

Απεικόνιση μικροκυκλοφορίας με χρήση λέιζερ και μέθοδο Ντόπλερ (LDI)

ΜΑΡΚΟΣ ΚΛΩΝΙΖΑΚΗΣ

Αγγειολογικό Ινστιτούτο Sheffield, Northern General Hospital, UK

Περίληψη: Η μικροκυκλοφορία της επιδερμίδας παρουσιάζει τόσο χρονική όσο και τοπική διακύμανση, η οποία έχει τις ρίζες της στην ετερογένεια του δικτύου μικροκυκλοφορίας της επιδερμίδας με μεγάλη παρουσία πλούσια αρδευόμενων αρτηριοφλεβικών αναστομών σε κάποιες περιοχές και ύπαρξη τριχοειδών αγγείων σε κάποιες άλλες. Η μελέτη της έχει αποδειχθεί ότι είναι ένα χρήσιμο εργαλείο για την πρόβλεψη και εξέλιξη μεγάλου αριθμού ασθενειών και παθήσεων, και επομένως είναι αναγκαία η χρήση ενός συστήματος που θα μπορεί να καταγράφει τις χρονικές και τοπικές διακυμάνσεις που παρουσιάζονται. Ο Οπτικοποιητής Λείζερ Ντόπλερ (LDI) αποτελεί ένα τέτοιο σύστημα που πλεονεκτεί απέναντί σε άλλα αντίστοιχα συστήματα αφού είναι ασφαλές, μη επεμβατικό και επιστημονικά επιβεβαιωμένο.

Λέξεις ευρετηρίου: μικροκυκλοφορία, αγγεία, LDI, λέιζερ, φλέβες.

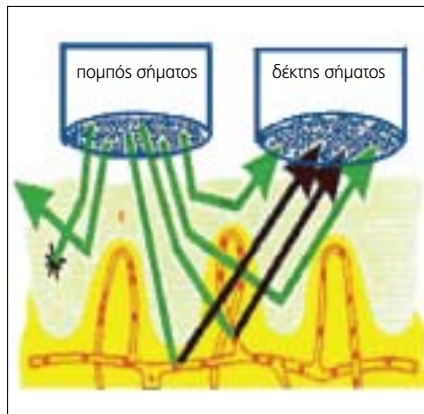
Εισαγωγή

Η μικροκυκλοφορία της επιδερμίδας παρουσιάζει τόσο χρονική όσο και τοπική διακύμανση. Η τοπική διακύμανση έχει τις ρίζες της στην ετερογένεια του δικτύου μικροκυκλοφορίας της επιδερμίδας με μεγάλη παρουσία πλούσια αρδευόμενων αρτηριοφλεβικών αναστομών σε κάποιες περιοχές και ύπαρξη τριχοειδών αγγείων σε κάποιες άλλες¹. Επομένως, για να μπορέσουμε να εκτιμήσουμε την αιμάτωση της επιδερμίδας, πρέπει να χρησιμοποιηθεί ένα σύστημα το οποίο θα επιτρέπει την καταγραφή τόσο των χρονικών όσο και των τοπικών διακυμάνσεων που παρουσιάζονται.

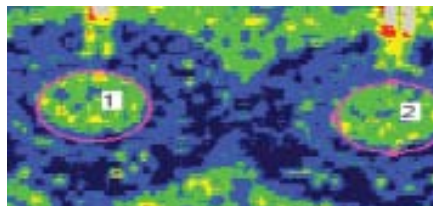
Ο Οπτικοποιητής Λείζερ Ντόπλερ (LDI) είναι ένα σχετικά πρόσφατο εύρημα², το οποίο εκμηδενίζει την ανάγκη της ύπαρξης ενός καθετήρα επικολλημένου στο δέρμα και το οποίο προσφέρει τη δυνατότητα μετρήσεων μιας σχετικά μεγάλης δερματικής περιοχής από απόσταση³. Με τη συλλογή δεδομένων χωρίς το άγγιγμα του ιστού, ο LDI παράγει μια χρωματικά κωδικοποιημένη απεικόνιση της τοπικής κατανομής της αιμάτωσης των ιστών⁴.

