

Zastosowanie pookluzyjnej reakcji przekrwiennej w ocenie funkcji śródbłonna mikrokrążenia

The use of post-occlusive reactive hyperemia in assessment of microvascular endothelial function

Maria Tarnawska¹, Maria Dudziak², Marcin Hellmann²

¹Katedra i Klinika Kardiologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

²Zakład Diagnostyki Chorób Serca II Katedry Kardiologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

STRESZCZENIE

Dysfunkcja śródbłonna to ogólnoustrojowy proces chorobowy, w którym dochodzi do osłabienia potencjału wazodylatacyjnego i wzmożenia wazokonstrykcji. Pookluzyjna reakcja przekrwienne (PORH) jest uznanym testem oceny funkcji śródbłonna mikrokrążenia. W celu obserwacji zmian perfuzji mikrokrążenia w odpowiedzi na PORH najczęściej wykorzystuje się techniki laserowo-dopplerowskie. Od niedawna dostępna jest nowa nieinwazyjna metoda oceny mikrokrążenia opierająca się na monitorowaniu fluorescencji dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego. Technika pozwala nie tylko na ocenę funkcji mikrokrążenia w okresie po niedokrwieniu, ale co istotne — umożliwia ocenę reakcji na przejściowe niedokrwienie tkanki. Istnieją przekonujące dowody na istnienie związku między dysfunkcją mikrokrążenia a patogenezą chorób układu sercowo-naczyniowego.

Choroby Serca i Naczyń 2016, 13 (6), 429–433

Słowa kluczowe: pookluzyjna reakcja przekrwienne, śródbłonek, mikrokrążenie

ABSTRACT

Endothelial dysfunction is a globalized systemic disease process consisting of attenuated vasodilation and augmented vasoconstriction. Post-occlusive reacti-

ve hyperemia (PORH) is commonly used as a marker of microvascular endothelial function. Laser-Doppler techniques are the most commonly used methods to observe changes in microvascular perfusion in response to PORH. Recently, there is a new non-invasive method to assess microcirculation, which is based on monitoring of the dihydronicotinamide adenine dinucleotide fluorescence. This method allows not only to evaluate microvascular function in the post-ischemic period, but also to assess it during transient ischemia of the tissue. There is compelling evidence for a link between microvascular dysfunction and the pathogenesis of cardiovascular disease.

Choroby Serca i Naczyń 2016, 13 (6), 429–433

Key words: post-occlusive reactive hyperemia, endothelium, microcirculation

WPROWADZENIE

Choroby serca i naczyń są wiodącą przyczyną zgonu w krajach rozwiniętych. Istnieją przekonujące dowody na to, że dysfunkcja śródbłonna mikrokrążenia jest jednym z najwcześniejszych etapów w patogenezie chorób układu krążenia — wyprzedza zmiany patologiczne w dużych naczyniach oraz wystąpienie objawów klinicznych [1]. Zdrowy śródbłonek odgrywa kluczową rolę w procesach hamowania agregacji płytek krwi, koagulacji i fibrynolizie, jak również w istotny sposób wpływa na regulację napięcia ściany naczyń przez wydzielanie takich substancji wazoaktywnych, jak tlenek azotu (NO, *nitric oxide*), prostacyklina czy śródbłonkowy czynnik hiperpolaryzujący (EDHF, *endothelium derived hyperpolarizing factor*). Dysfunkcja śródbłonna to ogólnoustrojowy proces chorobowy, w którym dochodzi do zaburzenia równowa-

Adres do korespondencji:

dr hab. n. med. Marcin Hellmann
Zakład Diagnostyki Chorób Serca
II Katedra Kardiologii
Gdański Uniwersytet Medyczny
ul. Smoluchowskiego 17, 80–214 Gdańsk
tel. 58 349 33 80, faks 58 349 33 79
e-mail: marcin.hellmann@gmail.com

gi między wydzielaniem śródbłonkowych mediatorów wazodylatacyjnych i wazokonstrykcyjnych, a także do osłabienia mechanizmów antymitogennych i antytrombogennych [2]. Wydaje się zatem, że wczesna diagnostyka zaburzeń funkcji śródbłonka mikrokrążenia może mieć istotne znaczenie kliniczne [3].

