

Caracterização da função vascular periférica pela resposta hemodinâmica da alteração postural passiva do membro inferior

Characterization of the peripheral vascular function by a hemodynamical response to a passive postural change in the lower limb

Pedro Contreiras Pinto¹, Francisco Rei², Milene Fernandes¹, Luís Monteiro Rodrigues^{1,2}

¹ UDE - Unidade de Dermatologia Experimental, Universidade Lusófona, Campo Grande 376, 1749-024 Lisboa, Portugal.

² Laboratório de Fisiologia Experimental & UCTF - Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, Av das Forças Armadas, 1600-083 Lisboa, Portugal.

Resumo

O estudo da função vascular periférica tem beneficiado do desenvolvimento de diversas técnicas e metodologias de avaliação as quais permitem caracterizar a função com um mínimo de invasibilidade. O estudo do significado de diversas variáveis transcutâneas tem ajudado a melhor compreender as complexas relações que regem a perfusão dos tecidos *in vivo*. No presente estudo procurámos avaliar o perfil de resposta de um grupo de indivíduos saudáveis jovens de ambos os sexos ($n=23$, $22,4 \pm 2,2$ anos), a uma manobra dinâmica (provocação) envolvendo a variação postural passiva do membro inferior (A: elevação da perna e B: decúbito dorsal) de modo a caracterizar a função vascular periférica por meio de variáveis transcutâneas (tc). A perfusão local medida por Fluxometria de Laser Doppler (LDF), a Perda Trans-epidérmica de água (PTEA) as pressões parciais de oxigénio e dióxido de carbono transcutâneos e a oximetria de pulso foram escolhidas e, um intervalo de confiança de 95% adoptado.

LDF, PTEA e $tcpO_2$ são, manifestamente, as variáveis que melhor permitem seguir o processo em cada fase experimental. Em A foram registadas, durante a provocação, diferenças significativas na perfusão sanguínea e na pressão transcutânea de oxigénio e PTEA, especialmente nas mulheres, enquanto que o perfil de resposta obtido em B foi idêntico em ambos os grupos e comparável à hiperémia reactiva. Qualquer dos protocolos permitiu evidenciar uma relação inversamente recíproca entre a PTEA e o LDF.

Os resultados obtidos confirmam a utilidade destas metodologias na avaliação da função vascular periférica, confirmando as relações entre PTEA e LDF as quais devem ser adequadamente aprofundadas.

Palavras chave: função vascular periférica; LDF; reflexo postural; PTEA; *in vivo*.

Abstract

The study of the peripheral vascular function benefits from the development of several evaluation techniques and methodologies which allow for the characterization of the function without invasion of the tissue. The study of the meaning of several transcutaneous variables has helped to understand the complex relationships that rule the perfusion of the tissues *in vivo*. In the present study, we attempted to evaluate the profile of response of a group of healthy young individuals from both genders ($n=23$, $22,4 \pm 2,2$ years), to a dynamic maneuver (provocation) involving the postural passive change of the inferior member (A: elevation of the leg and B: dorsal decubitus), to perform the characterization of the peripheral vascular function through transcutaneous variables (tc). The local perfusion, measured by Laser Doppler flowmetry (LDF), the Trans Epidermal Water Loss (TEWL), the transcutaneous partial pressures of oxygen and carbon and the pulse oximetry were chosen and a confidence interval of 95% was adopted.

LDF, TEWL and $tcpO_2$ are, clearly, the variables that allow for a better follow up of the process in each experimental phase. In A, during the provocation, significant differences in the blood perfusion and in the oxygen transcutaneous pressure and TEWL were registered, especially in women. The profile response obtained in B was identical in both groups and comparable to the reactive hyperemia. Any of the protocols allowed to evidence an inversely reciprocal relationship between TEWL and LDF.

The obtained results confirm the usefulness of these methodologies in the evaluation of the peripheral vascular function, confirming the relationships between TEWL and LDF, which should be appropriately studied.

Key words: peripheral vascular function; LDF; postural reflex; TEWL; *in vivo*.

