

Ocena stanu mikrokrążenia na podstawie stymulacji oscylacji miogennych przez przejściowe niedokrwienie

Assessment of microcirculatory status based on stimulation of myogenic oscillations by transient ischemia

Joanna Katarzyńska¹, Lesław Sieroń¹, Robert Skokowski¹, Andrzej Marcinek^{1, 2}, Jerzy Gębicki^{1, 2}

¹Angionica Sp. z o. o. w Łodzi

²Instytut Techniki Radiacyjnej Politechniki Łódzkiej w Łodzi

STRESZCZENIE

Oscylacje mikrokrążenia, znane jako *flowmotion*, są dobrze rozpoznaną cechą przepływu krwi przez naczynia krwionośne. Istnieją dowody na to, że upośledzenie przepływu mikronaczyniowego może być objawem różnych chorób, w tym cukrzycy, nowotworów i chorób układu sercowo-naczyniowego, a także chorób neurodegeneracyjnych i autoimmunologicznych.

Innowacyjna technika *Flow Mediated Skin Fluorescence (FMSF)* umożliwia monitorowanie oscylacji mikrokrążenia w sposób bezpośredni i precyzyjny, dając jakościowy i ilościowy obraz stanu mikrokrążenia organizmu. Parametr HS (*Hypoxia Sensitivity*), uzyskiwany techniką FMSF, pozwala w sposób ilościowy określić stopień wrażliwości organizmu na niedotlenienie poprzez pomiar oscylacji miogennych aktywowanych przez przejściową hipoksję. Zakłada się, że wrażliwość organizmu na niedotlenienie może być regulowana przez czynniki genetyczne, przy czym wiele badań wskazuje na znaczącą rolę w tej odpowiedzi czynnika indukowanego hipoksją (HIF). Parametr HS odzwierciedla zdolność stabilizowania czynnika HIF-1 α podczas przejściowej hipoksji powodowanej czasowym zamknięciem przepływu krwi w tętnicy ramiennej. Im większa wartość HS, tym prawdopodobnie wyższy poziom stabilizowanego

HIF-1 α podczas niedokrwienia, czyli lepsza odpowiedź organizmu na niedotlenienie.

Parametr HS umożliwia przewidywanie rozwoju chorób, którym towarzyszy hipoksja. Może też znaleźć zastosowanie do przewidywania stopnia nasilenia przebiegu choroby na podstawie związku pomiędzy wrodzoną odpowiedzią immunologiczną a niedotlenieniem, jak na przykład w przypadku infekcji chorobą koronawirusową 2019 (COVID-19). Dobra odpowiedź na niedotlenienie (duża wartość HS) może predestynować do uprawiania sportów wytrzymałościowych (biegi długodystansowe, wspinaczka itp.). Również aktywność fizyczna amatorów powinna być planowana z uwzględnieniem tej odpowiedzi.

Technika FMSF pozwala na wykrycie zaburzeń mikrokrążenia na ich wczesnym etapie w celu identyfikacji pacjentów do interwencji profilaktycznej lub terapeutycznej, a także do dalszych, dokładniejszych i bardziej złożonych badań diagnostycznych.

Choroby Serca i Naczyń 2021, 18 (2), 77–89

Słowa kluczowe: mikrokrążenie, oscylacje miogenne, hipoksja, fluorescencja NADH, technika FMSF

ABSTRACT

Microcirculation oscillations, known as *flowmotion*, are a well-recognized feature of blood flow through blood vessels. There is evidence that impaired microvascular flow can be a symptom of a variety of diseases,

Adres do korespondencji:

prof. dr hab. Andrzej Marcinek
prof. dr hab. Jerzy Gębicki
Instytut Techniki Radiacyjnej
Politechnika Łódzka
ul. Żeromskiego 116, 90–924 Łódź
e-mail: andrzej.marcinek@p.lodz.pl
e-mail: jerzy.gebicki@angionica.com.pl

including diabetes, cancer and cardiovascular disease, as well as neurodegenerative and autoimmune diseases. The innovative Flow Mediated Skin Fluorescence (FMSF) technique enables direct and precise monitoring of microcirculation oscillations, giving a qualitative and quantitative picture of the microcirculatory status of the organism.

The HS (Hypoxia Sensitivity) parameter, determined by the FMSF technique, allows to quantify the degree of sensitivity of the organism to hypoxia by measuring stimulation of myogenic oscillations by transient hypoxia. It is assumed that an organism's sensitivity to hypoxia may be regulated by genetic factors, but many studies indicate a significant role of hypoxia-inducible factor (HIF) in such response. The HS parameter seems to reflect a level of stabilized HIF-1 α during the transient hypoxia caused by temporary occlusion of the brachial artery.

The HS parameter can be used to predict development of the diseases accompanied by hypoxia. Based on the relationship between the innate immune response and hypoxia it can also be used to predict the severity of the disease such as coronavirus disease 2019 (COVID-19) infection. A good response to hypoxia (high values of HS parameter) can predispose the individuals to endurance training (long-distance running, climbing etc.). Amateurs' physical activity should also be undertaken based on the microcirculatory response to hypoxia. The FMSF technique allows to detect microcirculation disorders at an early stage in order to identify patients for preventive or therapeutic intervention, or for further more accurate and complex diagnostic tests.

Choroby Serca i Naczyń 2021, 18 (2), 77–89

Key words: microcirculation, myogenic oscillations, hypoxia, NADH fluorescence, FMSF technique

WPROWADZENIE

Oscylacje mikrokrążenia, znane jako *flowmotion*, są dobrze rozpoznaną cechą przepływu krwi przez naczynia krwionośne [1, 2]. Mechanistyczne aspekty tego zjawiska były przedmiotem szeroko zakrojonych badań [3, 4]. Do oceny *flowmotion* wykorzystywano głównie dopplerowskie techniki oceny przepływu krwi, jak na przykład laserowy przepływomierz dopplerowski (LDF, *laser Doppler flowmeter*), które pozwalają na półilościową charaktery-

stykę zmian przepływu krwi w skórze człowieka [5, 6]. Analiza sygnału zarejestrowanego techniką LDF w domenie częstotliwościowej pozwoliła na wyodrębnienie składowych oscylacji mikrokrążenia sklasyfikowanych jako: endogenne niezależne od tlenku azotu (NO, *nitric oxide*) (< 0,0095 Hz); endogenne zależne od NO (0,0095–0,021 Hz); neurogenne (0,021–0,052 Hz); miogenne (0,052–0,15 Hz); oddechowe (0,15–0,62 Hz) i związane z rytmem skurczów serca (0,62–2,00 Hz) [7–9].

Istotny potencjał diagnostyczny ma składowa miogenna, powiązana ze zmianą średnicy mikronaczyń (*vasomotion*) i oscylacjami przepływu krwi w naczyniach. Zmiany naczyniowe są dyktowane przez zmiany wewnątrzkomórkowego poziomu jonów wapnia i potencjału błonowego komórek mięśni gładkich naczyń krwionośnych (*vascular smooth muscle cells*). Zmiany cytoplazmatycznego poziomu wapnia zachodzą gwałtownie w ciągu kilku do kilkunastu sekund po zadziałaniu bodźca z udziałem między innymi białka wiążącego GTP, fosfolipazy C oraz wewnątrzkomórkowych wtórnych przekaźników sygnałów, w tym trifosforanu inozytoli (IP₃, *inositol triphosphate*) i diacylglicerolu (DAG, *diacylglycerol*). Wśród najważniejszych procesów związanych z aktywnością Ca²⁺ wymienić należy proces widzenia, kaskadę fosfoinozytolową, regulację skurczu mięśni, a także pośrednią aktywację pomp jonowych oraz licznych enzymów i innych białek docelowych, w tym między innymi syntazy NO decydującej o uwalnianiu tlenku azotu, działającego wazodylatacyjnie na naczynia krwionośne. Syntazę NO, w wyniku zwiększonego zapotrzebowania na tlen, aktywuje także receptor naczyniowego czynnika wzrostu śródbłonna (VEGF, *vascular endothelial growth factor*), który pobudza angiogenezę. Bodźcem przyspieszającym transkrypcję genu VEGF jest więc hipoksja, która indukuje czynnik transkrypcyjny indukowany hipoksją (HIF, *hypoxia inducible factor*). Hipoksja oraz systematyczny trening i praca mięśniowa, obniżające prężność tlenu w mięśniach, prowadzą do proliferacji naczyń mikrokrążenia.

Istnieją dowody na to, że upośledzenie przepływu mikronaczyniowego może być objawem różnych chorób, w tym cukrzycy, nowotworów i chorób układu sercowo-naczyniowego (CVD, *cardiovascular diseases*), a także chorób neurodegeneracyjnych i autoimmunologicznych [10–17]. Ilościowa analiza *flowmotion* z wykorzystaniem techniki LDF nie zawsze jest jednak wiarygodna, ze względu na znaczny szum związany z tą metodą pomiarową.

