

Tab. 3. Interindividuální variabilita parametrů SAHRV v jednotlivých dekádách.

Interindividuální variabilita hodnot spektrálních výkonů v oblasti nízk- a vysokofrekvenční (LF a HF power), celkového spektrálního výkonu (TP) a LF/HF ratio v jednotlivých intervalech (L1 – S – L2: Leh 1 – Stoj – Leh 2) a dekádách a také sumárně v celém souboru, vyjádřená jako interindividuální koeficient v % (*interCV*, výpočet viz Metodika).

<i>InterCV</i>	20–30		30–40		40–50		50–60		60–70		70+		Souhrnná	
	muži	ženy	muži	ženy	muži	ženy	muži	ženy	muži	ženy	muži	ženy	muži	ženy
L1: LF power	81	138	88	123	79	105	137	120	50	99	50	63	106	142
HF power	71	114	67	136	122	118	111	160	85	129	86	75	142	172
TP	60	104	71	111	99	100	112	135	54	74	60	49	109	141
LF/HF ratio	84	100	66	74	72	52	107	81	46	104	91	78	101	105
S: LF power	72	83	95	117	127	115	132	97	92	132	112	93	121	135
HF power	86	200	94	82	163	111	123	112	75	100	111	68	143	231
TP	62	115	91	100	133	101	125	88	87	98	111	81	116	147
LF/HF ratio	92	58	63	106	70	118	84	95	55	69	50	112	80	108
L2: LF power	76	112	73	166	105	117	83	127	83	70	89	75	111	193
HF power	82	128	89	96	182	128	121	125	64	116	103	85	153	163
TP	72	106	66	100	122	107	94	121	66	74	96	67	120	145
LF/HF ratio	128	122	95	120	92	76	90	92	114	127	125	98	110	116

použit variační koeficient (coefficient of variation, $CV = SD/x \times 100$).

Interindividuální variabilita hodnot jednotlivých parametrů tak byla vyjádřena jako interindividuální variační koeficient:

$$\text{interCV} = \frac{\sigma_b}{\bar{x}} \cdot 100$$

kde

$$\sigma_b = \left[\frac{1}{n} \sum_i^n (x_i - \bar{x})^2 \right]^{\frac{1}{2}}$$

(kde: n je počet jedinců, σ_b je směrodatná odchylka hodnot daného parametru v úvodních vyšetřeních celého souboru, \bar{x} je průměr hodnot daného parametru v celém souboru).

Intraday intraindividuální variabilita hodnot u jednotlivých vyšetřených jedinců byla vyjádřena jako intraday intraindividuální variační koeficient

$$\text{intraCV}_{ia} = \frac{\sigma_{ia}}{\bar{x}_{ia}} \cdot 100$$

kde

$$\sigma_{ia} = \left[\frac{1}{r_{ia}} \sum_j^{r_{ia}} (x_{ij} - \bar{x}_{ia})^2 \right]^{\frac{1}{2}}$$

Souhrnná intraday intraindividuální variabilita daného parametru v celém souboru pak byla vypočtena jako

$$\text{intraCV}_{ia-sum} = \frac{1}{n} \sum_i^n \frac{\sigma_{ia}}{\bar{x}_{ia}} \cdot 100$$

kde: n je počet jedinců, σ_{ia} je směrodatná odchylka hodnot opakovaných měření daného parametru u příslušného jedince během téhož dne, r_{ia} je počet opakovaných měření v jednom dni, \bar{x}_{ia} je průměr hodnot opakovaných měření daného parametru u příslušného jedince během téhož dne).

Obdobně interday intraindividuální variabilita hodnot u jednotlivých vyšetřených jedinců byla vyjádřena jako interday intraindividuální variační koeficient

$$\text{intraCV}_{ie} = \frac{\sigma_{ie}}{\bar{x}_{ie}} \cdot 100$$

kde

$$\sigma_{ie} = \left[\frac{1}{r_{ie}} \sum_j^{r_{ie}} (x_{ij} - \bar{x}_{ie})^2 \right]^{\frac{1}{2}}$$

a souhrnná interday intraindividuální variabilita daného parametru v celém souboru byla definována jako

$$\text{intraCV}_{ie-sum} = \frac{1}{n} \sum_i^n \frac{\sigma_{ie}}{\bar{x}_{ie}} \cdot 100$$

(kde: n je počet jedinců, σ_{ie} je směrodatná odchylka hodnot měření daného parametru u opakovaných u příslušného jedince ve stejnou denní dobu v různých

dnech, r_{ie} je počet měření opakovaných u příslušného jedince ve stejnou denní dobu v různých dnech, \bar{x}_{ie} je průměr hodnot měření daného parametru opakovaných u příslušného jedince ve stejnou denní dobu v různých dnech).

Výsledky

Sumarizace hodnot všech základních testovaných parametrů SAHRV je uvedena v tab. 2, a to jak formou neparametrické statistiky (medián, kvantily), tak formou statistiky parametrické (průměry, SD) derivované z logaritmičticky transformovaných hodnot. Prezentované výsledky lze využít jako normativní data pro jednotlivé parametry spektrálního výkonu, a to (vzhledem k níže uvedené vysoké interindividuální variabilitě hodnot) optimálně na dvou úrovních diagnostické jistoty, tj. jako dolní normální limity pro možnou (15. percentil a $x - 1$ SD) a definitivní (5. percentil nebo $x - 2$ SD) autonomní neuropatii (tab. 2).

Hodnoty spektrálního výkonu nízk- i vysokofrekvenčního pásma stejně jako celkového spektrálního výkonu prokázaly statisticky vysoce signifikantní pokles s věkem (tab. 2, graf 1a,b). Naopak vliv věku na LF/HF ratio byl méně významný (resp. v některých intervalech byl bez statistické významnosti) (tab. 2), i když ve všech vyšetřených intervalech lze vysledovat určitý obdobný trend k po-

Tab. 4: Intraindividuální (intra- a inter-day) variabilita parametrů SAHRV.

Intraindividuální variabilita hodnot spektrálních výkonů v oblasti nízko- a vysokofrekvenční (LF a HF power), celkového spektrálního výkonu (TP) a LF/HF ratio v jednotlivých intervalech (L1 – S – L2: Leh 1 – Stoj – Leh 2) zjištěná při opakovaných vyšetřeních v průběhu jednoho dne (Intra-day intraindividuální variabilita) nebo ve stejnou denní dobu v několika následujících dnech (Inter-day intraindividuální variabilita) a vyhodnocená s ohledem na pohlaví vyšetřených jedinců. Pro každý hodnocený parametr je uvedeno rozmezí jednotlivých intraindividuálních variačních koeficientů vyjádřených v % ($intraCV_{ia}$ a $intraCV_{ie}$, výpočet viz Metodika) ve vyšetřované skupině a jejich medián, sumární intraindividuální variační koeficient pro daný parametr ($intraCV_{ia-sum}$ a $intraCV_{ie-sum}$, výpočet viz Metodika), srovnání CV mezi muži a ženami (t-test¹) a srovnání intra- a interindividuální variability (t-test²) (N.S. = statisticky nevýznamný rozdíl).

	Intra-day intraindividuální variabilita				Inter-day intraindividuální variabilita				
	muži ($intraCV_{ia}$)	ženy ($intraCV_{ia}$)	t-test ¹ (p)	Sumární CV ($intraCV_{ia-sum}$)	muži ($intraCV_{ie}$)	ženy ($intraCV_{ie}$)	t-test ¹ (p)	sumární CV ($intraCV_{ie-sum}$)	t-test ² (p)
L1: LF power	43 (38–53)	58 (15–151)	N.S.	61	34 (4–51)	32 (7–80)	N.S.	36	N.S.
HF power	36 (27–40)	25 (7–74)	N.S.	34	14 (9–38)	35 (1–87)	N.S.	31	N.S.
TP	38 (34–50)	21 (12–83)	N.S.	39	30 (8–39)	30 (1–75)	N.S.	27	N.S.
LF/HF ratio	23 (13–41)	59 (23–151)	N.S.	52	19 (6–41)	52 (14–100)	0,02	47	N.S.
S: LF power	40 (20–52)	34 (14–85)	N.S.	42	35 (9–50)	30 (1–93)	N.S.	36	N.S.
HF power	36 (25–64)	39 (28–80)	N.S.	43	33 (23–48)	43 (4–88)	N.S.	37	N.S.
TP	38 (21–52)	31 (10–72)	N.S.	38	36 (3–44)	24 (3–83)	N.S.	34	N.S.
LF/HF ratio	34 (11–43)	37 (27–83)	N.S.	38	24 (9–66)	23 (1–80)	N.S.	34	N.S.
L2: LF power	41 (25–63)	28 (11–163)	N.S.	46	47 (9–80)	26 (3–87)	N.S.	35	N.S.
HF power	47 (21–64)	29 (17–78)	N.S.	41	43 (15–73)	33 (5–64)	N.S.	37	N.S.
TP	39 (24–66)	22 (4–116)	N.S.	40	41 (16–79)	26 (6–56)	N.S.	35	N.S.
LF/HF ratio	23 (12–32)	39 (25–118)	N.S.	40	16 (14–22)	30 (14–56)	0,02	30	N.S.

stupnému nárůstu hodnot LF/HF ratio od nejmladších věkových skupin s maximem kolem 50–60 let věku a s následným opětovným poklesem (tab. 2).

Při hodnocení vlivu pohlaví na nálezy SAHRV byl ve všech vyšetřovaných intervalech u mužů patrný trend k vyšším hodnotám power LF a méně zřetelně i k nižším hodnotám power HF ve srovnání s nálezy u žen. Při srovnání absolutních hodnot spektrálních výkonů nebyly zmíněné rozdíly statisticky významné, a to ani při souhrnném hodnocení celého souboru (tab. 2), ani při srovnání parametrů spektrálního výkonu mezi muži a ženami v jednotlivých věkových podskupinách. Pokud však byl vyhodnocen procentuální podíl spektrálního výkonu nízko- nebo vysokofrekvenčního pásma na celkovém spektrálním výkonu, byl prokázán významně vyšší podíl power LF a nižší podíl power HF na TP u mužů ve srovnání s ženami, a to ve všech vyšetřovaných intervalech ($p = 0,01–0,001$, data detailně neuvedena). U mužů byly dále prokázány signifikantně vyšší hodnoty LF/HF ratio ve všech vyšetřovaných intervalech (tab. 2).

Všechny hodnocené parametry vykazovaly výraznou interindividuální variabilitu, patrnou jak z interindividuálních variačních koeficientů (tab. 3), tak i z distribuce vlastních hodnot spektrálního výkonu (tab. 2), prokazující již od nejmladších věkových skupin u části vyšetřených jedinců velmi nízký spektrální výkon, a to nikoli jako izolované odlehle hodnoty, ale jako součást kontinuálního spektra nálezu (jak je patrné z blízkosti hodnot 5. a 10. percentilu většiny parametrů uvedených v tab. 2). Interindividuální variabilita (vyjádřená jako interindividuální variační koeficient $interCV$, výpočet viz Metodika) je obdobná ve všech věkových podskupinách a pro všechny vyšetřené parametry všech hodnocených intervalů a pohybuje se nejčastěji kolem 100 % (3/4 hodnot jsou v intervalu 70–130 %, rozmezí v jednotlivých dekádách 46–200 %) (tab. 3).

Poměrně vysoká je i intraindividuální variabilita hodnot (vyjádřena jako intra- či interday intraindividuální variační koeficient $intra CV_{ia}$ a $intra CV_{ie}$, výpočet viz Metodika), která dosahuje cca 25–50 % variability interindividuální a při souhr-

ném hodnocení se opět významně neliší mezi jednotlivými hodnocenými parametry (tab. 4). U většiny vyšetřených jedinců se však naopak variabilita jednotlivých parametrů navzájem liší, a tak např. při špatné reprodukovatelnosti power HF má daný jedinec velmi dobře či průměrně reprodukovatelné hodnoty power LF a naopak (data podrobněji neuvedena). Intraindividuální variační koeficient vyšší než 50 % mělo alespoň u některého ze sledovaných parametrů více než 3/4 testovaných jedinců, a to při hodnocení interday i intraday intraindividuální variability (data neuvedena). U většiny sledovaných parametrů je patrný určitý (statisticky nevýznamný) trend k mírně vyšší intraindividuální variabilitě při zohlednění několika vyšetření provedených v průběhu téhož dne (intraday variabilita) oproti opakovaným vyšetřením ve stejnou denní dobu během několika následujících dní (interday variabilita) (tab. 4).

Diskuze

Hlavním výstupem prezentované prospektivní studie je definice normativních

dat základních testovaných parametrů SAHRV a současně průkaz velmi vysoké inter- i intraindividuální variability hodnot spektrálního výkonu, která komplikuje jak zmíněné nastavení normativních dat, tak (v případě vysoké intraindividuální variability) také hodnocení případných změn při longitudinálním sledování autonomních funkcí. Při tvorbě normativních dat je dále nutno zohlednit vysoce signifikantní pokles hodnot spektrálního výkonu s věkem (potvrzený našimi výsledky), zatímco vliv pohlaví na většinu základních parametrů, hodnocených při vyšetření spektrální analýzy variability srdeční frekvence, je méně jednoznačný.

Autonomní nervový systém představuje důležitou a často opomíjenou složku nervového systému a možnost validního testování jeho funkce je pro neurology stejně jako pro další specializace vždy velmi cenná. Spektrální analýza variability srdeční frekvence, jež umožňuje detailní zhodnocení autonomní modulační kardiovaskulárního systému, se proto v poslední době stala dostupnou a široce využívanou metodou na řadě neurologických, ale i kardiologických pracovišť či v oblasti sportovní medicíny. I přes nesporné výhody metodiky se autoři této studie pokusili upozornit na některá úskalí, která je třeba zohlednit při jejím využití, tj. zejména na velmi vysokou inter- i intraindividuální variabilitu nálezů.

Variabilita parametrů popisujících autonomní funkce je fyziologický adaptační mechanismus a právě její existence je faktickým podkladem metodiky vyšetření SAHRV. Kromě vnitřních fyziologických vlivů, které jsou podkladem variability autonomních funkcí testovaných při SAHRV vyšetření (tj. respirační arytmie, baroreflexní mechanismy apod.), však na autonomní nervový systém působí řada dalších fyziologických proměnných i patologických mechanismů a vnějších faktorů [2,3], které mohou ovlivnit nálezy SAHRV a zvýšit tak inter- i intraindividuální variabilitu sledovaných parametrů. Proto je vhodné je standardizovat či zohlednit při hodnocení nálezů.

Jedním z nejdůležitějších faktorů podílejících se na vysoké interindividuální variabilitě nálezů je různé autonomní ladění a různá míra autonomních oscilací mezi vyšetřovanými jedinci. Jedná se o fyziologickou proměnnou, která charakterizuje vyšetřovaného jedince (obdobně

jako např. somatotyp), a její interindividuální rozdíly lze využít např. k rozlišení různých typů zdravých osob podle autonomní reaktivity. Její existence je tak faktická výhoda metodiky, přestože zásadním způsobem komplikuje možnosti nastavení normativních dat (viz níže).

Další velmi významný fyziologický parametr, jenž ovlivňuje výsledky SAHRV, je jednoznačně věk vyšetřovaného jedince. Obdobně jako autoři většiny dalších studií [9–15] jsme i my prokázali signifikantní pokles hodnot spektrálního výkonu nízkou i vysokofrekvenčního pásma i celkového spektrálního výkonu s věkem. Shodně s výsledky dříve publikovaných prací [11,13–15] naše nálezy ukazují také na významně menší vliv věku na LF/HF ratio (i když zde je patrný určitý trend k postupnému nárůstu hodnot LF/HF ratio od nejmladších věkových skupin s maximum kolem 50–60 let věku s následným opětovným poklesem). Nálezy SAHRV je tak nutno vždy interpretovat s ohledem na věk vyšetřovaného jedince, resp. optimálně s využitím věkově stratifikovaných normativních dat.

Méně jednoznačný je vliv pohlaví vyšetřovaných jedinců na výsledky SAHRV. V souladu s nálezy dříve publikovaných studií [13–15] jsme v naší studii prokázali u mužů signifikantně vyšší hodnoty LF/HF ratio a dále významně vyšší relativní podíl LF power a nižší podíl HF power na celkovém spektrálním výkonu ve srovnání se ženami. Naopak rozdíly absolutních hodnot celkového spektrálního výkonu ani jeho jednotlivých složek nebyly v našem souboru (přes existenci určitých trendů pro hodnoty power LF i HF) statisticky významné. Obdobně nejsou v tomto směru jednoznačné ani nálezy dalších publikovaných souborů. Většina prací se shoduje na absenci rozdílů celkového spektrálního výkonu [11–13], zatímco nálezy pro jeho jednotlivé složky se mezi publikovanými pracemi liší. Např. Zhang [14] našel u žen významně vyšší hodnoty power HF, zatímco absolutní hodnoty power LF se v jejich souboru mezi muži a ženami významně nelišily. Jiné studie [11,13,15] naopak popisují významně vyšší absolutní hodnoty power LF u mužů a absenci rozdílů absolutních hodnot power HF mezi pohlavími. Další práce [12] pak prokazuje oba uvedené rozdíly. Ve všech zmíněných studiích jsou však rozdíly vlastních hodnot spektrálních výkonů mezi pohlavími rela-

tivně malé a daleko méně statisticky významné ve srovnání s rozdíly relativních podílů LF nebo HF power na TP (resp. jsou pouze na hranici statistické významnosti), a to i přes vysoké počty jedinců zařazených do prezentovaných souborů. V souhrnu je tedy pravděpodobné, že určitý rozdíl ve smyslu nižších absolutních hodnot power LF a vyšších hodnot power HF u žen existuje, jsou ale zřejmě malé a hraničně statisticky významné, takže jsme je v naší studii neprokázali (zřejmě vzhledem k cca 2–3krát nižšímu počtu jedinců zařazených do prezentovaného souboru oproti ostatním zmíněným publikacím) a jejich klinický význam a nutnost jejich zohlednění při tvorbě normativních dat a interpretaci nálezů jsou sporné.

Podkladem zmíněných intersexuálních rozdílů autonomních funkcí jsou pravděpodobně hormonální vlivy. Diskutován proto bývá i vliv menstruačního cyklu u žen (resp. související hormonální změny) na nálezy SAHRV. Bylo prokázáno určité zvýšení hodnot LF power a snížení hodnot HF power v luteální fázi oproti fázi folikulární [16]. V naší studii jsme tento faktor nezohledňovali, a nemůžeme tak vyloučit určitý vliv hormonálních změn v rámci menstruačního cyklu u žen na prezentované výsledky. Podle dostupných studií jsou však tyto změny poměrně malé. Autoři se proto domnívají, že jejich případný vliv na základní rozložení hodnot či interindividuální variabilitu je pravděpodobně zanedbatelný (mj. proto, že jde o náhodný vliv, a lze tedy předpokládat, že vyšetřované ženy se v době provádění záznamu nacházely v různých fázích menstruačního cyklu, a vliv jednotlivých změn se tak v celém souboru vzájemně vyrovnal). Tento parametr navíc obvykle nebývá zohledňován ani u pacientek vyšetřovaných metodou SAHRV z diagnostických důvodů. Jediným parametrem, který tak mohl být změnami autonomní aktivity v různých fázích menstruačního cyklu případně ovlivněn, je interday intraindividuální variabilita. Tuto hypotézu však nepodporuje absence rozdílů interday intraindividuálních variačních koeficientů mezi muži a ženami, i když definitivní zhodnocení tohoto vlivu na reprodukovatelnost SAHRV by bylo pravděpodobně vhodné ověřit cílenou studií.

Kromě zmíněných fyziologických parametrů mohou být nálezy SAHRV (stejně jako jejich reprodukovatelnost) významně

ovlivněny řadou dalších faktorů. Prokázán je např. význam stresu či výraznější alterace spánkového režimu [17–20], jejichž vliv na hodnoty spektrálních výkonů a zejména na reprodukovatelnost nálezů nelze spolehlivě vyloučit ani v prezentované studii (přestože vyšetření jedinci byli na uvedené okolnosti dotazováni a ve výraznější míře je negovali). Uvedené faktory (obdobně jako řadu dalších) však obvykle nelze eliminovat ani u pacientů podstupujících vyšetření SAHRV z diagnostických důvodů, a autoři se proto domnívají, že jejich případný vliv na nálezy kontrolního souboru nesnižuje validitu zjištěných dat ani jejich použitelnost pro nastavení norem a hodnocení reprodukovatelnosti SAHRV.

Autonomní nervový systém také citlivě reaguje na farmakologické vlivy či řadu patologických faktorů vedoucích k rozvoji autonomní neuropatie či změnám kardiiovaskulárních funkcí [2,3]. Přestože se autoři v rámci nastavení vstupních kritérií prezentované studie pokusili tyto vlivy maximálně eliminovat, nemohou u části zařazených jedinců vyloučit např. výskyt subklinických, dosud nediodagnostikovaných onemocnění či patologických mechanismů s potenciálním vlivem na vegetativní funkce (a výsledky SAHRV). Takový vliv však lze předpokládat maximálně v několika ojedinělých případech a není možné vysvětlit jím konstantní extrémní interindividuální variabilitu a výskyt velmi nízkých hodnot SAHRV parametrů u významné části vyšetřených jedinců všech věkových skupin.

I přes maximální snahu o standardizaci podmínek vyšetření a eliminaci potenciálních interferujících faktorů jsme tak v naší studii prokázali velmi vysokou interindividuální variabilitu hodnot, a to pro všechny parametry spektrálního výkonu a ve všech věkových podskupinách. Obdobné nálezy popisuje i řada dříve publikovaných studií [14,21], prokazujících pro HF power, LF power i TP hodnoty SD vyšší (nebo alespoň srovnatelně velké) ve srovnání s průměrnými hodnotami zmíněných parametrů. Obdobně jako v našem souboru prokázal např. Zhang [14] u zdravých dobrovolníků velmi široký rozptyl hodnot všech sledovaných parametrů (kdy nejnižší hodnoty se pohybují v řádu jednotek ms^2 a nejvyšší v řádu několika tisíc), a to pro všechny sledované parametry ve všech věkových podskupinách a pro obě pohlaví.

Právě extrémní interindividuální variabilita hodnot prakticky ve všech sledovaných dekádách (kdy se v našem souboru zdravých jedinců pohybuje řada hodnot v pásmu často v rámci rutinního vyšetření popisovaném jako nesporná abnormita, přičemž se nejedná o jednotlivé odlehle hodnoty, které by bylo možno vysvětlit event. náhodnou chybou) je faktor, jenž výrazně komplikuje nastavení normativních dat. Přestože optimální nastavení normálních limitů je klíčový faktor limitující praktickou využitelnost jakékoli metodiky, a to jak pro výzkumné účely, tak zejména pro klinickou praxi, existuje jen minimum prací, které prezentují validní, v praxi využitelná věkově stratifikovaná normativní data SAHRV [11]. Jedním z důvodů je zřejmě non-normální distribuce hodnot jednotlivých parametrů a dále zmíněná extrémní interindividuální variabilita, jejímž důsledkem je pravděpodobný široký překryv nálezů mezi významnou částí zdravých jedinců a pacientů s autonomní neuropatií (viz např. [1]). U metodik s uvedenou distribucí hodnot pak může být norma nastavena běžným způsobem např. na úrovni 2 SD nebo 5. či 2,5. percentilu kontrolního souboru, kdy je dosaženo uspokojivé specifity vyšetření, avšak při jeho nízké senzitivitě (a velkém množství falešně negativních nálezů) nebo lze za účelem zvýšení senzitivity normu nastavit volněji (např. na úrovni 1 či 1,5 SD nebo 15. či 20. percentilu), ovšem za cenu snížení specifity a zvýšení množství nálezů falešně pozitivních. Možným řešením je kombinace obou metod s nastavením dvou stupňů abnormality, např. na úrovni 5. a 15. percentilu či 2 SD a 1 SD (viz tab. 2). Výsledky nacházející se pod přísnějším z obou limitů by pak měly být interpretovány jako nezpochybnitelná abnormita (a tedy průkaz definitivní autonomní neuropatie), kdežto výsledky z oblasti mezi oběma limitními hodnotami by měly být hodnoceny jako sporné, nevylučující určitou autonomní dysfunkci, resp. svědčící pro možnou autotickou spolehlivost.

V naší práci byla normativní data derivována jak pomocí kvantilů, tak také pomocí průměrů a SD (odvozených z logaritmičticky transformovaných hodnot). Výsledky získané oběma metodami jsou plně srovnatelné, což potvrzuje správnost nastavení limitů oběma zmíněnými způsoby a pod-

poruje oprávněnost logaritmičké transformace dat pro účely statistického hodnocení parametrů spektrálního výkonu.

S ohledem na výše zmíněné limity interpretace vlastních hodnot spektrálního výkonu je při vyšetření SAHRV vhodné zohlednit i další parametry záznamu, zejména jeho dynamiku (resp. grafické charakteristiky odpovědí spektrálních složek) v průběhu jednotlivých fází testu. Např. skutečnost, že při opakovaném lehu je spektrální výkon vysokofrekvenční oblasti vyšší než při úvodní fázi vleže, svědčí pro dobrou reflexní odpověď vagu [1]. Pouze z grafického záznamu zkoušky leh-stoj-leh tak lze hodnotit dynamiku odpovědí sympatiku a vagu (tedy zvýšení aktivity vagu vleže a snížení vstojie a opačnou reaktivitu sympatiku, graf 1a, b), a usuzovat tak na „fyziologickou“ či „abnormní“ reaktivitu ANS. Možnost hodnocení změn jednotlivých parametrů SAHRV při zkoušce leh-stoj-leh je proto nesporná výhoda a významným přínos této metodiky a vedle vlastních hodnot spektrálního výkonu jde o další parametr, který citlivě reflektuje aktivitu ANS [1]. V prezentované práci nebyla zmíněna dynamika hodnocena zejména proto, že původním účelem studie bylo stanovení normativních dat SAHRV zvláště v úvodní fázi testu (tedy při vyšetření vleže) za účelem vytvoření normativních dat využitelných např. při sledování rozvoje autonomní neuropatie u kriticky nemocných pacientů – tedy jedinců, kteří nejsou schopni provést dalších fáze testu (zejména postavení).

Intraindividuální variabilita všech základních parametrů hodnocených při vyšetření SAHRV je významně nižší než variabilita interindividuální, avšak také nezanedbatelná. V dostupné literatuře existuje jen málo prací, jež validně hodnotí reprodukovatelnost metodiky. Publikované studie [22–24] navíc většinou užívají k hodnocení reprodukovatelnosti tzv. intraclass korelační koeficient. Tento způsob hodnocení však na rozdíl od metodiky intraindividuálních variačních koeficientů (užívané v naší studii, obdobně jako např. Kobayashim [25]) neposkytuje informaci o běžné procentuální změně nálezu při opakovaném vyšetření, což je parametr využitelný pro hodnocení významnosti případných změn výsledků v klinické praxi. Námi zjištěná interday intraindividuální variabilita dosahuje cca 25–50 % variability interindividuální, což je plně

srovnatelné s nálezy dalších publikovaných studií [22,25] a v průměru se pohybuje kolem 35 %. V metodicky obdobné práci uvádí Kobayashi [25] průměrné intraindividuální variační koeficienty na úrovni nad 20 %, tedy také poměrně vysoké, i když mírně nižší, než jsme prokázali v naší studii. Rozdíly mohou být dány tím, že do jeho studie byli zařazeni pouze muži, vyšetření probíhalo v jiné denní době (a to po obědě, v časných odpoledních hodinách) a roli mohou hrát i rasové rozdíly variability srdeční frekvence (studie byla provedena u mužů japonské národnosti). Nálezy naší studie dále prokazují široký rozptyl hodnot intraindividuálních variačních koeficientů jednotlivých parametrů se změnou pohybující se mezi jednotlivými vyšetřeními v rozmezí od několika jednotek procent až po více než 100 %. Přitom opět platí, že nejde o extrémní nálezy jednoho či několika málo jedinců, po jejichž vyřazení by se variabilita významně snížila. Naopak většina pacientů vykazovala špatnou reprodukovatelnost alespoň některého ze sledovaných parametrů.

Intraindividuální variabilita je dle našich nálezů dále mírně (i když statisticky nevýznamně) vyšší při opakovaném vyšetření během jednoho dne než při hodnocení opakovaných vyšetření ve stejnou denní dobu v několika následujících dnech. Toto zjištění není překvapivé, protože při opakovaném vyšetření v různou denní dobu téhož dne přispívá k zvýšení variability také fyziologická cirkadiální fluktuace aktivity autonomního nervového systému.

V souhrnu jsme tedy prokázali poměrně vysokou intraindividuální variabilitu nálezů SAHRV, kterou je vhodné zohlednit při sledování případného vývoje nálezů v čase (např. při hodnocení event. změn

kondice pacientů po intenzivním tréninku či při longitudinálním sledování pacientů s možnou autonomní neuropatií). Pro snížení variability je vhodné vyšetření provádět vždy ve stejnou denní dobu, aby se omezil vliv kolísání aktivity vegetativního nervového systému v průběhu dne.

Literatura

1. Ewing DJ, Clarke BF. Diagnosis and management of diabetic autonomic neuropathy. *Br Med J* 1982; 285(6346): 916–918.
2. Opavský J. Autonomní nervový systém a diabetická autonomní neuropatie. Praha: Galén 2002.
3. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. *Circulation* 1996; 93(5): 1043–1065.
4. Akselrod S, Gordon D, Madwed JB, Snidman NC, Shannon DC, Cohen RJ. Hemodynamic regulation: investigation by spectral analysis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1985; 249(2): 867–875.
5. Akselrod S, Gordon D, Ubel FA, Shannon DC, Berger AC, Cohen RJ. Power spectrum analysis of heart rate fluctuation: a quantitative probe of beat-to-beat cardiovascular control. *Science* 1981; 213(4504): 220–222.
6. Stein PK, Bosner MS, Kleiger RE, Conger BM. Heart rate variability: a measure of cardiac autonomic tone. *Am Heart J* 1994; 127(5): 1376–1381.
7. Montano N, Ruscone TG, Porta A, Lombardi F, Pagani M, Malliani A. Power spectrum analysis of heart rate variability to assess the changes in sympathovagal balance during graded orthostatic tilt. *Circulation* 1994; 90(4): 1826–1831.
8. Krahulec B, Žúži M, Vozár J, Kučera P, Mazárová V. Diabetická polyneuropatia. Súčasný diagnostický a terapeutický možnosti. Bratislava: Lufema 1999.
9. Hosová J, Jirkovská A, Bouček P, Pumprla J, Hejnová J, Lacigová S, Skibová J. Normální hodnoty parametrů spektrální analýzy variability srdeční frekvence v závislosti na věku vhodné pro klinické hodnocení autonomní neuropatie u nemocných s diabetem. *DMEV* 2001; 4: 103–110.
10. Šlachta R, Stejskal P, Elfmark M, Salinger J, Kalina M, Rehová I. Age and spectral analysis of heart rate variability. *Acta Univ Palacki Olomouc Gymn* 2002; 32(1): 59–67.
11. Agelink MW, Malessa R, Baumann B, Majewski T, Akila F, Zeit T et al. Standardized tests of heart rate variability: normal ranges obtained from 309 healthy

humans, and effects of age, gender, and heart rate. *Clin Auton Res* 2001; 11(2): 99–108.

12. Kuch B, Hense HW, Sinnreich R, Kark JD, von Eckardstein A, Sapoznikov D et al. Determinants of short-period heart rate variability in the general population. *Cardiology* 2001; 95(3): 131–138.
13. Fagard RH, Pardaens K, Staessen JA. Influence of demographic, anthropometric and lifestyle characteristics on heart rate and its variability in the population. *J Hypertens* 1999; 17(11): 1589–1599.
14. Zhang J. Effect of age and sex on heart rate variability in healthy subjects. *J Manipulative Physiol Ther* 2007; 30(5): 374–379.
15. Park SB, Lee BC, Jeong KS. Standardized tests of heart rate variability for autonomic function tests in healthy Koreans. *Int J Neurosci* 2007; 117(12): 1707–1717.
16. Sato N, Miyake S, Akatsu J, Kumashiro M. Power spectral analysis of heart rate variability in healthy young women during the normal menstrual cycle. *Psychosom Med* 1995; 57(4): 331–335.
17. Šiška E, Opavský J, Opavská, H. Vliv experimentálního stresu na autonomní regulaci srdeční činnosti. *Cesk psychol* 1998; 17(4): 314–327.
18. Pagani M, Pizzinelli P, Traon AP, Ferreri C, Beltrami S, Bareille MP et al. Hemodynamic, autonomic and baroreflex changes after one night sleep deprivation in healthy volunteers. *Auton Neurosci* 2009; 145(1–2): 76–80.
19. Saito K, Hiya A, Uemura Y, Furuta M. Clinical training stress and autonomic nervous function in female medical technology students: analysis of heart rate variability and 1/f fluctuation. *J Med Invest* 2008; 55(3–4): 227–230.
20. Lucini D, Riva S, Pizzinelli P, Pagani M. Stress management at the worksite: reversal of symptoms profile and cardiovascular dysregulation. *Hypertension* 2007; 49(2): 291–297.
21. Carter JB, Banister EW, Blaber AP. The effect of age and gender on heart rate variability after endurance training. *Med Sci Sports Exerc* 2003; 35(8): 1333–1340.
22. Zöllei E, Csillik A, Rabi S, Gingl Z, Rudas L. Respiratory effects on the reproducibility of cardiovascular autonomic parameters. *Clin Physiol Funct Imaging* 2007; 27(4): 205–210.
23. Kowalewski MA, Urban M. Short- and long-term reproducibility of autonomic measures in supine and standing positions. *Clin Sci* 2004; 106(1): 61–66.
24. Nunan D, Donovan G, Jakovljevic DG, Hodges LD, Sandercock GR, Brodie DA. Validity and reliability of short-term heart-rate variability from the Polar S810. *Med Sci Sports Exerc* 2009; 41(1): 243–250.
25. Kobayashi H. Inter- and intra-individual variations of heart rate variability in Japanese males. *J Physiol Anthropol* 2007; 26(2): 173–177.

Tab. 2. Sumarizace parametrů SAHRV v jednotlivých dekadách – část 1.

Sumarizace spektrálních výkonů v oblasti nízko- a vysokofrekvenční (LF a HF power), celkového spektrálního výkonu (TP) a LF/HF ratio v jednotlivých intervalech (L1 – S – L2: Leh 1 – Stoj – Leh 2) a dekadách, provedená pomocí neparametrické statistiky (medián, kvantily) a současně pomocí statistiky parametrické (průměr, SD), vypočtené z logaritmicke transformovaných dat (s následným převedením zpět na hodnoty spektrálního výkonu pomocí příslušné exponenciální funkce – takto zpracované parametry jsou v tabulce označeny *). Hodnoty jsou uvedeny v ms². Výsledky lze použít k derivaci věkově stratifikovaných normativních dat, a to optimálně na dvou úrovních významnosti abnormality (5. a 15. percentil, nebo $x - 2$ SD a $x - 1$ SD). Uvedeno je dále srovnání náležů mezi věkovými podskupinami (ANOVA) a mezi muži a ženami (t-test): N.S. = nevýznamný rozdíl (non significant).

CV: variační koeficient (coefficient of variation), HF power: spektrální výkon vysokofrekvenčního pásma (high frequency power), L1 – S – L2: Leh 1 – Stoj – Leh 2, LF power: spektrální výkon nízkofrekvenčního pásma (low frequency power), LF/HF ratio: poměr spektrálního výkonu nízko- a vysokofrekvenčního pásma, N.S.: statisticky nevýznamný rozdíl (non significant), TP: celkový spektrální výkon (total power)

20–30										
	5. per- centil	10. per- centil	15. per- centil	Medián	X-2 SD *	X-1,5 SD *	X-1 SD *	Prů- měr *	ANOVA (věk) (p)	t-test (po- hlaví) ((p)
L1: LF power	55	70	73	295	30	53	94	291	0,002	N.S.
HF power	116	205	283	735	81	142	249	761	<0,001	N.S.
TP	207	282	375	1199	155	257	425	1168	<0,001	N.S.
LF/HF ratio	0,06	0,11	0,14	0,45	0,04	0,07	0,12	0,38	<0,001	0,01
S: LF power	182	223	239	810	129	196	297	681	<0,001	N.S.
HF power	39	65	84	276	29	49	81	226	<0,001	N.S.
TP	240	360	378	1075	185	279	422	963	<0,001	N.S.
LF/HF ratio	0,79	1,20	1,50	3,00	0,67	0,99	1,46	3,15	N.S.	0,01
L2: LF power	31	47	84	435	18	36	71	281	0,001	N.S.
HF power	200	236	270	945	103	178	304	890	<0,001	N.S.
TP	286	322	393	1313	204	328	526	1357	<0,001	N.S.
LF/HF ratio	0,07	0,10	0,11	0,36	0,01	0,03	0,07	0,32	0,02	0,01
30 – 40										
	5. per- centil	10. per- centil	15. per- centil	Medián	X-2 SD *	X-1,5 SD *	X-1 SD *	Prů- měr *	ANOVA (věk) (p)	t-test (po- hlaví) ((p)
L1: LF power	61	71	122	309	46	74	117	296	0,002	N.S.
HF power	79	104	137	433	51	87	148	433	<0,001	N.S.
TP	151	208	271	864	130	206	327	822	<0,001	N.S.
LF/HF ratio	0,14	0,20	0,25	0,80	0,08	0,13	0,23	0,68	<0,001	0,01
S: LF power	89	163	194	458	55	94	163	485	<0,001	N.S.
HF power	22	31	37	166	14	24	43	133	<0,001	N.S.
TP	105	259	322	555	87	145	241	665	<0,001	N.S.
LF/HF ratio	0,86	0,88	1,22	3,77	0,56	0,90	1,44	3,67	N.S.	0,01
L2: LF power	44	76	140	321	31	55	100	328	0,001	N.S.
HF power	88	98	161	712	60	105	185	571	<0,001	N.S.
TP	223	333	407	1111	161	259	416	1073	<0,001	N.S.
LF/HF ratio	0,05	0,11	0,15	0,76	0,04	0,08	0,15	0,58	0,02	0,01
40 – 50										
	5. per- centil	10. per- centil	15. per- centil	Medián	X-2 SD *	X-1,5 SD *	X-1 SD *	Prů- měr *	ANOVA (věk) (p)	t-test (po- hlaví) ((p)
L1: LF power	57	85	89	329	41	68	110	292	0,002	N.S.
HF power	39	74	94	192	22	41	76	258	<0,001	N.S.
TP	103	161	207	566	71	120	203	583	<0,001	N.S.
LF/HF ratio	0,46	0,55	0,68	1,06	0,27	0,39	0,56	1,14	<0,001	0,01
S: LF power	46	76	87	282	28	51	93	303	<0,001	N.S.
HF power	8	13	15	83	6	11	21	73	<0,001	N.S.
TP	61	103	120	472	41	72	128	398	<0,001	N.S.
LF/HF ratio	1,20	1,25	1,53	3,78	0,73	1,14	1,76	4,2	N.S.	0,01
L2: LF power	45	55	59	315	27	48	86	274	0,001	N.S.
HF power	34	55	71	209	17	33	63	233	<0,001	N.S.
TP	95	142	147	574	58	103	182	570	<0,001	N.S.
LF/HF ratio	0,15	0,34	0,63	1,57	0,15	0,25	0,42	1,18	0,02	0,01

Tab. 2. Sumarizace parametrů SAHRV v jednotlivých dekádách – část 2.

	50–60							Prů- měr *	ANOVA (věk) (p)	t-test (po- hlaví) ((p)
	5. per- centil	10. per- centil	15. per- centil	Medián	X-2 SD *	X-1,5 SD *	X-1 SD *			
L1: LF power	29	38	54	127	18	30	51	141	0,002	N.S.
HF power	13	16	36	112	10	18	31	100	<0,001	N.S.
TP	61	75	105	239	35	59	96	262	<0,001	N.S.
LF/HF ratio	0,37	0,51	0,57	1,33	0,25	0,39	0,60	1,42	<0,001	0,01
S: LF power	25	29	52	142	16	27	47	142	<0,001	N.S.
HF power	5	6	8	45	3	5	10	36	<0,001	N.S.
TP	29	41	69	173	24	40	67	193	<0,001	N.S.
LF/HF ratio	0,77	1,21	1,45	4,33	0,54	0,89	1,46	3,96	N.S.	0,01
L2: LF power	24	28	38	126	17	27	45	122	0,001	N.S.
HF power	19	20	35	131	11	20	37	131	<0,001	N.S.
TP	60	82	102	289	42	68	110	291	<0,001	N.S.
LF/HF ratio	0,16	0,22	0,30	0,78	0,10	0,18	0,31	0,93	0,02	0,01
	60–70							Prů- měr *	ANOVA (věk) (p)	t-test (po- hlaví) ((p)
	5. per- centil	10. per- centil	15. per- centil	Medián	X-2 SD *	X-1,5 SD *	X-1 SD *			
L1: LF power	6	16	25	106	6	12	21	69	0,002	N.S.
HF power	13	22	33	61	8	13	21	57	<0,001	N.S.
TP	46	66	75	201	22	36	57	147	<0,001	N.S.
LF/HF ratio	0,11	0,21	0,37	1,38	0,11	0,20	0,37	1,21	<0,001	0,01
S: LF power	11	14	16	52	6	11	19	61	<0,001	N.S.
HF power	4	7	9	23	3	5	8	24	<0,001	N.S.
TP	20	26	37	103	12	21	35	96	<0,001	N.S.
LF/HF ratio	0,54	0,77	1,02	3,63	0,29	0,50	0,86	2,60	N.S.	0,01
L2: LF power	19	25	32	74	12	18	29	73	0,001	N.S.
HF power	9	12	22	89	7	13	23	70	<0,001	N.S.
TP	49	71	85	192	34	51	77	173	<0,001	N.S.
LF/HF ratio	0,24	0,31	0,34	1,02	0,07	0,13	0,26	1,05	0,02	0,01
	70+							Prů- měr *	ANOVA (věk) (p)	t-test (po- hlaví) ((p)
	5. per- centil	10. per- centil	15. per- centil	Medián	X-2 SD *	X-1,5 SD *	X-1 SD *			
L1: LF power	17	21	24	68	10	16	26	63	0,002	N.S.
HF power	18	19	19	33	6	10	17	52	<0,001	N.S.
TP	36	41	55	137	22	34	53	131	<0,001	N.S.
LF/HF ratio	0,32	0,41	0,48	0,92	0,15	0,26	0,43	1,22	<0,001	0,01
S: LF power	9	10	11	38	3	6	12	45	<0,001	N.S.
HF power	5	7	7	15	2	3	6	16	<0,001	N.S.
TP	16	16	17	64	6	11	20	65	<0,001	N.S.
LF/HF ratio	1,06	1,31	1,39	2,74	0,56	0,84	1,27	2,85	N.S.	0,01
L2: LF power	14	16	18	39	8	12	18	41	0,001	N.S.
HF power	13	14	15	63	5	10	19	65	<0,001	N.S.
TP	39	53	60	103	19	30	48	124	<0,001	N.S.
LF/HF ratio	0,11	0,16	0,21	0,64	0,06	0,10	0,19	0,63	0,02	0,01

10. Buršová Š, Vlčková E, Hnojčíková M, Němec M, Dubový P, Dušek L, Jarkovský J, Bělobrádková J, Bednařík J. Validita a prediktivní hodnota skrínigových testů u prediabetické a časné diabetické polyneuropatie. *Cesk Slov Neurol N* 2012a; 75/108(5):562-572. IF = 0,372

Článek je zaměřen na hodnocení validity a prediktivní hodnoty několika nejčastěji užívaných skrínigových testů v diagnostice časné diabetické či prediabetické polyneuropatie (do 3 let od stanovení diagnózy časného diabetu a/nebo prediabetu). Hodnoceny byly dva dotazníky primárně koncipované za účelem skrínigu polyneuropatií, tj. The Michigan Neuropathy Screening Instrument (MNSI) (Feldman et al. 1994) a the Utah Early Neuropathy Scale (UENS) (Singleton et al. 2008), a skrínigový test pro detekci neuropatické bolesti (DN 4 (Douleur Neuropathique en 4 Questions) (Bouhassira et al. 2005). Uvedené dotazníky byly vyšetřeny u skupiny pacientů s prediabetem/ diabetem mellitem, u kterých byla současně detailně objektivizována přítomnost a typ polyneuropatie pomocí široké baterie klinických, elektrofyziologických a histologických metod. Na základě výsledků těchto metod byli pacienti rozděleni na jedince s/bez klinicky a/nebo laboratorně podporované polyneuropatie tenkých a/nebo silných vláken.

Studie potvrdila využitelnost DN4 dotazníku v hodnocení neuropatické bolesti u sledované skupiny pacientů, i když při použití doporučených cut-off hodnot má tento dotazník vysokou specifitu a nízkou senzitivitu a je proto vhodný spíše jako konfirmační než jako skrínigový test. Dotazník UENS a druhá část dotazníku MNSI jsou schopny spolehlivě diskriminovat pacienty s a bez postižení silných nervových vláken. UENS a první část MNSI dotazníku pak validně odliší pacienty s a bez klinických známek postižení vláken tenkých. Pacienty s čistě laboratorně potvrzeným postižením tenkých vláken (ale bez klinických známek takové léze) nelze spolehlivě diagnostikovat pomocí žádného z uvedených testů (kromě DN4, pokud mají neuropatickou bolest).

Práce tedy poskytla přehled o přínosu testovaných dotazníků v diagnostice časné diabetické/ prediabetické polyneuropatie.

Validita a prediktivní hodnota skrínigových testů u prediabetické a časně diabetické polyneuropatie

Validity and Predictive Value of Screening Tests in Prediabetic and Early Diabetic Polyneuropathy

Souhrn

Cíl: Ověřit validitu a prediktivní hodnotu vybraných skrínigových testů pro detekci polyneuropatie – The Michigan Neuropathy Screening Instrument (MNSI) a The Utah Early Neuropathy Scale (UENS), a skrínigového testu pro detekci neuropatické bolesti – DN4 – u pacientů s prediabetem a časným diabetem mellitem 2. typu (preDM/eDM2). **Soubory a metodika:** Soubor 17 pacientů s preDM a 48 pacientů s eDM2 (s trváním do tří let) a kontrolní skupina 40 zdravých dobrovolníků bez poruchy glukózového metabolismu byly extenzivně vyšetřeny se zaměřením na detekci neuropatie silných (LFN) a tenkých vláken (SFN). **Výsledky:** Možná diabetická periferní neuropatická bolest (DPNP) byla detekována u 15 preDM/eDM2 pacientů (23,1 %). DN4 prokázal schopnost diferencovat pacienty s DPNP a bez ní, optimální cut-off hodnota však byla nižší než doporučovaná (≥ 1 bodů). Pomocí MNSI I bylo možné odlišit nemocné s klinicky podporovanou SFN (cut-off > 1 bod), zatímco pomocí MNSI II bylo možné diferencovat nemocné s klinicky i laboratorně podporovanou LFN ($p = 0,003$; $p < 0,001$) při použití doporučeného kritéria ≥ 2 – ≥ 3 body. Pomocí UENS bylo navíc možné diskriminovat i nemocné s klinicky podporovanou SFN ($p = 0,038$), nikoliv však nemocné s laboratorně podporovanou SFN. **Závěry:** Pomocí DN4 bylo možné detekovat nemocné s DPNP, při použití doporučených limitních hodnot má však spíše charakter konfirmačního než skrínigového testu s vysokou specifitou a nižší senzitivitou. Pomocí MNSI I bylo možné diskriminovat nemocné s klinicky podporovanou SFN, avšak nikoli při použití doporučené hodnoty cut-off > 7 bodů. Pomocí MNSI II a UENS bylo možné u nemocných s preDM/eDM2 spolehlivě diskriminovat jedince s LFN a bez ní, pouze UENS však byl schopen diskriminovat nemocné s klinicky podporovanou SFN. Žádný z testů neprokázal dostatečnou validitu v detekci laboratorně podporované SFN.

Abstract

Aim: To confirm the validity and predictive value of selected screening tests for neuropathy – The Michigan Neuropathy Screening Instrument (MNSI) and The Utah Early Neuropathy Scale (UENS), and a screening test for detection of neuropathic pain – DN4 – in a population of patients with prediabetes and early type 2 diabetes mellitus (preDM/eDM2). **Patients and methods:** Groups of 17 preDM and 48 eDM2 patients (with duration of disease < 3 years), and a control group of 48 healthy subjects without impaired glucose metabolism were extensively evaluated with a focus on large fiber (LFN) and small fiber neuropathy (SFN). **Results:** Possible diabetic peripheral neuropathic pain (DPNP) was detected in 15 preDM/eDM2 patients (23.1%). DN4 significantly discriminated patients with and without DPNP, the optimal cut-off value being lower than recommended (≥ 1 point). MNSI I discriminated patients with and without clinically-based SFN (using cut-off > 1 point), while MNSI II discriminated effectively patients with and without both clinically- and laboratory-based LFN ($p = 0.003$, $p < 0.001$) using recommended cut-offs of ≥ 2 – ≥ 3 points. In addition, UENS discriminated patients with and without clinically-based SFN ($p = 0.038$) but not those with and without laboratory-based SFN. **Conclusions:** DN4 is able to discriminate patients with and without DPNP; the recommended cut-off values, however, provide high specificity but low sensitivity (i.e. attributes typical for a confirmatory, not a screening test). MNSI I discriminated patients with clinically-based SFN, although not when the recommended cut-off value of > 7 points was used. Both MNSI II and UENS reliably discriminated preDM/eDM2 patients with and without LFN while only UENS discriminated patients with and without clinically-based SFN. Neither test was useful for detection of laboratory-based SFN.

Š. Buršová^{1,2}, E. Vlčková^{1,2},
M. Hnojčiková^{1,2}, M. Němec¹,
P. Dubový^{2,3}, L. Dušek⁴,
J. Jarkovský⁴, J. Bělobrádková⁵,
J. Bednařík^{1,2}

¹ Neurologická klinika LF MU a FN Brno

² CEITEC – Středoevropský technologický institut MU, Brno

³ Anatomický ústav LF MU, Brno

⁴ Institut biostatistiky a analýz MU, Brno

⁵ Diabetologické centrum Interní gastroenterologické kliniky LF MU a FN Brno



MUDr. Šárka Buršová
Neurologická klinika
LF MU a FN Brno

Jihlavská 20

625 00 Brno

e-mail: bursova@email.cz

Přijato k recenzi: 24. 1. 2012

Přijato do tisku: 16. 2. 2012

Klíčová slova

prediabetes – diabetes mellitus 2. typu – neuropatie tenkých vláken – neuropatie silných vláken – časná diabetická neuropatie

Key words

prediabetes – type 2 diabetes mellitus – small-fiber neuropathy – large-fiber neuropathy – early diabetic neuropathy

Vytvořeno s podporou grantového projektu IGA MZČR č. NS 9667-4 bolestivá diabetická neuropatie, projekt specifického výzkumu MUNI/A/0765/2011 a projektu „CEITEC – Středoevropský technologický institut“ (CZ.1.05/1.1.00/02.0068) z Evropského fondu regionálního rozvoje.

Úvod

Porucha glukózové tolerance (IGT) byla v několika studiích potvrzena jako častá příčina idiopatické neuropatie tenkých vláken (Small-Fiber Neuropathy, SFN), s udávanou prevalencí IGT mezi 34–35,6 %, což je 3krát více než u stejně staré kontrolní populace [1]. V naší studii u pacientů s neuropatií tenkých vláken tvořila IGT 14,3 % případů [2]. Pokud jsme však vyloučili případy s jinou zjištěnou příčinou SFN než IGT, tak IGT tvořila 32,1 % kryptogenních případů, což je srovnatelné s ostatními studiemi. Asociace mezi poruchou glukózové tolerance a polyneuropatií však dosud nebyla prokázána v prospektivní studii [3] a je nutno počkat na výsledek další studie [4]. V jiné studii u pacientů s diabetem mellitem 2. typu (DM2) nebo IGT a neuropatickou bolestí v oblasti nohou jsme vyšetřili šest nemocných s IGT a všichni měli známky poškození senzitivních tenkých nervových vláken potvrzené jak abnormální hodnotou hustoty intraepidermálních nervových vláken (IntraEpidermal Nerve Fiber Density, IENFD), tak abnormálním termickým prahem (Thermal Perception Threshold, TPT) [5], což je v souladu s názorem, že neuropatie asociovaná s IGT je převážně typu SFN. U časně diabetické neuropatie jsou podobné jako u IGT poškozena převážně senzitivní nervová vlákna [6,7].

Ke skrínungu diabetické polyneuropatie jsou používány jak jednotlivé jednoduché klinické testy (nejčastěji vyšetření vibrační citlivosti ladičkou nebo tlakové citlivosti 10g monofilamentem), tak komplexní validované skrínungové testy, které obsahují exaktně definovanou kombinaci klinických vyšetření, v některých případech současně s identifikací senzitivních symptomů. Mezinárodně zřejmě nejrozšířenějším skrínungovým testem je The Michigan Neuropathy Screening Instrument (MNSI), který má sebehodnotící dotazníkovou část vyplňovanou pacientem a následně skórovanou (MNSI I), a dále část klinickou, založenou na jednoduchém hodnocení trofických změn, reflexu Achillovy šlachy, vibrační a tlakové citlivosti (MNSI II). Tento skrínungový test je pro potřeby definitivního stanovení diagnózy doplněn elektrofyzilogickým vyšetřením (The Michigan Diabetic Neuropathy Score, MDNS) [8] podobně jako další často užívaný test: The Total Neuropathy Score (TNS) [9]. V současnosti existuje

více než deset publikovaných a validovaných systémů ke skórování tíže polyneuropatie [10].

Většina skrínungových metod a testů, stejně jako škál, užívaných k detekci a skórování tíže jak obecně polyneuropatie, tak specificky diabetické distální symetrické senzomotorické polyneuropatie, favorizuje poškození silných nervových vláken.

V naší literatuře se používá pětistupňová klasifikace podle Vondrové, která je rovněž výlučně založena na EMG nálezů a klinických příznacích poškození silných vláken (tj. reflexologickém nálezů, poruše vibrační citlivosti, propiocepce a přítomnosti paréz) [11,12].

Nověji byl zaveden The Utah Early Neuropathy Scale (UENS), který reflektuje nové poznatky o významném a častém poškození tenkých nervových vláken zejména v časně fázi diabetické polyneuropatie. Klade důraz především na poruchu algické percepce na dolních končetinách. Tento test má vyšší senzitivitu a lépe koreluje s nálezů laboratorních metod než MDNS [13].

Neuropatická bolest představuje spolu s dalšími senzitivními symptomy častý iniciační příznak diabetické polyneuropatie. Existuje několik validovaných skrínungových testů, které jsou schopny diskriminovat neuropatickou a nociceptivní bolest [14]. Mezi nejčastěji používané a přitom jednoduché patří tzv. DN4 [15].

Cíl

Ověřit validitu a prediktivní hodnotu vybraných skrínungových testů – MNSI a UENS u prediabetické a časně diabetické polyneuropatie.

Ověřit validitu a prediktivní hodnotu DN4 v detekci periferní diabetické neuropatické bolesti.

Soubor

V období leden 2009–prosinec 2010 byli na Neurologické klinice LF MU a FN Brno skrínungově vyšetřeni pacienti s diabetem mellitem 2. typu (DM2), IGT nebo abnormální glukózou na lačno (Impaired Fasting Glucose, IFG), u kterých byla diagnóza stanovena na základě kritérií Světové zdravotnické organizace [16] a doporučení české diabetologické společnosti [17], a to bez ohledu na přítomnost neuropatických příznaků. Do studie byly zařazeny případy, které splňovaly následující vstupní kritéria:

1. trvání DM2 < 3 roky (tj. doba od stanovení diagnózy nebo objevení prvních příznaků s možným vztahem k diabetu), nebo trvání IFG anebo IGT < 1 rok.
2. vyloučení nemocí či stavů známých jako běžná možná alternativní příčina neuropatie (viz Metodika).

Zařazeno bylo:

- a) 48 pacientů s DM2 (30 mužů, 18 žen); věk: medián 59 let, 5.–95. kvantil: 32–71 let; trvání diabetu mellitu: medián 9 měsíců, rozmezí 1–36 měsíců – skupina časného DM2 (eDM2);
- b) 17 pacientů s buďto IFG, nebo IGT (10 mužů, 7 žen); věk: medián 62 let, 5.–95. kvantil: 35–74 let; trvání prediabetu: medián 1 měsíc, rozmezí 1–12 měsíců – skupina prediabetická (preDM);
- c) 40 zdravých dobrovolníků (23 mužů, 17 žen) bez diabetu či prediabetu; věk: medián 54,5 let, 5.–95. kvantil: 35–71 let – kontrolní skupina.

Metodika

Vyloučení alternativní příčiny neuropatie

Všichni předběžně vyšetřeni pacienti s DM2, prediabetem a kontrolní subjekty absolvovali před zařazením do studie následující vyšetření k vyloučení alternativní příčiny polyneuropatie:

- Detailní anamnézu zaměřenou na předchozí či současné onemocnění či léčbu, zejména: familiární výskyt neuropatie, přítomnost malignity, systémové vaskulitidy nebo zánětlivého onemocnění jater, ledvin, krvevotby, aplikaci neurotoxických léků.
- Kvantifikace konzumace alkoholu a potvrzení škodlivého užívání alkoholu a možné alkoholové závislosti byla prováděna pomocí The Alcohol Use Disorders Identification Test (AUDIT) [18]. Jako limitní hodnota škodlivého užívání alkoholu byla použita hodnota ≥ 8 AUDIT skóre. Příjem alkoholu byl dále kvantifikován pomocí tzv. standardního nápoje (s.d.). Použili jsme limitní hodnotu 21/14 (muži/ženy) s.d./týden odpovídající 48/32 g alkoholu/den (tj. 3/2 české standardní nápoje) [2]. Pacienti a kontroly se škodlivým užíváním alkoholu přesahujícím limitní hodnoty buďto AUDIT skóre nebo počtu stan-

dardních nápojů nebyli zařazeni do studie.

- Abnormality následujících laboratorních testů sloužily jako vylučující kritéria: testy funkce ledvin (urea, kreatinin) a jater (bilirubin, transaminázy), anti-nukleární faktor, elektroforéza bílkovin v séru, hormony štítné žlázy, karbohydrát deficientní transferin, hladina vitamínu B12 a kyseliny listové v séru, významné změny krevního obrazu (včetně počtu krevních destiček a elevace středního objemu erytrocytu).

Všechny kontrolní subjekty měly normální hladinu glykemie v séru nalačno a perorální glukózový toleranční test.

Vyšetření prediabetických a diabetických pacientů

U všech nemocných jsme zjišťovali body mass index (BMI), přítomnost arteriální hypertenze a kouření.

Bolest byla klasifikována jako nociceptivní a neuropatická. Jako možná diabetická periferní neuropatická bolest (DPNP) byly klasifikovány případy s převažující distální a oboustrannou bolestí v oblasti nohou, která měla typický neuropatický charakter (tj. bolest charakteru pálení či bolestivého chladu), alespoň střední intenzitu (≥ 3 body na Likertově numerické hodnotící škále, kde 0 reprezentuje „žádnou bolest“ a 10 „nejhorší možnou bolest“) a chronické trvání (tzn. > 6 měsíců). Tyto případy korespondovaly s kritérii možné neuropatické bolesti podle systému odstupňování diagnostické spolehlivosti přítomnosti neuropatické bolesti [19].

Klinické neurologické vyšetření zahrnovalo zhodnocení výbavnosti šlachových a okosticových reflexů, svalové síly, zhodnocení troficity svalů, kůže a kožních adnex, a vyšetření citlivosti.

Propriocepce charakteru polohocitu a pohybcitu byla vyšetřena v oblasti palců nohou.

Taktilní citlivost a přítomnost taktilní alodynzie byly vyšetřovány smotkem vaty na špejli.

Kožní tlaková citlivost byla vyšetřována pomocí Semmes-Weinsteinova 10gramového monofilamentu a citlivost pro bolest kalibrovanou sterilní pomůckou NeurotipTM, spolu s monofilamentem kombinovanou v tzv. Neuropenu (Owen-Mumford Ltd, Oxford, UK). Vyšet-

ření 10gramovým monofilamentem bylo prováděno na dorzu palce mezi nehtem a distálním interfalangeálním kloubem. Náhodně bylo aplikováno pět skutečných a pět falešných stimulů a za normální bylo považováno ≥ 8 správných odpovědí z 10 aplikovaných. Pomocí Neurotipu byla podobně vyšetřována citlivost pro bolest, kdy na plantární ploše palce nohy byly aplikovány náhodně ostré a tupé podněty a pacient je měl rozpoznávat [20].

Vibrace pomocí graduované ladičky 128 Hz byla vyšetřována na mediálním kotníku a dorzu palce nohy bilaterálně a k hodnocení byly použity publikované normy adjustované pro věk [21].

K hodnocení termické citlivosti byla použita pomůcka Tip-therm[®] (GmbH, Brügggen, Germany). Vyšetřující střídavě náhodně přikládal oba konce na špičku palce nohy a vyšetřovaný měl za úkol rozlišit chladný a teplý (méně chladný) podnět. Za normální odpověď bylo považováno ≥ 8 správných odpovědí [22].

Hodnocení prahu termické percepce (TPT) bylo prováděno pomocí systému Neurosensory analyser – modelu TSA-II (Medoc TSA 2001; Medoc, Ramat Yishai, Israel). Termické prahy byly vyšetřovány na dorzu pravé nohy za použití metody Limitů (randomizovaná a nerandomizovaná varianta) a metody Úrovní, a to jak pro teplo, tak pro chlad [23,24]. K hodnocení byly použity naše vlastní normativní hodnoty [25].

Hodnocení prahu vibrační percepce (Vibration Perception Threshold, VPT) bylo prováděno pomocí systému Vibratory sensory analyser – model VSA-3000 (Medoc, Ramat Yishai, Israel). Vibrační prahy byly vyšetřovány na plantární ploše hlavičky II.–III. metatarzu pravé nohy za použití metody Limitů a Úrovní. K hodnocení byly použity naše vlastní normativní hodnoty [25].

Spektrální analýza variability srdeční frekvence (SAVSF) byla vyšetřena pomocí systému VarCor PF 7 (Dimea group, Olomouc, ČR). Nejméně 300 R-R intervalů bylo analyzováno ve třech následných pozicích leh-stoj-leh a k hodnocení byla použita naše vlastní normativní data [26].

Elektromyografie (EMG) a kondukční studie (NCS) byly vyšetřeny na elektromyografu Keypoint II (Dantec, Skovlunde, Denmark) a výsledky byly hodnoceny pomocí vlastních normativních dat [27].

Hodnocení intraepidermální hustoty tenkých nervových vláken (IENFD)

bylo provedeno ve vzorcích kožních biopsií z distálního bérce a u části pacientů také z proximálního stehna. Detaily použité metodiky byly publikovány [24,28,29] a jsou v souladu s recentními doporučeními [30]. K analýze byla použita vlastní normativní data [25].

Klinicky podporovaná neuropatie silných vláken (Large-Fiber Neuropathy, LFN klinická) byla definována jako areflexie patelárního reflexu a/nebo reflexu Achillovy šlachy oboustranně a abnormalita nejméně jedné ze senzitivních modalit, tj. propriocepce, taktilní, tlakové nebo vibrační citlivosti, a to oboustranně.

Laboratorně podporovaná neuropatie silných vláken byla definována jako abnormalita EMG/NCS podporující polyneuropatii a současně abnormalita VPT.

Klinicky podporovaná neuropatie tenkých vláken (SFN klinická) byla definována jako abnormalita jak termické citlivosti, tak citlivosti pro bolest oboustranně.

Laboratorně podporovaná neuropatie tenkých vláken byla definována jako abnormalita IENFD i TPT.

Pro polyneuropatii asociovanou s prediabetem/časným diabetem (Prediabetes/Early Diabetes Associated Polyneuropathy, PEDAP) jsme stanovili dvě alternativní kritéria:

- PEDAP 1 + 1: nejméně jeden objektivní klinický příznak a jednu laboratorní abnormalitu jako známky postižení tenkých nebo silných vláken;
- PEDAP 2 + 2: nejméně dva objektivní klinické příznaky a dvě laboratorní abnormality jako známky postižení tenkých nebo silných vláken.

Senzitivní neuropatie tenkých vláken byla definována na základě kritérií dle Stewarta et al [31] a Lacomise [32] včetně vylučujících známek postižení silných nervových vláken (tj. porucha propriocepce na palci, porucha vibrace na kotnících a proximálněji, distální svalová slabost a atrofie, generalizovaná areflexie, abnormální nález na rutinním EMG/NCS).

DN4

Česká verze skrínigového testu DN4 (příloha 1), který byl validován k diskriminaci neuropatické a non-neuropatické bolesti [15], byla přeložena do českého jazyka s použitím metody „forward-backward translation“. Obsahuje dvě varianty skóre: kratší, dotazníkovou část (DN4 I) založe-

nou na zjištění přítomnosti typických deskriptorů neuropatické bolesti a výskytu doprovodných pozitivních senzitivních symptomů (doporučené cut-off ≥ 3 body ze 7 možných), a širší verzi skóre (DN4 II), v níž je část DN4 I doplněna třemi jednoduchými klinickými testy kožní citlivosti (doporučené cut-off ≥ 4 body z 10 možných).

MNSI

Česká verze skrínigového testu, který byl validován k detekci diabetické polyneuropatie [8,33], byla přeložena do českého jazyka s použitím metody „forward-backward translation“. Test je složen z úvodní sebehodnotící dotazníkové části (MNSI I) a následné klinické části (MNSI II). MNSI I vyplňuje pacient-diabetik a obsahuje 15 položek, z toho 13 je skórováno a doporučované cut-off skóre je > 7 bodů (příloha 2a). Klinická část je složena z jednoduchého klinického vyšetření hodnotícího vzhled a troficitu kůže, výbavnost reflexu Achillovy šlachy, vibrační a tlakovou citlivost (pomocí ladičky a 10gramového monofilamenta) (příloha 2b). K hodnocení byla použita dvě alternativní cut-off skóre: ≥ 2 body a ≥ 3 body [34].

UENS

Utažská škála pro detekci neuropatie byla přeložena do českého jazyka s použitím metody „forward-backward translation“. Je založena na jednoduchém klinickém vyšetření obsahujícím hodnocení síly extenze, vibrace a polohocitu palců u nohou, přítomnosti alodynies nebo hyperestezie na noze, výbavnosti reflexu Achillovy šlachy a zejména vyšetření algické citlivosti na dolní končetině, na které je kladen největší důraz. Dolní končetina je pro účel tohoto vyšetření rozdělena topicky do šesti segmentů počínaje prsty a konče distální částí stehna, algická percepce je hodnocena 0–2 body v každém z těchto 12 segmentů a tvoří tak 24 ze 42 možných bodů (příloha 3). Jako cut-off skóre byla použita hodnota > 6 bodů, odvozená z výsledků souboru jedinců bez neuropatie v práci prezentující UENS [13].

Statistická analýza

K popisu charakteristik souboru jsme použili frekvenční analýzu, dále odhad mediánu, 5. a 95. percentilů. Pro statistické hodnocení rozdílů mezi skupinami jsme použili Fisherův exaktní test. Plánovaný vzorek je zcela dostatečný pro

Příloha 1. Test DN 4.

Dotazníková část

Otázka 1: Má bolest jednu nebo více níže uvedených charakteristik? (odpovídá pacient)

	ANO	NE
1. Pálení (pálivá bolest)		
2. Bolestivý chlad		
2. Pocit elektrických šoků (výbojů)		

Otázka 2: Je bolest spojena s jedním nebo více příznaky v oblasti bolesti?

	ANO	NE
4. Brnění		
5. Mravenčení		
6. Necitlivost		
7. Svědění		

Skóre pacienta v dotazníkové části (DN4 I):/7 (cut-off $\geq 3/7$)

Vyšetření pacienta

Otázka 3: Je tato bolest lokalizována v oblasti, v níž lze klinickým vyšetřením odhalit jednu nebo obě následující poruchy? (porovnáním s citlivostí v nebolestivé oblasti)

	ANO	NE
8. Snížená citlivost na dotyk		
9. Snížená citlivost na tlak (von Frey č. 13)		

Otázka 4: Může být bolest vyvolána nebo zvýrazněna v bolestivé oblasti?

	ANO	NE
10. Třením smotkem vaty (dynamická taktilní alodynies)		

Celkové skóre pacienta (DN4 II):/10 (cut-off $\geq 4/10$)

Vysvětlivky: ano = 1 bod, ne = 0 bodů

Upraveno dle [15].

Příloha 2a. Dotazník MNSI I.

A. Dotazníková část (vyplňuje pacient)

1. Máte pocit zhoršení citlivosti končetin nebo nohou?	<input type="checkbox"/> 1 Ano <input type="checkbox"/> 0 Ne
2. Měl jste někdy pocit pálivé bolesti končetin nebo nohou?	<input type="checkbox"/> 1 Ano <input type="checkbox"/> 0 Ne
3. Jsou vaše nohy přecitlivělé na dotyk?	<input type="checkbox"/> 1 Ano <input type="checkbox"/> 0 Ne
4. Míváte křeče končetin nebo nohou?	<input type="checkbox"/> 0 Ano <input type="checkbox"/> 0 Ne
5. Měl jste někdy píchání nebo bodání v nohou?	<input type="checkbox"/> 1 Ano <input type="checkbox"/> 0 Ne
6. Vnímáte bolestivě i dotyk příkrývky s pokožkou?	<input type="checkbox"/> 1 Ano <input type="checkbox"/> 0 Ne
7. Jste při koupání schopen rozlišit teplou a studenou vodu?	<input type="checkbox"/> 0 Ano <input type="checkbox"/> 1 Ne
8. Měl jste již někdy otevřenou ránu na noze?	<input type="checkbox"/> 1 Ano <input type="checkbox"/> 0 Ne
9. Řekl Vám někdy lékař, že máte polyneuropatii?	<input type="checkbox"/> 1 Ano <input type="checkbox"/> 0 Ne
10. Cítíte se většinu času slabý?	<input type="checkbox"/> 0 Ano <input type="checkbox"/> 0 Ne
11. Jsou vaše příznaky horší v noci?	<input type="checkbox"/> 1 Ano <input type="checkbox"/> 0 Ne
12. Bolí vás končetiny při chůzi?	<input type="checkbox"/> 1 Ano <input type="checkbox"/> 0 Ne
13. Jste schopen cítit nohy při chůzi?	<input type="checkbox"/> 0 Ano <input type="checkbox"/> 1 Ne
14. Máte na nohou tak suchou kůži, že vznikají praskliny?	<input type="checkbox"/> 1 Ano <input type="checkbox"/> 0 Ne
15. Prodělal jste amputaci?	<input type="checkbox"/> 1 Ano <input type="checkbox"/> 0 Ne
Celkové hodnocení:/13

Interpretace: > 7 bodů signalizuje přítomnost diabetické neuropatie.

Příloha 2b. Klinická část – MNSI II.

B. Klinické vyšetření (provede lékař)

1.	Vzhled nohou				
		Vpravo		Vlevo	
	a. Normální	<input type="checkbox"/> 0 Ano	<input type="checkbox"/> 1 Ne	Normální	<input type="checkbox"/> 0 Ano <input type="checkbox"/> 1 Ne
	b. Pokud ano, zatrhni odpovídající:	Pokud ano, zatrhni odpovídající:			
	deformity	<input type="checkbox"/>		deformity	<input type="checkbox"/>
	suchá kůže, kalus	<input type="checkbox"/>		suchá kůže, kalus	<input type="checkbox"/>
	infekce	<input type="checkbox"/>		infekce	<input type="checkbox"/>
	fisury	<input type="checkbox"/>		fisury	<input type="checkbox"/>
	jiné	<input type="checkbox"/>		jiné	<input type="checkbox"/>
	specifikuj:			specifikuj:	

2.	Ulcerace	Ne	Ano	Ne	Ano
		<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1

3.	Reflex Achillovy šlachy	výbavný	facilitace	nevýbavný	výbavný	facilitace	nevýbavný
		<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 0,5	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 0,5	<input type="checkbox"/> 1

4.	Vibrace	přítomna	snížená	chybí	přítomna	snížená	chybí
		<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 0,5	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 0,5	<input type="checkbox"/> 1

5.	Monofilamentum	normální	snížené	chybí	normální	snížené	chybí
		<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 0,5	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 0,5	<input type="checkbox"/> 1

Podpis: _____

Celkové skóre _____ /10 bodů

Instrukce:

Část A je vyplňována pacientem a z formuláře je odstraněno bodové hodnocení jednotlivých položek

Část B: končetina musí být prohřátá (> 30 °C).

Vibrace je vyšetřována ladičkou C 128 na dorzu distálního interfalangeálního kloubu palce, který je opřen o podložku. Porovnává se délka vnímání vibrace s vnímáním vyšetřujícího na distálním článku palce ruky. Normálně je vnímána vibrace na palci ruky o 5 s déle. Pokud je rozdíl menší než 10 s, je hodnocena vibrace jako přítomna (0). Pokud je vibrace na palci ruky vyšetřujícího vnímána o > 10 s déle, jde o oslabení (0,5), pokud pacient vibraci vůbec nevnímá, jde o chybění vibrace (1).

Reflex šlachy Achillovy: lehká pasivní dorziflexe nohy. Při nevýbavnosti použít Jendrassikův manévr, pokud je reflex výbavný pouze po facilitaci, skórovat jako oslabení (0,5).

Monofilamentum 10 g: noha je opřena o podložku, filamentum se několikrát cvičně ohne zatlačením o podložku. Testuje se dotyk na dorzu palce mezi distálním interfalangeálním kloubem a nehtovým lůžkem, tlakem který právě ohne monofilamentum, kolmo k podložce, dotyk je krátký (< 1 s).

Celkem 10 pokusů, z toho 5 slepých, skóre ≥ 8 správných: 0 bodů, 1–7 správných: 0,5 bodů, 0 správných odpovědí: 1 bod. Chybnou odpovědí je také, pokud pacient neví.

Upraveno podle: <http://www.med.umich.edu/mdrtc/profs/survey.html#mnsi>

provedení takových srovnání s rozlišovací schopností + 5 %, při plně akceptovatelné úrovni chyby I. druhu < 5 % a chyby II. druhu < 20 %. Byla provedena analýza ROC křivek (Receiver-Operating characteristics Curve) s cílem zhodnotit schopnost jednotlivých testů, skóre a škál diskriminovat pacienty s prediabetem a časným diabetem 2. typu s při-

tomností a bez přítomnosti neuropatické bolesti (DN4) a s přítomností neuropatie a bez ní (MNSI a UENS). Dále byly kalkulovány tzv. konstruktová validita testů (kdy konstruktem byla přítomnost neuropatie na základě předem definovaných kritérií) se stanovením senzitivity a specifity, a dále pozitivní a negativní prediktivní hodnoty standardním

způsobem. Validita a prediktivní hodnota byly kalkulovány jednak za použití cut-off hodnot doporučených tvůrci testu nebo autory validačních studií, jednak byly kalkulovány optimální cut-off hodnoty pro daný soubor nemocných na základě ROC analýz. Standardní hodnota $\alpha < 0,05$ byla použita jako hranice statistické významnosti.

Příloha 3. The Utah Early Neuropathy Scale.

Jméno pacienta:			The Utah Early Neuropathy Scale		
Datum vyšetření:					
Vyšetření motoriky: extenze palce u nohy	vlevo	vpravo	Segmenty pro vyšetření algické percepce		
0: normální síla; 2: oslabení			levá dolní končetina	pravá dolní končetina	
celkem obě strany (0–4)					
Vyšetření algické percepce					
0: normální	vlevo	vpravo			
1: pro každý segment se sníženou citlivostí					
2: pro každý segment s necitlivostí					
celkem obě strany (0–24)					
Vyšetření přítomnosti alodynie/hyperestezie					
0: normální	vlevo	vpravo			
1: pokud přítomna na noze či prstech					
celkem obě strany (0–2)					
Vyšetření citlivosti silných vláken			Šlachové reflexy		
0: normální; 1: snížená; 2: necitlivost	vlevo	vpravo	0: normální; 1: snížená; 2: areflexie	vlevo	vpravo
vibrace palec u nohy			RŠA		
čas	s	s	Celkem obě strany (0–4)		
polohocit palec u nohy					
celkem obě strany (0–8):					
Celkové skóre (0–42):					

Instrukce:

K provedení je potřeba pomůcka k vyšetření algické percepce (např. Neuropen) a ladička C 128 Hz. Algickou citlivost je třeba nejprve vyzkoušet v nepostížené kožní oblasti. Vlastní vyšetření je prováděno na dorzální ploše palce, dorza nohy, bérce a stehna postupně od palce proximálně po 1–2 cm. Necitlivost je skórována 2 body, snížená citlivost („méně ostré, než lze očekávat“) 1 bodem. Vibrace je testována na dorzu distálního interfalangeálního kloubu palce nohy, percepce kratší než 10 s je považována za sníženou. Upraveno dle [13].

Výsledky

Demografické a klinické charakteristiky souborů

Nebyly zjištěny rozdíly ve věku a zastoupení pohlaví mezi studovanými skupinami. Kontrolní skupina měla signifikantně nižší body mass index (BMI) a nižší podíl jedinců s arteriální hypertenzí ve srovnání se sdílenou skupinou preDM/eDM2, zatímco podíl nemocných s abnormálním AUDIT skóre, počtem standardních drinků a kuřáků se nelišil.

Byl přítomen trend k vyšší frekvenci jak klinických příznaků, tak laboratorních abnormalit svědčících pro neuropatii u eDM2 pacientů ve srovnání s pacienty s prediabetem s výjimkou IENFD hodnot z distálního lýtka, které byly statisticky významně častěji abnormální u eDM2 skupiny ($p = 0,005$). Absolutní hodnoty IENFD jak z proximálního stehna,

tak z distálního lýtka byly však pouze nevýznamně nižší ve skupině eDM2 ($p = 0,362$ a $0,133$).

Z těchto důvodů byla data z obou skupin nemocných s poruchou glukózového metabolismu (preDM/eDM2) srovnávána souhrnně s kontrolní skupinou.

Neuropatická bolest typu DPNP a DN4

Možná neuropatická bolest typu DPNP byla přítomna u 12 eDM2 (25,6 %) a 3 preDM (17,6 %) pacientů, dohromady tedy u 15 (23,1 %) preDM/eDM2 případů (DPNP+ podskupina). Zbývajících 50 nemocných tvořilo podskupinu DPNP-. V kontrolní skupině jsme přítomnost neuropatické bolesti charakteru DPNP neznamenali (tab. 1).

U všech 15 nemocných, klasifikovaných při zařazení do studie jako možná

DPNP, byla splněna PEDAP 1 + 1 kritéria a u 8 z nich PEDAP 2 + 2 kritéria, což potvrdilo neuropatický charakter bolesti.

Abnormální skóre DN4 I bylo zjištěno u 8 z 15 (53,3 %) nemocných ze skupiny DPNP+ a u 5 z 50 DPNP- případů (10,0 %). Abnormální skóre DN4 II bylo přítomno u 6 z 15 nemocných ze skupiny DPNP+ (40,0 %) a u 2 z 50 nemocných ze skupiny DPNP- (4,0 %). Validita a prediktivní hodnota abnormálního skóre DN4 I, II a DN4 I a/nebo II jsou uvedeny v tab. 2.

Optimální hodnotou cut-off pro DN4 I a II však byla hodnota ≥ 1 , které ve srovnání s cut-off hodnotami, doporučenými tvůrci testu vedly k vyšší diskriminační schopnosti testu (viz hodnota plochy pod křivkou – AUC – Area Under Curve), vyšší senzitivitě, avšak na úkor specifity (tab. 3).

Tab. 1. Podíl abnormálních nálezů jednotlivých testů v hodnocených skupinách.

Parametr	eDM2 (n = 48)	preDM (n = 17)	Souhrnná data preDM/eDM2 (n = 65)	Kontroly (n = 40)	p hodnota*
DPNP – n (%)	12 (25,6)	3 (17,6)	15 (23,1)	0 (0,0)	0,0004
UENS abnormalita – n (%)	12 (25,0)	4 (23,5)	16 (24,6)	2 (5,0)	0,007
MNSI II abnormalita (cut-off > 2) – n (%)	32 (47,9)	9 (52,9)	32 (49,2)	9 (22,5)	0,007
MNSI II abnormalita (cut-off > 3) – n (%)	14 (29,2)	4 (23,5)	18 (27,7)	4 (10,0)	0,047

* porovnání preDM/eDM2 skupiny se skupinou kontrolní, eDM2 – časný diabetes mellitus 2. typu (early type 2. Diabetes Mellitus), preDM – prediabetes

MNSI

MNSI I

Při použití doporučené hodnoty abnormálního skóre > 7 bodů jsme nezaznamenali abnormitu u žádného nemocného ze skupiny preDM/eDM2 ani u kontrolního subjektu a validitu ani prediktivní hodnotu jsme pro tento cut-off nehodnotili. Optimální hodnota limitní hodnoty (cut-off) se pohybovala mezi > 1 a > 0 body (tab. 3) a při jejím použití (> 1 bod) bylo možné diskriminovat klinicky podporovanou SFN.

MNSI II

Abnormální skóre MNSI II při použití dvou alternativních cut-off skóre ≥ 2 a ≥ 3 body bylo statisticky významně častější ve skupině preDM/eDM2 ve srovnání s kontrolní skupinou (tab. 1). Pro hodnocení validity a prediktivní hodnoty testu jsme použili cut-off ≥ 2 body. Test byl schopen diskriminovat pacienty s LFN (klinicky i laboratorně podporovanou) a bez LFN s relativně dobrou senzitivitou (72,0 a 87,0 %) a specificitou (71,8 a 78,1 %) (tab. 2), nikoliv však pacienty se SFN a bez ní.

Optimální cut-off hodnoty pro různé konstrukty se pohybovaly mezi > 0 až > 3 body, avšak i při použití optimální limitní hodnoty nebyl tento test schopen diferencovat nemocné se SFN a bez ní (tab. 3).

UENS

Abnormální skóre UENS bylo statisticky významně častější ve skupině preDM/eDM2 ve srovnání s kontrolní skupinou (tab. 1).

Optimální cut-off hodnoty se pohybovaly mezi > 1 až > 7 body, tento test byl schopen dobře diskriminovat LFN a klinicky podporovanou SFN, nikoliv však laboratorně podporovanou SFN (tab. 2 a 3).

Detailní výsledky jednotlivých použitých testů a jejich analýza se zaměřením na prevalenci a anatomický profil neuropatie asociované s prediabetem a časným diabetem mellitem 2. typu budou publikovány v samostatné práci [35].

Diskuze

V naší malé, avšak dobře definované skupině nemocných s prediabetem a časným diabetem mellitem 2. typu jsme prokázali, že skrínigový test DN4 je schopen u nemocných s prediabetem nebo časným diabetem mellitem 2. typu diskriminovat jedince s DPNP, avšak při použití cut-off hodnot doporučených autory testu nemá test charakter skrínigového, ale spíše konfirmačního testu (s vysokou specificitou, avšak nízkou senzitivitou). Dva často používané skrínigové testy pro detekci polyneuropatie – MNSI II a UENS – se ukázaly validní zejména pro průkaz postižení silných vláken, méně pro průkaz klinicky manifestní léze tenkých senzitivních vláken (UENS a MNSI I). Žádný z těchto testů nebyl schopen detekovat laboratorně podporovanou neuropatii tenkých vláken, což je nejčastější iniciální typ neuropatie u nemocných s prediabetem a časným diabetem mellitem 2. typu.

Neuropatie asociovaná s IGT pravděpodobně reprezentuje nejčasnější stadium diabetické neuropatie [6]. V naší podskupině nemocných s prediabetem jsme nebyli schopni prokázat signifikantně vyšší podíl neuropatických abnormalit oproti kontrolní skupině s výjimkou abnormální IENFD z distálního lýtky, což bylo zřejmě podmíněno malým rozsahem souboru. Současně to však potvrzuje obecně akceptovaný fakt, že postižení senzitivních tenkých vláken je iniciální typ postižení u neuropatie asociované s prediabetem [36], podobně jako u časné diabetické polyneuropatie [6,7]. Odpo-

vídá tomu i naše analýza anatomického profilu polyneuropatie asociované s prediabetem a časným DM2 [35] a v souladu s tím je i relativně vysoká prevalence DPNP v našem souboru (23,1 %). U diabetu je udávaná prevalence DPNP relativně nižší: 10–20 % [37] s ohledem na využití diagnostických metod, zohledňujících především postižení silných nervových vláken.

DN4 je jedním ze skrínigových validovaných testů pro identifikaci neuropatické bolesti. Při diskriminaci jisté neuropatické bolesti oproti pacientům s nociceptivní bolestí byla prokázána jak u 7bodové (DN4 I), tak 10bodové škály (DN4 II) vysoká senzitivita (78,0 a 82,9 %) i specificita (81,2 a 89,9 %) [15]. V našem souboru nemocných s preDM a eDM2 byla senzitivita DN4 v detekci jedinců s možnou neuropatickou bolestí podstatně nižší (53,3 % u DN4 I, 40 % u DN4 II a 60 % při použití kombinovaného kritéria DN4 I a/nebo II s doporučenými cut-off hodnotami). Specificita byla naproti tomu srovnatelná s validační studií [15], u DN4 II dosáhla 95,9 %! Relativně nižší validitu DN4 II lze vysvětlit faktem, že jednoduché klinické vyšetření rozšiřující DN4 I je zaměřeno převážně na detekci postižení silných vláken (které nebylo u většiny našich nemocných s DPNP přítomno) a taktilní alodynii (která se vyskytla pouze u jednoho pacienta). Pacienti s diabetem mellitem či prediabetem mohou kromě DPNP trpět řadou dalších bolestí v oblasti dolních končetin nociceptivního charakteru, a tento test lze tedy použít k rychlé klinické konfirmaci neuropatického charakteru bolesti, zatímco normální výsledek testu ještě možnost DPNP nevylučuje. Pokud by však měl tento test plnit funkci skrínigového nástroje zejména s vysokou senzitivitou, je nutno použít nižší limitní hodnotu skóre – v našem souboru měla

Tab. 2. Validita a prediktivní síla vybraných skrínigových testů.

Test	Cílový parametr (end-point)	AUC (95% IS)	p	Senzitivita (95% IS)	Specifická (95% IS)	Pozitivní prediktivní hodnota	Negativní prediktivní hodnota
abnormální DN4 I	možná neuropatická bolest (DPNP)	0,72 (0,55; 0,88)	0,012	53,3 (26,6–78,7)	89,8 (77,8–96,6)	61,5%	86,3%
abnormální DN4 II	možná neuropatická bolest (DPNP)	0,68 (0,51; 0,86)	0,036	40,0 (16,3–67,7)	95,9 (86,0–99,5)	75,0%	83,9%
abnormální DN4 I/II*	možná neuropatická bolest (DPNP)	0,75 (0,59; 0,91)	0,004	60,0 (32,3–83,7)	89,8 (77,8–96,6)	64,3%	88,0%
abnormální MNSI II [§]	NTV klinicky podporovaná	0,65 (0,46; 0,83)	0,144	70,0 (34,8–93,3)	59,3 (45,0–72,4)	24,1%	91,4%
abnormální MNSI II [§]	NTV laboratorně podporovaná	0,57 (0,41; 0,73)	0,407	48,9 (34,1–63,9)	64,7 (38,3–85,8)	79,3%	31,4%
abnormální MNSI II [§]	NTV jakákoliv**	0,55 (0,39; 0,72)	0,535	47,9 (33,3–62,8)	62,5 (35,4–84,8)	79,3%	28,6%
abnormální MNSI II [§]	NSV klinicky podporovaná	0,72 (0,59; 0,85)	0,003	72,0 (50,6–87,9)	71,8 (55,1–85,0)	62,1%	80,0%
abnormální MNSI II [§]	NSV laboratorně podporovaná	0,83 (0,72; 0,94)	< 0,001	87,0 (66,4–97,2)	78,1 (62,4–89,4)	69,0%	91,4%
abnormální MNSI II [§]	NSV jakákoliv**	0,77 (0,65; 0,89)	< 0,001	71,9 (53,3–86,3)	81,3 (63,6–92,8)	79,3%	74,3%
abnormální MNSI II [§]	PEDAP 1 + 1	0,75 (0,62; 0,85)	< 0,001	72,4 (52,8–87,3)	77,1 (59,9–89,6)	72,4%	77,1%
abnormální MNSI II [§]	PEDAP 2 + 2	0,67 (0,48; 0,86)	0,99	75,0 (34,9–96,8)	58,9 (45,0–71,9)	20,7%	94,3%
UENS [#]	NTV klinicky podporovaná	0,71 (0,52; 0,90)	0,038	60,0 (26,2–87,8)	81,5 (68,6–90,7)	37,5%	91,7%
UENS [#]	NTV laboratorně podporovaná	0,55 (0,39; 0,71)	0,543	27,7 (15,6–42,6)	82,4 (56,6–96,2)	81,3%	29,2%
UENS [#]	NTV jakákoliv**	0,58 (0,43; 0,74)	0,321	29,2 (17,0–44,1)	87,5 (61,7–98,4)	87,5%	29,2%
UENS [#]	NSV klinicky podporovaná	0,62 (0,48; 0,77)	0,099	40,0 (21,1–61,3)	84,6 (69,5–94,1)	62,5%	68,8%
UENS [#]	NSV laboratorně podporovaná	0,71 (0,57; 0,85)	0,005	52,2 (30,6–73,2)	90,2 (76,9–97,3)	75,0%	77,1%
UENS [#]	NSV jakákoliv**	0,66 (0,52; 0,79)	0,032	40,6 (23,7–59,4)	90,6 (75,0–98,0)	81,3%	60,4%
UENS [#]	PEDAP 1 + 1	0,71 (0,59; 0,82)	< 0,001	48,3 (29,4–67,5)	94,3 (80,8–99,3)	87,5%	68,8%
UENS [#]	PEDAP 2 + 2	0,71 (0,59; 0,82)	0,025	62,5 (24,5–91,5)	80,4 (67,6–89,8)	31,3%	93,8%

*abnormální skóre DN4 I a/nebo DN4 II, **přítomnost klinicky podporované a/nebo laboratorně podporované varianty NTV nebo NSV, [§]použita cut-off hodnota ≥ 2 body, [#]použita cut-off hodnota > 6 bodů, NTV – neuropatie tenkých vláken, NSV – neuropatie silných vláken, DPNP – diabetická periferní neuropatická bolest, PEDAP – Prediabetes/Early Diabetes Associated Polyneuropathy, PEDAP 1 + 1 – alespoň jeden klinický příznak a jeden laboratorní marker neuropatie, PEDAP 2 + 2 – alespoň dva klinické příznaky a dva laboratorní markery neuropatie, AUC – Area Under Curve (parametr ROC analýzy nabývající hodnot 0–1, korelující s diskriminační silou testu), IS – interval spolehlivosti, hodnoty p $< 0,05$ jsou uvedeny tučně a kurzívou

největší diskriminační schopnost (vyjádřenou hodnotou AUC během ROC analýzy) cut-off hodnota ≥ 1 bod u DN4 I i II. To však v praxi znamená, že pokud má bolest u pacienta s prediabetem nebo časným diabetem jednu z typických charakteristik neuropatické bolesti, např. páliovou bolest, je test pozitivní. Takto nastavený test však má limitovanou hodnotu pro erudovaného neurologa seznámeného s ob-

razem neuropatické bolesti, a může být přínosný spíše pro jiné specialisty, např. diabetology.

Dotazníková část MNSI I obsahuje některé otázky, které reflektují přítomnost pozitivních senzitivních symptomů, jež typicky doprovázejí neuropatii tenkých vláken. Při použití doporučené hodnoty cut-off skóre > 7 bodů však byl test u všech preDM/eDM2 pacientů i kontrol

normální, a test tedy při použití navržené normy není schopen zachytit nemocné s incipientní neuropatií. Pro potřeby MNSI I jako skrínigového testu k zachycení neuropatie tenkých vláken by bylo třeba podobně jako u DN4 snížit hodnotu cut-off na $> 0 \rightarrow 1$, se stejnými závěry pro praktické použití jako u DN4.

Klinická část MNSI II je založena na testování těch kvalit citlivosti nebo při-

Tab. 3. Identifikace optimálních cut-offs diagnostických testů.

Test	Cílový parametr (endpoint)	AUC (95 % IS)	p	Optimální cut-off	Senzitivita (95 % IS)	Specifická (95 % IS)	Pozitivní prediktivní hodnota	Negativní prediktivní hodnota
DN4 I	možná DPNP	0,86 (0,75; 0,93)	< 0,001	> 0	93,33 (68,1–99,8)	71,43 (56,7–83,4)	50,0%	97,2%
DN4 II	možná DPNP	0,86 (0,75; 0,94)	< 0,001	> 0	93,33 (68,1–99,8)	71,43 (56,7–83,4)	50,0%	97,2%
MNSI I	NTV klinicky podporovaná	0,765 (0,642; 0,862)	< 0,001	> 1	80,0 (44,4–97,5)	74,1 (60,3–85,0)	36,4%	95,2%
MNSI I	NTV laboratorně podporovaná	0,650 (0,521; 0,765)	0,052	> 0	66,0 (50,7–79,1)	64,7 (38,3–85,8)	83,8%	40,7%
MNSI I	NTV jakákoliv*	0,632 (0,502; 0,749)	0,099	> 0	64,6 (49,5–77,8)	62,5 (35,4–84,8)	83,8%	37,0%
MNSI I	NSV klinicky podporovaná	0,601 (0,470; 0,721)	0,155	> 0	68,0 (46,5–85,1)	48,7 (32,4–65,2)	45,9%	70,4%
MNSI I	NSV laboratorně podporovaná	0,686 (0,557; 0,796)	0,006	> 0	78,3 (56,3–92,5)	53,7 (37,4–69,3)	48,6%	81,5%
MNSI I	NSV jakákoliv*	0,659 (0,530; 0,773)	0,015	> 0	71,9 (53,3–86,3)	56,3 (37,7–73,6)	62,2%	66,7%
MNSI I	PEDAP 1 + 1	0,802 (0,684; 0,891)	< 0,001	> 1	62,1 (42,3–79,3)	88,6 (73,3–96,8)	81,8%	73,8%
MNSI I	PEDAP 2 + 2	0,842 (0,729; 0,921)	< 0,001	> 1	87,5 (47,3–99,7)	73,2 (59,7–84,2)	31,8%	97,6%
MNSI II	NTV klinicky podporovaná	0,676 (0,547; 0,788)	0,102	> 3	50,0 (18,7–81,3)	92,6 (82,1–97,9)	55,6%	90,9%
MNSI II	NTV laboratorně podporovaná	0,646 (0,517; 0,762)	0,067	> 1	59,6 (44,3–73,6)	70,6 (44,0–89,7)	84,8%	38,7%
MNSI II	NTV jakákoliv*	0,646 (0,516; 0,761)	0,081	> 0	77,1 (62,7–88,0)	50,0 (24,7–75,3)	82,2%	42,1%
MNSI II	NSV klinicky podporovaná	0,810 (0,692; 0,897)	< 0,001	> 1,5	80,0 (59,3–93,2)	69,2 (52,4–83,0)	62,5%	84,4%
MNSI II	NSV laboratorně podporovaná	0,877 (0,771; 0,946)	< 0,001	> 2	73,9 (51,6–89,8)	90,2 (76,9–97,3)	81,0%	86,0%
MNSI II	NSV jakákoliv*	0,846 (0,734; 0,924)	< 0,001	> 1	78,1 (60,0–90,7)	75,0 (56,6–88,5)	75,8%	77,4%
MNSI II	PEDAP 1 + 1	0,847 (0,736; 0,925)	< 0,001	> 1,5	79,3 (60,3–92,0)	74,3 (56,7–87,5)	71,9%	81,3%
MNSI II	PEDAP 2 + 2	0,734 (0,609; 0,837)	0,046	> 3	50,0 (15,7–84,3)	91,1 (80,4–97,0)	44,4%	92,7%
UENS	NTV klinicky podporovaná	0,744 (0,619; 0,845)	0,021	> 6	60,0 (26,2–87,8)	87,0 (75,1–94,6)	46,2%	92,2%
UENS	NTV laboratorně podporovaná	0,596 (0,466; 0,717)	0,197	> 2	46,8 (32,1–61,9)	70,6 (44,0–89,7)	81,5%	32,4%
UENS	NTV jakákoliv*	0,626 (0,496; 0,744)	0,084	> 2	47,9 (33,3–62,8)	75,0 (47,6–92,7)	85,2%	32,4%
UENS	NSV klinicky podporovaná	0,783 (0,662; 0,876)	< 0,001	> 1	88,0 (68,8–97,5)	64,1 (47,2–78,8)	61,1%	89,3%
UENS	NSV laboratorně podporovaná	0,829 (0,714; 0,911)	< 0,001	> 1	91,3 (72,0–98,9)	63,4 (46,9–77,9)	58,3%	92,9%
UENS	NSV jakákoliv*	0,823 (0,708; 0,907)	< 0,001	> 1	87,5 (71,0–96,5)	75,0 (56,6–88,5)	77,8%	85,7%
UENS	PEDAP 1 + 1	0,812 (0,695; 0,899)	< 0,001	> 3	72,4 (52,8–87,3)	85,7 (69,7–95,2)	80,8%	78,9%
UENS	PEDAP 2 + 2	0,806 (0,688; 0,894)	0,003	> 7	62,5 (24,5–91,5)	89,3 (78,1–96,0)	45,5%	94,3%

*přítomnost klinicky a/nebo laboratorně podporované varianty NTV nebo NSV, DPNP – diabetická periferní neuropatická bolest, NTV – neuropatie tenkých vláken, NSV – neuropatie silných vláken, PEDAP – Prediabetes/Early Diabetes Associated Polyneuropathy, PEDAP 1 + 1 – alespoň jeden objektivní klinický příznak a jeden laboratorní marker neuropatie, PEDAP 2 + 2 – alespoň dva objektivní klinické příznaky a dva laboratorní markery neuropatie, AUC – Area Under Curve (parametr ROC analýzy nabývající hodnot 0–1, korelující s diskriminační silou testu), IS – interval spolehlivosti, hodnoty p < 0,05 jsou uvedeny tučně a kurzívou

znaků, které jsou podmíněny postižením silných vláken – např. tlaková a vibrační citlivost, reflex Achillovy šlachy. Výsledky tedy zcela dle očekávání potvrdily, že MNSI II je validní test pro diskriminaci nemocných s neuropatií silných vláken a bez ní, a byl schopen diferencovat nemocné s prediabetem a časným DM2 oproti kontrolní skupině. Jako optimální hodnotu cut-off skóre jsme potvrdili hodnotu ≥ 2 body [34].

UENS byl navržen s úmyslem zachytit více postižení tenkých senzitivních vláken, které je častější u prediabetické i časné diabetické neuropatie. Více než polovinu celkového skóre (24 ze 42 bodů) tvoří algická citlivost. UENS tak byl schopen diskriminovat i predikovat rozvoj klinicky manifestní SFN, avšak skóre nekorelovalo s přítomností preklinické SFN, která je nejčastější formou neuropatie u prediabetu a časného DM2.

Limitace naší studie spočívala v relativně malém vzorku nemocných. Výhodou byla dobrá definice souborů, ze kterých byli vyloučeni jedinci s jinou možnou příčinou polyneuropatie, což je nedostatek většiny dosavadních studií [38]. Další předností je kontrolní soubor adjustovaný věkem k souboru nemocných s poruchou glukózového metabolismu a dále vlastní normativní data pro kvantitativní metody, stratifikovaná vzhledem k věku [25,29].

Závěry

DN4 prokázal při diskriminaci jedinců s DPNP při použití doporučené cut-off hodnoty skóre spíše charakter konfirmačního než skrínigového testu s vysokou specificitou a nižší senzitivitou.

MNSI I není vhodný nástroj pro skrínig neuropatie u pacientů s prediabetem a časným diabetem 2. typu.

MNSI II a UENS u nemocných s preDM/eDM2 spolehlivě diskriminovaly jedince s LFN a bez ní, zatímco pouze UENS byl schopen diskriminovat nemocné s klinicky podporovanou SFN. Žádný z testů neprokázal dostatečnou validitu v detekci preklinické SFN, což je nejčastější iniciální typ neuropatie u nemocných s preDM/eDM2.

Použité zkratky

MNSI I The Michigan Neuropathy Screening Instrument, část I (II)
UENS The Utah Early Neuropathy Scale
preDM prediabetes
eDM2 časný diabetes mellitus 2. typu (early DM2)
LFN neuropatie silných vláken

SFN neuropatie tenkých vláken
DPNP diabetická periferní neuropatická bolest (Diabetic Peripheral Neuropathic Pain)
IGT porucha glukózové tolerance (Impaired Glucose Tolerance)
IENFD intraepidermální hustota nervových vláken (IntraEpidermal Nerve Fiber Density)
TPT termický práh (Thermal Perception Threshold)
MDNS The Michigan Diabetic Neuropathy Score
TNS The Total Neuropathy Score
IFG Impaired Fasting Glucose
AUDIT The Alcohol Use Disorders Identification Test s.d. standardní nápoj (standard drink)
BMI Body Mass Index
VPT vibrační práh (Vibration Perception Threshold)
SAVSF spektrální analýza variability srdeční frekvence
EMG elektromyografie
NCS kondukční studie periferních nervů (Nerve Conduction Studies)
PEDAP polyneuropatie asociovaná s prediabetem/časným diabetem (Prediabetes/Early Diabetes Associated Polyneuropathy)
ROC Receiver-Operating characteristics Curve
AUC plocha pod křivkou (Area Under Curve)

Literatura

- Singleton JR, Smith AG. Neuropathy associated with prediabetes: what is new in 2007? *Curr Diab Rep* 2007; 7(6): 420–424.
- Bednarik J, Vlckova-Moravcova E, Bursova S, Belobradkova E, Dusek L, Sommer C. Etiology of small-fiber neuropathy. *J Peripher Nerv Syst* 2009; 14(3): 177–183.
- Tapp RJ, Shaw JE, de Courten MP, Dunstan DW, Welborn TA, Zimmet PZ. AusDiab Study Group. Foot complications in Type 2 diabetes: an Australian population-based study. *Diabet Med* 2003; 20(2): 105–113.
- Dyck PJ, Dyck PJ, Klein CJ, Weigand SD. Does impaired glucose metabolism cause polyneuropathy? Review of previous studies and design of a prospective controlled population-based study. *Muscle Nerve* 2007; 36(4): 536–541.
- Vlckova-Moravcova E, Bednarik J, Belobradkova J, Sommer C. Small-fiber involvement in diabetic patients with neuropathic foot pain. *Diabet Med* 2008; 25(6): 692–699.
- Smith AG, Ramachandran P, Tripp S, Singleton JR. Epidermal nerve innervation in impaired glucose tolerance and diabetes-associated neuropathy. *Neurology* 2001; 57(9): 1701–1704.
- Løseth S, Stålberg E, Jorde R, Mellgren SI. Early diabetic neuropathy: thermal thresholds and intraepidermal nerve fibre density in patients with normal nerve conduction studies. *J Neurol* 2008; 255(8): 1197–1202.
- Feldman EL, Stevens MJ, Thomas PK, Brown MB, Canal N, Greene DA. A practical two-step quantitative clinical and electrophysiological assessment for the diagnosis and staging of diabetic neuropathy. *Diabetes Care* 1994; 17(11): 1281–1289.
- Cornblath DR, Chaudhry V, Carter K, Lee D, Seyse-dadr M, Miernicki M et al. Total neuropathy score: validation and reliability study. *Neurology* 1999; 53(8): 1660–1664.
- Cornblath DR. Diabetic neuropathy: diagnostic methods. *Adv Stud Med* 2004; 4(8A): S650–S661.

- Vondrová H. Neurologické projevy diabetes mellitus. In: Vondrová H (ed). Neurologické projevy endokrinních onemocnění. Praha: Geum 2003: 40–127.
- Moravcová E, Bednarik J. Diabetická neuropatie. *Neurol Prax* 2006; 7(2): 31–35.
- Singleton JR, Bixby B, Russell JW, Feldman EL, Pel-tier A, Goldstein J et al. The Utah Early Neuropathy Scale: a sensitive clinical scale for early sensory predominant neuropathy. *J Peripher Nerv Syst* 2008; 13(3): 218–227.
- Bennett MI, Attal N, Backonja MM, Baron R, Bouhassira D, Freynhagen R et al. Using screening tools to identify neuropathic pain. *Pain* 2007; 127(3): 199–203.
- Bouhassira D, Attal N, Alchaar H, Boureau F, Brochet B, Bruxelle J et al. Comparison of pain syndromes associated with nervous or somatic lesions and development of a new neuropathic pain diagnostic questionnaire (DN4). *Pain* 2005; 114(1–2): 29–36.
- Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications (document WHO/NCID/NDS/99.2). World Health Organisation 1999.
- Laboratorní diagnostika a sledování stavu diabetu mellitu. Dostupné z: <http://www.diab.cz/standardy>.
- Saunders JB, Aasland OG, Babor TF, de la Fuente JR, Grant M. Development of the Alcohol Use Disorders Identification Test (AUDIT): WHO Collaborative Project on Early Detection of Persons with Harmful Alcohol Consumption-II. *Addiction* 1993; 88(6): 791–804.
- Treede RD, Jensen TS, Campbell JN, Cruccu G, Ostrovsky JO, Griffin JW et al. Neuropathic pain: redefinition and a grading system for clinical and research purposes. *Neurology* 2008; 70(18): 1630–1635.
- Paisley AN, Abbott CA, van Schie CH, Boulton AJ. A comparison of the Neuropen against standard quantitative sensory-threshold measures for assessing peripheral nerve function. *Diabet Med* 2002; 19(5): 400–405.
- Martina IS, van Koningsveld R, Schmitz PI, van der Meché FG, van Doorn PA. European Inflammatory Neuropathy Cause and Treatment (INCAT) group. Measuring vibration threshold with a graduated tuning fork in normal aging and in patients with polyneuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1998; 65(5): 743–747.
- Viswanathan V, Snehalatha C, Seena R, Ramachandran A. Early recognition of diabetic neuropathy: evaluation of a simple outpatient procedure using thermal perception. *Postgrad Med J* 2002; 78(923): 541–542.
- Moravcova E, Bednarik J. Computer-assisted thermal threshold testing – normative data and sources of variability. *Cesk Slov Neurol N* 2003; 66(99/4): 263–269.
- Vlckova-Moravcova E, Bednarik J, Dusek L, Toyka K, Sommer C. Diagnostic validity of epidermal nerve fiber densities in painful sensory neuropathies. *Muscle Nerve* 2008; 37(1): 50–60.
- Buršová Š, Vlčková E, Hnojčíková M, Němec M, Bednarik J. Přístrojově asistované kvantitativní testování senzitivity – normativní data. *Cesk Slov Neurol N* 2012; 75/108(4): 444–453.
- Vlčková E, Bednarik J, Buršová Š, Šajgálíková K, Mlčáková L. Spectral analysis of heart rate variability – normative data. *Cesk Slov Neurol N* 2010; 73/106(6): 663–672.
- Kadanka Z, Bednarik J, Vohanka S. Practical Electromyography. 1st ed. Brno: iDPVZ 1994.
- Moravcova E, Bednarik J, Feit J, Sommer C. The evaluation of intraepidermal nerve fiber density in skin biopsy of polyneuropathy patients. *Cesk Slov Neurol N* 2005; 68/101: 219–226.
- Buršová Š, Vlčková E, Hnojčíková M, Němec M, Dubový P, Bednarik J et al. Vyšetření hustoty intraepi-

dermálních nervových vláken – normativní data. *Cesk Slov Neurol N* 2012; 75/108(4): 455–459.

30. Lauria G, Hsieh ST, Johansson O, Kennedy WR, Leger JM, Mellgren SI et al. European Federation of Neurological Societies. Peripheral Nerve Society. European Federation of Neurological Societies/Peripheral Nerve Society Guideline on the use of skin biopsy in the diagnosis of small fiber neuropathy. Report of a joint task force of the European Federation of Neurological Societies and the Peripheral Nerve Society. *Eur J Neurol* 2010; 17(7): 903–912.

31. Stewart JD, Low PA, Fealey RD. Distal small-fiber neuropathy: results of tests of sweating and au-

tonomic cardiovascular reflexes. *Muscle Nerve* 1992; 15(6): 661–665.

32. Lacomis D. Small-fiber neuropathy. *Muscle Nerve* 2002; 26(2): 173–188.

33. The Michigan Neuropathy Screening Instrument. Available from: <http://www.med.umich.edu/mdrtc/profs/survey.html#mnsi>.

34. Moghtaderi A, Bakhshipour A, Rashidi H. Validation of Michigan neuropathy screening instrument for diabetic peripheral neuropathy. *Clin Neurol Neurosurg* 2006; 108(5): 477–481.

35. Divisova S, Vlckova E, Hnojckova M, Skorna M, Nemeč M, Dubovy P et al. Prediabetes/early diabetes-

-associated polyneuropathy predominantly involves sensory small fibres. *J Periph Nerv Syst*. In print 2012.

36. Umapathi T, Tan WL, Loke SC, Soon PC, Tavintharan S, Chan YH. Intraepidermal nerve fiber density as a marker of early diabetic neuropathy. *Muscle Nerve* 2007; 35(5): 591–598.

37. Veves A, Backonja M, Malik RA. Painful diabetic neuropathy: epidemiology, natural history, early diagnosis, and treatment options. *Pain Med* 2008; 9(6): 660–674.

38. Freeman R. Not all neuropathy in diabetes is of diabetic etiology: differential diagnosis of diabetic neuropathy. *Curr Diab Rep* 2009; 9(6): 423–431.

Výroční kongres České neurochirurgické společnosti ČLS

pořádá Neurochirurgická klinika v Hradci Králové
při příležitosti 60. výročí svého založení

Harmony Club hotel
Špindlerův Mlýn
17. - 19.10.2012

www.fnhk.cz/nch

Traumata CNS
Neuroonkologie u seniorů
Cévní neurochirurgie u seniorů
Miniinvazivní spondylochirurgie
Varia



11. Buršová Š, Vlčková E, Hnojčíková M, Němec M, Dubový P, Mičánková Adamová B, Bednařík J. Vyšetření hustoty intraepidermálních nervových vláken z kožní biopsie – normativní data. *Cesk Slov Neurol N* 2012b; 75/108(4):455-459. IF = 0,372. Počet citací v SCI: 5.

Tato práce navazuje na výše komentovaný článek zaměřený na problematiku kožních biopsií (Moravcová et al. 2005) a dále jej rozšiřuje. Soubor zdravých kontrol z výše uvedené práce byl pro potřeby této studie významně rozšířen, což umožnilo věkovou stratifikaci nově vytvořených normativních dat IENFD pro oblast distálního lýtka hodnocenou pomocí metody nepřímé imunofluorescence. Navíc byla pilotně u části zdravých kontrol vyšetřena kožní biopsie z oblasti proximálního stehna, tedy z oblasti často používané jako „kontrolní“ nepostižená oblast pro různé studie zaměřené na typické distální polyneuropatie, pro kterou však v době publikace práce nebyla k dispozici validní normativní data (a v řadě studií byla pro hodnocení této oblasti využívány normy vytvořené pro distální oblast odběru vzorku).

Práce prokázala vysoce signifikantní pokles hodnot IENFD s věkem, což akcentuje význam věkové stratifikace normativních dat. Současně byl patrný trend k nižším hodnotám IENFD u mužů (i když tyto rozdíly nedosáhly v testovaném souboru statistické významnosti). Při hodnocení nálezů je proto vhodné zohlednit i pohlaví pacienta a věkově stratifikovaná normativní data byla z uvedených důvodů v této studii derivována odděleně pro muže a ženy. Takto vytvořená data pro imunofluorescenční hodnocení IENFD byla velmi blízká krátce předtím publikovaným normám pro imunohistochemické hodnocení vzorků kožní biopsie, která byla vytvořena na rozsáhlých souborech dobrovolníků (Lauria et al. 2010a, Bakkers et al. 2009), což poukazuje na blízkost nálezů kožní biopsie při obou způsobech hodnocení. V oblasti proximálního stehna byly hodnoty IENFD vysoce významně vyšší oproti distálnímu lýtku, což potvrzuje existenci signifikantního proximo-distálního gradientu intraepidermální inervace i u zdravých jedinců a poukazuje na nevhodnost využití normativních dat derivovaných pro distální lýtko i pro hodnocení vzorků, odebíraných z jiných oblastí. Vzhledem k počtu jedinců, u nichž byla biopsie hodnocena i proximálně, však nebylo možné vytvořit normativní data i pro tuto distribuci.

Studie tedy prioritně poskytla do té doby nepublikovaná věkově stratifikovaná normativní data pro imunofluorescenční hodnocení IENFD z nejčastěji hodnocené oblasti (tedy z distálního lýtka) a to odděleně pro obě pohlaví. Tato data byla poté využívána v řadě dalších navazujících studií (Divišová et al. 2012, Divišová et al. 2016, Škorňa et al. 2015).

Vyšetření hustoty intraepidermálních nervových vláken z kožní biopsie – normativní data

The Evaluation of Intraepidermal Nerve Fiber Density in Skin Biopsy – Normative Data

Souhrn

Úvod: Vyšetření intraepidermální hustoty tenkých nervových vláken (IENFD) z kožní biopsie patří v současnosti mezi klíčové metody v diagnostickém algoritmu neuropatické bolesti a senzitivních neuropatií, zejména neuropatie tenkých vláken. Cílem práce je ověření vlivu fyziologických proměnných na hodnoty IENFD, derivate validních normativních dat IENFD pro oblast distálního lýtka a dále zhodnocení nálezů této metodiky u pilotní skupiny vzorků z oblasti proximálního stehna. **Soubor a metodika:** Kožní biopsie z oblasti distálního lýtka byla provedena u souboru 74 zdravých dobrovolníků (39 mužů, 35 žen, věk: medián 54,5 let, rozmezí 27–84 let). Ve všech vzorcích byla stanovena IENFD metodou nepřímé imunofluorescence. Následně byl vyhodnocen vliv věku a pohlaví na IENFD a byla derivována věkově stratifikovaná normativní data (v podskupinách 20–40, 40–60 a 60+ let). U 14 jedinců byla kožní biopsie vyšetřena i z oblasti proximálního stehna a nálezy byly srovnány s distálními vzorky kožních biopsií. **Výsledky:** V oblasti distálního lýtka byl zaznamenán statisticky nevýznamný trend k vyšším hodnotám IENFD u žen oproti mužům a výsoce signifikantní pokles IENFD s věkem. Dolní normální limit byl pro jednotlivé věkové kategorie stanoven na úrovni 5,5–5,1–1,9 vláken na 1 mm délky epidermis u mužů a 6,1–5,2–3,1 u žen. Hodnoty IENFD v oblasti proximálního stehna byly signifikantně vyšší než v distální lokalizaci. **Závěr:** IENFD v oblasti distálního lýtka vykazuje signifikantní vliv věku a méně významný vliv pohlaví vyšetřených jedinců na nálezy ve skupině zdravých dobrovolníků. Při hodnocení IENFD z kožních biopsií je tedy vhodné zohlednění uvedených věkově stratifikovaných normativních dat pro jednotlivá pohlaví. Srovnání distálních vzorků s nálezy z oblasti anterolaterálního stehna potvrzuje existenci signifikantního proximo-distálního gradientu u zdravých dobrovolníků.

Abstract

Introduction: At present, evaluation of intraepidermal nerve fiber density (IENFD) from skin biopsies represents one of the most important methods for diagnosing neuropathic pain and sensory neuropathies, particularly in small-fiber neuropathy patients. The aim of the study was to analyze the effects physiological variables may have on IENFD values and to establish valid IENFD normal limits for distal calf region. Furthermore, we evaluated the IENFD values from anterolateral proximal thigh samples in a pilot study with a small group of healthy individuals. **Patients and methods:** Skin biopsies from the distal calf were obtained from a group of 74 healthy individuals (39 men, 35 women, age: median 54.5 years, range 27–84 years). IENFD was established in all the samples using the indirect immunofluorescence method. The effect of age and gender on IENFD values was evaluated and age-stratified normal values were derived in subgroups of patients aged 20–40, 40–60 and 60+ years. In addition, IENFD values obtained from proximal thigh skin biopsies of 14 individuals were compared to the distal samples. **Results:** Significant age-related decrease in IENFD values and non-significant trend to higher IENFD values in women were found in distal skin biopsy samples. Lower normal limits in the respective age subgroups were set at 5.5–5.1–1.9 fibers per 1 mm in men and 6.1–5.2–3.1, respectively, in women. Compared to the distal samples, proximal IENFD values were significantly higher. **Conclusion:** In a group of healthy volunteers, a significant effect of age and non-significant trend towards an effect of gender on IENFD values was found. Therefore, age-stratified and gender-specific normal values should be used when evaluating IENFD in distal skin biopsy samples. Comparison of these findings to proximal thigh samples confirms significant proximo-distal gradient of IENFD values.

Š. Buršová^{1,2}, E. Vlčková^{1,2},
M. Hnojčíková^{1,2}, M. Němec¹,
P. Dubový^{2,3}, B. Mičánková
Adamová^{1,2}, J. Bednařík^{1,2}

¹ Neurologická klinika LF MU
a FN Brno

² CEITEC – Středoevropský technologický
institut MU, Brno

³ Anatomický ústav LF MU, Brno



MUDr. Šárka Buršová
Neurologická klinika
LF MU a FN Brno
Jihlavská 20
625 00 Brno
email: bursova@email.cz

Přijato k recenzi: 26. 1. 2012

Přijato do tisku: 14. 2. 2012

Klíčová slova

kožní biopsie – intraepidermální hustota
nervových vláken – normativní data –
zdravé kontroly – věkové kategorie

Key words

skin biopsy – intraepidermal nerve fiber
density – normative values – healthy
individuals – age stratification

Práce byla podpořena grantem IGA
č. NS9667-4/2008 „Bolestivá diabetická
neuropatie“, projektem specifického vý-
zkumu MUNI/A/0765/2011 a projektem
„CEITEC – Středoevropský technologický
institut“ (CZ.1.05/1.1.00/02.0068) z Ev-
ropského fondu regionálního rozvoje.

Úvod

Hodnocení intraepidermální hustoty tenkých nervových vláken (IntraEpidermal Nerve Fiber Density, IENFD) z kožní biopsie patří v současnosti mezi klíčové metody diagnostického algoritmu senzitivních neuropatií, především pak neuropatie tenkých vláken, tedy klinické jednotky vyznačující se izolovaným postižením tenkých nervových vláken typu A-delta a C [1,2]. Dle recentně publikovaných doporučení [3,4] patří kožní biopsie s hodnocením IENFD také mezi nejdůležitější diagnostické metody neuropatické bolesti obecně. Jedná se o minimálně invazivní metodu, umožňující hodnocení morfologických změn a především redukce počtu tenkých nervových vláken v oblasti epidermis [2]. Díky možnosti hodnocení strukturálních změn tak toto vyšetření představuje unikátní objektivní metodu diagnostiky postižení tenkých nervových vláken, které není detekovatelné standardním elektromyografickým vyšetřením, resp. kondukčními studii periferních nervů [1,2]. Základním a nejčastěji hodnoceným parametrem kožní biopsie je hustota intraepidermálních nervových vláken detekovaných prostřednictvím panneuronálního markeru Protein Gene Product PGP 9.5, označovaná zkratkou IENFD (obr. 1a–c) [2,5,6]. Současným trendem v oblasti kožních biopsií je pak snaha o nalezení markerů umožňujících detekci časnějších stadií periferně neurogenního postižení, než dovoluje rutinní hodnocení počtu vláken pomocí PGP 9.5, a to jak ve smyslu změn exprese specifických proteinů na hodnocených nervových

vláknech, tak ve smyslu morfologických změn těchto vláken. Z hlediska změn exprese specifických proteinů se velmi perspektivně jeví např. marker regenerujících nervových vláken „Growth-Associated Protein 43“ (GAP-43). Tento typ markerů vykazuje signifikantní pokles imunoreaktivity intraepidermálních vláken v časných stadiích diabetické neuropatie, kde tato změna u části pacientů předchází poklesu počtu PGP 9.5 pozitivních vláken [7]. Z morfologického hlediska je v časných fázích periferně neurogenního postižení prokazována častější fragmentace vláken, výskyt varikozit (obr. 1c) a/nebo změny jejich větvení, přičemž i tyto změny předcházejí vlastní redukci IENFD (obr. 1b) [8,9]. Zmíněné parametry jsou velmi zajímavé pro účely klinických a výzkumných studií, jejich hodnocení je však časově náročné, složitější než hodnocení IENFD a více závislé na zkušenostech vyšetřujícího. Také z těchto důvodů zůstává IENFD i nadále nejvýznamnějším prakticky využitelným parametrem kožních biopsií a je na něj zaměřena maximální pozornost i z hlediska tvorby validních normativních dat [10–12], jejichž správné nastavení je jedním z klíčových faktorů ovlivňujících využitelnost metody v klinické praxi i pro výzkumné účely. Všechny velké, recentně publikované normativní soubory [10–12] jsou přitom zaměřeny na imunohistochemické barvení vzorků, zatímco pro alternativní metodu barvení, využívající metodu nepřímé imunofluorescence, nebyla normativní data derivovaná na podobně rozsáhlém vzorku pacientů dosud publikována.

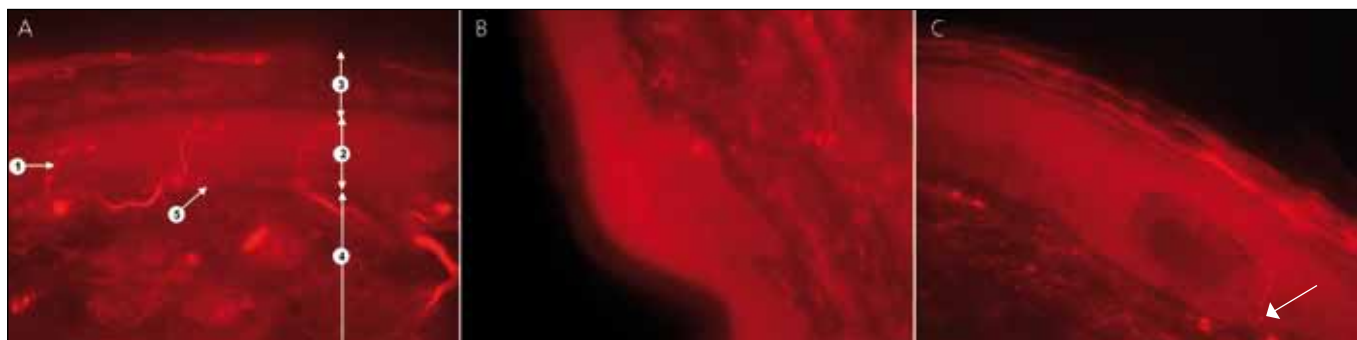
Cílem práce je proto nastavení validních, věkově stratifikovaných normativních dat využitelných v české populaci pro hodnocení IENFD stanovené v kožních biopsiích metodou nepřímé imunofluorescence, resp. ověření použitelnosti norem z recentně publikovaných souborů využívajících alternativní imunohistochemickou metodu barvení i pro detekci IENFD pomocí nepřímé imunofluorescence a v našich podmínkách.

Soubor

Normativní data pro IENFD byla derivována na základě nálezů zdravých dobrovolníků, u nichž byla kožní biopsie provedena na Neurologické klinice LF MU a FN Brno v rozmezí let 2000–2011. Většinu souboru představovali zaměstnanci kliniky, resp. FN Brno a jejich příbuzní a známí, menší část pak pacienti hospitalizovaní na naší klinice především pro bolesti hlavy, akutní vertebrogenní či jiné tranzitorní obtíže. U pacientů s vertebrogenní etiologií obtíží a s iradiací do některé dolní končetiny byl odběr biopsie proveden vždy na asymptomatické končetině, tj. kontralaterálně ke straně obtíží pacienta.

Vylučujícími kritérii zařazení do souboru byly:

1. anamnestické či klinické známky difuzního postižení periferního a/nebo centrálního nervového systému nebo fokální neuropatie ve vyšetřované distribuci,
2. známá přítomnost některého z rizikových faktorů vedoucích potenciálně k periferně neurogenní lézi – tedy zejména diabetu mellitu či poruchy glu-



Obr. 1. Srovnání normálního nálezu kožní biopsie (1a) s nálezy abnormálními (1b, c). Převzato z [5].

Obr. 1a) Normální nálezu kožní biopsie u zdravého jedince (zvětšení 400×). 1. PGP 9.5 – imunoreaktivní intraepidermální nervové vlákno. 2., 3. epidermis (2. stratum basale, spinosum, granulosum a lucidum. 3. stratum corneum), 4. dermis, 5. dermo-epidermální junctce.

Obr. 1b, c) Abnormální nálezu kožní biopsie (zvětšení 400×). 1b) Absence intraepidermálních vláken + redukce denzity subepidermálního plexu. 1c) Výrazná redukce počtu intraepidermálních vláken (zachyceno pouze jedno vlákno s patrnými „predegenerativními změnami“ – fragmentace, varikozity).

kózoové tolerance, chronického abúzu etanolu, onkologických onemocnění, hepatopatie, nefropatie či zánětlivého onemocnění pojiva.

Všichni jedinci zařazení do studie podepsali informovaný souhlas a jejich spolupráce nebyla honorována. Projekt byl schválen etickou komisí FN Brno.

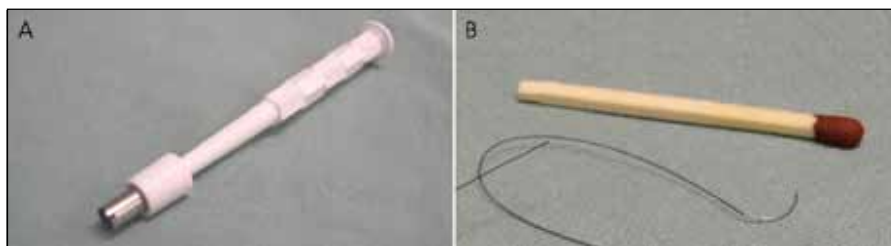
Celkem bylo hodnocení IENFD provedeno ve vzorcích kožních biopsií z oblasti distálního lýtka u 74 zdravých kontrol (39 mužů, 35 žen, věk: medián 54,5 let, rozmezí 27–84 let), u 14 pacientů byl tento parametr současně vyhodnocen i v proximálních vzorcích z oblasti anterolaterálního stehna. Pro účely derivace normativních dat byl dále soubor zdravých dobrovolníků věkově stratifikován do tří podskupin, definovaných dle věkových rozmezí:

- 20–40 let (14 jedinců, z toho 7 mužů a 7 žen, průměrný věk: $34,5 \pm 3,4$),
- 40–60 let (35 jedinců, z toho 16 mužů a 19 žen, průměrný věk: $51,1 \pm 4,8$),
- vyšší než 60 let (skupina 60+) (25 jedinců, z toho 16 mužů a 9 žen, průměrný věk: $66,4 \pm 5,7$ let).

Metodika

Vyšetření intraepidermální hustoty nervových vláken bylo provedeno ve vzorcích kožních biopsií z oblasti distálního lýtka (cca 10 cm nad pravým maleolus lateralis), u části zdravých dobrovolníků navíc i z anterolaterální strany proximálního stehna ipsilaterálně. Odběr byl proveden pomocí průbojníku o průměru 5 mm (obr. 2a) za aseptických kautel v lokální infiltrační anestezii 1% mezokainem. Po odběru následovala sutura jedním stehem pomocí atraumatického nevstřebatelného šití (obr. 2b), steh byl ponechán cca 10–14 dní a po zhojení jizvy extrahován.

Vzorky byly dále zpracovány standardním způsobem, který byl již opakovaně publikován [5–7]. Po fixaci a kryoprotekci byly z každého vzorku vytvořeny zmrazené řezy o tloušťce 50 μ m, které byly následně obarveny metodou nepřímé imunofluorescence s polyklonální primární protilátkou, zaměřenou proti panneuronálnímu markeru PGP 9.5 (Ultraclone, Wellow, UK; 1 : 800), a sekundární protilátkou, značenou fluorescenčním barvivem (TRITC-conjugated goat anti-rabbit, Chemicon International Inc., Temecula, California, USA; 1 : 100). Obarvené preparáty byly mikro-



Obr. 2. Vybavení pro odběr kožních biopsií. Převzato z [5].

Obr. 2a) Nástroj užívaný při odběru vzorků (průbojník).

Obr. 2b) Atraumatické nevstřebatelné šití (srovnání velikosti jehly s běžnou zápalkou).

skopicky hodnoceny pomocí epifluorescenčního mikroskopu firmy Leica DMLB (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany), vybaveného příslušným filtrem při 400násobném zvětšení. V každém hodnoceném řezu byl vyhodnocen počet imunoreaktivních intraepidermálních nervových vláken s patrným přechodem přes dermoepidermální junkci (obr. 1a–c) v souladu s doporučeními publikovanými pro tuto metodiku [2] v alespoň třech nepřilehlých tkáňových řezech. Následně byla pro každý vyhodnocený řez změřena délka epidermis pomocí analytického zobrazovacího systému firmy NIS-Elements AR, Laboratory Imaging s.r.o., Prague, Czech Republic a ze získaných výsledků byl stanoven počet intraepidermálních nervových vláken na 1 mm délky epidermis, který představuje vlastní hodnocený parametr, tedy intraepidermální hustotu tenkých nervových vláken (IENFD).

Statistické zpracování

Statistické zpracování bylo provedeno pomocí softwaru Statistica 10 firmy Statsoft. Ke zviditelnění rozložení hodnot jednotlivých testovaných parametrů a derivaci věkově stratifikovaných normativních dat byla použita robustní sumární statistika (medián, kvantily) a současně statistika parametrická (průměry, směrodatné odchylky). Vzhledem k normální distribuci hodnot IENFD bylo jejich srovnání mezi jednotlivými věkovými podskupinami provedeno s použitím analýzy variance (ANOVA) s Tukeyho post-hoc korekcí. Srovnání jednotlivých parametrů mezi muži a ženami bylo uskutečněno nepárovým t-testem, k porovnání nálezů IENFD v jednotlivých lokalizacích byl použit párový t-test. Korelační analýzy byly provedeny pomocí Pearsonova korelačního koeficientu v případě hodnocení distálních vzorků a pomocí koeficientu Spear-

manova u analýz zohledňujících IENFD ve vzorcích proximálních.

Výsledky

V rámci odběru kožních biopsií jsme nezaznamenali žádné komplikace. Jedinou částí vyšetření, hodnocenou některými jedinci jako mírně nepříjemnou, byla lokální infiltrační anestezie v úvodu výkonu. Samotný odběr vzorku k vyšetření pak hodnotili všichni zařazení jedinci jako nebolešlivý. S výjimkou dvou jedinců (z nichž u jednoho muže došlo k ruptuře stehu při výrazné fyzické aktivitě krátce po výkonu a u jedné ženy byl steh navzdory instrukcím extrahován předčasně již po 5 dnech od odběru biopsie a došlo k částečné dehiscenci rány) není autorům známa jiná komplikace hojení jizvy u žádného z odebraných zdravých dobrovolníků. Zhojení jizvy po odběru kožní biopsie tedy proběhlo ve všech ostatních případech per primam s minimálními následky a definitivní zhojení rány bylo uspokojivé i u obou jedinců, u nichž nastaly výše zmíněné komplikace. Metodu tak lze hodnotit jako zcela bezpečnou a pacienty dobře tolerovanou.

Sumarizace hodnot IENFD v jednotlivých věkových skupinách je uvedena v tab. 1, a to jednak souhrnně v celém souboru zdravých dobrovolníků a jednak samostatně u mužů a žen. Hodnoty IENFD vykazovaly trend k vyšší hustotě intraepidermálních nervových vláken u žen ve srovnání s muži, který však nebyl statisticky významný ($p = 0,268$). Naopak vysoce významný byl vliv věku: hodnoty IENFD v distální lokalizaci vysoce signifikantně negativně korelovaly s věkem (tab. 1). Pokles hustoty intraepidermálních nervových vláken s věkem byl významný i při srovnání jednotlivých věkových skupin (tab. 1), a to statisticky nejvýznamněji v nejstarší věkové kategorii (60+) oproti

Tab. 1. Sumarizace hodnot IENFD z kožní biopsie v distální lokalizaci.

	20–40				40–60				60+				Srovnání věkových skupin (p)	Korelace s věkem	
	průměr (X)	SD	X – 2 SD	5. percentil	průměr (X)	SD	X – 2 SD	5. percentil	průměr (X)	SD	X – 2 SD	5. percentil		r	p
IEFD: všichni	12,1	3,3	5,5	8,2	10,9	2,9	5,1	6,6	8,3	3,0	2,3	3,5	0,026	–0,4067	< 0,001
IEFD: muži	12,7	3,6	5,5	7,9	10,7	2,8	5,1	5,9	8,1	3,1	1,9	3,4	0,007	–0,4339	< 0,001
IEFD: ženy	11,3	2,6	6,1	9,0	11,2	3,0	5,2	6,9	8,6	2,7	3,1	4,7	0,272	–0,3179	0,08

Sumarizace hodnot IENFD z kožní biopsie v jednotlivých věkových kategoriích (20–40, 40–60, 60+), a to jednak souhrnně u všech jedinců dané věkové podskupiny, a dále odděleně u mužů a žen vč. korelace hodnot s věkem a srovnání nálezů mezi věkovými podskupinami. Hodnoty IENFD jsou uvedeny formou počtu vláken na 1 mm epidermis, a to v každé hodnocené skupině jako průměr, SD a 5. percentil hodnot. Výsledky lze použít k derivaci věkově stratifikovaných normativních dat, a to při dvou možných způsobech jejich nastavení, tj. na úrovni 5. percentilu prezentovaných hodnot a/nebo na úrovni X – 2 SD (obě hodnoty jsou explicitně uvedeny). Statistické zpracování bylo provedeno pomocí parametrické statistiky (ANOVA, t-test, Pearsonův korelační koeficient). IENFD – intraepidermální hustota nervových vláken (IntraEpidermal Nerve Fiber Density), SD – směrodatná odchylka (Standard Deviation), X – průměr

oběma kategoriím mladším (20–40, 40–60) (data post hoc korekce podrobněji neuvedena). Hodnoty IENFD naopak nevykazovaly statisticky významnou korelaci s výškou vyšetřených jedinců (Pearsonův korelační koeficient $r = 0,1664$; $p = 0,298$).

Normativní data stanovená oběma použitými metodami (tj. pomocí percentilů a/nebo na základě průměrů a směrodatných odchylek) jsou si ve všech věkových kategoriích poměrně blízká a odrážejí zmíněný věkově podmíněný pokles hodnot IENFD (tab. 1). Normy pro muže a ženy se v souladu s prokázanou absencí statisticky významných rozdílů hodnot IENFD liší pouze mírně, pro hodnocení tohoto parametru lze tedy využít i normativní data společná pro obě pohlaví (tab. 1).

Nálezů v proximálních vzorcích jedinců, u nichž byl odebrán vzorek v obou lokalizacích, vysoce významně korelovaly s nálezů ve vzorcích distálních (Spearmanův korelační koeficient $r = 0,6615$; $p < 0,05$) a hodnoty IENFD byly v oblasti proximálního stehna signifikantně vyšší (medián: 10,6; rozsah: 5,6–18,5) než v oblasti distálního lýtko (medián: 10,2; rozsah: 4,4–14,2) (Wilcoxonův párový test: $p = 0,0219$). Vliv věku, výšky ani pohlaví na zmíněné hodnoty nebylo možné vzhledem k malému počtu proximálních vzorků validně hodnotit.

Diskuze

Prezentovaný článek předkládá sumarizaci nálezů kožních biopsií z oblasti dis-

tálního lýtko s hodnocením intraepidermální hustoty tenkých nervových vláken u reprezentativního vzorku zdravých dobrovolníků z české populace a z nich derivovaná věkově stratifikovaná normativní data pro obě pohlaví. Současně jsou zde prioritně v české odborné literatuře publikovány nálezy kožních biopsií z proximální lokalizace, a to na vzorku pacientů srovnatelném s ojedinělými publikovanými zahraničními soubory.

Naše studie prokázala bezpečnost a dobrou toleranci kožní biopsie, která je při dodržení používaných doporučení pro vyšetřované jedince prakticky bez komplikací. Tyto zkušenosti jsou v souladu s výsledky jiných publikovaných prací zaměřených na hodnocení IENFD z kožní biopsie a také s platnými doporučeními pro použití této metody [2,10–12] a opravňují její bezproblémové zařazení do diagnostického algoritmu senzitivních neuropatií a neuropatické bolesti.

Hodnoty IENFD v distálních vzorcích našeho souboru zdravých kontrol i derivovaná normativní data jsou plně srovnatelné s nálezů dalších publikovaných studií, prezentujících data získaná převážně v rámci evropské populace [11–13], což verifikuje správnost námi použité metodiky. Oproti tomu Umapathi et al [10] uvádějí signifikantně vyšší průměrné hodnoty IENFD i doporučené normy: jako optimální dolní normální limit IENFD v distálních vzorcích kožních biopsií doporučuje na základě ROC analýzy 10 vláken na 1 mm délky epidermis, což je hodnota významně vyšší v porovnání s našimi výsledky i všemi dal-

šími citovanými pracemi [11–13] a prakticky odpovídá průměrné hodnotě IENFD v této oblasti ve všech ostatních zmíněných studiích včetně naší. Možným vysvětlením je signifikantně vyšší průměrný věk našeho kontrolního souboru ($53,2 \pm 12,3$) ve srovnání se zdravými dobrovolníky zařazenými do Umapathiho studie ($39,4 \pm 11,2$) a také možné rasové podmíněné rozdíly IENFD: data v citované práci [10] byla derivována na podkladě výsledků souboru zdravých dobrovolníků z asijské populace (Singapore).

Podobnost námi derivovaných norem s výsledky rozsáhlejších publikovaných multicentrických studií poskytuje možnost využít pro hodnocení nálezů IENFD aplikujících metodu nepřímé imunofluorescence u pacientů v české populaci oba typy normativních dat, tj. vedle naší studie také normy publikované autory Bakkers či Lauriou [11,12]. Určitou nevýhodou našeho souboru je jeho limitovaný rozsah, který neumožňuje derivovat validní normy stratifikované po jednotlivých dekádách tak, jak byly publikovány na základě nálezů velkých multicentrických studií [11,12]. Rozdíly hodnot IENFD např. mezi skupinami 20–29 a 30–39 nebo 40–49 a 50–59 jsou však v obou zmíněných rozsáhlejších souborech [11,12] poměrně malé a sloučení těchto skupin v našem souboru nepředstavuje významnou ztrátu validity derivovaných normativních dat. Výhodou je naopak derivace norem pro alternativní metodiku barvení využívanou řadou pracovišť (tedy nepřímou imunofluorescencí), resp. ověření vy-

užitelnosti normativních dat stanovených pro imunohistochemický způsob barvení vzorku i pro vzorky barvené metodou imunofluorescenční, u níž lze obecně předpokládat mírně vyšší počet IENFD oproti metodě imunohistochemické (kde jsou vlákna při mikroskopickém hodnocení poněkud hůře odlišitelná).

Hodnoty IENFD prokazují významnou věkově podmíněnou změnu. Tyto výsledky jsou v souladu s nálezy všech velkých souborů zdravých dobrovolníků recentně publikovaných pro IENFD [10–12]. Podobný trend bude zřejmě existovat i pro lokalizaci proximální, kde však s ohledem na malý rozsah našeho souboru nebylo možné věkově podmíněnou změnu validně hodnotit.

Vedle ovlivnění věkem prokazují naše výsledky také určité rozdíly nálezů mezi muži a ženami, které však v prezentované studii nebyly statisticky významné ($p = 0,268$), což je zřejmě ovlivněno limitovaným rozsahem našeho vzorku pacientů. Málo významné rozdíly mezi muži a ženami prokazují pro IENFD nicméně i další publikované studie [6,11], jiné pohlaví jako jeden z faktorů s potenciálním vlivem na IENFD nezohledňují a případné rozdíly mezi muži a ženami dokonce vůbec nehodnotí [10]. Většina studií nicméně prokazují pro tento parametr určité genderově podmíněné rozdíly [11,12] a v souladu s tím uvádí i odlišná normativní data IENFD pro muže a ženy [11,12], která lze odvodit i z naší studie a jejichž použitím autoři doporučují preferovat před využitím souhrnných norem nezohledňujících pohlaví pacienta. Existenci určitých rozdílů mezi muži a ženami nepřímo podporují i funkční testy tenkých nervových vláken prokazující významně lepší percepci termických modalit a nižší algické prahy u žen v řadě publikovaných validních studií [14,15], i když vlastní hodnota IENFD je samozřejmě pouze jedním z řady faktorů ovlivňujících percepci termických modalit a bolesti.

Vedle výsledků IENFD z distální oblasti uvádí naše publikace i nálezy menšího vzorku pacientů v lokalizaci proximální, tj. v oblasti anterolaterálního stehna. Přestože počet pacientů neumožňuje věkovou stratifikaci norem pro tuto lokalizaci, jedná se o prioritní publikaci tohoto typu dat v rámci ČR. V publikované literatuře obecně existuje poměrně málo prací za-

měřených na nálezy kožních biopsií v této lokalizaci a publikované soubory (s výjimkou Umaphathiho práce [10]) navíc rozsahem nepřevyšují naši studii [13,16]. Námi zjištěné hodnoty IENFD v proximální lokalizaci jsou, obdobně jako v lokalizaci distální, plně srovnatelné s dalšími publikovanými pracemi v evropské populaci [13], ale nižší oproti hodnotám derivovaným z populace asijské [10], pravděpodobně opět z důvodu rasově podmíněných rozdílů tohoto parametru. Naše nálezy dále potvrzují očekávanou vysoce významnou korelaci hodnot IENFD v distální a proximální oblasti stejně jako existenci určitého proximo-distálního gradientu intraepidermální inervace, tedy poklesu hodnot IENFD v distálních oblastech ve srovnání s oblastmi proximálními, která je plně v souladu s dalšími publikovanými nálezy [10,13,16]. Tyto výsledky opět korelují s nálezy funkčních testů tenkých nervových vláken, zejména s výsledky kvantitativního testování senzitivity, které prokazují významně nižší termické prahy pro teplo i bolest vyvolanou teplem na stehně ve srovnání s běžně vyšetřovanou oblastí na dorzu nohy [14].

Závěry

Prezentovaná studie poskytuje validní normativní data pro hodnocení intraepidermální hustoty tenkých nervových vláken z kožní biopsie, která jsou plně srovnatelná s publikovanými nálezy větších multicentrických studií, a umožňují tak pro hodnocení IENFD stanovené metodou nepřímé imunofluorescence a pro českou populaci využívat při hodnocení IENFD oba typy normativních dat.

Hodnoty IENFD vykazují významnou věkově podmíněnou změnu a určité rozdíly mezi muži a ženami. Uvedená normativní data jsou z těchto důvodů věkově stratifikována a umožňují využít genderově specifických norem.

Nálezy IENFD v proximálních částech prezentovaného souboru zdravých kontrol potvrzují existenci proximo-distálního gradientu intraepidermální inervace.

Použité zkratky

IE intraepidermální hustota nervových vláken (IntraEpidermal Nerve Fiber Density)

PGP 9.5 Protein Gene Product 9.5

GAP-43 Growth Associated Protein 43

Literatura

- Devigili G, Tugnoli V, Penza P, Camozzi F, Lombardi R, Melli G et al. The diagnostic criteria for small fibre neuropathy: from symptoms to neuropathology. *Brain* 2008; 131(Pt 7): 1912–1925.
- Lauria G, Hsieh ST, Johansson O, Kennedy WR, Leger JM, Mellgren SI et al. European Federation of Neurological Societies/Peripheral Nerve Society Guideline on the use of skin biopsy in the diagnosis of small fiber neuropathy. Report of a joint task force of the European Federation of Neurological Societies and the Peripheral Nerve Society. *Eur J Neurol* 2010; 17(7): 903–912.
- Cruccu G, Sommer C, Anand P, Attal N, Baron R, Garcia-Larrea L et al. EFNS guidelines on neuropathic pain assessment: revised 2009. *Eur J Neurol* 2010; 17(8): 1010–1018.
- Haanpää M, Attal N, Backonja M, Baron R, Bennett M, Bouhassira D et al. NeuPSIG guidelines on neuropathic pain assessment. *Pain* 2011; 152(1): 14–27.
- Moravcová E, Bednařík J, Feit J, Sommer C. Hodnocení intraepidermální hustoty tenkých nervových vláken z kožní biopsie u pacientů s polyneuropatií. *Cesk Slov Neurol N* 2005; 68/101(4): 219–226.
- Vlckova-Moravcova E, Bednarik J, Dušek L, Toyka KV, Sommer C. Diagnostic validity of epidermal nerve fiber densities in painful sensory neuropathies. *Muscle Nerve* 2008; 37(1): 50–60.
- Bursova S, Dubovy P, Vlckova-Moravcova E, Nemecek M, Klusakova I, Belobradkova J et al. Expression of growth-associated protein 43 in the skin nerve fibers of patients with type 2 diabetes mellitus. *J Neurol Sci* 2012; 315(1–2): 60–63.
- Lauria G, Morbin M, Lombardi R, Borgna M, Mazzoleni G, Sghirlanzoni A et al. Axonal swellings predict the degeneration of epidermal nerve fibers in painful neuropathies. *Neurology* 2003; 61(5): 631–636.
- Gibbons CH, Griffin JW, Polydefkis M, Bonyhay I, Brown A, Hauer PE et al. The utility of skin biopsy for prediction of progression in suspected small fiber neuropathy. *Neurology* 2006; 66(2): 256–258.
- Umaphathi T, Tan WL, Loke SC, Soon PC, Tavintharan S, Chan YH. Intraepidermal nerve fiber density as a marker of early diabetic neuropathy. *Muscle Nerve* 2007; 35(5): 591–598.
- Bakkers M, Merkies IS, Lauria G, Devigili G, Penza P, Lombardi R et al. Intraepidermal nerve fiber density and its application in sarcoidosis. *Neurology* 2009; 73(14): 1142–1148.
- Lauria G, Bakkers M, Schmitz C, Lombardi R, Penza P, Devigili G et al. Intraepidermal nerve fiber density at the distal leg: a worldwide normative reference study. *J Peripher Nerv Syst* 2010; 15(3): 202–207.
- Uçeyker N, Kafke W, Riediger N, He L, Necula G, Toyka KV et al. Elevated proinflammatory cytokine expression in affected skin in small fiber neuropathy. *Neurology* 2010; 74(22): 1806–1813.
- Defrin R, Shachal-Shiffer M, Hadgad M, Peretz C. Quantitative somatosensory testing of warm and heat-pain thresholds: the effect of body region and testing method. *Clin J Pain* 2006; 22(2): 130–136.
- Buršová Š, Vlčková E, Hnojčíková M, Němec M, Bednařík J. Přístrojově asistované kvantitativní testování senzitivity – normativní data. *Cesk Slov Neurol N* 2012; 75/108(4): 444–453.
- Pittenger GL, Ray M, Burcus NI, McNulty P, Basta B, Vinik AI. Intraepidermal nerve fibers are indicators of small-fiber neuropathy in both diabetic and nondiabetic patients. *Diabetes Care* 2004; 27(8): 1974–1979.