Introdução

A medicina vascular tem beneficiado especialmente da evolução tecnológica conducente ao desenvolvimento de técnicas e métodos de avaliação funcional, que têm ajudado a melhor compreender a complexa fisiologia microcirculatória^[1-4] bem como diversas patologias de natureza cardio-vascular,^[5-9] e outras que indirectamente afectam a função circulatória periférica^[10-12]. A avaliação do fluxo local, através da fluxometria de laser-doppler (LDF) ou a medição das pressões transcutâneas de O₂ e CO₂^[13,16-21,23] constituem duas das técnicas mais populares e mais amplamente utilizadas. Outras técnicas como a oximetria de pulso^[24-27] ou a Perda Trans-epidérmica de Água (PTEA), que parecem estar também condicionadas por factores hemodinâmicos locais comuns, apresentam outros níveis de aplicabilidade e são menos utilizadas^[28].

A presente linha de investigação tem procurado identificar indicadores (metabólicos e funcionais) relacionáveis com as condições de perfusão (periférica) local e, portanto, indicadores potenciais da disfunção vascular^[21,28]. Através da quantificação destes indicadores, será possível avaliar a função vascular, e detectar a sua alteração mesmo sem manifestação clínica, permitindo intervenções mais precoces e, potencialmente, mais eficientes.

No seguimento de anteriores trabalhos em que se exploram diversas estratégias dinâmicas de avaliação da função circulatória periférica por meios não invasivos^[5,6,16,30-32], são aqui avaliadas as relações dinâmicas que se estabelecem entre diversas variáveis transcutâneas, obtidas por meios não invasivos em indivíduos jovens, de ambos os sexos, em que a perfusão do membro inferior foi modificada por variação passiva da sua posição, em condições tão próximas quanto possível da normal fisiologia.

Material e Métodos

O estudo foi efectuado em 23 voluntários jovens (13 mulheres e 10 homens), com idades compreendidas entre os 19 e os 26 anos (média $22,4 \pm 2,18$ anos), saudáveis, sem qualquer patologia dermatológica ou circulatória declarada, não fumadores e não sujeitos a medicação vasoactiva. Os voluntários foram detalhadamente informados sobre o estudo, tendo expresso o seu consentimento prévio. Todos os procedimentos adoptados tiveram em consideração a Declaração de Helsínquia e emendas subsequentes.

Após aclimação, as medições, aleatoriamente distribuídas, foram realizadas no pé dos voluntários. A perfusão sanguínea foi medida através de Fluxometria por Laser Doppler (LFD) (Periflux System 5010, Perimed, Suécia) na face inferior do segundo dedo do

Introduction

The vascular medicine has especially benefited from a technological evolution that has conduced to the development of techniques and methods of functional evaluation which have helped to better understand the complex microcirculatory physiology,^[1-4] as well as several pathologies of cardio-vascular nature,^[5-9] and others that indirectly affect the peripheral circulatory function^[10-12]. The evaluation of the local flow through Laser Doppler flowmetry (LDF) or the measurement of the transcutaneous pressures of O₂ and CO₂^[13,16-21,23] became two of the most popular and widely used techniques. Other techniques as pulse oximetry^[24-27] or Trans Epidermal Water (TEWL), that seem to be conditioned by common local hemodynamic factors, present other applicability levels and are less frequently used^[28].

The present research line has been trying to identify markers (metabolic and functional) related with the local (peripheral) perfusion conditions, and therefore potential factors of vascular dysfunction^[21,28]. Through the quantification of these markers, it will be possible to evaluate the vascular function, and to detect modifications even without clinical manifestation, allowing more precocious interventions and, potentially, more efficient ones.

Following previous works, in which several dynamic strategies to explore the peripheral circulatory function by non invasive methods^[5,6,16,30-32] was used, we evaluate here different dynamical relations established with the transcutaneous variables. These relations are obtained by means of non invasive methods in young individuals, from both sexes, in which the perfusion of the lower limb was modified through a passive modification of the posture in close conditions of the normal physiology.

Material and Methods

The study was performed in 23 young healthy volunteers (13 women and 10 men), between the ages of 19 and 26 (average $22,4 \pm 2,18$ years), who were non smokers and did not have any dermatological or circulatory pathology or any vasoactive medication. The volunteers were fully informed about the study, having previously expressed their consent. All of the adopted procedures took into consideration the Helsinki declaration and subsequent amendments.