W ostatnich latach pojawiła się nowa, innowacyjna technika pomiarowa — *Flow Mediated Skin Fluorescence* (FMSF) — pozwalająca w sposób o wiele bardziej precyzyjny monitorować oscylacje mikrokrążenia. Technika FMSF opiera się na pomiarze zmian intensywności fluorescencji zredukowanego dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NADH, *nicotinamide adenine dinucleotide*) w skórze przedramienia w funkcji czasu w odpowiedzi na wymuszone zatrzymanie i uwolnienie przepływu krwi [18, 19]. Zmiany fluorescencji NADH zależą od dostarczania tlenu do naskórka z udziałem mikrokrążenia skórniego, dlatego też wykorzystanie techniki FMSF do monitorowania przepływu mikronaczyniowego jest unikalnym narzędziem do oceny stanu mikrokrążenia.

Rozwój technologiczny metody FMSF pozwolił na uzyskanie bardzo wysokiej czułości detekcji i wysokiej jakości sygnału w wyniku znacznej poprawy stosunku sygnału do szumu. Dlatego też technika ta umożliwia monitorowanie oscylacji mikrokrążenia w sposób bezpośredni i precyzyjny, dając jakościowy i ilościowy obraz stanu mikrokrążenia organizmu [20].

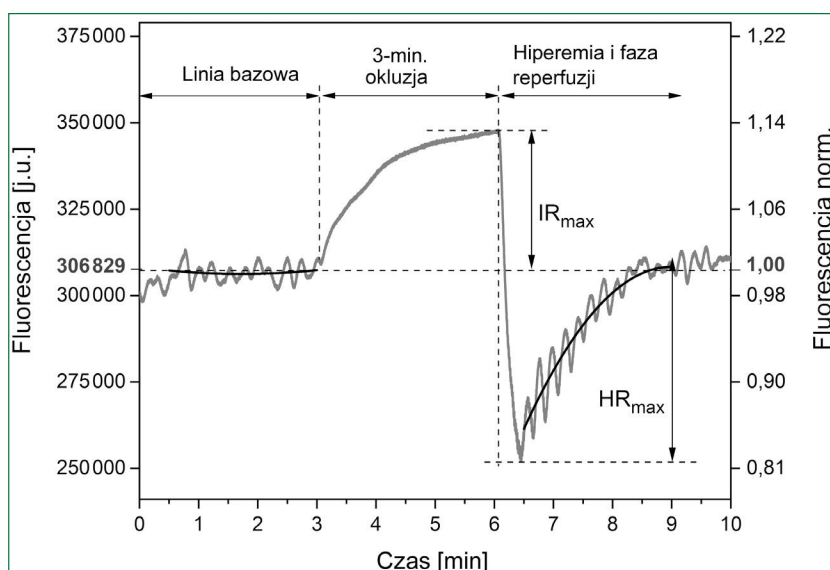
Technika FMSF jest z powodzeniem stosowana do nieinwazyjnej diagnostyki i monitorowania zaburzeń krążenia naczyniowego, regulacji metabolicznej oraz oceny ryzyka powikłań naczyniowych w cukrzycy [21, 22]. Jej użyteczność jest również testowana w przypadku innych schorzeń, w tym między innymi w CVD [23–26], przewlekłej obturacyjnej chorobie płuc (COPD, *chronic obstructive coronary disease*) [27], ponadto w dermatologii [28, 29], a także w fizjologii sportu [30–32]. Ostatnie obserwacje wskazują, że technika FMSF może również znaleźć zastosowanie w przewidywaniu stopnia nasilenia choroby na podstawie związku pomiędzy wrodzoną odpowiedzią immunologiczną a niedotlenieniem, jak na przykład w przypadku infekcji chorobą koronawirusową 2019 (COVID-19, *coronavirus disease 2019*) [33, 34].

TECHNIKA FMSF

Aparat *AngioExpert* firmy *Angionica Sp. z o. o.* jest urządzeniem przeznaczonym do pomiaru fluorescencji ze skóry ramienia pacjenta, co jest podstawą pomiaru techniką FMSF. Urządzenie mierzy zmiany poziomu fluorescencji NADH przy długości fali 460 nm (wzbudzenie przy 340 nm) z nieowłosionej skóry na przedramieniu pacjenta [18, 19]. Fluorescencja NADH jest najsilniejszą składową najsilniejsza składowa fluorescencji ze skóry człowieka i zależy od mikrokrążenia w skórze oraz od dyfuzji tlenu i innych składników wymaganych do jej prawidłowego

metabolizmu. W przypadku techniki FMSF fluorescencja NADH jest mierzona z naskórka, który nie jest unaczyniony, i oba powyżej wymienione czynniki mają na nią wpływ. Zredukowany dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy i jego utleniona forma (NAD⁺) odgrywają kluczową rolę jako koenzymy w wielu procesach redoks w układach biologicznych. Ale tylko NADH, w przeciwieństwie do NAD⁺, wykazuje właściwości fluorescencyjne. W produkcji adenozyno-5'-trifosforanu (ATP, *adenosine triphosphate*) w łańcuchu oddechowym w mitochondriach koenzym ten uczestniczy w transporcie elektronów do cząsteczek tlenu. W warunkach anoksji lub hipoksji, gdy dostępność tlenu jest ograniczona, równowaga NADH ↔ NAD⁺ zostaje przesunięta w stronę formy zredukowanej. Zahamowanie dopływu krwi do tkanek i narządów, ograniczające dopływ tlenu i składników odżywczych niezbędnych do metabolizmu komórkowego, prowadzi do zablokowania łańcucha oddechowego. Skutkuje to jednocześnie zmianami poziomu fluorescencji komórek i umożliwia obserwację zmian związanych z zaburzeniami równowagi NADH ↔ NAD⁺. Typowy przebieg FMSF, wykorzystujący pookluzyjną reaktywną hiperemię (PORH, *post-occlusive reactive hyperemia*), rejestrowany przez urządzenie *AngioExpert*, przedstawiono na rycinie 1.

Spoczynkowa linia bazowa zbierana jest przez 3 minuty, po czym mankiet okluzyjny jest pompowany do 60 mm Hg powyżej skurczowego ciśnienia tętniczego (SBP, *systolic blood pressure*). W konsekwencji następuje wzrost fluorescencji NADH, tak zwana odpowiedź ischemiczna–niedokrwienna (IR, *Ischemic Response*), osiągając maksimum. Po 3 minutach mankiet zostaje zwolniony, w wyniku czego wartość fluorescencji NADH maleje poniżej wartości zarejestrowanej dla linii bazowej, osiągając minimum. W dalszej kolejności następuje powrót do poziomu linii bazowej, tak zwana odpowiedź hiperemiczna–przekrwienna (HR, *Hyperemic Response*). W rzeczywistości, w rejestrowanej odpowiedzi HR można wyróżnić dwie odrębne fazy. Pierwsza, trwająca 20–30 sekund, jest związana z gwałtownym spadkiem fluorescencji NADH, a zarazem z widocznym przekrwieniem skóry. Po fazie hiperemii następuje reperfuzja — w tym czasie fluorescencja NADH powraca do poziomu wyjściowego. Warunki i parametry pomiaru zostały szczegółowo opisane [18–20]. Wyniki uzyskiwane techniką FMSF są z powodzeniem stosowane do nieinwazyjnej diagnostyki i monitorowania zaburzeń krążenia naczyniowego, regulacji metabolicznej oraz oceny ryzyka powikłań naczyniowych w cukrzycy [21, 22].



Rycina 1. Przykładowy przebieg *Flow Mediated Skin Fluorescence* (FMSF) zarejestrowany u zdrowego ochotnika (mężczyzna, 35 lat). Widoczne czarne linie zaznaczone w fazie spoczynkowej i reperfuzyjnej obrazują dopasowanie linii bazowej funkcją wielomianową drugiego stopnia (szczegółowe wyjaśnienie w tekście) (źródło: Katarzyńska J. i wsp. *Front. Physiol.* 2020; 11: 702. Oryginalny wydawca: Frontiers Media Ltd.)

SPOSÓB DOKONYWANIA ANALIZY OSCYLACJI TECHNIKĄ FMSF

Technika FMSF umożliwia ponadto ocenę mikrokrążenia naczyniowego na podstawie obserwowanych oscylacji uzyskiwanego sygnału. Pomiar fluorescencji NADH skóry w warunkach spoczynkowych (bez mechanicznego, fizycznego lub farmakologicznego blokowania przepływu krwi) pozwala na obserwację samoistnych oscylacji mikrokrążenia skóry (*flowmotion*). Ze względu na niską częstotliwość składowej endotelialnej (0,008–0,021 Hz) minimalny czas potrzebny do pomiaru zmian fluorescencji wynosi kilka minut. Choć nie ma ograniczeń czasowych dla pomiarów FMSF, to wymóg, aby pacjent pozostawał nieruchomo podczas badania, sprawia, że optymalny czas wynosi około 5 minut, aby uniknąć artefaktów i wynikających z nich błędów w oszacowaniu wielkości przepływu mikronaczyniowego. Z drugiej strony, ponieważ okres reperfuzji po zamknięciu mankieta trwa około 3 minut, czas na oszacowanie przepływu mikronaczyniowego na etapie reperfuzji jest również ograniczony. Zebrane dane są analizowane za pomocą oprogramowania analitycznego zainstalowanego na urządzeniu *AngioExpert*.

