

Jernej Šorli<sup>1</sup>, Helena Lenasi<sup>2</sup>

## Vpliv akutne hiperglikemije na endotelijsko funkcijo mikrožilja

### *The Effect of Acute Hyperglycemia on Microvascular Endothelial Function*

#### IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: akutna hiperglikemija, mikrožilje, endotelij, reaktivna hiperemija, laserska dopplerska metoda, oralni glukozni tolerančni test

IZHODIŠČA. Vpliv akutne hiperglikemije in hiperinzulinemije na endotelijsko funkcijo zdravih živali je dobro raziskan *in vitro*, pri ljudeh pa si ugotovitve raziskav *in vivo* nasprotujejo, zato smo želeli raziskati vpliv akutne hiperglikemije na endotelijsko funkcijo pri zdravih preiskovancih. Predpostavljali smo, da bo endotelijska funkcija mikrožilja kože ob akutni hiperglikemiji zmanjšana. METODE. Pri 20 zdravih preiskovancih smo z lasersko dopplersko metodo izmerili hiperemični odziv mikrožilja kože na blazinici prsta in na podlakti po eno- in triminutnem zažemu nadlaktne arterije, pred in po oralni obremenitvi s 75 g glukoze/2 dl vode ter neodvisno po kontrolni obremenitvi z 2 dl vode. Istočasno smo preiskovancu merili EKG in krvni tlak v arterijah prsta. REZULTATI. Diastolični tlak se je po obremenitvi z glukozo povečal manj kot po kontrolni obremenitvi ( $p = 0,044$ ; Wilcoxonov test), medtem ko se vrednosti drugih merjenih hemodinamskih spremenljivk med seboj niso statistično značilno razlikovale. Med obremenitvijo z glukozo in vodo nismo našli razlik v hiperemičnem odzivu mikrožilja kože, razen na blazinici prsta, kjer se je po triminutnem zažemu po obremenitvi z glukozo hiperemični odziv bolj zmanjšal kot po kontrolni obremenitvi ( $p = 0,067$ ; Wilcoxonov test). Na podlakti smo ugotovili negativno korelacijo med spremembo koncentracije glukoze in spremembo hiperemičnega odziva po enominutnem in po triminutnem zažemu ( $p = 0,047$  in  $0,004$ ; linearna regresija). ZAKLJUČKI. Z raziskavo nismo potrdili, da akutna hiperglikemija neposredno zmanjša endotelijsko funkcijo mikrožilja kože. Pokazali pa smo zmanjšano reaktivnost mikrožilja, ki je najverjetneje posledica aktivacije simpatičnega živčevja. Predvidevamo, da na reaktivnost mikrožilja bolj kot akutna hiperglikemija neposredno vpliva inzulin.

#### ABSTRACT

KEY WORDS: acute hyperglycaemia, microcirculation, endothelium, reactive hyperaemia, laser Doppler fluximetry, oral glucose tolerance test

BACKGROUND. The effects of acute hyperglycaemia and hyperinsulinemia on endothelial function have been established *in vitro* in non-diabetic animals, whereas the evidence of their impact on the human endothelium *in vivo* remain scarce and contradictory. In

<sup>1</sup> Jernej Šorli, štud. med., Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana

<sup>2</sup> Izr. prof. Helena Lenasi, dr. med., Inštitut za fiziologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana; helena.lenasi.ml@mfmf.uni-lj.si

the present study, we aimed to investigate the effect of acute hyperglycaemia on skin microvascular endothelial function in healthy volunteers, hypothesising it will be attenuated. METHODS. Skin microvascular hyperaemic response was measured using laser Doppler fluximetry on the finger pulp and the volar forearm in 20 participants following one- and three-minute brachial artery occlusion, before and after an oral load of 75 g glucose/2 dl water or 2 dl water in the control trial. The blood pressure of the digital arteries and ECG were simultaneously measured. RESULTS. The diastolic blood pressure increased significantly less following the glucose load compared to the control load ( $p = 0.044$ ; Wilcoxon test), while other haemodynamic variables did not differ between the glucose and the water load. There were no significant differences in hyperaemic response following a glucose load and a control load, however, a borderline significance following a three-minute occlusion was shown on the finger pulp ( $p = 0.067$ ; Wilcoxon test). A negative correlation between the change in blood glucose concentration and hyperaemic response was established on the forearm following both one- and three-minute occlusion ( $p = 0.047$  and  $0.004$ ; linear regression). CONCLUSIONS. In the present study, we did not observe any attenuation of the microvascular endothelial function due to acute hyperglycaemia. Microvascular reactivity was decreased, however, this could be attributed to increased sympathetic nervous system activity. We suggest that microvascular reactivity is more affected by hyperinsulinemia, rather than hyperglycaemia.

## IZHODIŠČA

Gljučen patogenetski proces pri nastanku srčno-žilnih zapletov sladkorne bolezni so funkcionalne in strukturne spremembe na ravni mikrožilja, ki se začnejo v endoteliju (1). Znanih je več mehanizmov, preko katerih naj bi sladkorna bolezen vplivala na endotelijsko funkcijo, denimo preko povišanja oksidativnega stresa in zmanjšane razpoložljivosti endotelijskih vazodilatatorjev (2-5). Zanimivo je dejstvo, da so tudi na bolezensko nespremenjenih endotelijskih celicah, ki so jih izpostavili akutni hiperglikemiji, ugotovili podobne spremembe, predvsem zmanjšano endotelijsko funkcijo (6-12).

Ker so večino raziskav opravili na izoliranih živalskih žilah in na kulturah endotelijskih celic, je vpliv akutne hiperglikemije na endotelij pri človeku vprašljiv (6-12). Znano je namreč, da poleg povišane koncentracije glukoze na endotelij neposredno učinkuje tudi inzulin. Vezava inzulina na inzulinski receptor sproži v endotelijskih celicah dve signalni poti: prva preko aktivacije kinaze Akt in endotelijske sinteze

dušikovega oksida (eNOS) spodbudi nastanjanje vazodilatatorja dušikovega oksida (NO), druga preko aktivacije z mitogenom aktivirane proteinske kinaze (MAPK) nastanjanje vazokonstriktorja endotelina-1 (13). Na živalskih modelih so pokazali, da v zdravih endotelijskih celicah prevlada prva pot, medtem ko se zdi, da ima pri neodzivnosti na inzulin večji vpliv aktivacija vazokonstriktorne poti (9, 14-16). Akutna hiperglikemija in hiperinzulinemija imata tako v zdravem organizmu nasprotujoča si učinka na endotelij; malo je raziskav, ki bi preučevale, kakšen je njun skupni učinek na endotelijsko funkcijo *in vivo*.

Skladno z izsledki raziskav na živalskih modelih so nekatere raziskave *in vivo* na ljudeh pokazale, da akutna hiperglikemija zmanjša od endotelija odvisno vazodilatacijo v mikrožilju pri ljudeh, ki so neodzivni na inzulin (17-19). Raziskave na mladih, zdravih preiskovancih pa si po ugotovitvah nasprotujejo (17, 20-26). Razlog bi lahko bilo dejstvo, da je uravnavanje pretoka krvi v mikrožilju zelo kompleksno, saj poleg

endotelija vključuje še lokalne mehanizme, kot sta presnovni in miogeni mehanizem ter simpatično avtonomno živčevje, ki deluje sistemsko in pretežno vazokonstriktorno. Ker akutna hiperglikemija potencialno učinkuje tako na endotelij kot neposredno na gladke mišice žil in na avtonomno živčevje, to predstavlja metodološko težavo za ocenjevanje vpliva akutne hiperglikemije na endotelij pri človeku (6–12, 27–30).