12. Buršová Š, Vlčková E, Hnojčiková M, Němec M, Mičánková Adamová B, Bednařík J. *Přístrojově asistované kvantitativní testování senzitivity - normativní data. Cesk Slov Neurol N* 2012c; 75/108(4):444-453. IF = 0,372. Počet citací v SCI: 6.

Tato studie navazuje na výše komentovanou práci zaměřenou na problematiku přístrojově asistovaného kvantitativního testování termického prahu (Moravcová a Bednařík 2003). Pro potřeby této studie byl dříve publikovaný soubor zdravých dobrovolníků významně rozšířen, což umožnilo věkovou stratifikaci derivovaných normativních dat. Kromě původně testovaných termických modalit (tedy tepla a chladu) byla navíc v rámci této práce nově zavedena metodika přístrojově asistovaného testování vibračního čítí (prioritně v rámci ČR). Všechny testované modality vykazovaly signifikantní vliv věku na výšku senzitivních prahů, což podporuje nutnost věkové stratifikace normativních dat. Současně byla prokázána mírně (ale statisticky významně) horší percepce termických i vibračních podnětů u mužů oproti ženám. Signifikantní byl také vliv použitého algoritmu na výšku termického či vibračního prahu. Z uvedených důvodů byla v rámci práce vytvořena věkově stratifikovaná normativní data pro přístrojově asistované stanovení termického a nově i vibračního čítí a to pro několik nejčastěji využívaných komerčně dostupných algoritmů testování a odděleně pro muže a ženy. Tato data byla následně využívána v navazujících studiích (Divišová et al. 2012, Divišová et al. 2016).

Přístrojově asistované kvantitativní testování senzitivity – normativní data

The Computer-Assisted Quantitative Sensory Testing – Normative Data

Souhrn

Úvod: Přístrojově asistované kvantitativní testování senzitivity (QST) se stanovením termických (TPT) a vibračních (VPT) prahů patří v současnosti mezi klíčové metody v diagnostickém algoritmu senzitivních neuropatií. Cílem práce je derivace validních, věkově stratifikovaných normativních dat pro obě QST metodiky. **Soubor a metodika:** Věkově stratifikovaná normativní data (v podskupinách 20–40, 40–60 a 60+ let) byla derivována z nálezů souborů 88 (TPT), resp. 74 (VPT) zdravých dobrovolníků. **Výsledky:** Při vyšetření TPT i VPT byla prokázána mírně horší percepce všech testovaných modalit u mužů ve srovnání se ženami a signifikantní věkově podmíněný pokles termických prahů pro chlad (při použití metody Limity byl dolní normální limit (NL) pro jednotlivé věkové kategorie stanoven na úrovni 26,3–25,5–22,8 °C u mužů a 29,1–26,6–21,1 °C u žen) a vzestup prahů pro teplo (horní NL 40,8–44,9–46,2 °C u mužů a 39,5–41,2–48,2 °C u žen) i vibrační čítí (horní NL 6,0–12,5–50,3 μm u mužů a 4,0–13,2–33,6 μm u žen). Výška prahu byla ovlivněna také volbou algoritmu testování, tj. byla mírně vyšší v metodách reakčního času (Limity) oproti metodám konstantního stimulu (Úrovně). **Závěry:** Senzitivní prahy pro teplo, chlad i vibrační čítí vykazují signifikantní vliv věku a méně významný vliv pohlaví vyšetřených jedinců na nálezy ve skupině zdravých dobrovolníků. Při hodnocení výsledků obou metod u pacientů se senzitivní neuropatií je tedy vhodné použití věkově stratifikovaných normativních dat pro jednotlivá pohlaví se zohledněním příslušného algoritmu testování.

Abstract

Introduction: Detection of thermal (TPT) and vibratory (VPT) perception thresholds using the computer-assisted quantitative sensory testing (QST) is currently one of the most important methods for diagnosing sensory neuropathies. The aim of the study was to establish valid, age-stratified normal limits for both the QST methods. **Patients and methods:** Findings from 88 (TPT) or 74 (VPT) healthy individuals provided the basis for establishing age-stratified normal values in subgroups of patients aged 20–40, 40–60 and 60+ years. **Results:** Slight but significant differences between men and women and highly significant age-related changes were found for all the TPTs and VPTs with lower cold thresholds and higher warm and vibratory thresholds in men and in older individuals. Using the method of limits, lower normal values for cold TPT were set at 26.3–25.5–22.8 °C for the respective age subgroups of men and 29.1–26.6–21.1 °C for the respective age subgroups of women. Similarly, upper normal limits for warm TPT were set at 40.8–44.9–46.2 °C, respectively, in men and 39.5–41.2–48.2 °C, respectively, in women, and at 6.0–12.5–50.3 μm, respectively, in men and 4.0–13.2–33.6 μm, respectively, in women for VPT. Threshold values also depend on the testing algorithm used, with slightly higher values in reaction time inclusive methods (Limits) compared to reaction time exclusive algorithms (Levels). **Conclusions:** Cold and warm TPT as well as VPT display significant age-effect and less significant effect of gender on perception threshold values. The evaluation of the VPT and TPT findings in patients with sensory neuropathies should thus be performed using the age- and gender-adjusted normal values for particular testing algorithm.

Š. Buršová^{1,2}, E. Vlčková^{1,2},
M. Hnojčková^{1,2}, M. Němec¹,
B. Mičánková Adamová^{1,2},
J. Bednařík^{1,2}

¹ Neurologická klinika LF MU a FN Brno

² CEITEC – Středoevropský technologický institut MU, Brno



MUDr. Šárka Buršová
Neurologická klinika
LF MU a FN Brno
Jihlavská 20
625 00 Brno
email: bursova@email.cz

Přijato k recenzi: 25. 1. 2012

Přijato do tisku: 28. 2. 2012

Klíčová slova

senzitivní neuropatie – neuropatie tenkých vláken – kvantitativní testování senzitivity – termický práh – vibrační práh – normativní data

Key words

sensory neuropathy – small fiber neuropathy – quantitative sensory testing – thermal perception threshold – vibratory perception threshold – normative values

Práce byla podpořena grantem IGA č. NS9667-4/2008 „Bolestivá diabetická neuropatie“, projektem specifického výzkumu MUNI/A/0765/2011 a projektem „CEITEC – Středoevropský technologický institut“ (CZ.1.05/1.1.00/02.0068) z Evropského fondu regionálního rozvoje.

Úvod

Diagnostický algoritmus senzitivních neuropatií se v posledních letech významně rozšířil zejména o metody kvantitativního testování senzitivity (QST), které dle recentně publikovaných doporučení patří i mezi klíčové metody v diagnostice neuropatické bolesti [1,2].

Termínem kvantitativní testování senzitivity (QST) je v současnosti označována skupina přístrojově asistovaných a/nebo jednoduchých klinických testů, které umožňují exaktně kvantifikovat percepci široké škály senzitivních modalit. Aktuálním trendem je tvorba standardizovaných vyšetřovacích protokolů [3,4], zahrnujících přesně definovaný soubor vyšetřovaných modalit, pro které je v rámci protokolu stanoven senzitivní práh (tedy nejnižší intenzita dané modality, jež u daného pacienta vyvolá percepci podnětu – např. práh pro termické čítí pro teplo a chlad, vibrační nebo taktilní čítí) a/nebo práh algický (tj. nejnižší intenzita dané modality, která u daného pacienta vede k vyvolání bolestivého vjemu – např. pro termickou bolest vyvolanou horkými a chladnými podněty, mechanickou statickou bolest vyvolanou tupým tlakem a bolest mechanickou bodovou evokovanou píchnutím špendlíkem). Součástí protokolu bývá i hodnocení mechanické dynamické alodynie, případně dalších parametrů [3,4]. Souhrn těchto metod pomáhá vyšetřujícímu vytvořit tzv. senzitivní profil pacienta umožňující posouzení míry dysfunkce jednotlivých typů senzitivních nervových vláken. Skupinové vyhodnocení tohoto typu dat pak umožňuje detekovat patofyziologické mechanismy řady klinických symptomů, je využitelné např. pro zpřesnění výběru pacientů vhodných pro studie zaměřené na možnost terapeutického ovlivnění konkrétních symptomů a umožňuje zpřesnit míru účinnosti hodnocené terapie na jednotlivé komponenty neuropatické bolesti [1,3]. Lze předpokládat, že v budoucnu bude senzitivní profil pacienta využitelný i klinicky pro volbu optimální terapie založené na ovlivnění konkrétních mechanismů vedoucích u daného jedince k rozvoji neuropatické bolesti [3]. I přes vzrůstající využití těchto metod v klinické i experimentální praxi jsou jediná recentně publikovaná validní normativní data jen částečně věkově stratifikována [3], což limituje jejich využití zejména u střední věkové skupiny

(40–60 let) a také u nejstarších jedinců (nad 60 let) – tedy u dvou nejčastěji vyšetřovaných skupin pacientů.

Většinu modalit testovaných v rámci QST lze vyšetřit pomocí jednoduchých klinických testů, přesnější informace pak poskytuje přístrojově asistované vyšetření, které je pro některé modalit (zejména termické čítí a termoalgickou percepci) obligátní součástí protokolu vzhledem k absenci dostatečně přesných jednoduchých klinických testů pro tyto modalit [1]. Právě hodnocení termické a termoalgické percepcie je přitom klíčovou součástí QST vyšetření, protože odráží funkci tenkých nervových vláken, jejichž postižení nelze detekovat pomocí rutinního elektromyografického vyšetření a jejichž dysfunkce hraje zřejmě klíčovou roli v rozvoji neuropatické bolesti [1].

Metody přístrojově asistovaného stanovení termického a vibračního prahu jsou již dostupné na více pracovištích v rámci České republiky a lze předpokládat, že jejich využití bude dále narůstat. Pro jejich racionální hodnocení (stejně jako pro jakoukoli jinou metodiku) je však klíčové exaktní nastavení normativních dat.

Cílem práce je proto nastavení validních, věkově stratifikovaných normativních dat využitelných v české populaci pro vyšetření termických (Thermal Perception Threshold, TPT) a vibračních (Vibratory Perception Threshold, VPT) prahů v rámci přístrojově asistovaného vyšetření QST.

Soubor

Derivace normativních dat pro hodnocení TPT a VPT v rámci QST byla provedena

s využitím nálezů zdravých dobrovolníků vyšetřených na Neurologické klinice LF MU a FN Brno alespoň jednou z těchto metod v rozmezí let 2000–2011. Většinu souboru představovali zaměstnanci kliniky, resp. FN Brno a jejich příbuzní a známí, menší část pak pacienti hospitalizovaní na NK především pro bolesti hlavy nebo akutní vertebrogenní či jiné tranzitorní obtíže. Vyšetření všech pacientů probíhalo v době, kdy již odezněly akutní obtíže a pacienti nebyli pod vlivem medikace s potenciálním vlivem na percepci hodnocených senzitivních modalit či koncentraci. U pacientů s vertebrogenní etiologií obtíží s iradiací do dolních končetin byla vždy vyšetřována končetina kontralaterální ke straně obtíží pacienta.

Vylučujícími kritérii zařazení do souboru byly:

1. anamnestické či klinické známky difuzního postižení periferního a/nebo centrálního nervového systému, cévní onemocnění DKK, fokální neuropatie a/nebo jiné významné změny lokálního nálezu ve vyšetřované distribuci (dermatomykózy, silná plantární hyperkeratóza apod.),
2. známá přítomnost některého z rizikových faktorů vedoucích potenciálně k periferní neurogenní lézi – tedy zejména diabetu mellitu či poruchy glukózové tolerance, chronického abúzu etanolu, onkologických onemocnění, hepatopatie, nefropatie či zánětlivého onemocnění pojiva,
3. aktuální medikace s potenciálním vlivem na senzitivní percepci, koncentraci a reakční čas.

Tab. 1. Demografické charakteristiky souborů zdravých kontrol pro jednotlivé QST metodiky: počet zařazených jedinců, průměrný věk a zastoupení pohlaví v jednotlivých věkových podskupinách.

QST: TPT	20–40	40–60	60+
počet pacientů	25	47	16
počet mužů/žen	12/13	26/21	9/7
průměrný věk	32,8 ± 6,7	50,0 ± 4,6	66,4 ± 5,2
QST: VPT	20–40	40–60	60+
počet pacientů	30	29	15
počet mužů/žen	15/15	15/14	8/7
průměrný věk	30,1 ± 5,1	50,2 ± 5,0	66,3 ± 4,9

QST – kvantitativní testování senzitivity (Quantitative Sensory Testing), TPT – termický práh (Thermal Perception Threshold), VPT – vibrační práh (Vibration Perception Threshold)

Všichni jedinci zařazení do studie podepsali informovaný souhlas a jejich spolupráce nebyla honorována. Projekt byl schválen etickou komisí FN Brno.

Celkem byly termické prahy pro teplo a chlad vyšetřeny pomocí QST u 88 zdravých jedinců (47 mužů, 41 žen, věk: medián 48,5 let, rozmezí 20–74 let), vibrační prahy pak u 74 zdravých dobrovolníků (38 mužů, 36 žen, věk: medián 45,5 let, rozmezí 20–78 let). Pro účely derivace normativních dat byly dále oba soubory zdravých dobrovolníků věkově stratifikovány do tří podskupin, definovaných dle věkových rozmezí 20–40 let, 40–60 let a vyšší než 60 let (60+). Blíže demografická data jednotlivých podskupin jsou pro obě hodnocené metody uvedena v tab. 1.

Metodika

Kvantitativní testování senzitivity

Kvantitativní testování senzitivity (QST) bylo provedeno pomocí elektrodiagnostické jednotky Nicolet Viking IV a příslušného specializovaného softwaru v tichém, klidném prostředí a při maximálním pohodlí pro vyšetřovaného, aby byla co nejméně narušena schopnost jeho koncentrace. Termické prahy (TPT) byly hodnoceny s využitím softwaru Neurosensory analyser – model TSA-II (Medoc TSA 2001; Medoc Ltd., RamatYishai, Israel) a termosondy 2,5 × 5 cm (obr. 1a). Vyšetření bylo provedeno na dorzu pravé nohy (resp. kontralaterálně k distribuci vertebrogenních obtíží) v oblasti nad musculus extensor digitorum brevis (dermatom L5). Na základě pilotní studie zaměřené na QST provedené na našem pracovišti [5] byly pro vyšetření zvoleny dvě metody reakčního času (tj. nerandomizovaná a randomizovaná varianta metody Limity) a jedna metoda konstantního stimulu (Úrovně). Každou z uvedených metod byl vyšetřen práh pro vnímání tepla (Warm Sensation, WS) a chladu (Cold Sensation, CS) v dané lokalizaci, a to ve vyšetřovaném tepelném rozsahu 0–50 °C (který nemůže být během vyšetření překročen z důvodu prevence termického poškození tkání pacienta). Výchozí, tzv. adaptační teplota je pro všechny testy 32 °C (jedná se o neutrální teplotu, při níž naprostá většina vyšetřovaných jedinců nevnímá teplo ani chlad). Rychlost nárůstu a poklesu teploty podnětu je 1 °C/s, interstimulační interval pak 4–6 sekund. Před provedením každého z testů je pacient detailně instru-



Obr. 1a) Termosonda, připevněná na nárt pravé dolní končetiny ve vyšetřované lokalizaci (dorsum nohy v oblasti nad musculus extensor digitorum brevis).

Obr. 1b) Vibrační sonda. Vlastní vibrující část představuje bílá cylindrická sonda s plochou 1,2 cm², patrná přibližně uprostřed plochy, určené pro položení vyšetřované končetiny.

ván (tyto instrukce jsou pro účel laboratoře standardizovány).

U nerandomizované (NR) varianty metody Limity je aplikováno pět chladných a následně pět teplých podnětů. V okamžiku percepce podnětu reaguje vyšetřovaný subjekt stisknutím tlačítka myši. Práh je určen jako průměrná hodnota z těchto pěti pokusů (obr. 2a, b). Spolupráce pacienta je při tomto testu hodnocena zejména pomocí variability jednotlivých odpovědí, vyjádřené formou variačního koeficientu.

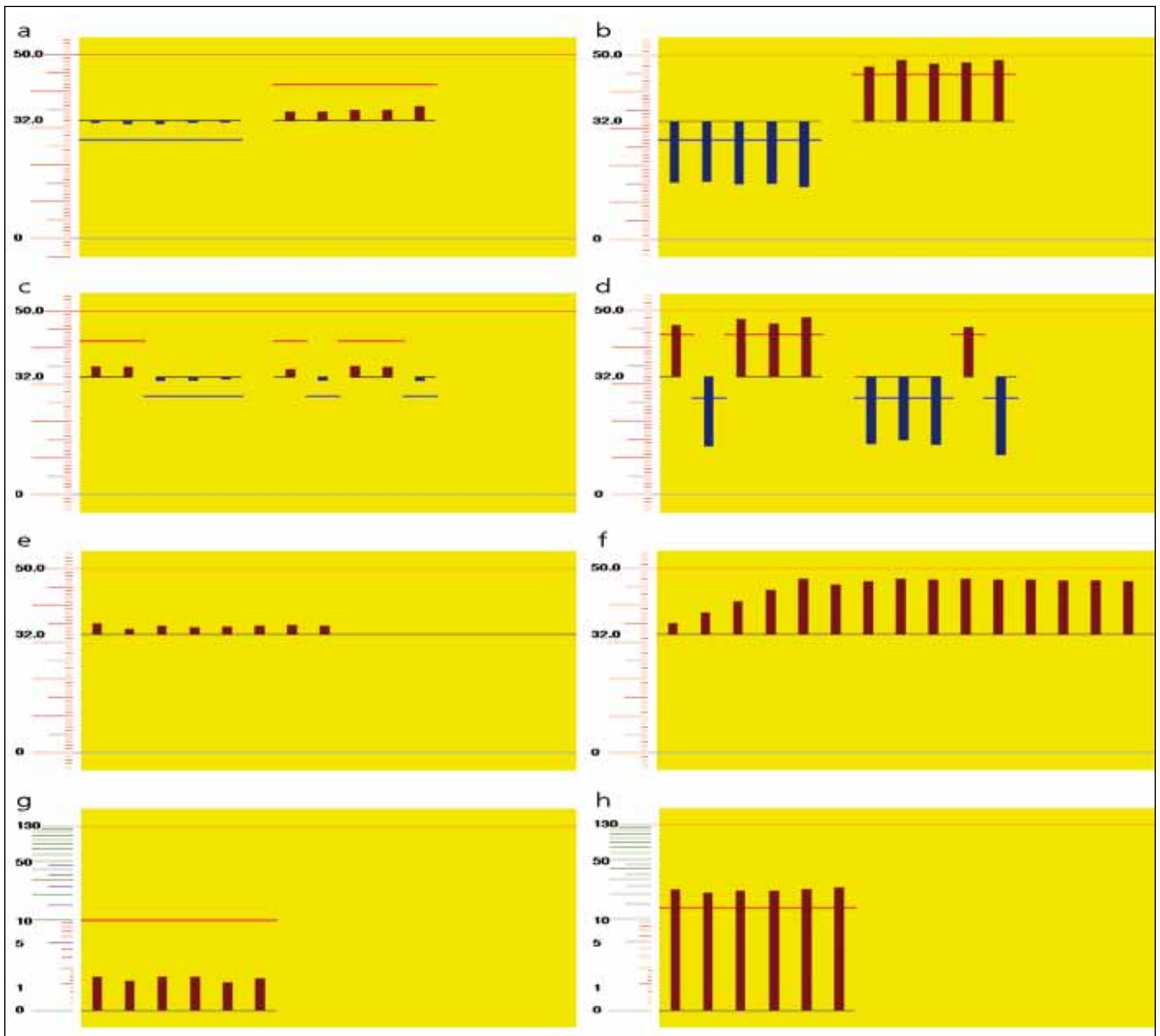
U randomizované varianty této metody (R) se teplé a chladné podněty (v celkovém počtu pět pro každou z těchto modalit) náhodně střídají a úkolem vyšetřovaného subjektu je kromě stanovení okamžiku percepce každého podnětu (opět pomocí stisknutí tlačítka myši) určit také jeho tepelnou modalitu (chlad nebo teplo) (obr. 2c, d). Kromě vlastních termických prahů (vypočtených opět jako průměr z pěti aplikovaných podnětů dané tepelné modalit) je zde hodnocena schopnost diskriminace tepelných modalit, a to formou počtu podnětů se správně detekovanou modalitou z celkového počtu 10 aplikovaných. Nejčastěji formou abnormality je pak tzv. paradoxical heat sensation, tedy paradoxní vnímání chladného stimulu jako teplého, resp. většinou horkého podnětu.

U metody Úrovně má iniciační podnět předem určenou intenzitu. Výchozí velikost změny jsou 3 °C, při adaptační teplotě 32 °C je tedy výchozí podnět na úrovni 35, resp. 29 °C. Vyšetřovaný subjekt má za úkol slovně označit, zda podnět vnímá či nikoli, vyšetřující jeho odpověď zaznamená do testu. Teplota

následujícího podnětu je pak odvozena od pacientovy reakce na podnět vstupní a její změna je buďto poloviční (je-li odpověď na předcházející stimulus kladná) nebo dvojnásobná oproti předchozímu podnětu (v případě záporné odpovědi). Test je ukončen při poklesu změny na předem určenou úroveň (0,1 °C), průměr poslední odpovědi „ano“ a „ne“ představuje práh. Vyšetření je prováděno odděleně pro jednotlivé tepelné modalit (tj. pro teplo – obr. 2e, f – a chlad – bez grafické dokumentace).

Vyšetření vibračního čítí bylo provedeno pomocí softwaru Vibratory sensory analyser – VSA-3000 model (Medoc Ltd., RamatYishai, Israel) a cylindrické vibrační sondy 1,2 cm² (obr. 1b) na plosce PDK v oblasti pod hlavičkou II.–III. metatarzu. Při vyšetření všech subjektů byla noha volně položena na vyšetřovací plochu a její pozice byla nastavena tak, aby poloha vibrační sondy odpovídala výše uvedené pozici. Pro vyšetření byla zvolena jedna metoda reakčního času (Limity) a jedna metoda konstantního stimulu (Úrovně). Podnět má stabilní frekvenci 100 Hz, během vyšetření narůstá logaritmičtě amplituda podnětu, hodnocená v mikrometrech (μm), v těchto jednotkách je vyjádřen i výsledný vibrační práh. Interstimulační interval je 4–6 sekund.

U metody Limity je aplikováno šest vibračních podnětů, jejichž amplituda z nulové hodnoty logaritmičtě narůstá rychlostí 0,8 μm/sekundu až do okamžiku percepce podnětu označeného vyšetřovaným subjektem stisknutím tlačítka myši. Práh je vypočten jako průměrná hodnota z šesti provedených pokusů (obr. 2g, h).



Obr. 2. Srovnání protokolů normálních a abnormálních nálezů prezentovaných algoritmy vyšetření.

Každý ze sloupců grafu představuje jeden aplikovaný podnět, výška sloupce odpovídá teplotě (a–f), resp. amplitudě vibrací (g, h), při níž subjekt daný stimulus percipoval – čím nižší jsou tedy jednotlivé sloupce, tím lépe vyšetřovaný vnímá danou senzitivní modalitu. Při testování TPT metodami reakčního času (a–d) představuje horizontální linie uprostřed sloupcového grafu neutrální adaptační teplotu 32 °C, sloupce pod touto linií odpovídají chladným podnětům, sloupce nad linií naopak podnětům teplým. Teplotu podnětu, která odpovídá výšce sloupce, lze odečíst na ose y, kde je lineární stupnice ve °C. U testů VPT představuje nulovou hodnotu vibrací osa x, osou y je pak logaritmicky modifikovaná škála amplitudy vibrací. Horizontální linie nad/pod sloupcovým grafem (resp. v případě abnormálních výsledků testů protínající jednotlivé sloupce) představuje v testech reakčního času (a–d, g, h) normální limit TPT/VPT v daném testu a pro daného pacienta (odvozený z věkové a genderově specifických norem, poskytovaných výrobcem přístrojového vybavení).

Obr. 2a, b) Vyšetření TPT nerandomizovanou variantou metody reakčního času (Limity NR).

Vyšetřeno je vždy 5 po sobě jdoucích chladných podnětů a následně 5 podnětů teplých, teplota podnětu narůstá/klesá z neutrální teploty 32 °C a vyšetřovaný reaguje stisknutím tlačítka myši v okamžiku percepcie podnětu (čímž zastaví jeho další nárůst). Obr. 2a představuje normální nález, obr. 2b pak nález abnormální s překročením termického prahu pro obě tepelné modalit.

Obr. 2c, d) Vyšetření TPT randomizovanou variantou metody reakčního času (Limity R).

Vyšetřeno je 5 chladných a 5 teplých podnětů, které se v náhodném pořadí střídají. Úkolem vyšetřovaného je kromě stanovení okamžiku percepcie podnětu (opět stisknutím tlačítka myši) určit také jeho tepelnou modalitu (teplý/chlad). Obr. 2c představuje normální nález, obr. 2d pak nález abnormální s překročením termického prahu pro obě tepelné modalit.

Obr. 2e, f) Vyšetření TPT pro teplo metodou konstantního stimulu (Úrovně).

Aplikovány jsou podněty předem určené teploty a vyšetřovaný určuje, zda je vnímá či nikoli. Zpočátku je patrný postupný nárůst teploty podnětu (a tedy výšky sloupců) až do okamžiku percepcie podnětu subjektem a poté mírný pokles a následné kolísání, během něhož dochází ke zpřesnění výšky prahu. Obr. 2e představuje normální nález, obr. 2f pak nález abnormální s překročením termického prahu pro teplo.

Obr. 2g, h) Vyšetření VPT metodou reakčního času (Limity).

Aplikováno je 6 podnětů, u každého z nich dochází postupně k nárůstu intenzity vibrací a vyšetřovaný reaguje stisknutím tlačítka myši v okamžiku percepcie podnětu (čímž zastaví jeho další nárůst). Obr. 2g představuje normální nález, obr. 2h pak nález abnormální s překročením doporučených hodnot vibračního prahu.

Princip metody Úrovně je identický jako při vyšetření termického čítí. Výchozí velikost změny mezi následnými podněty je 0,8 μm a po kladné odpovědi se vždy snižuje na polovinu. Trvání podnětu po dosažení maximální (cílové) amplitudy je pokaždé 2 000 ms. Test je ukončen při poklesu změny na předem určenou úroveň (0,1 μm), průměr poslední odpovědi „ano“ a „ne“ představuje práh (grafická podoba testu neuvedena, ale je obdobná jako vyšetření TPT pro teplo metodou Úrovně). Do testu jsou náhodně zařazeny nulové (slepé) podněty s cílem testovat spolupráci vyšetřovaného subjektu.

Statistické zpracování

Statistické zpracování bylo provedeno pomocí softwaru Statistica 10 firmy Statsoft. Ke zviditelnění rozložení hodnot jednotlivých testovaných parametrů a derivaci věkově stratifikovaných normativních dat byla použita robustní sumární statistika (medián, kvantily) a současně statistika parametrická (průměry, směrodatné odchylky). Vzhledem k normální distribuci dat TPT bylo srovnání hodnot mezi jednotlivými věkovými podskupinami provedeno s použitím analýzy variance (ANOVA) s Tukeyho post hoc korekcí. Srovnání jednotlivých parametrů mezi muži a ženami bylo provedeno nepárovým t-testem, k porovnání nálezů TPT v jednotlivých provedených testech byl použit párový t-test. Korelační analýzy byly provedeny pomocí Pearsonova korelačního koeficientu. Srovnání kategoriálních dat bylo provedeno chí-kvadrát testem. Statistické zpracování VPT a dále hodnot reflektujících variabilitu odpovědí při vyšetření TPT a VPT bylo s ohledem na non-normální distribuci těchto dat provedeno pomocí neparametrické statistiky: pro popis rozložení dat byla použita robustní sumární statistika (medián, kvantily), srovnání hodnot mezi ženami a muži a srovnání variability vibračních a termických prahů bylo provedeno metodou Kolmogorov-Smirnov, porovnání VPT v jednotlivých použitých algoritmech a hodnot variability jednotlivých TPT testů pak pomocí Wilcoxonova párového testu, porovnání hodnot v jednotlivých věkových kategoriích pomocí Kruskal-Wallisova ANOVA testu a korelační analýzy pomocí testu Spearmanova. Pro derivaci normativních hodnot VPT byla data logaritmičsky transformována a normy derivované na úrovni

X + 2SD vycházejí u VPT z takto logaritmičsky transformovaných dat (s tím, že po provedení potřebných výpočtů byla data zpětně převedena na hodnoty vibračních prahů příslušnou exponenciální funkcí a jako taková jsou v tabulkách prezentována).

Výsledky

Všichni zařazení jedinci tolerovali velmi dobře všechny testy provedené v rámci QST vyšetření. Stanovení VPT i TPT bylo pacienty hodnoceno jako zcela nebolestivé a u žádného z vyšetřených jedinců nedošlo ve vyšetřovaném tepelném rozsahu (0–50 °C) k termickému poškození kůže ani jinému typu komplikací. Obě metody tak lze hodnotit jako zcela bezpečné a pacienty dobře tolerované.

Sumarizace nálezů TPT a VPT v kontrolním souboru včetně derivovaných norem je uvedena v tab. 2.

V rámci hodnocení výsledků byl prokázán signifikantní vliv pohlaví vyšetřených jedinců na výšku senzitivních prahů u všech testovaných modalit (VPT i TPT). Muži vykazovali ve všech provedených testech mírně horší percepci (tedy nižší prahy pro chlad a vyšší prahy pro teplo a vibrační čítí) ve srovnání se ženami (tab. 2a). Derivace normativních dat byla proto provedena nejen souhrnně v celém souboru vyšetřených jedinců (tab. 2a), ale současně také odděleně pro muže a ženy (tab. 2b, c).

Obdobně vykazovaly všechny testy vibračního i termického čítí provedené v rámci QST signifikantní věkově podmíněné změny s poklesem termických prahů pro chlad a vzestupem prahů pro teplo a vibrační čítí s věkem (tab. 2). Tyto rozdíly byly patrné u mužů i žen a byly vysoce statisticky významné zejména u nejstarší věkové podskupiny (60+) ve srovnání s oběma mladšími kategoriemi (20–40 a 40–60) (tab. 2, význam rozdílů mezi jednotlivými podskupinami detailně neuveden).

Výška termických i vibračních prahů závisí na použitém algoritmu testování. Obecně byly prahy pro chlad vysoce významně vyšší (a prahy pro teplo a vibrační čítí nižší) při testování metodou konstantního stimulu (Úrovně) ve srovnání s metodami reakčního času (Limity) ($p < 0,0001$ pro všechny zmíněné modalit). V rámci metody Limity byly pak při vyšetření TPT nižší termické prahy pro chlad ($p = 0,01$)

při použití randomizované varianty testu ve srovnání s variantou nerandomizovanou. Prokázán byl i obdobný trend k vyšším prahům pro teplo při použití randomizované varianty metody Limity, rozdíly však nebyly statisticky významné ($p = 0,21$).

Hodnoty termických i vibračních prahů stanovené jednotlivými metodami vykazovaly vzájemně vysoce významnou korelaci: u prahů pro chlad byl korelační koeficient mezi hodnotami získanými metodou Limity a Úrovně $r = 0,4722$ ($p < 0,001$) a mezi randomizovanou a nerandomizovanou variantou metody Limity $r = 0,7212$ ($p < 0,001$). Obdobně u prahů pro teplo byla prokázána velmi úzká korelace jak mezi prahy stanovenými metodami Limity a Úrovně ($r = 0,6219$; $p < 0,001$), tak zejména mezi randomizovanou a nerandomizovanou variantou metody Limity ($r = 0,7370$; $p < 0,001$). Ještě významnější korelace mezi prahy hodnocenými metodou Limity a Úrovně byla prokázána u testů vibračního čítí ($r = 0,9474$; $p < 0,001$). Při zohlednění výše zmíněných rozdílů mezi jednotlivými metodami lze tedy nálezy u většiny testovaných jedinců považovat za vysoce konzistentní, což podporuje spolehlivost testování TPT i VPT pomocí QST (tab. 2).

Navržené normální limity všech parametrů derivované oběma použitými metodami (percentilovou metodou a/nebo pomocí průměrů a směrodatných odchylek, v případě VPT po logaritmičské transformaci dat) jsou ve většině věkových kategoriích a pro většinu testů navzájem poměrně blízké (tab. 2), a to zejména v podskupinách s vyšším zařazeným počtem jedinců. Tyto nálezy podporují oprávněnost použití obou typů normativních dat a derivované normy odrážejí i dokumentované věkově vázané změny hodnocených parametrů.

Při vyšetření TPT je v rámci randomizované varianty testu Limity vedle výšky termického prahu hodnocena i schopnost správné detekce modality aplikovaného podnětu. Tento parametr vykazoval obdobně jako výška termického prahu signifikantní, věkově podmíněné změny. Tepelnou modalitu u všech 10 aplikovaných podnětů určilo správně 100 % jedinců, zařazených v nejmladší věkové skupině (20–40 let), 94 % jedinců v prostřední skupině (40–60 let) a 81 % jedinců ve skupině nejstarší (60+) (χ^2 test:

Tab. 2. Sumarizace hodnot termických prahů (TPT) pro teplo (WS) a chlad (CS) a vibračních prahů (VPT) při vyšetření QST v jednotlivých věkových kategoriích (20–40, 40–60, 60+), a to jednak souhrnně u všech jedinců dané věkové podskupiny (2a) a dále odděleně u mužů (2b) a žen (2c) vč. korelace hodnot jednotlivých parametrů s věkem, srovnání nálezů mezi věkovými podskupinami a mezi muži a ženami. Pro každý parametr jsou uvedeny hodnoty průměru, SD a dále příslušné percentilové hodnoty, využitelné u daného parametru pro derivaci normálních limitů (tedy 5. percentil pro termické prahy pro chlad a 95. percentil pro termické prahy pro teplo a vibrační prahy). Výsledky lze použít k derivaci věkově stratifikovaných normativních dat a to při dvou možných způsobech jejich nastavení, tj. na úrovni 5./95. percentilu prezentovaných hodnot a/nebo na úrovni $X \pm 2SD$ (obě hodnoty jsou explicitně uvedeny). Hodnoty termických prahů jsou uvedeny ve °C, vibrační prahy jsou ve vibračních jednotkách (derivovaných z amplitudy pohybu vibrační sondy, uváděné v mikrometrech). Statistické zpracování bylo provedeno pomocí parametrické statistiky (ANOVA, t test, Pearsonův korelační koeficient) u všech parametrů TPT, jednotlivé parametry VPT byly vzhledem k non-normální distribuci zpracovány pomocí statistiky neparametrické (Kruskal-Wallis ANOVA, test Kolmogorov-Smirnov, Spearmanův korelační koeficient).

2a Souhrnné výsledky (muži + ženy)

	20–40				40–60				60+				Srovnání věkových skupin (p)	Korelace s věkem		Srovnání pohlaví (20–60+) (p)
	průměr (X)	SD	X ± 2SD	5./95.percentil	průměr (X)	SD	X ± 2SD	5./95.percentil	průměr (X)	SD	X ± 2SD	5./95.percentil		r	p	
TPT																
CS: limity NR	29,9	1,3	27,4	27,2	29,1	1,6	25,9	25,8	27,1	2,6	21,9	23,5	< 0,001	-0,4166	< 0,001	0,03
CS: limity R	29,8	1,3	27,2	26,8	28,6	1,7	25,1	25,5	27,0	2,4	22,2	23,1	0,001	-0,4265	< 0,001	0,01
CS: úrovně	30,9	0,9	29,1	29,7	30,0	1,6	26,8	26,8	28,6	2,0	24,5	24,4	0,002	-0,2795	0,008	0,02
WS: limity NR	36,7	1,7	40,2	40,0	38,5	2,7	43,9	42,6	42,0	2,6	47,1	45,4	< 0,001	0,5122	< 0,001	0,02
WS: limity R	37,8	2,1	41,9	40,9	39,3	3,0	45,3	44,9	42,7	3,5	49,8	47,6	< 0,001	0,3298	0,002	0,01
WS: úrovně	36,0	1,7	39,5	38,5	37,0	2,8	42,6	41,2	41,3	3,3	47,9	45,9	< 0,001	0,3785	< 0,001	0,04
VPT																
VPT: limity	2,7	1,7	7,3	6,3	5,7	3,8	16,4	13,1	19,0	16,2	79,6	50,0	< 0,001	0,6410	< 0,001	< 0,05
VPT: úrovně	1,7	1,5	6,7	5,1	4,7	3,9	17,5	12,1	13,9	11,2	54,7	33,0	< 0,001	0,6837	< 0,001	< 0,05

2b Muži

	20–40				40–60				60+				Srovnání věkových skupin (p)
	průměr (X)	SD	X ± 2SD	5./95.percentil	průměr (X)	SD	X ± 2SD	5./95.percentil	průměr (X)	SD	X ± 2SD	5./95.percentil	
TPT													
CS: limity NR	29,3	1,5	26,3	26,8	28,7	1,6	25,5	25,7	27,0	2,1	22,8	24,7	0,002
CS: limity R	29,2	1,6	26,1	26,3	28,2	1,7	24,8	25,6	26,7	2,6	21,6	22,7	0,039
CS: úrovně	30,5	1,0	28,4	28,8	29,7	1,6	26,4	26,7	28,8	2,1	24,6	25,1	0,132
WS: limity NR	36,9	2,0	40,8	40,2	39,8	2,6	44,9	42,6	41,7	2,2	46,2	45,4	< 0,001
WS: limity R	38,1	1,9	41,8	40,4	40,5	3,1	46,7	45,6	42,9	3,4	49,7	47,6	< 0,001
WS: úrovně	35,9	1,5	38,8	38,3	38,2	2,7	43,5	42,0	41,6	2,8	47,2	45,9	< 0,001
VPT													
VPT: limity	3,4	1,8	9,2	6,0	6,5	3,6	16,8	12,5	22,5	20,0	123,5	50,3	0,003
VPT: úrovně	2,4	1,7	9,7	5,3	5,5	3,9	17,5	12,6	14,0	11,3	69,3	29,8	0,003

PŘÍSTROJOVĚ ASISTOVANÉ KVANTITATIVNÍ TESTOVÁNÍ SENZITIVITY – NORMATIVNÍ DATA

Zc (pokračování)	Ženy												Srovnání věkových skupin (p)
	20–40				40–60				60+				
	průměr (X)	SD	X ± 2SD	5./95. percentil	průměr (X)	SD	X ± 2SD	5./95. percentil	průměr (X)	SD	X ± 2SD	5./95. percentil	
TPT													
CS: limity NR	30,4	0,6	29,1	29,3	29,5	1,5	26,6	26,4	27,3	3,1	21,1	22,4	0,007
CS: limity R	30,3	0,6	29,1	29,1	29,1	1,6	25,8	25,9	27,3	2,1	23,1	24,8	0,002
CS: úrovně	31,3	0,4	30,4	30,6	30,4	1,5	27,4	27,4	28,2	1,9	24,4	25,2	0,006
WS: limity NR	36,6	1,5	39,5	38,7	37,0	2,1	41,2	41,9	42,4	2,9	48,2	45,8	< 0,001
WS: limity R	37,6	2,2	42,0	40,9	37,8	2,1	42,0	42,8	42,6	3,6	49,9	47,9	0,04
WS: úrovně	36,2	1,9	40,1	38,9	35,6	2,2	40,0	40,0	41,0	3,8	48,6	46,0	< 0,001
VPT													
VPT: limity	2,1	1,4	4,6	4,0	5,0	3,8	14,4	13,2	16,1	11,2	48,7	33,6	< 0,001
VPT: úrovně	1,7	0,6	3,2	2,0	3,9	3,7	14,9	11,1	13,8	11,1	40,5	33,4	< 0,001

QST – kvantitativní testování senzitivity (Quantitative Sensory Testing), TPT – termický práh (Thermal Perception Threshold), VPT – vibrační práh (Vibration Perception Threshold), CS – percepce chladu (Cold Sensation), WS – percepce tepla (Warm Sensation), R – randomizovaná varianta testu, NR – nerandomizovaná varianta testu, SD – směrodatná odchylka (Standard Deviation), X – průměr

p = 0,002). V prostřední a nejstarší kategorii tak vždy tři jedinci vykazovali určitou poruchu schopnosti diskriminace tepelných modalit (obvykle se jednalo o nesprávné hodnocení některého chladného podnětu jako teplého či horkého). V každé z obou skupin se tento náález vyskytl u dvou jedinců jen ojediněle (chybně určená modalita jednoho či dvou pod-

nětů) a jeden jedinec z každé skupiny určil chybně modalitu tří až čtyř z 10 aplikovaných podnětů. Odvodíme-li pro každou z věkových podskupin normu maximálního přípustného počtu nesprávně hodnocených podnětů na základě 5. percentilu počtu podnětů se správně určenou modalitou v dané věkové skupině, pak v nejmladší věkové kategorii je v rámci normy

nutné správné určení modalit všech 10 podnětů aplikovaných v randomizované variantě testu Limity, v prostřední věkové skupině (40–60) jsou přípustné maximálně dva a v nejstarší skupině (60+) maximálně tři podněty s nesprávně určenou modalitou (data neuvedena).

Spolupráci vyšetřovaných subjektů lze ve všech případech hodnotit jako uspo-

Tab. 3. Variabilita odpovědí při stanovení jednotlivých termických (TPT) a vibračních (VPT) prahů metodou Limity, vyjádřená formou intraindividuálního variačního koeficientu a odrážející spolehlivost testu: souhrnná data u jednotlivých testů a zhodnocení vlivu věku a výšky senzitivního prahu na tento parametr. S ohledem na non-normální distribuci dat bylo zpracování provedeno pomocí neparametrických statistických testů.

	CV: souhrnná data (20–60+)			Srovnání věkových skupin p	Korelace s věkem		Korelace s výškou prahu	
	medián	5. percentil	95. percentil		r	p	r	p
CV: TPT								
CS: limity NR	0,15	0,00	1,20	< 0,001	0,434	< 0,001	-0,551	< 0,001
CS: limity R	0,20	0,00	1,39	0,08	0,236	0,02	-0,560	< 0,001
WS: limity NR	0,20	0,00	3,01	< 0,001	0,339	0,001	0,453	< 0,001
WS: limity R	0,20	0,07	3,44	0,009	0,250	0,02	0,466	< 0,001
CV: VPT								
VPT: limity	0,33	0,02	37,9	< 0,001	0,525	< 0,001	0,813	< 0,001

QST – kvantitativní testování senzitivity (Quantitative Sensory Testing), TPT – termický práh (Thermal Perception Threshold), VPT – vibrační práh (Vibration Perception Threshold), CS – percepce chladu (Cold Sensation), WS – percepce tepla (Warm Sensation), R – randomizovaná varianta testu, NR – nerandomizovaná varianta testu, SD – směrodatná odchylka (Standard Deviation), X – průměr, CV – variační koeficient (Coefficient of Variation)

kojivou. Spolehlivost výsledků v metodě Limity odráží především variabilita odpovědí na jednotlivé aplikované podněty vyjádřená formou variačního koeficientu. Sumarizace těchto hodnot je uvedena v tab. 3. Variabilita odpovědí při vyšetření TPT i VPT narůstala s výškou termického/vibračního prahu a méně významně také s věkem vyšetřených pacientů (tab. 3). Rozdíly variability TPT ani VPT mezi muži a ženami nebyly v žádném z hodnocených testů statisticky významné ($p > 0,10$).

Variabilita odpovědí byla mírně vyšší v testech pro teplo oproti testům pro chlad ($p = 0,002$ pro nerandomizovanou variantu metody Limity a $0,07$ pro variantu randomizovanou) a současně vyšší v randomizovaných variantách testů oproti variantám nerandomizovaným ($p = 0,002$ v testech pro chlad, v testech pro teplo byl v tomto směru pouze naznačen statisticky nevýznamný trend).

Diskuze

Prezentovaný článek předkládá normativní data pro klíčové laboratorní metody využívané v diagnostice senzitivních neuropatií a neuropatické bolesti, tj. pro přístrojově asistované metody kvantitativního testování vibračního a termického čítí, derivovaná pro českou populaci na reprezentativním souboru zdravých dobrovolníků.

Naše studie prokázala, že obě hodnocené metody jsou bezpečné a dobře tolerované. Tyto zkušenosti jsou v souladu s výsledky jiných publikovaných prací využívajících popisované metody [3,4,6] a opravňují bezproblémové zařazení obou zmíněných metod do diagnostického algoritmu senzitivních neuropatií.

Srovnání námi navrhovaných norem pro vyšetření TPT a VPT v rámci QST s jinými publikovanými soubory je komplikováno skutečností, že existuje jen málo prací poskytujících validní normativní data pro tyto parametry. Největší recentně publikovaná německá multicentrická studie zaměřená na normativní data QST včetně přístrojově asistovaného stanovení termických prahů [3,4] poskytuje nálezy zhruba dvojnásobného počtu zdravých kontrol, normativní data jsou však pouze částečně věkově stratifikována (do 40 let a nad 40 let), a to navzdory skutečnosti, že tato studie prokazuje signifikantní věkově podmíněné změny všech QST parametrů (s výjimkou testů mecha-

nické bodové bolesti) [3]. Dolní normální limit pro chlad je v této studii u žen do 40 let $26\text{ }^{\circ}\text{C}$, u žen nad 40 let $23,2\text{ }^{\circ}\text{C}$, u mužů pak do 40 let $24,3\text{ }^{\circ}\text{C}$ a nad 40 let dokonce $18,4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Horní normální limit pro teplo je u žen do 40 let $41,3\text{ }^{\circ}\text{C}$, nad 40 let $43,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ a u mužů do 40 let $44,2\text{ }^{\circ}\text{C}$ a nad 40 let $48,7\text{ }^{\circ}\text{C}$ [3]. Tyto hodnoty jsou v podstatě srovnatelné s naším souborem, nicméně podle našich zkušeností by byly málo senzitivní v prostřední věkové skupině (40–60 let), kde je senzitivita pro obě tepelné modalit u většiny vyšetřených jedinců významně lepší než navrhovaný normální limit. V obecné rovině jsou nicméně naše nálezy srovnatelné s prací Rolkeho et al, což opět verifikuje správnost použité metodiky při vyšetření TPT v rámci QST v našem souboru a umožňuje využití obou typů normativních dat, přičemž náš soubor poskytuje navíc oproti práci Rolkeho et al [3] výhodu exaktnější věkové stratifikace norem, a je tedy pro účely rutinního testování i klinických studií výhodnější zejména pro jedince v nejčastěji testovaných věkových skupinách 40–60 let a 60+.

Určitou limitaci naší studie představuje fakt, že počet zdravých kontrol v nejstarší věkové skupině není vysoký, a to především v důsledku obecně nízkého počtu zcela „zdravých“ jedinců v této věkové kategorii. S maximální pravděpodobností se však tento nedostatek týká i dalších publikovaných prací: v multicentrické studii Rolkeho et al [3] je průměrný věk $38,4 \pm 12,9$ let, tedy výrazně nižší než v našem souboru (průměrný věk $48,2 \pm 12,5$ let). Z této věkové distribuce lze usuzovat, že zastoupení jedinců nejstarší věkové kategorie je v Rolkeho souboru také výrazně limitováno, pravděpodobně ze stejných důvodů, jako je tomu v naší studii. Další rozšíření nejstarší věkové podskupiny souboru zdravých kontrol je tak jedním z významných perspektivních cílů naší práce.

Pro přístrojově asistované stanovení vibračního prahu existuje v publikované literatuře ještě méně validních studií zaměřených na nálezy u zdravých dobrovolníků, než je tomu v případě čítí termického. Srovnatelnost těchto nálezů mezi publikovanými studiemi a využitelnost normativních dat je dále komplikována skutečností, že jednotlivé dostupné přístroje určené pro kvantitativní testování vibračního čítí se vzájemně významně liší nastá-

vením charakteristik aplikovaných podnětů (např. frekvencí vibrací, plochou vibrační sondy, aplikovatelným rozsahem amplitud, lokalizací vibrační sondy a způsobem jejího upevnění apod.) [7]. Naše normy jsou derivovány pro vibrační frekvenci 100 Hz , která je v současnosti nejčastěji užívanou frekvencí v dostupných přístrojích pro QST testování (Medoc, Somedic). Při použití identické vibrační frekvence našli Peters et al [8] ve studii zaměřené na reprodukovatelnost vibračních prahů v souboru 104 zdravých dobrovolníků při vyšetření na dorzu hlavičky I. metatarzu průměrný práh $2,91$ (SD $5,11$). Tyto hodnoty jsou nižší oproti nálezům prezentované studie, a to zřejmě především z důvodu odlišné lokalizace vyšetření (které je v naší studii prováděno na plantární ploše hlaviček II. a III. metatarzu) a pravděpodobně i nižšího průměrného věku souboru dobrovolníků zařazených do jeho studie ($44 \pm 14,2$ let oproti $53,2 \pm 12,3$ v našem souboru). Nálezy studie Peterse et al [8] nicméně dobře dokumentují non-normální distribuci hodnot vibračních prahů zjištěnou i v našem souboru. Další práce [6] uvádí na dorzu nohy prahy dokonce ještě nižší než studie Peterse et al [8], hodnoty však byly derivovány pro frekvenci 120 Hz , a nejsou tedy s našimi nálezy dobře srovnatelné nejen z důvodu odlišné lokalizace vyšetření, ale i lišících se klíčových charakteristik aplikovaných podnětů. Při lokalizaci vyšetření v blízkosti oblasti využívané i v naší studii (tj. na plantárních plochách hlaviček metatarzů) prokázal Perry [9] při užití identické vibrační frekvence 100 Hz hodnoty prahů naopak vyšší, než bylo zjištěno v naší studii. Tato práce [9] však používá odlišné upevnění vibrační sondy k vyšetřované lokalitě. V jeho studii je sonda položena na plantární plochu nohy, čímž vyvíjí na plantu konstantní tlak, který je v případě potřeby regulovatelný, zatímco v případě naší studie je noha na vibrační sondě volně položena, což může vést k větší variabilitě hodnot vibračních prahů, neboť tlak, který noha na vibrační sondu vyvíjí, může být jednou z proměnných s potenciálním vlivem na výši prahu. Námi užívané přístrojové vybavení nicméně neumožňuje jiný způsob kontaktu s vibrační sondou než používaný. Navíc je otázkou, nakolik je tento faktor klinicky významný, protože při lepším upevnění vibrační sondy (jako je užíváno v Perryho

studii oproti studii naší) by bylo možno očekávat v obdobné lokalizaci hodnoty prahů spíše nižší ve srovnání s našimi nálezy, což je v rozporu s výsledky Perryho studie [9]. Podobná práce [10] využívající způsob kontaktu s vibrační sondou identický s Perryho studií [9] navíc prokázala v malé skupině starších pacientů s průměrným věkem 62 let v oblasti plantární plochy palce nohy hodnoty v podstatě velmi blízké našim nálezům v nejstarší věkové skupině (průměrný vibrační práh 22 μ m ve srovnání s 19 μ m v naší skupině 60+). V souhrnu jsou tedy publikované studie zaměřené na přístrojově asistované stanovení vibračních prahů velmi variabilní a vzájemně prakticky nesrovnatelné. Autorům práce není známa studie využívající identické přístrojové vybavení jako v aktuálně prezentované práci – naše nálezy tak můžeme srovnat prakticky pouze s normami poskytovanými výrobcem námi užívaného vibrametru (Medoc Ltd., RamatYishai, Izrael). Pro identickou lokalizaci jsou tyto normy velmi blízké našim nálezům, což verifikuje správnost použité metodiky při vyšetření VPT a umožňuje v klinické praxi využití obou typů normativních dat.

Nálezy obou hodnocených metod ukazují signifikantní věkově podmíněné změny. Tyto výsledky jsou v souladu s nálezy velkého souboru zdravých dobrovolníků, recentně publikovanými pro TPT [3]. Identický významný vliv věku na hodnoty VPT a přesvědčivý nárůst vibračních prahů zejména ve starších věkových skupinách je jednoznačně dokumentován také prakticky všemi výše zmíněnými studii využívajícími přístrojově asistované vyšetření vibračního čítí na DKK [6,8,9]. Tyto nálezy odpovídají obecně známému věkově podmíněnému poklesu citivosti pro většinu senzitivních modalit [3] včetně vibračního čítí při vyšetření kalibrovanou ladičkou [3,11]. Vzhledem k prokazatelnému statisticky významnému ovlivnění výsledků věkem jsou prezentovaná data pro všechny metody věkově stratifikována, což umožňuje exaktnější interpretaci výsledků.

Vedle ovlivnění věkem prokazují naše výsledky také určité, i když méně významné rozdíly nálezů mezi muži a ženami. Rolke et al [3] prokázali statisticky významně lepší senzitivitu pro tepelné podněty u žen pouze při vyšetření dolních končetin, ale nikoli v jiných lokaliza-

cích (obličej, horní končetina) a jimi doporučená normativní data jsou odlišná pro muže a ženy. Existující, i když statisticky málo významné rozdíly termické senzitivity mezi oběma pohlavími prokazují i další publikované studie [5,12]. Stejně tak pro vyšetření vibračního čítí s použitím kalibrované ladičky [11] i v rámci přístrojově asistovaných metod [6] jsou prokázány rozdíly vibrační percepce mezi muži a ženami (s obecně nižšími VPT u žen) a jsou doporučena normativní data specifická pro jednotlivá pohlaví. V našem souboru byl rozdíl mezi muži a ženami u všech QST parametrů zřetelný pouze při souhrnném srovnání celého souboru zdravých kontrol, zatímco v jednotlivých věkových podskupinách byly rozdíly v naprosté většině případů statisticky nevýznamné, což v souladu s dalšími publikovanými studii svědčí pro existující, i když ve srovnání s vlivem věku méně významné rozdíly QST parametrů podmíněné pohlavím vyšetřených jedinců. S ohledem na tuto skutečnost doporučují autoři využití odlišných norem pro mužskou a ženskou populaci pro vyšetření TPT i VPT v rámci QST a prezentovaná data jsou koncipována tak, aby umožnila derivaci specifických normativních dat pro obě pohlaví.

Obecně umožňují prezentovaná data derivaci norem s využitím dvou statistických postupů nejčastěji využívaných pro tento účel tj. pomocí percentilů a/nebo průměrů a směrodatných odchylek. Hodnoty TPT našim souborem nevykazují odchylky od normální distribuce dat, což opravňuje možnost použití obou zmíněných způsobů stanovení normálních limitů. Hodnoty VPT vykazovaly log-normální distribuci, pro derivaci normativních dat pomocí průměrů a směrodatných odchylek byla proto data logaritmicke transformována a normy byly odvozeny z takto upravených dat. Pro obě metody jsou nicméně normy odvozené oběma způsoby výpočtu poměrně blízké a výběr konkrétního typu hodnot závisí na charakteru studie, pro jejíž účely budou normy využity. Obecně přísnější normy s vyšší specificitou, ale nižší senzitivitou jsou vhodnější pro studie s nutností exaktní definice abnormity pro účely klinických či vědeckých studií. Naopak méně striktní normativní data s vyšší senzitivitou, ale zřejmě nižší specificitou jsou výhodnější např. pro účel screeningového populačního testování.

V rámci QST vyšetření vykazuje randomizovaná varianta testu Limity vyšší hodnoty termických prahů pro teplo (a nižší hodnoty pro chlad) oproti variantě nerandomizované, což je podmíněno delším reakčním časem z důvodu současného rozhodování o tepelné modalitě podnětu. Patrný je také trend k nižším hodnotám termických prahů pro teplo (a vyšším pro chlad) u tzv. testů konstantního stimulu (Úrovně) oproti testům reakčního času (Limity), což je charakteristický rozdíl mezi oběma typy testů, opakovaně prokázán již v předchozích studiích autorů i dalších publikacích, zaměřených na tuto problematiku [5,13–15]. Příčinou uvedeného jevu je závislost hodnoty prahu zjištěného metodou Limity na reakční době, což u metod konstantního stimulu odpadá. Identické rozdíly prokazuje naše studie i pro čítí vibrační. Z těchto důvodů je při výběru normativních dat vždy nutno zohlednit použitý testovací algoritmus. Naše studie proto poskytuje normativní data pro škálu nejčastěji užívaných typů testů, a to pro obě tepelné modalit i pro čítí vibrační.

Vedle výšky termického prahu může být při vyšetření TPT abnormálním nálezem také porucha diskriminace tepelných modalit. Nejčastější abnormitou v tomto smyslu je nesprávné vnímání chladných podnětů jako teplých či horkých. Jedná se poměrně častou abnormitou při QST vyšetření – Maier et al [16] popisují v rozsáhlé německé multicentrické studii výskyt tohoto jevu u 18 % ze souboru 1 236 pacientů s neuropatickou bolestí různé etiologie – a u části pacientů může být tento nález jedinou abnormitou zachycenou v rámci QST vyšetření. Vzhledem k tomuto faktu poskytuje naše studie i věkově stratifikované normální limity počtu podnětů s nesprávně detekovanou modalitou. Tyto limity jsou blízké výsledkům studie Rolkeho et al [3], což opět verifikuje správnost použité metodiky a koherenci obou studií. Obdobně jako v případě termických prahů jsou však v naší práci normy exaktněji věkově stratifikovány. To podle zkušeností autorů lépe odráží vyšší výskyt této abnormity u velkého procenta jedinců nad 60 let a signifikantně méně častý výskyt u pacientů mezi 40 a 60 rokem věku, což je v našem souboru zohledněno i při tvorbě normativních dat.

Spolehlivost stanovených termických i vibračních prahů odráží v testech reakčního času (Limity) zejména variabilita odpovědi na jednotlivé aplikované podněty. Yarnitski et al [17] našli malou variabilitu čtyř po sobě aplikovaných podnětů u zdravých, větší u nemocných, ale podstatně vyšší u „feigners“, tedy jedinců, jejichž úkolem bylo předstírat hypestezii.

V naší studii byla ve všech hodnocených testech termického i vibračního čítí variabilita obecně nízká, což potvrzuje vysokou spolehlivost stanovených hodnot termických i vibračních prahů. V souladu s prací Yarnitskiho et al [17] prokazují naše nálezy, že variabilita odpovědi prokazatelně závisí nejen na testované modalitě a použitém algoritmu testování, ale navíc jednoznačně koreluje s výškou prahu i věkem vyšetřených jedinců. Z těchto výsledků vyplývá, jak je nutné zohlednit možnou nižší spolehlivost stanovení senzitivních prahů u pacientů s abnormálním QST nálezem a je třeba na ni brát zřetel mimo jiné při hodnocení případných změn výšky prahu při opakovaných vyšetřeních identického jedince např. z důvodu longitudinálního sledování. Zejména méně významné změny výšky prahu nemusejí u těchto pacientů dokumentovat případný vývoj klinického nálezu, ale mohou odrážet určité kolísání výšky prahu z důvodu nižší spolehlivosti jeho stanovení u pacientů s abnormálním QST nálezem. Při hodnocení změn výšky prahu v rámci longitudinálního sledování je proto vhodné zohlednit limitní normální hodnoty rozdílů termických prahů při opakovaných vyšetřeních, zohledňující použitý algoritmus testování i testovanou modalitu, které již byly publikovány [18]. Obdobně vyšší variabilita hodnot senzitivních prahů ve vyšších věkových kategoriích může indikovat nižší spolehlivost QST vyšetření u starších jedinců, která však nebyla v předchozích studiích autorů potvrzena [19] a není popisována ani v rámci recentní rozsáhlé multicentrické studie zaměřené na kvantitativní testování senzitivity v širším slova smyslu [3].

Závěry

Prezentovaná studie poskytuje validní normativní data pro vyšetření termického a vibračního čítí v rámci kvantitativního testování senzitivity derivovaná pomocí dvou statistických postupů nejčastěji užívaných pro tento účel.

Obě hodnocené metody vykazují signifikantní věkově podmíněné změny a určité rozdíly mezi muži a ženami. Uvedená normativní data jsou z těchto důvodů věkově stratifikována a vytvořena odděleně pro mužskou a ženskou populaci.

Termické a vibrační prahy zjišťované v rámci QST vyšetření stejně jako jejich variabilita se významně liší mezi jednotlivými typy testů, a pro jejich hodnocení je tedy nutno používat normativní data specificky vytvořená pro daný algoritmus testování. Prezentovaná studie proto poskytuje normy pro nejčastěji užívané typy QST testů a navíc také limitní hodnoty pro diskriminaci tepelných modalit, jejichž porucha může být jedinou abnormitou testování TPT.

Použité zkratky

QST kvantitativní testování senzitivity (Quantitative Sensory Testing)

TPT termický práh (Thermal Perception Threshold)

VPT vibrační práh (Vibration Perception Threshold)

NL normální limit

CS percepce chladu (Cold Sensation)

WS percepce tepla (Warm Sensation)

VP vibrační čítí (Vibratory Perception)

R randomizovaná varianta testu

NR nerandomizovaná varianta testu

Literatura

1. Cruccu G, Sommer C, Anand P, Attal N, Baron R, Garcia-Larrea L et al. EFNS guidelines on neuropathic pain assessment: revised 2009. *Eur J Neurol* 2010; 17(8): 1010–1018.
2. Haanpää M, Attal N, Backonja M, Baron R, Bennett M, Bouhassira D et al. NeuPSIG guidelines on neuropathic pain assessment. *Pain* 2011; 152(1): 14–27.
3. Rolke R, Baron R, Maier C, Tölle TR, Treede RD, Beyer A et al. Quantitative sensory testing in the German Research Network on Neuropathic Pain (DFNS): standardized protocol and reference values. *Pain* 2006; 123(3): 231–243.
4. Rolke R, Magerl W, Campbell KA, Schalber C, Caspari S, Birklein F et al. Quantitative sensory testing: a comprehensive protocol for clinical trials. *Eur J Pain* 2006; 10(1): 77–88.

5. Moravcová E, Bednarík J. Počítačem asistované stanovení termického prahu. *Cesk Slov Neurol N* 2003; 66(99(4)): 263–269.

6. Hilz MJ, Axelrod FB, Hermann K, Haertl U, Duetsch M, Neundörfer B. Normative values of vibratory perception in 530 children, juveniles and adults aged 3–79 years. *J Neurol Sci* 1998; 159(2): 219–225.

7. Chong PST, Cros DP. AAEM review: quantitative sensory testing equipment and reproducibility studies [online]. Dostupné z: <http://www.aanem.org/getmedia/2621cf05-81e1-416e-b2eb-75282234972a/qst-Techniques.pdf.aspx>.

8. Peters EW, Bienfait HM, de Visser M, de Haan RJ. The reliability of assessment of vibration sense. *Acta Neurol Scand* 2003; 107(4): 293–298.

9. Perry SD. Evaluation of age-related plantar-surface insensitivity and onset age of advanced insensitivity in older adults using vibratory and touch sensation tests. *Neurosci Lett* 2006; 392(1–2): 62–67.

10. Van Deursen RW, Sanchez MM, Derr JA, Becker MB, Ulbrecht JS, Cavanagh PR. Vibration perception threshold testing in patients with diabetic neuropathy: ceiling effects and reliability. *Diabet Med* 2001; 18(6): 469–475.

11. Martina IS, van Koningsveld R, Schmitz PIM, van der Meché FGA, van Doorn PA, for the European Inflammatory Neuropathy Cause and Treatment (INCAT) group. Measuring vibration threshold with a graduated tuning fork in normal aging and in patients with polyneuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1998; 65(5): 743–747.

12. Doeland HJ, Nauta JJ, van Zandbergen JB, van der Eerden HA, van Diemen NG, Bertelsmann FW et al. The relationship of cold and warmth cutaneous sensation to age and gender. *Muscle Nerve* 1989; 12(9): 712–715.

13. Claus D, Hilz MJ, Neundörfer B. Thermal discrimination thresholds: a comparison of different methods. *Acta Neurol Scand* 1990; 81(6): 533–540.

14. Dyck PJ, O'Brien PC, Kosanke JL, Gillen DA, Karnes JL. A 4,2, and 1 stepping algorithm for quick and accurate estimation of cutaneous sensation threshold. *Neurology* 1993; 43: 1508–1512.

15. Dyck PJ, Zimmerman I, Gillen DA, Johnson D, Karnes JL, O'Brien PC. Cool, warm, and heat-pain detection thresholds: testing methods and inferences about anatomic distribution of receptors. *Neurology* 1993; 43(8): 1500–1558.

16. Maier C, Baron R, Tölle TR, Binder A, Birbaumer N, Birklein F et al. Quantitative sensory testing in the German Research Network on Neuropathic Pain (DFNS): somatosensory abnormalities in 1236 patients with different neuropathic pain syndromes. *Pain* 2010; 150(3): 439–450.

17. Yarnitsky D, Sprecher E, Tamir A, Zaslansky R, Hemli JA. Variance of sensory threshold measurements: discrimination of feigners from trustworthy performers. *J Neurol Sci* 1994; 125(2): 189–1996.

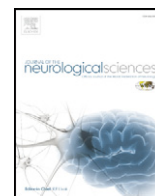
18. Moravcová E, Bednarík J, Svobodník A, Dusek L. Reproducibility of thermal threshold assessment in small-fibre neuropathy patients. *Scripta Medica (Brno)* 2005; 78(3): 177–184.

19. Vlckova-Moravcová E, Bednarík J. Painful sensory neuropathies in the elderly. *Scripta medica (Brno)* 2009; 82(1): 16–24.

13. Bursova S, Dubovy P, Vlckova-Moravcova E, Nemecek M, Klusakova I, Belobradkova J, Bednarik J. Expression of growth-associated protein 43 in the skin nerve fibers of patients with type 2 diabetes mellitus. *J Neurol Sci* 2012d;315(1-2):60-63. doi: 10.1016/j.jns.2011.11.038. IF = 2,243. Počet citací v SCI: 17.

Práce je zaměřena na novou perspektivní možnost využití vyšetření kožní biopsie a to na zobrazení regeneračního potenciálu intraepidermálních tenkých nervových vláken v kožní biopsii pomocí vizualizace growth-associated proteinu 43 (GAP-43). Tento protein je považován za marker regenerujících nervových vláken. V rámci studie byly hodnoceny kožní biopsie v souboru pacientů s časným diabetem mellitem 2. typu a ve skupině zdravých kontrol. Vzorky byly obarveny pomocí protilátek proti běžně užívanému panneuronálnímu markeru protein-genovému-produktu PGP 9.5 (který umožňuje obarvit všechny neuroendokrinní tkáň a tedy všechna intraepidermální nervová vlákna) a současně pomocí protilátek proti GAP-43. Ve skupině zdravých dobrovolníků byla všechna nervová vlákna vizualizovatelná současně pomocí PGP 9.5 i GAP-43. U pacientů s časným diabetem mellitem (a většinou s již vyjádřenou polyneuropatií) byl počet vláken obarvitelný pomocí GAP-43 významně nižší než počet vláken vizualizovatelných pomocí PGP 9.5. Některá vlákna jsou tedy zachovalá (a při běžném hodnocení kožní biopsie by se jevila jako intaktní), ztrácejí však zřejmě svůj regenerační potenciál. Narušení regenerační schopnosti intraepidermálních nervových vláken tak pravděpodobně předchází jejich vlastní ztrátě (reflektované poklesem IENFD). Vizualizace regenerační schopnosti intraepidermálních tenkých nervových vláken je proto potenciálním biomarkerem časně diabetické neuropatie.

Jedná se o vůbec první práci zaměřenou na hodnocení regeneračního potenciálu nervových vláken ve vzorcích kožní biopsie u pacientů s diabetickou neuropatií a jednu z prvních prací využívajících GAP-43 k diagnostice u humánních pacientů (a nikoli u experimentálních zvířat). Hledání markerů časnějšího poškození tenkých vláken v kožní biopsii (předcházejících vlastní ztrátě nervových vláken reflektované poklesem jejich intraepidermální hustoty) je perspektivní oblastí v oblasti výzkumu periferních neuropatií - prezentovaný článek tak prostřednictvím hodnocení regeneračního potenciálu nervových vláken vizualizovaného pomocí GAP-43 představuje jednu prvních možností takové časně diagnostiky.



Expression of growth-associated protein 43 in the skin nerve fibers of patients with type 2 diabetes mellitus

Sarka Bursova^{a,*}, Petr Dubovy^b, Eva Vlckova-Moravcova^a, Martin Nemeč^a, Ilona Klusakova^b, Jana Belobradkova^c, Josef Bednarik^a

^a Department of Neurology, University Hospital Brno and Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic

^b Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic

^c Diabetologic Centre, Department of Internal Medicine and Gastroenterology, University Hospital Brno and Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 August 2011

Received in revised form 4 November 2011

Accepted 30 November 2011

Available online 29 December 2011

Keywords:

Growth-associated protein 43

Protein gene product 9.5

Skin biopsy

Type 2 diabetes mellitus

Diabetic neuropathy

Regeneration

ABSTRACT

The growth-associated protein 43 (GAP-43) is known as a marker of regenerating nerve fibers and their continuous remodeling in the adult human skin. The purpose of this pilot study was to investigate a possible role for GAP-43 in the detection of the early stages of small-fiber neuropathy in patients with type 2 diabetes mellitus (DM2) as compared with a well-established and validated parameter – intra-epidermal nerve fiber density (IENFD) of protein gene product 9.5 (PGP 9.5) immunoreactive intra-epidermal C fibers. In a group of 21 patients with DM2 within three years of diagnosis (13 men, 8 women; mean age 53.9 ± 12.8 ; range 30–74) and a group of 17 healthy volunteers (8 men, 9 women; mean age 55.8 ± 8.5 ; range 45–70 years), skin punch biopsies were taken from a distal calf and double immunostained with both PGP 9.5 and GAP-43. In healthy controls, 96.8% of 629 PGP 9.5 immunoreactive fibers were immunostained with GAP-43; the proportion of PGP 9.5 intra-epidermal nerve fibers immunoreactive for GAP-43 in control subjects ranged from 86.5 to 100%. In DM2 patients, IENFD was significantly lower compared to controls (median, 1.5 vs. 11.2/mm; $p < 0.001$). The proportion of GAP-43 immunoreactive intraepidermal nerve fibers was significantly lower in DM2 patients compared to healthy controls (73.6% of 337 PGP 9.5 positive fibers; $p < 0.001$); ranged from 0 to 98.1%. In conclusion, these results show that impaired regeneration of intra-epidermal C fibers in the early stages of type 2 diabetes mellitus, as indicated by GAP-43, might be a marker of incipient diabetic neuropathy.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Diabetes mellitus type 2 (DM2) is one of the most frequent causes of peripheral neuropathies, including those with predominant involvement of small nerve fibers [1,2]. Skin biopsy is a widely accepted and validated diagnostic tool in the diagnostic work-up for small-fiber neuropathies [3,4]. Reduction of protein gene product 9.5 (PGP9.5) immunoreactive intra-epidermal C fibers expressed as intra-epidermal nerve fiber density (IENFD) is the best validated marker of small-fiber neuropathy, which is generally considered to be an early marker of peripheral nerve impairment [5].

Nevertheless, new diagnostic markers are being tested as possible indicators for even earlier small-fiber involvement in diabetic patients and potential predictors for the development of diabetic neuropathy. Growth-associated protein 43 (GAP-43), which is associated with axonal growth and plasticity [6–9], appears to be one of the most promising markers for this purpose. To our knowledge, little has been

published concerning GAP-43 immunoreactivity in humans under pathological conditions, such as neuropathy [10]. This pilot study therefore addresses possible changes of GAP-43 immunoreactivity in skin nerve structures in the early stages of diabetic peripheral neuropathy and their relation with PGP 9.5 immunostaining, a commonly-used procedure.

2. Patients and methods

2.1. Patients

A group of 21 patients with recent type 2 diabetes mellitus (DM2) (within 3 years of diagnosis) were included in the study (13 men, 8 women; mean age 53.9 ± 12.8 , range 30–74 years; median duration of DM2, 24; range, 1–36 months). Diagnosis of DM2 was established according to WHO criteria [11]. Other conditions or diseases as potential causes of peripheral neuropathies were excluded by medical history and a set of biochemical, haematological and immunological blood tests including thyroid hormones, cholesterol and triglycerides, vitamin B12 and folate levels, serum protein electrophoresis, carbohydrate-deficient transferrin and antinuclear factor.

* Corresponding author at: Department of Neurology, University Hospital Brno and Faculty of Medicine, Masaryk University Brno, Jihlavská 20, 625 00 Brno, Czech Republic. Tel.: +420 532233221; fax: +420 532232249.

E-mail address: bursova@email.cz (S. Bursova).

As a control group, 17 age-matched healthy volunteers with no pain or other positive or negative sensory symptoms, no clinical signs of polyneuropathy, and no diseases or conditions known as possible causes for polyneuropathy (confirmed by a set of laboratory tests mentioned above including normal oral glycaemic tolerance test), were included (8 men, 9 women; mean age 55.8 ± 8.5 , range 45–70 years).

The protocol was approved by the institutional ethics committee of Masaryk University, Brno and informed written consent was obtained from all patients and volunteers before inclusion into the study.

2.2. Skin biopsy

Five-millimeter skin punch biopsies were taken under local anesthesia from a distal calf (approximately 10 cm above lateral malleolus) in all patients and healthy control volunteers. The details of skin specimen removal and further processing have previously been published [12] and follow standard recommendations [3].

Sections of 50- μ m thickness were immunostained with rabbit polyclonal antibodies to human PGP 9.5 (Ultraclone, Wellow, UK; 1:800) or mouse monoclonal antibody to GAP-43 (Abcam, Cambridge, UK; 1:500) as primary antibodies. The immunoreaction was visualized by treatment with affinity-purified TRITC-conjugated goat anti-rabbit or FITC-conjugated goat anti-mouse secondary antibodies (Chemicon International Inc., Temecula, California, USA; 1:100). The control sections were incubated in the absence of the primary antibodies.

For double immunostaining, the sections were incubated with a mixture (1:1) of rabbit polyclonal anti-PGP9.5 (Abcam, Cambridge, UK; 1:500) and mouse monoclonal anti-GAP-43 antibodies (Abcam, Cambridge, UK; 1:500). A mixture (1:1) of affinity-purified TRITC-conjugated goat anti-rabbit and FITC-conjugated goat anti-mouse antibodies (Chemicon International Inc., Temecula, California, USA; both at a final dilution of 1:100) was used for visualization of double immunostaining.

2.3. Microscopy

The immunostained sections were examined and analyzed using a Leica DMLB epifluorescence microscope (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) equipped with appropriate filter combinations. Three non-adjacent sections per patient were evaluated. Immunoreactive nerve fibers crossing the dermo-epidermal junction were counted manually. Epidermal length was accurately measured using an image

analysis system by NIS-Elements AR, Laboratory Imaging s.r.o., Prague, Czech Republic. The average count of PGP 9.5 immunoreactive intra-epidermal nerve fibers per millimeter of epidermal length was calculated and expressed as intra-epidermal nerve fiber density (IENFD). Using the double staining method, the proportion of intra-epidermal PGP 9.5 positive fibers also immunoreactive for GAP-43 was evaluated.

2.4. Statistics

Robust summary statistics and the variance ratio F test were used to summarize the distribution of the data. Both the PGP 9.5 and GAP-43 fiber count values showed a non-normal distribution of the data. Non-parametrical statistics were therefore used for further analysis of the data. The Mann–Whitney test was used to compare PGP 9.5 nerve fiber counts between the controls and the DM2 group of patients. Comparison of the proportion of GAP-43 positive nerve fibers as well as numbers of individuals with normal IENFD values was performed using the χ^2 test. A value of $\alpha < 0.05$ was taken as the universal limit for statistical significance.

3. Results

3.1. PGP 9.5 – immunoreactive intraepidermal nerve fiber counts

In the healthy controls, a considerable number of PGP 9.5 immunoreactive nerve fibers were found in both the epidermis and subepidermal area (median IENFD 11.2/mm, range 4.0–14.2/mm). In two healthy individuals from this control group, the IENFD value was slightly reduced (4.0/mm; 5.4/mm); one of these was a 70-year-old man, so the fall was probably due to the well-known age-related decrease in intra-epidermal nerve fiber counts. In all the other healthy subjects, the IENFD values were above our normal limits (previously published in detail [12]).

In DM2 patients, IENFD was evaluated as normal in 6 cases, slightly reduced in 3 cases (4.3/mm; 3.4/mm; 3.4/mm) and markedly reduced in 6 cases (0.5/mm; 0.6/mm; 0.8/mm; 0.8/mm; 1.5/mm; 1.8/mm) (Table 1). PGP 9.5 immunoreactive fibers were completely absent in the epidermis in another 6 DM2 patients. In general, IENFD values were significantly lower in DM2 patients (median 1.5/mm; range 0.0–14.5/mm) compared to healthy controls (median 11.2/mm; range 4.0–14.2/mm; $p < 0.001$).

Table 1

Comparison of selected demographic and skin biopsy characteristics in DM2 patients and healthy controls.

	DM2 patients	Controls	Statistical significance (p value)
No	21	17	
Male	13	8	
Age (mean \pm SD)	53.9 ± 12.8	55.8 ± 8.5	n.s.
Duration of DM2 in months; median (range)	24 (1–36)		
PGP 9.5 IENF/mm; median (range)	1.5/mm (0.0 – 14.5/mm)	11.2/mm (4.0 – 14.2/mm)	$p < 0.001$
Proportion of GAP-43 positive fibers (in %) – pooled data from all PGP 9.5 positive fibers	73.6*	96.8**	
Proportion of GAP-43 positive fibers (in %) in individuals; median (range)	70.8 (0.0 – 98.1)	97.7 (86.5 – 100)	$p < 0.001$
No (proportion in %) of individuals with normal PGP 9.5 IENFD values	6 (28.6%)	15 (88.2%)	$p < 0.001$
Proportion of GAP-43 positive fibers (in %) in individuals with normal PGP 9.5 IENFD; median (range)	83.8 (75.8 – 98.1)	97.7 (86.5 – 100)	$p < 0.001$

* Pooled data from 337 PGP 9.5 positive fibers.

** Pooled data from 629 PGP 9.5 positive fibers.

DM2	Type 2 diabetes mellitus
PGP 9.5	Protein gene product 9.5
GAP-43	Growth associated protein – 43
IENF	Intra-epidermal nerve fibers
IENFD	Intra-epidermal nerve fiber density
n.s.	non-significant ($p > 0.05$)
SD	Standard deviation

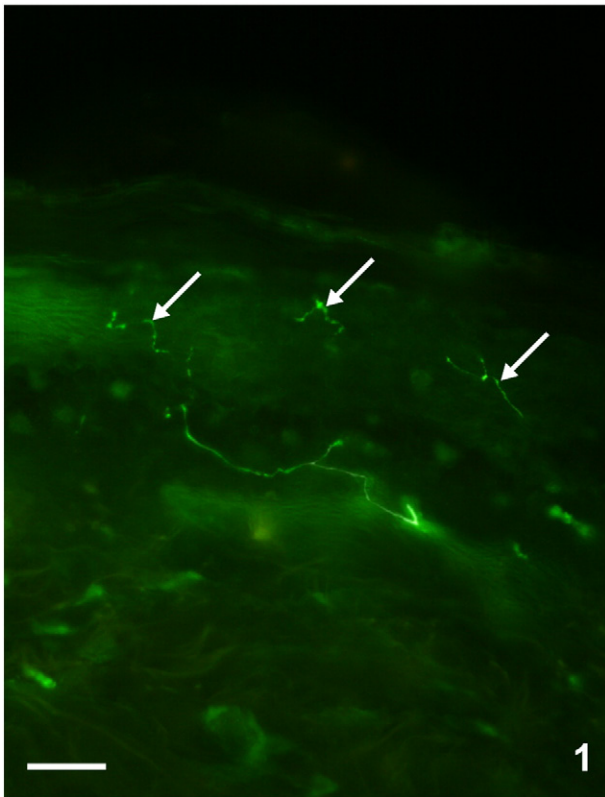
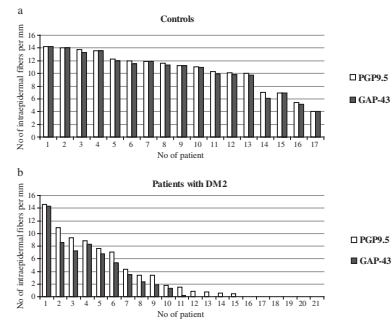


Fig. 1. Growth-associated protein 43 (GAP-43) immunoreactive nerve structures in the epidermis and superficial dermis of skin sample of healthy volunteer. Scale bar = 50 μ m.

3.2. Double immunostaining of PGP 9.5 and GAP-43

In healthy controls, GAP-43 immunostaining was present in the nerve structures of the epidermis and papillary dermis (Fig. 1). Most of intra-epidermal nerve fibers immunoreactive for PGP 9.5 also displayed immunostaining for GAP-43 (96.8% of 629 PGP 9.5-positive fibers) (Fig. 2). The proportion of GAP-43 positivity in control individuals ranged from 86.5 to 100% (median, 97.7%) (Graph 1a).

In DM2 patients with total loss of PGP 9.5 positive fibers, GAP-43 was also completely absent in the epidermis, while it could occasionally



Graph 1. Skin biopsy characteristics in healthy volunteers (a) and patients with DM2 (b).

be seen in the superficial dermis. In DM2 patients with preserved PGP 9.5 intra-epidermal nerve fibers, the proportion of GAP-43 immunoreactive nerve fibers was significantly lower compared to healthy controls (73.6% of 337 PGP 9.5 positive fibers; $p < 0.001$), ranged from 0 to 98.1% (Graph 1b). Even in DM2 patients with normal IENFD, the percentage of GAP-43 positive immunoreactive nerve fibers was significantly lower compared to healthy controls with normal nerve fiber counts ($p < 0.001$) (Table 1).

4. Discussion

This study provides a new insight into the regeneration potential of skin nerve fibers in diabetes mellitus type 2 patients. Significant reduction of GAP-43 immunoreactive nerve fibers in comparison with healthy individuals shows that regeneration potential is reduced in diabetic patients and its reduction appears to precede a decrease in PGP 9.5 immunoreactive fibers.

PGP 9.5 immunoreactive IENFD is currently widely used for the assessment of small nerve fiber involvement in diabetic neuropathy. However, IENFD values can occasionally be normal in very early stages of its development. Diagnostic markers more sensitive for the detection of such very early stages of peripheral nerve involvement are therefore being actively sought. Impaired regeneration is one factor thought to play an important role in experimental studies [13,14]. GAP-43 is referred to as a marker of regenerating nerve fibers [7,15] and their continuous remodeling in experimental [16] as well as human [6] studies. As previously reported [6,7], GAP-43 immunostained fibers were colocalized with PGP 9.5 immunoreactive nerve structures in the

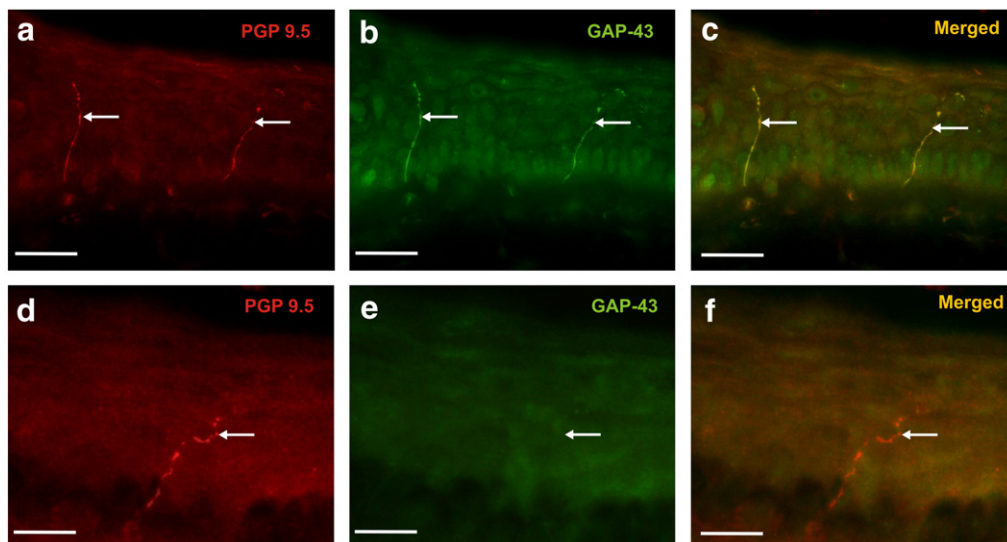


Fig. 2. Double immunostaining of skin biopsy samples with PGP 9.5 (a, d) and GAP-43 (b, e) antibodies and merged figures (c, f) in healthy control (a, b, c) and DM2 patient (d, e, f). The proportion of PGP 9.5 intraepidermal nerve fibers immunoreactive for GAP-43 was significantly lower in DM2 patients compared to healthy controls. Note that PGP 9.5 immunoreactive axons in the epidermis and papillary dermis were colocalized with GAP-43 immunostaining. Scale bars for a–c = 50 μ m; for d–f = 20 μ m.

epidermis and papillary dermis in our healthy controls. In addition, quantitative evaluation revealed that the major proportion of intra-epidermal nerve fibers (PGP 9.5) also displayed immunoreactivity to GAP-43 in the skin samples of healthy controls. Similarly, Verzé et al. [7] found equal numbers of PGP 9.5 and GAP-43 immunostained nerve fibers in the human epidermis. Recently, Ragé et al. [15] have published a study on regeneration of dermal nerve fibers using GAP-43 after topical application of capsaicin, where dermal GAP-43 immunoreactivity anticipated the regeneration of PGP 9.5 immunostained intra-epidermal nerve fibers. In their study, however, no GAP-43 immunoreactivity in the epidermis was found, in contrast to the results of Verzé and co-workers [7] and our findings.

In our study, the proportion of GAP-43 immunoreactive nerve fibers was significantly lower in DM2 patients compared to healthy controls. Even in DM2 patients with normal IENFD, the percentage of GAP-43 immunoreactive nerve fibers was significantly lower compared to healthy controls. These results suggest that reduction of GAP-43 expression in intra-epidermal nerve fibers may precede the loss of nerve fibers. Enlargement of our cohort and its prospective observation is, however, required to confirm this assumption and to establish the normal limit for the proportion of GAP-43 immunoreactive intraepidermal nerve fibers. The expression of GAP-43 may reflect the regenerative and remodeling capacity of the axons in human adult skin [6,7]. Therefore, our findings of decreased GAP-43 expression in intra-epidermal nerve fibers with preserved PGP 9.5 immunoreactivity of patients at early stages of DM2 might indicate a reduced remodeling potential of intra-epidermal nerve fibers that may precede their loss.

In conclusion, our results suggest that GAP-43 might be a sensitive marker of impaired regeneration in early stages of type 2 diabetes mellitus. Reduced expression of GAP-43 in skin nerve structures appears to be an initial sign in the development of diabetic neuropathy preceding the loss of intra- or subepidermal nerve structures in DM2 patients.

Acknowledgements

The authors would like to thank Ms. Dana Kutějová for her skilful technical assistance. The study was supported by a project of the

Internal Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic (grant No. NS9667-4).

References

- [1] Bednarik J, Vlckova-Moravcova E, Bursova S, Belobradkova J, Dusek L, Sommer C. Etiology of small-fiber neuropathy. *J Peripher Nerv Syst* 2009;14:177–83.
- [2] Lacomis D. Small-fiber neuropathy. *Muscle Nerve* 2002;26:173–88.
- [3] Lauria G, Hsieh ST, Johansson O, Kennedy WR, Leger JM, Mellgren SI, et al. European Federation of Neurological Societies/Peripheral Nerve Society Guideline on the use of skin biopsy in the diagnosis of small fiber neuropathy. Report of a joint task force of the European Federation of Neurological Societies and the Peripheral Nerve Society. *Eur J Neurol* 2010;17:903–12.
- [4] Beiswenger KK, Calcutt NA, Mizisin AP. Epidermal nerve fiber quantification in the assessment of diabetic neuropathy. *Acta Histochem* 2008;110:351–62.
- [5] Lauria G. Small fibre neuropathies. *Curr Opin Neurol* 2005;18:591–7.
- [6] Fantini F, Johansson O. Expression of growth-associated protein 43 and nerve growth factor receptor in human skin: a comparative immunohistochemical investigation. *J Invest Dermatol* 1992;99:734–42.
- [7] Verzé L, Viglietti-Panzica C, Maurizo S, Sica M, Panzica G. Distribution of GAP-43 nerve fibers in the skin of the adult human hand. *Anat Rec* 2003;272:467–73.
- [8] Denny JB. Molecular mechanisms, biological actions, and neuropharmacology of the growth-associated protein GAP-43. *Curr Neuropharmacol* 2006;4:293–304.
- [9] Biewenga JE, Schrama LH, Gispen WH. Presynaptic phosphoprotein B-50/GAP-43 in neuronal and synaptic plasticity. *Acta Biochim Pol* 1996;43:327–38.
- [10] Verzé L, Viglietti-Panzica C, Plumari L, Calcagni M, Stella M, Schrama LH, et al. Cutaneous innervation in hereditary sensory and autonomic neuropathy type IV. *Neurology* 2000;55:126–8.
- [11] World Health Organization Department of Noncommunicable Disease Surveillance. Definition, diagnosis and Classification of Diabetes mellitus and its Complications: Report of a WHO Consultation. Geneva: World Health Org.; 1999.
- [12] Vlcková-Moravcová E, Bednarík J, Dusek L, Toyka KV, Sommer C. Diagnostic validity of epidermal nerve fiber densities in painful sensory neuropathies. *Muscle Nerve* 2008;37:50–60.
- [13] Kennedy JM, Zochodne DW. The regenerative deficit of peripheral nerves in experimental diabetes: its extent, timing and possible mechanisms. *Brain* 2000;123:2118–29.
- [14] Yasuda H, Terada M, Maeda K, Kogawa S, Sanada M, Haneda M, et al. Diabetic neuropathy and nerve regeneration. *Prog Neurobiol* 2003;69:229–85.
- [15] Ragé M, Van Acker N, Facer P, Shenoy R, Knaapen MW, Timmers M, et al. The time course of CO₂ laser-evoked responses and of skin nerve fibre markers after topical capsaicin in human volunteers. *Clin Neurophysiol* 2010;121:1256–66.
- [16] Verzé L, Parainfo A, Ramieri G, Viglietti-Panzica C, Panzica GC. Immunocytochemical evidence of plasticity in the nervous structures of the rat lower lip. *Cell Tissue Res* 1999;297:203–11.

14. Divisova S, Vlckova-Moravcova E, Hnojčikova M, Skorna M, Nemeč M, Dubovy P, Dusek L, Jarkovsky J, Belobradkova J, Bednarik J. Prediabetes/early diabetes-associated neuropathy predominantly involves sensory small fibres. *J Peripher Nerv Syst* 2012;17:341-350. doi: 10.1111/j.1529-8027.2012.00420.x. IF = 2,570. Počet citací v SCI: 23.

Tato prospektivní případová studie je zaměřena na charakteristiky periferně neurogenního postižení u souboru pacientů s časným diabetem mellitem 2. typu (co 3 let od stanovení diagnózy) a/nebo prediabetem. Soubory pacientů s uvedeným metabolickým postižením a skupina zdravých kontrol byly velmi podrobně došetřeny širokou baterií metod, objektivizujících lézi nebo dysfunkci silných a/nebo tenkých nervových vláken. Výsledky uvedených vyšetření byly vyhodnoceny s využitím dvou typů recentně publikovaných diagnostických kritérií diabetické distální senzitivně-motorické polyneuropatie (Tesfaye et al. 2010, Dyck et al. 2011).

Kritéria potvrzené distální senzitivně-motorické polyneuropatie založená výhradně na abnormálním nálezu kondukčních studií (Dyck et al. 2011) naplnila pouze malá část pacientů s časným diabetem mellitem a/nebo prediabetem (14,6 %) a žádná ze zařazených kontrol. Při využití kritérií zohledňujících i postižení tenkých nervových vláken objektivizované redukcí IENFD z kožní biopsie (Tesfaye et al. 2010) podíl pacientů s potvrzenou polyneuropatií významně vzrostl (na 37,6 % oproti 2,5 % v kontrolním souboru). Subklinické postižení periferních nervů bylo na základě EMG prokázáno u dalších 4,2 % pacientů (a žádné kontroly) zatímco kožní biopsie odhalila subklinické abnormity téměř u další ¼ pacientů s časným diabetem mellitem.

Nálezy studie potvrzují, že prediabetes a/nebo časný diabetes mellitus jsou vysoce signifikantními rizikovými faktory periferní neuropatie. Jednoznačně také prokazují, že u pacientů s časným diabetem mellitem a/nebo prediabetem jsou postižena především tenká nervová vlákna a to nejen u jedinců s klinicky manifestní neuropatií, ale u významné části pacientů také subklinicky. Tyto nálezy akcentují vhodnost zařazení kožní biopsie do souboru vyšetření zaměřených na skrining periferních neuropatií u této skupiny pacientů. Hodnocení IENFD představuje v této kohortě dokonce jednoznačně nejsenzitivnější diagnostický marker. Výsledky studie proto u časně diabetické/prediabetické neuropatie podporují také využití kritérií diabetické distální polyneuropatie zohledňujících postižení tenkých nervových vláken (Tesfaye et al. 2010).

RESEARCH REPORT

Prediabetes/early diabetes-associated neuropathy predominantly involves sensory small fibres

Sarka Divisova^{1,2}, Eva Vlckova^{1,2}, Maria Hnojckova^{1,2}, Miroslav Skorna¹,
Martin Nemecek¹, Petr Dubovy^{2,3}, Ladislav Dusek⁴, Jiri Jarkovsky⁴, Jana Belobradkova⁵,
and Josef Bednarik^{1,2}

¹Department of Neurology, University Hospital; ²Central European Institute of Technology; ³Department of Anatomy, Faculty of Medicine; ⁴Institute of Biostatistics and Analyses; and ⁵Diabetologic Centre, Department of Gastroenterology, University Hospital, Masaryk University Brno, Czech Republic

Abstract The aim of this study was to investigate the characteristics of prediabetes (preDM) and early (<3 years) diabetes mellitus type 2 (eDM2)-associated neuropathy and the value of recently proposed diagnostic criteria for diabetic sensorimotor polyneuropathy (DSPN). A prospective case-control study in a group of 48 consecutive patients with eDM2, 16 preDM patients and 40 age- and sex-matched normoglycaemic controls was performed. Clinical and laboratory diagnostic tests were used to detect neuropathic abnormalities; these were further classified in terms of recent diagnostic criteria. Criteria for confirmed DSPN based on abnormal nerve conduction (NC) studies were met in 7 (14.6%) eDM2 patients compared to no control ($p < 0.05$), and the proportion significantly increased to 37.5% compared to 2.5% controls ($p < 0.001$), if intraepidermal nerve fibre density (IENFD) was used as an alternative criterion in addition to NC. The subclinical DSPN criteria based on NC abnormalities were met in 4.2% eDM2 patients, while the proportion of preDM and eDM2 cases with subclinical sensory small-fibre involvement documented by IENFD reached 12.5% and 22.9% compared with 2.5% controls ($p = 0.005$ for eDM2). The absolute IENFD values from distal leg were significantly lower in both eDM2 ($p < 0.0001$) and preDM patients ($p = 0.005$) compared to controls. Neuropathy associated with preDM/eDM2 predominantly involves sensory small fibres.

Key words: diabetic neuropathy, prediabetes, small-fibre neuropathy, subclinical neuropathy, type 2 diabetes mellitus

Introduction

Population-based studies suggest a gradient for the prevalence of neuropathy, at its highest in patients with manifest diabetes mellitus, followed by individuals with impaired glucose tolerance (IGT), then impaired fasting glucose (IFG), and least in those with

normoglycemia (Papanas *et al.*, 2011). Several studies have shown that IGT is a frequent cause of idiopathic small-fibre neuropathy (SFN), where the prevalence of IGT has been found to be 34–35.6%, three times the prevalence in age-matched control subjects (Singleton and Smith, 2007). In our group of patients with SFN, the proportion of IGT in cases without other cause was similar (32.1%) to previously reported data (Bednarik *et al.*, 2009). In a series of patients with neuropathic foot pain, we examined six patients with IGT and all had signs of sensory small-fibre involvement confirmed both by abnormal intraepidermal nerve fibre

Address correspondence to: Prof. Josef Bednarik, MD, PhD, Department of Neurology, University Hospital, Masaryk University Brno, Jihlavská 20, 625 00 Brno, Czech Republic. Tel: +(420)532232501; Fax: +(420)532232249; E-mail: jbednar@fnbrno.cz

density (IENFD) and thermal perception threshold (TPT) (Vlckova-Moravcova et al., 2008b). The interpretation of these studies, however, involves important limitations because the populations studied were selected for the presence of idiopathic SFN, rather than IGT (Boulton and Malik, 2010). Furthermore, as pointed out by Dyck et al. (2007) in a critical review, the association between IGT and neuropathy remains to be confirmed in a prospective study.

In early diabetes-associated polyneuropathy, sensory small fibres have been reported to be predominantly involved in a similar fashion to that in IGT-associated polyneuropathy (Smith et al., 2001; Løseth et al., 2008). Neuropathic pain is a frequent early symptom of small-fibre sensory neuropathy. The prevalence of neuropathic pain is 10–20% in patients with diabetes and from 40% to 50% in those with diabetic neuropathy (Veves et al., 2008). There was a consistent increase in the prevalence of diabetic peripheral neuropathic pain (DPNP) from normoglycaemic controls (1.2%) to IFG (4.2%), IGT (8.7%), and diabetic subjects (13.3%) in the MONICA/CORA study (Ziegler et al., 2009).

The minimum diagnostic criteria for typical chronic distal symmetrical sensory or sensorimotor diabetic polyneuropathy (DSPN) as the most important type of diabetic neuropathy were recently updated by the Toronto Diabetic Neuropathy Expert Group (Tesfaye et al., 2010). For confirmation of DSPN and determination of subclinical DSPN, abnormal nerve conduction (NC) studies are recommended in the main, and a validated measure of small-fibre neuropathy (SFN) with class 1 evidence suggested as an alternative. Similarly, Dyck et al. recommend a staging system with subclinical stage 1a based on abnormal NC that remain prerequisite to other stages of DSPN (Dyck et al., 2011). Unfortunately, these guidelines and consensus statements focus on large fibres and continue to advocate NC as a diagnostic modality and as a primary end-point for the assessment of therapeutic benefit. In part, this attitude reflects difficulties in quantifying small-fibre dysfunction and damage.

Reflecting these limitations, a definition for diabetic neuropathy that incorporates small-fibre damage has recently been proposed, utilising abnormalities of thermal perception threshold (TPT) and intraepidermal nerve fibre density (IENFD) (Malik et al., 2011).

We therefore performed a prospective case-control study in a closely defined group of consecutive patients with early diabetes mellitus type 2 (eDM2), prediabetes (preDM) – IGT or IFG – and in an age- and sex-matched normoglycaemic control group without impaired glucose metabolism, in which common

possible causes of polyneuropathy had been excluded, to investigate:

- the prevalence and characteristics of preDM/eDM2-associated neuropathy;
- the usefulness of recently-proposed diagnostic criteria for DSPN and SFN in classifying neuropathy associated with preDM/eDM2.

Patients and Methods

Patients

Between January 2009 and December 2010, consecutive patients with DM2, IFG or IGT, in whom diagnoses had been established according to World Health Organization criteria (World Health Organization, 1999), were screened in the diabetological centre of a University Hospital irrespective of neuropathic signs and symptoms, and those meeting the following criteria were included in the study:

- Duration of DM2 <3 years (i.e., time from the diagnosis or the beginning of first related signs or symptoms), and duration of IGT or IFG <1 year.
- Other conditions or diseases as common alternative causes of neuropathy were excluded by an extensive evaluation (see *Methods*).

Included were:

- Forty-eight DM2 patients (30 men, 18 women) with a median age of 59 (5th/95th percentile: 32–71) years and median duration of diabetes of 9 (range 1–36) months.
- Sixteen prediabetes patients with either IFG or IGT (10 men and 6 women) with a median age of 62 (5th/95th percentile: 35–74) years and median duration of impaired glucose metabolism of 1 (range 1–12) month(s).
- Forty healthy volunteers (23 men, 17 women) without diabetes or prediabetes with a median age of 54.5 (5th/95th percentile: 35–71) years.

Methods

Workup to exclude common alternative causes of neuropathy

All screened prediabetic, diabetic and control subjects underwent the following procedures before recruitment into the study in order to exclude conditions or diseases known as common causes of peripheral neuropathy:

- Detailed medical history with particular attention to previous or current diseases or treatment, especially: family history of neuropathy, presence of

malignancy, systemic vasculitis or connective tissue disorder, hepatitis C and other hepatic diseases, renal or haematological disorders, administration of neurotoxic drugs.

- Quantification of alcohol consumption and confirmation of harmful alcohol use and possible alcohol dependence was performed according to the alcohol use disorders identification test (AUDIT) manual (Saunders et al., 1993). The alcohol intake was further quantified using standard drinks (s.d.) (Bednarik et al., 2009). Patients and controls with harmful alcohol abuse exceeding cut-off for either AUDIT or s.d. were not included in the study.
- Abnormality in the following laboratory tests served as exclusion criteria: renal and liver function tests, antinuclear factor, serum protein electrophoresis, thyroid hormones, carbohydrate deficient transferrin, vitamin B12 and folate levels.

All control subjects had normal fasting glucose, oral glucose tolerance test and glycated haemoglobin.

Evaluation of prediabetic and diabetic patients

As possible diabetic peripheral neuropathic pain (DPNP) we classified cases with predominantly distal and bilateral pain in the feet of typical neuropathic quality (i.e., burning or painful cold) of at least moderate intensity (>3 points of the numerical rating scale, where 0 represented “no pain” and 10 “the worst pain”) and chronic (i.e., lasting >6 months). These cases complied with the criteria of possible neuropathic pain according to grading of certainty for the presence of neuropathic pain (Treede et al., 2008).

In addition, any other pain, both non-DPNP neuropathic and nociceptive, reported in the last 6 months, as well as other positive sensory symptoms with length-dependent pattern, were recorded (Table 1).

Clinical neurological examination included evaluation of tendon reflexes, muscle strength and sensory examination. Proprioception was evaluated in the great toes. Tactile sensation and presence of tactile allodynia was evaluated with a cotton swab.

Cutaneous pressure sensation was evaluated with a Semmes–Weinstein 10 g monofilament and pain sensation with a calibrated sterile Neurotip™ combined within the Neuropen (Owen-Mumford Ltd, Oxford, UK). The monofilament was applied to the dorsum of the great toe midway between the nail fold and the DIP joint. Five true and five false (null) stimuli were applied randomly and ≥ 8 correct responses out of 10 applications was considered normal. The Neuropen pinprick application was used to assess pain sensation. In random order, the sharp or blunt end of the Neurotip™ was pressed against the plantar surface

of the great toe until the guiding markers on the Neuropen were aligned. Patients were asked to distinguish between the painful and non-painful stimuli, and inability to do this indicated an abnormal response (Paisley et al., 2002).

Vibration was examined at medial ankle and the dorsum of the great toe using a 128 Hz graduated tuning fork and assessed using published normal values (Martina et al., 1998).

A Tip-therm® device (GmbH, Brüggem, Germany) was used to evaluate thermal sensation. The examiner placed the two flat surfaces on the tip of great toe at irregular intervals and asked whether it felt cold or warm (not so cold). Eight correct responses out of 10 applications were considered normal (Viswanathan et al., 2002).

Evaluation of thermal perception thresholds (TPT) was performed using a TSA-II neurosensory analyser (Medoc TSA 2001; Medoc, Ramat Yishai, Israel). Thermal thresholds were examined on the dorsum of the right foot, using both the method of limits (non-random and random variant) and levels for both warm and cold perception. For analysis, we used our own age-adjusted normal limits (Bursova et al., 2012b). The methodology has been described elsewhere in detail (Vlckova-Moravcova et al., 2008a; Bursova et al., 2012b).

Evaluation of vibration perception threshold (VPT) was performed using a VSA-3000 vibratory sensory analyser (Medoc TSA 2001). The vibratory threshold was measured on the plantar surface of the second metacarpal head of the right foot employing both the method of limits and that of levels. Our own age-adjusted normal limits were applied in the analysis (Bursova et al., 2012b).

Spectral analysis of heart rate variability (SAHRV) was performed to assess autonomic dysfunction/lesion using a VarCor PF 7 system (Dimea group, Olomouc, Czech Republic). At least 300 R–R intervals were analysed in three subsequent lying–standing–lying positions and our own normal limits were used for evaluation (Vlckova et al., 2010).

Electromyography (EMG) and NC were performed using a Keypoint type II electromyograph system (Dantec, Skovlunde, Denmark) and the results were processed according to reference values related to age and height worked out by our own EMG laboratory (Kadanka et al., 1994). As a criterion for NC abnormality we used ≥ 1 abnormality in two separate nerves (1 is sural); nerve conduction attribute assessed was ≤ 2.5 percentile or ≥ 97.5 percentile with corrections made for applicable variables.

Skin punch biopsy specimens were taken from the proximal thigh and distal calf. The details of skin specimen removal and further processing have

Table 1. Demographic and baseline clinical characteristics.

Parameter	Controls (n = 40)	preDM (n = 16)	p value (preDM vs. controls)	eDM2 (n = 48)	p value (eDM2 vs. controls)	preDM/eDM2 pooled data (n = 64)	p value (pooled preDM/eDM2 vs. controls)
Age (median; 5th/95th percentile) (years)	54.5; 35–71	62; 35–74	> 0.05	59; 32–71	> 0.05	59; 35–73	> 0.05
Men – n (%)	23 (57.5)	10 (62.5)	> 0.05	30 (62.5)	> 0.05	40 (62.5)	> 0.05
Glycaemia (median; 5th/95th percentile) (mmol/l)	5.0; 4.2–5.4	5.9; 4.7–6.4	<0.001	6.6; 5.0–10.1	<0.001	6.2; 5.0–9.9	<0.001
Glycated haemoglobin (median; 5th/95th percentile) %	3.5; 2.9–4.5	4.1; 3.3–4.9	<0.001	4.8; 3.7–7.7	<0.001	4.4; 3.6–7.6	<0.001
Cholesterol (median; 5th/95th percentile) (mmol/l)	5.1; 3.2–7.1	5.7; 4.2–7.7	> 0.05	5.1; 3.4–6.3	> 0.05	5.2; 3.6–6.6	> 0.05
Triglycerides (median; 5th/95th percentile) (mmol/l)	1.22; 0.51–3.97	2.13; 0.81–6.13	0.020	1.62; 0.75–3.79	0.021	1.75; 0.77–3.79	0.007
BMI (median; 5th/95th percentile)	24.9; 21.6–33.0	27.9; 19.6–38.3	0.022	29.0; 24.2–39.1	<0.001	28.7; 22.2–38.6	<0.001
Arterial hypertension – n (%)	14 (35.0)	9 (56.3)	> 0.05	37 (77.1)	<0.001	46 (71.9)	<0.001
Possible DPNP – n (%)	0 (0.0)	2 (12.5)	> 0.05	12 (25.6)	<0.001	14 (21.9)	<0.001
Positive sensory symptoms other than pain – n (%)	3 (7.5)	3 (18.8)	> 0.05	7 (14.6)	> 0.05	10 (15.6)	> 0.05
Any pain – n (%)	9 (22.5)	6 (31.3)	> 0.05	18 (37.5)	> 0.05	24 (37.5)	> 0.05
Absent ankle reflexes bilaterally – n (%)	2 (5.0)	2 (12.5)	> 0.05	12 (25.0)	0.017	14 (21.9)	0.025
Tactile hypo/anaesthesia and/or allodynia in feet bilaterally – n (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	> 0.05	5 (10.4)	> 0.05	5 (7.8)	> 0.05

Statistically significant differences are given in bold italics.
 BMI, body mass index; DPNP, diabetic peripheral neuropathic pain; eDM2, early type 2 diabetes mellitus; preDM, prediabetes.

previously been published (Vlckova-Moravcova et al., 2008a) and follow standard recommendations (Joint Task Force of the EFNS and the PNS, 2010; Lauria et al., 2010). Sections of 50 μm thickness were immunostained with rabbit polyclonal antibodies to human protein gene product (PGP) 9.5 (Ultraclone, Wellow, UK; 1:800) as a primary antibody and TRITC-conjugated goat anti-rabbit secondary antibodies (Chemicon International Inc., Temecula, CA, USA; 1:100). For analysis, we used our own age-adjusted normal limits (Bursova et al., 2012a).

We used several diagnostic criteria to classify neuropathy associated with preDM/eDM2, here headed A, B, C and D:

A. Minimum diagnostic criteria for typical DSPN after Tesfaye et al. (2010) using four diagnostic categories:

- possible DSPN: the presence of symptoms (decreased sensation, positive neuropathic sensory symptoms); or signs (symmetrical decrease of distal sensation or unequivocally decreased or absent ankle reflexes);
- probable DSPN: a combination of symptoms and signs of neuropathy including any two or more of the following: neuropathic symptoms, decreased distal sensation, or unequivocally decreased or absent ankle reflexes;
- confirmed DSPN: the presence of an abnormality of NC and a symptom or symptoms or a sign or signs of neuropathy; if NC is normal, a validated measure of SFN with class 1 evidence (IENFD) was used;
- subclinical DSPN: no signs or symptoms of neuropathy and abnormal NCs or IENFD.

B. Staged diagnostic criteria for DSPN after Dyck et al. (2011) using the following stages:

- stage 1a (subclinical DSPN): abnormal NC with no symptoms or signs;
- stage 1b: abnormal NC + signs without symptoms;
- stage 2a: abnormal NC + symptoms with or without signs;
- stage 2b: abnormal NC + weakness of ankle dorsiflexion.

C. Diagnostic criteria for SFN after Malik et al. (2011):

- possible SFN: symptoms and/or signs of small-fibre damage;
- probable SFN: symptoms + signs + normal or abnormal sural nerve NC;
- definite SFN: symptoms + signs + normal/abnormal sural nerve NC and abnormal TPT and/or IENFD.

D. We suggested the definition of subclinical SFN as the absence of symptoms or signs of small-fibre sensory involvement and:

- abnormal IENFD or TPT;
- abnormal IENFD.

Statistical analysis

Standard descriptive statistics using frequency analysis for categorical variables and median with 5th–95th percentile range for continuous variables were used to describe the primary data. Standard univariate statistics were used to examine the differences between subgroups of patients or the association between particular parameters (Fisher exact test for categorical variables, Mann–Whitney *U* test for continuous variables). All statistical tests were applied as two-sided, and α value <0.05 was considered the threshold for statistical significance. Odds ratio estimates with corresponding statistical significance were performed on the basis of logistic regression.

Informed consent was obtained from both patients and healthy participants. The study was approved by the institutional ethics committee.

Results

Demographic characteristics and medical history

There were no differences in age, sex, alcohol intake and smoking among the groups. The control subjects had significantly lower fasting glucose, glycated haemoglobin, serum triglyceride levels and body mass index (BMI) compared to preDM, eDM2 and pooled preDM/eDM2 patients (Table 1). Early diabetic patients displayed a higher proportion of arterial hypertension compared to controls.

Pain and other positive sensory symptoms

Possible neuropathic pain was present significantly more frequently in both eDM2 (25.6%) and pooled preDM/eDM2 subgroups (21.9%; $p < 0.001$) (DPNP + subgroup) compared with no control subject with a neuropathic pain of the DPNP type (Table 1). The proportion of subjects with positive sensory symptoms other than pain did not differ significantly among the subgroups (Table 1).

Clinical neuropathic signs

Bilateral absence of ankle reflexes was found significantly more frequently in both eDM2 and pooled preDM/eDM2 groups compared to the control group, while there was no difference in proportion of patients

with tactile hypoesthesia and/or allodynia (Table 1). Bilateral pareses of distal limb muscles or abnormal proprioception in the great toe were not found in any patient or control subject.

There was no difference in the proportion of patients with abnormal pressure, thermal, pain and vibration sensation in the preDM, eDM2, and pooled preDM/eDM2 group in comparison with the control group with the exception of abnormal pressure sensation that was found significantly more frequently in eDM2 patients (Table 2).

Laboratory tests

Abnormalities of NC were found more frequently in preDM patients ($p = 0.020$) and eDM2 patients ($p = 0.002$) as compared to controls, while TPT abnormalities were found more frequently in eDM2 patients (0.003), but not in preDM patients in comparison with controls. The proportion of VPT and SAHRV abnormalities did not show any significant difference among evaluated subgroups (Table 2).

The proportion of IENFD abnormalities from distal leg reached their most significant difference between eDM2 patients (47.9%) and controls (2.5%) among all performed tests ($p < 0.0001$) (Table 2). The absolute IENFD values from distal leg were significantly lower in both eDM2 ($p < 0.0001$) and preDM patients ($p = 0.005$) in comparison with controls, while the difference in absolute IENFD values from proximal thigh reached statistical significance in eDM2 patients only ($p = 0.014$) (Table 2).

Classification of neuropathy

Classification of neuropathy in preDM, eDM2, pooled preDM/eDM2 patients and controls using several recent diagnostic criteria and staging systems for DSPN and SFN is summarized in Table 3. Criteria for confirmed DSPN were met in 18 (37.5%) eDM2 cases using either NC or IENFD abnormalities ($p < 0.001$) and in 7 (14.6%) eDM2 cases using NC abnormalities only compared to none of the control subjects ($p < 0.05$).

In prediabetic patients, criteria for confirmed DSPN were met in 6 (37.5%) preDM cases using either NC or IENFD abnormalities ($p < 0.001$) and in 3 (18.8%) preDM cases using NC abnormalities only compared to none of the control subjects ($p < 0.05$).

Six control subjects that complied with criteria for possible DSPN reported either paresthesias in feet (two subjects), unequivocally decreased ankle reflexes (four subjects), absent ankle reflexes (one subject), and one subject showed both absent ankle reflexes and paresthesias in feet (probable DSPN).

Subclinical DSPN criteria using NC abnormalities were met in two (4.2%) eDM2 cases only, and no prediabetic or control subjects. The proportion of

eDM2 patients that met criteria for subclinical DSPN was significantly higher (16.7%) compared to 2.5% in controls ($p = 0.031$), if IENFD was used as an alternative criterion in addition to NC.

Comparison of the proportion of eDM2 cases complying with the criteria for confirmed DSPN based on either NC or IENFD (37.5%) showed a statistically significant increase compared to the proportion based on NC only (14.6%; $p < 0.019$) (Table 3).

Symptomatic SFN was identified in 21 (43.8%) eDM2 patients and in 5 (31.3%) preDM patients using the criteria for SFN proposed by Malik *et al.* (2011).

Subclinical involvement of sensory small fibres documented by IENFD abnormality was significantly more frequent in the eDM2 cohort (22.9%) compared to controls (2.5%; $p = 0.005$). In preDM patients, there were two patients (12.5%), in whom subclinical involvement of sensory small fibres was present.

Painful polyneuropathy

Clinical evaluation disclosed significantly more frequent abnormalities of tactile and pressure sensation in DPNP+ patients compared with DPNP- cases (Table 4).

Laboratory testing showed significantly more frequent abnormalities of EMG/NC, TPT and IENFD in DPNP+ patients compared to DPNP- cases (Table 4).

All 14 cases with pain classified at recruitment as possible DPNP complied with at least one diagnostic category of symptomatic DSPN after Tesfaye *et al.* (2010), and of symptomatic SFN after Malik *et al.* (2011). Patients with DPNP complied more frequently with criteria for symptomatic DSPN after Dyck *et al.* (2011) when compared with painless cases (Table 4).

Discussion

In our small, but well-defined, prospective case-control study of patients with prediabetes and early stage of DM2, we confirmed that both symptomatic and subclinical neuropathy is quite frequent, and involvement of sensory small fibres was the predominant type of neuropathy, with IENFD as the most sensitive marker. Using IENFD as a confirmatory test significantly increased the proportion of eDM2 patients that complied with minimum criteria for confirmed DSPN compared to the use of NC as the only confirmatory test. Neuropathic pain was shown to be a reliable marker of small fibre neuropathy.

Comparison of data from eDM2 patients with the age- and sex-matched control group showed a significantly higher proportion of abnormalities in eDM2 patients in some clinical parameters and most of the laboratory ones. Possible DPNP, ankle areflexia,

Table 2. Abnormalities of clinical bedside and laboratory tests.

Parameter	Controls (n = 40)	preDM (n = 16)	p value (preDM vs. controls)	eDM2 (n = 48)	p value (eDM2 vs. controls)	preDM/eDM2 pooled data (n = 64)	p value (pooled preDM/eDM2 vs. controls)
Pressure sensation abnormality (10 g monofilament) – n (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	>0.05	6 (12.5)	0.030	6 (9.4)	>0.05
Vibration sensation abnormality (128-Hz graduated tuning fork) – n (%)	1 (2.5)	2 (12.5)	>0.05	4 (8.3)	>0.05	6 (9.4)	>0.05
Thermal sensation abnormality (Tip-therm) – n (%)	2 (5.0)	1 (6.3)	>0.05	5 (10.4)	>0.05	6 (9.4)	>0.05
Pain sensation abnormality (weighted Neurotip™) – n (%)	2 (5.0)	3 (18.6)	>0.05	8 (16.7)	>0.05	11 (17.2)	>0.05
NC abnormality* – n (%)	1 (2.5)	4 (25.0)	0.020	13 (27.1)	0.002	17 (26.6)	0.001
NC abnormality† – n (%)	0 (0.00)	3 (18.6)	0.020	9 (18.7)	0.003	12 (18.6)	0.003
VPT abnormality – n (%)	2 (5.0)	2 (12.5)	>0.05	6 (12.5)	>0.05	8 (12.5)	>0.05
SAHRV abnormality – n (%)	2 (5.0)	1 (6.3)	>0.05	8 (16.7)	>0.05	9 (14.1)	>0.05
TPT abnormality – n (%)	6 (15.0)	3 (18.6)	>0.05	22 (45.8)	0.003	25 (39.1)	0.015
IENFD proximally – fibres/mm (median; 5th/95th percentiles)	10.55 (5.6–18.5)	9.78 (4.0–18.2)	>0.05	6.48 (0–17.2)	0.014	7.97 (0–17.2)	0.020
IENFD distally – fibres/mm (median; 5th/95th percentiles)	9.99 (3.9–19.1)	5.65 (0–15.1)	0.005	3.84 (0–14.2)	< 0.0001	4.54 (0–13.8)	< 0.0001
IENFD abnormality distally – n (%)	1 (2.5)	2 (12.5)	>0.05	23 (47.9)	< 0.0001	25 (39.1)	< 0.0001
Any clinical or laboratory neuropathic abnormality – n (%)	14 (35.0)	15 (93.8)	< 0.001	38 (76.0)	< 0.0001	53 (81.5)	< 0.0001

Statistically significant differences are given in bold italics. eDM2, early type 2 diabetes mellitus; IENFD, intraepidermal nerve fibre density; NC, nerve conduction studies; preDM, prediabetes; SAHRV, spectral analysis of heart rate variability; TPT, thermal perception threshold; VPT, vibration perception threshold. *≥1 abnormal in two separate nerves (2.5th/97.5th percentile). †≥1 abnormal in two separate nerves (1 is sural) (2.5th/97.5th percentile).

Table 3. Classification of neuropathy in prediabetic and early diabetic patients and controls.

	Number (%) of prediabetic/early diabetic/pooled prediabetic + early diabetic patients/controls complying with a defined diagnostic category				
	Subclinical	Possible	Probable	Confirmed	All symptomatic
DSPN minimum criteria†	1(6.3)/ 8(16.7)/*	3(18.7)/ 9(18.7)/	0(0.0)/ 3(6.3)/	6(37.5)/*** 18(37.5)/***	9(56.3)/** 30(62.5)/***
DSPN minimum criteria† without IENFD	1(2.5) 0(0.0)/ 2(4.2)/ 2(3.1)/ 0(0.0)	6(15.0) 3(18.7)/ 9(18.7)/ 12(18.6)/ 6(15.0)	1(2.5) 0(0.0)/ 3(6.3)/ 3(4.7)/ 1(2.5)	0(0.0) 3(18.8)/* 7(14.6)/* 10(15.6)/** 0(0.0)	7(17.5) 6(37.5)/ 19(39.6)/* 25(39.1)/* 7(17.5)
DSPN stage‡	1A: Subclinical (abnormal NC, no signs or symptoms)	1B (abnormal NC + signs)	2A (abnormal NC + symptoms ± signs)	2B (abnormal NC + ankle dorsiflexion weakness)	All symptomatic (1B+2A+2B)
	0(0.0)/ 2(4.2)/ 2(3.1)/ 0(0.0)	1(6.3)/ 2(4.2)/ 3(4.7)/ 0(0.0)	2(12.5)/ 5(10.4)/ 7(10.9)/* 0(0.0)	0(0.0)/ 0(0.0)/ 0(0.0)/ 0(0.0)	3(18.7)/* 7(14.6)/* 10(15.6)/** 0(0.0)
SFN grading§		Possible	Probable	Definite	All symptomatic
		4(25.0)/ 15(31.3)/ 19(29.7)/ 7(17.5)	1(6.3)/ 0(0.0)/ 1(1.6)/ 0(0.0)	0(0.0)/ 6(12.5)/* 6(9.4)/ 0(0.0)	5(31.3)/ 21(43.8)/* 26(31.3)/* 7(17.5)
Subclinical SFN	TPT or IENFD	IENTFD			
	3(18.7)/ 16(33.3)/ 19(29.7)/ 7(17.5)	2(12.5)/ 11(22.9)/** 13(20.3)/** 1(2.5)			

Asterisks indicate statistically significant difference between prediabetic, early diabetic or pooled prediabetic/early diabetic patients as compared with control subjects in number/proportion of subjects complying with selected criteria: *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001.

†After Tesfaye et al. (2010): possible = symptoms or signs; probable = symptoms and signs; confirmed = abnormal NC + symptom(s) or sign(s); subclinical = no symptoms or signs + abnormal NC or validated measure of SFN with class 1 evidence (i.e., IENFD).

‡After Dyck et al. (2011): ≥ 1 abnormal findings in 2 separate nerves (1 sural) (2.5th/97.5th percentile).

§After Malik et al. (2011): possible = small-fibre symptoms and/or signs; probable = small-fibre symptoms + signs + abnormal/normal sural nerve conduction study; definite = small – fibre symptoms + signs + abnormal/normal sural nerve conduction study and abnormal TPT and/or IENFD.

||Abnormal TPT and/or decreased IENFD, but no clinical small-fibre signs or symptoms (our own definition).

and pressure sensation abnormality were the only symptoms or signs (including clinical bedside tests) to disclose a significantly higher proportion of abnormalities in the eDM2 subgroup compared to controls.

Among the laboratory tests, IENFD (47.9%), TPT (45.8%) and EMG/NC (27.1%) showed the highest sensitivity in detection of neuropathic involvement in eDM2 patients compared to controls. The prediabetic subgroup showed a higher proportion of NC abnormalities and lower median IENFD from distal calf compared to controls (Table 2). On the other hand, abnormalities of SAHRV, reflecting autonomic dysfunction as a sign of possible cardiac autonomic neuropathy, showed only a trend towards a higher proportion of abnormality in eDM2 cases that was not significant. This finding shows that the involvement of autonomic small fibres is not so frequent in the early stages of glucose dysmetabolism as that of sensory small fibres.

Two population-based studies have assessed the prevalence of neuropathy in IGT, with neuropathy present in 11–13% of IGT and 26–28% of diabetic subjects but also in 4–8% of the nondiabetic control populations (Sorensen et al., 2006; Ziegler et al., 2008). Both studies, however, used criteria that were weighted towards large-fibre dysfunction. In our group, the criteria for confirmed DSPN based on abnormal NC and any clinical neuropathic sign or symptom (Teskaye et al., 2010) were met in 12.5% of preDM and 15.5% of eDM2 patients, which is fairly comparable.

Recently proposed diagnostic criteria for DSPN have reflected new data on the prevalent involvement of sensory small fibres in the early stages of glucose dysmetabolism and introduced a validated measure of SFN with class I evidence into the criteria for both confirmed symptomatic and subclinical DSPN. Skin biopsy with IENFD as a morphometric quantification

Table 4. Probability of abnormal symptoms/signs/tests in pooled preDM/eDM2 patients (n = 64) with possible diabetic peripheral neuropathic pain (DPNP) compared to painless cases – univariate analysis.

	OR (95% CI)*	p
Ankle areflexia	1.56 (0.40; 6.03)	0.519
Tactile hypo/anaesthesia and/or allodynia	19.20 (1.94; 190.51)	0.012
Pressure sensation abnormality (10 g monofilament)	9.40 (1.51; 58.57)	0.016
Thermal sensation abnormality (Tip-therm)	4.18 (0.74; 23.59)	0.105
Pain sensation abnormality (weighted Neurotip™)	1.40 (0.32; 6.17)	0.658
Vibration sensation abnormality (128-Hz graduated tuning fork)	1.88 (0.31; 11.49)	0.497
TPT abnormality	5.67 (1.53; 20.98)	0.009
VPT abnormality	4.18 (0.74; 23.59)	0.105
IENFD abnormality	3.71 (1.07; 12.90)	0.039
EMG/NC abnormality	5.38 (1.38; 20.95)	0.015
SAHRV abnormality	1.00 (0.18; 5.46)	0.992
Symptomatic DSPN (Dyck et al., 2011)	8.44 (1.94; 36.76)	0.005
Symptomatic DSPN (Tesfaye et al., 2010)	NA	
Symptomatic SFN (Malik et al., 2011)	NA	

Statistically significant differences are given in bold italics. CI, confidence interval; DSPN, distal symmetrical sensorimotor diabetic polyneuropathy; eDM2, early type 2 diabetes mellitus; EMG/NC, electromyography/nerve conduction studies; IENFD, intraepidermal nerve fibre density; NA, estimate of OR not accessible due to zero frequency of cases in one field of underlying 2 × 2 contingency table, because all 14 cases with DPNP complied with given diagnostic criteria; SAHRV, spectral analysis of heart rate variability; TPT, thermal perception threshold; VPT, vibration perception threshold.
*Odds ratio and its statistical significance derived on basis of univariate logistic regression.

of intraepidermal small sensory fibres has recently been advocated as a reliable and efficient technique to confirm the clinical diagnosis of SFN with a level A recommendation (*Joint Task Force of the EFNS and the PNS, 2010; Lauria et al., 2010*). Using IENFD abnormality as an alternative criterion more than doubled the proportion of confirmed DSPN in eDM2 cases (37.5%) in comparison with NC abnormality (14.6%). Similarly, the proportion of subclinical DSPN in eDM2 patients increased from 4.2% when based on abnormal NC to 16.7% using IENFD as an alternative criterion. Subclinical SFN was detected in 22.9% (using abnormal IENFD) or 33.3% (using abnormal IENFD or TPT). TPT, however, had less specificity (found in seven control subjects – 17.5%), and is therefore a less reliable marker of SFN.

As criteria for DSPN and SFN significantly overlap, most of our preDM or eDM2 cases that met the criteria for symptomatic DSPN actually had symptoms or signs of SFN. The criteria for SFN are therefore somewhat

artificial and serve mainly for research purposes. If we compare the Tesfaye et al. criteria for DSPN (Tesfaye et al., 2010) and those for SFN from Malik et al. (2011), the category of definite SFN becomes more restrictive (symptoms + signs + abnormality of IENFD and/or TPT) compared to confirmed DSPN (symptom or sign + abnormality of NC or SFN marker), a trend that arises out of the somewhat equivocal validity of laboratory tests for sensory small-fibre involvement. Our results, however, confirmed that IENFD is both a sensitive and a specific marker of SFN in patients with early stages of glucose dysmetabolism (Umapathi et al., 2007) in contrast with NC, which are specific and reliable but not sensitive enough. Unfortunately, skin biopsy is not suitable as a screening method for routine use.

We found that neuropathic pain in prediabetes/early diabetes is a reliable marker of sensory small-fibre neuropathy, similar to the situation in advanced diabetes (Boulton and Malik, 2010), but it is also associated with increased probability of large-fibre involvement. This is in agreement with our previous finding in patients with painful neuropathy, in whom large-fibre involvement was associated with more advanced lesions of sensory small fibres (Vlckova-Moravcova et al., 2008b).

The greatest limitation of our study was the fact that it is statistically underpowered, due to a limited sample of especially prediabetic patients and a subset of painful cases. We believe that this drawback is partly outweighed by very close definition of both study and control groups and using age-stratified normal limits, mostly our own, as well as an exceptionally extensive and standardized evaluation.

Conclusions

Prediabetes and early diabetes are significant risk factors for peripheral neuropathy.

Neuropathy in prediabetes/early diabetes predominantly involves sensory small fibres; any classification or diagnostic method should take this fact into consideration.

IENFD is the most valid test, and DPNP is a reliable marker of SFN in preDM/eDM2 patients.

Acknowledgements

The study was supported by a project of the Internal Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic (grant No.NS9667-4), by a project of the Specific Research MUNI/A/0765/2011 and by the project "CEITEC – Central European Institute of

Technology" (CZ.1.05/1.1.00/02.0068) from European Regional Development Fund.

References

- Bednarik J, Vlckova-Moravcova E, Bursova S, Belobradkova J, Dusek L, Sommer C (2009). Etiology of small-fibre neuropathy. *J Peripher Nerv Syst* 14:177–183.
- Boulton AJM, Malik RA (2010). Neuropathy of impaired glucose tolerance and its measurement. *Diabetes Care* 33:207–209.
- Bursova S, Vlckova E, Hnojckikova M, Nemecek M, Dubovy P, Bednarik J (2012a). Evaluation of intraepidermal nerve fiber density in skin biopsy – normative data. *Cesk Slov Neurol N* 75/108: 455–459.
- Bursova S, Vlckova E, Hnojckikova M, Nemecek M, Bednarik J (2012b). Laboratory-assisted quantitative sensory testing – normative data. *Cesk Slov Neurol N* 75/108: 444–454.
- Dyck PJ, Dyck PJ, Klein CJ, Weigand SD (2007). Does impaired glucose metabolism cause polyneuropathy? Review of previous studies and design of a prospective controlled population-based study. *Muscle Nerve* 36:536–541.
- Dyck PJ, Albers JW, Andersen H, Arezzo JC, Biessels GJ, Bril V, Feldman EL, Litchy WJ, O'Brien PC, Russell JW, on behalf of The Toronto Expert Panel on Diabetic Neuropathy (2011). Diabetic polyneuropathies: update on research definition, diagnostic criteria and estimation of severity. *Diabetes Metab Res Rev* 27:620–628.
- Joint Task Force of the EFNS and the PNS (2010). European Federation of Neurological Societies/Peripheral Nerve Society guideline on the use of skin biopsy in the diagnosis of small fibre neuropathy. Report of a joint task force of the European Federation of Neurological Societies and the Peripheral Nerve Society. *J Peripher Nerv Syst* 15:79–92.
- Kadanka Z, Bednarik J, Vohanka S (1994). Practical Electromyography. IDPVZ, Brno.
- Lauria G, Hsieh ST, Johansson O, Kennedy WR, Leger JM, Mellgren SI, Nolano M, Merkies IS, Polydefkis M, Smith AG, Sommer C, Valls-Solé J (2010). European Federation of Neurological Societies/Peripheral Nerve Society Guideline on the use of skin biopsy in the diagnosis of small fibre neuropathy. Report of a joint task force of the European Federation of Neurological Societies and the Peripheral Nerve Society. *Eur J Neurol* 17:903–912.
- Løseth S, Stålberg E, Jorde R, Mellgren SI (2008). Early diabetic neuropathy: thermal thresholds and intraepidermal nerve fibre density in patients with normal nerve conduction studies. *J Neurol* 255:1197–1202.
- Malik RA, Veves A, Tesfaye S, Smith G, Cameron N, Zochodne D, Lauria G, on behalf of The Toronto Consensus Panel on Diabetic Neuropathy (2011). Small fibre neuropathy: role in the diagnosis of diabetic sensorimotor polyneuropathy. *Diabetes Metab Res Rev* 27:678–684.
- Martina ISJ, van Koningsveld R, Schmitz PIM, van der Meché FG, van Doorn PA, for the European Inflammatory Neuropathy Cause and Treatment (INCAT) group (1998). Measuring vibration threshold with a graduated tuning fork in normal aging and in patients with polyneuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 65:743–747.
- Paisley AN, Abbott CA, van Schie CH, Boulton AJ (2002). A comparison of the Neuropen against standard quantitative sensory-threshold measures for assessing peripheral nerve function. *Diabet Med* 19:400–405.
- Papanas N, Vinik AI, Ziegler D (2011). Neuropathy in prediabetes: does the clock start ticking early? *Nat Rev Endocrinol* 7:682–690.
- Saunders JB, Aasland OG, Babor TF, de la Fuente JR, Grant M (1993). Development of the alcohol use disorders identification test (AUDIT): WHO collaborative project on early detection of persons with harmful alcohol consumption-II. *Addiction* 88:791–804.
- Singleton JR, Smith AG (2007). Neuropathy associated with prediabetes: what is new in 2007? *Curr Diab Rep* 7:420–424.
- Smith AG, Ramachandran P, Tripp S, Singleton JR (2001). Epidermal nerve innervation in impaired glucose tolerance and diabetes-associated neuropathy. *Neurology* 57:1701–1704.
- Sorensen L, Molyneaux L, Yue DK (2006). The relation among pain, sensory loss and small nerve fibres in diabetes. *Diabetes Care* 29:883–887.
- Tesfaye S, Boulton AJM, Dyck PJ, Freeman R, Horowitz M, Kempler P, Lauria G, Malik RA, Spallone V, Vinik A, Bernardi L, Valensi P, Toronto Diabetic Neuropathy Expert Group (2010). Diabetic neuropathies: update on definitions, diagnostic criteria, estimation of severity, and treatments. *Diabetes Care* 33:2285–2293.
- Treede R-D, Jensen TS, Campbell JN, Cruccu G, Dostrovsky JO, Griffin JW, Hansson P, Hughes R, Nurmikko T, Serra J (2008). Neuropathic pain. Redefinition and a grading system for clinical and research purposes. *Neurology* 70:1630–1635.
- Umapathi T, Tan WL, Loke SC, Soon PC, Tavintharan S, Chan YH (2007). Intraepidermal nerve fibre density as a marker of early diabetic neuropathy. *Muscle Nerve* 35: 591–598.
- Veves A, Backonja M, Malik RA (2008). Painful diabetic neuropathy: epidemiology, natural history, early diagnosis, and treatment options. *Pain Medicine* 9:660–674.
- Viswanathan V, Snehalatha C, Seena R, Ramachandran A (2002). Early recognition of diabetic neuropathy: evaluation of a simple outpatient procedure using thermal perception. *Postgrad Med J* 78:541–542.
- Vlckova-Moravcova E, Bednarik J, Dusek L, Toyka KV, Sommer C (2008a). Diagnostic validity of epidermal nerve fibre densities in painful sensory neuropathies. *Muscle Nerve* 37:50–60.
- Vlckova-Moravcova E, Bednarik J, Belobradkova J, Sommer C (2008b). Small-fibre involvement in diabetic patients with neuropathic foot pain. *Diabet Med* 25:692–699.
- Vlčková E, Bednařík J, Buršová Š, Šajgalíková K, Mlčáková L (2010). Spectral analysis of heart rate variability – normative data. *Cesk Slov Neurol N* 73/106:663–672.
- World Health Organisation (1999). Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications. WHO/NCD/NDS/99.2.
- Ziegler D, Rathmann W, Dickhaus T, Meisinger C, Mielck A, KORA Study Group (2008). Prevalence of polyneuropathy in pre-diabetes and diabetes is associated with abdominal obesity and macroangiopathy: the MONICA/KORA Augsburg Surveys S2 and S3. *Diabetes Care* 31:464–469.
- Ziegler D, Rathmann W, Dickhaus T, Meisinger C, Mielck A, KORA Study Group (2009). Neuropathic pain in diabetes, pre-diabetes and normal glucose tolerance: The MONICA/KORA Augsburg surveys S2 and S3. *Pain Med* 10:393–400.

Copyright of Journal of the Peripheral Nervous System is the property of Wiley-Blackwell and its content may not be copied or emailed to multiple sites or posted to a listserv without the copyright holder's express written permission. However, users may print, download, or email articles for individual use.

15. *Vlčková E, Šrotová I. Vyšetření senzitivity (minimonografie). Cesk Slov Neurol N 2014; 77/110(4): 402-418. IF = 0,165. Počet citací v SCI: 1.*

Minimonografie poskytuje přehled o možnostech vyšetření citlivosti pro spektrum nejčastěji hodnocených senzitivních modalit (taktilní, vibrační a termické čítí, termoalgické čítí, hodnocení hluboké tlakové bolesti, mechanické algické citlivosti a dynamické mechanické alodynie) jako jeden v klíčových kroků diagnostického procesu neuropatické bolesti. Pro každou z uvedených modalit jsou popsány metody používané k jejímu hodnocení a to od nejjednodušších kvalitativních a semikvantitativních (obvykle využívaných v klinické praxi) po složitější metody kvantitativní (nezastupitelné pro potřeby klinických studií, zejména zaměřených na neuropatickou bolest). Popisované testy zahrnují vždy vysvětlení interpretace nálezů a využitelná normativní data (pokud jsou dostupná).

Výhodou použití kvalitativních a semikvantitativních metod je jejich časová, metodická i finanční nenáročnost. Poskytují však pouze orientační informaci o citlivosti pro danou modalitu a spolehlivě detekují až pokročilé poruchy senzitivity.

Kvantitativní metody jsou souhrnně označovány termínem kvantitativní testování senzitivity („quantitative sensory testing“ - QST). Jedná se o vyšetření časově a metodicky náročnější, vyžadující použití specializovaných pomůcek a cílený zácvik vyšetřujících. Klíčovou výhodou jejich použití jsou však kvantifikované výstupy s lepší diagnostickou validitou, které s vyšší pravděpodobností odhalí i klinicky méně vyjádřené abnormality. Výsledky testování jsou lépe reprodukovatelné a tedy snáze srovnatelné mezi jednotlivými pacienty a jejich skupinami a využitelné i pro longitudinální sledování. Tyto metody jsou nezastupitelné v diagnostice neuropatie tenkých vláken a v současnosti jsou velmi široce využívány ve studiích zaměřených na neuropatickou bolest a to většinou formou komplexních protokolů, zahrnujících celé spektrum hodnocených senzitivních modalit.

Komentovaná minimonografie tedy poskytuje ojedinělý a do té doby nepublikovaný přehled různých typů metod využitelných pro tuto náročnou část neurologického vyšetření, která je současně jedním z nejdůležitějších kroků v diagnostice neuropatické bolesti.

Vyšetření senzitivity

Sensory Examination

Souhrn

Mezi nejnáročnější součásti klinického neurologického vyšetření patří vyšetření citlivosti vyžadující detailní edukaci pacienta a jeho následnou spolupráci. Při správné metodice vyšetření a jeho exaktním hodnocení lze často odhalit i diskrétní poruchy citlivosti, kterých si pacient nemusí být vědom nebo není schopen je validně popsat. Naším cílem je podat přehled nejčastěji používaných metod vyšetření běžně hodnocených senzitivních a algických modalit (taktilní, vibrační a termické čítí, termoalgické čítí, hodnocení hluboké tlakové bolesti a dále mechanická algická citlivost a hodnocení dynamické mechanické alodynie), včetně interpretace jejich nálezů a využitelných normativních dat (pokud jsou dostupná), a to od nejjednodušších kvalitativních a semikvantitativních metod po složitější metody kvantitativní. Kvalitativní či semikvantitativní metody jsou v běžné klinické praxi využívány podstatně častěji. Jejich výhodou je rychlost a metodická nenáročnost testování a široká dostupnost používaných pomůcek. Nevýhodou je naopak skutečnost, že poskytují pouze orientační informaci o citlivosti pro danou modalitu a spolehlivě detekují většinou až pokročilé poruchy senzitivity. Absence kvantifikace limituje možnosti těchto metod v longitudinálním sledování pacientů i při srovnání nálezů mezi pacienty či jejich skupinami. Kvantitativní metody souhrnně označované termínem kvantitativní testování senzitivity (Quantitative Sensory Testing, QST) jsou časově a metodicky náročnější a vyžadují použití specializovaných pomůcek. Jejich předností jsou kvantifikované výstupy s lepší diagnostickou validitou, které potenciálně diagnostikují i klinicky méně vyjádřené abnormality a jsou lépe využitelné např. pro longitudinální sledování. Tyto metody se častěji uplatňují v klinických studiích a jsou nezastupitelné v diagnostice neuropatie tenkých vláken.

Abstract

Sensory examination represents one of the most complicated parts of clinical neurological examination that requires detailed instructions to patients and their attentive cooperation. Using correct methodology of testing and precise evaluation of the results, sensory tests frequently disclose even very fine sensory abnormalities which patients may not be able to describe or even may not be aware of. The aim of this paper is to provide an overview of methods most frequently used to evaluate common sensory and pain modalities (touch, vibration and thermal sensation, thermoalgic sensation, deep pain pressure, mechanical detection threshold and sensitivity, evaluation of dynamic mechanical allodynia), including interpretation of the findings and recommended normal values (if applicable). In each of the tested modalities, most commonly used methods are described from the easiest qualitative and semiquantitative methods (usually more frequently used in clinical practice) up to more complicated quantitative tests. Main advantages of qualitative and semiquantitative methods include their low methodological and time burden and high availability of the equipment used. Quantitative sensory testing (QST) is more demanding and requires the use of specialized, not widely available, equipment. These methods, however, provide quantified results with better diagnostic validity, may disclose even less pronounced sensory abnormalities and are more useful in long-term follow-up as well as in inter-individual comparisons, both at individual and group level. These methods have been widely used in recent clinical and pharmacological studies and are essential in the diagnostic process of small fiber neuropathy.

Autorky deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.
The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.
Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.
The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.

E. Vlčková^{1,2}, I. Šrotová^{1,2}

¹ Neurologická klinika LF MU a FN Brno

² CEITEC – Středoevropský technologický institut MU, Brno



as. MUDr. Eva Vlčková, Ph.D.
Neurologická klinika
LF MU a FN Brno
Jihlavská 20
625 00 Brno
e-mail: evlckova@email.cz

Přijato k recenzi: 11. 6. 2014

Přijato do tisku: 1. 7. 2014

Recenzenti

doc. MUDr. Ivana Štětkařová, Ph.D.
doc. MUDr. Edvard Ehler, CSc.
MUDr. Radim Mazanec, Ph.D.

Klíčová slova

neurologické vyšetření – senzitivní práh – algický práh – normativní data – neuropatie tenkých vláken

Key words

neurological examination – sensory threshold – pain threshold – normal values – small fiber neuropathy

Práce byla podpořena grantem IGA MZ ČR NT 13523-4 a MZ ČR – RVO (FNBr, 65269705) a interními zdroji CEITEC MUNI.

Úvod

Vyšetření senzitivity je standardním prvkem klinického neurologického vyšetření, patří však mezi jeho nejnáročnější součásti, a to z řady důvodů na straně pacienta i vyšetřujícího [1]. Především jde o část vyšetření založenou na subjektivních vjemech pacienta, který si poruchy citlivosti v řadě případů nemusí být vědom. Pokud si poruchu uvědomuje, je pro něj popis senzitivních symptomů často obtížný a obvykle mu chybí vhodný slovník. Na straně vyšetřujících není na poruchy senzitivity v rámci anamnézy a objektivního vyšetření pacienta mnohdy kladen dostatečný důraz, jsou považovány za málo spolehlivé a přínosnou část neurologického vyšetření nebo jsou dokonce zcela opomíjeny. Jedním z důvodů je zřejmě poměrně častá diskrepance mezi výskytem subjektivních senzitivních symptomů a absencí klinicky detekovatelných poruch citlivosti (zejména při méně detailním či extenzivním vyšetření senzitivity). Běžná je i opačná situace, tj. záchyt poruch senzitivity při klinickém neurologickém vyšetření bez relevantních subjektivních symptomů.

Navzdory uvedeným komplikacím je u fyziologicky i anatomicky konzistentních nálezů možné pokládat vyšetření senzitivity do značné míry za objektivní test. Při správné metodice vyšetření a jeho exaktním hodnocení lze často odhalit i diskrétní poruchy citlivosti, kterých si pacient není vědom nebo není schopen je správně popsat a interpretovat. Jejich zohlednění přitom může hrát významnou roli při souhrnném hodnocení klinického stavu pacienta a jeho subjektivních obtíží i zjištění jejich příčin.

Přehled metod používaných k vyšetření senzitivity

Pro testování senzitivity lze využít metody klinické („bedside“) či přístrojově asistované (laboratorní). Klinické metody jsou častěji kvalitativní či semikvantitativní a méně často kvantitativní, zatímco přístrojově asistované metody jsou prakticky výhradně kvantitativní.

Kvalitativní vyšetření je vhodné zejména v úvodu testování, kdy zjišťujeme orientačně přítomnost signifikantních senzitivních abnormit a jejich distribuci. Toto vyšetření poskytuje pouze hrubou informaci (typu ano či ne) o přítomnosti výrazných poruch citlivosti. Lépe reflektuje tzv. negativní senzitivní symptomy (tedy ztrátu

či výrazné snížení senzitivní percepce dané modality – hypestézie, hypoalgie) než symptomy pozitivní (tj. zvýšené vnímání senzitivní a zejména algické percepce pro některou z hodnocených modalit – hyperalgie, alodynie či vzácně hyperestézie). Neumožňuje ale validně hodnotit míru postižení a většinou ani spolehlivě detekovat méně vyjádřené abnormity. Tyto metody navíc využívají podněty, které nejsou přesně definovány a standardizovány (nekalibrovaná štětka, nekalibrované špendlíky, zkumavky s teplou a chladnou vodou apod.), což dále snižuje validitu testování. Nevýhodou absence kvantifikovaného výstupu je i omezená možnost hodnocení event. vývoje abnormit v dlouhodobém horizontu (např. při longitudinálním sledování pacienta či v rámci hodnocení terapeutického efektu preparátů užívaných v léčbě neuropatické bolesti). Klíčovou výhodou kvalitativních metod je naopak minimální finanční náročnost používaných pomůcek, jejich běžná velmi dobrá dostupnost, relativní jednoduchost vyšetření a v neposlední řadě jeho nízká časová náročnost.