Analiza oscylacji rejestrowanych przez urządzenie *AngioExpert* zakłada normalizację sygnału FMSF względem średniej wartości fluorescencji w centralnym okresie pomiaru (1–2 min). Przy zastosowaniu takiego podejścia

wszelkie zaburzenia spowodowane zmianami skórnymi, takimi jak pigmentacja lub różnice w poziomach fluorescencji skóry pacjentów, są zminimalizowane, gdyż względna zmiana w stosunku do wartości wyjściowej pozostaje znormalizowana (ryc. 1). Optymalną funkcją linii bazowej, która umożliwia „elastyczne” dopasowanie do sygnałów pochodzących od przepływu mikronaczyniowego rejestrowanego techniką FMSF, zarówno w czasie zbierania sygnału w fazie spoczynku, jak i w fazie reperfuzji, okazała się funkcja wielomianowa drugiego stopnia. Wartość średniego błędu kwadratowego odchylenia sygnału fluorescencji od dopasowanej krzywej wielomianowej (powiększoną 10^6 razy) uznano za miarę wielkości oscylacji i przyjęto jako parametr służący do określania wielkości oscylacji w części spoczynkowej (FM) oraz parametr do określania wielkości oscylacji w części reperfuzyjnej FM(R). Tak zdefiniowane parametry FM i FM(R) pozostają wielkościami bezwymiarowymi, gdyż zmiany fluorescencji są znormalizowane.

Dodatkowo analizowane mogą być częstotliwości oscylacji wchodzących w skład sygnału FMSF. Wykorzystywany jest do tego celu algorytm szybkiej transformacji Fouriera (FFT, *fast Fourier transformation*). Zgodnie z danymi literaturowymi wyodrębniane są trzy najważniejsze dla mikrokrążenia przedziały częstotliwości, a mianowicie: nie więcej niż 0,021 Hz, 0,021–0,052 Hz i 0,052–0,15 Hz, które odpowiadają aktywności odpowiednio

endotelialnej, neurogennej i miogennej [7–9], oraz siła oscylacji, tak zwana *power spectral density* (PSD), silnie skorelowana z wartością FM i FM(R).

W sygnale widoczne są również oscylacje o innych częstotliwościach, na przykład wyraźna obecność w rejestrowanym sygnale FMSF oscylacji związanych z rytmem serca, co potwierdza dużą czułość metody. Ograniczony wpływ rytmu skurczów serca na zmiany całkowitej fluorescencji NADH w skórze wynika najprawdopodobniej z tego, że duża część światła wzbudzającego (340 nm) nie dociera bezpośrednio do naczyń krwionośnych, a jest absorbowana głównie przez naskórek [35].

Zdefiniowano następujące parametry jako ilościowe miary rejestrowanych oscylacji mikrokrążenia:

- FM — parametr charakteryzujący oscylacje mikrokrążenia w spoczynku;
- FM(R) — parametr charakteryzujący oscylacje mikrokrążenia w fazie reperfuzji, odzwierciedlający wpływ niedotlenienia na przepływ związany z aktywnością naczyń, dający możliwość oceny sztywności naczyń;
- HS (*Hypoxia Sensitivity*) — wrażliwość organizmu na niedotlenienie — parametr będący bezpośrednią miarą intensywności miogennych oscylacji mikrokrążenia rejestrowanych podczas reperfuzji, o częstotliwościach z zakresu 0,052–0,15 Hz.

Za najważniejszy spośród wymienionych powyżej uważa się parametr HS, który pozwala w sposób ilościowy określić stopień wrażliwości organizmu na niedotlenienie poprzez pomiar oscylacji miogennych stymulowanych przejściową hipoksją. Niedotlenienie w przypadku prawidłowo funkcjonującego organizmu jest bodźcem wymuszającym przystosowanie do niesprzyjających warunków. Przykładem jest między innymi hipoksja hipobaryczna powodująca fizjologiczną adaptację Sierpów do warunków wysokogórskich, ale również dostosowanie się organizmu sportowców do długich okresów wysiłku [36–39]. Zakłada się, że wrażliwość organizmu na niedotlenienie może być regulowana przez czynniki genetyczne. Wyniki wielu badań wskazują, że znaczącą rolę w odpowiedzi organizmu na niedotlenienie odgrywa HIF. Stabilizacja, zwłaszcza HIF-1 α , indukuje szereg szlaków sygnałowych odpowiedzialnych za regulację wielu procesów fizjologicznych, takich jak wrodzona odpowiedź immunologiczna, gojenie się ran i adaptacja do przebywania na dużych wysokościach lub do wysiłku fizycznego.

Postuluje się, że parametr HS, uzyskiwany techniką FMSF, odzwierciedla wartość stabilizowanego czynnika

HIF-1 α podczas przejściowej hipoksji powodowanej czasowym zamknięciem przepływu krwi w tętnicy ramiennej. Im wyższa wartość HS, tym wyższy poziom stabilizowanego HIF-1 α w komórkach mięśni gładkich mikronaczyń podczas hipoksji, czyli lepsza odpowiedź organizmu na niedotlenienie. Można przypuszczać, że parametr HS, jako parametr fizjologiczny, podobnie jak na przykład ciśnienie tętnicze, cechuje zmienność w czasie. Może on podlegać cyklowi okołodobowemu, może zależeć od przyjmowanych leków czy suplementów, ale także od stopnia zmęczenia pacjenta w momencie pomiaru.

Poniżej zaprezentowane zostały przykłady zastosowania parametrów FM, FM(R) i HS do oceny odpowiedzi mikrokrążenia na niedotlenienie, ukazujące ich przydatność diagnostyczną.

ANALIZA OSCYLACJI TECHNIKĄ FMSF W PRZYKŁADOWYCH ZASTOSOWANIACH **Analiza oscylacji mikrokrążenia u zdrowych ochotników**

Analiza jakościowa i ilościowa oscylacji związanych z przepływem krwi przez naczynia została przeprowadzona w grupie zdrowych ochotników zrekrutowanych zgodnie z protokołami opisanymi w uprzednio publikowanych artykułach [20–22].

Prezentowane wyniki zostały przeliczone według algorytmu zaimplementowanego w oprogramowaniu urządzenia AngioExpert. Należy przypomnieć, że uczestnicy badania każdorazowo przed pomiarem FMSF byli aklimatyzowani w temperaturze pokojowej (≥ 15 min) i mierzono im ciśnienie tętnicze. Każdy pomiar powtarzano dwukrotnie w ciągu kilku dni w celu oszacowania powtarzalności parametru FM oraz poszczególnych składowych rejestrowanych oscylacji: endogennych (endo), neurogennych (neuro) i miogennych (myo). Wykonano dwa typy pomiarów: 1) fluorescencję mierzono techniką FMSF na przedramieniu przez 5 minut, tylko w okresie spoczynku, 2) fluorescencję mierzono techniką FMSF na przedramieniu, stosując test PORH. Pomiar trwał standardowo około 10 minut i w jego przebiegu zakładano 3-minutowy okres spoczynku, 3-minutową okluzję oraz 4-minutową fazę reperfuzji (zgodnie z ryc. 1).

W obu przypadkach uzyskano dobrą powtarzalność mierzonych parametrów, przy stosunkowo dużej zmienności dla pomiarów okluzyjnych (ok. 40%) i znacznie mniejszej dla pomiarów spoczynkowych (20%, dłuższy pomiar i okres uwzględniony w analizie).

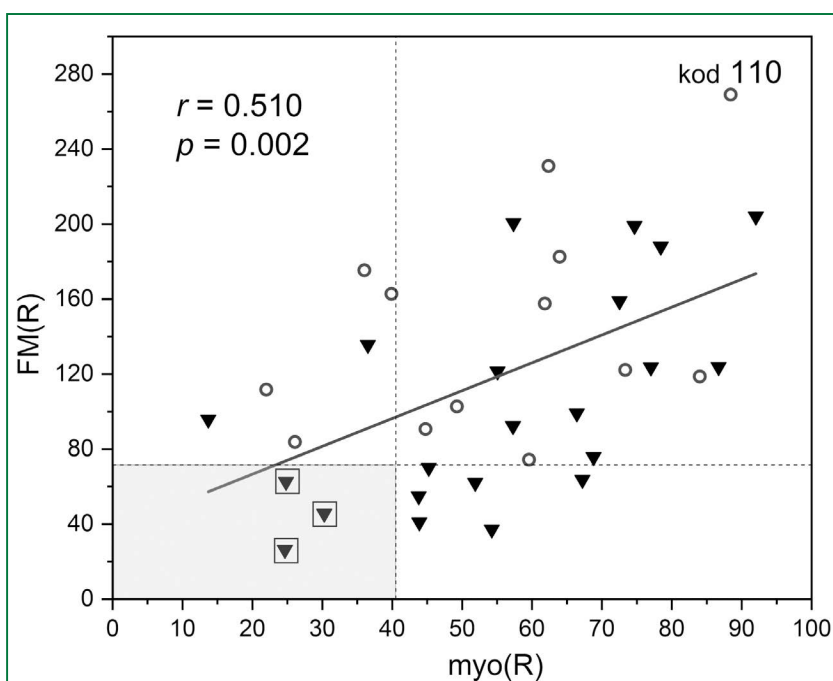
Pomiary spoczynkowe pokazały, że parametr FM korelował ujemnie z wiekiem ($r = -0,462$; $p = 0,003$), co potwierdzają inne doniesienia naukowe [40, 41]. Płeć nie miała istotnego wpływu na obserwowaną zależność. Można było również zauważyć, że jeden z wyników był usytuowany powyżej górnego przedziału predykcji (kobieta, 39 lat, FM = 165), co może wskazywać, że na wartość FM wpływa poziom żeńskich hormonów (faza cyklu menstruacyjnego kobiety); wymaga to jednak udowodnienia w kolejnych badaniach, aczkolwiek w literaturze ten problem jest podnoszony [42–44].