After acclimatization, the randomly distributed measurements were performed on the volunteers' foot. The blood perfusion was measured through Laser Doppler Flowmetry (LFD) (Periflux System 5010, Perimed, Sweden) in the inferior face of the second toe. The transcutaneous Oxygen pressure and CO₂ was accessed by transcutaneous oximetry (Periflux System

pé. As pressões transcutâneas de oxigênio e dióxido de carbono, foram registradas por gasometria transcutânea (Periflux System 5040, Perimed, Suécia) na face superior do pé, abaixo da raiz do primeiro dedo. A PTEA foi medida por evaporimetria (Tewameter TM300, CK electronics, Germany), na face superior do pé, na zona adjacente à sonda de gasometria, no lado externo. A saturação percentual da hemoglobina em oxigênio foi medida, por oximetria de pulso (Schiller Argus LCM plus, Schiller, Switzerland) na extremidade do primeiro dedo do pé.

Os voluntários foram sujeitos a dois protocolos sequenciais:

- Protocolo A Registo basal durante 10 minutos obtido na posição sentado. Elevação passiva da perna, fixada em repouso a 90 graus durante 10 minutos. Retorno à posição original durante 10 minutos.

- Protocolo B Registo basal durante 10 minutos obtido em decúbito dorsal. Elevação passiva do membro inferior, fixando o pé a uma altura constante (45° em relação à posição da cabeça) durante 10 minutos. Retorno à posição original durante 10 minutos.

Em ambos os protocolos o registo foi mantido até à estabilização das variáveis.

Para efeito do tratamento dos dados foram considerados os valores médios de 5 minutos antes de iniciar a provocação, de 5 minutos antes do fim da provocação e de 5 minutos antes do fim do protocolo, para todas as variáveis estudadas.

A análise estatística foi realizada através do teste de Wilcoxon para variáveis emparelhadas. O coeficiente de correlação de Spearman foi escolhido para verificar a correlação entre as diferentes variáveis estudadas. Todos os testes estatísticos foram realizados com o software SPSS13.0, e adoptado um nível de confiança de 95%.

Resultados

A figura 1 ilustra o perfil típico de registo obtido em cada um dos protocolos. Os valores médios e respectivos desvios padrão de todos os indivíduos, para as diferentes variáveis, estão representados nas tabelas I e II, bem como as diferenças estatisticamente significativas encontradas para cada fase experimental. Foram analisados independentemente os voluntários de acordo com o género, uma vez que este é um conhecido condicionante a tcO_2 ^[33].

A observação das tabelas indicia que são especialmente importantes as diferenças encontradas entre os valores do período de registo basal e o período de provocação. Entre estes foram observadas diferenças significativas nas variáveis de perfusão sanguínea (LDF) e $tcpO_2$, quer nos indivíduos do sexo feminino, quer nos indivíduos do sexo masculino.

5040, Perimed, Sweden) in the superior face of the foot, below the root of the first finger. TEWL was measured by evaporimetry (Tewameter TM300, CK electronics, Germany), in the superior face of the foot, in the area adjacent to the gazometry probe, on the external side. The percentage of Hemoglobin saturation was measured by pulse oximetry (Schiller Argus LCM plus, Schiller, Switzerland) in the extremity of the first toe.

The volunteers completed two sequential protocols:

- Protocol A 10 minute basal recording obtained in a seated position. Passive elevation of the leg fixed in rest at 90° for 10 minutes. Return to the original position for another 10 minute recording.

- Protocol B - 10 minute basal recording obtained in decubitus. Passive elevation of the inferior member, at constant height (45° in relation to the head's position), for 10 minutes. Return to the original position for 10 more minutes of recording.

In both protocols the recording was maintained until the stabilization of the variables. For data treatment we considered the mean values of 5 minutes before the beginning of the provocation, 5 minutes before the end of the provocation and 5 minutes before the end of the protocol, for all the studied variables.

The statistical analysis was performed through the Wilcoxon test for paired variables. The Spearman's coefficient of correlation was chosen to verify the correlation among the different studied variables. All the statistical tests were performed with the SPSS13.0 software, and adopt a confidence level of 95%.

