

KLINICZNA INTERPRETACJA WYNIKÓW BADAŃ

Ocena funkcji śródbłonna mikrokrążenia u pacjentów ze schorzeniami układu sercowo-naczyniowego

Assessment of microvascular endothelial function in patients with cardiovascular diseases

Marcin Hellmann, Karolina Dorniak, Maria Dudziak

Zakład Diagnostyki Chorób Serca II Katedry Kardiologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

STRESZCZENIE

Dysfunkcja śródbłonna jest zjawiskiem kluczowym w przebiegu chorób układu krążenia. Testy reaktywności, w połączeniu z technikami obrazowania mikrokrążenia *in vivo*, umożliwiają nieinwazyjną ocenę funkcji śródbłonna i reaktywności naczyń. Najczęściej stosuje się test pookluzyjnej reakcji przekrwiennej, test przekrwienia termicznego oraz jonoforezę acetylocholino. Dokładne zrozumienie mechanizmów regulacyjnych poszczególnych reakcji mikronaczyniowych uzupełnia wiedzę na temat patofizjologii schorzeń układu sercowo-naczyniowego. Warto również podkreślić, że — poza niewątpliwymi walorami naukowymi — zasadne jest stosowanie testów reaktywności w celach diagnostycznych i prognostycznych.

Choroby Serca i Naczyń 2014, 11 (1), 29–33

Słowa kluczowe: mikrokrążenie, śródbłonek, testy reaktywności, choroby układu sercowo-naczyniowego

ABSTRACT

Endothelial dysfunction is a pivotal phenomenon in cardiovascular disease. Reactivity tests coupled with *in vivo* microcirculation imaging methods allow for noninvasive assessment of endothelial function and vascular reactivity. Post-occlusive reactive hyperemia, local thermal hyperemia and acetylcholine iontophoresis are the most commonly used tests. Exact comprehension of the regulatory pathways underlying these microvascular reactions completes the knowledge about the pathophysiology of cardiovascular disease. It should also be noted that besides scientific advantages reactivity tests could provide diagnostic and prognostic values.

Choroby Serca i Naczyń 2014, 11 (1), 29–33

Key words: microcirculation, endothelium, reactivity tests, cardiovascular diseases

WPROWADZENIE

Dysfunkcja śródbłonna mikrokrążenia jest jednym z najwcześniejszych etapów w patogenezie chorób układu sercowo-naczyniowego. Proces ten polega na osłabieniu potencjału wazodylatacyjnego zależnego od śródbłonna przy jednoczesnym wzmożeniu wazokonstrykcji i strukturalnym remodelingu naczyń mikrokrążenia [1, 2]. W związku z powyższym precyzyjna ocena mikrokrążenia może mieć dużą wartość diagnostyczną i prognostyczną. Jednak — ze względu na bardzo zróżnicowany przepływ krwi, niejednorodną morfologię oraz mikroskopijne wymiary naczyń — mikrokrążenie to część układu krążenia, której badanie jest szczególnie trudne [1, 3]. Biorąc pod uwagę łatwy dostęp i nieinwazyjny charakter pomiarów, mikrokrążenie skórne pozostaje najczęściej stosowanym modelem badawczym służącym do oceny funkcji śródbłonna u pacjentów ze schorzeniami układu sercowo-naczyniowego. Ponadto z przedstawionych w piśmiennictwie badań wynika, że obszar skóry jest reprezentatywny dla mikrokrążenia w innych narządach.

Adres do korespondencji:

dr 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

dach, stanowiąc swoiste „okno” do oceny systemowego stanu naczyń [4–6].

Ocena mikrokrążenia w warunkach podstawowych rzadko dostarcza informacji na temat mechanizmów patofizjologicznych, ponieważ jest to obszar naczyniowy cechujący się dużą zmiennością czasową i przestrzenną. Wartość poznawcza badań nad mechanizmami regulacyjnymi mikrokrążenia istotnie wzrasta po zastosowaniu testów stymulacyjnych opartych na prowokacji fizjologicznej bądź farmakologicznej [7]. Pozwalają one na ocenę funkcji śródbłonna i reaktywności naczyń, a każdy z nich działa w innym mechanizmie fizjologicznym, przez co uzupełniają się nawzajem w badaniach nad patogenezą chorób układu krążenia [8].