Z raziskavo smo želeli preveriti, če akutna hiperglikemija vpliva na funkcijo mikrožilja pri mladih, zdravih preiskovanih, in v kolikšni meri morebitni vpliv lahko pripišemo neposrednemu učinku povišane koncentracije glukoze na endotelij. Predpostavljali smo, da bo endotelajska funkcija mikrožilja kože ob akutni hiperglikemiji zmanjšana.

Kot model za oceno funkcije mikrožilja smo izbrali kožo, saj je za merjenje lahko dostopna in hkrati nudi dober vpogled v splošno stanje žilja (31).

## **METODE**

### **Preiskovanci**

V raziskavi je sodelovalo 20 prostovoljcev (15 moških in 5 žensk, starih  $21,6 \pm 1,6$  let), ki smo jih povabili k sodelovanju. Preiskovanci so potrdili, da so zdravi, ne jemljejo nobenih zdravil, ne kadijo in vsaj 12 ur pred prihodom niso uživali hrane, kave ali alkohola. Na dan meritev so pili izključno vodo do 0,5 l in ne eno uro pred pričetkom meritev. Preiskovanke so bile v začetni folikularni fazi menstruacijskega cikla in niso jemale oralne kontracepcije.

Preiskovanci so pisno privolili k sodelovanju v raziskavi. Raziskavo je potrdila Komisija Republike Slovenije za medicinsko etiko (številka soglasja: 0120-175/2017/6).

### **Metode**

Prekrvljenost mikrožilja smo ocenjevali z uporabo laserske dopplerske (LD) metode, s katero merimo laserski dopplerski pretok (angl. *laser-doppler flux*, LDF). Merili

smo bazalni pretok v mirovanju ( $LDF_{\text{baz}}$ ) in pretok po prehodnem zažemu nadlaktne arterije – pookluzivno reaktivno hiperemijo (PORH). Sočasno smo na istem mestu merili temperaturo kože. Kontinuirano smo preiskovancem merili arterijski krvni tlak in EKG. Podatke krvnega tlaka, LDF in EKG smo zajemali s 500 Hz in zbirali s programsko opremo Nevrokard (Nevrokard Kiauta, d. o. o., Izola, Slovenija).

### **Laserska dopplerska metoda za merjenje krvnega pretoka v koži**

Pretok krvi v mikrožilju kože smo ocenjevali s pomočjo LD-metode, ki temelji na Dopplerjevem pojavu. Laserski žarek valovne dolžine 632,8 nm izhaja iz sonde z emitirajočim vlaknom, ki jo namestimo na kožo in se sipa po mirujočih in premikajočih se strukturah v spodaj ležečem tkivu, približno 1 mm globoko (32). Delež fotonov se odbije nazaj proti sondi, kjer jih ujame ta dve optični vlakni. Nameščeni sta tako, da z emitirajočim vlaknom zaobjemata površino približno 1 mm<sup>2</sup>. Premikajoče se strukture, pretežno eritrociti, povzročijo Dopplerjev premik valovne dolžine odbitih fotonov. Delež odbitih fotonov s spremenjeno valovno dolžino je sorazmeren številu in hitrosti eritrocitov, ki v časovni enoti prehajajo skozi opazovani del kože s prostornino približno 1 mm<sup>3</sup>. Število in hitrost eritrocitov sta meri za oceno pretoka krvi, ki pa ni dejanski volumski pretok, ampak ga imenujemo LDF in je brezdimenzijska količina, sorazmerna volumskemu pretoku, ki jo ponazorimo z arbitrarnimi pretočnimi enotami (PE). Potrdili so, da meritve, ki jih pridobimo z LD-metodo in z drugimi (pletizmografskimi, dilucijskimi) metodami, dobro korelirajo med seboj (32–34).

Uporabili smo LD-napravo Periflux 4001 Master/4002 Satellite (Perimed, Järfälla, Švedska). Naprava omogoča sočasno merjenje temperature kože s sondo, ki je bila v naši raziskavi nameščena 3 mm od izstopišča laserskega žarka.

## Pookluzivna reaktivna hiperemija

Žilno reaktivnost smo merili z oceno hiperemije po sprostitvi prehodnega zažema nadlaktne arterije. PORH nastane zaradi več med seboj prepletenih mehanizmov: endotelijskih in presnovnih dejavnikov, miogene odziva ter aksonskega refleksa senzoričnih nevronov (31, 34, 35).

PORH smo izzvali tako, da smo nadlaktno arterijo zaželi s standardno manšeto Riva-Rocci za 1 min in v ločenem poskusu za 3 min. Vrednost LDF po sprostitvi zažema strmo naraste, doseže največji pretok in postopno pada na bazalno raven (slika 1). Izsledki raziskav predpostavljajo, da naj bi k hiperemiji po eni minuti zažema največ doprinesli endotelijski dejavniki, po treh ali več minutah zažema pa v večji meri presnovni, miogeni in nevrogeni mehanizmi (35, 36).

Splošnega strinjanja glede izbire parametrov, ki opišejo krivuljo odziva PORH, ni. V raziskavah običajno ocenjujejo naslednje parametre (31, 34):

- največji LDF ( $LDF_{max}$ ),
- absolutni in relativni porast LDF,
- čas do nastopa največjega LDF,

- trajanje hiperemije in
- ploščino pod krivuljo LDF v odvisnosti od časa.

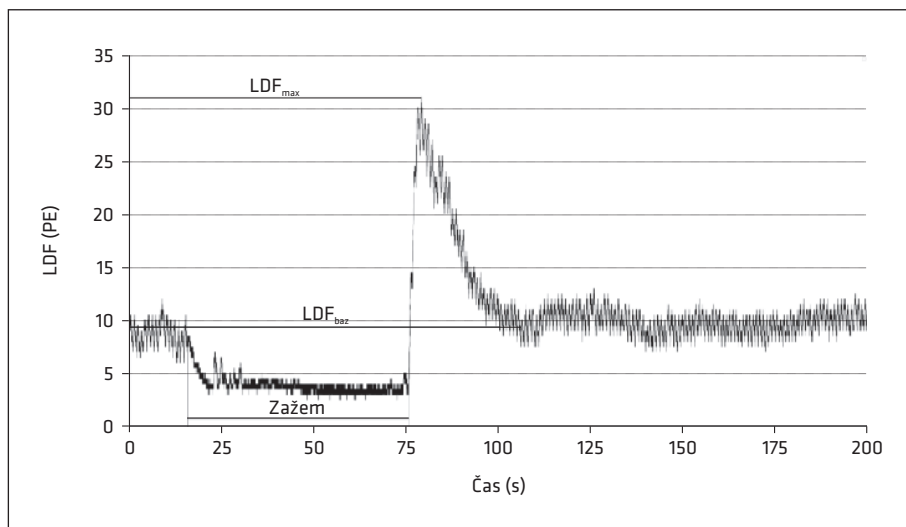
V naši raziskavi smo ocenjevali  $LDF_{max}$ , saj naj bi bil po navedbah nekaterih raziskav najbolj ponovljiv parameter (36–38).