Mikrokrążenie jest częścią systemu sercowo-naczyniowego, zlokalizowaną między układem tętniczym a żylnym. Naczynia mikrokrążenia mają średnicę poniżej 200 μm , a w ich skład wchodzi tętniczki, naczynia włosowate, żyłki oraz zespolenia tętniczo-żylnie (anastomozy). Mikrokrążenie jest bardzo heterogenną — zarówno morfologicznie, jak i funkcjonalnie — częścią układu krążenia. Wynika to ze specyficznego dla danej tkanki bądź narządu zapotrzebowania metabolicznego. Na poziomie mikrokrążenia zachodzi intensywna wymiana gazowa i metaboliczna, a optymalna reaktywność naczyń mikrokrążenia w odpowiedzi na niedokrwienie jest kluczowa, by ograniczyć stopień uszkodzenia tkanek. W związku z tym badanie mikrokrążenia w spoczynku rzadko dostarcza istotnych informacji na temat funkcji śródbłonka oraz potencjału wazodylatacyjnego naczyń. Wartość poznawcza badań nad mechanizmami regulacyjnymi mikrokrążenia wzrasta po zastosowaniu prowokacji mechanicznej bądź farmakologicznej [4]. Wśród stosowanych testów reaktywności najbardziej fizjologicznym bodźcem wydają się niedokrwienie spowodowane okluzją naczyń oraz obserwacja zmian występujących w naczyniu w wyniku reperfuzji.

Liczne badania dowodzą, że łatwo dostępne łożysko mikrokrążenia skórne jest reprezentatywnym obszarem do oceny systemowej funkcji mikrokrążenia. Udowodniono związek między dysfunkcją mikrokrążenia skórne a innymi łożyskami naczyniowymi. Wykazano również, że reaktywność mikrokrążenia skórne jest zaburzona w populacji ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia choroby niedokrwiennej serca [5].

MECHANIZMY REGULACYJNE POKLUZYJNEJ REAKCJI PRZEKRWIENNEJ

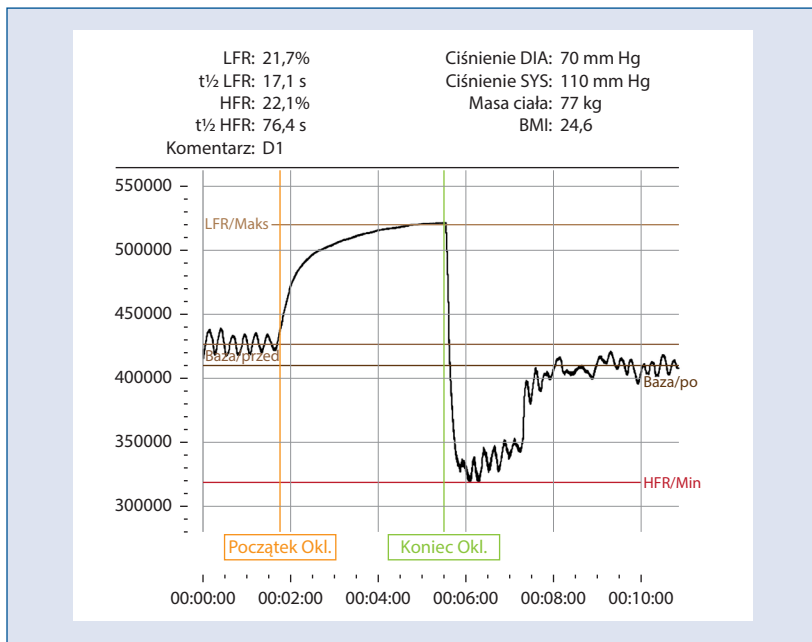
Pookluzyjna reakcja przekrwienna (PORH, *post-occlusive reactive hyperemia*) jest uznanym testem służącym do oceny reaktywności naczyń mikrokrążenia [6]. Ostatnie badania nad mechanizmami regulacyjnymi PORH uzasadniają jej stosowanie jako testu do oceny funkcji śródbłonka mikrokrążenia. Udowodniono, że kilka mediatorów, na czele z odruchem aksonalnym (włóknkowym) oraz EDHF, uczestniczy w obserwowanej