Θεωρία

Ενώ με τη χρήση του προκατόχου του (Ροομετρική Λείζερ Ντόπλερ -LDF) το λέ-



Σχήμα 1. Η αρχή του φαινομένου Ντόπλερ, όπως αυτή εφαρμόζεται στο LDI.



Σχήμα 2. Τυπικός χάρτης αιμάτωσης σε περιφερική περιοχή ασθενούς με αγγειακό έλκος, αποκτηθείς με χρήση LDI.

ιζερ που χρησιμοποιείται τοποθετείται σε ένα ακριβές σημείο καθ' όλη τη διάρκεια

της μελέτης, με το LDI η δέση του λέιζερ «σαρώνει» μια προεπιλεγμένη περιοχή παράγοντας πολλαπλές περιοχές μέτρησης. Με τη χρήση καθρεπτών, συνδεδεμένων με «βηματικούς» κινητήρες, η δέση λέιζερ κινείται τμηματικά, βήμα προς βήμα, πάνω από τον ιστό μέσω ενός μεγάλου αριθμού μετρήσιμων περιοχών (4096 το μέγιστο και περίπου 0,04cm² το καθένα), καλύπτοντας περίπου 144cm² σε περίπου 5 λεπτά³. Οι συντελεστές διόρθωσης που χρησιμοποιούνται για την απόσταση μεταξύ του ανιχνευτή και της μετρούμενης περιοχής έχουν αποδειχθεί επαρκείς σε πραγματικές συνθήκες². Τα φωτόνια από το λέιζερ προσκρούουν στην επιφάνεια του ιστού και σκεδάζονται σε μια εκτιμώμενη επιφάνεια 1 κυβικού χιλιοστού μέσω της μάζας του ιστού, που εξαρτάται από την ένταση και το μήκος κύματος της ακτίνας λέιζερ, καθώς επίσης και τις οπτικές ιδιότητες του πλέγματος του ιστού⁵. Μερικά από τα φωτόνια συγκρούονται με τα κινούμενα ερυθροκύτταρα και αλληλίζουν τις συχνότητες τους σύμφωνα με το φαινόμενο Ντόπλερ, ενώ άλλα συγκρούονται με το στατικό ιστό, κρατώντας την αρχική συχνότητα της πηγής του λέιζερ. Ένα μικρό ποσοστό και από τις δυο κατηγορίες φωτονίων επιστρέφουν προς τον ανιχνευτή φωτός που βρίσκεται στην κεφαλή του σαρωτή, και επεξεργάζο- ➡

⇒ νται κεντρικά για να παράγουν ένα ηλεκτρικό σήμα το οποίο είναι ανάλογο με την αιμάτωση του ιστού (Σχήμα 1). Μετά από μια πλήρη σάρωση της επιφάνειας του ιστού, το σήμα του LDI κωδικοποιείται χρωματικά για να προβάλει μια δισδιάστατη εικόνα της αιμάτωσης του ιστού⁶, με κάθε χρώμα να αντιπροσωπεύει ένα συγκεκριμένο επίπεδο αιμάτωσης σαν ποσοστό του μέγιστου επιπέδου αιμάτωσης μιας συγκεκριμένης απεικόνισης (Σχήμα 2).

Το σήμα του LDI βρέθηκε να έχει στενή συσχέτιση με τις μετρήσεις αιματικής ροής με μικροσκοπική εξέταση των τριχοειδών⁶, ενώ παράλληλα συγκρίνεται (με θετικά αποτελέσματα) με τα αποτελέσματα της χρήσης του LDF, ενώ αποδείχθηκε ανώτερο από τη θερμογραφική απεικόνιση⁴.