## Arterijski krvni tlak in srčna frekvenca

Z analizo signala drugega odvoda trikanalnega EKG smo merili interval med zobcema R ( $t_{RR}$ ), s pletizmografsko metodo pa arterijski krvni tlak na prstnih arterijah sredinca desne roke: sistolični ( $p_{sis}$ ), diastolični ( $p_{dia}$ ), srednji ( $p_{sred}$ ) in pulzni tlak ( $p_{pulz}$ ). Uporabili smo napravo Finapres<sup>TM</sup> BP monitor (Ohmeda 2300, Englewood, USA).

## Obremenitev z glukozo in merjenje plazemske koncentracije glukoze

Hiperglikemijo smo dosegli po protokolu za oralni glukozni tolerančni test (OGTT). Preiskovanci so na tešče popili 82,5 g glukoze monohidrata (masa ustreza 75 g čiste glukoze), ki smo jih raztopili v 2 dl ustekleničene vode.



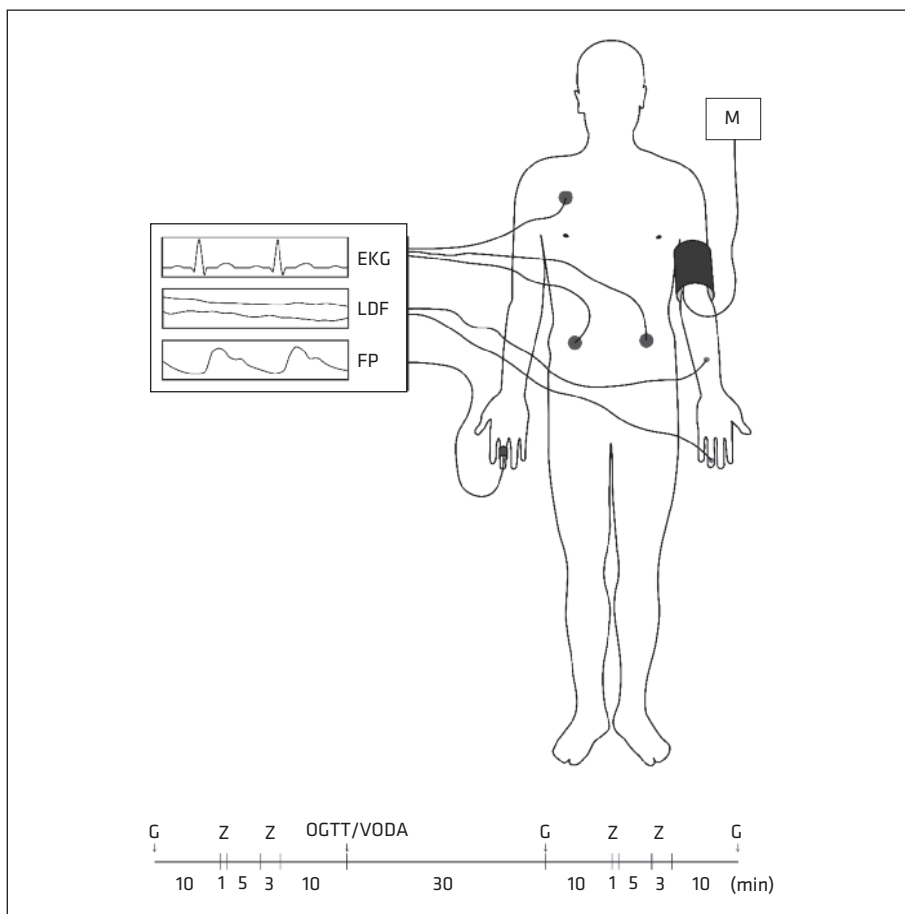
**Slika 1.** Prikaz pookluzivne reaktivne hiperemije na podlakti. LDF – laserski dopplerski pretok,  $LDF_{max}$  – največji pretok po sprostitvi zažema proksimalne arterije,  $LDF_{baz}$  – bazalni pretok, PE – pretočna enota.

Plazemsko koncentracijo glukoze ( $c_{glu}$ ) smo merili v kapilarni krvi kazalca desne roke. Uporabili smo spektrofotometrični merilnik HemoCue® Glucose 201+ (HemoCue AB, Ängelholm, Švedska). Opravili smo pilotsko raziskavo, v kateri smo desetim preiskovancem merili kinetiko  $c_{glu}$  v petminutnih intervalih: ugotovili smo, da je bila  $c_{glu}$  najvišja 30 min po OGTT, zato smo meritve žilne reaktivnosti opravili 30 min po OGTT.

### Protokol

Meritve smo izvajali v laboratoriju Inštituta za fiziologijo Medicinske fakultete Univerze

v Ljubljani v temperaturno nadzorovanem (temperatura 23–25 °C), mirnem in tihem prostoru od oktobra do decembra v dopoldanskem času (med 8. in 13. uro). Preiskovanci so med meritvami ležali, niso se premikali in niso smeli govoriti. Na sredinec desne roke smo namestili manšeto za merjenje krvnega tlaka, na levo nadlaket manšeto za zažem nadlaktne arterije, LD-sondi s temperaturnima sondama na volarno podlaket in na blazinico sredinca leve roke ter na trup nalepili elektrode za merjenje EKG. Namestitev merilnih naprav in potek meritev prikazuje slika 2.



**Slika 2.** Shematski prikaz protokola meritev. Zgoraj: namestitev merilnih naprav; spodaj: časovnica protokola. M – manšeta za zažem, LDF – laserski dopplerski pretok, FP – arterijski tlak v arteriji prsta izmerjen z napravo Finapres, G – meritev plazemske koncentracije glukoze, Z – zažem, OGTT – oralni glukozni tolerančni test.

Preiskovancem smo izmerili  $c_{glu}$ , jih pokrili z odejo in pred začetkom meritev počakali 20 minut, da so se preiskovanci umirili.

Vse parametre smo najprej merili v mirovanju deset minut. Za tem smo za eno minuto napolnili manšeto na nadlakti nad sistolični tlak in zažem nemudoma sprostili. Po petminutnem neprekinjenem merjenju vseh količin smo zažem izvedli za tri minute in nadaljevali meritve deset minut. Preiskovanca smo namestili v polsedeč položaj, mu dali piti raztopino glukoze, ki jo je spil v manj kot eni minuti, in ga znova namestili v ležč položaj; 30 minut po pitju smo izmerili  $c_{glu}$  in meritve ponovili. Po končnih meritvah smo preiskovancem ponovno izmerili  $c_{glu}$  (slika 3).

Pri vseh preiskovancih smo pri drugem obisku v enakih pogojih znova opravili kontrolne meritve, pri katerih so namesto raztopine glukoze popili enako količino (2 dl) ustekleničene vode.