Semikvantitativní metody již umožňují určitým způsobem kvantifikovat senzitivní percepci, a to většinou opakovaným použitím jasně definovaného a standardizovaného podnětu konstantní intenzity. Patří sem např. vyšetření pomocí 10g filamenta, Neuropen, Termopen (Tip Therm®) apod. Kvantifikace je pak vyjádřena hodnocením počtu percipovaných podnětů z určitého počtu podnětů aplikovaných. Tyto metody poskytují přesnější informaci o senzitivní percepci a jsou lépe použitelné pro hodnocení případného vývoje nálezu v mezidobí mezi opakovanými vyšetřeními. Nezachytí ovšem poruchy senzitivity pro podněty příslušné modality o jiné intenzitě, než jakou má používaný uniformní podnět. Neumožní ani stanovení senzitivního prahu a také v omezené míře reflektují pozitivní senzitivní abnormity. Ve srovnání s metodami kvalitativními jsou již poněkud náročnější na vybavení i čas potřebný k vyšetření. Pro získání validního výstupu by měly být prováděny standardizovaným způsobem, takže mnohdy vyžadují úvodní zácvek vyšetřujícího. Ve všech uvedených směrech je však jejich náročnost zřetelně nižší oproti metodám kvantitativním.

Klíčovou výhodou **kvantitativních** metod je použití přesně definovaných

a standardizovaných podnětů kvantifikovatelné intenzity. Tyto metody jsou v současnosti často vyčleněny jako samostatná podskupina metod vyšetření citlivosti, označovaná termínem kvantitativní testování senzitivity (**Quantitative Sensory Testing, QST**) [2–4]. Patří do ní tzv. počítačem asistované metody (umožňující např. stanovení termických a termalgických prahů či stanovení prahu vibračního pomocí specializovaného softwaru) používané většinou ve specializovaných laboratořích zaměřených na psychofyziální testování, a dále metody využívající kvantifikované vybavení bez nutnosti počítačové asistence (např. von Freyova filamenta, kalibrované špendlíky, kalibrovaný tlakoměr apod.) („bedside“ testy). Tyto metody jsou podstatně náročnější na používané vybavení i čas potřebný k vyšetření. Pro použití některých pomůcek je doporučen iniciální zácvek vyšetřujícího, běžně je však může provádět zaučený specializovaný laborant.

Z uvedených důvodů je využitelnost těchto metod v běžné klinické praxi limitována, mají ale klíčové místo v oblasti klinických studií a jsou také nezastupitelné v diagnostice neuropatie tenkých vláken (viz níže).

Parametry hodnocené při vyšetření citlivosti

Kvantitativní metody umožňují stanovení tzv. **senzitivního prahu** (tj. nejnižší intenzity dané modality, která u vyšetřovaného jedince již vyvolá percepci podnětu) a/nebo **prahu algického** (nejnižší intenzity dané modality, jež u daného pacienta vede k vyvolání bolestivého vjemu). Dále lze tyto metody použít pro tzv. nadprahové testování, kdy se hodnotí např. **tolerance algických podnětů** (tj. nejvyšší pro pacienta snesitelná intenzita daného podnětu) nebo **senzitivita pro příslušnou algickou modalitu**. Při hodnocení senzitivity je využívána numerická škála (Numeric Rating Scale, NRS) o rozsahu 0–10, resp. 0–100, kdy „0“ znamená „žádnou vnímanou bolest“ a 10 (nebo 100) představuje „nejhorší představitelnou bolest“ [3].

Typy nervových vláken (a drah) a možnosti objektivizace jejich funkce

V rámci hodnocení citlivosti lze vyšetřit řadu senzitivních modalit. Z praktického

Tab. 1. Sumarizace metod testování funkce jednotlivých typů nervových vláken. Modifikováno z [5].

Typ vláken	Modalita citlivosti	Způsob testování		
		Jednoduché klinické testy	QST	Laboratorní testy
A-beta	dotyk	smotek vaty	Freyova filamenta	kondukční studie senzitivních nervů, SEP
	vibrace	graduovaná ladička	vibrometrie	
A-delta	bodnutí	Neuropen, špendlík	algometrie	LEPs, CHEPs
	chlad	Tip Therm, zkumavky	termické testování	
C	bolest (pálení)		termické testování	kožní biopsie
	teplo	zkumavky	termické testování	

QST – kvantitativní testování senzitivity (Quantitative Sensory Testing), SEP – somatosenzitivní evokované potenciály, LEPs – laserem evokované potenciály (Laser Evoked Potentials), CHEPs – evokované potenciály vyvolatelné kontaktním teplem (Contact-Heat Evoked Potentials).

hlediska je vhodné jejich dělení na **povrchovou senzitivitu** (tzv. kožní, exteroceptivní), kam patří lehký dotek, teplo a bolest, a **hlubokou senzitivitu** zahrnující polohocit, pohybovit, vibrace, diskriminační čítí a hluboký tlak, resp. jím vyvolanou bolest [1]. Toto dělení reflektuje anatomický podklad obou typů citlivosti: modalita povrchové senzitivity jsou vedeny především tenkými, málo myelinizovanými a nemyelinizovanými vlákny typu A-delta (podílejícími se zejména na percepci chladu a ostré mechanicky vyvolané bolesti) a C (zapojenými zejména do vnímání tepla a termo-algických podnětů) a následně cestou tractus spino-thalamicus. Modalita hluboké senzitivity jsou pak zprostředkovány silnými myelinizovanými vlákny typu A-beta a následně zadními provazci a tractus spino-bulbo-thalamicus. Odlišná je i thalamicáa kortikální projekce obou typů senzitivní percepcie.

Jednotlivé typy vláken a souvisejících nervových drah se liší nejen funkčně, ale také paraklinickými metodami umožňujícími objektivizaci jejich funkce (tab. 1) [5,6]. Běžně užívané metody (hodnocení vodivosti periferních nervů v rámci elektromyografického vyšetření, somatosenzitivní evokované potenciály) reflektují výhradně funkci A-beta vláken a spino-bulbo-thalamicých drah.

K objektivizaci funkce **A-delta** vláken lze využít specifické modalita evokovaných potenciálů, vyvolané např. laserem (Laser Evoked Potentials, LEPs) [5,7], kontaktním teplem (Contact-Heat Evoked Potentials, CHEPs) [5,8] či specifickou elektrickou stimulací, která vyvolá odpověď

výhradně v intraepidermálních nervových strukturách (Pain-Related Evoked Potentials, PREPs) [5,8,9]. Z uvedených metod jsou v ČR aktuálně dostupné pouze CHEPs, a to ve Středoevropském technologickém institutu Masarykovy univerzity, Brno (CEITEC MUNI), a jsou prozatím využívány zejména pro výzkumné a nikoli běžné diagnostické účely.

Funkci **C-vláken** a relevantních drah je možné vyšetřit pomocí některých specifických modalit LEPs, k dispozici je však prozatím velmi limitované množství publikací zaměřených na tuto problematiku [5,10]. Nejvalidnější metodou objektivizace postižení tenkých nervových vláken typu C je tak nadále vyšetření intraepidermálních nervových vláken z kožní biopsie [11,12]. V ČR je vyšetření prováděno ve Fakultní nemocnici Brno, a to jak pro experimentální, tak i pro klinické diagnostické účely. Identický typ nervových vláken lze vyšetřit pomocí korneální kontaktní mikroskopie [13].

Senzitivní profil

Souhrnné zhodnocení citlivosti pro více senzitivních modalit umožňuje vytvořit tzv. senzitivní profil [14–16]. Tento profil poskytne komplexní informaci o postižení citlivosti v příslušné oblasti včetně posouzení dysfunkce jednotlivých typů nervových vláken, resp. příslušných senzitivních drah. Vytvoření senzitivního profilu je možné již s použitím kvalitativních metod vyšetření citlivosti. V případě kvalitativně stanoveného senzitivního profilu však nelze srovnávat míru postižení jednotlivých modalit a je nutno spolehnout se pouze na orientační kvalitativní infor-

maci (tj. zda je, či není příslušná modalita hrubě postižena). Diagnostická validita senzitivního profilu je proto vyšší při použití semikvantitativních nebo ještě lépe kvantitativních metod. Kvantitativně stanovený senzitivní profil umožní hodnotit i modalita nadprahového testování (senzitivitu či toleranci). Míru postižení jednotlivých modalit je možné vyjádřit formou tzv. Z-skóre. Jedná se o počet směrodatných odchylek od průměru hodnot příslušného parametru v normativním souboru, a to pro daný věk a pohlaví pacienta a vyšetřovanou oblast (tab. 2–6) [14–16]. **Normativní data** jsou nezbytnou pomůckou při hodnocení odlišnosti výsledků pacienta od fyziologických nálezů v běžné populaci. Jejich spolehlivost však pochopitelně není absolutní. Jsou derivována na limitovaných vzorcích jedinců, kteří splní určitým způsobem definovaná kritéria normality. Hodnoty norem jsou tak ovlivněny zejména rozsahem testovaného vzorku, jenž se ve většině QST studií pohybuje kolem 20–40 v jednotlivých věkových skupinách. Dalším faktorem je interindividuální variabilita senzitivních a algických prahů v testované populaci. K určitému zkreslení nálezů zejména v nejvyšších věkových kategoriích může vést i definice „zdravého“ jedince pro potřeby příslušné studie (protože především v nejvyšších věkových skupinách je jen málo jedinců skutečně zcela zdravých). Uvedené proměnné tak mohou vést k poněkud nelogickým nálezům v normativních datech, kdy je hodnota normy pro určité modalita nižší (a tedy senzitivita vyšší) u starších věkových skupin než u mladších jedinců (tab. 2–6).

Tab. 2. Doporučené normální limity hodnot senzitivních prahů pro mechanické tlakové podněty (Mechanical Detection Threshold, MDT) v milinewtonech (mN) v závislosti na vyšetřované oblasti, věku a pohlaví.

Vyšetřovaná oblast/ /pohlaví		Věkové rozmezí (v letech)				
		20–30	30–40	40–50	50–60	nad 60
obličej:	muži	0,69	0,75	0,52	0,55	0,66
	ženy	0,46	0,38	0,41	0,42	0,24
dorzum ruky:	muži	3,17	5,81	10,04	6,56	3,17
	ženy	2,80	3,07	4,75	8,61	12,13
dorzum nohy:	muži	15,50	26,83	41,11	38,84	15,57
	ženy	7,16	9,15	13,73	25,83	29,88

Hodnoty jsou uvedeny jako horní normální limit (odvozený z 95% konfidenčního intervalu hodnot normativního souboru zdravých dobrovolníků): abnormitou jsou hodnoty vyšší než uvedené. Převzato z [22].

Tab. 3. Doporučené normální limity hodnot algických prahů pro mechanicky vyvolanou bolest (Mechanical Pain Threshold, MPT) v milinewtonech (mN) v závislosti na vyšetřované oblasti, věku a pohlaví.

Vyšetřovaná oblast/ /pohlaví		Věkové rozmezí (v letech)				
		20–30	30–40	40–50	50–60	nad 60
obličej:	muži	6,21–331,41	5,76–325,71	5,89–311,43	9,83–310,44	19,15–226,13
	ženy	6,65–283,60	5,93–182,30	4,88–149,00	3,07–128,84	3,06–64,86
dorzum ruky:	muži	11,97–572,54	13,62–577,90	19,38–596,08	20,50–554,95	28,45–464,47
	ženy	15,52–403,43	16,52–337,30	16,74–326,91	12,36–296,37	13,02–265,28
dorzum nohy:	muži	10,97–486,09	14,71–616,95	15,30–695,38	16,89–504,91	26,75–321,42
	ženy	9,92–485,16	12,46–269,26	16,24–271,05	11,21–313,27	8,57–259,02

Hodnoty jsou uvedeny jako rozmezí horního i dolního normálního limitu (odvozené z 95% konfidenčního intervalu hodnot souboru zdravých dobrovolníků): abnormitou jsou hodnoty vyšší než horní normální limit (hypoalgie) i nižší než dolní normální limit (hyperalgie). Převzato z [22].

Tab. 4. Doporučené normální limity hodnot senzitivity pro ostrou mechanicky vyvolanou bolest (Mechanical Pain Sensitivity, MPS) (uvedené jako průměrná hodnota NRS v rozmezí 0–100 při použití celého setu kalibrovaných špendlíků) v závislosti na vyšetřované oblasti, věku a pohlaví.

Vyšetřovaná oblast/ /pohlaví		Věkové rozmezí (v letech)				
		20–30	30–40	40–50	50–60	nad 60
obličej:	muži	0,09–8,30	0,09–8,45	0,10–6,25	0,06–6,95	0,07–13,21
	ženy	0,11–8,35	0,14–6,91	0,14–9,52	0,15–15,09	0,14–13,41
dorzum ruky:	muži	0,11–4,90	0,10–5,25	0,07–5,78	0,08–3,49	0,13–3,23
	ženy	0,13–4,91	0,15–3,26	0,14–3,97	0,12–6,09	0,10–5,62
dorzum nohy:	muži	0,09–6,33	0,08–6,96	0,07–6,39	0,07–4,65	0,10–5,56
	ženy	0,14–4,47	0,17–4,07	0,14–5,85	0,12–7,75	0,12–6,22

Hodnoty jsou uvedeny jako rozmezí horního i dolního normálního limitu (odvozené z 95% konfidenčního intervalu hodnot normativního souboru zdravých dobrovolníků): abnormitou jsou hodnoty vyšší než horní normální limit (abnormálně snížená senzitivita pro bolest – hypoalgie) i nižší než dolní normální limit (abnormálně zvýšená senzitivita pro bolest – hyperalgie). Převzato z [22].

Základní principy vyšetření senzitivity

Vyšetření senzitivity (kvantitativní i kvalitativní) vyžaduje detailní edukaci pacienta

a následně pacientovo soustředění a spolupráci. Testování nelze provádět u pacientů s poruchou vědomí, nespolupracujících subjektů ani u jedinců s poruchou

pozornosti či výrazným kognitivním deficitem. Pokud má vyšetřující podezření, že výsledky mohou být ovlivněny únavou, stresem nebo jinými psychickými faktory,

VYŠETŘENÍ SENZITIVITY

je vhodné tuto skutečnost zohlednit při jejich interpretaci. V optimálním případě je za takových okolností vhodné testování přerušit a dokončit po odeznění vlivu zmíněných psychických faktorů, případně vyšetření opakovat s odstupem k ověření konzistence výsledků [2–4,15–17].

Vyšetření by mělo probíhat vždy v tiché klidné místnosti při maximálním pohodlí pro vyšetřovaný subjekt a po eliminaci rušivých vlivů interferujících s jeho pozorností a soustředěním. Instrukce k jednotlivým částem testování, které jsou pacientovi sdělovány, by měly být jednotné (aby byly výsledky jednotlivých vyšetření intra- i interindividuálně srovnatelné) a pokud možno standardizované [15,16]. Je nutné vyvarovat se sugestivních dotazů. Přínosné může být i úvodní upozornění pacienta, že nejsou „správné a chybné“ odpovědi, ale jde o nalezení jeho konkrétního vzorce vnímání, což může snížit míru úzkosti z vyšetření u disponovaných jedinců.

Pro stanovení distribuce poruch citlivosti je vhodné využít komparační princip, tj. srovnání vyšetřované oblasti s oblastí pravděpodobně nepostiženou (jakou je např. obličej u míšních lézí či onemocnění s distribucí závislou na délce, nebo kontralaterální oblast u jednostranných postižení). Distribuci lze dále zpřesnit stanovením tzv. hranice čítí, tedy rozhraní mezi nepostiženou a postiženou oblastí. Při jejím stanovení je vhodné postupovat vždy z oblasti s nižší citlivostí do oblasti s citlivostí vyšší, a to kolmo k předpokládané hranici [1]. Po stanovení distribuce postižení je vhodné zaznamenat výsledek do schématu, které zřehlední poru-

Tab. 5a) Doporučené normální limity pro hodnocení vibračních prahů pomocí 64Hz ladičky na HKK (processus styloideus radii) a DKK (malleolus medialis). Převzato z [42].

Vyšetřovaná oblast	Věková skupina (v letech)			
	do 40	41–60	61–85	nad 85
HKK	6,5	6,0	6,0	5,5
DKK	4,5	4,0	3,5	3,0

Tab. 5b) Doporučené normální limity hodnot vibračních prahů při použití 64Hz ladičky u zdravých dobrovolníků v závislosti na vyšetřované oblasti, pohlaví a věku (data jsou uvedena jako dolní normální limit odvozený jako „průměr – 2SD“ hodnot normativního souboru).

Vyšetřovaná oblast/ /pohlaví	Věkové rozmezí (v letech)				
	20–30	30–40	40–50	50–60	nad 60
horní končetiny: muži	7,13	7,30	7,18	7,06	6,58
ženy	6,86	7,04	6,68	6,38	6,55
dolní končetiny: muži	6,19	6,56	5,44	4,32	3,47
ženy	6,13	6,17	5,12	4,38	4,54

Lokalizace na dorzu ruky a nohy (bez bližší specifikace). Převzato z [22].

Tab. 5c) Doporučené normální limity hodnot vibračních prahů při použití 128Hz ladičky na HKK (na druhém metakarpu) a DKK (na prvním metatarzu) v závislosti na věku (data jsou uvedena jako dolní normální limit, odvozený jako „průměr – 2SD“ hodnot souboru zdravých dobrovolníků). Převzato z [41].

Vyšetřovaná oblast	Věkové rozmezí (v letech)					
	18–29	30–39	40–49	50–59	60–69	70–79
HKK	7,2	7,1	7,1	7,0	7,0	6,2
DKK	6,6	5,5	5,7	5,4	5,2	5,3

Tab. 6. Doporučené normální limity hodnot algických prahů pro hluboký tlak (Pressure Pain Threshold, PPT) v kilopascálech (kPa) v závislosti na vyšetřované oblasti, věku a pohlaví.

Vyšetřovaná oblast/ /pohlaví	Věkové rozmezí (v letech)				
	20–30	30–40	40–50	50–60	nad 60
obličej: muži	124–418	134–457	143–451	147–452	133–496
ženy	135–306	136–319	138–350	149–351	149–331
dorzum ruky: muži	190–925	233–1068	277–981	264–896	270–869
ženy	218–569	221–648	237–763	294–751	317–629
dorzum nohy: muži	245–1380	260–1467	319–1182	263–1110	241–942
ženy	273–832	292–863	286–1036	254–1102	269–858

Hodnoty jsou uvedeny jako rozmezí horního i dolního normálního limitu (odvozené z 95% konfidenčního intervalu hodnot normativního souboru zdravých dobrovolníků): abnormitou jsou hodnoty vyšší než horní normální limit (hypoalgie) i nižší než dolní normální limit (hyperalgie). Převzato z [22].

chu citlivosti zejména v případě postižení více senzitivních modalit a usnadní porovnání případných změn v rámci longitudinálního sledování pacienta [1].

Spolehlivost a reprodukovatelnost testování senzitivity

Většina parametrů kvantitativního testování senzitivity prokazuje uspokojivou reprodukovatelnost nálezů při opakovaných měřeních [18–21]. V rámci vyšetření QST jsou k dispozici nástroje umožňující hodnocení jeho validity a spolehlivosti. Jedná se např. o **hodnocení variability** následných opakovaných měření. Yarnitsky et al [20] našli malou variabilitu odpovědí u zdravých dobrovolníků, větší u nemocných, ale podstatně vyšší u tzv. feigners, tedy jedinců, jejichž úkolem bylo předstírat poruchu citlivosti. Při vyšetření senzitivity s použitím kvantitativních či semikvantitativních metod je proto citlivost pacienta pro stejnou intenzitu podnětu testována vždy opakovaně. Zřetelná inkoherece jednotlivých odpovědí při tomto opakovaném testování by měla vést k větší obezřetnosti při interpretaci nálezů a zvážení nižší validity výsledků [20,21].

Vliv fyziologických proměnných na senzitivní percepci

Při vyšetření senzitivity a zejména pak při použití kvantitativních či semikvantitativních metod je nezbytné zohlednění řady fyziologických proměnných s potenciálním vlivem na senzitivní percepci.

Nejvýznamnějším faktorem, jenž ovlivňuje výšku senzitivních a algických prahů, resp. obecně senzitivitu, je **testovaná oblast těla** [16,22]. Vliv této proměnné na hodnoty senzitivních i algických prahů je pro všechny běžně hodnocené modalities citlivosti signifikantně vyšší než vliv ostatních fyziologických proměnných (věk, pohlaví atd.) [16,22]. Senzitivní prahy jsou obecně nejnižší (a citlivost nejvyšší) na obličeji, lehce vyšší na horních končetinách a nejvyšší na končetinách dolních [16,22]. Podkladem uvedených rozdílů je odlišná hustota receptorů v jednotlivých lokalizacích a současně nesterétná délka senzitivních drah pro různé vyšetřené oblasti. Při hodnocení senzitivní percepcce je tak vždy nutno vycházet z toho, jaká část těla je vyšetřována, a použít normativní data pro odpovídající oblast. Pro distální segmenty končetin jsou aktuálně dostupné

věkově stratifikované normy obvykle hodnocených QST parametrů pro dospělou [16,22] i dětskou populaci [23]. Tato data jsou aplikovatelná na akrální části končetin a autoři publikovaných normativních dat blíže nespecifikují konkrétní anatomickou distribuci (tzn. identická normativní data jsou většinou používána např. pro plosku a nárt, pro dlaň a hřbet ruky apod.). Recentně byla publikována i normativní data pro hodnocení QST nálezů v oblasti trupu a proximálních segmentů končetin [24].

Senzitivní percepcce je dále významně ovlivněna věkem. Výsledky většiny publikovaných studií v souladu s klinickou zkušeností prokazují signifikantní pokles senzitivní percepcce s **věkem**, kdy dochází k postupnému zvýšení prahů pro většinu senzitivních modalit [16,20,22]. Nejvýrazněji jsou tyto změny vyjádřeny při hodnocení propriocepce [16,22]. Prokázán naopak nebyl signifikantní vliv věku na mechanické algické prahy vyvolané píchnutím špendlíkem (Mechanical Pain Threshold, MPT) ani na senzitivitu vůči této modalitě (Mechanical Pain Sensitivity, MPS) [22]. Etiopatogeneze věkově závislých změn citlivosti je zřejmě multifaktoriální. Předpokládá se vliv stárnutí na degenerativní transformaci senzitivních receptorů a demyelinizaci a redukci nervových vláken v periferním nervovém systému. Tyto změny postihují především silná myelinizovaná nervová vlákna a jim příslušné receptory [25]. Pravděpodobný je i podíl věkově vázaných degenerativních změn centrálního nervového systému.

Další faktor prokazatelně ovlivňující senzitivní percepci je **pohlaví**. Vliv této fyziologické proměnné je však podstatně menší než význam předchozích dvou faktorů. Ve většině QST parametrů vykazují ženy vyšší senzitivitu než muži [16,22,26]. Tento jev je pravděpodobně dominantně podmíněn rozdílným centrálním zpracováním informací v rámci senzitivní percepcce u mužů a žen. Podstatně menší roli hrají zřejmě periferní faktory, jako například odlišná hustota receptorů či rozdíly inervace v závislosti na pohlaví [16].

Podle očekávání nejsou patrné významné rozdíly v percepci běžně hodnocených senzitivních modalit mezi **pravou a levou polovinou těla** [16]. U zdravých dobrovolníků či při stranově symetrickém postižení je proto dostačující

jednostranné provedení detailního testování senzitivity. U pacientů s jednostranným či zřetelně asymetrickým postižením je vhodné detailní vyšetření obou stran (kdy je nepostižená strana vnímána jako referenční oblast). Tento běžně užívaný algoritmus však komplikují recentní studie [27] prokazující častý výskyt senzitivních abnormalit v kontralaterální distribuci u pacientů s jednostranným postižením. Při jednostranném výskytu senzitivní abnormality pro některý z hodnocených senzitivních parametrů je prevalence abnormality identického parametru v kontralaterální distribuci až 57 % [27]. Tuto skutečnost je třeba zohlednit při interpretaci nálezů v objektivně nepostižené oblasti kontralaterálně od místa postižení.

Význam QST vyšetření

Detailní a v optimálním případě kvantifikované vyšetření senzitivity je podle aktuálních doporučení [2,5,28] jednou ze základních součástí **diagnostického procesu neuropatické bolesti** využívanou především v diagnostice neuropatie tenkých vláken a časné diabetické neuropatie. Testování senzitivity je považováno i za metodu vhodnou pro sledování a kvantifikaci terapeutického efektu preparátů využívaných v léčbě neuropatické bolesti. Využití QST metod umožní mj. izolované sledování vlivu podávaného preparátu na jednotlivé komponenty bolesti (např. hyperalgie, alodynii apod.).

Většina publikací zaměřených na QST hodnotí využitelnost metod především v diagnostice postižení tenkých málo myelinizovaných a nemyelinizovaných vláken typu **A-delta a C** [2,5]. Důvodem je skutečnost, že pro diagnostiku dysfunkce silných myelinizovaných senzitivních vláken typu A-beta je k dispozici jiná vysoce validní a objektivní metoda, tj. hodnocení vodivosti periferních nervů v rámci elektromyografického vyšetření. Důsledkem tohoto přístupu je nicméně zkrácení významu využití QST metod v diagnostice postižení silných nervových vláken a relevantních senzitivních drah. Toto zkrácení umožní s vysokou pravděpodobností v nejbližších letech upravit studie využívající recentně publikovaný a aktuálně široce používaný **komplexní standardizovaný QST protokol**. Protokol byl vytvořen německou pracovní skupinou pro výzkum neuropatické bolesti (Der Deutsche Forschungsverbund Neuropathis-



Obr. 1a) Kalibrované pomůcky k vyšetření DMA (mechanická dynamická alodynne).



Obr. 1b) Vyšetření kalibrovaným štětcem.

cher Schmerz (DFNS), The German Research Network on Neuropathic Pain). Zahrnuje vyšetření řady senzitivních modalit a reflektuje funkci obou typů nervových vláken v souladu s aktuálními doporučeními [15,16]. DFNS protokol je aktuálně téměř bezvýhradně využíván ve studiích zaměřených na klinickou charakteristiku pacientů s neuropatickou bolestí různého původu a dokonce i s bolestí neneuropatickou [29].

Cíl sdělení

Cílem prezentovaného sdělení je podat stručný přehled o klinických (bedside) kvalitativních, semikvantitativních a kvantitativních metodách vyšetření běžně hodnocených senzitivních modalit (s výjimkou detailního rozboru metod počítačově asistovaných, které již byly v naší literatuře recentně publikovány [17,18,30]), a to včetně doporučených normativních dat, pokud jsou pro daný parametr známa.

Vyšetření mechanické kožní citlivosti (dotyku, povrchového tlaku, mechanicky vyvolané ostré bolesti)

Vyšetření taktilní citlivosti

Kvalitativní metody vyšetření taktilní citlivosti zahrnují dotyk smotkem vaty, štětičkou nebo nekalibrovaným štětcem při využití obecných principů testování citlivosti, které byly uvedeny v úvodní části. Dynamické podněty (vyvolané pohybem štětce nebo štětičky o rozsahu 1–3 cm) jsou obecně lépe vnímány než podněty statické (kdy je štětec či štětička pouze přiložen k vyšetřovanému místu, ale nedochází k jejich pohybu). Při vyšetření je nutné zohlednit skutečnost, že citlivost není na všech částech těla identická. Plošky a dlaně vyžadují intenzivnější stimulaci (vzhledem ke zrohovatělé kůži), ochlupené

části těla naopak stimulaci méně intenzivní (z důvodu vysoké četnosti nervových zakončení v okolí vlasových folikulů). Senzitivita se poněkud liší i mezi proximálními a distálními částmi končetin a vyšší je např. také na krku. Kvalitativní metody poskytou hrubou informaci o anestézii či zřetelné hypestézii nebo naopak hyperestézii pro dotyk v postižené oblasti (většinou při využití komparačního principu s oblastí nepostiženou). Umožní hodnotit také **alodynii**, tj. vnímání senzitivního podnětu běžně nebolestivého charakteru jako podnětu bolestivého. Nejčastějším typem alodynne je mechanická dynamická alodynne (DMA) vyšetřitelná pomocí dynamických taktilních podnětů. Jejich vyvolání je závislé mj. na intenzitě aplikovaného dotyku. Pro testování DMA lze proto využít i **kalibrované nástroje** vyvolávající dotyk o definované intenzitě, např. kalibrovaný štětec (např. Somedic, Švédsko), jenž evokuje dotyk o tlakové síle přibližně 200–400 mN (obr. 1a, b), vatovou štětičku (působící tlakovou silou přibližně 100 mN) (obr. 1a) či vatový chomáč (s tlakovou silou jen asi 3 mN) [15,16]. Využití takových pomůcek testování pak představuje přechod k metodám semikvantitativním.

Vyšetření tlakové kožní citlivosti

Pro potřeby semikvantitativního a kvantitativního vyšetření kožní tlakové citlivosti jsou nejčastěji využívána **Semmes-Weinsteinova (Von Freyova) monofilamenta** (obr. 2a–f). Přestože jsou tato vlákna většinou uváděna jako metoda hodnocení taktilního cití, testují ve skutečnosti povrchový tlak, což je specifická modalita ne zcela identická s běžným významem termínu „dotyk“. Vlákna tohoto typu byla za účelem testování senzitivity poprvé použita v 60. letech 20. století psychology Florencem Semme-

sem a Sydney Weinsteinem, a to k diagnostice ztráty dotykového cití na horní končetině u pacientů po mozkovém traumatu [31]. Později byla široce využívána zejména v diagnostice diabetické polyneuropatie [32]. V současnosti je kvantitativní vyšetření těmito filamenti součástí komplexního protokolu testování senzitivity [15,16].

Při vlastním vyšetření je filamentum přiloženo kolmo na vyšetřovaný povrch (obvykle kůži) a následně je na jeho rukojeť vyvíjena tlaková síla působící ve směru dlouhé osy vlákna (a tedy stejná, jakou působí vlákno na kůži), dokud se filamentum nezačne prohýbat do tvaru písmene C (obr. 2b, f) [15,16,31,32]. Při pokračujícím ohybu vlákna zůstává již tato tlaková síla relativně konstantní. Jedná se o klíčovou charakteristiku, která každé z vláken definuje, a je odvozena zejména od jeho tloušťky, délky a tuhosti použitého materiálu. Při správném způsobu testování je vytvářen pouze přímý tlak vlákna na kůži v trvání přibližně 1–2 s. Nemělo by dojít k event. pohybu filamenta a tím k nežádoucí aktivaci receptorů reagujících na dynamickou složku takto aplikovaného podnětu.

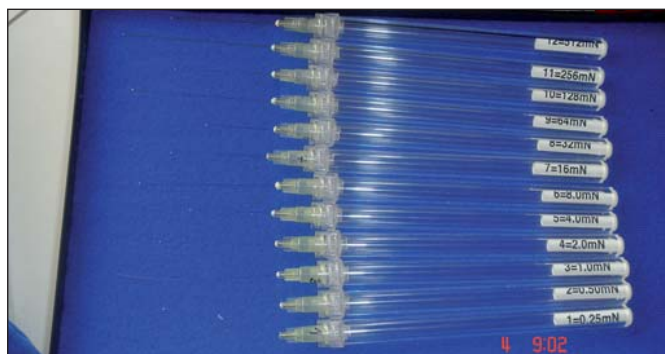
Existují standardní sady obsahující definovaný počet filament (např. 12, 20, event. i více) (obr. 2c, d). Mezi jednotlivými vlákny v sadě se tlaková síla nutná k jejich ohybu liší, a to určitým systematickým způsobem: např. každé silnější vlákno v sadě působí na vyšetřovaný povrch dvojnásobnou tlakovou silou oproti vláknu předcházejícímu (slabšímu) [15,16,32,33]. V běžně používaných sadách jsou k dispozici filamenta evokující tlakovou sílu v rozmezí od 0,25 (či dokonce 0,125) po 512 (případně 1024) mN (např. v systému Optihair vyráběném firmou Marstock NerveTest, Německo) (obr. 2b, d). Alternativně se k popisu vláken používá hmotnost, kterou je



Obr. 2a) Semmes-Weinsteinovo filamentum, vyrobené z nylonu (fy. Somedic).



Obr. 2c) Sada kalibrovaných filament, vyrobených z nylonu (fy. Somedic).



Obr. 2d) Sada kalibrovaných filament z optických vláken (fy. Marstock).



Obr. 2e) Neuropen, pomůcka, kombinující 10g filamentum s kalibrovaným špendlíkem.



Obr. 2b) Vyšetření Semmes-Weinsteinovým monofilamentem, vyrobeným z optických vláken (fy. Marstock).

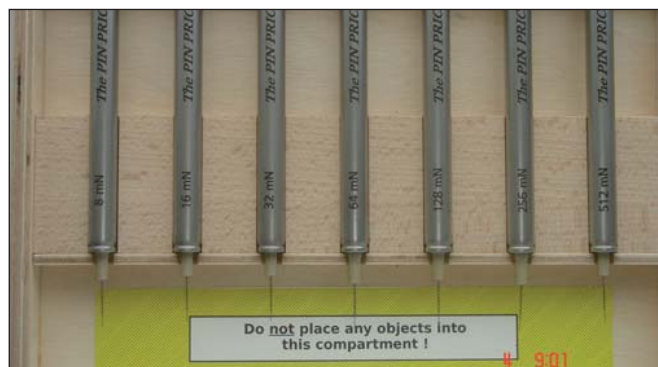


Obr. 2f) Vyšetření 10g filamentem, obsaženým v pomůcce Neuropen.

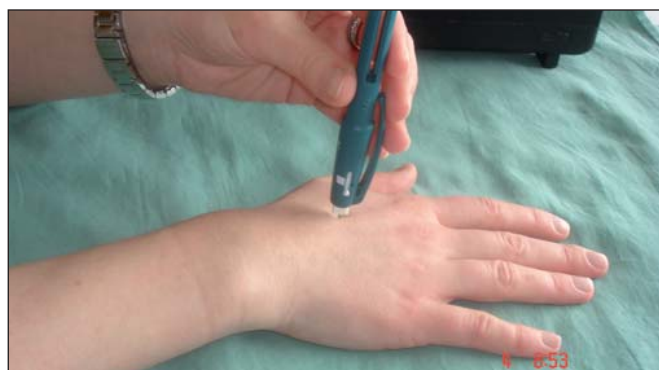
VYŠETŘENÍ SENZITIVITY



Obr. 3a) Vyšetření kalibrovaným špendlíkem.



Obr. 3b) Sada kalibrovaných špendlíků.



Obr. 3c) Vyšetření kalibrovaným špendlíkem, obsaženým v pomůcce Neuropen.



Obr. 3d) Kalibrovaný špendlík.

nutno působit na filamentum v příslušném směru, aby došlo k jeho prohnutí (např. Senselab Aesthesiometer, Somedic, Švédsko) (obr. 2a, c). Dle údajů výrobce druhého systému jsou oba typy vláken snadno kompatibilní. Pro převod na výše uvedenou tlakovou sílu je nutné pouze vynásobit zmíněnou hmotnost gravitačním zrychlením, jež má v našich zeměpisných šířkách hodnotu 9,81 ($m \times s^{-2}$). Práce zaměřené na srovnání obou systémů nebyly dle znalostí autorů dosud publikovány. Praktické zkušenosti však prokazují, že srovnatelnost obou systémů je limitována a příslušná vlákna z obou systémů, která by měla být srovnatelná, vyvolávají zře-

telně odlišný senzitivní vjem. Pro potřeby klinických studií nebo longitudinálního sledování pacientů lze proto jednoznačně doporučit konstantní používání jednoho systému.

Při **semikvantitativním** způsobu testování taktilní senzitivity se používá jen jedno **monofilamentum**, a to obvykle **10gramové**. Toto filamentum bylo zvoleno s ohledem na obecnou shodu, že ztráta protektivní citlivosti odpovídá neschopnosti vnímat dotyk vlákna této síly. Uvedený předpoklad byl potvrzen např. Litzelmanovou studií [34], v níž měli pacienti se ztrátou schopnosti vnímat dotyk 10gramového vlákna pětinašobně zvýšenou prav-

děpodobnost vzniku diabetických ulcerací na DKK. Princip metody zůstává stejný. Filamentum je přiloženo na kůži pacienta silou, která vyvolá jeho ohnutí do tvaru písmene C. U 10gramového filamenta odpovídá výsledná síla 5,07 mN. Při semikvantitativním vyšetření citlivosti s použitím tohoto vlákna je podnět obvykle aplikován opakovaně (3- až 10krát). Hodnocena je schopnost jej vnímat, vyjádřená většinou formou zlomku (reflektujícího počet percipovaných podnětů z počtu podnětů aplikovaných) či procentuálně. Existuje přitom řada možných způsobů vyšetření, které se liší počtem aplikovaných podnětů, vyšetřovanou lokalizací a sa-

možřejmě i souvisejícími normativními daty [32,35,36].

Desetigramové monofilamentum je pro semikvantitativní způsob vyšetření k dispozici také v rámci pomůcky označované jako Neuropen (Owen-Mumford Ltd., Oxford, UK) (obr. 2e, f), který kombinuje toto vlákno s kalibrovaným špendlíkem Neurotip™. V rámci vyšetření lze pak použít monofilamentum izolovaně (a aplikovat 10 podnětů v různých lokalizacích nejčastěji na plantární straně nohou, protože pomůcka je používána především v detekci diabetické polyneuropatie) nebo je možné využít současně kalibrovaný špendlík a monofilamentum, a to tak, že jsou v náhodném pořadí aplikovány podněty ostré (vyvolané píchnutím kalibrovaným špendlíkem) a tupé (evokované stimulací pomocí 10g monofilamenta) a úkolem pacienta je rozlišit tyto ostré (algické) a tupé (taktilní) podněty [35].

Cílem kvantitativního vyšetření tlakové kožní citlivosti pomocí sady **Semmes-Weinsteinových filament** je stanovení tzv. **senzitivního prahu pro tlakové kožní podněty** (tzv. Mechanical Detection Threshold, MDT) [15]. Při tomto způsobu testování začínáme obvykle od nejtenčích filament (a/nebo od filamenta vyvolávajícího tlakovou sílu přibližně na úrovni izolovaného 10g vlákna) a postupujeme k silnějším. Pacient je při každém dotyku vlákna na kůži dotázán, zda podnět cítí, a odpovídá „ano/ne“. Nejpřesněji lze práh stanovit jako geometrický průměr opakovaně detekovaných nadprahových a podprahových podnětů. Síla nejslabšího již percipovaného filamenta tak odpovídá první nadprahové hodnotě taktilního prahu (first suprathreshold value). Poté při vyšetření pokračujeme naopak sestupně slabšími filamenty k prvnímu již nepercipovanému vláknu, které představuje první podprahovou hodnotu (first infrathreshold value). Stejný postup je vhodné opakovat několikrát (optimálně pětkrát, čímž získáme celkem pět nadprahových a pět podprahových hodnot). Z takto stanovených hodnot je následně vypočítán geometrický průměr (tj. všech 10 získaných hodnot se vzájemně vynásobí a poté je vypočtena 10. odmocnina takového násobku), který představuje hledaný senzitivní práh [37]. Vyšetření se nejčastěji provádí na dorzu nohy nebo ruky, event. na obličeji (tab. 2) [16,22].

Vyšetření algické citlivosti pro ostrou, mechanicky vyvolanou bolest

Kvalitativní vyšetření algické citlivosti pro mechanické podněty je prováděno pomocí **nekalibrovaných špendlíků**. Vyšetřovaný subjekt je instruován, aby označil, zda podnět vnímá jako ostrý či nikoli. Vyšetření je většinou prováděno na akrálních částech končetin, i když hodnotit lze samozřejmě jakoukoli lokalizaci. Je však třeba zohlednit nutnost intenzivnější stimulace v místech se zrohovatělou kůží, jako jsou plošky nohou a dlaně. Při vyšetření je nutno používat sterilní pomůcky optimálně určené pro jednorázové použití, protože při stimulaci špendlíkem může dojít k porušení kožního povrchu a potenciálně k parenterálnímu přenosu infekčních agens.

Při kvalitativním vyšetření algických prahů je nutno vzít v úvahu také poměrně široký rozsah normální algické senzitivity v běžné populaci. Algické prahy a zejména senzitivita vůči algickým podnětům mají obecně zřetelně vyšší interindividuální variabilitu oproti prahům senzitivním. Podobná stimulace tak může být různými osobami vnímána různě od velmi bolestivé až po prakticky nebolestivou. Vzhledem k faktu, že aplikovaný podnět není v případě kvalitativního vyšetření standardizován, není navíc možné spolehlivé inter- ani intraindividuální srovnání tlakové percepce.

Semikvantitativní vyšetření algického čítí pro mechanicky vyvolanou bolest lze provádět pomocí **jednoho kalibrovaného špendlíku**, který je např. součástí pomůcky **Neuropen** (Owen-Mumford Ltd., Oxford, UK) (obr. 2e, 3c). Kalibrovaný špendlík v této sadě evokuje vpich o tíže 40g a má vyměnitelné sterilní nastavce pro jednorázové použití (tzv. neuropens). V Neuropenu je kombinován s monofilamentem pro vyšetření kožní tlakové senzitivity. V rámci vyšetření jsou pak v náhodném pořadí aplikovány podněty ostré (vyvolané píchnutím kalibrovaným špendlíkem) a tupé (evokované stimulací pomocí 10g monofilamenta). Úkolem pacienta je tyto typy podnětů od sebe rozpoznat (bliže viz vyšetření taktilního čítí) [35].

Kvantitativní vyšetření bolestivého čítí je prováděno pomocí **sady kalibrovaných špendlíků** (obr. 3a, b, d). Komerčně je k dispozici sada sedmi špendlíků, které vyvolají vpich o tlakové síle 8, 16, 32, 64, 128, 256 a 512 mN na ploše

o průměru 0,2 mm (MRC Systems GmbH, Heidelberg, Germany). S jejich pomocí lze stanovit práh pro mechanicky vyvolanou bolest (Mechanical Pain Treshold, MPT) a v rámci nadprahového testování také senzitivitu pro mechanicky vyvolanou bolest (Mechanical Pain Sensitivity, MPS). Vyšetření se provádí dotykem kalibrovaných špendlíků v testované lokalizaci, tj. nejčastěji na dorzu nohy (vnitřní hrana nohy nad palcem) nebo na dorzu ruky (nad m. interosseus dorsalis I) [15].

Při vyšetření algického prahu pro ostrou mechanicky vyvolanou bolest postupujeme od nejslabšího kalibrovaného špendlíku k silnějším s minimálním doporučeným rozestupem mezi jednotlivými podněty v trvání 2 s. Vyšetřovaná osoba je při každém podnětu dotázána, zda jej vnímá jako ostrý vjem nebo dotyk. Algický práh je pak nejpřesněji stanoven jako geometrický průměr opakovaně detekovaných nadprahových (tj. ostře vnímaných) a podprahových (neostře percipovaných) podnětů. Nejslabší stimulus, který je již percipován vyšetřovanou osobou jako ostrý vjem (nikoli dotyk), tak odpovídá prvnímu nadprahovému podnětu (first suprathreshold value). Po jeho dosažení pokračujeme ve vyšetření kalibrovanými špendlíky sestupně směrem ke slabším až k prvnímu podnětu, jenž již není percipován jako ostrý vjem. Ten představuje první podprahový podnět (first infrathreshold value). Podobně jako při vyšetření senzitivního prahu je toto testování opakováno několikrát (optimálně 5krát). Ze získaných 10 hodnot (pět nadprahových, pět podprahových) se vypočítá geometrický průměr, který představuje hledaný algický práh (metodika výpočtu viz výše v odstavci o kvantitativním vyšetření taktilního čítí) [15]. Publikovaná normativní data zohledňující vyšetřovanou lokalizaci, věk a pohlaví jsou uvedena v tab. 3.

Vedle stanovení algického prahu se dají kvantitativní nástroje pro vyšetření bolestivého čítí pro ostrou mechanicky vyvolanou bolest využít také k **nadprahovému testování**, tj. hodnocení tolerance a zejména **senzitivity pro mechanicky vyvolanou bolest** (Mechanical Pain Sensitivity, MPS). Při tomto způsobu testování vyšetřujeme pacienta jednotlivými kalibrovanými špendlíky v pseudonáhodném pořadí podle exaktního protokolu. Bolestivost podnětů vnímaných jako „ostré“ má pak pacient za úkol hodnotit pomocí

numerické škály bolesti (Numeric Rating Scale, NRS) o rozsahu 0–100, kde 0 představuje „žádnou bolest“ a 100 znamená „nejhorší pro pacienta představitelnou bolest“ (tab. 4) [15]. Vyšetření MPS lze spojit s kvantitativním hodnocením mechanické dynamické alodynzie (DMA) pomocí kalibrovaného štětce, štětičky a smotku vaty, které jsou opět v pseudonáhodném pořadí zařazeny do testovacího protokolu. Jejich percepce je také hodnocena pomocí NRS škály. Výskyt mechanické dynamické alodynzie lze pokládat za spolehlivou známku abnormity, která se u zdravých jedinců za fyziologických okolností prakticky nevyskytuje, a to konzistentně v žádném z publikovaných souborů zdravých kontrol [16,22].

Vyšetření termické a termoalgiecké kožní citlivosti

Kvalitativní vyšetření termické citlivosti se provádí pomocí zkumavek (Falcon Tubes) s teplou (45 °C) a studenou (10 °C) vodou nebo kovových válečků (metal thermorollers), které se před vyšetřením ohřejí či ochladí na požadovanou teplotu (20 °C a 40 °C). V případě, že dostupné technické vybavení neumožňuje přesně změřit teplotu pomůcky, orientuje se vyšetřující dotykem na vlastní kůži a ověří, že je rozdíl teplot obou zkumavek nebo válečků dostatečně velký, aby bylo možné je od sebe spolehlivě rozeznat. Současně by však teplota obou zkumavek (nebo válečků) měla být v rozmezí 10–45 °C, aby teplotní vjem nebyl pro vyšetřovaného jedince bolestivý a nedošlo k tepelnému poškození vyšetřované oblasti. Zkumavky jsou přikládány na kůži a pacient udává, zda podnět ve vyšetřované oblasti vnímá jako identický či více nebo méně chladný anebo teplý v porovnání s oblastí těla, kde předpokládáme nenarušené termické vnímání. Uvedeným způsobem lze orientačně vyšetřit výrazné změny tepelné citlivosti. Je možné stanovit i hranici čítí, a to pohybem zkumavky z méně citlivé oblasti do oblasti s lepší (normální) senzitivitou pro termické modality [1]. Identicky může být hranice čítí stanovena pohybem metalického válečku.

Pro lepší standardizaci aplikovaných podnětů a pro účely semikvantitativního testování termického čítí lze využít pomůcku Termopen (Tip Therm® GmbH, Brügggen, Germany) (obr. 4). Jedná se o jednoduchou pomůcku umožňující rychlé orientační vyšetření tepelného čítí



Obr. 4. Pomůcka pro vyšetření tepelného čítí (Tip Therm).

zejména pro chlad. Termopen má tvar válečku o délce 10 cm a průměru 1,5 cm. Je vyroben z plastového polymeru (chlorovaný polyvinylchlorid), který tvoří jeden z jeho konců, druhý konec je vyroben z kovu s vysokou tepelnou vodivostí (vysokolegovaná, tzv. austenitická nerezová ocel). Použití pomůcky je založeno právě na odlišné tepelné vodivosti obou jejích konců. Kontakt kůže s kovovým koncem vyvolá vzhledem k vysoké tepelné kondukcí chladný vjem, zatímco plastový konec (s minimální tepelnou vodivostí) vyvolá dojem neutrální až teplý. Při vyšetření přikládá lékař pacientovi do vyšetřované oblasti vždy střídavě kovový a plastový konec kolmo k povrchu kůže v náhodném pořadí. Doporučená doba kontaktu pomůcky s kůží pacienta je alespoň 3 s, aby byla zaručena dostatečná časová rezerva pro tepelnou kondukcí a související vyvolání termické percepce. Úkolem pacienta je určit, který ze dvou aplikovaných podnětů byl chladnější. Pacient by měl mít během vyšetření zavřené oči, aby byla vyřazena možnost vizuální kontroly aplikovaného podnětu [38].

Při semikvantitativním vyšetření je aplikován definovaný počet podnětů (většinou tři série párové aplikace chladného a teplého podnětu) a stanovuje se počet sérií, při nichž pacient správně určil kovový konec jako chladnější. Na DKK je za normu považováno dva a více správně stanovených podnětů ze tří, tzn. že abnormitou je nesprávné určení chladného podnětu u alespoň dvou ze tří aplikovaných sérií. V souboru 160 zdravých dobrovolníků však Ziegler et al zaznamenali na DKK výskyt dokonce tří nesprávných odpovědí ze tří aplikovaných u 8,6% jedinců, což poukazuje na relativně nízkou specifitu vyšetření [39].

Pro potřeby detailního testování percepce tepelných modalit byly vyvinuty kvantitativní metody testování termického prahu (Thermal Perception Threshold, TPT), které využívají počítačem asisto-

vané algoritmy. Tyto testy byly v ČSNN již opakovaně publikovány včetně dostupných normativních dat [17,18,30].

Vyšetření hluboké citlivosti (vibrace, propriocepce, hluboká tlaková bolest)

Vyšetření vibrační citlivosti

Mezi nejjednodušší kvalitativní metody umožňující hodnocení vibrační citlivosti patří vyšetření nekalibrovanou ladičkou (64Hz nebo 128Hz). Ladička se rozezvučí poklepem vidlice o podložku a následně se přiloží kolmo k povrchu těla patkou na vyšetřované místo. Vyšetřovaný subjekt je dotázán, zda vnímá vibrace, a v případě kladné odpovědi je eventuálně instruován, aby upozornil vyšetřujícího v okamžiku, kdy je vnímat přestane. Vyšetřující pak vedle obecné schopnosti vibrační percepce ve vyšetřovaném místě může hodnotit dobu, po kterou vyšetřovaný subjekt vibrace vnímá (vyjádřenou např. v sekundách). Může také testovat, zda na identickém (nebo odlišném) místě vlastního těla vnímá vibrace déle než vyšetřovaný subjekt a případně kvantifikuje o kolik sekund.

Vyšetření se obvykle provádí na tzv. kostních prominencích, tj. v místech, kde jsou kostní výstupky co nejbližší pod kůži s minimální vrstvou vymezené svalové, vazivové či tukové tkáně. Nejčastěji vyšetřovaným místem na horních končetinách je processus styloideus radii nebo ulnae [1,15,16], interfalangeální kloub palce nebo ukazováku [40], event. druhý metakarp [41]. Na dolních končetinách je obvykle vyšetřován kotník (vnitřní či vnější), případně tuberositas tibiae či dorzální strana interfalangeálního kloubu palce [1,15,41,42]. Testování se většinou provádí oboustranně [42].

Pokud je hodnocena pouze schopnost vyšetřovaného subjektu vnímat vibrace v příslušném místě nebo obecná schopnost vyšetřujícího vnímat vibrace déle než vyšetřovaný, jedná se o kvalitativní me-



Obr. 5a) Kalibrovaná ladička.



Obr. 6a) Kalibrovaný tlakoměr.



Obr. 6b) Vyšetření kalibrovaným tlakoměrem.



Obr. 5b) Vyšetření kalibrovanou ladičkou.

totu vyšetření citlivosti. Vyšetření je jednoduché a rychlé, ale neumožňuje kvantifikovat práh vnímání vibračního čítí a poskytují limitované možnosti pro hodnocení eventuálního vývoje nálezu při opakovaném vyšetření pacienta.

Metody hodnotící **trvání vibračního vjemu** (absolutně nebo relativně vůči vyšetřujícímu) poskytují již určitou možnost kvantifikace podnětů a dají se zařadit mezi testy **semikvantitativní**. Průměrná doba vnímání vibrací na kotníku je 10–15 s. Pokud je následně ladička rychle přiložena na odpovídající kontralaterální místo těla, lze tam fyziologicky vnímat vibraci dalších 3–5 s [1,42]. Trvání vibračního vjemu, vy-

ždřené v sekundách, je i součástí některých komplexních dotazníkových nástrojů zaměřených na diagnostiku neurologických onemocnění, jako je časná diabetická neuropatie. Takový test je obsažen např. v klinické části dotazníku Michigan Neuropathy Screening Instrument [40].

Nejjednodušším nástrojem ke **kvantifikaci vibračního čítí** je tzv. **graduovaná (kalibrovaná) ladička** o frekvenci 64 Hz nebo 128 Hz (Rydel-Seiffer tuning fork), která nese na koncích obou ramen vidlice indikátory (kalibrovaná závaží) (obr. 5a, b) [1,41,42]. Na každém z nich je znázorněn rovnoramenný trojúhelník se základnou na straně blíže patce ladičky a s vrcholem

směřujícím ke konci příslušného ramene vidlice a vedle něj stupnice o rozsahu od 0 (minimum, při základně trojúhelníku) do 8 (maximum, při vrcholu trojúhelníku). Po rozesevu ladičky vibrují její ramena s frekvencí 64 Hz nebo 128 Hz, což vyvolá optický dojem zdvojení trojúhelníků na indikátorech na konci každého ramene vidlice. Při postupně klesající amplitudě kmitání ramen vidlice dochází k protnutí „zdvojených“ trojúhelníků. Tento průnik opticky imponuje dojmem nového trojúhelníku o postupně narůstající výšce od základny směrem ke konci ramene vidlice, přičemž tento nárůst je v exponenciální závislosti na klesající amplitudě kmi-

tání vidlice. Výška tohoto prolínajícího se trojúhelníku se hodnotí pomocí stupnice v rozsahu 0–8, znázorněné na indikátoru vedle sledovaného trojúhelníku. Práh pro vnímání vibrací tak představuje hodnota na této stupnici, která je nejbližší aktuální výšce protínajícího se trojúhelníku v momentě, kdy vyšetřovaný subjekt verbálně avizuje, že přestal vnímat vibrace ladičky [1,42]. Hodnota prahu se vyjadřuje ve formě zlomku, jehož číselník představuje výše popsaná hodnota na kalibrované škále, při které subjekt přestal vibraci vnímat (např. 7), a jmenovatel je maximální dosažitelná hodnota stupnice (8). Čím vyšší je hodnota v čitateli zlomku, tím lépe vyšetřovaný subjekt vibrace vnímá (vibrační prahy se v tomto ohledu liší od ostatních modalit citlivosti, u nichž se zhoršující se senzitivitou pro příslušnou modalitu prahy naopak stoupají).

Při poruše propriocepce se hodnota vibračního prahu v čitateli adekvátně snižuje (např. 2/8 představuje palhypestézii), případně vyšetřovaný subjekt nevnímá ve vyšetřovaném rozsahu vibrační čítí vůbec (hodnota prahu je 0/8, což odpovídá palanestézii).

Vyšetření se většinou provádí oboustranně [42], a to v identických místech jako při vyšetření ladičkou nekalibrovanou (viz výše).

Zjištěné výsledky je vždy nutno hodnotit ve vztahu k normativním datům pro danou lokalizaci a při zohlednění fyziologických proměnných ovlivňujících výšku vibračního prahu (především věku vyšetřovaného subjektu a méně výrazně i pohlaví) (tab. 5a–c) [16,22,41,42].

Detailní kvantitativní stanovení prahu pro vibrační citlivost je možné také pomocí **vibroesteziometru**. Jedná se o počítačem asistovanou modalitu QST. Zařízení obsahuje vibrační sondu, která vibruje o frekvenci 100, resp. 120 Hz [30,42] a během vyšetření narůstá logaritmičtí amplituda podnětu v mikrometrech (μm). V těchto jednotkách je vyjádřen i výsledný vibrační práh. Detailní informace včetně normativních dat byly v ČSNN recentně publikovány [30].

Vyšetření propriocepce

Při hodnocení propriocepce jsou odděleně vyšetřovány dvě základní složky této modality, a to vnímání polohy (**polohocit – statestézie**) a pohybu příslušné části těla (**pohybocit – kinestézie**). Polohocit se kvalitativně vyšetřuje pasivním nastave-

ním polohy končetiny při zavřených očích. Pacient má za úkol tuto polohu napodobit na druhostranných končetinách nebo detailně popsat. Při kvalitativním vyšetření pohybocitu je prováděna změna polohy těla pasivním pohybem v určitém kloubu a úkolem pacienta je popsat směr pohybu. Nejčastěji je hodnoceno vnímání pohybu v interfalangeálním kloubu palce nohy, případně ruky [1]. Vyšetření pohybocitu na dalších prstech je méně časté, přičemž kromě izolovaného vyšetření jednotlivých prstů lze testovat i složitější funkce, např. pomocí duální stimulace se současnou změnou polohy či pohybem dvou prstů [43].

Semikvantitativně můžeme propriocepci hodnotit **kvantifikací rozsahu pohybu** v příslušném kloubu, který je již pacient schopen vnímat. Fyziologicky lze na prstech vnímat pohyb v interfalangeálním kloubu v rozsahu 5° , v rameni dokonce v rozsahu 1° [1]. Vnímání závisí mj. na rychlosti pohybu – proto je vhodné odděleně vyšetřovat pomalý a rychlý pasivní pohyb (při úhlové rychlosti $0,5\text{--}1^\circ$ nebo $10\text{--}30^\circ$ za sekundu). Schopnost vnímat rychlý pasivní pohyb mizí později [1].

Publikovány byly ojedinělé práce zaměřené na **kvantitativní** vyšetření propriocepce, a to prostřednictvím bedside metod využívajících **set polystyrenových koulí** (o objemu $126\text{--}505\text{ cm}^3$) [44], případně pomocí **počítačem asistovaných algoritmů** s využitím magnetických systémů, které sledují pohyb pomocí senzorů na vyšetřovaných končetinách [45]. Jedná se však vesměs o experimentální práce, jejichž vybavení není komerčně dostupné. Kvantitativní vyšetření propriocepce není ani součástí komplexního QST protokolu [15,16].

Vyšetření hlubokého tlaku a algické citlivosti pro hlubokou tlakovou bolest

Hluboký tlak lze **kvalitativně** vyšetřit **tlakem tupého předmětu** na vyšetřovanou oblast; hlubokou tlakovou bolest (deep pain) pak tlakem na sval či sevřením šlachy [1].

Kvantifikace senzitivního prahu pro hluboký tlak je obtížná, protože při percepci podnětu se iniciálně uplatňuje vnímání jeho taktilní složky a percepce této složky není zřetelně oddělena od složky tlakové.

Pro účely **kvantitativního** vyšetření hluboké tlakové bolesti je možné využít **kalibrovaný mechanický tlakoměr** (např. Wagner Instruments, Greenwich,

USA) (obr. 6a, b). Tento nástroj je patkou přiložen k vyšetřované oblasti (většinou svalovému bříšku např. na thenaru na ruce či nad m. extensor digitorum brevis na noze). Následně je jím na vyšetřovanou oblast vyvíjen kontinuální pozvolna narůstající tlak. Hodnotu tlaku, aktuálně vyvíjeného v rámci aplikovaného podnětu, lze odečíst na stupnici tlakoměru. Úkolem vyšetřovaného subjektu je upozornit na okamžik, kdy se změní charakter vnímaného podnětu a k původně tlakovému vjemu se přidá jiná složka (bolest, pálení apod.). Aktuální hodnota vyvíjeného tlaku v tomto okamžiku představuje **práh pro hlubokou tlakovou bolest** (Pressure Pain Threshold, PPT) [15]. Hodnoty tohoto parametru závisí významně na vyšetřované lokalizaci. Nejnižší jsou na obličeji, vyšší na ruce a nejvyšší na noze. U mladších věkových skupin (do 50 let) jsou závislé také na pohlaví (u žen jsou poněkud nižší), zatímco u starších pacientů nejsou rozdíly tohoto parametru v závislosti na pohlaví významné (tab. 6) [16,22].

Alternativním nástrojem k vyšetření hluboké tlakové citlivosti a bolesti vyvolané touto modalitou je **digitální tlakoměr** (Algometer firmy Somedic, Sweden), který představuje určitý přechod k přístrojově asistovaným metodám [46–48]. Princip vyšetření je podobný jako při použití mechanického kalibrovaného tlakoměru. Výhodou digitálního Algometru je větší diagnostická přesnost stanovení prahů ve srovnání s mechanickým tlakoměrem a také možnost použití nástavců o různém průměru ($0,5\text{--}2\text{ cm}^2$) umožňujících vyšetření tlakové citlivosti pro různě velké plochy [48].

Kromě detekce algických prahů slouží oba typy tlakoměrů ke stanovení senzitivity či tolerance pro hlubokou tlakovou bolest [46–48], a to analogickým způsobem, jakým jsou tyto parametry vyšetřovány u ostatních senzitivních modalit.

Shrnutí

Prezentovaná práce poskytuje komplexní přehled o možnostech vyšetření senzitivity. Toto testování je nepostradatelnou součástí klinického neurologického vyšetření, klíčovým prvkem diagnostického algoritmu neuropatické bolesti a důležitým nástrojem pro detailní charakteristiku pacientů v klinických i experimentálních studiích. Pro testování je nezbytná spolupráce a soustředění pacienta. Při

hodnocení výsledků vyšetření je nutné zohlednit řadu fyziologických proměnných, které mají vliv na senzitivní percepci. Jedná se zejména o testovanou lokalizaci, věk a pohlaví vyšetřovaného jedince. Používané metody lze podle náročnosti testování a přesnosti a informativnosti získaných výstupů dělit na kvalitativní, semikvantitativní a kvantitativní. V běžné klinické praxi se nejčastěji používají metody kvalitativní (nekalibrovaná štětka, ladička, špendlík, zkumavky s teplou a chladnou vodou). Tyto metody jsou finančně nenáročné a dostupné, poskytují ale jen zcela orientační informaci o hrubých poruchách citlivosti. Semikvantitativní metody umožňují standardizaci a částečnou kvantifikaci výsledků, což představuje jednoznačnou výhodu při longitudinálním sledování pacientů i jejich interindividuálním srovnání. Jejich použití je relativně jednoduché, a lze je tedy doporučit jako nejhodnější alternativu pro běžné klinické vyšetření. Patří sem např. 10gramové filamentum, kalibrovaný špendlík, Neuropen či Termopen. Kvantitativní metody (označované souhrnným termínem QST) jsou nezbytné pro účely detailní klinické charakteristiky pacientů pro potřeby studií (výzkumných i klinických) a diagnostiku neuropatie tenkých vláken. Poskytují přesné, kvantifikované výstupy a jsou dobře reprodukovatelné. Jsou však náročné z hlediska časového i finančního. Podle použitého vybavení je lze dělit na tzv. bedside metody (např. sady kalibrovaných vláken či špendlíků, kalibrovaná ladička a tlakoměr) a metody počítačem asistované (využívané zejména k hodnocení termické a termoalgiecké percepcie, event. vibračního cití). V současnosti je pro detailní kvantifikované vyšetření senzitivity nejčastěji využíván tzv. komplexní QST protokol (DFNS protokol) umožňující standardizované testování citlivosti pro řadu senzitivních modalit.

Literatura

- Bednařík J, Růžička E (eds). *Klinická neurologie. I. Část obecná*. Praha: Triton 2004; 167–198.
- Backonja MM, Attal N, Baron R, Bouhassira D, Drangholt M, Dyck PJ et al. Value of quantitative sensory testing in neurological and pain disorders: NeuPSIG consensus. *Pain* 2013; 154(9): 1807–1819. doi: 10.1016/j.pain.2013.05.047.
- Yarnitsky D. Quantitative sensory testing. *Muscle Nerve* 1997; 20(2): 198–204.
- Dyck PJ, O'Brien PC, Johnson DM, Klein CJ, Dyck PJ. Quantitative sensation testing. In: Dyck PJ, Thomas PK (eds). *Peripheral neuropathy*. 4th ed. Philadelphia: Elsevier 2005; 1063–1093.
- Cruccu G, Sommer C, Anand P, Attal N, Baron R, Garcia-Larrea L et al. EFNS guidelines on neuropathic pain assessment: revised 2009. *Eur J Neurol* 2010; 17(8): 1010–1018. doi: 10.1111/j.1468-1331.2010.02969.x.
- Garcia-Larrea L. Objective pain diagnostics: clinical neurophysiology. *Neurophysiol Clin* 2012; 42(4): 187–197. doi: 10.1016/j.neucli.2012.03.001.
- Valeriani M, Pazzaglia C, Cruccu G, Truini A. Clinical usefulness of laser evoked potentials. *Neurophysiol Clin* 2012; 42(5): 345–353. doi: 10.1016/j.neucli.2012.05.002.
- Baumgärtner U, Greffrath W, Treede RD. Contact heat and cold, mechanical, electrical and chemical stimuli to elicit small fiber-evoked potentials: merits and limitations for basic science and clinical use. *Neurophysiol Clin* 2012; 42(5): 267–280. doi: 10.1016/j.neucli.2012.06.002.
- Lefaucheur JP, Ahdab R, Ayache SS, Lefaucheur-Ménard I, Rouie D, Tebbal D et al. Pain-related evoked potentials: a comparative study between electrical stimulation using a concentric planar electrode and laser stimulation using a CO2 laser. *Neurophysiol Clin* 2012; 42(4): 199–206. doi: 10.1016/j.neucli.2011.12.003.
- Cruccu G, Pennisi E, Truini A, Iannetti GD, Romaniello A, Le Pera D et al. Unmyelinated trigeminal pathways as assessed by laser stimuli in humans. *Brain* 2003; 126(10): 2246–2256.
- Lauria G, Hsieh ST, Johansson O, Kennedy WR, Leger JM, Mellgren SI et al. European Federation of Neurological Societies/Peripheral Nerve Society Guideline on the use of skin biopsy in the diagnosis of small fiber neuropathy. Report of a joint task force of the European Federation of Neurological Societies and the Peripheral Nerve Society. *Eur J Neurol* 2010; 17(7): 903–912.
- Moravcová E, Bednařík J, Feit J, Sommer C. Hodnocení intraepidermální hustoty tenkých nervových vláken z kožní biopsie u pacientů s polyneuropatií. *Cesk Slov Neurol N* 2005; 68/101: 219–226.
- Tavakoli M, Petropoulos IN, Malik RA. Assessing corneal nerve structure and function in diabetic neuropathy. *Clin Exp Optom* 2012; 95(3): 338–347. doi: 10.1111/j.1444-0938.2012.00743.x.
- Krumova EK, Geber C, Westermann A, Maier C. Neuropathic pain: is quantitative sensory testing helpful? *Curr Diab Rep* 2012; 12(4): 393–402. doi: 10.1007/s11892-012-0282-7.
- Rolke R, Magerl W, Campbell KA, Schalber C, Caspari S, Birklein F et al. Quantitative sensory testing: a comprehensive protocol for clinical trials. *Eur J Pain* 2006; 10(1): 77–88.
- Rolke R, Baron R, Maier C, Tölle TR, Treede RD, Beyer A et al. Quantitative sensory testing in the German Research Network on Neuropathic Pain (DFNS): standardized protocol and reference values. *Pain* 2006; 123(3): 231–243.
- Moravcová E, Bednařík J. Počítačem asistované stanovení termického prahu. *Cesk Slov Neurol N* 2003; 66/99: 263–269.
- Moravcová E, Bednařík J, Svobodník A, Dušek L. Reproducibility of thermal threshold assessment in small-fibre neuropathy patients. *Scripta Medica (Brno)* 2005; 78(3): 177–184.
- Moloney NA, Hall TM, Doody CM. Reliability of thermal quantitative sensory testing: a systematic review. *J Rehabil Res Dev* 2012; 49(2): 191–207.
- Yarnitsky D, Sprecher E. Thermal testing: normative data and repeatability for various test algorithms. *J Neurol Sci* 1994; 125(1): 39–45.
- Geber C, Klein T, Azad S, Birklein F, Giethmühlen J, Hüge V et al. Test-retest and interobserver reliability of quantitative sensory testing according to the protocol of the German Research Network on Neuropathic Pain (DFNS): a multi-centre study. *Pain* 2011; 152(3): 548–556. doi: 10.1016/j.pain.2010.11.013.
- Magerl W, Krumova EK, Baron R, Tölle T, Treede RD, Maier C. Reference data for quantitative sensory testing (QST): refined stratification for age and a novel method for statistical comparison of group data. *Pain* 2010; 151(3): 598–605. doi: 10.1016/j.pain.2010.07.026.
- Blankenburger M, Boekens H, Hechler T, Maier C, Krumova E, Scherens A et al. Reference values for quantitative sensory testing in children and adolescents: developmental and gender differences in somatosensory perception. *Schmerz* 2010; 24(4): 380–382. doi: 10.1007/s00482-010-0943-x.
- Pfau DB, Krumova EK, Treede RD, Baron R, Tölle T, Birklein F et al. Quantitative sensory testing in the German Research Network on Neuropathic Pain (DFNS): reference data for the trunk and application in patients with chronic postherpetic neuralgia. *Pain* 2014; 155(5): 1002–1015. doi: 10.1016/j.pain.2014.02.004.
- Shaffer SW, Harrison AL. Aging of the somatosensory system: a translational perspective. *Phys Ther* 2007; 87(2): 193–207.
- Bartley EJ, Fillingim RB. Sex differences in pain: a brief review of clinical and experimental findings. *Br J Anaesth* 2013; 111(1): 52–58. doi: 10.1093/bja/aet127.
- Konopka KH, Harbers M, Houghton A, Kortekaas R, van Vliet A, Timmerman W et al. Bilateral sensory abnormalities in patients with unilateral neuropathic pain: a quantitative sensory testing (QST) study. *PLoS One* 2012; 7(5): e37524. doi: 10.1371/journal.pone.0037524.
- Haanpää M, Attal N, Backonja M, Baron R, Bennett M, Bouhassira et al. NeuPSIG guidelines on neuropathic pain assessment. *Pain* 2011; 152(1): 14–27. doi: 10.1016/j.pain.2010.07.031.
- Westermann A, Rönau AK, Krumova E, Regehr S, Schwenkreis P, Rolke R et al. Pain-associated mild sensory deficits without hyperalgesia in chronic non-neuropathic pain. *Clin J Pain* 2011; 27(9): 782–789. doi: 10.1097/AJP.0b013e31821d8fce.
- Buršová Š, Vlčková E, Hnojčíková M, Němec M, Mičanková Adamová B, Bednařík J. Přístrojově asistované kvantitativní testování senzitivity – normativní data. *Cesk Slov Neurol N* 2012; 75/108(4): 444–453.
- Semmes J, Weinstein S, Ghent L, Teuber HL. Performance on complex tactual tasks after brain injury in man: analyses by locus of lesion. *Am J Psychol* 1954; 67(2): 220–240.
- Feng Y, Schlösser FJ, Sumpio BE. The Semmes Weinstein monofilament examination as a screening tool for diabetic peripheral neuropathy. *J Vasc Surg* 2009; 50(3): 675–682. doi: 10.1016/j.jvs.2009.05.017.
- Fruhstorfer H, Gross W, Selbmann O. Von Frey hairs: new materials for a new design. *Eur J Pain* 2001; 5(3): 341–342.
- Litzelman DK, Marriott DJ, Vinicor F. Independent physiological predictors of foot lesions in patients with NIDDM. *Diabetes Care* 1997; 20(8): 1273–1278.
- Paisley AN, Abbott CA, van Schie CH, Boulton AJ. A comparison of the Neuropen against standard quantitative sensory-threshold measures for assessing peripheral nerve function. *Diabet Med* 2002; 19(5): 400–405.
- Slater RA, Koren S, Ramot Y, Buchs A, Rapoport MJ. Pilot study on the significance of random intrasite placement of the Semmes-Weinstein monofilament.

Diabetes Metab Res Rev 2013; 29(3): 235–238. doi: 10.1002/dmrr.2388.

37. Baumgartner U, Magerl W, Klein T, Hopf HC, Tredede RD. Neurogenic hyperalgesia versus painful hypoalgesia: two distinct mechanisms of neuropathic pain. *Pain* 2002; 96(1–2): 141–151.

38. Viswanathan V, Snehalatha C, Seenaa R, Ramachandran A. Early recognition of diabetic neuropathy: evaluation of a simple outpatient procedure using thermal perception. *Postgrad Med J* 2002; 78(923): 541–542.

39. Ziegler D, Siekierka-Kleiser E, Meyer B, Schweers M. Validation of a novel screening device (NeuroQuick) for quantitative assessment of small nerve fiber dysfunction as an early feature of diabetic polyneuropathy. *Diabetes Care* 2005; 28: 1169–1174.

40. Feldman EL, Stevens MJ, Thomas PK, Brown MB, Canal N, Greene DA. A practical two-step quantitative clinical and electrophysiological assessment for

the diagnosis and staging of diabetic neuropathy. *Diabetes Care* 1994; 17(11): 1281–1289.

41. Hiltz MJ, Axelrod FB, Hermann K, Haertl U, Duetzsch M, Neundörfer B. Normative values of vibratory perception in 530 children, juveniles and adults aged 3–79 years. *J Neurol Sci* 1998; 159(2): 219–225.

42. Martina IS, van Koningsveld R, Schmitz PI, van der Meché FG, van Doorn PA. Measuring vibration threshold with a graduated tuning fork in normal aging and in patients with polyneuropathy. *European Inflammatory Neuropathy Cause and Treatment (INCAT) group. J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1998; 65(5): 743–747.

43. Beckmann YY, Çiftçi Y, Ertekin C. The detection of sensitivity of proprioception by a new clinical test: the dual joint position test. *Clin Neurol Neurosurg* 2013; 115(7): 1023–1027. doi: 10.1016/j.clineuro.2012.10.017.

44. Kalisch T, Kattenstroth JC, Kowalewski R, Tegenhoff M, Dinse HR. Age-related changes in the

joint position sense of the human hand. *Clin Interv Aging* 2012; 7: 499–507.

45. Leibowitz N, Levy N, Weingarten S, Grinberg Y, Karniel A, Sacher Y et al. Automated measurement of proprioception following stroke. *Disabil Rehabil* 2008; 30(24): 1829–1836. doi: 10.1080/09638280701640145.

46. Mainka T, Bischoff FS, Baron R, Krumova EK, Nicolas V, Pennekamp W et al. Comparison of muscle and joint pressure-pain thresholds in patients with complex regional pain syndrome and upper limb pain of other origin. *Pain* 2014; 155(3): 591–597. doi: 10.1016/j.pain.2013.12.014.

47. Carvalho B, Zheng M, Aiono-Le Tagaloa L. Evaluation of experimental pain tests to predict labour pain and epidural analgesic consumption. *Br J Anaesth* 2013; 110(4): 600–606. doi: 10.1093/bja/aes423.

48. Somedic Algometer – Technical Specifications. [online] Available from: <http://en.somedic.com/default.asp?pid=37>.



as. MUDr. Eva Vlčková, Ph.D.

Odb. as. MUDr. Eva Vlčková, Ph.D., promovovala na Lékařské fakultě brněnské Masarykovy univerzity s vyznamenáním v roce 2000 a byla oceněna Cenou rektora Masarykovy univerzity pro nejlepší absolventy MU. Stejnou cenu obdržela v roce 2011 za dizertační práci na téma „Neuropatie tenkých vláken – komplexní diagnostika a etiologie“. Již v pregraduálním období se v rámci studentské vědecké činnosti úspěšně věnovala výzkumným projektům na Neurologické klinice LF MU a FN Brno, kde od promoce navázala doktorandským studiem oboru neurologie. Dlouhodobě se věnuje výzkumu neuropatické bolesti a její diagnostiky. Společně se školitelem prof. MUDr. Josefem Bednářkem, CSc. se podílela na zavedení prvních metod kvantitativního testování senzitivity v ČR v období let 1999–2000 a na zavedení metody vyšetření intraepidermální hustoty tenkých nervových vláken z kožní biopsie (v letech 2002–2003), a to ve spolupráci s Univerzitní klinikou ve Wuerzburgu (Německo), kde absolvovala dlouhodobou zahraniční stáž (2005). Podílí se na výukové činnosti neurologické kliniky – od roku 2010 pracuje jako odborná asistentka na LF MU a ve Středoevropském technologickém institutu (CEITEC MU). Je autorkou či spoluautorkou 26 odborných článků v českých a zahraničních časopisech a více než 80 publikovaných abstraktů. Její práce byly opakovaně oceněny Českou neurologickou společností ČLS JEP (Hennerova cena pro mladé autory do 35 let za vynikající originální práci roku 2008, cena ČNS za vynikající originální práci roku 2009). Počet citací dle Web of Science k 30. 6. 2014 (bez autocitací) je 192, H-index 6. V letech 2000–2011 byla spoluřešitelkou několika grantových projektů. Od roku 2012 je hlavní řešitelkou grantového projektu IGA MZ ČR s názvem Specifické charakteristiky neuropatické bolesti centrálního a periferního typu. Ve spolupráci s prestižními pracovišti v Německu, Rakousku, Francii a Izraeli se podílí na výzkumu nekódujících mRNA v patogenezi neuropatické bolesti v rámci grantového projektu 7. rámcového programu Evropské unie.

16. Škorňa M, Kopacik R, Vlckova E, Adamova B, Kostalova M, Bednarik J. *Small nerve fiber pathology in critical illness documented by serial skin biopsies. Muscle Nerve* 2015;52(1):28-33. IF = 2,713. Počet citací v SCI: 11.

Práce je zaměřena na objektivizaci postižení tenkých nervových vláken u pacientů s polyneuropatií (resp. polyneuromyopatií) kriticky nemocných. Souboru pacientů kritickém stavu (bez předchozích rizikových faktorů pro rozvoj periferní neuropatie a bez známek takového postižení v začátku sledování) byl vyšetřen v úvodu rozvoje kritického stavu (bezprostředně po těžkém iktu) a sledován v dalším průběhu onemocnění, který byl u většiny pacientů komplikován rozvojem sepse či multiorgánového selhání. Součástí iniciálního i kontrolního vyšetření (o 10-14 dní později) bylo klinické vyšetření, detailní došetření za účelem objektivizace rozvoje sepse (tedy infekčních komplikací a/nebo systémové zánětlivé odpovědi) a/nebo multiorgánového selhání v rámci kritického stavu, a také vyšetření elektromyografické (objektivizující rozvoj polyneuropatie silných vláken a/nebo myopatie), hodnocení spektrální analýzy variability srdeční frekvence (SAHRV) a kožní biopsie s objektivizací hustoty intraepidermálních tenkých nervových vláken (IENFD). S výjimkou 3 pacientů (z nichž u 2 nebyl stav komplikován sepsí či multiorgánovým selháním) došlo u všech pacientů při kontrolním vyšetření k vysoce signifikantnímu tj. více než 50% poklesu IENFD při kontrolním vyšetření. U více než poloviny pacientů sledovaného souboru se rozvinuly také známky postižení silných nervových vláken a/nebo myopatie. Necelých 20 % pacientů vykazovalo také elektrofyziologicky potvrzenou signifikantní autonomní dysfunkci. Tyto nálezy prokazují, že postižení tenkých nervových vláken (často současně s postižením vláken silných a/nebo myopatií) je frekventní součástí multisystémového postižení v rámci polyneuromyopatie kriticky nemocných a může u části z nich vést k rozvoji bolestivé polyneuropatie.

Komentovaná studie tak zpřesňuje rozsah možných změn, k nimž může docházet v rámci kritického stavu, kde mohou být příčinou řady komplikací (např. autonomní dysfunkce či následné neuropatické bolesti u těchto pacientů). Současně rozšiřuje spektrum možných etiologických faktorů neuropatie tenkých vláken (a periferní neuropatické bolesti), což je vhodné reflektovat v rámci diferenciální diagnostiky.

SMALL-NERVE-FIBER PATHOLOGY IN CRITICAL ILLNESS DOCUMENTED BY SERIAL SKIN BIOPSIES

MIROSLAV SKORNA, MD,¹ ROMAN KOPACIK, MD,¹ EVA VLCKOVA, MD, PhD,² BLANKA ADAMOVA, MD, PhD,² MILENA KOSTALOVA, PhD,² and JOSEF BEDNARIK, MD, PhD²

¹Department of Neurology, University Hospital Brno, Brno, Czech Republic

²Central European Institute of Technology, Masaryk University, Kamenice 5, 62500 Brno, Czech Republic

Accepted 9 October 2014

ABSTRACT: *Introduction:* Small-fiber pathology can develop in the acute phase of critical illness and may explain chronic sensory impairment and pain in critical care survivors. *Methods:* Eleven adult ischemic stroke patients in a neurocritical care unit were enrolled in an observational cohort study. Intraepidermal nerve fiber density (IENFD) in the distal leg was assessed on admission to the intensive care unit and 10–14 days later, together with electrophysiological testing. *Results:* Of the 11 patients recruited, 9 (82%) had sepsis or multiple-organ failure. Median IENFD on admission (5.05 fibers/mm) decreased significantly to 2.18 fibers/mm ($P < 0.001$), and abnormal IENFD was found in 6 patients (54.5%). Electrodiagnostic signs of large-fiber neuropathy and/or myopathy were found in 6 patients (54.5%), and autonomic dysfunction was found in 2 patients (18.2%). *Conclusion:* Serial IENFD measurements confirmed the development of small-fiber sensory involvement in the acute phase of critical illness.

Muscle Nerve 000:000–000, 2015

Critical illness polyneuropathy (CIP), critical illness myopathy (CIM), and their combination, critical illness polyneuromyopathy, are recognized and clearly defined conditions that are often encountered in critically ill patients. They probably represent dysfunction or failure of the neuromuscular system as part of multiple-organ failure (MOF).^{1–4} In addition to flaccid quadriplegia, difficulty in weaning from mechanical ventilation, and sensory loss, critical illness survivors may develop neuropathic pain.^{5,6} In a recent series of patients with acute respiratory distress syndrome evaluated 6–24

months after discharge from the intensive care unit (ICU), one-third reported various combinations of pain, paresthesias, and impaired exercise ability in the absence of nerve conduction study (NCS) abnormalities.⁶ These findings appeared to indicate small-fiber neuropathy, but this hypothesis was not confirmed, as skin biopsy that may have documented any degeneration of intraepidermal nerve fibers (IENF) was not performed.⁷

Degeneration of IENF has been described in other painful neuropathies, including those with predominantly large-fiber involvement, such as Guillain-Barré syndrome^{8–11} and chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy.¹² Recently, a series was reported of 14 adult neurocritical care patients on artificial ventilation with no previous history of neuromuscular diseases or associated risk factors who developed sepsis or MOF.¹³ Skin biopsy performed on ICU days 18–24 showed severe and non-length-dependent loss of IENF that indicated the development of small-fiber pathology in the acute phase of critical illness, thus providing evidence that critical illness also gives rise to small-nerve-fiber degeneration in the early phases of the disease. This evidence was, however, based on a single cross-sectional evaluation during the acute stage of critical illness without clear evidence of normal pre-morbid IENF density (IENFD) values. With respect to the non-length-dependent pattern of IENF degeneration on skin biopsy, the investigators hypothesized that critical illness may affect dorsal root ganglion neurons.¹³

To confirm the development of small-fiber loss in the acute stage of critical illness, we prospectively monitored organ dysfunction or failure and neurological status and performed serial skin biopsy and electrophysiological evaluation in a series of neurocritical care patients.

METHODS

Recruitment. Patients with ischemic stroke admitted to the ICU of the Department of Neurology at University Hospital Brno, Czech Republic, between April 1 and December 31, 2013, were screened and recruited consecutively. Inclusion criteria were: age ≥ 18 years; available for recruitment and examination within 72 hours of stroke onset; dysfunction or failure of at least 2 organs or systems

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Abbreviations: ADQ, abductor digiti quinti muscle; CAM-ICU, confusion assessment method for the intensive care unit; CIM, critical illness myopathy; CIP, critical illness polyneuropathy; CMAP, compound muscle action potential; EMG, electromyography; HRV, heart rate variability; ICU, intensive care unit; IENF, intraepidermal nerve fibers; IENFD, intraepidermal nerve fiber density; MOF, multiple-organ failure; NCS, nerve conduction study; NRS, numerical rating scale; SAHRV, spectral analysis of heart rate variability; SAPS, simplified acute physiology score; SOFA, sequential organ failure assessment; TP, total power

Key words: critical illness; small fibers; polyneuropathy; myopathy; skin biopsy

This study was supported by the Central European Institute of Technology (CZ.1.05/1.1.00/02.0068), a project of the European Regional Development Fund, by the Ministry of Health of the Czech Republic project for conceptual development in research organizations, Ref. No. 65269705 (University Hospital Brno, Brno, Czech Republic), and by Student Projects Support Grants at Masaryk University (Specific Research), grant no. MUNI/A/0935/2013.

Correspondence to: J. Bednarik; e-mail: jbednar@fnbrno.cz

© 2014 Wiley Periodicals, Inc.
Published online 00 Month 2014 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI 10.1002/mus.24489

[admission sequential organ failure assessment (SOFA) total score ≥ 2 ; that is, at least 2 organ scores ≥ 1]¹⁴; and a Simplified Acute Physiology Score (SAPS) III on admission of 35–70 (corresponding to a predicted hospital mortality of 4–55%).^{15,16} Exclusion criteria included: any previously known neuromuscular disease or condition indicating risk for peripheral neuropathy; any previously identified disease of the brain (previous stroke, trauma) or spinal cord; or inability to be involved in electrophysiological investigations and/or skin biopsy on admission; and inability to provide informed consent, or circumstances that prevented a valid waiver.

After recruitment, patients underwent electromyography and nerve conduction studies (EMG/NCS), and those with findings of neuropathy and/or myopathy were excluded from further follow-up in this study. Patients who survived at least 14 days after the onset of critical illness, were accessible for daily evaluation and final electrophysiological and skin biopsy examination, and spent at least 7 days in the ICU were included in the final assessment.

Ethics Statement. The study was approved by the ethics committee of the School of Medicine, Masaryk University Brno (doctoral project “Neurological Complications of Critical Illness”). Because some patients were in states of altered consciousness at ICU admission, the ethics committee allowed personal consent to be waived in these cases. Detailed written information was provided to the family members about the study protocol, the need for minimally invasive skin biopsy, the safety of the technique, and the need for follow-up visits. At follow-up, written informed consent was obtained from the patients if they had regained mental capacity. All clinical investigations were conducted in accordance with the principles expressed in the Declaration of Helsinki and its later amendments.

Clinical Assessment. Recruited patients were examined clinically within 24 hours of ICU admission and then daily until final examination 13–15 days after admission (on the day of final skin biopsy and electrophysiological examination).

Daily assessment included:

- Detailed neurological examination, including sensory function and muscle strength (scored as Medical Research Council sum score of 6 muscles bilaterally, range 0–60)¹⁷ in cooperative patients.
- Evaluation of consciousness using the Glasgow Coma Scale and the confusion assessment method for the ICU (CAM-ICU).^{18,19}

- Development of sepsis defined in terms of current recommendations: the presence of both infection and systemic inflammatory response.²⁰
- Dysfunction or failure of organs or systems using the SOFA score¹⁴; MOF was diagnosed as failure of 2 or more organs or systems (i.e., individual organ SOFA score of 3 or 4).

Electrophysiological Examination. EMG/NCS were performed on admission and at the end of the follow-up (i.e., on the same day as skin biopsy in both cases) and included examination of 2 motor (median and fibular) and sensory (median and sural) nerves bilaterally and needle EMG of the tibialis anterior muscles bilaterally. Other nerves or muscles were examined as necessary. Repetitive stimulation of motor nerves was performed at the beginning of all NCS examinations to exclude neuromuscular transmission disturbances due to administration of neuromuscular blocking agents. We performed repetitive motor nerve stimulation on the ulnar nerve at the wrist with the compound motor action potential (CMAP) recorded from the abductor digiti quinti (ADQ) muscle or on the median nerve recorded from the thenar muscles, if the amplitude of the CMAP from ADQ was below normal. We used a train of 6–10 electrical stimuli of supramaximal intensity at 2 Hz. A decrement in CMAP amplitude of $>10\%$ (fourth or fifth response compared with the first) was considered to indicate possible neuromuscular blockade, and precluded further electrophysiological investigation. In addition to standard parameters, quantitative analyses of motor unit potentials in patients capable of cooperation and direct muscle stimulation in non-capable patients were done at the final examination (from the right tibialis anterior muscle).⁴ The presence of neuropathy, myopathy, or neuromyopathy was established by using our own laboratory normative values and currently recommended criteria for the diagnosis of CIP and CIM.³ Normative values for selected conduction study parameters are given in Table S1 (refer to Supplementary Material, available online).

Autonomic dysfunction was evaluated using spectral analysis of heart rate variability (SAHRV). The recording of R-R intervals and evaluation of heart rate variability (HRV) were performed using a VarCor PF7 microcomputer-based diagnostic system (Dimeia Group, Olomouc, Czech Republic), which enables routine short-term assessment of time and frequency in the HRV domain. The examination was performed at rest in the supine position. Short R-R interval recordings (15 minutes in each patient) were used for SAHRV evaluation. The SAHRV calculation was carried out by Fast Fourier Transformation with a partial variant of

coarse graining spectral analysis²¹ that facilitates optimal suppression of non-harmonics and noise components of the signal, particularly in the low-frequency domain. The basic parameter calculated is the power spectral density (PSD; in ms^{-2}) of the frequency components separated. Summation of all PSDs in a defined frequency range is expressed as the spectral power of the low-frequency band (LF power 0.05–0.15 Hz) or high-frequency band (HF power 0.15–0.40 Hz). Their summation, termed total power (TP 0.05–0.40 Hz), is considered the most reliable parameter representing SAHRV. SAHRV was performed on admission and at the end of the follow-up period on the patients who were eligible for this testing, those in sinus rhythm without significant arrhythmia, and/or without a cardiac pacemaker. Our own laboratory normative values were applied for the assessment of abnormality in SAHRV.²²

Skin Biopsy. Skin punch biopsies were taken from the distal calf, approximately 10 cm above the lateral malleolus. Performing additional skin biopsies at proximal sites was considered unacceptable by the ethics committee. The initial skin biopsy was taken from the right limb, and the subsequent biopsy from the left. The procedure was performed under sterile conditions after local anesthesia with 1% trimecaine hydrochloride (Mesocain; Zentiva, Prague, Czech Republic). A single suture was used to approximate the wound edges. Upon removal, the skin specimens were fixed in 4% phosphate-buffered paraformaldehyde (pH 7.4) for 3–4 hours and cryoprotected in 10% sucrose at 4°C overnight. Afterwards, the skin samples were embedded in Tissue-Tek, frozen in 2-methylbutane cooled in liquid nitrogen, and stored at -80°C until further processing. Sections were cut on a sliding microtome and immunostained with rabbit polyclonal antibodies to human protein gene product 9.5 (1:200; Ultraclone, Wellow, UK) as primary antibody and goat anti-rabbit IgG labeled with a fluorescein probe as secondary antibody (1:100; Chemicon, Temecula, California).²³ The intraepidermal nerve fibers were counted manually at 630 \times magnification using an optical microscope (Leica DMLB). Images of the skin sections were taken with an attached camera (Leica DFC 480) at a resolution of 5 megapixels. The epidermal length of skin section was measured with calibrated software (ImageJ). The average IENFD per millimeter of epidermal length was calculated in accordance with current guidelines.²⁴ The entire epidermal length of 3 non-adjacent sections was evaluated in each patient. To maintain reliability of results, all samples were counted by a

single observer unaware of the clinical data (R.K.) and then re-evaluated by another reviewer (E.V.).

We used both our own laboratory normative values, obtained from a smaller sample of individuals by immunofluorescence,²⁵ and those collected in a larger group of individuals using bright-field immunohistochemistry,²⁶ adjusted for age and gender for assessment.

Therapy. Patients received standard treatment for ischemic stroke, including systemic, intra-arterial, and mechanical thrombolysis, as well as non-specific symptomatic therapy. Because of the possible effect of hyperglycemia upon development of CIP and CIM, all patients received intensive insulin therapy in order to normalize blood glucose levels.

Long-Term Follow-Up. Six months after admission we interviewed our patients or their relatives by phone regarding development of symptoms of painful polyneuropathy. We asked about the presence of positive sensory symptoms, their distribution, quality, time course, and intensity using an 11-item numerical rating scale (NRS).

Data Presentation. On the whole, the data were not normally distributed, so they are reported as median values and minimum-maximum ranges. The differences in IENFD and SAHRV values between admission and final examination were evaluated using the Wilcoxon matched-pairs test.

RESULTS

During the study period, 83 patients were recruited. After detailed discussion with family members and examination of clinical charts, 64 were excluded due to prior history of risk factors for neuromuscular disease (mostly diabetes mellitus, which was observed in 36 patients); and 5 subjects were excluded for abnormal NCS/EMG findings on admission examination that suggested peripheral neuropathy. A complete study admission examination, including skin biopsy, was performed in 14 patients.

Two patients were not available for final examination, and 1 patient died in the follow-up period. Thus, 11 patients (3 women, 8 men), with a median age of 70 years (range 59–79), having undergone a complete admission examination (performed mostly on day 1 after admission, range 1–3 days) and a final examination (performed between 13 and 15 days after admission), were included in the final analysis.

The demographic, clinical, and electrophysiological characteristics of the 11 patients finally analyzed are presented in Table 1. Median ICU stay was 10 days (range 7–15 days). Four patients (36.7%) needed mechanical ventilation, 5 developed MOF (45.5%), and 8 showed signs of sepsis

Table 1. Patients' characteristics.

Patient no.	Gender, age (years)	SAPS 3 score*	SOFA score*	Maximum SOFA score	Days with MOF	Days with sepsis	Days with delirium	EMG/nerve conduction findings [†]
1	M, 59	60	4	7	0	2	2	Neuropathy (axonal sensorimotor)
2	M, 59	47	2	4	0	0	0	Normal
3	W, 72	49	2	5	0	1	1	Normal
4	W, 79	41	3	3	0	0	1	Normal
5	M, 56	40	8	8	3	1	2	Myopathy
6	M, 71	50	4	4	2	0	3	Normal
7	M, 69	45	2	2	0	4	— [‡]	Myopathy
8	M, 70	44	3	5	2	9	— [‡]	Normal
9	M, 79	63	5	5	2	2	14	Neuropathy (axonal sensorimotor)
10	W, 66	59	11	12	14	4	— [‡]	Neuropathy (axonal sensorimotor) + myopathy
11	M, 79	56	2	2	0	0	2	Neuropathy (sensory)

M, man; W, woman; SAPS, Simplified Acute Physiology Score; SOFA, sequential organ failure assessment; MOF, multiple-organ failure.

*Score on admission examination.

[†]Findings on final examination.

[‡]Not assessed due to Richmond Agitation and Sedation Scale -4 to -5.

(72.7%). Episodes of delirium also occurred, as detected by CAM-ICU in 7 patients (median 2 days, range 1–14 days). Detailed selected laboratory data assessed daily are given in Table S2 (refer to Supplementary Material online). Due to an intensified insulin therapy regimen the serum fasting glucose rarely exceeded 10 mmol/L.

Electrophysiological examination on admission was normal in all 11 patients. Final NCS/EMG analysis disclosed signs of neuropathy in 4 patients (axonal sensorimotor polyneuropathy in 3 and sensory neuropathy in 1), and signs of myopathy in 3 patients (in association with neuropathy in 1; Table 1). Altogether, electrophysiological signs of large-fiber CIP or CIM were found in 6 patients (54.5%). Detailed NCS and needle EMG results obtained on admission and final examinations are given in Table S3a and b (refer to Supplementary Material online). Flaccid quadriplegia during the follow-up period was present in 3 patients with sensorimotor CIP and 1 patient with myopathy. Sensory deficit in a bilateral distribution and not attributed to stroke was present on examination in 1 patient with sensorimotor neuropathy and in a patient with sensory neuropathy; sensory deficits were absent in 1 patient and could not be assessed in another with sensorimotor polyneuropathy due to inability to cooperate adequately for the examination.

IENFD values obtained on admission and final examination are presented in Table 2. The final skin biopsy showed a significant decrease in median IENFD values, and the proportion of patients with abnormal IENFD values increased from 2 patients (18.2%) to 6 patients (54.5%) using our own normal limits,²⁵ and from 4 patients (36.4%) to 8 patients (72.7%) using Lauria's nor-

mal limits,²⁶ from admission to final examination (Table 2).

SAHRV could not be evaluated in 5 patients because of cardiac arrhythmia present on admission to ICU (usually atrial fibrillation). In all 6 patients examined for the presence of autonomic dysfunction, all SAHRV parameters on admission examination were normal, whereas, on final examination, TP was abnormal in 2 of 6 patients (33.3%); the difference between admission and final examination, however, was not significant (Table 2).

Two of 7 interviewed patients (patients 3 and 10) confirmed that 6 months post-stroke they had symmetrical chronic pain present for at least 3 months in both lower extremities (1 patient) or in all extremities (1 patient), graded as at least grade 4 (NRS), and described as having a burning or painful cold quality. One patient (patient 3) showed small-fiber sensory loss on the final IENFD evaluation without clear signs of large-fiber CIP or CIM on electrophysiological evaluation, and patient 10 showed signs of both IENFD reduction and large-fiber CIP.

DISCUSSION

This study extends a previous report of IENF degeneration based on 1-time IENFD measurements performed about 3 weeks after ICU admission in a series of 14 neurocritical care patients with prolonged mechanical ventilation and ICU confinement.¹³ In association with sensory small-fiber impairment, patients also showed signs of autonomic dysfunction, large-fiber axonal neuropathy, and acute myopathy, confirming that neuromuscular alterations in critical illness together with critical illness encephalopathy are not isolated

Table 2. Skin biopsy and SAHRV findings.

Patient no.	MOF and/or sepsis	Day of admission skin biopsy*	Skin biopsy		SAHRV		
			IENFD (admission exam) fibers/mm (our own normal limits ²⁵ /limits according to Lauria ²⁶)	Interval between admission and final skin biopsy	IENFD (final exam) fibers/mm (normal limits)	SAHRV—total power (admission exam, in ms ²)	SAHRV—total power (final examination, in ms ²)
1	Yes	3	4.344 (5.1/3.5)	10	2.136 (5.1/3.5)	113.99	33.50
2	No	1	3.13 (5.1/3.5)	13	0.651 (5.1/3.5)	349.20	207.37
3	Yes	1	4.042 (2.7/2.2)	11	2.179 (2.7/2.2)	892.52	258.01
4	No	1	5.725 (2.7/2.2)	13	5.557 (2.7/2.2)	ND	ND
5	Yes	2	5.821 (5.1/3.5)	13	5.539 (5.1/3.5)	ND	ND
6	Yes	1	2.679 (3.1/2.1)	14	0.902 (3.1/2.1)	8758	109.68
7	Yes	1	5.221 (3.1/2.8)	13	2.923 (3.1/2.8)	ND	ND
8	Yes	1	6.27 (3.1/2.1)	11	2.575 (3.1/2.1)	15,732	16.20
9	Yes	2	1.48 (3.1/2.1)	12	0.479 (3.1/2.1)	ND	ND
10	Yes	1	5.051 (2.7/3.2)	14	2.085 (2.7/3.2)	30,088	26.98
11	No	1	9.773 (3.1/2.1)	13	9.445 (3.1/2.1)	ND	ND
Median (min-max)			5.05 1.48–9.77	13 (10–14)	2.18 (0.48–9.44), P = 0.0033 [†]	316.9 (87.6–892.5)	132.9 (27.0–258.0), P = 0.116 [†]

Abnormal IENFD according to Lauria²⁶ are given in italics. Abnormal IENFD and SAHRV values according to our own values^{22,25} are given in **bold italics**. ND, not done, due to cardiac arrhythmia; MOF, multiple-organ failure; IENFD, intraepidermal nerve fiber density; SAHRV, spectral analysis of heart rate variability.

*Day 1 means 24 hours after ICU admission.

[†]P-value expresses the significance of the difference between the median value on admission and on final exam.

and exceptional events complicating critical illness, but they may well be an integral element of multiple-organ dysfunction and failure in critically ill patients.

IENFD is considered to be a valid marker of sensory small-fiber degeneration and loss, and reduction of IENFD has been described as a marker for both isolated small-fiber neuropathy and mixed small- and large-fiber involvement in several chronic conditions, such as diabetic neuropathy,^{27,28} as well as in acute inflammatory neuropathies, such as Guillain-Barré syndrome.^{8–11}

CIP is typically an acute axonal polyneuropathy involving large sensory and motor fibers. Some critical illness survivors, however, have neuropathic pain with no signs of large-fiber polyneuropathy on electrophysiological examination and are suspected to have sensory small-fiber neuropathy.⁶ Although our study, similar to another recently published study,¹³ excluded individuals with neuromuscular disease, risk factors for neuropathy, or electrophysiological findings of neuropathy, 2 of the 11 patients who completed follow-up had abnormally decreased IENFD on admission evaluation. These findings could be explained by pre-morbid small-fiber neuropathy due to some unknown risk factor, such as prediabetes, diabetes, or excessive alcohol intake. Nevertheless, despite these pitfalls on IENFD evaluation in critically ill patients, a convincing and significant decrease in the average IENFD values and increase in proportion of patients with abnormal IENFD values has

been demonstrated here that, in our view, represents evidence for degeneration of IENF during the acute phase of critical illness.

Signs of CIP are known to develop as early as several days from the onset of critical illness.^{29,30} Latronico *et al.* detected signs of IENF degeneration 3 weeks after ICU admission,¹³ and our study showed a drop in IENFD as early as 2 weeks after the onset of critical illness. Both in the Latronico *et al.* series and in our study group, degeneration of IENF was usually associated with signs of CIP or CIM. Two of the Latronico *et al.* patients¹³ and 3 patients from our cohort (patients 2, 3, and 6, see tables) showed signs of SFN without CIP or CIM. Development of painful neuropathy in patient 3 suggests that early IENFD loss could predict development of symptomatic small-fiber painful neuropathy in critically ill patients, even in the absence of large-fiber CIP. Involvement of sensory small fibers, irrespective of the type of involvement (non-length-dependent sensory neuronopathy or length-dependent sensory small-fiber neuropathy) thus seems to be common, appearing both as an isolated condition and in association with large-fiber neuropathy or myopathy, and developing within 2 weeks of critical illness and sepsis.

Latronico *et al.*¹³ found signs of sepsis and/or MOF in all but 1 patient and, with respect to a non-length-dependent pattern of sensory small-fiber involvement, they hypothesized that the small-fiber loss is a result of sensory neuronopathy due to involvement of dorsal root ganglia, a

consequence of sepsis and a part of the more widespread neuromuscular failure involved in MOF. We found signs of sepsis or MOF in 8 of 11 patients. Although the pathophysiological role of sepsis in the development of IENF degeneration seems highly probable, it should be noted that small- or large-fiber neuropathy occurred in 2 of 3 patients without sepsis and MOF. It is thus not possible to confirm the causality of any associated risk factor in such a small cohort of patients.

A major limitation of this study is the small patient sample and the absence of younger individuals, a result of the strict inclusion criteria (the high prevalence of diabetes mellitus in stroke patients played a role here). The absence of a control group was compensated for by serial evaluation with the initial examination serving as control. We did not evaluate IENFD from a proximal site to confirm a non-length-dependent pattern of involvement; however, this finding was clearly documented by Latronico *et al.*¹³ Our study focused mainly on the acute stage of critical illness, but after 6 months we were able to document development of neuropathic pain in 2 of 11 patients who underwent final evaluation. Both had shown small-fiber involvement within 2 weeks of development of critical illness.

Future studies should use serial skin biopsies to follow the development of the disease together with the effects of potential treatment and should evaluate larger samples of non-neurological critical care patients, including younger individuals and those without sepsis and MOF, to investigate further the pathophysiology of small-fiber degeneration in critical illness. A controlled, observational study is presently underway investigating severe sepsis patients with serial skin biopsies at onset of sepsis and then 14 days and 2 months later. The study is scheduled to conclude in 2015.³¹

REFERENCES

- Bolton CF, Laverty DA, Brown JD, Witt NJ, Hahn AF, Sibbald WJ. Critically ill polyneuropathy: electrophysiological studies and differentiation from Guillain-Barré syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1986;149:563–573.
- Lacomis D, Zochodne DW, Bird SJ. Critical illness myopathy. *Muscle Nerve* 2000;23:1785–1788.
- Latronico N, Bolton CF. Critical illness polyneuropathy and myopathy: a major cause of muscle weakness and paralysis. *Lancet Neurol* 2011;10:931–941.
- Bednarik J, Lukas Z, Vondracek P. Critical illness polyneuropathy: the electrophysiological components of a complex entity. *Intensive Care Med* 2003;29:1505–1514.
- Latronico N, Shehu I, Seghelini E. Neuromuscular sequelae of critical illness. *Curr Opin Crit Care* 2005;11:381–390.
- Angel MJ, Bril V, Shannon P, Herridge MS. Neuromuscular function in survivors of the acute respiratory distress syndrome. *Can J Neurol Sci* 2007;34:427–432.
- Sommer C, Lauria G. Skin biopsy in the management of peripheral neuropathy. *Lancet Neurol* 2007;6:632–642.
- Seneviratne U, Gunasekera S. Acute small fibre sensory neuropathy: another variant of Guillain-Barré syndrome? *J Neurol Neurosurg, Psychiatry* 2002;72:540–542.
- Pan CL, Tseng TJ, Lin YH, Chiang MC, Lin WM, Hsieh ST. Cutaneous innervation in Guillain-Barré syndrome: pathology and clinical correlations. *Brain* 2003;126:386–397.
- Martinez V, Fletcher D, Martin F, Orlikowski D, Sharshar T, Chauvin M, *et al.* Small fibre impairment predicts neuropathic pain in Guillain-Barré syndrome. *Pain* 2010;151:53–60.
- Ruts L, van Doorn PA, Lombardi R, Haasdijk ED, Penza P, Tulen JH, *et al.* Unmyelinated and myelinated skin nerve damage in Guillain-Barré syndrome: correlation with pain and recovery. *Pain* 2012;153:399–409.
- Chiang MC, Lin YH, Pan CL, Tseng TJ, Lin WM, Hsieh ST. Cutaneous innervation in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Neurology* 2002;59:1094–1098.
- Latronico N, Filosto M, Fagoni N, Ghezzi L, Guarneri B, Todeschini A, *et al.* Small nerve fiber pathology in critical illness. *PLoS One* 2013;8:e75696.
- Vincent JL, Moreno R, Takala J, Willatts S, De Mendonça A, Bruining H, *et al.* The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. *Intensive Care Med* 1996;22:707–710.
- Metnitz PGH, Moreno RP, Almeida E, Jordan B, Bauer P, Campos RA, *et al.* SAPS 3—from evaluation of the patient to evaluation of the ICU. Part 1. Objectives, methods and cohort description. *Intensive Care Med* 2005;31:1336–1344.
- Moreno RP, Metnitz PGH, Almeida E, Jordan B, Bauer P, Campos RA, *et al.* SAPS 3—from evaluation of the patient to evaluation of the ICU. Part 2. Development of a prognostic model for hospital mortality at ICU admission. *Intensive Care Med* 2005;31:1345–1355.
- Kleyweg RP, Meche FG, Schmitz PI. Interobserver agreement in the assessment of muscle strength and functional abilities in Guillain-Barré syndrome. *Muscle Nerve* 1991;14:1103–1109.
- Ely EW, Inouye S, Bernard GL, Gordon S, Francis J, May L, *et al.* Delirium in mechanically ventilated patients: Validity and reliability of the Confusion Assessment Method for the Intensive Care Unit (CAM-ICU). *JAMA* 2001;286:2703–2710.
- Mitasova A, Kostalova M, Bednarik J, Michalcakova R, Kasperek T, Balabanova P, *et al.* Post-stroke delirium incidence and outcomes: validation of the CAM-ICU. *Crit Care Med* 2012;40:484–490.
- Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, Bion J, Parker MM, Jaeschke R, *et al.* Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Intensive Care Med* 2008;34:17–60.
- Yamamoto Y, Hungson RL, Peterson JC. Autonomic control of heart rate during exercise studied by heart rate variability spectral analysis. *J Appl Physiol* 1991;71:1136–1142.
- Vlčková E, Bednarik J, Buršová Š, Šajgalíková K, Mlčáková L. [Spectral analysis of heart rate variability—normative data]. *Cesk Slov Neurol N* 2010;73/106:663–672.
- Vlčkova-Moravcova E, Bednarik J, Dušek L, Toyka KV, Sommer C. Diagnostic validity of epidermal nerve fiber densities in painful sensory neuropathies. *Muscle Nerve* 2008;37:50–60.
- Lauria G, Cornblath DR, Johansson O, McArthur JC, Mellgren SI, Nolano M, *et al.* EFNS guidelines on the use of skin biopsy in the diagnosis of peripheral neuropathy. *Eur J Neurol* 2005;12:747–758.
- Buršová Š, Vlčková E, Hnojčíková M, Němec M, Dubový P, Mičánková Adamová B, *et al.* [Intraepidermal nerve fiber density assessment in skin biopsy—normative values]. *Cesk Slov Neurol N* 2012;75/108:455–459.
- Lauria G, Bakkens M, Schmitz C, Lombardi R, Penza P, Devigili G, *et al.* Intraepidermal nerve fiber density at the distal leg: a worldwide normative reference study. *J Periph Nerv Syst* 2010;15:202–207.
- Smith AG, Ramachandran P, Tripp S, Singleton JR. Epidermal nerve innervation in impaired glucose tolerance and diabetes-associated neuropathy. *Neurology* 2001;57:1701–1704.
- Divisova S, Vlčkova E, Hnojčíkova M, Skorma M, Nemeč M, Dubový P, *et al.* Prediabetes/early diabetes-associated neuropathy predominantly involves sensory small fibres. *J Periph Nerv Syst* 2012;17:341–350.
- Tennilä A, Salmi T, Pettilä V, Roine RO, Varpula T, Takkunen O. Early signs of critical illness polyneuropathy in ICU patients with systemic inflammatory response syndrome or sepsis. *Intensive Care Med* 2000;26:1360–1363.
- Bednarik J, Vondráček P, Dusek L, Moravcova E, Cundrle I. Risk factors for critical illness polyneuropathy. *J Neurol* 2005;252:343–351.
- Axer H, Grimm A, Porzelius C, Teschner U, Schumacher U, Witte OW, *et al.* Impairment of small somatic and autonomic nerve fibres in intensive care unit patients with severe sepsis and critical illness polyneuropathy—a single center controlled observational study. *BMC Neurol* 2013;13:159.

17. Šrotová I, Vlčková E, Straková J, Kincová S, Adamová B, Dušek L, Jarkovský J, Bednařík J. Validace české verze komplexního protokolu kvantitativního testování senzitivity. *Cesk Slov Neurol N* 2015a; 78/111(4): 442-452. IF = 0,209. Počet citací v SCI: 3.

Práce je zaměřena na validaci české verze tzv. komplexního protokolu kvantitativního testování senzitivity (QST), vytvořeného německou multicentrickou skupinou DFNS (Rolke et al. 2006). Tento komplexní protokol zahrnuje hodnocení široké škály algických i nealgických senzitivních modalit a je v současnosti velmi široce využíván pro detailní fenotypizaci pacientů ve většině publikovaných studií zaměřených na neuropatickou bolest. Protokol obsahuje složité slovní instrukce, které je pro dosažení standardizovaného výstupu nutné přesně následovat, což implikuje nutnost validace jeho jazykových mutací. Z těchto důvodů byla v rámci publikované studie vytvořena a následně validována česká jazyková verze instrukcí k protokolu a byla ověřena platnost publikovaných normativních dat (Magerl et al. 2010) pro českou populaci.

Pro potřeby validační studie byly pomocí české verze standardizovaných slovních instrukcí vyšetřeny větší soubory zdravých dobrovolníků a pacientů s periferní či centrální neuropatickou bolestí. Pro hodnocení spolehlivosti bylo u některých jedinců testování provedeno opakovaně (4x) s přibližně 30 denními rozestupy mezi jednotlivými vyšetřeními. Vyšetření celého protokolu bylo pacienty hodnoceno jako nenáročné či málo náročné. V souboru zdravých dobrovolníků spadalo 94 % zjištěných hodnot jednotlivých senzitivních parametrů na HKK a 95 % na DKK do rozsahu fyziologických nálezů podle publikovaných normativních dat. Alespoň jedna abnormita z hodnocených senzitivních modalit byla zachycena u 90 % pacientů s neuropatickou bolestí. Shluková analýza umožnila identifikaci dvou symptomových profilů, z nichž jeden většinově odpovídal bolestivé diabetické neuropatii a druhý centrální bolesti při roztroušené skleróze. Reliabilita jednotlivých modalit hodnocená pomocí Cronbachova alfa se pohybovala v rozmezí 0,593 – 0,926.

V souhrnu česká jazyková verze komplexního QST protokolu prokázala velmi dobrou praktickou použitelnost a nízkou subjektivní náročnost vyšetření. Jedná se o spolehlivý test s vysokou vnitřní konzistencí a dobrou opakovatelností všech hodnocených parametrů. Na rozdíl od hodnocení symptomových profilů vytvořených na základě NPSI lze senzitivní profily stanovené na základě QST protokolu využít m.j. pro odlišení centrální a periferní neuropatické bolesti. Práce také prokázala, že publikovaná normativní data (Magerl et al. 2010) jsou dobře využitelná v české populaci.

Validace české verze komplexního protokolu kvantitativního testování senzitivity

Validation of the Czech Version of the Quantitative Sensory Testing Protocol

Souhrn

Úvod: Komplexní protokol kvantitativního testování senzitivity (QST), zahrnující hodnocení široké škály modalit termické, algické, taktilní a vibrační citivosti, je často využívaným nástrojem pro kvantifikaci senzitivity a hodnocení tzv. senzitivního profilu, zejména u pacientů s neuropatickou bolestí. Protokol obsahuje složité slovní instrukce, které je pro dosažení standardizovaného výstupu nutné přesně následovat, což implikuje nutnost validace jeho jazykových mutací. *Soubor a metodika:* Pomocí české verze standardizovaných slovních instrukcí ke komplexnímu QST protokolu bylo vyšetřeno 75 zdravých dobrovolníků, 68 pacientů s periferní neuropatickou bolestí při diabetické neuropatii a 59 jedinců s centrální neuropatickou bolestí při roztroušené skleróze, a to vždy na HKK i DKK. Pro hodnocení spolehlivosti bylo u 26 jedinců testování provedeno opakovaně (4x) s přibližně 30denními rozestupy mezi jednotlivými vyšetřeními. **Výsledky:** Vyšetření pomocí české verze komplexního QST protokolu bylo pro pacienty nenáročné či málo náročné. V souboru zdravých dobrovolníků spadalo 94 % zjištěných hodnot jednotlivých senzitivních parametrů na HKK a 95 % na DKK do rozsahu fyziologických nálezů podle publikovaných normativních dat. Alespoň jedna abnormita z hodnocených senzitivních modalit byla zachycena u 90 % pacientů s neuropatickou bolestí. Shluková analýza umožnila identifikaci dvou symptomových profilů, z nichž jeden většinou odpovídal bolestivé diabetické neuropatii a druhý centrální bolesti při roztroušené skleróze. Reliabilita jednotlivých modalit hodnocená pomocí Cronbachova alfa se pohybovala v rozmezí 0,593–0,926. **Závěr:** Česká jazyková verze komplexního QST protokolu prokázala velmi dobrou praktickou použitelnost pro hodnocení širokého spektra senzitivních abnormit a nízkou subjektivní náročnost vyšetření. Jedná se o spolehlivý test s vysokou vnitřní konzistencí a dobrou opakovatelností všech hodnocených parametrů.

Abstract

Background: Quantitative sensory testing (QST) following the protocol of the German Research Network on Neuropathic Pain (DFNS) is frequently used for the evaluation of sensory profiles in neuropathic pain patients. It covers a broad spectrum of sensory modalities using both nociceptive and non-nociceptive thermal and mechanical stimuli. The protocol requires the use of standardized instructions and thus necessitates validation of each language version. *Material and methods:* The standardized instructions for DFNS-QST protocol were translated using the forward-backward translation method and validated in a group of patients suffering from neuropathic pain of peripheral (n = 68) or central origin (n = 59) due to painful diabetic polyneuropathy or multiple sclerosis, and in a group of healthy volunteers (n = 75). The testing was repeated four times (with one-month interval between examinations) in 26 individuals to determine test-retest reliability. **Results:** In a group of healthy volunteers, 95% of values across all the parameters were within the physiological range based on published normal data. At least one sensory abnormality was found in 90% of neuropathic pain patients. Cluster analysis identified two distinctive pain profiles, the first mostly consisted of patients with painful diabetic neuropathy and the second of patients with pain in multiple sclerosis. Repeated administration confirmed an acceptable test-retest reliability (Cronbach's alpha of 0.59–0.93 for the different sensory modalities). **Conclusion:** The Czech version of DFNS-QST protocol instructions displayed a good practical applicability in evaluating sensory abnormalities in neuropathic pain patients, acceptable reliability and high internal consistency of the findings. The protocol provides results comparable to the original language version and can be recommended as an easy-to-apply and suitable testing method.

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.

**I. Šrotová^{1,2}, E. Vlčková^{1,2},
J. Straková¹, S. Kinclová^{1,2},
B. Adamová^{1,2}, L. Dušek³,
J. Jarkovský³, J. Bednařík^{1,2}**

¹ Neurologická klinika LF MU a FN Brno

² CEITEC – Středoevropský technologický institut, MU, Brno

³ Institut biostatistiky a analýz, LF a PřF MU, Brno



MUDr. Eva Vlčková, Ph.D.
Neurologická klinika
LF MU a FN Brno
Jihlavská 20
625 00 Brno
e-mail: evlckova@email.cz

Přijato k recenzi: 11. 5. 2015

Přijato do tisku: 22. 6. 2015

Klíčová slova

neurologické vyšetření – senzitivní práh – algický práh – kvantitativní testování – neuropatická bolest – diabetická neuropatie – roztroušená skleróza

Key words

neurological examination – sensory threshold – pain threshold – quantitative evaluation – neuropathic pain – diabetic neuropathy – multiple sclerosis

Úvod

Detailní vyšetření senzitivity je podle aktuálních doporučení [1–3] jednou z klíčových součástí diagnostického procesu neuropatické bolesti a slouží zejména k vytvoření tzv. senzitivního profilu pacienta s neuropatickou bolestí, který pomáhá odhalit patofyziologické mechanismy jejího vzniku. Kvantitativní testování senzitivity (Quantitative Sensory Testing; QST) je přitom vhodnější než orientační kvalitativní vyšetření vzhledem k možnosti přesnějšího hodnocení míry postižení dané senzitivní modalit, detekci méně vyjádřených či subklinických změn, lepším možností interindividuálního srovnání i longitudinálního sledování vývoje jednotlivých vyšetřovaných senzitivních modalit [3]. V současnosti je v diagnostice neuropatické bolesti nejčastěji využíván komplexní standardizovaný QST protokol, zavedený německou pracovní skupinou pro výzkum neuropatické bolesti (Der Deutsche Forschungsverbund Neuropathischer Schmerz (DFNS), The German Research Network on Neuropathic Pain) [4–6]. Protokol zahrnuje vyšetření senzitivních prahů pro termické modality (tepla a chladu včetně schopnosti jejich diskriminace), mechanickou kožní citlivost a vibrační cití, algických prahů pro tepelné modality (tepla a chladu), ostrou (mechanicky vyvolanou) bolest a hlubokou tlakovou bolest. Umožňuje také vyšetření mechanické dynamické alodynie a fenoménu časové sumace v percepce bolestivých podnětů. Reflektuje tedy funkci silných (A-beta) i tenkých nervových vláken (A-delta i C). Aktuálně je téměř bezvýhradně využíván ve studiích zaměřených

na neuropatickou bolest. V nich poskytuje detailní klinickou charakteristiku sledovaných pacientů, definici podskupin pacientů s různými senzitivními profily (a tedy předpokládanou odlišnou patofyziologií rozvoje neuropatické bolesti) a hodnocení terapeutického efektu preparátů využívaných v její léčbě, kde umožňuje mj. izolované sledování vlivu podávaného preparátu na jednotlivé její symptomy (např. hyperalgezií, alodynii apod.).

DFNS protokol obsahuje složité slovní instrukce pro testování jednotlivých hodnocených modalit. Pro dosažení standardizovaného výstupu je nutné tyto instrukce přesně následovat, což implikuje nutnost validace jeho jazykových mutací.

Cílem studie bylo vytvoření české jazykové verze instrukcí ke komplexnímu DFNS QST protokolu a jejich validace.

Soubor

Do studie byly zařazeny dvě skupiny pacientů: (A) pacienti s periferní či centrální neuropatickou bolestí (jako klinickým projevem diabetické polyneuropatie či roztroušené sklerózy) vyšetřovaní na Neurologické klinice LF MU a FN Brno a (B) zdraví dobrovolníci, bez přítomné nociceptivní či neuropatické bolesti či neurologického onemocnění podmiňujícího možnou lézi nebo onemocnění somatosenzitivního nervového systému jako možný příčinný faktor jejího vzniku [7]. Vstupním kritériem pro oba soubory byla dobrá spolupráce pacienta, ochota k zařazení do studie a absence kognitivního deficitu. Všichni zařazení jedinci byli informováni o účelu vyšetření a podepsali

informovaný souhlas. Protokol vyšetření byl schválen etickou komisí FN Brno.

Skupina A

Do souboru pacientů s neuropatickou bolestí bylo zařazeno 127 jedinců s diabetickou polyneuropatií nebo roztroušenou sklerózou (tab. 1). Diagnóza neuropatické bolesti byla u nich expertně stanovena na základě podrobného rozboru anamnestických dat a recentně validované české verze NPSI dotazníku (Neuropathic Pain Symptom Inventory; NPSI_{cz}) [8]. Léze nebo onemocnění somatosenzitivního nervového systému (jejichž přítomnost je dle současných doporučení vyžadována pro stanovení diagnózy neuropatické bolesti [7]) byla potvrzována pomocí klinického a EMG vyšetření u pacientů s periferní neuropatickou bolestí u diabetické polyneuropatie (Painful Diabetic Peripheral Neuropathy; pDPN; soubor A1, 68 pacientů, tab. 1) a/nebo pomocí klinického vyšetření, somatosenzitivních evokovaných potenciálů a MR vyšetření mozku a event. C či Th míchy u pacientů s centrální neuropatickou bolestí při roztroušené skleróze (Pain in Multiple Sclerosis; pMS; soubor A2, 59 pacientů, tab. 1). Základní diagnóza (polyneuropatie a/nebo roztroušená skleróza) byla stanovena v souladu s aktuálními diagnostickými kritérii [9,10].

Skupina B

Skupinu zdravých dobrovolníků tvořilo 75 jedinců (tab. 1). Vylučovacími kritérii pro zařazení do studie byly: 1. přítomnost akutní či chronické bolesti neuropatické či nociceptivní, 2. známá přítomnost polyneuropatie, onemocnění centrálního nervového systému či bolesti radikulárního původu, 3. anamnestická přítomnost rizikových faktorů periferních neuropatií (zejména diabetu mellitu, chronického abúzu alkoholu či stavu po aplikaci chemoterapie v anamnéze), a/nebo 4. abnormální nález při klinickém neurologickém vyšetření (korelující s postižením periferních nervů nebo kořenů na HKK či DKK nebo s postižením centrálního nervového systému).

Metodika

Validace QST protokolu probíhala ve FN Brno od prosince 2013 do listopadu 2014.

Validaci předcházelo získání DFNS certifikátu pro provádění komplexního QST protokolu dvěma členy autorského kolektivu (IŠ + EV) v návaznosti na absolvované školení v prováděných metodách na jednom ze

Tab. 1. Základní charakteristika souboru.

Charakteristika ¹	A1, pDPN (n = 68)	A2, pMS (n = 59)	B, kontroly (n = 75)	p ²
pohlaví				
muži	39 (57,4 %)	9 (16,1 %)	25 (33,3 %)	< 0,001
ženy	29 (42,6 %)	47 (83,9 %)	50 (66,7 %)	
věk – spojitě	61 (41; 73)	42 (27; 56)	30 (23; 63)	< 0,001
věk – kategorie				
≤ 45 (n = 99)	7 (10,3 %)	38 (67,9 %)	54 (72,0 %)	< 0,001
> 45 (n = 100)	61 (89,7 %)	18 (32,1 %)	21 (28,0 %)	

¹ Absolutní a relativní četnosti pro data kategoriální; medián doplněný o 5.–95.% percentil pro data spojitá.

² Fisherův přesný test pro data kategoriální, Kruskalův-Wallisův test pro data spojitá.

pDPN – bolestivá diabetická polyneuropatie (painful Diabetic Peripheral Neuropathy), pMS – bolest při roztroušené skleróze (pain in Multiple Sclerosis).

dvou školících pracovišť DFNS skupiny (a to na Ruhr-Universität v Bochumi, Německo) v prosinci 2013.

Česká verze standardizovaných instrukcí pro provádění kompletního vyšetření, které jsou školícími pracovišti administrvány v originální německé a validované anglické verzi, byla vytvořena metodou forward-backward translation.

Před vlastním QST vyšetřením podstoupili všichni zařazení pacienti i zdravé kontroly detailní anamnestické a klinické neurologické vyšetření. U pacientů s neuropatickou bolestí bylo toto vyšetření součástí diagnostického procesu základního onemocnění a neuropatické bolesti jako takové a bylo zaměřeno mj. na konfirmaci léze somatosenzitivního nervového systému.

U zdravých kontrol bylo cílem úvodního vyšetření naopak potvrzení absence vylučujících kritérií pro zařazení do studie, zejména vyloučení akutní či chronické bolesti a známek léze nebo onemocnění somatosenzitivního, resp. obecně centrálního či periferního nervového systému.

QST vyšetření probíhalo za standardizovaných podmínek v tiché klidné místnosti s eliminací rušivých vlivů, v polosedu při zajištění maximálního pohodlí pro pacienta, aby nebyla narušena jeho schopnost koncentrace. Během testování bylo sledováno trvání vyšetření jednotlivých parametrů i celého QST protokolu a hodnocena náročnost vyšetření každé z hodnocených senzitivních i algických modalit pro pacienty i vyšetřující, a to semikvantitativně na stupnici 1–5, kde 1 představuje „zcela nenáročný“ a 5 znamená „velmi náročný“.

Testování všech parametrů probíhalo na HKK v oblasti thenaru a následně na DKK na dorzu nohy nad m. extensor digitorum brevis. Výjimkou bylo pouze stanovení vibračních prahů, které byly vyšetřovány na kostních prominencích (processus styloideus radii, malleolus medialis). V úvodu vyšetření každé z hodnocených modalit byl princip testování pacientovi vysvětlen pomocí standardizovaných instrukcí. Průběh vyšetření včetně sekvence jednotlivých modalit byl u všech pacientů jednotný a odpovídal původní německé verzi protokolu. Detailní protokol testování a používané instrukce jsou k dispozici ve formě Supplementary data v online verzi článku.

Hodnocení termických a termoalgických modalit bylo provedeno pomocí softwaru Neurosensory analyser – model TSA-II (Medoc TSA 2001; Medoc Ltd., RamatYishai,

Izrael) a termosondy 2,5 × 5 cm. Detailní popis vyšetření včetně hodnocených parametrů byl již opakovaně publikován [11,12]. Termosonda se během vyšetření ohřívala či ochlazovala z neutrální teploty 32 °C. Při vyšetření *senzitivních prahů pro teplo a chlad* (Warm and Cold Detection Threshold; WDT, CDT) bylo úkolem vyšetřovaných jedinců stisknout tlačítko myši v okamžiku začátku vnímané změny teploty termosondy. Využíván byl algoritmus s pěti teplými a pěti chladnými podněty, aritmetický průměr rozdílů zjištěných hodnot od neutrální teploty (32 °C) představuje termický práh (CDT, WDT). Vedle absolutních hodnot prahů byl určován tzv. *thermal sensory limen* (TSL), tedy rozsah, v němž vyšetřený jedinec vnímá teplotu termosondy jako neutrální (a který odpovídá rozdílu absolutních hodnot prahu pro teplo a chlad, vyjádřenému ve °C). Dalším hodnoceným parametrem v tomto testu byl výskyt tzv. *paradoxního vnímání chladu jako tepla* (Paradoxical Heat Sensation; PHS), odrážejícího poruchu diskriminace tepelných modalit. PHS byl vyjádřen formou počtu takto nesprávně vnímaných chladných podnětů jako teplých či horkých ze tří testovaných. Při měření algických prahů pro horké a chladné podněty (Heat and Cold Pain Threshold; HPT, CPT) vyšetřované subjekty určovaly okamžik, kdy se při dále narůstající/klesající teplotě termosondy k původnímu teplému či studenému vjemu přidala další subjektivně nepříjemná složka (charakteru pálení, bodání, štipání apod.). Aplikovány byly vždy tři podněty příslušné modalit (tepla nebo chladu), aritmetický průměr zjištěných hodnot vyjádřených ve °C představoval práh (HPT nebo CPT).

Mechanická kožní citlivost byla testována pomocí monofilament evokujících při ohybu tlakovou sílu v rozmezí od 0,25 po 512 mN (Optihair, MarstockNerveTest, Německo). Práh (Mechanical Detection Threshold; MDT) byl stanoven jako geometrický průměr z detekovaných nad- a podprahových podnětů. Vyšetření začínalo od nejtěněšího filamenta a postupovalo k silnějším. Pacient byl při každém dotyku vlákna na kůži dotázán, zda podnět cítí, a odpovídal „ano/ne“. Síla nejslabšího již percipovaného filamenta odpovídala první nadprahové hodnotě taktilního prahu (first suprathreshold value), poté vyšetření pokračovalo naopak sestupně slabšími filamenti k prvnímu již nepercipovanému vláknu, které představovalo první podprahovou hodnotu (first infrathreshold value). Od tohoto vlákna pokračoval

čovalo testování opět vzestupně směrem k vláknům silnějším. Celý postup byl opakován celkem pětkrát. Z takto stanovených hodnot byl následně vypočítán geometrický průměr (tj. všechny získané pod- a nadprahové hodnoty se vzájemně vynásobily a byla vypočtena desátá odmocnina takového výsledku), který představuje hledaný senzitivní práh (MDT), vyjádřený v mN [3,5,6].

Ostrá, mechanicky vyvolaná bolest byla testována pomocí sady sedmi špendlíků, které vyvolají vpich o tlakové síle 8, 16, 32, 64, 128, 256 a 512 mN na ploše o průměru 0,2 mm (MRC Systems GmbH, Heidelberg, Německo). Při vyšetření algického prahu (Mechanical Pain Threshold; MPT) byla sada špendlíků zpočátku používána ve vzestupném pořadí, tedy od nejslabšího kalibrovaného špendlíku k silnějším s minimálním doporučeným časovým rozestupem mezi jednotlivými podněty v trvání alespoň 2 s. Vyšetřovaná osoba byla při každém podnětu dotázána, zda jej vnímá jako ostrý vjem nebo dotyk. Nejslabší stimulus, který byl již percipován vyšetřovanou osobou jako ostrý vjem (nikoli dotyk), odpovídal prvnímu nadprahovému podnětu (first suprathreshold value). Po jeho dosažení pokračovalo vyšetření sestupně směrem ke slabším kalibrovaným špendlíkům až k prvnímu podnětu, který již nebyl percipován jako ostrý vjem (ale pouze jako dotyk), a tedy představoval první podprahový podnět (first infrathreshold value). Identický postup byl opakován celkem pětkrát. MPT (vyjádřený v mN) byl vypočten jako geometrický průměr pěti takto získaných nadprahových a pěti podprahových hodnot [3,5,6].

Stejná sada kalibrovaných špendlíků byla využívána pro vyšetření *senzitivity pro mechanicky vyvolanou bolest* (Mechanical Pain Sensitivity; MPS). Při tomto testu byl pacient vyšetřován jednotlivými kalibrovanými špendlíky v pseudonáhodném pořadí podle exaktního protokolu (k dispozici jako Supplementary data v online verzi článku), a to střídavě s podněty využívanými k hodnocení *mechanické dynamické alodynie* (Dynamic Mechanic Allodynia; DMA), tj. vyvolanými kalibrovaným štětcem (působícím dotyk o tlakové síle ~200–400 mN, Somedic, Švédsko), štětíčkou (evokující tlakovou sílu ~100 mN, MRC Systems GmbH, Heidelberg, Německo) a smotkem vaty (s tlakovou silou ~3 mN). Bolestivost podnětů vnímaných při stimulaci kalibrovaným špendlíkem jako „ostré“ a/nebo podnětů evokovaných nástroji určenými k vyšetření DMA (v případě,

že tyto jako bolestivé vnímá) pacient hodnotil pomocí numerické škály bolesti (Numeric Rating Scale; NRS) o rozsahu 0–100, kde 0 představuje „žádnou bolest“ a 100 znamená „nejhorší pro pacienta představitelnou bolest“. Každý podnět byl během vyšetření použit celkem pětkrát. MPS byla následně vypočítána jako logaritmický průměr odpovědí pacienta na 35 podnětů evokovaných kalibrovanými špendlíky, DMA pak jako logaritmický průměr odpovědí na celkem 15 podnětů vyvolaných kalibrovaným štětcem, štětičkou a smotkem vaty [3,5,6]. Obě hodnoty jsou vyjádřeny v bodech NRS škály.

Posledním testovaným parametrem, využívajícím kalibrované špendlíky, byla časová sumace bolestivých podnětů, hodnocená pomocí tzv. *wind-up ratio* (WUR). Pro vyšetření byl používán kalibrovaný špendlík působící vpich o tlakové síle 256 mN. Srovnávána byla bolestivost (hodnocená pomocí NRS škály) izolovaného vpichu a série 10 opakovaných vpichů s frekvencí jeden vpich za sekundu v okrsku cca 1 cm² při použití stejného špendlíku. Test byl opakován celkem pětkrát, výsledný WUR je poměrem aritmetických průměrů NRS hodnocení série podnětů k aritmetickému průměru NRS hodnocení izolovaného stimulu [5,6]. Tento parametr nemá měrné jednotky (jedná se o poměr dvou hodnot vyjádřených v identických jednotkách).

Senzitivní práh pro vibrační čítí (Vibration Detection Threshold; VDT) byl hodnocen pomocí 128Hz kalibrované ladičky (graduated Rydel-Seiffer Tuning Fork se stupnicí 8/8), přikládáné na kostní prominence (proc. styloideus radii, malleolus lateralis). Vyšetření bylo provedeno standardním, v běžné klinické praxi rutinně prováděným způsobem. Detailní popis způsobu testování byl recentně publikován [3]. Vyšetření bylo provedeno vždy třikrát, práh (vyjádřený v jednotkách měřítka na kalibrované ladičce z osmi maximálně dosažitelných) byl stanoven jako aritmetický průměr z těchto tří pokusů.

Vyšetření hluboké tlakové bolesti bylo provedeno pomocí kalibrovaného tlakoměru (Wagner Instruments, Greenwich, USA). Během vyšetření postupně narůstal tlak vyvíjený kontinuálně na vyšetřovanou oblast. Rychlost nárůstu byla po celou dobu vyšetření konstantní, a to 50 kPa/s. Úkolem vyšetřovaného subjektu bylo upozornit na okamžik, kdy se změnil charakter vnímaného podnětu a k původnímu tlakovému vjemu se přidala jiná, subjektivně nepříjemná složka (bolest, pálení apod.). Aktuální hodnota vy-

víjeného tlaku v tomto okamžiku představovala hledaný práh. Vyšetření bylo provedeno celkem třikrát, práh pro hlubokou tlakovou bolest (Pressure Pain Threshold; PPT) vyjádřený v kPa byl vypočítán jako aritmetický průměr z těchto tří pokusů [3,5,6].

Hodnocení spolehlivosti (reliability) vyšetření

Za účelem orientačního zhodnocení spolehlivosti (reliability) stanovení jednotlivých parametrů byl celý protokol u 26 zdravých kontrol (14 mužů a 12 žen ve věkovém rozmezí 19–42 let s mediánem 25 let) vyšetřeno opakovaně (a to celkem čtyřikrát). Opakované vyšetření bylo provedeno pouze v jedné lokalizaci, a to na PHK. Odstup mezi jednotlivými vyšetřeními byl u mužů 3–6 týdnů. Vzhledem k možnému vlivu menstruačního cyklu bylo vyšetření reprodukovatelnosti u žen provedeno vždy v téže (ovulační) fázi, tedy mezi 12. a 14. dnem menstruačního cyklu. Interval mezi opakovanými vyšetřeními u žen tudíž odpovídal standardní délce menstruačního cyklu u zařazených pacientek (mezi 24 a 35 dny).

Formát vyjádření dat

Hodnoty prahů ve všech provedených testech byly vypočteny výše popsaným způsobem v souladu s metodikou doporučenou autory originální verze DFNS protokolu. Vedle absolutních hodnot prahů vyjádřených v původních měrných jednotkách (°C, kPa, mN apod.) byly jednotlivé parametry vyjádřeny také formou tzv. Z-skóre, tedy počtu směrodatných odchylek od průměrné hodnoty prahu v příslušné věkové kategorii publikovaného normativního souboru [6].

Statistické zpracování

Statistické zpracování bylo provedeno pomocí software SPSS 22.0.0.1 (IBM Corporation 2014) a R statistického software, verze 3.1.1 (The R Foundation for Statistical Computing, 2014).

Ke zviditelnění rozložení primárních hodnot jednotlivých testovaných parametrů byla použita standardní deskriptivní statistika: mediány s rozsahem hodnot (definovaným 5.–95. percentilem) a/nebo průměry se směrodatnými odchylkami (SD) pro spojitě proměnné a absolutní a relativní četnosti pro data kategoriální. Srovnání hodnocených parametrů mezi jednotlivými testovanými skupinami pacientů bylo provedeno pomocí exaktního Fisherova testu pro kategoriální proměnné a pomocí Manova-Whitneyho testu (při srovnávání dvou

skupin) a/nebo Kruskalova-Wallisova testu (při současném srovnání více skupin) pro data spojitá. Všechny analýzy byly provedeny s využitím jak základních hodnot všech sledovaných parametrů, tak i hodnot Z-skóre.

Prediktivní síla hodnocených parametrů v odlišení zdravých subjektů a pacientů s diabetickou polyneuropatií byla testována pomocí ROC analýzy a kvantifikována prostřednictvím tzv. plochy pod ROC křivkou (Area Under the Curve; AUC) a její statistické významnosti. Optimální cut-off hodnoty byly identifikovány pomocí Youden J statistiky. Dalšími hodnocenými parametry byly senzitivita, specifita, pozitivní a negativní prediktivní hodnota a celková přesnost měření.

Shluková analýza pacientů s diabetickou polyneuropatií a roztroušenou sklerózou byla založena na hodnocení Euklidovských vzdáleností standardizovaných parametrů z horních i dolních končetin a Wardově algoritmu (Ward's clustering algorithm).

Spolehlivost (reliabilita) testu byla hodnocena pomocí variability hodnot při opakovaných vyšetřeních a pomocí tzv. Cronbachova alfa, kde lze hodnoty od 0,5 výše lze považovat za dobré a hodnoty 0,7 a více odkazují na velmi vysokou spolehlivost testu.

Výsledky

Trvání a náročnost vyšetření

Vyšetření QST protokolu i jednotlivých testovaných parametrů bylo většinou pacientů i vyšetřujících hodnoceno jako nenáročná (1) nebo málo náročná (2) (data neuvedena). Obecně byly pro pacienty i vyšetřující náročnější testy, v nichž byla hodnocena senzitivita pro bolestivé podněty nebo jejich časová sumace anebo určování algického prahu (s průměrnou náročností hodnocenou pacienty na úrovni 1,75–2,0), než testy zaměřené na hodnocení prahů senzitivních (průměrná náročnost pro pacienty kolem 1,2–1,5). Souhrnná subjektivní náročnost testování celého QST protokolu byla dle hodnocení pacientů průměrně 1,64 ± 1,23, dle vyšetřujících pak 1,28 ± 0,70. Trvání jednotlivých testů bylo na HKK přibližně 2–3 min (data detailněji neuvedena), na DKK mírně vyšší. Vyšetření celého protokolu včetně úvodních instrukcí trvalo na HKK v průměru 21,85 ± 8,13 min a na DKK 26,13 ± 7,88 min.

Nálezy v souboru zdravých kontrol

V souboru zdravých kontrol odpovídalo na HKK 94 % a na DKK dokonce 95 % zjištěných

VALIDACE ČESKÉ VERZE KOMPLEXNÍHO PROTOKOLU KVANTITATIVNÍHO TESTOVÁNÍ SENZITIVITY

Tab. 2a) Měřené charakteristiky pravé horní končetiny – základní hodnoty.

Charakteristika ¹	A1, pDPN (n = 68)	A2, pMS (n = 59)	B, kontroly (n = 75)	p ² A1 vs. B	p ² A2 vs. B	p ² A1 vs. A2
CDT	-2,8 (2,0); -2,3 (-7,9; -1,0)	-2,7 (2,3); -1,9 (-9,4; -1,1)	-1,5 (0,7); -1,4 (-2,7; -0,7)	< 0,001	< 0,001	0,316
WDT	4,4 (2,9); 3,5 (1,3; 11,1)	3,0 (2,1); 2,5 (1,1; 7,6)	1,9 (0,9); 1,7 (1,0; 3,2)	< 0,001	< 0,001	0,001
TSL	7,1 (4,6); 5,8 (2,4; 18,5)	5,8 (4,2); 4,4 (2,3; 17,1)	3,4 (1,5); 3,1 (1,8; 5,9)	< 0,001	< 0,001	0,014
CPT	12,8 (7,9); 12 (1,6; 24,9)	14,2 (9,1); 12,8 (0,0; 28,4)	10,5 (8,0); 9,5 (0,0; 26,4)	0,070	0,026	0,535
HPT	46,1 (3,8); 47,6 (38,3; 50,0)	44,0 (6,0); 44,6 (37,4; 50,0)	45,6 (3,8); 46,7 (39,1; 50,0)	0,354	0,210	0,062
PPT	782,8 (512,9); 691,7 (403,3; 1 416,7)	508,7 (171,9); 479,4 (300,7; 866,7)	599,5 (471,4); 550,8 (290,6; 924,7)	< 0,001	0,106	< 0,001
MPT	77,8 (153,2); 21,9 (6,5; 294,1)	74,9 (91,2); 42,3 (7,5; 274,4)	81,9 (91,4); 45,3 (12,1; 362,0)	0,001	0,274	0,053
MPS	7,8 (11,0); 3,0 (0,0; 31,7)	5,7 (8,7); 1,4 (0,1; 24,9)	3,4 (4,4); 2,5 (0,3; 14,4)	0,473	0,234	0,385
WUR	3,5 (3,1); 2,5 (1,3; 10,0)	3,9 (5,9); 2,0 (1,0; 15,3)	3,1 (2,2); 2,3 (0,9; 7,2)	0,971	0,198	0,095
MDT	0,6 (1,5); 0,2 (0,2; 1,4)	1,3 (2,5); 0,5 (0,2; 7,0)	0,6 (0,9); 0,4 (0,2; 1,4)	< 0,001	0,014	< 0,001
VDT	7,4 (1,0); 7,4 (5,0; 8,0)	7,2 (1,3); 7,2 (4,0; 8,0)	7,9 (0,2); 7,9 (7,0; 8,0)	< 0,001	< 0,001	0,552
PHS	0,1 (0,5); 0,0 (0,0; 0,0)	0,2 (0,9); 0,0 (0,0; 2,0)	0,0 (0,0); 0,0 (0,0; 0,0)	0,067	0,019	0,502
DMA	0,0 (0,0); 0,0 (0,0; 0,0)	0,2 (1,2); 0,0 (0,0; 0,0)	0,0 (0,0); 0,0 (0,0; 0,0)	0,999	0,100	0,118

¹ Průměr (směrodatná odchylka); medián (5.–95.% percentil).

² Mann-Whitney U test.

Použité zkratky – viz přehled zkratk v textu.

Tab. 2b) Měřené charakteristiky pravé dolní končetiny – základní hodnoty.

Charakteristika ¹	A1, pDPN (n = 68)	A2, pMS (n = 59)	B, kontroly (n = 75)	p ² A1 vs. B	p ² A2 vs. B	p ² A1 vs. A2
CDT	-13,1 (9,1); -10,3 (-32,0; -3,1)	-8,4 (8,4); -5,0 (-28,4; -1,3)	-3,0 (2,0); -2,4 (-7,7; -1,0)	< 0,001	< 0,001	< 0,001
WDT	13,5 (4,1); 14,6 (5,0; 18,0)	9,7 (4,6); 9,1 (3,1; 17,2)	6,4 (3,4); 5,5 (2,1; 13,8)	< 0,001	< 0,001	< 0,001
TSL	26,6 (11,9); 25,5 (8,8; 49,8)	18,1 (12,1); 14,0 (5,0; 43,4)	9,4 (4,9); 8,3 (3,0; 19,5)	< 0,001	< 0,001	< 0,001
CPT	5,4 (7,4); 2,0 (0,0; 22,3)	12,0 (11,4); 9,5 (0,0; 27,6)	11,2 (9,8); 8,6 (0,0; 26,4)	< 0,001	0,870	0,001
HPT	49,1 (1,9); 50,0 (46,2; 50,0)	46,9 (3,7); 48,5 (38,3; 50,0)	46,3 (2,9); 46,7 (40,7; 50,0)	< 0,001	0,050	< 0,001
PPT	801,5 (374,7); 760,0 (303,3; 1603,3)	525,1 (235,4); 466,7 (216,7; 1070,9)	620,4 (209,7); 606,7 (336,3; 986,7)	0,002	0,002	< 0,001
MPT	208,4 (269,3); 64,0 (6,5; 724,1)	75,8 (92,7); 33,1 (5,7; 315,2)	54,4 (53,2); 42,2 (9,8; 194,0)	0,009	0,968	0,016
MPS	4,9 (8,6); 0,8 (0,0; 24,2)	5,1 (8,4); 1,2 (0,1; 20,4)	3,8 (4,9); 2,5 (0,3; 13,4)	0,016	0,155	0,214
WUR	3,8 (4,3); 2,4 (1,0; 12,2)	4,1 (4,5); 2,5 (0,7; 15,0)	3,5 (3,7); 2,2 (1,1; 8,0)	0,910	0,858	0,908
MDT	52,7 (158); 2,1 (0,3; 415,9)	2,1 (3,8); 0,6 (0,3; 14,6)	1,3 (2,3); 0,7 (0,3; 3,2)	< 0,001	0,627	< 0,001
VDT	4,8 (2,9); 4,8 (0,0; 8,0)	6,0 (2,3); 6,0 (0,0; 8,0)	7,7 (0,7); 7,7 (7,0; 8,0)	< 0,001	< 0,001	0,012
PHS	2,3 (2,0); 2,0 (0,0; 5,0)	1,6 (2,2); 0,0 (0,0; 5,0)	0,1 (0,5); 0,0 (0,0; 1,0)	< 0,001	< 0,001	0,026
DMA	0,5 (3,2); 0,0 (0,0; 0,2)	0,5 (2,9); 0,0 (0,0; 0,4)	0,0 (0,3); 0,0 (0,0; 0,0)	0,075	0,041	0,742

¹ Průměr (směrodatná odchylka); medián (5.–95.% percentil).