Εφαρμογές του LDI

Μια από τις πρώτες εφαρμογές του LDI ήταν η αντικειμενική μελέτη των ερεθιστικών και αλλεργικών δερματικών αντιδράσεων. Ένα παράδειγμα μελέτης είναι η μελέτη ουσιών που μπορεί να χρησιμοποιηθούν ως αντίδοτα για τις δερματικές παρενέργειες που προκαλούνται με τη χρήση ισταμίνης, που διερευνήθηκε από τους Willis et al⁷, καθώς επίσης και αυτά της μελέτης φλεγμονώδους υπεραϊμίας που προκαλείται από δερματικές αλλεργικές αντιδράσεις, το οποίο μελετήθηκε από τους Stucker et al⁸. Σε άλλη εφαρμογή στον τομέα της δερματολογίας χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη των αγγειοδιασταλτικών επιπτώσεων της ουσίας PGE(2) σε ασθενείς με ατοπική δερματίτιδα, με τελικό σκοπό αυτόν της μελέτης της πρωτεϊνικής εξαγγελίωσης⁹.

Το LDI χρησιμοποιείται επίσης στις πλαστικές χειρουργείες και στις χειρουργείες αποκατάστασης¹⁰, όπου παρατηρήθηκε ότι η ανόρθωση των χειρουργικών κρημών αυξάνει την εγγύς αιμάτωσή τους και τη μειώνει περιφερικά¹¹. Ακόμα, θεωρείται ένας από τους πιο ακριβείς τρόπους υπολογισμού του βάθους των εγκαυμάτων¹².

Η μέθοδος έδειξε επίσης ότι ασθενείς με συστηματική σκλήρωση μπορεί να ωφεληθούν από την αγγειοδιασταλτική θεραπεία στα δάκτυλα χορηγούμενη με ιοντοφόρηση¹³.

Με τον LDI μελετήθηκε και η νεοαγγειογένεση που παρουσιάζεται σε ασθενείς με επιφανειακούς ή δερματικούς όγκους, επικεντρώνοντας στην αιμάτωση μέσα και γύρω από επιφανειακούς όγκους του μαστού⁴, ενώ οι Vogel et al¹⁴ εξέτασαν επι-

τυχώς την αγγειογένεση σε ασθενείς με σάρκωμα Kaposi πριν και μετά από κυταροτοξική και αντι-αγγειογενετική θεραπεία. Οι Morris et al¹⁵ χρησιμοποίησαν τον LDI για να μελετήσουν τη δερματική αιματική ροή αντίδρασης στα ACh και SNP, παρατηρώντας ότι η δερματική ροή βάσης δε διέφερε σημαντικά μεταξύ διαβητικών και της ομάδας ελέγχου, ενώ με την έναρξη χρήσης των ACh και SNP αυξάνεται σε όλους τους συμμετέχοντες, με την αγγειοδιαστολή να είναι μεγαλύτερη στην ομάδα ελέγχου.

Όσο αφορά στα κάτω άκρα, οι Krishnan et al¹⁶ μελέτησαν διαβητικούς ασθενείς τύπου II με έληκη, στους οποίους παρατηρήθηκε ότι ο χρόνος θεραπείας των πληγών δεν επηρεάζεται από τις αλλαγές στη νευροαγγειακή λειτουργία και δομή λόγω της ασθένειας. Σε άλλη μελέτη σε ασθενείς με αγγειακά έληκη, οι Gschwandtner et al⁵ παρατήρησαν ότι η ροή στην περιοχή υπό μελέτη ήταν μεγαλύτερη στον κοκκοποιημένο ιστό σε σύγκριση με τον κανονικό και τις γειτονικές περιοχές. Ο LDI χρησιμοποιήθηκε επίσης σε τραυματικές κακώσεις των κάτω άκρων από τους Stucker et al⁸ που έδειξαν ότι η τοπική διαφοροποίηση στην αιμάτωση του ιστού άλλαξε κατά τη διάρκεια της διαδικασίας επούλωσης στη μετεχειρουργική περίοδο. Τέλος, οι Cheatle et al¹⁷ μελέτησαν ασθενείς με λιποδερματοσκλήρωση (LDS), βρίσκοντας υψηλή βασική ροή στην ηρεμία και μειωμένη υπεραϊματική αντίδραση στη θερμότητα, σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου.