Monitorowanie przepływu mikronaczyniowego w spoczynku identyfikuje osoby z niskimi wartościami FM, wskazując na nieprawidłowości w funkcjonowaniu mikrokrążenia. Jednocześnie zbyt wysoka aktywność miogenna w spoczynku w porównaniu z fazą reperfuzji powinna również wzbudzać niepokój co do stanu badania mikrokrążenia.

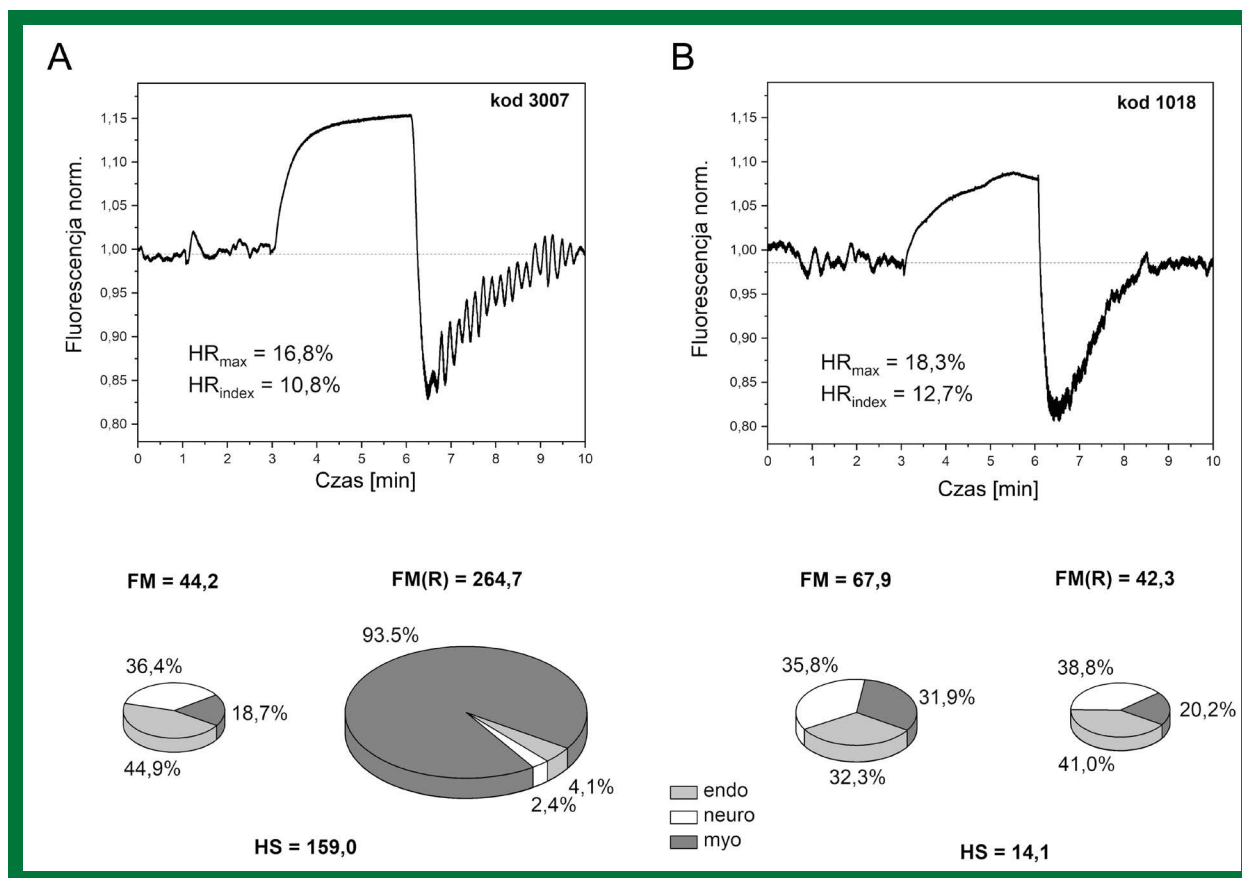
W przypadku zastosowania testu FMSF-PORH na podstawie przeprowadzonej analizy wykazano, że zmiany fluorescencji naskórka podczas fazy reperfuzji w porównaniu z okresem spoczynku miały znacznie większą amplitudę (FM = 75,9 vs. FM(R) = 119,0). Wartości parametrów fazy reperfuzyjnej — FM(R) były istotnie

statystycznie większe aniżeli odpowiadające im wartości parametrów fazy spoczynkowej — FM ($p = 0,0005$). Wzrost parametrów oscylacyjnych był wynikiem aktywacji oscylacji miogennych i to one są odpowiedzialne za zwiększony przepływ mikronaczyniowy w odpowiedzi na niedotlenienie. Związek parametrów części reperfuzyjnej FM(R) i procentowego udziału oscylacji miogennych w parametrze FM(R), tak zwany parametr myo(R), przedstawiono na rycinie 2.

Korzystając z tej zależności wytypowano osoby charakteryzujące się zarówno niskimi wartościami parametru FM(R), jak i myo(R). Byli to trzej mężczyźni, którzy posiadali zaburzoną odpowiedź na niedotlenienie. Wszyscy trzej charakteryzowali się brakiem wzrostu wartości parametrów części reperfuzyjnej w porównaniu do parametrów części spoczynkowej jako odniesienia. Nie powinien dziwić fakt, że w grupie osób zdrowych w wieku 30–50 lat upośledzona wrażliwość na niedotlenienie, której miarą jest stopień aktywacji oscylacji miogennych w fazie reperfuzyjnej, dotyczy głównie mężczyzn. Istnienie różnic w funkcjonowaniu naczyń u kobiet i mężczyzn jest dobrze znane i uważa się, że kluczową rolę w tej kwestii odgrywają hormony płciowe [42–44]. Częstość występowania CVD jest niższa u kobiet przed menopauzą,



Rycina 2. Korelacja między parametrem przepływu mikronaczyniowego dla części reperfuzyjnej FM(R) a składową miogenną oscylacji na linii reperfuzyjnej myo(R) (kobiety — koła, mężczyźni — trójkąty). Kwadratowe obwódki oznaczają osoby z zaburzoną wrażliwością na niedotlenienie. Kod 110 oznacza wynik FM(R) = 269 powyżej górnego przedziału predykcji (kobieta, 30 lat) (źródło: Katarzyńska J. i wsp. *Front. Physiol.* 2020; 11: 702. Oryginalny wydawca: Frontiers Media Ltd.)



Rycina 3. Przykładowe przebiegi *Flow Mediated Skin Fluorescence* (FMSF): **A.** Pacjent z wysoką wrażliwością na niedotlenienie (mężczyzna, 30 lat); **B.** Pacjent z niską wrażliwością na niedotlenienie (mężczyzna, 34 lata). Na wykresach kołowych przedstawiono procentowy udział składowych oscylacji endo, neuro i myo odpowiednio rejestrowanych w fazach spoczynkowej oraz reperfuzyjnej (źródło: Katarzyńska J. i wsp. *Front. Physiol.* 2020; 11: 702. Oryginalny wydawca: Frontiers Media Ltd.)

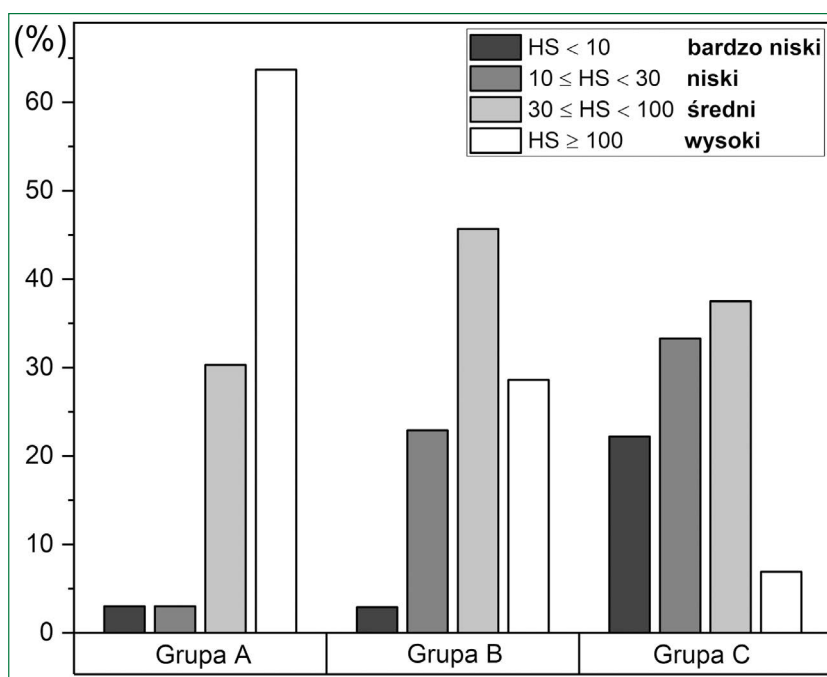
ale zwiększa się wraz z wiekiem i początkiem menopauzy w porównaniu z mężczyznami w podobnym wieku. Sugeruje się ponadto, że czynnik indukowany hipoksją HIF-1 α jest stabilizowany przez estrogen (testosteron nie stabilizuje w takim stopniu HIF-1 α), jednak ze względu na małą liczebność grupy ocena wpływu płci na stan mikrokrążenia wymaga dalszych badań.