Results

Figure 1 shows a recording of a typical profile obtained in each of the protocols. The mean values and corresponding standard deviation values for all the individuals, in each variables, are represented in the tables I and II. Also presented are the statistically significant differences found in each experimental phase. The gender effect gender was independently analyzed, once it is a known factor that influences tcO_2 ^[33].

The observation of the tables demonstrates that differences between the basal period and the provocation period are especially important. Among these, were the significant differences observed in the variables of blood perfusion (LDF) and $tcpO_2$, in both male and female volunteers.

Protocolo/Protocol A

Protocolo/Protocol B

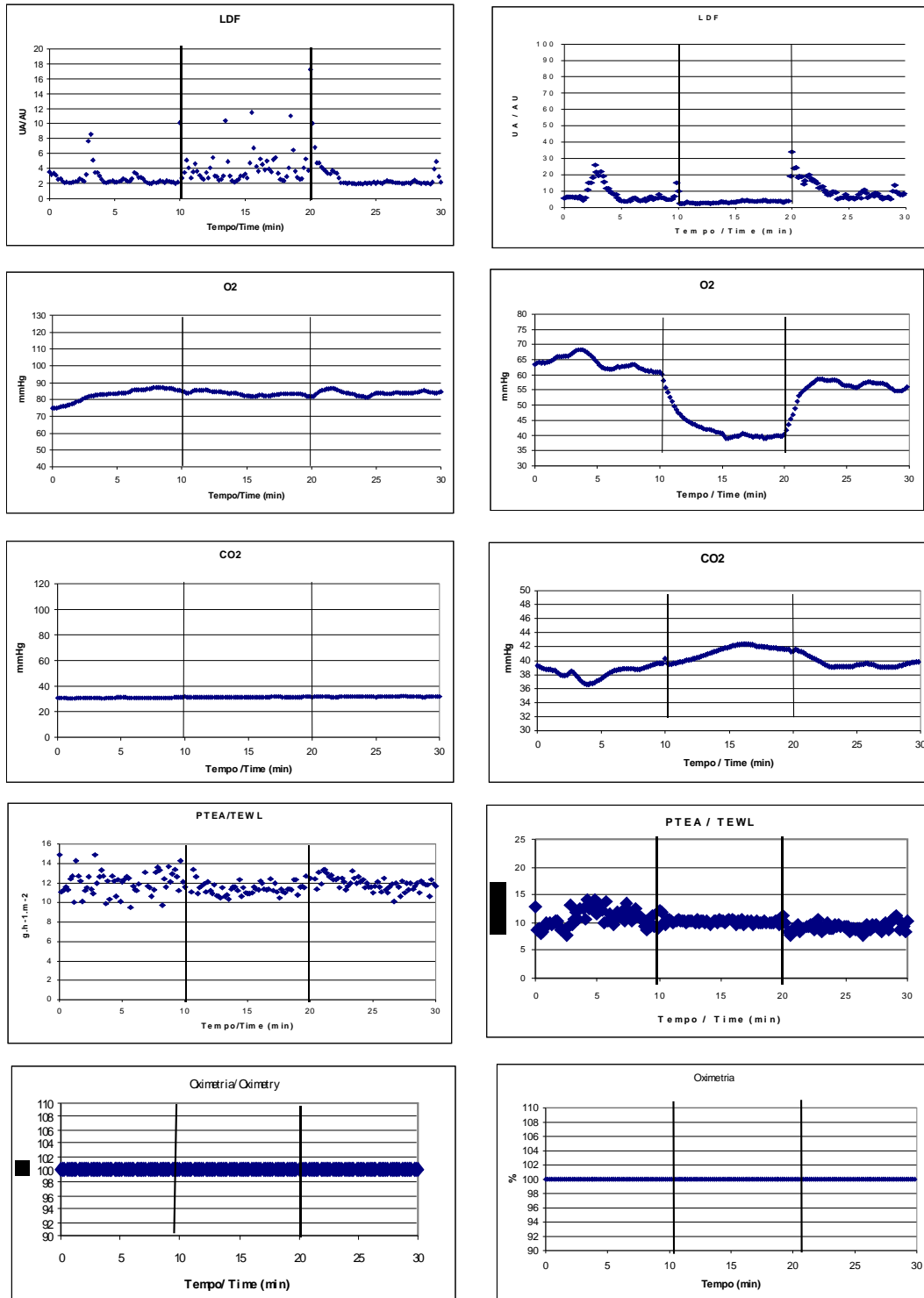


Figura 1- Registo completo ilustrativo da evolução das variáveis obtidas num voluntário (#4) no decurso do protocolo A e B (ver texto). As barras verticais correspondem ao início e final do período de provocação.