## Statistična analiza

LDF,  $p_{sis}$ ,  $p_{sred}$ ,  $p_{dia}$ ,  $p_{pulz}$  in  $t_{RR}$  smo določili kot časovno povprečje začetnega desetminutnega intervala meritev v mirovanju.  $LDF_{max}$  smo določili iz krivulje PORH. Dobljene spremenljivke smo preračunali v razlike med vrednostmi pred obremenitvijo in po obremenitvi – spremembe ( $\Delta$ količina = količina po obremenitvi – količina pred obremenitvijo). Izhodiščne vrednosti in spremembe prikazujemo kot mediane (prvi kvartil; tretji kvartil) za nenormalno porazdeljene spremenljivke in kot srednje vrednosti  $\pm$  standardni odklon (angl. *standard deviation*, SD) za normalno porazdeljene spremenljivke. Normalnost porazdelitve smo določali na podlagi testa Shapiro-Wilk. Razlike med poskusi z OGTT smo primerjali z razlikami med poskusi z obremenitvijo z vodo, in sicer z Wilcoxonovim testom,  $t_{RR}$  in  $c_{glu}$  pa smo primerjali s parnim testom t. Odvisnost spremembe  $LDF_{max}$  od spremembe koncentracije glukoze smo

opredelili z linearno regresijo. Preiskovance smo razdelili v dve skupini glede na velikost spremembe  $c_{glu}$  in  $LDF_{max}$  primerjali s testom Mann-Whitney. Vse statistične teste smo opravili z uporabo programske opreme SPSS 24 (IBM, Armonk, New York, ZDA). Kot statistično značilno smo upoštevali vrednost  $p \leq 0,05$ .

## REZULTATI

### Preiskovanci in izhodiščne vrednosti merjenih spremenljivk

Z izjemo dveh preiskovancev, ki se meritev v drugem sklopu (kontrolnih meritev) nista udeležila, smo meritve opravili pri vsakem preiskovancu dvakrat – meritve po OGTT in kontrolne meritve po obremenitvi z vodo. Izhodiščne vrednosti vseh merjenih spremenljivk pred obremenitvijo z OGTT ali z vodo prikazujemo v tabeli 1. Ugotovili smo, da so imeli preiskovanci pred obremenitvijo z OGTT višjo srčno frekvenco, nižja  $LDF_{baz}$  in  $LDF_{max}$  na podlakti po obeh časih zažema, zato moramo absolutne vrednosti spremenljivk interpretirati s previdnostjo in raje primerjati njihove spremembe (razlike med vrednostmi spremenljivk pred in po testu).

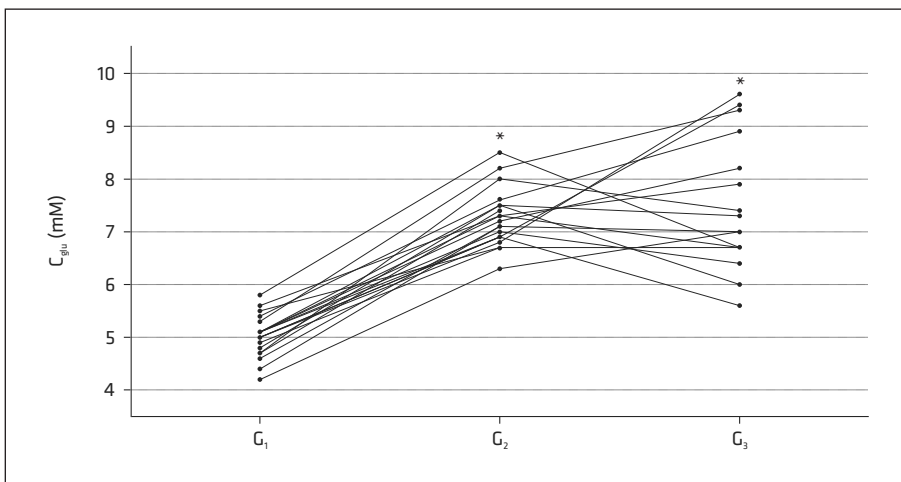
### Plazemska koncentracija glukoze po obremenitvi z glukozo

Po OGTT je  $c_{glu}$  narasla in do konca meritev ostala povišana pri vseh preiskovancih, kar prikazuje slika 3.

### Spremembe hemodinamskih spremenljivk po obremenitvi z glukozo

$LDF_{baz}$  se je na blazinici zmanjšal tako po OGTT kot po obremenitvi z vodo po enominutnem (OGTT:  $p = 0,019$ ; voda:  $p = 0,048$ ) in po triminutnem zažemu (OGTT:  $p = 0,033$ ; voda:  $p = 0,004$ ), vendar nismo našli statistično značilnih razlik med obremenitvijo z OGTT in z vodo (tabela 2).

Po OGTT se je po enominutnem zažemu  $LDF_{max}$  na blazinici značilno zmanjšal ( $p = 0,022$ ), po obremenitvi z vodo tega nismo



**Slika 3.** Koncentracija glukoze v plazmi pred OGTT (G1), 30 minut po OGTT (G2) in po zaključku meritev (G3). Porazdelitve podatkov G1, G2 in G3 so normalne. N = 20.  $c_{glu}$  – plazemska koncentracija glukoze, G1 – pred OGTT, G2 – 30 minut po OGTT, G3 – po zaključku meritev, \* $p < 0,05$  (parni test t), glede na izhodišče (G1).

**Tabela 1.** Značilnosti preiskovancev in izhodiščne vrednosti merjenih spremenljivk pred obremenitvijo z OGTT ali z vodo. Vrednosti prikazujemo kot mediane in interkvartilni razmik (prvi kvartil; tretji kvartil).  $c_{glu}$  – plazemska koncentracija glukoze,  $t_{RR}$  – interval med zobcema R v EKG,  $p_{sis}$ ,  $p_{sred}$ ,  $p_{dia}$ ,  $p_{pulz}$  – sistolični, srednji, diastolični in pulzni arterijski tlak,  $LDF_{baz}$  – laserski dopplerski pretok v mirovanju,  $LDF_{max}$  – največji laserski dopplerski pretok po sprostitvi zažema, PE – pretočna enota, OGTT – oralni glukozni tolerančni test, p – vrednost p (Wilcoxonov test).

		Izhodišče pred OGTT	Izhodišče pred obrem. z vodo	p	
Velikost vzorca		N = 20	N = 18		
Starost (leta)		21 (21; 22)	22 (22; 23)		
Moški		15	13		
Ženske		5	5		
$c_{glu}$ (mM)		5,0 (4,7; 5,2)	5,3 (4,9; 5,5)	0,210	
$t_{RR}$ (ms)		968 (918; 1.000)	1.029 (941; 1.163)	0,010 <sup>a</sup>	
$p_{sis}$ (mmHg)		115 (107; 124)	118 (103; 125)	0,831	
$p_{sred}$ (mmHg)		81 (77; 88)	83 (74; 87)	0,868	
$p_{dia}$ (mmHg)		66 (60; 69)	64 (59; 71)	0,981	
$p_{pulz}$ (mmHg)		52 (44; 55)	51 (45; 56)	0,687	
	Mesto	Zažem			
$LDF_{baz}$ (PE)	Podlaket	6,0 (4,7; 8,9)	7,3 (6,6; 8,5)	0,020 <sup>a</sup>	
	Blazinica	243 (174; 329)	313 (214; 345)	0,446	
$LDF_{max}$ (PE)	Podlaket	1 min	27 (21; 32)	33 (28; 39)	0,038 <sup>a</sup>
		3 min	41 (29; 51)	46 (36; 63)	0,025 <sup>a</sup>
	Blazinica	1 min	336 (254; 384)	399 (321; 418)	0,570
		3 min	336 (268; 457)	417 (368; 448)	0,777

<sup>a</sup>  $p \leq 0,05$

ugotovili ( $p = 0,127$ ). Tudi po triminutnem zažemu se je  $LDF_{max}$  značilno zmanjšal po OGTT ( $p = 0,006$ ), česar po obremenitvi z vodo nismo zasledili ( $p = 0,215$ ), prav tako ne sprememb LDF na podlakti. Ugotovili smo torej, da je obremenitev z OGTT vplivala na  $LDF_{max}$  na blazinici, vendar se sprememba ni statistično značilno razlikovala od tiste po obremenitvi z vodo. Mejno značilno razliko ( $p = 0,067$ ) med obremenitvijo z OGTT in vodo smo ugotovili le po triminutnem zažemu na blazinici (tabela 2).