Παράγοντες επηρεασμού των Μετρήσεων LDI

Ένα βασικό μειονέκτημα των συστημάτων αυτής της τεχνολογίας είναι ότι η αιματική ροή δε μπορεί να μετρηθεί ποσοτικά και ότι οι τιμές δείχνουν μια πλατιά διαφοροποίηση από άτομο σε άτομο λόγω των εγγενών διαφορών στο πάχος και αγγειακή γεωμετρία, επιτρέποντας επομένως μόνο τη μέτρηση σχετικών αλλαγών με αξιοπιστία¹⁸.

Οι Kernick και Shore¹⁹, μελετώντας διάφορους παράγοντες που επιδρούν στις μετρήσεις με LDI (τόσο σε πραγματικές συνθήκες όσο και σε συνθήκες εργαστηρίου), έδειξαν ότι αυξάνοντας το ύψος της κεφαλής του σαρωτή είχαμε αύξηση του σήματος σε όλες τις ταχύτητες, με την αύξηση αυτή να είναι μη γραμμική υπό πραγματι-

κές συνθήκες. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι το σήμα του LDI μειώθηκε μη γραμμικά με την αύξηση της πυκνότητας, κάτι που κάνει την τεχνική πιο χρήσιμη σε επιφανειακές μετρήσεις ροής. Στην ίδια μελέτη εισηγείται ότι το σημείο του «βιολογικού μηδενός» (δηλ. το σημείο στο οποίο παρατηρείται μηδενική ροή) συνεισφέρει πολύ περισσότερο στο σήμα ροής στον LDI, από ότι στο LDF. Οι Bornmyr et al¹⁸ αντικρούσαν τον ισχυρισμό αυτό, δηλώνοντας ότι δεν είναι σίγουρο εάν τα φαινόμενα τα οποία είναι υπεύθυνα για την παρουσία του «βιολογικού μηδενός» συμβαίνουν υπό κανονικές συνθήκες. Οι μελετητές αυτοί καταλήγουν ότι δε θα πρέπει να υπάρχει αφαίρεση τιμής από τα αποτελέσματα των μετρήσεων αυτών.

Οι Kernick και Shore¹⁹ διαπίστωσαν επίσης μια γραμμική σχέση στην αύξηση της συγκέντρωσης των ερυθρών αιμοσφαιρίων και του σήματος εξόδου του LDI, κάτι το οποίο συμφωνεί με τα αποτελέσματα των Wardell et al². Αυτό φαίνεται να ισχύει για χαμηλού αιματοκρίτες (μέχρι 1%), αλλά με την αύξηση του αιματοκρίτη η γραμμικότητα χάνεται.

Τέλος, οι Svedman et al³, σε μια μελέτη πάνω στην άκρα χείρα, πρότειναν κατά την εκτίμηση της επίδρασης των διαφορών στις τιμές που προέρχονται από την κλίση του δέρματος, να υπάρχει η παραδοχή ότι η αιμάτωση του δέρματος είναι παρόμοια σε όλα τα τμήματα της περιφέρειας της άκρας χειρός, κάτι το οποίο επιβεβαιώνεται από τη σχετικά μικρή διακύμανση των μέσων τιμών LDI της μελέτης.