Wrażliwość na niedotlenienie

Parametr HS, stanowiący ułamek wartości parametru FM(R), określający intensywność miogennych oscylacji mikrokrążenia (o częstotliwościach 0,052–0,15 Hz) zarejestrowanych podczas reperfuzyj, może być uznany za miarę odpowiedzi organizmu na niedotlenienie. Ponieważ parametr HS odzwierciedla stan mikrokrążenia, które bardzo często jest upośledzone w wielu chorobach, dlatego jego wartość może być czynnikiem prognostycznym w wykrywaniu wczesnych objawów wielu schorzeń.

Na rycinie 3 przedstawiono porównanie przebiegu FMSF jednej z wytypowanych osób z niską wrażliwością na niedotlenienie (kod 1018, mężczyzna, 34 lata) z przebiegiem FMSF uczestnika z dobrą odpowiedzią na niedotlenienie (kod 3007, mężczyzna, 30 lat). Aktywacja oscylacji miogennych w odpowiedzi na niedotlenienie u drugiego z wymienionych jest typowa dla osób zdrowych [30, 38] i świadczy o prawidłowej reakcji mikrokrążenia.

Wykazano silną, ujemną zależność parametru HS od ciśnienia tętniczego, zarówno SBP ($r = -0,486$; $p = 0,003$), jak i rozkurczowego (DBP, *diastolic blood pressure*) ($r = -0,645$; $p = 0,00003$). Silna korelacja parametru HS z ciśnieniem tętniczym wynika najprawdopodobniej z faktu, że HS jest zależny od czynnika stymulowanego hipoksją HIF-1 α . Jeśli HIF-1 α wpływa na homeostazę jonów wapnia, od której zależy *vasomotion*, to oznacza, że niskie wartości HIF-1 α predestynują do podwyższonego ciśnienia tętniczego [45]. Regulacja ciśnienia tętniczego i oscylacji miogennych mogą być kontrolowane przez



Rycina 4. Rozkład wrażliwości organizmu na niedotlenienie (HS, *Hypoxia Sensitivity*) w grupach A, B i C: A — sportowcy, $n = 33$, średni wiek 22,5 roku (16–35 lat); B — osoby zdrowe w średnim wieku, $n = 35$, średni wiek 38,5 lat (30–50 lat), C — chorzy na cukrzycę typu 2, $n = 72$, średni wiek 62 lata (50–80 lat) (źródło: Gebicki J. i wsp. *Vasc. Health Risk Manag.* 2021; 17: 35. Przedrukowano za zgodą oryginalnego wydawcy: Dove Medical Press Ltd.)

HIF-1 α . Oscylacje przepływu mikronaczyniowego są więc czułą miarą dysfunkcji mikrokrążenia u ludzi z samoistnym nadciśnieniem tętniczym [2].

Podsumowując opisane badania, należy stwierdzić, że technika FMSF jest doskonale dostosowana do analizy oscylacji mikrokrążenia, dzięki której możliwa jest ocena wrażliwości organizmu na niedotlenienie. Obecność oscylacji jest warunkiem koniecznym prawidłowego funkcjonowania układu krążenia.

Ocena przepływu mikronaczyniowego w fazie reperuzji, wyrażona wartością HS, pozwala na identyfikację osób z zaburzoną aktywacją oscylacji miogennych. Regulacja oscylacji miogennych jest zależna od generowanego poziomu HIF-1 α . Słaba wrażliwość na niedotlenienie (cecha osobnicza), definiowana jako stopień pobudzenia przejściową hipoksją oscylacji miogennych, oznacza słabą stabilizację HIF-1 α (niski poziom tego markera) w komórkach mięśni gładkich mikronaczyń. Z tego względu parametr HS umożliwia prognozowanie rozwoju chorób, którym towarzyszy hipoksja.

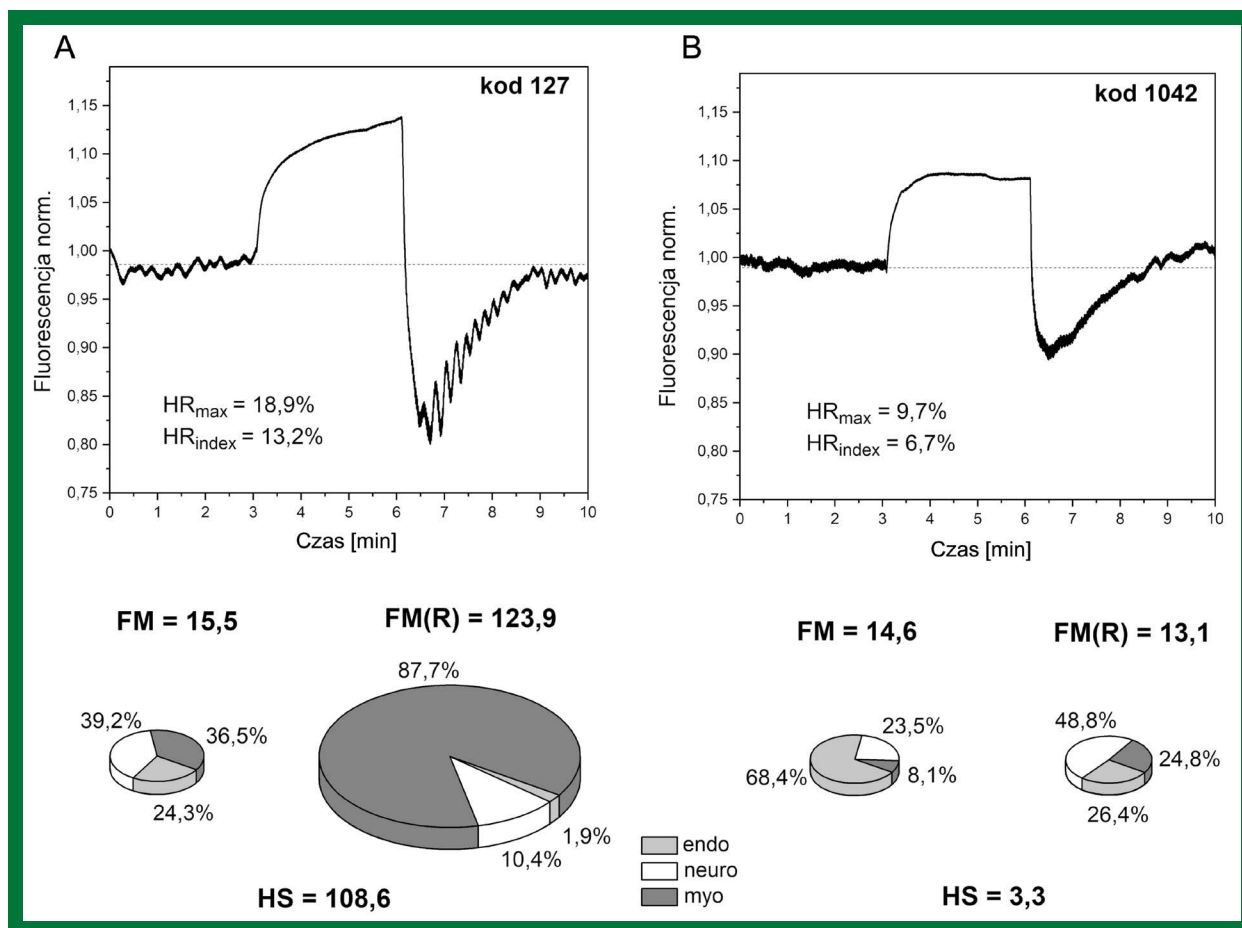
Silna reakcja na niedotlenienie może być korzystną cechą w przypadku sportowców, którzy uprawiają sporty wytrzymałościowe (biegi długodystansowe, wspinaczka itp.) i muszą być szczególnie przystosowani do długotrwałego wysiłku. Znajomość parametru HS może pomóc

osobom aktywnym fizycznie w wyborze i planowaniu harmonogramu ćwiczeń.

Porównawcza analiza oscylacji miogennych (HS)

Na podstawie wyników zebranych na Uniwersytecie Medycznym w Łodzi [21, 22] i Akademii Wychowania Fizycznego w Poznaniu [30] przeprowadzono analizę wartości parametrów HS uzyskanych dla trzech badanych grup: sportowców (grupa A), osób zdrowych (grupa B) oraz chorych na cukrzycę typu 2 (grupa C) [32]. Istotnie statystycznie różnice wartości HS między tymi grupami są znacznie większe, niż wynikałoby to z różnicy wieku osób wchodzących w skład grup (ryc. 4).