METODY OCENY MIKROKRĄŻENIA

Ocena reaktywności mikrokrążenia w odpowiedzi na bodźce stymulacyjne jest możliwa dzięki zastosowaniu nowoczesnych technik obrazowania przepływu krwi *in vivo*, takich jak laserowy skaner dopplerowski (LDI, *laser Doppler imaging*) czy analiza kontrastu obrazu spekl laserowych (LSCI, *laser speckle contrast imaging*) [6, 8]. Laserowy skaner dopplerowski umożliwia obrazowanie perfuzji w dużym obszarze tkanki, co dostarcza informacji na temat zmienności przepływów w mikrokrążeniu. Trzeba jednak pamiętać, że skanowanie większego badanego obszaru zajmuje od kilku sekund do kilku minut, czego konsekwencją jest gorsza rozdzielczość czasowa. Od niedawna jest dostępna nowa laserowa metoda oceny hemodynamiki mikrokrążenia. Podstawą tej techniki jest analiza kontrastu obrazu spekl laserowych. Pozwala ona na monitorowanie zmian perfuzji w czasie rzeczywistym w dużym obszarze tkanki, a przy tym cechuje się doskonałą powtarzalnością pomiarów, jak również bardzo dobrą rozdzielczością przestrzenną [1].

Obie wspomniane wyżej metody umożliwiają nieinwazyjne i bezkontaktowe rejestrowanie zmian przepływu krwi w mikrokrążeniu dzięki głowicy lasera, która jest umieszczona 20 cm nad badanym obszarem. Światło lasera skanuje wybraną do analizy przestrzeń, wnikając około 1 mm w głąb tkanki. Aparat rejestruje przepływ w badanym obszarze w arbitralnych jednostkach perfuzji oraz tworzy kolorowe mapy ukrwienia pozwalające na ocenę zmian w mikrokrążeniu w odpowiedzi na zastosowane testy stymulacyjne [9, 10]. Wśród najczęściej wykorzystywanych i najbardziej wystandaryzowanych testów reaktywności należy wymienić stymulację mechaniczną — test pookluzyjnej reakcji przekrwiennej (PORH, *post-*

occlusive reactive hyperemia), stymulację termiczną — test przekrwienia termicznego (LTH, *local thermal hyperemia*) oraz bodźce farmakologiczne w postaci jonoforezy acetylocholino (Ach, *acetylcholine*) i nitroprusydku sodu (SNP, *sodium nitroprusside*) [11].