Πλεονεκτήματα και Μειονεκτήματα του LDI

Παρότι οι χρονικές αλλαγές στη ροή του αίματος μπορούν να μελετηθούν μέσω συνεχών μετρήσεων LDF (στο οποίο χρησιμοποιούνται οπτικές ίνες), οι τοπικές αλλαγές δε μπορούν να μελετηθούν ανάλογα με αυτή τη μέθοδο, μιας και θα πρέπει να πραγματοποιηθεί μια μεγάλη σειρά μετρήσεων σε διαφορετικά σημεία σε αληθινό χρόνο.

Αυτό μπορεί να γίνει με το LDI²⁰. Ως αποτέλεσμα, και με τη μέτρηση μέχρι 4096 διαφορετικών σημείων σε μία και μόνη σάρωση, η διαφοροποίηση από σημείο σε σημείο μπορεί να θεωρηθεί ως μη σημαντική, πράγμα που επιτρέπει μεγαλύτερη εμπιστοσύνη στις διαφορές μεταξύ ασθε-

ών¹⁷. Επιπροσθέτως οι Kernick και Shore¹⁹ έδειξαν σε μια σειρά από πειράματα σε μελέτες μοντέλων, ότι τα αποτελέσματα του LDI έχουν γραμμική εξάρτηση με την ταχύτητα των ερυθρών κυττάρων εάν αυτή είναι μέχρι 3 χιλ. ανά εκατοστό σε φυσιολογικούς αιματοκρίτες και ότι οι παραγόμενες τιμές είναι εξαρτώμενες στο ύψος του οργάνου τόσο σε κανονικές όσο και πειραματικές συνθήκες.

Ένα άλλο σοβαρό πλεονέκτημα είναι ότι παρότι είναι πιθανόν να διαφέρει η ροή στο διασδιάστατο χάρτη αιματικής ροής που δημιουργείται από τον LDI¹, τα συνολικά χαρακτηριστικά του χάρτη είναι σταθερά από μέρα σε μέρα, ενώ και η σχετική διαφορά μεταξύ των σημείων στην τοπική ροή παραμένει σταθερή. Οι Sorensen et al²¹ έχουν επίσης βρει ότι η ακρίβεια της μεθόδου σε κλινικές συνθήκες έχει βρεθεί να κατέχει μια επαναληψιμότητα που αντιστοιχεί σε συντελεστή συσχέτισης 0.78 ή και μεγαλύτερο. Βρέθηκε επίσης ότι υπάρχει μια σημαντική μείωση θορύβου με την εξαγωγή του μέσου όρου ροής ανάμεσα σε τέσσερις ή δεκαέξι περιοχές μέτρησης²².

Στα παραπάνω πρέπει να προστεθεί και το ότι η μέθοδος είναι μη επεμβατική, έχει αποδειχθεί επιστημονικά, ενώ μια σειρά επιστημονικών δημοσιεύσεων έχει αποδείξει ότι έχει ένα πλήθος εφαρμογών, καθώς μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για την παρακολούθηση και εξέλιξη ασθενειών κατά το χρόνο²³.

Ένα από τα μιονεκτάματα της μεθόδου είναι ότι η ένταση του περιβάλλοντος φωτός¹ και η ύπαρξη μικροκλιδών²⁴ μπορούν να επηρεάσουν τα αποτελέσματα, μιας και στη μέθοδο χρησιμοποιείται η συνολική στάθμη φωτός για την εξομάλυνση των εικόνων. Επομένως προτείνεται το φως στο χώρο μετρήσεων να βρίσκεται στο χαμηλότερο δυνατό επίπεδο.

Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δίνεται σε παράγοντες που επηρεάζουν τη ροή του αίματος στο δέρμα (π.χ. άγχος), καθώς επίσης και σε παράγοντες του περιβάλλοντος που μπορεί να επηρεάσουν εύκολα τα αποτελέσματα (π.χ. θερμοκρασία περιβάλλοντος), αλλά μπορούν να ελεγχθούν σχετικά εύκολα^{1,25}.

