

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Scuola di Ingegneria

Dipartimento di Ingegneria dell'Informazione

Dipartimento di Ingegneria Industriale

Corso di Laurea Magistrale in Bioingegneria

Analisi Wavelet del segnale di perfusione cutanea

Relatore: Prof. Andrea Bagno

Correlatore: Dott. Romeo Costanzo Martini

Laureanda: Myriam Ferrari

A.A. 2013/2014

Alla mia famiglia

Abstract

Microcirculatory haemodynamics can be evaluated by Laser Doppler Fluxmetry (LDF). Laser Doppler signal shows periodic oscillations, named flowmotion. The spectral analysis of flowmotion displays six characteristic frequency intervals due to distinct vascular activities: endothelial cells NO-dependent and NO-independent, local sympathetic, myogenic, respiratory and heart.

The aim of this work is to evaluate the contribution of the mentioned physiological activities under different conditions of microcirculation.

Laser Doppler signals of two groups of patients affected by Peripheral Arterial Occlusive Disease (PAOD) were investigated: in the first case the patients were evaluated before and after occlusive reactive hyperaemia and before and after FREMS (*Frequency Rhythmic Electrical Modulation System*); in the second group, patients were analyzed before and after revascularization procedure.

Chapter 1 presents some elements of physiology and the terms of *vasomotion* and *flowmotion* are explained. In Chapter 2, the basic principles of Laser Doppler Flowmetry are exposed.

In Chapter 3 the theoretical basis of spectral analysis are illustrated, highlighting how the Wavelet transform is particularly suitable for the analysis of LDF signal. Chapter 4 is an introduction to the experimental work: it describes FREMS treatment and various types of revascularization, the treated patients, the characteristics of the instrumentation used and the acquired signals, and the implemented code.

In Chapter 5 the results obtained are presented and discussed, and in Chapter 6 some conclusions are provided with some suggestions for further research activities.

Sommario

L'analisi della perfusione cutanea, al fine di determinare l'emodinamica del microcircolo cutaneo, può essere realizzata mediante acquisizione del segnale flussimetrico Laser Doppler (LD). Il segnale è caratterizzato da oscillazioni periodiche, dette onde di *flowmotion*. Dall'analisi spettrale di questo segnale si possono rilevare sei intervalli di frequenze, riferibili ad attività di strutture del sistema cardiovascolare: endoteliale non dipendente dall'ossido nitrico, endoteliale dipendente dall'ossido nitrico, del sistema nervoso autonomo simpatico locale, miogena, del sistema nervoso autonomo relativo all'attività respiratoria e cardiaca.

Attraverso la trasformata Wavelet del segnale LD, si è cercato di valutare il contributo dei diversi intervalli di frequenza al variare dell'emodinamica microcircolatoria cutanea. In particolare, sono stati presi in considerazione due diversi gruppi di pazienti affetti da arteriopatia periferica degli arti inferiori. Nel primo gruppo è stata analizzata l'influenza della terapia FREMS (*Frequency Rhythmic Electrical Modulation System*) sull'attività vascolare prima e dopo prova PORH. Nel secondo gruppo, sono stati esaminati segnali LD di pazienti in ischemia critica prima e dopo rivascolarizzazione dell'arto affetto.

Nel Capitolo 1 vengono presentati alcuni elementi di fisiologia e vengono precisati i concetti di *vasomotion* e *flowmotion*. Nel Capitolo 2 vengono esposti i principi della Flussimetria Laser Doppler. Nel Capitolo 3 si espongono le basi teoriche dell'analisi in frequenza, evidenziando come la trasformata Wavelet risulti particolarmente adatta alla analisi del segnale LD. Nel Capitolo 4 si descrivono: i pazienti considerati, il trattamento FREMS e le varie tipologie di rivascolarizzazione, le caratteristiche dello strumento utilizzato e del codice implementato per l'analisi. Nel Capitolo 5 sono presentati e discussi i risultati ottenuti. Nel Capitolo 6 vengono tracciate le conclusioni fornendo alcuni suggerimenti per proseguire l'attività di ricerca.