² Mann-Whitney U test.

Použité zkratky – viz přehled zkratk v textu.

hodnot fyziologickému rozsahu nálezů jednotlivých parametrů podle publikovaných věkově stratifikovaných normativních dat [6].

Při souhrnném hodnocení celého QST protokolu jsme abnormitu alespoň jednoho testovaného parametru prokázali u 43 % zdravých

jedinců kontrolního souboru na HKK a 41 % kontrol na DKK. Dvě a více abnormit pak v souboru zdravých kontrol vykazovalo 17 % jedinců na HKK a 11 % na DKK, zatímco tři a více abnormit bylo zachyceno pouze u 4 % zdravých kontrol v každé z vyšetřených lokalizací.

Nálezy u pacientů s neuropatickou bolestí

Mezi pacienty s neuropatickou bolestí byl výskyt abnormit vysoce signifikantně častější: abnormální nález alespoň jednoho z testovaných parametrů byl zachycen na

Tab. 3a) Měřené charakteristiky pravé horní končetiny – Z-skóre.

Charakteristika ¹	A1, pDPN (n = 68)	A2, pMS (n = 59)	B, kontroly (n = 75)	p ² A1 vs. B	p ² A2 vs. B	p ² A1 vs. A2
CDT	-0,8 (1,0); -0,6 (-2,9; 0,7)	-1,0 (1,3); -0,7 (-3,8; 0,5)	-0,2 (0,8); -0,2 (-1,7; 1,1)	0,001	< 0,001	0,517
WDT	-1,0 (1,2); -0,9 (-3,1; 0,9)	-0,7 (1,2); -0,5 (-3,3; 1,0)	0,0 (0,8); 0,1 (-1,1; 1,2)	< 0,001	< 0,001	0,188
TSL	-0,9 (0,9); -0,9 (-2,9; 0,5)	-0,9 (1,0); -0,7 (-3,2; 0,4)	-0,3 (0,6); -0,2 (-1,4; 0,7)	< 0,001	< 0,001	0,621
CPT	0,6 (1,2); 0,7 (-1; 2,6)	0,2 (1,1); 0,0 (-1,4; 1,9)	-0,3 (1,1); -0,3 (-1,8; 1,6)	< 0,001	0,020	0,035
HPT	-0,1 (1,5); -0,6 (-1,8; 3,1)	0,4 (1,8); 0,0 (-1,9; 2,7)	0,2 (1,4); 0,1 (-1,8; 2,3)	0,260	0,597	0,135
PPT	-1,5 (1,8); -1,4 (-4,0; 0,7)	-0,5 (1,0); -0,4 (-2,2; 1,1)	-0,9 (1,8); -1 (-2,8; 0,8)	0,005	0,049	< 0,001
MPT	1,4 (1,7); 1,7 (-1,9; 3,6)	0,7 (1,4); 0,7 (-1,8; 3,0)	0,5 (1,1); 0,5 (-1,5; 2,3)	< 0,001	0,316	0,010
MPS	1,1 (2,4); 1,4 (-3,1; 4,6)	0,8 (2,1); 0,7 (-2,3; 4,2)	1,1 (1,2); 1,3 (-1,2; 3,1)	0,474	0,218	0,385
WUR	0,5 (1,2); 0,1 (-0,9; 2,9)	0,1 (1,6); -0,3 (-1,6; 3,3)	0,2 (1,1); 0,1 (-1,5; 2,0)	0,235	0,243	0,032
MDT	1,3 (1,0); 1,6 (-0,5; 2,2)	0,4 (1,3); 0,7 (-2,1; 1,9)	0,8 (0,8); 0,9 (-0,7; 2,0)	< 0,001	0,346	< 0,001
VDT	-0,5 (2,3); -0,5 (-5,7; 1,2)	-1,7 (3,8); -1,7 (-11,4; 0,6)	0,4 (0,6); 0,4 (-1,2; 0,9)	0,137	< 0,001	< 0,001
PHS	0,1 (0,7); 0,0 (0,0; 0,0)	0,3 (1,4); 0,0 (0,0; 4,0)	0,0 (0,0); 0,0 (0,0; 0,0)	0,067	0,019	0,490
DMA	0,0 (0,0); 0,0 (0,0; 0,0)	1,3 (6,9); 0,0 (0,0; 0,0)	0,0 (0,0); 0,0 (0,0; 0,0)	0,999	0,100	0,118

¹ Průměr (směrodatná odchylka); medián (5.–95.% percentil).

² Mann-Whitney U test.

Použité zkratky – viz přehled zkratk v textu.

Tab. 3b) Měřené charakteristiky pravé dolní končetiny – Z-skóre.

Charakteristika ¹	A1, pDPN (n = 68)	A2, pMS (n = 59)	B, kontroly (n = 75)	p ² A1 vs. B	p ² A2 vs. B	p ² A1 vs. A2
CDT	-1,8 (1,2); -1,8 (-3,5; 0,0)	-1,3 (1,5); -1,2 (-4,0; 0,9)	-0,1 (0,9); 0,0 (-1,5; 1,5)	< 0,001	< 0,001	0,036
WDT	-1,6 (0,8); -1,8 (-2,7; 0,0)	-1,3 (1,1); -1,3 (-2,8; 1,0)	-0,5 (1,1); -0,5 (-2,3; 1,4)	< 0,001	< 0,001	0,145
TSL	-1,7 (1,0); -1,7 (-3,3; -0,1)	-1,4 (1,3); -1,2 (-3,7; 0,8)	-0,4 (1,0); -0,4 (-2,0; 1,4)	< 0,001	< 0,001	0,164
CPT	-0,5 (0,8); -0,9 (-1,1; 1,4)	0,0 (1,2); -0,4 (-1,4; 1,7)	-0,1 (1,1); -0,4 (-1,7; 1,6)	0,081	0,762	0,234
HPT	-1,3 (0,9); -1,5 (-2,0; -0,2)	-0,7 (1,5); -1,3 (-2,0; 2,9)	-0,6 (1,1); -0,7 (-2,1; 1,6)	< 0,001	0,132	0,031
PPT	-1,0 (1,4); -1,3 (-3,2; 1,5)	0,3 (1,3); 0,4 (-2,1; 3,0)	-0,3 (1,0); -0,4 (-1,9; 1,2)	0,001	0,002	< 0,001
MPT	0,0 (2,0); 0,1 (-3,2; 3,1)	0,7 (1,5); 0,8 (-1,8; 2,9)	0,7 (1,0); 0,6 (-1,0; 2,7)	0,032	0,845	0,051
MPS	-0,2 (2,5); 0,2 (-4,0; 3,4)	0,5 (2,0); 0,4 (-2,4; 3,7)	1,0 (1,3); 1,2 (-1,1; 3,2)	0,010	0,115	0,274
WUR	0,2 (1,3); 0,0 (-1,8; 3,2)	0,1 (1,6); 0,0 (-2,4; 3,1)	0,0 (1,1); -0,3 (-1,5; 2,0)	0,462	0,847	0,646
MDT	-0,4 (1,8); 0,0 (-4,3; 1,9)	0,6 (1,1); 0,9 (-2,0; 2,2)	0,7 (0,7); 0,8 (-0,6; 1,6)	< 0,001	0,734	0,001
VDT	-1,9 (2,8); -1,9 (-6,5; 1,0)	-1,6 (2,7); -1,6 (-6,5; 0,9)	0,5 (0,7); 0,5 (-0,7; 1,4)	< 0,001	< 0,001	0,584
PHS	2,6 (3,9); 1,6 (-1,8; 13,2)	1,8 (2,9); -0,2 (-0,3; 6,6)	-0,1 (1,1); -0,2 (-1,8; 0,5)	< 0,001	0,004	0,292
DMA	4,0 (17,2); 0,0 (0,0; 26,9)	3,1 (12,0); 0,0 (0,0; 39,8)	1,3 (11,5); 0,0 (0,0; 0,0)	0,077	0,044	0,786

¹ Průměr (směrodatná odchylka); medián (5.–95.% percentil).

² Mann-Whitney U test.

Použité zkratky – viz přehled zkratk v textu.

HKK u 86 % pacientů s bolestivou diabetickou polyneuropatií a na DKK u 90 % z nich. Dvě a více abnormit pak vykazovalo na HKK 64 % těchto pacientů a na DKK dokonce 70 %. Tři a více abnormit bylo na DKK prokázáno u 52 % pacientů s diabetickou neuropatií.

V souboru pacientů s centrální neuropatickou bolestí při roztroušené skleróze byly výsledky velmi podobné (data neuvedena).

Na skupinové úrovni se hodnoty většiny sledovaných parametrů významně lišily mezi zdravými kontrolami a oběma skupinami

pacientů s neuropatickou bolestí (centrální i periferní), a to zejména na dolních končetinách a v lehce menším rozsahu i na končetinách horních. Tyto rozdíly byly patrné jak při srovnání absolutních hodnot jednotlivých senzitivních i algických prahů (tab. 2a,b), tak

Tab. 4. Predikční schopnost charakteristik pravé dolní končetiny – Z-skóre pro odlišení kontrol a bolestivé diabetické polyneuropatie.

Charakteristika ¹	Cut-off	Falešně negativní	Falešně pozitivní	Specifická	Senzitivita	PPV	NPV	Celková přesnost	AUC (95% CI) ¹	p ¹
CDT	-0,913	0,098	0,105	0,800	0,794	0,783	0,811	0,797	0,872 (0,814; 0,930)	< 0,001
WDT	0,145	0,105	0,105	0,800	0,779	0,779	0,800	0,790	0,813 (0,741; 0,885)	< 0,001
TSL	-0,277	0,140	0,098	0,813	0,706	0,774	0,753	0,762	0,828 (0,761; 0,894)	< 0,001
CPT	-1,303	0,154	0,217	0,587	0,676	0,597	0,667	0,629	0,585 (0,487; 0,682)	0,081
HPT	-0,585	0,105	0,154	0,707	0,779	0,707	0,779	0,741	0,721 (0,634; 0,809)	< 0,001
PPT	-0,462	0,217	0,070	0,867	0,544	0,787	0,677	0,713	0,665 (0,572; 0,758)	0,001
MPT	-0,335	0,266	0,063	0,880	0,441	0,769	0,635	0,671	0,604 (0,505; 0,703)	0,032
MPS	-1,225	0,322	0,007	0,987	0,324	0,957	0,617	0,671	0,625 (0,530; 0,721)	0,01
WUR	5,136	0,140	0,301	0,427	0,706	0,527	0,615	0,559	0,536 (0,440; 0,631)	0,462
MDT	-1,179	0,266	0,035	0,933	0,441	0,857	0,648	0,699	0,684 (0,593; 0,776)	< 0,001
VDT	-0,286	0,140	0,049	0,907	0,706	0,873	0,773	0,811	0,792 (0,709; 0,875)	< 0,001
PHS	-1,562	0,140	0,035	0,933	0,706	0,906	0,778	0,825	0,739 (0,646; 0,832)	< 0,001
DMA	-1,211	0,441	0,007	0,987	0,074	0,833	0,540	0,552	0,530 (0,435; 0,625)	0,539

¹ ROC analýza.

Použité zkratky – viz přehled v textu.

při srovnání hodnot Z-skóre, derivovaných na základě publikovaných, věkově stratifikovaných normativních dat (tab. 3a,b) [6].

Rozdíly hodnot většiny testovaných parametrů mezi pacienty s periferní neuropatickou bolestí při diabetické neuropatii a centrální neuropatickou bolestí při roztroušené skleróze byly patrné zejména při srovnání základních hodnot (a tedy byly z větší části relevantní odlišné věkové distribuci obou skupin) (tab. 2a,b), zatímco při srovnání Z-skóre nebyly výsledky většiny testovaných parametrů signifikantně odlišné (tab. 3a,b).

V souladu s uvedenými nálezy prokázala následná ROC analýza vynikající predikční schopnost většiny hodnocených senzitivních parametrů v odlišení pacientů s bolestivou diabetickou polyneuropatií a zdravých kontrol, a to zejména na DKK (tab. 4 a 4e, která je k dispozici ve formě Supplementary data v online verzi článku) a pro menší počet parametrů i na HKK (tab. 5 a 5e, která je k dispozici ve formě Supplementary data v online verzi článku). Výsledky ROC analýzy byly obdobné jak pro základní hodnoty sledovaných senzitivních parametrů, tak v případě vyjádření výsledků formou Z-skóre.

Nejnižší prediktivní schopnost v diagnostice bolestivé diabetické polyneuropatie a současně nejméně významné rozdíly hodnot mezi pacienty s diabetickou neuropatií a zdravými kontrolami vykazovaly

dynamická mechanická alodynne a časová sumace bolestivých podnětů, vyjádřená formou wind-up ratio. Tyto parametry nedokázaly odlišit pacienty s diabetickou neuropatií od zdravých kontrol na horních ani dolních končetinách.

Nejvýznamnější rozdíly a současně nejlepší prediktivní schopnost v diagnostice bolestivé diabetické neuropatie naopak vykazovaly senzitivní prahy pro termické a mechanické podněty a dále algické prahy pro ostrou mechanickou bolest a hlubokou tlakovou bolest, a to na horních i dolních končetinách. Pouze na dolních končetinách byly prokázány i vysoce významné rozdíly vibračních prahů a výskytu paradoxního vnímání chladných podnětů jako teplých (které bylo na horních končetinách zcela výjimečné).

Analýza symptomových profilů

Hierarchická aglomerativní shluková analýza umožnila vytvoření dendrogramu pacientů na základě jejich vzdálenosti ve vícerozměrném prostoru vycházející z 13 hodnocených senzitivních parametrů na horních i dolních končetinách. Čím kratší byl odstup mezi pacienty na tomto dendrogramu, tím si byli pacienti fenotypicky podobnější (graf 1e, k dispozici ve formě Supplementary data v online verzi článku). Následná analýza jasně identifikovala dva odlišné clusterly odpovídající různým senzitivním profilům (graf 1a,b),

z nichž první zahrnoval většinou pacienty s bolestivou diabetickou polyneuropatií (cluster 1) a druhý nemocné s centrální neuropatickou bolestí při roztroušené skleróze (cluster 2). Tyto výsledky svědčí pro významnou a spolehlivě identifikovatelnou možnost odlišení těchto dvou klinických jednotek s předpokládaným odlišným patofyziologickým mechanismem rozvoje neuropatické bolesti s použitím setu hodnocených senzitivních parametrů.

Reliabilita testování

Variabilita výsledků čtyř opakovaných měření dosahovala u všech vyšetřených QST modalit nízkých hodnot v rozmezí 6,0–17,4 % (tab. 6). Reliabilita jednotlivých modalit hodnocená pomocí Cronbachova alfa se pohybovala v rozmezí 0,593–0,926 (tab. 6).

Diskuze

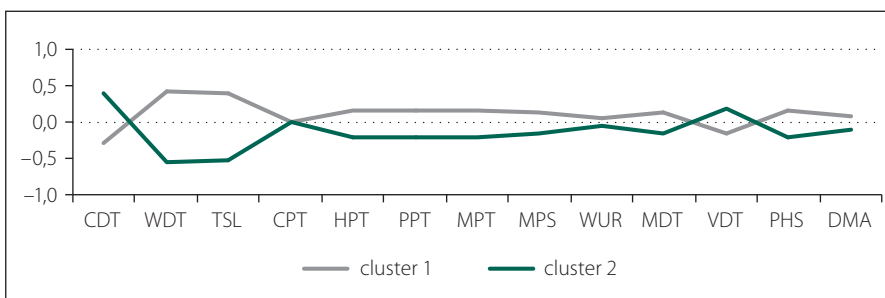
Prezentovaná studie prokázala velmi dobrou praktickou použitelnost české jazykové verze komplexního QST protokolu, uspokojivou reliabilitu testování a jeho přínos a využitelnost u pacientů s neuropatickou bolestí různé etiologie. Protokol poskytuje komplexní, kvantifikované informace o většině běžně hodnocených senzitivních a algických modalit a reflektuje funkci tenkých i silných nervových vláken. Jeho zařazení do diagnostického algoritmu přispívá k prohloubení a rozšíření

Tab. 5. Predikční schopnost charakteristik pravé horní končetiny – Z-skóre pro odlišení kontrol a bolestivé diabetické polyneuropatie.

Charakteristika ¹	Cut-off	Falešně negativní	Falešně pozitivní	Specifická	Senzitivita	PPV	NPV	Celková přesnost	AUC (95% CI) ¹	p ¹
CDT	0,154	0,063	0,322	0,387	0,868	0,562	0,763	0,615	0,657 (0,567; 0,746)	0,001
WDT	1,250	0,210	0,084	0,840	0,559	0,760	0,677	0,706	0,752 (0,672; 0,831)	< 0,001
TSL	1,362	0,224	0,077	0,853	0,529	0,766	0,667	0,699	0,721 (0,637; 0,805)	< 0,001
CPT	-0,756	0,203	0,119	0,773	0,574	0,696	0,667	0,678	0,711 (0,628; 0,795)	< 0,001
HPT	0,386	0,210	0,210	0,600	0,559	0,559	0,600	0,580	0,555 (0,460; 0,65)	0,260
PPT	-0,381	0,119	0,266	0,493	0,750	0,573	0,685	0,615	0,636 (0,544; 0,727)	0,005
MPT	1,205	0,161	0,133	0,747	0,662	0,703	0,709	0,706	0,681 (0,589; 0,773)	< 0,001
MPS	-0,821	0,280	0,077	0,853	0,412	0,718	0,615	0,643	0,535 (0,433; 0,636)	0,474
WUR	-1,000	0,133	0,301	0,427	0,721	0,533	0,627	0,566	0,558 (0,463; 0,652)	0,235
MDT	-0,447	0,147	0,105	0,800	0,691	0,758	0,741	0,748	0,752 (0,668; 0,837)	< 0,001
VDT	0,718	0,252	0,063	0,880	0,471	0,780	0,647	0,685	0,572 (0,467; 0,677)	0,139
PHS	1,962	0,455	0,000	1,000	0,044	1,000	0,536	0,545	0,522 (0,427; 0,617)	0,649
DMA	-0,858	0,000	0,524	0,000	1,000	0,476	0,000	0,476	0,500 (0,405; 0,595)	0,999

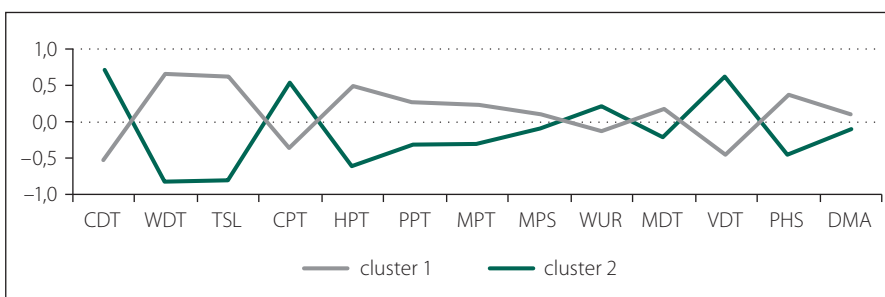
¹ ROC analýza.

Použité zkratky – viz přehled v textu.



Graf 1a. Průměrné standardizované hodnoty 13 hodnocených senzitivních parametrů na HKK v jednotlivých clusterech.

Vysvětlivky v seznamu zkratk.



Graf 1b. Průměrné standardizované hodnoty 13 hodnocených senzitivních parametrů na DKK v jednotlivých clusterech.

Vysvětlivky v seznamu zkratk.

klinických informací o testovaném pacientovi a na skupinové úrovni má potenciál přispět k odhalení patofyziologických mechanismů vzniku bolesti. Tato validační studie byla proto navržena s cílem vytvořit českou jazy-

kovou verzi tohoto v současnosti široce využívaného protokolu, protože nálezy jednotlivých testovaných parametrů jsou významně závislé na instrukcích k jednotlivým testům poskytovaných pacientům.

Z běžně vyšetřovaných senzitivních modalit [3] nereflkuje komplexní QST protokol pouze polohocit a pohybovit (statesteezii a kinesteezii, které však odrážejí postižení stejného typu vláken a senzitivních drah jako jiný z hodnocených parametrů, tj. vibrační cití, a jejichž kvantitativní testování je velmi složité [3]) a dále stereognozii (jejíž izolovaná abnormalita, beze změn jiných parametrů senzitivního testování nepatří do klinického obrazu pacientů s neuropatickou bolestí centrální ani periferní etiologie).

Jednotlivé soubory pacientů a zdravých dobrovolníků zařazených do naší studie neměly vzájemně odpovídající věkovou distribuci ani identické rozložení pohlaví. Tento fakt je podmíněn odlišnou věkovou distribucí pacientů s neuropatickou bolestí při sledovaných diagnózách a odlišným výskytem bolesti u mužů a žen v těchto skupinách nemocných. Zatímco výskyt bolestivé diabetické neuropatie signifikantně vzrůstá s věkem i trváním diabetu mellitu, a jedná se tedy spíše o onemocnění starších jedinců [17], u pacientů s roztroušenou sklerózou se neuropatická bolest vyskytuje nejčastěji během prvních 20 let vývoje onemocnění a postihuje tudíž častěji mladší dospělá, a to zejména ženy [18]. Nehomogenní věková distribuce souborů a nesterjnoměrné zastoupení pohlaví představují určitý problém při srovnávání absolutních hodnot jednotlivých prahů, a to vzhledem k fyziologic-

kým rozdílu citlivosti mezi muži a ženami a věkově podmíněnému poklesu percepce většiny senzitivních modalit [3,5,6]. V prezentované studii jsou však jednotlivé parametry QST protokolu hodnoceny ve formě tzv. Z-skóre, a tedy vztaženy k normativním hodnotám v příslušné věkové kategorii, což eliminuje význam věkových rozdílů mezi hodnocenými soubory.

Vyšetření kompletního protokolu v jedné lokalizaci trvá téměř 30 min. Pro pacienty i vyšetřující v naší studii však bylo testování navzdory zmíněnému trvání nenáročné či málo náročné a při zohlednění výše zmíněného přínosu je trvání komplexního QST protokolu možné pokládat za přijatelné. Pacienta je však vhodné před vyšetřením na tuto okolnost upozornit a během něj zajistit optimální podmínky umožňující udržení pozornosti pacienta po celou dobu testování. Vyšetření je proto nutné provádět v tichém klidném prostředí, bez zevních rušivých vlivů. Testovat také nelze pacienty s poruchou pozornosti či výrazným kognitivním deficitem, nespolupracující, unavené nebo pod vlivem psychoaktivních látek. Všechny tyto okolnosti byly reflektovány v prezentované studii.

Hodnoty jednotlivých testovaných parametrů v souboru zdravých kontrol vykazovaly vynikající (94–95 %) shodu s publikovanými normativními daty v obou testovaných lokalizacích (HKK i DKK) [6]. Zohledníme-li skutečnost, že normativní data jsou obvykle derivována tak, aby pokrývala 90–95 % hodnot v souborech zdravých kontrol, je zmíněná shoda prakticky ideální a potvrzuje vynikající použitelnost české jazykové verze komplexního QST protokolu a správnost testování všech hodnocených senzitivních modalit. Současně tyto výsledky poukazují na možnost bezvýhradného převzetí zmíněných publikovaných normativních dat u pacientů vyšetřovaných českou jazykovou verzí tohoto protokolu.

Při souhrnném hodnocení protokolu byla v souboru zdravých kontrol zachycena alespoň jedna abnormita u 43, resp. 41 % jedinců na HKK/DKK, dvě a více abnormit pak u 17, resp. 11 % kontrol (opět na HKK a DKK) a tři nebo více abnormit u 4 % z nich. Při interpretaci těchto nálezů je nezbytné opět zohlednit výše zmíněnou skutečnost, že normativní data jsou nastavena tak, aby pokrývala asi 90–95 % hodnot v souboru zdravých kontrol. Pokud použijeme přísnější z těchto kritérií, tedy normy zahrnující 95 % hodnot normativního souboru, pak 5 % nálezů v tomto

Tab. 6. Deskriptivní statistika a reliabilita čtyř opakovaných měření QST protokolu (n = 26).

Test	Průměr ze čtyř měření ¹	SD ze čtyř měření ¹	Min. a max. hodnota ²	SD ze čtyř měření v % celk. rozsahu ³	Reliabilita ⁴
CDT	-1,09	0,24	-1,90; -0,50	17,4 %	0,782
WDT	1,45	0,32	0,60; 3,30	11,9 %	0,699
TSL	2,54	0,52	1,10; 4,50	15,4 %	0,711
CPT	10,20	3,66	0,00; 27,30	13,4 %	0,892
HPT	47,31	2,15	33,00; 50,00	12,7 %	0,663
PPT	921,12	144,63	340,00; 1 800,00	9,9 %	0,926
MPT	60,02	35,05	5,66; 415,87	8,5 %	0,887
MPS	6,30	3,03	0,08; 50,18	6,0 %	0,918
WUR	2,36	0,63	1,06; 5,92	12,9 %	0,737
MDT	0,33	0,12	0,18; 1,08	13,1 %	0,593
VDT	7,83	0,12	7,00; 8,00	11,7 %	0,845
PHS	0,00	0,00	0,00; 0,00	–	–
DMA	0,00	0,00	0,00; 0,00	–	–

¹ Průměrná hodnota ze čtyř agregovaných měření daného parametru všech vyšetřených jedinců.

² Min. a max. hodnota ze všech vyšetřených subjektů ve čtyřech měřeních (určuje rozsah měřených hodnot).

³ Variabilita (SD mezi jednotlivými měřeními) vyjádřená jako procento rozsahu měřených hodnot.

⁴ Cronbachova alfa.

Použité zkratky – viz přehled v textu.

souboru zdravých kontrol bude při použití těchto normativních dat abnormální. Při 13 hodnocených parametrech lze statisticky snadno odvodit, že pravděpodobnost zcela normálního nálezu všech vyšetřených parametrů je u zdravých kontrol 51,3 %. Abnormitu alespoň jedné z testovaných senzitivních modalit lze tedy statisticky očekávat u 48,7 % testovaných jedinců. Pravděpodobnost výskytu dvou a více abnormit je pak 13,5 % a průkaz tří a více abnormit lze očekávat u 2,5 % zdravých kontrol. Tyto statisticky odvozené náhodné pravděpodobnosti výskytu zmíněného počtu abnormit jsou opět ve vynikající shodě se zjištěnými nálezy v našem souboru zdravých dobrovolníků. Podobný záchyt abnormit v souboru zdravých kontrol byl prokázán i ve velké multicentrické německé studii autorů originální verze protokolu [13], kde byla abnormita alespoň jedné z testovaných senzitivních modalit prokázána u více než 40 % testovaných zdravých jedinců kontrolního souboru. Tyto nálezy znovu potvrzují velmi dobrou validitu používané české verze komplexního QST protokolu, správnost testování sledovaných

parametrů a vhodný výběr jedinců do souboru zdravých kontrol.

Při hodnocení nálezů na skupinové úrovni prokázala naše studie vysoce signifikantní rozdíly většiny testovaných senzitivních parametrů mezi zdravými kontrolami a pacienty s neuropatickou bolestí (centrální i periferní). Abnormální nálezy alespoň jedné z hodnocených senzitivních modalit byl při souhrnném hodnocení celého protokolu zachycen u 90 % pacientů s neuropatickou bolestí. Tyto výsledky zcela odpovídají publikovaným velkým souborům pacientů vyšetřovaných pomocí originální verze DFNS-QST protokolu [13], kde byla alespoň jedna senzitivní abnormita zachycena u 92 % pacientů s neuropatickou bolestí (při zařazení širšího spektra klinických jednotek vedoucích k jejímu rozvoji). Plně v souladu s těmito nálezy je i výborná prediktivní schopnost většiny testovaných senzitivních parametrů v odlišení zdravých kontrol a pacientů s bolestivou diabetickou neuropatií. Česká jazyková verze protokolu proto vykazuje vysokou a s původní verzí srovnatelnou schopnost detekce senzitivních abnormit u pacientů s neuropatickou bolestí různé etiologie.

Všechny zařazené senzitivní parametry nevykazovaly v naší studii stejnou četnost záchytu abnormit a predikční schopnost v diagnostice neuropatické bolesti. Určité rozdíly byly v tomto smyslu prokázány dokonce i mezi hodnocenými skupinami pacientů s neuropatickou bolestí (centrální ve srovnání s periferní). Podkladem těchto rozdílů je skutečnost, že různé druhy neuropatické bolesti (s předpokládaným odlišným patofyziologickým mechanismem vzniku) vykazují odlišné spektrum senzitivních abnormit. Každý z hodnocených senzitivních parametrů má tedy odlišnou frekvenci abnormit u různých typů neuropatické bolesti [13]. Parametry s nízkou prediktivní schopností v naší studii (DMA, WUR) vykazovaly u pacientů s diabetickou neuropatií a centrální neuropatickou bolestí nízký záchyt abnormálních nálezů i ve velkém multicentrické studii hodnotící výskyt senzitivních abnormit u 1 236 pacientů s neuropatickou bolestí různé etiologie [13]. Abnormity těchto senzitivních parametrů jsou však naopak velmi časté u pacientů s jinými klinickými jednotkami manifestujícími se neuropatickou bolestí, které nebyly v naší studii hodnoceny, tedy zejména u posttherapeutické neuralgie či CRPS [13]. Protože protokol není specifický pro diagnostiku určitého typu neuropatické bolesti, ale naopak je využíván k hodnocení senzitivních abnormit u celého spektra pacientů s neuropatickou bolestí v plné šíři možných vyvolávajících příčin, je zařazení těchto senzitivních parametrů do komplexního QST testování zcela opodstatněné.

Právě odlišný výskyt jednotlivých senzitivních abnormit u různých pacientů a klinických jednotek manifestujících se neuropatickou bolestí je podkladem pro možnost odlišení různých senzitivních profilů [13]. Podle současných předpokladů odpovídají tyto profily různým patofyziologickým mechanismům rozvoje neuropatické bolesti a jejich výskyt může být různý dokonce i u identické klinické jednotky vedoucí ke vzniku algického stavu (na velkých souborech pacientů byly např. prokázány různé senzitivní profily u pacientů diabetickou neuropatií, které mohou vysvětlit třeba variabilní klinické obtíže či odlišnou medikamentózní ovlivnitelnost bolesti u různých skupin pacientů s touto klinickou jednotkou) [14]. Podobně jako specializované dotazníkové nástroje [8,15,16] tak komplexní QST protokol umožňuje odlišení různých typů neuropatické bolesti jako podklad pro stratifikaci

pacientů např. pro potřeby lékových studií či sledování odlišného přirozeného vývoje postižení u různých typů neuropatické bolesti. Detailní zhodnocení výskytu senzitivních abnormit u pacientů s neuropatickou bolestí na skupinové i individuální úrovni navíc přispívá k odhalení příslušných patofyziologických mechanismů jejího vzniku. Naše studie prokázala schopnost české verze QST protokolu odlišit různé profily neuropatické bolesti u dvou skupin pacientů s předpokládaným odlišným mechanismem rozvoje neuropatické bolesti (tedy u bolestivé diabetické neuropatie a roztroušené sklerózy). Zjištěné typy senzitivních abnormit v naší studii byly u obou těchto skupin pacientů obdobné jako v publikované multicentrické německé studii autorů originální verze protokolu [13], což potvrzuje dobrou a s původní verzí srovnatelnou konstruktovou validitu české verze QST protokolu ve schopnosti odlišení různých typů senzitivních profilů.

Opakované testování kompletního protokolu v souboru zdravých dobrovolníků prokázalo nízkou variabilitu nálezů a uspokojivou reliabilitu všech hodnocených parametrů. Při hodnocení opakovatelnosti vyšetření představuje u psychofyzikálních vyšetřovacích metod vždy určitý problém nastavení vhodného odstupů mezi jednotlivými prováděnými vyšetřeními. V klinické praxi jsou vyšetření určená pro monitoraci vývoje klinického stavu pacienta a/nebo monitoraci terapeutického efektu preparátů používaných v terapii neuropatické bolesti prováděna obvykle s většími odstupy (mnoho měsíců či spíše let). Při testování opakovatelnosti vyšetření v rámci validačních studií je vhodné vyhnout se velmi krátkým (několikadenním) odstupům mezi opakovanými vyšetřeními, zejména proto, aby si vyšetřovaní jedinci neměli možnost spolehlivě pamatovat minulý výsledek jednotlivých testů, což by mohlo vést k falešně lepší opakovatelnosti vyšetření. Velmi dlouhé intervaly mezi provedenými vyšetřeními (v řádu několika měsíců či let) jsou naopak podkladem velké časové náročnosti studie, častým důvodem pro předčasné ukončení účasti ve studii ze strany řady zařazených jedinců a event. i příčinou falešně horší opakovatelnosti vzhledem k možnému ovlivnění nálezů případným vývojem klinického stavu vyšetřovaných jedinců.

V naší studii jsme zvolili měsíční interval mezi jednotlivými opakováními testování, který se jeví jako optimální proto, že jednak eliminuje nevýhody obou výše zmíně-

ných méně vhodných časových nastavení (tj. velmi krátkých i velmi dlouhých intervalů mezi testováními) a jednak umožňuje vyšetření žen vždy v identické fázi menstruačního cyklu, což napomáhá eliminaci dalšího z faktorů s potenciálním vlivem na senzitivní percepci.

Závěry

Prezentovaná studie prokázala velmi dobrou praktickou použitelnost a nízkou subjektivní náročnost vyšetření všech hodnocených parametrů české jazykové verze komplexního QST protokolu pro pacienty i vyšetřující, a to navzdory skutečnosti, že je testování poměrně časově náročné. Poskytuje však unikátní kvantifikované souhrnné informace o velmi širokém spektru senzitivních modalit.

Hodnoty všech vyšetřených parametrů a počty zjištěných abnormit při kumulativním hodnocení celého protokolu byly v souboru zdravých kontrol ve zcela vynikající shodě s publikovanými normativními daty, což potvrdilo velmi dobrou validitu české jazykové verze QST protokolu a správnost testování všech zařazených senzitivních modalit v provedené studii a umožnilo bezvýhradně převzetí publikovaných normativních dat [6].

Signifikantní rozdíly většiny testovaných senzitivních parametrů komplexního QST protokolu mezi pacienty s neuropatickou bolestí (centrálního i periferního původu) a zdravými kontrolami a jejich vynikající prediktivní schopnost v odlišení zdravých kontrol a pacientů s diabetickou neuropatií verifikovaly velmi dobrou použitelnost komplexního QST protokolu pro hodnocení výskytu širokého spektra senzitivních abnormit u pacientů s neuropatickou bolestí různé etiologie.

Absence signifikantních rozdílů většiny hodnocených senzitivních modalit mezi pacienty s bolestivou diabetickou neuropatií a nemocnými s centrální neuropatickou bolestí při roztroušené skleróze potvrdilo, že tyto jednotky nelze spolehlivě odlišit pomocí izolovaného hodnocení jednotlivých QST parametrů. Obě skupiny však vykazovaly odlišný senzitivní profil, zjištěný souhrnným zhodnocením všech zařazených QST parametrů pomocí shlukové analýzy. Tyto nálezy verifikovaly schopnost české verze komplexního QST protokolu diferencovat skupiny pacientů s odlišným mechanismem vzniku neuropatické bolesti pomocí odlišení různých senzitivních profilů.

VALIDACE ČESKÉ VERZE KOMPLEXNÍHO PROTOKOLU KVANTITATIVNÍHO TESTOVÁNÍ SENZITIVITY

Nízká variabilita hodnot všech 13 testovacích senzitivních parametrů a uspokojivá až velmi dobrá reliabilita nálezů opakovaných vyšetření prokázala, že česká verze komplexního QST protokolu je spolehlivým testem s vysokou vnitřní konzistencí a dobrou opakovatelností a lze ji doporučit pro použití v klinické praxi, včetně dlouhodobého klinického sledování pacientů a hodnocení terapeutického efektu léků určených pro léčbu neuropatické bolesti.

Práce byla podpořena grantem IGA MZ ČR NT 13523-4 a MZ ČR – RVO (FNBr, 65269705), interními zdroji CEITEC MUNI, projektem specifického výzkumu č. MUNI/ /A/0935/2013 z programu podpory studentských projektů na Masarykově univerzitě a 7. rámcovým programem Evropské unie v rámci projektu No. 602133 (Non-coding RNAs for personalised pain medicine).

Autoři práce děkují paní Janě Novohradské za zásadní pomoc při sběru dat a vyšetřování pacientů.

Použité zkratky

AUC – Area Under Curve (plocha pod ROC křivkou)
 CDT – Cold Detection Threshold (senzitivní práh pro chlad)
 CPT – Cold Pain Threshold (termoalgický práh pro chlad)
 DFNS – Der Deutsche Forschungsverbund Neuropathischer Schmerz (německá multicentrická skupina zaměřená na výzkum neuropatické bolesti)
 DMA – Dynamic Mechanic Allodynia (dynamická mechanická alodynie)
 HPT – Heat Pain Threshold (termoalgický práh pro teplo)
 MDT – Mechanical Detection Threshold (senzitivní práh pro mechanickou kožní citlivost)
 MPS – Mechanical Pain Sensitivity (senzitivita pro ostrou, mechanicky vyvolanou bolest)
 MPT – Mechanical Pain Threshold (algický práh pro ostrou, mechanicky vyvolanou bolest)
 NPSI – Neuropathic Pain Symptom Inventory (dotazník používaný v diagnostice neuropatické bolesti)
 NRS – Numeric Rating Scale (numerická škála bolesti)

pDPN – painful Diabetic Peripheral Neuropathy (bolestivá diabetická polyneuropatie)
 pMS – pain in Multiple Sclerosis (bolest při roztroušené skleróze)
 PHS – Paradoxical Heat Sensation (paradoxní vnímání chladných podnětů jako horkých)
 PPT – Pressure Pain Threshold (algický práh pro hlubokou tlakovou bolest)
 QST – Quantitative Sensory Testing (kvantitativní testování senzitivity)
 ROC křivka – Receiver Operating Characteristic curve
 TSL – Thermal Sensory Limen (teplotní rozsah vnímaný jako neutrální)
 VDT – Vibration Detection Threshold (senzitivní práh pro vibrační čítí)
 WDT – Warm Detection Threshold (senzitivní práh pro teplo)
 WUR – Wind-Up Ratio (časová sumace ostrých mechanicky vyvolaných bolestivých podnětů)

Literatura

1. Cruccu G, Sommer C, Anand P, Attal N, Baron R, Garcia-Larrea L et al. EFNS guidelines on neuropathic pain assessment: revised 2009. *Eur J Neurol* 2010; 17(8): 1010–1018. doi: 10.1111/j.1468-1331.2010.02969.x.
2. Haanpää M, Attal N, Backonja M, Baron R, Bennett M, Bouhassira et al. NeuPSIG guidelines on neuropathic pain assessment. *Pain* 2011; 152(1): 14–27. doi: 10.1016/j.pain.2010.07.031.
3. Vlčková E, Šrotová I. Vyšetření senzitivity. *Cesk Slov Neurol N* 2014; 77/110(4): 402–418.
4. Rolke R, Magerl W, Campbell KA, Schalber C, Caspari S, Birklein F et al. Quantitative sensory testing: a comprehensive protocol for clinical trials. *Eur J Pain* 2006; 10(1): 77–88.
5. Rolke R, Baron R, Maier C, Tölle TR, Treede RD, Beyer A et al. Quantitative sensory testing in the German Research Network on Neuropathic Pain (DFNS): standardized protocol and reference values. *Pain* 2006; 123(3): 231–243.
6. Magerl W, Krumova EK, Baron R, Tölle T, Treede RD, Maier C. Reference data for quantitative sensory testing (QST): refined stratification for age and a novel method for statistical comparison of group data. *Pain* 2010; 151(3): 598–605. doi: 10.1016/j.pain.2010.07.026.
7. Treede RD, Jensen TS, Campbell JN, Cruccu G, Ostrovsky JO, Griffin JW et al. Neuropathic pain. Redefinition and a grading system for clinical and research purposes. *Brain* 2008; 131(18): 1630–1635.

8. Šrotová I, Vlčková E, Straková J, Kincová S, Ryba L, Dušek L et al. Validace české verze Neuropathic Pain Symptom Inventory (NPSIcz). *Cesk Slov Neurol N* 2015; 78/111(1): 45–56.
9. England JD, Gronseth GS, Franklin G, Miller RG, Asbury AK, Carter GT et al. Distal symmetric polyneuropathy: a definition for clinical research: report of the American Academy of Neurology, the American Association of Electrodiagnostic Medicine, and the American Academy of Physical Medicine and Rehabilitation. *Neurology* 2005; 64(2): 199–207.
10. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol* 2011; 69(2): 292–302. doi: 10.1002/ana.22366.
11. Moravcová E, Bednařík J. Počítačem asistované stanovení termického prahu. *Cesk Slov Neurol N* 2003; 66/99(4): 263–269.
12. Buršová Š, Vlčková E, Hnojčíková M, Němec M, Mičánková Adamová B, Bednařík J. Počítačem asistované kvantitativní testování senzitivity – normativní data. *Cesk Slov Neurol N* 2012; 75/108(4): 444–453.
13. Maier C, Baron R, Tölle TR, Binder A, Birbaumer N, Birklein F et al. Quantitative sensory testing in the German Research Network on Neuropathic Pain (DFNS): somatosensory abnormalities in 1,236 patients with different neuropathic pain syndromes. *Pain* 2010; 150(3): 439–450. doi: 10.1016/j.pain.2010.05.002.
14. Krumova EK, Geber C, Westermann A, Maier C. Neuropathic pain: is quantitative sensory testing helpful? *Curr Diab Rep* 2012; 12(4): 393–402. doi: 10.1007/s11892-012-0282-7.
15. Bennett MI, Attal N, Backonja MM, Baron R, Bouhassira D, Freynhagen R et al. Using screening tools to identify neuropathic pain. *Pain* 2007; 127(3): 199–203.
16. Bouhassira D, Attal N, Fermanian J, Alchaar H, Gautron M, Masquelier E et al. Development and validation of the Neuropathic Pain Symptom Inventory. *Pain* 2004; 108(3): 248–257.
17. Young MJ, Boulton AJ, MacLeod AF, Williams DR, Sonksen PH. A multicentre study of the prevalence of diabetic peripheral neuropathy in the United Kingdom hospital clinic population. *Diabetologia* 1993; 36(2): 150–154.
18. Osterberg A, Boivie J, Thuomas KA. Central pain in multiple sclerosis – prevalence and clinical characteristics. *Eur J Pain* 2005; 9(5): 531–542.

Elektronické přílohy naleznete na stránkách www.csnn.eu.

18. Šrotová I, Vlčková E, Straková J, Kincová S, Ryba L, Dušek L, Bednařík J. Validace české verze Neuropathic Pain Symptom Inventory (NPSI_{CZ}). *Cesk Slov Neurol N* 2015b; 78/111: 45-56. IF = 0,209.

Původní práce je zaměřená na validaci české jazykové verze dotazníku Neuropathic Pain Symptom Inventory (NPSI). NPSI je jedním ze specifických diagnostických nástrojů vyvinutých cíleně za účelem bližší specifikace charakteru neuropatické bolesti, intenzity jednotlivých symptomů a analýzy jednotlivých jejích subtypů (domén). Umožňuje podrobný popis obtíží pacienta spojený s kvantitativním hodnocením intenzity bolestí různého charakteru a zahrnuje i vyjádření frekvence těchto potíží.

V rámci validační studie byla vytvořena česká verze dotazníku doporučovanou metodou „forward-backward translation“ a pomocí této verze byly následně vyšetřeny soubory pacientů s neuropatickou bolestí periferní nebo centrální etiologie a skupina nemocných s bolestí nociceptivní v důsledku pokročilé artrózy kyčelního nebo kolenního kloubu.

Výsledky validační studie prokazují velmi dobrou použitelnost dotazníku a nenáročnost jeho použití ve všech testovaných skupinách. NPSI dotazník je využitelný nejen k bližšímu popisu a kvantifikaci intenzity jednotlivých symptomů či dimenzí neuropatické bolesti (k němuž byl původně koncipován), ale navíc i jako diskriminační nástroj pro odlišení pacientů s neuropatickou a nociceptivní bolestí. V této roli prokázala nově vytvořená česká jazyková verze dotazníku vynikající diagnostickou validitu a lze ji doporučit jako vhodný a snadno použitelný nástroj v diagnostickém algoritmu neuropatické bolesti.

Dotazník má však omezenou validitu v odlišení centrální a periferní neuropatické bolesti, což je v souladu s předpokladem, že se oba typy neuropatické bolesti mohou projevat podobně. Tyto výsledky plně podporuje i hodnocení symptomových profilů (jako jeden v nejaktuálnějších trendů ve výzkumu neuropatické bolesti), které v komentované práci prokázalo jejich široký překryv mezi pacienty s centrální neuropatickou bolestí při roztroušené skleróze a periferní neuropatickou bolestí při diabetické polyneuropatii. Tyto výsledky tak plně podporují v současnosti akcentovanou hypotézu, že charakter neuropatické bolesti není specifický pro jednotlivé etiologické jednotky, ale odráží určité patofyziologické mechanismy, které se na rozvoji bolesti podílejí napříč spektrem vyvolávajících diagnóz.

Komentovaná práce tedy v českém jazykovém prostředí poskytla první validovanou jazykovou verzi některého z dotazníků, využitelných v diagnostice neuropatické bolesti.

Validace české verze Neuropathic Pain Symptom Inventory (NPSI_{CZ})

Validation of the Czech Version of the Neuropathic Pain Symptom Inventory (NPSI_{CZ})

Souhrn

Úvod: Důležitou součástí diagnostického algoritmu neuropatické bolesti jsou jednoduché dotazníkové nástroje založené na přítomnosti typických popisných charakteristik (tzv. deskriptorů). V českém jazykovém prostředí však není k dispozici validovaná verze žádného z mezinárodně akceptovaných dotazníků. **Cíl:** Cílem práce bylo vytvoření české jazykové verze jednoho z nejpoužívanějších dotazníků zaměřených na diagnostiku neuropatické bolesti a charakteristiku jednotlivých jejích subtypů, a to tzv. NPSI (Neuropathic Pain Symptom Inventory) a její validace. **Soubory a metodika:** Dotazník byl přeložen metodou „forward-backward translation“. Pro potřeby validace byla touto českou jazykovou verzí následně vyšetřena skupina pacientů s neuropatickou bolestí periferního (n = 66) nebo centrálního (n = 30) původu (v rámci polyneuropatie či roztroušené sklerózy) a skupina nemocných s bolestí nociceptivní v důsledku pokročilé artrózy kyčelního nebo kolenního kloubu (n = 70). Za účelem hodnocení opakovatelnosti testu byl u části pacientů (n = 19) dotazník administrován dvakrát s odstupem přibližně tří hod. **Výsledky:** Srovnání jednotlivých hodnocených položek, dílčích škál i celkového NPSI skóre pomocí ROC analýzy prokázalo vysokou schopnost diskriminace mezi neuropatickou a nociceptivní bolestí (p < 0,001), ale nízkou schopnost odlišení neuropatické bolesti centrálního a periferního původu (p > 0,05). Opakovaná administrace testu potvrdila vysokou opakovatelnost testu (ICC, Intraclass Correlation Coefficient = 0,86 pro sumární skóre). Pomocí clusterové analýzy bylo identifikováno šest odlišných symptomových profilů. **Závěr:** Vytvořená česká verze dotazníku NPSI je schopna spolehlivě diskriminovat neuropatickou a nociceptivní bolest a identifikovat odlišné symptomové profily bolesti při akceptovatelné opakovatelnosti testu. Dotazník lze tedy doporučit jako vhodný a snadno použitelný nástroj v diagnostickém algoritmu neuropatické bolesti, využitelný i pro longitudoální sledování.

Seznam použitých zkratk

AUC	Area Under Curve (plocha pod ROC křivkou)		ňuje i výsledky otázek Q4 a Q7 (nezapočítávané do NPSI skóre v originální verzi testu)
ICC	Intraclass Correlation Coefficient	NPSI _{CZ-D} skóre	modifikovaná verze originálního NPSI _{CZ} skóre, vytvořená na základě výsledků diskriminační analýzy
NPSI	Neuropathic Pain Symptom Inventory (dotazník pro diagnostiku neuropatické bolesti)	NRS	Numeric Rating Scale (numerická škála bolesti)
NPSI _{CZ}	česká verze dotazníku Neuropathic Pain Symptom Inventory (a jeho originálního skóre)	ROC křivka	Receiver Operating Characteristic curve
NPSI _{CZ-12} skóre	modifikovaná verze originálního NPSI _{CZ} skóre, která zohled-	TEP	totální endoprotéza (kyčelního nebo kolenního) kloubu

Práce byla podpořena grantem IGA MZ ČR NT 13523-4 a MZ ČR – RVO (FNBr, 65269705), interními zdroji CEITEC MUNI a 7. rámcovým programem Evropské unie v rámci projektu No. 602133 (Non-coding RNAs for personalised pain medicine).

Autoři práce děkují paní Janě Novohradské za pomoc při sběru dat a vyšetřování pacientů.

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.

I. Šrotová^{1,2}, E. Vlčková^{1,2}, J. Straková¹, S. Kincová^{1,2}, L. Ryba³, L. Dušek⁴, B. Adamová^{1,2}, J. Bednařík^{1,2}

¹ Neurologická klinika LF MU a FN Brno

² CEITEC – Středoevropský technologický institut MU Brno

³ Ortopedická klinika LF MU a FN Brno

⁴ Institut biostatistiky a analýz MU, Brno



MUDr. Eva Vlčková
Neurologická klinika
LF MU a FN Brno
Jihlavská 20
625 00 Brno
e-mail: evlckova@email.cz

Přijato k recenzi: 1. 8. 2014

Přijato do tisku: 28. 8. 2014

Klíčová slova

neuropatická bolest – nociceptivní bolest – kvantifikace bolesti – dotazník – polyneuropatie – roztroušená skleróza – artróza

Key words

neuropathic pain – nociceptive pain – pain measurement – questionnaire – polyneuropathy – multiple sclerosis – osteoarthritis

Abstract

Introduction: Simple questionnaires based on so called "neuropathic pain descriptors" are the most frequently used screening tools in the diagnosis of neuropathic pain, especially by non-specialists. However, no validated Czech version of any of the internationally accepted neuropathic pain questionnaires is available. **Aim:** The aim of this study was to develop and validate a Czech version of the Neuropathic Pain Symptom Inventory (NPSI), a questionnaire that allows the user to characterize subtypes of neuropathic pain, is sensitive to change, and has discriminatory power. **Patients and methods:** The NPSI was translated into the NPSI_{CZ} using the forward-backward translation method and validated in a group of patients suffering from neuropathic pain of peripheral (n = 66) or central origin (n = 30) due to polyneuropathy or multiple sclerosis, and in a group of individuals suffering from nociceptive pain (due to severe osteoarthritis of the knee or hip joint; n = 70). The NPSI_{CZ} was repeated within three hours in 19 individuals to determine test-retest reliability. **Results:** The NPSI_{CZ} showed good diagnostic validity in discriminating between patients with neuropathic and nociceptive pain (p < 0.001) but low ability to discriminate between patients with central and peripheral neuropathic pain (p > 0.05). Repeated administration confirmed acceptable test-retest reliability (intra-class correlation coefficient of 0.86 for the NPSI_{CZ} sum score). Cluster analysis identified six different pain profiles. **Conclusions:** The NPSI_{CZ} is able to discriminate between neuropathic and nociceptive pain, to identify different pain profiles, and has acceptable test-retest reliability. It can, therefore, be recommended as an easy-to-administer questionnaire suitable for the diagnosis of neuropathic pain, including long-term follow up.

Úvod

Neuropatická bolest je součástí klinického obrazu řady onemocnění periferního i centrálního nervového systému. Podle aktuální definice vzniká důsledkem léze nebo nemoci postihující somatosenzitivní nervový systém [1].

Ve vyspělém světě se její prevalence odhaduje na 6–8 % populace [2,3]. Nejčastěji se vyskytuje u diabetické polyneuropatie, po traumatech periferních nervů, toxických (alkoholových, polékových) a ischemických poškozeních periferního nervového systému, při neuroinfekcích (borelióze, herpetických infekcích, HIV), neuralgii trigeminu, míšních lézích, po iktech či při roztroušené skleróze. Neuropatická složka je také významnou součástí bolesti vertebrogenního původu.

Neuropatická bolest je spojována s typickými deskriptory (popisnými charakteristikami), jako např. pálení, bodání, svědění, pocit elektrických výbojů či bolestivého chladu, a často bývá provázena dalšími senzitivními vjemy, jako jsou mravenčení anebo brnění apod. Stanovení přítomnosti těchto deskriptorů je klíčovou součástí diagnostického algoritmu neuropatické bolesti, a to jak v rámci anamnézy, tak i při použití v rámci specializovaných dotazníků zaměřených na diagnostiku neuropatické bolesti. Tyto dotazníky umožňují detailní deskripci bolesti, většinou v kombinaci s hodnocením intenzity celkové bolesti a/nebo jejich jednotlivých charakteristik a v některých případech i se specifikací její anatomické distribuce [4–15]. V klinické praxi je k dispozici velké množství takových dotazníků, jejich validita v diagnostice neuropatické bolesti však není ve všech případech stejná a většina dotazníků není cíleně zaměřena na neu-

ropatickou bolest jako takovou, což snižuje senzitivitu i specifitu příslušného dotazníku v její diagnostice [5]. Výjimku tvoří několik dotazníků, které byly v posledních letech cíleně vyvinuty právě jako screeningové testy za účelem rychlé a objektivní identifikace neuropatické bolesti na podkladě přítomnosti jejích typických deskriptorů (v některých případech v kombinaci s jednoduchým klinickým testováním). Jedná se především o následující dotazníky: „The LANSS Pain Scale: the Leeds Assessment of Neuropathic Symptoms and Signs“ [9,10], „Neuropathic Pain Questionnaire“ [11], a jejich zkrácená verze [12], „Neuropathic Pain Symptom Inventory“ [13], „DN 4“ [14], „ID Pain“ [15] či „PainDETECT“ [4]. Tyto dotazníky vykazují vysokou a vzájemně srovnatelnou validitu v diskriminaci neuropatické a nociceptivní bolesti [5] a jsou podle aktuálních doporučení klíčovou součástí diagnostického procesu neuropatické bolesti, zejm. pro nespécialisty [16,17]. Vedle diagnostiky neuropatické bolesti jsou využívány pro analýzu jednotlivých symptomových profilů testovaných pacientů. Dotazníky tak poskytují např. podklad pro stratifikaci pacientů v rámci lékových či intervenčních studií nebo hodnocení cíleného efektu léčby na jednotlivé komponenty neuropatické bolesti. Z longitudinálního hlediska je účelné jejich využití pro monitorace terapeutického efektu preparátů využívaných v léčbě neuropatické bolesti, stejně jako pro potřeby monitorování klinického vývoje v rámci dlouhodobého sledování pacientů. Žádný z těchto dotazníků nebyl nicméně dosud validován v českém jazyce.

Dotazník NPSI (Neuropathic Pain Symptom Inventory) [13], na jehož validaci je zamě-

řena prezentovaná studie, je jedním z výše jmenovaných specifických diagnostických nástrojů vyvinutých cíleně za účelem diagnostiky neuropatické bolesti a analýzy jednotlivých jejích subtypů. Dotazník obsahuje 12 položek a je zaměřen na popis pacientových bolestí v posledních 24 hod (Příloha 1). Deset otázek je zaměřeno na typické deskriptory neuropatické bolesti a její časté doprovodné symptomy (bolest pálivá (Q1), svíravá (Q2), tlaková (Q3), krátká záchvatovitá bolest charakteru elektrického šoku (Q5) či bodání (Q6), bolest evokovaná vnějším podnětem, tj. dotekem (Q8), tlakem (Q9) anebo chladem (Q10), a přítomnost abnormálních pocitů v distribuci bolesti charakteru mravenčení (Q11) či brnění (Q12)). Intenzita každého z těchto deskriptorů je hodnocena pomocí numerické škály bolesti (Numeric Rating Scale, NRS) (Příloha 1). Celkové NPSI skóre je pak vypočteno jako průměr hodnot NRS z těchto 10 otázek (Příloha 2). Jedna otázka testu (Q4) je zaměřena na počet hodin, po které pacient v posledním dni trpěl samovolnou bolestí, a jeden dotaz (Q7) je cílen na počet krátkých záchvatů bolesti podobných elektrickému šoku či bodání. U obou otázek jsou odpovědi hodnoceny semikvantitativně (Příloha 1) a v originální verzi testu se do celkového NPSI skóre ani do jednotlivých dílčích škál (viz níže) nezapočítávají (Příloha 2). Podle některých novějších prací zaměřených na validaci NPSI dotazníku, resp. jeho jazykových verzí mohou být tyto otázky při výpočtu celkového skóre také zohledněny, případně může být jednotlivým otázkám dotazníku přiřkládána různá váha (s ohledem na jejich poněkud odlišnou validitu v diagnostice neuropatické bolesti). Mohou tak být vypočtena modifiko-

DOTAZNÍK NEUROPATHIC PAIN SYMPTOM INVENTORY – NPSI_{CZ}

Rádi bychom věděli, zda pociťujete **SPONTÁNNÍ BOLEST**, tj. **samovolnou bolest, objevující se bez jakékoli provokace**. Pro každou z následujících otázek vyberte číslo, které nejlépe odpovídá **průměrné intenzitě spontánní bolesti během posledních 24 hod** (pokud se toto časové období zásadně neliší od Vašeho běžného průměru např. v posledním měsíci). Nepociťujete-li žádné takové bolesti, zvolte číslo „0“ (zakroužkujte vždy jen jedno číslo).

Q1. POCIŤUJETE PÁLIVOU BOLEST? 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Q2. POCIŤUJETE SVÍRAVOU BOLEST? 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Q3. POCIŤUJETE TLAKOVOU BOLEST? 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Q4. BĚHEM POSLEDNÍCH 24 HOD jste měl/a SPONTÁNNÍ BOLESTI (vyberte odpověď, která nejlépe vystihuje Váš případ):

/_/ neustále /_/ mezi 8 a 12 hod /_/ mezi 4 a 7 hod /_/ mezi 1 a 3 hod /_/ méně než 1 hod

Rádi bychom věděli, zda míváte **KRÁTKÉ ZÁCHVATOVITÉ BOLESTI**. Pro každou z následujících otázek vyberte číslo, které nejlépe odpovídá **průměrné intenzitě Vašich krátkých záchvatů bolesti v posledních 24 hod** (pokud se toto časové období neliší od Vašeho běžného průměru např. v posledním měsíci). Nepociťujete-li žádné takové bolesti, zvolte číslo „0“ (zakroužkujte vždy jen jedno číslo).

Q5. PŘIPOMÍNÁ VAŠE BOLEST ELEKTRICKÉ ŠOKY? 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Q6. PŘIPOMÍNÁ VAŠE BOLEST BODÁNÍ? 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Q7. KOLIK TĚCHTO KRÁTKÝCH ZÁCHVATŮ BOLESTI JSTE MĚL/A BĚHEM POSLEDNÍCH 24 HOD? (vyberte odpověď, která nejlépe vystihuje Váš případ)

/_/ více než 20 /_/ mezi 11 a 20 /_/ mezi 6 a 10 /_/ mezi 1 a 5 /_/ žádné záchvaty bolesti

Rádi bychom věděli, jestli pociťujete **BOLEST VYVOLANOU NEBO ZHORŠENOU DOTEKEM, TLAKEM, KONTAKTEM S CHLADEM ČI TEPEM V OBLASTI, KDE TUTO BOLEST POCIŤUJETE**. Pro každou z následujících otázek vyberte číslo, které nejlépe odpovídá **průměrné intenzitě vyvolané bolesti během posledních 24 hod** (pokud se toto období neliší od Vašeho běžného průměru). Nepociťujete-li žádné takové bolesti, zvolte číslo „0“ (zakroužkujte vždy jen jedno číslo).

Q8. Je BOLEST VYVOLÁNA NEBO ZHORŠENA DOTEKEM v oblasti, kde pociťujete bolest? 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Q9. Je BOLEST VYVOLÁNA NEBO ZHORŠENA TLAKEM v oblasti, kde pociťujete bolest? 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Q10. Je bolest VYVOLÁNA NEBO ZHORŠENA KONTAKTEM S NĚČÍM STUDENÝM v oblasti, kde pociťujete bolest? 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Rádi bychom věděli, zda máte **ABNORMÁLNÍ POCITY** v oblasti bolesti. Pro každou z následujících otázek vyberte číslo, které nejlépe odpovídá **průměrné intenzitě těchto pocitů během posledních 24 hod** (pokud se neliší od Vašeho běžného průměru). Nemáte-li žádné takové pocity, zvolte číslo „0“ (zakroužkujte vždy jen jedno číslo).

Otázka č. 11 CÍTÍTE MRAVENČENÍ? 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Otázka č. 12 CÍTÍTE BRNĚNÍ? 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Příloha 1. Doporučená finální verze dotazníku NSPI_{CZ}.

vaná NPSI skóre (např. NPSI-G skóre [18]). Autoři originální verze dále doporučují výpočet dílčích škál hodnotících specificky intenzitu jednotlivých typů neuropatické bolesti (tj. povrchové a hluboké spontánní bolesti, krátké záchvatovité bolesti, bolesti vyvolané či zhoršené vnějším podnětem) a doprovodných abnormálních senzitivních pocitů (Příloha 2).

Cílem prezentované studie bylo vytvoření české jazykové verze dotazníku Neuropathic

Pain Symptom Inventory tak, aby byla akceptovatelná tvůrci původní jazykové verze a co nejsrozumitelnější pro české pacienty, a validace jejího použití v klinické praxi.

Soubor

Do studie byly zařazeny dvě skupiny pacientů:

a) pacienti s periferní či centrální neuropatickou bolestí (jako klinickým projevem polyneuropatie či roztroušené sklerózy), vyšet-

řování v příslušném období (viz metodika) na Neurologické klinice LF MU a FN Brno a b) pacienti s nociceptivní bolestí při artróze kyčelního nebo kolenního kloubu, bezprostředně před implantací endoprotézy (TEP), hospitalizovaní či ambulantně vyšetření na Ortopedické klinice stejné nemocnice. Vstupním kritériem pro oba soubory byla dobrá spolupráce pacienta, ochota k zařazení do studie a absence kognitivního deficitu. Všichni zařazení je-

Jednotlivé typy bolesti		
Otázky, reflektující danou problematiku:	Výpočet subskóre:	
<i>Pálivá (povrchová) spontánní bolest</i> 1. otázka 1 =	otázka 1 =	/10
<i>Tlaková (hluboká) spontánní bolest</i> 2. (otázka 2 + otázka 3) =	(otázka 2 + otázka 3)/2 =	/10
<i>Paroxysmální bolest</i> 3. (otázka 5 + otázka 6) =	(otázka 5 + otázka 6)/2 =	/10
<i>Vyvolaná bolest</i> 4. (otázka 8 + 9 + 10) =	(otázka 8 + 9 + 10)/3 =	/10
<i>Parestézie/dysestezie</i> 5. (otázka 11 + otázka 12) =	(otázka 11 + otázka 12)/2 =	/10
<i>Celková úroveň intenzity bolesti:</i> (1. + 2. + 3. + 4. + 5.) =		/100

Příloha 2. Výpočet intenzity bolesti.

dinci byli informováni o účelu vyšetření a podepsali informovaný souhlas. Protokol vyšetření byl schválen etickou komisí FN Brno.

Soubor A – pacienti s neuropatickou bolestí

Do souboru pacientů s neuropatickou bolestí bylo zařazeno 96 jedinců (32 mužů a 64 žen, průměrný věk 56,4 ± 14,7 let) (tab. 1a, b). Diagnóza neuropatické bolesti byla u nich expertně stanovena na základě podrobného rozboru anamnestických dat. Léze nebo dysfunkce somatosenzitivního nervového systému (jejíž přítomnost je dle současných doporučení vyžadována pro stanovení diagnózy neuropatické bolesti) byla potvrzena pomocí klinického a EMG vyšetření u pacientů s periferní neuropatickou bolestí při polyneuropatii (soubor A1, 66 pacientů) a/nebo pomocí klinického vyšetření, somatosenzitivních evokovaných potenciálů a MR vyšetření mozku a/nebo C či Th míchy u pacientů s centrální neuropatickou bolestí při roztroušené skleróze (soubor A2, 33 pacientů). Základní diagnóza (polyneuropatie a/nebo roztroušená skleróza) byla stanovena v souladu s aktuálními diagnostickými kritérii [19,20].

Soubor B – pacienti s nociceptivní bolestí

Skupinu pacientů s nociceptivní bolestí při artróze velkých kloubů tvořilo 70 pacientů (25 mužů a 45 žen, průměrný věk 66,2 ± 9,9 let) (tab. 1a,b), z toho u 33 pacientů se jednalo o postižení kyčelního kloubu a u 37 jedinců o artrózu kloubu kolenního. Ve všech pří-

padech se jednalo o pacienty s pokročilým stupněm artritického postižení, tedy se III. nebo IV. stupněm artrózy dle RTG vyšetření příslušného kloubu při hodnocení dle Kellgren a Lawrence [21]. Pacienti byli většinou vyšetřováni bezprostředně před implantací TEP nebo byli k takovému výkonu indikováni. Vylučujícími kritérii pro zařazení do studie byly:

1. známá přítomnost polyneuropatie, onemocnění centrálního nervového systému či bolesti radikulárního původu;
2. anamnestická přítomnost rizikových faktorů periferních neuropatií (zejm. diabetu mellitu, chronického abúzu alkoholu či stavu po aplikaci chemoterapie v anamnéze), a/nebo
3. abnormální nález při klinickém neurologickém vyšetření (korelující s postižením periferních nervů na DKK, radikulopatií L3–S1 bilat. nebo s postižením centrálního nervového systému).

V rámci statistického zpracování byl soubor vyhodnocen jako celek a současně bylo provedeno srovnání výsledků u pacientů s klidovými bolestmi při artróze (soubor B1, 31 pacientů) a pacientů bez klidových bolestí (tedy s bolestmi vázanými pouze na pohyb, resp. zátěž příslušného kloubu, soubor B2, 39 pacientů) (tab. 1b).

Metodika

Validace dotazníku probíhala od října 2012 do února 2014 ve FN Brno.

Všichni zařazení pacienti podstoupili detailní anamnestické a klinické neurologické vyšetření: u pacientů s neuropatickou bolestí

bylo toto vyšetření součástí diagnostického procesu základního onemocnění a neuropatické bolesti jako takové a bylo zaměřeno také na potvrzení léze somatosenzitivního nervového systému. U pacientů s bolestí nociceptivní bylo vyšetření zaměřeno na potvrzení absence vylučujících kritérií pro zařazení do studie. Následně byl každý pacient vyšetřen pomocí české verze dotazníku NPSI (NPSI_{CZ}).

Česká verze dotazníku NPSI (NPSI_{CZ}) byla vytvořena metodou forward-backward translation. Vyplnění dotazníku pacientem proběhlo ve všech případech v návaznosti na anamnestické a klinické neurologické vyšetření, a to v přítomnosti vyšetřujícího lékaře. V souladu s metodikou použití originální verze NPSI byly jednotlivé položky dotazníku zaměřené na popis intenzity jednotlivých deskriptorů neuropatické bolesti (otázky Q1, Q2, Q3, Q5, Q6, Q8, Q9, Q10, Q11, Q12) hodnoceny pomocí numerické škály bolesti (Numeric Rating Scale; NRS) v rozsahu 0–10. „0“ na této škále znamená absenci bolesti příslušného charakteru a „10“ představuje nejhorší představitelnou intenzitu bolesti daného typu. Celkové základní NPSI_{CZ} skóre bylo vypočteno jako průměr hodnot NRS v těchto 10 otázkách (Příloha 2), tedy stejně jako v originální verzi bez zohlednění otázek Q4 a Q7 zaměřených na dobu trvání a frekvenci symptomů. Vytvořena byla dále modifikovaná verze NPSI_{CZ} skóre (NPSI_{CZ-12} skóre), započítávající i položky Q4 a Q7 NPSI_{CZ} dotazníku (bližší viz Statistická metodologie). Hodnoceny byly i dílčí škály, reflektující specificky intenzitu některých subtypů neuropatické bolesti, tj. povrchové spontánní bolesti (otázka Q1), hluboké spontánní bolesti (průměrná hodnota NRS z otázek Q2 + Q3), krátké záchvatovité bolesti (průměr NRS z otázek Q5 + Q6), bolesti vyvolané či zhoršené vnějším podnětem (průměrné NRS z otázek Q8 + Q9 + Q10) a přítomnost abnormálních senzitivních pocitů (průměrná hodnota NRS v otázkách Q11 + Q12) (Příloha 2). Výsledky byly srovnány mezi skupinami pacientů s neuropatickou a nociceptivní bolestí (soubor A vs soubor B) a dále mezi pacienty s klidovou (spontánní) nociceptivní bolestí (B1) a pacienty s neuropatickou bolestí jako celkem (A). Srovnání bylo provedeno i mezi souborem B1 (pacienti s klidovou nociceptivní bolestí) a jednotlivými podskupinami souboru A, tedy pacienty s neuropatickou bolestí periferní (A1) a centrální (A2). Obě podskupiny souboru A byly srovnány také vzájemně (soubory A1 vs. A2).

Tab. 1a) Hodnoty jednotlivých položek NPSI_{CZ} dotazníku, celkového NPSI_{CZ} skóre (a to základního, vypočteného dle originální verze dotazníku, i nově derivovaného, tzv. NPSI_{CZ-12} skóre) a doporučených dílčích škál u pacientů s nociceptivní a neuropatickou bolestí.

Parametr ¹	Nociceptivní bolest (n = 70)	Neuropatická bolest (n = 96)	p ⁴
věk	66,2 (9,9)	56,4 (14,7)	< 0,001
muži	n = 25 (35,7 %)	n = 32 (33,3 %)	0,869
Q1 spontánní pálivá bolest	1,3 (2,5)	4,2 (3,0)	< 0,001
Q2 spontánní svíravá bolest	1,0 (2,4)	3,8 (3,2)	< 0,001
Q3 spontánní tlaková bolest	1,3 (2,5)	3,6 (2,9)	< 0,001
Q4 počet hodin se spontánní bolestí/24 hod			
< 1	n = 50 (71,4 %)	n = 15 (15,6 %)	
1–3	n = 4 (5,7 %)	n = 8 (8,3 %)	
4–7	n = 4 (5,7 %)	n = 12 (12,5 %)	< 0,001
8–12	n = 4 (5,7 %)	n = 12 (12,5 %)	
trvale	n = 8 (11,4 %)	n = 49 (51,0 %)	
Q4 binární kódování: 1 a více hod se spontánní bolestí/24 hod ²	n = 20 (28,6 %)	n = 81 (84,4 %)	< 0,001
Q5 krátké záchvaty bolesti jako elektrické šoky	0,6 (1,8)	3,4 (3,4)	< 0,001
Q6 krátké záchvaty bodavé bolesti	2,4 (3,2)	4,1 (3,3)	0,001
Q7 počet krátkých záchvatů bolesti/24 hod			
žádné	n = 40 (57,1 %)	n = 22 (22,9 %)	
1–5	n = 16 (22,9 %)	n = 31 (32,3 %)	
6–10	n = 9 (12,9 %)	n = 24 (25,0 %)	< 0,001
11–20	n = 1 (1,4 %)	n = 9 (9,4 %)	
> 20	n = 4 (5,7 %)	n = 10 (10,4 %)	
Q7 binární kódování: 1 a více krátkých záchvatů bolesti/24 hod ²	n = 30 (42,9 %)	n = 74 (77,1 %)	< 0,001
Q8 provokace/zhoršení bolesti dotykem	0,5 (1,4)	2,6 (3,5)	< 0,001
Q9 provokace/zhoršení bolesti tlakem	1,6 (2,3)	2,6 (3,1)	0,021
Q10 provokace/ zhoršení bolesti chladem	0,4 (1,7)	2,2 (3,3)	< 0,001
Q11 mravenčení	0,3 (1,3)	5,8 (2,6)	< 0,001
Q12 brnění	0,1 (0,6)	5,6 (2,4)	< 0,001
dílčí škála I: spontánní pálivá bolest	1,3 (2,5)	4,2 (3,0)	< 0,001
dílčí škála II: spontánní hluboká (tlaková) bolest	1,2 (1,9)	3,7 (2,4)	< 0,001
dílčí škála III: záchvatovitá bolest	1,5 (2,1)	3,7 (2,9)	< 0,001
dílčí škála IV: vyvolaná bolest	0,8 (1,3)	2,5 (2,3)	< 0,001
dílčí škála V: parestezie/dysestezie	0,2 (0,8)	5,7 (2,4)	< 0,001
celková intenzita bolesti (základní NPSI_{CZ} skóre)	9,5 (9,8)	38,0 (16,9)	< 0,001
celková intenzita bolesti (NPSI_{CZ-12} skóre)³	16,7 (16,7)	53,7 (20,9)	< 0,001

¹ Hodnoty jsou uvedeny jako absolutní (relativní) frekvence u kategoriálních poměrných a průměry (standardní odchylky) pro kontinuální proměnné a skóre, ² cut-off hodnota pro binární kódování otázek Q4 a Q7 zvolená na podkladě výsledků ROC analýzy jako nejlepší diskriminační hodnota mezi pacienty s neuropatickou a nociceptivní bolestí, ³ NPSI_{CZ-12} skóre bylo vypočteno jako součet základního NPSI_{CZ} skóre a binárně kódovaných otázek Q4 a Q7 (hodnocených 0 body za negativní odpověď a 10 body za odpověď pozitivní; hodnota 10 byla zvolena tak, aby vyrovnala maximum dosažitelných bodů u ostatních otázek), ⁴ srovnání bylo provedeno exaktním Fisherovým testem u kategoriálních dat a t-testem u dat kontinuálních. Použité zkratky vysvětleny v textu článku.

Sledován byl rovněž čas potřebný k vyplnění dotazníku. Současně byla hodnocena náročnost jeho vyplnění (semikvantitativně

na stupnici 1–5, kde 1 = zcela nenáročný a 5 = velmi náročný), a to jak pacientem, tak i vyšetřujícím lékařem.

U 19 pacientů byl test administrován dvakrát s odstupem tří hod za účelem ověření reprodukovatelnosti vyšetření.

VALIDACE ČESKÉ VERZE NEUROPATHIC PAIN SYMPTOM INVENTORY (NPSI_{CZ})

Tab. 1b) Hodnoty jednotlivých položek NPSI_{CZ} dotazníku, celkového NPSI_{CZ} skóre (a to základního, vypočteného dle originální verze dotazníku, i nově derivovaného, tzv. NPSI_{CZ-12} skóre) a doporučených dílčích škál u pacientů s jednotlivými podskupinami souborů pacientů s nociceptivní bolestí (s a bez klidových spontánních bolestí) a bolestí neuropatickou (centrální a periferní).

Parametr ¹	Neuropatická bolest: periferní (n = 66)	Neuropatická bolest: centrální (n = 30)	Nociceptivní bolest: spontánní (klidová) (n = 31)	Nociceptivní bolest: bez klidových obtíží (n = 39)	p ⁴
věk	62,5 (12,7) ^b	43,2 (9,1) ^a	66,6 (8,3) ^b	65,8 (11,1) ^b	< 0,001
muži	n = 30 (45,5 %) ^a	n = 2 (6,7 %) ^b	n = 10 (32,3 %) ^a	n = 15 (38,5 %) ^a	0,001
Q1 spontánní pálivá bolest	4,8 (2,8) ^c	2,8 (3,1) ^b	2,9 (3,2) ^b	0,1 (0,4) ^a	< 0,001
Q2 spontánní svíravá bolest	4,1 (3,2) ^c	3,0 (3,1) ^b	2,3 (3,2) ^b	0,0 (0,0) ^a	< 0,001
Q3 spontánní tlaková bolest	3,5 (2,8) ^b	4,0 (3,1) ^b	3,0 (3,1) ^b	0,0 (0,0) ^a	< 0,001
Q4 počet hodin se spontánní bolestí/24 hod					
< 1	n = 5 (7,6 %) ^a	n = 10 (33,3 %) ^b	n = 11 (35,5 %) ^b	n = 39 (100,0 %) ^c	
1–3	n = 7 (10,6 %)	n = 1 (3,3 %)	n = 4 (12,9 %)	n = 0 (0,0 %)	
4–7	n = 8 (12,1 %)	n = 4 (13,3 %)	n = 4 (12,9 %)	n = 0 (0,0 %)	< 0,001
8–12	n = 7 (10,6 %)	n = 5 (16,7 %)	n = 4 (12,9 %)	n = 0 (0,0 %)	
trvale	n = 39 (59,1 %)	n = 10 (33,3 %)	n = 8 (25,8 %)	n = 0 (0,0 %)	
Q4 binární kódování: 1 a více hodin se spontánní bolestí/24 hod ²	n = 61 (92,4 %) ^a	n = 20 (66,7 %) ^b	n = 20 (64,5 %) ^b	n = 0 (0,0 %) ^c	< 0,001
Q5 krátké záchvaty bolesti jako el. šoky	3,6 (3,4) ^b	3,1 (3,3) ^b	1,2 (2,5) ^a	0,1 (0,5) ^a	< 0,001
Q6 krátké záchvaty bodavé bolesti	4,3 (3,2) ^b	3,5 (3,5) ^b	4,0 (3,3) ^b	1,2 (2,5) ^a	< 0,001
Q7 počet krátkých záchvatů bolesti/24 hod					
žádné	n = 13 (19,7 %) ^a	n = 9 (30,0 %) ^a	n = 9 (29,0 %) ^a	n = 31 (79,5 %) ^b	
1–5	n = 19 (28,8 %)	n = 12 (40,0 %)	n = 11 (35,5 %)	n = 5 (12,8 %)	
6–10	n = 20 (30,3 %)	n = 4 (13,3 %)	n = 6 (19,4 %)	n = 3 (7,7 %)	< 0,001
11–20	n = 7 (10,6 %)	n = 2 (6,7 %)	n = 1 (3,2 %)	n = 0 (0,0 %)	
> 20	n = 7 (10,6 %)	n = 3 (10,0 %)	n = 4 (12,9 %)	n = 0 (0,0 %)	
Q7 binární kódování: 1 a více krátkých záchvatů bolesti/24 hod ²	n = 53 (80,3 %) ^a	n = 21 (70,0 %) ^a	n = 22 (71,0 %) ^a	n = 8 (20,5 %) ^b	< 0,001
Q8 provokace/zhoršení bolesti dotykem	2,7 (3,7) ^c	2,2 (3,2) ^{bc}	0,7 (1,6) ^{ab}	0,3 (1,3) ^a	< 0,001
Q9 provokace/zhoršení bolesti tlakem	2,4 (3,3) ^{ab}	2,9 (2,8) ^b	2,3 (2,4) ^{ab}	1,0 (2,1) ^a	0,030
Q10 provokace/zhoršení bolesti chladem	2,4 (3,4) ^c	1,9 (2,9) ^{bc}	0,6 (1,9) ^{ab}	0,2 (1,4) ^a	< 0,001
Q11 mravenčení	5,6 (2,4) ^b	6,3 (2,9) ^b	0,2 (0,9) ^a	0,5 (1,5) ^a	< 0,001
Q12 brnění	5,4 (2,2) ^b	6,1 (2,8) ^b	0,1 (0,6) ^a	0,1 (0,6) ^a	< 0,001
dílčí škála I: spontánní pálivá bolest	4,8 (2,8) ^c	2,8 (3,1) ^b	2,9 (3,2) ^b	0,1 (0,4) ^a	< 0,001
dílčí škála II: spontánní hluboká (tlaková) bolest	3,8 (2,4) ^b	3,5 (2,4) ^b	2,6 (2,1) ^b	0,0 (0,0) ^a	< 0,001
dílčí škála III: záchvatovitá bolest	3,9 (2,8) ^b	3,3 (3,0) ^b	2,6 (2,5) ^b	0,6 (1,3) ^a	< 0,001
dílčí škála IV: vyvolaná bolest	2,5 (2,5) ^c	2,4 (1,8) ^{bc}	1,2 (1,4) ^{ab}	0,5 (1,1) ^a	< 0,001
dílčí škála V: parestezie/dysestezie	5,5 (2,2) ^b	6,2 (2,7) ^b	0,1 (0,6) ^a	0,3 (0,9) ^a	< 0,001
celková intenzita bolesti (základní NPSI_{CZ} skóre)	39,0 (17,7)^c	35,9 (15,3)^c	17,3 (8,9)^b	3,4 (5,0)^a	< 0,001
celková intenzita bolesti (NPSI_{CZ-12} skóre)³	55,7 (21,3)^c	49,5 (19,8)^c	30,8 (13,9)^b	5,5 (7,8)^a	< 0,001

¹ Hodnoty jsou uvedeny jako absolutní (relativní) frekvence u kategoriálních poměrných a průměry (standardní odchylky) pro kontinuální proměnné a skóre, ² cut-off hodnota pro binární kódování otázek Q4 a Q7 zvolená na podkladě výsledků ROC analýzy jako nejlepší diskriminační hodnota mezi pacienty s neuropatickou a nociceptivní bolestí, ³ NPSI_{CZ-12} skóre bylo vypočteno jako součet základního NPSI_{CZ} skóre a binárně kódovaných otázek Q4 a Q7 (hodnocených 0 body za negativní odpověď a 10 body za odpověď pozitivní; hodnota 10 byla zvolena tak, aby vyrovnala maximum dosažitelných bodů u ostatních otázek, ⁴ srovnání bylo provedeno exaktním Fisherovým testem u kategoriálních dat a ANOVA testem u dat kontinuálních, ^{a-c} odlišná písmena označují (v rámci každého řádku) vzájemně statisticky signifikantně odlišné hodnoty na podkladě výsledků post-hoc testů (exaktní Fisherův test u kategoriálních dat a Tukeyho test pro spojitá data). Použité zkratky vysvětleny v textu článku.

Tab. 2. ROC analýza zaměřená na diskriminaci mezi různými typy bolesti s použitím jednotlivých způsobů výpočtu NPSI_{CZ} skóre.

Srovnávané typy bolesti	Prediktor	AUC (95% CI)	p	Cut-off	Senzitivita	Specifita
nociceptivní vs. neuropatická	základní NPSI _{CZ} skóre	0,935 (0,901; 0,969)	< 0,001	≥ 17,50	0,874	0,843
	NPSI _{CZ-12} skóre	0,912 (0,871; 0,952)	< 0,001	≥ 37,25	0,792	0,871
	NPSI _{CZ-D} skóre (diskriminační)	0,995 (0,990; 1,000)	< 0,001	≥ -0,45	0,937	1,000
spontánní nociceptivní vs. periferní neuropatická	základní NPSI _{CZ} skóre	0,872 (0,804; 0,941)	< 0,001	≥ 33,00	0,631	0,968
	NPSI _{CZ-12} skóre	0,836 (0,758; 0,913)	< 0,001	≥ 44,50	0,727	0,871
	NPSI _{CZ-D} skóre (diskriminační)	0,998 (0,993; 1,000)	< 0,001	≥ -1,13	0,985	1,000
spontánní nociceptivní vs. centrální neuropatická	základní NPSI _{CZ} skóre	0,851 (0,756; 0,945)	< 0,001	≥ 18,00	0,900	0,677
	NPSI _{CZ-12} skóre	0,781 (0,663; 0,898)	< 0,001	≥ 45,00	0,633	0,871
	NPSI _{CZ-D} skóre (diskriminační)	0,997 (0,989; 1,000)	< 0,001	≥ -0,33	0,967	1,000
spontánní nociceptivní vs. neuropatická (perif. + centr.)	základní NPSI _{CZ} skóre	0,865 (0,800; 0,930)	< 0,001	≥ 33,00	0,600	0,968
	NPSI _{CZ-12} skóre	0,818 (0,746; 0,891)	< 0,001	≥ 44,50	0,698	0,871
	NPSI _{CZ-D} skóre (diskriminační)	0,998 (0,994; 1,000)	< 0,001	≥ -1,41	0,979	1,000
neuropatická bolest centrální vs. periferní	základní NPSI _{CZ} skóre	0,540 (0,417; 0,664)	0,530	≥ 31,25	0,662	0,467
	NPSI _{CZ-12} skóre	0,584 (0,463; 0,706)	0,188	≥ 60,50	0,424	0,733
	NPSI _{CZ-D} skóre (diskriminační)	0,801 (0,705; 0,897)	< 0,001	≥ 0,05	0,708	0,800

Použité zkratky vysvětleny v textu článku.

Statistické zpracování

Statistické zpracování bylo provedeno pomocí software SPSS 22 (IBM Corporation, 2013), Statistica 12 (Statsoft Inc., 2013) a MedCalc verze 14.10.02 (MedCalc Software, 1993–2014). Ke zviditelnění rozdělení primárních hodnot jednotlivých testovaných parametrů byla použita standardní deskriptivní statistika (průměry a směrodatné odchylky pro spojité proměnné a absolutní a relativní četnosti pro data kategoriální). Srovnání hodnocených parametrů mezi jednotlivými skupinami pacientů bylo provedeno pomocí exaktního Fisherova testu pro kategoriální proměnné a pomocí t-testu pro srovnání nezávislých vzorků a ANOVA modelu pro spojité data, s následnými dílčími post-hoc testy (Tukeyho test).

Následně byla provedena diskriminační analýza a na základě koeficientů tohoto modelu byl vážením jednotlivých otázek vytvořen třetí možný způsob výpočtu NPSI skóre (diskriminační skóre – NPSI_{CZ-D} skóre).

ROC (Receiver Operating Characteristic curve) analýza byla použita pro identifikaci cut-off hodnot u otázek Q4 a Q7 NPSI skóre (před jejich začleněním do modifikovaného NPSI_{CZ-12} skóre a před diskriminační analýzou s výpočtem NPSI_{CZ-D} skóre, pro jejichž účel byly tyto položky na základě výsledků

ROC analýzy binárně kódovány) a současně pro zhodnocení diagnostické validity originálního NPSI skóre a jeho modifikovaných verzí (NPSI_{CZ-12} skóre po začlenění binárně kódovaných položek Q4 a Q7 NPSI dotazníku a NPSI_{CZ-D} skóre vytvořeného na podkladě diskriminační analýzy).

Analýza subtypů neuropatické bolesti byla provedena pomocí clusterové (shlukové) analýzy s použitím Euklidovských distancí a Wardových algoritmů.

Intraclass korelační koeficient (Intraclass Correlation Coefficient; ICC) byl využit pro hodnocení opakovatelnosti testu při jeho opakovaných administracích.

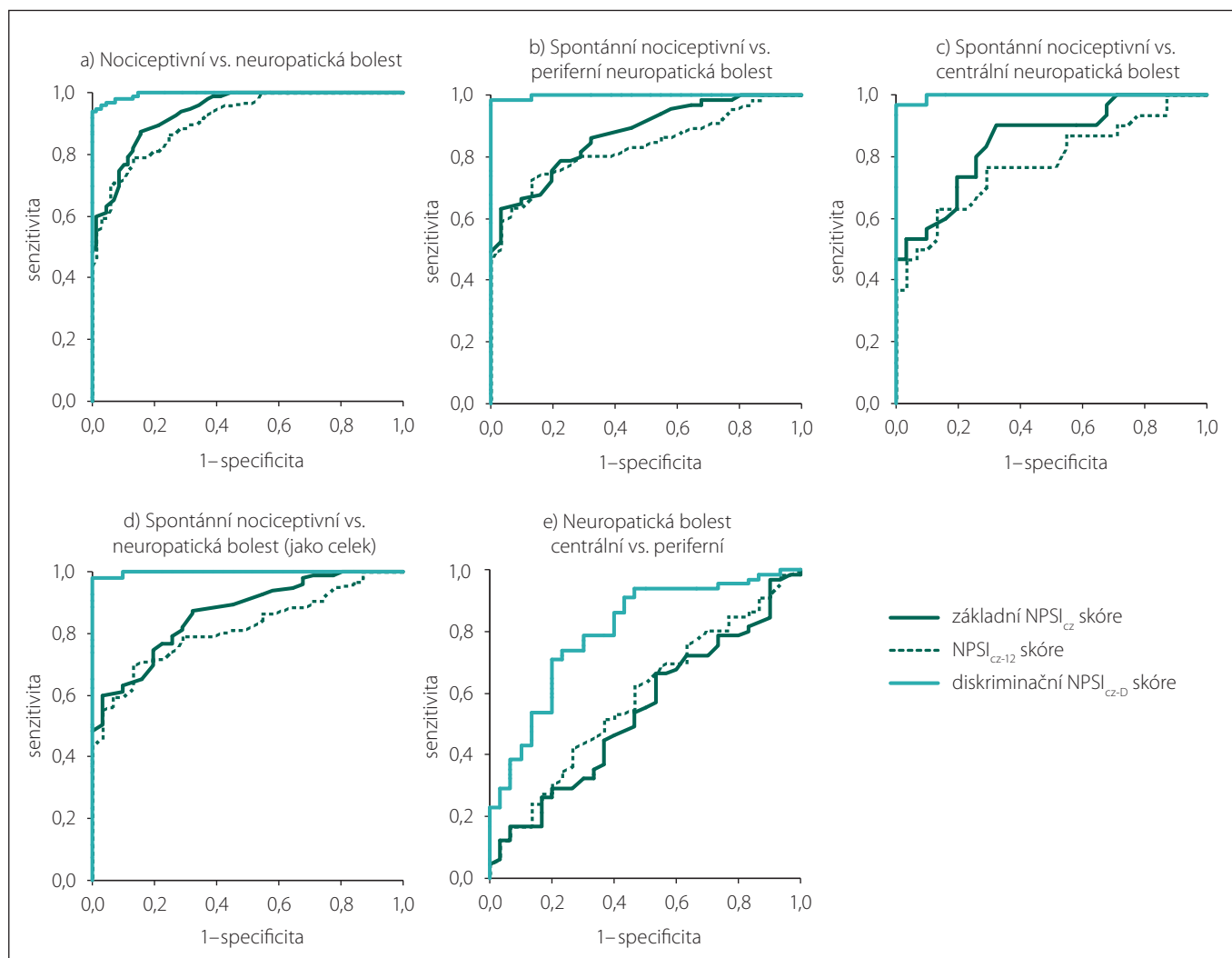
Výsledky

Vyplnění dotazníku NPSI_{CZ} bylo většinou pacientů i vyšetřujícím personálem hodnoceno jako nenáročné či mírně náročné a trvalo v průměru 2,23 ± 0,47 min. Rozdíly těchto parametrů mezi jednotlivými skupinami pacientů nebyly statisticky významné s výjimkou kratšího trvání testu a trendu k nižší subjektivní náročnosti jeho použití u pacientů s centrální neuropatickou bolestí při roztroušené skleróze (data neuvedena). Test byl pro pacienty dobře srozumitelný. Problémem byl pro část zařazených jedinců pouze termín „spontánní“, ke kterému

některým pacientům vyžadovalo doplňující vysvětlení. U některých pacientů bylo problematické také specifické cílení odpovědí na posledních 24 hod, protože se u nich toto období vymykalo jejich dlouhodobému stavu. Oba problémy byly zohledněny při tvorbě finální verze dotazníku (Příloha 1). Doporučené změny reflektující řešení potíží zjištěných během procesu validace jsou v této verzi vyznačeny kurzívou.

Pro část pacientů bylo poněkud obtížné využití NRS škály pro hodnocení intenzity symptomů a jeví tendenci nahradit numerické hodnocení slovním popisem. Tato skutečnost poukázala na nutnost podrobného iničiálního vysvětlení před zahájením vlastního testování včetně zácvičení použití NRS škály.

Hodnoty celkového NPSI_{CZ} skóre (základního i tzv. NPSI_{CZ-12} skóre, modifikovaného zařazením položek Q4 a Q7), hodnocených dílčích škál i NRS v jednotlivých testovaných položkách byly statisticky vysoce významné vyšší ve skupině pacientů s neuropatickou bolestí ve srovnání s pacienty s bolestí nociceptivní (tab. 1a). Nejméně vyjádřený (i když stále statisticky významný) byl rozdíl v otázce Q9 (zhoršení bolesti tlakem). Pacienti s neuropatickou bolestí udávali také delší trvání spontánní bolesti v průběhu dne (Q4) a vyšší



Grafy 1a–e) ROC analýza zaměřená na diskriminaci mezi jednotlivými typy bolesti při použití různých NPSI skóre.

počet krátkých záchvatů bolesti (Q7) ve srovnání s pacienty s bolestí nociceptivní.

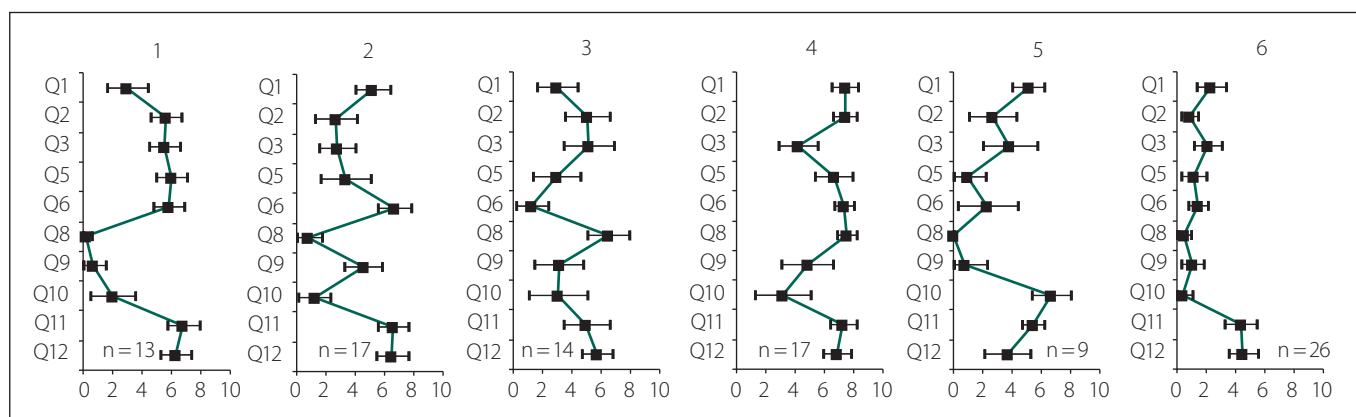
Mezi pacienty s neuropatickou bolestí centrálního a periferního typu se hodnoty celkového NPSI_{CZ} skóre (základního ani NPSI_{CZ-12}) ani dílčích škál statisticky významně nelišily (tab. 1b). V každé z obou podskupin pacientů s neuropatickou bolestí byly tyto hodnoty signifikantně odlišné od pacientů s bolestí nociceptivní, a to zejm. při srovnání s jedinci s nociceptivní bolestí bez klidových obtíží. Méně významné byly rozdíly každé z podskupin jedinců s neuropatickou bolestí oproti pacientům s klidovou (spontánní) nociceptivní bolestí (tab. 1b). Při srovnání jednotlivých položek NPSI_{CZ} skóre mezi oběma skupinami pacientů s neuropatickou bolestí byl prokázán významně častější výskyt spontánní pálivé a svíravé bolesti u pacientů s centrální etiologií a celkově menší počet hodin se spontánní bolestí u těchto pacientů

ve srovnání s pacienty s bolestí periferního typu (tab. 1b).

Pacienti s klidovými bolestmi při artróze kolenního či kyčelního kloubu vykazovali obecně signifikantně vyšší hodnoty celkového NPSI_{CZ} skóre, dílčích škál i jednotlivých hodnocených položek ve srovnání s pacienty, u nichž byla bolest v rámci kloubního postižení vázána pouze na pohyb, resp. zátěž příslušného kloubu (tab. 1b). Hodnoty celkového NPSI_{CZ} skóre (základního i NPSI_{CZ-12}) i jednotlivých dílčích škál byly v obou nociceptivních skupinách signifikantně nižší oproti pacientům s neuropatickou bolestí (tab. 1b).

Provedená diskriminační analýza zaměřená na odlišení neuropatické a nociceptivní bolesti (k dispozici jako Supplementary data v on-line verzi článku) byla využita pro koncept třetího způsobu výpočtu NPSI_{CZ} skóre, tzv. NPSI_{CZ-D} skóre.

Následná ROC analýza prokázala velmi dobrou diagnostickou validitu NPSI_{CZ} skóre v odlišení neuropatické bolesti (i jejích jednotlivých typů) od bolesti nociceptivní (včetně klidové nociceptivní bolesti), a to při použití různých způsobů výpočtu NPSI_{CZ} skóre (grafy 1a–d, tab. 2). Diagnostická validita byla ve všech případech velmi dobrá již pro základní NPSI_{CZ} skóre, obdobná (ale nikoli vyšší) pro NPSI_{CZ-12} skóre a jednoznačně nejvyšší byla u diskriminačního NPSI_{CZ-D} skóre, kde se blížila dokonalosti (grafy 1a–d, tab. 2). Validita testu v odlišení pacientů s neuropatickou bolestí (či jejích jednotlivých podskupin) od jedinců s bolestmi nociceptivními byla obecně vyšší při zohlednění nociceptivní skupiny jako celku (tedy současně pacientů bez spontánních bolestí i s nimi) než v případě, kdy bylo srovnání provedeno pouze vůči pacientům s klidovou nociceptivní bolestí (grafy 1a–d, tab. 2). I v případě



Graf 2. Jednotlivé symptomové profily definované provedenou clusterovou analýzou.

srovnání s pacienty se spontánní nociceptivní bolestí byla však validita testu v diagnostice neuropatické bolesti uspokojivá (grafy 1a–d, tab. 2).

Základní NPSI_{CZ} skóre ani modifikovaná verze NPSI_{CZ-12} neumožňovaly spolehlivé odlišení centrální a periferní neuropatické bolesti. Toto rozlišení bylo možné pouze pomocí diskriminačního NPSI_{CZ-D} skóre (tab. 2, graf 1e). Diagnostická validita testu v diskriminaci centrální a periferní neuropatické bolesti byla však i v tomto případě nižší než spolehlivost testu v odlišení neuropatické bolesti od bolesti nociceptivní (tab. 2).

Clusterová analýza umožnila identifikaci šesti symptomových profilů, lišících se přítomností jednotlivých hodnocených deskriptorů neuropatické bolesti a jejich intenzitou (graf 2). V každé z těchto šesti podskupin byli zastoupeni pacienti s centrální i periferní neuropatickou bolestí.

Opakovaná administrace NPSI dotazníku prokázala uspokojivou opakovatelnost sumárního NPSI_{CZ} skóre i většiny položek testu a dílčích škál, hodnocenou pomocí intraclass korelačních koeficientů (tab. 3).

Diskuze

Provedená studie ověřila snadnou použitelnost dotazníku NPSI_{CZ} v diagnostice neuropatické bolesti, jeho vynikající diskriminační schopnost oproti bolesti nociceptivní a schopnost identifikace jednotlivých symptomových profilů neuropatické bolesti. Zařazení testu do diagnostického algoritmu pacientů s neuropatickou bolestí je vzhledem k nízké časové náročnosti, vysoké diagnostické validitě a uspokojivé opakovatelnosti možné jak pro potřeby rutinního klinického testování, tak pro účely klinických či výzkumných studií včetně longitudinálního sledování pacientů.

Tab. 3. Intraclass korelace pro opakované administrace testu.

Parametr	ICC (Intraclass Correlation Coefficient)
Q1 spontánní pálivá bolest	0,5019
Q2 spontánní svíravá bolest	0,4911
Q3 spontánní tlaková bolest	0,7487
Q4 počet hodin se spontánní bolestí/24 hod	0,7086
Q5 krátké záchvaty bolesti jako el. šoky	0,3889
Q6 krátké záchvaty bodavé bolesti	0,8380
Q7 počet krátkých záchvatů bolesti/24 hod	0,7224
Q8 provokace/zhoršení bolesti dotykem	0,7150
Q9 provokace/zhoršení bolesti tlakem	0,7371
Q10 provokace/zhoršení bolesti chladem	0,7000
Q11 mravenčení	0,9371
Q12 brnění	0,9200
dílčí škála I: spontánní pálivá bolest	0,5019
dílčí škála II: spontánní hluboká (tlaková) bolest	0,7109
dílčí škála III: záchvatovitá bolest	0,7379
dílčí škála IV: vyvolaná bolest	0,7133
dílčí škála V: parestezie/dysestezie	0,9622
celková intenzita bolesti (základní NPSI _{CZ} skóre)	0,8608

Intraclass korelační koeficienty jsou uvedeny pro jednotlivé položky, dílčí škály i sumární NPSI_{CZ} skóre. Použité zkratky vysvětleny v textu článku.

Náročnost testování, potřeba asistence při vyplnění dotazníku

Test byl většinou pacientů i vyšetřujících hodnocen jako nenáročný či málo náročný a jeho vyplnění trvalo pouze několik minut. Nižší časová náročnost testu u pacientů s centrální neuropatickou bolestí je zřejmě podmíněna nižším věkem jedinců v této skupině a také jejich obecně větší zkušeností s vyplňováním dotazníků různého druhu pro

potřeby lékových i jiných studií. I v ostatních skupinách pacientů však bylo trvání testu i jeho subjektivně hodnocená náročnost zcela přijatelné.

Autoři originální verze koncipovali test tak, že jej pacient vyplňuje sám, bez pomoci lékaře. Při procesu validace české verze byl ve většině případů vyplnění dotazníku přítomen lékař, což se ukázalo jako účelné s ohledem na možnost bezprostředního vy-

světlení některých termínů v původně vytvořeném českém překladu originální verze, které nebyly pro část pacientů dobře srozumitelné (viz níže). Přítomnost lékaře (či jiné zacvičené osoby) byla přínosná i pro možnost ověření konzistence odpovědí pacienta s jeho dlouhodobými klinickými obtížemi (rovněž viz níže). Několik pacientů vyžadovalo asistenci vyšetřujícího také za účelem pomoci s využitím NRS škály, které bylo pro některé z nich navzdory úvodnímu vysvětlení principu hodnocení poněkud problematické. Část pacientů jevila tendenci nahradit číselný údaj NRS škály slovním popisem intenzity. Použití dotazníku u nich proto vyžadovalo opakované detailní vysvětlení. Z uvedených skutečností vyplývá, že v případě, kdy pacient vyplňuje dotazník samostatně, je nezbytné detailní úvodní vysvětlení principu testování včetně zácvičení využití NRS škály. Optimální je ověřit porozumění pacienta principům testování vyplněním alespoň jedné otázky dotazníku v přítomnosti vyšetřujícího. Účelná je i následná konfirmace výsledků dotazem objektivizujícím soulad uvedeného číselného údaje např. se slovním popisem intenzity daného deskriptoru pacientem pro verifikaci správného použití NRS škály a konzistence odpovědí se skutečnými obtížemi pacienta. Je proto vhodné, aby byl pacientovi během vyšetření k dispozici zaučený asistent (kterým může být zdravotní sestra či dokonce nezdravotnický personál obeznámený s principy testování), na kterého se může pacient obrátit v případě potřeby.

Jazyková stránka tvorby české verze NPSI_{CZ} dotazníku

Česká verze dotazníku byla vytvořena metodou „forward-backward translation“, tedy metodou zpětného překladu, kdy je původní jazyková verze přeložena do češtiny a tato česká verze následně jiným překladatelem převedena do angličtiny. Poté jsou posuzovány rozdíly takto vytvořené verze v původním jazyce s originální verzí dotazníku a hledán konsenzus v neshodujících se termínech. Tento způsob tvorby jazykových mutací dotazníků je obvyklou součástí validačního procesu a je většinou vyžadován autory originálních dotazníků pro uznání nové jazykové verze.

Původní česká jazyková verze vytvořená zmíněnou metodou forward-backward translation obsahuje v úvodním odstavci výraz „spontánní bolest, tj. objevující se bez jakékoli provokace“ (Příloha 1). Pro

řadu pacientů však nebyl výraz „spontánní“ dobře srozumitelný. Autoři práce proto doporučují zpřesnění termínu doplněním výrazu „samovolná“, které bylo použito při ústním vysvětlení v případě dotazu pacienta na slovo „spontánní“ a které bylo pro testované pacienty lépe srozumitelné. Tento zpřesňující termín jsme zařadili i do finální verze českého NPSI_{CZ} dotazníku.

Dotazník je v originální verzi koncipován tak, aby reflektoval obtíže pacienta za posledních 24 hod. V provedené studii se tato okolnost ukázala jako poněkud problematická, a to především u souboru pacientů před implantační TEP. Tito pacienti byli v době vyplňování dotazníku většinou krátkodobě hospitalizováni před plánovaným ortopedickým zákrokem. Hodnocené období posledních 24 hod se vymykalo jejich dlouhodobému stavu, protože v důsledku omezení fyzické aktivity při hospitalizaci u nich došlo k poklesu intenzity bolestí vázaných na pohyb či pohybem akcentovaných. Diskrepance s běžnou intenzitou obtíží byla zjištěna v rámci rozhovoru s vyšetřujícím lékařem, který mj. cíleně ověřoval konzistenci odpovědí s dlouhodobým stavem pacienta. Z tohoto důvodu byla v rámci validačního procesu do textu původní české jazykové verze dotazníku za údaj o zohlednění obtíží za posledních 24 hod dodatečně doplněna věta: „pokud se toto časové období zásadně neliší od vašeho běžného průměru např. v posledním měsíci“. Tato věta podle zkušeností autorů zvýší pravděpodobnost souladu odpovědí pacienta s jeho dlouhodobými potížemi v případě, že pacient vyplňuje dotazník sám, bez asistence vyšetřujícího lékaře či jiného zaučeného zdravotního personálu.

Diagnostická validita dotazníku

Dotazník NPSI je v originální verzi zaměřen na diagnostiku neuropatické bolesti, resp. její odlišení od bolesti nociceptivní [13]. Většina položek dotazníku je tedy zaměřena na tzv. deskriptory charakteristické pro neuropatickou bolest. Podle očekávání byly proto hodnoty celkového NPSI_{CZ} skóre, dílčích škál i NRS skóre v jednotlivých položkách dotazníku signifikantně vyšší ve skupině pacientů s neuropatickou bolestí oproti jedincům s bolestí nociceptivní.

Nejméně výrazné rozdíly mezi pacienty s nociceptivní a neuropatickou bolestí byly prokázány v otázce Q9 (Zhoršení bolesti tlakem). Tento příznak byl často přítomen u pacientů s bolestí neuropatického i nociceptivního původu, což není překva-

pivé, protože tlak je známý provokační faktor bolesti při artrtickém poškození kloubů stejně jako u pacientů s bolestí neuropatického typu.

Diagnostická validita testu je kromě jiných faktorů významně ovlivněna výběrem srovnávaných vzorků pacientů. U jedinců s neuropatickou bolestí jsou kritéria pro zařazení do studií poměrně jednoznačná. V publikovaných studiích jde prakticky bezvýhradně o jedince s bolestí odpovídající současné definici [1], a to s intenzitou odpovídající NRS ≥ 4 , resp. 3 [2,4,13,18]. U souboru pacientů s bolestí nociceptivní je však definice souboru významně ovlivněna skutečností, že klidová bolest není uniformně přítomným symptomem artrózy velkých kloubů DKK, a to ani v pokročilých stádiích kloubních změn [22]. V úvodní fázi validačního procesu byli do skupiny pacientů s nociceptivní bolestí zařazováni konsektivně téměř všichni pacienti přicházející na Ortopedickou kliniku FN Brno k implantaci TEP. V tomto souboru bylo proto zařazeno velké množství jedinců, u nichž byla bolest vázána výhradně na pohyb či zátěž příslušného kloubu, a tedy bez bolestí klidových, což vedlo k velmi vysoké diskriminační schopnosti NPSI_{CZ}. V klinické praxi je však problém spíše odlišení neuropatické bolesti od spontánní klidové nociceptivní bolesti. Proto byl soubor pacientů s nociceptivní bolestí v dalším období rozšířen zejména o pacienty s klidovými bolestmi při artróze velkých kloubů a následné statistické zpracování bylo zaměřeno mj. na zhodnocení diagnostické validity dotazníku v odlišení neuropatické bolesti izolovaně od pacientů s klidovými bolestmi nociceptivními a bez nich. Výsledky statistické analýzy prokázaly, že diskriminace pacientů s neuropatickou bolestí od pacientů s klidovou nociceptivní bolestí je poněkud nižší než při zohlednění nociceptivních pacientů bez klidových bolestí, stále ale velmi uspokojivá.

Nastavení vstupních kritérií je také pravděpodobným důvodem poněkud vyšší diagnostické validity základního NPSI_{CZ} skóre v naší studii oproti obdobné validační studii německé verze dotazníku [18]. V této studii nebylo základní NPSI skóre schopno diskriminovat spolehlivě pacienty s neuropatickou bolestí od pacientů s bolestí neneuropatickou. Tuto schopnost vykazovala až modifikovaná verze, tzv. NPSI-G (German) skóre vytvořená na základě diskriminační analýzy, podobně jako NPSI_{CZ-D} skóre v naší studii. Skupina pacientů s neneuropatickou bolestí

však byla tvořena jednak pacienty s osteoartrózou (bez bližší specifikace stupně pokročilosti postižení či případného výskytu klidových bolestí) a dále pacienty s bolestí hlavy (kteří v naší studii nefigurovali).

Diagnostická validita NPSI_{CZ} skóre byla v prezentované studii, stejně jako např. v práci Sommera et al [18], hodnocena pomocí ROC křivky. ROC křivka je statistický parametr kombinující senzitivitu a specifitu testu pro jednotlivé hodnoty (cut-offs), které může test nabývat. Čím vyšší je pro daný test plocha pod křivkou (tzv. Area Under Curve; AUC), tím vyšší je jeho diagnostická validita. Z křivky lze odečíst senzitivitu a specifitu pro každou hodnotu cut-off testu, a stanovit tak hodnotu s optimální kombinací obou parametrů jako limitní pro dané vyšetření. Ze statistického hlediska jde o optimální statistický test umožňující hodnocení diagnostické validity vyšetření. Výsledky prezentované studie (stejně jako validace německé verze NPSI) proto lépe reflektují problematiku diagnostické validity testu než originální verze testu [13], v níž je validita hodnocena bez použití ROC analýz.

V prezentované studii byla diagnostická validita NPSI_{CZ} dotazníku hodnocena jednak pro základní NPSI_{CZ} skóre (vypočítané podle doporučení autorů originální verze dotazníku [13]), jednak pro dvě modifikované skóre: NPSI_{CZ-12} (zohledňující i položky Q4 a Q7) a NPSI_{CZ-D} (vytvořené na základě diskriminační analýzy). Diagnostická validita NPSI_{CZ-12} skóre byla obdobná jako validita základní NPSI_{CZ} verze, NPSI_{CZ-D} skóre však při ROC analýze vykazovalo signifikantně lepší validitu a představuje ze statistického hlediska funkci s maximální prediktivní silou. Pro potřeby exaktního odlišení pacientů s neuropatickou a nociceptivní bolestí je tak použití modifikovaných verzí (a to především skóre NPSI_{CZ-D}) vhodnější nástroj než základní NPSI_{CZ} skóre.

Dotazník NPSI není primárně zaměřen na odlišení centrální a periferní neuropatické bolesti. Oba typy neuropatické bolesti vykazují řadu podobných charakteristik a deskriptory používané v jejich popisu jsou obdobné [1,4,5]. V souladu s touto skutečností nebyly prokázány významné rozdíly základního NPSI mezi pacienty s centrální a periferní neuropatickou bolestí a rozdíly jednotlivých dílčích položek NPSI skóre mezi těmito skupinami byly jen ojedinělé. Obě skupiny bylo možno částečně diskriminovat pomocí NPSI_{CZ-D} skóre, ale s obecně nižší validitou oproti odlišení neuropatické bolesti od

bolesti nociceptivní. Dotazník tedy obecně není spolehlivě využitelný pro odlišení centrální a periferní neuropatické bolesti.

Analýza subtypů neuropatické bolesti

Provedená clusterová analýza umožnila v prezentované studii identifikovat šest odlišných symptomových profilů. Zmíněné profily jsou podobné jako ve srovnatelné studii zaměřené na validaci německé jazykové verze stejného dotazníku [18]. Zastoupení pacientů s centrální i periferní neuropatickou bolestí v každé z takto definovaných podskupin pacientů poukazuje na skutečnost, že patologický proces zodpovědný za rozvoj neuropatické bolesti není klíčovým faktorem v rozvoji příslušného symptomového profilu. Definované profily však mohou být podkladem např. pro odlišnou odpovědnost pacientů na terapii neuropatické bolesti či rozdílný přirozený vývoj onemocnění u jedinců s odlišným symptomovým profilem. Tuto hypotézu bude nutno potvrdit následnými studii.

Opakovatelnost vyšetření

Provedená intraclass korelační analýza na základě opakovaných administrací dotazníku prokázala uspokojivou opakovatelnost testu, a to zejm. při hodnocení sumárního skóre (ICC = 0,86). Srovnatelná opakovatelnost byla prokázána i pro originální francouzskou (ICC = 0,94) [13] a recentně validovanou německou jazykovou verzi NPSI dotazníku (ICC = 0,89) [18]. Opakovatelnost některých položek testu byla v naší studii horší než v případě německé a francouzské verze, což je nejspíše podmíněno omezeným rozsahem testovaného vzorku v našem souboru, kde byla opakovatelnost hodnocena jen u 19 pacientů. Důsledkem hodnocení opakovatelnosti v menším souboru pacientů může být větší vliv eventuálních odlehklých hodnot na výsledný ICC u některých dílčích položek naší studie.

Uspokojivá opakovatelnost celkového NPSI skóre prokázána ve všech provedených studiích včetně naší opravňuje použití dotazníku pro longitudinální sledování pacientů a hodnocení změn klinických symptomů, a to jak v souvislosti s přirozeným průběhem onemocnění a vývojem základního patologického procesu vedoucího k rozvoji neuropatické bolesti, tak při sledování vlivu terapeutických intervencí zaměřených na ovlivnění neuropatické bolesti a souvisejících symptomů.

Závěr

Prezentovaná studie prokázala vysokou diagnostickou validitu nově vytvořené české jazykové verze dotazníku NPSI (NPSI_{CZ}) v diskriminaci neuropatické a nociceptivní bolesti a analýze symptomových profilů umožňující hodnocení jednotlivých subtypů neuropatické bolesti. Prokázána byla i nízká časová náročnost, uspokojivá opakovatelnost a snadná použitelnost testu. Dotazník lze využít v podmínkách ambulantní neurologické praxe i pro potřeby klinických či vědeckých studií. Administraci dotazníku musí předcházet detailní vysvětlení způsobu testování a principu použití NRS škály, následně mohou pacienti vyplnit dotazník samostatně, ale je vhodné, aby byl v dosahu zaškolený personál, který může odpovědět na případné dotazy. Během procesu validace bylo zjištěno několik drobných problémů s původně vytvořenou českou jazykovou verzí. Ty byly zohledněny při tvorbě finální verze dotazníku vhodné pro účely použití v českém jazykovém prostředí. Provedená studie prokázala velmi uspokojivou diagnostickou validitu dotazníku v odlišení neuropatické a nociceptivní bolesti. Tato validita je dostačující již při základním způsobu výpočtu NPSI_{CZ} skóre (dle doporučení autorů originální verze) a dále stoupá použitím jeho modifikovaných verzí (zejména NPSI_{CZ-D} skóre). Test v základní verzi naopak není schopen spolehlivě odlišit pacienty s centrální a periferní neuropatickou bolestí. Vedle detekce neuropatické bolesti umožňuje dotazník také analýzu jednotlivých symptomových profilů. Jejich klinická relevance však bude muset být ověřena následnými studii.

Literatura

1. Treede RD, Jensen TS, Campbell JN, Cruccu G, Ostrofsky JO, Griffin JW et al. Neuropathic pain: redefinition and a grading system for clinical and research purposes. *Brain* 2008; 70(18): 1630–1635.
2. Bouhassira D, Lantéri-Minet M, Attal N, Laurent B, Touboul C. Prevalence of chronic pain with neuropathic characteristics in the general population. *Pain* 2008; 136(3): 380–387.
3. Torrance N, Smith BH, Bennett MI, Lee AJ. The epidemiology of chronic pain of predominantly neuropathic origin. Results from a general population survey. *J Pain* 2006; 7(4): 281–289.
4. Freynhagen R, Baron R, Gockel U, Tölle TR. PainDETECT: a new screening questionnaire to identify neuropathic components in patients with back pain. *Curr Med Res Opin* 2006; 22(10): 1911–1920.
5. Bennett MI, Attal N, Backonja MM, Baron R, Bouhassira D, Freynhagen R et al. Using screening tools to identify neuropathic pain. *Pain* 2007; 127(3): 199–203.
6. Melzack R. The McGill Pain Questionnaire: major properties and scoring. *Pain* 1975; 1(3): 277–299.

VALIDACE ČESKÉ VERZE NEUROPATHIC PAIN SYMPTOM INVENTORY (NPSI_{CZ})

7. Gracely RH, Dubner R, McGrath P, Heft H. New methods of pain measurement and their application to pain control. *Int Dent J* 1978; 28(1): 52–65.
8. Cleeland CS. Pain assessment in cancer. In: Osoba D (ed). *Effect of cancer on quality of life*. Boca Raton: CRC Press, Inc: 1991: 293–305.
9. Bennett M. The LANSS Pain Scale: the Leeds assessment of neuropathic symptoms and signs. *Pain* 2001; 92(1–2): 147–157.
10. Bennett MI, Smith BH, Torrance N, Potter J. The S-LANSS score for identifying pain of predominantly neuropathic origin: validation for use in clinical and postal research. *J Pain* 2005; 6(3): 149–158.
11. Krause SJ, Backonja MM. Development of a neuropathic pain questionnaire. *Clin J Pain* 2003; 19(5): 306–314.
12. Backonja MM, Krause SJ. Neuropathic pain questionnaire – short form. *Clin J Pain* 2003; 19(5): 315–316.
13. Bouhassira D, Attal N, Fermanian J, Alchaar H, Gautron M, Masquelier E et al. Development and validation of the Neuropathic Pain Symptom Inventory. *Pain* 2004; 108(3): 248–257.
14. Bouhassira D, Attal N, Alchaar H, Boureau F, Brochet B, Bruxelle J et al. Comparison of pain syndromes associated with nervous or somatic lesions and development of a new neuropathic pain diagnostic questionnaire (DN4). *Pain* 2005; 114(1–2): 29–36.
15. Portenoy R. Development and testing of a neuropathic pain screening questionnaire: ID pain. *Curr Med Res Opin* 2006; 22(8): 1555–1565.
16. Cruccu G, Sommer C, Anand P, Attal N, Baron R, Garcia-Larrea L et al. EFNS guidelines on neuropathic pain assessment: revised 2009. *Eur J Neurol* 2010; 17(8): 1010–1018. doi: 10.1111/j.1468-1331.2010.02969.x.
17. Haanpää M, Attal N, Backonja M, Baron R, Bennett M, Bouhassira et al. NeuPSIG guidelines on neuropathic pain assessment. *Pain* 2011; 152(1): 14–27. doi: 10.1016/j.pain.2010.07.031.
18. Sommer C, Richter H, Rogausch JP, Frettlöh J, Lungenhausen M, Maier C. A modified score to identify and discriminate neuropathic pain: a study on the German version of the Neuropathic Pain Symptom Inventory (NPSI). *BMC Neurol* 2011; 11: 104. doi: 10.1186/1471-2377-11-104.
19. England JD, Gronseth GS, Franklin G, Miller RG, Asbury AK, Carter GT et al. Distal symmetric polyneuropathy: a definition for clinical research: report of the American Academy of Neurology, the American Association of Electrodiagnostic Medicine, and the American Academy of Physical Medicine and Rehabilitation. *Neurology* 2005; 64(2): 199–207.
20. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol* 2011; 69(2): 292–302. doi: 10.1002/ana.22366.
21. Kellgren JH, Lawrence JS. Radiological assessment of osteo-arthritis. *Ann Rheum Dis* 1957; 16(4): 494–502.
22. Haverkamp D, Brokelman RB, van Loon CJ, van Kampen A. Timing of arthroplasty, what is the influence of nocturnal pain and pain at rest on the outcome? *Knee Surg Traumatol Arthrosc* 2013; 21(11): 2590–2594. doi: 10.1007/s00167-012-2071-x.

Supplementum naleznete na webových stránkách www.csnn.eu.

Informace o členství

Česká neurologická společnost je součástí České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně (www.cls.cz). Členem společnosti se může stát lékař, farmaceut, případně jiný pracovník ve zdravotnictví a příbuzném oboru, který souhlasí s posláním a cíli ČLS JEP a zaváže se přispívat k jejich plnění. Každý může být členem více odborných společností.

Co vám členství v České neurologické společnosti ČSL JEP přinese?

- Pravidelný elektronický zpravodaj s novinkami.
- Zvýhodněné podmínky účasti na akcích pod záštitou neurologické společnosti.
 - Předplatné časopisu „Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie“.
 - Pozvánky na odborné akce.
- Budete součástí týmu odborníků a spolupodílet se na rozhodování České neurologické společnosti.

Jak se stát členem společnosti?

- Vyplňte přihlášku na webových stránkách společnosti www.czech-neuro.cz.
- Každému žadateli bude zaslán, po schválení přihlášky výborem České neurologické společnosti, dopis o potvrzení přijetí.

Změny údajů

Dojde-li ke změně údajů členů společnosti (adresa, telefon, e-mail apod.), zašlete tyto informace na email sekretariat@czech-neuro.cz, změny ve vašich údajích budou předány také ČLS JEP.

19. Šrotová I, Vlčková E, Bednařík J. *Autonomní dysfunkce a její diagnostika u roztroušené sklerózy. Cesk Slov Neurol N 2016; 79/ 112(2): 188-198. IF = 0,368.*

Přehledné sdělení je zaměřené na sumarizaci klinických projevů autonomní dysfunkce (AD) u pacientů s roztroušenou sklerózou (RS) a přehled možností její diagnostiky. Dysfunkce autonomního nervového systému patří k častým klinickým projevům RS. AD významně ovlivňuje kvalitu života pacientů s RS, přispívá k celkové disabilitě a úzce souvisí také s rozvojem únavy a neuropatické bolesti u těchto pacientů. Přesto postižení autonomního nervového systému však patří mezi relativně poddiagnostikované symptomy tohoto onemocnění.

Nejčastějším a nejzávažnějším typem AD u pacientů s RS je narušení funkce kardiovaskulárního a/ nebo urogenitálního systému. Častá je i dysfunkce sexuální. Kardiovaskulární AD lze objektivizovat zejména pomocí HUT testu, statického zátěžového testu (tzv. handgrip testu) využívajícího izometrickou svalovou kontrakci a pomocí testů variability srdeční frekvence s využitím metod časové a/ nebo frekvenční analýzy. Pro vyšetření urogenitální autonomní dysfunkce je využíváno především urologické a urodynamické vyšetření a dále elektrofyziologické metody, zejména elektromyografie svalů pánevního dna (včetně sfinkterů), vyšetření sakrálních reflexů (nejčastěji bulbokavernózního, vezikoanálního a análního) a evokované potenciály n. pudendus. Tyto metody se (vedle strukturované anamnézy a cílených dotazníků) podílejí i na diagnostice dysfunkce sexuální.

Méně častá je dysfunkce gastrointestinální, sudomotorická či narušení pupilomotoriky. K diagnostice gastrointestinální autonomní dysfunkce lze kromě cílené anamnézy a klinického vyšetření využít např. perkutánní elektrogastrografii či scintigrafické vyšetření evakuace žaludku. U pacientů s RS jsou prokazovány i abnormality při vyšetření jícnové manometrie a manometrie sfinkterů (vnitřního a zevního análního svěrače). K došetření zácpy lze využít také EMG vyšetření análního sfinkteru. Pro hodnocení sudomotorických funkcí je nejčastěji využívána sympatická kožní odpověď a/ nebo tzv. kvantitativní sudomotorický test. Hodnocení pupilomotorické dysfunkce je především klinické.

Autonomní dysfunkce a její diagnostika u roztroušené sklerózy

Autonomic Dysfunction and its Diagnostic Tools in Multiple Sclerosis

Souhrn

Dysfunkce autonomního nervového systému patří k častým klinickým projevům roztroušené sklerózy (RS). Incidence autonomní dysfunkce (AD) u pacientů s RS se v různých studiích pohybuje mezi 16 a 80 % a jednoznačně se zvyšuje s délkou trvání RS a progredující disabilitou. Může se však projevit v kterékoli fázi demyelinizačního onemocnění a dokonce může být jeho prvním klinickým projevem. AD významně ovlivňuje kvalitu života pacientů s RS a přispívá k celkové disabilitě. Přesto postižení autonomního nervového systému patří mezi stále relativně poddiagnostikované symptomy tohoto onemocnění. Nejčastějším a nejzávažnějším typem AD u pacientů s RS je narušení funkce kardiovaskulárního a/nebo urogenitálního systému. Méně častá je dysfunkce gastrointestinální, sudomotorická či narušení pupilomotoriky. Autonomní (především kardiovaskulární) dysfunkce u pacientů s RS také úzce souvisí s rozvojem únavy. Cílem tohoto sdělení je poskytnout přehled jednotlivých typů AD u pacientů s RS a možností jejich diagnostiky.

Abstract

Autonomic nervous system dysfunction (AD) represents a frequent clinical presentation of multiple sclerosis (MS). According to published studies, the incidence of AD in MS patients ranges between 16 and 80% and gradually increases with the length of the demyelinating disease and with the progression of disability. However, AD can occur in any phase of MS and can even represent its first symptom in some patients. Autonomic dysfunction has a significant negative impact on the quality of life in MS patients and contributes to overall disability. Even so, autonomic nervous system dysfunction is frequently underdiagnosed in patients with multiple sclerosis. Cardiovascular and urogenital dysfunction are the most frequent types of AD in MS patients with the highest impact on their clinical status and the quality of life. Less frequently, gastrointestinal, sudomotor or pupilomotor dysfunction can be found. Autonomic (in particular cardiovascular) dysfunction in multiple sclerosis is closely related to fatigue, another frequent clinical symptom in MS patients. The aim of this paper is to sum up the spectrum of symptoms of autonomic dysfunction in multiple sclerosis and its diagnostic tools.

Tato publikace vznikla na Masarykově univerzitě v rámci projektu „Diagnostika a patofyziologie neuropatické bolesti“ číslo MUNI/A/1072/2015 podpořeného z prostředků účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum, kterou poskytlo MŠMT v roce 2016, grantovým projektem Interní Grantové Agentury (IGA MZ ČR NT 13523-4), projektem MZ ČR – RVO (FNBr, 65269705) a interními zdroji CEITEC MUNI.

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.

I. Šrotová, E. Vlčková, J. Bednařík

Neurologická klinika LF MU a FN Brno
CEITEC – Středoevropský technologický institut, MU, Brno



MUDr. Eva Vlčková, Ph.D.
Neurologická klinika
LF MU a FN Brno
Jihlavská 20
625 00 Brno
e-mail: evlckova@email.cz

Přijato k recenzi: 12. 11. 2015

Přijato do tisku: 14. 1. 2016

Klíčová slova

roztroušená skleróza – dysfunkce autonomního nervového systému – ortostatická intolerance – močová inkontinence – močová retence – sexuální dysfunkce – gastrointestinální dysfunkce – pocení

Key words

multiple sclerosis – autonomic nervous system diseases – orthostatic intolerance – urinary incontinence – urinary retention – sexual dysfunction – gastrointestinal dysfunction – sweating

Úvod

Autonomní dysfunkce (AD) je častý a závažný symptom roztroušené sklerózy (RS) [1,2], který významně ovlivňuje kvalitu života pacientů s tímto onemocněním [3].

Incidence autonomních symptomů se u pacientů s RS dle různých studií pohybuje v rozmezí od 16 do 80 % [4]. Výskyt subjektivně vnímaných obtíží je přitom poněkud častější než objektivní průkaz AD pomocí příslušných paraklinických (většinou elektrofyziologických) metod [1].

Postižení autonomního nervového systému (ANS) se může objevit již v počátečních fázích neurologického onemocnění [4], nejčastěji ale výskyt symptomů vegetativní dysfunkce narůstá s délkou trvání onemocnění RS [5].

U pacientů s RS dochází v různé míře k postižení sympatického i parasympatického nervového systému. Sympatická dysfunkce vzrůstá s délkou trvání RS, zatímco postižení parasympatiky koreluje spíše s progresí klinické disability [6].

Etiopatogeneze rozvoje AD u RS je vysvětlována přítomností demyelinizačních lézí ve strukturách mozku a míchy, odpovědných za centrální regulaci ANS. Jedná se především o léze oblasti v okolí 4. mozkové komory v mozkovém kmeni a o postižení prodloužené a spinální míchy [7,8]. Saari et al prokázali, že míra postižení ANS u pacientů s RS je přímo úměrná celkovému objemu lézí na magnetické rezonanci (MR) mozku [9]. Tato korelace neplatí u postižení spinální míchy, kde míra AD souvisí spíše s míšní atrofií než s přítomností demyelinizačních ložisek. AD u pacientů s RS tedy vzniká nejen jako důsledek demyelinizace, ale také v rámci axonální ztráty (např. jako podkladu spinální atrofie) [10].

Klinická manifestace AD u pacientů s RS je poměrně variabilní. Mezi nejčastější projevy patří sfinkterová dysfunkce a dysfunkce kardiovaskulární [4]. Ostatní symptomy (např. sudomotorické, gastrointestinální, sexuální a pupilomotorické) se vyskytují méně často [4]. Většina zmíněných projevů vegetativní dysfunkce přispívá k celkové disability pacientů s RS [5].

Ačkoliv postižení ANS jednoznačně patří mezi časté projevy RS, řada jeho symptomů zůstává stále poddiagnostikována a klinická manifestace AD převážně není zohledňována ani při hodnocení disability. V současné době je k popsání celkové míry disability u pacientů s RS nejčastěji využívána Kurtzkeho škála (Kurtzke Expanded Disabi-

lity Status Scale; EDSS) [11]. V této škále jsou však symptomy AD uváděny pouze okrajově (jedná se především o dotazy zaměřené na sfinkterové a sexuální dysfunkce) [4].

Projevy AD významně ovlivňují kvalitu života pacientů s RS a jedná se o závažné a zčásti ovlivnitelné symptomy. V klinické praxi je proto vhodné diagnostikovat jejich přítomnost, a to zejména pomocí cílených anamnestických dotazů. Ještě výhodnější jsou pro tento účel specializované dotazníky, z nichž některé umožňují nejen zhodnotit přítomnost daného typu klinických obtíží, ale také do určité míry kvantifikovat jejich závažnost [12–14].

Pro účely vědeckých studií je v současné době zřejmě nejčastěji využívaným dotazníkem, zaměřeným na dysfunkci ANS, tzv. Autonomic Symptom Profile (ASP) [12]. Tento dotazník zahrnuje 169 položek a je rozdělen na dílčí škály odpovídající jednotlivým typům AD. Je zaměřen na nejvýznamnější a nejčastější symptomy AD. Dotazník je strukturován, což usnadňuje jeho vyplňování. Část otázek je cílena na přítomnost daného typu klinických obtíží. V případě potvrzení jejich výskytu je pacient následně směřován k zodpovězení doplňujících otázek umožňujících zpřesnění informací o příslušných autonomních symptomech. Vyplnění trvá asi 30 min a po základní instrukci její zvládne pacient vyplnit samostatně [12]. Dotazník byl poprvé publikován v roce 1999 a dále se rutinně využívá. Poskytuje komplexní a detailní informace o celém spektru autonomních funkcí. Jedinou nevýhodou je velký rozsah dotazníku a s ním související již zmiňovaná časová náročnost jeho použití. Dosud nebyla publikována žádná studie zabývající se hodnocením ASP u pacientů s RS.

Dalším dotazníkem zaměřeným na diagnostiku AD je COMPASS 31 (Composite Autonomic Symptom Score) [13,14]. Jedná se v podstatě o zkrácenou verzi ASP, která opět umožňuje diagnostikovat přítomnost celého spektra symptomů AD a také kvantifikovat jejich závažnost. Skládá se z dílčích škál zaměřených na ortostatickou intoleranci a vazomotorickou, sudomotorickou, gastrointestinální, sfinkterovou a pupilomotorickou dysfunkci. Dotazník se široce využívá k diagnostice AD u periferních neuropatií vč. polyneuropatie tenkých vláken [14]. Recentně byl validován také k diagnostice AD u pacientů s RS [3].

K základní orientační diagnostice AD je možné využít též jednoduchý dotazník [15], který byl cíleně vytvořen právě za účelem

rychlé a snadné identifikace příznaků AD u pacientů s RS [15]. Zahrnuje šest základních položek, z nichž každá reflektuje jeden ze základních typů AD při RS (ortostatickou intoleranci, změny kožního prokrvení, dysfunkci termoregulační, sfinkterovou a sexuální a gastroparézu) [15]. U každé z těchto položek jsou podrobněji vysvětleny možné klinické projevy. Pacient pak každou z těchto šesti položek skóruje „ano“ nebo „ne“ podle toho, zda pociťuje alespoň některý z vyjmenovaných příznaků [15].

AD lze dále objektivizovat pomocí paraklinických metod, a to nejčastěji metod elektrofyziologických. K diagnostice kardiovaskulární AD je využíván především HUT test (Head Up Tilt test – test na nakloněné rovině), analýza variability srdeční frekvence (tzv. Ewingovy testy či analýza spektrální), případně handgrip test. K průkazu dysfunkce sudomotorické lze využít např. sympatickou kožní odpověď (Sympathetic Skin Response; SSR), kvantitativní sudomotorický axon reflex (Quantitative Sudomotor Axon Reflex Test; QSART) nebo termoregulační potní test (Thermoregulatory Sweat Test; TST). Pro diagnostiku sfinkterové a sexuální dysfunkce mohou být použity urodynamické vyšetřovací metody a dále somatosenzorické evokované potenciály (SEP) n. pudendus a motorické evokované potenciály (MEP) svalů pánevního dna.

Typy AD u RS

Narušení centrální autonomní regulace může u pacientů s RS postihovat řadu funkčních systémů organismu. Z tohoto hlediska nejčastěji rozlišujeme dysfunkci kardiovaskulární, gastrointestinální, sexuální, pupilomotorickou, sudomotorickou a dysfunkci močového měchýře. K poruše autonomních funkcí má úzký vztah také únava a potíže se spánkem.

Kardiovaskulární dysfunkce

Jedním z nejčastějších typů AD u pacientů s RS je kardiovaskulární autonomní dysfunkce (KD), která se projevuje zejména ortostatickou intolerancí. Kardiální dysfunkce se však u pacientů s RS může objevit i v jiné souvislosti než v rámci narušení funkce ANS (např. jako nežádoucí účinek terapie).

KD postihuje více než dvě třetiny pacientů s RS [16,17] a její výskyt vzrůstá s trváním onemocnění [16]. Podle některých studií její výskyt a závažnost koreluje se zvýšenou únavností u pacientů s RS [18,19].

Dominující klinickou manifestací KD je ortostatická intolerance, která je přítomna asi

u 50 % pacientů s RS [20]. Mezi typické symptomy ortostatické intolerance patří závrať, nauzea a palpitace, které se objevují v bezprostřední návaznosti na změnu polohy na vertikální (tj. obvykle po postavení) nebo při dlouhodobém stání nebo sezení.

V případech, že se u pacienta s RS náhle objeví recentní kardiální symptomy, je nezbytné na tyto obtíže nahlížet také jako na možný příznak akutní exacerbace RS (zejména v případech léze v oblastech relevantních centrální autonomní regulaci – viz výše). Akutně vzniklá léze centrálního nervového systému může navíc vést ke zvýšenému uvolnění katecholaminů, které následně způsobují nekrotické změny v kardiálních myocytech [21]. Tímto mechanismem pak může dojít k narušení endokardiálního převodního systému a vzniku sinusové bradykardie nebo paroxysmální fibrilace síní [22,23].

Popsány byly i případy rozvoje kardiogenního šoku a plicního edému, které se rozvinuly v rámci akutního relapsu RS [23,24], a to pravděpodobně v důsledku přítomnosti demyelinizačních lézí v mozgovém kmeni, jež vedou k narušení centrální autonomní regulace kardiopulmonálního systému [24,25].

KD se může objevit u pacientů s RS i jako nežádoucí účinek terapie demyelinizačního onemocnění, a to nejčastěji při léčbě kortikosteroidy, mitoxantronem nebo fingolimodem.

Kortikosteroidy jsou indikovány k léčbě akutní ataky RS. Standardní postup je podání metylprednizolonu v dávce 3–5 g během 3–7 dnů intravenózně [27]. Kortikosteroidy v uvedeném dávkování mohou vyvolat srdeční arytmie [28], nejčastěji sinusové tachykardie nebo bradykardie. V ojedinělých případech se po podání kortikosteroidů objevují potíže charakteru atrioventrikulárního bloku, fibrilace síní nebo ventrikulární tachykardie [28]. Riziko rozvoje srdečních arytmí po podání vysokých dávek kortikoidů je vyšší u pacientů s RS s již prokázanou AD a dále u kuřáků [28].

Mitoxantron se v terapii RS používal především v minulosti. Jedná se o cytostatikum s antrachinonovou strukturou, které v současné době není v České republice pro léčbu RS registrováno, ale vzhledem k prokázanému klinickému efektu v terapii RS je jeho podání možné po individuálním schválení revizním lékařem především v indikaci rychle progredující RS [29]. Mitoxantron je přímo toxický pro kardiomyocyty a může vyvolat akutní, subakutní či chronické změny kardiální funkce, a to s vyšším rizikem u osob

s preexistujícím kardiálním onemocněním. Chronická kardiotoxicita je závislá na kumulativní dávce preparátu. Proto je v průběhu léčby nutné monitorovat srdeční ejekční frakci [30]. Echokardiografické vyšetření je nutno provádět před zahájením léčby a během ní. Pokles ejekční frakce pod 55 % je spojen s rizikem srdečního selhání a terapie mitoxantronem musí být ukončena [31].

Fingolimod patří mezi perorální specifickou terapii RS. Indikací k jeho nasazení je rychle progredující relaps-remitentní RS [32]. Fingolimod může způsobit zpomalení srdeční frekvence, a to jak u zdravých jedinců, tak u pacientů s RS [33]. Zpomalení tepové frekvence je většinou rychle regulováno a ke kompletní úpravě dochází během 4–6 hod [33]. Přechodně, klinicky asymptomatické bradykardie se po podání fingolimodu vyskytují u 0,5–2,4 % pacientů. U menší části nemocných (cca 0,9 %) může terapie fingolimodem vést k výraznějšímu ovlivnění kardiiovaskulárních funkcí, přičemž mezi nejzávažnější patří atrioventrikulární blokáda, která se objevuje u 0,4 % pacientů léčených tímto přípravkem [34]. Pacienti s RS, u kterých je diagnostikováno postižení ANS, projevující se zvýšenou parasymptickou a sníženou sympatickou modulací, jsou vznikem bradykardie po podání fingolimodu ohroženi více [35].

Vzhledem k uvedenému riziku rozvoje bradykardie je důležité monitorovat pacienta po zahájení léčby během prvních 6 hod 12svodovým elektroardiografickým vyšetřením (EKG), měřit krevní tlak a pulz každou hodinu a kontaktovat kardiologa v případech, kdy tepová frekvence klesne pod 40/min. Obecně je asymptomatická bradykardie po podání fingolimodu častá, ale přechodná a asistenci kardiologa obvykle nevyžaduje [35].

Diagnostika KD pacientů s RS

K nejčastěji užívaným diagnostickým testům KD patří HUT test, statický zátěžový test (tzv. handgrip) využívající izometrickou svalovou kontrakci a testy variability srdeční frekvence s využitím metod časové a/nebo frekvenční analýzy.

HUT test

Při diagnostice KD u pacientů s RS se využívá především testu na nakloněné rovině s hlavou vzhůru (Head Up Tilt test; HUT test). HUT test je diagnostickou modalitou funkční kardiologie. S jeho pomocí lze studovat jak časně autonomní kardiiovaskulární

reflexy (časná odpověď během 30–60 s), tak neurokardiogenní reflexy (pozdní odpověď za 30–60 min). V úvodu testu je změřen základní krevní tlak a srdeční frekvence po dobu 5 min u pacienta v horizontální poloze. Poté se provede elevace pacienta do 80° a oba parametry (tlak i tepová frekvence) se měří dalších 5–45 min (případně do objevení synkopy) v závislosti na tom, zda testujeme časně kardiiovaskulární či neurokardiogenní reflexy. Časně autonomní kardiiovaskulární reflexy jsou obdobné jako reflexní změny po postavení – změny tlaku jsou řízeny sympatiem, změny tepové frekvence parasymptií. Na rozdíl od postavení dochází v časně fázi k přesunu 25–30 % venózní krve z centrálního do periferního kompartmentu, snížení venózního návratu k srdci a snížení srdečního výdeje. Snížená aferentace z baroreceptorů vede ke snížení tonu parasymptiku a následně zvýšení tonu sympatiky, k zvýšení cévního tonu a periferní rezistence. Krevní tlak fyziologicky nepoklesne. Neurokardiogenní reflexy jsou používány k detekci neurokardiogenní synkopy, u které dochází k hypotenzii a paradoxní bradykardii [36].

U pacientů s RS je pomocí HUT testu často diagnostikována ortostatická hypotenze (významný pokles krevního tlaku po postavení) nebo syndrom posturální ortostatické tachykardie (POTS) [37]. Za příčinu rozvoje obou těchto abnormalit je považováno narušení funkce sympatiky. U ortostatické hypotenze dochází vlivem této dysfunkce k dysbalanci vazokonstrikčních reflexů, které jsou odpovědné za udržení krevního tlaku po vertikalizaci [38]. POTS je charakterizován nárůstem tepové frekvence v návaznosti na vertikalizaci bez rozvoje ortostatické hypotenze a klinicky se projevuje symptomy ortostatické intolerance [39]. POTS se u pacientů s RS vyskytuje poměrně často a předpokládá se, že přímo souvisí s demyelinizačními změnami mozkového kmene [17,39].

Statický zátěžový test („handgrip“) – izometrická svalová kontrakce

Mezi další klinické testy, které slouží k hodnocení kardiiovaskulární autonomní regulace, patří statický zátěžový test („handgrip“). Pacient vyvine izometrickou svalovou kontrakci (např. stisk ruky) po dobu 3–5 min silou odpovídající 30 % maxima. Svalová kontrakce zvyšuje afterload kompresí arteriol a zvýšením celkové periferní cévní rezistence. Fyziologicky by mělo dojít k vzestupu diastolického tlaku o 15 mm Hg a vzestupu tepové frekvence. Hodnoty vzestupu tlaku

mezi 11–15 mm Hg jsou hodnoceny jako hraniční, hodnoty pod 10 mm Hg jsou jednoznačně patologické [40]. Test odráží především funkci sympatického nervového systému. U pacientů se sympatickou dysfunkcí při RS je většinou prokazován signifikantně nižší vzestup krevního tlaku oproti zdravým kontrolám [19,38].

Hodnocení variability srdeční frekvence

Vliv autonomních nervových funkcí na kardiovaskulární systém odráží také hodnocení variability srdeční frekvence [41]. Pro její testování lze využít metody tzv. časové analýzy [41] (souhrnně označované jako tzv. Ewingovy testy) nebo analýzy frekvenční (pomocí tzv. spektrální analýzy) [42]. Obě metody vycházejí ze skutečnosti, že srdeční frekvence (obdobně jako další biologické parametry, např. krevní tlak) vykazuje při hodnocení v delších časových úsecích fyziologickou variabilitu, která se mění při dysfunkci ANS. Testování lze provádět v klidových podmínkách (vleže, při spontánním dýchání) nebo při aktivaci s použitím standardizovaných zkoušek se známým vlivem na aktivitu ANS, jakými jsou např. hluboké dýchání, Valsalvův manévř, statický zátěžový test („handgrip“) a zejména aktivní vertikalizace (tzv. ortostatická zkouška, resp. ortoklinostatický test (zkouška leh-stoj-leh) [41,42].

Nevýhodou metodiky je skutečnost, že variabilita srdeční frekvence je významně ovlivněna řadou patologických stavů, farmakologických vlivů i fyziologických proměnných, a nálezy tak mohou být zkresleny např. medikací (typicky betablokátoři, digoxinem apod.), stejně jako výraznější aktuální psychickou zátěží a dalšími fyziologickými i patologickými proměnnými [41,42]. Testování také není hodnotitelné u pacientů s většinou typů srdečních arytmií.

Časová analýza variability srdeční frekvence (Ewingovy testy)

Hodnocení variability srdeční frekvence (HRV) časovou analýzou je široce dostupný a relativně nenáročný test, jehož provedení umožňuje i většina běžně dostupných elektromyografických (EMG) přístrojů. Hodnocena bývá řada parametrů [41,42], které odráží zejména parasympatické autonomní funkce (i když v obecné rovině se na modulaci srdeční frekvence, tedy i na nálezech většiny zmíněných parametrů, podílí jak složka parasympatická, tak složka sympatická). Vedle hodnocení klidové HRV při normálním dýchání je sledována také

reakce ANS na různé typy aktivačních manévřů (nejčastěji Valsalvův manévř, hluboké dýchání a/nebo aktivní vertikalizaci) [41,42]. K hodnocení každého ze zmíněných zátěžových testů jsou užívány specifické parametry odrážející dynamiku fyziologické reakce kardiovaskulárního systému na daný typ aktivace.

Studie využívající pro hodnocení AD u pacientů s RS metody časové analýzy HRV nepřinášejí jednoznačné výsledky. Některé práce prokazují u pacientů s RS při 24hod holterovské monitoraci srdeční frekvence při normálním dýchání signifikantní pokles její HRV oproti zdravým kontrolám [43,44]. Hodnoty HRV v těchto studiích vykazovaly signifikantní negativní korelaci s disabilitou. Signifikantní alterace HRV v testu hlubokého dýchání byla prokázána i v další studii [45], zatímco jiné práce [19,38,46] prokazují sice mírnou redukci HRV, většinou ale nedosahující statistické významnosti. Test reakce na postavení bývá u pacientů s RS často významně abnormální a koreluje se zvýšenou únavností [19,38]. Reakce HRV na Valsalvův manévř se u pacientů s RS většinou signifikantně neliší od zdravých kontrol [19,38,46].