Figure 1- Complete record of the evolution of interest variables in one volunteer (#4) during protocol A And B (check text). Vertical rules indicate beginning and end of the provocation period.

Para averiguar a influência do factor género, realizou-se uma comparação não emparelhada, resumida na tabela III a qual mostra apenas diferenças significativas na variável LDF no protocolo B. A correlação entre variáveis está resumida nas tabelas IV e V.

To evaluate the influence of the gender factor a paired comparison was performed, summarized in table III, which shows significant differences in the LDF variable in protocol B. The correlation between variables was summarized in tables IV and V.

Tabela III Comparação não emparelhada dos valores das variáveis em diferentes momentos dos protocolos experimentais (* p<0,05; ns: não significativo).

Table III Non-paired comparison for variables obtained during the different experimental periods for both sexes (* p<0,05; ns: non significant).

	Mulheres vs Homens Women vs Men					
	Protocolo / Protocol A			Protocolo / Protocol B		
	Basal Basal	Provocação Provocation	Pós-provocação Post-provocation	Basal Basal	Provocação Provocation	Pós-provocação Post-provocation
LDF	n.s.	n.s.	n.s.	*	*	*
tcpO ₂	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
tcpCO ₂	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
PTEA	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Oximetria	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Tabela IV - Correlações estatísticas entre as diferentes variáveis, para ambos os sexos, em diferentes períodos do protocolo A (* p<0,05; ns: não significativo).

Table IV Statistical correlations between variables obtained, for both sexes, during the different experimental periods for protocol A (* p<0,05; ns: non significant).

	Mulheres Women		Homens Men	
	Basal e provocação Basal and provocation	LDF/tcpO ₂	r=-0,301 *	LDF/tcpO ₂
LDF/PTEA		r=-0,538 *	LDF/PTEA	r=-0,380*
PTEA/tcpO ₂		r= 0,513	PTEA/tcpO ₂	r= -0,379 *
tcpO ₂ /tcpCO ₂		r= 0,752 *	tcpO ₂ /tcpCO ₂	r= -0,421 *

Tabela V - Correlações estatísticas entre as diferentes variáveis, para ambos os sexos, em diferentes períodos do protocolo B (* p<0,05; ns: não significativo).

Table V Statistical correlations between variables obtained, for both sexes, during the different experimental periods for protocol B (* p<0,05; ns: non significant).

	Mulheres Women		Homens Men	
	Basal e provocação Basal and provocation	LDF/tcpO ₂	r=-0,667 *	LDF/tcpO ₂
LDF/tcpCO ₂		r= -0,165 *	LDF/tcpCO ₂	r=-0,264 *
PTEA/tcpO ₂		r= 0,500 *	PTEA/tcpO ₂	r= -0,310 *
tcpO ₂ /tcpCO ₂		r= 0,794 *	tcpO ₂ /tcpCO ₂	r= -0,953 *

Discussão

São conhecidas as implicações reflexas neurocirculatórias e vasomotoras locais (reflexo venoarterial) implicadas na alteração de postura^[33]. Estas traduzem-se, no protocolo A, num aumento do fluxo de sangue que, por sua vez, induz um efeito de "wash out" que diminui a capacidade nutritiva do tecido (por diminuição da passagem de O₂) e um reajustamento das determinantes de perfusão local. Neste caso concreto, a mudança de posição parece facilitar a perfusão local, o que se revela de forma inversa sobre a PTEA (tabela I). De resto, esta relação recíproca entre LDF e PTEA foi já sugerida anteriormente, lançando a ideia de que outros factores de natureza hemodinâmica podem influenciar esta variável^[28,33]. Este efeito parece ser mais evidente nas mulheres devido provavelmente às diferenças anatómicas próprias entre a epiderme feminina e masculina^[33].

Os valores de tcpCO₂ e Oximetria não variam, tanto nos homens como nas mulheres, indicando um comportamento semelhante da macrocirculação (avaliada pelo valor de spO₂).