reakcji. Zastosowanie miejscowego znieczulenia skóry za pomocą kremu zawierającego lidokainę lub prilokainę częściowo hamuje odpowiedź szczytową PORH, co potwierdza, że za reakcję przekrwienną w dużej części odpowiadają nerwy czuciowe [7]. Z kolei blokowanie kanałów potasowych aktywowanych jonami wapnia o dużym przewodnictwie (BK-Ca) oraz hamowanie metabolizmu cytochromu CYP (kwasów epoksyekoza-trienowych) zaburza odpowiedź naczyniową w teście PORH, co sugeruje istotny udział czynnika EDHF [8]. Udowodniono, że NO jest silnym czynnikiem rozszerzającym naczynia mikrokrążenia w mięśniach szkieletowych oraz tętnicach typu mięśniowego. W wyniku generowania cyklicznego guazynomonofosforanu (cGMP, *cyclic guanosine monophosphate*) dochodzi do rozkurczu mięśni gładkich naczyń krwionośnych prowadzącego do wazodylatacji. W przeciwieństwie do wymienionych wcześniej łożysk naczyniowych, zablokowanie syntazy tlenku azotu (NOS, *nitric oxide synthase*) nie wpływa na przebieg odpowiedzi przekrwienną w mikrokrążeniu skórnym. W ostatnich badaniach dowodzi się również, że zastosowanie nieselektywnych inhibitorów cyklooksygenazy nie ma wpływu na przebieg pookluzyjnej wazodylatacji u osób zdrowych, co jest dowodem na brak udziału prostanoidów w tej reakcji [9].

METODY OCENY POKLUZYJNEJ REAKCJI PRZEKRWIENNEJ

Pookluzyjną reakcję przekrwienną wykonuje się, umieszczając mankiety do pomiaru ciśnienia tętniczego na ramieniu i rejestrując przepływ krwi w mikrokrążeniu w obrębie przedramienia. Mankiet pompuje się 50 mm Hg powyżej wartości ciśnienia skurczowego. Typowy czas okluzji trwa 3–5 min. Po zwolnieniu okluzji obserwuje się natychmiastowe zwiększenie perfuzji. W celu obserwacji zmian perfuzji mikrokrążenia w odpowiedzi na PORH najczęściej wykorzystuje się techniki laserowo-doplerowskie. Metody te pozwalają na analizę zmian wielkości przepływu powstałych w wyniku okluzji tętnicy ramiennej. Najczęściej ocenianym parametrem jest wartość szczytowa często wyrażana jako procent przepływu spoczynkowego. Możliwe są również ocena czasu narastania szczytu perfuzji oraz obliczenie pola pod krzywą (AUC, *area under the curve*) dla całego czasu trwania reakcji [10, 11].

Od niedawna dostępna jest nowa nieinwazyjna metoda oceny mikrokrążenia opierająca się na monitorowaniu fluorescencji dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego



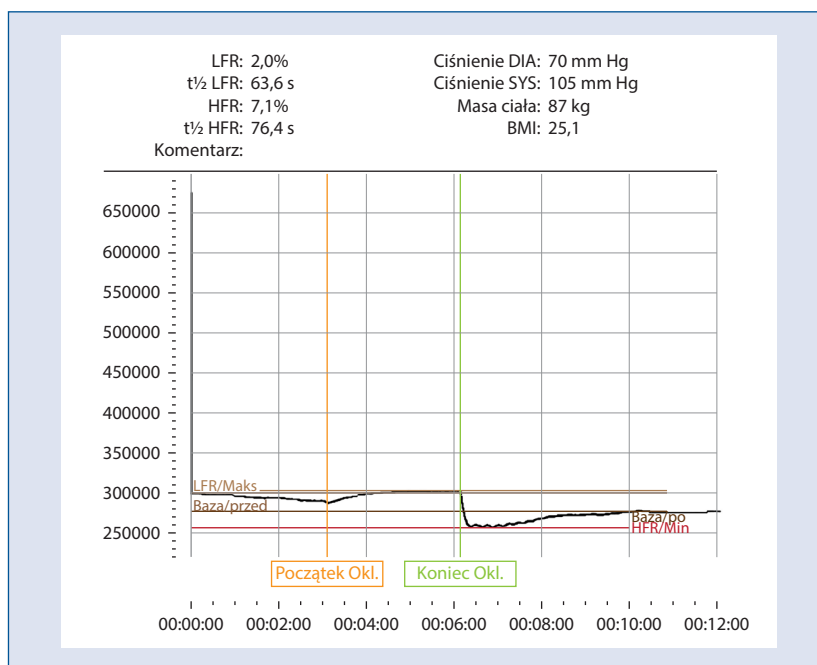
Rycina 1. Rejestracja zmian fluorescencji dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NADH, *dihydronicotinamide adenine dinucleotide*) w następstwie zmian przepływu krwi w naczyniach mikrokrążenia (FMSF, *flow mediated skin fluorescence*) podczas niedokrwienia i w okresie reperuzji u zdrowego 60-letniego mężczyzny aktywnie uprawiającego sport. Wyraźnie widać oscylacje związane z przepływem spoczynkowym w mikrokrążeniu. Można zaobserwować wysokie wartości parametru odpowiedzi na niedokrwienie (LFR, *low flow response*), jak również wysokie wartości odpowiedzi reperfuzyjnej (HFR, *high flow response*) związane ze wzrostem przepływu w mikrokrążeniu w okresie reperuzji, co świadczy m.in. o dobrej funkcji śródbłonna; DIA (*diastolic*) — rozkurczowe ciśnienie tętnicze; SYS (*systolic*) — skurczowe ciśnienie tętnicze; BMI (*body mass index*) — wskaźnik masy ciała

(NADH, *dihydronicotinamide adenine dinucleotide*) w następstwie zmian przepływu krwi w naczyniach mikrokrążenia (FMSF, *flow mediated skin fluorescence*). Metoda FMSF pozwala nie tylko na ocenę reaktywności mikrokrążenia w okresie po niedokrwieniu, ale także — co istotne — umożliwiła ocenę zachodzących reakcji biochemicznych w badanej tkance w okresie niedokrwienia. Technika opiera się na monitorowaniu zmian fluorescencji NADH emitowanej z tkanek skóry przedramienia jako funkcji czasu w odpowiedzi na zastosowaną niedokrwienie. Fluorescencja NADH jest najsilniejszą komponentą fluorescencji emitowanej ze skóry człowieka. Warto podkreślić, że dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy (NAD⁺) oraz jego zredukowana forma (NADH) pełnią istotną rolę w procesach oddychania komórkowego jako akceptory elektronów i protonów w reakcjach utleniania komórkowego [12].

W metodzie FMSF stosuje się promieniowanie o długości fali 340 nm do wzbudzenia cząsteczek NADH. Charakteryzuje się ono niską penetracją do tkanek skóry i wynosi około 0,5 mm. Większość tego promieniowania jest pochłaniana przez naskórek oraz warstwę brodawkowatą skóry, gdzie gęstość naczyń mikrokrążenia jest bardzo niska. Dlatego też zmiany fluorescencji NADH zależą od zaburzeń przepływu w naczyniach w głębszych warstwach skóry, które są odpowiedzialne za dostarczanie tlenu do naskórka i warstwy brodawkowatej skóry [13].

W opisywanej metodzie analizowane są dwa główne parametry: odpowiedź na niedokrwienie (LFR, *low flow response*) i odpowiedź reperfuzyjna (HFR, *high flow re-*