W grupie A, którą tworzyli sportowcy wyczynowi (biegacze długodystansowi — 9, sprinterzy — 7, wioślarze — 9 i praktykujący *taekwondo* — 8), 63,6% osób charakteryzowało się wzorowym stanem krążenia mikronaczyniowego. Wartości HS dla 30,3% całej grupy były powyżej 200, stąd mikrokrążenie takich zawodników można określić jako doskonałe. Ze względu na sprawny układ naczyniowy osoby te posiadają wysoki potencjał, aby być wybitnymi sportowcami. Należy zauważyć, że tylko w tej grupie znalazły się wyniki HS przewyższające wartość 200. W grupie A zidentyfikowano również dwie osoby ze słabo funkcjonującym mikrokrążeniem, z których jedna



Rycina 5. Przykładowe przebiegi Flow Mediated Skin Fluorescence (FMSF) zarejestrowane u dwojga chorych na cukrzycę typu 2: **A.** Kod 127, kobieta, 70 lat, czas trwania choroby 20 lat, bez powikłań naczyniowych; **B.** Kod 1042, kobieta, 59 lat, czas trwania choroby 18 lat, zespół stopy cukrzycowej. Podane na rycinie wartości parametrów dotyczą prezentowanych pomiarów (badania własne, rycina autorska)

miała niski poziom HS (HS = 17,4, mężczyzna, 19 lat, *taekwondo*), a druga zastanawiająco bardzo niski poziom HS (HS = 8,6, mężczyzna, 18 lat, sprinter). Oczywiście, stan zdrowia tych osób powinien zostać dokładnie zbadany przed kontynuowaniem kariery sportowej.

Uderzająco odmienny obraz wyłonił się z analizy wyników w grupie C (chorzy na cukrzycę typu 2). Cukrzyca powiązana ze starzeniem silnie osłabia odpowiedź mikrokrążenia na hipoksję, co widać po wartościach parametru HS. W tej grupie 55,5% chorych miało bardzo niskie lub niskie wartości parametru HS. Ale 5 z 72 pacjentów w grupie C miało wysokie wartości HS (> 100). Dwa przykładowe dla tej grupy przebiegi sygnału FMSF przedstawiono na rycinie 5. Mało prawdopodobne jest wystąpienie powikłań mikronaczyniowych u pacjentów z wysokim HS (np. pacjentka, kod 127 z ryc. 5), pomimo długiego czasu trwania choroby i zaawansowanego wie-

ku. Ta obserwacja może sugerować powiązanie z predyspozycją genetyczną.

Analiza wyników w grupie B (zdrowe osoby w średnim wieku, 30–50 lat) ujawniła, że 8 osób (2 kobiety i 6 mężczyzn) miało niskie wartości parametru HS, a u jednej osoby (mężczyzna) wykryto bardzo niską wartość parametru HS. Nie jest zaskakujące, że osobnikami z grup A i B z niskimi lub bardzo niskimi parametrami HS byli głównie mężczyźni (9 na 11).

Przedstawiona powyżej analiza sugeruje, że parametr HS jest wyjątkowo trafnie dostosowany do oceny stanu mikrokrążenia. Szerokie okno analizy parametru HS sprawia, że podejście to można zastosować zarówno u osób zdrowych, jak i u pacjentów z wyraźnym upośledzeniem funkcjonowania krążenia mikronaczyniowego.

Na podstawie wyników badań FMSF zebranych dla kilkuset uczestników wyróżnione zostały cztery zakresy

Tabela 1. Wyróżnione zakresy wrażliwości organizmu na niedotlenienie (HS, Hypoxia Sensitivity)

Wysoki	$HS \geq 100$
Średni	$30 \leq HS < 100$
Niski	$10 \leq HS < 30$
Bardzo niski	$HS < 10$

wartości parametru HS, charakteryzujące różne poziomy status mikrokrążenia (patrz tab. 1).

Potencjał aplikacyjny analizy oscylacji mikrokrążenia u pacjentów z chorobą koronawirusową 2019

W ostatniej dekadzie opublikowano wiele prac opisujących zależność między wrodzoną odpornością a reakcją na niedotlenienie [46]. Postuluje się, że istotną rolę odgrywa tu HIF. Pozytywny wpływ, jaki stabilizacja HIF-1 α ma na łagodzenie ostrych stanów zapalnych błony śluzowej, wywołanych przez patogeny, jest dobrze udokumentowany. Stabilizacja HIF-1 α prowadzi do indukcji szeregu cząsteczek ochronnych, co ma istotne znaczenie dla ustąpienia stanu zapalnego. Zatem stabilizacja HIF-1 α w niedotlenionej tkance jest również ważnym warunkiem prawidłowego funkcjonowania wrodzonej odpowiedzi immunologicznej. Dlatego też bezpośredni ilościowy pomiar odpowiedzi organizmu na niedotlenienie może być przydatny do przewidywania odporności wrodzonej. Takie podejście może być cenną pomocą na przykład w zarządzaniu pandemią COVID-19.

Ocena odpowiedzi przepływu mikronaczyniowego na niedotlenienie może być przydatna w przewidywaniu objawów COVID-19, zważywszy, że hipoksemia jest niezależnie związana ze śmiertelnością wewnątrzszpitalną z powodu COVID-19 [47]. Ponieważ przepływ mikronaczyniowy jest aktywowany podczas adaptacji do dużych wysokości, wydaje się zrozumiałe, że dla osób żyjących na dużych wysokościach koronawirus zespołu ostrej niewydolności oddechowej 2 (SARS-CoV-2, *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*) nie stanowi tak dużego zagrożenia epidemiologicznego ze względu na mechanizmy kompensacyjne, jakie rozwinęły się w organizmach tamtejszych mieszkańców [38, 48].

Z opisu przypadku czteroosobowej rodziny, w której jeden z członków zaraził się wirusem SARS-CoV-2, wynika, że osoby, które miały wysoką wartość parametru HS (> 100), nie były podatne na zarażenie wirusem, chociaż przebywały w tym samym gospodarstwie domo-

wym [34]. Zarażony członek rodziny posiadał wartość HS = 39,6, która prognozowała umiarkowane objawy choroby. Należy jednocześnie zauważyć, że niezarażeni członkowie rodziny mieli ponadto niskie wartości ciśnienia tętniczego.

Parametr HS, reprezentujący stymulację oscylacji miogennych przez przejściową hipoksję, jest silnie zależny od ciśnienia tętniczego i osiąga najwyższe wartości przy bardzo niskich wartościach ciśnienia tętniczego. Wysoka wartość parametru HS odzwierciedla skuteczną stabilizację HIF-1 α w warunkach przejściowej hipoksji. Ciśnienie tętnicze jest również regulowane przez HIF-1 α w komórkach mięśni gładkich naczyń [45]. Dodatkowo nadciśnienie tętnicze uznano za poważną przyczynę ciężkości przebiegu choroby i śmiertelności COVID-19. Normalna reakcja na stres hipoksyiczny osoby o niskim ciśnieniu tętniczym, spowodowana na przykład obecnością SARS-CoV-2, powinna skutkować stabilizacją HIF-1 α , co z kolei może prowadzić do braku zarażenia. Natomiast w przypadku braku wrażliwości organizmu na niedotlenienie i przy wysokich wartościach ciśnienia tętniczego, ryzyko zarażenia jest duże, jak również objawy COVID-19 mogą być cięższe. Ta wstępna obserwacja wymaga dokładniejszej weryfikacji w dalszych badaniach.

Podsumowując, technika FMSF może być wykorzystana jako narzędzie prognostyczne w infekcji COVID-19, gdyż parametr HS może być użyteczny do przewidywania nasilenia objawów COVID-19. Silna aktywacja oscylacji miogennych minimalizuje szkodliwy wpływ hipoksji na tkanki i utrudnia rozwój choroby.

PODSUMOWANIE

Oscylacje mikrokrążenia, znane jako *flowmotion*, są dobrze rozpoznaną cechą przepływu krwi przez naczynia krwionośne. Ponieważ przepływ mikronaczyniowy odzwierciedla stan mikrokrążenia, które bardzo często jest upośledzone w wielu chorobach, dlatego też jego ilościowa ocena może być wykorzystana do badania wczesnych objawów wielu schorzeń. Oscylacje mikrokrążenia mogą być monitorowane w sposób bezpośredni i precyzyjny za pomocą techniki FMSF.

Przebieg sygnału FMSF posiada dwa charakterystyczne fragmenty z widocznymi oscylacjami mikrokrążenia: oscylacje spoczynkowe na linii bazowej oraz oscylacje na linii reperfuzyjnej, będące wynikiem wymuszonego przekrwienia reaktywnego (PORH). Analiza przepływu mikronaczyniowego zarejestrowanego w trakcie reper-

fuzji pozwala na ilościową ocenę reakcji mikrokrążenia skórno na przejściowo zastosowane niedokrwienie, dając w konsekwencji obraz reakcji organizmu na niedotlenienie. Zaobserwowano, że parametry charakteryzujące przepływ mikronaczyniowy są zaburzone u pacjentów z różnymi chorobami, w tym z cukrzycą, CVD czy nadciśnieniem tętniczym.

Zdefiniowano kilka parametrów jako ilościowe miary rejestrowanych oscylacji mikrokrążenia:

- FM — parametr charakteryzujący oscylacje mikrokrążenia w spoczynku;
- FM(R) — parametr charakteryzujący oscylacje mikrokrążenia w fazie reperfuzji, odzwierciedlający wpływ niedotlenienia na przepływ związany z aktywnością naczyń, dający możliwość oceny sztywności naczyń;
- HS (*Hypoxia Sensitivity*) — wrażliwość organizmu na niedotlenienie — parametr będący bezpośrednią miarą intensywności miogennych oscylacji mikrokrążenia zarejestrowanych podczas reperfuzji, o częstotliwościach z zakresu 0,052–0,15 Hz.