No protocolo B verifica-se uma adaptação semelhante à obtida através de indução de hiperémia reactiva por oclusão supra-sistólica com uma almofada de pressão^[28]. Esta manobra provoca uma diminuição estatisticamente significativa no sinal de LDF, em ambos os grupos, conducente a uma depleção de O₂ dos tecidos e a acumulação de CO₂. No período pós provocação obtêm-se resultados semelhantes aos verificados num período pós oclusivo^[33] isto é, a vasodilatação determina o aumento imediato e abrupto da perfusão, resultado de uma readaptação vascular à onda de sangue, retornando lentamente aos valores basais (tabela II). As pressões transcutâneas dos gases voltam também a valores próximos dos obtidos no período de registo basal.

Analisando em função do género, observa-se que homens e mulheres apresentam um perfil de resposta semelhante estando mais uma vez os valores de tcpO₂ mais elevados nos indivíduos do sexo feminino conforme descrito^[28,33]. Nesta perspectiva, foram observadas diferenças significativas no protocolo B para a variável LDF. Contudo, esta diferença, parece não se traduzir numa alteração dinâmica, uma vez que a diferença estatisticamente significativa existe já antes da provocação e mantém-se durante e após a mesma. Este resultado pode, mais uma vez, indiciar apesar das diferenças de natureza anatomo-fisiológica entre os géneros, estas parecem não interferir nos aspectos de resposta dinâmica, uma vez que as adaptações vasculares são idênticas.

As relações entre variáveis (coeficiente de Spearman)

Discussion

The neurocirculatory and local vasomotor reflexes (venoarterial reflex) are well known to be implicated in the postural change^[33]. These reflexes have a corresponding translation, in Protocol A, in an increase in the blood flow that induces a "wash out" effect, that reduces the nutritious capacity of the tissue (by decreasing the O₂ passage) and a readjustment of the local perfusion determinants. In this case, the position change seems to facilitate the local perfusion, an effect that is revealed in an inverse way on the TEWL values (Table I). This reciprocal relationship between LDF and TEWL was already suggested, introducing the idea that other factors of hemodynamic nature can influence this variable^[28,33]. This effect seems to be more evident in the women probably due to the anatomic differences between male and female epidermis^[33].

The tcpCO₂ values and Oximetry don't change, both in men and women, showing a similar behavior of the macrocirculation (evaluated by the spO₂ values).

In protocol B there is an adaptation similar to the one that is verified in the induction of a reactive hyperaemia with supra-systolic occlusion with a pressure cuff^[28]. This maneuver induces a statistically significant decrease in the LDF signal, in both groups, that leads to a depletion of O₂ in the tissue and an accumulation of CO₂. In the post provocation period similar results to the ones verified in a post occlusive period are observed^[33]. That is, the vasodilatation results in an immediate and abrupt increase of the perfusion, which produces a vascular readaptation to the blood wave. After this adaptation the perfusion values slowly return to the basal values (table II). The transcutaneous gas pressures also return to values close to the ones obtained in the basal period.

Considering the gender, it is observed that men and women present a similar profile to the provocation. Once again the tcpO₂ values are higher in the female individuals than in male, as previously described^[28,33]. There were significant differences in protocol B for the LDF variable. However, these differences don't mean a dynamic change, since the statistically significant difference already exists before the provocation and is maintained during and after the modification. This result can, once again, mean that, in spite of the anatomo-physiologic differences between the genders, it seems that this fact does not to interfere in dynamical aspects of response, since the vascular adaptations are identical.

The correlations between variables (Spearman coefficient) suggests significant relations between LDF and tcpCO₂, PTEA and LDF and PTEA and tcpCO₂ (tables III and IV). This demonstrates the influence of the vascular dynamics in variables related with the

sugerem relações significativas para o LDF e tcpCO_2 , PTEA e LDF e PTEA e tcpCO_2 (tabelas III e IV) indiciando influência da dinâmica vascular em variáveis relacionadas com o equilíbrio de gases e a perda transepidermica de água, em ambos os géneros

Conclusão

A metodologia proposta mostrou-se adequada aos objectivos propostos, evidenciando, mais uma vez a influência das condições de perfusão local sobre a função de barreira epidérmica representada pela PTEA, cujo conhecimento deve ser aprofundado de modo a melhor conhecer a fisiologia desta propriedade essencial da pele humana .

balance of gases and the Trans Epidermal Water Loss, in both genders.