sponse). Parametr LFR określa odpowiedź na zastosowane niedokrwienie, jest on definiowany jako stosunek wzrostu intensywności fluorescencji NADH do względnej linii bazowej po zastosowanej okluzji naczynia. Natomiast HFR to parametr określający odpowiedź przekrwienną, opisywany jako stosunek maksymalnego spadku intensywności fluorescencji NADH do określonej względnej linii bazowej. Porównując parametry LFR i HFR osób zdrowych i pacjentów obciążonych chorobami układu sercowo-naczyniowego, obserwuje się istotne różnice w otrzymanych wartościach tych parametrów (ryc. 1). Niskie wartości LFR, obserwowane między innymi u pacjentów z rozpoznaną chorobą wieńcową, mogą wynikać z mniejszej wrażliwości na hipoksję. Wydaje się również, że ujemna wartość LFR może wskazywać na bardzo duże niedotlenienie tkanek, na przykład w przebiegu przewlekłego stanu zapalnego, który koreluje z wysokim stężeniem czynnika indukowanego hipoksją 1 (HIF-1, *hypoxia-inducible factor 1*) we krwi, szczególnie w naskórku. Po okluzji komórki naskórka przechodzą w metabolizm glikolityczny (beztlenowy). W wyniku zatrzymania reakcji łańcucha oddechowego następuje nagromadzenie NADH z towarzyszącym spadkiem NAD⁺, który jest niezbędny do zajścia cyklu Krebsa [14]. Z kolei niższe wartości parametru HFR świadczą między innymi o zaburzeniu funkcji śródbłonna (ryc. 2). Metoda FMSF pozwala również na obserwację oscylacji wynikających z rytmicznych zmian w przepływie krwi (*flow motion*) i będących istotnym elementem fizjologii mikrokrążenia obwodowego



Rycina 2. Rejestracja zmian fluorescencji dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NADH, *dihydropyridinonikotynoamidoadenine dinucleotide*) w następstwie zmian przepływu krwi w naczyniach mikrokrążenia (FMSF, *flow mediated skin fluorescence*) podczas niedokrwienia i w okresie reperuzji u 60-letniego mężczyzny z niewydolnością serca o etiologii wieńcowopochodnej (frakcja wyrzutowa lewej komory 20%). Nie można obserwować oscylacji mikrokrążenia. Niskie wartości parametru odpowiedzi na niedokrwienie (LFR, *low flow response*) wskazują najprawdopodobniej na zmniejszoną wrażliwość tkanek na hipoksję, niska wartość odpowiedzi reperuzyjnej (HFR, *high flow response*) zaś świadczy o znacznej dysfunkcji śródbłonna; DIA (*diastolic*) — rozkurczowe ciśnienie tętnicze; SYS (*systolic*) — skurczowe ciśnienie tętnicze; BMI (*body mass index*) — wskaźnik masy ciała

ZABURZENIA FUNKCJI ŚRÓDBŁONKA MIKROKRAŻENIA W CHOROBYCH UKŁADU SERCOWO-NACZYNIOWEGO

Technikami laserowo-doplerowskimi dowiedziono, że odpowiedź wazodylatacyjna zależna od śródbłonna jest zaburzona u pacjentów ze schorzeniami układu krążenia. Odpowiedź naczyniowa podczas testu PORH jest istotnie zredukowana u chorych obciążonych wysokim ryzykiem sercowo-naczyniowym. Zaobserwowano również, że farmakoterapia hipotensyjna, hipolipemizująca lub metforminą może poprawić zależne od śródbłonna mechanizmy wazodylatacyjne mikrokrążenia [15].

Zwiększony opór naczyniowy związany z dysfunkcją mikrokrążenia jest istotnym elementem wpływającym na utrzymywanie się wysokich wartości ciśnienia tętniczego. U pacjentów z nadciśnieniem tętniczym reakcja na test PORH jest nieprawidłowa, ponieważ dochodzi do zaburzenia reaktywności oraz struktury mikrokrążenia [16]. Wykazano, że po 8 tygodniach skutecznej terapii hipotensyjnej antagonistami kanału wapniowego, sartanami (ARB, *angiotensin receptor blockers*), inhibitorami konwertazy angiotensyny (ACE, *angiotensin-converting enzyme*) znacząco poprawia się wynik przeprowadzonego ponownie testu PORH w tej grupie pacjentów. Wyniki grupy chorych na nadciśnienie tętnicze nie odbiegały istotnie od wartości parametrów PORH uzyskanych w grupie kontrolnej. Co więcej, udowodniono, że zaprzestanie przyjmowania tych leków wiąże się z ponownym pogorszeniem funkcji śródbłonna [17].

W ostatnich badaniach wskazano również, że PORH jest niezależnym czynnikiem prognostycznym zmian miażdżycowych w cukrzycy typu 1 [18]. U pacjentów z hipercholesterolemią, bez jawnej choroby miażdżycowej, obserwuje się nieprawidłową reakcję podczas przeprowadzania testu PORH, co wskazuje na zaburzenie zależnej od śródbłonna regulacji mikrokrążenia. Wykazano, że odpowiedź naczyniowa poprawia się po 3-miesięcznej doustnej farmakoterapii z zastosowaniem atorwastatyny (redukcja stężenia cholesterolu frakcji LDL [*low-density lipoprotein*] < 100 mg/dl) [19, 20].