Frekvenční (spektrální) analýza variability srdeční frekvence (SAHRV)

Alternativou předchozí metodiky je testování variability srdeční frekvence pomocí spektrální analýzy (SAHRV) [47]. Na rozdíl od analýzy časové umožňuje tato metoda validnější odlišení aktivity sympatické a parasympatické složky ANS, a tedy hodnocení balance vagu a sympatiku [47]. Podstatou metodiky je skutečnost, že kolísání srdeční frekvence probíhá současně v různých rytmech, které mají z fyziologického hlediska odlišný význam. Jednotlivé frekvence, na nichž ke zmíněné oscilaci dochází, lze pomocí spektrální analýzy vzájemně odlišit a rozdělit do několika (obvykle čtyř) pásem [47], která odrážejí funkce různých složek ANS [47,48].

Nejvýznamnější je pásmo nízkofrekvenční (v rozsahu 0,04–0,15 Hz), které reflektuje současně aktivitu sympatiku i vagu (příčemž míra jejich zastoupení závisí na vyšetřované situaci, např. poloze těla). Souvisí zřejmě s periodickými změnami periferní cévní rezistence a dále s baroreflexními mechanismy. Vysokofrekvenční pásmo (0,15–0,40 Hz) odráží zejména aktivitu vagu spojenou s fyziologickou respirační arytmií. Fyziologický podklad zbylých dvou frekvenčních pásem, tj. pásma ultranízkofrekvenčního (do 0,0033 Hz) a velmi nízkofrekvenčního (very

low frequency, 0,0033–0,04 Hz), není dosud jednoznačně objasněn. Tato frekvenční pásma proto většina publikovaných studií nezohledňuje [48].

Obdobně jako při využití metod časové analýzy lze HRV testovanou pomocí spektrální analýzy hodnotit v klidovém stavu (při spontánním dýchání) a/nebo za standardizovaných zkoušek. Nejčastějším aktivačním manévřem je zde ortoklinostatický test (zkouška leh-stoj-leh) [47].

SAHRV představuje, zejména s ohledem na zmíněnou lepší možnost odlišení podílu sympatické a vagové aktivity, vylepšení dříve užívaných metodik.

Podobně jako v případě metod časové analýzy HRV přináší také vyšetření SAHRV u pacientů s RS v různých studiích poměrně nejednoznačné výsledky. Brezinova et al prokázali u pacientů s RS metodou spektrální analýzy pokles HRV ve všech hodnocených frekvenčních pásmech [45], který koreluje s alterací sympatických i parasympatických funkcí. Jiní autoři našli signifikantní změny parametrů SAHRV pouze u pacientů s RS s klinickými známkami ortostatické intolerance [38]. Další studie prokazují zase změny především v nízkofrekvenčních pásmech [46].

Příčinou rozdílných výsledků zmíněných studií může být různý klinický stav sledovaných pacientů. Variabilita srdeční frekvence signifikantně klesá v důsledku inaktivity, a negativní korelace s disabilitou je tedy logická a zcela očekávatelná. U pacientů s pokročilejší disabilitou jsou proto alterovány nálezy více testů HRV, a to výrazněji oproti pacientům s méně pokročilým základním onemocněním.

Dysfunkce močového měchýře

Celoživotní prevalence symptomů vyplývajících z dysfunkce močového měchýře je u pacientů s RS u více než 97 % [49]. U 9 % pacientů s RS je porucha močení prvním příznakem neurologického onemocnění a u 2 % pacientů je mikční dysfunkce jeho jediným symptomem [49].

Dysfunkce močového měchýře vzniká nejčastěji jako přímý důsledek demyelinizačních lézí v míše, které vedou k narušení spojení mezi mikturickým centrem v dorzálním segmentu pontu a parasympatickými ganglii močového měchýře [50].

U pacientů s predilekční míšní lokalizací neurologického postižení je nejčastěji se vyskytující dysfunkcí močových cest hyperreflexie detruzoru. Klinicky se projevuje

symptomy hyperaktivního močového měchýře: frekventní močení u 17–65 %, urgence 24–86 % a urgentní inkontinence 34–72 % pacientů s RS. Další (méně častou) skupinou potíží jsou obstrukční příznaky [51].

Na základě suprapontinních lézí se až u 40 % pacientů s RS rozvine detruzoro-sfinkterová dyssynergie (DSD), při níž dochází k současným kontrakcím běžně antagonisticky působících svalů, tj. m. detrusor a m. sphincter, což vede ke zvýšení intravezikálního tlaku. Klinickými projevy DSD jsou epizody inkontinence provázené nedostatečným vyprázdněním. V menší míře dochází u pacientů s RS také k hypokontraktilitě detruzoru až k retenci moči. Jímací a evakuační příznaky se mohou i kombinovat. Asi 33 % pacientů s RS s diagnostikovanou hyperreflexií detruzoru trpí zároveň DSD [51]. Močová retence a přítomnost močového rezidua mohou vést k hydronefróze a chronickému renálnímu selhání [49]. Vysoká incidence poruch funkce močového měchýře u pacientů s RS je také podkladem podstatně častějších močových infekcí v této skupině pacientů ve srovnání se zdravou populací [52]. Uroinfekce (stejně jako jiné infekce u pacientů s RS) mohou u nich způsobit přechodné zhoršení neurologické symptomatiky a/nebo vyvolat relaps základního onemocnění [52].

Diagnostika dysfunkce močového měchýře

Pro diagnostiku dysfunkce močového měchýře je využíváno především urologické a urodynamické vyšetření a dále elektrofyzilogické metody, zejména elektromyografie svalů pánevního dna, vyšetření sakrálních reflexů a evokované potenciály n. pudendus.

Urologické a urodynamické vyšetření

Diagnostika dysfunkce močového měchýře je komplexní a zahrnuje urologické a urodynamické vyšetření, případně některé elektrofyzilogické metody. V rámci urologického vyšetření se provádí mj. sonografické vyšetření ledvin k vyloučení dilatace horních cest močových, a dále vyšetření močového měchýře, vč. měření postmikčního rezidua [53]. Vždy je také nutno vyšetřit močový sediment a kultivaci moči kvůli případné uroinfekci, která (jak již bylo uvedeno) může zhoršovat již přítomné symptomy i základní onemocnění jako takové [53]. Zásadní význam v diagnostice močové dysfunkce má urodynamické vyšetření. Základem je provedení uroflowmetrie (metoda, pomocí které

se měří rychlost a event. objem proudu moči za určitou časovou jednotku). Při patologickém nálezu a/nebo při anamnestických údajích svědčících pro evakuační poruchu je nezbytné doplnění cystometrického vyšetření (tedy měření vztahu mezi intravezikálním tlakem a objemem močového měchýře) [4,53]. Obě metody jsou zejména v kompetenci urologů.

Uvedená urodynamická vyšetření mohou být doplněna o elektromyografické vyšetření (EMG) svalů pánevního dna, vyšetření sakrálních reflexů a/nebo evokované potenciály nervus pudendus. Tato vyšetření jsou již většinou prováděna v neurofyzilogických laboratořích.

Elektromyografické vyšetření svalů pánevního dna

Elektromyografie svalů pánevního dna vč. sfinkterů umožňuje hodnocení integrity inervace těchto svalů, tedy především posouzení funkce dolního motoneuronu a sakrálních míšních kořenů (tj. úseku mezi motoneurony v Onufově jádru v sakrální míše (S3–S5) a vyšetřovaným svalem). Nepřímo (prostřednictvím hodnocení volní kontrakce) lze tímto vyšetřením získat také informace o integritě spojení mikturického centra v dorzálním segmentu pontu s Onufovým jádrem, která může být diagnosticky přínosná u pacientů s DSD. Vzhledem k relativně snadnému přístupu a dostatečně objemné svalové hmotě je zevní anální sfinkter nejčastěji vyšetřovaným svalem pánevního dna [54–57]. Na rozdíl od končetinových svalů, kde je ve zdravém relaxovaném svalu přítomno elektrické ticho, ve sfinkteru některé motorické jednotky vybíjejí kontinuálně. Při volní kontrakci dochází samozřejmě k aktivaci dalších MUPs. Metoda tedy umožňuje vyšetření potenciálů obou populací motorických jednotek (MUP): reflexně (nebo volně) aktivovaných vysokoprahových MUP a kontinuálně aktivních nízkoprahových MUP [56]. Hodnocení abnormální spontánní aktivity (fibrilací a pozitivních ostrých vln) je však v tomto svalu z důvodu kontinuální aktivity nízkoprahových MUPs obtížné a méně spolehlivé než ve svalech končetinových. Při vyšetření se elektroda zavádí vleže na boku, bez lokální anestezie asi 1 cm laterálně od análního ústí na rozhraní mukokutánní junkce. Jehlovou elektrodou lze vyšetřit povrchovou i hlubokou část zevního análního svěrače. Správná poloha elektrody je ověřena sluchovým hodnocením svalové aktivity.

Záchyt abnormit v jehlové EMG análního sfinkteru je u pacientů s RS poměrně častý. Rodi et al prokázali na malém souboru pacientů s RS a mikční dysfunkcí lehce abnormální EMG nález ze zevního análního sfinkteru (korelující s dysfunkcí dolního motoneuronu) u 42 % vyšetřených jedinců (a to zejména u žen, kde byla abnormita přítomna dokonce v 54 % oproti 12 % abnormit u mužských pacientů s RS) [57]. Jednalo se především o drobné odchylky zjištěné pomocí analýzy parametrů motorických jednotek (vyšší výskyt polyfází, lehce delší trvání MUPs) či o ojedinělý výskyt komplexních repetitivních výbojů. Výskyt uvedených abnormit je zřejmě podmíněn především přítomností lézí v oblasti conus medullaris (prokázané cca u 1/4 pacientů v této studii), u žen je pak možný vliv puerperálních poranění. Dále se u pacientů s RS udává výskyt změn v jehlové EMG z análního sfinkteru také jako důsledek excesivního natažení svalových vláken při defekaci v důsledku obstrukce [58].

Vyšetření sakrálních reflexů

Sakrální reflexy představují reflexní kontrakci příčně pruhovaných svalů pánevního dna jako odpověď na stimulaci senzitivních vláken oblasti perinea či genitální oblasti.

Nejčastěji jsou vyšetřovány reflexy bulbokavernózní, vezikooanální a anální. Aferentní část reflexního oblouku je ve všech případech zprostředkována senzitivními vlákny n. pudendus (v klinické praxi většinou v návaznosti na elektrickou stimulaci tohoto nervu), eferentní složka pak motorickými vlákny téhož nervu. Všechny reflexy odrážejí funkci sakrálních míšních segmentů v rozsahu S2–S4. U sakrálních reflexů jsou obecně hodnoceny dvě komponenty odpovědi. Časná, která je lépe vybavitelná, stabilní a nepodléhá habituaci, představuje pravděpodobně oligosynaptický reflex. Pozdní komponenta má delší latenci, je méně konstantní a při opakovaném vyšetření má tendenci k habituaci a odpovídá reflexu polysynaptickému [57]. Hodnocena je výbavnost odpovědi a jejich latence, event. stranová asymetrie.

V případě bulbokavernózního reflexu je stimulován n. dorsalis penis, resp. clitoridis (u mužů při koření penisu, u žen na klitoris), který je konečnou větví n. pudendus. Stimulace probíhá povrchovou bipolární elektrodou. Registrace je z m. bulbocavernosus, a to povrchovou nebo jehlovou elektrodou.

Při vyšetření vezikooanálního reflexu je stimulace zprostředkována prstencovou elek-

trodou připevněnou na Foleyův katétr, který je zaveden uretrou až ke sliznici močového měchýře nebo do jeho krčku. Registrovány jsou kontrakce análního sfinkteru pomocí anální elektrody.

V případě análního reflexu je pomocí anální elektrody elektricky stimulována anální sliznice, odpovědí je kontrakce análního sfinkteru, registrovatelná buďto jehlovou elektrodou nebo elektrodou povrchovou.

Abnormita sakrálních reflexů je u RS (zejména v případě relevantní klinické symptomatiky) prokazována řadou studií. Například Rodi et al zachytili abnormitu sakrálních reflexů (nejčastěji prodloužení jejich latencí) u 33 % pacientů s mikční dysfunkcí při RS [58]. Tento nález je (podobně jako abnormity jehlové EMG) většinou dáván do souvislosti s demyelinizací v sakrálních míšních segmentech.

Motorické a senzitivní evokované potenciály n. pudendus

V diagnostice dysfunkce močového měchýře u pacientů s RS lze využít také evokované potenciály n. pudendus. Cílem těchto vyšetření je prokázat integritu spojení suprapontinních center a mikturického centra v dorzálním segmentu pontu s Onufovým jádrem v sakrální míši (S3–S5). Vyšetření tedy reflektují funkci celé dráhy regulující mikci a jsou indikována zejména u hyperreflexie detruzoru či DSD.

Princip MEP n. pudendus vychází z faktu, že při magnetické či elektrické stimulaci motorického kortexu může být registrována odpověď ze svalů pánevního dna, nejčastěji z m. sphincter ani externus a/nebo m. bulbocavernosus [56,57,59]. U pacientů s míšními lézemi při RS a klinickým postižením sfinkterů je prokazován signifikantně delší kondukční čas ve srovnání se zdravými kontrolami [60].

Pudendální SEP jsou poměrně jednoduše výbavné elektrickou stimulací n. dorsalis penis či clitoridis a snímáním odpovědí z oblasti kortexu [61]. Metoda je vcelku snadná, dostupná a nevyžaduje použití speciálního instrumentária. Její nevýhodou je zejména negativní emoční kontext.

Hlavní indikací těchto metod je neurogenní močový měchýř (kde je cílem vyšetření stanovení integrity mikčních drah) a dále erektilní dysfunkce [62]. Častá abnormita SEP n. pudendus je však popisována již v časných fázích RS, a to dokonce i u klinicky asymptomatických pacientů [63,64]. Na druhou stranu senzitivita vyšetření není vysoká.

Rodi et al prokázali abnormitu pudendálních SEP (většinou prodloužení latence, event. nevybavnost odpovědí) pouze u 48 % pacientů s mikční dysfunkcí při RS [58].

V klinické praxi je přínos pudendálních SEP obdobný jako přínos SEP k periferním nervům DKK. Ertekin et al srovnávali abnormity SEP n. peroneus a SEP n. pudendus u mužů se spinální formou RS (s klinickou manifestací charakteru neurogenního močového měchýře a/nebo impotencí) nebo s míšní lézí jiného původu [65]. Zjistili, že přítomnost i charakter abnormity, tj. nevybavnost odpovědi, prodloužení latence nebo pokles amplitudy skalpové odpovědi, jsou obdobné u obou vyšetření. Při podezření na spinální lézi je tedy možné použít místo SEP n. pudendus, který může být z výše uvedených důvodů někdy hůře tolerován, SEP n. tibialis [65].

Gastrointestinální dysfunkce

Z multicentrické studie, v rámci které bylo 280 pacientů s RS dotazováno na gastrointestinální (GIT) potíže, vyplývá, že se GIT dysfunkce objevují až u 68 % pacientů s RS [66]. Mezi její nejčastější příznaky patří zácpa, která je diagnostikována u 43 % pacientů s RS. Fekální inkontinence, která přímo souvisí s porušenou funkcí zevního análního svěrače, postihuje 51 % pacientů s RS [66]. Dalším příznakem může být paradoxní puborektální kontrakce, kdy se při defekaci (na rozdíl od fyziologického stavu) puborektální sval kontrahuje a iliococcygeální sval relaxuje. Klinickou manifestací tohoto stavu je nejčastěji zácpa. Paradoxní puborektální kontrakce je často spojena s DSD [66,67]. Mezi méně časté příznaky GIT dysfunkce, které však mohou být pro pacienta značně obtěžující, patří také hypersalivace nebo škytavka.

Další studie zaměřená na výskyt GIT obtíží sledovala tyto symptomy u 218 pacientů s RS [69]. Výsledky byly obdobné jako v předchozí práci [66], navíc ale pacienti uváděli často další obtíže charakteru dysfagie, dyspepsie, pocitu plnosti po jídle a nadýmání [68].

Na rozvoji GIT dysfunkce se vedle poruchy centrální autonomní regulace jako přímého důsledku vlastního onemocnění podílí také nežádoucí účinky specifické terapie RS [4]. Nejvýznamnější GIT dysfunkce je popisována u perorálně podávaného preparátu druhé linie – dimethylfumarátu (Tecfidera). Potíže mají nejčastěji charakter nevolnosti, bolesti v epigastriu a průjmu. K jejich zmírnění se doporučuje symptomatická terapie (např. prokinetika, režimová opatření (uží-

vání tablety s tučnější stravou) a pozvolná itrace dávkování (první týden 120 mg dvakrát denně, až poté se přechází na plnou dávku dvakrát denně 240 mg) [69].

Za prediktory rozvoje GIT dysfunkce u pacientů s RS jsou považovány: stupeň disability, močové dysfunkce a ženské pohlaví. Výskyt tohoto typu potíží stoupá také s věkem pacientů a je častější u jedinců s primárně progresivní RS oproti relaps-remitentní nebo sekundárně progresivní RS [70].

Dvakrát častější než v běžné populaci je u pacientů s RS také syndrom dráždivého tračníku [71], který je charakterizován poruchou vyprazdňování stolice spojenou s břišním dyskomfortem nebo bolestí břicha. Podklad tohoto funkčního onemocnění trávicího traktu není dosud jednoznačně objasněn, onemocnění však zřejmě není přímým důsledkem poruchy autonomní regulace GIT.

Diagnostické metody gastrointestinální dysfunkce

K diagnostice GIT autonomní dysfunkce lze kromě cílené anamnézy a klinického vyšetření využít např. perkutánní elektrogastrografii [72,73]. Jedná se o neinvazivní metodu sloužící k záznamu myoelektrické aktivity žaludku z povrchu břišní stěny. Snímaná motorická aktivita je cyklický periodický děj, který je vytvářen a šířen z tzv. žaludečního pacemakeru. Ten je tvořen specializovanými intersticiálními buňkami myenterického plexu, tzv. IC-MY buňkami. Tyto buňky jsou odpovědné za genezi tzv. pomalých žaludečních vln. Jejich záznam pomocí speciálního hardware je zpracováván Fourierovou spektrální analýzou a prezentován ve formě sinusoidy s přesně hodnotitelnými parametry. Metoda je široce využívána v diagnostice diabetické autonomní neuropatie [72,73], není však specifická pro konkrétní typ onemocnění a lze ji použít pro průkaz poruchy motorické funkce žaludku v rámci gastroparézy jako projevu GIT autonomní dysfunkce jakékoli etiologie [73].

Další metodou využitelnou v indikaci hodnocené GIT autonomní dysfunkce je scintigrafické vyšetření evakuace žaludku. Metoda má řadu výhod: je neinvazivní, senzitivní, přesná a existuje jen malé množství kontraindikací k jejímu provedení. Nevýhodou vyšetření je expozice radiačnímu záření. K určení rychlosti vyprazdňování pevných soust ze žaludku se jako radioaktivní izotop používá nejčastěji techneciem (^{99m}Tc) označená nízkotučná pevná strava [74]. Vyšetření trvá 90–120 min, v rozšířenější verzi testu event.

až čtyři hod. Retence více než 60 % testační stravy v žaludku po dvou hod a 10 % po čtyřech hod je považována za důkaz významně opožděného vyprazdňování žaludku [74]. El-Maghraby et al popsali u pacientů s RS signifikantně zpomalené vyprazdňování žaludku ve srovnání s kontrolním souborem [75]. Tento nálezkoreloval s výskytem symptomů charakteru pocitu plnosti po jídle, nauzeou nebo zvracením, a s výskytem gastroezofageálního refluxu [75].

U pacientů s RS jsou prokazovány i abnormality při vyšetření jícnové manometrie a manometrie sfinkterů (vnitřního a zevního análního svěrače). K došetření zácpy lze využít také EMG vyšetření análního sfinkteru [4,57].

Sexuální dysfunkce

Incidence sexuální dysfunkce (SD) u pacientů s RS je v různých studiích variabilní (zejména v závislosti na charakteristice vyšetřované skupiny a použitých diagnostických metodách) a v mužské populaci se pohybuje v rozmezí od 50 do 84 %, u žen pak mezi 34 a 85 % [76].

Na rozvoji SD se kromě postižení centrálního nervového systému při základním neurologickém onemocnění podílí celé spektrum dalších příčin. Z tohoto hlediska lze SD u pacientů s RS rozdělit na primární, sekundární a terciární [77,78].

Primární SD je důsledkem přímého postižení centrálního nervového systému. Dle recentních studií zaměřených na korelaci SD s nálezy na MR mozku a míchy SD úzce souvisí především s přítomností demyelinizačních lézí v mozgovém kmeni, dominantně v pontu, a s pontinní atrofií. Dále je popisována korelace s postižením pyramidových drah, celkovým objemem lézí a s přítomností demyelinizačních lézí v míše [78].

Klinicky se primární SD v důsledku strukturálních lézí mozkomíšního systému projevuje nejčastěji snížením až absencí libida, genitální hypestézií nebo alodynii. Časté jsou také potíže charakteru snížené vaginální lubrikace u žen a poruchy erekce a ejakulace u mužů s RS [79].

Dalším faktorem, který může podmnít rozvoj primární SD, je endokrinní dysfunkce s postižením hypothalamo-hypofyzární osy. U pacientek s RS se jedná především o signifikantně zvýšenou hladinu folikuly stimulačního hormonu (FSH), luteinizačního hormonu (LH) a sníženou hladinu estrogenu ve srovnání se zdravými ženami [80]. RS má vliv také na hladiny dalších hormonů, zejména

prolaktinu a androgenů. Všechny uvedené změny se podílejí na zvýšené incidenci oligo- až amenorei u pacientek s RS ve srovnání se zdravými ženami [81].

Postižení hypothalamo-hypofyzární osy se u mužských pacientů s RS může manifestovat snížením hladiny testosteronu v séru, což negativně ovlivňuje spermatogenezi a další sexuální funkce, a způsobuje tak např. poruchy erekce a pokles libida [82].

Podkladem sekundárních SD jsou sfinkterové potíže a další organické symptomy doprovázející RS, jako jsou únava, deprese, spasticita, svalová slabost a neuropatická bolest [83].

Současně jsou mezi sekundární příčiny SD zahrnuty i nežádoucí účinky terapie užívané při léčbě RS. Jednoznačně největší vliv na fertilitu má mitoxantron: u žen se jedná o chemoterapií indukovanou amenorheu a u mužů se jedná o přechodný negativní vliv na spermatogenezi [84].

Mezi terciární obtíže patří psychosociální problémy, které jsou důsledkem základního onemocnění [78].

Nejčastější SD, která je popisována u pacientek s RS, je snížení libida (36–86 %), dále potíže při dosažení orgazmu (28–58 %), poruchy genitální citlivosti (43–62 %) a dyspareunie, tj. nepříjemné až bolestivé pocity ženy během soulože (8–40 %) [76].

Pokles libida patří mezi nejčastější SD také u mužů s RS (37–86 %), u kterých se mnohdy vyskytuje také erektilní dysfunkce (34–80 %), genitální hypestézie (21–72 %) a problémy s ejakulací (34–61 %) [76].

Recentní studie popisují pozitivní korelaci mezi SD a celkovým skóre disability (EDSS) [84]. Signifikantními prediktory SD jsou také únava, poruchy paměti a koncentrace a dále sfinkterové obtíže [84].

SD se mohou negativně podílet na ovlivnění plodnosti pacientů a pacientek s RS. Ačkoliv dosud neproběhla žádná systematická studie, která by cíleně mapovala výskyt poruch plodnosti u pacientů a pacientek s tímto onemocněním, z dosavadních údajů vyplývá, že existuje trend ke snížené plodnosti u RS, i když se většinou nejedná o významné narušení reprodukčních schopností [76]. Dle recentních demografických studií jsou pacienti s RS častěji bezdětní a častěji podstupují metody asistované reprodukce (ART) ve srovnání se zdravou populací [76].

Diagnostika sexuální dysfunkce

Diagnostika SD se opírá především o cílenou anamnézu, specializované dotazníky [78]

a klinické vyšetření (neurologické, gynekologické a/nebo urologické). Využit lze také elektrofyziologické metody, a to identické jako v případě dysfunkce sfinkterové. Jejich přínos je však (zejména s ohledem na multifaktoriální etiologii SD) limitovaný. Jedná se především o EMG ze svalů pánevního dna, MEP ke svalům pánevního dna a SEP n. pudendus, případně vyšetření sakrálních reflexů. Zivadinov et al prokázali abnormální SEP n. pudendus a MEP ke svalům pánevního dna u 50 % pacientů s RS a SD, ale dokonce u 57 % pacientů s RS bez SD [85]. Jednoznačný vztah mezi abnormitou MEP k pánevním svalům a SEP n. pudendus a výskytem a tíží erektilní dysfunkce u mužských pacientů s RS nebyl nalezen ani v dalších studiích [86]. Yang et al prokázali sice abnormitu SEP n. pudendus u většiny žen se SD u RS, nálezy však nebyly srovnány s výskytem abnormity tohoto testu u pacientek s RS bez známek SD, a význam tohoto nálezu je tedy sporný [87].

Sudomotorická dysfunkce

Dle epidemiologických studií se prevalence sudomotorické dysfunkce u pacientů s RS pohybuje od 26 do 94 %, v závislosti na použité metodice jejího průkazu [88]. Sudomotorická dysfunkce se může objevit již v časně fázi RS, její výskyt se však zvyšuje s trváním onemocnění a tíží neurologického deficitu [89]. Klinicky se manifestuje sníženým pocením až anhidrózou, jejichž důsledkem je narušení termoregulace [90].

Pocení je fyziologickou reakcí organismu na zvýšení teploty. Tato funkce je regulována aktivitou sympatiku (potní žlázy mají sympatickou cholinergní inervaci, ale nikoli inervaci parasympatickou). Poruchy potivosti vedou k narušení termoregulace, a tedy negativně ovlivní reakci organismu na zvýšení tělesné teploty, což může vést ke zhoršení symptomů RS [4]. Tento jev se nazývá Uhthoffův fenomén. Jeho podkladem je negativní ovlivnění vedení nervového vzruchu demyelinizovanými axony zvýšenou teplotou [91].

U pacientů s RS lze očekávat narušení sudomotorických funkcí zejména v důsledku narušení funkce centrálních sudomotorických drah, které začínají v preoptické oblasti hypothalamu, tegmentu, latelární retikulární formaci a sestupují k neuronům intermediolaterální šedé hmoty míšni v cerviko-thorako-lumbální oblasti [90].

Saari et al prokázali, že celkový objem demyelinizačních lézí na MR mozku, objem lézí v oblasti pontu, mozečku a spánkovém laloku

a přítomnost lézí v hrudní míše koreluje s narušením sudomotorických funkcí (hodnocených pomocí sympatické kožní odpovědi) [88]. Kromě vlastní centrální sudomotorické dysfunkce však tyto změny vedou sekundárně i ke změnám periferním: porucha centrálních sudomotorických drah má za následek nedostatečnou sympatickou inervaci kožních potních žláz a vede k periferní adaptaci charakteru down regulace muskarinových receptorů, a tím ke snížení cholinergní citlivosti a atrofii potních žláz [92], které se u pacientů s RS podléjí na poruše potivosti a termoregulace.

Diagnostika sudomotorické dysfunkce

Pro hodnocení sudomotorických funkcí je nejčastěji využívána sympatická kožní odpověď a/nebo tzv. kvantitativní sudomotorický test. Existuje i řada komplexnějších metod poskytujících detailnější informaci o sudomotorických funkcích (např. termoregulační potní test), které však vyžadují specializované vybavení a jejich uplatnění v běžné klinické praxi je limitováno.

Sympatická kožní odpověď

Mezi nejčastěji využívané neurofyziologické testy určené k diagnostice sudomotorické dysfunkce patří sympatická kožní odpověď (Sympathetic Skin Response; SSR). SSR je definována jako přechodná změna elektrického potenciálu kůže, která může být reflexně vyvolána řadou vnitřních či zevních stimulů [93]. Vyvolávajícím zevním podnětem může být např. nadprahová elektrická či magnetická stimulace nebo neočekávaný sluchový podnět. Mezi vnitřní stimuly, které mohou vyvolat přechodnou změnu elektrického potenciálu kůže, patří prudké inspirium nebo úleková reakce. Podkladem změny kožního potenciálu je pohyb iontů zejména přes membránu buněk ekrinních potních žláz [94]. Proto je SSR řazena mezi testy sudomotorických funkcí, i když ve skutečnosti netestuje vlastní potivost. SSR je polysynaptický reflex s variabilní aferentací a společnou eferentní částí sestávající z míšních autonomních neuronů, pre- a postganglionárních sympatických nervových vláken a potní žlázy jako efektoru. Reflex je modifikován suprasegmentálními strukturami, především hypothalamem a retikulární formací horního kmene [93]. SSR tedy může být využívána i k hodnocení funkce spinálního a supraspinálního sympatického systému [95]. Publikované studie shodně potvrzují, že SSR je výbavná u všech zdravých jedinců [96]. Nejspolehlivější abnormitou

SSR při různých typech AD vč. postižení centrálních autonomních drah je nevybavnost (event. snížená výbavnost) odpovědi [10,97,98]. Naopak názory na význam hodnocení amplitud odpovědi a jejich latencí se různí. Při zohlednění výrazné interindividuální variability těchto parametrů a jejich často jen mírné alterace v rámci různých typů AD je jejich hodnocení zatíženo nízkou senzitivitou [99]. U pacientů s klinicky izolovaným syndromem [100], optickou neuritidou [101] a RS [88] bylo zachyceno prodloužení SSR latencí na horních a dolních končetinách. Všechny zmíněné studie jsou však limitovány relativně malým počtem vyšetřených pacientů a uvedené výsledky jsou poněkud kontroverzní vzhledem k tomu, že prodloužení latencí reflektuje především postižení pre- a postgangliových nervových vláken, tedy periferního (a nikoli centrálního) úseku sudomotorických drah [97]. Každopádně je senzitivita SSR v diagnostice autonomních AD porovnání s kardiovaskulárními testy významně nižší [24].

Kvantitativní sudomotorický test

Mezi testy sudomotorických dysfunkcí s vyšší diagnostickou validitou patří kvantitativní sudomotorický test (Quantitative Sudomotor Axon Reflex Test; QSART) a termoregulační testování potivosti (thermoregulatory sweat testing). Tyto metody jsou prokazatelně senzitivnější než SSR, zároveň však jsou daleko méně dostupné, vyžadují speciální vybavení. Z těchto důvodů jsou využívány zejména k vědeckým účelům [102,103].

Pupilmotorická dysfunkce

Jedním z celkově nejčastějších symptomů RS je optická neuritida, která může být asociována s poruchou pupilmotorických vláken [104]. Dysfunkce těchto vláken se však může vyskytovat i samostatně. Prevalence narušení pupilmotoriky u pacientů s RS se pohybuje v rozmezí 26–60 % [105]. Tato dysfunkce ale pacienty většinou významně neomezuje a je spíše náhodným nálezem v rámci neurologického vyšetření, bez jednoznačné klinické manifestace vnímané pacientem.

U většiny AD narůstá jejich výskyt s dobou trvání RS a stupněm disability. U pupilmotorické dysfunkce však tato závislost prokázána nebyla, a to nejspíše právě v souvislosti se skutečností, že k narušení pupilmotoriky dochází často v rámci optické neuritidy, která může být iniciální manifestací RS [105].

Vyšetření pupilmotorické dysfunkce

Porucha pupilmotorických vláken vede k postižení zornicových reakcí. Pozzessere et al prokázali, že dysfunkce zornicové reakce je u pacientů s RS většinou způsobena sníženým tonem parasymptiku a zvýšeným tonem symptiku a pravděpodobně odráží postižení v průběhu zrakové dráhy [107]. Zornicové reakce mohou být postiženy v důsledku léze aferentní či eferentní části reflexního oblouku. V případě postižení aferentní části (tedy při lézi zrakové dráhy) je vzhledem k obvykle jednostrannému postižení přínosná klinická zkouška fotoreakce zornic zaměřená na vyšetření tzv. relativního aferentního pupilárního defektu (RAPD, také Gunnova zornice). Toto vyšetření je plně v kompetenci oftalmologů [106,107].

Únava a potíže se spánkem u pacientů s RS

Potíže se spánkem jsou u pacientů s RS relativně časté. V rozsáhlé multicentrické studii je udávalo více než 50 % pacientů s tímto onemocněním [108]. Oka et al prokázali, že poruchy spánku u pacientů s RS přímo souvisí s demyelinizačními lézemi hypothalamu [109]. Mezi nejčastější potíže se spánkem patří problémy s usínáním a udržením spánku [4].

Častější probouzení během spánku může být u pacientů s RS způsobeno také jinými symptomy RS. Jedná se např. o křeče dolních končetin nebo častější močové urgencye během spánku [110]. Spánek může být narušen také vlivem specifické imunomodulační terapie RS (insomnie je např. poměrně častým nežádoucím účinkem terapie interferonem beta 1a a beta 1b) [111]. Tyto potíže vedou k tomu, že spánek je méně kvalitní a může přispívat ke zvýšené únavě během dne [111].

Únava postihuje více než 90 % pacientů s RS. Více než polovinu nemocných s tímto onemocněním únava omezuje v běžných denních aktivitách. Nejméně třetina pacientů jí přikládá největší význam z faktorů ovlivňujících kvalitu jejich života [112].

Příčina nadměrné únavy je multifaktoriální. Jedním ze základních faktorů je primární poškození centrálního nervového systému a dysfunkce imunitního systému. Významný vliv mají také sekundární faktory onemocnění jako bolest, poruchy afektivity, již zmíněné poruchy spánku a nežádoucí účinky farmakoterapie. Nezanedbatelný je

AUTONOMNÍ DYSFUNKCE A JEJÍ DIAGNOSTIKA U ROZTROUŠENÉ SKLERÓZY

také podíl snížení fyzické kondice u pacientů s motorickou dysfunkcí [112].

Stejně jako postižení spánku i zvýšená únava u pacientů s RS souvisí především s demyelinizačními změnami, které postižují hypothalamus [113]. Jak již bylo uvedeno, podle některých studií má zvýšená únava vztah ke kardiovaskulární dysfunkci u pacientů s RS [18,19].

Diagnostika zvýšené únavy a poruch spánku u pacientů s RS

Při kvantifikaci únavy se v praxi využívají dotazníkové metody. Mezi nejrozšířenější patří stupnice tíže únavy označovaná jako Fatigue Severity Scale (FSS) sestávající z devíti jednoduchých testovacích otázek [114]. Nejužívanější multidimenzionální škálou je stupnice vlivu únavy s názvem Fatigue Impact Scale (FIS), kterou tvoří 40 otázek zaměřených na vliv únavy na sociální, kognitivní a fyzickou aktivitu pacienta [115].

K diagnostice spánkové dysfunkce přispívá polysomnografie, která umožní určení spánkového vzorce [4].

Závěr

RS může vést k postižení kterékoli části ANS. Klinická manifestace jednotlivých typů AD je variabilní [4] a její symptomy jsou stále relativně poddiagnostikované. Diagnostika a terapie AD vyžaduje komplexní interdisciplinární přístup, který může přispět k výraznému zlepšení kvality života pacientů s RS.

Seznam použitých zkratk

AD – autonomní dysfunkce
ANS – autonomní nervový systém
ART – metody asistované reprodukce
ASP – autonomní dotazník (Autonomic Symptom Profile)
COMPASS – autonomní dotazník (Composite Autonomic Symptom Score)
DSD – detruzorosfinkterová dysynergie
EDSS – Kurtzkeho škála (Kurtzke Expanded Disability Status Scale)
EKG – elektrokardiografické vyšetření
EMG – elektromyografické vyšetření
FIS – stupnice vlivu únavy (Fatigue Impact Scale)
FSS – stupnice tíže únavy (Fatigue Severity Scale)
GIT – gastrointestinální
HRV – variabilita srdeční frekvence (Heart Rate Variability)
HUT – test na nakloněné rovině (Head Up Tilt test)
KD – kardiální dysfunkce
MEP – motorické evokované potenciály
MUP – potenciály motorických jednotek
POTS – posturální ortostatická tachykardie
QSART – kvantitativní sudomotorický test (Quantitative Sudomotor Axon Reflex Test)
RAPD – relativní aferentní pupilární defekt
RS – roztroušená skleróza
SAHRV – spektrální analýza variability srdeční frekvence (Spectral Analysis of Heart Rate Variability)
SD – sexuální dysfunkce
SEP – somatosenzorické evokované potenciály
SSR – sympatická kožní odpověď (Sympathetic Skin Response)

Literatura

1. McDougall AJ, McLeod JG. Autonomic nervous system function in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 2003;215(2):79–85.
2. Thomaides TN, Zoukos Y, Chaudhuri KR, et al. Physiological assessment of aspects of autonomic function in patients with secondary progressive multiple sclerosis. *J Neurol* 1993;240(3):139–43.
3. Cortez MM, Nagi Reddy SK, Goodman B, et al. Autonomic symptom burden is associated with MS-related fatigue and quality of life. *Mult Scler Relat Disord* 2015;4(3):258–63. doi: 10.1016/j.msard.2015.03.007.
4. Adamec I, Habek M. Autonomic dysfunction in multiple sclerosis. *Clin Neurol Neurosurg* 2013;115(Suppl 1):S73–8. doi: 10.1016/j.clineuro.2013.09.026.
5. Gunal DI, Afsar N, Tanridag T, et al. Autonomic dysfunction in multiple sclerosis: correlation with disease-related parameters. *Eur Neurol* 2002;48(1):1–5.
6. Flachenecker P, Reiners K, Krauser M, et al. Autonomic dysfunction in multiple sclerosis is related to disease activity and progression of disability. *Mult Scler* 2001;7(5):327–34.
7. Vita G, Fazio MC, Milone S, et al. Cardiovascular autonomic dysfunction in multiple sclerosis is likely related to brainstem lesions. *J Neurol Sci* 1993;120(1):82–6.
8. Stenager E, Asbeth NS. Sexual aspect of multiple sclerosis. *Sem Neurol* 1992;12(2):120–4.
9. Saari A, Tolonen U, Pääkkö E, et al. Cardiovascular autonomic dysfunction correlates with brain MRI lesion load in MS. *Clin Neurophysiol* 2004;115(6):1473–8.
10. De Seze J, Stojkovic T, Gauvrit JY, et al. Autonomic dysfunction in multiple sclerosis: cervical spinal cord atrophy correlates. *J Neurol* 2001;248(4):297–303.
11. Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 1983;33(11):1444–52.
12. Suarez GA, Opfer-Gehrking TL, Offord KP, et al. The Autonomic Symptom Profile: a new instrument to assess autonomic symptoms. *Neurology* 1999;52(3):523–8.
13. Sletten DM, Suarez GA, Low PA, et al. COMPASS 31: a refined and abbreviated Composite Autonomic Symptom Score. *Mayo Clin Proc* 2012;87(12):1196–201. doi: 10.1016/j.mayocp.2012.10.013.
14. Treister R, O'Neil K, Downs HM, et al. Validation of the composite autonomic symptom scale 31 (COMPASS-31) in patients with and without small fiber polyneuropathy. *Eur J Neurol* 2015;22(7):1124–30. doi: 10.1111/ene.12717.
15. Kale N, Magana S, Agaoglu J, et al. Assessment of autonomic nervous system dysfunction in multiple sclerosis and association with clinical disability. *Neurol Int* 2009;1(1):5–10. doi: 10.4081/ni.2009.e5.
16. Acevedo AR, Nava C, Arriada N, et al. Cardiovascular dysfunction in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 2000;101(2):85–8.
17. Nasser K, TenVoorde BJ, Adèr HJ, et al. Longitudinal follow-up of cardiovascular reflex tests in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 1998;155(1):50–4.
18. Kesselbrenner L, Akselrod S, Ahiron A, et al. Is fatigue in patients with multiple sclerosis related to autonomic dysfunction? *Clin Auton Res* 2000;10(4):169–75.
19. Flachenecker P, Rufer A, Bihler I, et al. Fatigue in MS is related to sympathetic vasomotor dysfunction. *Neurology* 2003;61(6):851–3.
20. Kanjwal K, Karabin B, Kanjwal Y, et al. Autonomic dysfunction presenting as postural orthostatic tachycardia syndrome in patients with multiple sclerosis. *Int J Med Sci* 2010;7(1):62–7.
21. Sörös P, Hachinski V. Cardiovascular and neurological causes of sudden death after ischaemic stroke. *Lancet Neurol* 2012;11(2):179–88. doi: 10.1016/S1474-4422(11)70291-5.
22. Juric S, Mismas A, Mihic N, et al. Newly onset sinus bradycardia in context of multiple sclerosis relapse. *Intern Med* 2012;51(9):1121–4.
23. Chagnac Y, Martinovits G, Tadmor R, et al. Paroxysmal atrial fibrillation associated with an attack of multiple sclerosis. *Postgrad Med J* 1986;62(727):385–7.
24. Uriel N, Kaluski E, Hendler A, et al. Cardiogenic shock in a young female with multiple sclerosis. *Resuscitation* 2006;70(1):153–7.
25. Padley JR, Feneley MP, Hayward CS, et al. Neurocardiogenic pulmonary oedema: initial presentation of multiple sclerosis. *Heart Lung Circ* 2012;21(12):853–5. doi: 10.1016/j.hlc.2012.06.003.
26. Bramow S, Faber-Rod JC, Jacobsen C, et al. Fatal neurogenic pulmonary edema in a patient with progressive multiple sclerosis. *Mult Scler* 2008;14(5):711–5. doi: 10.1177/1352458507087848.
27. Paty DW, Ebers GC, Hartung HP. Management of relapsing-remitting multiple sclerosis and treatment guidelines. *Eur J Neurology* 1999;1(1):1–35.
28. Vasheghani-Farahani A, Sahraini MA, Darabi L, et al. Incidence of various cardiac arrhythmic and conduction disturbances due to high dose intravenous methylprednisolone in patients with multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 2001;309(2):75–8.
29. Štourač P. Imunomodulační léčba roztroušené sklerózy mozkomíšni v klinických a zobrazovacích parametrech. *Cesk Slov Neurol N* 2012;75/108(4):404–10.
30. Meluzínová E. Současné možnosti léčby roztroušené sklerózy. *Neurol Prax* 2010;11(5):303–7.
31. Piňha J. Imunosupresiva v léčbě neurologických onemocnění. *Neurol Prax* 2011;12(6):389–93.
32. Kappos L, Radue EW, O'Connor P, et al. A placebo-controlled trial of oral fingolimod in relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2010;362(5):387–401. doi: 10.1056/NEJMoa0909494.
33. Budde K, Schmouder RL, Brunkhorst R, et al. First human trial of FTY720, a novel immunomodulator, in stable renal transplant patients. *J Am Soc Nephrol* 2002;13(4):1073–83.
34. Gold R, Comi G, Palace J, et al. Assessment of cardiac safety during fingolimod treatment initiation in a real-world relapsing multiple sclerosis population: a phase 3b, open-label study. *J Neurol* 2014;261(2):267–76. doi: 10.1007/s00415-013-7115-8.
35. Rossi S, Rocchi C, Studer V, et al. The autonomic balance predicts cardiac responses after the first dose of fingolimod. *Mult Scler* 2015;21(2):206–16. doi: 10.1177/1352458514538885.
36. Ambler Z, Bednařík J, Růžička E. Klinická neurologie – část obecná. Praha: Triton 2008.
37. Adamec I, Bach I, Barušič AK, et al. Assessment of prevalence and pathological response to orthostatic provocation in patients with multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 2013;324(1–2):80–3. doi: 10.1016/j.jns.2012.10.006.
38. Flachenecker P, Wolf A, Krauser M, et al. Cardiovascular autonomic dysfunction in multiple sclerosis: correlation with orthostatic intolerance. *J Neurol* 1999;246(7):578–86.
39. Adamec I, Lovrić M, Zaper D, et al. Postural orthostatic tachycardia syndrome associated with multiple sclerosis. *Auton Neurosci* 2013;173(2):65–8. doi: 10.1016/j.autneu.2012.11.009.
40. Martin CE, Shaver JA, Leon DF, et al. Autonomic mechanisms in hemodynamic responses to isometric exercise. *J Clin Invest* 1974;54(1):104–15.
41. Ewing DJ, Clarke BF. Autonomic neuropathy: its diagnosis and prognosis. *Clin Endocrinol Metab* 1986;15(4):855–88.
42. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. *Circulation* 1996;93(5):1043–65.

43. Mahovic D, Lakusic N. Progressive impairment of autonomic control of heart rate in patients with multiple sclerosis. *Arch Med Res* 2007;38(3):322–5.
44. Tombul T, Anlar O, Tuncer M, et al. Impaired heart rate variability as a marker of cardiovascular autonomic dysfunction in multiple sclerosis. *Acta Neurol Belg* 2011;111(2):116–20.
45. Brezinova M, Goldenberg Z, Kucera P. Autonomic nervous system dysfunction in multiple sclerosis patients. *Bratisl Lek Listy* 2004;105(12):404–7.
46. Frontoni M, Fiorini M, Strano S, et al. Power spectrum analysis contribution to the detection of cardiovascular dysautonomia in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 1996;93(4):241–5.
47. Opavsky MA, Martino T, Rabinovitch M, et al. Enhanced ERK-1/2 activation in mice susceptible to coxsackievirus-induced myocarditis. *J Clin Invest* 2002;109(12):1561–9.
48. Vlčková E, Bednařík J, Buršová Š, et al. Spektrální analýza variability srdeční frekvence – normativní data a variabilita metodiky. *Cesk Slov Neurol N* 2010; 73/106(4):469–70.
49. Haensch CA, Jörg J. Autonomic dysfunction in multiple sclerosis. *J Neurol* 2006;253(1):3–9.
50. Thompson AJ, Toosy AT, Ciccarelli O. Pharmacological management of symptoms in multiple sclerosis: current approaches and future directions. *Lancet Neurol* 2010;9(12):1182–99. doi: 10.1016/S1474-4422(10)70249-0.
51. Betts CD, D'Mellow MT, Fowler CJ. Urinary symptoms and the neurological features of bladder dysfunction in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1993;56(3):245–50.
52. Metz LM, McGuinness SD, Harris C. Urinary tract infections may trigger relapse in multiple sclerosis. *Axone* 1998;19(4):67–70.
53. Blaivas JG, Bhimani G, Labib KB. Vesicourethral dysfunction in multiple sclerosis. *J Urol* 1979;122(3):342–7.
54. Podnar S, Vodusek DB. Standardization of anal sphincter electromyography: uniformity of the muscle. *Muscle Nerve* 2000;23(1):122–5.
55. Podnar S, Rodi Z, Lukanovic A, et al. Standardisation of anal sphincter EMG: technique of needle examination. *Muscle Nerve* 1999;22(3):400–3.
56. Thiry AJ, Deltre PF. Neurophysiological assessment of the central motor pathway to the external urethral sphincter in man. *Br J Urol* 1989;63(5):515–9.
57. Kadaňka Z jr. Elektrofyziologické vyšetření pánevního dna. *Cesk Slov Neurol N* 2013;76/109(2):155–61.
58. Rodi Z, Vodusek DB, Denislic M. Clinical uro-neurophysiological investigation in multiple sclerosis. *Eur J Neurol* 1996;3(6):574–80.
59. Vodusek DB, Zidar J. Perineal motor evoked responses. *NeuroUrol Urodyn* 1988;7(1):236–7.
60. Eardley I, Nagendran K, Lecky B, et al. Neurophysiology of the striated urethral sphincter in multiple sclerosis. *Br J Urol* 1991;68(1):81–8.
61. Haldeman S, Bradley WE, Bhatia N. Evoked responses from the pudendal nerve. *J Urol* 1982;128(5):974–80.
62. Bojar M, Mazanec R, Kučera Z. Role neurologa v diagnostice, léčbě a rehabilitaci osob trpících inkontinencí moči (část I). *Neurol Prax* 2006;4(1):212–9.
63. Sau G, Siracusano S, Aiello I, et al. The usefulness of the somatosensory evoked potentials of the pudendal nerve in diagnosis of probable multiple sclerosis. *Spinal Cord* 1999;37(4):258–63.
64. Sau GF, Aiello I, Siracusano S, et al. Pudendal nerve somatosensory evoked potentials in probable multiple sclerosis. *Ital J Neurol Sci* 1997;18(5):289–91.
65. Ertekin C, Reel F. Bulbocavernosus reflex in normal men and in patients with neurogenic bladder and/or impotence. *J Neurol Sci* 1976;28(1):1–15.
66. Hinds JP, Eidelman BH, Wald A. Prevalence of bowel dysfunction in multiple sclerosis. A population survey. *Gastroenterology* 1990;98(6):1538–42.
67. Chia YW, Gill KP, Jameson JS, et al. Paradoxical puborectalis contraction is a feature of constipation in patients with multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1996;60(1):31–5.
68. Levinthal DJ, Rahman A, Nusrat S, et al. Adding to the burden: gastrointestinal symptoms and syndromes in multiple sclerosis. *Mult Scler Int* 2013;2013:319201. doi: 10.1155/2013/319201.
69. Gold R, Kappos L, Arnold DL, et al. Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2012;367(12):1098–107.
70. Preziosi G, Raptis DA, Raeburn A, et al. Gut dysfunction in patients with multiple sclerosis and the role of spinal cord involvement in the disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2013;25(9):1044–50. doi: 10.1097/MEG.0b013e328361eaf8.
71. Marrie RA, Reider N, Stuve O, et al. The incidence and prevalence of comorbid gastrointestinal, musculoskeletal, ocular, pulmonary, and renal disorders in multiple sclerosis: a systematic review. *Mult Scler* 2015;21(3):332–41. doi: 10.1177/1352458514564488.
72. Mlčáková L, Bednařík J, Ošlejšková E, et al. Spektrální analýza variability srdeční frekvence a elektrogastrografie – metody popisující funkce autonomního nervového systému. *Cesk Slov Neurol N* 2008;71/104(5):621–22.
73. Riezzo G, Russo F, Indrio F. Electrogastrography in adults and children: the strength, pitfalls, and clinical significance of the cutaneous recording of the gastric electrical activity. *Biomed Res Int* 2013;2013:282757. doi: 10.1155/2013/282757.
74. Chang J, Rayner CK, Jones KL, et al. Diabetic gastroparesis-backwards and forwards. *J Gastroenterol Hepatol* 2011;26(Suppl 1):46–57. doi: 10.1111/j.1440-1746.2010.06573.x.
75. El-Maghraby TA, Shalaby NM, Al-Tawdy MH, et al. Gastric motility dysfunction in patients with multiple sclerosis assessed by gastric emptying scintigraphy. *Can J Gastroenterol* 2005;9(1):141–5.
76. Zorzon M, Zivadinov R, Monti Bragadin L, et al. Sexual dysfunction in multiple sclerosis: a 2-year follow-up study. *J Neurol Sci* 2001;187(1–2):1–5.
77. Šrotová I, Crha I, Vlčková E, et al. Roztroušená skleróza, neplodnost a její léčba. *Cesk Slov Neurol N* 2015;78/11(6):655–60.
78. Foley FW, Zemon V, Campagnolo D, et al. The Multiple Sclerosis Intimacy and Sexuality Questionnaire – revalidation and development of a 15-item version with a large US sample. *Mult Scler* 2013;19(9):1197–203. doi: 10.1177/1352458512471876.
79. Confavreux C, Hutchinson M, Hours MM, et al. Rate of pregnancy-related relapse in multiple sclerosis. *Pregnancy in Multiple Sclerosis Group*. *N Engl J Med* 1998;339(5):285–91.
80. Grinsted L, Heltberg A, Hagen C, et al. Serum sex hormone and gonadotropin concentrations in premenopausal women with multiple sclerosis. *J Intern Med* 1989;226(4):241–4.
81. Falaschi P, Martocchia A, Piroietti A, et al. High incidence of hyperandrogenism-related clinical signs in patients with multiple sclerosis. *Neuro Endocrinol Lett* 2001;22(4):248–50.
82. Fode M, Krogh-Jespersen S, Brackett NL, et al. Male sexual dysfunction and infertility associated with neurological disorders. *Asian J Androl* 2012;14(1):61–8. doi: 10.1038/aja.2011.70.
83. Cocco E, Sardu C, Gallo P, et al. Frequency and risk factors of mitoxantrone-induced amenorrhea in multiple sclerosis: the FEMIMS study. *Mult Scler* 2008;14(9):1225–33. doi: 10.1177/1352458508094882.
84. Cavalla P, Rovei V, Masera S, et al. Fertility in patients with multiple sclerosis: current knowledge and future perspectives. *Neurol Sci* 2006;27(4):231–9.
85. Zivadinov R, Zorzon M, Locatelli L, et al. Sexual dysfunction in multiple sclerosis: a MRI, neurophysiological and urodynamic study. *J Neurol Sci* 2003;210(1–2):73–6.
86. Ghezzi A, Malvestiti GM, Baldini S, et al. Erectile impotence in multiple sclerosis: a neurophysiological study. *J Neurol* 1995;242(3):123–6.
87. Yang CC, Bowen JR, Kraft GH, et al. Cortical evoked potentials of the dorsal nerve of the clitoris and female sexual dysfunction in multiple sclerosis. *J Urol* 2000;164(6):2010–3.
88. Saari A, Tolonen U, Pääkkö E, et al. Sympathetic skin responses in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 2008;118(4):226–31.
89. Saari A, Tolonen U, Pääkkö E, et al. Sweating impairment in patients with multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 2009;120(5):358–63. doi: 10.1111/j.1600-0404.2009.01164.x.
90. Noronha MJ, Vas CJ, Aziz H. Autonomic dysfunction (sweating responses) in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1968;31(1):19–22.
91. Guthrie TC, Nelson DA. Influence of temperature changes on multiple sclerosis: critical review of mechanisms and research potential. *J Neurol Sci* 1995;129(1):1–8.
92. Davis SL, Wilson TE, Vener JM, et al. Pilocarpine-induced sweat gland function in individuals with multiple sclerosis. *J Appl Physiol* 1985;98(5):1740–4.
93. Shahani BT, Halperin JJ, Boulu P, et al. Sympathetic skin response – a method of assessing unmyelinated axon dysfunction in peripheral neuropathies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1984;47(5):536–42.
94. Wang GH. The galvanic skin reflex; a review of old and recent works from a physiologic point of view. *Am J Phys Med* 1957;36(5):295–320.
95. Illigens BM, Gibbons CH. Sweat testing to evaluate autonomic function. *Clin Auton Res* 2009;19(2):79–87. doi: 10.1007/s10286-008-0506-8.
96. Vlčková E, Šrotová I, Bednařík J. Sympatická kožní odpověď v diagnostice neuropatie tenkých vláken. *Cesk Slov Neurol N* 2016;79/112(1):52–60.
97. Claus D, Schondorf R. Sympathetic skin response. The International Federation of Clinical Neurophysiology. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol Suppl* 1999;52(1):277–82.
98. Knezevic W, Bajada S. Peripheral autonomic surface potential. A quantitative technique for recording sympathetic conduction in man. *J Neurol Sci* 1985;67(2):239–51.
99. Vinik AI, Nevoret M, Casellini C, et al. Neurovascular function and sudorimetry in health and disease. *Curr Diab Rep* 2013;13(4):517–32. doi: 10.1007/s11892-013-0392-x.
100. Aghamollai V, Harirchian MH, Modabbernia A, et al. Sympathetic skin response (SSR) in multiple sclerosis and clinically isolated syndrome: a case-control study. *Neurophysiol Clin* 2011;41(4):161–71. doi: 10.1016/j.neucli.2011.08.003.
101. Saari A, Tolonen U, Pääkkö E, et al. Sudomotor dysfunction in patients with optic neuritis. *Clin Auton Res* 2010;20(3):199–204. doi: 10.1007/s10286-009-0052-z.
102. Pintér A, Cseh D, Sárközi A, et al. Autonomic dysregulation in multiple sclerosis. *Int J Mol Sci* 2015;16(8):16920–52. doi: 10.3390/ijms160816920.
103. Crnošija L, Adamec I, Lovrić M, et al. Autonomic dysfunction in clinically isolated syndrome suggestive of multiple sclerosis. *Clin Neurophysiol* 2016;127(1):864–9. doi: 10.1016/j.clinph.2015.06.010.
104. Blazek P, Davis SL, Greenberg BM, et al. Objective characterization of the relative afferent pupillary defect in MS. *J Neurol Sci* 2012;323(1–2):193–200. doi: 10.1016/j.jns.2012.09.015.
105. Surakka J, Ruutiainen J, Romberg A, et al. Pupillary function in early multiple sclerosis. *Clin Auton Res* 2008;18(3):150–4. doi: 10.1007/s10286-008-0471-2.

- 106.** Ampapová M, Ampapa R. Optická neuritida a roztroušená skleróza. *Klin Farmakol Farm* 2013;27(2):75–9.
- 107.** Pozzessere G, Rossi P, Valle E, et al. Autonomic involvement in multiple sclerosis: a pupillometric study. *Clin Auton Res* 1997;7(6):315–9.
- 108.** Bamer AM, Johnson KL, Amtmann D, et al. Prevalence of sleep problems in individuals with multiple sclerosis. *Mult Scler* 2008;14(8):1127–30. doi: 10.1177/1352458508092807.
- 109.** Oka Y, Kanbayashi T, Mezaki T, et al. Low CSF hypocretin-1/orexin-A associated with hypersomnia secondary to hypothalamic lesion in a case of multiple sclerosis. *J Neurol* 2004;251(7):885–6.
- 110.** Tachibana N, Howard RS, Hirsch NP, et al. Sleep problems in multiple sclerosis. *Eur Neurol* 1994;34(6):320–3.
- 111.** Fleming WE, Pollak CP. Sleep disorders in multiple sclerosis. *Semin Neurol* 2005;25(1):64–8.
- 112.** Vališ M, Taláb R, Masopust J. Únava u roztroušené sklerózy mozkomíšní a možnosti jejího ovlivnění. *Neurol Prax* 2005;1(1):40–1.
- 113.** Zellini F, Niepel G, Tench CR, et al. Hypothalamic involvement assessed by T1 relaxation time in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Mult Scler* 2009;15(12):1442–9. doi: 10.1177/1352458509350306.
- 114.** Krupp LB, LaRocca NG, Muir-Nash J, et al. The fatigue severity scale. Application to patients with multiple sclerosis and systemic lupus erythematosus. *Arch Neurol* 1989;46(10):1121–3.
- 115.** Kos D, Kerckhofs E, Ketelaer P, et al. Self-report assessment of fatigue in multiple sclerosis: A critical evaluation. *Occupational Therapy in Health Care* 2004;17(3–4): 45–62.

20. Divisova S, Vlckova E, Srotova I, Kincova S, Skorna M, Dusek L, Dubovy P, Bednarik J. *Intraepidermal nerve-fibre density as a biomarker of the course of neuropathy in patients with type 2 diabetes mellitus. Diabet Med* 2016; 33(5): 650-654. doi: 10.1111/dme.12890. IF = 3,054. Počet citací v SCI: 4.

Tato originální práce je zaměřena na možnost využití hodnocení intraepidermální hustoty tenkých nervových vláken stanovené z kožní biopsie jako biomarkeru rozvoje a klinického průběhu polyneuropatie u pacientů s diabetem mellitem 2. typu. Podstatou projektu bylo opakované vyšetření vzorků kožní biopsie u pacientů s recentním diabetem mellitem (do 3 let od stanovení diagnózy) a dobrou glykemickou kontrolou, a souboru zdravých kontrol. Časový odstup mezi oběma vyšetřeními byl v průměru 2,5 roku.

V průběhu sledování došlo u většiny pacientů i kontrol k určitému poklesu hodnot IENFD. Změny těchto hodnot nebyly ve sledovaném souboru lineární – jako optimální způsob popisu změn IENFD se proto jeví vyjádření v procentech původních hodnot IENFD, které byly zjištěny při vstupním vyšetření. Při tomto způsobu hodnocení došlo u kontrol během sledování jen k minimální změně (cca o 2 % původních hodnot IENFD/rok). Oproti tomu u pacientů s diabetem byl tento pokles několikanásobně vyšší (přibližně o 12 % původních hodnot IENFD ročně). Změna hodnot IENFD byla překvapivě podobná u diabetiků bez prokázané polyneuropatie i u pacientů, kteří měli při vstupním vyšetření subjektivní/objektivní známky periferně neurogenního postižení. Oproti očekávání nekoreloval pokles počtu IENF ani s kontrolou diabetu mellitu.

Práce tedy prokázala systematický pokles hodnot IENFD u pacientů s diabetem mellitem 2. typu a to již v časných fázích vývoje onemocnění a bez ohledu na úroveň glykemické kontroly či přítomnost polyneuropatie při vstupním vyšetření. IENFD je tedy využitelný jako biomarker dokumentující na skupinové i individuální úrovni průběh periferně neurogenních změn. Tato studie je ojedinělá zejména stanovením hodnot „fyziologického“ poklesu nervových vláken u zdravých pacientů – jedná se o první práci tohoto typu, poskytující podobnou validně stanovenou informaci. Překročení této fyziologické míry poklesu IENFD hodnot je tedy možné hodnotit jako určitou iniciační známku neuropatie. Obvyklý pokles u pacientů s diabetem pak dokumentuje očekávaný vývoj polyneuropatie u této skupiny pacientů.

Short Report: Complications

Intraepidermal nerve-fibre density as a biomarker of the course of neuropathy in patients with Type 2 diabetes mellitus

S. Divisova^{1,2}, E. Vlckova^{1,2}, I. Srotova^{1,2}, S. Kincova^{1,2}, M. Skorna², L. Dusek³, P. Dubovy⁴ and J. Bednarik^{1,2}

¹Central European Institute of Technology, Applied Neuroscience, Masaryk University Brno, ²Department of Neurology, University Hospital Brno, ³Institute of Biostatistics and Analyses, Masaryk University Brno and ⁴Central European Institute of Technology, Cellular and Molecular Neurobiology, Masaryk University Brno, Czech Republic

Accepted 14 August 2015

Abstract

Aims This paper aims to investigate whether intraepidermal nerve-fibre density (IENFD) may be used as a marker of the course of neuropathy in patients with Type 2 diabetes mellitus.

Methods Skin biopsies from the distal leg were serially evaluated in a group of 30 patients with Type 2 diabetes mellitus (median age 60 years, 17 men) with a short duration of diabetes (< 3 years) and good glucose control, and in 23 age- and sex-matched controls. The time intervals between biopsies were > 2 years (median 33.8 months). Eighteen patients with Type 2 diabetes mellitus had symptoms or signs of distal symmetrical diabetic polyneuropathy, 12 had no neuropathy.

Results At first skin biopsy, IENFD was normal in all controls and in patients without neuropathy (mean 9.5 and 7.9 fibres/mm, respectively) compared with abnormal IENFD in 77.8% in patients with polyneuropathy (mean 3.4 fibres/mm). The annual rate of intraepidermal nerve-fibre (IENF) loss expressed as a percentage of the first IENFD value in patients with diabetic polyneuropathy was significantly higher [mean (SE), 11.95 (3.82)%] compared with controls [1.92 (1.81)%, $P < 0.001$] and similar to patients without polyneuropathy [12.16 (4.38)%]. The rate of IENF loss did not correlate with degree of glucose control.

Conclusions The annual rate of IENF loss in patients with Type 2 diabetes mellitus was several times higher than that of healthy participants, irrespective of the presence of signs or symptoms of diabetic polyneuropathy at initial evaluation. The change in IENFD is not linear and should be expressed as a proportion of initial IENFD to serve as a marker of the course of diabetic neuropathy.

Diabet. Med. 33, 650–654 (2016)

Introduction

Intraepidermal nerve-fibre density (IENFD) is a reliable marker of small-fibre neuropathy and has recently been incorporated into the criteria for diabetic polyneuropathy [1,2]. Serial IENFD evaluation after 1 year has been used to follow the effects of lifestyle interventions in people with impaired glucose metabolism [3]. In a recent study of a group of patients with diabetic polyneuropathy investigated at 6-month intervals, IENFD was found to be a useful marker of disease progression [4]. The annual rate of mean

intraepidermal nerve-fibre (IENF) loss in Narayanaswamy *et al.* [4] was 3.76 fibres/mm for PGP-9.5 positive fibres.

To investigate the reliability of IENFD as a marker for the progression of diabetic neuropathy, we performed a prospective evaluation of patients with Type 2 diabetes mellitus and healthy individuals without diabetes over a longer period (> 2 years).

Patients and methods

Between January 2009 and December 2010, 30 consecutive patients [17 men, median age 60 (range 31–81) years], in whom Type 2 diabetes mellitus diagnosis according to World Health Organization criteria [5] had been established within

Correspondence to: Josef Bednarik. E-mail: jbednar@fnbrno.cz

What's new?

- Intraepidermal nerve-fibre loss in patients with Type 2 diabetes mellitus is not linear and should be expressed as a proportion of initial intraepidermal nerve-fibre density.
- Annual intraepidermal nerve-fibre loss as a marker of the progression of small-fibre neuropathy in patients with Type 2 diabetes mellitus is several times higher compared with age-related intraepidermal nerve-fibre loss in age- and sex-matched people without diabetes.
- Change in intraepidermal nerve-fibre density in patients with Type 2 diabetes mellitus of short duration and good glucose control is not dependent on the presence of neuropathy and degree of glucose control.

the previous 3 years, from whom other conditions or diseases as common alternative causes of neuropathy had been excluded by comprehensive evaluation, and who had agreed to undergo repeated skin biopsy, were included into the study.

Eighteen patients [12 men; median age 58 (39–81) years] met the minimum criteria for possible chronic diabetic symmetrical sensorimotor polyneuropathy [1], and 12 patients with Type 2 diabetes mellitus did not meet these criteria [5 men; median age 60 (range 41–70) years] (Table 1). Criteria for definite diabetic polyneuropathy were met by 10 patients with Type 2 diabetes mellitus (33.3%). Among polyneuropathy patients, nine met the criteria for painful diabetic polyneuropathy (six men; median age 58.0 years), and nine had painless polyneuropathy (six men; median age 58.0 years).

In parallel with the patients with Type 2 diabetes mellitus, 23 age- and sex-matched healthy volunteers without diabetes mellitus or prediabetes, and/or clinical/ paraclinical signs or symptoms of polyneuropathy were recruited and a second skin biopsy evaluation taken from them [14 men; median age 57 (34–79) years].

All the diabetic and control participants were comprehensively examined before recruitment into the study in order to exclude conditions or diseases known to be common causes of peripheral neuropathy, including chronic alcoholism, family history of neuropathy, presence of malignancy and other conditions predisposing to risk of neuropathy (details are given in Divisova *et al.* [6]).

Normal fasting glucose, oral glucose tolerance test and glycated haemoglobin were established in all control participants.

Management and evaluation of patients with diabetes mellitus

All patients with Type 2 diabetes mellitus were followed in the diabetology centre of our university hospital, where strict

attention is paid to maintenance of glucose levels and to weight control.

Clinical neurological examination included evaluation of tendon reflexes, muscle strength and a sensory examination using standard methodology [6].

Quantitative sensory testing with evaluation of warmth and cold detection thresholds and vibration detection threshold, needle electromyography and nerve conduction studies were performed using standard methodology and our own normal values [7,8].

Skin-punch biopsy specimens were taken from the right distal calf. Details of skin specimen removal and further processing have appeared in one of our previous publications [9] and follow standard recommendations [10]. Sections of 50- μ m thickness were immunostained with rabbit primary polyclonal antibody to human protein gene product (PGP) 9.5 (Ultraclone, Wellow, UK; 1:800) and TRITC-conjugated goat anti-rabbit secondary antibody (Chemicon International Inc., Temecula, CA, USA; 1:100). Evaluation of abnormality was based on our own age-adjusted normal limits [11].

The same procedure was followed for the second skin biopsy and IENFD was calculated by the same investigator (SD). The time intervals between skin biopsies were at least 2 years in patients with Type 2 diabetes mellitus (median 33.8, range 25.5–54.1 months) and controls (median 29.6, range 24.7–58.4 months). The second skin samples were taken in close proximity to the scar resulting from the first examination, ~ 5 cm from it.

In addition to the exclusion of diabetes, prediabetes and other risk factors for polyneuropathy, control participants were given the same clinical examination as patients with Type 2 diabetes mellitus, including detailed sensory examination, quantitative sensory testing, needle electromyography, nerve conduction studies and skin biopsy. They were free of any clinical or paraclinical symptoms and signs of polyneuropathy, and their IENFD was normal on first skin biopsy.

The study was approved by the Ethical Committee of the University Hospital, Brno.

Statistical analysis

The periods between the two consecutive biopsies and the initial IENFD value were assessed as possible covariates for the estimation of the annual rate of IENF loss, calculated as the absolute annual rate expressed in number of fibres and as a proportion of the initial IENFD value expressed as a percentage.

The statistical significance of differences among groups of patients was assessed by means of the Fisher exact test for categorical variables and standard Mann–Whitney test for continuous variables and indices. The non-parametric Spearman's correlation coefficient was used as a measure of correlation for continuous variables.

Table 1 Demographic, laboratory, clinical, electrophysiological and skin biopsy characteristics

Variable*	I. Controls (N = 23)	II. Diabetic polyneuropathy† (n = 18)	III. Type 2 diabetes mellitus without polyneuropathy (n = 12)	P (I vs. II)‡	P (I vs. III)‡	P (II vs. III)‡
Demography						
Age, years	56.8 (2.4)	58.9 (2.5)	53.9 (4.0)	0.554	0.862	0.538
Time between biopsies, days	1 152.7 (122.1)	1 121.1 (62.8)	1 109.7 (76.4)	0.121	0.266	0.899
HbA _{1c} at first exam, mmol/mol [%]	37 (1.3) [5.4 (0.2)]	51 (2.1) [6.6 (0.4)]	46 (2.8) [6.2 (0.4)]	< 0.001	< 0.001	0.233
HbA _{1c} at second exam, mmol/mol [%]		54 (3.1) [6.9 (0.5)]	53 (2.5) [6.8 (0.4)]			0.923
Sensory and electrophysiological characteristics						
Abnormal sensation	0 (0.0%)	14 (77.8%)	0 (0.0%)	< 0.001	0.056	< 0.001
Abnormal nerve conduction studies	0 (0.0%)	10 (55.5%)	0 (0.0%)	< 0.001	NR	< 0.001
Quantitative sensory testing (abnormal warmth and cold detection threshold)	0 (0.0%)	14 (77.8%)	1 (8.3%)	< 0.001	0.056	< 0.001
Quantitative sensory testing (abnormal vibration detection threshold)	0 (0.0%)	6 (33.3%)	0 (0.0%)	0.004	NR	0.031
Skin biopsy characteristics						
Intraepidermal nerve-fibre density abnormality at first exam	0 (0.0%)	14 (77.8%)	0 (0.0%)	< 0.001	NR	< 0.001
Intraepidermal nerve-fibre density at first exam	9.5 (0.7)	3.4 (0.9)	7.9 (0.9)	< 0.001	0.164	0.001
Intraepidermal nerve-fibre density abnormality at second exam	0 (0.0%)	15 (83.3%)	4 (33.3%)	< 0.001	0.009	< 0.001
Intraepidermal nerve-fibre density at second exam	8.9 (0.7)	2.1 (0.5)	5.3 (1.1)	< 0.001	0.009	0.012
Estimated annual rate of Intraepidermal nerve-fibre density change as number of fibres/mm	-0.29 (0.19)	-0.48 (0.20)	-0.92 (0.28)	0.854	0.071	0.175
Estimated annual rate of intraepidermal nerve-fibre density change as percentage of first value	-1.92 (1.81)	-11.95 (3.82)	-12.16 (4.38)	0.037	0.022	0.790

Significant differences are expressed in bold. NR, not relevant.

*Absolute and relative frequencies for categorical variables; mean with (SEM) for continuous variables.

†Criteria for possible chronic symptomatic diabetic symmetrical sensorimotor polyneuropathy follow Tesfaye et al. (1).

‡Fisher's exact test for categorical variables and Mann-Whitney U-test for continuous variables.

Results

Characteristics of subgroups

No significant differences emerged between controls and subgroups of patients in terms of age, gender and time between biopsies (Table 1).

Abnormal sensation on clinical examination, needle electromyography, and thermal and vibratory quantitative sensory testing were found at significant levels more frequently in the polyneuropathy subgroup compared with both controls and patients without polyneuropathy (Table 1).

There was no significant difference in glucose control, expressed as glycated haemoglobin, between subgroups with and without polyneuropathy, or between people with painful and painless polyneuropathy.

Skin biopsy

At the first skin biopsy, IENFD from the distal leg was normal in all controls and patients without polyneuropathy, whereas abnormally low IENFD values were found in 77.8% of the patients with diabetic polyneuropathy. At second skin biopsy, the proportion of IENFD abnormalities increased to 83.3% in the polyneuropathy subgroup, and to 33.3% in the subgroup without polyneuropathy (Table 1).

The mean estimated annual rate of IENF loss was 0.29 fibres/mm in controls, 0.48 fibres/mm fibres in the polyneuropathy subgroup, and 0.92 fibres/mm in the subgroup without polyneuropathy. The differences in IENFD fall expressed as fibres per year were not significant between subgroups (Table 1).

Because the absolute annual rate of IENF loss correlated significantly with the initial IENFD values at first skin biopsy, we chose to calculate IENF loss as a proportion of the first IENFD value, expressed as a percentage. This relative IENF loss was significantly lower in controls (1.92%/year) compared with both patients with polyneuropathy (11.95%/year) and those without polyneuropathy (12.16%/year) ($P < 0.05$); there was no difference between patients with and without polyneuropathy (Table 1), or between subgroups with painful and painless polyneuropathy (Table S1). The annual rate of IENF loss in patients with Type 2 diabetes mellitus does not correlate with degree of glucose control, serum cholesterol and triglyceride levels, BMI or the presence of arterial hypertension (Table S2).

Discussion

This study centred on mid-term changes in the IENFD of PGP 9.5-immunoreactive fibres from the distal leg in patients with Type 2 diabetes mellitus in the early stages of the disease and in age-matched healthy volunteers without diabetes. Patients with Type 2 diabetes mellitus in the early

phase of the disease exhibited a rate of decrease in IENFD several times higher than that found in healthy individuals without diabetes, irrespective of symptoms and signs of diabetic polyneuropathy at the beginning of the follow-up period. A decrease in IENFD before the development of diabetic polyneuropathy accords with the findings of Polydefkis *et al.* [12] who reported impaired peripheral nerve-fibre repair in people with diabetes without signs of neuropathy, indicating that abnormalities in peripheral nerve function are present early in diabetes, before signs or symptoms develop.

Age-dependent loss of IENF in people without diabetes is well documented. Age is probably the most important physiological variable influencing IENFD values, rather than gender, height, weight or BMI. In our control group, we found an IENF loss of 0.29 fibres/mm/year, or 1.92% of the initial IENFD, which is somewhat higher than, but comparable with, values that could be derived from a normative reference study [13], with an estimated annual rate of between 0.11 and 0.14 fibres/mm. Similarly, Azmi *et al.* [14] reported an annual loss rate of 0.1 fibres/mm (1.03%).

Narayanaswamy *et al.* [4], investigating a group of 29 patients with diabetic neuropathy, calculated the annual rate of mean IENF loss as 3.76 fibres/mm for PGP-9.5 immunoreactive fibres, a figure much higher than our results. Their patients with diabetes had longer duration of diabetes (mean 18.7 years) and worse glucose control, which favours the assumption that these factors accelerate the loss of small fibres. However, we were unable to confirm the influence of glucose control upon IENF loss, something that might be due to short duration of diabetes and good glucose control in our participants. It may also derive from the limited number of Type 2 diabetes mellitus people included in the study.

IENF loss is probably not linear and the rate of progression in diabetes mellitus patients should be expressed as a relative rate. Further studies are required to disclose all the factors contributing to severity and time course of IENFD decline (duration of diabetes, severity of diabetic polyneuropathy, degree of glycaemic control). Correlation with corneal confocal microscopy, a newly validated, non-invasive measure of small-fibre loss in diabetes mellitus, may well prove helpful [14,15].

Funding sources

This study was supported by CEITEC – the Central European Institute of Technology (reference: CZ.1.05/1.1.00/02.0068), a European Regional Development Fund project, and by the Ministry of Health of the Czech Republic project for conceptual development in research organizations, ref. 65269705 (University Hospital, Brno, Czech Republic).

Competing interests

None declared.

Acknowledgements

The authors extend their thanks to Dana Kutějová, Jitka Mikulášková and Hana Rychtecká for their support in processing skin biopsy samples. Tony Long (Svinošice) helped with the English translation.

References

- 1 Tesfaye S, Boulton AJM, Dyck PJ, Freeman R, Horowitz M, Kempner P *et al.* Toronto Diabetic Neuropathy Expert Group. Diabetic Neuropathies: update on definitions, diagnostic criteria, estimation of severity, and treatments. *Diabetes Care* 2010; **33**: 2285–2293.
- 2 Malik RA, Veves A, Tesfaye S, Smith G, Cameron N, Zochodne D *et al.* on behalf of The Toronto Consensus Panel on Diabetic Neuropathy. Small fibre neuropathy: role in the diagnosis of diabetic sensorimotor polyneuropathy. *Diabetes Metab Res Rev* 2011; **27**: 678–684.
- 3 Smith AG, Russell J, Feldman EL, Goldstein J, Peltier A, Smith S *et al.* Lifestyle intervention for pre-diabetic neuropathy. *Diabetes Care* 2006; **29**: 1294–1299.
- 4 Narayanaswamy H, Facer P, Misra VP, Timmers M, Byttebier G, Meert T *et al.* A longitudinal study of sensory biomarkers of progression in patients with diabetic peripheral neuropathy using skin biopsies. *J Clin Neurosci* 2012; **19**: 1490–1496.
- 5 World Health Organisation. *Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications*. WHO/NCD/NDS/99.2. Geneva: WHO, 1999.
- 6 Divisova S, Vlckova E, Hnojckikova M, Skorna M, Nemeč M, Dubovy P *et al.* Prediabetes/early diabetes-associated neuropathy predominantly involves sensory small fibres. *J Periph Nerv Syst* 2012; **17**: 341–350.
- 7 Bursova S, Vlckova E, Hnojckikova M, Nemeč M, Bednarik J. Laboratory-Assisted Quantitative Sensory Testing – Normative Data. *Cesk Slov Neurol N* 2012; **75/108**: 444–453.
- 8 Kadanka Z, Bednarik J, Vohanka S. [*Practical Electromyography*]. Brno: IDPVZ, 1994.
- 9 Vlckova-Moravcova E, Bednarik J, Dusek L, Toyka KV, Sommer C. Diagnostic validity of epidermal nerve fibre densities in painful sensory neuropathies. *Muscle Nerve* 2008; **37**: 50–60.
- 10 Lauria G, Hsieh ST, Johansson O, Kennedy WR, Leger JM, Mellgren SI *et al.* European Federation of Neurological Societies/Peripheral Nerve Society guideline on the use of skin biopsy in the diagnosis of small fibre neuropathy. Report of a joint task force of the European Federation of Neurological Societies and the Peripheral Nerve Society. *Eur J Neurol* 2010; **17**: 903–912.
- 11 Bursova S, Vlckova E, Hnojckikova M, Nemeč M, Dubovy P, Bednarik J. [Evaluation of intraepidermal nerve fiber density in skin biopsy – normative data]. *Cesk Slov Neurol N* 2012; **75/108**: 455–459.
- 12 Polydefkis M, Hauer P, Sheth S, Sirdofsky M, Griffin JW, McArthur JC. The time course of epidermal nerve fibre regeneration: studies in normal controls and in people with diabetes, with and without neuropathy. *Brain* 2004; **127**: 1606–1615.
- 13 Lauria G, Bakkers M, Schmitz Ch, Lombardi R, Penza P, Devigili G *et al.* Intraepidermal nerve fiber density at the distal leg: a worldwide normative reference study. *J Periph Nerv Syst* 2010; **15**: 202–207.
- 14 Azmi S, Ferdousi M, Petropoulos IN, Ponirakis G, Fadavi H, Tavakoli M *et al.* Corneal confocal microscopy shows an improvement in small-fiber neuropathy in subjects with type 1 diabetes on continuous subcutaneous insulin infusion compared with multiple daily injection. *Diabetes Care* 2015; **38**: e3–e4.
- 15 Pritchard N, Edwards K, Russell AW, Perkins BA, Malik RA, Efron N. Corneal confocal microscopy predicts 4-year incident peripheral neuropathy in type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2015; **38**: 671–675.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

- Table S1.** Demography and skin biopsy characteristics in participants with painful and painless diabetic neuropathy.
Table S2. Relationship between time-related change in IENFD and patient characteristic

21. Kincová S, Vlčková E, Šrotová I, Raputová J, Bednařík J. Dynamické metody kvantitativního testování senzitivity (QST). *Cesk Slov Neurol N* 2016; 79/ 112(1): 68-76. IF = 0,368.

Tato originální práce je v českém jazykovém prostředí první publikací zaměřenou na aktuální trend ve využití metod kvantitativního testování senzitivity (QST), tedy na metody tzv. dynamického kvantitativního testování senzitivity (dQST), které představují relativně novou a vysoce perspektivní nastavbovou aplikaci QST. Při tomto způsobu vyšetření je bolest percipující systém stimulován způsobem, který odhalí určité fyziologické mechanismy fungující v percepci bolesti. Metody dynamického QST tak umožňují objektivizovat funkci tzv. centrálních modulačních mechanismů algické percepce, jejichž individuální výkonnost odráží „pronociceptivní“ či „antinociceptivní“ nastavení daného jedince a pravděpodobně hraje roli v rozvoji akutní bolesti i chronických bolestivých stavů a má vliv i na efekt analgetické terapie. Pomocí dQST metod lze tak např. predikovat budoucí rozvoj pooperační bolesti a to při jejich provedení v době, kdy pacient dosud bolesti nemá.

K metodám dQST patří především testování mechanismů centrální integrace, jako je např. časová sumace (temporal summation, TS), a testy descendentních kontrolních mechanismů, zejména podmíněné modulace bolesti (conditioned pain modulation, CPM).

V rámci této práce byly oba zmíněné typy dQST metod (tedy TS a CPM) vyšetřeny pomocí termoalgických podnětů u většího souboru zdravých dobrovolníků. Hodnocen byl mj. vliv fyziologických proměnných na jejich funkci.

V rámci studie byla uspokojivá funkce obou testovaných mechanismů prokázána u naprosté většiny testovaných dobrovolníků. U žen testovaných v ovulační fázi menstruačního cyklu jsme prokázali signifikantně vyšší efektivitu CPM mechanismu ve srovnání s muži. Funkce TS se mezi oběma pohlavími významně nelišila. Významný vliv věku na efektivitu CPM ani TS mechanismu nebyl ve sledovaném souboru prokázán.

Provedená studie tedy ověřila použitelnost zvolených algoritmů dynamického testování senzitivity a prokázala antinociceptivní nastavení žen v ovulační fázi menstruačního cyklu ve srovnání s muži.

Dynamické metody kvantitativního testování senzitivity

Dynamic Methods of Quantitative Sensory Testing

Souhrn

Úvod: Dynamické metody kvantitativního testování senzitivity (Quantitative Sensory Testing; QST) jsou relativně novou nadstavbovou aplikací QST umožňující objektivizovat funkci centrálních modulačních mechanismů algické percepce, jejichž individuální nastavení může přispívat k rozvoji chronických bolestivých stavů. Testování těchto mechanismů umožňuje např. predikci rozvoje pooperační bolesti. K nejčastěji hodnoceným dynamickým QST metodám patří tzv. podmíněná modulace bolesti (Conditioned Pain Modulation; CPM) a časová sumace percepce bolestivých podnětů (Temporal Summation; TS). **Soubor a metodika:** Vyšetření dQST (dynamic methods of Quantitative Sensory Testing) metod s využitím termoalgických podnětů a modulace bolestivým chladem bylo provedeno u 77 zdravých dobrovolníků (47 žen testovaných v ovulační fázi menstruačního cyklu, 30 mužů, věk 19–73 let). Hodnocen byl také vliv věku a pohlaví na výsledky obou dQST testů. **Výsledky:** Uspokojivá funkce podmíněné modulace bolesti byla prokázána u 84 % testovaných dobrovolníků. Časová sumace bolestivých podnětů byla zachycena u 92, resp. 98 % jedinců v závislosti na použité teplotě podnětů. Nefunkčnost mechanismů u zbylé části souboru byla ve většině případů podmíněna nesprávně nastavenými technickými parametry testu. U žen testovaných v ovulační fázi menstruačního cyklu jsme prokázali signifikantně vyšší efektivitu CPM mechanismu ve srovnání s muži. Funkce TS se mezi oběma pohlavími významně nelišila. Významný vliv věku na efektivitu CPM ani TS mechanismu nebyl ve sledovaném souboru prokázán. **Závěr:** Provedená studie ověřila použitelnost zvolených algoritmů dynamického testování senzitivity a prokázala antinociceptivní nastavení žen v ovulační fázi menstruačního cyklu ve srovnání s muži, zatímco významný vliv věku na funkci centrálních modulačních mechanismů algické percepce nebyl zachycen.

Abstract

Background: So called "dynamic quantitative sensory methods" (dQST) represent relatively new QST application which enables to objectify certain mechanisms of pain processing, e.g. central integration or descending control. Their dysfunction may contribute to the development of chronic painful conditions. dQST methods proved the potential to predict the development of chronic postoperative pain. Conditioned pain modulation (CPM) and temporal summation (TS) are the most commonly used dQST tests. **Patients and methods:** The CPM and TS testing was performed in a group of 77 healthy volunteers (47 women tested in the ovulatory phase of the menstrual cycle, 30 men, age range 19–73) using thermal pain stimuli. Efficiency of CPM and TS mechanism including age and gender influence was evaluated. **Results:** Efficient CPM was found in 84% of healthy volunteers. In remaining 16%, the inefficiency was mainly due to low intensity of testing or modulatory stimuli. Based on the temperature used, efficient TS mechanism was found in 92% or 98% of healthy individuals. Women in the ovulatory phase of the menstrual cycle showed significantly more efficient CPM comparing to men. No sex differences of TS testing were found. Age had no significant effect on the CPM or TS mechanism in our group of healthy volunteers. **Conclusions:** Our study has verified the applicability of CPM and TS algorithms used. Women in ovulatory phase of the menstrual cycle show increased anti-nociceptive setting comparing to men. No significant effect of age on central modulation of pain perception has been found in pain-free healthy individuals.

Práce byla podpořena grantem IGA MZ ČR NT 13523-4.

Autoři práce děkují paní Janě Novohradské za významnou technickou pomoc a asistenci při testování a organizaci studie a všem testovaným dobrovolníkům za účast v projektu.

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.

**S. Kincová^{1,2}, E. Vlčková^{1,2},
I. Šrotová^{1,2}, J. Raputová¹,
J. Bednařík^{1,2}**

¹ Neurologická klinika LF MU a FN Brno

² CEITEC – Středoevropský technologický institut, MU, Brno



MUDr. Eva Vlčková, Ph.D.
Neurologická klinika
LF MU a FN Brno
Jihlavská 20
625 00 Brno
e-mail: evlckova@email.cz

Přijato k recenzi: 1. 10. 2015

Přijato do tisku: 17. 12. 2015

Klíčová slova

percepce bolesti – nociceptivní bolest – neuropatická bolest – časová sumace – podmíněná modulace bolesti – měření bolesti – vliv pohlaví – vliv věku

Key words

pain perception – nociceptive pain – neuropathic pain – temporal summation – conditioned pain modulation – pain measurement – sex factors – age factors

Úvod

Kvantitativní testování senzitivity (QST) je souhrnný název pro skupinu metod umožňujících detailní kvantifikované vyšetření percepce jednotlivých senzitivních modalit, vč. bolesti [1–3]. Tyto metody jsou v současnosti široce využívány především v diagnostice neuropatické bolesti a podrobné klinické charakteristice (tzv. fenotypizaci) pacientů pro potřeby klinických studií a dále v diagnostice neuropatie tenkých vláken [1–3].

Na běžné (tzv. statické) QST pak navazuje skupina relativně nově využívaných nastavení metod, označovaných termínem „dynamické kvantitativní testování senzitivity“ (dQST) [4–7].

Během vyšetřování těmito metodami je bolest percipující systém stimulován takovým způsobem, který odhalí určité fyziologické mechanismy fungující v percepci bolesti [6].

Metody dQST tak umožňují objektivizovat funkci centrálních modulačních mechanismů algické percepce, jejichž individuální nastavení hraje roli v rozvoji akutní bolesti i chronických bolestivých stavů, a to především tzv. idiopatických (např. fibromyalgie, syndrom dráždivého tračnicku, tenzní bolest hlavy, temporomandibulární bolest) a částečně i některých neuropatických bolestí (postherpetické neuralgie, centrální poiktové bolesti, bolesti při polyneuropatii indukované chemoterapií) [5]. Funkce těchto mechanismů umožňuje také predikovat rozvoj chronické bolesti, např. pooperační, a to při testování v předoperačním období, kdy pacient ještě žádné bolesti nemá [8]. Podobně lze s jejich využitím předvídat analgetický efekt opioidů [7]. Funkce centrálních modulačních mechanismů algické percepce tak odráží „pronociceptivní“ či „antinociceptivní“ nastavení daného jedince [5].

K metodám dQST patří zejména testování mechanismů centrální integrace, jako je časová i prostorová sumace (Temporal or Spatial Summation; TS, SS), a testy descendních kontrolních mechanismů, zejména podmíněné modulace bolesti (Conditioned Pain Modulation; CPM) označované i jako Diffuse Noxious Inhibitory Control (DNIC), Endogenous Analgesia (EA) či Heterotopic Noxious Conditioning Stimulation (HNCS) [8].

Principem fenoménu časové sumace percepce bolestivých podnětů (Temporal Summation; TS, také označované jako

tzv. wind-up fenomén; WUR) je nárůst intenzity bolesti při opakované (rychle po sobě následující) stimulaci podnětem identické modalit a intenzity. Tento fenomén zřejmě odráží především centrální integraci percepce algických podnětů v oblasti zadních rohů míšních. Abnormitou reflektující zvýšené pronociceptivní nastavení vyšetřovaného jedince je v tomto případě akcentace mechanismu s výraznějším nárůstem algického vnímání opakovaných podnětů oproti běžným nálezům. Podstatou podmíněné modulace bolesti (CPM) je skutečnost, že bolestivý podnět aplikovaný na určitou část těla („podmiňující“ – conditioned stimulus) vyvolá difuzní inhibici algické percepce jiné bolestivé stimulace (testovacích podnětů) na téže i jiné části těla [5–7]. Pokud tedy během podmiňující modulace nedojde ke snížení bolestivosti testovacích podnětů, jedná se o pronociceptivní abnormitu CPM testu. Tento mechanismus odráží descendní inhibiční modulační složku percepce bolesti a zejména funkci spino-medullospinalních mechanismů.

Funkce obou zmíněných mechanismů závisí na řadě fyziologických proměnných vč. pohlaví a věku testovaného subjektu, u žen je zvažován i vliv menstruačního cyklu (MC) [6,9], což však většina publikovaných prací nereflexuje a sledované ženy nevyšetřuje v identické fázi MC. Jednotlivé publikované práce využívající vyšetření těchto mechanismů u pacientů s různými typy bolestivých stavů se zřetelně liší také způsobem hodnocení funkce jednotlivých mechanismů (a často i způsobem jejich testování).

Cílem práce bylo proto vedle zavedení vyšetřování těchto metod do klinické praxe též ověřit vlivu fyziologických proměnných na jejich funkci.

Soubor

Do studie bylo zařazeno 77 zdravých dobrovolníků (47 žen, 30 mužů, věk 19–73 let) (tab. 1). Před zařazením do studie podstoupili všichni tito jedinci detailní anamnestické a klinické neurologické vyšetření. Vstupním kritériem byla dobrá spolupráce vyšetřovaného, ochota k zařazení do studie, absence kognitivního deficitu a normální klinický neurologický nálezn. Vylučujícím kritériem bylo známé onemocnění periferního či centrálního nervového systému, přítomnost rizikových faktorů periferních neuropatií (diabetes mellitus, chemoterapie atd.) a dále chronická bolest jiného původu. Ženy byly testovány vždy v ovulační fázi MC (v zá-

vislosti na délce cyklu obvykle mezi jeho 12. a 14. dnem). Čtyřicet osm hodin před testováním neužíli zařazení dobrovolníci analgetika ani jiné léky ovlivňující centrální nervový systém.

Všichni zařazení jedinci byli plně informováni o účelu vyšetření a podepsali informovaný souhlas.

Metodika

Testování obou hodnocených metod dynamického kvantitativního testování senzitivity bylo provedeno pomocí termoalgických podnětů s využitím softwaru Neurosensory analyser – model TSA-II (Medoc TSA 2001; Medoc Ltd., RamatYishai, Israel) a termosondy 30 × 30 mm.

Při vyšetření podmíněné modulace bolesti (CPM) byla termosonda umístěna na thenaru pravé horní končetiny. V úvodu byl proveden iniciální test, při kterém bylo aplikováno pět testovacích podnětů (o teplotě 46, 47, 48, 49 a 50 °C). U každého podnětu vyšetřovaný jedinec zhodnotil intenzitu vyvolané bolesti na numerické škále bolesti (Numeric Rating Scale; NRS) o rozsahu 0–100, kde „0“ představuje „žádnou vnímanou bolest“ a „100“ znamená „nejhorší představitelnou intenzitu bolestivého podnětu“. Tímto způsobem byla vybrána teplota, která u daného jedince vyvolala bolest o intenzitě co nejbližší hodnotě 60 na NRS škále. Ta byla v následném testu využívána jako teplota testovací [10].

V průběhu testu bylo aplikováno celkem pět po sobě jdoucích testovacích podnětů. Bezprostředně po skončení každého z těchto testovacích podnětů byl vyšetřovaný jedinec vyzván, aby zhodnotil intenzitu bolesti vyvolané tímto podnětem na NRS škále 0–100. Trvání každého z testovacích podnětů bylo 3 s, rychlost nárůstu teploty 10 °C/s a interstimulační interval 12 s. Podmiňující (conditioning) modulací (viz níže) bylo ponoření levé ruky do nádrže s chladnou vodou (8 °C) na 30 s.

Protokol testování (obr. 1): iniciálně byl aplikován první testovací tepelný podnět, vyšetřovaný jedinec ohodnotil intenzitu jím vyvolané bolesti a bezprostředně poté byl vyzván k ponoření levé (netestované) ruky až po zápěstí do nádrže s chladnou vodou k zajištění podmiňující (conditioning) modulace. Během 30 s této modulace byly termosondou aplikovány další dva testovací teplé podněty (2. a 3.), opět s bezprostředním ohodnocením bolestivosti každého z nich vyšetřeným jedincem. Potom byl vyšetřovaný dobrovolník vyzván, aby ruku z nádrže s chladnou vodou vyjmul, a byly apli-

Tab. 1. Demografické charakteristiky souboru a základní výsledky jednotlivých hodnocených parametrů dynamických QST testů (CPM a TS 47 a 49 °C), a to souhrnně v celém souboru zdravých kontrol a dále odděleně u mužů a žen a/nebo ve třech oddělených věkových skupinách, vč. srovnání nálezů mezi těmito podsoubory.

Hodnoty jsou uvedeny jako medián (5. percentil; 95. percentil) v případě kontinuálních proměnných a/nebo jako absolutní (relativní) četnosti v případě proměnných kategoriálních.

Parametr	Celý soubor (n = 77)	Muži (n = 30)	Ženy (n = 47)	P	Do 40 let (n = 47)	41–60 let (n = 24)	Nad 60 let (n = 6)	p 1
věk	30 (23; 62)	37 (24; 66)	29 (22; 52)	0,29	26 (22; 39)	49 (41; 53)	63 (60; 73)	< 0,001
CPM								
teplota podnětu	48 (46; 50)	48 (46; 50)	48 (46; 50)	0,60	48 (46; 50)	49 (46; 50)	48 (46; 48)	0,26
NRS 1	60 (30; 80)	60 (40; 80)	55 (20; 70)	0,04	60 (40; 70)	50 (20; 80)	63 (40; 70)	0,25
NRS modulace	55 (10; 90)	55 (20; 86)	55 (10; 90)	0,34	60 (20; 90)	55 (0; 95)	45 (30; 86)	0,98
funkční CPM efekt	65 (84 %)	25 (83 %)	40 (85 %)	0,83	39 (83 %)	20 (83 %)	6 (100 %)	0,55
CPM efekt (poměr)	0,7 (0,3; 1,1)	0,8 (0,5; 1,1)	0,7 (0,3; 1,0)	0,01	0,7 (0,3; 1,0)	0,8 (0,3; 1,1)	0,6 (0,5; 0,9)	0,80
TS 47 °C								
NRS 1	50 (5; 80)	50 (7; 80)	45 (5; 90)	0,53	50 (20; 80)	50 (5; 80)	50 (30; 70)	0,75
předčasně ukončen*	10 (14 %)	3 (11 %)	7 (15 %)	0,62	6 (13 %)	3 (14 %)	1 (20 %)	0,90
funkční TS efekt†	67 (92 %)	24 (89 %)	43 (94 %)	0,49	44 (94 %)	18 (86 %)	5 (100 %)	0,43
TS efekt (poměr)#	1,3 (1,0; 2,7)	1,3 (1,0; 2,3)	1,3 (1,0; 3,5)	0,33	1,3 (1,0; 2,8)	1,4 (1,0; 2,5)	1,4 (1,1; 1,7)	0,85
TS efekt > 2#	11 (17 %)	2 (8 %)	9 (23 %)	0,13	7 (17 %)	4 (22 %)	0 (0 %)	0,57
TS efekt > 2,5#	5 (8 %)	1 (4 %)	4 (10 %)	0,39	4 (10 %)	1 (6 %)	0 (0 %)	0,71
TS 49 °C								
NRS 1	50 (10; 99)	55 (20; 80)	50 (10; 100)	0,31	50 (15; 99)	50 (8; 100)	50 (50; 80)	0,30
předčasně ukončen*	11 (18 %)	2 (8 %)	9 (24 %)	0,12	7 (17 %)	3 (18 %)	1 (25 %)	0,88
funkční TS efekt†	58 (98 %)	24 (100 %)	34 (97 %)	0,40	39 (100 %)	15 (94 %)	4 (100 %)	0,25
TS efekt (poměr)#	1,4 (1,1; 2,5)	1,3 (1,1; 2,3)	1,4 (1,1; 3,0)	0,63	1,3 (1,1; 2,5)	1,5 (1,0; 3,0)	1,2 (1,1; 1,4)	0,34
TS efekt > 2#	8 (16 %)	2 (9 %)	6 (21 %)	0,59	4 (12 %)	4 (29 %)	0 (0 %)	0,26
TS efekt > 2,5#	5 (10 %)	1 (5 %)	4 (14 %)	0,51	2 (6 %)	3 (21 %)	0 (0 %)	0,22

CPM – podmíněná modulace bolesti (Conditioned Pain Modulation) vyjádřená formou poměru mezi NRS mezi modulovaným podnětem s nižší NRS (druhý nebo třetí) a podnětem prvním; TS – časová sumace (Temporal Summation) vyjádřená formou poměru hodnot NRS podnětu s maximální hodnotou NRS dosaženou během testu a prvním testovaným podnětem; NRS – numerická škála bolesti (Numeric Rating Scale); QST – kvantitativní testování senzitivity (Quantitative Sensory Testing); p – statistická významnost při srovnání výsledků ve skupině mužů a žen (Mann-Whitneyho test pro data kontinuální, chí2 test pro data kategoriální); p 1 – statistická významnost při srovnání věkových skupin do 40 let, 40–59 a 60+ let (Kruskalův-Wallisův ANOVA pro data kontinuální, chí2 test pro data kategoriální).

*Počet pacientů, u nichž bylo nutné test předčasně ukončit z důvodu vysoké bolestivosti aplikovaných podnětů (NRS 100).

† TS efekt byl hodnocen jako funkční v případě, že během testu došlo k jakémukoli vzestupu vnímané bolestivosti aplikovaných podnětů oproti prvnímu podnětu (o 1 a více bodů NRS škály), bez ohledu na to, zda pacient test dokončil či nikoli. Do hodnocení byli zařazeni všichni pacienti, u kterých byly aplikovány dva a více podnětů (tedy bez ohledu na to, zda byl test předčasně ukončen).

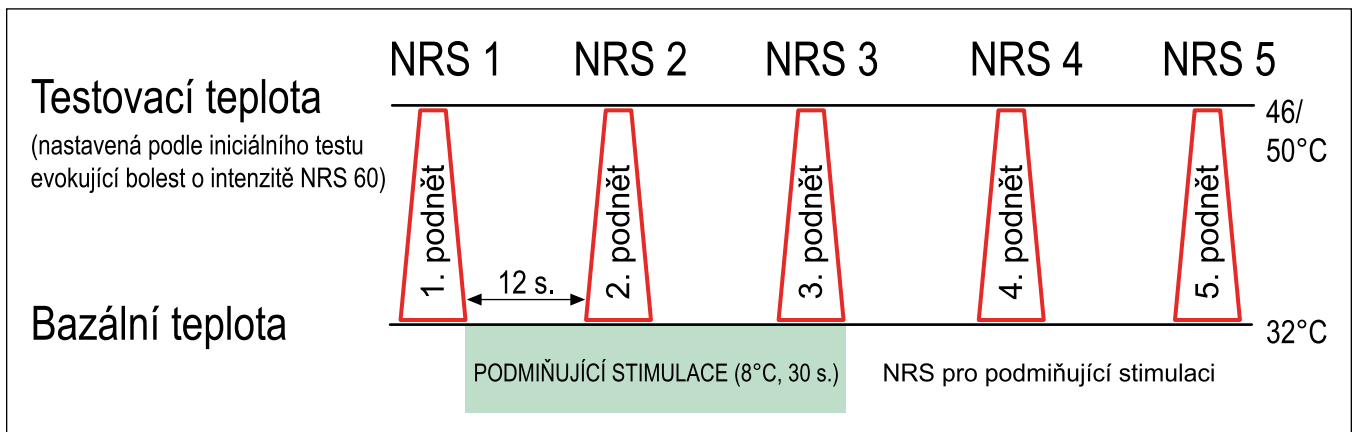
Parametry TS efektu hodnoceny pouze v případě, že byl test dokončen.

kovány poslední dva testovací podněty (4. a 5.). Na konci testování byl vyšetřovaný požádán, aby ohodnotil pomocí NRS škály také intenzitu bolesti vyvolanou podmiňující (conditioning) stimulací.

Při testu časové sumace percepce bolestivých podnětů (TS) byla termosonda umístěna na volární straně předloktí pravé horní

končetiny. V úvodu testování byla teplota termosondy nastavena na 40 °C (bazální teplota). Z této výchozí teploty docházelo opakovaně k rychlému nárůstu teploty na cílových 47 °C (nebo v následném testu event. na 49 °C). Rychlost nárůstu/poklesu teploty byla 10 °C/s s interstimulačním intervalem v trvání 2 s. Aplikováno bylo 10 iden-

tických termoalgických podnětů o teplotě 47 °C. Testování bylo ukončeno v případě, že bylo pro vyšetřovaného jedince silně bolestivé (dosažení hodnoty 100 na NRS škále). Pokud dobrovolník test uspokojivě toleroval, byl následně identický mechanismus testován s teplotou 49 °C. Během testu vyšetřovaný slovně hodnotil úroveň vnímané inten-



Obr. 1. Schéma testu podmíněné modulace bolesti (CPM).

V průběhu testu je aplikováno pět po sobě jdoucích testovacích podnětů (červené lichoběžníky odpovídající 1.–5. podnětu). Trvání každého podnětu bylo 3 s, rychlost nárůstu teploty 10 °C/s a interstimulační interval 12 s. Podmíněná (conditioning) modulace (modrý obdélník), bylo ponoření levé ruky do nádrže s chladnou vodou (8 °C) na 30 s.

zity bolesti vyvolané každým z aplikovaných podnětů pomocí NRS škály 0–100.

Detaily protokolu testování obou metod byly převzaty z již publikovaných studií [7] a odpovídají aktuálním doporučením pro tento typ testování [11].

Způsob vyjádření výsledků

CPM efekt byl vyjádřen jako poměr hodnot NRS mezi tím z obou modulovaných podnětů (2. nebo 3.), který byl vyšetřovaným jedincem hodnocen nižší hodnotou na NRS škále (tedy tím, u něhož je vyšší účinnost hodnoceného mechanismu), a prvním (nemodulovaným) podnětem aplikovaným během testu. Hodnoty poměru nižší než 1 odpovídají poklesu intenzity bolestivosti v průběhu podmíněné modulace, tedy očekávané funkci testovaného mechanismu.

TS efekt byl vyjádřen jako poměr hodnot NRS prvního aplikovaného podnětu a podnětu s nejvyšší hodnotou NRS dosaženou během testování. Hodnoty poměru větší než 1 představují nárůst intenzity vnímané bolestivosti během testu, který je očekávanou funkcí testovaného mechanismu.

Vlastní CPM i TS efekt je tudíž vyjádřen formou poměru jako bezrozměrný koeficient. Dané hodnocení je v souladu s aktuálními doporučeními pro metodiku dQST [11].

Funkčnost obou testovaných mechanismů byla dále vyjádřena kvalitativně (ano nebo ne) v závislosti na tom, zda během testu došlo k poklesu (v případě CPM testu) nebo vzestupu (v rámci vyšetření TS) hodnot NRS alespoň o 1 bod na použité škále o rozsahu 0–100 ve srovnání s prvním testovacím podnětem.

U testů časové sumace byl dále sledován výskyt abnormálně zvýšené funkce hodnoceného mechanismu (tedy skutečnost, zda během testu došlo k vzestupu hodnot NRS nad dvojnásobek, resp. 2,5násobek NRS hodnoty prvního podnětu), která je pronociceptivní abnormitou testu.

Výsledky všech sledovaných parametrů byly vyhodnoceny mj. s ohledem na věk a pohlaví zařazených jedinců.

Statistické zpracování

Statistické zpracování bylo provedeno pomocí software SPSS 22.0.0.1 (IBM Corporation 2014) and Statistica verze 12 (StatSoft, 2013).

Ke zviditelnění rozložení primárních hodnot jednotlivých testovaných parametrů byla použita standardní deskriptivní statistika, tj. mediány s rozsahem hodnot (definovaným 5.–95. percentilem). Srovnání hodnocených kontinuálních parametrů bylo provedeno pomocí Mannova-Whitneyova testu, při vícečetných srovnáních pak pomocí Kruskalova-Wallisova ANOVA testu (tj. neparametrického testu analogického ANOVA). Pro srovnání kategoriálních dat byl použit chí kvadrát test.

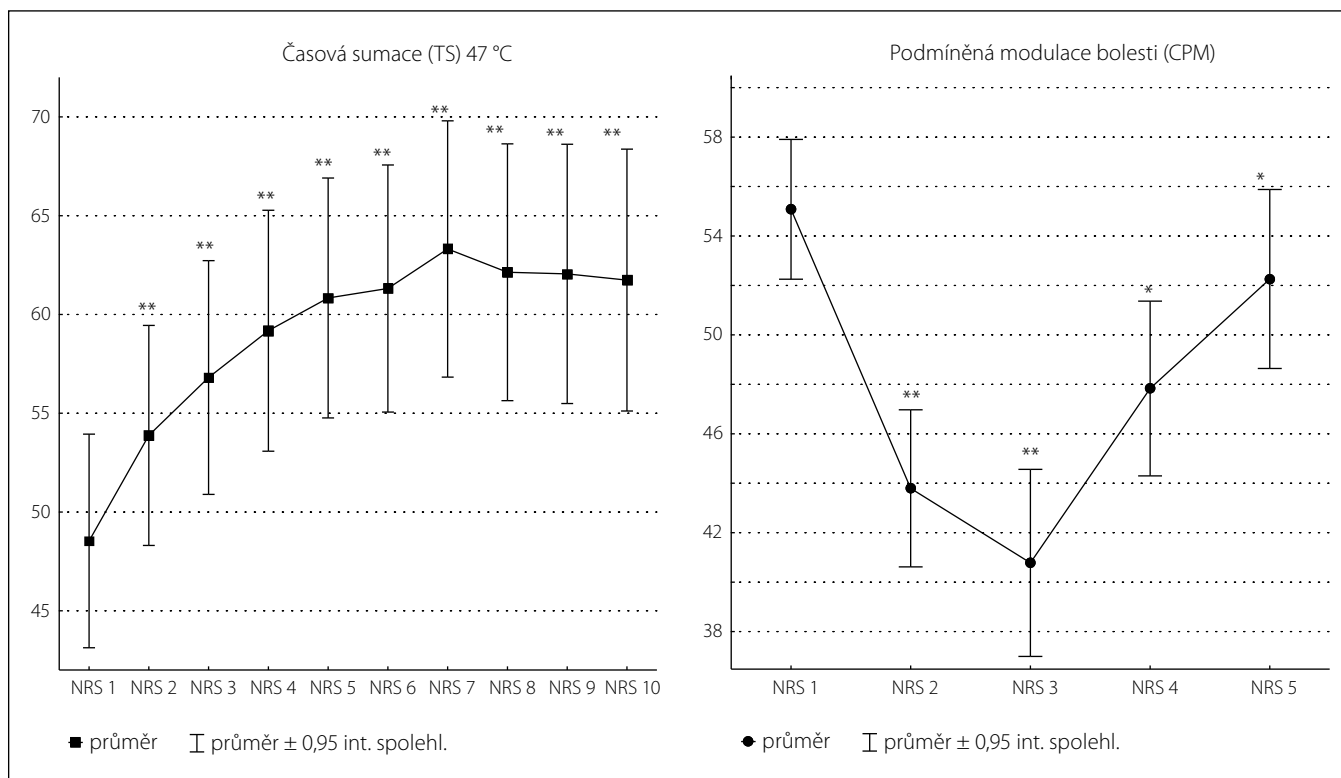
Výsledky

Podmíněná modulace bolesti – průběh testu, vliv pohlaví a věku

Test CPM efektu byl proveden u všech 77 zdravých dobrovolníků a dokončili jej všichni testovaní jedinci. Intenzita bolesti vyvolaná podmíněnou modulací (tedy ponořením netestované končetiny do nádrže s chladnou vodou) dosahovala v celém sou-

boru hodnot téměř identických s testovacími bolestivými podněty. Při skupinovém hodnocení v celém souboru zdravých dobrovolníků byla tudíž použita modulace dostatečně intenzivní pro vyvolání testovaného efektu.

U většiny vyšetřovaných jedinců (84 %) byl během podmíněné modulace prokázán očekávaný pokles vnímané bolestivosti aplikovaných testovacích podnětů (2. a/nebo 3. podnět testu) (graf 1, tab. 1), což odpovídá funkčnosti testovaného mechanismu. Podíl jedinců, u nichž byl prokázán funkční CPM mechanismus, byl obdobný ve všech podskupinách vyšetřovaného souboru (muži a ženy, mladší a starší) (tab. 1). Jedinci, u nichž nebyl funkční CPM mechanismus, vykazovali významně nižší bolestivost všech aplikovaných termoalgických podnětů ve všech provedených testech TS i CPM (vyjma podnětů modulovaných) ve srovnání s dobrovolníky s funkčním CPM ($p = 0,04 - < 0,001$). Výrazný rozdíl v tomto smyslu byl zachycen i pro NRS modulujícího podnětu (medián 40 ve skupině s nevýbavným CPM efektem a 60 ve skupině s efektem výbavným; $p = 0,03$). Podobně vykazovali tito jedinci i nižší hodnoty NRS prvního (nemodulovaného) podnětu (medián = 50) oproti dobrovolníkům s výbavným CPM efektem (medián = 60) ($p = 0,005$), a to i přesto, že použitá testovací teplota byla u nich naopak vysoce významně vyšší (medián = 50 °C oproti 48 °C ve skupině s výbavným CPM efektem; $p < 0,001$). V rámci DFNS-QST protokolu [13] pak byly ve skupině dobrovolníků, u nichž nebyl výbavný CPM efekt, zaznamenány signifikantně vyšší hod-



Graf 1A, B) Vývoj hodnot NRS v průběhu testu časové sumace s použitím teploty 47 °C (TS, graf 1A) nebo podmíněné modulace bolesti (CPM, graf 1B) v celém souboru zdravých kontrol.

Střední bod představuje vždy průměr, whisker pak jeho $\pm 0,95$ interval spolehlivosti.

Podněty, jejichž bolestivost byla v celé podskupině souhrnně hodnocena jako signifikantně vyšší (u TS) nebo nižší (u CPM) ve srovnání s NRS hodnotou prvního podnětu, jsou v grafu označeny pomocí hvězdiček, a to podle úrovně statistické významnosti buďto * (při $p = 0,001-0,05$) nebo ** (při $p < 0,001$).

noty termoalgieckých prahů (data podrobněji neuvedena).

Vliv věku na funkci CPM nebyl zachycen (tab. 1). Prokázán však byl statisticky významný rozdíl CPM efektu v závislosti na pohlaví: ženy v naší studii udávaly signifikantně nižší hodnoty NRS hodnot u podnětů aplikovaných v průběhu podmiňující modulace (tj. 2. a 3. podnět testu) ve srovnání s muži, přičemž rozdíly bolestivosti vyvolané prvním (nemodulovaným) testovacím podnětem nebyly statisticky významné. CPM efekt byl tedy u testovaných žen v ovulační fázi MC významně vyšší než u mužů (tab. 1).

Časová sumace – průběh testu, vliv pohlaví a věku

Časová sumace byla testována u 74 zdravých dobrovolníků. Test s použitím teploty 47 °C nedokončilo 10 dobrovolníků (tři muži a sedm žen) (14 % z testovaných) (tab. 1).

Ve všech nedokončených případech byl důvodem přerušení testu velmi silný nárůst bolestivosti podnětů aplikovaných během testování dosahující hodnoty 100 na NRS

škále. Jedinci, kteří test nedokončili, vykazovali signifikantně vyšší bolestivost již prvního podnětu, aplikovaného během testu: medián NRS prvního podnětu byl 45 u dobrovolníků, kteří test dokončili, a 75 u těch, kteří jej nedokončili ($p = 0,003$).

Vyšetření s teplotou 49 °C nebylo prováděno u jedinců, u nichž bylo nutné ukončit předčasně test s použitím nižší teploty, a dále u dvou žen, u kterých byl test s nižší teplotou sice dokončen, ale poslední podnět byl také skórován hodnotou NRS 100. Testování bylo tedy započato u 62 zdravých dobrovolníků (24 mužů a 38 žen). Z toho u tří žen byl hned první podnět vnímán jako extrémně bolestivý (NRS 100), a vyšetření proto dále nepokračovalo. V následujícím průběhu byl test ukončen u dalších osmi testovaných osob (tab. 1). I zde bylo u jedinců s nutností předčasného ukončení testu vysoce signifikantně vyšší NRS prvního podnětu testu (medián = 90) oproti dobrovolníkům, kteří test dokončili (medián = 50) ($p = 0,002$).

Při hodnocení časové sumace byl zaznamenán pozvolný nárůst vnímané bolesti-

vosti aplikovaných podnětů odpovídající očekávané funkci testovaného mechanismu u naprosté většiny vyšetřovaných jedinců všech sledovaných skupin (graf 1, tab. 1). Při testu s teplotou 47 °C byl mechanismus funkční u 92 % jedinců, kteří dokončili test, při teplotě 49 °C u 98 % z nich (tab. 1). U šesti jedinců (8 %) nedošlo při teplotě 47 °C k žádnému nárůstu (ani poklesu) vnímané bolestivosti v celém průběhu testu, identický průběh měl test i u jednoho jedince (2 %) při testování s teplotou 49 °C (u této ženy nedošlo ke změně vnímané bolestivosti podnětů v ani v průběhu testu s použitím nižší teploty). Příčinou absence efektu přítom nebyla abnormálně nízká bolestivost podnětu. Hodnoty NRS prvního podnětu se u jedinců s nefunkčním TS efektem významně nelišily od osob, u nichž byla zaznamenána očekávaná funkčnost mechanismu ($p = 0,88$).

Rozdíly v hodnotě maximálního TS efektu dosaženého při použití teploty 47 a 49 °C nebyly statisticky významné (hodnoty jsou uvedeny v tab. 1; $p = 0,24$).

Hodnoty TS efektu se ve většině případů pohybovaly v rozmezí od 1 do 2 (tab. 1). U části vyšetřených jedinců přesáhla tato hodnota 2,0 či dokonce 2,5. Jedinci, u nichž byla hodnota TS efektu nad 2, resp. 2,5, vykazovali v obou TS testech (47 i 49 °C) vysoce signifikantně nižší hodnoty NRS prvního podnětu (a tedy vyšší prostor pro následný nárůst hodnot v průběhu testování) ve srovnání s jedinci, u nichž byl TS efekt v obvyklém rozmezí 1–2 ($p < 0,001$) (data podrobněji neuvedena).

Žádný ze sledovaných parametrů nevykázal statisticky významné rozdíly mezi muži a ženami ani mezi jedinci různých věkových skupin (tab. 1), a to při použití teploty 47 ani 49 °C.

Souvislost výsledků obou dQST testů

Ve sledovaném souboru nebyla zachycena statisticky prokazatelná souvislost výsledků CPM a TS testu: počty dobrovolníků s atypickými nálezy TS (ať ve smyslu snížení nebo zvýšení funkce tohoto mechanismu) se v podsouborech jedinců s funkčním a nefunkčním CPM mechanismem významně nelišily (data neuvedena). Vlastní hodnoty TS efektu (při jakémkoli způsobu jeho vyjádření) se mezi dobrovolníky s funkčním a nefunkčním CPM efektem významně nelišily ($p = 0,40–0,88$).

Podobně se nelišila ani hodnota CPM efektu mezi jedinci s TS efektem vyšším než 2, resp. 2,5 při srovnání s dobrovolníky, jejichž TS efekt se pohyboval v obvyklém rozmezí 1 a 2 ($p = 0,38–0,86$).

Diskuze

Prezentovaná studie potvrdila použitelnost, jednoduchost i uspokojivou toleranci zvolených algoritmů vyšetření podmíněné modulační bolesti i časové sumace. U naprosté většiny testovaných zdravých dobrovolníků byla prokázána funkčnost obou mechanismů. V rámci podmíněné modulační bolesti byla nevybavnost očekávaného efektu (která je pronociceptivní abnormitou testu) ve většině případů podmíněna nevhodnými technickými parametry stimulace (tj. nedostatečnou bolestivostí testovacích podnětů a/nebo podnětu modulujícího). V případě časové sumace představuje pronociceptivní abnormita testu abnormálně vysoký nárůst vnímané bolestivosti podnětů. Také tento průběh testu byl v našem souboru zdravých dobrovolníků většinou podmíněn technicky, tj. nižší bolestivostí iniciálních podnětů aplikovaných během testu.

Věk nemá u zdravých dobrovolníků významný vliv na funkci CPM ani TS mechanismu. U žen v ovulační fázi MC byla prokázána lepší funkce CPM efektu v porovnání s muži, což svědčí pro jejich zřetelně antinociceptivní nastavení v této fázi cyklu.

Náročnost a průběh testování, volba použitých algoritmů testů, nálezy testovaných mechanismů u zdravých dobrovolníků

Většina zařazených jedinců byla schopna bez problémů absolvovat všechny použité testy. Pro některé z nich bylo však v úvodu testování poněkud obtížné využití NRS škály pro hodnocení bolestivosti vyvolané testovanými podněty a měli navzdory iniciálním instrukcím tendenci nahradit numerické hodnocení slovním popisem. V těchto případech bylo nutné opětovné vysvětlení principu testování optimálně spojené s aplikací „zkušebních podnětů“, tedy jakýsi praktický zácvik v použití NRS škály. Před vlastním testováním je proto důležité pacienty detailně instruovat a optimálně aplikovat úvodní zkušební podnět pro ověření uspokojivého porozumění instrukcím k testu a principu použití NRS škály na straně vyšetřovaného jedince. Určitým problémem byl také rychlý sled po sobě následujících podnětů v testech časové sumace. V tomto testu bylo proto pro některé dobrovolníky obtížné hodnotit každý z aplikovaných podnětů. Rychlá aplikace podnětů je přitom podmínkou pro funkci TS mechanismu. Při prodlužování interstimulačních intervalů se časová sumace rychle snižuje a brzy zcela vymizí. V naší studii byla problematická zejména kombinace rychlého sledu podnětů s širokým rozpětím NRS škály (0–100) poskytujícím vyšetřovaným jedincům větší prostor pro úvahy nad konkrétní hodnotou NRS vhodnou pro daný podnět, pro které však nebyly při rychlém průběhu testu dostatečné podmínky. V úvodu TS testu je proto nezbytné vyšetřované jedince informovat, že podněty v testu rychle navazují jeden na druhý a spíše než na přesnou hodnotu NRS je nutné zaměřit se na změnu vnímané bolestivosti ve srovnání s předchozími podněty.

Podmíněná modulační bolesti

Algoritmus testování CPM je v publikovaných studiích velmi variabilní [4,6–11]. Nejméně konstantním parametrem je volba použité modulační bolesti, která může být zprostředkována řadou různých typů algických podnětů (např. bolestivé teplo, me-

chanický algický podnět apod.) [6,10,11]. V naší studii jsme pro tento účel zvolili aplikaci bolestivého chladového podnětu evokovaného ponořením netestované končetiny do chladné vody, která je nejčastěji využívaným typem modulujícího podnětu [4,7,10,12]. Teplota chladné vody se v různých studiích pohybuje v rozsahu od „ice water“ [12] do 12 °C [7]. Vyšší teploty nejsou dostačující pro vyvolání CPM efektu [10]. V naší studii byla teplota modulujícího podnětu nastavena na 8 °C (vzhledem k špatné toleranci nižších teplot podmiňujícího podnětu u řady testovaných jedinců dle osobních zkušeností vyšetřujících během zavádění metodiky). Bolestivost podmiňující modulační bolesti dosáhla v naší studii hodnot srovnatelných s bolestivostí vyvolanou podněty testovanými, což spolu s výbavným CPM efektem u většiny jedinců ve všech hodnocených podsкупinách podporuje správnost zvoleného testovacího algoritmu. Stejně tak výše uvedené skutečnosti svědčí pro správnost volby testovacích podnětů, jejichž teplota byla nastavena v úvodu testu tak, aby byl použitý podnět vyšetřovaným jedincem hodnocen co nejbližší úrovni NRS = 60. Tolerance CPM testu byla při tomto způsobu testování ve sledovaném souboru zcela neproblematická. Užívaný algoritmus vyšetření lze proto doporučit pro použití v klinické a experimentální praxi.

U malé části zařazených jedinců v našem souboru nebyl CPM efekt výbavný. Tato podsкупina vykazovala významně nižší bolestivost podmiňující modulační bolesti i testovacích podnětů oproti dobrovolníkům s funkčním CPM mechanismem. Jedinci s nevybavným CPM efektem měli také signifikantně vyšší hodnoty termoalgických prahů v rámci běžného QST vyšetření. V souladu s touto skutečností byla teplota použitých testovacích podnětů v této skupině významně vyšší než u osob s funkčním CPM mechanismem, avšak ani tak nedosáhla bolestivosti prvního testovacího podnětu u většiny z těchto dobrovolníků požadované hodnoty NRS 60. Rozsah teplot testovacích podnětů je totiž limitován použitým stimulatorem a nejvyšší dosažitelná teplota je 50 °C. Ze studií využívajících standardní QST protokoly je známo, že u části zdravých jedinců leží termoalgický práh až nad touto hodnotou nebo se této hodnotě blíží [3,13]. Pokud tedy testované teploty (v rozsahu 46–50 °C) nevyvolaly u vyšetřovaného jedince bolestivý vjem na úrovni NRS = 60, byla pro testování použita teplota nejvíce se této hodnotě blížící (větši-

nou nejvyšší testovaná teplota, tj. 50 °C), která však minimálně v části z nich byla zřejmě pod úrovní algického prahu nebo byla jen mírně bolestivá. Stejně tak tito jedinci vnímali jako méně bolestivý i podnět modulující (tedy ponoření netestované končetiny do nádrže s chladnou vodou). Intenzita testovacích podnětů a/nebo podnětu modulujícího tak v této skupině dobrovolníků pravděpodobně nebyla dostačující k vyvolání CPM mechanismu. Absence CPM efektu tudíž u těchto jedinců pravděpodobně neodráží dysfunkci centrálních modulačních mechanismů algické percepce, ale spíše obecně nižší senzitivitu vůči termalgickým stimulům. Při hodnocení CPM efektu je proto vhodné zohlednit, zda je bolestivost testovacích i modulujících podnětů dostatečná, a v případě, že efekt není výbavný a bolestivost obou podnětů či některého z nich není dostačující, je vhodné pozměnit algoritmus testování a použít podněty evokující u daného jedince vyšší bolestivost (pokud to umožní technické podmínky stimulace). Nelze-li za daných technických podmínek dosáhnout dostatečné algické stimulace testovacího a/nebo modulujícího podnětu, nedá se nevybavnost efektu považovat za spolehlivý průkaz abnormality.

Časová sumace

Stejně jako v případě podmíněné modulace bolesti existuje i v případě časové sumace bolestivých podnětů řada různých způsobů testování. V naší studii byl použit jeden z nejčastějších algoritmů vyšetření, kdy je mechanismus testován opakovanou aplikací termalgických podnětů [7]. Časovou sumaci lze však vyvolat i pomocí jiných typů podnětů a testování WUR je zahrnuto např. i do komplexního protokolu kvantitativního testování senzitivity podle německé multicentrické skupiny DFNS, kde je využívána stimulace kalibrovaným špendlíkem evokujícím ostrou, mechanicky vyvolanou bolest [3,13]. V prezentované studii byl test s ohledem na vysokou bolestivost vyvolanou opakovanou termickou stimulací předčasně ukončen u 14 % vyšetřovaných dobrovolníků při testování teplotou 47 °C, a dokonce u dalších 18 % při teplotě podnětu na úrovni 49 °C. Jedinci, u nichž bylo nutné test předčasně ukončit, udávali významně vyšší bolestivost již prvního testovacího podnětu ve srovnání s dobrovolníky, kteří test dokončili. Pro běžné použití u jedinců s intaktní termickou a termalgickou percepcí je proto výhodnější algoritmus vyšetření s podněty o tep-

lotě 47 °C nebo dokonce ještě nižší, protože vyšší teplota stimulace není některými z nich dobře tolerována. Testování pomocí vyšší teploty aplikovaných podnětů by naopak mohlo být účelně využito u pacientů s elevací termalgických prahů, u nichž není podnět o teplotě 47 °C vnímán jako bolestivý [3,13], protože jde o teplotu pod úrovní jejich algického prahu, která nemusí být dostatečně účinná k vyvolání testovaného mechanismu [3,13]. Optimálním postupem při výběru vhodné testovací teploty by tedy byl postup analogický testování CPM efektu, kdy by byl v úvodu testování nejprve vyhledán termický podnět evokující bolestivost na úrovni např. NRS 40 a ten by byl použit pro testování TS efektu.

U malé části vyšetřovaných jedinců nedošlo v průběhu testu k očekávanému nárůstu bolestivosti podnětu, který odpovídá fyziologické funkci testovaného mechanismu. Nevybavnost TS efektu byla zaznamenána u 8 % zařazených dobrovolníků při stimulaci teplotou 47 °C a pouze u 2 % z nich při použití vyšší teploty testování. Nefunkčnost mechanismu přitom nebyla ve většině případů podmíněna nedostatečnou intenzitou použité stimulace. Pouze u jednoho z dobrovolníků byly všechny podněty TS testu hodnoceny číslem 1 na NRS škále o rozsahu 0–100. V celé skupině jedinců s nevybavným TS efektem však nebyla bolestivost prvního podnětu signifikantně odlišná od dobrovolníků, u nichž byl efekt výbavný. Minimální počet zdravých dobrovolníků, u nichž nebyl v naší studii TS efekt výbavný, nicméně představuje raritní okolnost, která v podstatě odpovídá obvyklé situaci, kdy jsou parametry ve zdravé populaci ve fyziologickém rozmezí u 90 % jedinců. Absence nárůstu bolestivosti při repetitivní stimulaci algickým podnětem byla zaznamenána např. i u části zdravých dobrovolníků vyšetřovaných v rámci tvorby normativních dat pro komplexní protokol testování senzitivity německé multicentrické skupiny pro výzkum neuropatické bolesti (DFNS) [3,13], kde byl identický mechanismus testován pomocí mechanických algických podnětů (kalibrovaným špendlíkem). V souladu s našimi daty tak výsledky této studie potvrzují, že u části zdravých jedinců nedochází v testech časové sumace k nárůstu vnímané bolestivosti a tento průběh vyšetření nepředstavuje zřejmě abnormální nález.

Pronociceptivní abnormitou TS testu je naopak výrazně vysoký nárůst bolestivosti podnětu v průběhu testu. V našem souboru

se hodnoty maximálního TS efektu, vyjádřené formou poměru maximální dosažené NRS a iniciální NRS hodnoty v průběhu testu, pohybovaly většinou v rozmezí 1–2. U části jedinců byly hodnoty vyšší (nad 2 nebo dokonce 2,5). Tito dobrovolníci však vykazovali signifikantně nižší bolestivost prvního podnětu v testu (a měli tedy vyšší prostor pro další nárůst bolestivosti v průběhu testu). Zvýšený TS efekt tak u nich pravděpodobně opět neodráží dysfunkci centrálních modulačních mechanismů algické percepce, ale spíše odlišnou termalgickou percepci, protože tito jedinci vnímali použité testovací podněty při jednorázové stimulaci jako méně bolestivé.

Vliv fyziologických proměnných na funkci CPM a TS

Fyziologické proměnné (věk, pohlaví) jsou často udávané faktory s předpokládaným vlivem na funkci centrálních modulačních mechanismů algické percepce [5,6,8–10,12]. U žen je navíc zvažována odlišná funkce těchto mechanismů v různých fázích MC [9,12]. Variabilita funkce centrální modulace algické percepce přitom pravděpodobně souvisí i s odlišnou predispozicí k rozvoji chronických bolestivých stavů [5,6]. Tato predispozice je obecně vyšší u starších jedinců a u žen, tedy ve skupinách, kde je zvažována nižší efektivita CPM mechanismu [5,6].

Vliv pohlaví na percepci bolesti a funkci jejich centrálních modulačních mechanismů obecně je dobře známý. Receptory pro pohlavní hormony se nacházejí v mnoha oblastech mozku, vč. oblastí zapojených v percepci bolesti a její centrální modulaci [14]. Kolísání hladin pohlavních hormonů je tak jednoznačný podklad známé klinické skutečnosti, že se v různých fázích MC mění výskyt řady bolestivých stavů (např. migrenózních bolestí hlavy), který typicky vzrůstá v premenstruačním a menstruačním období [14]. Studie cíleně zaměřené na problematiku vlivu MC na modulaci percepce bolesti prokazují zcela souladu s tímto klinickým pozorováním, že funkce inhibičních modulačních mechanismů (tj. CPM efekt) je signifikantně nejnižší přibližně od 5. dne před menstruací po 3. den po ní a naopak nejvyšší v ovulační fázi MC (kdy je účinnost mechanismus jednoznačně lepší než ve fázi menstruační, folikulační a luteální) [9,12]. Funkce excitačních modulačních mechanismů (např. TS efektu) není v průběhu MC signifikantně odlišná. Zatímco kolísání funkce CPM efektu v prů-

běhu MC je poměrně jasná, výsledky skupinového srovnání funkce tohoto mechanismu mezi muži a ženami v publikovaných studiích nejsou jednoznačné [14]. Řada prací prokazuje nižší CPM efekt u žen [10,14], většina z těchto studií však nezohledňuje fázi MC a/nebo vyšetřuje ženy v jeho folikulární fázi, kdy je efekt CPM mechanismu nižší oproti fázi ovulační.

Naše studie testovala ženy v ovulační fázi MC neboli v období nejvyšší funkce CPM mechanismu. Naše výsledky prokázaly u žen v ovulační fázi MC signifikantně vyšší CPM efekt oproti mužům, zatímco rozdíly v testu časové sumace nebyly statisticky významné. Tyto výsledky tak svědčí pro zřetelné antinociceptivní nastavení žen v ovulační fázi MC, což je z fyziologického hlediska zcela opodstatněná a logický mechanismus.

Poměrně překvapivým nálezem v naší studii se může zdát absence jasného vlivu věku na funkci CPM i TS mechanismu ve sledovaném souboru. Věkově podmíněné změny funkce centrálních modulačních mechanismů algické percepce jsou v publikovaných studiích prokazovány zejména u osob starších šedesáti let a jsou považovány za jeden z faktorů podílejících se na zvýšeném výskytu chronických bolestivých stavů u starších pacientů [15–17]. Většina prací prokazujících změny CPM nebo TS efektu u jedinců vyššího věku však využívá pro evidenci těchto změn srovnání nálezů ve věkově velmi odlišných skupinách zdravých dobrovolníků. Nálezy u jedinců starších šedesáti let jsou tak převážně srovnávány s nejmladšími dospělými [15–17]. Například Edwards et al srovnávali nálezy CPM efektu ve skupinách s věkovým průměrem 22 a 78 let [16]. Při tomto nastavení byly sice rozdíly v obou souborech statisticky signifikantně odlišné, v konkrétních parametrech však rozdíly představovaly jednotky průměrných hodnot NRS. V naší studii jsme srovnávali nálezy v daleko méně věkově odlišných souborech, což je pravděpodobně podkladem odlišných výsledků. Vzhledem k velmi přísným vstupním kritériím se nám nezdařilo zařadit do studie větší množství jedinců v nejstarší věkové kategorii (nad 60 let), u nichž by bylo možné očekávat výraznější změny. I přes velmi malý počet jedinců v této věkové podskupině jsme se pokusili vyhodnotit jejich nálezy i odděleně od ostatních dobrovolníků ve věkové skupině 40+. Ani v tomto případě však nebyl zachycen významný rozdíl žádného ze sledovaných parametrů DNIC ani TS efektu.

Vedle malého počtu zařazených jedinců se na této skutečnosti může podílet sku-

tečnost, že publikované studie [17] prokázaly signifikantně vyšší hodnoty CPM efektu u jedinců s menší tělesnou bolestí („bodily pain“) a lepší fyzickou kondicí při hodnocení pomocí dotazníku SF-36 (The Short Form (36) Health Survey) [18]. Vstupním kritériem pro zařazení do našeho souboru zdravých dobrovolníků byla přítomnost absence jakýchkoli chronických bolestí, neurologických onemocnění a většiny závažnějších onemocnění interních, což je vcelku obvyklá situace u jedinců nejmladších věkových kategorií, ale poměrně neobvyklá u osob nad 60 let věku. Jedinci zařazení do naší studie byli tedy v dobré fyzické kondici a v určitém smyslu „superzdraví“. Při zohlednění nálezů poslední jmenované studie šlo tedy o osoby méně predisponované k rozvoji chronických bolestivých stavů než obecná populace.

V souhrnu z našich dat vyplývá, že u zdravých jedinců bez chronických bolestí nedochází po 40. roce věku k významné změně funkce CPM ani TS efektu. Ani po 60. roce věku není jejich funkčnost u zdravých osob v dobré fyzické kondici signifikantně alterována. Věkově podmíněné změny funkce uvedených mechanismů tak pravděpodobně nejsou „normou“, jakkoli mohou být u starších jedinců obvyklé.

Závěr

V souhrnu prezentovaná studie potvrdila, že podmíněná modulace bolesti i časová sumace percepce bolestivých podnětů jsou spolehlivě výbavné u naprosté většiny zdravých jedinců. Případné změny funkce testovaných mechanismů je vhodné vždy nejprve posuzovat z hlediska technických parametrů stimulace, zejména vhodné intenzity testovacích a/nebo modulujících podnětů. Atypický průběh testu lze tedy pokládat za možnou abnormitu až po ověření, že je intenzita stimulačních podnětů i podnětu modulujícího dostatečná, ale nikoli zbytečně vysoká pro potřeby příslušného testu.

Algoritmus testování podmíněné modulace bolesti je možné pro další použití doporučit v identické formě, jaká byla využívána v prezentované studii. Pro testování časové sumace je vhodné předřadit vlastnímu testu výběr vhodné testovací teploty pomocí iniciačních testovacích aplikací různých tepelných podnětů, stejně jako je tomu v testu CPM.

Provedená studie potvrdila významný vliv pohlaví na funkci centrálních modulačních mechanismů algické percepce a proká-

zala zřetelné antinociceptivní nastavení žen v ovulační fázi MC.

Věkově podmíněné změny funkce centrálních modulačních mechanismů algické percepce naopak přesvědčivě prokázány nebyly, což svědčí pro zachovalou funkci těchto mechanismů i u starších zdravých jedinců.

Seznam použitých zkratk

QST – Quantitative Sensory Testing (kvantitativní testování senzitivity)
 CPM – Conditioned Pain Modulation (podmíněná modulace bolesti)
 DNIC – Diffuse Noxious Inhibitory Control (podmíněná modulace bolesti)
 TS – Temporal Summation (časová sumace)
 WUR – Wind-Up Ratio (wind-up fenomén)
 NRS – Numeric Rating Scale (numerická škála bolesti)
 dQST – dynamic methods of Quantitative Sensory Testing (dynamické metody kvantitativního testování senzitivity)

Literatura

1. Vlčková E, Šrotová I. Vyšetření senzitivity. *Cesk Slov Neurol N* 2014; 77/110: 402–418.
2. Cruccu G, Sommer C, Anand P, Attal N, Baron R, Garcia-Larrea L et al. EFNS guidelines on neuropathic pain assessment: revised 2009. *Eur J Neurol* 2010; 17(8): 1010–1018. doi: 10.1111/j.1468-1331.2010.02969.x.
3. Rolke R, Baron R, Maier C, Tölle TR, Treede RD, Beyer A et al. Quantitative sensory testing in the German Research Network on Neuropathic Pain (DFNS): standardized protocol and reference values. *Pain* 2006; 123(3): 231–243.
4. Yarnitsky D, Crispel Y, Eisenberg E, Granovsky Y, Ben-Nun A, Sprecher E et al. Prediction of chronic post-operative pain: pre-operative DNIC testing identifies patients at risk. *Pain* 2008; 138(1): 22–28.
5. Yarnitsky D. Conditioned pain modulation (the diffuse noxious inhibitory control-like effect): its relevance for acute and chronic pain states. *Curr Opin Anaesthesiol* 2010; 23(5): 611–615. doi: 10.1097/ACO.0b013e32833c348b.
6. Arendt-Nielsen L, Yarnitsky D. Experimental and clinical applications of quantitative sensory testing applied to skin, muscles and viscera. *J Pain* 2009; 10(6): 556–572. doi: 10.1016/j.jpain.2009.02.002.
7. Eisenberg E, Midbari A, Haddad M, Pud D. Predicting the analgesic effect to oxycodone by „static“ and „dynamic“ quantitative sensory testing in healthy subjects. *Pain* 2010; 151(1): 104–109. doi: 10.1016/j.pain.2010.06.025.
8. Yarnitsky D. Conditioned pain modulation (the diffuse noxious inhibitory control-like effect): its relevance for acute and chronic pain states. *Curr Opin Anaesthesiol* 2010; 23(5): 611–615. doi: 10.1097/ACO.0b013e32833c348b.
9. Tousignant-Laflamme Y, Marchand S. Excitatory and inhibitory pain mechanisms during the menstrual cycle in healthy women. *Pain* 2009; 146(1–2): 47–55. doi: 10.1016/j.pain.2009.06.018.
10. Granot M, Weissman-Fogel I, Crispel Y, Pud D, Granovsky Y, Sprecher E et al. Determinants of endogenous analgesia magnitude in a diffuse noxious inhibitory control (DNIC) paradigm: do conditioning stimulus painfulness, gender and personality variables matter? *Pain* 2008; 136(1–2): 142–149.
11. Yarnitsky D, Bouhassira D, Drewes AM, Fillingim RB, Granot M, Hansson P et al. Recommendations on practice of conditioned pain modulation (CPM) testing. *Eur J Pain* 2015; 19(6): 805–806. doi: 10.1002/ejp.605.
12. Rezaei T, Hirschberg AL, Carlström K, Ernberg M. The influence of menstrual phases on pain modulation

in healthy women. *J Pain* 2012; 13(7): 646–655. doi: 10.1016/j.jpain.2012.04.002.

13. Šrotová I, Vlčková E, Straková J, Kincová S, Adamová B, Dušek L et al. Validace české verze komplexního protokolu kvantitativního testování senzitivity. *Cesk Slov Neurol N* 2015; 78/111(4): 442–452.

14. Popescu A, LeResche L, Truelove E, Drangsholt M. Gender differences in pain modulation by diffuse no-

xious inhibitory controls: a systematic review. *Pain* 2010; 150(2): 309–318. doi: 10.1016/j.pain.2010.05.013.

15. Van Wijk G, Veldhuijzen D. Perspective on diffuse noxious inhibitory controls as a model of endogenous pain modulation in clinical pain syndromes. *Pain* 2010; 11(5): 408–419. doi: 10.1016/j.jpain.2009.10.009.

16. Edwards R, Fillingim R, Ness T. Age-related differences in endogenous pain modulation: a comparison

of diffuse noxious inhibitory controls in healthy older and younger adults. *Pain* 2003; 101(1–2): 155–165.

17. Edwards RR, Ness TJ, Weigent DA, Fillingim RB. Individual differences in diffuse noxious inhibitory controls (DNIC): association with clinical variables. *Pain* 2003; 106(3): 427–437.

18. Ware JE jr, Sherbourne CD. The MOS 36-item short-form health survey (SF-36). I. Conceptual framework and item selection. *Med Care* 1992; 30(6): 473–483.

Projekt ncRNAPain

Rádi bychom vás informovali o projektu ncRNAPain, který bude zkoumat ncRNAs specificky u vybraných klinických jednotek provázených neuropatickou bolestí – zejména u bolestivé diabetické neuropatie (pDPN), traumatických neuropatií a chronického regionálního bolestivého syndromu (CRPS) s cílem získat poznatky o mechanismech chronické bolesti.

Na základě porozumění mechanismů indukce a udržení chronické bolesti a přenosu výsledků preklinického a klinického výzkumu do klinické praxe zlepšit kvalitu života nemocných a sníží celospolečenskou zátěž způsobenou chronickou bolestí v Evropě.

Projekt je podporován ze 7. rámcového programu EU, na kterém se podílí řada center ostatních evropských zemí (Dánsko, Francie, Německo, Rakousko, Velká Británie) a Izraele.

Trvání projektu: 1. 11. 2013–31. 10. 2017.

Kteří pacienti a zdraví dobrovolníci se mohou účastnit výzkumu?

- pacienti s cukrovkou 1. nebo 2. typu a bolestivou nebo nebolestivou formou diabetické neuropatie (ať už prokázanou nebo při podezření na tuto komplikaci cukrovky),
- pacienti s poraněním periferního nervu déle než 3 měsíce od úrazu,
- zdraví dobrovolníci netrpící chronickou bolestí ve věku 40–70 let.

Výzkum bude probíhat v 1. fázi na Neurologické klinice Fakultní nemocnice Brno.

Pro více informací o projektu a pro ověření vhodnosti kandidáta k účasti ve studii, kontaktujte prosím:

Jana Novohradská
laborantka

E-mail: neuropain@seznam.cz

Telefon: +420 733 165 191

Pacientům a dobrovolníkům účast v projektu umožní kromě podílení se na zajímavém a špičkovém výzkumu, jehož výsledky mohou zásadně ovlivnit léčbu chronické bolesti, také upřesnění stupně a typu postižení periferních nervů a v případě zájmu zejména u bolestivé formy následná konzultace stran optimální léčby.

*prof. MUDr. Josef Bednařík, CSc., FCMA
garant projektu*

22. Kovalova I, Vlckova E, Bednarik J. *Broadening the spectrum of controls for skin biopsy in painful neuropathies: spondyloitic cervical myelopathy patients with painful feet. Brain Behav* 2016; 6(3): e00444. DOI: 10.1002/brb3.444. IF = 2,157.

Tato originální práce rozšiřuje spektrum kontrol pro vyšetření IENFD z kožní biopsie. Studie vychází z doporučení EFNS k problematice kožních biopsií (Lauria et al. 2010b), která zdůrazňuje nutnost potvrzení specifity nálezů kožní biopsie prostřednictvím jejího vyšetření u pacientů s klinickými symptomy podobnými polyneuropatiím, ale podmíněnými jinou etiologií.

Popisovaná studie proto hodnotila IENFD z kožní biopsie u pacientů s distálními pozitivními senzitivními symptomy při spondylogenní cervikální myelopatii. Tito pacienti neměli žádné klinické ani elektromyografické změny prokazující postižení periferních nervů ani žádné rizikové faktory pro takový typ postižení. Většina z nich však vykazovala signifikantní změny v rámci kvantitativního testování senzitivity (jako odraz postižení centrálních senzitivních drah). Hodnoty IENFD byly u všech pacientů z vyšetřované skupiny v mezích normy a nelišily se od souboru zdravých kontrol podobného věku a pohlaví.

Studie tedy prostřednictvím rozšíření souboru zdravých kontrol potvrdila specifitu vyšetření IENFD z kožní biopsie v diagnostice neuropatie tenkých vláken. Jedná se teprve o druhou studii podobného designu, reflektující výše zmíněné doporučení EFNS, která je této problematice k dispozici: první byla zaměřena na pacienty s distálními senzitivními symptomy při roztroušené skleróze (Herrmann et al. 2010).

Broadening the spectrum of controls for skin biopsy in painful neuropathies: spondylotic cervical myelopathy patients with painful feet

Ivana Kovalova^{1,2}, Eva Vlckova^{1,2} & Josef Bednarik^{1,2}

¹Department of Neurology, University Hospital Brno, Jihlavská 20, 62500 Brno, Czech Republic

²Central European Institute of Technology, Masaryk University, Brno, Czech Republic

Keywords

Cervical spondylotic myelopathy, epidermal nerve fibers, neuropathic pain, peripheral neuropathy, skin biopsy

Correspondence

Eva Vlckova, Department of Neurology, University Hospital Brno, Jihlavská 20, 62500 Brno, Czech Republic. Tel: +420 5 3223 2503; Fax: +420 5 3223 2249; E-mail: evlckova@email.cz

Funding Information

This study was supported by “CEITEC – the Central European Institute of Technology” (CZ.1.05/1.1.00/02.0068), a project of the European Regional Development Fund, by the Ministry of Health of the Czech Republic project for conceptual development in research organizations, ref. no. 65269705 (University Hospital Brno, Brno, Czech Republic), by two grants supported by the Internal Grant Agency of Czech Republic (IGA CR NT 13449-4 and NT 13523-4), and Specific University Research Grant MUNI/A/1358/14 provided by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic in the year 2015.