Ringraziamenti

La parte dedicata ai ringraziamenti nella sua semplicità di contenuti risulta sempre la più difficile da elaborare.

È però doveroso rivolgere un pensiero a chi mi ha sostenuto in questo importante percorso formativo, a chi mi ha dovuto sopportare nei momenti di nervosismo e a chi ha saputo confortarmi e consigliarmi nei momenti difficili.

Un “grazie” particolare a chi mi ascolta, a chi mi guarda e capisce subito cosa sto per dire, a chi mi conosce fin troppo bene e sa come placare le mie ire e, “perché no?”, anche a chi mi conosce da poco, e ha visto qualcosa di buono in me che vale la pena di coltivare.

Un sentito “grazie” è rivolto alla mia famiglia, ai vecchi amici e quelli nuovi, agli amici che si “vivono” quotidianamente e a quelli che nonostante siano lontani molti chilometri sono sempre presenti soprattutto nei momenti importanti della vita.

Ringrazio il Prof. Andrea Bagno che mi ha seguito nello sviluppo di questa tesi, che è stato sempre molto disponibile e col quale è stato un piacere confrontarsi; ringrazio allo stesso tempo il Dott. Romeo Martini, che ha supervisionato dal punto di vista clinico il lavoro svolto.

Indice generale

1	Introduzione.....	13
1.1	Il sistema cardiovascolare.....	14
1.2	Vasomotion e flowmotion: aspetti generali.....	18
1.3	La vasomotion.....	19
1.4	La flowmotion.....	20
2	La Flussimetria Laser Doppler.....	25
2.1	Effetto Doppler.....	25
2.1.1	Cenni storici.....	25
2.1.2	Formulazione matematica.....	26
2.2	Il Flussimetro Laser Doppler.....	27
2.2.1	Funzionamento del dispositivo.....	28
2.2.2	Limiti nella Flussimetria Laser Doppler.....	30
3	Analisi in frequenza.....	33
3.1	La trasformata di Fourier.....	33
3.1.1	Non idealità dovuta all'acquisizione.....	36
3.1.2	Limiti della trasformata.....	37
3.2	La trasformata di Fourier Short Time.....	38
3.2.1	Limiti della trasformata.....	40
3.3	La trasformata Wavelet.....	41
3.3.1	La risoluzione tempo-frequenza.....	41
3.3.2	L'equazione.....	42
3.3.3	La mother Wavelet.....	43
3.3.4	La scala.....	44
3.3.5	Lo scalogramma.....	46
3.3.6	Limitazioni e cono di influenza.....	48
4	Lavoro sperimentale.....	51
4.1	Descrizione dello strumento e acquisizione del segnale.....	51
4.2	Segnale e durata dell'acquisizione.....	53
4.3	Prima parte: pazienti trattati con FREMS.....	55
4.3.1	Terapia FREMS.....	55
4.3.2	Iperemia reattiva post-occlusiva (PORH).....	56
4.3.3	Pazienti.....	57
4.3.4	Caratteristiche del segnale.....	58
4.4	Seconda parte: pazienti rivascolarizzati.....	59
4.4.1	Tipologie di rivascolarizzazione.....	59
4.4.2	Pazienti.....	60
4.4.3	Caratteristiche del segnale.....	61
4.5	Il codice.....	62
4.5.1	Caricamento dei dati e plot.....	63
4.5.2	Eliminazione artefatti da movimento.....	64
4.5.3	Function <i>wwt.m</i>	66
4.5.4	Analisi di potenza e ampiezza al variare del tempo.....	67
4.5.5	Ampiezza e potenza assoluta, media e relativa e confronti.....	69
4.5.6	Test statistici e boxplot.....	73
5	Risultati e discussione.....	75
5.1	Prima parte: pazienti trattati con FREMS.....	76
5.2	Seconda parte: pazienti rivascolarizzati.....	86
6	Conclusioni.....	97
	Appendice.....	99
	Bibliografia.....	103