Tako po OGTT kot po obremenitvi z vodo se je povečal  $p_{sis}$  (OGTT:  $p = 0,012$ , voda:

$p = 0,002$ ),  $p_{sred}$  se je povečal samo po obremenitvi z vodo ( $p = 0,001$ ),  $p_{dia}$  samo po obremenitvi z vodo ( $p = 0,001$ ) in  $p_{pulz}$  po obeh obremenitvah (OGTT:  $p = 0,003$ ; voda:  $p = 0,004$ ). Spremembe srčne frekvence niso bile značilne, a smo ugotovili trend večjih sprememb po OGTT v primerjavi z vodo (tabela 3).

### Zveza med koncentracijo glukoze in največjim pretokom

Ko smo primerjali, kako se je pri preiskovancu spremenil  $LDF_{max}$  glede na spremembo  $c_{glu}$ , smo ugotovili, da je bila na podlakti spre-

**Tabela 2.** Primerjava sprememb bazalnega pretoka in največjega pretoka po sprostitvi zažema po obremenitvi z OGTT in z vodo na obeh merilnih mestih. Rezultate prikazujemo kot mediane in interkvartilni razmik (prvi kvartil; tretji kvartil).  $\Delta LDF_{baz}$  – sprememba laserskega dopplerskega pretoka v mirovanju,  $\Delta LDF_{max}$  – sprememba največjega laserskega dopplerskega pretoka po sprostitvi zažema, PE – pretočna enota, OGTT – oralni glukozi tolerančni test, p – vrednost p (Wilcoxonov test).

	Zažem	Podlaket		p	Blazinica		p
		OGTT	voda		OGTT	voda	
$\Delta LDF_{baz}$ (PE)		0,7 (-0,8; 2,1)	0,5 (-0,3; 1,0)	0,286	-54,3 (-116,6; -6,3)	-55,9 (-81,4; -16,1)	0,711
$\Delta LDF_{max}$ (PE)	1 min	0,0 (-5,0; 7,0)	0,5 (-2,8; 13,0)	0,408	-37,0 (-97,0; 4,5)	-28,0 (-51,0; 8,8)	0,551
	3 min	-0,5 (-4,8; 6,8)	2,5 (-1,5; 6,5)	0,471	-32,0 (-78,0; -9,0)	-17,5 (-40,8; 8,0)	0,067

**Tabela 3.** Primerjava sprememb plazemske koncentracije glukoze, srčne frekvence in arterijskega tlaka po obremenitvi z OGTT in z vodo. Rezultate prikazujemo kot srednjo vrednost in SD pri normalni porazdelitvi oz. kot mediane in interkvartilni razmik (prvi kvartil; tretji kvartil), če porazdelitev ni normalna.  $\Delta c_{glu}$  – sprememba plazemske koncentracije glukoze,  $\Delta t_{RR}$  – sprememba intervala RR v EKG,  $\Delta p_{sis}$ ,  $\Delta p_{sred}$ ,  $\Delta p_{dia}$ ,  $\Delta p_{pulz}$  – sprememba sistoličnega, srednjega, diastoličnega in pulznega arterijskega tlaka, OGTT – oralni glukozi tolerančni test, p – vrednost p (parni test t za normalno in Wilcoxonov test za nenormalno porazdeljene spremenljivke).

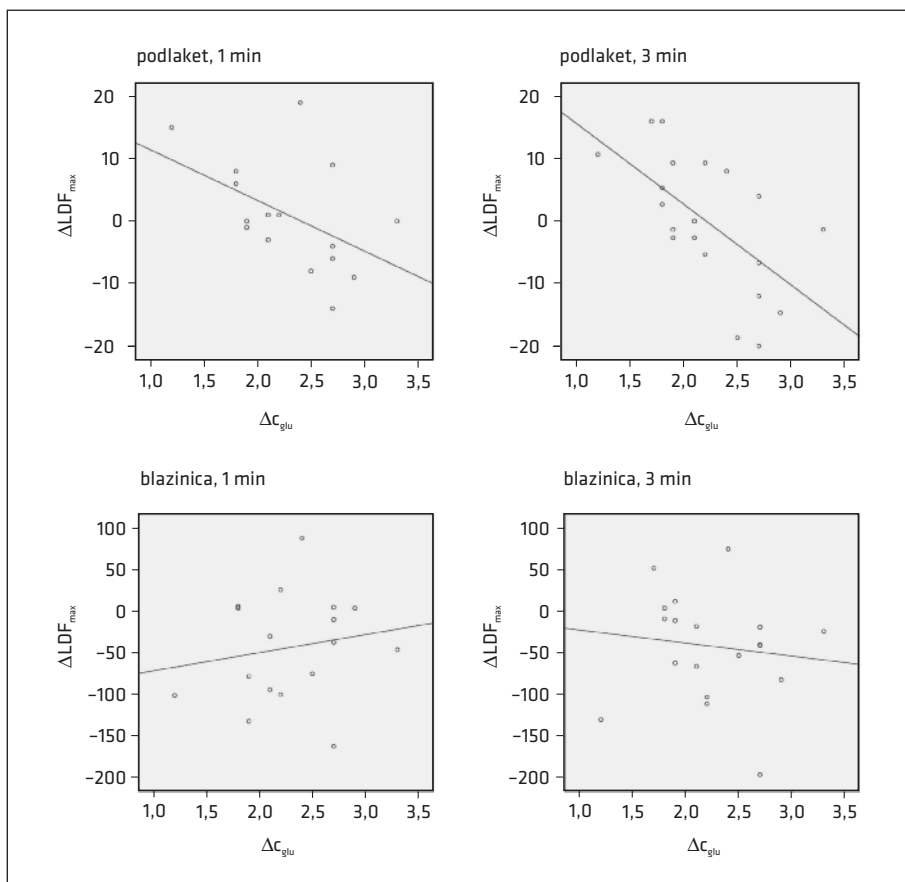
	OGTT	Voda	p
$\Delta c_{glu}$ (mM)	2,2 ± 0,5	0,0 ± 0,5	< 0,001 <sup>a</sup>
$\Delta t_{RR}$ (ms)	-15,8 ± 63,9	26,0 ± 94,2	0,113
$\Delta p_{sis}$ (mmHg)	10,2 (-1,2; 19,3)	11,6 (4,9; 17,5)	0,266
$\Delta p_{sred}$ (mmHg)	4,1 (-3,0; 10,5)	6,4 (3,3; 11,4)	0,136
$\Delta p_{dia}$ (mmHg)	0,7 (-4,0; 5,8)	6,2 (2,1; 7,6)	0,044 <sup>a</sup>
$\Delta p_{pulz}$ (mmHg)	7,3 (3,2; 11,9)	5,9 (1,2; 10,3)	0,868