Received: 27 October 2015; Revised: 5 January 2016; Accepted: 11 January 2016

Brain and Behavior, 2016; 0(0), e00444, doi: 10.1002/brb3.444

Background

In recent years, skin biopsy with assessment of intraepidermal nerve fiber density (IENFD) has increasingly been used in the evaluation of small-fiber neuropathy (SFN) (England et al. 2009; Lauria et al. 2010b). An American Academy of Neurology, American Association of Neuro-

Abstract

Purpose: Intraepidermal nerve fiber density (IENFD) is useful in the evaluation of small-fiber neuropathy (SFN). Recent guidelines recommend extending the spectrum of controls for IENFD assessment by evaluation of patients whose clinical picture mimics that of SFN. The aim of this study was to broaden the spectrum of IENFD controls by the assessment of patients with cervical spondylotic myelopathy (CSM) and painful feet. **Methods:** Evaluation of IENFD from skin biopsy samples and quantitative sensory testing (QST) were performed in a cohort of 14 CSM patients (eight men, median age: 58; range: 46–63 years), with painful feet, exhibiting no clinical or electrophysiological signs of large-fiber polyneuropathy, and no risk factors for peripheral neuropathies. **Results:** Quantitative sensory testing abnormalities were found in all but two of the CSM patients (86%), while the IENFD values were within reference range. The mean IENFD value (6.87 ± 2.78 fibers/mm) did not differ from that of an age- and sex-matched cohort of healthy volunteers (7.97 ± 2.21 fibers/mm, $P > 0.05$). **Conclusions:** The study confirmed normal skin biopsy findings in patients with CSM as one of the clinical conditions mimicking SFN and provided further support for the use of IENFD assessment in case of suspicion of SFN.

muscular and Electrodiagnostic Medicine (AANEM), and American Academy of Physical Medicine and Rehabilitation evidence-based review issued a Level C recommendation that supports skin biopsy in the diagnostic evaluation of SFN (England et al. 2009), while the European Federation of Neurological Societies/Peripheral Nerve Society Guideline (Lauria et al. 2010b) stated that

decreased IENFD reliably indicates the presence of SFN (level A recommendation). Both recommendations, however, emphasize the need to broaden the spectrum of controls for IENFD assessment by the evaluation of skin biopsy in patients whose clinical picture mimics that of SFN (Lacomis 2002).

A clinical picture similar to that exhibited by SFN, with positive sensory symptoms in the lower extremities together with clinical or quantitative sensory testing (QST) abnormalities in this distribution, may also be found in certain other clinical conditions, particularly those affecting central somatosensory pathways; these may be confused with SFN. Recently, this emerged in a study of patients with multiple sclerosis and restless legs syndrome (Herrmann et al. 2010). Another disease that may present with sensory symptoms and signs in the lower legs is cervical spondylotic myelopathy (CSM) (Yoshiyama et al. 1995). Sensory symptoms in the lower extremities were included within the original Japanese Orthopaedic Association (JOA) scale (Yonenobu et al. 2001) used in CSM evaluation, but not in the modified (mJOA) score (Benzel et al. 1991).

The aim of this study was to extend the range of controls for skin biopsy and IENFD evaluation in patients with CSM and positive sensory symptoms in the lower legs, a condition resembling SFN.

Methods

A large cohort of 244 CSM patients, followed up by the Department of Neurology of the University Hospital, Brno, was screened for the presence of positive sensory symptoms in the lower legs mimicking SFN. Such symptoms were described by a total of 42 patients from this cohort. These were clinically examined, screened for known risk factors for peripheral neuropathies, and given standard nerve conduction studies. Nineteen of these patients fulfilled the following inclusion criteria: (1) pain intensity of at least 3 as assessed by a numerical rating scale ranging from 0 to 10, in which 0 represented “no pain” and 10 “the worst pain I can imagine”; (2) no risk factors for peripheral neuropathies in the medical history (in particular, diabetes mellitus, alcohol abuse, uremia, thyroid disorders, malignancy, or exposure to toxins or medication associated with neuropathy); (3) normal or increased deep tendon reflexes in the lower legs; (4) normal nerve conduction studies in the lower extremities, to exclude large nerve-fiber involvement in this distribution; and (5) absence of other diseases or conditions leading to foot pain (i.e., plantar fasciitis, tarsal tunnel syndrome, osteoarthritis, peripheral vascular disease). Finally, only 14 patients fulfilled inclusion criteria and were willing to participate (eight men, six women, median age: 58; range:

Table 1. Demographic data, mJOA score, evoked potentials, skin biopsy findings, and quantitative sensory testing in CSM patients.

Patient no.	Sex	Age	mJOA	MEP	SEP	IENFD	QST abnormality	
							Gain	Loss
1	M	46	17	N	N	5.9 ^{1,2}	MPT, MPS	MDT, VDT
2	M	55	16	N	N	4.3 ¹	PHS	CDT, TSL, MDT
3	F	60	14	C	N	7.4 ^{1,2}	0	0
4	F	59	17	N	C	14.7 ^{1,2}	0	0
5	M	61	17	N	N	5.0 ^{1,2}	PHS, MPT, MPS	CDT, TSL
6	F	55	13	C	N	4.3 ¹	PHS	MPT
7	M	62	16	N	N	7.5 ^{1,2}	PHS, MPT, HPT	0
8	M	51	17	N	N	6.3 ^{1,2}	PHS, WUR	CDT, TSL, MDT
9	F	61	15	N	N	4.7 ^{1,2}	0	WDT, MPT
10	M	53	17	N	C	6.4 ^{1,2}	0	WDT, TSL
11	F	63	16	N	N	5.0 ^{1,2}	PPT	CDT
12	F	57	16	N	C	7.2 ^{1,2}	0	CDT, WDT, TSL, MDT
13	M	62	14	N	C	6.4 ^{1,2}	0	PPT, MDT
14	M	50	17	N	N	11.2 ^{1,2}	PHS	CDT, WDT, TSL

CSM, cervical spondylotic myelopathy; mJOA, modified Japanese Orthopaedic Association (JOA) scale (Benzel et al. 1991); MEP, motor-evoked potentials; SEP, somatosensory-evoked potentials; N, normal finding of MEP or SEP; C, central conduction abnormality in MEP/SEP attributed to possible cervical spinal cord lesion; IENFD, intraepidermal nerve fiber density; QST, quantitative sensory testing; CDT, cold detection threshold; WDT, warm detection threshold; TSL, thermal sensory limen; HPT, heat pain threshold; PPT, pressure pain threshold; MPT, mechanical pain threshold; MPS, mechanical pain sensitivity; WUR, wind-up ratio; MDT, mechanical detection threshold; VDT, vibration detection threshold; PHS, paradoxical heat sensation.

¹IENFD value within normal range, after Lauria et al. (2010a,b).

²IENFD value within normal range, after Bursova et al. (2012).

46–63 years – see Table 1). The study was approved by the local Ethics Committee and written informed consent was obtained from all the participants.

All the individuals included fulfilled the diagnostic criteria for cervical spondylotic myelopathy based on clinical symptoms and signs of cervical cord dysfunction or lesion due to spondylotic cervical cord compression, documented by magnetic resonance imaging (MRI) (Emery 2001). Severity of clinical disability was graded by means of mJOA score (Benzel et al. 1991).

Standard short-latency SEPs from the median and the tibial nerves were elicited with electrical stimulation of mixed nerves at the wrist and the ankle, and recorded using a Nicolet four-channel Viking II unit.

Motor evoked potentials (MEPs) were elicited using a MAGSTIM 200 magnetic stimulator and circular 90-mm (type 9784) stimulating coil with a peak magnetic field strength of 2.0 T. On-line data acquisition was performed using a Dantec Keypoint electromyograph. MEPs were elicited by means of transcranial and root magnetic stimulation, and recorded from abductor digiti minimi and abductor hallucis muscles on both sides.

The details of the testing procedures of both SEPs and MEPs were previously published in detail (Bednarik et al. 1999), including the criteria for the definition of central conduction abnormality attributed to possible cervical spinal cord lesion.

Quantitative sensory testing examination in the lower legs was performed, following the standardized protocol of the German Research Network on Neuropathic Pain (Deutscher Forschungsverbund Neuropathischer Schmerz, DFNS) (Rolke et al. 2006) and using its standard recommendations. The Czech version of the instructions used for this purpose has recently been validated and the applicability of published reference values (Magerl et al. 2010) has been confirmed for the Czech population (Srotova et al. 2015). All the tests were performed on the dorsum of the foot with the exception of PPT, which was tested on the sole. The symptoms were symmetrical in all the 14 cases. One-sided QST testing was therefore performed on the right side.

Skin-punch biopsy samples were taken from the distal calf, approximately 10-cm above the right lateral malleolus. The details of specimen removal and staining techniques have been widely published (Vlckova-Moravcova et al. 2008; Skorna et al. 2015) and follow standard recommendations (Lauria et al. 2010b). In brief, after fixation in 4% phosphate-buffered paraformaldehyde (pH 7.4) and cryoprotection in 10% sucrose, frozen sections of 50 μm thickness were cut and immunostained with rabbit polyclonal antibodies to human PGP-9.5 (1:200; Ultraclone, Wellow, UK, Ultraclone Cat. RA95101, RRID: AB_2313685) as primary antibody, and goat

anti-rabbit IgG labeled with fluorescein probe as secondary antibody (1:100; Chemicon, Temecula, CA). The intraepidermal nerve fibers were counted manually at $\times 630$ magnification using a Leica DMLB microscope (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany). The epidermal length of the skin section was measured with calibrated software (ImageJ, NIH Image, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1.42p, RRID:SCR_003070). The average intraepidermal nerve fiber density (IENFD) per millimeter of epidermal length was calculated according to current guidelines (Lauria et al. 2010b). The entire epidermal length of three nonadjacent sections was evaluated in each patient. All the samples were counted by a single observer unaware of the clinical data (IK) and re-evaluated by another (EV) to ensure reliability. The results were evaluated using our own laboratory normative values, obtained from a smaller sample of individuals by immunofluorescence (Bursova et al. 2012) as well as published reference values based on results from a large cohort of normal individuals using bright-field immunohistochemistry (Lauria et al. 2010b).

Results

All the patients included in the study showed only mild and predominantly sensory clinical impairment (mainly sensory loss, in upper and lower extremities, but without pronounced lack of stability when walking) which corresponds with high values of mJOA score in all the cases (Table 1). Clinical presentation of CSM thus corresponds with the “pseudopolyneuropathic pattern” of distal sensory involvement in lower extremities, which mimics the SFN (in part in combination with plurisegmental sensory loss in one or both upper extremities probably due to lesions of dorsal horns at the cervical level).

Central conduction abnormalities in somatosensory or motor-evoked potentials were found in a small proportion of the cases due to associated lesions of the corticospinal tract and dorsal columns at the cervical level.

Quantitative sensory testing protocol revealed numerous sensory abnormalities in the lower extremities in most of the participants (Table 1). Only two of the 14 patients (14%) had no QST abnormality. In one patient (7%), only gain abnormalities were revealed, while four patients (29%) displayed only loss abnormalities. Most frequently, a combination of both positive and negative sensory signs emerged upon QST examination (seven patients, i.e., 50%) (Table 1).

The IENFD values for all 14 patients were within the range of age- and sex-related reference values when using the reference data from the worldwide normative study (Lauria et al. 2010a). When using our own normal data, IENFD values were borderline in two of the patients,

ranging between $x-2$ SD and $x-2.5$ SD of the reference data set, while all the other values did not exceed normal range (Table 1). On a group basis, however, mean IENFD values in the CSM group were not significantly different (6.87 ± 2.78 fibers/mm of epidermal length) from the cohort of healthy volunteers matched for age and gender with this study (7.97 ± 2.21 fibers/mm, $P > 0.05$) (Vlckova-Moravcova et al. 2008; Bursova et al. 2012).

Discussion

This prospective study confirmed normal skin biopsy findings in patients with cervical spondylotic myelopathy as one of the clinical conditions that can mimic small-fiber neuropathy. Such a finding provides further support for the use of IENFD evaluation from skin biopsy in the diagnosis of SFN. Our study thus confirms recommendations for future research on this topic, tallying with recent reviews and guidelines (England et al. 2009; Lauria et al. 2010b).

In CSM, sensory pathways are frequently involved at the cervical level, and pseudopolyneuropathic patterns of sensory dysfunction in the lower extremities may be found in a significant proportion of CSM patients (Yoshiyama et al. 1995). In our group of patients, positive sensory symptoms, including pain, were less frequent than negative symptoms and signs, but not exceptional. In our large cohort of 244 CSM patients, such positive symptoms were found in 42 individuals (i.e., 17%). As well as clinical evidence of abnormal thermal and/or pain sensitivity, most of the patients included in our study also exhibited multiple QST abnormalities, usually in both loss and gain directions. Our findings are thus in agreement with the assumption that positive as well as negative sensory symptoms and signs in the lower extremities are not rare in CSM patients. Cervical spondylotic myelopathy may thus parallel some of the criteria used for SFN diagnosis and may be confused with this condition, thus constituting a suitable control group for IENFD evaluation. This study therefore successfully broadens the spectrum of controls for skin biopsies in the diagnosis of peripheral neuropathies, in similar fashion to a further, recently published study using different control groups of patients (Herrmann et al. 2010).

Predominantly, sensory involvement in our selected group of CSM patient is documented by quite high values of mJOA score. SEPs and/or MEPs showed the abnormality only in a small proportion of the CSM patients. These results also support only the mild and predominantly sensory (i.e., pseudopolyneuropathic) pattern of involvement mimicking SFN, which is supposed to result from spinothalamic tract dysfunction and thus is not reflected by any abnormality in SEP examination. Central conduc-

tion abnormality of somatosensory-evoked potentials results from the lesion of dorsal spinal column, while dysfunction of the dorsal horn in the lower cervical spine leads to segmental abnormality of N13 wave (only).

The main limitation of this study is sample size of CSM patients, which proved impossible to expand despite considerable effort, primarily as a result of the strict inclusion criteria. At the beginning of the study, quite a large cohort of CSM patients being followed up in our department were screened for the presence of symptoms and signs similar to those seen in SFN. The prevalence of CSM, however, is significantly higher in older patients, among whom there are only a few individuals with a complete absence of risk factors for peripheral neuropathies together with normal large nerve-fiber function according to nerve conduction studies. On the other hand, the inclusion criteria were strict enough to exclude as many patients with suspected coincidence of CSM and peripheral neuropathy (as a confounding factor for such a type of study) as possible.

Two of the CSM patients in this study showed borderline IENFD values according to our own reference data. Despite very strict inclusion criteria, the possible association of CSM and SFN cannot be excluded in these individuals. In a recent study, an overall minimum prevalence of SFN, about 52.95 per 100,000 individuals, was revealed, with an increasing incidence and prevalence in elderly patients compared with younger ones (Peters et al. 2013). SFN is thus not a rare condition, particularly in older adults, and one or two of our patients may be diagnosed with both. On the other hand, the IENFD results were only borderline in these cases and, when using the worldwide normative reference data, all values were within the normal range. Furthermore, most of the patients included in our study showed fully normal IENFD values according to both sets of reference data used. Considering their clinical symptoms and signs mimicking SFN, the study broadened a spectrum of controls for skin biopsy evaluation and provided further support for the use of IENFD assessment in painful peripheral neuropathies. IENFD is thus a valuable marker in the differentiation of peripheral neuropathy with small nerve-fiber dysfunction from other possible causes of neuropathic pain in the feet, at both group and individual levels.

Acknowledgments

This study was supported by “CEITEC – the Central European Institute of Technology” (CZ.1.05/1.1.00/02.0068), a project of the European Regional Development Fund, by the Ministry of Health of the Czech Republic project for conceptual development in research organizations, ref. no. 65269705 (University Hospital Brno, Brno, Czech Republic), by two grants supported by the Internal

Grant Agency of Czech Republic (IGA CR NT 13449-4 and NT 13523-4), and Specific University Research Grant MUNI/A/1358/14 provided by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic in the year 2015. The data were presented in part at the Czech and Slovak Neuromuscular Meeting (2015, Bratislava, Slovakia).

Conflict of Interest

None declared.

References

- Bednarik, J., Z. Kadanka, S. Vohánka, L. Stejskal, O. Vlach, and R. Schröder. 1999. The value of somatosensory- and motor-evoked potentials in predicting and monitoring the effect of therapy in spondylotic cervical myelopathy. Prospective randomized study. *Spine (Phila Pa 1976)* 24:1593–1598.
- Benzel, E. C., J. Lancon, L. Kesterson, and T. Hadden. 1991. Cervical laminectomy and dentate ligament section for cervical spondylotic myelopathy. *J. Spinal Disord.* 4:286–295.
- Bursova, S., E. Vlckova, M. Hnojčikova, M. Nemeč, P. Dubovy, B. Micankova-Adamova, et al. 2012. Intraepidermal nerve fiber density assessment in skin biopsy – normative values. *Cesk. Slov. Neurol. N.* 75:455–459.
- Emery, S. E. 2001. Cervical spondylotic myelopathy: diagnosis and treatment. *J. Am. Acad. Orthop. Surg.* 9:376–388.
- England, J. D., G. S. Gronseth, G. Franklin, G. T. Carter, L. J. Kinsella, J. A. Cohen, et al. 2009. Evaluation of distal symmetric polyneuropathy: the role of autonomic testing, nerve biopsy, and skin biopsy (an evidence-based review). *Muscle Nerve* 39:106–115.
- Herrmann, D. N., A. B. O'Connor, S. R. Schwid, Y. Da, A. D. Goodman, J. Rafferty, et al. 2010. Broadening the spectrum of controls for skin biopsy in painful neuropathies. *Muscle Nerve* 42:436–438.
- Lacomis, D. 2002. Small-fiber neuropathy. *Muscle Nerve* 26:173–188.
- Lauria, G., M. Bakkers, C. Schmitz, R. Lombardi, P. Penza, G. Devigili, et al. 2010a. Intraepidermal nerve fiber density at the distal leg: a worldwide normative reference study. *J. Peripher. Nerv. Syst.* 15:202–207.
- Lauria, G., S. T. Hsieh, O. Johansson, W. R. Kennedy, J. M. Leger, S. I. Mellgren, et al. 2010b. European Federation of Neurological Societies/Peripheral Nerve Society Guideline on the use of skin biopsy in the diagnosis of small fiber neuropathy. Report of a joint task force of the European Federation of Neurological Societies and the Peripheral Nerve Society. *Eur. J. Neurol.* 17:903–912.
- Magerl, W., E. K. Krumova, R. Baron, T. Tölle, R. D. Treede, and C. Maier. 2010. Reference data for quantitative sensory testing (QST): refined stratification for age and a novel method for statistical comparison of group data. *Pain* 151:598–605.
- Peters, M. J., M. Bakkers, I. S. Merkies, J. G. Hoeijmakers, E. P. van Raak, and C. G. Faber. 2013. Incidence and prevalence of small-fiber neuropathy: a survey in the Netherlands. *Neurology* 81:1356–1360.
- Rolke, R., R. Baron, C. Maier, T. R. Tölle, R. D. Treede, A. Beyer, et al. 2006. Quantitative sensory testing in the German Research Network on Neuropathic Pain (DFNS): standardized protocol and reference values. *Pain* 123:231–243.
- Skorna, M., R. Kopacik, E. Vlckova, B. Adamova, M. Kostalova, and J. Bednarik. 2015. Small nerve fiber pathology in critically illness documented by serial skin biopsies. *Muscle Nerve* 52:28–33.
- Srotova, I., E. Vlckova, J. Strakova, S. Kincova, B. Adamova, L. Dusek, et al. 2015. Validation of Czech version of DFNS protocol for quantitative sensory testing]. *Cesk. Slov. Neurol. N.* 78:442–452.
- Vlckova-Moravcova, E., J. Bednarik, L. Dušek, K. V. Toyka, and C. Sommer. 2008. Diagnostic validity of epidermal nerve fiber densities in painful sensory neuropathies. *Muscle Nerve* 37:50–60.
- Yonenobu, K., K. Abumi, E. Takeomi, and K. Ueyama. 2001. Interobserver and intraobserver reliability of the Japanese Orthopaedic Association scoring system for evaluation of cervical compression myelopathy. *Spine (Phila Pa 1976)* 26:1890–1894.
- Yoshiyama, Y., Y. Tokumaru, T. Hattori, and K. Hirayama. 1995. The “pseudo-polyneuropathy” type sensory disturbances in cervical spondylotic myelopathy. *Rinsho Shinkeigaku (Clin. Neurol.)* 35:141–146.

23. *Vlčková E, Šrotová E, Bednařík J. Sympatická kožní odpověď v diagnostice neuropatie tenkých vláken. Cesk Slov Neurol N 2016; 79/ 112(1): 52-60. IF = 0,368*

Oceněno Cenou časopisu Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie za rok 2016.

Originální práce je zaměřena na jednu z metod hodnocení autonomní dysfunkce, která je v klinické praxi současně často využívána jako test objektivizující postižení tenkých nervových vláken (tedy nejvýznamnější faktor rozvoje periferní neuropatické bolesti). Jedná se o sympatickou kožní odpověď (SSR) využívanou jako široce dostupný test sudomotorických funkcí (a tenkých nervových vláken typu C).

Tento test byl v rámci komentované studie vyšetřen u větších souborů zdravých dobrovolníků a pacientů s neuropatií tenkých nervových vláken a/nebo kombinovaným postižením vláken tenkých a silných.

Na základě hodnocení SSR odpovědí v těchto souborech pacientů práce poskytuje věkově stratifikovaná normativní data pro hodnocení výbavnosti, latencí i amplitud SSR, reflektuje intra- i interindividuální variabilitu odpovědí a prokazuje, že nejspolehlivějším abnormitou testu je nevýbavnost odpovědí. Hodnocení latencí či amplitud SSR odpovědi má naopak v diagnostice postižení tenkých nervových vláken jen omezený význam. Ve vyšetřeném souboru pacientů s neuropatií tenkých a/nebo tenkých a silných vláken vykazuje SSR (při zohlednění nevýbavnosti odpovědí) jen nízkou senzitivitu, což svědčí proti využití této metody jako izolovaného konfirmačního testu v diagnostice neuropatie tenkých vláken (a to zejména při izolovaném postižení těchto nervových vláken, bez současného postižení vláken silných).

Sympatická kožní odpověď v diagnostice neuropatie tenkých vláken

Sympathetic Skin Response in the Diagnosis of Small Fibre Neuropathy

Souhrn

Úvod: Sympatická kožní odpověď (SSR) je jednoduchý a široce dostupný test sudomotorických funkcí. Jedná se o polysynaptický reflex s variabilní aferentací a eferentní částí, zprostředkovanou tenkými nemyelinizovanými vlákny typu C. Cílem práce bylo zhodnocení validity SSR v diagnostice neuropatie s postižením tenkých senzitivních nervových vláken. **Metodika:** SSR byla vyšetřena na horních a dolních končetinách u 69 pacientů s bolestivou periferní neuropatií. U 33 pacientů této skupiny šlo o izolovanou neuropatii tenkých nervových vláken (NTV). Třicet šest pacientů mělo kombinované postižení vláken tenkých a silných. Nálezby byly srovnány se souborem 89 zdravých kontrol. Hodnocena byla výbavnost odpovědi elektrickým proudem a prudkým inspirem a jejich reprodukovatelnost, amplituda a latence. **Výsledky:** Hodnocení latencí ani amplitud odpovědí ne-prokázalo jasný přínos pro diagnostiku postižení tenkých nervových vláken. Nejspolehlivější typ SSR abnormality je tedy nevybavnost odpovědí. Postižení tenkých autonomních vláken však bylo v našem souboru pomocí SSR prokazatelné pouze u malé části pacientů se senzitivní neuropatií – senzitivita dosáhla necelých 10 % u pacientů s čistou NTV a 33 % u pacientů s kombinovaným postižením vláken tenkých a silných (u nichž je současně pravděpodobněji těžší stupeň postižení vláken tenkých). **Závěr:** Při zohlednění nízké senzitivity není SSR optimální metoda využitelná jako jediný diagnostický test neuropatie tenkých vláken.

Abstract

Introduction: Sympathetic skin response (SSR) is a simple and widely available test of sudomotor functions. Afferent part of this polysynaptic reflex is variable, while the efferent direction of the reflex arch is via thin unmyelinated C fibres. No reliable study of the SSR diagnostic validity in patients with sensory small fiber neuropathy (SFN) has so far been published. In clinical practice, however, we repeatedly meet patients, who have been diagnosed with SFN based solely on abnormal SSR. The aim of the study was to evaluate diagnostic validity of SSR in patients with sensory small fibre neuropathy. **Methods:** SSR was recorded from palms and soles of 69 patients with painful sensory neuropathy (33 of them with pure SFN and 36 with mixed small and large nerve fibre dysfunction) using electrical stimulation and inspiratory gasp stimuli. Small nerve fiber involvement was confirmed by reduced intraepidermal nerve fiber densities in skin biopsy samples of all cases. The results were compared with those of 89 healthy controls. The outcome for health controls were also used to establish age-stratified normative data. We assessed electric stimuli and sudden inspiration response recall end their reproducibility, amplitude and latency. **Results:** Both the SSR latencies and amplitudes showed very low diagnostic validity in small fibre neuropathy patients. The absence of SSR response represented the most reliable abnormality. However, using this parameter, dysfunction of small autonomic nerve fibres has only been found in a small part of our sensory neuropathy patients: sensitivity did not exceed 10% in pure SFN patients and 33% in those with mixed small and large nerve fibre dysfunction (where more pronounced small sensory nerve fibre involvement has previously been found). **Conclusion:** Considering its low sensitivity, SSR should not be used as the only test to confirm sensory small fibre neuropathy.

Práce byla podpořena z prostředků MZ ČR – RVO (FNBr, 65269705), interními zdroji CEITEC MUNI a projektem specifického výzkumu č. MUNI/A/0935/2013 z programu podpory studentských projektů na Masarykově univerzitě. Práce byla podpořena grantovým projektem IGA MZ ČR NT 13523-4.

Autoři práce děkují spolupracovníkům, příbuzným a známým, kteří se studie zúčastnili jako zdravé kontroly.

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.

**E. Vlčková^{1,2}, I. Šrotová^{1,2},
J. Bednařík^{1,2}**

¹ Neurologická klinika LF MU a FN Brno

² CEITEC – Středoevropský technologický institut, MU, Brno



MUDr. Eva Vlčková, Ph.D.
Neurologická klinika
LF MU a FN Brno
Jihlavská 20
625 00 Brno
e-mail: evlckova@email.cz

Přijato k recenzi: 17. 9. 2015

Přijato do tisku: 11. 11. 2015

Klíčová slova

neuropatie tenkých vláken – polyneuropatie – onemocnění autonomního nervového systému – vyšetření potivosti – sympatická kožní odpověď

Key words

small fiber neuropathy – polyneuropathies – autonomic nervous system diseases – sweating – sympathetic skin response

Úvod

Sympatická kožní odpověď (Sympathetic Skin Response; SSR) je definována jako přechodná změna elektrického potenciálu kůže, která může být reflexně vyvolána řadou vnitřních či zevních stimulů [1–3]. Vyvolávajícím podnětem může být např. nadprahová elektrická či magnetická stimulace, neočekávaný sluchový podnět, prudké inspirium, úleková reakce, ale i emoce [2]. SSR stejně jako alternativa metody, při níž je místo změny kožního potenciálu měřena změna kožního odporu (tzv. galvanická kožní odpověď; galvanic skin response) [4], byly mj. široce testovány jako „detektor lži“. Podkladem změny kožního potenciálu je pohyb iontů zejména přes membránu buněk ekkrinálních potních žláz [4]. Proto je SSR obvykle řazena mezi testy sudomotorických funkcí, i když na rozdíl od jiných sudomotorických testů ve skutečnosti netestuje vlastní povinnost. Sudomotorické funkce lze hodnotit i dalšími testy, k nimž patří např. kvantitativní sudomotorický test (Quantitative Sudomotor Axon Reflex Test; QSART) či termoregulační testování potivosti (thermoregulatory sweat testing) [2]. Tyto testy jsou však složitější než SSR a vyžadují specializované vybavení, takže nejsou tak široce dostupné jako vyšetření SSR.

SSR je polysynaptický reflex s variabilní aferentací a společnou eferentní částí sestávající z míšních autonomních neuronů, pre- a postganglionárních sympatických nervových vláken a potní žlázy jako efektoru. Reflex je modifikován suprasegmentálními strukturami, především hypothalamem a retikulární formací horního kmene. Experimentální práce prokazují, že 95 % doby potřebné k vyvolání odpovědi představuje vedení nemyelinizovanými tenkými nervovými vlákny typu C s rychlostí 1–2 m/s [5].

Jedná se o velmi jednoduchý a v současnosti široce dostupný test [2,3,5] proveditelný pomocí jakéhokoli standardního elektromyografického přístroje a běžně používaných elektrod. V praxi je nejčastěji testována odpověď na nadprahovou elektrickou stimulaci periferního nervu (nejčastěji nervus medianus, ulnaris nebo tibialis) s intenzitou dostatečnou k vyvolání bolestivého vjemu, případně reakce na prudké inspirium [5].

Reprodukovatelnost odpovědi je nutno ověřit opakovanou stimulací (obvykle je doporučováno 5–10 opakování), kterou je však nutno provádět s maximální frekvencí 2/min, protože odpověď jeví tendenci k tzv. habituaci (tj. snížení či vymizení odpovědi

při opakované stimulaci, zejména s vyšší frekvencí) [2,3,5].

Hodnocena bývá výbavnost odpovědi a její reprodukovatelnost, latence, amplituda, event. vybavitelnost různými typy užívané stimulace [2,3,5]. V publikované literatuře dosud neexistuje jednoznačná shoda v definici abnormality SSR. Za nejspolehlivější indikátor abnormality je považována nevybavnost odpovědi [1,6–9], zatímco hodnocení amplitud (a méně i latencí) je pokládáno za méně spolehlivé zejména vzhledem vysoké intraindividuální variabilitě odpovědi a širokému překryvu hodnot těchto parametrů mezi zdravými jedinci a pacienty se susp. autonomní dysfunkcí v rámci onemocnění centrálního či periferního nervového systému [1,6–9].

SSR je nejčastěji využívána pro testování sudomotorických cholinergních funkcí, přičemž iniciální a nadále dominantní využití metodiky je v testování eferentních nemyelinizovaných sympatických nervových vláken v rámci periferních neuropatií [1,9]. Test však lze využít i pro testování změn autonomních funkcí při alteraci centrálních struktur zapojených do regulace odpovědi [2,3].

Pre- i postgangliová autonomní nervová vlákna patří mezi tenká nervová vlákna [10]. SSR je tedy především testem autonomních tenkých nervových vláken. Neuropatie postihující autonomní tenká nervová vlákna patří spolu se senzitivní neuropatií tenkých vláken (NTV) do širší skupiny NTV. U pacientů s NTV nemusí být senzitivní a autonomní vlákna postižena současně, a klinickému obrazu tudíž může dominovat postižení vegetativní či senzitivní.

V rámci klinické praxe se v posledních letech přesto opakovaně setkáváme s využitím SSR jako jediného provedeného testu funkce tenkých nervových vláken, na základě jehož výsledků (s variabilní definicí abnormality v různých elektrofyziologických laboratořích) je stanovena či vyloučena diagnóza NTV.

Přínos SSR pro diagnostiku NTV přitom dosud cíleně reflektuje jediná práce [11], která prokázala u většiny pacientů s NTV signifikantní prodloužení latence SSR na některé z vyšetřovaných končetin. Tyto nálezy jsou ovšem v přímém rozporu s výsledky většiny dalších publikací zaměřených na diagnostickou validitu SSR u polyneuropatií obecně. Např. Brill et al prokázali u pacientů s diabetickou polyneuropatií nevybavnost SSR jako nejspolehlivější typ abnormality, zatímco hodnocení latencí odpovědi ne-

bylo v diagnostice periferní neuropatie výtečně [9]. Přínos SSR pro diagnostiku NTV tak nadále zůstává nejasný.

Cílem práce bylo proto zhodnocení diagnostické validity metodiky a jednotlivých sledovaných parametrů v diagnostice dysfunkce tenkých nervových vláken pomocí vyšetření velmi dobře definovaného souboru pacientů s NTV nebo s kombinovaným postižením vláken tenkých a silných.

Soubor

Do studie bylo zařazeno 69 pacientů s bolestivou distální polyneuropatií s prokázaným postižením tenkých senzitivních nervových vláken (41 mužů, 28 žen, průměrný věk $56,8 \pm 12,7$ let, rozmezí 23–83 let) (tab. 1). Postižení tenkých nervových vláken bylo potvrzeno pomocí vyšetření intraepidermální hustoty tenkých nervových vláken z kožní biopsie a dále pomocí vyšetření termické či termoalgie senzitivity v rámci kvantitativního testování senzitivity. Obě uvedené diagnostické metody vykazovaly abnormalitu u všech zařazených pacientů. Dle aktuální klasifikace NTV pro výzkumné účely [10] šlo tedy ve všech případech o postižení jisté nebo pravděpodobné. Třicet tři zařazených jedinců mělo izolovanou neuropatii tenkých nervových vláken (tab. 1), a tedy normální nález v kondukčních studiích periferních nervů, 36 pacientů mělo převážně senzitivní polyneuropatii s kombinovaným postižením vláken tenkých a silných (PNP; tab. 1), a tudíž abnormalitu kondukčních studií, především v senzitivním neurogramu. Etiologie periferně neurogenního postižení byla různá, nejčastěji šlo o polyneuropatii diabetickou či toxickou (v rámci chronického abúzu alkoholu či po aplikované chemoterapii). U čtvrtiny pacientů bylo postižení idiopatické neboli u nich nebylo možné prokázat žádný běžně hodnocený příčinný faktor periferně neurogenní léze.

Kontrolní soubor tvořilo 89 zdravých dobrovolníků (40 mužů, 49 žen, průměrný věk $42,8 \pm 15,2$ let, rozmezí 20–80 let), především z řad zaměstnanců kliniky, jejich příbuzných a známých. Tito jedinci měli normální klinické neurologické vyšetření a nevykazovali pozitivní ani negativní senzitivní symptomy, korelující s event. polyneuropatií. Další vylučující kritérium byla anamnestická přítomnost rizikových faktorů periferně neurogenních lézí (zejména diabetu mellitu, chronického abúzu alkoholu či stavu po aplikaci chemoterapie). Asi u třetiny pacientů byla současně provedena kožní biopsie, 70 % pacientů

SYMPATICKÁ KOŽNÍ ODPOVĚĎ V DIAGNOSTICE NEUROPATIE TENKÝCH VLÁKEN

Tab. 1. Základní charakteristiky souboru a hodnocené parametry sympatické kožní odpovědi (SSR) v souboru zdravých kontrol (ZK) a v souborech pacientů s neuropatií tenkých vláken (NTV) a s polyneuropatií s kombinovaným postižením vláken silných (PNP).

Hodnocený parametr ¹	Polyneuropatie (PNP, n = 36)	Neuropatie tenkých vláken (NTV, n = 33)	Zdravé kontroly (ZK, n = 35)	p ²
věk	58 (38; 77)	58 (30; 72)	53 (30; 80)	0,218
muži	n = 22 (61,1 %)	n = 19 (57,6 %)	n = 17 (48,6 %)	0,550
SSR na horních končetinách				
<i>výbavnost (alespoň dvě reprodukovatelné odpovědi):</i>				
elektrickou stimulací (ES) (3–6násobkem prahu)	34 (94 %)	31 (94 %)	34 (97 %)	0,799
jen vysokou intenzitou el. proudu (100 mA)	1 (3 %)	1 (3 %)	1 (3 %)	0,998
jen prudkým inspiřiem	1 (3 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0,385
žádným z uvedených způsobů = nevýbavná SSR	0 (0 %)	1 (3 %)	0 (0 %)	0,337
reprodukovatelnost odpovědí, výbavných ES (%)*	75 (40; 100) ^b	70 (30; 100) ^b	100 (60; 100) ^a	0,006
Průměrné hodnoty odpovědí				
latence minimální (s)*	1,42 (1,27; 1,89)	1,40 (1,13; 1,62)	1,38 (1,11; 1,77)	0,065
latence průměrná (s)*	1,53 (1,34; 2,08)	1,48 (1,30; 1,71)	1,47 (1,23; 1,84)	0,070
amplituda průměrná (mV)*	0,98 (0,28; 1,84) ^b	1,10 (0,27; 3,60) ^{ab}	1,04 (0,40; 4,12) ^a	0,040
amplituda maximální (mV)*	1,54 (0,33; 3,21)	1,73 (0,46; 5,01)	1,79 (0,60; 6,31)	0,111
Výskyt abnormit³				
reprodukovatelnost odpovědí, výbavných ES (%)*	9 (25 %) ^b	11 (33 %) ^b	1 (3 %) ^a	0,005
latence minimální*	5 (14 %)	1 (3 %)	1 (3 %)	0,106
latence průměrná*	6 (17 %)	2 (6 %)	1 (3 %)	0,096
amplituda průměrná*	7 (19 %)	3 (9 %)	1 (3 %)	0,072
amplituda maximální*	7 (19 %) ^b	2 (6 %) ^{ab}	1 (3 %) ^a	0,042
jedna a více abnormit na HKK (latence, amplitudy)*	11 (31 %) ^b	5 (15 %) ^{ab}	2 (6 %) ^a	0,020
Intraindividuální variabilita parametrů SSR (CV_{intra})⁴				
latence*	4,58 (2,33; 9,61)	4,73 (2,37; 7,99)	4,12 (2,14; 7,69)	0,406
amplituda*	31,43 (12,60; 78,73)	32,71 (17,68; 61,59)	29,63 (15,32; 52,77)	0,457
Interindividuální variabilita parametrů SSR (CV_{inter})⁵				
latence*	12,49	10,12	10,52	
amplituda*	63,62	81,13	83,59	
SSR na dolních končetinách				
<i>výbavnost (alespoň dvě reprodukovatelné odpovědi):</i>				
elektrickou stimulací (ES) (3–6násobkem prahu)	19 (53 %) ^b	28 (85 %) ^a	33 (94 %) ^a	< 0,001
jen vysokou intenzitou el. proudu (100 mA)	2 (6 %)	1 (3 %)	2 (6 %)	0,846
jen prudkým inspiřiem	3 (8 %)	1 (3 %)	0 (0 %)	0,181
žádným z uvedených způsobů = nevýbavná SSR	12 (33 %) ^b	3 (9 %) ^a	0 (0 %) ^a	< 0,001
reprodukovatelnost odpovědí, výbavných ES (%)*	50 (0; 100) ^b	70 (0; 100) ^a	90 (30; 100) ^a	< 0,001

Tab. 1 – pokračování. Základní charakteristiky souboru a hodnocené parametry sympatické kožní odpovědi (SSR) v souboru zdravých kontrol (ZK) a v souborech pacientů s neuropatií tenkých vláken (NTV) a s polyneuropatií s kombinovaným postižením vláken silných (PNP).

Hodnocený parametr ¹	Polyneuropatie (PNP, n = 36)	Neuropatie tenkých vláken (NTV, n = 33)	Zdravé kontroly (ZK, n = 35)	p ²
Průměrné hodnoty odpovědi				
latence minimální (s)*	1,97 (1,72; 2,43)	2,03 (1,40; 2,35)	1,94 (1,58; 2,33)	0,972
latence průměrná (s)*	2,11 (1,88; 2,66)	2,17 (1,95; 2,58)	2,11 (1,75; 2,47)	0,394
amplituda průměrná (μV)*	0,52 (0,18; 0,94)	0,65 (0,19; 1,98)	0,53 (0,18; 2,08)	0,182
amplituda maximální (μV)*	0,80 (0,27; 1,75)	1,05 (0,26; 3,50)	0,91 (0,27; 3,37)	0,179
Výskyt abnormit³				
reprodukovatelnost odpovědí, výbavných ES (%) ^a	17 (47 %) ^b	5 (15 %) ^a	2 (6 %) ^a	< 0,001
latence minimální*	2 (9 %)	2 (7 %)	0 (0 %)	0,346
latence průměrná*	2 (9 %)	2 (7 %)	0 (0 %)	0,346
amplituda průměrná*	5 (24 %)	2 (7 %)	1 (3 %)	0,200
amplituda maximální*	3 (14 %)	3 (10 %)	1 (3 %)	0,528
jedna a více abnormit na DKK (latence, amplitudy)*	5 (24 %)	5 (15 %)	1 (3 %)	0,140
Intraindividuální variabilita parametrů SSR (CV)⁴				
latence*	5,24 (2,43; 7,61)	3,67 (1,88; 9,99)	3,97 (2,10; 6,64)	0,178
amplituda*	38,55 (22,10; 55,10)	37,14 (13,73; 66,08)	32,96 (10,57; 60,17)	0,439
Interindividuální variabilita parametrů SSR (CVinter)⁵				
latence*	15,86	9,98	10,25	
amplituda*	85,27	81,95	83,53	

U parametrů označených * byly statisticky zpracovány pouze odpovědi získané elektrickou stimulací o intenzitě odpovídající 3–6násobku stimulačního prahu (tzn. že z analýzy byly vyloučeni pacienti s odpovědí nevybavnou oběma typy stimulace i jedinci s odpovědí evokovatelnou pouze prudkým inspiřiem).

¹ Hodnoty jsou vyjádřeny jako absolutní (relativní) frekvence pro kategoriální proměnné a jako medián (rozsah hodnot definovaný 5. a 95. percentilem) pro kontinuální proměnné.

² Srovnání provedeno Fisherovým exaktním testem pro kategoriální proměnné a ANOVA testem pro data kontinuální.

³ Výskyt abnormity příslušného parametru při hodnocení při hodnocení s použitím normativních dat získaných v širším souboru zdravých kontrol (tab. 2).

⁴ Intraindividuální koeficient variability vypočtený jako poměr směrodatné odchylky a průměru hodnot 5 (event. v případě nižší výbavnosti méně) SSR odpovědí získaných elektrickou stimulací o intenzitě 3–5násobku senzitivního prahu u daného pacienta v příslušné lokalizaci (na HKK nebo DKK).

⁵ Interindividuální variabilita hodnot příslušného parametru, vypočtená jako poměr směrodatné odchylky a průměru všech odpovědí všech pacientů v daném souboru, získaných elektrickou stimulací o intenzitě 3–5násobku senzitivního prahu.

^{a,b,c} Odlišná písmena představují statisticky významně rozdílné výsledky daného parametru mezi příslušnými skupinami na základě odpovídajících post hoc testů (Fisherův exaktní test pro kategoriální proměnné, Tukeyho test pro proměnné kontinuální).

CV – koeficient variability, DKK – dolní končetiny, ES – elektrická stimulace o intenzitě 3–6násobku senzitivního prahu, HKK – horní končetiny, NTV – neuropatie tenkých vláken, PNP – polyneuropatie, SSR – sympatická kožní odpověď, ZK – zdravé kontroly.

mělo vyšetřené kondukční studie periferních nervů a kvantitativní testování senzitivity – tato vyšetření nebyla požadována obligátně, byla však doplněna u jedinců s nízkou výbavností SSR či zřetelně nízkými hodnotami amplitud odpovědí k vyloučení postižení neuropatie silných nebo tenkých vláken jako podkladu možné SSR abnormity.

Nález v tomto rozsáhlém kontrolním souboru byly využity pro tvorbu věkově stratifi-

kovaných normativních dat (tab. 2). Pro tento účel byl soubor podle věku rozdělen na pět podskupin, odpovídajících jednotlivým dekádam. Normativní data pro jednotlivé parametry pak byla vytvořena zvlášť pro každou z těchto podskupin (tab. 2).

Za účelem srovnávacích analýz byla ze souboru zdravých dobrovolníků následně vybrána podskupina 35 zdravých jedinců obdobného věku a pohlaví, jaké vykazovaly

oba podsoubory pacientů s neuropatií (ZK; tab. 1).

Všichni zařazení pacienti i zdravé kontroly byli informováni o účelu vyšetření a podepsali informovaný souhlas. Projekt byl schválen etickou komisí FN Brno.

Metodika

U všech zařazených pacientů i zdravých kontrol bylo provedeno vyšetření SSR, a to na

Tab. 2. Věkově stratifikovaná demografická data a nálezy SSR v širším souboru zdravých kontrol a derivovaná normativní data pro jednotlivé hodnocené parametry.

Hodnocený parametr	20–30	30–40	40–50	50–60	60+	Korelace s věkem: r (p) ³
Demografické charakteristiky¹						
počet pacientů	21	21	17	19	11	
počet mužů	8	11	7	9	5	
věk: medián (rozmezí)	25 (20–29)	33 (30–39)	46 (40–49)	54 (51–59)	67 (60–80)	
Parametry SSR na HKK²						
reprodukovatelnost při ES (%)	100 (100 ; 100)	100 (80 ; 100)	100 (60 ; 100)	87,5 (70 ; 100)	87,5 (70 ; 100)	–0,18 (0,09)
latence minimální (s)	1,39 (1,19; 1,67)	1,43 (1,13; 1,58)	1,38 (1,25; 1,53)	1,33 (1,08; 1,60)	1,43 (1,33; 1,63)	0,04 (0,70)
latence průměrná (s)	1,52 (1,30; 1,72)	1,52 (1,33; 1,65)	1,47 (1,36; 1,67)	1,44 (1,23; 1,66)	1,53 (1,37; 1,71)	–0,01 (0,89)
amplituda průměrná (mV)	1,15 (0,50 ; 3,08)	1,99 (0,69 ; 4,95)	0,92 (0,24 ; 2,06)	1,43 (0,75 ; 2,28)	0,75 (0,40 ; 3,95)	–0,16 (0,14)
amplituda maximální (mV)	1,83 (0,72 ; 5,61)	3,28 (1,24 ; 7,51)	1,35 (0,60 ; 4,31)	2,05 (1,19 ; 3,20)	1,23 (0,56 ; 6,09)	–0,22 (0,04)
Parametry SSR na DKK²						
reprodukovatelnost při ES (%)	100 (40 ; 100)	100 (60 ; 100)	100 (40 ; 100)	87,5 (50 ; 100)	80 (30 ; 100)	–0,34 (0,001)
latence minimální (s)	2,01 (1,79; 2,33)	2,02 (1,72; 2,13)	1,97 (1,67; 2,33)	1,94 (1,58; 2,14)	2,12 (1,81; 2,47)	0,04 (0,70)
latence průměrná (s)	2,09 (1,87; 2,38)	2,11 (1,89; 2,34)	2,09 (1,88; 2,47)	2,10 (1,75; 2,25)	2,18 (1,88; 2,58)	0,04 (0,72)
amplituda průměrná (mV)	0,69 (0,27 ; 1,71)	0,93 (0,41 ; 2,50)	0,69 (0,24 ; 2,09)	0,89 (0,24 ; 2,08)	0,50 (0,22 ; 1,12)	–0,21 (0,05)
amplituda maximální (mV)	1,25 (0,48 ; 2,76)	1,54 (0,71 ; 3,47)	0,99 (0,37 ; 3,68)	1,13 (0,33 ; 3,37)	0,91 (0,37 ; 2,00)	–0,23 (0,03)

¹ Hodnoty jsou vyjádřeny jako absolutní frekvence pro kategoriální proměnné a jako medián (rozsah hodnot) pro kontinuální proměnné.

² Hodnoty jsou vyjádřeny jako medián (rozsah hodnot definovaný 5. a 95. percentilem). Doporučený dolní normální limit pro hodnocení výbavnosti a amplitud lze odvodit jako 5. percentil hodnot pro příslušnou věkovou kategorii, horní normální limit pro hodnocení latencí představuje 95. percentil hodnot v daném věkovém rozmezí. Pro lepší orientaci jsou limitní hodnoty v tabulce vyznačeny kurzívou.

³ Hodnoty vyjádřeny jako Spearmanův korelační koeficient r (statistická významnost p).

ES – elektrická stimulace o intenzitě 3–6násobku senzitivního prahu, SSR – sympatická kožní odpověď.

horních (HKK) a následně i na dolních končetinách (DKK). Vyšetření probíhalo v tichém klidném prostředí, před započítáním testování byli vyšetřovaní jedinci detailně obeznámeni s jeho průběhem. Při vyšetření HKK byly aktivní elektrody umístěny na dlaních a referenční na hřbetech obou rukou a stimulován byl nervus ulnaris (jednostranně, obvykle vpravo), na DKK byly aktivní elektrody na ploskách a referenční na dorzech obou nohou a odpověď byla vyvolána stimulací n. tibialis (opět jednostranně, obvykle vpravo). Před započítáním vlastní stimulace byl u vyšetřovaného jedince stanoven práh citivosti pro stimulaci elektrickým proudem ve vyšetřované lokalizaci (tedy na zápěstí nad průběhem nervus ulnaris při vyšetření HKK a za vnitřním kotníkem nad průběhem nervus tibialis při vyšetření DKK). Vlastní stimulace probíhala ve zmíněných lokalizacích iniciální intenzitou rovnou trojnásobku takto stanoveného senzitivního prahu. Stimulace

byla provedena vždy alespoň 5x v každé lokalizaci, intenzita stimulace postupně narůstala (maximálně k hodnotě odpovídající šestnásobku senzitivního prahu), zejména nebyla-li při úvodních stimulech odpověď vybavena. Pokud se při tomto způsobu stimulace nepodařilo vybavit odpověď i přes dosažení maximální stimulační intenzity (tj. 100 mA při délce trvání podnětu 0,3 ms), byla opět po předchozí instruktaži testována ještě výbavnost prudkým inspirem. Metodika vyšetření odpovídá publikovaným doporučením [2,3,5].

Hodnocena byla výbavnost odpovědí příslušným typem stimulace (tedy elektrickým proudem o základní intenzitě 3–6násobku senzitivního prahu, elektrickým proudem o intenzitě 100 mA a prudkým inspirem) a (v případě výbavnosti odpovědi) dále reprodukovatelnost při stimulaci základní intenzitou elektrického proudu (tj. počet vybavených odpovědí/počet stimulů), průměrná

(a nejkratší) latence vybavených odpovědí a jejich průměrná (a maximální) amplituda.

Hodnoceny byly jednak absolutní hodnoty jednotlivých parametrů (reprodukovatelnost, minimální a průměrná latence, průměrná a maximální amplituda), jednak výskyt jejich abnormit ve srovnání s nálezy v odpovídající věkové skupině širšího souboru zdravých dobrovolníků. Doporučený dolní normální limit pro hodnocení reprodukovatelnosti a amplitud odpovědí byl odvozen jako 5. percentil hodnot v příslušné věkové kategorii širšího souboru zdravých dobrovolníků. Horní normální limit pro hodnocení latencí byl vypočten jako 95. percentil hodnot v daném věkovém rozmezí v tomto souboru. Použitá normativní data jsou uvedena v tab. 2. Pro lepší orientaci jsou limitní hodnoty v tabulce vyznačeny kurzívou.

Posledním hodnoceným parametrem byla variabilita parametrů SSR odpovědi.

Testována byla intraindividuální variabilita latencí a amplitud, vyjádřená u každého pacienta jako intraindividuální variační koeficient (CV_{intra}), vypočtený z průměru a směrodatné odchylky hodnot příslušného parametru při opakovaných stimulacích u daného pacienta ($CV_{intra} = x/SD \times 100$).

Interindividuální variační koeficient (CV_{inter}) byl vypočten identickým způsobem souhrnně ze všech hodnot daného parametru (tedy latencí nebo amplitud) získaných základní elektrickou stimulací o intenzitě odpovídající 3–6násobku senzitivního prahu v dané skupině pacientů a lokalizaci.

Srovnání hodnot mezi jednotlivými skupinami bylo provedeno Fisherovým exaktním testem pro kategoriální proměnné a ANOVA testem s Tukeyho post hoc korekcí pro data kontinuální.

Výsledky

Sumarizace výsledků všech hodnocených parametrů v každé ze tří sledovaných skupin (NTV, PNP, ZK) a jejich vzájemné srovnání je uvedena v tab. 1.

Alespoň dvě reprodukovatelné odpovědi byly na HKK vybaveny u všech zdravých jedinců a s výjimkou jednoho pacienta s NTV i u všech jedinců s periferní neuropatií (tab. 1). Ve všech případech (vyjma jednoho pacienta s PNP a jednoho vyše uvedeného s NTV) bylo odpověď možné vybavit elektrickou stimulací. Vybavnost prudkým inspiroem proto s výjimkou těchto dvou pacientů na HKK nebyla testována (tab. 1). K vybavení odpovědi byla u většiny pacientů dostačující stimulace elektrickým proudem o intenzitě odpovídající 3–6násobku senzitivního prahu. Pouze u jednoho pacienta v každé skupině (NTV, PNP, ZK) byla pro vybavení alespoň dvou reprodukovatelných odpovědí nezbytná stimulace vysokou intenzitou elektrického proudu (100 mA).

Na DKK byla odpověď při stimulaci elektrickým proudem vybavena u všech zdravých jedinců a u 50 z 69 testovaných pacientů s neuropatií, čtyři další pacienti s PNP nebo NTV měli pak odpověď vybavnou po stimulaci prudkým inspiroem. Celkem se tak SSR nezdařilo vybavit žádným z použitých typů stimulace u 15 z 69 pacientů s periferní neuropatií (22 %), přičemž nevybavnost odpovědi (ať už elektrickou stimulací nebo obecně některou z použitých stimulačních metod) byla statisticky významně častější ve skupině pacientů s kombinovaným postižením silných a tenkých vláken než mezi jedinci s izolovanou lézí vláken ten-

kých (tab. 1). Naopak rozdíly vybavnosti mezi pacienty s izolovaným postižením tenkých nervových vláken a zdravými kontrolami nedosáhly statistické významnosti, i když byl přítomen jednoznačný trend k nižší vybavnosti u pacientů s NTV ($p = 0,20$ pro vybavnost základní stimulační intenzitou elektrického proudu a 0,068 pro nevybavnost SSR) (tab. 1).

Reprodukovatelnost SSR (tedy počet vybavných odpovědí z počtu stimulací) byla na HKK signifikantně nižší u pacientů s PNP i NTV oproti zdravým kontrolám (tab. 1). Také výskyt abnormit tohoto parametru ve srovnání s věkově stratifikovanými normami byl v obou skupinách pacientů signifikantně vyšší oproti souboru zdravých kontrol (tab. 1).

Na DKK byla reprodukovatelnost významně nižší jen ve skupině pacientů s kombinovaným postižením silných a tenkých vláken. U pacientů s NTV byl také patrný trend k nižší reprodukovatelnosti odpovědi oproti ZK, který však nedosáhl statistické významnosti ($p = 0,15$) (tab. 1). Prakticky identické výsledky byly patrné při hodnocení výskytu abnormit v porovnání s normativními daty. Abnormálně nízká reprodukovatelnost odpovědi byla signifikantně častější u pacientů s PNP, zatímco u pacientů s NTV byl patrný trend k vyššímu výskytu abnormit tohoto parametru, bez statistické významnosti ($p = 0,20$) (tab. 1).

Amplitudy SSR byly obecně vyšší a latence kratší na HKK oproti DKK, a to jak u zdravých jedinců, tak u pacientů s neuropatií. Tyto rozdíly mezi HKK a DKK byly u všech zmíněných parametrů vysoce statisticky významné ve všech sledovaných skupinách (statistická významnost detailně neuvedena, rozdíly hodnot jsou patrné z tab. 1).

V širším souboru zdravých kontrol byla prokázána negativní korelace amplitud a vybavnosti odpovědi s věkem (nebo alespoň trend k takové korelaci), zatímco vliv věku na hodnoty latencí odpovědi nebyl přesvědčivě prokázán (tab. 2).

Při hodnocení latencí odpovědi nebyl prokázán významný rozdíl mezi vyšetřovanými skupinami (NTV, PNP, ZK) na HKK ani na DKK, i když zejména na HKK byl naznačen trend k mírně vyšším latencím odpovědi u pacientů neuropatií, a to především s kombinovaným typem postižení silných a tenkých vláken, nicméně bez statistické významnosti a s malými absolutními hodnotami rozdílů a vysokým překryvem hodnot mezi sledovanými skupinami. Rozdíly latencí

mezi pacienty s NTV a zdravými kontrolami byly jednoznačně nevýznamné v obou hodnocených lokalizacích (tab. 1). Obdobně nebyl u pacientů s PNP ani NTV prokázán významně vyšší výskyt abnormit latencí SSR na HKK ani DKK oproti skupině zdravých dobrovolníků (tab. 1). Záchyt abnormit pomocí hodnocení latencí byl obecně velmi nízký v obou testovaných lokalizacích (max. 17 % jedinců ve sledovaných souborech pacientů) (tab. 1).

Amplitudy odpovědi byly zejména na HKK poněkud nižší u pacientů s neuropatií se smíšeným postižením tenkých a silných nervových vláken oproti zdravým kontrolám. Tento trend byl výraznější při hodnocení průměrných amplitud (kde dokonce dosáhl statistické významnosti) než při zohlednění amplitud maximálních (tab. 1). Podobný trend (bez statistické významnosti) byl ve skupině pacientů s PNP prokázán i na DKK. U pacientů s izolovaným postižením tenkých nervových vláken redukce amplitud prokázána nebyla. Obecně však byly absolutní rozdíly amplitud v jednotlivých skupinách poměrně malé a byl patrný velmi výrazný překryv hodnot mezi skupinami pacientů a kontrol (tab. 1). S touto skutečností koreluje i poměrně nízký záchyt abnormit tohoto parametru při srovnání s normativními daty – ty byly častější u jedinců s PNP, vyskytovaly se však u méně než 1/4 hodnocených pacientů (tab. 1).

Souhrnný výskyt abnormit latencí a/nebo amplitud byl ve všech hodnocených skupinách poměrně nízký. Na HKK byla v souboru pacientů s PNP alespoň jedna abnormita těchto parametrů sice zachycena významněji než v souboru zdravých kontrol, přesto kumulativní senzitivita těchto parametrů dosáhla pouze 31 %. V souboru NTV byla alespoň jedna abnormita latencí nebo amplitud zachycena jen u 15 % pacientů, což se od souboru zdravých kontrol statisticky nelišilo.

Na DKK byl výskyt abnormit dokonce ještě méně častý. Jedna či více abnormit latencí či amplitud byla na DKK zachycena pouze u necelé 1/4 pacientů s periferní neuropatií s vybavnou SSR odpovědi (tab. 1).

Intra- i interindividuální variabilita hodnot latencí i amplitud byla obdobná ve všech třech skupinách pacientů a prakticky identická na HKK a DKK. Na intra- i interindividuální úrovni byla prokázána poměrně nízká variabilita latencí, zatímco variabilita amplitud byla několikanásobně vyšší (tab. 1).

Diskuze

Prezentovaná práce je první publikovaná systematická studie, zaměřená na validitu vyšetření SSR v diagnostice neuropatie s izolovaným postižením tenkých nervových vláken a s kombinovaným postižením vláken tenkých a silných na poměrně velkém a velmi dobře definovaném souboru pacientů v porovnání s rozsáhlým souborem zdravých kontrol.

Naše studie potvrdila nevybavnost odpovědi jako nejspolehlivější typ SSR abnormality, a to především na DKK, kde jsme však takový nález prokázali u méně než 10 % pacientů s izolovaným postižením tenkých nervových vláken. Hodnocení latencí a amplitud prokázalo nízkou senzitivitu i spolehlivost vzhledem k vysokému překrytu hodnot mezi pacienty s periferními neuropatiemi a zdravými kontrolami a zejména v případech amplitud také z důvodu vysoké intra- i interindividuální variability hodnot. Přes zohlednění všech výše uvedených typů abnormalit se tak SSR jeví jako málo senzitivní test v diagnostice senzitivní NTV.

Využití SSR v diagnostice NTV má nesporně racionální opodstatnění s ohledem na skutečnost, že SSR odráží vedení tenkými cholinergními nemyelinizovanými sympatickými nervovými vlákny. Současně jde o test snadno proveditelný a široce dostupný, na rozdíl od ostatních diagnostických metod NTV (tedy kvantitativního testování senzitivity a kožní biopsie či korneální konfokální mikroskopie) [10]. Jedná se ale o metodu, jejíž diagnostická validita nebyla v této indikaci dosud systematicky hodnocena. U části pacientů s NTV zcela dominuje senzitivní postižení a klinické známky i subjektivní symptomy autonomní dysfunkce u nich nejsou patrné. SSR navíc není specifický test reflektující autonomní dysfunkce pouze u periferních neuropatií postihujících tenká nervová vlákna. Jedná se o polysynaptický reflex s aferentní částí reflexního oblouku, zprostředkovanou silnými nervovými vlákny, a významnou suprasegmentální modulací. Abnormality odpovědi jsou tak prokazovány u řady onemocnění centrálního nervového systému (např. u míšních lézí, Alzheimerovy či Parkinsonovy choroby a dalších extrapyramidových onemocnění, roztroušené sklerózy i stavech po cévních mozkových příhodách) [2,8], stejně jako u jedinců s chronickými bolestivými stavy, např. fibromyalgií [12] či recentně u pacientů s chronickým lumbagem a/nebo bolestmi zad po operacích páteře (tzv. failed back surgery syndro-

mem) [13]. Jedná se tedy o vysoce nespecifickou metodu odrážející dysfunkci silných i tenkých nervových vláken i suprasegmentální modulační vlivy, jejíž abnormalita je prokazatelně přítomna u řady různých neurologických onemocnění, což významně snižuje využitelnost metodiky jako klíčového diagnostického testu NTV.

SSR je vybavná řadou různých stimulačních metod. Nejčastěji je v klinické praxi využívána stimulace elektrickým proudem. Použitá intenzita stimulace by měla být dostatečná pro vyvolání odpovědi. Většinou je doporučováno volit intenzitu odpovídající troj- a vícenásobku senzitivního prahu pro stimulaci elektrickým proudem a použít dostatečný počet stimulací, pokud možno ve zvyšující se intenzitě jako prevence habituace odpovědi [5]. Tato metodika byla zvolena i v naší studii. Není-li odpověď vybavná tímto způsobem, je vhodné zvážit testování vybavnosti vyšší intenzitou elektrického proudu nebo prudkým inspiem [5]. Při nedostatečné intenzitě stimulace totiž případná nevybavnost odpovědi nemusí odrážet přítomnost abnormalit v eferentní části reflexního oblouku (zprostředkované tenkými nervovými vlákny), ale v části aferentní. Studie používající k vybavení odpovědi pouze stimulaci elektrickým proudem nižší konstantní intenzity tak prokazují nevybavnost odpovědi daleko častěji než naše práce [9]. Jde však v podstatě o falešně pozitivní výsledky testu, přinejmenším z hlediska průkazu dysfunkce tenkých nervových vláken, na který je zaměřena naše studie. Například Brill et al prokázali u rozsáhlého souboru pacientů s diabetickou neuropatií (definovanou na základě přítomnosti senzitivních symptomů a abnormality kondučních studií a/nebo kvantitativního testování senzitivity pro chlad a vibrace) nevybavnost SSR na HKK v 31 % případů a u diabetiků bez prokázané polyneuropatie v 11 %, na DKK pak nebyla odpověď vybavná dokonce u 85 % pacientů s diabetickou polyneuropatií a pouze u 8 % diabetiků bez známek PNP [9]. Tyto nálezy by svědčily pro velmi dobrou senzitivitu SSR v diagnostice periferních neuropatií. Testovány ovšem byly pouze tři podněty o konstantní intenzitě 15–20 mA v každé z obou lokalizací. Naše nálezy však prokazují, že u významné části pacientů s periferními neuropatiemi je odpověď vybavná až při použití vyšších intenzit stimulace elektrickým proudem či dokonce až s využitím stimulace prudkým inspiem. Odpověď lze přesto vybat, a to s jinak fyziologickými pa-

rametry (latence, amplitudy), což svědčí proti významné dysfunkci tenkých nervových vláken. Při zohlednění této skutečnosti je tedy spolehlivost průkazu nevybavnosti odpovědi způsobem použitým ve studii Brill et al poměrně nízká, resp. poskytuje odlišnou informaci: odráží pravděpodobně určitou periferně neurogenní dysfunkci (např. horší stimulovatelnost periferních nervů nižšími intenzitami elektrického proudu), není však spolehlivým indikátorem dysfunkce tenkých nervových vláken [9].

Spornou otázkou je definice abnormality SSR. Za nejspolehlivější abnormální nález je považována nevybavnost odpovědi (pokud není způsobena habituací či technickou chybou, např. nedostatečnou stimulací) [1,6–9]. Naopak názory na význam hodnocení amplitudy SSR a její latence se různí. Někteří autoři nedoporučují hodnocení těchto parametrů a jako jedinou známku abnormality připouštějí absenci odpovědi [1], jiní zohledňují snížení amplitudy (přičemž je vzhledem k variabilitě odpovědí a jejich habituaci obvykle doporučováno hodnotit spíše nejlepší odpověď z 5–10 stimulací než odpověď průměrnou) [6,7,14] a další práce připouštějí jako známku abnormality SSR i prolongaci průměrné latence odpovědi [6,7].

V naší studii jsme alespoň dvě reprodukovatelné SSR odpovědi vybavili u všech zdravých kontrol. Ve shodě s dříve publikovanými pracemi [6–9] tak naše nálezy prokazují, že SSR je vybavná u všech zdravých jedinců a její nevybavnost je spolehlivou známkou abnormality na HKK i DKK. U většiny zdravých kontrol (97 % na HKK, 94 % na DKK) byla pro vybavení odpovědi dostačující stimulace základní intenzitou elektrického proudu (tedy 3–6násobkem prahu). Situace, kdy není SSR vybavná tímto způsobem a pro její vybavení je nutné použití jiných typů stimulace, je proto s vysokou pravděpodobností také ukazatelem abnormality, pravděpodobně však neodráží dysfunkci tenkých nervových vláken, protože v našem souboru byl tento vzorec významně častější u pacientů s kombinovaným postižením silných a tenkých vláken než u jedinců s izolovaným postižením vláken tenkých (kde se výskyt tohoto typu abnormality nelišil od souboru zdravých kontrol).

Nevybavnost odpovědi jako spolehlivá známka abnormality SSR však byla v naší studii prokázána na DKK pouze u 9 % pacientů s NTV. Častěji byla tato abnormalita zachycena u pacientů s kombinovaným postižením vláken tenkých a silných, kde jsme ji prokázali

u 1/3 všech zařazených jedinců. Vyšší výskyt abnormit u této skupiny pacientů zřejmě odráží skutečnost, že u pacientů se smíšeným postižením silných a tenkých vláken je postižení senzitivních tenkých nervových vláken pokročilejší než u jedinců s izolovanou NTV [15] a lze u nich častěji předpokládat i postižení vláken autonomních. Zcela raritní pak byla nevybavnost odpovědi na HKK (kde byla zachycena pouze u jednoho pacienta s NTV). Nevybavnost SSR tedy sice představuje spolehlivou abnormitu, senzitivita tohoto parametru v diagnostice NTV je však nízká. Důvody diskrepance nízké senzitivity nevybavnosti odpovědi v naší studii s některými dříve publikovanými pracemi [9] jsou dominantně podmíněny metodicky a byly vysvětleny výše. Při zaměření na diagnostiku NTV se nicméně metodika použitá v naší studii jeví jako racionálnější. Určitý podíl na rozdílných výsledcích obou studií pak může mít i odlišné spektrum pacientů. Ve studii publikované Brilem et al měla většina pacientů abnormitu kondukčních studií periferních nervů a/nebo vibračního cití jako známku dysfunkce silných nervových vláken [9]. Lze u nich tedy předpokládat více vyjádřené postižení tenkých nervových vláken [15], vč. častější léze autonomních vláken, což je pravděpodobně jedním z důvodů vyšší prokázané senzitivity vyšetření SSR v této studii [9] v porovnání s výsledky naší studie. Také v našem souboru pacientů s kombinovaným postižením silných a tenkých nervových vláken jsme prokázali nevybavnost odpovědi základní intenzitou elektrického proudu podstatně častěji (u 47 % pacientů) než u jedinců s izolovaným postižením vláken tenkých.

Reprodukovatelnost odpovědi (počet vybavených odpovědí z počtu stimulací) byla v našem souboru prokazatelně nižší v obou souborech pacientů s neuropatií (tedy při postižení tenkých nervových vláken i jeho kombinaci s postižením vláken silných) než u zdravých kontrol. Tento parametr je tudíž také možné považovat za poměrně spolehlivý ukazatel dysfunkce tenkých autonomních nervových vláken a méně než 40 % vybavitelných odpovědí je pravděpodobnou známkou dysfunkce SSR.

Všechny ostatní parametry SSR (latence, amplitudy) byly v naší studii hodnoceny pouze u odpovědí získaných elektrickou stimulací (z analýzy byli tedy vyloučeni nejen pacienti s odpovědí nevybavnou žádným typem stimulace, ale i jedinci s odpovědí evokovatelnou pouze prudkým inspiriem).

Důvodem pro vyloučení odpovědi stimulovaných prudkým inspiriem byla v minulosti prokázaná odlišnost parametrů odpovědi výbavných tímto typem stimulace. Shani et al prokázali u zdravých jedinců statisticky významně vyšší amplitudu odpovědi po stimulaci prudkým inspiriem než po stimulaci elektrické. Také hodnocení latencí je při stimulaci prudkým inspiriem málo spolehlivé a stejně tak lze při tomto typu stimulace očekávat vyšší intra- i interindividuální variabilitu obou parametrů, protože stimulační podnět nelze validně kvantifikovat ani standardizovat [1].

Latence SSR odpovědi v naší studii plně odpovídaly dosud publikovaným normálním hodnotám tohoto parametru [2,9,16]. Průměrné ani minimální latence nevykazovaly na HKK ani DKK statisticky signifikantní rozdíly mezi zdravými kontrolami a pacienty s neuropatií silných ani tenkých vláken. Také výskyt abnormit tohoto parametru při srovnání s věkově stratifikovanými normativními daty byl nízký a ze statistického hlediska se nelišil od výskytu ojedinělých abnormálních nálezů v souboru zdravých kontrol. Tyto výsledky jsou zcela v korelaci s dalšími publikovanými soubory pacientů s polyneuropatií [9] a implikují skutečnost, že se hodnocení latencí SSR v diagnostice dysfunkce polyneuropatie tenkých ani silných nervových vláken nejeví jako přínosné.

Význam hodnocení amplitud je méně jednoznačný. Naše studie prokázala hraničně statisticky významný pokles amplitud SSR odpovědi u pacientů s neuropatií v porovnání se zdravými kontrolami, a to především na HKK (a méně na DKK, kde byl přítomen pouze trend v tomto smyslu, bez statistické významnosti). Rozdíly však byly patrné pouze u pacientů s kombinovaným postižením silných a tenkých nervových vláken, zatímco u pacientů s izolovaným postižením tenkých nervových vláken nebyla významná redukce amplitud SSR odpovědi zachycena. Podobně i výskyt abnormit amplitud odpovědi ve srovnání s věkově stratifikovanými normativními daty byl vyšší pouze u pacientů s kombinovaným postižením silných a tenkých vláken, ale nikoli u jedinců s izolovanou NTV. Tyto nálezy naznačují, že redukce amplitud SSR pravděpodobně není spolehlivou známkou dysfunkce tenkých nervových vláken, ale může souviset např. s nedostatečnou intenzitou stimulace při dysfunkci silných vláken v aferentní části reflexního oblouku. Rozdíly absolutních hodnot amplitud mezi jednotlivými skupinami

pacientů v naší studii byly navíc velmi malé a prokázali jsme široký překryv hodnot amplitud odpovědi mezi všemi hodnocenými soubory a jejich vysokou variabilitu, což dále významně limituje validitu hodnocení tohoto parametru. V souhrnu tak naše nálezy (v korelaci s dalšími publikovanými pracemi – např. Bril et al [9]) neprokázaly přínos hodnocení amplitud SSR v diagnostickém procesu pacientů s polyneuropatií, zejména pak ne v diagnostice dysfunkce tenkých nervových vláken.

Jako poměrně překvapivá se v naší studii může jevit vyšší statistická významnost rozdílů amplitud mezi pacienty s neuropatií a zdravými kontrolami na HKK než na DKK (kdy by dle očekávání měly být změny související s periferní neuropatií více vyjádřeny). Tyto rozdíly jsou však podmíněny statistickou metodologií a souvisejí s poměrně malým počtem jedinců s neuropatií a hodnotitelnou odpovědí SSR na DKK. Důvodem je častá nevybavnost SSR na DKK a také skutečnost, že ze statistických analýz byli z výše uvedených důvodů vyřazeni pacienti s odpovědí výbavnou pouze po stimulaci prudkým inspiriem. Nižší počet hodnocených jedinců pak samozřejmě snižuje významnost zachycených rozdílů.

Jedním z přínosů naší studie je vytvoření normativních dat pro řadu hodnocených parametrů na poměrně rozsáhlém souboru zdravých dobrovolníků. Naše výsledky prokázaly v souboru zdravých kontrol mírnou negativní korelaci řady hodnocených parametrů (zejména amplitud odpovědi a jejich reprodukovatelnosti) s věkem. Tyto nálezy jsou očekávatelné vzhledem k obecně známým, věkově podmíněným změnám většiny elektrofyziologických parametrů. Korelace SSR parametrů s věkem je však pouze mírná, což je zřejmě důvod, proč nebyla v některých předešlých studiích s podstatně menšími soubory zdravých dobrovolníků prokázána [9]. Průkaz korelace parametrů s věkem současně implikuje nutnost použití věkově stratifikovaných normativních dat, která poskytuje naše studie.

Výsledky SSR a využitelnost metodiky jsou významně limitovány variabilitou odpovědi. Hoeldtke et al nalezli při opakovaném vyšetření zdravých jedinců během téhož dne průměrnou intraindividuální variabilitu amplitud kolem 35 %, zatímco variabilita latencí byla pouze 8 % [14]. Námi zjištěné hodnoty CV jsou prakticky identické a je nutno je zohlednit při interpretaci nálezů a zejména při longitudinálním sledování pacientů, resp. při

hodnocení event. změn jednotlivých parametrů SSR (ať už v souvislosti s přirozeným vývojem onemocnění nebo např. v souvislosti s event. terapeutickou intervencí). Variabilita amplitud i latencí je obdobná na HKK i DKK a významně se neliší ani mezi zdravými jedinci a pacienty s periferně neurogenními lézemi.

V souhrnu prezentovaná studie poskytla validní normativní data pro řadu hodnocených parametrů SSR a potvrdila abnormální nález SSR u části pacientů s periferními neuropatiemi. Postižení tenkých autonomních vláken je však touto metodou prokazatelné pouze u malé části pacientů s čistou NTV (u nichž v našem souboru senzitivita SSR vyšetření nepřesáhla 10 % pro žádný z hodnocených parametrů vč. nevýbavnosti odpovědi jako nejspolehlivějšího typu abnormity). Daleko častěji je abnormita testu prokazována u pacientů s polyneuropatií s kombinovaným postižením tenkých a silných nervových vláken (u nichž je současně pravděpodobnější těžší stupeň postižení vláken tenkých). Ani v této skupině však senzitivita testu v našem souboru nepřesáhla 33 %. Při zohlednění nízké specifity SSR tedy SSR není optimální jako jediný diagnostický test NTV.

Seznam použitých zkratk

SSR – sympatická kožní odpověď (Sympathetic Skin Response)
 QSART – kvantitativní sudomotorický test (Quantitative Sudomotor Axon Reflex Test)
 NTV – neuropatie tenkých vláken
 PNP – polyneuropatie s kombinovaným postižením silných a tenkých vláken
 ZK – zdravé kontroly
 HKK – horní končetiny
 DKK – dolní končetiny
 mA – miliampér
 ms – milisekunda
 CV – variační koeficient
 CV_{intra} – intraindividuální variační koeficient
 CV_{inter} – interindividuální variační koeficient

Literatura

1. Shahani BT, Halperin JJ, Boulu P, Cohen J. Sympathetic skin response – a method of assessing unmyelinated axon dysfunction in peripheral neuropathies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1984; 47(5): 536–542.
2. Illigens BM, Gibbons CH. Sweat testing to evaluate autonomic function. *Clin Auton Res* 2009; 19(2): 79–87. doi: 10.1007/s10286-008-0506-8.
3. Hilz MJ, Dütsch M. Quantitative studies of autonomic function. *Muscle Nerve* 2006; 33(1): 6–20.
4. Wang GH. The galvanic skin reflex; a review of old and recent works from a physiologic point of view. *Am J Phys Med* 1957; 36(5): 295–320.
5. Claus D, Schondorf R. Sympathetic skin response. The International Federation of Clinical Neurophysiology. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1999; 52 (Suppl): 277–282.
6. Knezevic W, Bajada S. Peripheral autonomic surface potential. A quantitative technique for recording sympathetic conduction in man. *J Neurol Sci* 1985; 67(2): 239–251.
7. Baba M, Watahiki Y, Matsunaga M, Takebe K. Sympathetic skin response in healthy man. *Electromyogr Clin Neurophysiol* 1988; 28(5): 277–283.
8. Arunodaya GR, Taly AB. Sympathetic skin response: a decade later. *J Neurol Sci* 1995; 129(2): 81–89.
9. Bril V, Nyunt M, Ngo M. Limits of the sympathetic skin response in patients with diabetic polyneuropathy. *Muscle Nerve* 2000; 23(9): 1427–1430.
10. Lacomis D. Small-fiber neuropathy. *Muscle Nerve* 2002; 26(2): 173–188.
11. Wang HX, Jia ZR, Shi X, Liang W, Sun XR, Huang YN. Significance of sympathetic skin response in diagnosis of diabetic small fiber neuropathy. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2008; 88(25): 1753–1755.
12. Martínez-Martínez LA, Mora T, Vargas A, Fuentes-Iniestra M, Martínez-Lavín M. Sympathetic nervous system dysfunction in fibromyalgia, chronic fatigue syndrome, irritable bowel syndrome, and interstitial cystitis: a review of case-control studies. *J Clin Rheumatol* 2014; 20(3): 146–150. doi: 10.1097/RHU.000000000000089.
13. El-Badawy MA, El Mikkawy DM. Sympathetic Dysfunction in Patients with Chronic Low Back Pain and Failed Back Surgery Syndrome. *Clin J Pain* 2015; in press.
14. Hoeldtke RD, Davis KM, Hsieh PB, Gaspar SR, Dworkin GE. Autonomic surface potential analysis: assessment of reproducibility and sensitivity. *Muscle Nerve* 1992; 15(8): 926–931.
15. Vlckova-Moravcova E, Bednarik J, Belobradkova J, Sommer C. Small-fibre involvement in diabetic patients with neuropathic foot pain. *Diabet Med* 2008; 25(6): 692–699. doi: 10.1111/j.1464-5491.2008.02446.x.
16. Kucera P, Goldenberg Z, Kurca E. Sympathetic skin response: review of the method and its clinical use. *Bratisl Lek Listy* 2004; 105(3): 108–116.

Poděkování partnerům České neurologické společnosti



platinový partner



zlatý partner



stříbrný partner

24. Kovařová I, Chmelíková M, Vlčková E, Michalec M, Raputová J, Bednařík J. Hodnocení rohovkové inervace pomocí konfokální mikroskopie. *Cesk Slov Neurol N* 2017; 80/113(1): 49-57. DOI: 10.14735/amcsnn201749. IF = 0,507.

Tato originální práce je v českém jazykovém prostředí první publikací, zaměřenou na novou metodu diagnostiky periferních neuropatií včetně neuropatie tenkých vláken (jako klíčového faktoru rozvoje periferní neuropatické bolesti). Jedná se o konfokální mikroskopii rohovky („corneal confocal microscopy“ - CCM), která poskytuje objektivní morfologické informace o inervaci rohovky zprostředkované výhradně tenkými nervovými vlákny.

V rámci prezentované studie byla CCM vyšetřena v souborech zdravých dobrovolníků a pacientů s diabetickou polyneuropatií a to pomocí automatické i manuální analýzy (nezávisle dvěma hodnotiteli).

Studie prokázala metodickou nenáročnost, bezproblémovou proveditelnost a uspokojivou toleranci vyšetření mezi pacienty s diabetickou polyneuropatií i zdravými kontrolami. Nález ve skupině zdravých dobrovolníků byly využity pro tvorbu věkově stratifikovaných normativních dat. V souboru pacientů s diabetickou neuropatií byly hodnoty všech sledovaných parametrů vysoce signifikantně odlišné od souboru zdravých dobrovolníků. Při manuálním hodnocení nálezů byla prokázána vynikající shoda mezi oběma hodnotiteli, automatická analýza však poskytuje poněkud odlišné hodnoty sledovaných parametrů a oba způsoby hodnocení nejsou vzájemně zaměnitelné.

Prezentovaná studie tak poskytla podklady pro rozšíření spektra diagnostických metod postižení tenkých nervových vláken jako nejvýznamnějšího strukturálního podkladu periferní neuropatické bolesti.

Hodnocení rohovkové inervace pomocí konfokální mikroskopie

The Evaluation of Corneal Innervation Using Corneal Confocal Microscopy

Souhrn

Konfokální mikroskopie rohovky (Corneal Confocal Microscopy; CCM) je neinvazivní metoda morfologického vyšetření rohovky umožňující m.j. vizualizaci korneálních nervových vláken, která jsou tenká, málo myelinizovaná či nemyelinizovaná. CCM je tedy diagnostická metoda neuropatie tenkých vláken, resp. obecně periferních neuropatií. Cílem práce bylo zavedení vyšetření CCM do klinické neurologické praxe v České republice, nastavení vhodných normativních dat a stanovení reprodukovatelnosti vyšetření. *Soubor a metodika:* CCM byla vyšetřena v souborech 71 zdravých dobrovolníků a 54 pacientů s diabetickou polyneuropatií (Diabetic Polyneuropathy; DPN). Ze zjištěných dat byly stanoveny normy pro tři oddělené věkové kategorie. Nálezy byly vyhodnoceny automatickou i manuální analýzou (a to nezávisle dvěma hodnotiteli) ke stanovení spolehlivosti vyšetření. *Výsledky:* Vyšetření CCM bylo časově a metodicky nenáročné a bylo naprostou většinou pacientů dobře tolerováno. Stanovená věkově stratifikovaná normativní data vykazují velmi dobrou použitelnost ve sledovaných souborech pacientů. U pacientů s DPN byly prokázány signifikantní změny všech sledovaných CCM parametrů oproti zdravým kontrolám. Při hodnocení CCM snímků manuální analýzou byla prokázána velmi dobrá shoda dvou hodnotitelů. Při hodnocení automatickým softwarem však byly hodnoty všech sledovaných CCM parametrů signifikantně nižší. *Závěr:* Prezentovaná studie v souhrnu prokázala jednoduchost, bezpečnost a dobrou spolehlivost vyšetření rohovkové inervace pomocí konfokální mikroskopie rohovky na poměrně rozsáhlém souboru zdravých kontrol a skupině pacientů s DPN a poukázala rovněž na rozdílnost automatického a manuálního hodnocení.

Abstract

Corneal confocal microscopy (CCM) is a novel noninvasive method enabling morphological evaluation of corneal structures including nerve fibers. These fibers are almost exclusively of A-delta and C type, i.e. small unmyelinated and poorly myelinated. CCM is thus used as a diagnostic tool for peripheral neuropathies and in particular small fiber neuropathy. The aim of this study was to introduce this method into clinical practice in the Czech Republic, to set-up appropriate normative data and to verify reproducibility of the method. *Material and methods:* A group of 71 healthy controls was examined using the CCM. The data were used to set normal values in three distinct age-related groups and compare these with CCM findings in a group of 54 patients with diabetic polyneuropathy (DPN). Fully-automated as well as expert manual analysis (by two evaluators) were used for quantification of nerve fiber densities, length and branches to verify reliability of the results. *Results:* CCM evaluation was easy, well-tolerated and time-efficient in the majority of patients/controls. Age-related normal values showed very good applicability in evaluated groups of healthy individuals and DPN patients. Compared to healthy controls, DPN patients showed highly significant changes of all the evaluated CCM parameters. Results by the two evaluators of the expert manual analysis showed very good reliability, while results from the automated analysis showed significantly lower values on the majority of the CCM parameters. *Conclusion:* The present study proved on a rather large cohort of healthy controls and a smaller sample of DPN patients that CCM is a easy to use, safe and reliable approach to evaluating corneal innervation. The data also highlighted the differences between automated analysis expert manual CCM analysis.

Práce byla podpořena projektem institucionální podpory FN Brno MZ ČR – RVO (FNBr – 65269705) a projektem specifického výzkumu č. MUNI/A/1072/2015 z programu podpory studentských projektů na Masarykově univerzitě.

Autorky č. 1 a 2 (IK a MH) se podílely stejnou měrou na akvizici dat a přípravě manuskriptu.

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.

**I. Kovalová^{1,2}, M. Horáková^{1,2},
E. Vlčková^{1,2}, M. Michalec³,
J. Raputová^{1,2}, J. Bednařík^{1,2}**

¹ Neurologická klinika LF MU a FN Brno

² CEITEC – Středoevropský technologický institut, MU, Brno

³ Oční klinika LF MU a FN Brno



MUDr. Eva Vlčková, Ph.D.
Neurologická klinika
LF MU a FN Brno
Jihlavská 20
625 00 Brno
e-mail: evlckova@email.cz

Přijato k recenzi: 4. 7. 2016

Přijato do tisku: 17. 8. 2016

Klíčová slova

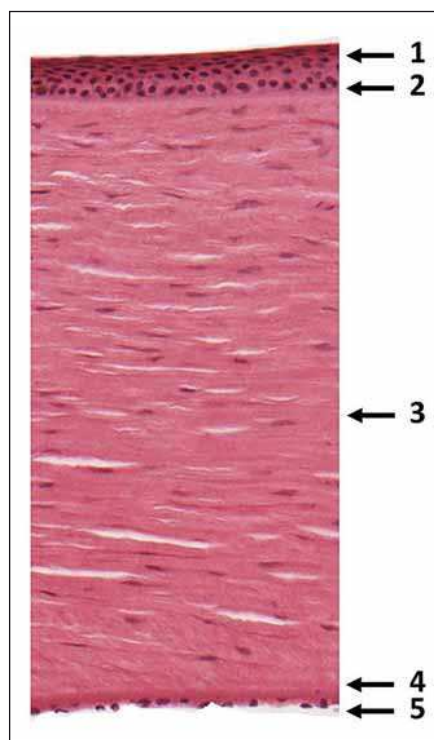
konfokální mikroskopie – rohovka – neuropatie tenkých vláken – diabetická neuropatie – spolehlivost nálezů

Key words

confocal microscopy – cornea – small fiber neuropathy – diabetic neuropathies – reliability of results

Úvod

Konfokální mikroskopie rohovky (Corneal Confocal Microscopy, CCM) je relativně nová neinvazivní metoda morfologického vyšetření rohovky s širokým klinickým využitím [1]. Pro potřeby neurologie je přínosná zejména možnost vizualizace korneálních nervových vláken, která je podkladem v současnosti dominujícího využití CCM v diagnostice periferních neuropatií, zejména neuropatie tenkých vláken (Small Fiber Neuropathy; SFN) [2,3]. Tato indikace je založena na skutečnosti, že rohovka je nejhustěji in-



Obr. 1. Snímek mikroskopického řezu rohovkou v barvení hematoxylinem-eosinem ve zvětšení 100× s vyznačením pěti základních vrstev: 1. epitel, 2. Bowmanova membrána, 3. stroma, 4. Descemetova membrána a 5. endotel.

Za poskytnutí snímku autoři děkují doc. MUDr. Miroslavě Sedláčkové, CSc., zástupkyni přednosti Ústavu histologie a embryologie, LF MU v Brně.

Fig. 1. Transversal section through cornea (stained with haematoxylin and eosin, 100× magnification) showing five corneal layers: 1. epithelium, 2. Bowman's layer, 3. corneal stroma, 4. Descemet's membrane and 5. endothelium.

The section was provided by Assoc. prof. Miroslava Sedláčková, MD, PhD from the Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, Masaryk University Brno.

vovaná tkáň lidského těla (až 400× více než lidská kůže) [4]. Současně je velmi dobře dostupná a jako jediná struktura lidského těla umožňuje neinvazivní morfologické vyšetření terminálních segmentů periferního nervového systému [2,3].

Anatomie rohovky a její inervace

Rohovka se skládá z pěti základních vrstev:

1. epitel,
2. Bowmanova membrána (amorfní vrstva mezi epitelem a stromatem),
3. stroma (lamelární vrstva složená z kolagenových fibril, proteoglykanů, keratocytů),
4. Descemetova membrána (mezi stromatem a endotelem, složená z kolagenových vláken a glykoproteinů),
5. endotel (obr. 1) [5].

Její inervaci zabezpečuje trigeminální nerv, konkrétně jedna z jeho tří hlavních větví – n. ophthalmicus. Terminální větve toho nervu vytvářejí v rohovce tři základní nervové formace:

1. subbazální plexus ležící mezi epitelem a Bowmanovou membránou,
2. subepiteliální plexus mezi Bowmanovou membránou a stromatem,
3. stromální nervy [5].

Vyšetření rohovkové inervace pomocí CCM je zaměřeno především na subbazální plexus, který leží z velké části v centrální oblasti rohovky a jeho vlákna jsou uložena většinou ve svislém směru, rovnoběžně vedle sebe (obr. 2, 3) a často navzájem anastomozují. V důsledku husté inervace je rohovka velmi citlivá na chemické, mechanické i termické stimuly a i nejmenší podráždění vede k sevření víček za účelem maximální ochrany oka [6,7].

Vyšetření pomocí laserové rastrovací konfokální mikroskopie (optický princip)

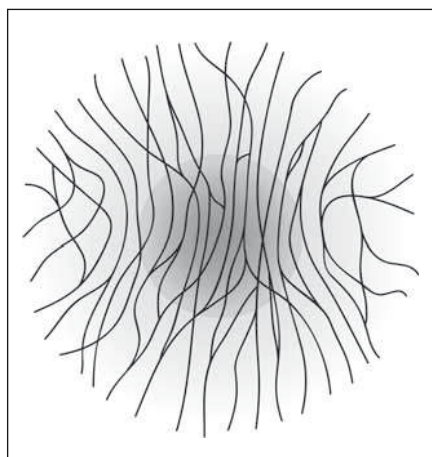
Zdrojem světla v konfokálním mikroskopu je laserový paprsek, který je optikou mikroskopu zaostřen do jednoho konkrétního bodu rohovky. Stejný objektiv snímá i světlo odražené z tohoto bodu, současně ale snímá i světlo rozptýlené (z jiných bodů rohovky, a to především v menší nebo větší hloubce). Proto je v přístroji speciální konfokální clonka, která eliminuje světlo odražené z bodů mimo rovinu, do které je mikroskop právě zaostřen. Otvor v clonce je konjugovaný (con-) s ohniskem (focus) objektivu, odtud tedy název konfokální [8]. V jeden

okamžik tak získáme obraz z jediného bodu (ve skutečnosti velmi malé plochy, jejíž velikost je dána rozlišením mikroskopu). Obraz celé zaostřené roviny se získává „bod po bodu“ (rastr) pomocí rozmítání laserového paprsku. Počítač registruje intenzitu světla a souřadnice a vytvoří obraz celého snímku. Ve skutečnosti je to však velmi rychlý proces a obraz je obnoven asi třikrát za sekundu. Výsledkem jsou tedy již z principu vždy ostré snímky získané v reálném čase, ve frontální rovině a především *in vivo* [8].

Význam hodnocení inervace rohovky pomocí CCM

Klíčovým diagnostickým přínosem konfokální mikroskopie pro neurologickou praxi je možnost neinvazivní vizualizace nervových vláken v rohovce. Nervová vlákna subbazálního plexu rohovky jsou tenká nervová vlákna typu A delta a C [5]. Úbytek a strukturální změny korneálních nervů přitom reflektují obecné postižení tenkých nervových vláken v organismu [2,3,5,9–11]. Jedná se tedy o novou objektivní morfologickou metodu v diagnostice periferních neuropatií, zejména SFN [10–12]. Diagnostika SFN je v současné době založena především na anamnéze relevantních pozitivních senzitivních symptomů, klinickým vyšetření (v němž je prokazována často obtížně klinicky detekovatelná porucha termického a algického čítí) a kvantitativním testování senzitivity (Quantitative Sensory Testing; QST), které umožňuje detailnější hodnocení percepce obou zmíněných senzitivních modalit. Klíčová diagnostická metoda (představující v současnosti zlatý standard v diagnostice SFN) je pak hodnocení intraepidermální inervace z kožní biopsie, která je však na rozdíl od CCM metodou invazivní s omezenou opakovatelností a daleko větší časovou a metodickou náročností zpracování a hodnocení nálezu [10–14]. Provedená pilotní studie přitom prokazuje obdobnou diagnostickou validitu CCM a kožní biopsie v diagnostice periferních neuropatií [10]. CCM je proto perspektivní metoda s potenciálem zjednodušit objektivní diagnostiku jinak obtížně verifikovatelného typu periferní neuropatie.

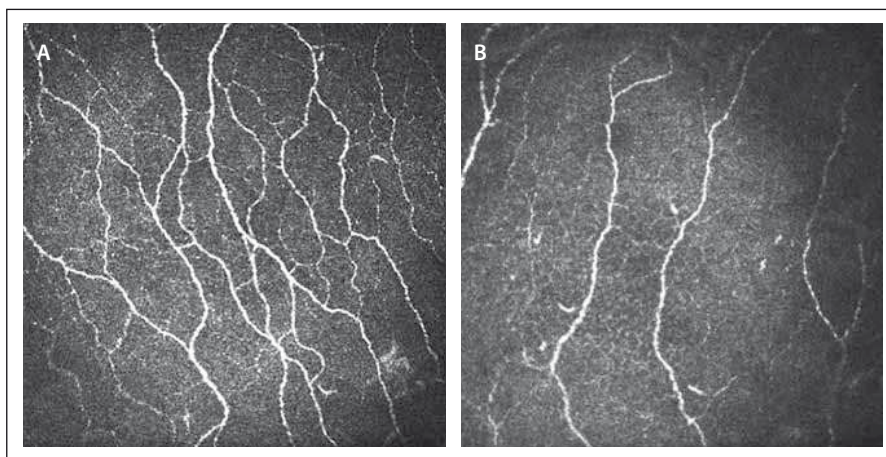
Využitelnost CCM v diagnostice různých periferně neurogeních onemocnění byla již potvrzena řadou studií. Nejčastější zkoumanou diagnostickou jednotkou je diabetická polyneuropatie (Diabetic Polyneuropathy; DPN). Konfokální mikroskopie prokazuje signifikantní redukci rohovkové inervace u pacientů s polyneuropatií při diabetes



Obr. 2. Schéma orientace nervových vláken subbazálního plexu rohovky s vyznačenou centrální oblastí rohovky, na kterou je cíleno vyšetření CCM.

Fig. 2. Diagram of nerve fibres in subbasal plexus of cornea, the CCM examination is targeted at the central part of cornea (marked by the darker circle).

mellitus (DM) 1. i 2. typu či prediabetu a také u diabetické SFN i autonomní DPN [3,5,9]. Nález CCM mohou být využity dokonce jako prediktor budoucího rozvoje periferní neuropatie u pacientů s DM a slouží k identifikaci pacientů, kteří jsou z tohoto hlediska vysoce riziková a lze u nich zvážit zintenzivnění terapeutického přístupu k základnímu metabolickému onemocnění [15,16]. Hodnocení změn inervace rohovky při vyšetření CCM vykazuje u pacientů s DPN vysokou senzitivitu i specifitu většiny sledovaných parametrů [3]. Signifikantní morfologické změny korneální inervace byly prokázány také u pacientů se SFN při Fabryho chorobě [17] či idiopatické SFN [2], u polyneuropatie indukované chemoterapií [4] či hereditární neuropatie Charcot Marie Tooth, typ 1A [18]. Změny inervace rohovky jsou však prokazovány také u některých neurodegenerativních onemocnění, a to poněkud od-



Obr. 3. CCM snímky korneálního nervového plexu z centrální části rohovky (zvětšení 700x).

Obr. 3A) Snímek u zdravého dobrovolníka s patrným velkým počtem dobře identifikovatelných paralelně ležících nervových vláken s četnými anastomózami.

Obr. 3B) Snímek u pacienta s DPN zřetelně vyjádřenou redukcí vyšetřovaného nervového plexu.

Fig. 3. CCM image of the nerve plexus in the central part of the cornea (original magnification 700x).

Fig. 3A) Image of a healthy volunteer with high density of nerve fibres and many branches.

Fig. 3B) Image of a patient with DPN with pronounced reduction of fibre density and low number of branches.

lišného charakteru než v případě periferních neuropatií. Například u Parkinsonovy nemoci bylo sice zjištěno snížení hustoty nervových vláken, ale zároveň zvýšení hustoty jejich větví i celkové délky nervových vláken, což je jedinečný a klinicky determinantní nález [19]. CCM se tedy jeví jako široce využitelná, relativně jednoduchá a neinvazivní metoda rozšiřující významným způsobem spektrum diagnostických metod u pacientů s periferními neuropatiemi vč. SFN, ale i u některých dalších neurologických onemocnění.

Pro využití metody v klinické praxi je nezbytné srovnání nálezů hodnocených parametrů s normativními daty. Recentně byla publikována multicentrická studie poskytující věkově stratifikovaná normativní data pro obě pohlaví [20].

Cílem naší studie bylo zavést hodnocení korneální inervace pomocí CCM do klinické praxe v České republice a ověřit platnost publikovaných normativních dat pro jednotlivé CCM parametry [20] v české populaci, resp. vytvoření vlastních norem pro hodnocení této metody. Současně byla studie zaměřena na ověření spolehlivosti nálezů CCM při využití metody různými hodnotiteli a dále na srovnání nálezů manuální a automatické analýzy jednotlivých parametrů CCM.

Soubor

Inervace rohovky byla pomocí konfokální mikroskopie vyšetřena v souboru 71 zdravých dobrovolníků (tab. 1), převážně zaměstnanců Neurologické kliniky LF MU a FN Brno a jejich rodinných příslušníků. Menší část

Tab. 1. Demografická data vyšetřených souborů zdravých dobrovolníků a pacientů s DPN.

	Celý soubor		< 30		30–50		> 50	
	počet celkem (M; Ž)	věk (roky)	počet celkem (M; Ž)	věk (roky)	počet celkem (M; Ž)	věk (roky)	počet celkem (M; Ž)	věk (roky)
ZK	71 (27; 44)	40 (23; 79)	20 (10; 10)	26 (23; 29)	33 (11; 22)	40 (32; 49)	18 (6; 12)	57 (50; 79)
DPN	54 (36; 18)	59 (27; 87)	2 (1; 1)	27 (27; 27)	15 (8; 7)	44 (32; 49)	37 (27; 10)	68 (63; 87)

Věk je vyjádřen ve formátu: medián (min.; max.).

DPN – pacienti s diabetickou polyneuropatií, ZK – zdravé kontroly, M – počet mužů, Ž – počet žen.

zdravých kontrol tvořili pacienti neurologické kliniky s onemocněními nepostihujícími periferní nervový systém (např. s bolestmi hlavy, lumbagem apod.). Vylučujícími kritérii pro zařazení do souboru zdravých kontrol byly:

1. Známa polyneuropatie a/nebo klinický náález či anamnestické obtíže svědčící pro polyneuropatii.
2. Anamnesticky zjištěné rizikové faktory potenciálně vedoucí ke vzniku periferní neuropatie (např. DM, porucha glukózové tolerance, chronický abúzus alkoholu, tyreopatie, stav po prodělané protinádorové chemoterapii).
3. Dlouhodobé používání kontaktních čoček v současnosti či kdykoliv v minulosti.
4. Operace či úraz oka v anamnéze.

Žádný z vyšetřených jedinců neměl známé oční onemocnění a neužíval lokální medikaci aplikovanou intraokulárně.

Za účelem vytvoření věkově stratifikovaných normativních dat byl soubor dále rozdělen do tří podskupin (do 30 let, 30–50 let a nad 50 let) (tab. 1).

Validita metodiky v diagnostice periferních neuropatií byla ověřena srovnáním náálezů se souborem 54 pacientů s DPN s postižením silných a/nebo tenkých nervových vláken (tab. 1). Dvanáct pacientů mělo DM 1. typu a 42 pacientů DM 2. typu. Polyneuropatie byla v tomto souboru verifikována klinickým a anamnestickým vyšetřením, korelující abnormitou elektromyografického vyšetření a případně (při normálním nálezu elektromyografického vyšetření a současně relevantních pozitivních senzitivních symptomech) abnormálním nálezem intraepidermální inervace v kožní biopsii (která je zlatým standardem v diagnostice SFN). Také u těchto pacientů byla vylučujícím kritériem operace či úraz oka v anamnéze a používání kontaktních čoček aktuálně a/nebo v minulosti. Ani v tomto souboru neměli zařazení pacienti oční onemocnění a neužívali lokální medikaci aplikovanou intraokulárně.

Metodika

Všichni zdraví dobrovolníci i pacienti s DPN zařazení do studie byli informováni o účelu vyšetření a podepsali informovaný souhlas. CCM byla vyšetřena pomocí mikroskopu Heidelberg Retina Tomograph (HRT II) v souladu s publikovanými doporučeními [2,3,20] a na základě praktického školení v metodice, které absolvovaly dvě lékařky autorského týmu (IK, MH) v Centru pro endokrinologii

a diabetes na Univerzitě v Manchesteru, UK, u dr. Mityry Tavakoli.

V úvodu vyšetření byla provedena anestezie rohovky lokální aplikací oxybuprokainu (Benoxi 0,4 %, Unimed Pharma, Bratislava, Slovensko). Po znecitlivění rohovky byl z důvodu dostatečné lubrikace do každého oka aplikován viskoelastický gel (Vidisc, Dr. Gerhard Mann, Chem-pharm. Fabrik, GmbH, Berlín, Německo). Malé množství tohoto gelu bylo umístěno i na povrch čočky objektivu a ta byla následně kryta jednorázovým sterilním kloboučkem (perspex cap), který byl během vyšetření v kontaktu s vyšetřovaným okem. Vyšetřovaný byl vyzván k fixaci pevného bodu (bílé světlo) v průběhu celého vyšetření, což eliminovalo nežádoucí pohyby očí. Manuálním zaostřováním čočky objektivu pak bylo možno prohlédnout rohovku v celém rozsahu a z vrstvy obsahující subbázální plexus pořídit snímky o velikosti 384 × 384 pixelů. Následně byly z náhodně zvoleného oka vybrány tři odlišné reprezentativní snímky od sebe vzájemně vzdálených vrstev. Na vybraných snímcích byly v souladu s publikovanými doporučeními [20] hodnoceny následující parametry (obr. 3A, B):

1. Hustota korneálních nervových vláken (Corneal Nerve Fiber Density; CNFD) – celkový počet hlavních nervových vláken na milimetr čtvereční snímku.
2. Délka korneálních nervových vláken (Corneal Nerve Fiber Length; CNFL) – celková délka všech hlavních nervových vláken a větví v rámci příslušného snímku rohovky.
3. Hustota větví korneálních nervových vláken (Corneal Nerve Branch Density; CNBD) – celkový počet větví vycházejících z hlavních vláken na milimetr čtvereční snímku.
4. Koefficient tortuozity (Corneal Nerve Fiber Tortuosity; CNFT) – míra vinutosti korneálních nervových vláken. Tortuozita je v používaném programu CCMetrics hodnocena poměrně komplikovaným způsobem. Výpočet vychází z odchylky mezi přímoú linií spojující oba konce hodnoceného nervového vlákna a skutečného průběhu tohoto vlákna. Skutečný průběh vlákna je určen matematicky za pomoci diferenciálního počtu. Každé nervové vlákno je reprezentováno jako funkce. Derivací této funkce v konkrétním bodě získáme informaci o sklonu nervového vlákna v daném bodě. Pro každý bod (pixel) je určen sklon a současně i odchylka od přímé linie. Výpočet CFFT pak vychází ze sumy všech

odchylek. Jde o bezrozměrné číslo, které může nabývat hodnot od 0 do 1, kde se zvyšujícím se číslem se zvyšuje i míra vinutosti nervového vlákna. Podrobnější popis výpočtu tohoto parametru je k dispozici v původní práci autorů Kallinikos et al [21].

Každý z uvedených parametrů byl hodnocen dvěma způsoby:

1. Manuálně pomocí softwaru CCMetrics (CCMetrics, MA Dabbah; Imaging Science and Biomedical Engineering, University of Manchester, Manchester, UK). Pro stanovení interindividuální variability bylo hodnocení manuálním softwarem provedeno nezávisle dvěma vyškolenými lékaři (IK, MH).
2. Automaticky softwarem ACCMetrics (ACCMetrics, MA Dabbah; Imaging Science and Biomedical Engineering, University of Manchester, Manchester, UK) [22,23].

Po skončení vyšetření byl pacient požádán, aby semikvantitativně zhodnotil náročnost vyšetření a jeho nepříjemnost, a to s použitím stupnice:

- 1 – vyšetření nebylo vůbec nepříjemné;
- 2 – vyšetření bylo lehce nepříjemné;
- 3 – vyšetření bylo středně nepříjemné, ale absolvoval bych ho znovu;
- 4 – vyšetření bylo velmi nepříjemné, znovu bych ho nechtěl absolvovat;
- 5 – vyšetření bylo silně nepříjemné, téměř se nedalo vydržet.

Statistická metodologie

Statistické zpracování bylo provedeno pomocí software SPSS 23.0.0.0 (IBM Corporation 2014). Iničiálně byla zhodnocena distribuce dat jednotlivých sledovaných parametrů, pro její ověření byly použity normal probability ploty (N-P ploty) a Kolmogorovův-Smirnovův test. Hodnoty CNFL a CNFT vykazovaly normální rozdělení a hodnoty CNFD a CNBD vykazovaly log-normální rozdělení. Pro další statistické zpracování byly použity parametrické testy na logaritmičtě transformovaných datech CNFD a CNBD a původních datech CNFL a CNFT. Před vlastní prezentací dat bylo v případě práce s logaritmičtě transformovanými daty provedeno jejich zpětné převedení na základní formát a jako taková jsou data prezentována v tabulkách. Vzhledem k obtížné interpretaci hodnoty směrodatné odchylky (Standard Deviation, SD) u logaritmičtě transformovaných dat není tato hodnota explicitně uvedena. Zviditelnění rozložení primárních hod-

Tab. 2. Sumarizace nálezů jednotlivých parametrů korneální konfokální mikroskopie v souboru zdravých dobrovolníků a odvozený normální rozsah hodnot na úrovni $x \pm 2$ SD (hodnotitel MH).

	Celý soubor n = 71		< 30 n = 20		30–50 n = 33		> 50 n = 18		Srovnání mužů a žen (p) ¹	Vliv věku	
	průměr (x)	norma (x – 2SD; x + 2SD)	průměr (x)	norma (x – 2SD; x + 2SD)	průměr (x)	norma (x – 2SD; x + 2SD)	průměr (x)	norma (x – 2SD; x + 2SD)		regresní koeficient ²	p ²
CNFD	32,81	(20,76; 51,85)	34,76	(23,09; 52,35)	33,32	(20,98; 52,90)	29,94	(18,73; 47,86)	0,56	–0,165	0,01
CNFL	21,67	(12,41; 30,93)	23,01	(14,83; 31,20)	21,89	(13,18; 30,59)	19,80	(9,26; 30,34)	0,65	–0,095	0,02
CNBD	62,39	(21,79; 178,65)	75,75	(29,39; 195,27)	61,32	(22,85; 164,59)	51,86	(15,96; 168,47)	0,45	–0,531	0,04
CNFT	0,12	(0,04; 0,2)	0,12	(0,07; 0,18)	0,12	(0,05; 0,20)	0,11	(0,02; 0,21)	0,19	–0,001	0,84

¹ Srovnání hodnot mezi muži a ženami bylo provedeno nepárovým t-testem.

² Hodnota regresního koeficientu a jeho statistické významnosti z jednoduchého lineárního modelu.

Pozn. CNFD, CNFL a CNBD jsou považovány za abnormální v případě, že výsledná hodnota je pod úrovní dolního normálního limitu rozsahu hodnot příslušného parametru v normativním souboru, abnormitou CNFT je naopak hodnota nad horním normálním limitem zmíněného normálního rozsahu hodnot. Pro lepší orientaci jsou relevantní normativní data v tabulce vyznačena tučně.

CNFD – hustota korneálních nervových vláken (Corneal Nerve Fiber Density), CNFL – délka korneálních nervových vláken (Corneal Nerve Fiber Length), CNBD – hustota větví korneálních nervových vláken (Corneal Nerve Branch Density), CNFT – koeficient vinutosti (Corneal Nerve Fiber Tortuosity), x – průměr, SD – směrodatná odchylka (Standard Deviation).

not kontinuálních dat bylo proto provedeno pomocí průměrů (x) a intervalů definovaných průměrem \pm dvěma se směrodatnými odchylkami ($x + 2$ SD). Kategoriální data jsou znázorněna pomocí absolutních (relativních) četností. Na základě výsledků hodnoceného normativního souboru byla vytvořena normativní data na úrovni $x \pm 2$ SD. Ke srovnání hodnocených parametrů mezi jednotlivými skupinami pacientů/zdravých kontrol byl použit nepárový t-test. Korelace jednotlivých parametrů s věkem byla hodnocena pomocí jednoduchého lineárního regresního modelu.

Pro analýzu spolehlivosti vyhodnocení snímků různými hodnotiteli a způsoby hodnocení (manuální/automatická analýza) byl použit koeficient ICC (Intraclass Correlation Coefficient, varianta two-way random).

Výsledky

Náročnost vyšetření a potenciální komplikace

Vyšetření CCM proběhlo v naprosté většině případů zcela bez problémů. Z vyšetřených 125 pacientů/kontrol jsme závažnější komplikace zaznamenali pouze v jednom případě (0,8 %), a to v podobě reakce na použité lokální anestetikum (oxybuprokain) formou prekolapsového stavu u pacienta bez dosavadní anamnézy alergické reakce na lokálně anestetické preparáty. Aplikace anestetických kapek, která vyvolá přechodné (několik s až max. několik málo min

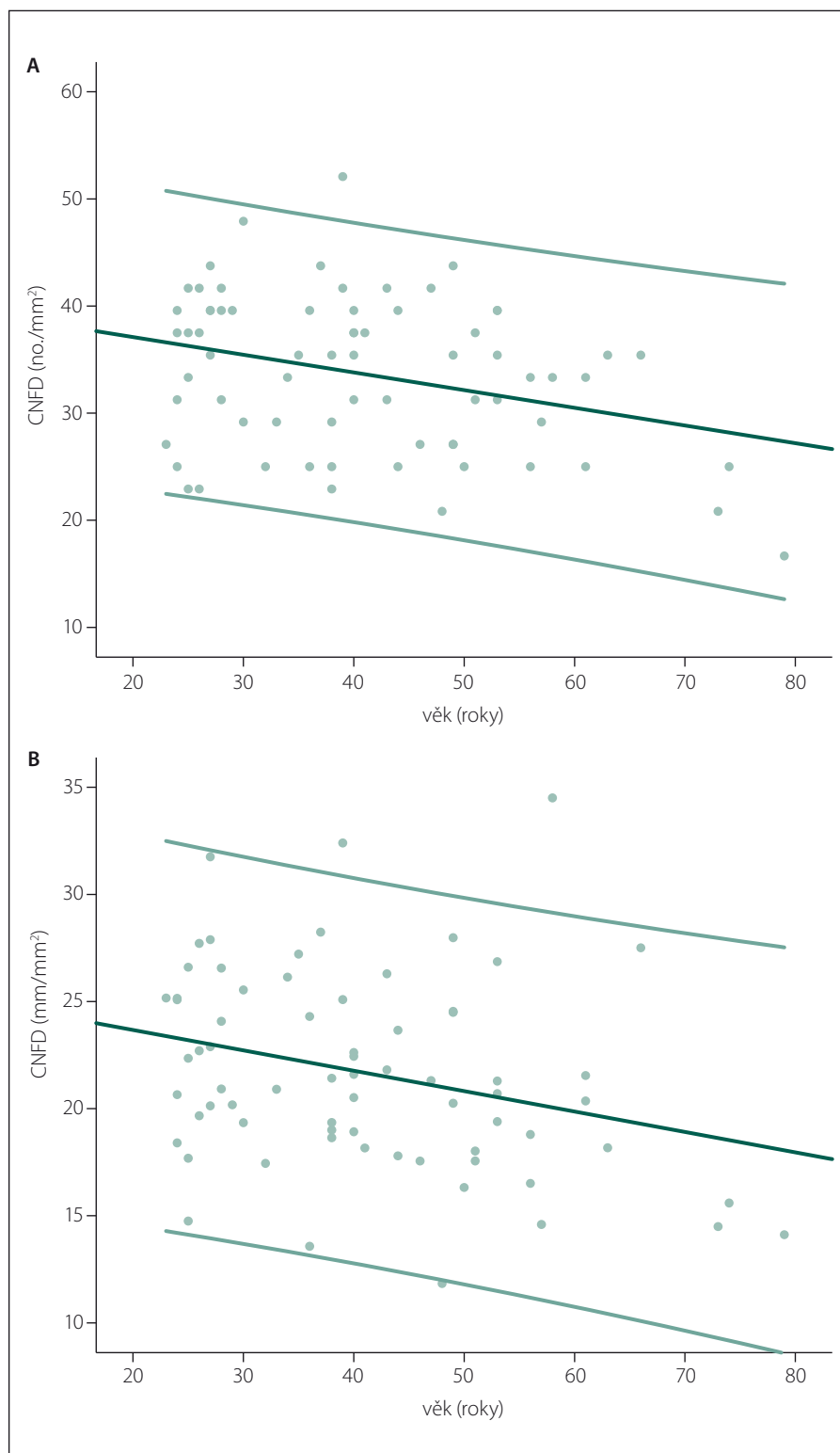
trvající) lehce pálivé pocity v oblasti oka, byla obecně nejnepříjemnější částí vyšetření. U dvou dalších pacientů byla zaznamenána hypersenzitivní reakce na tyto lokálně anestetické kapky, která se projevila prodlouženým několikahodinovým trváním popsaných nepříjemných pocitů. Při použití semikvantitativní stupnice v rozsahu od 1 do 5 hodnotili pacienti vyšetření většinou jako nenáročné (1) nebo málo náročné (2), pro jednoho pacienta bylo vyšetření výrazně nepříjemné (4), a to právě v důsledku výše uvedené reakce na lokální anestetické kapky. Průměrná hodnota náročnosti vyšetření při hodnocení pacientem $1,56 \pm 0,67$, při hodnocení vyšetřujícím pak $1,14 \pm 0,17$.

Z hlediska vyšetřujících bylo pro zajištění kvalitní snímkové dokumentace velmi důležité zajištění maximálního komfortu pacienta během vyšetření (zejména pomocí jeho optimálního napolohování), protože i minimální nepohodlí způsobovalo velmi drobné pohyby těla a hlavy, které výrazně komplikovaly až znemožňovaly pořízení kvalitních snímků. U malé části pacientů bylo vyšetření ztíženo úzkou oční šterbinou, ať už z důvodu anatomických nebo z důvodu neschopnosti pacienta více otevřít oko při obecně špatné toleranci očních vyšetření. Úzká oční šterbina omezovala dostatečný kontakt oka s čočkou mikroskopu, který je nezbytný pro získání kvalitních snímků. U žádného z dobrovolníků nicméně nebylo nutné vyšetření ukončit předčasně bez získání požadovaných snímků.

Vlastní vyšetření pacienta nebylo v našem souboru náročné ani časově. Průměrné trvání vyšetření bylo $17,2 \pm 4,6$ min (rozsah 7–40 min v závislosti na spolupráci pacienta a jeho toleranci vyšetření), a to vč. vysvětlení podstaty vyšetření pacientovi, iniciální aplikace lokálních anestetik a viskoelastického gelu, nastavení mikroskopu, jeho zaostření na sledovanou vrstvu rohovky a pořízení snímkové dokumentace. Následné hodnocení jednoho snímku pak v závislosti na počtu nervových vláken trvá přibližně 3–8 min při manuálním hodnocení a zhruba 20 s (podle výkonu počítače) v případě využití automatického softwaru. Celkový čas potřebný pro vyhodnocení tří snímků u jednoho pacienta je tedy 10–25 min při manuální analýze a přibližně 1 min při analýze automatické.

Nálezy v souboru zdravých kontrol

Průměrné hodnoty jednotlivých parametrů v souboru zdravých kontrol jsou uvedeny v tab. 2. Žádný z hodnocených CCM parametrů nevykazoval významné rozdíly mezi muži a ženami (tab. 2), zachycen však byl mírný, ale již statisticky signifikantní pokles hodnot většiny parametrů (s výjimkou tortuozity) s věkem (tab. 2, obr. 4A, B). Z tohoto důvodu byly výsledky dále zpracovány odděleně ve třech věkově definovaných podskupinách zdravých kontrol (do 30 let, 30–50 let, nad 50 let) (tab. 1, 2), pro které byla následně stanovena i vlastní normativní data



Obr. 4. Bodové grafy znázorňující hodnoty CNFD (A) a CNFL (B) v závislosti na věku proložené lineární regresní přímkou, a dvěma přímkami ohraničujícími 5. a 95. percentil.

Výsledky z jednoduchého lineárního regresního modelu prokazují signifikantní roční úbytek CNFD ($-0,165 \text{ no./mm}^2$) a CNFL ($-0,095 \text{ mm/mm}^2$).

Fig. 4. Scatter plots showing CNFD (A) and CNFL (B) values by age with linear regression line and the 5th and 95th percentile.

Linear regression analysis shows significant yearly decrease of both CNFD (-0.165 no./mm^2) and CNFL (-0.095 mm/mm^2).

(tab. 2). V případě CNFD, CNFL a CNBD jsou v tabulce zvýrazněny dolní normální limity, a abnormitou je tedy hodnota pod úrovní uvedeného limitu. Pro CNFT je zvýrazněná hodnota naopak horním normálním limitem a abnormální jsou hodnoty přesahující uvedenou normu (tab. 2).

Platnost uvedených normativních dat byla dále ověřena srovnáním s publikovanou rozsáhlou multicentrickou normativní studií, jež využila manuální způsob hodnocení snímků, a to identický jako v naší studii [20]. Počet abnormit jednotlivých parametrů ve sledovaném normativním souboru při použití vlastních a dříve publikovaných normativních dat je uveden v tab. 3.

Nález v souboru pacientů s DPN

Věkové složení souborů pacientů s DPN a zdravých kontrol bylo v naší studii odlišné. Srovnání sledovaných parametrů mezi těmito skupinami bylo proto za účelem eliminace vlivu věku provedeno odděleně v jednotlivých věkových skupinách (tab. 4). Hodnoty CNFD, CNFL a CNBD byly u pacientů s DPN ve všech věkových skupinách signifikantně nižší než v odpovídajících souborech zdravých kontrol (tab. 4). Vzestup CNFT se nám podařilo prokázat pouze v nejstarší věkové skupině (tab. 4).

Spolehlivost hodnocení snímků různými hodnotiteli a srovnání s automatickou analýzou

Vyhodnocení spolehlivosti (reliability) hodnocení snímků je uvedeno v tab. 5. Spolehlivost manuálního hodnocení snímků mezi dvěma různými hodnotiteli (MH a IK) vyjádřená pomocí intra-class korelačního koeficientu vykazuje hodnoty $> 0,8$ pro všechny parametry kromě tortuozity. Tyto hodnoty odpovídají výborné shodě nálezů mezi hodnotiteli. Srovnání výsledků manuální a automatické analýzy naopak dobrou shodu neprokazuje (tab. 5). Při hodnocení automatickým softwarem byly všechny hodnocené parametry (CNFD, CNFL, CNBD) signifikantně nižší oproti analýze manuální (tab. 5).

Diskuze

Prezentovaná studie v souhrnu prokázala jednoduchost, bezpečnost a nízkou časovou i metodickou náročnost vyšetření rohovkové inervace pomocí konfokální mikroskopie na poměrně rozsáhlém souboru zdravých kontrol a skupině pacientů s DPN. Na základě zjištěných výsledků byla vytvořena vlastní normativní data a současně byla ověřena

Tab. 3. Výskyt abnormit jednotlivých parametrů ve skupině zdravých dobrovolníků při použití vlastních normativních dat (viz tab. 2) a multicentrické normativní studie (Tavakoli et al, 2015) (hodnotitel MH).

Použitá normativní data	Celý soubor (n = 71)		< 30 (n = 20)		30–50 (n = 33)		> 50 (n = 18)	
	vlastní (tab. 2)	Tavakoli et al 2015	vlastní (tab. 2)	Tavakoli et al 2015	vlastní (tab. 2)	Tavakoli et al 2015	vlastní (tab. 2)	Tavakoli et al 2015
CNFD	5 (7 %)	1 (1 %)	1 (5 %)	0 (0 %)	3 (9 %)	0 (0 %)	1 (6 %)	1 (6 %)
CNFL	2 (3 %)	2 (3 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	1 (3 %)	1 (3 %)	1 (6 %)	1 (6 %)
CNBD	4 (6 %)	2 (3 %)	1 (5 %)	0 (0 %)	1 (3 %)	0 (0 %)	2 (11 %)	2 (11 %)
CNFT	8 (11 %)	3 (4 %)	3 (15 %)	1 (5 %)	2 (6 %)	1 (3 %)	3 (17 %)	1 (6 %)

Hodnoty jsou uvedeny jako absolutní (relativní četnosti).

CNFD – hustota korneálních nervových vláken (Corneal Nerve Fiber Density), CNFL – délka korneálních nervových vláken (Corneal Nerve Fiber Length), CNBD – hustota větví korneálních nervových vláken (Corneal Nerve Branch Density), CNFT – koeficient vinutosti (Corneal Nerve Fiber Tortuosity).

Tab. 4. Průměrné hodnoty parametrů korneální konfokální mikroskopie v jednotlivých věkových skupinách pacientů s DPN a zdravých kontrol.

	Věková skupina < 30 let			Věková skupina 30–50 let			Věková skupina > 50 let		
	ZK (n = 20)	DPN (n = 2)	p ¹	ZK (n = 33)	DPN (n = 15)	p ¹	ZK (n = 18)	DPN (n = 37)	p ¹
CNFD	37,90	22,82	0,002	34,04	28,90	0,040	33,13	23,46	< 0,001
CNFL	27,02	14,33	0,002	25,53	19,10	< 0,001	23,54	17,02	< 0,001
CNBD	65,85	22,24	0,041	58,40	32,12	< 0,001	51,73	24,60	0,048
CNFT	0,20	0,22	0,555	0,20	0,22	0,155	0,20	0,23	0,011

¹ Srovnání hodnot jednotlivých parametrů mezi pacienty s DPN a ZK bylo provedeno nepárovým t-testem.

CNFD – hustota korneálních nervových vláken (Corneal Nerve Fiber Density), CNFL – délka korneálních nervových vláken (Corneal Nerve Fiber Length), CNBD – hustota větví korneálních nervových vláken (Corneal Nerve Branch Density), CNFT – koeficient vinutosti (Corneal Nerve Fiber Tortuosity), ZK – zdravé kontroly, DPN – pacienti s diabetickou polyneuropatií.

Tab. 5. Srovnání nálezů jednotlivých parametrů korneální konfokální mikroskopie při manuální analýze více hodnotiteli a současně mezi manuální a automatickou analýzou.

	Manuální hodnocení						Automatická analýza a srovnání s analýzou manuální			
	hodnotitel MH		hodnotitel IK		srovnání hodnotitelů		x	IS	ICC ²	p ²
	x	IS	x	IS	ICC ¹	p ¹				
CNFD	32,81	(31,07; 34,65)	34,86	(33,04; 36,78)	0,849	< 0,001	21,45	(19,70; 23,36)	0,609	< 0,001
CNFL	21,67	(20,57; 22,78)	25,44	(24,16; 26,73)	0,870	< 0,001	14,55	(13,74; 15,37)	0,773	< 0,001
CNBD	62,39	(55,04; 70,73)	58,58	(51,40; 66,77)	0,841	< 0,001	21,56	(18,50; 25,11)	0,620	< 0,001
CNFT	0,12	(0,11; 0,13)	0,20	(0,19; 0,21)	0,496	< 0,001	–	–	–	–

¹ Srovnání nálezů jednotlivých parametrů mezi oběma hodnotiteli (MH, IK) při hodnocení manuální analýzou pomocí koeficientu ICC.

² Srovnání nálezů jednotlivých parametrů mezi automatickou analýzou a průměrem hodnot manuální analýzy obou hodnotitelů (MH, IK). Srovnání je provedeno pomocí koeficientu ICC. Hodnoty tortuozity nejsou uvedeny, protože nejsou při automatické analýze hodnoceny.

CNFD – hustota korneálních nervových vláken (Corneal Nerve Fiber Density), CNFL – délka korneálních nervových vláken (Corneal Nerve Fiber Length), CNBD – hustota větví korneálních nervových vláken (Corneal Nerve Branch Density), CNFT – koeficient vinutosti (Corneal Nerve Fiber Tortuosity), x – průměr, ICC – intraclass correlation coefficient, IS – interval spolehlivosti.

platnost recentně publikovaných normativních dat z rozsáhlé multicentrické studie [20] pro českou populaci. U pacientů s DPN byly prokázány signifikantní změny všech sledovaných parametrů, což potvrzuje využitel-

nost metody jako alternativního konfirmačního testu DPN. Pro hodnocení CCM snímků lze využít manuální i automatickou analýzu. Naše studie však prokázala, že oba typy analýzy nejsou vzájemně zaměnitelné. Při ma-

nuální analýze byla prokázána velmi dobrá shoda dvou hodnotitelů ve všech sledovaných parametrech s výjimkou tortuozity. Metoda tedy vykazuje uspokojivou inter-rater reliabilitu. Naopak hodnocení automatic-

kým softwarem vykazovalo ve srovnání s manuální analýzou signifikantně nižší hodnoty CNFD, CNFL i CNBD. Při interpretaci nálezů CCM je proto nutné zohlednit typ analýzy a volit vždy jednotný způsob hodnocení nálezů pro všechny pacienty v příslušné studii.

Naše zkušenost potvrdila uspokojivou toleranci vyšetření rohovkové inervace pomocí konfokální mikroskopie prakticky u všech vyšetřených pacientů a nízkou náročnost metodiky pro vyšetřující lékaře. Jedinou zaznamenanou komplikací byla reakce na lokální anestetikum aplikované iniciálně při vyšetření: u jednoho pacienta jsme zaznamenali celkovou reakci ve formě preklapového stavu, u dvou pacientů pak prodloužené (několik hodin trávající) nepříjemné pocity v oblasti oka charakteru pálení a řezání. Oba zmíněné typy nežádoucích účinků jsou uvedeny i v příbalovém letáku Benoxi kapek a při jejich aplikaci je třeba s podobnými reakcemi počítat, i když jsou obecně poměrně málo časté. Před vyšetřením je také vhodné se na případnou anamnézu alergických reakcí na lokální anestetika cíleně dotazovat a v případě pozitivní anamnézy vyšetření neprovádět. Indikaci k vyšetření CCM je s ohledem na používání lokálních anestetik obecně vhodné pečlivě zvažovat také u pacientů s polyvalentními alergiemi, a to i v případě, že není anamnesticky známa přímo alergie na lokálně-anestetické preparáty. Je však třeba si uvědomit, že stejný problém nastává i u alternativní konfirmační metody SFN, tedy u kožní biopsie, při které je vzorek odebírán v lokální infiltrační anestezii.

Nálezy v prezentovaném souboru zdravých kontrol jsou prakticky identické jako publikované výsledky velké multicentrické normativní studie hodnotící sledované parametry CCM na souboru 343 zdravých dobrovolníků [20], stejně jako v dříve publikovaných menších souborech zdravých kontrol [15,24,25]. Tato skutečnost potvrzuje správnost použité metodiky hodnocení jednotlivých CCM parametrů a její srovnatelnost s mezinárodním standardem. Velmi blízká uvedená studii jsou také derivovaná normativní data. Při použití obou typů norem jsme abnormitu jednotlivých parametrů zachytili jen u malé (a v obou případech velmi podobné) části normativního souboru, což umožňuje v české populaci použít oba typy normativních dat.

Identicky jako zmíněná multicentrická normativní studie prokázaly i naše výsledky určitou závislost většiny parametrů CCM na věku pacienta, i když věkově podmíněné

změny byly v případě obou studií spíše mírné (tab. 2) [20]. Při hodnocení nálezů je proto vhodné zvažovat věk pacienta a používat věkově stratifikovaná normativní data, která byla z těchto důvodů vytvořena i v naší práci.

Prokázán naopak nebyl signifikantní vliv pohlaví pacientů. Tavakoli et al sice uvádí oddělené normy pro muže a ženy, přímé srovnání hodnot CCM parametrů mezi oběma pohlavími však v práci překvapivě uvedeno není a orientační srovnání hodnot v souboru mužů a žen v této práci svědčí proti významným rozdílům sledovaných parametrů mezi muži a ženami [20]. I v tomto směru tak výsledky naší studie odpovídají již publikovaným nálezům.

Hodnocení rohovkové inervace pomocí konfokální mikroskopie se v současnosti využívá především v diagnostice DPN [3,5,9]. V posledních letech byla publikována řada studií potvrzujících využitelnost metodiky v hodnocení přítomnosti a tíže periferní neuropatie u pacientů s DM 1. [3,15,26,27] i 2. typu [3,24,25]. Výhodou vyšetření je jeho neinvazivita a téměř neomezená možnost opakování testu a tedy dobrá využitelnost např. pro dlouhodobé sledování pacientů [15]. Inervace rohovky vykazuje signifikantní změny již u pacientů s recentním DM 2. typu [25] a dokonce u jedinců s pre-diabetickými stavy (tj. především poruchou glukózové tolerance) [28]. Metoda je však využitelná i při hodnocení neuropatie jiné než diabetické etiologie [17,18], vč. idiopatické SFN [2].

Uvedené nálezy potvrdila i naše studie, v níž byly hodnoty hustoty i celkové délky nervových vláken u pacientů s DPN signifikantně nižší ve srovnání se souborem zdravých kontrol. Soubor zahrnoval pacienty s DM 1. i 2. typu, což potvrzuje využitelnost metody v hodnocení neuropatie u pacientů s oběma typy DM. Hodnoty jednotlivých parametrů zjištěné v našem souboru pacientů s DPN odpovídají dříve publikovaným nálezům u obdobných souborů pacientů [24–28] a opět nepřímo potvrzují správnost používané metodiky.

Jedním z mála limitů metodiky je při manuálním hodnocení nálezů potřeba zkušeného a vyškoleného jedince – hodnotitele – a čas, který je nutný ke zhodnocení jednoho pacienta (cca 10–25 min). Z tohoto důvodu byl univerzitou v Manchesteru vyvinut software k automatické analýze CCM (ACCMetrics), který zredukoval čas potřebný k hodnocení na několik vteřin na snímek [11,29]

a snížil nutnost erudice hodnotitelů. Dosud však bylo publikováno jen minimum studií poskytujících srovnání manuální a automatické analýzy CCM parametrů [29,30]. Podobně je k dispozici pouze omezená evidence o spolehlivosti nálezů CCM při hodnocení různými hodnotiteli [31,32]. V další části studie jsme se proto pokusili zaměřit na hodnocení spolehlivosti CCM při využití více hodnotiteli a na srovnání manuální a automatické analýzy.

Hodnocení inter-rater reliability jednotlivých parametrů CCM prokázalo při manuální analýze výbornou spolehlivost nálezů všech sledovaných parametrů s výjimkou tortuozity. Výsledky velmi obdobné naší studii vč. vlastních hodnot ICC koeficientů mezi více hodnotiteli prokázali např. Hertz et al [31]. Podobně jako naše nálezy byla i v této studii nejhůře reprodukovatelným parametrem tortuozita, zatímco ostatní parametry byly z hlediska shody nálezů mezi více hodnotiteli signifikantně lepší a vzájemně srovnatelné. Jiné studie prokázaly horší reprodukovatelnost NFBD. Nejlépe reprodukovatelným parametrem je ve většině sledovaných studií (vč. naší) délka nervových vláken rohovky, případně jejich hustota – tyto dva parametry lze tedy doporučit jako nejvhodnější markery pro longitudinální sledování pacientů [32].

Intra-class korelační koeficienty pro srovnání manuální a automatické analýzy byly významně nižší ve srovnání s ICC reflektujícími spolehlivost nálezů při manuální analýze snímků více hodnotiteli. Všechny hodnocené parametry (CNFD, CNFL a CNBD) vykazovaly při hodnocení automatickou analýzou signifikantně nižší hodnoty ve srovnání s analýzou manuální. Podkladem těchto rozdílů jsou pravděpodobně především technické aspekty, jako je nižší kvalita některých snímků (např. drobné vzduchové bubliny, přítomnost linií způsobených přílišným tlakem na rohovku), díky nimž automatický software neidentifikuje správně některá nervová vlákna. Těmto problémům se však v běžné praxi nelze úplně vyhnout a pomocí manuální analýzy lze tyto snímky bez problémů hodnotit. Prakticky identické nálezy se signifikantně nižšími hodnotami CNFL při použití automatické analýzy ve srovnání s analýzou manuální byly prokázány i v dalších podobných studiích [29,30]. Tyto rozdíly jsou tedy systémové a nelze je vysvětlit event. horší kvalitou snímků v našem centru. Výsledky všech zmíněných studií vč. naší tak ukazují, že obě

metody hodnocení (manuální a automatická) nejsou vzájemně zaměnitelné a není možné je v rámci jedné studie libovolně střídát. Při hodnocení je obecně nutné používat normativní data vytvořená pro příslušný typ analýzy. Pro manuální analýzu tak lze doporučit využití dat z práce autorů Tavakoli et al [20] nebo z naší studie, zatímco pro automatický software nejsou validní normativní data prozatím k dispozici [29].

Seznam použitých zkratk

CCM – konfokální mikroskopie rohovky (Corneal Confocal Microscopy)
 CNBD – hustota větví korneálních nervových vláken (Corneal Nerve Branch Density)
 CNFD – hustota korneálních nervových vláken (Corneal Nerve Fiber Density)
 CNFL – délka korneálních nervových vláken (Corneal Nerve Fiber Length)
 CNFT – koeficient vinutosti (Corneal Nerve Fiber Tortuosity)
 DM – diabetes mellitus
 DPN – diabetická polyneuropatie
 ICC – intraclass correlation coefficient
 SD – směrodatná odchylka (Standard Deviation)
 SFN – neuropatie tenkých vláken (Small Fiber Neuropathy)
 x – průměr

Literatura

- Tavakoli M, Hossain P, Malik RA. Clinical applications of corneal confocal microscopy. *Clin Ophthalmol* 2008;2(2):435–45.
- Tavakoli M, Marshall A, Pitcheathly R, et al. Corneal confocal microscopy: a novel means to detect nerve fibre damage in idiopathic small fibre neuropathy. *Exp Neurol* 2010;223(1):245–50. doi: 10.1016/j.expneurol.2009.08.033.
- Tavakoli M, Quattrini C, Abbott C, et al. Corneal confocal microscopy: a novel noninvasive test to diagnose and stratify the severity of human diabetic neuropathy. *Diabetes Care* 2010;33(8):1792–7. doi: 10.2337/dc10-0253.
- Ferrari G, Gemignani F, Macaluso C. Chemotherapy-associated peripheral sensory neuropathy assessed using in vivo corneal confocal microscopy. *Arch Neurol* 2010;67(3):364–5. doi: 10.1001/archneurol.2010.17.
- Papanas N, Ziegler D. Corneal confocal microscopy: a new technique for early detection of diabetic neuropathy. *Curr Diab Rep* 2013;13(4):488–99. doi: 10.1007/s11892-013-0390-z.
- Guthoff RF, Zhivov A, Stachs O. In vivo confocal microscopy, an inner vision of the cornea – a major review. *Clin Exp Ophthalmol* 2009;37(1):100–17. doi: 10.1111/j.1442-9071.2009.02016.x.
- Müller LJ, Pels L, Vrensen GF. Ultrastructural organization of human corneal nerves. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;37(4):476–88.
- Pawley JB, Masters BR. Handbook of biological confocal microscopy. *Optical Engineering* 1996;35(9):2765–6.
- Papanas N, Ziegler D. Corneal confocal microscopy: recent progress in the evaluation of diabetic neuropathy. *J Diabetes Investig* 2015;6(4):381–9. doi: 10.1111/jdi.12335.
- Chen X, Graham J, Dabbah MA, et al. Small nerve fiber quantification in the diagnosis of diabetic sensorimotor polyneuropathy: comparing corneal confocal microscopy with intraepidermal nerve fiber density. *Diabetes Care* 2015;38(6):1138–44. doi: 10.2337/dc14-2422.
- Petropoulos IN, Alam U, Fadavi H, et al. Rapid automated diagnosis of diabetic peripheral neuropathy with in vivo corneal confocal microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014;55(4):2071–8. doi: 10.1167/iov.13-13787.
- Lacomis D. Small-fiber neuropathy. *Muscle Nerve* 2002;26(2):173–88.
- Buršová Š, Vlčková E, Hnojčková M, et al. Vyšetření hustoty intraepidermálních nervových vláken z kožní biopsie – normativní data. *Cesk Slov Neurol N* 2012;75/108(4):455–9.
- Vlčkova-Moravcova E, Bednarik J, Dusek L, et al. Diagnostic validity of epidermal nerve fiber densities in painful sensory neuropathies. *Muscle Nerve* 2008;37(1):50–60.
- Pritchard N, Edwards K, Dehghani C, et al. Longitudinal assessment of neuropathy in type 1 diabetes using novel ophthalmic markers (LANDMark): study design and baseline characteristics. *Diabetes Res Clin Pract* 2014;104(2):248–56. doi: 10.1016/j.diabres.2014.02.011.
- Lovblom LE, Halpern EM, Wu T, et al. In vivo corneal confocal microscopy and prediction of future incident neuropathy in type 1 diabetes: a preliminary longitudinal analysis. *Can J Diabetes* 2015;39(5):390–7. doi: 10.1016/j.jcjd.2015.02.006.
- Tavakoli M, Marshall A, Thompson L, et al. Corneal confocal microscopy: a novel noninvasive means to diagnose neuropathy in patients with Fabry disease. *Muscle Nerve* 2009;40(6):976–84. doi: 10.1002/mus.21383.
- Tavakoli M, Marshall A, Banka S, et al. Corneal confocal microscopy detects small-fiber neuropathy in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A patients. *Muscle Nerve* 2012;46(5):698–704. doi: 10.1002/mus.23377.
- Kass-Ilyiya L, Javed S, Gosal D, et al. Small fiber neuropathy in Parkinson's disease: a clinical, pathological and corneal confocal microscopy study. *Parkinsonism Relat Disord* 2015;21(12):1454–60. doi: 10.1016/j.parkrel.2015.10.019.
- Tavakoli M, Ferdousi M, Petropoulos IN, et al. Normative values for corneal nerve morphology assessed using corneal confocal microscopy: a multinational normative data set. *Diabetes Care* 2015;38(5):838–43. doi: 10.2337/dc14-2311.
- Kallinikos P, Berhanu M, O'Donnell C, et al. Corneal nerve tortuosity in diabetic patients with neuropathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45(2):418–22.
- Dabbah MA, Graham J, Petropoulos I, et al. Dual-model automatic detection of nerve-fibres in corneal confocal microscopy images. *Med Image Comput Comput Assist Interv* 2010;13(1):300–7.
- Dabbah MA, Graham J, Petropoulos IN, et al. Automatic analysis of diabetic peripheral neuropathy using multi-scale quantitative morphology of nerve fibres in corneal confocal microscopy imaging. *Med Image Anal* 2011;15(5):738–47. doi: 10.1016/j.media.2011.05.016.
- Nitoda E, Kallinikos P, Pallikaris A, et al. Correlation of diabetic retinopathy and corneal neuropathy using confocal microscopy. *Curr Eye Res* 2012;37(10):898–906. doi: 10.3109/02713683.2012.683507.
- Ziegler D, Papanas N, Zhivov A, et al. Early detection of nerve fiber loss by corneal confocal microscopy and skin biopsy in recently diagnosed type 2 diabetes. *Diabetes* 2014;63(7):2454–63. doi: 10.2337/db13-1819.
- Ahmed A, Brill V, Orszag A, et al. Detection of diabetic sensorimotor polyneuropathy by corneal confocal microscopy in type 1 diabetes: a concurrent validity study. *Diabetes Care* 2012;35(4):821–8. doi: 10.2337/dc11-1396.
- Halpern EM, Lovblom LE, Orlov S, et al. The impact of common variation in the definition of diabetic sensorimotor polyneuropathy on the validity of corneal in vivo confocal microscopy in patients with type 1 diabetes: a brief report. *J Diabetes Complicat* 2012;27(3):240–2. doi: 10.1016/j.jdiacomp.2012.10.011.
- Asghar O, Petropoulos IN, Alam U, et al. Corneal confocal microscopy detects neuropathy in subjects with impaired glucose tolerance. *Diabetes Care* 2014;37(9):2643–6. doi: 10.2337/dc14-0279.
- Ostrovski I, Lovblom LE, Farooqi MA, et al. Reproducibility of in vivo corneal confocal microscopy using an automated analysis program for detection of diabetic sensorimotor polyneuropathy. *PLoS One* 2015;10(11):e0142309. doi: 10.1371/journal.pone.0142309.
- Pacaud D, Romanchuk KG, Tavakoli M, et al. The reliability and reproducibility of corneal confocal microscopy in children. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2015;56(9):5636–40. doi: 10.1167/iov.15-16995.
- Hertz P, Brill V, Orszag A, et al. Reproducibility of in vivo corneal confocal microscopy as a novel screening test for early diabetic sensorimotor polyneuropathy. *Diabet Med* 2011;28(10):1253–60. doi: 10.1111/j.1464-5491.2011.03299.x.
- Petropoulos IN, Manzoor T, Morgan P, et al. Repeatability of in vivo corneal confocal microscopy to quantify corneal nerve morphology. *Cornea* 2013;32(5):e83–9. doi: 10.1097/ICO.0b013e3182749419.

25. Raputova J, Srotova I, Vlckova E, Sommer C, Üçeyler N, Birklein F, Rittner HL, Reborn C, Adamova B, Kovalova I, Kralickova Nekvapilova E, Forer L, Belobradkova J, Olsovsky J, Weber P, Dusek L, Jarkovsky J, Bednarik J. Sensory phenotype and risk factors for painful diabetic neuropathy: a cross-sectional observational study. *Pain* 2017;158(12):2340-2353. doi: 10.1097/j.pain.0000000000001034. IF = 5,559. Počet citací v SCI: 2.

Oceněno mimořádnou cenou České neurologické společnosti ČLS JEP za rok 2017.

Tato velká průřezová multicentrická prospektivní observační studie je zaměřená na hodnocení rizikových faktorů a význam senzitivního profilování u velkého souboru pacientů s bolestivou diabetickou neuropatií (DSPN) a současně u skupiny zdravých kontrol (ZK). Analyzovány byly výsledky velmi široké baterie laboratorních, elektrofyziologických a klinických testů včetně řady specializovaných dotazníků (zaměřených mj. na neuropatickou bolest a její komorbidity – tedy úzkost, depresi a katastrofizaci bolesti) a podrobného kvantitativního testování senzitivity s využitím DFNS protokolu.

Studie potvrdila význam senzitivního profilování u pacientů s diabetickou polyneuropatií a to s možností využití známých senzitivních profilů, definovaných v rámci jiných klinických jednotek (tedy profilu deafferentačního a profilu označovaného jako „iritabilní nociceptor“). K uvedeným dvěma profilům lze zařadit většinu pacientů s DSPN. Přibližně třetina pacientů však zůstává nezařazena, protože nesplňuje kritéria žádného z obou profilů.

Pacienti s bolestivou diabetickou neuropatií (zejména v případě její vyšší intenzity) vykazují také řadu neuropsychologických změn: jasně zvýšenou míru úzkosti a úzkostnosti, častější depresivní symptomy a vyšší míru katastrofizace bolesti.

Studie také poukazuje na tíži neuropatie jako klíčový rizikový faktor rozvoje neuropatické bolesti u pacientů s DSPN a identifikuje další zajímavý rizikový faktor rozvoje bolesti a to diabetickou nefropatii (definovanou zvýšenou hladinou kreatininu, resp. jeho sníženou clearance), zřejmě jako další mikroangiopatickou komplikací.

Na podkladě výše uvedených faktorů, které byly v rámci studie identifikovány jako nezávislé prediktory signifikantně asociované s neuropatickou bolestí, byl vytvořen prediktivní model, který byl při zpětném zhodnocení sledovaného souboru schopen selektovat pacienty s neuropatickou bolestí a to s vynikající (více než 90%) senzitivitou a 76% specificitou.

Práce tedy přispěla k odhalení několika rizikových faktorů neuropatické bolesti u DSPN.

Sensory phenotype and risk factors for painful diabetic neuropathy: a cross-sectional observational study

Jana Raputova^{a,b}, Iva Srotova^{a,b}, Eva Vlckova^{a,b}, Claudia Sommer^c, Nurcan Üçeyler^c, Frank Birklein^d, Heike L. Rittner^e, Cora Reborn^d, Blanka Adamova^{a,b}, Ivana Kovalova^{a,b}, Eva Kralickova Nekvapilova^b, Lucas Forer^f, Jana Belobradkova^g, Jindrich Olsovsky^h, Pavel Weberⁱ, Ladislav Dusek^j, Jiri Jarkovsky^j, Josef Bednarik^{a,b,*}

Abstract

Different sensory profiles in diabetic distal symmetrical sensory-motor polyneuropathy (DSPN) may be associated with pain and the responsiveness to analgesia. We aimed to characterize sensory phenotypes of patients with painful and painless diabetic neuropathy and to assess demographic, clinical, metabolic, and electrophysiological parameters related to the presence of neuropathic pain in a large cohort of well-defined DSPN subjects. This observational cross-sectional multi-center cohort study (performed as part of the ncRNAPain EU consortium) of 232 subjects with nonpainful ($n = 74$) and painful ($n = 158$) DSPN associated with diabetes mellitus of type 1 and 2 (median age 63 years, range 21–87 years; 92 women) comprised detailed history taking, laboratory tests, neurological examination, quantitative sensory testing, nerve conduction studies, and neuropathy severity scores. All parameters were analyzed with regard to the presence and severity of neuropathic pain. Neuropathic pain was positively correlated with the severity of neuropathy and thermal hyposensitivity ($P < 0.001$). A minority of patients with painful DSPN (14.6%) had a sensory profile, indicating thermal hypersensitivity that was associated with less severe neuropathy. Neuropathic pain was further linked to female sex and higher cognitive appraisal of pain as assessed by the pain catastrophizing scale ($P < 0.001$), while parameters related to diabetes showed no influence on neuropathic pain with the exception of laboratory signs of nephropathy. This study confirms the value of comprehensive DSPN phenotyping and underlines the importance of the severity of neuropathy for the presence of pain. Different sensory phenotypes might be useful for stratification of patients with painful DSPN for analgesic treatment and drug trials.