Testy PORH przeprowadzone u chorych obciążonych chorobą wieńcową pokazały 2-krotnie dłuższy czas do osiągnięcia szczytu przepływu oraz osłabienie całej reakcji przekrwiennej w porównaniu z osobami zdrowymi. U mężczyzn z oporną na leczenie dławicą wykazano dysfunkcję śródbłonna w porównaniu zarówno z grupą osób zdrowych, jak i z bezobjawowymi pacjentami z potwierdzoną angiograficznie chorobą wieńcową, niezależną od standardowych czynników ryzyka sercowo-naczyniowego. Ponadto pacjenci z chorobą wieńcową o wczesnym występowaniu wykazują gorszą funkcję śródbłonna mikrokrążenia niż osoby zdrowe w tym samym wieku [21–23]. U chorych z zastoinową niewydolnością serca zarówno spoczynkowy przepływ, jak i reaktywność mikrokrążenia są znacznie upośledzone [24]. Dodatkowo upośledzona odpowiedź PORH występuje u osób palących tytoń [25] oraz u kobiet z kardiologicznym zespołem X bez rozpoznanej

cukrzycy, u których udowodniono, że zastosowanie terapii metforminą w dawce 500 mg 2 ×/dobę przez 8 tygodni istotnie poprawia funkcję śródbłonna mikrokrążenia [26].

PODSUMOWNIE

Mikrokrążenie skórne jest łatwo dostępnym do badania łożyskiem naczyniowym, którego dysfunkcję stwierdza się w przebiegu wielu chorób układu sercowo-naczyniowego. Badania mikrokrążenia śródbłonna z pewnością uzupełniają wiedzę na temat patofizjologii układu krążenia. Ponadto test PORH może się stać ważnym markerem diagnostycznym i prognostycznym w chorobach układu sercowo-naczyniowego, służyć monitorowaniu farmakoterapii oraz określeniu jej wpływu na śródbłonek mikrokrążenia.

Rzeczywiście nowych nieinwazyjnych technik oceny mikrokrążenia obwodowego, takich jak FMSE, może się przyczynić do szerszego stosowania testu PORH w codziennej praktyce lekarskiej. W celu ich upowszechnienia konieczne są badania walidacyjne zmierzające do określenia powtarzalności pomiarów oraz standaryzacji w wyrażaniu wyników.