Oscylacje miogenne w fazie reperfuzyjnej powstają w wyniku stymulacji poprzez zastosowanie przejściowego niedokrwienia, które polega na zamknięciu przepływu krwi w tętnicy ramiennej za pomocą opaski okluzyjnej. Parametr HS stanowi bezpośrednią miarę intensywności miogennych oscylacji mikrokrążenia zarejestrowanych podczas reperfuzji, dlatego też parametr HS mierzony techniką FMSE zapewnia prostą i dość uniwersalną ocenę stanu mikrokrążenia, a co za tym idzie, jest czynnikiem prognostycznym rozwoju i przebiegu wielu chorób.

DIAGNOSTYCZNE WYKORZYSTANIE PARAMETRU HS UZYSKANE Z POMIARÓW TECHNIKĄ FMSE

Diagnostyczne wykorzystanie HS za pomocą FMSE obejmuje:

- ocenę zaburzeń mikrokrążenia w cukrzycy, CVD i nadciśnieniu tętniczym;
- ocenę tolerancji wysiłku fizycznego w sporcie amatorskim i wyczynowym;
- ocenę adaptacji do przebywania na dużych wysokościach.

Technika FMSE, z racji tego, że posiada unikalny potencjał aplikacyjny do analizy przepływu mikronaczyniowego i jego odpowiedzi na niedotlenienie, może być stosowana do charakteryzowania stanu mikrokrążenia organizmu. Technika FMSE pozwala na wykrycie zaburzeń we wczesnym stadium rozwoju choroby oraz

umożliwia monitorowanie procesu leczenia. Dzięki temu możliwa jest identyfikacja pacjentów do podjęcia interwencji profilaktycznej lub terapeutycznej z ewentualnym skierowaniem do dalszej diagnostyki.

KONFLIKT INTERESÓW

JG i AM są twórcami patentów chroniących wykorzystanie technologii FMSE.

PIŚMIENNICTWO

1. Nilsson H, Aalkjaer C. Vasomotion: mechanisms and physiological importance. *Mol Interv.* 2003; 3(2): 79–89, 51, doi: 10.1124/mi.3.2.79, indexed in Pubmed: 14993429.
2. Rossi M, Carpi A, Galetta F, et al. The investigation of skin blood flowmotion: a new approach to study the microcirculatory impairment in vascular diseases? *Biomed Pharmacother.* 2006; 60(8): 437–442, doi: 10.1016/j.biopha.2006.07.012, indexed in Pubmed: 16935461.
3. Aalkjær C, Boedtker D, Matchkov V. Vasomotion — what is currently thought? *Acta Physiol (Oxf).* 2011; 202(3): 253–269, doi: 10.1111/j.1748-1716.2011.02320.x, indexed in Pubmed: 21518271.
4. Cole WC, Gordon GR, Braun AP. Cellular and ionic mechanisms of arterial vasomotion. In: Hashitani H, Lang RJ. ed. *Smooth muscle spontaneous activity: physiological and pathological modulation.* Springer, Singapore 2019: 297–312.
5. Stefanovska A, Bracic M, Kvernmo HD. Wavelet analysis of oscillations in the peripheral blood circulation measured by laser Doppler technique. *IEEE Trans Biomed Eng.* 1999; 46(10): 1230–1239, doi: 10.1109/10.790500, indexed in Pubmed: 10513128.
6. Kvandal P, Landsverk SA, Bernjak A, et al. Low-frequency oscillations of the laser Doppler perfusion signal in human skin. *Microvasc Res.* 2006; 72(3): 120–127, doi: 10.1016/j.mvr.2006.05.006, indexed in Pubmed: 16854436.
7. Bernjak A, Clarkson PBM, McClintock PVE, et al. Low-frequency blood flow oscillations in congestive heart failure and after beta1-blockade treatment. *Microvasc Res.* 2008; 76(3): 224–232, doi: 10.1016/j.mvr.2008.07.006, indexed in Pubmed: 18721820.
8. Ticcinelli V, Stankovski T, McClintock PVE, et al. Ageing of the couplings between cardiac, respiratory and myogenic activity in humans. *Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc.* 2015; 2015: 7366–7369, doi: 10.1109/EMBC.2015.7320093, indexed in Pubmed: 26737993.
9. Clough GF, Kuliga KZ, Chipperfield AJ. Flow motion dynamics of microvascular blood flow and oxygenation: evidence of adaptive changes in obesity and type 2 diabetes mellitus/insulin resistance. *Microcirculation.* 2017; 24(2), doi: 10.1111/micc.12331, indexed in Pubmed: 27809397.
10. Schmidt-Lucke C, Borgström P, Schmidt-Lucke JA. Low frequency flowmotion/(vasomotion) during patho-physiological conditions. *Life Sci.* 2002; 71(23): 2713–2728, doi: 10.1016/s0024-3205(02)02110-0, indexed in Pubmed: 12383879.
11. Bari F, Tóth-Szuki V, Domoki F, et al. Flow motion pattern differences in the forehead and forearm skin: age-dependent alterations are not specific for Alzheimer's disease. *Microvasc Res.* 2005; 70(3): 121–128, doi: 10.1016/j.mvr.2005.09.001, indexed in Pubmed: 16229865.
12. Rossi M, Matteucci E, Pesce M, et al. Study of skin vasomotion in type 1 diabetic patients and of its possible relationship with clinical and laboratory variables. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2013; 53(4): 357–367, doi: 10.3233/CH-2012-1621, indexed in Pubmed: 23070199.
13. Bruning RS, Kenney WL, Alexander LM. Altered skin flowmotion in hypertensive humans. *Microvasc Res.* 2015; 97: 81–87, doi: 10.1016/j.mvr.2014.01.001, indexed in Pubmed: 24418051.