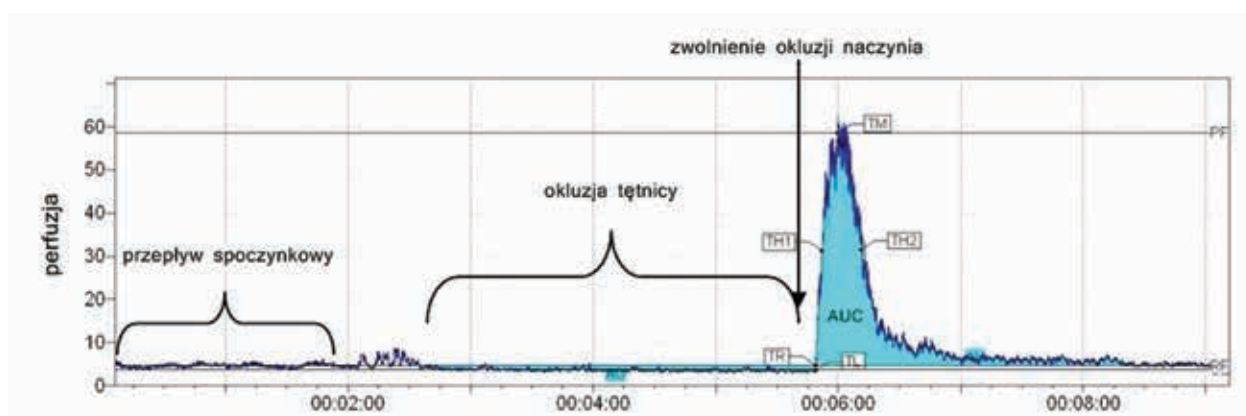
TEST POOKLUZYJNEJ REAKCJI PRZEKRWIENNEJ

Test pookluzyjnej reakcji przekrwiennej jest jednym z najczęściej stosowanych w badaniach mikrokrążenia. Wykonuje się go, umieszczając mankiety do pomiaru ciśnienia tętniczego (zazwyczaj) na ramieniu i rejestrując przepływ krwi w mikrokrążeniu w obrębie przedramienia. Mankiet pompuje się do 50 mm Hg powyżej wartości ciśnienia skurczowego. Najczęściej okluzję naczyń utrzymuje się przez 5 minut, choć okres ten może trwać od 1 do 15 minut i różni się zależnie od doświadczenia poszczególnych badaczy [8, 11]. Podczas testu PORH obserwuje się specyficzne zwiększenie perfuzji następujące natychmiast po zwolnieniu okluzji naczyń tętniczego (ryc. 1).

Ostatnie badania nad mechanizmami regulacyjnymi pookluzyjnej reakcji przekrwiennej uzasadniają jej stosowanie jako testu do oceny funkcji śródbłonna mikrokrążenia. Wynika z nich również, że nerwy czuciowe — poprzez tak zwany odruch włókienkowy (aksonowy) — są głównym pośrednikiem odpowiedzialnym za obserwowaną odpowiedź naczyniową [8]. Najnowsze dane sugerują także udział śródbłonkowego czynnika hiperpolarizującego (EDHF, *endothelium derived hyperpolarizing factor*) i metabolitów cytochromu P450 jako regulatorów PORH [12].

Charakterystyczna krzywa obrazująca przepływ krwi w mikrokrążeniu generowana w odpowiedzi na PORH umożliwia różnorodną analizę wielu parametrów. W praktyce najczęściej ocenia się szczyt przepływu, tak zwany *peak*, bądź oblicza się pole pod krzywą (AUC, *area under the curve*) dla całego czasu trwania reakcji — aż do momentu, gdy przepływ powróci do wartości spoczynkowych [11].

W licznych doświadczeniach wykazano, że odpowiedź naczyniowa podczas PORH jest zaburzona u pacjentów obciążonych wysokim ryzykiem sercowo-naczyniowym [8]. Ponadto w ostatnich badaniach dowiedziono, że PORH jest niezależnym czynnikiem prognostycznym zmian miażdżycowych w cukrzycy typu 1 [13]. U pacjentów z hipercholesterolemią obserwuje się nieprawidłową reakcję podczas przeprowadzania testu PORH, co wskazuje na zaburzenie zależnej od śródbłonna regulacji mikrokrążenia. Udowodniono również, że odpowiedź naczyniowa normalizuje się po włączeniu terapii farmakologicznej z zastosowaniem statyn [14].



Rycina 1. Charakterystyczne zmiany perfuzji mikrokrążenia podczas testu pookluzyjnej reakcji przekrwiennej rejestrowane metodą laserowo-dopplerowską; TM (*time of peak flow*) — czas maksymalnej reakcji przekrwiennej; TH (*half time of hiperemia*) — czas połowy przekrwienia; TR (*time of recovery*) — czas od zwolnienia okluzji do powrotu do przepływu spoczynkowego; AUC (*area under the curve*) — pole pod krzywą wyrażające zmianę wielkości perfuzji; TL (*time of latency*) — czas od momentu zwolnienia okluzji do zaobserwowania zmian perfuzji; PF (*peak flow*) — przepływ maksymalny; RF (*rest flow*) — przepływ spoczynkowy

TEST PRZEKRWIENIA TERMICZNEGO

Test przekrwienia termicznego prowadzi do zależności od temperatury zwiększenia przepływu krwi w mikrokrążeniu. Reakcję tę wywołuje się, umieszczając na powierzchni skóry specjalną sondę ogrzewającą. Maksymalna wazodylatacja jest osiągana przy zastosowaniu temperatury między 42°C a 44°C. Odpowiedź naczyniowa obserwowana w przebiegu testu LTH ma charakter dwufazowy. Początkowy szybki szczyt przepływu, tak zwany *peak*, trwający 2–3 minuty, zależy głównie od odruchu aksonowego [8, 11]. Udział nerwów czuciowych potwierdza się w badaniach, w których wyjściowy wzrost perfuzji został znacznie osłabiony po wcześniejszym zastosowaniu miejscowego znieczulenia. Natomiast druga faza, tak zwana *plateau*, trwająca 20–30 minut, zależy w przeważającej części od działania tlenu azotu (NO, *nitric oxide*) wydzielanego przez śródbłonek. W doświadczeniach z zastosowaniem inhibitora syntazy tlenu azotu (NOS, *nitric oxide synthase*) obserwowano istotne przytłumienie fazy *plateau*, co udowadnia, że NO jest ważnym mediatorem przekrwienia termicznego [15].