Conclusion

The proposed methodology was shown appropriate for the main goals, evidencing, once again, the influence of the local perfusion conditions over the epidermal barrier function represented by TEWL. This knowledge should be well studied in order to know the physiology of this essential property of the human skin.

Bibliografia / References

- [1] Van den Brande P, von Kemp K, De Coninck A, Debing E. Laser Doppler flux characteristics at the skin of the dorsum of the foot in young and in elderly healthy human subjects. *Microvasc Res.* 1997; 53(2): 156-62.
- [2] Weiss M, Milman B, Rosen B, Eisenstein Z, Zimlichman R. Analysis of the diminished skin perfusion in elderly people by laser Doppler flowmetry. *Age Ageing.* 1992; 21(4): 237-41.
- [3] Tao J, Jin YF, Yang Z, Wang LC, Gao XR, Lui L, Ma H. Reduced arterial elasticity is associated with endothelial dysfunction in persons of advancing age: comparative study of non-invasive pulse wave analysis and laser Doppler blood flow measurement. *Am J Hypertens.* 2004; 17(8): 654-9.
- [4] Evans E, Rendeel M, Bartek J, Connor S, Bamisedun O, Dovgan D, Güitter M. Thermally-induced cutaneous vasodilation in aging. *J Gerontol* 1993; 48(2): M53-7.
- [5] Jarm T, Kragelj R, Liebert A, Lukaszewicz P, Erjavec T, Preseren-Strukelj M, Maniewski R, Poredos P, Miklavcic D. Postocclusive reactive hyperemia in healthy volunteers and patients with peripheral vascular disease measured by three non-invasive methods. *Adv Exp Med Biol.* 2003; 530:661-9.
- [6] Cisek PL, Eze AR, Comerota AJ, Kerr R, Brake B, Kelly P. Microcirculatory compensation to progressive atherosclerotic disease. *Ann Vasc Surg.* 1997; 11(1):49-53.
- [7] Saumet JL, Fabry R, Girard P, Saumet M, Abraham P, Schaff G. Laser Doppler flowmetry, transcutaneous oxygen pressure and thermal clearance in patients with vascular intermittent claudication. *Int J Microcirc Clin Exp.* 1993 Apr, 12(2):173-83.
- [8] Mayrovitz HN, Larsen PB. Peri wound skin microcirculation of venous leg ulcers. *Microvasc Res.* 1994 Jul; 48(1):114-23.
- [9] Taddei S, Virdis A, Mattei P, Ghiadoni L, Gennari A, Fasolo CB, Sudano I, Salvetti A. Aging and endothelial function in normotensive subjects and patients with essential hypertension. *Circulation.* 1995; 91(7): 1981-7.
- [10] Shapiro SA, Stansberry KB, Hill MA, Meyer MD, McNitt PM, Bhatt BA, Vinik AI. Normal blood flow response and vasomotion in the diabetic Charcot foot. *J Diabetes Complications.* 1998; 12(3):147-53.
- [11] Netten PM, Wollersheim H, Thien T, Lutterman JA. Skin microcirculation of the foot in diabetic neuropathy. *Clin Sci (Lond).* 1996; 91(5): 559-65.
- [12] Kurvers HA, Jacobs MJ, Beuk RJ, van den Wildenberg FA, Kitslaar PJ, Slaaf DW, Reneman RS. The influence of local skin heating and reactive hyperaemia on skin blood flow abnormalities in patients with reflex sympathetic dystrophy (RSD). *Eur J Clin Invest.* 1995; 25(5): 346-52.
- [13] Fagrell B. Advances in microcirculation network evaluation: an update. *Int J Microcirc Clin Exp.* 1995; 15 Suppl 1: 34-40.
- [14] Aalkjaer C, Nilsson H. Vasomotion: cellular background for the oscillator and for the synchronization of smooth muscle cells. *Br J Pharmacol.* 2005; 144(5):605-16.
- [15] Nilsson H, Aalkjaer C. Vasomotion; mechanisms and physiological importance. *Mol Interv.* 2003, 3(2): 79-89.
- [16] Jorneskog G, Brismar K, Fagrell B. Skin capillary circulation is more impaired in the toes of diabetic than non-diabetic patients with peripheral vascular disease. *Diabet Med.* 1995; 12(1): 36-41.
- [17] Mayrovitz HN, Larsen PB. Standard and near-surface laser-Doppler perfusion in foot dorsum skin of diabetic and nondiabetic subjects with and without coexisting peripheral arterial disease. *Microvasc Res.* 1994; 48(3):338-48.