<sup>a</sup>  $p \leq 0,05$



membra  $LDF_{max}$  negativno sorazmerna spremembi  $c_{glu}$  po enominutnem (koeficient sorazmerja:  $-8,1$ ; 95-% interval zaupanja:  $[-16,1; -0,1]$ ;  $R^2 = 0,24$ ;  $p = 0,047$ ) in po triminutnem zažemu (koeficient sorazmerja:  $-9,7$ ; 95-% interval zaupanja:  $[-15,8; -3,6]$ ,  $R^2 = 0,38$ ;  $p = 0,004$ ) (slika 4). Zveze na blazinici po enominutnem ( $p = 0,506$ ) ali po triminutnem zažemu ( $p = 0,597$ ) nismo ugotovili. Če smo razdelili preiskovance na tiste, pri katerih je bila sprememba  $c_{glu}$  30 minut po OGTT večja kot  $2,3$  mM, in ostale, smo ugotovili, da je bila v skupini z večjo spremembo  $c_{glu}$  sprememba  $LDF_{max}$  bolj ne-

gativna kot pri tistih z manjšo spremembo  $c_{glu}$  (pri teh je bila na podlakti celo pozitivna): v skupini z manjšo spremembo  $c_{glu}$  po enominutnem zažemu so bile spremembe  $LDF_{max}$  na podlakti  $1,0$  PE ( $0,0; 6,0$ ) in v skupini z večjo spremembo  $c_{glu}$   $-5,0$  PE ( $-8,3; 2,3$ ), po triminutnem zažemu pa  $3,0$  PE ( $-1,3; 7,3$ ) oz.  $-7,0$  PE ( $-11,0; 0,0$ ). Skupini se po enominutnem zažemu med seboj nista razlikovali ( $p = 0,123$ ), pri triminutnem zažemu pa smo ugotovili statistično značilno bolj negativne spremembe  $LDF_{max}$  v skupini z večjo spremembo  $c_{glu}$  ( $p = 0,017$ ; test Mann-Whitney). Na blazinici zveze nismo



**Slika 4.** Odvisnost spremembe največjega pretoka po sprostitvi zažema po OGTT od spremembe plazemske koncentracije glukoze. Nad posameznim grafom je označeno merilno mesto in čas trajanja zažema. Premica označuje odvisnost med spremenljivkama.  $\Delta LDF_{max}$  – sprememba največjega pretoka po sprostitvi zažema,  $\Delta c_{glu}$  – sprememba plazemske koncentracije glukoze.

ugotovili. Preiskovanci v skupinah z večjo in manjšo spremembo  $c_{glu}$  se po starosti niso značilno razlikovali ( $p = 0,619$ ; test Mann-Whitney).

## RAZPRAVA

Z raziskavo smo potrdili, da je akutna hiperglikemija povezana z zmanjšano žilno reaktivnostjo, ki pa najverjetneje ni posledica zmanjšane endotelijske funkcije, saj nismo potrdili enoznačne povezave med akutno hiperglikemijo in od endotelija odvisno vazodilatacijo. Predpostavljamo, da akutna hiperglikemija vpliva na sistemski nadzor pretoka v mikrožilju preko spremembe tonusa simpatičnega živčevja, medtem ko je v endotelijski nadzor žilne funkcije verjetno vpleteno delovanje inzulina med hiperglikemijo. Naše ugotovitve se skladajo z ugotovitvami nekaterih podobnih raziskav, kjer so v različnih pogojih raziskovali vpliv akutne hiperglikemije na endotelij, medtem ko so v nekaterih drugih raziskavah ugotovili nasprotno (17, 20–26, 39). Različne ugotovitve so lahko posledica različnih raziskovalnih pristopov, različne vzdraženosti avtonomnega živčevja, različne  $c_{glu}$  ali vpliva hiperinzulinemije na endotelijsko funkcijo in morda s tem povezano starostjo preiskovancev.

Akbari in sodelavci so ugotovili, da se je endotelijska funkcija po obremenitvi z glukozo zmanjšala, vendar ugotovitev niso primerjali s kontrolno skupino, v kateri bi preiskovance obremenili zgolj s tekočino (20). Predvidevamo, da bi zmanjšan odziv na iontoforezo acetilholina (ki so jo uporabili za oceno endotelijske funkcije) in zmanjšano PORH, ki so ju izmerili, lahko pripisali volumski obremenitvi prebavil s tekočino, ki naj bi, skladno z izsledki raziskave Scotta in sodelavcev, povečala vzdraženost simpatičnega vazokonstriktorskega nitja in s tem vplivala na krvne pretoke v mirovanju in reaktivnost žilja (40). Simpatični vazokonstriktorski odziv bi lahko povzročil tudi stres, ki ga raziskovalni

postopek predstavlja preiskovancu (41). V nekaterih raziskavah so namreč pokazali, da akutna hiperglikemija poveča vzdraženost simpatika, kar so druge raziskave ovrgle (29, 42). V naši raziskavi smo morebiten vpliv simpatika ocenjevali z merjenjem sprememb sistemskih hemodinamskih spremenljivk (arterijskega tlaka in srčne frekvenca). Spremembe vrednosti arterijskega tlaka in srčne frekvenca so bile primerljive med obremenitvijo z OGTT in z vodo. Med obremenitvijo z OGTT in vodo se je razlikovala le sprememba diastoličnega tlaka, ki je po OGTT padel bolj kot po obremenitvi z vodo. Morda je manjšo spremembo diastoličnega tlaka po OGTT povzročila višja osmolarnost zaužite tekočine (43). Oceno vzdraženosti simpatika bi zato v naši raziskavi morali izboljšati, denimo z analizo variabilnosti srčne frekvenca, kar načrtujemo v prihodnje.

Tudi v nekaterih drugih raziskavah, v katerih so preiskovanci izvedli OGTT in kontrolno obremenitev z vodo, so med akutno hiperglikemijo pri zdravih ugotovili zmanjšano endotelijsko funkcijo (21, 24, 26). Vendar pa so bili preiskovanci v povprečju 8–14 let starejši kot v naši raziskavi. Možen vzrok za različne rezultate bi lahko bila drugačna kinetika glukoze v plazmi in s tem različna  $c_{glu}$  pri starejših preiskovancih (v primerjavi z mlajšimi). Loader in sodelavci so izmerili najvišjo koncentracijo  $8,85 \pm 0,36$  mM 40 minut po pitju sladkane pijače, ki je vsebovala 72,5 g neopredeljenega sladkorja (24). Ta koncentracija je bila v povprečju višja kot v naši raziskavi, a natančnih podatkov za primerjavo nimamo. Še višjo plazemsko koncentracijo glukoze, 16,7 mM, so izmerili Williams in sodelavci, ki so akutno hiperglikemijo povzročili z intraarterijsko infuzijo dekstroze (26). Ugotovili so, da se je endotelijska funkcija mikrožilja kože zmanjšala med šest ur trajajočo infuzijo dekstroze, tako brez in s sočasno inhibicijo izločanja inzulina z oktreotidom (26). To bi lahko pomenilo, da so pri

dovolj visoki  $c_{\text{glu}}$  učinki glukoze na zmanjšanje endotelijske funkcije prevladali nad učinki inzulina, ki poveča razpoložljivost endotelijskih vazodilatatorjev (9, 14–16).