W licznych badaniach potwierdzono, że odpowiedź naczyniowa podczas LTH jest nieprawidłowa w cukrzycy [16–18]. U pacjentów z nadciśnieniem tętniczym wykazano obniżenie potencjału wazodylatacyjnego w teście LTH [19]. Natomiast u pacjentów z hipercholesterolemią dowiedziono, że terapia statynami wpływa korzystnie na zależną od śródbłonka fazę *plateau* podczas LTH [20]. Obie fazy reakcji naczyniowej podczas LTH są zaburzone również w twardzinie układowej u pacjentów, u których obserwuje się objaw Raynauda [21].

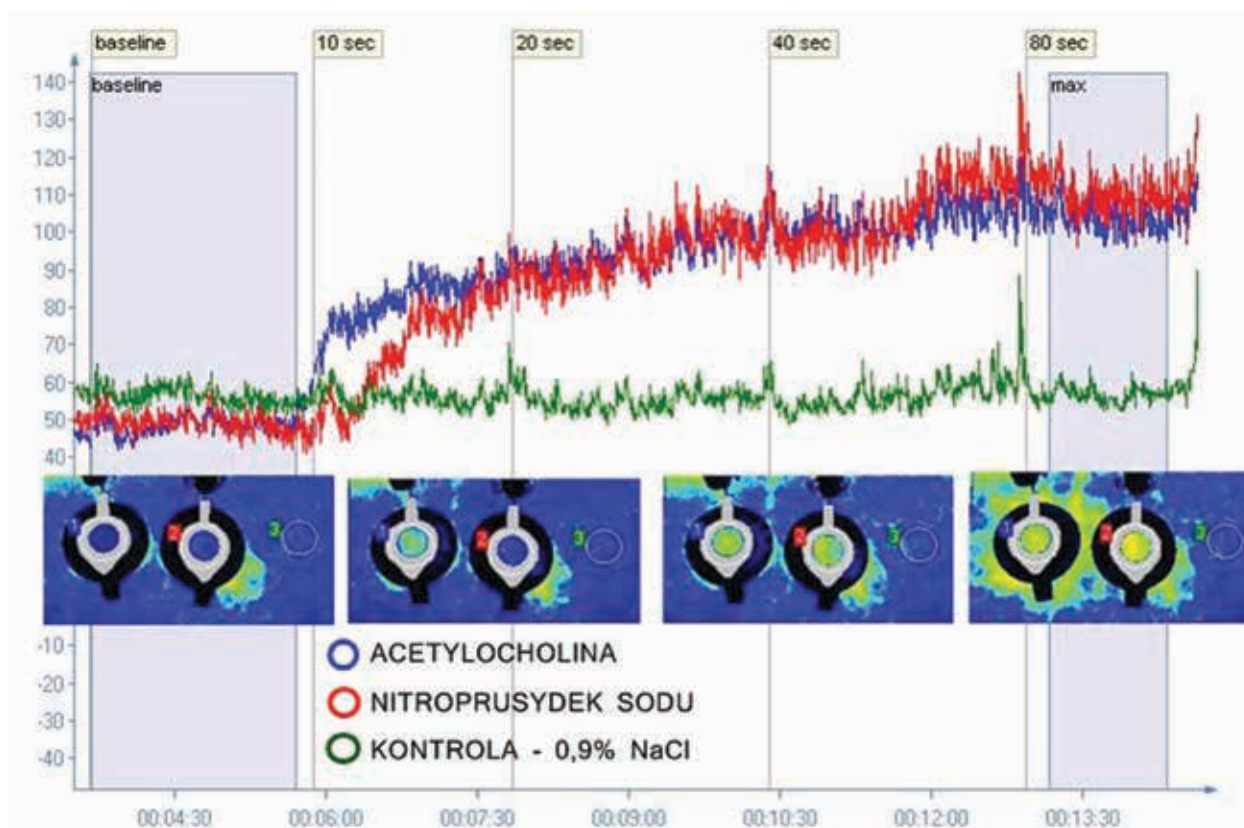
JONOFOREZA ACETYLOCHOLINY I NITROPRUSYDKU SODU

Jonoforeza jest nieinwazyjną metodą miejscowej aplikacji rozpuszczonych substancji pozostających w formie zjonizowanej. Polega na transdermalnym przenikaniu jonów, co jest możliwe dzięki zastosowaniu prądu elektrycznego o małym natężeniu (maksimum 0,5 mA). Ilość wprowadzonej substancji jest wprost proporcjonalna do natężenia prądu i czasu jego przepływu. Przenikanie jonów zależy również od wartości pH i stężenia roztworu [11, 22].

Jonoforezę wykorzystuje się głównie jako farmakologiczny test reaktywności naczyń. Zmiany perfuzji mikrokrążenia zachodzące pod wpływem podanej substancji wazoaktywnej ocenia się, stosując techniki laserowo-dopplerowskie bądź LSCI (ryc. 2). Jonoforezę Ach i SNP stosuje się szeroko do oceny zależnej i niezależnej od śródbłonka wazodylatacji mikrokrążenia [8].

Dokładny mechanizm, w którym jonoforeza Ach prowadzi do wazodylatacji, pozostaje niejasny. Wydaje się, że regulacja ta zależy w głównej mierze od szlaków cyklooksygenazy, choć dane na ten temat są rozbieżne. Dyskusyjny pozostaje także fakt, w jakim stopniu NO uczestniczy w obserwowanej reakcji. Poza zależnymi od śródbłonka mechanizmami wazodylatacyjnymi jonoforeza Ach powoduje również rozkurcz naczyń regulowany przez odruch aksonalny [8, 11].