1 Introduzione

L'analisi svolta nel presente progetto di tesi ha avuto per oggetto l'analisi del segnale di perfusione cutanea osservata con il Laser Doppler (LD). Questo strumento consente di analizzare la perfusione del microcircolo cutaneo nell'unità di tempo in unità arbitrarie di perfusione (PU). Il segnale LD rilevato a livello cutaneo presenta un andamento oscillatorio. Le oscillazioni sono variabili da soggetto a soggetto e dipendono dalle condizioni sistemiche e locali di perfusione cutanea.

La causa dell'andamento oscillatorio del segnale LD è da ricercarsi nel meccanismo di contrazione e rilassamento delle cellule muscolari lisce presenti nella tonaca media delle arteriole cutanee, la *vasomotion*. Essa è controllata da meccanismi che agiscono sui microvasi determinando un processo denominato autoregolazione della perfusione tissutale, processo attraverso cui si mantiene una adeguata perfusione nel tessuto in base alle caratteristiche metaboliche [1].

Un'utile analisi del segnale di perfusione cutanea può essere effettuata grazie alla trasformata Wavelet che è in grado di fornire lo spettro in frequenza, per ogni istante temporale.

Con la Wavelet possono essere evidenziate diverse bande di frequenza (FB, *frequency band*) comprese nello spettro tra 0.005 a 2 Hz. Secondo alcuni studi ciascuna FB è messa in relazione all'attività di specifiche strutture del sistema cardiovascolare. In particolare, la FB endoteliale NO indipendente è compresa tra 0.005-0.0095 Hz, la FB endoteliale NO dipendente tra 0.0095-0.021 Hz, la FB del sistema nervoso autonomo simpatico locale tra 0.021-0.052 Hz, la FB miogena tra 0.052-0.145 Hz, la FB del sistema nervoso autonomo relativo all'attività respiratoria tra 0.145-0.6 Hz, ed infine la FB cardiaca tra 0.6-2 Hz (Tabella 1).

Attività	Banda di frequenza (FB) [Hz]
Cardiaca	0.6-2.0
Respiratoria	0.145-0.6
Miogena	0.052-0.145
Neurogena	0.021-0.052
Endoteliale NO dipendente	0.0095-0.021
Endoteliale NO indipendente	0.005-0.0095

Tabella 1: Attività e relative bande di frequenza.

Nella presente tesi si è scelto di analizzare lo spettro del segnale LD in diverse modalità: la prima consiste nell'osservare lo spettro dell'ampiezza e della potenza in ogni distinto istante temporale, mentre la seconda consiste nello studio dello spettro di potenza e ampiezza mediato nel tempo.

Sono stati pertanto calcolati i seguenti parametri: *Ampiezza e Potenza Assolute, Medie e Relative*. Successivamente, per quanto riguarda *l'Ampiezza* e la *Potenza Assoluta e Relativa*, sono stati calcolati i valori medi per ogni banda di frequenza, ed è stata eseguita un'analisi di tipo statistico sui dati ottenuti.

Sono stati osservati i segnali LD di pazienti arteriopatici sottoposti alla prova PORH, prima e dopo il trattamento con terapia FREMS, al fine di ricercare differenze significative che potessero essere correlate agli effetti della terapia.

Inoltre è stata effettuata un'analisi del segnale LD di pazienti affetti da ischemia critica degli arti inferiori per valutare la risposta della *flowmotion* del microcircolo cutaneo prima e dopo rivascolarizzazione.

1.1 Il sistema cardiovascolare

Il sistema cardiovascolare provvede al trasporto e della distribuzione del sangue nei vari organi e tessuti del corpo umano, oltre al trasporto dell'ossigeno e alla rimozione dei prodotti terminali del metabolismo, tra cui la CO_2 . Il sistema cardiovascolare provvede anche ad altre funzioni come quella di difesa immunitaria, idratazione dei tessuti, nutrizione delle cellule degli organi e termoregolazione [2, 3]. Tale sistema è composto da una pompa (il cuore) e da condotti di trasporto, distribuzione e scambio, i vasi sanguigni che sono distinti in arterie, vene e capillari (Figura 1).