Zanimivo je, da v drugi raziskavi pri preiskovancih povprečne starosti 22 let, v katerih so z intraarterijsko infuzijo dosegli  $c_{\text{glu}}$  18 mM, učinka na endotelijsko funkcijo mikrožilja kože niso izmerili, ko so meritve opravili 20, 40 in 60 minut po začetku infuzije (23). Rezultati so skladni z rezultati naše raziskave. Prav tako pri enaki starostni skupini učinka na mikrožilje niso izmerili, ko so infuzijo podaljšali na 6, 12 in 24 ur (22). V slednjem primeru so hiperglikemijo povzročili lokalno na zgornji okončini in vselej spremljali, da se plazemska koncentracija glukoze v nasprotni zgornji okončini ni povišala. Nasprotno pa so zmanjšano endotelijsko funkcijo izmerili v raziskavi, kjer so meritve opravili dve uri po OGTT, ko je bila  $c_{\text{glu}}$  v normoglikemičnem območju, koncentracija inzulina pa še povišana – spet so bili preiskovanci v povprečju deset let starejši od naših (21). Zato menimo, da je zmanjšana endotelijska funkcija, ki so jo pokazali v nekaterih raziskavah, lahko posledica spremenjene signalne poti inzulina v endoteliju, kot so potrdili na izoliranih živalskih arterijah, in ne hiperglikemija sama (16). S tem se skladajo tudi naši rezultati – pri preiskovancih, pri katerih smo izmerili večje spremembe  $c_{\text{glu}}$  po OGTT, smo namreč izmerili manjše odzive PORH, kar lahko kaže na zmanjšano odzivnost na inulin pri teh preiskovancih ali na nižjo koncentracijo inzulina pri njih. Podobno so ugotovili v drugi raziskavi, v kateri so največji vpliv na endotelijsko funkcijo izmerili med preiskovanci z moteno toleranco za glukozo in kompenzatorno hipersekrecijo inzulina (17). Vpliv na endotelij ni bil povezan s plazemsko koncentracijo glukoze, saj tako pri mladih kot pri sladkornih bolnikih, pri katerih je bila  $c_{\text{glu}}$  najvišja, vpliva niso pokazali (17).

V naši raziskavi smo vpliv na endotelijsko funkcijo vrednotili z oceno PORH po dveh različnih časih zažema proksimalne arterije in na dveh različnih merilnih mestih. V odzivu PORH, ki sledi krajšemu zažemu, naj bi na vazodilatacijo po sprostitvi zažema najbolj vplivali endotelijski vazodilatatorji, po daljših zažemih pa presnovni, miogeni in nevrogeni mehanizmi (35, 36). Poleg tega je odziv PORH na blazinici, kjer je veliko s simpatikom oživčenih arteriovenskih anastomoz, pretežno pod nadzorom centralnih mehanizmov (vegetativnega živčevja), medtem ko je vpliv vegetativnega živčevja na volarni strani podlakti manjši, vpliv endotelija pa večji (34). V naši raziskavi je bila razlika v odzivu PORH po OGTT v primerjavi z obremenitvijo z vodo mejno značilna le po daljšem zažemu na blazinici, kar bi lahko pripisali od endotelija neodvisnim mehanizmom, denimo simpatiku. To lahko razložimo s prej omenjenim vplivom akutne hiperglikemije na vzdraženost simpatika in z izsledki raziskave na kulturi gladkomišičnih celic podganje aorte (27, 29). V omenjeni raziskavi so namreč ugotovili, da je glukozna vpletena v znotrajcelično signalizacijo s  $\text{Ca}^{2+}$  in s tem povezanim krčenjem gladkih mišic žil (4, 27). Po drugi strani smo v naši raziskavi povezavo med velikostjo spremembe  $c_{\text{glu}}$  in spremembo odziva PORH zasledili le pri krajšem zažemu in samo na podlakti, kar lahko potrjuje vpletenost endotelija. Predpostavljamo, da povišana koncentracija inzulina, ki razmeroma hitro sledi povišanju koncentracije glukoze, nasprotuje zmanjšanju od endotelija odvisne vazodilatacije zaradi same hiperglikemije, vendar pa bi morali za potrditev te domneve izmeriti kinetiko plazemske koncentracije inzulina, kar načrtujemo v nadaljnji raziskavi (17, 25). Poleg tega bi za zanesljivejše ugotovitve potrebovali večji vzorec preiskovancev.

Z raziskavo torej nismo ugotovili, da bi akutna hiperglikemija neposredno zmanjšala endotelijsko funkcijo mikrožilja kože.

Predvidevamo, da na reaktivnost mikrožilja bolj kot akutna hiperglikemija neposredno vpliva inzulin, učinki katerega so odvisni od spremenjenih signalnih poti

v endoteliju. Akutna hiperglikemija verjetno vpliva tudi na aktivnost simpatičnega živčevja, ki spremeni reaktivnost in s tem vazodilatacijsko sposobnost mikrožilja.

## LITERATURA

1. Mapanga RF, Essop MF. Damaging effects of hyperglycemia on cardiovascular function: spotlight on glucose metabolic pathways. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2016; 310 (2): H153–H73.
2. Cassuto J, Dou H, Czikora I, et al. Peroxynitrite disrupts endothelial caveolae leading to eNOS uncoupling and diminished flow-mediated dilation in coronary arterioles of diabetic patients. *Diabetes*. 2014; 63 (4): 1381–93.
3. Xia P, Inoguchi T, Kern TS, et al. Characterization of the mechanism for the chronic activation of diacylglycerol-protein kinase C pathway in diabetes and hypergalactosemia. *Diabetes*. 1994; 43 (9): 1122–9.
4. Inoguchi T, Battan R, Handler E, et al. Preferential elevation of protein kinase C isoform beta II and diacylglycerol levels in the aorta and heart of diabetic rats: differential reversibility to glycemic control by islet cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992; 89 (22): 11059–63.
5. Mori A, Suzuki S, Sakamoto K, et al. Vasodilation of retinal arterioles induced by activation of BKCa channels is attenuated in diabetic rats. *Eur J Pharmacol*. 2011; 669 (1–3): 94–9.
6. Bohlen HG, Lash JM. Topical hyperglycemia rapidly suppresses EDRF-mediated vasodilation of normal rat arterioles. *Am J Physiol*. 1993; 265 (1 Pt 2): H219–H25.
7. Graier WF, Simecek S, Kukovetz WR, et al. High D-glucose-induced changes in endothelial Ca<sup>2+</sup>/EDRF signaling are due to generation of superoxide anions. *Diabetes*. 1996; 45 (10): 1386–95.
8. Ng HH, Leo CH, O'Sullivan K, et al. 1,4-Anhydro-4-seleno-d-talitol (SeTal) protects endothelial function in the mouse aorta by scavenging superoxide radicals under conditions of acute oxidative stress. *Biochem Pharmacol*. 2017; 128: 34–45.
9. Sobrevia L, Nadal A, Yudilevich DL, et al. Activation of L-arginine transport (system y<sup>+</sup>) and nitric oxide synthase by elevated glucose and insulin in human endothelial cells. *The J Physiol*. 1996; 490 (Pt 3): 775–81.
10. Tesfamariam B, Brown ML, Deykin D, et al. Elevated glucose promotes generation of endothelium-derived vasoconstrictor prostanoids in rabbit aorta. *J Clin Invest*. 1990; 85 (3): 929–32.
11. Tsai S-H, Hein TW, Kuo L, et al. High glucose impairs EDHF-mediated dilation of coronary arterioles via reduced cytochrome P450 activity. *Microvasc Res*. 2011; 82 (3): 356–63.
12. Zhou ZW, Xie XL, Zhou SF, et al. Mechanism of reversal of high glucose-induced endothelial nitric oxide synthase uncoupling by tanshinone IIA in human endothelial cell line EA.hy926. *Eur J Pharmacol*. 2012; 697 (1–3): 97–105.
13. Arce-Esquivel AA, Bunker AK, Mikus CR, et al. Insulin resistance and endothelial dysfunction: macro and microangiopathy. In: Masuo K, ed. *Type 2 diabetes* [Internet]. InTech; 2013 [citirano 2019 Feb 14]. Dosegljivo na: <http://www.intechopen.com/books/type-2-diabetes/insulin-resistance-and-endothelial-dysfunction-macro-and-microangiopathy>
14. Imaeda K, Okayama N, Okouchi M, et al. Effects of insulin on the acetylcholine-induced hyperpolarization in the guinea pig mesenteric arterioles. *J Diabetes Complications*. 2004; 18 (6): 356–62.
15. Zeng G, Quon MJ. Insulin-stimulated production of nitric oxide is inhibited by wortmannin. Direct measurement in vascular endothelial cells. *J Clin Invest*. 1996; 98 (4): 894–8.
16. Huang SS, Lu YJ, Huang JP, et al. The essential role of endothelial nitric oxide synthase activation in insulin-mediated neuroprotection against ischemic stroke in diabetes. *J Vasc Surg*. 2014; 59 (2): 483–91.
17. Natali A, Baldi S, Vittone F, et al. Effects of glucose tolerance on the changes provoked by glucose ingestion in microvascular function. *Diabetologia*. 2008; 51 (5): 862–71.
18. Wilhelm B, Weber MM, Kreisselmeier HP, et al. Endothelial function and arterial stiffness in uncomplicated type 1 diabetes and healthy controls and the impact of insulin on these parameters during an euglycemic clamp. *J Diabetes Sci Technol*. 2007; 1 (4): 582–9.