Nitroprusydek sodu jest egzogennym donorem NO, który aktywuje cytozolową cyklazę guanylanową, powodując wzrost stężenia cyklicznego guanozynomonofosforanu (cGMP, *cyclic guanosine monophosphate*). Nasilenie



Rycina 2. Rejestracja perfuzji mikrokrążenia metodą analizy kontrastu obrazu speklów laserowych. Na kolorowych rycinach pod wykresem przedstawiającym przepływ można zaobserwować postępującą wazodylatację zachodzącą pod wpływem jonoforezy acetylocholino i nitroprusydku sodu oraz brak reakcji naczyniowej po kontrolnym podaniu 0,9-pocentowego roztworu chlorku sodu (NaCl)

produkcji cGMP prowadzi do rozkurczu mięśni gładkich naczyń. Jonoforezę SNP stosuje się do oceny mechanizmu wazodylatacji niezależnej od śródbłonna [23].

W ostatnich badaniach z zastosowaniem jonoforezy wykazano zaburzenie zależnej i niezależnej od śródbłonna wazodylatacji u chorych na cukrzycę typu 2 i obturacyjny bezdech senny [8]. Dowiedziono również, że zależna od śródbłonna odpowiedź naczyniorozkurczowa jest istotnie zmniejszona w grupie chorych z nadciśnieniem tętniczym i dyslipidemią [24]. Ponadto u pacjentów z chorobą wieńcową stwierdzono dysfunkcję zależnych i niezależnych od śródbłonna mechanizmów wazodylatacyjnych w mikrokrażeniu obwodowym [25].

PODSUMOWANIE

Przedstawione testy reaktywności, w połączeniu z nowoczesnymi metodami obrazowania perfuzji w mikrokrażeniu, umożliwiają precyzyjną ocenę stanu naczyń i funkcji śródbłonna. W licznych testach dowiedziono, że odpowiedź wazodylatacyjna zależna od śródbłonna jest zaburzona u pacjentów ze schorzeniami układu sercowo-naczyniowego. Ponadto coraz lepsze zrozumienie

mechanizmów regulacyjnych poszczególnych reakcji naczyniowych uzupełnia wiedzę na temat patofizjologii schorzeń układu krążenia. Warto również podkreślić, że — poza niewątpliwymi walorami naukowymi — zasadne jest stosowanie testów reaktywności naczyń w celach diagnostycznych i prognostycznych.