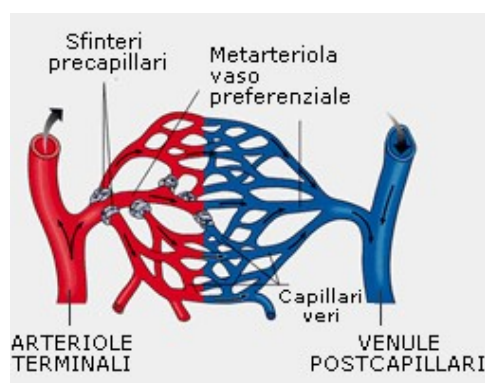


Figura 1: Schema composito della microcircolazione: arteriole, venule, metarteriole e capillari. Le frecce indicano la direzione del flusso sanguigno.

Oltre a queste strutture, nella funzione del sistema cardiovascolare, sono coinvolti il sistema linfatico e il sistema nervoso autonomo. Il sistema linfatico provvede al trasporto dei liquidi interstiziali, cioè di quei liquidi filtrati dai capillari nella matrice interstiziale extracellulare che costituiscono la linfa. Il sistema nervoso autonomo, nelle sue componenti simpatica e parasimpatica, partecipa assieme al sistema endocrino (tiroide, surreni, ipofisi ecc) al mantenimento del tono vascolare e quindi alla regolazione della perfusione ematica nei vari organi.

Le arterie iniziano con l'aorta da cui si diramano altre branche arteriose che assumono un diametro sempre più piccolo via via che procedono verso la periferia. La struttura dell'arteria è tipicamente distinta in tre tonache, intima, media e avventizia (Figura 2):

- *tonaca intima*: è la più interna, a contatto con il sangue. È formata da uno strato singolo di cellule endoteliali disposte sulla membrana basale. La tonaca intima, ovvero l'endotelio, svolge funzioni di barriera, di trasporto e di *signaling* verso le sottostanti cellule muscolari della tonaca media. Inoltre partecipa attivamente al processo emato-coagulativo;
- *tonaca media*: è composta da cellule muscolari lisce che possono essere disposte in vari strati. Nelle arterie più periferiche gli strati possono essere ridotti anche ad un singolo strato (le arteriole) o addirittura un singolo strato discontinuo. La funzione principale delle cellule muscolari lisce è quello di mantenere il tono dell'arteria. Attraverso il controllo neuroendocrino ed endoteliale, le cellule muscolari della tonaca media vanno incontro a contrazione e rilassamento. Tali fenomeni a livello delle arteriole determinano le cosiddette resistenze periferiche attraverso le quali l'organismo mantiene livelli di perfusione dei tessuti adeguati. Nella tonaca media sono presenti, nelle grandi, medie e piccole arterie, fibre elastiche che hanno lo scopo di mantenere il tono vascolare e consentire la funzione di trasporto e distribuzione del sangue attraverso i loro movimenti di contrazione e rilassamento;
- *tonaca avventizia*: è costituita da tessuto connettivo denso che forma l'avvolgimento esterno del vaso ed ha una funzione prettamente protettiva. In questa tonaca sono presenti anche delle terminazioni nervose.