Παράλληλα, θεωρείται ότι η διαφοροποίηση της διαφάνειας του δέρματος μπορεί να επηρεάσει τα αποτελέσματα του LDI, παρότι η μέθοδος παρουσιάζεται ως πιο αξιόπιστη όταν συγκρίνεται με άλλες (π.χ. αγγειακή μικροσκόπηση)⁵.

Επίλογος

Η χρήση του LDI ως μέσου μελέτης της επιδερμικής μικροκυκλοφορίας έχει αποδειχθεί χρήσιμη και ουσιαστική, ενώ η αναπαραγωγιμότητά της έχει υποστηριχθεί από τη διεθνή βιβλιογραφία²³.

Παράλληλα, το γεγονός ότι αποτελεί μια μη παρεμβατική μέθοδο μελέτης αποτελεί ένα πολύ σημαντικό πλεονέκτημα απέναντι σε άλλες επεμβατικές μεθόδους όπως η αγγειογραφία. Έτσι, μπορεί να υποστηριχθεί ότι, εφόσον ακολουθηθούν οι διεθνείς συστάσεις για τη χρήση της²⁵, τα όποια μειονεκτήματα υπάρχουν μπορούν να περιοριστούν ώστε να διευρυνθεί περαιτέρω η εφαρμογή της.

Summary

The use of Laser Doppler Imaging (LDI) in the study of microcirculation

M. Klonizakis

Cutaneous microcirculation possesses both temporal and spatial variability.

The spatial variability has its origin in the heterogeneity of the cutaneous microvascular network, with richly perfused arteriovenous anastomoses in some areas and mainly capillaries in others¹. Its study has been proven as a useful tool in order to predict and study the progress of a number of diseases and conditions, and therefore, it is necessary to utilise a system that enables the recording of both temporal fluctuations and spatial variability. LDI is a useful, scientifically-proven, non-invasive system that has been shown to have a large number of advantages against other similar systems.

Key words: *imaging, microcirculation, veins, Laser Doppler.*

Βιβλιογραφία

1. Nilsson G. LDPI for assessment of cutaneous microcirculation. *Phlebol*, 1997; 26:87-91.
2. Wårdell K, Jakobsson A, Nilsson GE. Laser Doppler perfusion imaging by dynamic light scattering. *IEEE Trans Biomed Eng*. 1993 Apr; 40(4):309-16.
3. Svedman C, Cherry GW, Strigini E, Ryan TJ. Laser Doppler Imaging of Skin microcirculation. *Acta Derm Venereol (Stockh)*, 1998; 78:114-118.
4. Seifalian AM, Stansby G, Jackson A, Howell K, Hamilton G. Comparison of LDI, LDF and Thermographic Imaging for assessment of blood flow in human skin. *Eur J Vasc Surg*, 1994; 8:65-69.
5. Gschwandner ME, Ambrozy E, Schneider B, Fasching S, Willfort A, Ehringer H. LDI and capillary microscopy in ischemic ulcers, Atherosclerosis, 1999; 142:225-232.
6. Bray R, Forrester K, McDougall JJ, Damji A, Ferrell WR. Evaluation of LDI to measure blood flow in knee liga-

ments of adult rabbits, *Med & Biol. Eng. & Comp*, 1996; 34:227-231.

7. Willis EF, Clough GF, Church MK. Investigation into the mechanisms by which nedocromil sodium, frusemide and bumetanide inhibit the histamine-induced itch and flare response in human skin in vivo. *Clin Exp Allergy*. 2004 Mar; 34(3):450-455.

8. Stucker M, Auer T, Hoffman K, Altmeyer P. 2-d blood flow determinations in allergic reactions using Laser Doppler scanning. *Contact Dermatitis*, 1995; 33:299-303.

9. Neisius U, Olsson R, Rukwied R, Lischetzki G, Schmelz M. Prostaglandin E2 induces vasodilation and pruritus, but no protein extravasation in atopic dermatitis and controls. *J Am Acad Dermatol*. 2002 Jul; 47(1):28-32.