Należy zauważyć, że wysokie koszty specjalistycznej aparatury do badań mikrokrażenia znacząco ograniczają rutynowe stosowanie testów reaktywności. Dodatkowo, w celu ich upowszechnienia, niezbędne są precyzyjne określenie powtarzalności i standaryzacja metod pomiaru i interpretacji wyników. Równie konieczne jest dokładne zrozumienie złożonych mechanizmów fizjologicznych leżących u podłoża PORH, LTH i jonoforezy Ach.

PIŚMIENNICTWO

1. Hellmann M., Dudziak M. Analiza kontrastu obrazu speklów laserowych — nowa metoda oceny mikrokrażenia. *Chor. Serca i Naczyń* 2013; 10: 91–94.
2. Holowatz 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.
3. Roustit M., Hellmann M., Cracowski C., Blaise S., Cracowski J.L. Sildenafil increases digital skin blood flow during all phases of local

- cooling in primary Raynaud's phenomenon. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2013; 91: 813–819.
4. Blaise S., Hellmann M., Roustit M., Isnard S., Cracowski J.L. Oral sildenafil increases skin hyperaemia induced by iontophoresis of sodium nitroprusside in healthy volunteers. *Br. J. Pharmacol.* 2010; 160: 1128–1134.
 5. Abraham P., Bourgeau M., Camo M. i wsp. Effect of skin temperature on skin endothelial function assessment. *Microvasc. Res.* 2013; 88: 56–60.
 6. Mahé G., Humeau-Heurtier A., Durand S., Leftheriotis G., Abraham P. Assessment of skin microvascular function and dysfunction with laser speckle contrast imaging. *Circ. Cardiovasc. Imaging* 2012; 5: 155–163.
 7. Tesselaar E., Sjöberg F. Transdermal iontophoresis as an in-vivo technique for studying microvascular physiology. *Microvasc. Res.* 2011; 81: 88–96.
 8. Roustit M., Cracowski J.L. Assessment of endothelial and neurovascular function in human skin microcirculation. *Trends Pharmacol. Sci.* 2013; 34: 373–384.
 9. Roustit M., Millet C., Blaise S., Dufournet B., Cracowski J.L. Excellent reproducibility of laser speckle contrast imaging to assess skin microvascular reactivity. *Microvasc. Res.* 2010; 80: 505–511.
 10. Millet C., Roustit M., Blaise S., Cracowski J.L. Comparison between laser speckle contrast imaging and laser Doppler imaging to assess skin blood flow in humans. *Microvasc. Res.* 2011; 82: 147–151.
 11. Roustit M., Cracowski J.L. Non-invasive assessment of skin microvascular function in humans: an insight into methods. *Microcirculation* 2012; 19: 47–64.
 12. 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.
 13. 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.
 14. 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.
 15. Minson C.T. Thermal provocation to evaluate microvascular reactivity in human skin. *J. Appl. Physiol.* 2010; 109: 1239–1246.
 16. Wigington G., Ngo B., Rendell M. Skin blood flow in diabetic dermopathy. *Arch. Dermatol.* 2004; 140: 1248–1250.
 17. Wick D.E., Roberts S.K., Basu A. i wsp. Delayed threshold for active cutaneous vasodilation in patients with Type 2 diabetes mellitus. *J. Appl. Physiol.* 2006; 100: 637–641.
 18. Colberg S.R., Parson H.K., Nunnold T. i wsp. Change in cutaneous perfusion following 10 weeks of aerobic training in type 2 diabetes. *J. Diabetes Complications* 2005; 19: 276–283.
 19. Smith C.J., Santhanam L., Bruning R.S. i wsp. Upregulation of inducible nitric oxide synthase contributes to attenuated cutaneous vasodilation in essential hypertensive humans. *Hypertension* 2011; 58: 935–942.
 20. Holowatz 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.
 21. Boignard A., Salvat-Melis M., Carpentier P.H. i wsp. Local hyperemia to heating is impaired in secondary Raynaud's phenomenon. *Arthritis Res. Ther.* 2005; 7: 1103–1112.
 22. Kalia Y.N., Naik A., Garrison J., Guy R.H. Iontophoretic drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2004; 56: 619–658.
 23. Turner J., Belch J.J., Khan F. Current concepts in assessment of microvascular endothelial function using laser Doppler imaging and iontophoresis. *Trends Cardiovasc. Med.* 2008; 18: 109–116.
 24. 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.
 25. 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.