19. Woerdeman J, Meijer RI, Eringa EC, et al. Insulin sensitivity determines effects of insulin and meal ingestion on systemic vascular resistance in healthy subjects. *Microcirculation*. 2016; 23 (1): 62–8.
20. Akbari CM, Saouaf R, Barnhill DF, et al. Endothelium-dependent vasodilatation is impaired in both microcirculation and macrocirculation during acute hyperglycemia. *J Vasc Surg*. 1998; 28 (4): 687–94.
21. De Marchi S, Prior M, Rigoni A, et al. Ascorbic acid prevents vascular dysfunction induced by oral glucose load in healthy subjects. *Eur J Intern Med*. 2012; 23 (1): 54–7.
22. Houben AJHM, Schaper NC, de Haan CHA, et al. Local 24-h hyperglycemia does not affect endothelium-dependent or -independent vasoreactivity in humans. *Am J Physiol*. 1996; 270 (6 Pt 2): H2014–H20.
23. Houben AJ, Schaper NC, Kruseman AC, et al. Acute effects of local hyperglycaemia on peripheral blood flow in man. *Diabet Med*. 1993; 10 (1): 39–43.
24. Loader J, Meziat C, Watts R, et al. Effects of sugar-sweetened beverage consumption on microvascular and macrovascular function in a healthy population. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2017; 37 (6): 1250–60.
25. Title LM, Cummings PM, Giddens K, et al. Oral glucose loading acutely attenuates endothelium-dependent vasodilation in healthy adults without diabetes: an effect prevented by vitamins C and E. *J Am Coll Cardiol*. 2000; 36 (7): 2185–91.
26. Williams SB, Goldfine AB, Timimi FK, et al. Acute hyperglycemia attenuates endothelium-dependent vasodilation in humans in vivo. *Circulation*. 1998; 97 (17): 1695–701.
27. El-Najjar N, Kulkarni RP, Nader N, et al. Effects of hyperglycemia on vascular smooth muscle Ca<sup>2+</sup> signaling. *Biomed Res Int*. 2017; 2017: 3691349.
28. Hien TT, Turczyńska KM, Dahan D, et al. Elevated glucose levels promote contractile and cytoskeletal gene expression in vascular smooth muscle via rho/protein kinase C and actin polymerization. *J Biol Chem*. 2016; 291 (7): 3552–68.
29. Marfella R, Nappo F, De Angelis L, et al. The effect of acute hyperglycaemia on QTc duration in healthy man. *Diabetologia*. 2000; 43 (5): 571–5.
30. Paolisso G, Manzella D, Ferrara N, et al. Glucose ingestion affects cardiac ANS in healthy subjects with different amounts of body fat. *Am J Physiol*. 1997; 273 (3 Pt 1): E471–E8.
31. Cracowski JL, Minson CT, Salvat-Melis M, et al. Methodological issues in the assessment of skin microvascular endothelial function in humans. *Trends Pharmacol Sci*. 2006; 27 (9): 503–8.
32. Serup J, Jemec GBE, Grove GL, et al. Handbook of non-invasive methods and the skin [Internet]. CRC Press; 2006 [citirano 2019 Feb 14]. Dosegljivo na: <https://www.taylorfrancis.com/books/9781420003307>
33. Johnson JM, Taylor WF, Shepherd AP, et al. Laser-Doppler measurement of skin blood flow: comparison with plethysmography. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol*. 1984; 56 (3): 798–803.
34. Lenasi H. Assessment of human skin microcirculation and its endothelial function using laser doppler flowmetry. In: Erondü OF, ed. *Medical Imaging* [Internet]. InTech; 2011 [citirano 2019 Feb 14]. Dosegljivo na: <http://www.intechopen.com/books/medical-imaging/assessment-of-human-skin-microcirculation-and-its-endothelial-function-using-laser-doppler-flowmetry>
35. Tee GB, Rasool AH, Halim AS, et al. Dependence of human forearm skin postocclusive reactive hyperemia on occlusion time. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2004; 50 (1): 73–8.
36. Yvonne-Tee GB, Rasool AH, Halim AS, et al. Method optimization on the use of postocclusive hyperemia model to assess microvascular function. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2008; 38 (2): 119–33.
37. Yvonne-Tee GB, Rasool AH, Halim AS, et al. Reproducibility of different laser Doppler fluximetry parameters of postocclusive reactive hyperemia in human forearm skin. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2005; 52 (2): 286–92.
38. Rašić L, Čavka A, Bari F, et al. Reproducibility of post-occlusion reactive hyperaemia. *Period Biol*. 2014; 116 (1): 77–82.
39. Varsamis P, Walther G, Share B, et al. Transient endothelial dysfunction induced by sugar-sweetened beverage consumption may be attenuated by a single bout of aerobic exercise. *Microvasc Res*. 2018; 115: 8–11.
40. Scott EM, Greenwood JP, Gilbey SG, et al. Water ingestion increases sympathetic vasoconstrictor discharge in normal human subjects. *Clin Sci (Lond)*. 2001; 100 (3): 335–42.
41. Muller MD, Sauder CL, Ray CA. Mental stress elicits sustained and reproducible increases in skin sympathetic nerve activity. *Physiol Rep*. 2013; 1 (1): e00002.
42. van Gurp PJ, Rongen GA, Lenders JW, et al. Sustained hyperglycaemia increases muscle blood flow but does not affect sympathetic activity in resting humans. *Eur J Appl Physiol*. 2005; 93 (5–6): 648–54.
43. Brown CM, Barberini L, Dulloo AG, et al. Cardiovascular responses to water drinking: does osmolality play a role? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005; 289 (6): R1687–R92.