10. Eichhorn V, Auer T, Voy ED, Hoffmann K. LDI of Axial and random pattern flaps in the maxillo-facial area. A preliminary report. *J Cranio-Maxillofacial Surg*, 1994; 34:301-306.

11. Arnold F, He CYJ, Cherry GW. Perfusion imaging of skin island flap blood flow by a scanning LD technique. *Brit J Plast Surg*, 1995; 48:280-287.

12. Sainsbury DC. Critical evaluation of the clinimetrics of laser Doppler imaging in burn assessment. *J Wound Care*. 2008 May; 17(5):193-4, 196-8, 200.

13. Murray AK, Moore TL, King TA, Herrick AL. Vasodilator iontophoresis a possible new therapy for digital ischaemia in systemic sclerosis? *Rheumatology (Oxford)*. 2008 Jan; 47(1):76-79.

14. Vogel A, Dasgeb B, Hassan M, Amyot F, Chernomordik V, Tao Y, Demos SG, Wyvill K, Aleman K, Little R, Yarchoan R, Gandjbakhche AH. Using quantitative imaging techniques to assess vascularity in AIDS-related Kaposi's sarcoma. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*. 2006; 1:232-235.

15. Morris SJ, Shore AC, Tooke JE. Responses of the skin microcirculation to acetylcholine and sodium nitroprusside in patients with NIDDM. *Diabetologia*, 1995; 38:1337-1344.

16. Krishnan ST, Quattrini C, Jeziorska M, Malik RA, Rayman G. Neurovascular factors in wound healing in the foot skin of type 2 diabetic subjects. *Diabetes Care*. 2007 Dec; 30(12):3058-62. Epub 2007 Sep 26.

17. Cheate TR, Quashie C, Villemur B, Carpenter P. 2-D Laser Doppler Perfusion Imaging and microcirculatory function in patients with venous skin damage, *Phlebology*, 1995; 10:32-36.

18. Bornmyr S, Svensson H, Lilja B, Sundkvist G. Skin temperature changes and changes in skin blood flow monitored with LDF and LDI: a methodological study in normal humans, *Clin Phys*, 1997; 17:71-81.

19. Kernick DP, Shore AC. Characteristics of LDPI in vitro and in vivo, *Phys Meas*, 2000; 21:333-340.

20. Svedman C, Cherry GW, Ryan TJ. The Venous-arterial reflex in venous leg ulcer patients studied by LDI, *Acta Derm Venereol (Stockh)*, 1998; 78:258-261.

21. Sorensen J, Bengtsson M, Malmqvist EL, Nilsson G, Sjöberg F. Laser Doppler perfusion imager (LDPI)—for the assessment of skin blood flow changes following sympathetic blocks. *Acta Anaesthesiol Scand*. 1996 Oct; 40(9):1145-1148.

22. Wårdell K, Nilsson GE. Duplex laser Doppler perfusion imaging. *Microvasc Res*. 1996 Sep; 52(2):171-82.

23. Turner J, Belch JJ, Khan F. Current concepts in assessment of microvascular endothelial function using laser Doppler imaging and iontophoresis. *Trends Cardiovasc Med*. 2008 May; 18(4):109-16.

24. Rajan V, Varghese B, Van Leeuwen TG, Steenbergen W. Influence of tissue optical properties on laser Doppler perfusion imaging, accounting for photon penetration depth and the laser speckle phenomenon. *J Biomed Opt*. 2008 Mar-Apr; 13(2):024001.

25. Fullerton A, Stucker M, Wilhelm KP, Wårdell K, Anderson C, Fischer T, Nilsson GE, Serup J; European Society of Contact Dermatitis. Guidelines for visualization of cutaneous blood flow by laser Doppler perfusion imaging. A report from the Standardization Group of the European Society of Contact Dermatitis based upon the HIRELADO European community project. *Contact Dermatitis*. 2002 Mar; 46(3):129-140. **(B)**