14. Tikhonova IV, Kosyakova NI, Tankanag AV, et al. Oscillations of skin microvascular blood flow in patients with asthma. *Microcirculation*. 2016; 23(1): 33–43, doi: [10.1111/micc.12252](https://doi.org/10.1111/micc.12252), indexed in Pubmed: [26494289](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26494289/).
15. Mizeva I, Makovik I, Dunaev A, et al. Analysis of skin blood microflow oscillations in patients with rheumatic diseases. *J Biomed Opt*. 2017; 22(7): 70501, doi: [10.1117/1.JBO.22.7.070501](https://doi.org/10.1117/1.JBO.22.7.070501), indexed in Pubmed: [28703257](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28703257/).
16. Pedanekar T, Kedare R, Sengupta A. Monitoring tumor progression by mapping skin microcirculation with laser Doppler flowmetry. *Lasers Med Sci*. 2019; 34(1): 61–77, doi: [10.1007/s10103-018-2600-z](https://doi.org/10.1007/s10103-018-2600-z), indexed in Pubmed: [30141135](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30141135/).
17. Sorelli M, Francia P, Bocchi L, et al. Assessment of cutaneous microcirculation by laser Doppler flowmetry in type 1 diabetes. *Microvasc Res*. 2019; 124: 91–96, doi: [10.1016/j.mvr.2019.04.002](https://doi.org/10.1016/j.mvr.2019.04.002), indexed in Pubmed: [30959000](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30959000/).
18. Piotrowski L, Urbaniak M, Jedrzejczak B, et al. Note: Flow mediated skin fluorescence — a novel technique for evaluation of cutaneous microcirculation. *Rev Sci Instrum*. 2016; 87(3): 036111, doi: [10.1063/1.4945044](https://doi.org/10.1063/1.4945044), indexed in Pubmed: [27036844](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27036844/).
19. Katarzynska J, Lipinski Z, Cholewinski T, et al. Non-invasive evaluation of microcirculation and metabolic regulation using flow mediated skin fluorescence (FMSF): Technical aspects and methodology. *Rev Sci Instrum*. 2019; 90(10): 104104, doi: [10.1063/1.5092218](https://doi.org/10.1063/1.5092218).
20. Katarzynska J, Cholewinski T, Sieron L, et al. Flowmotion monitored by flow mediated skin fluorescence (FMSF): a tool for characterization of microcirculatory status. *Front Physiol*. 2020; 11: 702, doi: [10.3389/fphys.2020.00702](https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00702), indexed in Pubmed: [32636761](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32636761/).
21. Katarzynska J, Borkowska A, Czajkowski P, et al. Flow mediated skin fluorescence technique reveals remarkable effect of age on microcirculation and metabolic regulation in type 1 diabetes. *Microvasc Res*. 2019; 124: 19–24, doi: [10.1016/j.mvr.2019.02.005](https://doi.org/10.1016/j.mvr.2019.02.005), indexed in Pubmed: [30807771](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30807771/).
22. Katarzynska J, Borkowska A, Los A, et al. Flow-mediated skin fluorescence (FMSF) technique for studying vascular complications in type 2 diabetes. *J Diabetes Sci Technol*. 2020; 14(3): 693–694, doi: [10.1177/1932296819895544](https://doi.org/10.1177/1932296819895544), indexed in Pubmed: [31855069](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31855069/).
23. Hellmann M, Tarnawska M, Dudziak M, et al. Reproducibility of flow mediated skin fluorescence to assess microvascular function. *Microvasc Res*. 2017; 113: 60–64, doi: [10.1016/j.mvr.2017.05.004](https://doi.org/10.1016/j.mvr.2017.05.004), indexed in Pubmed: [28529171](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28529171/).
24. Tarnawska M, Dorniak K, Kaszubowski M, et al. A pilot study with flow mediated skin fluorescence: a novel device to assess microvascular endothelial function in coronary artery disease. *Cardiol J*. 2018; 25(1): 120–127, doi: [10.5603/CJ.a2017.0096](https://doi.org/10.5603/CJ.a2017.0096), indexed in Pubmed: [28840593](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28840593/).
25. Pajkowski M, Chlebus K, Hellmann M. Microvascular endothelial dysfunction in a young patient with familial hypercholesterolemia. *Pol Arch Intern Med*. 2020; 130(7-8): 679–680, doi: [10.20452/pamw.15411](https://doi.org/10.20452/pamw.15411), indexed in Pubmed: [32491301](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32491301/).
26. Rechciński T, Cieślak-Guerra U, Siedlecki P, et al. Flow-mediated skin fluorescence: a novel method for the estimation of sleep apnea risk in healthy persons and cardiac patients. *Cardiol J*. 2020 [Epub ahead of print], doi: [10.5603/CJ.a2020.0139](https://doi.org/10.5603/CJ.a2020.0139), indexed in Pubmed: [33140392](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33140392/).
27. Majewski S, Szewczyk K, Białas AJ, et al. Assessment of microvascular function in vivo using flow mediated skin fluorescence (FMSF) in patients with obstructive lung diseases: a preliminary study. *Microvasc Res*. 2020; 127: 103914, doi: [10.1016/j.mvr.2019.103914](https://doi.org/10.1016/j.mvr.2019.103914), indexed in Pubmed: [31472204](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31472204/).
28. Bogaczewicz J, Tokarska K, Wozniacka A. Changes of NADH fluorescence from the skin of patients with systemic lupus erythematosus. *Biomed Res Int*. 2019; 2019: 5897487, doi: [10.1155/2019/5897487](https://doi.org/10.1155/2019/5897487), indexed in Pubmed: [31930128](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31930128/).
29. Liszewska A, Robak E, Bernacka M, et al. Methotrexate use and NAD⁺/NADH metabolism in psoriatic keratinocytes. *Postepy Dermatol Alergol*. 2020; 37(1): 19–22, doi: [10.5114/ada.2020.93379](https://doi.org/10.5114/ada.2020.93379), indexed in Pubmed: [32467678](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32467678/).
30. Bugaj O, Zieliński J, Kusy K, et al. The effect of exercise on the skin content of the reduced form of NAD and its response to transient ischemia and reperfusion in highly trained athletes. *Front Physiol*. 2019; 10: 600, doi: [10.3389/fphys.2019.00600](https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00600), indexed in Pubmed: [31156467](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31156467/).
31. Bugaj O, Kusy K, Kantanista A, et al. The effect of a 7-week training period on changes in skin NADH fluorescence in highly trained athletes. *Appl Sci*. 2020; 10(15): 5133, doi: [10.3390/app10155133](https://doi.org/10.3390/app10155133).
32. Gebicki J, Marcinek A, Zielinski J. Assessment of microcirculatory status based on stimulation of myogenic oscillations by transient ischemia: from health to disease. *Vasc Health Risk Manag*. 2021; 17: 33–36, doi: [10.2147/VHRM.S292087](https://doi.org/10.2147/VHRM.S292087), indexed in Pubmed: [33603387](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33603387/).
33. Gebicki J, Katarzynska J, Marcinek A. Can the microcirculatory response to hypoxia be a prognostic factor for Covid-19? *Respir Physiol Neurobiol*. 2020; 280: 103478, doi: [10.1016/j.resp.2020.103478](https://doi.org/10.1016/j.resp.2020.103478), indexed in Pubmed: [32540481](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32540481/).
34. Gebicki J, Katarzynska J, Marcinek A. Can efficient stimulation of myogenic microcirculatory oscillations by transient ischemia predict low incidence of COVID-19 infection? *Respir Physiol Neurobiol*. 2021; 286: 103618, doi: [10.1016/j.resp.2021.103618](https://doi.org/10.1016/j.resp.2021.103618), indexed in Pubmed: [33460776](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33460776/).
35. Balu M, Mazhar A, Hayakawa CK, et al. In vivo multiphoton NADH fluorescence reveals depth-dependent keratinocyte metabolism in human skin. *Biophys J*. 2013; 104(1): 258–267, doi: [10.1016/j.bpj.2012.11.3809](https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.11.3809), indexed in Pubmed: [23332078](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23332078/).
36. Davies T, Gilbert-Kawai E, Wythe S, et al. Xtreme Everest 2 Research Group. Sustained vasomotor control of skin microcirculation in Sherpas versus altitude-naive lowlanders: Experimental evidence from Xtreme Everest 2. *Exp Physiol*. 2018; 103(11): 1494–1504, doi: [10.1113/EP087236](https://doi.org/10.1113/EP087236), indexed in Pubmed: [30182473](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30182473/).
37. Carey D, Thanaj M, Davies T, et al. Enhanced flow-motion complexity of skin microvascular perfusion in Sherpas and lowlanders during ascent to high altitude. *Sci Rep*. 2019; 9(1): 14391, doi: [10.1038/s41598-019-50774-0](https://doi.org/10.1038/s41598-019-50774-0), indexed in Pubmed: [31591502](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31591502/).
38. Salvi P, Faini A, Castiglioni P, et al. Increase in slow-wave vasomotion by hypoxia and ischemia in lowlanders and highlanders. *J Appl Physiol* (1985). 2018; 125(3): 780–789, doi: [10.1152/jappphysiol.00977.2017](https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00977.2017), indexed in Pubmed: [29927733](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29927733/).
39. Pickering C, Kiely J. Exercise response efficiency: a novel way to enhance population health? *Lifestyle Genom*. 2018; 11(3-6): 129–135, doi: [10.1159/000501206](https://doi.org/10.1159/000501206), indexed in Pubmed: [31302657](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31302657/).
40. Bernardi L, Rossi M, Leuzzi S, et al. Reduction of 0.1 Hz microcirculatory fluctuations as evidence of sympathetic dysfunction in insulin-dependent diabetes. *Cardiovasc Res*. 1997; 34(1): 185–191, doi: [10.1016/s0008-6363\(97\)00017-5](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(97)00017-5), indexed in Pubmed: [9217889](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9217889/).
41. Khalil A, Humeau-Heurtier A, Gascoin L, et al. Aging effect on microcirculation: a multiscale entropy approach on laser speckle contrast images. *Med Phys*. 2016; 43(7): 4008, doi: [10.1118/1.4953189](https://doi.org/10.1118/1.4953189), indexed in Pubmed: [27370119](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27370119/).
42. Thompson J, Khalil RA. Gender differences in the regulation of vascular tone. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2003; 30(1-2): 1–15, doi: [10.1046/j.1440-1681.2003.03790.x](https://doi.org/10.1046/j.1440-1681.2003.03790.x), indexed in Pubmed: [12542447](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12542447/).
43. Chen H. Mechanism of gender-related differences in vascular function. *Cardiovasc Pharm Open Access*. 2018; 7(4), doi: [10.4172/2329-6607.1000246](https://doi.org/10.4172/2329-6607.1000246).
44. Pabbidi MR, Kuppusamy M, Didion SP, et al. Sex differences in the vascular function and related mechanisms: role of 17β-estradiol. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2018; 315(6): H1499–H1518, doi: [10.1152/ajpheart.00194.2018](https://doi.org/10.1152/ajpheart.00194.2018), indexed in Pubmed: [30192631](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30192631/).
45. Huang Y, Di Lorenzo A, Jiang W, et al. Hypoxia-inducible factor-1α in vascular smooth muscle regulates blood pressure homeostasis through a peroxisome proliferator-activated receptor-γ-angiotensin II receptor type 1 axis. *Hypertension*. 2013; 62(3): 634–640, doi: [10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.00160](https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.00160), indexed in Pubmed: [23918749](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23918749/).
46. Colgan SP, Furuta GT, Taylor CT. Hypoxia and innate immunity: keeping up with the HIFsters. *Annu Rev Immunol*. 2020; 38: 341–363, doi: [10.1146/annurev-immunol-100819-121537](https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-100819-121537), indexed in Pubmed: [31961750](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31961750/).

47. Xie J, Covassin N, Fan Z, et al. Association between hypoxemia and mortality in patients with COVID-19. *Mayo Clin Proc.* 2020; 95(6): 1138–1147, doi: [10.1016/j.mayocp.2020.04.006](https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2020.04.006), indexed in Pubmed: 32376101.
48. Arias-Reyes C, Zubieta-DeUrioste N, Poma-Machicao L, et al. Does the pathogenesis of SARS-CoV-2 virus decrease at high-altitude? *Respir Physiol Neurobiol.* 2020; 277: 103443, doi: [10.1016/j.resp.2020.103443](https://doi.org/10.1016/j.resp.2020.103443), indexed in Pubmed: 32333993.