PIŚMIENNICTWO

- Flammer A.J., Anderson T., Celermajer D.S. i wsp. The assessment of endothelial function: from research into clinical practice. *Circulation* 2012; 126: 753–767.
- Hollowatz L.A., Thompson-Torgerson C.S., Kenney W.L. The human cutaneous circulation as a model of generalized microvascular function. *J. Appl. Physiol.* 2008; 105: 370–372.
- Serné E.H., de Jongh R.T., Eringa E.C., IJzerman R.G., Stehouwer C.D. Microvascular dysfunction: a potential pathophysiological role in the metabolic syndrome. *Hypertension* 2007; 50: 204–211.
- Tesselaar E., Sjöberg F. Transdermal iontophoresis as an in-vivo technique for studying microvascular physiology. *Microvasc. Res.* 2011; 81: 88–96.
- Ijzerman R.G., de Jongh R.T., Beijik M.A. i wsp. Individuals at increased coronary heart disease risk are characterized by an impaired microvascular function in skin. *Eur. J. Clin. Invest.* 2003; 33: 536–542.
- Roustit M., Cracowski J.L. Assessment of endothelial and neurovascular function in human skin microcirculation. *Trends Pharmacol. Sci.* 2013; 34: 373–384.
- Cracowski J.L., Lorenzo S., Minson C.T. Effects of local anaesthesia on subdermal needle insertion pain and subsequent tests of microvascular function in human. *Eur. J. Pharmacol.* 2007; 557: 150–154.
- Cracowski J.L., Gaillard-Bigot F., Cracowski C. i wsp. Involvement of cytochrome epoxygenase metabolites in cutaneous postocclusive hyperemia in humans. *J. Appl. Physiol.* 2013; 114: 245–251.
- Hellmann M., Gaillard-Bigot F., Roustit M., Cracowski J.L. Prostanoids are not involved in postocclusive reactive hyperemia in human skin. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 2015; 29: 510–516.
- Roustit M., Cracowski J.L. Non-invasive assessment of skin microvascular function in humans: an insight into methods. *Microcirculation* 2012; 19: 47–64.
- Cracowski J.L., Roustit M. Current methods to assess human cutaneous blood flow: an updated focus on laser-based techniques. *Microcirculation* 2016; 23: 337–344.
- Gebicki J., Marcinek A., Zielonka J. Transient species in the stepwise interconversion of NADH and NAD⁺. *Acc. Chem. Res.* 2004; 37: 379–386.
- Piotrowski L., Urbaniak M., Jedrzejczak B., Marcinek A., Gebicki J. Flow mediated skin fluorescence — a novel technique for evaluation of cutaneous microcirculation. *Rev. Sci. Instrum.* 2016; 87: 036111.
- Ioannou M., Pyrpasopoulou A., Simos G. i wsp. Upregulation of VEGF expression is associated with accumulation of HIF-1 α in the skin of naive scleroderma patients. *Mod. Rheumatol.* 2013; 23: 1245–1248.
- Hellmann M., Roustit M., Cracowski J.L. Skin microvascular endothelial function as a biomarker in cardiovascular diseases? *Pharmacol. Rep.* 2015; 67: 803–810.
- Cordovil I., Huguenin G., Rosa G. i wsp. Evaluation of systemic microvascular endothelial function using laser speckle contrast imaging. *Microvasc. Res.* 2012; 83: 376–379.
- Rossi M., Bradbury A., Magagna A. i wsp. Investigation of skin vaso-reactivity and blood flow oscillations in hypertensive patients: effect of short-term antihypertensive treatment. *J. Hypertens.* 2011; 29: 1569–1576.
- Rossi M., Matteucci E., Pesce M. i wsp. Peripheral microvascular dysfunction as an independent predictor of atherosclerotic damage in type 1 diabetes patients: a preliminary study. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 2013; 54: 381–391.
- Binggeli C., Spieker L.E., Corti R. i wsp. Statins enhance postischemic hyperemia in the skin circulation of hypercholesterolemic patients: a monitoring test of endothelial dysfunction for clinical practice? *J. Am. Coll. Cardiol.* 2003; 42: 71–77.
- Hollowatz L.A., Santhanam L., Webb A., Berkowitz D.E., Kenney W.L. Oral atorvastatin therapy restores cutaneous microvascular function by decreasing arginase activity in hypercholesterolaemic humans. *J. Physiol.* 2011; 589: 2093–2103.
- Shamim-Uzzaman Q.A., Pfenninger D., Kehrer C. i wsp. Altered cutaneous microvascular responses to reactive hyperemia in coronary artery disease: a comparative study with conduit vessel responses. *Clin. Sci. (Lond.)* 2002; 103: 267–273.
- Agarwal S.C., Allen J., Murray A., Purcell I.F. Laser Doppler assessment of dermal circulatory changes in people with coronary artery disease. *Microvasc. Res.* 2012; 84: 55–59.
- Strain W.D., Hughes A.D., Mayet J. i wsp. Attenuated systemic microvascular function in men with coronary artery disease is associated with angina but not explained by atherosclerosis. *Microcirculation* 2013; 20: 670–677.
- Andreassen A.K., Kirkeno K.A., Gullestad L., Simonsen S., Kvernebo K. Effect of heart transplantation on impaired peripheral microvascular perfusion and reactivity in congestive heart failure. *Int. J. Cardiol.* 1998; 65: 33–40.
- Rossi M., Pistelli F., Pesce M. i wsp. Impact of long-term exposure to cigarette smoking on skin microvascular function. *Microvasc. Res.* 2014; 93: 46–51.
- Jadhav S., Ferrell W., Greer I.A. i wsp. Effects of metformin on microvascular function and exercise tolerance in women with angina and normal coronary arteries: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2006; 48: 956–963.