- [18] Criqui MH, Fronek A, Klauber MR, Barrett-Connor E, Gabriel S. The sensitivity and predictive value of traditional clinical evaluation peripheral arterial disease: results from non-invasive testing in a defined population. *Circulation* 1985; 71: 516-522.
- [19] Berardesca E, and the EEMCO Group. EEMCO guidance for the measurement of skin microcirculation. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 2002; 15: 442-456.
- [20] Takiwaki H. Measurement of transcutaneous oxygen tension. In: Serup J, Jemec GBE, eds *Hand book of non-invasive methods and the skin*. Boca Raton, NY: CRC Press, 1995: 185-195.
- [21] Hauser CJ, Klein SR, Mehringer CM, Apple P, Shoemaker WC. Superiority of transcutaneous oximetry in non-invasive vascular diagnosis in patients with diabetes. *Arch Surg* 1984; 119: 690-694.
- [22] The Oral Iloprost in Severe Leg Ischaemia Study Group. Two randomised and placebo-controlled studies of an oral prostacyclin analogue (Iloprost) in severe leg ischaemia. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2000 Oct;20(4):358-62.
- [23] White RA, Nolan L, Harley D, Long J, Klein S, Tremper K, Nelson R, Trabiski J, Shoemaker W. Non-invasive evaluation of peripheral disease using transcutaneous oxygen tension. *Am J Surg*. 1982; 144: 68-75.
- [24] Vijaylakshmi K. Pulse oximetry. *Indian J. Anaesth*. 2002; 46(4): 261-268.
- [25] Parameswaran GI, Brand K, Dolan J. Pulse oximetry as a potential screening tool for lower extremity arterial disease in asymptomatic patients with diabetes mellitus. *Arch Intern Med*. 2005; 165(4): 442-6.
- [26] Jawahar D., Rachamalla HR, Rafalowski A, Ilkhani R, Bharatan T, Anandarao N. Pulse oximetry in the evaluation of peripheral vascular disease. *Angiology*. 1997; 48(8): 721-4.
- [27] Lévêque JL. Measurement of trans-epidermal water loss;. In: Lévêque JL, ed. *Cutaneous investigation in health and disease: non-invasive methods and instrumentation..* New Yourk: Marcel Dekker, 1989: 135-153.
- [28] Rodrigues LM, Pinto PC, Magro JM, Fernandes M, Alves J. Exploring the influence of skin perfusion on transepidermal water loss. *Skin Res Technol* 2004; 10: 257-262.
- [29] Stucker M, Steinbrugge J, Memmel U, Avermaete A, Altmeyer P. Disturbed vasomotion in chronic venous insufficiency. *J Vasc Surg*. 2003; 38(3): 522-7.
- [30] Klonizakis M, Yeung JM, Nash JR, Lingam K, Manning G, Donnelly R. Effects of posture and venous insufficiency on endothelial-dependent and independent cutaneous vasodilation in the perimalleolar region. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2003; 26(1):100-4
- [31] Slagsvold CE, Strandén E, Rosen L, Kroese AJ. The role of blood perfusion and tissue oxygenation in the post-ischemic transcutaneous TcPO₂ response. *Angiology* 1999; 50: 283-288.
- [32] Jaszczak P, Poulsen J. tc pO₂ dependence on a sufficient blood flow. In: Huch R, Huch A, eds *Continuous transcutaneous blood gas monitoring*. New York: Marcel Dekker, 1983: 35-43.
- [33] Rodrigues LM, Pinto PC, Leal A. Transcutaneous flow related variables measured in vivo: the effects of gender, *BMC Dermatol*. 2001;1:4. Epub 2001 Aug 20.