Keywords: Painful diabetic neuropathy, Sensory profile, Quantitative sensory testing, Risk factors

1. Introduction

Neuropathic pain (NeuP) has multiple pathophysiological mechanisms that represent potential targets for tailored therapy. Because NeuP is defined as pain caused by a lesion or disease affecting the somatosensory system,³⁹ there have been attempts to identify sensory phenotypes that may reflect these pathophysiological mechanisms³⁸ and to identify NeuP biomarkers. For example, sensory function is lost or reduced in a group of

patients, which might be indicative of deafferentation (DA), whereas other patients have evidence of preserved small-fiber function and associated hypersensitivity, a pattern termed the “irritable nociceptor” (IN).^{9,13}

There exist several types of painful neuropathies in patients with diabetes, but painful diabetic distal symmetrical sensory-motor polyneuropathy (pDSPN) as a variant of a typical symmetrical length-dependent DSPN is the most frequent. The findings

Sponsorships or competing interests that may be relevant to content are disclosed at the end of this article.

^a Central European Institute of Technology, Masaryk University, Brno, Czech Republic, ^b Department of Neurology, University Hospital Brno, Brno, Czech Republic, ^c Department of Neurology, University of Würzburg, Würzburg, Germany, ^d Department of Neurology, University Medical Center, Mainz, Germany, ^e Department of Anesthesiology, Centre for Interdisciplinary Pain Medicine, University Hospital Würzburg, Würzburg, Germany, ^f Division of Genetic Epidemiology, Department of Medical Genetics, Molecular and Clinical Pharmacology, Medical University of Innsbruck, Innsbruck, Austria, ^g Diabetologic Centre, Department of Internal Medicine and Gastroenterology, University Hospital Brno, Brno, Czech Republic, ^h Diabetologic Centre, St. Anne University Hospital, Brno, Czech Republic, ⁱ Department of Internal Medicine, Geriatrics and Practical Medicine, University Hospital Brno, Brno, Czech Republic, ^j Institute of Biostatistics and Analyses, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic

*Corresponding author. Address: Central European Institute of Technology, Masaryk University, 625 00 Brno, Czech Republic. Tel.: 00420532232501. E-mail address: bednarik.josef@fnbrno.cz (J. Bednarik).

Supplemental digital content is available for this article. Direct URL citations appear in the printed text and are provided in the HTML and PDF versions of this article on the journal's Web site (www.painjournalonline.com).

PAIN 158 (2017) 2340–2353

Copyright © 2017 The Author(s). Published by Wolters Kluwer Health, Inc. on behalf of the International Association for the Study of Pain. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial-No Derivatives License 4.0 (CCBY-NC-ND), where it is permissible to download and share the work provided it is properly cited. The work cannot be changed in any way or used commercially without permission from the journal.

<http://dx.doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001034>

that characterize pDSPN compared with painless DSPN (nDSPN) have been addressed in many studies, mainly with the goal of better understanding the mechanisms of NeuP in pDSPN, determining risk markers for pain development, and targeting therapy.^{3,32} The results, however, are mixed and sometimes even controversial, partly because of sample heterogeneity and small sample sizes.³ A recent cross-sectional observational study in a large cohort of patients with DSPN gave the first robust results, providing the rationale for a further phenotyping of pDSPN.³⁸ These results included that pDSPN severity was positively correlated with pain.

To investigate further the question of why some persons with DSPN report no pain while the same disease leads to severe pain in others, we aimed to characterize sensory phenotypes together with clinical and neurophysiological parameters possibly affecting the development of NeuP in a large and well-defined cohort of patients with DSPN. Our objectives were to identify the pattern of symptoms and signs of large and small-fiber dysfunction that would distinguish pDSPN and nDSPN.

2. Material and methods

2.1 Study design and patients

This observational, cross-sectional, multicenter cohort study was part of the international “ncRNAPain consortium” (<http://www.ncrna-pain.eu/>). It was approved by the respective local authorities: the Ethical committees of the University Hospital Brno (No.602133), and the Rhineland—Palatinate medical association (9142-F), and registered at the German Clinical Trials Register; <https://www.germanctr.de/> (Registration Number DRKS00008964).

Patients with diabetes mellitus type 1 or 2 older than 18 years with diagnosed DSPN, or patients with symptoms and signs suggestive of DSPN were recruited from 2 University Diabetes Centers in Brno (Czech Republic), from the Departments of Neurology and Anesthesiology in Würzburg and Department of Neurology in Mainz (Germany), and referred for a single clinical assessment to one of 3 study centers (Departments of Neurology in Brno, Würzburg, and Mainz). Patients who were referred to our centers were consecutively recruited between January 2015 and June 2016 and agreed to participate in the study. All participants signed written informed consent before inclusion.

All patients first underwent evaluation to confirm the diagnosis of DSPN and their eligibility for the study. During this assessment, patients reported their medical and drug history in detail. They also reported on their age, ethnicity, education, employment status, medical history, date of diabetes diagnosis, its type and treatment. Alcohol consumption was quantified using standard drinks with a cutoff of 3/2 standard drinks/day in men/women.²⁸ Basic clinical parameters were measured for each participant (weight, height, body mass index, and blood pressure). All patients also underwent basic blood tests to exclude other causes of polyneuropathy (vitamin B12 and folate levels, thyroid hormones, serum protein electrophoresis, blood count, serum creatinine, bilirubin and transaminases), glycosylated haemoglobin (HbA1C), and serum lipid spectrum. A structured neurological examination was conducted to assess clinical signs and symptoms of DSPN. Nerve conduction studies (NCS) and skin biopsy with evaluation of intraepidermal nerve fiber density (IENFD) (performed in patients who did not comply with NCS criteria for DSPN—9 cases) were conducted to confirm the diagnosis of DSPN.

Exclusion criteria were:

- (1) NeuP due to other cause than DSPN
- (2) Central nervous system lesions

- (3) History or presence of laboratory abnormalities indicating a disease, condition, or treatment that might be a potential cause of polyneuropathy other than diabetes.

Included were patients with a combination of symptoms (decreased sensation, positive sensory symptoms, like burning or aching pain, mainly in the toes, feet, or legs) or signs (decreased distal sensation, decreased or absent ankle reflexes) of distal symmetrical sensory-motor diabetic neuropathy and abnormalities in either NCS or IENFD, who complied with the criteria for definite DSPN.³⁷

Subjects meeting study inclusion and exclusion criteria then underwent quantitative sensory testing (QST), pain assessment, and evaluation of neuropathy severity and neuropsychological scores and questionnaires. Recruitment of study participants and the criteria used to subdivide the study participants into the different subgroups are shown in the flow diagram (Fig. 1).

2.2. Structured neurological examination

A comprehensive neurological examination included assessment of light touch (using a brush), pain (pinprick), temperature (TipTherm) and vibration sensation (tuning fork), deep-tendon reflexes, muscle bulk, and motor power using a motor Medical Research Council (mMRC) scale²⁵ modified by professors Sommer and Üçeyler (August 2013, unpublished). The mMRC scoring was extended to the following muscle pairs: elbow extensors, finger extensors, fingers spreading muscles, foot

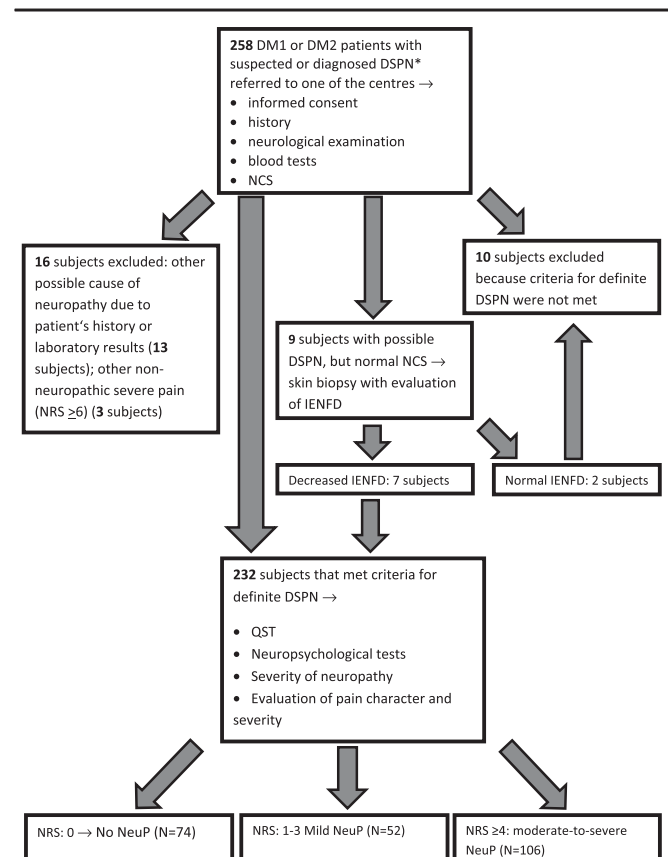


Figure 1. Flow diagram of study participant recruitment and the criteria to subdivide the study participants into the different subgroups. *Diagnosis was made outside one of the centres participating in the study. DM1, diabetes mellitus type 1; DM2, diabetes mellitus type 2; DSPN, diabetic polyneuropathy; IENFD, intraepidermal nerve fiber density; NCS, Nerve conduction studies; NeuP, Neuropathic pain; NRS, numerical rating scale; QST, quantitative sensory testing.

plantar flexors, big toe extensors, and big toe plantar flexors to better account for distal pareses. The mMRC sum score thus ranges from 0 (“total paralysis”) to 120 (“normal strength”). Autonomic signs and symptoms in the limbs (color changes, sweating, skin temperature, trophic changes) were also assessed.

2.3. Nerve conduction studies

The extent of electrophysiological examination was set to comply with the American Association of Electrodiagnostic Medicine (AAEM) definition of distal neuropathy for research purposes.¹¹ Motor NCS of the peroneal, tibial, and ulnar nerves, including 10 consecutive F-waves, antidromic sensory nerve conduction of the sural and radial nerve, and concentric needle electromyography from at least 2 distal lower-extremity muscles and 1 distal upper-extremity muscle, were performed in a standard manner.² The results were processed according to published reference values accepted by our EMG laboratories.²⁰

2.4. Skin biopsy for intraepidermal nerve fiber density assessment

All skin biopsies were processed in the Brno laboratory. Skin punch biopsy samples were taken from the distal calf, approximately 10 cm above the right lateral malleolus. Frozen sections of 50 μm thickness were cut and immunostained with rabbit polyclonal antibodies to human PGP-9.5 (1:200; Ultraclone, Wellow, United Kingdom) as primary antibody and goat anti-rabbit IgG labelled with fluorescein probe as secondary antibody (1:100; Chemicon, Temecula, CA). The details of specimen removal and staining techniques have been published⁴³ and follow standard recommendations.²² The average IENFD per millimeter of epidermal length was calculated according to current guidelines.²²

2.5. Quantitative sensory testing

Skin and muscle sensitivity was tested using the standardized test battery for QST published by the German Research Network on Neuropathic Pain (Deutscher Forschungsverbund Neuropathischer Schmerz, DFNS).²⁷ The standardized quantitative sensory testing assessment published by the DFNS contained 13 different thermal and mechanical tests: cold detection thresholds (CDT); warm detection thresholds (WDT); paradoxical heat sensations (PHS) during the procedure of alternating warm and cold stimuli (thermal sensory limen [TSL]); cold pain thresholds (CPT) and heat pain thresholds (HPT); mechanical detection thresholds for touch (MDT) and vibration (VDT); mechanical pain thresholds (MPT) for pinprick and pressure pain thresholds (PPT); a stimulus–response–function for pinprick sensitivity (mechanical pain sensitivity [MPS]); and dynamic mechanical allodynia (DMA) as well as pain summation to repetitive pinprick stimuli (wind-up ratio). All tests were performed on the dorsum of the foot, except for PPT (sole) and VDT (medial malleolus) on the right.

The Czech version of DFNS instructions have recently been validated, and the applicability of published reference values²³ has been confirmed for the Czech population.³⁶ For all parameters, negative (loss of function) as well as positive (gain of function) phenomena were assessed. Definition of QST abnormalities were based on DFNS recommendations²⁴: if the individual z-values were outside of the 95% confidence interval of the reference group (ie, z-scores >1.96 or <-1.96), the values were designated as absolute abnormalities.

2.6. Pain assessment

Assessment of any pain was performed during neurological examination and included its descriptors, distribution, pain duration, intensity, time course, and analgesic treatment. Based on clinical evaluation and results of additional tests (QST, NCS, IENFD), pain in every patient was classified as NeuP and nonneuropathic using the International Association for the Study of Pain (IASP)/Neuropathic Pain Special Interest Group (NeuPSIG) definition.³⁹

Severity of NeuP was quantified using an 11-step numerical rating scale (NRS). We assessed current pain intensity, mean, and minimum and maximum pain intensity during the preceding week. Ongoing analgesic therapy was not stopped before the assessment.

Patients with DSPN were further classified as pDSPN and nDSPN. Participants classified as pDSPN had to have chronic (ie, ≥ 3 months) peripheral NeuP at the time of the clinical assessment and to meet the criteria of probable or confirmed NeuP according to the updated IASP grading system.¹⁴

The severity of NeuP was rated according to the mean NRS during the last week before clinical examination. Study participants were thereafter allocated into 3 groups based on the mean pain intensity last week score: 0: no NeuP (nDSPN); 1 to 3: mild NeuP (pDSPN-m); and 4 to 10: moderate to severe NeuP (pDSPN-s).

In addition, pain and its impact on everyday life activities was quantified and characterized using the Graded Chronic Pain Scale (GCPS).⁴⁴ The Neuropathic Pain Symptom Inventory (NPSI),⁶ a self-administered questionnaire, was applied to evaluate NeuP symptoms. We used the Czech and German validated versions of the NPSI.^{30,35}

2.7. Neuropathy severity and neuropsychological scores and questionnaires

The modified Toronto Clinical Neuropathy Score (mTCNS) was applied as a tool to quantify DSPN. It consists of 6 symptoms scores and 5 sensory test scores, summarized as sum score of symptoms (0–18 points), sum score of sensory tests (0–15 points) and total sum score (0–33 points), and correlates with diabetic neuropathy severity.⁷ Similarly, the INCAT Overall Disability Sum Score (ODSS) was used to quantify disability in DSPN.²⁵

The Beck Depression Inventory II (BDI II) and the State-Trait Anxiety Inventory Y (STAI Y) were used to measure symptoms of depression and anxiety.³⁴ The Pain Catastrophizing Scale (PCS) was used to assess negative cognitions and appraisals of pain.²⁶

2.8. Standardization of performed evaluations

During the preparation phase of the study, investigators from all 3 centers had 2 meetings focused on the standardized use of all tests and scores, on the use of validated versions of the questionnaires in Czech and German, and on the interpretation and possible pitfalls of all individual items of scores and tests. Evaluation of most of the tests and scores was done by 1 researcher in the Mainz (C.R.) and Würzburg (N.Ü.), and by 3 researchers in the Brno center (J.R., I.S., and I.K.), where the greatest part of the study group was recruited. The data were submitted to a common online database, which forces complete data entry and includes plausibility checks, and data were discussed in regular meetings.

2.9. Statistical evaluation

Standard measures of summary statistics were applied to describe primary data: Continuous parameters were summarized

as median (5th-95th percentile range) or mean \pm SD. Categorical parameters are expressed as absolute and relative frequencies.

P value represents the comparison of patients with different levels of pain (Kruskal–Wallis test for continuous variables and Fisher exact test for categorical variables). Normal distribution of continuous variables was inspected by graphical tools and confirmed by the Shapiro–Wilks test. The diagnostic power of potential predictors and final model scores were assessed on the basis of receiver operating characteristics (ROC) curves. The ROC analysis was performed using an ROC web calculator¹⁰ for curve fitting, SPSS 24.0.0.0.1 (IBM Corporation, 2016) for the area under the curve (AUC) computation and testing and MedCalc 11.1.0.0 (MedCalc Software 1993-2009) for computation of positive and negative predictive value. Significance of ROC analysis was based on the calculated AUC with corresponding 95% confidence interval. The computation was based on binormal assumption. The analyses used logistic regression models to quantify the association between potential predictors and the end point. Both a univariate-adjusted and a multivariate-adjusted approach were followed. The models used maximum likelihood estimation directly comparing the likelihood L_0 for the null model when all slope parameters are zero, with the likelihood L_1 of the fitted model. Significance of regression coefficients was tested by the help of Wald statistics, which is based on the asymptotic normality property of maximum likelihood estimates (tested on the basis of Chi-square distribution). Spearman correlation analysis was performed to explore associations between findings, clinical scores or pain intensities. The propensity score matching method was used to match subgroups.

3. Results

3.1. Study participants

Of 258 assessed patients, 232 study participants with DSPN were included (Fig. 1). Ten subjects did not meet the criteria for DSPN and 16 subjects met exclusion criteria. According to the presence and intensity of NeuP, study participants were divided into 3 groups: nDSPN ($n = 74$), (pDSPN-m) ($n = 52$), and pDSPN-s ($n = 106$); 66 of the latter had severe pain (NRS ≥ 6). In 21 pDSPN-m patients who responded to analgesic therapy, NRS before administration of analgesic therapy was reported to be ≥ 4 .

3.2. Demographics and diabetes characteristics

Most participants had type 2 diabetes (172 cases; 74.1%). The median age was 63 (range 21-87) years, and all participants were white, with 92 women (39.7%). Table 1 summarizes demographic and clinical data in relation to subtyping of NeuP. Women were overrepresented in pDSPN-s compared with nDSPN ($P = 0.017$).

Laboratory data are given in Table 2 (with possible relation to diabetes) and Suppl. Table 1 (additional laboratory data; available online at <http://links.lww.com/PAIN/A474>). Regarding diabetes mellitus-related data, the only difference between pDSPN and nDSPN was the higher number of abnormally increased serum creatinine ($P < 0.015$) and abnormally decreased estimated glomerular filtration rate ($P = 0.036$) as markers of possible diabetic nephropathy in pDSPN.

3.3. Pain characteristics and questionnaires

All pDSPN patients reported descriptors typical of neuropathic pain.^{6,15} In all cases, pain was present symmetrically and distally in the feet, and in some patients, also in the hands.

Study participants in all groups reported additional pain of nonneuropathic origin, mostly low back pain, musculoskeletal pain, or headache (Table 3).

As expected from the group definition, patients classified as pDSPN-s had higher NeuP intensities (Table 3) in comparison with those classified as pDSPN-m. Similarly, all subscores and the summary disability score of GPCS and the GPCS classification grade showed higher values in pDSPN-s compared with pDSPN-m and nDSPN.

Study participants with pDSPN-s reported greater severity of symptoms across all parameters of the NPSI compared with those with pDSPN-m (Table 3).

Psychological scales reflecting pain catastrophizing, depression, and anxiety (PCS, BDI II, STAI-S, and STAI-T) were higher (sum scores and some individual items) in pDSPN compared with nDSPN (BDI II, STAI-S, and STAI-T), and showed higher scores (PCS) in pDPS-s compared with pDSPN-m (Table 3).

3.4. Analgesic treatment

There was increased reported analgesic use in study participants with NeuP, and especially of those analgesics specific for treatment of neuropathic pain, that is, gabapentinoids and serotonin-norepinephrine reuptake inhibitors (mostly duloxetine) (Suppl. Table 2, available online at <http://links.lww.com/PAIN/A474>). These analgesics were prescribed only in a very small number of patients with nDSPN (in 4 patients—5.4%). Of 158 patients with pDSPN, 70 patients were treated with standard analgesics recommended in painful diabetic neuropathy, whereas 88 subjects received either nonrecommended analgesia or no treatment (Suppl. Table 2, available online at <http://links.lww.com/PAIN/A474>).

3.5. Clinical examination

Qualitative and semiquantitative sensory examination disclosed more frequent abnormalities representing loss of function (hypo/anesthesia) in pDSPN-s in comparison with nDSPN (cold and warm hypoesthesia, $P < 0.006$ and < 0.011 ; pallhypoesthesia, $P \leq 0.006$), and in comparison with the pDSPN-m subgroup (tactile hypoesthesia and mechanical hypoalgesia, $P < 0.001$) (Suppl. Table 3, available online at <http://links.lww.com/PAIN/A474>). Motor deficits expressed as the mMRC score of the lower extremities were greater in pDSPN-s compared with both nDSPN and pDSPN-m ($P < 0.001$). Autonomic signs/symptoms were not different between pain subgroups (Suppl. Table 3, available online at <http://links.lww.com/PAIN/A474>).

3.6. Quantitative sensory testing

A substantial proportion of individual Z-scores in patients with DSPN fell outside the normative range (below -2 z-score). Group comparisons revealed differences in the loss of function direction in all 3 subgroups with the lowest z-score values (greatest loss) in pDSPN-s and the highest z-score values (the least loss) in nDSPN. We found differences between pDSPN-s and nDSPN for all thermal QST modalities (CDT, WDT, TSL, CPT, and HPT; $P < 0.01$), but also between pDSPN-s and pDSPN-m (CDT, WDT, TSL, and HPT; $P < 0.05$), and between pDSPN-m and nDSPN (WDT and TSL; $P < 0.01$, CDT; $P < 0.05$) (Suppl. Table 4, available online at <http://links.lww.com/PAIN/A474>; Fig. 2).

Quantitative sensory testing parameters for sensation of mechanical stimuli showed the same trend with less pronounced differences between subgroups. Group comparisons revealed a greater loss for

Table 1**Summary of demographic and clinical parameters.**

Parameters	Moderate/severe pain (NRS \geq 4) N = 106	Mild pain (NRS 1-3) N = 52	Painless (NRS 0) N = 74	P
Age, y	63.0 (39.1; 78.5)	63.9 (30.9; 76.5)	63.0 (28.9; 80.1)	0.770
Gender				0.017
Women	52 (49.1%) ^a	19 (36.5%) ^{ab}	21 (28.4%) ^b	
Men	54 (50.9%)	33 (63.5%)	53 (71.6%)	
Employment status				0.965
Regularly working	33 (31.1%)	17 (32.7%)	30 (40.5%)	
Sick leave	2 (1.9%)	1 (1.9%)	1 (1.4%)	
Sick leave because of pain	1 (0.9%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	
Retired	69 (65.1%)	33 (63.5%)	42 (56.8%)	
Retired because of pain	1 (0.9%)	1 (1.9%)	1 (1.4%)	
Height, cm	173.0 (159.0; 187.0)	177.0 (159.0; 188.0)	177.5 (161.0; 191.0)	0.096
BMI	29.7 (21.4; 43.0)	29.4 (22.6; 38.6)	28.7 (21.5; 36.5)	0.385
Type of diabetes				0.183
Type 1	24 (22.6%)	11 (21.2%)	25 (33.8%)	
Type 2	82 (77.4%)	41 (78.8%)	49 (66.2%)	
Duration of diabetes, y	13.0 (1.0; 32.0)	13.5 (3.0; 37.0)	12.5 (1.0; 27.0)	0.622
HbA1c (mmol/mol/(%))	61 (7.7) (39 (5.7); 96 (10.9))	54 (7.1) (42 (6.0); 89 (10.3))	58 (7.5) (37 (5.5); 86 (10.0))	0.612
HbA1c (mmol/mol/(%)) Controlled: <31 mmol/mol (<5.0%)	42 (39.6%)	23 (44.2%)	29 (39.2%)	0.817
Oral antidiabetics				0.632
No	38 (35.8%)	16 (30.8%)	29 (39.2%)	
Yes	68 (64.2%)	36 (69.2%)	45 (60.8%)	
Number of oral antidiabetics	1.0 (0.0; 3.0)	1.0 (0.0; 3.0)	1.0 (0.0; 3.0)	0.882
Metformin				0.808
No	48 (45.3%)	21 (40.4%)	34 (45.9%)	
Yes	58 (54.7%)	31 (59.6%)	40 (54.1%)	
Daily dose of metformin	500.0 (0.0; 2550.0)	925.0 (0.0; 3000.0)	500.0 (0.0; 3000.0)	0.691
Known retinopathy				0.771
No	82 (77.4%)	38 (74.5%)	59 (79.7%)	
Yes	24 (22.6%)	13 (25.5%)	15 (20.3%)	
Diabetic nephropathy				0.950
No	81 (81.8%)	42 (82.4%)	57 (80.3%)	
Yes	18 (18.2%)	9 (17.6%)	14 (19.7%)	
Serum creatinine, μ mol/L	80.0 (52.0; 129.7)	81.5 (57.0; 132.0)	79.0 (55.0; 130.0)	0.528
Abnormal serum creatinine level				0.015
No	79 (74.5%) ^a	35 (67.3%) ^a	65 (87.8%) ^b	
Yes	27 (25.5%)	17 (32.7%)	9 (12.2%)	
eGFR, mL/min/1.73 m ²	78.6 (49.1; 123.1) ^a	75.1 (49.7; 116.8) ^a	86.5 (50.6; 126.5) ^b	0.063
Abnormal eGFR (<90 mL/min/1.73 m ²)				0.582
No	35 (33.0%)	18 (34.6%)	30 (40.5%)	
Yes	71 (67.0%)	34 (65.4%)	44 (59.5%)	
Abnormal eGFR (<60 mL/minute/1.73 m ²)				0.036
No	83 (78.3%) ^a	41 (78.8%) ^a	68 (91.9%) ^b	
Yes	23 (21.7%)	11 (21.2%)	6 (8.1%)	
Arterial hypertension				0.287
No	16 (15.1%)	9 (17.3%)	18 (24.3%)	
Yes	90 (84.9%)	43 (82.7%)	56 (75.7%)	
Number of antihypertensives	2.0 (0.0; 5.0)	2.0 (0.0; 5.0)	2.0 (0.0; 5.0)	0.442
Ischemic arterial disease of lower extremities				0.999
No	97 (91.5%)	47 (92.2%)	67 (90.5%)	
Yes	9 (8.5%)	4 (7.8%)	7 (9.5%)	

(continued on next page)

Table 1 (continued)

Parameters	Moderate/severe pain (NRS ≥ 4)	Mild pain (NRS 1-3)	Painless (NRS 0)	P
	N = 106	N = 52	N = 74	
Ischemic coronary disease				
No	75 (70.8%)	36 (70.6%)	53 (71.6%)	0.999
Yes	31 (29.2%)	15 (29.4%)	21 (28.4%)	
At least 1 macroangiopathic complication				
No	67 (63.2%)	34 (65.4%)	47 (63.5%)	0.968
Yes	39 (36.8%)	18 (34.6%)	27 (36.5%)	

Continuous parameters are summarized as median (5th-95th percentile range). Categorical parameters are expressed as absolute and relative frequencies. P value represents the comparison of patients with different levels of pain (Kruskal–Wallis test for continuous variables and Fisher exact test for categorical variables); post hoc tests: a, b, c—same letters marking values of categories within given row denote mutually statistically not different groups. Statistically significant differences are expressed in bold type ($p < 0.05$).

BMI, body mass index; eGFR, estimated glomerular filtration rate; NRS, numerical rating scale.

MDT in pDSPN-s compared with nDSPN ($P < 0.01$) and pDSPN-m ($P < 0.05$), for MPS and MPT in pDSPN-s compared with nDSPN ($P < 0.01$, and $P < 0.05$, respectively) (Suppl. Table 4, available online at <http://links.lww.com/PAIN/A474>; **Fig. 3**).

We did not observe a higher proportion of “gain” abnormalities in pDSPN with the exception of DMA and PHS ($P < 0.05$) (**Fig. 3**). Dynamic mechanical allodynia was found in 12 patients with

pDSPN (7.6%), that is, in 8 (7.5%) patients with pDSPN-s and 4 (7.7%) patients with pDSPN-m. The patients with allodynia did not differ regarding demographic and clinical data, other QST data, NCS, and severity of DSPN (data not shown). In the NPSI, 31.9% of patients with pDSPN reported evoked pain (ie, allodynia), but only 7.6% had clinical evidence of brush-evoked allodynia. Paradoxical heat sensations was observed in all groups

Table 2

Summary of laboratory parameters (related to diabetes).

Parameters	Moderate/severe pain (NRS ≥ 4)	Mild pain (NRS 1-3)	Painless (NRS 0)	P
	N = 106	N = 52	N = 74	
Cholesterol				
Serum level, mmol/L	4.9 (3.2; 6.3)	4.9 (3.0; 6.3)	4.6 (3.3; 7.1)	0.639
Normal	51 (55.4%)	30 (61.2%)	43 (67.2%)	
Abnormal (>5.0 mmol/L)	41 (44.6%)	19 (38.8%)	21 (32.8%)	0.341
TAG				
Serum level, mmol/L	1.8 (0.7; 5.5)	1.5 (0.7; 4.5)	1.6 (0.6; 3.3)	0.101
Normal	45 (48.9%)	30 (62.5%)	40 (62.5%)	
Abnormal (>1.7 mmol/l)	47 (51.1%)	18 (37.5%)	24 (37.5%)	0.160
HDL				
Serum level, mmol/L	1.3 (0.8; 2.5)	1.4 (0.9; 2.0)	1.3 (0.7; 2.8)	0.582
Normal	24 (80.0%)	22 (91.7%)	29 (78.4%)	
Abnormal (<1.0 mmol/L)	6 (20.0%)	2 (8.3%)	8 (21.6%)	0.418
LDL				
Serum level, mmol/L	2.7 (1.1; 3.6)	2.8 (1.5; 3.9)	2.3 (1.4; 3.8)	0.180
Normal	25 (80.6%)	15 (65.2%)	33 (89.2%)	
Abnormal (>3.0 mmol/L)	6 (19.4%)	8 (34.8%)	4 (10.8%)	0.088
Dyslipidemia—at least 1 abnormality				
No	41 (38.7%)	24 (46.2%)	35 (47.3%)	0.443
Yes	65 (61.3%)	28 (53.8%)	39 (52.7%)	
Hypolipemics				
No	55 (51.9%)	28 (53.8%)	38 (51.4%)	0.970
Yes	51 (48.1%)	24 (46.2%)	36 (48.6%)	
Statins				
No	59 (55.7%)	29 (55.8%)	43 (58.1%)	0.941
Yes	47 (44.3%)	23 (44.2%)	31 (41.9%)	
Fibrates				
No	97 (91.5%)	48 (92.3%)	66 (89.2%)	0.835
Yes	9 (8.5%)	4 (7.7%)	8 (10.8%)	
Insulin				
No	50 (47.2%)	18 (34.6%)	28 (37.8%)	0.246
Yes	56 (52.8%)	34 (65.4%)	46 (62.2%)	
Insulin (number of units per day)	18.0 (0.0; 100.0)	31.0 (0.0; 126.0)	33.5 (0.0; 83.0)	0.498

Continuous parameters are summarized as median (5th-95th percentile range). Categorical parameters are expressed as absolute and relative frequencies. P value represents the comparison of patients with different levels of pain (Kruskal–Wallis test for continuous variables and Fisher exact test for categorical variables); post hoc tests: a, b, c—same letters marking values of categories within given row denote mutually statistically not different groups.

HDL, high density lipoproteins; LDL, low density lipoproteins; NRS, numerical rating scale; TAG, triacylglycerides.

Table 3

Summary of pain-related parameters, questionnaires, and neuropsychological scales.

Parameters	Moderate/severe pain (NRS ≥ 4)	Mild pain (NRS 1-3)	Painless (NRS 0)	P
	N = 106	N = 52	N = 74	
Duration of pain associated with diabetic polyneuropathy, y	4.0 (1.0; 15.0)	6.0 (2.0; 15.0)	0.0 (0.0; 0.0)	0.115
Other chronic pain (NRS <6, >3 mo)				0.002
No	38 (35.8%) ^a	31 (59.6%) ^b	44 (59.5%) ^b	
Yes	68 (64.2%)	21 (40.4%)	30 (40.5%)	
Current pain intensity (NRS 0-10)	3.6 ± 2.4 ^a	1.0 ± 1.3 ^b	0.0 ± 0.0 ^c	<0.001
Mean pain intensity last week (NRS 0-10)	5.8 ± 1.4 ^a	2.2 ± 1.3 ^b	0.0 ± 0.0 ^c	<0.001
Minimum pain intensity last week (NRS 0-10)	2.0 ± 2.2 ^a	0.4 ± 0.7 ^b	0.0 ± 0.0 ^c	0.001
Maximum pain intensity last week (NRS 0-10)	7.6 ± 1.7 ^a	4.0 ± 2.4 ^b	0.0 ± 0.0 ^c	<0.001
Neuropathic Pain Symptom Inventory				
Q1 burning	4.3 ± 3.1 ^a	0.9 ± 1.7 ^b	0.0 ± 0.0 ^c	<0.001
Q2 squeezing	2.8 ± 3.4 ^a	0.9 ± 2.1 ^b	0.0 ± 0.0 ^c	<0.001
Q3 pressure	3.5 ± 3.1 ^a	1.4 ± 2.2 ^b	0.0 ± 0.2 ^c	<0.001
Q4 pain duration	3.5 ± 1.4 ^a	2.2 ± 1.4 ^b	1.0 ± 0.0 ^c	<0.001
Q5 electric shocks	1.8 ± 3.0 ^a	0.6 ± 1.8 ^b	0.0 ± 0.1 ^c	<0.001
Q6 stabbing	3.3 ± 3.3 ^a	0.8 ± 1.8 ^b	0.0 ± 0.1 ^c	<0.001
Q7 number of attacks	2.2 ± 1.2 ^a	1.3 ± 0.5 ^b	1.0 ± 0.1 ^c	<0.001
Q8 evoked pain upon rubbing	2.1 ± 3.3 ^a	0.4 ± 1.1 ^b	0.0 ± 0.1 ^c	<0.001
Q9 evoked pain upon pressure	3.0 ± 3.4 ^a	0.3 ± 0.9 ^b	0.0 ± 0.1 ^c	<0.001
Q10 evoked pain upon cold	1.2 ± 2.7 ^a	0.0 ± 0.2 ^b	0.0 ± 0.0 ^b	<0.001
Q11 pins and needles	4.7 ± 2.7 ^a	1.9 ± 1.9 ^b	0.0 ± 0.3 ^c	<0.001
Q12 tingling	4.6 ± 3.0 ^a	1.9 ± 1.9 ^b	0.0 ± 0.1 ^c	<0.001
Total score	31.3 ± 16.8 ^a	9.1 ± 7.4 ^b	0.1 ± 0.7 ^c	<0.001
Burning score	4.3 ± 3.1 ^a	0.9 ± 1.7 ^b	0.0 ± 0.0 ^c	<0.001
Pressure score	3.1 ± 2.8 ^a	1.2 ± 2.0 ^b	0.0 ± 0.1 ^c	<0.001
Paroxysmal pain score	2.6 ± 2.6 ^a	0.7 ± 1.7 ^b	0.0 ± 0.1 ^c	<0.001
Evoked pain score	2.1 ± 2.4 ^a	0.2 ± 0.5 ^b	0.0 ± 0.1 ^c	<0.001
Paresthesia/dysesthesia score	4.7 ± 2.7 ^a	1.9 ± 1.8 ^b	0.0 ± 0.2 ^c	<0.001
Graded Chronic Pain Scale				
Current pain (0-10)	3.1 ± 2.5 ^a	0.6 ± 1.0 ^b	0.0 ± 0.0 ^c	<0.001
Worst pain 6 mo (0-10)	7.7 ± 1.7 ^a	3.9 ± 2.3 ^b	0.1 ± 0.6 ^c	<0.001
Average pain 6 mo (0-10)	5.4 ± 1.5 ^a	2.1 ± 1.6 ^b	0.0 ± 0.0 ^c	<0.001
Disability days (in 6 mo)	30.7 ± 55.4 ^a	5.3 ± 26.6 ^b	0.0 ± 0.0 ^c	<0.001
Daily activities (0-10)	3.7 ± 4.0 ^a	0.6 ± 1.3 ^b	0.0 ± 0.1 ^c	<0.001
Social activities (0-10)	3.3 ± 3.2 ^a	0.7 ± 1.6 ^b	0.0 ± 0.1 ^c	<0.001
Working ability (0-10)	3.4 ± 3.3 ^a	0.7 ± 1.9 ^b	0.0 ± 0.1 ^c	<0.001
Characteristic pain intensity	53.7 ± 14.8 ^a	21.9 ± 13.7 ^b	0.4 ± 1.6 ^c	<0.001
GCPS disability score	33.0 ± 29.2 ^a	6.5 ± 14.0 ^b	0.1 ± 1.2 ^c	<0.001
GCPS classification (grade 0-4)	2.3 ± 1.2 ^a	1.1 ± 0.7 ^b	0.0 ± 0.2 ^c	<0.001
Neuropsychological scales				
Pain catastrophizing scale sum score	16.0 ± 11.1 ^a	6.2 ± 7.4 ^b	3.0 ± 6.0 ^c	<0.001
Beck depression inventory II sum score	13.1 ± 8.4 ^a	10.8 ± 6.8 ^a	6.8 ± 5.9 ^b	<0.001
Stait-trait anxiety inventory—S sum-score	39.0 ± 10.1 ^a	36.5 ± 10.1 ^{ab}	33.8 ± 10.8 ^b	0.013
Stait-trait anxiety inventory—T sum-score	41.4 ± 10.1 ^a	39.4 ± 10.3 ^a	33.5 ± 9.4 ^b	<0.001

Continuous parameters are summarized as mean ± SD. Categorical parameters are expressed as absolute and relative frequencies. P value represents the comparison of patients with different levels of pain (Kruskal–Wallis test for continuous variables and Fisher exact test for categorical variables); post hoc tests: a, b, c—same letters marking values of categories within given row denote mutually statistically not different groups. Statistically significant differences are expressed in bold type ($p < 0.05$). GCPS, graded chronic pain scale; NRS, numerical rating scale.

and was more frequent in pDSPN-s (53.8%) compared with pDSPN-m and nDSPN ($P < 0.05$) (Suppl. Table 4, available online at <http://links.lww.com/PAIN/A474>).

In summary, QST data from the feet displayed abnormalities in 93.1% of the subjects in the whole DSPN cohort. The percentage of any QST abnormality was higher in pDSPN compared with nDSPN ($P < 0.05$, Suppl. Table 4, available online at <http://links.lww.com/PAIN/A474>). The frequency of abnormal QST values (below 2 SD of healthy controls) is shown in Fig. 4. The overall pattern for both thermal and mechanical parameters expressed

both as a mean z-score and proportion of patients with abnormal results was of “loss of function” type.

The concept of the “irritable nociceptor” profile is of a sensory phenotype with preserved small-fiber function (cold, warm, and pinprick sensitivity) together with hyperalgesia, whereas the “deafferentation” profile is dominated by thermal or mechanical sensory loss (irrespective of the presence of gain).^{3,18} In pDSPN, using this definition, a DA profile prevailed (found in 53.8%), whereas an IN profile was less frequent (in 14.6%); 31.6% of patients did not fall into any of these definitions.

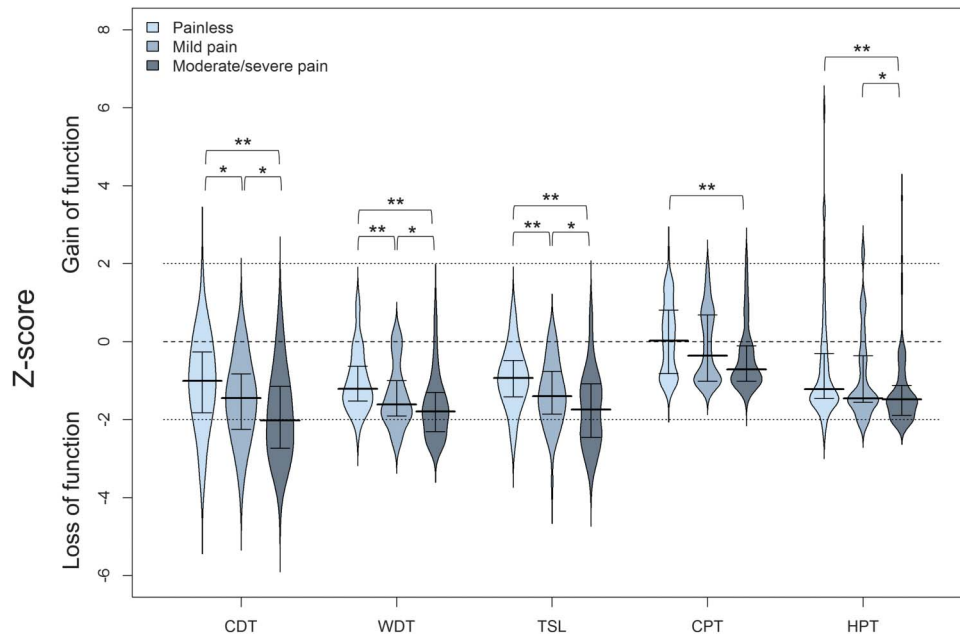


Figure 2. Median and interquartile ranges of Z-scores for thermal QST parameters in patients with no neuropathic pain, mild and moderate/severe neuropathic pain. Kruskal–Wallis test, post hoc comparisons: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. CDT, cold detection threshold; CPT, cold pain threshold; HPT, heat pain threshold; QST, quantitative sensory testing; TSL, thermal sensory limen; WDT, warm detection threshold.

The comparison of subgroups of patients with painful DSPN with different sensory QST profiles showed that those with a DA profile had a higher severity of neuropathy (expressed as mTCNS scores, $P < 0.001$), longer duration of pain associated with DSPN ($P < 0.001$), and higher NPSI and GCPS sum scores ($P < 0.001$) (Table 4).

3.7. Severity of diabetic neuropathy

The modified Toronto Clinical Neuropathy Score scores indicated a higher degree of disability in patients with pDSPN-s compared with pDSPN-m and nDSPN (Table 5). Namely, all individual symptom items and the mTCNS sum score of symptoms and the mTCNS total sum score discriminated all pain subgroups ($P <$

0.001), whereas the mTCNS sensory tests were able to discriminate pDSPN-s only (with the exception of thermal sensation that showed differences between all 3 subgroups) ($P < 0.001$) (Table 5 and Fig. 5 and Suppl. Fig. 1, 2; available online at <http://links.lww.com/PAIN/A475>).

Similarly, the ODSS discriminated all 3 pain subgroups (legs score and sum score) or the pDSPN-s subgroup (arms score, $P < 0.001$; Table 5 and Suppl. Fig. 3, available online at <http://links.lww.com/PAIN/A475>), and the ODSS sum score correlated with severity of pain ($r = 0.60$; $P < 0.001$).

3.8. The relation between clinical examination and quantitative sensory testing

Quantitative sensory testing thermal and mechanical parameters correlated well with the clinical scores when considering all study participants, that is, including those with and without NeuP (Suppl. Table 5, available online at <http://links.lww.com/PAIN/A474>). The mTCNS sum score correlated negatively with QST z-scores ($P < 0.01$ for CDT, WDT, TSL, CPT, HPT, MPT, MPS, MDT, and VDT; $P < 0.05$ for PPT and wind-up ratio). Similarly, the ODSS sum score correlated negatively with most QST z-scores ($P < 0.001$ for CDT, WDT, TSL, CPT, HPT, and MPS; $P < 0.05$ for MPT). Finally, the mMRC sum score correlated negatively with most thermal QST z-scores ($P < 0.01$ for CDT, WDT, TSL; $P < 0.05$ for CPT). Therefore, the higher the clinical scores, that is, more severe the DSPN, the greater was the loss of sensation on QST parameters. The correlation was stronger for thermal QST parameters.

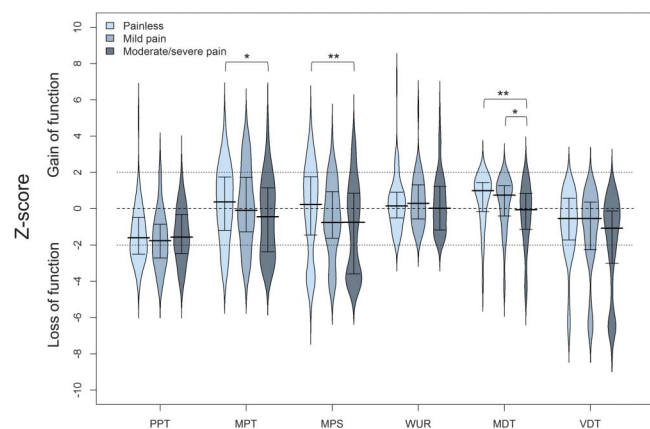


Figure 3. Median and interquartile ranges of Z-scores for mechanical QST parameters in patients with no neuropathic pain, mild and moderate/severe neuropathic pain. Kruskal–Wallis test, post hoc comparisons: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. MDT, mechanical detection threshold; MPS, mechanical pain sensitivity; MPT, mechanical pain threshold; PPT, pressure pain threshold; VDT, vibration detection threshold; WUR, wind-up ratio.

3.9. Nerve conduction studies and skin biopsies

Nerve conduction studies were abnormal in all but 7 DSPN cases, in whom the diagnosis of DSPN was based on abnormal IENFD findings. There were no differences in any of the evaluated NCS parameters between pain subgroups (Suppl. Table 6, available online at <http://links.lww.com/PAIN/A474>).

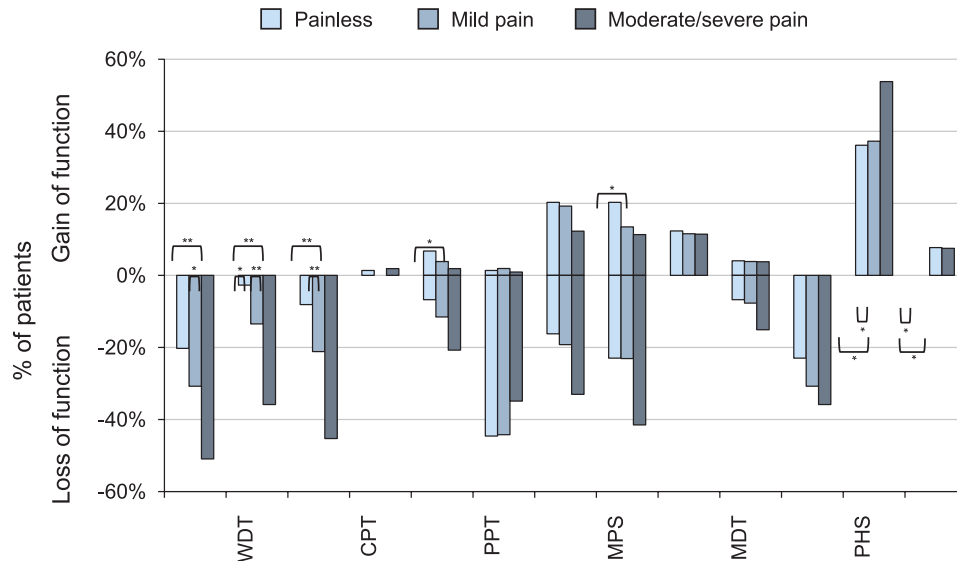


Figure 4. Loss and gain of functions (based on QST values outside the normal range according to DFNS reference data) in patients with no neuropathic pain, mild and moderate/severe neuropathic pain (body region–foot). Fisher exact test, post hoc comparison: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. CDT, cold detection threshold; CPT, cold pain threshold; DFNS, Deutscher Forschungsverbund Neuropathischer Schmerz; DMA, dynamic mechanical allodynia; HPT, heat pain threshold; MDT, mechanical detection threshold; MPS, mechanical pain sensitivity; MPT, mechanical pain threshold; PHS, paradoxical heat sensation; PPT, pressure pain threshold; QST, quantitative sensory testing; TSL, thermal sensory limen; VDT, vibration detection threshold; WDT, warm detection threshold; WUR, wind-up ratio.

IENFD was determined in 9 DSPN cases with normal NCS and was abnormal in 7 cases, in whom the diagnosis of DSPN was based on IENFD decrease; the median IENFD was 2.8 (range 0–10.0) fibers/mm.

3.10. Logistic models to predict pain

Using multivariate logistic regression analysis and the most robust independent predictors (mTCNS total score ≥ 7 , mMRC leg total score < 60 , WDT z-score < 1.5 and abnormal serum creatinine), it was possible to find a model predicting the presence of NeuP with high sensitivity ($> 90\%$) and moderate specificity (76%) (Table 6). Accuracy of the predictive models in terms of sensitivity, specificity, and positive and negative predictive value was even higher in model 2, predicting/discriminating pDSPN with severe pain compared with painless cases and based on DSPN severity predictors (mTCNS total score ≥ 7 , and ODSS total score > 1 ; Table 6).

As mTCNS scores reflecting neuropathy severity seem to be the strongest predictors of NeuP, we compared characteristics of the pDSPN and nDSPN subgroups matched for the severity of neuropathy. Patients with pDSPN were more frequently women ($P < 0.001$; Suppl. Table 7, only selected parameters with significant differences included; available online at <http://links.lww.com/PAIN/A474>).

4. Discussion

This study reports detailed phenotyping using structured neurological examination and QST in a well-defined largest-ever published cohort of patients with DSPN. Key findings are that the presence and severity of NeuP was associated with more advanced diabetic neuropathy leading to higher disability and more frequent and advanced dysfunction of sensory fibers. No correlation was found between NeuP and factors related to diabetes and its control with the exception of laboratory signs of

nephropathy. Our study, conducted in a large independent cohort, confirms key findings of a recent large-scale cohort study of DSPN subjects,³⁸ and adds additional information.

There is a continuous effort to uncover distinct sensory profiles specific not only for the presence of NeuP as such, but also for predicting the response to therapy. Quantitative sensory testing findings in previous studies revealed a heterogeneity of sensory profiles in different pain syndromes, and some sensory profiles have been suggested to represent specific pathophysiological mechanisms.^{4,24} In a large cohort of 343 patients with painful polyneuropathy of different etiologies, 83.4% had a QST abnormality.²⁴ Gain-of-function abnormalities were found in 31.2% and loss-of-function abnormalities in 72.9%.²⁴ In previously described DSPN cohorts, loss-of-function abnormalities of small fiber-mediated and large fiber-mediated sensory modalities disclosed by not only QST, but also by clinical and electrophysiological methods was predominant, whereas gain-of-function abnormalities were only found in a minority,^{21,42} which corresponds to our findings.

Correlations of thermal QST abnormalities (CDT and WDT thresholds) with the severity of NeuP in patients with diabetic neuropathy have been reported previously in a smaller study.²¹ Others⁴¹ suggested that severe neuropathy is associated with an increased risk of developing pDSPN, although their small cohort was hospital-based and thus selective. In a cohort of diabetic patients with a low prevalence of neuropathy, pDSPN was more likely to occur in those with clinically manifest neuropathy.³¹ In a smaller community-based study, 51 patients with pDSPN had a higher severity of neuropathy compared with patients with painless DSPN.⁸

The PiNS study³⁸ was the first that used the DFNS QST protocol in a large cohort of DSPN subjects with and without NeuP and correlated sensory profiles with the severity of NeuP, measures of neuropathy severity, and disability. In this study, the QST pattern of diabetic neuropathy was consistent with loss of function in both large and small sensory fibers. Furthermore,

Table 4
Comparison of patient characteristics between sensory QST phenotypes in painful DSPN patients.

Parameters	DA N = 80	IN N = 32	P
Age, y	63.3 (39.9; 78.5)	60.4 (37.1; 77.9)	<0.001
Gender			
Women	44 (55.0%)	13 (40.6%)	0.211
Men	36 (45.0%)	19 (59.4%)	
Type of diabetes			
Type 1	19 (23.8%)	5 (15.6%)	0.448
Type 2	61 (76.3%)	27 (84.4%)	
Duration of diabetes (y)	12.5 (1.5; 35.0)	13.5 (3.0; 33.0)	<0.001
mTCNS—symptom score			
Range 0-18	8.6 ± 5.0	6.3 ± 5.5	<0.001
mTCNS—sensory test score			
Range 0-15	7.2 ± 4.6	5.7 ± 5.0	<0.001
mTCNS sum-score			
Range 0-33	15.7 ± 8.2	12.0 ± 9.6	<0.001
PCS sum-score	14.1 ± 10.5	10.8 ± 12.2	<0.001
Duration of pain associated with diabetic polyneuropathy, y	5.0 (1.0; 15.0)	3.0 (1.0; 8.0)	<0.001
Other chronic pain (NRS ≥ 4, >3 mo)			
No	35 (43.8%)	16 (50.0%)	0.675
Yes	45 (56.3%)	16 (50.0%)	
NPSI			
Sum-score	0.3 ± 0.2	0.2 ± 0.2	<0.001
Burning score	0.4 ± 0.3	0.3 ± 0.3	<0.001
Pressure score	0.3 ± 0.3	0.2 ± 0.2	<0.001
Attacks	0.2 ± 0.3	0.2 ± 0.2	<0.001
Evoked pain score	0.2 ± 0.3	0.1 ± 0.1	<0.001
Paresthesia/dysesthesia score	0.4 ± 0.3	0.3 ± 0.3	<0.001
GCPS disability score	28.0 ± 28.0	16.4 ± 25.1	<0.001
GCPS classification (grade 0-4)	2.0 ± 1.2	1.5 ± 1.0	<0.001

Continuous parameters are summarized as median (5th–95th percentile range) or mean ± SD. Categorical parameters are expressed as absolute and relative frequencies. *P* value represents the comparison of patients with different levels of pain (Mann–Whitney *U* test for continuous variables and Fisher exact test for categorical variables). Statistically significant differences are expressed in bold type (*p* < 0.05).

DA, deafferentation sensory profile; DSPN, diabetic symmetrical sensory-motor polyneuropathy; GCPS, graded chronic pain scale; IN, irritable nociceptor sensory profile; mTCNS, modified Toronto clinical neuropathy score; NPSI, neuropathic pain symptom inventory; NRS, numerical rating scale; PCS, pain catastrophizing scale; QST, quantitative sensory testing.

study participants with moderate to severe NeuP had the greatest loss of function in QST and more severe neuropathy assessed with neuropathy disability scores.³⁸ Our results are in concordance with all these findings. The DA QST profile was predominant in our patients with pDSPN, and the frequency and severity of thermal loss correlated not only with the presence and severity of NeuP, but also to severity of neuropathy and disability. Gain-of-function sensory abnormalities in general were rare in pDSPN in both the PiNS and our study. Dynamic mechanical allodynia was the only gain-of-function abnormality in the PiNS, whereas we also observed a high frequency of PHS, in concordance with the findings of Maier et al.²⁴ Paradoxical heat sensations was more frequent in our patients with moderate to severe pain. This is plausible because PHS represent disturbances of thermal processing in the peripheral or central nervous system. Such disturbances were recently reported as a typical component of a “loss of function” QST sensory cluster in neuropathic pain syndromes including polyneuropathies.⁴ The IN pattern, recently described as a “thermal hyperalgesia” sensory cluster,⁴ was only present in a minority of our patients with painful DSPN (13.6%), although not so rarely as in the PiNS study (6.3%).³⁸ Similar to the PiNS study,³⁸ the DA profile prevailed in our study. Patients with the IN profile showed lower

neuropathy disability scores, shorter duration of pain, higher level of pain catastrophizing, and different characteristics of pain associated with lower GCPS and NSPI scores in comparison with most patients with pDSPN with the DA profile. Further research is needed to confirm whether or not the IN profile might represent a promising target for stratification of patients for analgesic treatment and future drug trials.

Correlations between NeuP and hyposensitivity to small-fiber-mediated thermal perception in both our and the PiNS study, and the absence of any correlation between NeuP and NCS underline the importance of small-fiber loss or dysfunction for the generation of pDSPN. The subpopulation of pDSPN subjects with less hyposensitivity to thermal and mechanical pain stimuli, either manifesting as the IN profile or displaying gain-of-function abnormalities like DMA or PHS, might represent a subgroup with specific mechanisms of NeuP.

Study participants with more severe NeuP reported higher scores for anxiety, depressive symptoms, and pain catastrophizing, and also more frequently reported other chronic pain compared with the study participants with no NeuP and mild NeuP. The association of emotional distress with the severity of NeuP in DSPN, although not indicating causal relationship, is in concordance with a previous study that reported a high

Table 5
Severity of diabetic neuropathy (mTCNS and ODSS scores).

Parameters	Moderate/severe pain (NRS ≥ 4) N = 106	Mild pain (NRS 1-3) N = 52	Painless (NRS 0) N = 74	P
ODSS				
Arms (0-5)	0.4 \pm 0.8 ^b	0.1 \pm 0.4 ^a	0.1 \pm 0.4 ^a	<0.001
Legs (0-7)	1.3 \pm 1.1 ^a	0.6 \pm 0.9 ^b	0.2 \pm 0.6 ^c	<0.001
Sum-score (0-12)	1.8 \pm 1.4 ^a	0.8 \pm 1.0 ^b	0.3 \pm 0.7 ^c	<0.001
mTCNS symptom score				
Foot pain	2.3 \pm 0.8 ^a	1.0 \pm 0.9 ^b	0.0 \pm 0.3 ^c	<0.001
Hypoesthesia	1.7 \pm 1.2 ^a	0.6 \pm 1.0 ^b	0.3 \pm 0.7 ^c	<0.001
Tingling	1.9 \pm 1.0 ^a	0.8 \pm 0.9 ^b	0.1 \pm 0.3 ^c	<0.001
Paresis	1.4 \pm 1.3 ^a	0.3 \pm 0.7 ^b	0.1 \pm 0.5 ^c	<0.001
Ataxia	1.2 \pm 1.3 ^a	0.5 \pm 0.9 ^b	0.2 \pm 0.6 ^c	<0.001
Symptoms at arms	0.7 \pm 1.0 ^a	0.2 \pm 0.6 ^b	0.0 \pm 0.3 ^c	<0.001
Sum-score of symptoms (0-18)	9.1 \pm 4.7 ^a	3.5 \pm 3.5 ^b	0.7 \pm 1.8 ^c	<0.001
mTCNS sensory test score				
Pinprick discrimination of blunt/sharp	1.5 \pm 1.2 ^a	0.7 \pm 1.1 ^b	0.6 \pm 1.0 ^b	<0.001
Thermal sensation	1.9 \pm 1.2 ^a	1.5 \pm 1.1 ^b	1.1 \pm 1.1 ^c	<0.001
Light touch	1.5 \pm 1.4 ^a	0.7 \pm 1.0 ^b	0.5 \pm 1.0 ^b	<0.001
Vibration	1.6 \pm 1.3 ^a	1.0 \pm 1.2 ^b	0.6 \pm 1.0 ^b	<0.001
Position sense	1.0 \pm 1.2 ^a	0.4 \pm 0.8 ^b	0.3 \pm 0.8 ^b	<0.001
Sum-score of sensory tests (0-15)	7.5 \pm 4.9 ^a	4.3 \pm 4.0 ^b	3.1 \pm 3.5 ^b	<0.001
mTCNS sum-score (0-33)	16.5 \pm 8.1^a	7.8 \pm 5.8^b	3.8 \pm 4.6^c	<0.001

Continuous parameters are summarized as mean \pm SD. Categorical parameters are expressed as absolute and relative frequencies. P value represents the comparison of patients with different levels of pain (Kruskal–Wallis test for continuous variables and Fisher exact test for categorical variables); post hoc tests: a, b, c—same letters marking values of categories within given row denote mutually statistically not different groups. Statistically significant differences are expressed in bold type ($p < 0.05$).

mTCNS, modified Toronto clinical neuropathy score; NRS, numerical rating scale; ODSS, overall disability sum score.

prevalence of depression and anxiety in pDSPN, and which underlined the necessity to integrate these psychological factors into treatment of NeuP in DSPN.²⁹

As for demographic factors, the proportion of women displaying severe NeuP was higher compared with men. The “risk factor” female sex was already reported several times.^{1,12,17,19} The influence of age, reported by some studies,^{18,40,45,46} was neither confirmed in our study nor in PiNS study.³⁸

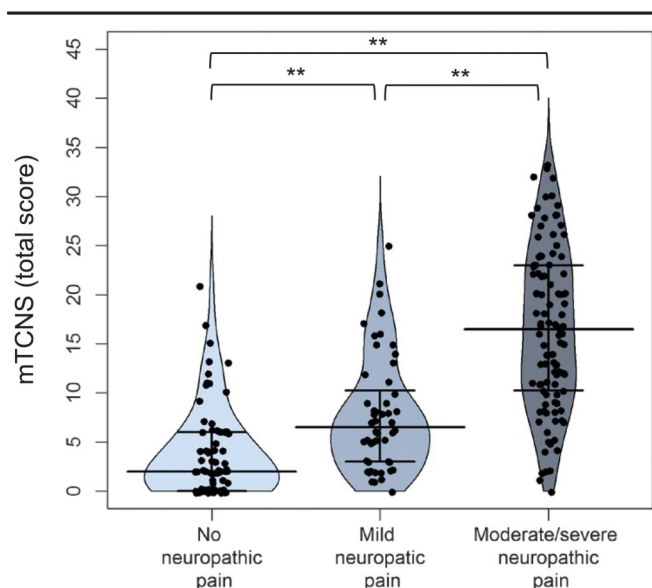


Figure 5. Median and interquartile ranges of modified Toronto Clinical Neuropathy Score (mTCNS) total score in patients with no neuropathic pain, mild and moderate/severe neuropathic pain. Kruskal–Wallis test, post hoc comparison: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Unsatisfactory diabetes control, usually expressed as elevated HbA1c levels, and other factors associated with diabetes have been repeatedly associated with the development of DSPN, whereas association of factors related to diabetes with painful DSPN discussed is contradictory.³² Among factors related to diabetes reported as associated with increased risk of pain in some studies, but not confirmed in the others, were diabetes duration,^{17–19,31,40} diabetes type 1¹⁹ and type 2,¹ dyslipidemia (low high density lipoproteins,⁴⁰ increased triglycerides⁴⁰), obesity, increased weight, body mass index or waist circumference,^{33,40,45,46} peripheral arterial disease,^{45,46} and nephropathy.⁴⁰ The PiNS study reported higher levels of HbA1c in painful DSPN³⁸ as the only parameter related to pain, although the association was not as robust as in the other factors, such as severity of neuropathy. In our study, we were not able to confirm an association of painful neuropathy with any of these parameters with the exception of a higher proportion of increased creatinine serum levels or decreased estimated glomerular filtration rate as a sign of nephropathy in patients with pain. Increased serum level of methylglyoxal has been shown in painful diabetic neuropathy⁵ and knockdown of glyoxalase 1 in mice causes alterations in kidney morphology indistinguishable from those caused by diabetes,¹⁶ but the possible link between pain and nephropathy in diabetes is still unclear.

In our study, several factors were associated with the presence and severity of NeuP. We calculated a predictive model including the most important independent predictors of pDSPN. This model included neuropathy severity (mTCNS total score, motor function in the legs [mMRC]), pain catastrophizing and anxiety (PCS and STAI-T total scores), and loss of C-fiber function (WDT). The model was able to predict the presence of pain in DSPN with excellent sensitivity and moderate specificity.

One of the limitations of our study was that the pain scoring was not based on a diary, but on a one-time assessment. As analgesic therapy was not stopped before assessment of pain severity, it

Table 6
Multivariate logistic regression predictive models and its accuracy.

		Logistic regression					
		OR (95% CI)	P				
Model 1 (N = 232): Painful DSPN (NRS > 0) (N = 158) vs painless DSPN (N = 74)							
mTCNS total score	≥7 (ref. 0-6)	6.184 (2.506; 15.263)	<0.001				
PCS total score	≥1 (ref. 0)	16.679 (6.464; 43.031)	<0.001				
STAI-T total score	≥37 (ref. 0-36)	4.294 (1.752; 10.522)	0.001				
mMRC—Leg total score (R + L)	<60 (ref. 60)	5.212 (1.318; 20.617)	0.019				
QST (foot)—WDT	<-1.5 (ref. ≥-1.5)	3.389 (1.376; 8.345)	0.008				
Model 2 (N = 140): Painful DSPN with severe (NRS > 6) pain (N = 66) vs painless DSPN (N = 74)							
mTCNS total score	≥7 (ref. 0-6)	99.172 (16.079; 611.685)	<0.001				
ODSS total score	≥1 (ref. 0)	5.343 (1.176; 24.285)	0.028				
PCS total score	≥3 (ref. 0-2)	76.099 (11.970; 483.777)	<0.001				
	N	AUC (95% CI)	P	Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV (%)	NPV (%)
Accuracy of verified multivariate logistic models to predict pain							
Model 1							
Multivariate model	232	0.943 (0.915; 0.971)	<0.001	92.9%	76.1%	89.5%	83.1%
Model 2							
Multivariate model	140	0.977 (0.955; 0.999)	<0.001	87.9%	97.3%	96.7%	90.0%

Statistically significant differences are expressed in bold type ($p < 0.05$). AUC, area under curve; DSPN, diabetic symmetrical sensory-motor polyneuropathy; HPT, heat pain threshold; mMRC score, motor medical research council score; mTCNS, modified Toronto clinical neuropathy score; NPV, negative predictive value; NRS, numerical rating scale; OR, odds ratio; ODSS, overall disability sum score; PCS, pain catastrophizing scale; PPV, positive predictive value; QST, quantitative sensory testing; STAI-T, state-trait anxiety inventory—trait; WDT, warm detection threshold.

might have influenced subclassification of painful cases into pDSPN-m and pDSPN-s subgroups. In fact, 21 painful DSPN cases who reported mild pain in the last week before assessment (the mean NRS during the last week between 1 and 3 points), reported pain of higher severity (NRS >4) before administration of analgesic treatment. Numerical rating scale values reported retrospectively with a delay of several months or years are, however, less reliable for subclassification of painful cases.

Despite the fact that patients were included consecutively into the study, the proportion of painful cases is higher than expected. This might be due to a higher motivation of patients with painful DSPN to participate.

The presence of foot pain that per definition must not be present in the painless cases was one of the items of mTCNS that were used to compare severity of neuropathy between painless and painful DSPN subgroups. This fact might slightly influence the differences in mTCNS symptoms and total scores, but not the mTCNS sensory tests subscore or the conclusion concerning the influence of severity of neuropathy on pain presence and severity in DSPN.

In conclusion, NeuP presence and severity is related to neuropathy severity, predominant thermal sensory loss, female sex, and nephropathy. It is also associated with levels of anxiety, depressive symptoms, and pain catastrophizing. A minority of pDSPN subjects display gain QST abnormalities. Different sensory profiles might represent distinctive pathophysiological mechanisms of NeuP in diabetes and new target populations for future pain trials.

Conflict of interest statement

J. Raputova, I. Srotova, E. Vlckova, I. Kovalova, B. Adamova, J. Bednarik, H. Rittner, C. Reborn, L. Forer, and F. Birklein report grants from FP7 EU Grant during the conduct of the study. N. Üçeyler reports grants from FP7 EU Grant during the conduct of the study; grants from Genzyme, grants from Shire, other from Daiichi Sankyo, personal fees from Baxalta, outside the submitted work. C. Sommer reports grants from FP7 EU Grant during the conduct of the study; personal fees from Air Liquide, personal fees from Astellas, personal fees from Baxalta, personal fees from CSL Behring, personal fees from Genzyme, personal fees from

Pfizer, personal fees from UCB, grants from Kedrion, outside the submitted work. The remaining authors have no conflicts of interest to declare.

Supported by the European Commission (602133—ncRNAPain), and by the project “CEITEC—Central European Institute of Technology” (CZ.1.05/1.1.00/02.0068) from European Regional Development Fund.

Acknowledgements

The authors thank all patients for their participation and the research support team and medical and nursing staff at University Hospital in Würzburg, Mainz, and Brno for assistance with recruitment (Jana Novohradská, Barbara Broll, Barbara Dekant, Mathias Leinders, Sonja Mildner).

Author contributions: J. Raputova and I. Srotova were involved in the literature review, data collection including QST, data interpretation, data analysis, prepared the first draft of the manuscript and contributed equally to the article. I. Kovalova and C. Reborn contributed to data collection and data interpretation. E. Kralickova contributed to data interpretation and analysis (neuropsychological tests). B. Adamova contributed to collection and interpretation of electrophysiological data. J. Belobradkova, J. Olsovsky and P. Weber contributed to recruitment and pre-screening of diabetic patients in 2 diabetologic centers in Brno. L. Dusek contributed to planning of study design and power analysis, performed statistical analysis and contributed to manuscript preparation including figures. J. Jarkovsky contributed to interpretation of data (statistical analysis). L. Forer contributed to design and administration of online database used for data management. E. Vlckova was involved in literature review, contributed to study design, data collection (electrophysiological data), data interpretation, data analysis, prepared draft of the manuscript. N. Üçeyler contributed to study design, was involved in data collection, data interpretation, and reviewed/edited manuscript. H. Rittner contributed to data interpretation, data analysis, and reviewed/edited manuscript. C. Sommer and F. Birklein contributed to study design and data interpretation, to discussion and reviewed/edited manuscript. J. Bednarik

assumed overall responsibility for the study, had full access to all the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis. He contributed to study design, data analysis, data interpretation, manuscript preparation including figures, and writing, and prepared the first draft of the manuscript. All authors approved the final manuscript.

Appendix A. Supplemental digital content

Supplemental digital content associated with this article can be found online at <http://links.lww.com/PAIN/A474> and <http://links.lww.com/PAIN/A475>.

Article history:

Received 28 April 2017

Received in revised form 27 July 2017

Accepted 28 July 2017

Available online 3 August 2017

References

- Abbott CA, Malik RA, van Ross ER, Kulkarni J, Boulton AJ. Prevalence and characteristics of painful diabetic neuropathy in a large community-based diabetic population in the U.K. *Diabetes Care* 2011;34:2220–4.
- American Association of Electrodiagnostic Medicine. Guidelines in electrodiagnostic medicine. *Muscle Nerve* 1999;22(suppl 8):S3–300.
- Baron R, Forster M, Binder A. Subgrouping of patients with neuropathic pain according to pain-related sensory abnormalities: a first step to a stratified treatment approach. *Lancet Neurol* 2012;11:999–1005.
- Baron R, Maier C, Attal N, Binder A, Bouhassira D, Cruccu G, Finnerup NB, Haanpää M, Hansson P, Hüllemann P, Jensen TS, Freynhagen R, Kennedy JD, Magerl W, Maingka T, Reimer M, Rice AS, Segerdahl M, Serra J, Sindrup S, Sommer C, Tölle T, Vollert J, Treede RD; German Neuropathic Pain Research Network (DFNS), and the EUROPAIN and NEUROPAIN consortia. Peripheral neuropathic pain: a mechanism-related organizing principle based on sensory profiles. *PAIN* 2017;158:261–72.
- Bierhaus A, Fleming T, Stoyanov S, Leffler A, Babes A, Neacsu C, Sauer SK, Eberhardt M, Schnölzer M, Lasitschka F, Neuhuber WL, Kichko TI, Konrade I, Elvert R, Mier W, Pirags V, Lukic IK, Morcos M, Dehmer T, Rabbani N, Thornalley PJ, Edelstein D, Nau C, Forbes J, Humpert PM, Schwaninger M, Ziegler D, Stern DM, Cooper ME, Haberkorn U, Brownlee M, Reeh PW, Nawroth PP. Methylglyoxal modification of Nav1.8 facilitates nociceptive neuron firing and causes hyperalgesia in diabetic neuropathy. *Nat Med* 2012;18:926–33.
- Bouhassira D, Attal N, Alchaar H, Boureau F, Brochet B, Bruxelle J, Cunin G, Fermanian J, Ginies P, Grun-Overdyking A, Jafari-Schluep H, Lanteri-Minet M, Laurent B, Mick G, Serrie A, Valade D, Vicaut E. Comparison of pain syndromes associated with nervous or somatic lesions and development of a new neuropathic pain diagnostic questionnaire (DN4). *PAIN* 2005;114:29–36.
- Bril V, Tomioka S, Buchanan RA, Perkins BA; the mTCNS Study Group. Reliability and validity of the modified Toronto clinical neuropathy score in diabetic sensorimotor polyneuropathy. *Diabetic Med* 2009;26:240–6.
- Davies M, Brophy S, Williams R, Taylor A. The prevalence, severity, and impact of painful diabetic peripheral neuropathy in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2006;29:1518–22.
- Demant DT, Lund K, Vollert J, Maier C, Segerdahl M, Finnerup NB, Jensen TS, Sindrup SH. The effect of oxcarbazepine in peripheral neuropathic pain depends on pain phenotype: a randomised, double-blind, placebo controlled phenotype-stratified study. *PAIN* 2014;155:2263–73.
- Eng J. ROC analysis: web-based calculator for ROC curves. Baltimore: Johns Hopkins University. Available at: <http://www.jrocf.org>. Accessed March 19, 2014.
- England JD, Gronseth GS, Franklin G, Carter GT, Kinsella LJ, Cohen JA, Asbury AK, Sziget K, Lupski JR, Latov N, Lewis RA, Low PA, Fisher MA, Herrmann D, Howard JF, Lauria G, Miller RG, Polydefkis M, Sumner AJ; American Academy of Neurology; American Association of Neurophysiologists and Electrodiagnostic Medicine; American Academy of Physical Medicine and Rehabilitation. Evaluation of distal symmetric polyneuropathy: the role of autonomic testing, nerve biopsy, and skin biopsy (an evidence-based review). *Muscle Nerve* 2009;39:106–15.
- Erbas T, Ertas M, Yucel A, Keskinaslan A, Senocak M; TURNEP Study Group. Prevalence of peripheral neuropathy and painful peripheral neuropathy in Turkish diabetic patients. *J Clin Neurophysiol* 2011;28:51–5.
- Fields HL, Rowbotham M, Baron R. Postherpetic neuralgia: irritable nociceptors and deafferentation. *Neurobiol Dis* 1998;5:209–27.
- Finnerup NB, Haroutounian S, Kamerman P, Baron R, Bennett DLH, Bouhassira D, Cruccu G, Freeman R, Hansson P, Nurmikko T, Raja SN, Rice AS, Serra J, Smith BH, Treeder RD, Jensen TS. Neuropathic pain: an updated grading system for research and clinical practice. *PAIN* 2016;157:1599–606.
- Freynhagen R, Baron R, Gockel U, Tölle TR. painDETECT: a new screening questionnaire to identify neuropathic components in patients with back pain. *Curr Med Res Opin* 2006;22:1911–20.
- Giacco F, Du X, D'Agati VD, Milne R, Sui G, Geoffrion M, Brownlee M. Knockdown of glyoxalase 1 mimics diabetic nephropathy in Nondiabetic mice. *Diabetes* 2014;63:291–9.
- Halawa MR, Karawagh A, Zeidan A, Mahmoud AE, Sakr M, Hegazy A. Prevalence of painful diabetic peripheral neuropathy among patients suffering from diabetes mellitus in Saudi Arabia. *Curr Med Res Opin* 2010;26:337–43.
- Harris M, Eastman R, Cowie C. Symptoms of sensory neuropathy in adults with NIDDM in the U.S. population. *Diabetes Care* 1993;16:1446–52.
- Jambart S, Ammache Z, Haddad F, Younes A, Hassoun A, Abdalla K, Selwan CA, Sunna N, Wajsbrot D, Yousef E. Prevalence of painful diabetic peripheral neuropathy among patients with diabetes mellitus in the Middle East region. *J Int Med Res* 2011;39:366–77.
- Kimura J. Electrodiagnosis in diseases of nerve and muscles. 4th ed. New York: Oxford University Press, 2013.
- Krämer HH, Rolke R, Bickel A, Birklein F. Thermal thresholds predict painfulness of diabetic neuropathies. *Diabetes Care* 2004;27:2386–91.
- Lauria G, Hsieh ST, Johansson O, Kennedy WR, Leger JM, Mellgren SI, Nolano M, Merkies IS, Polydefkis M, Smith AG, Sommer C, Valls-Solé J; European Federation of Neurological Societies; Peripheral Nerve Society. European Federation of Neurological Societies/Peripheral Nerve Society Guideline on the use of skin biopsy in the diagnosis of small fiber neuropathy. Report of a joint task force of the European Federation of Neurological Societies and the Peripheral Nerve Society. *Eur J Neurol* 2010;17:903–12.
- Magerl W, Krumova EK, Baron R, Tölle T, Treede RD, Maier C. Reference data for quantitative sensory testing (QST): refined stratification for age and a novel method for statistical comparison of group data. *PAIN* 2010;151:598–605.
- Maier C, Baron R, Tölle TR, Binder A, Birbaumer N, Birklein F, Giethmühlen J, Flor H, Geber C, Hüge V, Krumova EK, Landwehrmeyer GB, Magerl W, Maihöfner C, Richter H, Rolke R, Scherens A, Schwarz A, Sommer C, Tronnier V, Uçeyler N, Valet M, Wasner G, Treede RD. Quantitative sensory testing in the German Research Network on Neuropathic Pain (DFNS): somatosensory abnormalities in 1236 patients with different neuropathic pain syndromes. *PAIN* 2010;150:439–50.
- Merkies ISJ, Schmitz PIM, van der Meché FGA, Samijn JPA, van Doorn PA; Inflammatory Neuropathy Cause and Treatment (INCAT) group. Clinimetric evaluation of a new overall disability scale in immune mediated polyneuropathies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2002;72:596–601.
- Osman A, Barrios F, Kopper B, Hauptmann W, Jones J, O'Neill E. Factor structure, reliability, and validity of the pain catastrophizing scale. *J Behav Med* 1997;20:589–605.
- Rolke R, Baron R, Maier C, Tölle TR, Treede RD, Beyer A, Binder A, Birbaumer N, Birklein F, Bötefür IC, Braune S, Flor H, Hüge V, Klug R, Landwehrmeyer GB, Magerl W, Maihöfner C, Rolke C, Schaub C, Scherens A, Sprenger T, Valet M, Wasserka B. Quantitative sensory testing in the German Research Network on Neuropathic Pain (DFNS): standardized protocol and reference values. *PAIN* 2006;123:231–43.
- Saunders JB, Aasland OG, Babor TF, de la Fuente JR, Grant M. Development of the Alcohol Use Disorders Identification Test (AUDIT): WHO collaborative project on early detection of persons with harmful alcohol consumption-II. *Addiction* 1993;88:791–804.
- Selvarajah D, Cash T, Sankar A, Thomas L, Davies J, Cachia E, Gandhi R, Wilkinson ID, Wilkinson N, Emery CJ, Tesfaye S. The contributors of emotional distress in painful diabetic neuropathy. *Diab Vasc Dis Res* 2014;11:218–25.
- Sommer C, Richter H, Rogausch JP, Frettlöh J, Lungenhausen M, Maier Ch. A modified score to identify and discriminate neuropathic pain: a study on the German version of the neuropathic pain symptom inventory (NPSI). *BMC Neurol* 2011;11:104.
- Sorensen L, Molyneaux L, Yue DK. Insensate vs painful diabetic neuropathy: the effects of height, gender, ethnicity and glycemic control. *Diabetes Res Clin Pract* 2002;57:45–51.

- [32] Spallone V, Greco C. Painful and painless diabetic neuropathy: one disease or two? *Curr Diab Rep* 2013;13:533–49.
- [33] Spallone V, Morganti R, D'Amato C, Cacciotti L, Fedele T, Maiello MR, Marfia G. Clinical correlates of painful diabetic neuropathy and relationship of neuropathic pain with sensorimotor and autonomic nerve function. *Eur J Pain* 2011;15:153–60.
- [34] Spielberger CD. *Manual for the State-Trait Anxiety Inventory: STAI* (Form Y). Palo Alto: Consulting Psychologists Press, 1983.
- [35] Srotova I, Vlckova E, Strakova J, Kincova S, Ryba L, Dusek L, Adamova B, Bednarik J. Validation of the Czech version of the Neuropathic Pain Symptom Inventory (NPSIcz). *Cesk Slov Neurol N* 2015;78/111:45–56.
- [36] Srotova I, Vlckova E, Strakova J, Kincova S, Adamova B, Dusek L, Jarkovsky J, Bednarik J. Validation of Czech version of DFNS protocol for quantitative sensory testing. *Cesk Slov Neurol N* 2015;78/111:442–52.
- [37] Tesfaye S, Boulton AJ, Dyck PJ, Freeman R, Horowitz M, Kempner P, Lauria G, Malik RA, Spallone V, Vinik A, Bernardi L, Valensi P. Diabetic neuropathies: update on definitions, diagnostic criteria, estimation of severity, and treatments. *Diabetes Care* 2010;33:2285–93.
- [38] Themistocleous AC, Ramirez JD, Shillo PR, Lees JG, Selvarajah D, Orengo C, Tesfaye S, Rice AS, Bennett DL. The Pain in Neuropathy Study (PINS): a cross-sectional observational study determining the somatosensory phenotype of painful and painless diabetic neuropathy. *PAIN* 2016;157:1132–45.
- [39] Treede RD, Jensen TS, Campbell JN, Cruccu G, Dostrovsky JO, Griffin JW, Hansson P, Hughes R, Nurmikko T, Serra J. Neuropathic pain: redefinition and a grading system for clinical and research purposes. *Neurology* 2008;70:1630–5.
- [40] Van Acker K, Bouhassira D, De Bacquer D, Weiss S, Matthys K, Raemen H, Mathieu C, Colin IM. Prevalence and impact on quality of life of peripheral neuropathy with or without neuropathic pain in type 1 and type 2 diabetic patients attending hospital outpatients clinics. *Diabetes Metab* 2009;35:206–13.
- [41] Veves A, Manes C, Murray HJ, Young MJ, Boulton AJ. Painful neuropathy and foot ulceration in diabetic patients. *Diabetes Care* 1993;16:1187–9.
- [42] Vlckova-Moravcova E, Bednarik J, Belobradkova J, Sommer C. Small-fiber involvement in diabetic patients with neuropathic foot pain. *Diabet Med* 2008;25:692–9.
- [43] Vlckova-Moravcova E, Bednarik J, Dušek L, Toyka KV, Sommer C. Diagnostic validity of epidermal nerve fiber densities in painful sensory neuropathies. *Muscle Nerve* 2008;37:50–60.
- [44] Von Korff M, Ormel J, Keefe FJ, Dworkin SF. Grading the severity of chronic pain. *PAIN* 1992;50:133–49.
- [45] Ziegler D, Rathmann W, Dickhaus T, Meisinger C, Mielck A; KORA Study Group. Neuropathic pain in diabetes, prediabetes and normal glucose tolerance: the MONICA/KORA Augsburg Surveys S2 and S3. *Pain Med* 2009;10:393–400.
- [46] Ziegler D, Rathmann W, Meisinger C, Dickhaus T, Mielck A; KORA Study Group. Prevalence and risk factors of neuropathic pain in survivors of myocardial infarction with pre-diabetes and diabetes. The KORA Myocardial Infarction Registry. *Eur J Pain* 2009;13:582–7.

26. *Vlčková E, Bednařík J. Současný pohled na kontraindikace a komplikace elektromyografie. Cesk Slov Neurol N 2017; 80/113(1): 43-48. IF = 0,508*

Tato přehledná práce je zaměřena na jednu z nejčastěji využívaných metod v diagnostice periferní neuropatické bolesti, tedy na elektromyografické (EMG) vyšetření. Zaměřuje se na nejčastější tradované kontraindikace a komplikace vyšetření a dokumentuje jejich případnou oporu v rámci současných poznatků medicíny založené na důkazech.

EMG vyšetření je v klinické praxi nejčastěji kontraindikováno u pacientů s implantovaným kardiostimulátorem/ defibrilátorem či u jedinců užívajících chronickou antikoagulační nebo dokonce antiagregační terapii. Určitou kontraindikací, resp. okolností znemožňující validní provedení vyšetření, jsou také lokální změny ve vyšetřované oblasti (zejména výrazné otoky a/nebo pokročilé trofické změny). V různých laboratořích však podle místních zvyklostí zohledňují tyto kontraindikace plně, částečně nebo jen v minimálním rozsahu a to často bez opory příslušného přístupu v publikovaných studiích či doporučeních.

Mezi možné komplikace EMG patří krvácení do vyšetřovaného svalu, infekce, pneumotorax (při vyšetření svalů hrudníku nebo v jeho blízkosti), kompartment syndrom, poranění elektrických proudem, poranění periferního nervu jehlovou elektrodou a případně interference s funkcí kardiostimulátoru/defibrilátoru (pokud jej má pacient implantován).

Práce proto poskytuje aktuální poznatky ke všem výše jmenovaným klinickým situacím a poskytuje tak podklad pro racionální „evidence-based“ indikaci ev. kontraindikaci tohoto důležitého vyšetření v diagnostice periferních neuropatií, myopatií a onemocnění motoneuronu a také u pacientů s neuropatickou bolestí.

Současný pohled na kontraindikace a komplikace elektromyografie

Current Perception of Contraindications and Complications of Nerve Conduction Studies and Needle Electromyography

Souhrn

Cílem práce je poskytnout přehled současných poznatků a doporučení vztahujících se k nejčastěji tradovaným kontraindikacím elektromyografie (EMG), tedy implantovanému kardiostimulátoru/defibrilátoru či užívání chronické antikoagulační nebo antiagregační terapie, a komplikacím EMG (infekce, pneumotorax, kompartment syndrom, poranění periferního nervu). Z publikovaných studií vyplývá, že u pacientů s implantovaným kardiostimulátorem/defibrilátorem lze bez problémů provádět běžnou i repetitivní elektrickou stimulaci periferních nervů. Je však vhodné vyhnout se místům v blízkosti těchto zařízení, a to s ohledem na možnou interferenci s jejich funkcí. Antikoagulační ani antiagregační terapie nepředstavuje dle provedených studií systematicky zvýšené riziko rozvoje klinicky významných intramuskulárních krvácení. Hematomy, detekované v návaznosti na jehlovou EMG, jsou většinou velmi drobné (několik milimetrů) a klinicky asymptomatické. Symptomatická a asymptomatická krvácení se po provedení jehlové EMG mohou vyskytovat i bez souvislosti s medikací, interferující s krevní srážlivostí. Jsou však obecně málo časté a jehlová EMG je považována za bezpečnou vyšetřovací metodu. Vysazení terapie ovlivňující srážení krve z důvodů EMG vyšetření představuje pro pacienta jednoznačně vyšší riziko než provedení jehlové EMG u pacienta při trvající antikoagulační/antiagregační terapii. Ostatní výše jmenované komplikace EMG jsou raritní, je však nutno počítat s možností jejich rozvoje a maximalizovat technická a hygienicko-epidemiologická opatření k zábraně jejich vzniku a uvážlivě indikovat EMG vyšetření.

Abstract

Clinical electromyography (EMG) is a key diagnostic tool in many neuromuscular diseases. Despite this, many laboratories do not perform nerve conduction studies (NCS) in patients with a pacemaker or implantable cardioverter-defibrillator. Furthermore, some labs do not perform needle EMG or at least do not examine some of the higher risk muscle groups in patients on anticoagulant or even antiplatelet therapy. In rare cases, EMG examination may also be complicated by leakage, transmission of infectious diseases, pneumothorax, compartment syndrome, or a peripheral nerve lesion. The aim of this study was to summarize current knowledge and recommendations related to these limitations and complications of EMG examination. According to published studies, common as well as repetitive electrical peripheral nerve stimulation can be performed in patients with pacemaker/defibrillator. Stimulation in close proximity to pacemaker/defibrillator should be avoided to prevent electromagnetic interference with their function. No increased systemic risk of clinically significant intramuscular haemorrhage was found in patients on an anticoagulant or antiplatelet therapy. Intramuscular hematomas resulting from needle EMG are usually very small (several millimetres) and clinically asymptomatic. Symptomatic and asymptomatic haemorrhages following needle EMG can occur without any relation to anticoagulant/antiplatelet therapy. However, they are generally rare and needle EMG is considered to be a safe diagnostic tool. In patients taking anticoagulation medication, thrombotic risk of discontinuing anticoagulation prior to EMG outweighs the risks associated with needle examination while on anticoagulation. All other EMG complications listed above are very rare but relevant. Therefore, it should always be carefully considered whether EMG examination is indicated. General technical and hygienic-epidemiological recommendations for EMG examination should be strictly followed to minimise the incidence of complications.

Práce byla podpořena projektem institucionální podpory FN Brno MZ ČR – RVO (FNBr – 65269705) a projektem specifického výzkumu č. MUNI/A/1072/2015 z programu podpory studentských projektů na Masarykově univerzitě.

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.

E. Vlčková, J. Bednařík

Neurologická klinika LF MU a FN Brno



MUDr. Eva Vlčková, Ph.D.
Neurologická klinika
LF MU a FN Brno
Jihlavská 20
625 00 Brno
e-mail: evlckova@email.cz

Přijato k recenzi: 17. 5. 2016

Přijato do tisku: 8. 8. 2016

Klíčová slova

elektromyografie – kardiostimulátor – defibrilátor – elektrická stimulace – warfarin – antikoagulační terapie – antiagregační terapie – krvácení – infekce – pneumotorax

Key words

electromyography – artificial pacemaker – implantable defibrillators – electric stimulation – warfarin – anticoagulant agents – antiplatelet agents – haemorrhage – infection – pneumothorax

Úvod

Klinická elektromyografie (EMG) je jednou ze základních diagnostických metod u neuromuskulárních onemocnění. Navzdory nezpochybnitelnému diagnostickému přínosu a mnohdy omezené zastupitelnosti jinými metodami není vyšetření (nebo některá z jeho částí) v řadě elektrofyziologických laboratoří prováděno u jedinců s implantovaným kardiostimulátorem/defibrilátorem a/nebo u pacientů užívajících chronickou antikoagulační či antiagregační terapii [1–4]. Tato omezení vycházejí většinou z dlouhodobé tradice příslušné laboratoře, ale nejsou založena na formálních doporučeních a často nejsou podpořena ani výsledky systematických studií.

EMG vyšetření představuje také riziko pro rozvoj řady dalších komplikací, jako jsou poranění elektrickým proudem, vznik pneumotoraxu či kompartment syndromu, poranění periferních nervů a/nebo přenos infekčních onemocnění.

Cílem práce bylo zhodnotit výsledky dosud publikovaných studií a relevantních doporučení hodnotících možnost provedení vyšetření a výskyt případných komplikací u pacientů se zmíněnými kontraindikacemi některé ze složek EMG vyšetření. Sumarizovány jsou také současné znalosti o výskytu a případné prevenci výše uvedených komplikací EMG vyšetření.

Kontraindikace kondukčních studií periferních nervů

Nejčastější kontraindikací kondukčních studií je implantovaný kardiostimulátor (Pacemaker; PM) nebo defibrilátor (Implantable Cardioverter Defibrillator; ICD), případně elektrody zavedené do srdce a velkých žil (např. elektrody v rámci dočasné zevní kardiostimulace nebo měřiče centrálního venózního tlaku). V řadě laboratoří není u těchto skupin pacientů EMG prováděno vůbec a/nebo jsou vyšetřovány pouze dolní končetiny, případně končetina na straně kontralaterální místu implantace PM. Důvodem pro takový postup je obava z interference elektrické stimulace s funkcí PM (který by mohl elektrické impulzy, generované v rámci stimulace při EMG, snímat jako impulzy kardiálního původu a měnit příslušným způsobem stimulaci), případně obava z přeprogramování PM/ICD nebo z vybití jeho baterie [2,4]. Dosud však nebyl publikován žádný případ okamžitého ani odloženého negativního vlivu běžných kondukčních studií periferních nervů na funkci

PM/ICD. Uvedené obavy jsou tedy pravděpodobně neopodstatněné – současné PM i ICD jsou schopny odlišit elektrickou aktivitu srdce od interferujících zevních podnětů. Elektrický impulz používaný v rámci kondukčních studií je vzdálený registračním elektrodám PM/ICD, nepravidelný a při v současnosti užívaném bipolárním zapojení kardiálních elektrod nemá schopnost generovat far-field potenciály detekovatelné zmíněnými intrakardiálními registračními elektrodami. Tyto předpoklady byly v posledním desetiletí potvrzeny několika menšími, ale velmi detailně dokumentovanými systematickými studiemi, které monitorovaly funkci PM/ICD během kondukčních studií periferních nervů, a to jak pomocí povrchového elektrokardiografického vyšetření (EKG), tak přímo hodnocením elektrické aktivity, snímané intrakardiálními elektrodami PM [4–6]. Pacienti byli současně klinicky kardiologicky sledováni a po ukončení testu byla provedena kontrola nastavení PM/ICD, aby bylo vyloučeno event. nežádoucí přeprogramování zařízení. Uvedené studie prokázaly, že běžná elektrická stimulace v lokti a zápěstí na straně PM/ICD nevedla k žádné interferenci s funkcí PM/ICD a nebyla zaznamenána ani na povrchovém EKG ani intrakardiálně [4,5]. Stimulaci v této distribuci lze tedy považovat za bezpečnou [2]. U menší skupiny pacientů byla provedena dokonce stimulace v Erbově bodě [4]; ani v tomto případě však nebyla zaznamenána žádná interference s funkcí PM/ICD. Další studie prokázala bezpečnost repetitivní stimulace v zápěstí [6]. V jedné ze studií byla testována i hypotéza, že by ovlivnění funkce PM mohlo být výraznější u pacientů se současně zavedenou periferní žilní linkou ve stimulované končetině, a to z důvodu snazšího šíření elektrických impulzů při porušení kožního povrchu [5]. Ani v tomto případě nebyla u pacientů s PM/ICD a současně zavedeným žilním katétre v zápěstí či lokti zaznamenána žádná interference s funkcí PM/ICD, a to dokonce ani při stimulaci během infuze fyziologického roztoku. V případě všech zmíněných studií byly PM/ICD v nyní převážně používaném bipolárním zapojení, o zařízeních v unipolárním zapojení je evidence minimální a riziko může být vyšší. Autoři studií dále upozorňují, že tyto výsledky nelze aplikovat na situace, kdy jsou elektrody zavedeny přes kůži přímo do srdce nebo jeho blízkosti (např. v případě dočasných zevních PM) a s ohledem na závažná potenciální rizika je v těchto případech vyšetření kontraindikováno [2,5].

Ke stimulaci v blízkosti PM/ICD (zejména repetitivní) je k dispozici minimální evidence. Doporučení Americké asociace neuromuskulární a elektrodiagnostické medicíny (American Association of Neuromuscular and Electrodiagnostic Medicine; AANEM) z roku 2009 [2] je proti používání stimulace v oblasti krku a proximálních svalových skupin HKK v blízkosti PM mj. s ohledem na nedostatek dat o její bezpečnosti. Toto doporučení podporuje i publikovaný případ kompletní přechodné inhibice funkce PM interskalenickým stimulátorem periferního nervu zavedeným z důvodu lokální anestezie při operaci ramenního kloubu [7]. Pro vhodnost vynechání stimulace v blízkosti PM/ICD svědčí i výsledky následně provedené systematické studie hodnotící vliv repetitivní stimulace n. medianus (v zápěstí), n. accessorius (na krku) a n. axillaris (ve fossa supraclavicularis) na funkci PM/ICD [6]. Z 10 vyšetřených pacientů s ICD byla při proximální stimulaci (supraklavikulárně a na krku) zachycena elektromagnetická interference s funkcí ICD u dvou případů, kdy byla elektrická stimulace patrná jako šum na intrakardiálním elektrokardiogramu. Tento šum byl ICD zaznamenán, ale nebyl identifikován jako impulzy kardiálního původu, a tedy nebyl zařízením hodnocen jako ventrikulární arytmie a nevedl k žádné změně aktivity ICD. U pacientů s PM byla elektromagnetická interference s funkcí PM zaznamenána ve třech ze čtyř případů a vedla (jak v případě bipolárního, tak i unipolárního zapojení PM) k přechodným změnám funkce kardiostimulátoru, tj. k několikavteřinové inhibici ventrikulární stimulace nebo naopak k přechodnému zvýšení stimulační frekvence. Při stimulaci v zápěstí žádná podobná interference zaznamenána nebyla [6].

V souhrnu lze tedy u pacientů s PM/ICD bez problémů provádět běžnou i repetitivní elektrickou stimulaci periferních nervů na DKK i distálně na HKK vč. strany ipsilaterální k místu implantace kardiostimulátoru. Výjimkou jsou pouze pacienti s elektrodami zavedenými transkutánně přímo do blízkosti srdce (např. při dočasné zevní kardiostimulaci či měření centrálního venózního tlaku), u nichž je vyšetření z důvodu vyššího rizika kontraindikováno [8]. Stejně tak je vhodné vyhnout se místům v okolí PM/ICD (alespoň do vzdálenosti 16–20 cm od PM/ICD) [8], tedy zejména stimulaci v proximálních segmentech končetiny, na krku či na trupu, a to s ohledem na možnou interferenci s funkcí PM či ICD [2,6,8,9]. Důležité je také adekvátní uzemnění pacienta [8].

Kontraindikace jehlové EMG

Nejčastější kontraindikací jehlové EMG je chronická antikoagulační či dokonce antiagregační terapie. Zejména v případech terapie antikoagulační je ve většině laboratoří rozsah vyšetření redukován, v řadě z nich není jehlová EMG prováděna vůbec nebo je před vyšetřením požadován převod pacienta na terapii nízkomolekulárními hepariny. V některých laboratořích je před EMG vyšetřením antikoagulovaného pacienta vyžadováno stanovení aktuální srážlivosti krve (zejména protrombinového času ve formě tzv. INR, tedy mezinárodního normalizovaného poměru) s tím, že další provedení vyšetření a jeho rozsah se řídí takto zjištěnou hodnotou. Tato praxe je na základě osobní komunikace autorů běžná na řadě českých i zahraničních pracovišť. Přesné údaje z českého prostředí nejsou k dispozici. V roce 2006 bylo publikováno dotazníkové šetření zaměřené na tuto problematiku a provedené ve 47 z 60 nejvýznamnějších EMG laboratoří v USA akreditovaných jako výuková pracoviště [3]. Pouze 10 z těchto laboratoří (21 %) udávalo ochotu vyšetřit u pacientů užívajících antikoagulační (případně i antiagregační) terapii jakoukoli svalovou skupinu. Ve všech ostatních (79 %) nejsou u antikoagulovaných pacientů vyšetřovány některé ze svalových skupin považovaných tradičně za rizikové (paravertebrální svaly, hluboké končetinové svaly – zejména m. iliopsoas, svaly obličeje či krku). Přitom pouze čtyři z oslovených laboratoří (9 %) udávaly v dosavadní historii pracoviště alespoň jeden případ závažnější krvácivé komplikace u antikoagulovaného pacienta vyžadující lékařskou (většinou chirurgickou) intervenci. Ve třech laboratořích udávali jeden takový případ, jedna laboratoř pak připustila dokonce dvě podobné komplikace. Při zvážení frekvence antikoagulační terapie (v USA je ročně vystaveno 30 000 000 receptů na warfarin) [10] a relativně vysoké četnosti EMG vyšetření zejména u starších pacientů (kteří jsou současně častěji antikoagulováni) je uvedená frekvence komplikací naprosto minimální. Žádná z laboratoří neuváděla podobné komplikace u pacientů užívajících antiagregační medikaci. Přesto v devíti laboratořích z výše uvedeného dotazníkového šetření (18 %) redukuje vyšetření jehlovou EMG i u těchto pacientů [3]. Nízkou reálnou četností závažnějších komplikací jehlové EMG dobře odráží i počet publikovaných prací na toto téma. Dosud bylo publikováno pouze šest případů závažnějšího symptomatického

krvácení v návaznosti na jehlovou EMG, z toho dva u pacientů užívajících chronickou antikoagulační terapii (warfarin) [11,12] a čtyři u jedinců bez medikace interferující s krevní srážlivostí [13–16] (většinou se jednalo o kompartment syndromy při vyšetření svalových skupin obalených pevnou fascií). I když je pravděpodobné, že řada komplikací tohoto typu nebyla publikována, uvedené výsledky dobře dokumentují skutečnost, že možný výskyt intramuskulárních hematomů v návaznosti na EMG vyšetření je nezbytné zohledňovat i u pacientů bez antikoagulační či antiagregační medikace.

V českém prostředí nevychází omezení jehlové EMG u chronicky antikoagulovaných pacientů z formálního doporučení odborné společnosti. K dispozici jsou pouze doporučení AANEM doporučující u pacientů s elevací INR a/nebo nízkým počtem destiček iniciálně vyšetřit povrchové svaly, ověřit výskyt případných krvácivých projevů a teprve následně přistoupit k elektromyografii hlubších svalových skupin. Po vyjmutí jehly doporučuje AANEM aplikovat na vyšetřovaný sval prodlouženou kompresi [1,2].

Systematická evidence výskytu subklinických intramuskulárních hematomů v běžně vyšetřovaných svalech (zejména končetinových) u pacientů s užíváním medikací i bez ní, interferující se srážlivostí krve, je dosud pouze limitována. Největší počet studií je překvapivě zaměřen na paravertebrální svaly. Tyto studie využívají skutečnost, že pacienti s vertebrogenními onemocněními mají často ve stejném období provedeno EMG vyšetření, zahrnující i jehlovou EMG paravertebrálních svalových skupin, a současně MR příslušného spinálního segmentu. Většina studií je proto založena na retrospektivním hodnocení MR nálezů provedených nejpozději týden po EMG vyšetření paravertebrálních svalů. K dispozici jsou celkem tři studie tohoto typu s velmi podobným designem [13,17,18]. Caress et al retrospektivně vyhodnotili MR vyšetření 54 spinálních segmentů vyšetřených jehlovou EMG u 17 pacientů [13]. Drobný subklinický hematoma byl zachycen ve čtyřech segmentech (7 % vyšetřených svalů, 24 % pacientů). Tato četnost je poměrně vysoká, je však vhodné si uvědomit, že tyto hematomy byly velmi malé, neměly žádný klinický korelát a nebyly ani v jednom případě popsány při původním hodnocení MR, ale až při následné cílené reevaluaci. Další studie identickým způsobem zhodnotila MR vyšetření 29 pacientů provedené nejpozději týden po

jehlové EMG paravertebrálních svalů a současně dalších 25 pacientů, u nichž dosud jehlová EMG paravertebrálních svalových skupin provedena nebyla [18]. Žádný z pacientů obou skupin neužíval warfarin, někteří však měli v pravidelné medikaci kyselinu acetylsalicylovou a/nebo nesteroidní antirevmatika. Výsledky této studie jsou poměrně překvapivé: možné intramuskulární hematomy byly zachyceny v paravertebrálních svalech u šesti pacientů každé z obou skupin (tedy bez ohledu na předcházející EMG vyšetření a také bez souvislosti s užívanou medikací). Ve většině případů šlo o velmi drobná krvácení (většinou 2–8 mm velká), pouze u jednoho pacienta (bez předchozího EMG) byl zachycen hematoma poněkud větší (14 mm). I v této studii byla všechna zachycená krvácení asymptomatická. Zcela jiné výsledky přinesla největší dosud publikovaná studie na toto téma [17]. Zařazeno bylo 370 pacientů, u nichž byla MR páteře provedena nejdéle týden po jehlové EMG paravertebrálních svalů. Někteří pacienti měli vyšetřeno více segmentů páteře. Celkem tedy bylo tímto způsobem zhodnoceno 431 krčních a/nebo bederních páteří. V rámci tohoto souboru užívalo 161 pacientů medikaci interferující se srážlivostí krve (tj. většinou medikaci antiagregační, 10 jedinců bylo chronicky warfarinovaných, ojedinělí pacienti pak byli na medikaci heparinem, enoxaparinem či dalteparinem). Ani v jednom případě nebyl zaznamenán MR detekovatelný hematoma v paravertebrálních svalových skupinách. Zřetelná diskrepance mezi výsledky uvedených studií je zřejmě podmíněna odlišností použitých kritérií pro hodnocení intramuskulárních hematomů. Vysoká četnost jejich záchytu u skupiny pacientů, která neprodělala předcházející jehlovou EMG paravertebrálních svalů v Londonově studii [18], zpochybňuje validitu takto nastavených kritérií, pro kterou svědčí i absence záchytu intramuskulárních krvácení v největší z uvedených prací [17]. V souhrnu výsledky těchto studií svědčí pro skutečnost, že případná nečetná krvácení, která se mohou vyskytovat v návaznosti na jehlovou EMG paravertebrálních svalů, jsou vesměs drobná a asymptomatická. Zvýšené riziko takových krvácení u pacientů užívajících antiagregační terapii a/nebo nesteroidní antirevmatika nebylo prokázáno [17–19]. Pro systematické hodnocení vlivu warfarinu, heparinu a nových antikoagulancií je však evidence pouze limitovaná.

Další studie byly zaměřeny na míru rizika intramuskulárních krvácení při uží-

vání warfarinu nebo kyseliny acetylsalicylové a/nebo klopidogrelu v návaznosti na jehlovou EMG v ostatních běžně vyšetřovaných svalech [20,21]. V obou studiích bylo místo vpichu bezprostředně po vytažení jehly na určitou dobu (u různých pacientů variabilní podle aktuální míry krvácivosti) pevně komprimováno (v souladu s doporučením AANEM [2] – viz níže), jinak se metodika vyšetření nelišila od běžného postupu. Výskyt hematomů byl monitorován pomocí ultrazvukového vyšetření příslušných svalů [20,21]. Lynch et al hodnotili výskyt ultrazvukem (UZ) detekovatelných hematomů v m. tibialis anterior v návaznosti na provedenou kvantitativní analýzu motorických jednotek v tomto svalu [20]. V rámci studie byl drobný (několika milimetrový), klinicky asymptomatický hematoma zachycen pouze u dvou pacientů ze 101 vyšetřených jedinců na terapii warfarinem (1,98 %) a jednoho pacienta z 57 vyšetřených pacientů léčených kyselinou acetylsalicylovou a/nebo klopidogrem (1,75 %), ale u žádného z 51 zdravých dobrovolníků. Rozdíl ve výskytu hematomů mezi jednotlivými skupinami nebyly statisticky významné. Prakticky identické výsledky přinesla další podobná studie [21] zaměřená na výskyt UZ detekovatelných intramuskulárních hematomů po jehlové EMG v dalších svalových skupinách, považovaných běžně za rizikové (paravertebrální svaly v krční, hrudní a bederní oblasti, musculus iliopsoas, flexor digitorum longus, flexor pollicis longus či tibialis posterior). Celkem bylo do studie zařazeno 206 jedinců: 70 kontrol, 78 pacientů s antiagregační terapií a 58 pacientů s terapií antikoagulační. Také v tomto souboru byly zachyceny UZ známky drobných subklinických hematomů pouze u dvou pacientů: jeden u pacientky užívající klopidogrel, druhý u warfarinizovaného pacienta.

Pro hodnocení výskytu komplikací jehlové EMG u pacientů užívajících nová antikoagulantia (rivaroxaban, dabigatran apod.) není dosud k dispozici dostatečná evidence. Publikovány byly ojedinělé případy pacientů užívajících tuto medikaci, bez průkazu intramuskulárních hematomů po provedené jehlové EMG [17], jedná se však pouze o velmi malé soubory. Obecně lze předpokládat, že jejich riziko nebude vyšší ve srovnání s warfarinizací [22].

V souhrnu z uvedených studií vyplývá, že intramuskulární hematomy (asymptomatické i symptomatické) se mohou vyskytovat i bez souvislosti s medikací inter-

ferující s krevní srážlivostí a k jehlové EMG je vždy nutné přistupovat s vědomím rizika vzniku těchto komplikací a rozsah vyšetření podle toho individuálně modifikovat. Tyto komplikace jsou však velmi málo časté, a to jak v běžné populaci, tak i u pacientů užívajících antikoagulační či antiagregační medikaci. Užívání léků interferujících se srážlivostí krve nepředstavuje dle provedených studií systematicky zvýšené riziko rozvoje klinicky významných intramuskulárních krvácení. Vysazení terapie ovlivňující srážlivost krve z důvodů EMG vyšetření představuje pro pacienta jednoznačně vyšší riziko než provedení jehlové EMG při trvající antikoagulační/antiagregační terapii [2,8]. Případně drobné intramuskulární hematomy jsou v naprosté většině případů asymptomatické a klinicky nevýznamné, zatímco vážnější symptomatické hemoragie jsou i u chronicky antikoagulovaných pacientů a/nebo u pacientů užívajících antiagregační medikaci zcela raritní. V rámci jehlové EMG je vhodné iniciálně vyšetřit povrchové svaly (s monitorací případného krvácení) a teprve následně přistoupit k vyšetření hlubších svalových skupin. Přínosná je pravděpodobně také aplikace prolongované komprese na vyšetřený sval, v souladu s doporučením AANEM [2]. Při tomto postupu není nezbytná ani znalost hodnot INR před vlastním EMG vyšetřením, protože aktuální krvácivost lze do značné míry posoudit při iniciálním vyšetření povrchových svalových skupin. S opatrností je vhodné přistupovat zejména k vyšetření paravertebrálních svalů, pro které je u antikoagulovaných pacientů k dispozici jen limitovaná evidence.

Další specifické situace potenciálně limitující možnost provedení EMG vyšetření

Vedle výše uvedených tradičně udávaných kontraindikací EMG existují další specifické situace znemožňující validní provedení vyšetření nebo některé z jeho částí. Jedná se především o výrazné trofické defekty ve vyšetřované oblasti, otoky (zejména lymf- edém) a také výraznou intoleranci vyšetření ze strany pacienta či jeho nespolupráci [2].

Kontraindikací EMG naopak není gravidita. V literatuře není popisována žádná komplikace kondukčních studií ani jehlové EMG u těhotných a není důvod neprovést vyšetření pacientky v této fyziologické situaci [2].

Individuální zvážení přínosu a rizik vyšetření je doporučeno u pacientů s hlubokou mozkovou stimulací (např. u pacientů s ex-

trapyramidovými onemocněními), kde také existuje potenciální riziko interference s uvedenými zařízeními během elektrické stimulace periferních nervů, zejména v oblasti krku, Erbova bodu, event. proximálních segmentů končetin. Protože dosud nejsou k dispozici žádné studie systematicky hodnotící rizika kondukčních studií periferních nervů u těchto pacientů, je rozhodnutí o provedení vyšetření vždy závislé na individuální úvaze indikujícího a/nebo vyšetřujícího lékaře [2].

Další možné komplikace EMG vyšetření

EMG vyšetření představuje nízké, ale nikoli zanedbatelné riziko také pro rozvoj dalších iatrogeních komplikací. Ty jsou jednoznačně častější a závažnější v rámci jehlové EMG, která je sice v naprosté většině případů bezpečná a dobře tolerovaná, ale přesto představuje určitý miniinvasivní zážitek a v ojedinělých případech může vést ke vzniku pneumotoraxu či kompartment syndromu, přenosu infekčních onemocnění a/nebo k lokálnímu poranění nervů ve vyšetřované oblasti [8]. Kondukční studie jsou v běžném rozsahu vyšetřením zcela neinvazivním, avšak v případech složitějších a invazivnějších stimulačních technik (jako např. „near-nerve needle“ technika či stimulace nervových kofenů) je jejich riziko obdobné jako při jehlové EMG [8]. V neposlední řadě je nutné uvést, že elektromyograf (stejně jako ostatní elektrické přístroje a zařízení přicházející do kontaktu s pacientem) se může stát zdrojem unikajícího proudu, a může tedy za určitých okolností vyvolat **poranění elektrickým proudem** [8].

Riziko poranění elektrickým proudem je vyšší zejména v případě, že je pacient napojen na další elektrické přístroje a zařízení, tedy nejčastěji na jednotkách intenzivní péče. V případě vyšších intenzit unikajícího proudu a jeho průchodu přes oblast srdce tak mohou vzniknout závažné a dokonce potenciálně letální arytmie. Prevencí této komplikace je správná údržba a kontrola přístrojů, použití funkční zemnicí elektrody (která by při kondukčních studiích měla být umístěna vždy mezi elektrodou stimulační a aktivní a v rámci jehlové EMG by se měla nacházet v blízkosti jehly) a také používání uzemněných jednofázových zásuvek se třemi válcovými kontakty [8]. Ostatní elektrické přístroje je – pokud je to možné – vhodné odpojit od pacienta a optimálně odstranit z místnosti, kde je vyšetření prováděno. Pacient by po

dobu vyšetření také neměl být ve fyzickém kontaktu s kovovými předměty ani s vlastním elektromyografem [8].

Pneumotorax jako komplikace jehlové EMG svalů v oblasti hrudníku, event. krku (zejména bránice a hrudní stěny a event. svalů v okolí apexu plic) je poměrně vzácný. Pravděpodobnost jeho rozvoje je vyšší u neklidných nemocných, u starších pacientů, u jedinců s plicními onemocněními a také při medikaci kortikoidy [23]. Dosud bylo publikováno jen několik ojedinělých případů (vč. oboustranného pneumotoraxu u jedné pacientky v návaznosti na vyšetření m. serratus anterior oboustranně [24]) a jediná retrospektivní studie. Tato recentní studie je zaměřena na výskyt pneumotoraxu u velkého souboru pacientů EMG laboratoří Mayo kliniky (Rochester, USA), u nichž byl vyšetřen alespoň jeden sval rizikový z hlediska rozvoje pneumotoraxu [23]. Za rizikové byly v rámci uvedené studie považovány následující svaly a svalové skupiny: paravertebrální svaly v krčním a hrudním úseku páteře, bránice, mezižeberní svaly, m. sternocleidomastoideus, m. trapezius, m. infra- a supraspinatus, m. latissimus dorzi, m. pectorales (major či minor), m. rhomboideus major a m. serratus anterior. V databázi EMG vyšetření provedených v tamních laboratořích v období 1997–2014 bylo identifikováno 64 490 pacientů, u nichž bylo ve sledovaném 18 let trvajícím období vyšetřeno celkem 71 782 rizikových svalů. Současně byli z nemocničního informačního systému dohledáni pacienti vyšetřovaní a léčeni v identickém období pro pneumotorax. Celkem bylo identifikováno sedm pacientů, u nichž pneumotorax vznikl v pravděpodobné či jisté souvislosti s EMG vyšetřením. U pěti z těchto sedmi pacientů bylo provedeno vyšetření více než jednoho rizikového svalu. Jako nejrizikovější se jeví vyšetření m. serratus anterior (kde byl pneumotorax zachycen u 0,445 % vyšetřených pacientů s 95% CI 0,17–1,14 %), bránice (s relativním rizikem 0,149 % a 95% CI v rozsahu 0,04–0,54 %) a m. trapezius (riziko 0,117%, 95% CI 0,05–0,30 %). Riziko u ostatních vyšetřených svalových skupin bylo ještě daleko menší a pohybovalo se pod 0,5 %.

O riziku rozvoje **kompartment syndromu** v návaznosti na jehlovou EMG bylo částečně diskutováno v části zaměřené na komplikace antikoagulační terapie, a to vč. případů, u nichž rozvoj intramuskulárního krvácení vedoucího k rozvoji kompartment syndromu nebyl vázán na medikaci inter-

ferující se srážlivostí krve [13–15]. Riziko je obecně vyšší u svalů, obalených pevnou fascií (kromě svalů bérce [13,14] může jít např. o svaly předloktí [15], případně stehna [16]). Dosud bylo publikováno jen několik ojedinělých případů a žádná systematická studie mapující výskyt kompartment syndromu v návaznosti na EMG vyšetření. Rizikové faktory vedoucí k rozvoji této komplikace (s výjimkou koagulačních změn) nejsou tedy dosud známy. Jedná se o závažnou a zřejmě nepreventabilní komplikaci, jejíž výskyt je však zcela raritní. I při zvážení faktu, že část případů nepochybně publikována nebyla, je (při vysokém počtu každoročně provedených EMG vyšetření) riziko velmi nízké a pohybuje se v setinách či tisícinách promile.

Jehlová EMG a ve výjimečných případech (kdy je primárně narušena kontinuita kožního povrchu a/nebo je nutné významně skarifikovat kůži k dosažení snížení kožního odporu) i kondukční studie periferních nervů představují (stejně jako jakýkoli jiný invazivní či miniinvazivní zákrok) také **riziko přenosu infekce**. K přenosu infekčních agens může docházet mezi pacienty, a to v případě nedodržování základních hygienických opatření vč. opakovaného používání jehlových elektrod či nedostatečné dezinfekce ostatních EMG pomůcek a vybavení laboratoře (např. přístrojů, povrchových elektrod, kabelů či elektrod zemnicích) v případě, že tyto přišly do kontaktu s tělesnými tekutinami pacienta. Přenos je možný také mezi pacientem a vyšetřujícím. K nejzávažnějším onemocněním, rizikovým z hlediska možného přenosu v rámci EMG vyšetření, patří virus lidské imunodeficiency (HIV), virové hepatitidy (především typu B, C a D) a prionová onemocnění (Creutzfeldova-Jakobova choroba) [8]. Systematické studie monitorující riziko přenosu těchto onemocnění po provedené EMG nebyly dosud publikovány. Prevencí je používání jednorázových jehlových elektrod a také pečlivé dodržování standardních hygienických opatření a důkladná dezinfekce pomůcek v případě jejich kontaktu s tělesnými tekutinami pacienta. Prevencí poranění vyšetřujícího je také opatrné zacházení s jehlou během vyšetření (zejména mezi jednotlivými inzercemi). Pokud je nezbytné zasunout během vyšetření jehlu zpět do ochranné krytky, nemělo by to být prováděno pomocí druhé ruky (držící krytku). Některé laboratoře používají speciální držáky těchto krytek umožňující bezpečné zasunutí jehly [8]. Každé poranění vyšetřujícího je nutné pečlivě zaznamenat do dokumentace

a optimálně konzultovat s hygienicko-epidemiologickým oddělením daného pracoviště.

Jehlová EMG může představovat také určité riziko zavlčení **infekčních agens z kožního povrchu do hlubších tkání** či krve pacienta. Podobné komplikace nebyly dosud publikovány. Je však vhodné dodržovat určitá základní opatření identická jako v případě jiných invazivních zákroků: jehlová elektroda by nikdy neměla být zaváděna přes infikované tkáně (např. bércový vřed) [8], vhodná je také dezinfekce kožního povrchu před vlastním vpichem jehly. Zvažováno bylo rovněž možné riziko bakteriemie po transkutánním vpichu u pacientů ve vyšším riziku infekční endokarditidy, což však dosud nebylo potvrzeno žádným publikovaným případem podobné komplikace EMG ani systematickými studii. Z tohoto důvodu není u těchto pacientů tč. doporučen odlišný přístup k vyšetření ani není indikována případná antibiotická profylaxe před plánovaným EMG [8].

V neposlední řadě může v rámci EMG vyšetření hypoteticky dojít k **poranění periferních nervů** přímým vpichem jehly do intraneurálního prostoru [8]. Autoři práce si nejsou vědomi žádného publikovaného případu poranění periferního nervu jehlovou elektrodou. Publikována však byla samozřejmě řada případů poranění periferně neurogenních struktur např. v návaznosti na intramuskulární injekce či venepunkce, a toto riziko nelze tedy ani v rámci jehlové EMG považovat za zcela vyloučené. Nejpravděpodobněji by taková situace mohla nastat při vyšetření svalů, v jejichž těsné blízkosti některý z nervů prochází. Příkladem by mohlo být např. poranění n. ischiadicus při vyšetření m. gluteus maximus, poranění n. radialis superficialis při vyšetření m. flexor pollicis longus, léze n. ulnaris při jehlové EMG z m. flexor digitorum longus a zejména poranění n. medianus v rámci jehlové EMG z m. pronator teres. V rámci jehlové EMG uvedených svalů mohou pacienti výjimečně udávat parestezie v distribuci příslušného nervu vznikající pravděpodobně v důsledku jeho iritace. V takovém případě je nezbytné okamžitě vyjmout jehlu z vyšetřovaného svalu a před případnou další inzercí jehly do identického či jiného svalu vyčkat na odeznění parestezií.

Rozvoj posledních zmiňovaných komplikací (tj. infekce, kompartment syndromu, pneumotoraxu, poranění elektrickým proudem, poranění periferních nervů) není vázán na konkrétní, pro určité spektrum pacientů specifickou predisponující okolnost, kterou

je vhodné zohlednit při indikaci EMG vyšetření u příslušného jedince (na rozdíl od antikoagulační/ antiagregační terapie či implantovaného PM/ICD). Nejedná se tedy o okolnosti za určitých podmínek kontraindikující EMG vyšetření. Jejich prevence je možná pouze respektováním obecných hygienicko-epidemiologických opatření (tedy zejména používání jednorázových jehel či používání nepropustných rukavic v případě jakýchkoli lézí na rukou vyšetřujícího), správného technického postupu vyšetření nebo anatomických poměrů vyšetřované oblasti (jako prevence pneumotoraxu či poranění periferních nervů). Důležitou prevencí jejich vzniku je samozřejmě také uvážlivá indikace vyšetření, které – jakkoli je vysoce přínosné a velmi bezpečné – může být ve výjimečných případech příčinou zmíněných iatrogenických komplikací.

Seznam použitých zkratk

AANEM – Americká Asociace Neuromuskulární a Elektrodiagnostické Medicíny (American Association of Neuromuscular and Electrodiagnostic Medicine)
 EKG – elektrokardiografie
 EMG – elektromyografie
 ICD – defibrilátor (Implantable Cardioverter-Defibrillator)
 INR – mezinárodní normalizovaný poměr protrombinového času (International Normalized Ratio)
 MR – magnetická rezonance (Magnetic Resonance Imaging)
 PM – kardiostimulátor (Pacemaker)
 UZ – ultrazvuk

Literatura

1. Guidelines in electrodiagnostic medicine. Risks in electrodiagnostic medicine. American Association of Electrodiagnostic Medicine. *Muscle Nerve* 1999;8(Suppl 1):S53–69.
2. American Association of Electrodiagnostic Medicine. Risks in electrodiagnostic medicine. Rochester, MN: AAEM; 2009. [accessed 2016 May 10]. Available from URL: <http://www.aanem.org/AANEM/media/AANEM/Documents/Practice/Position%20Statements/risksinEDX.pdf>.
3. Gruis KL, Little AA, Zebarah VA, et al. Survey of electrodiagnostic laboratories regarding hemorrhagic complications from needle electromyography. *Muscle Nerve* 2006;34(3):356–8.
4. Schoeck AP, Mellion ML, Gilchrist JM, et al. Safety of nerve conduction studies in patients with implanted cardiac devices. *Muscle Nerve* 2007;35(4):521–4.
5. Mellion ML, Buxton AE, Iyer V, et al. Safety of nerve conduction studies in patients with peripheral intravenous lines. *Muscle Nerve* 2010;42(2):189–91. doi: 10.1002/mus.21714.
6. Cronin EM, Gray J, Abi-Saleh B, et al. Safety of repetitive nerve stimulation in patients with cardiac implantable electronic devices. *Muscle Nerve* 2013;47(6):840–4. doi: 10.1002/mus.23707.
7. Engelhardt L, Grosse J, Birnbaum J, et al. Inhibition of a pacemaker during nerve stimulation for regional anaesthesia. *Anaesthesia* 2007;62(10):1071–4.
8. Al-Shekhlee A, Shapiro BE, Preston DC. Iatrogenic complications and risks of nerve conduction studies and needle electromyography. *Muscle Nerve* 2003;27(5):517–26.
9. Kadaňka Z, Bednařík J, Voháňka S. Praktická elektromyografie. 1. vyd. Brno: IDPVZ 1994.
10. Wysowski DK, Nourjah P, Swartz L. Bleeding complications with warfarin use: a prevalent adverse effect resulting in regulatory action. *Arch Intern Med* 2007;167(13):1414–9.
11. Butler ML, Dewan RW. Subcutaneous hemorrhage in a patient receiving anticoagulant therapy: an unusual EMG complication. *Arch Phys Med Rehabil* 1984;65(11):733–4.
12. Rosioreanu A, Dickson A, Lypen S, et al. Pseudoaneurysm of the calf after electromyography: sonographic and CT angiographic diagnosis. *AJR Am J Roentgenol* 2005;185(1):282–3.
13. Caress JB, Rutkove SB, Carlin M, et al. Paraspinal muscle hematoma after electromyography. *Neurology* 1996;47(1):269–72.
14. Farrell CM, Rubin DI, Haidukewych GJ. Acute compartment syndrome of the leg following diagnostic electromyography. *Muscle Nerve* 2003;27(3):374–7.
15. Vaienti L, Vourtsis S, Urzola V. Compartment syndrome of the forearm following an electromyographic assessment. *J Hand Surg Br* 2005;30(6):656–7.
16. Brewer MB, Folstein MK, Kerns M, et al. Compartment syndrome of the thigh as a complication of electromyography. *Am Surg* 2012;78(2):72–3.
17. Gertken JT, Hunt CH, Montes China NI, et al. Risk of hematoma following needle electromyography of the paraspinal muscles. *Muscle Nerve* 2011;44(3):439–40. doi: 10.1002/mus.22138.
18. London Z, Quint DJ, Haig AJ, et al. The risk of hematoma following extensive electromyography of the lumbar paraspinal muscles. *Muscle Nerve* 2012;46(1):26–30. doi: 10.1002/mus.23288.
19. Gertken JT, Patel AT, Boon AJ. Electromyography and anticoagulation. *PM R* 2013;5(Suppl):S3–7. doi: 10.1016/j.pmrj.2013.03.018.
20. Lynch SL, Boon AJ, Smith J, et al. Complications of needle electromyography: hematoma risk and correlation with anticoagulation and antiplatelet therapy. *Muscle Nerve* 2008;38(4):1225–30. doi: 10.1002/mus.21111.
21. Boon AJ, Gertken JT, Watson JC, et al. Hematoma risk after needle electromyography. *Muscle Nerve* 2012;45(1):9–12. doi: 10.1002/mus.22227.
22. Caress JB. Bleeding and electromyography: the needle and the damage (not) done. *Muscle Nerve* 2011;44(3):313–5. doi: 10.1002/mus.22137.
23. Kassardjian CD, O'Gorman CM, Sorenson EJ. The risk of iatrogenic pneumothorax after electromyography. *Muscle Nerve* 2016;53(4):518–21. doi: 10.1002/mus.24883.
24. Unlüer EE, Akyol PY, Karagöz A, et al. A deadly complication of superficial muscular needle electromyography: bilateral pneumothoraces. *Case Rep Med* 2013;2013:861787. doi: 10.1155/2013/861787.

Impact faktor časopisu Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie pro rok 2015 činí **0,209** (nárůst oproti roku 2014, kdy impact faktor činil **0,159**).

27. Srotova I, Vlckova E, Dusek L, Bednarik J. A-waves increase the risk of developing neuropathy. *Brain Behav* 2017;7(8):e00760. doi: 10.1002/brb3.760. IF = 2,219.

Tato originální práce je (podobně jako předchozí přehledný článek) zaměřena na elektromyografické vyšetření, tedy jednu z nejvýznamnějších metod v diagnostice periferní neuropatické bolesti.

Studie hodnotí prognostický význam jednoho z méně často sledovaných parametrů kondukčních studií (tzv. A-vlny). Je zaměřena na otázku, zda výskyt tohoto elektrofyziologického parametru jako izolované abnormality při jinak normálním EMG vyšetření predikuje určitý vývoj EMG nálezu do budoucna. Problematika je řešena prostřednictvím retrospektivního hodnocení několika set EMG nálezů pacientů, vyšetřených opakovaně v rámci stejné elektrofyziologické laboratoře, u nichž byla při iniciálním vyšetření zachycena A-vlna na některém z periferních nervů, bez jiných EMG abnormalit. U těchto jedinců je pak hodnocen výskyt abnormalit při kontrolním elektrofyziologickém vyšetření s odstupem cca 2 let, a to s ohledem na iniciální průkaz A-vln.

Studie prokazuje, že výskyt A-vln na některém z periferních nervů (jako izolovaná elektrofyziologická abnormalita) signifikantně zvyšuje prospektivní pravděpodobnost rozvoje širších elektrofyziologických abnormalit a jedná se tedy o nález potvrzující iniciální periferně neurogenní dysfunkci v testované distribuci.

A-waves increase the risk of developing neuropathy

Iva Srotova¹ | Eva Vlckova¹  | Ladislav Dusek² | Josef Bednarik¹

¹Department of Neurology, Masaryk University and University Hospital Brno, Brno, Czech Republic

²Institute of Biostatistics and Analyses, Masaryk University, Brno, Czech Republic

Correspondence

Eva Vlckova, Department of Neurology, Masaryk University and University Hospital Brno, Brno, Czech Republic.
Email: evlckova@email.cz

Funding information

The Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic, Grant/Award Number: SVMUNI/A/1072/2015; Ministry of Health of the Czech Republic, Grant/Award Number: MH CZ - DRO, FNBr, 65269705

Abstract

Introduction: A-waves, which are observed following the M-wave during motor nerve conduction studies (NCS), are late responses that are frequently found in many types of neurogenic disorders. However, A-waves are also common in healthy individuals, where their significance remains unclear. The aim of this study was to examine whether the occurrence of A-waves does in fact represent an increased risk for the future development of changes upon NCS or needle electromyography (EMG) in the corresponding nerve.

Methods: Nerve conduction studies/needle electromyography findings at control examination were evaluated in relation to the occurrence of initial A-waves in 327 individuals who had undergone repeated NCS/EMG examination and exhibited normal initial findings, with or without the occurrence of A-waves as the only acceptable abnormality.

Results: The odds ratio, which reflects the predictive power of the occurrence of A-waves at the initial testing for the development of an abnormality (neuropathy or radiculopathy) at the follow-up examination, ranged from 2.7 ($p = .041$) in the tibial nerve and 3.9 ($p = .034$) in peroneal one, to 30.0 ($p = .002$) in the ulnar nerve.

Conclusions: A-waves constitute an initial abnormality in all nerves, and they may be predictive for the future development of broader NCS/EMG abnormalities in the corresponding nerve.

KEYWORDS

A-wave, electromyography, F-wave, late response, nerve conduction study, neurography, neuropathy

1 | INTRODUCTION

A-wave is a common late response, i.e., a response that can be identified following the compound muscle action potential (CMAP, M-wave) during routine motor nerve conduction studies (NCS) (Bischoff, 2002). In general, several types of late responses can be differentiated based on their latency, amplitude, stability, the stimulus intensity necessary to elicit the response, the consistency of the occurrence and the possibility to block them using double stimulation (Bischoff, 2002). Some of these late responses are physiological (H-reflex and F-waves), whereas others are usually considered to be a sign of some underlying

pathology (A-waves). A-waves are characterized by a constant shape and latency upon repeated stimulation (the variation of their onset latency is usually less than 1.5 ms) and, in most cases, a low amplitude (Figure 1). The number of A-waves increases with an increasing stimulus intensity, whereas the latency does not change. They are frequently found in many neurogenic disorders, including demyelinating neuropathies, axonal neuropathies, focal mononeuropathies, radiculopathies, and motor neuron diseases (Andersen, Stålberg, & Falck, 1997; Bischoff, Stålberg, Falck, & Pukša, 1996; Kornhuber, Bischoff, Mentrup, & Conrad, 1999; Pukša, Stålberg, & Falck, 2003; Rowin & Meriggioli, 2000) but they are also common in healthy individuals,

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2017 The Authors. *Brain and Behavior* published by Wiley Periodicals, Inc.

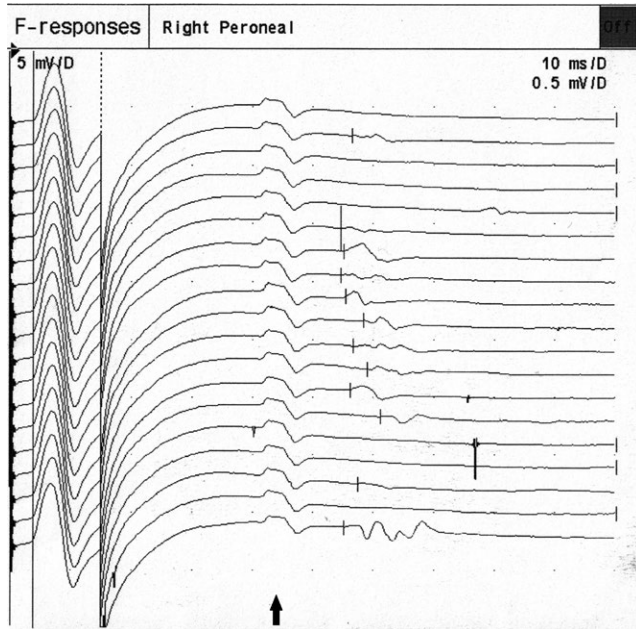


FIGURE 1 A-waves (marked by black arrow) occurring between M-wave and F-wave in peroneal nerve in a healthy volunteer. Constant shape with minimal variability of the onset latency can be seen

mainly in the lower extremities (Bischoff et al., 1996; Puksa et al., 2003; Rowin & Meriggioli, 2000). In the study published by Puksa et al. (2003), A-waves were found in 25% of the tibial nerves studied and in 14% of the peroneal nerves in a group of otherwise healthy subjects (Puksa et al., 2003). The frequency of A-waves in their study increased with age. Therefore, the authors hypothesize that A-waves may be related to normal age-related mild neuropathic changes of alpha motor neurons (Puksa et al., 2003). A-waves thus seem to represent an initial peripheral nerve abnormality. It is, however unclear, if their presence increases the risk of development of more pronounced neuropathy in future, which—according to our knowledge—has not been studied yet.

The aim of this study was to examine whether the occurrence of supramaximally stimulated A-waves, which were recorded as the only abnormality in routine F-wave studies, might predict an increased probability for the development of other electrophysiological abnormalities in the respective nerve.

2 | METHODS

2.1 | Patients

The occurrence of A-waves was studied retrospectively in the records of EMG/NSC examinations from patients/healthy controls performed in the electrophysiological laboratory of University Hospital Brno (which represents the biggest neuromuscular center in the Czech Republic). The use of these data for this study was approved by the Institutional Ethics Committee. Initially, one examiner (IŠ) went through all the records from the period between 2006 and 2015, and selected the patients/controls, complying with following inclusion criteria: (i) normal initial NCS and needle EMG, with or without the

occurrence of A-waves as the only acceptable abnormality, and (ii) re-examination of the same peripheral nerve within 12–60 months. In the next step, clinical records of all the selected patients/controls were checked and individuals suitable for further analysis were selected based on the following exclusion criteria: (i) known risk factors for peripheral neuropathy (e.g., diabetes mellitus, chronic alcohol abuse, uremia, and thyroid dysfunction) and (ii) acute sensory symptoms (with the duration of few days, possibly related to acute neuropathies, e.g., Guillain-Barre syndrome—only two patients otherwise complying with the inclusion criteria, were excluded for this reason). The majority of the individuals (102) were healthy volunteers who were examined for the purposes of several other studies. In addition, patients with no objective signs of peripheral neuropathy but with various other types of complaints (mainly subacute or chronic sensory symptoms in the upper or lower extremities [91], unexplained fatigue [47] and/or pain radiating from the cervical/lumbar spinal cord to the upper/lower extremities [87]) who had undergone re-evaluation for the same or different reasons were included in the analysis. All these individuals (as well as the healthy volunteers) showed normal clinical neurological examination (including the evaluation of muscle strength using the MRC scale, the examination of deep tendon reflexes and sensitivity to touch, pinprick, vibration, and statesthesia and kinesthesia). The only acceptable deviation from the fully normal clinical status was the decrease (but not the absence) of Achilles tendon reflex, which was found in about one-third of all the individuals included (Table 3 and 4). Using the above-mentioned inclusion/exclusion criteria, a total of 815 motor nerves (median, ulnar, peroneal, and tibial) from 327 individuals (131 males and 194 females; mean age 50.3 ± 10.7 years) were further investigated for the presence of A-waves and development of abnormalities at control examination (Table 1 and 2), with a mean interval between examinations of 26.6 ± 14.2 months.

2.2 | Electrophysiological examination

Electrophysiological examinations were performed using a Keypoint Dantec type II or IV electromyography system (Dantec, Skovlunde, Denmark). Routine motor nerve conduction studies of the median, ulnar, peroneal, and tibial nerves, including 20 consecutive F-waves and needle EMG from related muscles, were performed using standard protocols, and were processed relative to our own reference values, which are based on age and height (Kadanka, Bednarik, & Vohanka, 1994) and are similar to the reference values published by Kimura (Kimura, 2013). We used standard silver/silver chloride surface electrodes (10 mm in diameter), with the active electrode placed on the belly of the muscle and the reference electrode positioned on a muscle tendon. Electrical stimulation was performed at the distal stimulation site (80 or 100 mm proximal to the active electrode in the upper or lower extremities) using repetitive stimulation at a frequency of 1 Hz, a duration of 0.2 ms (for each stimuli) and a supramaximal intensity of 10%–15% above the level needed to elicit a maximal M-response. Patients remained fully relaxed during the examination.

Late responses were recorded in each motor nerve when stimulated at the wrist (median or ulnar) or the ankle (peroneal or tibial). The

TABLE 1 Occurrence of A-waves and its influence on the future development of NCS/EMG abnormalities in the median and ulnar nerves

Characteristics ^a	Median nerves (N = 188)			Ulnar nerves (N = 190)		
Interval between 1st and 2nd examination (months)	27.5 (12.0; 60.0)			27.0 (12.0; 60.0)		
Nerves with A-waves (initial examination)	4 (2.1%)			4 (2.1%)		
	Nerves with initial A-waves (N = 4)	Nerves without initial A-waves (N = 184)	<i>p</i> ^b	Nerves with initial A-waves (N = 4)	Nerves without initial A-waves (N = 186)	<i>p</i> ^b
Abnormality at 2nd examination	2 (50.0%)	28 (15.2%)	.120	2 (50.0%)	6 (3.2%)	.009
Types of abnormality at 2nd examination						
ALS	0 (0.0%)	0 (0.0%)		0 (0.0%)	2 (1.1%)	
PNP	1 (25.0%)	1 (0.5%)		0 (0.0%)	2 (1.1%)	
Radiculopathy C8	1 (25.0%)	1 (0.5%)	.014^c	0 (0.0%)	1 (0.5%)	.429 ^c
CTS	0 (0.0%)	26 (14.1%)		0 (0.0%)	0 (0.0%)	
Ulnar nerve entrapment neuropathy	0 (0.0%)	0 (0.0%)		2 (50.0%)	1 (0.5%)	

^aAbsolute and relative frequencies for categorical variables and median and min–max range for continuous variables.

^bFisher's exact test for categorical variables; Mann–Whitney test for continuous variables and scores.

^cStatistical significance for the difference in the incidence of a particular abnormality at the 2nd examination between nerves with and without A-waves at the initial examination.

Bold values are statistically significant.

TABLE 2 Occurrence of A-waves and its influence on the future development of NCS/EMG abnormalities in the peroneal and tibial nerves

Characteristics ^a	Peroneal nerves (N = 212)			Tibial nerves (N = 224)		
Interval between 1st and 2nd examination (months)	20.0 (12.0; 60.0)			20.5 (12.0; 60.0)		
Nerves with A-waves (initial examination)	21 (9.9%)			70 (31.3%)		
	Nerves with initial A-waves (N = 21)	Nerves without initial A-waves (N = 191)	<i>p</i> ^b	Nerves with initial A-waves (N = 70)	Nerves without initial A-waves (N = 154)	<i>p</i> ^b
Abnormality at 2nd examination	4 (19.0%)	11 (5.8%)	.047	10 (14.3%)	9 (5.8%)	.067
Types of abnormality at 2nd examination						
ALS	0 (0.0%)	2 (1.0%)		0 (0.0%)	2 (1.3%)	
PNP	3 (14.3%)	6 (3.1%)	.999 ^c	6 (8.6%)	6 (3.9%)	.353 ^c
Radiculopathy L5	1 (4.8%)	3 (1.6%)		0 (0.0%)	0 (0.0%)	
Radiculopathy S1	0 (0.0%)	0 (0.0%)		4 (5.7%)	1 (0.6%)	

ALS, amyotrophic lateral sclerosis; PNP, polyneuropathy.

^aAbsolute and relative frequencies for categorical variables and median and min–max range for continuous variables.

^bFisher's exact test for categorical variables; Mann–Whitney test for continuous variables and scores.

^cStatistical significance for the difference in the incidence of a particular abnormality at the 2nd examination between nerves with and without A-waves at the initial examination.

Bold values are statistically significant.

presence of A-waves at initial examination was evaluated from the NCS records by single observed (EV) experienced in clinical neurophysiology and blinded to the findings at follow-up and patients/controls clinical status. A-waves were considered present if they fulfilled the following criteria: constant shape and latency (with a chronodispersion under 0.5 ms) and present in at least 40% of the recorded responses. Similar to previous studies (Bischoff et al., 1996; Pukša et al., 2003), A-waves were considered to be a group of late responses that were different from F-waves and the H-reflex and were not further classified based on their pathophysiological mechanisms. In addition, compound muscle action potentials (CMAPs), motor nerve conduction velocities (NCVs), distal

motor latencies (DML), minimum F-wave latencies and needle EMG findings in related muscles were also noted at both the initial and follow-up examination using previously described methods (Kadanka et al., 1994). These parameters and their intertrial change were analyzed statistically to establish a possible relationship with the presence of A-waves.

2.3 | Statistical methodology

Standard descriptive statistics were applied in the analysis, which included the median, and the min–max range for continuous variables and the absolute and relative frequencies for categorical variables.

The statistical significance of differences between the groups of patients was assessed using a nonparametric Mann–Whitney *U* test and the Kruskal–Wallis test for continuous variables. Chi-squared test and Fisher's exact test were applied to categorical variables. The predictive power of the occurrence of A-waves at first examination with the development of an abnormality at second examination was quantified using the odds ratio (OR) and 95% confidence interval. Estimates of OR were performed using logistic regression models. The analysis was performed using SPSS 22.0.0.1 software (IBM Corporation, 2014).

3 | RESULTS

Initially, the data from healthy controls and patients with no objective signs of peripheral neuropathy but with various other types of complaints were compared. The initial values of all the evaluated NCS parameters (amplitudes, conduction velocities, and F-wave latencies), clinical findings as well as the occurrence of A-waves did not show any significant difference between these two subgroups (Table 3 and 4). For further analysis, all the individuals were thus considered as one group.

A summary of the results processed in relation to the A-waves presence is presented in Tables 1, 2. At the initial examination, A-waves

were rare in the upper extremities, occurring in only 2.1% of all assessed ulnar and median nerves. In contrast, A-waves were found significantly more frequently in the lower extremities, particularly in the tibial nerve (31.3%) but less frequently in the peroneal nerve (9.9%).

At the follow-up examination 12–60 months later, the most frequent abnormality that developed in the upper extremities was mild (22 patients) to moderate (4 cases) carpal tunnel syndrome (CTS, documented by the decrease in sensory and/or motor median NCVs in the transcarpal segment of the nerve and by the increase in distal sensory and/or motor latencies), followed by ulnar nerve entrapment at the elbow (2 cases) and Guyon's canal (1 patient) (confirmed by decrease in motor NCVs across the elbow or Guyon's canal together with the increase of ulnar DML in the latter case, and by the decrease of the amplitudes in the ulnar CMAP and chronic axonal changes of motor unit potentials in needle EMG from ulnar muscles). Less frequently, axonal sensory motor polyneuropathy (documented by the decrease in CMAP amplitudes and/or sensory nerve action potentials as well as by the new development of chronic axonal changes of motor unit potentials in needle EMG from distal muscles), or C8 radiculopathy (with the decrease in CMAP amplitudes of the ulnar and median nerves, and related chronic needle EMG changes in appropriate muscles) were associated with the ulnar or median nerves. In the lower extremities, the most frequent

TABLE 3 Clinical status and nerve conduction studies at 1st examination and types of abnormality at 2nd examination: comparison of the healthy controls and patients with clinical symptoms in the median and ulnar nerves

Characteristics ^a	Median nerves (N = 188)			Ulnar nerves (N = 190)		
	Healthy controls (N = 69)	Patients with clinical symptoms ^b (N = 119)	<i>p</i> ^c	Healthy controls (N = 70)	Patients with clinical symptoms ^b (N = 120)	<i>p</i> ^c
Interval between 1st and 2nd exam. (months)	28.0 (12.0; 60.0)	25.0 (20.0; 60.0)	.11	28.5 (12.0; 60.0)	25.5 (12.0; 60.0)	.17
Clinical status at 1 st examination: decreased Achilles tendon reflex	21 (30.4%)	41 (34.5%)	.57	21 (30.0%)	41 (34.2%)	.55
Nerves with A-waves (initial examination)	1 (1.4%)	3 (2.5%)	.62	1 (1.4%)	3 (2.5%)	.62
Abnormality at 2nd examination	8 (11.6%)	22 (18.6%)	.21	2 (2.9%)	6 (4.8%)	.48
CMAP at 1st examination (mV)	10.7 (6.6;17.1)	10.2 (3.9;18.7)	.16	10.4 (7.0;17.0)	11.1 (6.3;17.1)	.38
CMAP at 1st examination (Z-score)	0.5 (-0.7;2.6)	0.4 (-2.0;3.2)	.13	-0.3 (-1.9;2.4)	0.0 (-1.9;2.5)	.38
MCV at 1st examination (m/s)	55.2 (48.0;65.6)	55.0 (48.0;69.6)	.88	56.9 (48.5;72.1) ^d	57.1 (48.4;73.9) ^d	.51
F-M latency at 1st examination (Z-score)	-0.8 (-3.2;1.6)	-1.0 (-3.2;1.8)	.47	0.5 (-2.6;1.8)	-0.2 (-3.3;1.7)	.08
Types of abnormality at 2nd examination						
Normal	61 (88.4%)	97 (81.5%)	.301	68 (97.1%)	114 (95%)	.712
ALS	0 (0.0%)	0 (0.0%)		1 (1.4%)	1 (0.8%)	
PNP	1 (1.5%)	1 (0.8%)		1 (1.4%)	1 (0.8%)	
Radiculopathy C8	0 (0.0%)	2 (1.7%)	.733	0 (0.0%)	1 (0.8%)	.571
CTS	7 (10.1%)	19 (16.0%)		0 (0.0%)	0 (0.0%)	
Ulnar nerve entrapment neuropathy	0 (0.0%)	0 (0.0%)		0 (0.0%)	3 (2.5%)	

ALS, amyotrophic lateral sclerosis; CMAP, compound muscle action potential; CTS, carpal tunnel syndrome; MCV, motor conduction velocity; PNP, polyneuropathy.

^aAbsolute and relative frequencies for categorical variables and median and min–max range for continuous variables.

^bPatients with no objective signs of peripheral neuropathy but with various other types of complaints (mainly subacute or chronic sensory symptoms in the upper or lower extremities, unexplained fatigue and/or pain radiating from the cervical/lumbar spinal cord to the upper/lower extremities).

^cChi-squared test or Fisher's exact test for categorical variables; Mann–Whitney test for continuous variables and scores.

^dFor the ulnar nerve, conduction velocity across the elbow was employed.

TABLE 4 Clinical status and nerve conduction studies at 1st examination and types of abnormality at 2nd examination: comparison of the healthy controls and patients with clinical symptoms in the peroneal and tibial nerves

Characteristics ^a	Peroneal nerves (N = 212)			Tibial nerves (N = 224)		
	Healthy controls (N = 75)	Patients with clinical symptoms ^b (N = 137)	p ^c	Healthy controls (N = 75)	Patients with clinical symptoms ^b (N = 149)	p ^c
Interval between 1st and 2nd exam. (months)	20.0 (12.0; 60.0)	20.0 (12.0; 60.0)	.76	20.0 (12.0; 60.0)	23.0 (12.0; 60.0)	.60
Clinical status at 1 st examination: decreased Achilles tendon reflex	23 (30.7%)	48 (35.0%)	.52	23 (30.7%)	49 (32.9%)	.74
Nerves with A-waves (initial examination)	6 (8.0%)	15 (10.9%)	.49	21 (28.0%)	49 (32.9%)	.46
Abnormality at 2nd examination	5 (6.7%)	10 (7.3%)	.86	5 (6.7%)	14 (9.4%)	.49
CMAP at 1st examination (mV)	5.4 (2.2;15.7)	5.1 (2.1;11.6)	.45	14.3 (3.3;25.1)	13.7 (4.5;25.1)	.22
CMAP at 1st examination (Z-score)	-0.2 (-1.6;1.9)	-0.3 (-2.0;1.9)	.50	1.0 (-1.7;3.6)	0.7 (-1.5;3.9)	.31
MCV at 1st examination (m/s)	47.9 (40.7;69.0)	46.9 (40.3;60.4)	.24	52.1 (40.7;71.2)	50.0 (40.4;70.4)	.13
F-M latency at 1st examination (Z-score)	-0.3 (-2.4;1.7)	-0.2 (-2.8;1.9)	.49	0.2 (-2.5;1.9)	0.3 (-2.4;2.0)	.67
Types of abnormality at 2nd examination						
Normal	70 (93.3%)	127 (92.7%)	.999	70 (93.3%)	135 (90.6%)	.615
ALS	1 (1.3%)	1 (0.7%)		1 (1.3%)	1 (0.7%)	
PNP	3 (4.0%)	6 (4.4%)	.999	3 (4.0%)	9 (6.0%)	.787
Radiculopathy L5	1 (1.3%)	3 (2.2%)		0 (0.0%)	0 (0.0%)	
Radiculopathy S1	0 (0.0%)	0 (0.0%)		1 (1.3%)	4 (2.7%)	

ALS, amyotrophic lateral sclerosis; CMAP, compound muscle action potential; CTS, carpal tunnel syndrome; MCV, motor conduction velocity; PNP, polyneuropathy.

^aAbsolute and relative frequencies for categorical variables and median and min–max range for continuous variables.

^bPatients with no objective signs of peripheral neuropathy but with various other types of complaints (mainly subacute or chronic sensory symptoms in the upper or lower extremities, unexplained fatigue and/or pain radiating from the cervical/lumbar spinal cord to the upper/lower extremities).

^cChi-squared test or Fisher's exact test for categorical variables; Mann–Whitney test for continuous variables and scores.

abnormal findings at the follow-up examination were polyneuropathy (with the same criteria as had been mentioned above), followed by L5 or S1 radiculopathy (confirmed by subacute or chronic axonal changes of motor unit potentials in appropriate muscles in needle EMG). In addition, one patient without initial A-waves had amyotrophic lateral sclerosis at follow-up (Table 1 and 2) (documented by the generalized subacute pure motor axonopathy with fasciculations in needle EMG).

In general, new abnormalities were most frequently associated with the median nerve (possibly due to the high prevalence of CTS), followed by both nerves in the lower limbs. In the peroneal and ulnar nerves, a significantly higher number of new abnormalities were observed at follow-up in nerves with A-waves at the initial examination. In the tibial nerve, this difference was close to significant, whereas the difference in the median nerve was not significant (Table 1 and 2).

At the group level, a comparison of the NCS parameters at the initial examination did not show any significant difference between the nerves with and without A-waves with the only exception of tibial nerve, which showed mild but significant decrease of CMAP amplitudes in the nerves with A-waves at the initial examination ($p = .031$) when being expressed in mV, but was insignificant when expressed as a Z-score, i.e., a number of standard deviations below (negative)/above (positive) the mean. Furthermore, at the individual level, the Z-score

values showed that the CMAP amplitudes were within the normal range in all the nerves (data not shown). Differences in initial MCVs and F-wave latencies between nerves with and without A-waves were not significant (data not shown).

The logistic regression analysis with the odds ratios ranging from 2.7 to 30.0 ($p < .05$) indicated that the presence of A-waves at the initial examination had significant predictive power for the development of abnormalities at the follow-up examination 12 or more months later in all nerves, with the exception of the median nerve ($p = .092$) (Figure 2, Table 5).

4 | DISCUSSION

The principal finding of this study is the confirmation that A-waves are an initial peripheral nerve abnormality in all motor nerves, including the tibial nerve. The occurrence of A-waves had significant predictive power for the future development of broader NCS abnormalities in part of the patients and should be considered a prognostic factor for future neuropathy, neuronopathy, or radiculopathy.

A-waves are heterogeneous and involve several pathophysiological mechanisms, e.g., an extra-axonal discharge elicited by an afferent

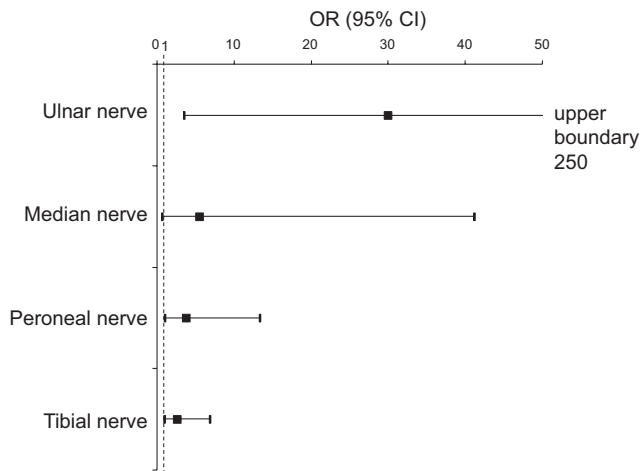


FIGURE 2 A-wave at first examination as a predictor for abnormality at later examination. Odds ratios (OR) supplemented with their 95% confidence intervals and p -values according to the logistic regression analysis showing significant predictive power of A-waves for the development of abnormality at future examination 12 or more months later, in all the nerves with the exception of median, where such a trend achieved only borderline significance ($p = .092$)

TABLE 5 A-wave at first examination as a predictor for abnormality at second examination

Nerve	OR (95% CI) ^a	p^a
Ulnar nerves	30.0 (3.6; 250.4)	.002
Median nerves	5.6 (0.8; 41.2)	.092
Peroneal nerves	3.9 (1.1; 13.4)	.034
Tibial nerves	2.7 (1.0; 6.9)	.041

ALS, amyotrophic lateral sclerosis; CMAP, compound muscle action potential; CTS, carpal tunnel syndrome; MCV, motor conduction velocity; NCS/EMG, nerve conduction studies/electromyography; PNP, polyneuropathy. ^aBased on logistic regression.

Bold values are statistically significant.

action potential, hyperexcitability of proximal nerve segments, ephaptic transmission from one axon to another, or myoaxonal ephapse (Bischoff, 2002; Magistris & Roth, 1992; Roth, 1993). To distinguish the pathophysiological origin of a given A-wave, special tests must be applied (e.g., the evaluation of the presence of A-waves following paired or repetitive stimuli and/or during a series of stimuli applied along the course of the nerve) that are usually not conducted in routine clinical practice (Bischoff, 2002; Kimura, 2013; Magistris & Roth, 1992; Roth, 1993). During routine electrophysiological studies, underlying pathophysiological mechanisms thus are not identified, and A-waves are considered to be a group of late responses that differ from the F-wave and H-reflex (Bischoff et al., 1996; Pukša et al., 2003). Therefore, to achieve a practical application of the results, the same approach was used in this study.

The patient group for this study consisted from two subtypes of individuals: healthy controls and the patients with no objective signs of peripheral neuropathy but with various other types of complaints (sensory symptoms, unexplained fatigue). There were several reasons for not including the healthy controls only. Mainly, we tried to find-out

the answer to the following question: if we perform the NCS/EMG examination in routine practice, which was completely normal with the only exception of A-wave findings, should we pay attention to it? Does such a finding represent a subclinical "mild neuropathic change" (as had been postulated by Pukša et al., [2003]) and thus may suggest that this particular patient has an increased "chance" to develop some clinically important abnormality in the future? This question is not related to "healthy controls" only, but the other way round, it may apply to any individual examined in NCS/EMG lab.

Similar to the results of previous studies in healthy individuals (Pukša et al., 2003), this analysis revealed that few A-waves initially occurred in the otherwise normal median and ulnar nerves. However, they were more frequently observed in the peroneal nerve, and the highest number of A-waves was detected in the tibial nerve. In this study, the frequency of A-waves in a particular nerve at the initial examination was similar to the findings reported by Pukša et al. (2003). These findings confirm that a similar methodology for A-wave evaluation was used in the two studies and that the individuals examined in both studies were considered to be of the "healthy status."

The most frequent new abnormality found in second examination was carpal tunnel syndrome. However, to our knowledge, no study has reported a relationship between A-waves and mild-to-moderate carpal tunnel syndrome; therefore, this finding may distort the results of our study because the high prevalence of CTS falsely decreases the significance and predictive power of A-waves in the median nerve.

The significantly higher frequency of the development of new abnormalities in nerves with A-waves at the initial examination supports the significance of A-waves as the initial abnormality during nerve conduction studies. Based on these results, our findings show that the occurrence of A-waves increases the future probability of developing several types of neuropathy, neuronopathy, and radiculopathy. This observation achieved statistical significance in all nerves examined, with the exception of the median nerve, for which there was only a trend towards significance, likely due to the high prevalence of CTS discussed above.

These findings were confirmed using the odds ratio and a regression analysis, which demonstrated that the presence of A-waves at the initial examination had statistically significant predictive power for the development of abnormalities in future examinations several months later in all nerves, with the exception of the median nerve (for the same reason discussed above).

Despite statistically significant power of A-waves in the prediction of future status of the examined peripheral nerve, the absolute numbers of the patients with newly found abnormalities at second examination were quite low, which represents certain limitation of this study. Further increase in the number of patients/controls or peripheral nerves tested would allow more convincing evaluation of A-waves significance. This, however, is not simply accessible in a single center study: the authors come from the biggest neuromuscular center in the Czech Republic with several thousands of patients examined every year. In such a big cohort, only few patients/controls complied with a strict inclusion/exclusion criteria. Further confirmation of the results by multicentre trial can provide more reliable results, which can represent a suggestion for future studies.

This study shows that the occurrence of A-waves as a sole electrophysiological abnormality has significant predictive power for the future development of more pronounced neuropathies/neuronopathies and, therefore, provides a clear initial abnormality in the examined peripheral nerve. Our results thus suggest that the occurrence of A-waves as a sole abnormality during the NCS/EMG examination should be reported and the re-examination after 12 or more months might be considered in relation to clinical status of the patient. Further studies confirming the results in big cohorts of patients/controls are, however, recommended.

ACKNOWLEDGMENTS

The study was supported by the grant of Czech Ministry of Health (MH CZ – DRO, FNBr, 65,269,705) and Specific University Research Grant SVMUNI/A/1072/2015 provided by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic.

CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare no potential conflict of interests.

REFERENCES

Andersen, H., Stålberg, E., & Falck, B. (1997). F-wave latency, the most sensitive nerve conduction parameter in patients with diabetes mellitus. *Muscle and Nerve*, 20(10), 1296–1302.

- Bischoff, C. (2002). Neurography: Late responses. *Muscle and Nerve*, 11, S59–S65.
- Bischoff, C., Stålberg, E., Falck, B., & Puksa, L. (1996). Significance of A-waves recorded in routine motor nerve conduction studies. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, 101, 528–533.
- Kadanka, Z., Bednarik, J., & Vohanka, S. (1994). *Practical electromyography*, 1st edn.. Brno: IDPVZ.
- Kimura, J. (2013). *Electrodiagnosis in diseases of nerve and muscle: Principles and practice*, 4th edn.. Oxford: Oxford University Press.
- Kornhuber, M. E., Bischoff, C., Mentrup, H., & Conrad, B. (1999). Multiple A waves in Guillain-Barré syndrome. *Muscle and Nerve*, 22(3), 394–399.
- Magistris, M. R., & Roth, G. (1992). Motor axon reflex and indirect double discharge: Ephaptic transmission? A reappraisal. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, 85(2), 124–130.
- Puksa, L., Stålberg, E., & Falck, B. (2003). Occurrence of A-waves in F-wave studies of healthy nerves. *Muscle and Nerve*, 28, 626–629.
- Roth, G. (1993). Myo-axonal ephaptic responses and their F waves in case of chronic denervation. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, 89(4), 252–260.
- Rowin, J., & Meriggioli, M. N. (2000). Electrodiagnostic significance of supramaximally stimulated A-waves. *Muscle and Nerve*, 23, 1117–1120.

How to cite this article: Srotova I, Vlckova E, Dusek L, Bednarik J. A-waves increase the risk of developing neuropathy. *Brain Behav.* 2017;7:e00760. <https://doi.org/10.1002/brb3.760>

28. Raputová J, Vlčková E, Kočica J, Skutil T, Rajdová A, Kec D, Bednařík J. Evokované potenciály vyvolané kontaktním teplem – vliv fyziologických proměnných. *Cesk Počet citací v SCI: 2. Slov Neurol N 2018: submitováno. IF = 0,508.*

Tato originální práce je v českém jazykovém prostředí první publikací, zaměřenou na metodiku evokovaných potenciálů vyvolaných kontaktním teplem (CHEPs) jako další z nových diagnostických metod, reflektujících funkci tenkých nervových vláken (A-delta) a nociceptivních drah a tedy využitelnou podobně jako další nociceptivní evokované potenciály v diagnostice neuropatické bolesti.

Pro účely studie byly CHEPs vyšetřeny v souboru zdravých dobrovolníků a skupině pacientů s diabetickou polyneuropatií se smíšeným postižením silných a tenkých nervových vláken. Studie ověřila možnost využití publikovaných normativních dat (Lagerburg et al. 2015, Jutzeler et al. 2016, Granovsky et al. 2016) v české populaci, poskytla podklady pro volbu optimálního algoritmu vyšetření a verifikovala technickou správnost používané metodiky. Ve skupině pacientů s diabetickou polyneuropatií byly nálezy CHEPs na skupinové úrovni signifikantně odlišné od nálezů v souboru zdravých dobrovolníků (s horší výbavností, nižšími amplitudami a prolongací latence), což potvrzuje využitelnost metodiky v diagnostice diabetické polyneuropatie. Na individuální úrovni se však CHEPs v uvedené indikaci jeví jako poměrně málo senzitivní test.

Původní práce

EVOKOVANÉ POTENCIÁLY VYVOLANÉ KONTAKTNÍM TEPEM – VLIV
FYZIOLOGICKÝCH PROMĚNNÝCH

CONTACT HEAT EVOKED POTENTIALS – IMPACT OF PHYSIOLOGICAL
VARIABLES

RAPUTOVÁ J^{1,2}, VLČKOVÁ E^{1,2}, KOČICA J^{1,2}, SKUTIL T¹, RAJDOVÁ A^{1,2}, KEC
D^{1,2}, BEDNAŘÍK J^{1,2}

1 Neurologická klinika Lékařské fakulty Masarykovy univerzity a Fakultní nemocnice
Brno

2 CEITEC - Středoevropský technologický institut, Brno

Korespondence: MUDr. Eva Vlčková, Ph.D.

Neurologická klinika LF MU a FN Brno

Jihlavská 20

62500 Brno

email: evlckova@email.cz, vlckova.eva@fnbrno.cz

Práce byla podpořena z prostředků MZ ČR – RVO (FNBr, 65269705) a projektem specifického výzkumu č. MUNI/A/1072/2017 z programu podpory studentských projektů na Masarykově univerzitě.

Autoři práce děkují svým spolupracovníkům, příbuzným, známým a pacientům, kteří se této studii zúčastnili jako vyšetřovaní dobrovolníci. Autoři rovněž děkují Dr. Catherine Jutzelerové, prof. Dr. Arminu Curtovi a jejich týmu ze Spinal Cord Injury Center, Balgrist University Hospital, Zurich, Switzerland, za zaškolení v metodice vyšetření CHEPs a MUDr. Soni Kincové za pomoc při zahájení tohoto projektu.

SOUHRN: Evokované potenciály vyvolané kontaktním teplem (CHEPs) představují novou metodiku testování funkce tenkých nervových vláken a spinothalamických drah. Cílem práce bylo ověření platnosti publikovaných normativních dat a vlivu parametrů testování a fyziologických proměnných na parametry CHEPs.

Soubor a metodika: Testování CHEPs bylo provedeno na dorzu ruky a distálně na bérce pomocí základního a/nebo intenzivního teplotního algoritmu v souborech 97 zdravých dobrovolníků (53 žen, věk 20–82 let) a 37 pacientů s diabetickou distální symetrickou senzomotorickou polyneuropatií (DSPN) (14 žen, věk 29–77 let).

Výsledky: Naprostá většina hodnot amplitud i latencí v souboru zdravých kontrol odpovídala normálním rozmezím hodnot těchto parametrů v publikovaných souborech zdravých dobrovolníků. Latence odpovědi byly významně ovlivněny použitým teplotním algoritmem a testovanou lokalizací ($p < 0,001$) a byly signifikantně kratší u žen ($p < 0,05$). Amplitudy CHEPs byly u žen naopak vyšší ($p < 0,05$). Pokles amplitud byl patrný u jedinců vyššího věku ($p < 0,05$). Pacienti s DSPN vykazovali delší latence ($p < 0,05$) a nižší amplitudy ($p < 0,05$) oproti kontrolnímu souboru.

Závěry: Publikovaná normativní data CHEPS jsou využitelná pro českou populaci. Při interpretaci výsledků je nutné zohlednit fyziologické proměnné a parametry testování. Na skupinové úrovni je vyšetření využitelné k pomocné diagnostice postižení tenkých nervových vláken v rámci DSPN.

ABSTRACT: Contact heat evoked potentials (CHEPs) represent a neurophysiological method of functional testing of small nerve fibers and the spinothalamic tracts. The study aimed to confirm the validity of published normal values for this method in the Czech population and to evaluate the influence of physiological and test-related variables on the CHEPs response. **Methods:** Two groups were included in the study: a healthy control group (97 healthy volunteers; 53 women; age range 20–82 years) and a group of patients with diabetic distal sensorimotor polyneuropathy (DSPN group, 37 patients; 14 women; age range 29–77 years). In all the participants, CHEPs were examined in the dorsum of the hand and above the ankle using two different algorithms. **Results:** The CHEPs testing was mostly well-tolerated. The vast majority of the latencies and amplitudes of the CHEPs responses obtained in the healthy control group fell within the reference range according to the published normal values. Women had significantly higher amplitudes and shorter latencies ($p < 0.05$). Older volunteers had significantly lower amplitudes ($p < 0.05$) than the younger ones (while the impact of age on the latency of the response was not significant). Test-related variables showed also a highly significant impact on CHEPs values: the latencies were shorter in hands (comparing to the calf) and whenever the intensive temperature algorithm was used ($p < 0.001$ in both cases). The DSPN group had longer latencies ($p < 0.05$) in comparison with age-matched healthy volunteers and lower amplitudes in basic temperature algorithm used ($p < 0.05$). **Conclusion:** The study confirmed validity of published normal values for Czech population. For precise evaluation of the results, physiological (gender, age) and test-related parameters (tested area, temperature algorithm) should be taken into account. On a group level, CHEPs proved to be a useful tool for small-nerve fiber dysfunction assessment in diabetic neuropathy.

Klíčová slova: somatosenzitivní evokované potenciály; neuropatie tenkých vláken; spinothalamická dráha; neuropatická bolest; normativní data

Key words: somatosensory evoked potentials; small fiber neuropathy; spinothalamic tracts; neuropathic pain; reference values

ÚVOD

Evokované potenciály vyvolané kontaktním teplem (contact heat evoked potentials, CHEPs) patří k relativně novým diagnostickým metodám objektivizace funkce termoalgických drah v periferním (PNS) a centrálním úseku nervového systému (CNS). Anatomickým korelátém (termo)algické percepce jsou tenká senzitivní nervová vlákna v průběhu PNS a spinoalamokortikální dráha v CNS. CHEPs tak z anatomického hlediska představují určitý protipól běžných somatosenzitivních evokovaných potenciálů, odrážejících funkci silných nervových vláken a spino-bulbo-talamických drah. Podle provedených studií CHEPs korelují s bolestí [1,2]. Jsou proto využívány především v diagnostice a výzkumu neuropatické bolesti periferní či centrální etiologie [1,3], například u neuropatie tenkých vláken, kde amplitudy CHEPs korelují s hodnotami intraepidermální hustoty tenkých nervových vláken z kožní biopsie [4].

Rozvíjí se i využití CHEPs v diagnostice dysfunkce spinoalamických traktů či navazujících periferních struktur (u kompresivních radikulopatií, plexopatií, diabetické polyneuropatie apod.) [5-11]. Zatím však jde pouze o doplňkovou elektrofyziologickou metodu.

Metoda vyžaduje speciální stimulátor (termosonda), generující z výchozí (base-line) teploty (35 - 42°C) intenzivní teplé podněty (50 - 52°C) při velmi rychlém navýšení teploty stimulátoru (70°C/s) [8,10,11]. Teplotní podnět je obvykle vnímán jako poněkud nepříjemný a bývá popisován jako píchnutí, nikoli jako vjem tepelný. Většinou však jde jen o mírně nepříjemný pocit s bezproblémovou tolerancí vyšetření. Po každém podnětu je nutné lehce změnit stimulovanou oblast. Vyšetřující se proto sondou pohybuje v rozsahu několika centimetrů čtverečních. Současně je nezbytné zachovat dostatečný, a pokud možno nepravidelný časový odstup mezi jednotlivými podněty. Tento časový odstup slouží k prevenci habituace odpovědi, tedy snížení velikosti odpovědi při opakované stimulaci [12]. Testovat lze prakticky jakoukoli oblast: publikována byla normativní data pro volární stranu předloktí [2,13], dorzum ruky a oblast ramene [11], distální bérce [2,13,14], oblast dolní krční a horní bederní páteře a tvář [2]. Na končetinách je možné testovat i jednotlivé dermatomy odděleně [7,11,14].

Výsledná odpověď je snímána nad oblastí primárního senzitivního kortexu a skládá se z časné, nekonstantně výbavné komponenty N1 a následného dominujícího komplexu negativní vlny N2 a pozitivní vlny P2. Podkladem vlny N1 je současná aktivace mechanoreceptorů s nízkým prahem (nereflektuje tedy funkci tenkých vláken a spinoalamických traktů). Komplex negativní vlny N2 a pozitivní vlny P2 (tzv. pozdní vertexové odpovědi) představuje vlastní testovanou odpověď na aktivaci A δ tenkých nervových vláken (obr. 1, 2) [9]. Hodnocena je výbavnost odpovědi, jejich latence a velikost amplitudy N2/P2 [2,9,11,12]. Pro spolehlivé vyhodnocení záznamu je vhodné získat odpovědi z 15 – 20 podnětů. Další navyšování počtu podnětů nevede ke zlepšení výbavnosti ani technické kvality odpovědi. Výsledný záznam vzniká zprůměrněním odpovědi na tyto podněty (všech nebo vybraného konstantního počtu nejlepších odpovědi).

Cílem práce bylo zavedení metodiky testování CHEPs do klinické praxe v České republice a ověření platnosti normativních dat pro českou populaci. Dalším cílem bylo zhodnocení vlivu fyziologických proměnných a technických parametrů stimulace na výsledky vyšetření a výběr optimálního teplotního algoritmu testování. Pokusili jsme se také zhodnotit možnost využití CHEPs v diagnostice postižení tenkých nervových vláken u diabetické polyneuropatie.

SOUBOR A METODIKA

Projekt byl schválen institucionální etickou komisí. CHEPs byly vyšetřeny u 97 zdravých dobrovolníků (53 žen, věkové rozmezí 20 – 82 let, medián 27 let) z řad zaměstnanců nemocnice, studentů medicíny, jejich rodinných příslušníků a přátel. Abychom ověřili diagnostickou výtěžnost CHEPs jako metody testující funkci termoalgičkových drah, vyšetřili jsme také skupinu 37 pacientů (14 žen, věkové rozmezí 29 – 77 let, medián 55 let) s diabetes mellitus 1. či 2. typu a s diabetickou periferní neuropatií splňující kritéria potvrzené distální symetrické polyneuropatie (confirmed distal symmetrical polyneuropathy, DSPN) dle Tesfayeho [15]. Diabetická polyneuropatie byla pro potřeby ověření diagnostického přínosu metodiky zvolena jako obecně nejčastější příčina neuropatie tenkých vláken, a tedy také nejčastější klinická jednotka, u níž je v praxi funkce těchto nervových vláken hodnocena. U všech těchto pacientů bylo proto provedeno vyšetření kvantitativního testování senzitivity (QST/TTT), které prokázalo abnormální termické prahy svědčící pro postižení tenkých nervových vláken. Abnormita termického čítí v rámci QST/TTT byla spíše lehčího stupně a byla u všech pacientů prokazatelná na DKK (u méně než 30 % pacientů i na HKK). Přítomnost/nepřítomnost neuropatické bolesti nebyla zohledněna jako kritérium pro zařazení do DSPN souboru.

Pro potřeby srovnávacích analýz se skupinou DSPN pacientů byla následně z celé skupiny zdravých dobrovolníků vybrána podskupina 37 jedinců odpovídajícího věku a pohlaví (18 žen, věkové rozmezí 29 – 82 let, medián 48 let).

Vylučujícími kritérii pro zařazení do souboru zdravých kontrol byla:

- (1) známá polyneuropatie horních (HKK) a/nebo dolních (DKK) končetin;
- (2) jiný známý typ postižení periferního (radikulopatie, plexopatie) nebo centrálního (myelopatie apod.) nervového systému;
- (3) klinický nález či anamnestické obtíže, svědčící pro některou z uvedených neurologických diagnóz;
- (4) anamnestický údaj o rizikových faktorech polyneuropatie (např. diabetes mellitus, porucha glukózové tolerance, chronický abúzus alkoholu, tyreopatie, stav po prodělané protinádorové chemoterapii)
- (5) výrazná alterace kognitivních funkcí či jiné faktory limitující spolupráci a soustředění.

Metodika vyšetření byla exaktně převzata ze Spinal Cord Injury Center, University Hospital Balgrist, University of Zurich, Zurich, Švýcarsko. Tato klinika je jedním z klíčových pracovišť v oblasti výzkumu CHEPs s rozsáhlou zkušeností s využitím metody pro účely experimentální i klinické diagnostiky [11,14,16]. Dva členové vyšetřujícího týmu (EV a JB) zde absolvovali několikadenní zácvik.

Vyšetření CHEPs bylo provedeno pomocí stimulátoru PATHWAY Sensory Analyzer System (Medoc, RamatYishai, Israel) a termosondy s aktivní plochou kruhového tvaru o průměru 27 mm. Ke snímání byl využit elektromyografický přístroj Keypoint typ 4 (Dantec, Skovlunde, Denmark). Poloha termosondy se po každém podnětu v rámci testované oblasti lehce měnila ve snaze minimalizovat habituaci stimulovaných receptorů. Změna polohy termosondy byla vždy provedena v rozsahu, v němž nedocházelo k významným změnám vzdálenosti mezi místem stimulace a oblastí snímání. Stimulace byla provedena na HKK v distální části dermatomu C6 a/nebo C8 (na radiální a ulnární straně dorza ruky) a DKK v distální části dermatomu L4 a/nebo

L5 (přibližně 10 cm nad vnitřním/zevním kotníkem). V souboru zdravých kontrol bylo vyšetření u 6 jedinců provedeno pouze na DKK a u 42 jedinců pouze na HKK. Většina zdravých kontrol měla tedy testování provedeno v obou hodnocených lokalizacích (tedy na HKK i DKK) (tab. 1). Všichni pacienti s diabetem mellitem byli naopak vyšetřeni na DKK, více než 2/3 z nich pak současně i na HKK (tab. 1). Iničiálně jsme vyšetřili podskupinu 30 zdravých jedinců oboustranně. Vzhledem ke statisticky nevýznamnému rozdílu výsledků mezi oběma stranami byly u dalších dobrovolníků CHEPs v jednotlivých dermatomech vyšetřeny pouze jednostranně. Pro celkové vyhodnocení byl u jedinců s oboustranným vyšetřením použit průměr obou stran, u jedinců s jednostranným vyšetřením pak pouze vyšetřená strana. Vyšetření bylo provedeno s použitím dvou teplotních algoritmů:

- (1) při základním teplotním algoritmu stoupala teplota z výchozích 35 °C na cílovou teplotu 50 °C;
- (2) při intenzivním teplotním algoritmu byla výchozí teplota 42 °C a stoupala na 52 °C.

Interstimulační interval kolísal v obou algoritmech v rozmezí 8 - 12 sekund.

Kortikální odpověď byla snímána pomocí standardních Ag/AgCl povrchových miskových elektrod o průměru 9 mm, vyplněných vodící pastou Ten20 (D.O.Weaver and Company, Colorado, USA). Elektrody byly umístěny na vertexu nad parietálním kortexem (při využití mezinárodního systému 10-20 v oblasti Cz) s referencí pomocí spojených ušních lalůček (tedy A1-A2). Oblasti umístění elektrod na skalpu a ušních lalůčkách byly předem skarifikovány abrazivní pastou Nuprep (D.O.Weaver and Company, Colorado, USA). Během vyšetření bylo aplikováno 15, v případě horší výbavnosti či výskytu artefaktů maximálně 20 podnětů. Během testování byli vyšetřovaní jedinci v poloze vleže (k dosažení maximální svalové relaxace) a při otevřených očích trvale fixovali konkrétní bod na stropě laboratoře. Tento postup byl zvolen jako prevence vzniku artefaktů vyvolaných pohybem očí a kontaminace alfa-aktivitou během snímání. Vyšetřovaní jedinci byli poučeni, aby se pokusili maximálně se soustředit na vyvolaný vjem. Po každém podnětu měli za úkol určit intenzitu vyvolané bolesti. Hodnocení intenzity bylo provedeno pomocí numerické škály bolesti (numeric rating scale, NRS) v rozsahu 0 - 10 („0“ odpovídá „žádné vnímané bolesti“ a „10“ znamená „nejhorší představitelnou bolest“). Hodnocená křivka byla získána zprůměrněním 10 nejlepších vyvolaných odpovědí. V rámci ověření vlivu fyziologických a technických proměnných byl v souboru zdravých dobrovolníků zhodnocen vliv věku (skupina < 40 let a ≥ 40 let věku), výšky (u žen < 170 cm a ≥ 170 cm, u mužů < 180 cm a ≥ 180 cm) a pohlaví vyšetřovaných jedinců na jednotlivé parametry odpovědí (výbavnost, latence, amplituda). Odpověď byla hodnocena jako dobře výbavná v případě, že amplituda komplexu N2/P2 na zprůměrněném záznamu překročila hranici 10 μV. Odpovědi nižších amplitud jsou obtížně odlišitelné od artefaktů a pro zajištění dostatečné spolehlivosti hodnocených odpovědí byly klasifikovány jako nevýbavné.

Za účelem verifikace využití CHEPs v diagnostice diabetické polyneuropatie pak bylo provedeno srovnání výbavnosti a hodnot latencí a amplitud mezi pacienty s DSPN a zdravými kontrolami.

Ke statistickému zpracování byl použit program IBM SPSS Statistics Version 25. Vzhledem k normální distribuci hodnot byla ke zviditelnění jejich rozložení použita popisná statistika (průměr, směrodatná odchylka) a hodnocené parametry byly

statisticky srovnány parametrickými testy (Studentův t-test). Pro srovnání kategoriálních dat byl použit chí-kvadrát test.

VÝSLEDKY

Vyšetření CHEPs bylo většinou jedinců zařazených do studie dobře tolerováno. U několika pacientů však bylo nutné test předčasně ukončit. Důvodem pro toto ukončení testu byla intolerance používaných teplotních podnětů, které byly pacienty vnímané jako velmi bolestivé. Jednalo se celkem o:

- tři pacienty s DSPN (tj. 8,1 % z celého souboru DSPN pacientů, 2 ženy, 1 muž). Všichni tři pacienti netolerovali stimulaci při použití intenzivního algoritmu na HKK ani DKK. Jeden z nich netoleroval na HKK ani DKK ani algoritmus základní. Zbylí dva tolerovali základní algoritmus na DKK, jeden z nich i na HKK.
- pět zdravých jedinců (tj. 5,2 % z celého souboru zdravých kontrol, 3 ženy, 2 muži). Všichni tito pacienti netolerovali vyšetření pomocí intenzivnějšího algoritmu, zatímco při použití základního algoritmu netoleroval vyšetření na HKK pouze jeden pacient a na DKK 3 pacienti.

Nálezy u těchto jedinců nebyly zahrnuty do celkového hodnocení výbavnosti ani amplitud a latencí. Několik jedinců absolvovalo pouze vyšetření v základním teplotním algoritmu a nechtělo podstoupit vyšetření v intenzivním teplotním algoritmu z důvodu obav z vyšší bolestivosti stimulace. U těchto jedinců bylo proto provedeno jen vyšetření v algoritmu základním (tab. 1).

U většiny zdravých dobrovolníků byla odpověď spolehlivě výbavná a reprodukovatelná, a to zejména na HKK a poněkud lépe při použití intenzivního teplotního algoritmu (tab. 1). Všichni vyšetření dobrovolníci i pacienti s DSPN, kteří měli odpověď výbavnou při základním algoritmu, měli přitom CHEPs spolehlivě vybavitelné i při algoritmu intenzivním. V tomto intenzivním teplotním algoritmu však bylo možné vybavit reprodukovatelné CHEPs odpovědi i u malé části jedinců, u nichž odpověď v základním algoritmu výbavná nebyla. Někteří pacienti s nevýbavnou odpovědí na DKK neměli CHEPs výbavné ani na HKK. Část pacientů s nevýbavnou odpovědí na DKK však měla odpověď na HKK výbavnou. Pokud byla odpověď výbavná na DKK, bylo ji u všech pacientů i zdravých kontrol možné vybavit i na HKK.

Ve skupině pacientů s DSPN byla na HKK výbavnost CHEPs odpovědi podobná jako v souboru zdravých kontrol. Na DKK byla výbavnost u diabetiků velmi významně nižší, a to především při použití základního teplotního algoritmu. Při použití intenzivnějšího teplotního algoritmu nebyly naopak rozdíly ve výbavnosti statisticky významné (tab. 1).

Bolest vyvolaná použitou stimulací byla podobná při základním i intenzivním teplotním algoritmu a nelišila se ani mezi DSPN pacienty a zdravými dobrovolníky. Průměrná NRS byla v základním teplotním algoritmu $4,5 \pm 2,4$ v kontrolní skupině a $4,2 \pm 1,7$ u DSPN pacientů, v intenzivním teplotním algoritmu $4,5 \pm 2,2$ u zdravých kontrol a $4,5 \pm 2,0$ u DSPN pacientů ($p > 0,05$). Intenzita bolesti vyvolané stimulací přitom neměla významný vliv na výslednou amplitudu CHEPs odpovědi ani na její výbavnost ($p = 0,5$ až $0,7$ pro korelaci hodnot NRS s amplitudou odpovědi v jednotlivých teplotních algoritmech, data podrobně neuvedena). Naopak záznamy dobrovolníků udávajících vyšetření jako velmi nepříjemné obsahovaly jednoznačně více artefaktů a byly obtížněji hodnotitelné.

Při srovnání nálezů hodnocených parametrů z pravé a levé strany za použití příslušného teplotního algoritmu v daném dermatomu nebyl prokázán statisticky významný rozdíl (data detailně neuvedena).

Téměř 95 % odpovědí CHEPs v našem souboru zdravých dobrovolníků vykazovalo latence N2 a P2 vln odpovídající publikovaným normativním datům [2,11,13]. Amplitudy odpovědí se obvykle pohybovaly v rozmezí 20 - 40 μ V. I zde byla naprostá většina hodnot v rozmezí publikovaných normativních dat (tab. 2).

Latence odpovědí byly na DKK signifikantně delší než na HKK, rozdíly amplitud mezi testovanými oblastmi HKK a DKK nebyly statisticky významné (tab. 2). Při srovnání jednotlivých dermatomů na dané končetině (tedy C6 vs. C8 a L4 vs. L5) nebyl patrný signifikantní rozdíl latencí ani amplitud odpovědí (tab. 2). Statisticky významný rozdíl byl prokázán pouze v latencích odpovědí v dermatomu C6 a C8 při použití intenzivního teplotního algoritmu. Reálné rozdíly se však pohybovaly kolem 10 až 20 ms, což je klinicky nevýznamné (tab. 2).

Ve většině hodnocených dermatomů (a použitých teplotních algoritmů) vykazovaly ženy vyšší amplitudy ($p = <0,001$ až $0,01$, data detailněji neuvedena) a kratší latence odpovědí ($p = <0,001$ až $0,02$, data detailněji neuvedena). Výbavnost odpovědí se mezi oběma pohlavími významně nelišila ($p = 0,80$, data podrobně neuvedena). Při rozdělení zdravých kontrol na mladší (< 40 let) a starší (≥ 40 let) jedince nebyl ve většině případů patrný signifikantní vliv věku na hodnoty latencí. S věkem však docházelo k poklesu amplitudy N2/P2 (tab. 4, k dispozici jako „online only“). Naproti tomu vliv výšky na hodnoty latencí ani amplitud nebyl statisticky významný (tab. 5, k dispozici jako „online only“). Nejvýznamnějším faktorem ovlivňujícím latenci je volba teplotního algoritmu: při použití intenzivního teplotního algoritmu byly latence vysoce významně kratší (tab. 2). Rozdíl amplitud N2/P2 mezi oběma typy teplotních algoritmů však nebyl prokázán (tab. 2).

Pacienti s DSPN vykazovali oproti zdravým kontrolám signifikantně delší latence a nižší amplitudy CHEPs při použití základního teplotního algoritmu (tab. 3). Při použití intenzivního teplotního algoritmu byla ve skupině DSPN zachycena pouze signifikantní prolongace latencí, zatímco amplitudy se významně nelišily od zdravých kontrol (tab. 3). Hodnoty amplitud i latencí CHEPs odpovědí v základním teplotním algoritmu vykazovaly ve skupině pacientů s DSPN významně vyšší podíl abnormit podle publikovaných normativních dat [2,11,13] oproti skupině zdravých kontrol (tab. 2,3).

DISKUZE

Provedená studie poskytuje informace o prvních klinických zkušenostech s evokovanými potenciály vyvolanými kontaktním teplem v České republice. CHEPs představují vůbec první v naší republice dostupnou elektrofyziologickou diagnostickou metodu odrážející funkci tenkých nervových vláken a/nebo spinotalamických traktů a využitelnou v diagnostice neuropatické bolesti. Naše studie potvrdila dobrou technickou proveditelnost a uspokojivou toleranci vyšetření CHEPs a použitelnost publikovaných normativních dat pro českou populaci. Ověřila také vliv některých fyziologických proměnných (věk, pohlaví) a technických parametrů stimulace (volba teplotního algoritmu, testovaná lokalizace) na parametry evokované odpovědi, což je nezbytné zohlednit při interpretaci nálezů.

Interpretace nálezů nociceptivních potenciálů včetně CHEPs je poněkud komplikována faktem, že chybění spolehlivě reprodukovatelné CHEPs odpovědi se vyskytuje i u malé části zdravých jedinců. V naší práci nebyla odpověď při použití základního teplotního algoritmu spolehlivě vybavena na HKK u 6,7 % a na DKK u 13,5 % zdravých kontrol.

Podobně Lagerburg et al popisují nevýbavnost odpovědí při použití základního teplotního algoritmu u 9 % pacientů při vyšetření HKK i DKK [13] a Jutzeler et al u 5 % jedinců kontrolního normativního souboru při vyšetření HKK [11]. Výbavnost odpovědí se zvyšuje při použití intenzivního teplotního algoritmu: v našem souboru zdravých kontrol nebyla při použití tohoto teplotního algoritmu odpověď vybavena u 4,8 % zdravých kontrol na HKK a až u 10 % na DKK. Lagerburg dokonce udává nevýbavnost odpovědí při intenzivnější stimulaci pouze u 2 % zdravých jedinců vyšetřeného souboru [13]. Pravděpodobným podkladem rozdílů ve výbavnosti je skutečnost, že jsme v naší studii hodnotili jako výbavné až potenciály s amplitudou nad 10 μ V, a to z důvodu velmi nízké spolehlivosti hodnocení potenciálů nižších amplitud. Tento přístup není využíván autory ostatních publikovaných normativních dat. Zejména Lagerburg a Granovsky [2,13] hodnotí i amplitudy v řádu jednotek μ V, které jsou však podle našich zkušeností prakticky neodlišitelné od artefaktů. Hodnocení odpovědí s velmi nízkou amplitudou jako nevýbavných dle našeho názoru zvyšuje validitu CHEPs nálezů.

Na druhou stranu představuje nevýbavnost odpovědí u malé části zdravých jedinců určitou limitaci vyšetření a je nutné ji zohlednit při interpretaci nálezů. Obecně lze říct, že výbavná odpověď svědčí proti významnější dysfunkci testovaných struktur PNS a/nebo CNS. Nevýbavnost odpovědí zejména při použití základního algoritmu testování sice není úplně vzácná ani u zdravých jedinců, je však vysoce významně častější u pacientů s pravděpodobnou dysfunkcí tenkých nervových vláken, a představuje tedy zřejmě určitou abnormitu, a to pravděpodobně i v případě, že je odpověď následně vybavena v rámci intenzivnějšího stimulačního protokolu. Pro zpřesnění jejího významu bude však nutné doplnění širších studií, optimálně zahrnujících korelaci s dalšími testy reflektujícími funkční a/nebo morfologický stav tenkých nervových vláken (jako jsou kvantitativní testování senzitivity, kožní biopsie a korneální konfokální mikroskopie).

Navýšení bazální i stimulační teploty při intenzivním teplotním algoritmu je navíc současně podkladem horší tolerance vyšetření. V našem souboru bylo vyšetření pomocí intenzivnějšího intenzivního teplotního algoritmu na HKK nutné předčasně ukončit u 5 % zdravých kontrol, zatímco základní teplotní algoritmus zde byl s jedinou výjimkou vyšetřitelný u všech testovaných jedinců. Podobně Jutzeler et al popisují intoleranci vyšší teplotní stimulace u 4 % jedinců vyšetřovaného kontrolního souboru [11].

Všichni pacienti i zdravé kontroly s výbavnou odpovědí při základním teplotním algoritmu, měli odpovědi výbavné i při intenzivním teplotním algoritmu.

Při zohlednění výše zmíněných skutečností se s ohledem na lepší toleranci vyšetření jeví vhodné zahájit testování CHEPs s použitím základního teplotního algoritmu. Jeho nález lze při normální výbavnosti a fyziologických parametrech odpovědí považovat za dostatečný průkaz normální funkce testované nociceptivní dráhy. Pokud není odpověď uspokojivě vybavena při použití základního teplotního algoritmu, je v identické lokalizaci vhodné následně provést testování pomocí intenzivního teplotního algoritmu (pokud bude pacient tuto stimulaci tolerovat). Nevýbavnost odpovědí při použití intenzivního teplotního algoritmu se na HKK vyskytuje nejvýše u 4 % zdravé populace, a lze ji tedy s vysokou pravděpodobností interpretovat jako známku abnormity. Složitější je interpretace tohoto nálezu na DKK, jak již bylo diskutováno výše.

Kromě vlastní výbavnosti odpovědí je při hodnocení CHEPs vhodné zohledňovat latence a amplitudy odpovědí. Sama nevýbavnost odpovědí nemusí být dostatečně senzitivním markerem prokazujícím abnormitu. V našem souboru pacientů s DSPN nebyla odpověď při použití základního teplotního algoritmu výbavná na HKK u 8,7 % a na DKK u 44,4 % jedinců, což odpovídá poměrně senzitivitě vyšetření v případě

zohlednění výbavnosti odpovědi jako jediného hodnoceného parametru. Recentně bylo publikováno několik sérií normativních dat pro hodnocení amplitud a latencí v různých testovaných lokalizacích [2,11,13]. Tato data vykazují navzájem určité odlišnosti, související m.j. s rozdíly v použitých teplotních algoritmech a pravděpodobně i v testovaných populacích. Naše výsledky na HKK jsou velmi blízké publikovaným normám, protože využívají podobný či prakticky identický algoritmus vyšetření [2,11,13]. Naprostá většina hodnot latencí a amplitud v našem souboru spadá do rozmezí zmíněných publikovaných normativních dat, což verifikuje jejich platnost pro českou populaci a také zpětně potvrzuje správnost testování CHEPs v rámci provedené studie. Pacienti s DSPN vykazovali v našem souboru při skupinovém srovnání s věkově odpovídajícími zdravými kontrolami signifikantní prodloužení latencí (bez ohledu na testovaný algoritmus) a snížení amplitud odpovědi (zejména při základním teplotním algoritmu, protože při intenzivním teplotním algoritmu nebyly tyto rozdíly statisticky významné). Tyto nálezy potvrzují význam hodnocení latencí a amplitud jako přídatných markerů potenciální dysfunkce nociceptivních drah. Poměrně nízký počet zachycených abnormit těchto parametrů na individuální úrovni však poukazuje na nízkou senzitivitu metodiky v diagnostice diabetické polyneuropatie s lehčím postižením tenkých nervových vláken.

Hodnocené parametry odpovědi jsou významně ovlivněny testovanou oblastí a/nebo použitým teplotním algoritmem. Naše nálezy prokázaly delší latence odpovědi na DKK oproti HKK. Naopak rozdíly amplitud mezi testovanými oblastmi nebyly statisticky významné, což je zcela ve shodě s výsledky dalších publikovaných prací [2,13].

Také absence významných rozdílů mezi testovanými dermatomy odpovídá dříve publikovaným studiím [11] a potvrzuje možnost použití jednotných normativních dat pro více dermatomů v příslušné lokalizaci.

Nezpochybnitelný je naopak vliv testovaného teplotního algoritmu na parametry odpovědi. Při použití intenzivního teplotního algoritmu byly v naší studii latence N2 i P2 vln signifikantně kratší. Tento nálezy lze očekávat s ohledem na menší trvání podnětu u intenzivního teplotního algoritmu při menším rozdílu základní a vrcholové teploty. Naše nálezy zde opět potvrzují výsledky dříve publikovaných studií [11]. Komplikovanější je pak vliv použitého teplotního algoritmu na amplitudy odpovědi. Jutzeler et al prokázali vyšší amplitudy při použití intenzivního teplotního algoritmu [11], naše nálezy v podobně velkém souboru prokazují pouze statisticky nevýznamný trend v tomto smyslu. Určité navýšení amplitudy evokované odpovědi CHEPs při použití intenzivního teplotního algoritmu je tedy pravděpodobné, tento vliv je ale zřejmě méně významný, než vliv zvoleného teplotního algoritmu na výbavnost odpovědi a její latenci.

Při interpretaci nálezů CHEPs je nutné zohledňovat také fyziologické proměnné. Nejvýznamnější je pravděpodobně vliv věku: naše studie prokázala pokles amplitud CHEPs s věkem, což je plně v souladu s nálezy dalších publikovaných studií [2,13]. Poněkud složitější je vliv věku na hodnoty latencí: někteří autoři zmiňují určitý nárůst hodnot latencí s věkem, jedná se však pouze o velmi mírné změny [2,13], což je patrné i z grafické či numerické prezentace hodnot latencí v závislosti na věku v těchto souborech. V našem souboru jsme neprokázali významné rozdíly latencí mezi pacienty do a nad 40 let věku. Vliv věku na hodnoty latencí se tak jeví daleko méně významný v porovnání s věkově podmíněným poklesem amplitud.

Amplitudy CHEPs jsou také jednoznačně závislé na pohlaví vyšetřovaných jedinců. Ženy mají obecně vyšší amplitudy N2/P2 komplexu [2,11,13], což je plně ve shodě s výsledky naší studie.

Vliv pohlaví na latence CHEPs je ve většině studií spojován s vlivem výšky. Výsledky různých publikovaných studií jsou však v tomto smyslu poměrně nejednoznačné. V publikacích, které při interpretaci nálezů nezohledňují výšku pacienta, [2] je obvykle prokazována významná prolongace latencí CHEPs u mužů v porovnání se ženami. Při nezávislém hodnocení vlivu pohlaví a výšky jsou nálezy publikovaných studií daleko méně jednoznačné: Lagerburg et al prokázali po eliminaci vlivu výšky absenci vlivu pohlaví na latence odpovědí [13]. Naopak Jutzeler et al prokázali i po vyloučení výškových rozdílů trvající delší latence odpovědí u mužů (zejména při použití intenzivního teplotního algoritmu) [11]. Naše nálezy prokázaly kratší latence N2 i P2 u žen. Při srovnání nálezů mezi pacienty s vyšší a nižší výškou (hodnoceno izolovaně u mužů a žen) nebyly zachyceny statisticky významné rozdíly, což potvrzuje spíše vliv pohlaví jako nezávislého parametru ovlivňujícího latence CHEPs.

Při výběru testované oblasti je vhodné zohlednit také předpokládanou distribuci postižení, protože pravděpodobnost záchytu abnormity CHEPs je vyšší v klinicky postižené oblasti než v oblasti klinicky nepostižené. Také tuto skutečnost potvrzují naše nálezy, prokazující v testovaném souboru pacientů s DSPN vyšší počet abnormálních odpovědí CHEPs na DKK. Na dolních končetinách byla u těchto pacientů současně významně častěji prokazována abnormita termického čítí jako známka dysfunkce tenkých nervových vláken. Na HKK, kde bylo termické čítí u většiny vyšetřovaných pacientů ještě v mezích normy, byl záchyt abnormit daleko méně častý. Tyto nálezy jsou tedy zcela v souladu s předchozími publikovanými pracemi, které prokazují na skupinové úrovni signifikantně vyšší diskriminační schopnost CHEPs v odlišení zdravých kontrol a pacientů s neuropatií tenkých vláken při vyšetření DKK oproti HKK [13]. Na individuální úrovni je však i při zohlednění abnormit kteréhokoli z hodnocených parametrů (výbavnost, amplituda, latence) kumulativní senzitivita CHEPs v diagnostice lehké diabetické polyneuropatie poměrně nízká.

Podobně jako Granovsky et al potvrdila i naše studie stranovou symetrii parametrů odpovědí [2]. U zdravých kontrol a pacientů se symetrickými klinickými obtížemi je tak dostačující jednostranné provedení vyšetření v příslušné lokalizaci. Naopak při jednostranném postižení je kontralaterální oblast využitelná jako „kontrolní“ lokalizace pro potřeby srovnání s nepostiženou oblastí.

ZÁVĚR

CHEPs představují relativně novou diagnostickou metodou, umožňující neurofyziologické testování funkce tenkých nervových vláken a spinotalamických drah a využitelnou v diagnostice neuropatické bolesti. Metodu lze tedy využít pro hodnocení periferních neuropatií s předpokládaným postižením tenkých nervových vláken [12], včetně polyneuropatie diabetické etiologie, jak prokázala tato studie. Využitelná je také v diagnostice lézí spinothalamických traktů v jejich centrálním úseku např. v rámci myelopatií při degenerativní spondylóze nebo po míšních traumatech [7,11,16].

Metoda je časově nenáročná a ve většině případů dobře tolerovaná. Nevýhodou je potřeba speciálního přístrojového vybavení, které je však méně náročné než u jiných modalit nociceptivních evokovaných potenciálů. U zdravých jedinců a pacientů s předpokládaným symetrickým postižením je postačující jednostranné testování, optimálně v klinicky postižené distribuci. V jeho průběhu je vhodné iniciálně využít základní teplotní algoritmus testování, v případě nevýbavné odpovědi pak zvážit intenzivní teplotní algoritmus. Určitým limitem vyšetření je nevýbavnost odpovědí u malé části zdravých jedinců, a to zejména na DKK. Tuto skutečnost je nutné zohlednit při interpretaci nálezů. Výbavná odpověď tedy svědčí proti významnější dysfunkci testovaných struktur PNS a CNS. Interpretace nevýbavnosti odpovědí na DKK je však

méně jednoznačná a bude vyžadovat další zpřesnění v navazujících studiích. Kromě vlastní výbavnosti odpovědi patří k hodnoceným parametrům i amplitudy a latence, které mohou být ovlivněny řadou fyziologických proměnných (věk, pohlaví, ev. výška) a parametrů testování (testovaná oblast, použitý teplotní algoritmus). Tyto parametry je proto nutné zohlednit při interpretaci nálezů. Pro potřeby české populace je možné využít publikovaná normativní data.

POUŽITÉ ZKRATKY

CHEPs - evokované potenciály vyvolané kontaktním teplem (contact heat evoked potentials)

CNS – centrální nervový systém

ČR – Česká republika

DKK - dolní končetiny

DM – diabetes mellitus

DSPN – distální symetrická polyneuropatie (distal symmetrical polyneuropathy)

HKK – horní končetiny

NRS - numerická škála bolesti (numeric rating scale)

PNS – periferní nervový systém

QST/TTT – testování termického prahu jako jedna z metod kvantitativního testování senzitivity (quantitative sensory testing/thermal threshold testing)

SD – směrodatná odchylka (standard deviation)

LEGENDA K OBRAZOVÝM PŘÍLOHÁM

Obrázek 1: Dobře výbavná odpověď CHEPs u zdravé kontroly s latencí v mezích normy a vysokou amplitudou (dermatom C6 vpravo, 35 - 50°C).

Image 1: Very nice CHEPs response in a healthy volunteer with physiological latency and high amplitude of the response (dermatome C6 on the right side, 35 - 50°C)

Obrázek 2: Špatně výbavná CHEPs odpověď u pacienta s DSPN s nízkou amplitudou a latencí nad horní hranicí normy (dermatom C6 vpravo, 35 - 50°C)

Image 2: Abnormal CHEPs response in a DSPN patient with low amplitude of the response (and latency above normal limit) (dermatome C6 on the right side, 35 - 50°C)

LITERATURA

1. Haanpää M, Attal N, Backonja M, et al. NeuPSIG guidelines on neuropathic pain assessment. *Pain* 2011;152(1):14-27. doi: 10.1016/j.pain.2010.07.031.
2. Granovsky Y, Anand P, Nakae A, et al. Normative data for A δ contact heat evoked potentials in adult population: a multicenter study. *Pain* 2016;157(5):1156-63. doi: 10.1097/j.pain.0000000000000495.
3. Cruccu G, Sommer C, Anand P, et al. EFNS guidelines on neuropathic pain assessment: revised 2009. *Eur J Neurol* 2010;17:1010-1018.
4. Atherton DD, Facer P, Roberts KM, et al. Use of the novel Contact Heat Evoked Potential Stimulator (CHEPS) for the assessment of small fibre neuropathy: correlations with skin flare responses and intra-epidermal nerve fibre counts. *BMC Neurol* 2007;7:21.
5. Chao CC, Hsieh SC, Tseng MT, et al. Patterns of contact heat evoked potentials (CHEP) in neuropathy with skin denervation: correlation of CHEP amplitude with intraepidermal nerve fiber density. *Clin Neurophysiol* 2008;119(3):653-61. doi: 10.1016/j.clinph.2007.11.043.
6. Wong MC, Chung JW. Feasibility of contact heat evoked potentials for detection of diabetic neuropathy. *Muscle Nerve* 2011;44(6):902-6. doi: 10.1002/mus.22192.
7. Ulrich A, Haefeli J, Blum J, et al. Improved diagnosis of spinal cord disorders with contact heat evoked potentials. *Neurology* 2013;80(15):1393-1399. doi: 10.1212/WNL.0b013e31828c2ed1.
8. Kramer JL, Haefeli J, Curt A et al. Increased baseline temperature improves the acquisition of contact heat evoked potentials after spinal cord injury. *Clin Neurophysiol* 2012;123(3):582-9. doi: 10.1016/j.clinph.2011.08.013.
9. Chen AC, Niddam DM, Arendt-Nielsen L. Contact heat evoked potentials as a valid means to study nociceptive pathways in human subjects. *Neurosci Lett* 2001;316:79-82.
10. Wydenkeller S, Wirz R, Halder P. Spinothalamic tract conduction velocity estimated using contact heat evoked potentials: what needs to be considered. *Clin Neurophysiol* 2008;119(4):812-21. doi: 10.1016/j.clinph.2007.12.007.
11. Jutzeler CR, Rosner J, Rinert J, et al. Normative data for the segmental acquisition of contact heat evoked potentials in cervical dermatomes. *Sci Rep* 2016;6:34660. doi: 10.1038/srep34660.
12. Baumgärtner U, Greffrath W, Treede RD. Contact heat and cold, mechanical, electrical and chemical stimuli to elicit small fiber-evoked potentials: merits and limitations for basic science and clinical use. *Neurophysiol Clin* 2012;42(5):267-80. doi: 10.1016/j.neucli.2012.06.002.
13. Lagerburg V, Bakkens M, Bouwhuis A, et al. Contact heat evoked potentials: normal values and use in small-fiber neuropathy. *Muscle Nerve* 2015;51(5):743-9. doi: 10.1002/mus.24465.
14. Rosner J, Hubli M, Hostettler P, et al. Contact heat evoked potentials: Reliable acquisition from lower extremities. *Clin Neurophysiol* 2018;129(3):584-591. doi: 10.1016/j.clinph.2017.12.034.
15. Tesfaye S, Boulton AJM, Dyck PJ, et al. Diabetic neuropathies: update on definitions, diagnostic criteria, estimation of severity, and treatments. *Diabetes Care* 2010;33(10):2285-93. doi: 10.2337/dc10-1303.
16. Jutzeler CR, Ulrich A, Huber B, et al. Improved Diagnosis of Cervical Spondylotic Myelopathy with Contact Heat Evoked Potentials. *J Neurotrauma* 2017;34(12):2045-2053. doi: 10.1089/neu.2016.4891.

Tabulka 1: Celkový počet jedinců s provedeným CHEPs vyšetřením, počet jedinců s hodnotitelným nálezem (po vynechání osob netolerujících vyšetření) a počet jedinců, u nichž nebyla vybavena reprodukovatelná odpověď, a to odděleně v souborech zdravých kontrol a pacientů s DSPN a v obou vyšetřených lokalizacích s použitím různých algoritmů testování.

	Vyšetření zdraví dobrovolníci	Zdraví dobrovolníci tolerující vyšetření	Zdraví dobrovolníci s nevybavnou odpovědí*		Vyšetření pacienti s DSPN	Pacienti s DSPN tolerující vyšetření	Pacienti s DSPN s nevybavnou odpovědí*		p**
			N	%			N	%	
HKK ZA	91	90	6	6,66	25	23	2	8,70	NS
HKK IA	88	83	4	4,82	25	22	2	9,09	NS
DKK ZA	55	52	7	13,46	37	36	16	44,44	0,001
DKK IA	55	50	5	10,00	33	30	4	13,33	NS

*Výpočet výbavnosti CHEPs odpovědi je proveden z počtu jedinců tolerujících vyšetření.

**Srovnání výbavnosti CHEPs odpovědi mezi zdravými kontrolami a pacienty s DSPN provedený pomocí chí2 testu

ZA – základní teplotní algoritmus

IA – intenzivní teplotní algoritmus

ZA + IA – počet jedinců s vyšetřením provedeným v základním i intenzivním teplotním algoritmu na HKK či DKK

N – počet vyšetřených jedinců

NS – non significant (statisticky nevýznamný rozdíl).

Tabulka 2: Srovnání nálezů hodnocených parametrů CHEPs v jednotlivých dermatomech na HKK (C6 a 8) a DKK (L4 a 5) v celém souboru zdravých dobrovolníků a počet abnormálních nálezů v souboru zdravých dobrovolníků s použitím publikovaných normativních dat.

	Základní teplotní algoritmus (35 - 50°C)		Procento abnormit*		Intenzivní teplotní algoritmus (42 - 52°C)		Procento abnormit*		p ¹	
	Latence N2 [ms]	Amplituda N2/P2 [μV]	Latence N2 [ms]	Amplituda N2/P2 [μV]	Latence N2 [ms]	Amplituda N2/P2 [μV]	Latence N2 [ms]	Amplituda N2/P2 [μV]	Latence N2 [ms]	Amplituda N2/P2 [μV]
C6	377 ± 39	34,0 ± 13,9	5,0; 1,0; 0	3,6; 0,7; 0	291 ± 27	36,2 ± 13,9	7,0; n.a.; n.a.	11,0; n.a.; n.a.	< 0,001	0,22
C8	387 ± 32	30,7 ± 13,8	0; 0; 0	1,6; 1,6; 0	310 ± 34	30,7 ± 13,8	13,0; n.a.; n.a.	15,0; n.a.; n.a.	< 0,001	0,66
p ²	0,07	0,12	—	—	< 0,001	0,06	—	—	—	
L4	415 ± 42	27,5 ± 11,8	n.a.; n.a.; n.a.	n.a.; n.a.; n.a.	363 ± 49	27,7 ± 11,9	n.a.; n.a.; n.a.	n.a.; n.a.; n.a.	< 0,001	0,83
L5	430 ± 54	32,2 ± 13,2	15,0; 2,0; 0	1,6; 0; 0	376 ± 66	29,4 ± 13,3	15,0; n.a.; n.a.	n.a.; n.a.; n.a.	< 0,001	0,38
p ³	0,22	0,13	—		0,37	0,57	—		—	
p ⁴	< 0,001	0,23	—		< 0,001	0,06	—		—	

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD

*Podíl abnormálních hodnot (tedy hodnot nad horní hranici referenčního rozmezí pro latence a pod dolní hranici referenčního rozmezí pro amplitudy dle publikovaných normativních dat – Jutzeler 2016; Lagerburg 2015; Granovsky 2016)

p¹ – statistická významnost rozdílu hodnocených CHEPs parametrů mezi nálezy základního (35 - 50°C) a intenzivního (42 - 52°C) teplotního algoritmu v příslušném dermatomu (vyjádřeno Studentovým t-testem)

p² – statistická významnost rozdílu hodnocených CHEPs parametrů mezi dermatomy C6 a 8 vyšetřeními na HKK (vyjádřeno Studentovým t-testem)

p³ - statistická významnost rozdílu hodnocených CHEPs parametrů mezi dermatomy L4 a 5 vyšetřeními na DKK (vyjádřeno Studentovým t-testem)

p⁴ - statistická významnost rozdílu hodnocených CHEPs parametrů mezi vyšetřeními HKK a DKK (vyjádřeno Studentovým t-testem)

n. a. – nelze hodnotit (not applicable), protože data pro příslušný typ algoritmu/distribuci nejsou v příslušné normativní práci k dispozici

Tabulka 3: Srovnání nálezů jednotlivých parametrů CHEPs mezi pacienty s DSPN a vybraným podsouborem zdravých kontrol odpovídajícího věku a pohlaví

	Pacienti s DSPN				Zdravé kontroly		P	
	Latence N2 [ms]		Amplituda N2/P2 [μ V]		Latence N2 [ms]	Amplituda N2/P2 [μ V]	Latence N2 [ms]	Amplituda N2/P2 [μ V]
		Procento abnormit ¹		Procento abnormit ²				
HKK: ZA	420 \pm 46	6,0; 1,2; 0	25,2 \pm 12,2	22,7; 10,5; 0	381 \pm 49	32,6 \pm 11,6	0,007	0,04
HKK: IA	341 \pm 71	20,0; n.a.; n.a.	29,3 \pm 13,7	21,0; n.a.; n.a.	301 \pm 32	34,2 \pm 16,0	< 0,001	0,91
DKK: ZA	488 \pm 62	37,5; 12,5; 0	16,8 \pm 4,6	25,0; 8,3; 0	426 \pm 51	30,9 \pm 12,9	0,01	0,04
DKK: IA	402 \pm 67	N.a.	25,0 \pm 10,3	N.a.	368 \pm 56	28,3 \pm 12,4	0,001	0,77

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD

p hodnota – statistická významnost rozdílu hodnocených CHEPs parametrů mezi souborem pacientů s DSPN a věkově odpovídající podskupinou souboru zdravých kontrol (vyjádřeno Studentovým t-testem)

¹Procentuální vyjádření počtu hodnot pacientů s DSPN s výbavnou odpovědí nad horní hranicí referenčního rozmezí pro latence dle publikovaných normativních dat - Jutzeler 2016; Lagerburg 2015; Granovsky 2016

²Procentuální vyjádření počtu hodnot pacientů s DSPN s výbavnou odpovědí pod dolní hranicí referenčního rozmezí pro amplitudy dle publikovaných normativních dat - Jutzeler 2016; Lagerburg 2015; Granovsky 2016

n. a. – nelze hodnotit (not applicable), protože data pro příslušný typ algoritmu/distribuci nejsou v příslušné normativní práci k dispozici

ZA – základní teplotní algoritmus

IA –intenzivní teplotní algoritmus

ONLINE ONLY: Tabulka 4: Vliv věku: souhrn hodnocených CHEPs parametrů na horních a dolních končetinách u odlišných věkových skupin v souboru zdravých dobrovolníků

	Ženy do 39 let		Ženy nad 40 let		p ¹		Muži do 39 let		Muži nad 40 let		p ²		p ³	
	Lat. N2 [ms]	Amp. N2/P2 [μV]	Lat. N2 [ms]	Amp. N2/P2 [μV]	Lat. N2 [ms]	Amp. N2/P2 [μV]	Lat. N2 [ms]	Amp. N2/P2 [μV]	Lat. N2 [ms]	Amp. N2/P2 [μV]	Lat. N2 [ms]	Amp. N2/P2 [μV]	Lat. N2 [ms]	Amp. N2/P2 [μV]
HKK: ZA	390 ± 37	27,4 ± 10,9	387 ± 52	28,5 ± 9,6	0,15	0,63	385 ± 33	29,9 ± 10,2	395 ± 43	19,3 ± 7,4	0,16	< 0,001	0,02	0,002
HKK: IA	291 ± 29	42,9 ± 19,6	289 ± 21	31,8 ± 8,0	0,82	0,005	305 ± 30	32,0 ± 12,2	326 ± 40	20,7 ± 9,2	0,01	< 0,001	0,08	< 0,001
DKK: ZA	417 ± 45	38,4 ± 12,9	450 ± 49	30,3 ± 13,3	0,04	0,07	432 ± 57	25,0 ± 7,8	424 ± 56	19,3 ± 5,2	0,71	0,04	0,07	0,003
DKK: IA	336 ± 53	36,9 ± 12,0	324 ± 17	30,5 ± 10,9	0,42	0,14	416 ± 43	26,5 ± 10,6	378 ± 46	20,1 ± 10,5	0,01	0,07	0,06	0,05

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD

p1– statistická významnost rozdílu hodnocených CHEPs parametrů mezi skupinami zdravých žen do 39 let a nad 40 let (vyjádřeno Studentovým t-testem)

p2 – statistická významnost rozdílu hodnocených CHEPs parametrů mezi skupinami zdravých mužů do 39 let a nad 40 let (vyjádřeno Studentovým t-testem)

p3 - statistická významnost rozdílu hodnocených CHEPs parametrů mezi skupinami zdravých dobrovolníků do 39 let a nad 40 let (vyjádřeno Studentovým t-testem)

Lat. – latence

Amp. – amplituda

ZA – základní teplotní algoritmus

IA –intenzivní teplotní algoritmus

ONLINE ONLY: Tabulka 5: Vliv výšky: souhrn hodnocených CHEPs parametrů na horních a dolních končetinách v závislosti na výšce v souboru zdravých dobrovolníků

	Ženy do 169 cm		Ženy nad 170 cm		p ¹		Muži do 179 cm		Muži nad 180 cm		p ²	
	Lat. N2 [ms]	Amp. N2/P2 [μV]	Lat. N2 [ms]	Amp. N2/P2 [μV]	Lat. N2 [ms]	Amp. N2/P2 [μV]	Lat. N2 [ms]	Amp. N2/P2 [μV]	Lat. N2 [ms]	Amp. N2/P2 [μV]	Lat. N2 [ms]	Amp. N2/P2 [μV]
HKK: ZA	372 ± 40	39,1 ± 15,2	374 ± 27	34,2 ± 11,1	0,87	0,16	393 ± 43	25,1 ± 7,8	383 ± 29	28,1 ± 12,5	0,24	0,19
HKK: IA	286 ± 30	40,0 ± 15,4	294 ± 23	39,2 ± 19,9	0,13	0,82	311 ± 28	26,7 ± 10,0	309 ± 39	31,7 ± 14,2	0,73	0,05
DKK: ZA	421 ± 51	37,8 ± 12,3	432 ± 36	33,6 ± 14,6	0,44	0,32	449 ± 35	22,7 ± 6,4	425 ± 64	22,7 ± 9,3	0,06	0,99
DKK: IA	331 ± 45	31,8 ± 11,0	329 ± 29	39,4 ± 12,6	0,84	0,11	393 ± 47	21,0 ± 13,0	405 ± 46	21,1 ± 10,8	0,44	0,97

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD.

p1 – statistická významnost rozdílu hodnocených CHEPs parametrů mezi skupinami zdravých žen o výšce do 169 cm a nad 170 cm (vyjádřeno Studentovým t-testem)

p2 – statistická významnost rozdílu hodnocených CHEPs parametrů mezi skupinami zdravých mužů o výšce do 179 cm a nad 180 cm (vyjádřeno Studentovým t-testem)

Lat. – latence

Amp. – amplituda

ZA – základní teplotní algoritmus

IA – intenzivní teplotní algoritmus

Obrázek 1. Dobře výbavné CHEPs.



Obrázek 2. Špatně výbavné CHEPs.



SOUHRN: Přínos autorky k jednotlivým diagnostickým modalitám využívaným u pacientů s neuropatickou bolestí

1. Dotazníkové nástroje

Klíčovým přínosem naší pracovní skupiny k problematice dotazníkových nástrojů v diagnostice neuropatické bolesti je validace české verze dotazníku Neuropathic Pain Symptom Inventory (*Šrotová et al. 2015b*) provedená na naší klinice v letech 2012-2014 v rámci grantového projektu IGA MZ ČR č. NT 13823-4 s názvem „Specifické charakteristiky neuropatické bolesti centrálního a periferního typu“ (řešitel Eva Vlčková). Jedná se o první dotazník zaměřený na bližší specifikaci jednotlivých symptomů neuropatické bolesti, který je k dispozici ve validované české verzi. Součástí validačního procesu byly dílčí kroky, zpracované formou studentského vědeckého projektu (*Straková Jana. Validace české verze dotazníku „Neuropathic Pain Symptom Inventory“*. **Ocenění: 2. místo interní sekce Studentské vědecké konference LF MU 2013**). V rámci validace byly vyhodnoceny i symptomové profily v souladu s aktuálním trendem zaměřeným na fenotypizaci pacientů pomocí hodnocení různých kombinací symptomů neuropatické bolesti. Práce navíc prokázala využitelnost NPSI dotazníku v odlišení pacientů s neuropatickou bolestí od jedinců s bolestí nociceptivní a to při použití cut-off hodnot, derivovaných pro tento účel prostřednictvím ROC analýzy (Receiver-Operating Characteristic Curve, ROC). Výsledky studie tak mohou sloužit jako podklad pro možné širší využití NPSI dotazníku i jako screeningového nástroje u pacientů s neuropatickou bolestí.

Validovaná verze dotazníku je následně využívána v navazujících projektech, např. v rámci mezinárodního kolaborativního projektu 7. rámcového programu Evropské unie s názvem: Non-coding RNAs in neurogenic and neuropathic pain mechanisms and their application for risk assessment, patient stratification and personalised pain medicine (ncRNAPain) (řešitel prof. Michaela Kress, MD, PhD, řešitel za MU prof. MUDr. Josef Bednařík, CSc.). Recentně byly publikovány dílčí výsledky zmíněného projektu hodnotící nálezy pacientů s bolestivou diabetickou neuropatií (*Raputová et al. 2017*). **Tato práce obdržela v r. 2018 mimořádnou cenu České neurologické společnosti.**

Problematika dotazníkových nástrojů užívaných v diagnostice diabetické neuropatie (včetně dotazníků zaměřených na hodnocení neuropatické bolesti u pacientů s touto diagnostickou jednotkou) byla detailně vyhodnocena také v rámci publikace cíleně zaměřené na validitu a

prediktivní hodnotu dotazníkových nástrojů v diagnostice diabetické neuropatie (*Buršová et al. 2012a*).

2. Testování senzitivity vč. QST

Metody počítačově asistovaného kvantitativního testování senzitivity byly v České republice zavedeny poprvé naší pracovní skupinou v období 1999 – 2000 a to zpočátku pouze se zaměřením na testování termických (a termoalgických) modalit. Zavedení metodiky bylo realizováno v rámci studentského vědeckého projektu autorky (*Moravcová E. Kvantitativní testování senzitivity: normativní data a senzitivita v detekci neuropatie tenkých vláken. Školitel doc. MUDr. Josef Bednařík, CSc. Ocenění: 2. místo v rámci interní sekce Studentské vědecké konference LF MU Brno v r. 2000 a následně 5. místo v rámci celostátního kola této konference*). Tato data byla po dalším rozšíření projektu publikována v časopise Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie (*Moravcová a Bednařík, 2003*). V navazující studii pak byla řešena i reprodukovatelnost a intraindividuální variabilita kvantitativního testování termického prahu (*Moravcova et al. 2005b*). Publikovaná normativní data byla využívána v řadě studií, zaměřených především na neuropatii tenkých vláken či senzitivní neuropatie obecně (*Vlčková-Moravcová et al. 2008a, Vlčková-Moravcová et al. 2008b, Bednařík et al. 2009, Vlčková-Moravcová a Bednařík 2009*). Dvě z těchto prací byly oceněny Českou neurologickou společností (práce *Vlčková-Moravcová et al. 2008a* obdržela **za rok 2008 Hennerovu cenu pro mladé autory do 35 let**, práce *Bednařík et al. 2009* obdržela **cenu České neurologické společnosti za vynikající originální práci roku 2009**).

Tato vlastní normativní data byla později dále rozšířena a věkově stratifikována (*Buršová et al. 2012c*) a v takto revidované verzi byla využívána v navazujících studiích (*Divišová et al. 2012, Divišová et al. 2016*).

Od roku 2010 bylo v rámci řešeného grantového projektu IGA MZ ČR č. NT 13823-4 (viz výše) rozšířeno spektrum diagnostických modalit na plný rozsah testovaný v rámci DFNS-QST protokolu. Celý protokol byl přeložen a validován v českém jazyce (*Šrotová et al. 2015a*). Detailní přehled o možnostech testování senzitivity byl publikován formou minimonografie (*Vlčková a Šrotová 2014*). Dva členové pracovní skupiny (autorka práce a její doktorandka MUDr. Iva Šrotová) absolvovaly tréninkovou stáž v QST metodách na školicím pracovišti DFNS skupiny na Ruhr-Universität Bochum (Německo) a obdržely certifikát pro provádění

těchto metod. FN Brno tedy bylo prvním a je dosud jediným certifikovaným pracovištěm v ČR, které provádí komplexní hodnocení QST modalit v plném rozsahu DFNS-QST protokolu.

Součástí procesu validace DFNS-QST protokolu (Šrotová *et al.* 2015ab) bylo i hodnocení senzitivních profilů se snahou o nalezení typických clusterů napříč spektrem klinických různých jednotek manifestujících se neuropatickou bolestí v souladu s aktuálním trendem, tedy fenotypizací pacientů na základě QST dat. Současně byla hodnocena také spolehlivost (reliabilita) QST metod a to v dílčím studentském vědeckém projektu (Straková J. *Spolehlivost (reliabilita) kvantitativního testování senzitivity. Školitel: Eva Vlčková. Ocenění: 1. místo v interní sekci Studentské vědecké konference LF MU Brno v r. 2015*).

Tento protokol je využíván v navazujících projektech včetně výše zmíněného mezinárodního kolaborativního projektu 7. rámcového programu EU. Dílčí výsledky projektu zaměřené m.j. na hodnocení senzitivních profilů u pacientů s bolestivou diabetickou neuropatií (Raputová *et al.* 2017) byly recentně publikovány (viz výše).

Další problematikou, řešenou v rámci výše zmíněného grantového projektu IGA, bylo zavedení dynamických metod kvantitativního testování senzitivity a to jak časové sumace (testované pro mechanické i termické podněty), tak i podmíněné modulace bolesti (Kincová *et al.* 2016). Také v tomto smyslu má FN Brno prioritu v rámci ČR.

3. Kožní biopsie

Metodika kožní biopsie byla v rámci ČR poprvé zavedena naší pracovní skupinou v návaznosti na krátkodobou stáž autorky práce na Neurologickém klinice Univerzitní nemocnice ve Wuerzburgu (Německo) jako jednom z klíčových evropských pracovišť, zaměřených na tuto problematiku. Na základě těchto zkušeností byla vytvořena vlastní normativní data pro tuto metodiku (Moravcová *et al.* 2005a), která byla následně využívána v rámci projektu, zaměřeného na neuropatie tenkých vláken. Nálezy byly podrobně vyhodnoceny v rámci navazující půlroční stáže autorky na stejném pracovišti (IV-IX/2015) a byly publikovány v rámci originálních prací, zaměřených na problematiku postižení tenkých vláken u pacientů s diabetickou polyneuropatií (Vlčková-Moravcová *et al.* 2008b, Scherens *et al.* 2009), bolestivou polyneuropatií různé etiologie (Vlčková-Moravcová *et al.* 2008a), bolestivou polyneuropatií ve stáří (Vlčková-Moravcová a Bednařík 2009) a na etiologické faktory neuropatie tenkých vláken (Bednařík *et al.* 2009). V rámci jedné ze jmenovaných studií bylo zavedeno také hodnocení hustoty subepidermálního plexu jako nového originálního přídatného

markeru hodnotitelného v kožních biopsiích (Vlčková-Moravcová et al. 2008a). Tato práce poskytla také hodnocení diagnostické validity vyšetření intra-a subepidermálního nervového plexu v diagnostice neuropatie tenkých vláken (izolované a/nebo kombinované s postižením vláken silných) (Vlčková-Moravcová et al. 2008a).

Dvě z těchto prací (Vlčková-Moravcová et al. 2008a a Bednařík et al. 2009) byly **oceněny cenami České neurologické společnosti** – viz výše v sekci zaměřené na QST.

Problematika kožní biopsie byla poté velmi detailně zpracována v rámci dizertační práce autorky (Vlčková 2011), která byla **oceněna Cenou rektora Masarykovy univerzity za vynikající dizertační práci (2012)**.

Soubor zdravých kontrol byl následně rozšířen a normativní data byla revidována a věkově stratifikována (Buršová et al. 2012b). Tato revidovaná normativní data byla poté využita při hodnocení nálezů kožních biopsií v rámci grantového projektu IGA MZ ČR NS 9667-4 s názvem „Bolestivá diabetická neuropatie“ (řešitel prof. MUDr. Josef Bednařík, CSc.). V rámci tohoto projektu byla prokázána diagnostická validita kožní biopsie u pacientů s polyneuropatií při časném diabetu mellitu či prediabetu (Divišová et al. 2012). Současně bylo zavedeno testování nového originálního markeru diagnostiky časně diabetické polyneuropatie reflektujícího regenerační potenciál nervových vláken - tzv. growth-associated proteinu 43 (GAP 43). Provedená studie prokázala, že snížení imunoreaktivity vůči tomuto proteinu představuje v rámci rozvoje diabetické polyneuropatie velmi časně změny, předcházející vlastní redukci IENFD (Buršová et al. 2012d). Další práce pak prokázala možnost využití kožní biopsie jako biomarkeru reflektujícího rozvoj postižení tenkých nervových vláken v rámci diabetické polyneuropatie prostřednictvím opakovaných vyšetření při longitudinálním sledování pacientů (Divišová et al. 2016).

Jiný projekt pak prokázal možnost využití metodiky kožní biopsie u pacientů s polyneuropatií kriticky nemocných. U pacientů s tímto postižením dochází již v prvních 2 týdnech jeho rozvoje k signifikantnímu poklesu hodnot IENFD, což bylo dokumentováno pomocí sériového vyšetření kožních biopsií u těchto pacientů (provedených v úvodu rozvoje kritického stavu a následně s odstupem 2 týdnů) (Škorna et al. 2015).

Poslední práce byla zaměřena na problematiku ověření specifity kožní biopsie v diagnostice SFN prostřednictvím vyšetření pacientů s podobnou klinickou symptomatikou, která je projevem jiného onemocnění, v souladu s publikovanými doporučeními EFNS. Studie

prokázala normální nálezy kožní biopsie v souboru pacientů s pozitivními senzitivními symptomy na DKK při spondylogenní cervikální myelopatii (Kovalova et al. 2016) a verifikovala tak specificitu kožní biopsie v diagnostice SFN.

4. Konfokální mikroskopie rohovky (CCM)

Metoda hodnocení korneálních tenkých nervových vláken pomocí konfokální mikroskopie rohovky byla v rámci ČR zavedena poprvé na našem pracovišti a to v r. 2014 v návaznosti na krátkodobou stáž dvou lékařek pracovní skupiny v Manchesteru (UK) u dr. Mitry Tavakoli (jako klíčovém školícím pracovišti pro tuto metodiku).

Následně byla publikována studie verifikující platnost publikovaných multicentrických normativních dat pro českou populaci a byla ověřena využitelnost hodnocení CCM parametrů v diagnostice diabetické polyneuropatie (Kovalova et al. 2017), i když pravděpodobně s nižší senzitivitou ve srovnání s jinými metodami (např. kožní biopsií). Metoda je dále využívána v navazujících projektech u pacientů s diabetickou polyneuropatií a polyneuropatií indukovanou chemoterapií, které v rámci naší pracovní skupiny aktuálně probíhají.

5. Elektromyografie (vč. kondukčních studií periferních nervů)

K problematice elektromyografie byl recentně publikován přehledný článek reflektující současný pohled na kontraindikace a komplikace vyšetření (Vlčková a Bednařík 2017). V publikované originální práci byl hodnocen prognostický význam jednoho z méně často hodnocených parametrů kondukčních studií (tzv. A-vlny) jako izolované abnormality při jinak normálním EMG vyšetření a bylo prokázáno, že tento parametr signifikantně zvyšuje prospektivní pravděpodobnost rozvoje širších elektrofyziologických abnormalit a jedná se tedy o nález reflektující iniciální periferně neurogenní dysfunkci v testované distribuci (Šrotová et al. 2017).

Obecně je EMG vyšetření souladu s doporučeními EFNS a NeuPSIG (Cruccu et al. 2004, Cruccu et al. 2010, Haanpää et al. 2011) rutinně využíváno k průkazu/vyloučení polyneuropatie silných vláken ve všech studiích, zaměřených na problematiku periferní neuropatické bolesti či neuropatie tenkých vláken (Vlčková-Moravcová et al. 2008a, Vlčková-Moravcová et al. 2008b, Bednařík et al. 2009, Vlčková-Moravcová a Bednařík 2009, Scherens et al. 2009, Divišová et al. 2012, Škorna et al. 2015, Divišová et al. 2016, Kovalová et al. 2016, Raputová et al. 2017).

6. Nociceptivní evokované potenciály

První modalitou nociceptivních evokovaných potenciálů dostupnou v České republice jsou evokované potenciály vyvolané kontaktním teplem (CHEPs), které jsou k dispozici v rámci Středoevropského technologického institutu (CEITEC). Jejich testování bylo zavedeno naší pracovní skupinou v letech 2015-2018 a to v návaznosti na krátkodobou stáž tří členů výzkumné skupiny včetně autorky práce na Centru pro poranění páteře Univerzitní nemocnice Balgrist (Spinal Cord Injury Center, Balgrist University Hospital, Zurich, Švýcarsko). Tato klinika je jedním z vedoucích pracovišť v oblasti výzkumu CHEPs a autorem jedné z výše uvedených prací zaměřených na normativní data (Jutzeler et al. 2016).

Tato metodika byla proto převzata pro potřeby našeho pracoviště. Iniciální vyšetření souboru zdravých dobrovolníků probíhalo v rámci studentského vědeckého projektu (*Kočica J. Evokované potenciály vyvolané kontaktním teplem. Školitel: Eva Vlčková. Ocenění: 1. místo v rámci interní sekce Studentské vědecké konference LF MU Brno v r. 2017*).

Po rozšíření byly nálezy CHEPs v souboru zdravých dobrovolníků a skupině pacientů s diabetickou polyneuropatií se smíšeným postižením silných a tenkých nervových vláken zhodnoceny v rámci originální práce, která byla aktuálně submitována k publikaci (*Raputová et al., submitováno*). Tato studie ověřila možnost využití publikovaných normativních dat v české populaci, poskytla podklady pro volbu optimálního algoritmu vyšetření a verifikovala technickou správnost používané metodiky (*Raputova et al., submitováno*). Ve skupině pacientů s diabetickou polyneuropatií byly nálezy CHEPs na skupinové úrovni signifikantně odlišné od nálezů v souboru zdravých dobrovolníků (s horší výbavností, nižšími amplitudami a prolongací latence). Na individuální úrovni se však CHEPs v uvedené indikaci jeví jako poměrně málo senzitivní test (*Raputova et al., submitováno*).

7. Testování autonomních funkcí

Naše pracovní skupina vytvořila věkově stratifikovaná normativní data pro hodnocení sympatické kožní odpovědi (*Vlčková et al. 2016, práce byla oceněna Cenou časopisu Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie za rok 2016 - dělené první místo*) a spektrální analýzy variability srdeční frekvence (SAHRV) (*Vlčková et al. 2010*). V obou studiích je kromě normativních dat řešena také problematika reprodukovatelnosti nálezů (jako klíčového faktoru při posuzování event. změn nálezu, daných vývojem základního onemocnění či jeho terapeutickým ovlivněním). Ve studii zaměřené na sympatickou kožní odpověď (*Vlčková et al.*

2016) je současně hodnocen i diagnostický přínos metodiky u pacientů s neuropatií tenkých vláken a polyneuropatií s kombinovaným postižením vláken tenkých a silných. Závěry této studie prokazují, že metoda je využitelná jako pomocný test v diagnostice obou typů periferně neurogenního postižení, avšak s poměrně nízkou senzitivitou. Je tedy vhodná pouze jako doplňkový test a nikoli jako jediná diagnostická metoda v dané indikaci.

Testy kardiovaskulárních a/nebo sudomotorických funkcí jsou využívány i v řadě dalších studií naší pracovní skupiny a to zejména v projektech zaměřených na periferní neuropatie (*Vlčková-Moravcová et al. 2008a, Vlčková-Moravcová et al. 2008b, Vlčková-Moravcová a Bednařík 2009, Buršová et al. 2012a, Divišová et al. 2012, Škorňa et al. 2015*). Popisované studie prokazují diagnostický přínos testů autonomních nervových funkcí u různých kohort pacientů s polyneuropatií či neuropatií tenkých vláken (diabetické či prediabetické etiologie, u pacientů v kritickém stavu a/nebo u pacientů s variabilní etiologií postižení včetně idiopatických polyneuropatií). Senzitivita testů vegetativního nervového systému však byla ve všech uvedených studiích nižší ve srovnání s dalšími metodami, reflektujícími postižení senzitivních tenkých nervových vláken (zejména s kožní biopsií).

IV. LITERATURA:

1. Apkarian AV, Bushnell MC, Treede RD, Zubieta JK. Human brain mechanisms of pain perception and regulation in health and disease. *Eur J Pain* 2005; 9: 463– 484.
2. Arendt-Nielsen L, Yarnitsky D. Experimental and Clinical Applications of Quantitative Sensory Testing Applied to Skin, Muscles and Viscera. *J Pain* 2009; 10(6): 556-572. doi: 10.1016/j.jpain.2009.02.002.
3. Attal N, Bouhassira D, Baron R. Diagnosis and assessment of neuropathic pain through questionnaires. *Lancet Neurol* 2018;17(5):456-466. doi: 10.1016/S1474-4422(18)30071-1.
4. Attal N, Cruccu G, Baron R, Haanpää M, Hansson P, Jensen TS, Nurmikko T; European Federation of Neurological Societies. EFNS guidelines on the pharmacological treatment of neuropathic pain: 2010 revision. *Eur J Neurol* 2010;17(9):1113-e88. doi: 10.1111/j.1468-1331.2010.02999.x.
5. Backonja MM, Attal N, Baron R, Bouhassira D, Drangholt M, Dyck PJ, Edwards RR, Freeman R, Gracely R, Haanpää MH, Hansson P, Hatem SM, Krumova EK, Jensen TS, Maier C, Mick G, Rice AS, Rolke R, Treede RD, Serra J, Toelle T, Tugnoli V, Walk D, Walalce MS, Ware M, Yarnitsky D, Ziegler D. Value of quantitative sensory testing in neurological and pain disorders: NeuPSIG consensus. *Pain* 2013;154(9):1807-19. doi: 10.1016/j.pain.2013.05.047.
6. Backonja MM, Krause SJ. Neuropathic pain questionnaire--short form. *Clin J Pain* 2003;19:315-316.
7. Bakkers M, Merkies IS, Lauria G, Devigili G, Penza P, Lombardi R, Hermans MC, van Nes SI, De Baets M, Faber CG. Intraepidermal nerve fiber density and its application in sarcoidosis. *Neurology* 2009;73:1142-1148.
8. Baron R, Binder A. How neuropathic is sciatica? The mixed pain concept. *Orthopade* 2004;33(5):568-575.
9. Baron R, Binder A, Wasner G. Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment. *Lancet Neurol* 2010;9: 807–19. doi: 10.1016/S1474-4422(10)70143-5.
10. Baron R, Förster M, Binder A. Subgrouping of patients with neuropathic pain according to pain-related sensory abnormalities: a first step to a stratified treatment approach. *Lancet Neurol* 2012;11(11):999-1005. doi: 10.1016/S1474-4422(12)70189-8.

11. Baron R, Maier C, Attal N, Binder A, Bouhassira D, Cruccu G, Finnerup NB, Haanpää M, Hansson P, Hüllemann P, Jensen TS, Freynhagen R, Kennedy JD, Magerl W, Mainka T, Reimer M, Rice AS, Segerdahl M, Serra J, Sindrup S, Sommer C, Tölle T, Vollert J, Treede RD. Peripheral neuropathic pain: a mechanism-related organizing principle based on sensory profiles. *Pain* 2017;158(2):261-272. doi: 10.1097/j.pain.0000000000000753.
12. Baumgärtner U, Greffrath W, Treede RD. Contact heat and cold, mechanical, electrical and chemical stimuli to elicit small fiber-evoked potentials: merits and limitations for basic science and clinical use. *Neurophysiol Clin* 2012;42(5):267-80. doi: 10.1016/j.neucli.2012.06.002.
13. Bednařík J. Senzitivní systém. In: Ambler Z, Bednařík J, Růžička E (eds). *Klinická neurologie. I. Část obecná*. Praha: Triton 2004: 167–198.
14. Bednařík J, Ambler Z, Opavský J, Keller O, Rokyta R, Mazanec R, Lejčko J, Kozák J, Suchý M, Pátá M, Kožený P. Klinický standard pro farmakoterapii neuropatické bolesti. *Cesk Slov Neurol N* 2012; 75/108(1): 93-101.
15. Bednarik J, Vlckova-Moravcova E, Bursova S, Belobradkova J, Dusek L, Sommer C. Etiology of small-fiber neuropathy. *J Peripher Nerv Syst* 2009;14:177-183. doi: 10.1111/j.1529-8027.2009.00229.x.
16. Bennett M. The LANSS Pain Scale: the Leeds assessment of neuropathic symptoms and signs. *Pain* 2001;92:147-157.
17. Bennett MI, Attal N, Backonja MM, Baron R, Bouhassira D, Freynhagen R, Scholz J, Tölle TR, Wittchen HU, Jensen TS. Using screening tools to identify neuropathic pain. *Pain* 2007;127:199-203.
18. Bennett MI, Smith BH, Torrance N, Potter J. The S-LANSS score for identifying pain of predominantly neuropathic origin: validation for use in clinical and postal research. *J Pain* 2005;6:149-158.
19. Bickel A, Butz M, Schmelz M, Handwerker HO, Neundörfer B. Density of sympathetic axons in sural nerve biopsies of neuropathy patients is related to painfulness. *Pain* 2000;84(2-3):413-9.
20. Bieri D, Reeve RA, Champion GD, Addicoat L, Ziegler JB. The Faces Pain Scale for the self-assessment of the severity of pain experienced by children: development, initial validation, and preliminary investigation for ratio scale properties. *Pain* 1990;41(2):139-50.

21. Bouhassira D, Attal N. Diagnosis and assessment of neuropathic pain: the saga of clinical tools. *Pain* 2011;152(3 Suppl):S74-83. doi: 10.1016/j.pain.2010.11.027.
22. Bouhassira D, Attal N, Alchaar H, Boureau F, Brochet B, Bruxelle J, Cunin G, Fermanian J, Ginies P, Grun-Overdyking A, Jafari-Schluep H, Lantéri-Minet M, Laurent B, Mick G, Serrie A, Valade D, Vicaut E. Comparison of pain syndromes associated with nervous or somatic lesions and development of a new neuropathic pain diagnostic questionnaire (DN4). *Pain* 2005;114:29-36.
23. Bouhassira D, Attal N, Fermanian J, Alchaar H, Gautron M, Masquelier E, Rostaing S, Lanteri-Minet M, Collin E, Grisart J, Boureau F. Development and validation of the Neuropathic Pain Symptom Inventory. *Pain* 2004;108:248-257.
24. Bouhassira D, Lantéri-Minet M, Attal N, Laurent B, Touboul C. Prevalence of chronic pain with neuropathic characteristics in the general population. *Pain* 2008; 136: 380–387.
25. Brelford KL, Uematsu S. Thermographic presentation of cutaneous sensory and vasomotor activity in the injured peripheral nerve. *J Neurosurg* 1985;62:711–5.
26. Bromm B, Treede RD. Nerve fibre discharges, cerebral potentials and sensations induced by CO2 laser stimulation. *Hum Neurobiol* 1984;3(1):33-40.
27. Buršová Š, Vlčková E, Hnojčíková M, Němec M, Dubový P, Dušek L, Jarkovský J, Bělobrádková J, Bednařík J. Validita a prediktivní hodnota skriningových testů u prediabetické a časně diabetické polyneuropatie. *Cesk Slov Neurol N* 2012a; 75/108(5):562-572.
28. Buršová Š, Vlčková E, Hnojčíková M, Němec M, Dubový P, Mičánková Adamová B, Bednařík J. Vyšetření hustoty intraepidermálních nervových vláken z kožní biopsie – normativní data. *Cesk Slov Neurol N* 2012b; 75/108(4):455-459.
29. Buršová Š, Vlčková E, Hnojčíková M, Němec M, Mičánková Adamová B, Bednařík J. Přístrojově asistované kvantitativní testování senzitivity - normativní data. *Cesk Slov Neurol N* 2012c; 75/108(4):444-453.
30. Bursova S, Dubovy P, Vlckova-Moravcova E, Nemecek M, Klusakova I, Belobradkova J, Bednarik J. Expression of growth-associated protein 43 in the skin nerve fibers of patients with type 2 diabetes mellitus. *J Neurol Sci* 2012d;315(1-2):60-63. doi: 10.1016/j.jns.2011.11.038.
31. Campbell JN, Meyer RA. Mechanisms of neuropathic pain. *Neuron* 2006;52:77–92.

32. Casanova-Molla J, Grau-Junyent JM, Morales M, Valls-Solé J. On the relationship between nociceptive evoked potentials and intraepidermal nerve fiber density in painful sensory polyneuropathies. *Pain* 2011;152(2):410-8. doi: 10.1016/j.pain.2010.11.012.
33. Chao CC, Tseng MT, Lin YJ, Yang WS, Hsieh SC, Lin YH, Chiu MJ, Chang YC, Hsieh ST. Pathophysiology of neuropathic pain in type 2 diabetes: skin denervation and contact heat-evoked potentials. *Diabetes Care* 2010;33(12):2654-9. doi: 10.2337/dc10-1135.
34. Chen X, Graham J, Dabbah MA, et al. Small nerve fiber quantification in the diagnosis of diabetic sensorimotor polyneuropathy: comparing corneal confocal microscopy with intraepidermal nerve fiber density. *Diabetes Care* 2015;38(6):1138–44. doi: 10.2337/dc14-2422
35. Colloca L, Ludman T, Bouhassira D, Baron R, Dickenson AH, Yarnitsky D, Freeman R, Truini A, Attal N, Finnerup NB, Eccleston C, Kalso E, Bennett DL, Dworkin RH, Raja SN. Neuropathic pain. *Nat Rev Dis Primers* 2017;3:17002. doi: 10.1038/nrdp.2017.2.
36. Cragg JJ, Warner FM, Shupler MS, Jutzeler CR, Cashman N, Whitehurst DGT, Kramer JK. Prevalence of chronic pain among individuals with neurological conditions. *Health Rep* 2018;29(3):11-16.
37. Cruccu G, Aminoff MJ, Curio G, Guerit JM, Kakigi R, Mauguiere F, Rossini PM, Treede RD, Garcia-Larrea L. Recommendations for the clinical use of somatosensory-evoked potentials. *Clin Neurophysiol* 2008a;119(8):1705-19. doi: 10.1016/j.clinph.2008.03.016.
38. Cruccu G, Anand P, Attal N, Garcia-Larrea L, Haanpää M, Jørum E, Serra J, Jensen TS. EFNS guidelines on neuropathic pain assessment. *Eur J Neurol* 2004;11(3):153-62.
39. Cruccu G, Gronseth G, Alksne J, Argoff C, Brainin M, Burchiel K, Nurmikko T, Zakrzewska JM; American Academy of Neurology Society; European Federation of Neurological Society. AAN-EFNS guidelines on trigeminal neuralgia management. *Eur J Neurol* 2008b;15(10):1013-28. doi: 10.1111/j.1468-1331.2008.02185.x.
40. Cruccu G, Ongerboer de Visser BW. The jaw reflexes. *The International Federation of Clinical Neurophysiology. Electroencephalogr Clin Neurophysiol Suppl* 1999;52:243-7.
41. Cruccu G, Sommer C, Anand P, Attal N, Baron R, Garcia-Larrea L, Haanpää M, Jensen TS, Serra J, Treede RD. EFNS guidelines on neuropathic pain assessment: revised 2009. *Eur J Neurol* 2010;17:1010-1018. doi: 10.1111/j.1468-1331.2010.02999.x.

42. Dalla Bella E, Lombardi R, Porretta-Serapiglia C, Ciano C, Gellera C, Pensato V, Cazzato D, Lauria G. Amyotrophic lateral sclerosis causes small fiber pathology. *Eur J Neurol*. 2016 Feb;23(2):416-20. doi: 10.1111/ene.12936.
43. de Moraes Vieira EB, Garcia JB, da Silva AA, Mualem Araújo RL, Jansen RC. Prevalence, characteristics, and factors associated with chronic pain with and without neuropathic characteristics in São Luís, Brazil. *J Pain Symptom Manage* 2012;44(2):239-51. doi: 10.1016/j.jpainsymman.2011.08.014.
44. Demant DT, Lund K, Vollert J, Maier C, Segerdahl M, Finnerup NB, Jensen TS, Sindrup SH. The effect of oxcarbazepine in peripheral neuropathic pain depends on pain phenotype: a randomised, double-blind, placebo controlled phenotype-stratified study. *Pain* 2014;155:2263–73. doi: 10.1016/j.pain.2014.08.014.
45. Divisova S, Vlckova-Moravcova E, Hnojčíkova M, Skorna M, Nemeč M, Dubovy P, Dusek L, Jarkovsky J, Belobradkova J, Bednarik J. Prediabetes/early diabetes-associated neuropathy predominantly involves sensory small fibres. *J Peripher Nerv Syst* 2012;17:341-350. doi: 10.1111/j.1529-8027.2012.00420.x.
46. Divisova S, Vlckova E, Srotova I, Kincova S, Skorna M, Dusek L, Dubovy P, Bednarik J. Intraepidermal nerve-fibre density as a biomarker of the course of neuropathy in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med* 2016; 33(5): 650-654. doi: 10.1111/dme.12890.
47. Donadio V, Nolano M, Provitera V, Stancanelli A, Lullo F, Liguori R, Santoro L. Skin sympathetic adrenergic innervation: an immunofluorescence confocal study. *Ann Neurol* 2006;59(2):376-81.
48. Doppler K, Ebert S, Uçeyler N, Trenkwalder C, Ebentheuer J, Volkmann J, Sommer C. Cutaneous neuropathy in Parkinson's disease: a window into brain pathology. *Acta Neuropathol* 2014;128(1):99-109. doi: 10.1007/s00401-014-1284-0.
49. Dworkin RH, O'Connor AB, Backonja M, Farrar JT, Finnerup NB, Jensen TS, Kalso EA, Loeser JD, Miaskowski C, Nurmikko TJ, Portenoy RK, Rice AS, Stacey BR, Treede RD, Turk DC, Wallace MS. Pharmacologic management of neuropathic pain: evidence-based recommendations. *Pain* 2007;132(3):237-51.
50. Dworkin RH, Turk DC, Farrar JT, Haythornthwaite JA, Jensen MP, Katz NP, Kerns RD, Stucki G, Allen RR, Bellamy N, Carr DB, Chandler J, Cowan P, Dionne R, Galer BS, Hertz S, Jadad AR, Kramer LD, Manning DC, Martin S, McCormick CG, McDermott MP, McGrath P, Quessy S, Rappaport BA, Robbins W, Robinson JP, Rothman M, Royal MA, Simon L, Stauffer JW, Stein W, Tollett J, Wernicke J, Witter

- J; IMMPACT. Core outcome measures for chronic pain clinical trials: IMMPACT recommendations. *Pain* 2005;113(1-2):9-19.
51. Dworkin RH, Turk DC, Revicki DA, Harding G, Coyne KS, Peirce-Sandner S, Bhagwat D, Everton D, Burke LB, Cowan P, Farrar JT, Hertz S, Max MB, Rappaport BA, Melzack R. Development and initial validation of an expanded and revised version of the Short-form McGill Pain Questionnaire (SF-MPQ-2). *Pain* 2009;144(1-2):35-42. doi: 10.1016/j.pain.2009.02.007.
52. Dyck PJ, Albers JW, Andersen H, Arezzo JC, Biessels GJ, Bril V, Feldman EL, Litchy WJ, O'Brien PC, Russell JW, on behalf of The Toronto Expert Panel on Diabetic Neuropathy. Diabetic polyneuropathies: update on research definition, diagnostic criteria and estimation of severity. *Diabetes Metab Res Rev* 2011;27:620–628.
53. Dyck PJ, Zimmerman I, Gillen DA, Johnson D, Karnes JL, O'Brien PC. Cool, warm, and heat-pain detection thresholds: testing methods and inferences about anatomic distribution of receptors. *Neurology* 1993;43(8):1500-8.
54. Eckberg DL, Wallin BK, Fagius J, Lundberg L, Torebjork HE. Prospective study of symptoms after human microneurography. *Acta Physiol Scand* 1989; 137: 567–569.
55. Eisenberg E, Midbari A, Haddad M, Pud D. Predicting the analgesic effect to oxycodone by 'static' and 'dynamic' quantitative sensory testing in healthy subjects. *Pain* 2010; 151: 104-109. doi: 10.1016/j.pain.2010.06.025.
56. European Medicines Association, Committee for Medicinal Products for Human Use. Guideline on the clinical development of medicinal products for the treatment of pain'. 2011.(Publication no. EMA/CHMP/970057/2011). http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2015/12/WC500199242.pdf.
57. Ewing DJ, Clarke BF. Autonomic neuropathy: its diagnosis and prognosis. *Clin Endocrinol Metab* 1986;15:855-888.
58. Feldman EL, Stevens MJ, Thomas PK, Brown MB, Canal N, Greene DA. A practical two-step quantitative clinical and electrophysiological assessment for the diagnosis and staging of diabetic neuropathy. *Diabetes Care* 1994; 17(11): 1281–1289.
59. Ferrari G, Gemignani F, Macaluso C. Chemotherapy-associated peripheral sensory neuropathy assessed using in vivo corneal confocal microscopy. *Arch Neurol* 2010;67(3):364– 5. doi: 10.1001/ archneurol.2010.17.
60. Fields HL, Rowbotham M, Baron R. Postherpetic neuralgia: irritable nociceptors and deafferentation. *Neurobiol Dis* 1998;5:209–27.

61. Finnerup NB, Attal N, Haroutounian S, McNicol E, Baron R, Dworkin RH, Gilron I, Haanpää M, Hansson P, Jensen TS, Kamerman PR, Lund K, Moore A, Raja SN, Rice AS, Rowbotham M, Sena E, Siddall P, Smith BH, Wallace M. Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol* 2015;14(2):162-73. doi: 10.1016/S1474-4422(14)70251-0.
62. Finnerup NB, Haroutounian S, Kamerman P, Baron R, Bennett DL, Bouhassira D, Cruccu G, Freeman R, Hansson P, Nurmikko T, Raja SN, Rice AS, Serra J, Smith BH, Treede RD, Jensen TS. Neuropathic pain: an updated grading system for research and clinical practice. *Pain* 2016;157(8):1599-606. doi: 10.1097/j.pain.0000000000000492.
63. Frank AJ, Moll JM, Hort JF. A comparison of three ways of measuring pain. *Rheumatol Rehabil* 1982;21(4):211-7.
64. Freynhagen R, Baron R, Gockel U, Tölle TR. painDETECT: a new screening questionnaire to identify neuropathic components in patients with back pain. *Curr Med Res Opin* 2006; 22:1911-1920.
65. Galer BS, Jensen MP. Development and preliminary validation of a pain measure specific to neuropathic pain: the Neuropathic Pain Scale. *Neurology* 1997;48:332-338.
66. Geber C, Magerl W, Fondel R, Fechir M, Rolke R, Vogt T, Treede RD, Birklein F. Numbness in clinical and experimental pain—a cross-sectional study exploring the mechanisms of reduced tactile function. *Pain* 2008;139:73–81.
67. Gibbons CH, Griffin JW, Polydefkis M, Bonyhay I, Brown A, Hauer PE, McArthur JC. The utility of skin biopsy for prediction of progression in suspected small fiber neuropathy. *Neurology* 2006;66:256-258.
68. González-Darder JM, Segura-Pastor D. Skin perfusion changes in experimental neuropathic pain: sciatic nerve constriction. *Neurol Res* 1994;16(3):187-90.
69. Gorson KC, Ropper AH. Idiopathic distal small fiber neuropathy. *Acta Neurol Scand* 1995;92:376-82.
70. Granovsky Y, Anand P, Nakae A, Nascimento O, Smith B, Sprecher E, Valls-Solé J. Normative data for A δ contact heat evoked potentials in adult population: a multicenter study. *Pain* 2016;157(5):1156-63. doi: 10.1097/j.pain.0000000000000495.
71. Graven-Nielsen T, Wodehouse T, Langford RM, Arendt-Nielsen L, Kidd BL. Normalization of widespread hyperesthesia and facilitated spatial summation of deep-tissue pain in knee osteoarthritis patients after knee replacement. *Arthritis Rheum* 2012;64:2907–16. doi: 10.1002/art.34466.

72. Haanpää M, Attal N, Backonja M, Baron R, Bennett M, Bouhassira D, Cruccu G, Hansson P, Haythornthwaite JA, Iannetti GD, Jensen TS, Kauppila T, Nurmikko TJ, Rice AS, Rowbotham M, Serra J, Sommer C, Smith BH, Treede RD. NeuPSIG guidelines on neuropathic pain assessment. *Pain* 2011;152(1):14-27. doi: 10.1016/j.pain.2010.07.031.
73. Haga R, Sugimoto K, Nishijima H, Miki Y, Suzuki C, Wakabayashi K, Baba M, Yagihashi S, Tomiyama M. Clinical Utility of Skin Biopsy in Differentiating between Parkinson's Disease and Multiple System Atrophy. *Parkinsons Dis* 2015;2015:167038. doi: 10.1155/2015/167038.
74. Hagarth KE, Vallbo AB. Single unit recordings from muscle nerves in human subjects. *Acta Physiol Scand* 1969;76:321-34.
75. Harifi G, Amine M, Ait Ouazar M, Boujemaoui A, Ouilki I, Rekkab I, Belkhou A, El Bouchti I, Niamane R, El Hassani S. Prevalence of chronic pain with neuropathic characteristics in the Moroccan general population: a national survey. *Pain Med* 2013;14(2):287-92. doi: 10.1111/pme.12009.
76. Herrmann DN, O'Connor AB, Schwid SR, Da Y, Goodman AD, Rafferty J, Donahue S, Dworkin RH. Broadening the spectrum of controls for skin biopsy in painful neuropathies. *Muscle Nerve* 2010;42(3):436-8. doi: 10.1002/mus.21747.
77. Hicks CL, von Baeyer CL, Spafford PA, van Korlaar I, Goodenough B. The Faces Pain Scale-Revised: toward a common metric in pediatric pain measurement. *Pain* 2001;93(2):173-83.
78. Holland NR, Crawford TO, Hauer P, Cornblath DR, Griffin JW, McArthur JC. Small-fiber sensory neuropathies: clinical course and neuropathology of idiopathic cases. *Ann Neurol* 1998;44:47-59.
79. Jensen TS, Baron R, Haanpää M, Kalso E, Loeser JD, Rice AS, Treede RD. A new definition of neuropathic pain. *Pain* 2011;152(10):2204-5. doi: 10.1016/j.pain.2011.06.017.
80. Jensen MP, Gammaitoni AR, Olaleye DO, Oleka N, Nalamachu SR, Galer BS. The pain quality assessment scale: assessment of pain quality in carpal tunnel syndrome. *J Pain* 2006;7:823-832.
81. Jutzeler CR, Rosner J, Rinert J, Kramer JL, Curt A. Normative data for the segmental acquisition of contact heat evoked potentials in cervical dermatomes. *Sci Rep* 2016;6:34660. doi: 10.1038/srep34660.

82. Kass-Iliyya L, Javed S, Gosal D, Kobylecki C, Marshall A, Petropoulos IN, Ponirakis G, Tavakoli M, Ferdousi M, Chaudhuri KR, Jeziorska M, Malik RA, Silverdale MA. Small fiber neuropathy in Parkinson's disease: A clinical, pathological and corneal confocal microscopy study. *Parkinsonism Relat Disord* 2015;21(12):1454-60. doi: 10.1016/j.parkreldis.2015.10.019.
83. Katsarava Z, Ayzenberg I, Sack F, Limmroth V, Diener HC, Kaube H. A novel method of eliciting pain-related potentials by transcutaneous electrical stimulation. *Headache* 2006;46(10):1511-7.
84. Kennedy WR, Wendelschafer-Crabb G, Johnson T. Quantitation of epidermal nerves in diabetic neuropathy. *Neurology* 1996;47:1042-1048.
85. Killian JM, Smyth S, Guerra R, Adhikari I, Harati Y. Comparison of sudomotor and sensory nerve testing in painful sensory neuropathies. *J Clin Neuromuscul Dis* 2011;12(3):138-42. doi: 10.1097/CND.0b013e318209efb1.
86. Kincová S, Vlčková E, Šrotová I, Raputová J, Bednařík J. Dynamické metody kvantitativního testování senzitivity (QST). *Cesk Slov Neurol N* 2016; 79/ 112(1): 68-76.
87. Koenig J, Jarczok MN, Ellis RJ, Hillecke TK, Thayer JF. Heart rate variability and experimentally induced pain in healthy adults: a systematic review. *Eur J Pain* 2014;18:301–14.
88. Kosek E, Ordeberg G. Lack of pressure pain modulation by heterotopic noxious conditioning stimulation in patients with painful osteoarthritis before, but not following, surgical pain relief. *Pain* 2000;88:69–78.
89. Koval'ová I, Chmelíková M, Vlčková E, Michalec M, Raputová J, Bednařík J. Hodnocení rohovkové inervace pomocí konfokální mikroskopie. *Cesk Slov Neurol N* 2017; 80/113(1): 49-57. DOI: 10.14735/amcsnn201749
90. Kovalova I, Vlckova E, Bednarik J. Broadening the spectrum of controls for skin biopsy in painful neuropathies: spondylotic cervical myelopathy patients with painful feet. *Brain Behav* 2016; 6(3): e00444. DOI: 10.1002/brb3.444.
91. Krause SJ, Backonja MM. Development of a neuropathic pain questionnaire. *Clin J Pain* 2003;19:306-314.
92. Kucera P, Goldenberg Z, Kurca E. Sympathetic skin response: review of the method and its clinical use. *Bratisl Lek Listy* 2004;105(3):108-16.
93. Kurča E, Kučera P. Senzitívny neurogram nervus plantaris medialis v diagnostike diabetickej neuropatie. *Neurol Praxi* 2002;4:214-216.

94. Kurvers H, Daemen M, Slaaf D, Stassen F, van den Wildenberg F, Kitslaar P, de Mey. Partial peripheral neuropathy and denervation induced adrenoceptor supersensitivity. Functional studies in an experimental model. *Acta Orthop Belg* 1998;64(1):64-70.
95. La Cesa S, Di Stefano G, Leone C, Pepe A, Galosi E, Alu F, Fasolino A, Cruccu G, Valeriani M, Truini A. Skin denervation does not alter cortical potentials to surface concentric electrode stimulation: A comparison with laser evoked potentials and contact heat evoked potentials. *Eur J Pain* 2018;22(1):161-169. doi: 10.1002/ejp.1112.
96. Lacomis D. Small-fiber neuropathy. *Muscle Nerve* 2002; 26:173-188.
97. Lagerburg V, Bakkers M, Bouwhuis A, Hoeijmakers JG, Smit AM, Van Den Berg SJ, Hordijk-De Boer I, Brouwer-Van Der Lee MD, Kranendonk D, Reulen JP, Faber CG, Merkies IS. Contact heat evoked potentials: normal values and use in small-fiber neuropathy. *Muscle Nerve* 2015;51(5):743-9. doi: 10.1002/mus.24465.
98. Latronico N, Filosto M, Fagoni N, Gheza L, Guarneri B, Todeschini A, Lombardi R, Padovani A, Lauria G. Small nerve fiber pathology in critical illness. *PLoS One* 2013;8(9):e75696. doi: 10.1371/journal.pone.0075696.
99. Lauria G, Bakkers M, Schmitz C, Lombardi R, Penza P, Devigili G, Smith AG, Hsieh ST, Mellgren SI, Umaphathi T, Ziegler D, Faber CG, Merkies IS. Intraepidermal nerve fiber density at the distal leg: a worldwide normative reference study. *J Peripher Nerv Syst* 2010a;15(3):202-7. doi: 10.1111/j.1529-8027.2010.00271.x.
100. Lauria G, Cazzato D, Porretta-Serapiglia C, Casanova-Molla J, Taiana M, Penza P, Lombardi R, Faber CG, Merkies IS. Morphometry of dermal nerve fibers in human skin. *Neurology* 2011;77(3):242-9. doi: 10.1212/WNL.0b013e318225ab51.
101. Lauria G, Cornblath DR, Johansson O, McArthur JC, Mellgren SI, Nolano M, Rosenberg N, Sommer C. EFNS guidelines on the use of skin biopsy in the diagnosis of peripheral neuropathy. *Eur J Neurol* 2005;12:747-58.
102. Lauria G, Dacci P, Lombardi R, Cazzato D, Porretta-Serapiglia C, Taiana M, Sassone J, Dalla Bella E, Rinaldo S, Lettieri C, Eleopra R, Devigili G. Side and time variability of intraepidermal nerve fiber density. *Neurology* 2015;84(23):2368-71. doi: 10.1212/WNL.0000000000001666.
103. Lauria G, Hsieh ST, Johansson O, Kennedy WR, Leger JM, Mellgren SI, Nolano M, Merkies IS, Polydefkis M, Smith AG, Sommer C, Valls-Solé J; European Federation of Neurological Societies; Peripheral Nerve Society. European Federation of Neurological Societies/Peripheral Nerve Society Guideline on the use of skin biopsy in the diagnosis of small fiber neuropathy. Report of a joint task force of the European Federation of

- Neurological Societies and the Peripheral Nerve Society. *Eur J Neurol* 2010b;17(7):903-12, e44-9. doi: 10.1111/j.1468-1331.2010.03023.x
104. Lauria G, McArthur JC, Hauer PE, Griffin JW, Cornblath DR. Neuropathological alterations in diabetic truncal neuropathy: evaluation by skin biopsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1998;65:762-766.
105. Leis AA, Kofler M, Stetkarova I, Stokic DS. *Eur Spine J* 2011;20(2):236-9. doi: 10.1007/s00586-010-1627-z.
106. Loeser JD, Treede RD. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. *Pain* 2008;137:473-477.
107. Løseth S, Stålberg E, Jorde R, Mellgren SI. Early diabetic neuropathy: thermal thresholds and intraepidermal nerve fibre density in patients with normal nerve conduction studies. *J Neurol* 2008;255:1197-1202.
108. Low PA, Caskey PE, Tuck RR, Fealey RD, Dyck PJ. Quantitative sudomotor axon reflex test in normal and neuropathic subjects. *Ann Neurol* 1983a;14:573-580
109. Low PA, Neumann C, Dyck PJ, Fealey RD, Tuck RR. Evaluation of skin vasomotor reflexes by using laser Doppler velocimetry. *Mayo Clin Proc* 1983b;58:583-592.
110. McArthur JC, Stocks EA, Hauer P, Cornblath DR, Griffin JW. Epidermal nerve fiber density: normative reference range and diagnostic efficiency. *Arch Neurol* 1998;55:1513-1520.
111. Magerl W, Krumova EK, Baron R, Tölle T, Treede RD, Maier C. Reference data for quantitative sensory testing (QST): refined stratification for age and a novel method for statistical comparison of group data. *Pain* 2010;151(3):598-605. doi: 10.1016/j.pain.2010.07.026.
112. Maier C, Baron R, Tölle TR, Binder A, Birbaumer N, Birklein F, Gierthmühlen J, Flor H, Geber C, Hüge V, Krumova EK, Landwehrmeyer GB, Magerl W, Maihöfner C, Richter H, Rolke R, Scherens A, Schwarz A, Sommer C, Tronnier V, Uçeyler N, Valet M, Wasner G, Treede RD. Quantitative sensory testing in the German Research Network on Neuropathic Pain (DFNS): somatosensory abnormalities in 1236 patients with different neuropathic pain syndromes. *Pain* 2010;150(3):439-50. doi: 10.1016/j.pain.2010.05.002.
113. Martinez V, Fletcher D, Martin F, Orlikowski D, Sharshar T, Chauvin M, Bouhassira D, Attal N. Small fibre impairment predicts neuropathic pain in Guillain-Barré syndrome. *Pain* 2010;151:53-60.

114. Mazanec R. Elektrofyziologické vyšetření lícního nervu. *Cesk Slov Neurol N* 2007; 70/103(6): 625-630.
115. Merskey H, Albe-Fessard D, Bonica JJ, Carmon A, Dubner R, Kerr FWL, et al. Pain terms: a list with definitions and notes on usage. Recommended by the IASP subcommittee on taxonomy. *Pain* 1979;6:249–52.
116. Moravcová E, Bednařík J. Počítačem asistované stanovení termického prahu. *Cesk Slov Neurol N* 2003; 66/99: 263-269.
117. Moravcová E, Bednařík J. Diabetická neuropatie. *Neurol praxi* 2006; 2: 99-103.
118. Moravcová E, Bednařík J, Feit J, Sommer C. Hodnocení intraepidermální hustoty tenkých nervových vláken z kožní biopsie u pacientů s polyneuropatií. *Cesk Slov Neurol N* 2005a; 68/101: 219-226.
119. Moravcova E, Bednařík J, Svobodník A, Dušek L. Reproducibility of thermal threshold assessment in small-fibre neuropathy patients. *Scripta medica (Brno)* 2005b; 78(3): 177-184.
120. Nahman-Averbuch H, Coghill RC. Pain-autonomic relationships: implications for experimental design and the search for an "objective marker" for pain. *Pain* 2017;158(11):2064-2065. doi: 10.1097/j.pain.0000000000001035.
121. Nie H, Arendt-Nielsen L, Andersen H, Graven-Nielsen T. Temporal summation of pain evoked by mechanical stimulation in deep and superficial tissue. *J Pain* 2005;6(6):348-55.
122. Nolano M, Biasiotta A, Lombardi R, Provitera V, Stancanelli A, Caporaso G, Santoro L, Merkies IS, Truini A, Porretta-Serapiglia C, Cazzato D, Dacci P, Vitale DF, Lauria G. Epidermal innervation morphometry by immunofluorescence and bright-field microscopy. *J Peripher Nerv Syst* 2015a;20(4):387-91. doi: 10.1111/jns.12146.
123. Nolano M, Crisci C, Santoro L, Barbieri F, Casale R, Kennedy WR, Wendelschafer-Crabb G, Provitera V, Di Lorenzo N, Caruso G. Absent innervation of skin and sweat glands in congenital insensitivity to pain with anhidrosis. *Clin Neurophysiol* 2000;111:1596-1601.
124. Nolano M, Manganelli F, Provitera V, Pisciotta C, Stancanelli A, Caporaso G, Iodice R, Shy ME, Santoro L. Small nerve fiber involvement in CMT1A. *Neurology* 2015b;84(4):407-14. doi: 10.1212/WNL.0000000000001188.
125. Nolano M, Provitera V, Estraneo A, Selim MM, Caporaso G, Stancanelli A, Saltalamacchia AM, Lanzillo B, Santoro L. Sensory deficit in Parkinson's disease:

- evidence of a cutaneous denervation. *Brain* 2008;131(Pt 7):1903-11. doi: 10.1093/brain/awn102.
126. Nolano M, Provitera V, Manganelli F, Iodice R, Stancanelli A, Caporaso G, Saltalamacchia A, Califano F, Lanzillo B, Picillo M, Barone P, Santoro L. Loss of cutaneous large and small fibers in naive and l-dopa-treated PD patients. *Neurology* 2017a;89(8):776-784. doi: 10.1212/WNL.0000000000004274.
127. Nolano M, Provitera V, Manganelli F, Iodice R, Caporaso G, Stancanelli A, Marinou K, Lanzillo B, Santoro L, Mora G. Non-motor involvement in amyotrophic lateral sclerosis: new insight from nerve and vessel analysis in skin biopsy. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2017b;43(2):119-132. doi: 10.1111/nan.12332.
128. Oaklander AL. The density of remaining nerve endings in human skin with and without postherpetic neuralgia after shingles. *Pain* 2001;92:139-145.
129. Oosterling A, te Boveldt N, Verhagen C, van der Graaf WT, Van Ham M, Van der Drift M, Vissers K, Engels Y. Neuropathic Pain Components in Patients with Cancer: Prevalence, Treatment, and Interference with Daily Activities. *Pain Pract* 2016;16(4):413-21. doi: 10.1111/papr.12291.
130. Packham TL, Cappelleri JC, Sadosky A, MacDermid JC, Brunner F. Measurement properties of painDETECT: Rasch analysis of responses from community-dwelling adults with neuropathic pain. *BMC Neurol* 2017;17(1):48. doi: 10.1186/s12883-017-0825-2.
131. Pan CL, Tseng TJ, Lin YH, Chiang MC, Lin WM, Hsieh ST. Cutaneous innervation in Guillain-Barré syndrome: pathology and clinical correlations. *Brain* 2003;126:386-397.
132. Papanas N, Ziegler D. Corneal confocal microscopy: recent progress in the evaluation of diabetic neuropathy. *J Diabetes Investig* 2015;6(4):381–9. doi: 10.1111/jdi.12335.
133. Periquet MI, Novak V, Collins MP, Nagaraja HN, Erdem S, Nash SM, et al. Painful sensory neuropathy: prospective evaluation using skin biopsy. *Neurology* 1999; 53:1641-1647.
134. Petersen KL, Rice FL, Farhadi M, Reda H, Rowbotham MC. Natural history of cutaneous innervation following herpes zoster. *Pain* 2010;150:75-82.
135. Peyron R, Laurent B, Garcia-Larrea L. Functional imaging of pain. A review and meta-analysis. *Neurophysiol Clin* 2000; 30: 263–288.

136. Pfau DB, Krumova EK, Treede RD, Baron R, Toelle T, Bircklein F, Eich W, Geber C, Gerhardt A, Weiss T, Magerl W, Maier C. Quantitative sensory testing in the German Research Network on Neuropathic Pain (DFNS): reference data for the trunk and application in patients with chronic postherpetic neuralgia. *Pain* 2014;155(5):1002-15. doi: 10.1016/j.pain.2014.02.004.
137. Portenoy R. Development and testing of a neuropathic pain screening questionnaire: ID Pain. *Curr Med Res Opin* 2006;22:1555-1565.
138. Potočková V, Malá Š, Tomek A, Baumgartner D, Mazanec R. Význam testování termických prahů v detekci neuropatie tenkých vláken u diabetiků 1. typu. *Cesk Slov Neurol N* 2016; 79/112(6): 692-697.
139. Provitera V, Gibbons CH, Wendelschafer-Crabb G, Donadio V, Vitale DF, Stancanelli A, Caporaso G, Liguori R, Wang N, Santoro L, Kennedy WR, Nolano M. A multi-center, multinational age- and gender-adjusted normative dataset for immunofluorescent intraepidermal nerve fiber density at the distal leg. *Eur J Neurol* 2016;23(2):333-8. doi: 10.1111/ene.12842.
140. Provitera V, Nolano M, Caporaso G, Stancanelli A, Manganelli F, Iodice R, Selim MM, De Rosa A, Lanzillo B, Pellicchia MT, De Michele G, Santoro L. Postganglionic sudomotor denervation in patients with multiple system atrophy. *Neurology* 2014;82(24):2223-9. doi: 10.1212/WNL.0000000000000518
141. Rangavajla G, Mokarram N, Masoodzadehgan N, Pai SB, Bellamkonda RV. Noninvasive imaging of peripheral nerves. *Cells Tissues Organs* 2014;200(1):69-77. doi: 10.1159/000369451.
142. Raputova J, Srotova I, Vlckova E, Sommer C, Üçeyler N, Bircklein F, Rittner HL, Rebhorn C, Adamova B, Kovalova I, Kralickova Nekvapilova E, Forer L, Belobradkova J, Olsovsky J, Weber P, Dusek L, Jarkovsky J, Bednarik J. Sensory phenotype and risk factors for painful diabetic neuropathy: a cross-sectional observational study. *Pain* 2017;158(12):2340-2353. doi: 10.1097/j.pain.0000000000001034.
143. Raputová J, Vlčková E, Kočica J, Skutil T, Rajdová A, Kec D, Bednařík J. Evokované potenciály vyvolané kontaktním teplem – vliv fyziologických proměnných. *Cesk Slov Neurol N*: submitováno.
144. Rice A, Casale R. Microneurography and the investigation of pain mechanisms. *Pain Reviews* 1994;1:123-139.
145. Rokyta R. Léčba bolesti v primární péči. Praha: Grada 2017.

146. Rokyta R. Patofyziologie bolesti a její klinické aplikace. *Čas. Lék. Čes.* 2018;157:57-61
147. Rolke R, Baron R, Maier C, Tölle TR, Treede RD, Beyer A, et al. Quantitative sensory testing in the German Research Network on Neuropathic Pain (DFNS): standardized protocol and reference values. *Pain* 2006a;123:231-243.
148. Rolke R, Magerl W, Campbell KA, Schalber C, Caspari S, Birklein F, et al. Quantitative sensory testing: a comprehensive protocol for clinical trials. *Eur J Pain* 2006b;10:77-88.
149. Rosner J, Hubli M, Hostettler P, Scheuren PS, Rinert J, Kramer JLK, Hupp M, Curt A, Jutzeler CR. Contact heat evoked potentials: Reliable acquisition from lower extremities. *Clin Neurophysiol* 2018;129(3):584-591. doi: 10.1016/j.clinph.2017.12.034.
150. Rowbotham MC, Yosipovitch G, Connolly MK, Finlay D, Forde G, Fields HL. Cutaneous innervation density in the allodynic form of postherpetic neuralgia. *Neurobiol Dis* 1996;3:205-214.
151. Ruts L, van Doorn PA, Lombardi R, Haasdijk ED, Penza P, Tulen JH, Hempel RJ, van den Meiracker AH, Lauria G. Unmyelinated and myelinated skin nerve damage in Guillain-Barré syndrome: correlation with pain and recovery. *Pain* 2012;153(2):399-409. doi: 10.1016/j.pain.2011.10.037.
152. Scherens A, Maier C, Haussleiter IS, Schwenkreis P, Vlckova-Moravcova E, Baron R, Sommer C. Painful or painless lower limb dysesthesias are highly predictive of peripheral neuropathy: comparison of different diagnostic modalities. *Eur J Pain* 2009;13(7):711-8.
153. Schuh-Hofer S, Wodarski R, Pfau DB, Caspani O, Magerl W, Kennedy JD, Treede RD. One night of total sleep deprivation promotes a state of generalized hyperalgesia: a surrogate pain model to study the relationship of insomnia and pain. *Pain* 2013;154:1613–21.
154. Shun CT, Chang YC, Wu HP, Hsieh SC, Lin WM, Lin YH, Tai TY, Hsieh ST. Skin denervation in type 2 diabetes: correlations with diabetic duration and functional impairments. *Brain* 2004;127:1593-1605.
155. Singleton JR, Bixby B, Russell JW, Feldman EL, Peltier A, Goldstein J, Howard J, Smith AG. The Utah Early Neuropathy Scale: a sensitive clinical scale for early sensory predominant neuropathy. *J Peripher Nerv Syst* 2008; 13(3): 218–227.

156. Skljarevski V, Ramadan NM. The nociceptive flexion reflex in humans -- review article. *Pain* 2002;96(1-2):3-8.
157. Sommer C, Lauria G. Skin biopsy in the management of peripheral neuropathy. *Lancet Neurol* 2007;6:632–42.
158. Sommer C, Richter H, Rogausch JP, Frettlöh J, Lungenhausen M, Maier C. A modified score to identify and discriminate neuropathic pain: a study on the German version of the Neuropathic Pain Symptom Inventory (NPSI). *BMC Neurol* 2011;11:104. doi: 10.1186/1471-2377-11-104.
159. Stetkarova I, Kofler M. Cutaneous silent periods in the assessment of mild cervical spondylotic myelopathy. *Spine (Phila Pa 1976)* 2009;34(1):34-42. doi: 10.1097/BRS.0b013e31818f8be3.
160. Sumner CJ, Sheth S, Griffin JW, Cornblath DR, Polydefkis M. The spectrum of neuropathy in diabetes and impaired glucose tolerance. *Neurology* 2003;60:108-111.
161. Škorňa M, Kopacik R, Vlckova E, Adamova B, Kostalova M, Bednarik J. Small nerve fiber pathology in critical illness documented by serial skin biopsies *Muscle Nerve* 2015;52(1):28-33.
162. Šrotová I, Vlčková E, Bednařík J. Autonomní dysfunkce a její diagnostika u roztroušené sklerózy. *Cesk Slov Neurol N* 2016; 79/ 112(2): 188-198.
163. Šrotová I, Vlckova E, Dusek L, Bednarik J. A-waves increase the risk of developing neuropathy. *Brain Behav* 2017;7(8):e00760. doi: 10.1002/brb3.760.
164. Šrotová I, Vlčková E, Straková J, Kincová S, Ryba L, Dušek L Bednařík J. Validace české verze Neuropathic Pain Symptom Inventory (NPSI_{cz}). *Cesk Slov Neurol N* 2015b; 78/111: 45-56.
165. Šrotová I, Vlčková E, Straková J, Kincová S, Adamová B, Dušek L, Jarkovský J, Bednařík J. Validace české verze komplexního protokolu kvantitativního testování senzitivity. *Cesk Slov Neurol N* 2015a; 78/111(4): 442-452.
166. Štětkářová I. Neurofyziologické metody v diagnostice míšních lézí. *Neurol. praxi* 2017; 18(6): 373–379.
167. Štětkářová I, Horáček J. Deprese u vybraných neurologických onemocnění. *Cesk Slov Neurol N* 2016; 79/112(6): 626-638.
168. Tang Z, Chen Z, Tang B, Jiang H. Primary erythromelalgia: a review. *Orphanet J Rare Dis* 2015;10:127. doi: 10.1186/s13023-015-0347-1.

169. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. *Circulation* 1996;93:1043-1065
170. Tavakoli M, Ferdousi M, Petropoulos IN, Morris J, Pritchard N, Zhivov A, Ziegler D, Pacaud D, Romanchuk K, Perkins BA, Lovblom LE, Bril V, Singleton JR, Smith G, Boulton AJ, Efron N, Malik RA. Normative values for corneal nerve morphology assessed using corneal confocal microscopy: a multinational normative data set. *Diabetes Care* 2015;38(5):838– 43. doi:10.2337/ dc14-2311.
171. Tavakoli M, Marshall A, Banka S, Petropoulos IN, Fadavi H, Kingston H, Malik RA. Corneal confocal microscopy detects small-fiber neuropathy in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A patients. *Muscle Nerve* 2012;46(5):698– 704. doi: 10.1002/ mus.23377.
172. Tavakoli M, Marshall A, Pitceathly R, Fadavi H, Gow D, Roberts ME, Efron N, Boulton AJ, Malik RA. Corneal confocal microscopy: a novel means to detect nerve fibre damage in idiopathic small fibre neuropathy. *Exp Neurol* 2010a;223(1):245– 50. doi: 10.1016/ j.expneurol.2009.08.03.
173. Tavakoli M, Quattrini C, Abbott C, Kallinikos P, Marshall A, Finnigan J, Morgan P, Efron N, Boulton AJ, Malik RA. Corneal confocal microscopy: a novel noninvasive test to diagnose and stratify the severity of human diabetic neuropathy. *Diabetes Care* 2010b;33(8):1792– 7. doi: 10.2337/ dc10-0253.
174. Tesfaye S, Boulton AJ, Dyck PJ, Freeman R, Horowitz M, Kempler P, Lauria G, Malik RA, Spallone V, Vinik A, Bernardi L, Valensi P; Toronto Diabetic Neuropathy Expert Group. Diabetic neuropathies: update on definitions, diagnostic criteria, estimation of severity, and treatments. *Diabetes Care* 2010;33(10):2285-93. doi: 10.2337/dc10-1303.
175. Themistocleous AC, Ramirez JD, Shillo PR, Lees JG, Selvarajah D, Orengo C, Tesfaye S, Rice AS, Bennett DL. The Pain in Neuropathy Study (PiNS): a cross-sectional observational study determining the somatosensory phenotype of painful and painless diabetic neuropathy. *Pain* 2016;157(5):1132-45. doi: 10.1097/j.pain.0000000000000491.
176. Torrance N, Smith BH, Bennett MI, Lee AJ. The epidemiology of chronic pain of predominantly neuropathic origin. Results from a general population survey. *J Pain* 2006;7(4):281-9.

177. Treede RD, Jensen TS, Campbell JN, Cruccu G, Dostrovsky JO, Griffin JW, Hansson P, Hughes R, Nurmikko T, Serra J. Neuropathic pain: redefinition and a grading system for clinical and research purposes. *Neurology* 2008;70(18):1630-5.
178. Treede RD, Rief W, Barke A, Aziz Q, Bennett MI, Benoliel R, Cohen M, Evers S, Finnerup NB, First MB, Giamberardino MA, Kaasa S, Kosek E, Lavand'homme P, Nicholas M, Perrot S, Scholz J, Schug S, Smith BH, Svensson P, Vlaeyen JW, Wang SJ. A classification of chronic pain for ICD-11. *PAIN* 2015;156:1003–7. doi: 10.1097/j.pain.000000000000160.
179. Treister R, Eaton TA, Trudeau JJ, Elder H, Katz NP. Development and preliminary validation of the focused analgesia selection test to identify accurate pain reporters. *J Pain Res* 2017;10:319-326. doi: 10.2147/JPR.S121455.
180. Truini A, Galeotti F, Biasiotta A, Gabriele M, Inghilleri M, Petrucci MT, Cruccu G. Dissociation between cutaneous silent period and laser evoked potentials in assessing neuropathic pain. *Muscle Nerve* 2009;39(3):369-73. doi: 10.1002/mus.21162.
181. Truini A, Galeotti F, Haanpaa M, Zucchi R, Albanesi A, Biasiotta A, Gatti A, Cruccu G. Pathophysiology of pain in postherpetic neuralgia: A clinical and neurophysiological study. *Pain* 2008;140:405–10.
182. Üçeyler N, Kahn AK, Kramer D, Zeller D, Casanova-Molla J, Wanner C, Weidemann F, Katsarava Z, Sommer C. Impaired small fiber conduction in patients with Fabry disease: a neurophysiological case-control study. *BMC Neurol* 2013a;13:47. doi: 10.1186/1471-2377-13-47.
183. Üçeyler N, Sommer C. Objective evidence that small-fiber polyneuropathy underlies some illnesses currently labeled as fibromyalgia. *Pain* 2013b;154(11):2569. doi: 10.1016/j.pain.2013.06.037.
184. Üçeyler N, Vollert J, Broll B, Riediger N, Langjahr M, Saffer N, Schubert AL, Siedler G, Sommer C. Sensory profiles and skin innervation of patients with painful and painless neuropathies. *Pain* 2018;159(9):1867-1876. doi: 10.1097/j.pain.0000000000001287.
185. Üçeyler N, Zeller D, Kahn AK, Kewenig S, Kittel-Schneider S, Schmid A, Casanova-Molla J, Reiners K, Sommer C. Small fibre pathology in patients with fibromyalgia syndrome. *Brain* 2013c;136(Pt 6):1857-67. doi: 10.1093/brain/awt053.

186. Umapathi T, Tan WL, Tan NC, Chan YH. Determinants of epidermal nerve fiber density in normal individuals. *Muscle Nerve* 2006;33:742-746.
187. Vasko P, Bocek V, Mencl L, Haninec P, Stetkarova I. Preserved cutaneous silent period in cervical root avulsion. *Spinal Cord Med* 2017;40(2):175-180. doi: 10.1179/2045772315Y.0000000053.
188. Vlčková E. *Neuropatie tenkých vláken, komplexní diagnostika a etiologie (dizertační práce, 2011)*. K dispozici na: <https://is.muni.cz/th/njy42/>.
189. Vlčková E, Bednařík J. Současný pohled na kontraindikace a komplikace elektromyografie. *Cesk Slov Neurol N* 2017; 80/113(1): 43-48.
190. Vlčková E, Bednařík J, Buršová E, Šajgalíková K, Mlčáková L. Spektrální analýza variability srdeční frekvence – normativní data. *Cesk Slov Neurol N* 2010; 73/106(6): 663-672.
191. Vlčková E, Šrotová I. Vyšetření senzitivity (minimonografie). *Cesk Slov Neurol N* 2014; 77/110(4): 402-418.
192. Vlčková E, Šrotová E, Bednařík J. Sympatická kožní odpověď v diagnostice neuropatie tenkých vláken. *Cesk Slov Neurol N* 2016; 79/ 112(1): 52-60.
193. Vlčková-Moravcová E, Bednařík J. Painful sensory neuropathies in the elderly. *Scripta medica (Brno)* 2009;82(1):16-24.
194. Vlckova-Moravcova E, Bednarik J, Dušek L, Toyka KV, Sommer C. Diagnostic validity of epidermal nerve fiber densities in painful sensory neuropathies. *Muscle and Nerve* 2008a; 37: 50-60.
195. Vlckova-Moravcova E, Bednarik J, Belobradkova J, Sommer C. Small-fibre involvement in diabetic patients with neuropathic foot pain. *Diabet Med* 2008b;25(6):692-699.
196. Vollert J, Magerl W, Baron R, Binder A, Enax-Krumova EK, Geisslinger G, Gierthmühlen J, Henrich F, Hüllemann P, Klein T, Lötsch J, Maier C, Oertel B, Schuh-Hofer S, Tölle TR, Treede RD. Pathophysiological mechanisms of neuropathic pain: comparison of sensory phenotypes in patients and human surrogate pain models. *Pain* 2018;159(6):1090-1102. doi: 10.1097/j.pain.0000000000001190.
197. Vollert J, Maier C, Attal N, Bennett DLH, Bouhassira D, Enax-Krumova EK, Finnerup NB, Freynhagen R, Gierthmühlen J, Haanpää M, Hansson P, Hüllemann P, Jensen TS, Magerl W, Ramirez JD, Rice ASC, Schuh-Hofer S, Segerdahl M, Serra J, Shillo PR, Sindrup S, Tesfaye S, Themistocleous AC, Tölle TR, Treede RD, Baron R.

- Stratifying patients with peripheral neuropathic pain based on sensory profiles: algorithm and sample size recommendations. *Pain* 2017;158(8):1446-1455. doi: 10.1097/j.pain.0000000000000935.
198. Wang N, Gibbons CH, Lafo J, Freeman R. α -Synuclein in cutaneous autonomic nerves. *Neurology* 2013;81(18):1604-10. doi: 10.1212/WNL.0b013e3182a9f449.
199. Waxman SG, Merkies ISJ, Gerrits MM, Dib-Hajj SD, Lauria G, Cox JJ, Wood JN, Woods CG, Drenth JPH, Faber CG. Sodium channel genes in pain-related disorders: phenotype-genotype associations and recommendations for clinical use. *Lancet Neurol*. 2014 Nov;13(11):1152-1160. doi: 10.1016/S1474-4422(14)70150-4.
200. Wild D, Grove A, Martin M, Eremenco S, McElroy S, Verjee-Lorenz A, Erikson P; ISPOR Task Force for Translation and Cultural Adaptation. Principles of Good Practice for the Translation and Cultural Adaptation Process for Patient-Reported Outcomes (PRO) Measures: report of the ISPOR Task Force for Translation and Cultural Adaptation. *Value Health* 2005;8(2):94-104.
201. Wilder-Smith OH, Schreyer T, Scheffer GJ, Arendt-Nielsen L. Patients with chronic pain after abdominal surgery show less preoperative endogenous pain inhibition and more postoperative hyperalgesia: a pilot study. *J Pain Palliat Care Pharmacother* 2010;24:119–28. doi: 10.3109/15360281003706069.
202. Wu SW, Wang YC, Hsieh PC, Tseng MT, Chiang MC, Chu CP, Feng FP, Lin YH, Hsieh ST, Chao CC. Biomarkers of neuropathic pain in skin nerve degeneration neuropathy: contact heat-evoked potentials as a physiological signature. *Pain* 2017;158(3):516-525. doi: 10.1097/j.pain.0000000000000791.
203. Yarnitsky D. Quantitative sensory testing. *Muscle Nerve* 1997;20(2):198-204.
204. Yarnitsky D. Conditioned pain modulation (the diffuse noxious inhibitory control-like effect): its relevance for acute and chronic pain states. *Curr Opin Anaesthesiol* 2010; 23: 611-615. doi: 10.1097/ACO.0b013e32833c348b.
205. Yarnitsky D, Crispel Y, Eisenberg E, Granovsky Y, Ben-Nun A, Sprecher E et al. Prediction of chronic post-operative pain: pre-operative DNIC testing identifies patients at risk. *Pain* 2008; 138: 22-28.
206. Yarnitsky D, Granot M, Granovsky Y. Pain modulation profile and pain therapy: between pro- and antinociception. *Pain* 2014;155(4):663-5. doi: 10.1016/j.pain.2013.11.005.

207. Yarnitsky D, Granot M, Nahman-Averbuch H, Khamaisi M, Granovsky Y. Conditioned pain modulation predicts duloxetine efficacy in painful diabetic neuropathy. *Pain* 2012;153:1193–8.

V. POUŽITÉ ZKRATKY

AAN - Americká neurologická akademie (American Academy of Neurology)

CCM - korneální mikroskopie rohovky (Corneal Confocal Microscopy)

CHEPs – evokované potenciály, vyvolané kontaktním teplem (Contact-Heat Evoked Potentials)

CPM - podmíněná modulace bolesti (Conditioned Pain Modulation)

CRPS - komplexní regionální bolestivý syndrom (Complex Regional Pain Syndrome)

CSP - kožní perioda útlumu (Cutaneous Silent Period)

CT – počítačová tomografie (Computer Tomography)

DFNS – německá multicentrická pracovní skupina pro výzkum neuropatické bolesti (Der Deutsche Forschungsverbund Neuropathischer Schmerz, The German Research Network on Neuropathic Pain)

dQST - dynamické metody kvantitativního testování senzitivity (Dynamic methods of Quantitative Sensory Testing)

DTI - zobrazení tenzorů difuze (Diffusion Tensor Imaging)

EFNS - Evropská federace neurologických společností (European Federation of Neurological Societies)

EMG – elektromyografie (ElectroMyoGraphy)

fMRI - funkční magnetická resonance (Functional Magnetic Resonance Imaging)

FPS – škála intenzity bolesti založené na hodnocení změn výrazu obličeje (Faces Pain Scale)

GAP 43 – marker regenerace tenkých nervových vláken (Growth-Associated Protein 43)

HRV – variabilita srdeční frekvence (Heart Rate Variability)

IASP - Mezinárodní asociace pro studium bolesti (International Association for the Study of Pain)

IENF – intraepidermální nervové vlákno (Intraepidermal Nerve Fiber)

IENFD – intraepidermální hustota nervových vláken (Intraepidermal Nerve Fiber Density)

IFCN - Mezinárodní federace pro klinickou neurofyziologii (International Federation of Clinical Neurophysiology)

LANSS – the Leeds Assessment of Neuropathic Symptoms and Signs

LEPs - laserem evokované potenciály (Laser-Evoked Potentials)

MR – magnetická resonance (Magnetic Resonance)

NeuP - neuropatická bolest (Neuropathic Pain)

NeuPSIG - speciální skupina při IASP zaměřená na neuropatickou bolest (Special Interest Group on Neuropathic Pain)

NFR - nocicepční flekční reflex (Nociception Flexion Reflex)

NPSI - Neuropathic Pain Symptom Inventory

NRS – numerická škála bolesti (Numeric Rating Scale)

QSART - kvantitativní sudomotorický test (Quantitative Sudomotor Axon Reflex Test)

QST – kvantitativní testování senzitivity (Quantitative Sensory Testing)

PET - pozitronová emisní tomografie (Positron Emission Tomography)

PGP 9.5 – Protein Gene Product 9.5

PHS - paradoxní vnímání chladných podnětů jako teplých až horkých (Paradoxical Heat Sensation)

PREPs - evokované potenciály se vztahem k bolesti (Pain-Related Evoked Potentials)

ROC - Receiver-Operating Characteristic Curve

SAHRV - spektrální analýza variability srdeční frekvence (Spectral Analysis Of Heart Rate Variability)

SE-PREPS - nociceptivní evokované potenciály vyvolané povrchovou elektrickou stimulací (Surface Electrode Pain-Related Evoked Potentials)

SEP – somatosenzorické evokované potenciály (Somatosensory Evoked Potentials)

SFN – neuropatie tenkých vláken (Small Fiber Neuropathy)

SSR – sympatická kožní odpověď (Sympathetic Skin Response)

SP – substance P

TTT – testování termického prahu (Thermal Threshold Testing)

TS – časová sumace (Temporal Summation)

VAS - vizuální analogová škála (Visual Analogue Scale)

VRS - verbální škála hodnocení intenzity bolesti (Verbal Rating Scale)