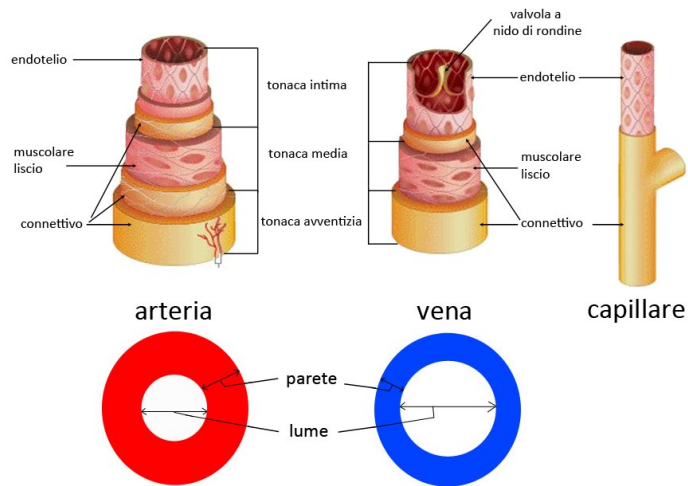


Figura 2: Struttura dei vasi sanguigni: si noti la differenza della istologia e la suddivisione in tonache delle pareti vascolari.

Il passaggio tra le piccole arterie e i capillari avviene attraverso delle strutture intermedie denominate arteriole. È noto in letteratura che le arteriole definiscono l'inizio della cosiddetta microcircolazione, per cui col termine microcircolazione in questa tesi ci riferiremo alle strutture vascolari che sono al di là delle piccole arterie e cioè arteriole capillari e venule. Fanno parte del sistema microcircolatorio i capillari linfatici, le fibre terminali del sistema nervoso autonomo, le cellule ematiche, la matrice interstiziale e le cellule degli organi perfusi; in questa tesi definiamo così l'unità microvascolo tessutale. Le arteriole, il cui diametro varia tra circa 5 e 100 μm (Figura 3), presentano uno strato endoteliale, sino a tre strati di cellule muscolari lisce e uno strato avventiziale.

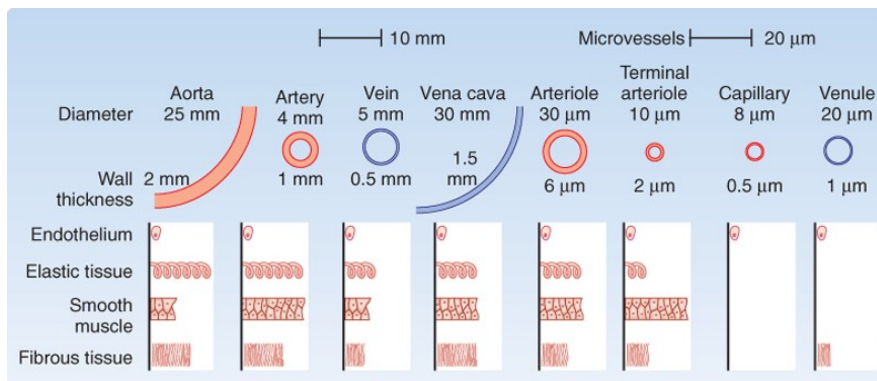


Figura 3: Caratteristiche morfologiche delle strutture vascolari sistemiche: diametro, spessore delle pareti e delle varie tonache costituenti la parete. Le sezioni trasversali dei vasi non sono riportate in scala a causa del notevole divario tra le dimensioni dell'aorta e delle vene cave e quelle dei capillari.

Come detto, le arteriole hanno la capacità di regolare l'afflusso del sangue all'interno della microcircolazione. Man mano che si prosegue verso i capillari le cellule muscolari lisce riducono i loro strati sino ad arrivare ad un singolo strato discontinuo (le metarteriole). Al di là delle metarteriole si ritrovano i capillari, strutture molto semplici formate da un singolo strato endoteliale che poggia sulla membrana basale. I capillari variano da organo ad organo in ragione della disposizione delle cellule endoteliali. I capillari continui hanno le cellule endoteliali disposte in maniera continua, cioè senza interruzione da cellula a cellula, e sono tipiche della cute e del cervello. I capillari discontinui o fenestrati hanno le cellule endoteliali disposte in modo da creare zone attraverso cui la filtrazione o l'assorbimento dei liquidi è favorita, come intestino, rene e milza. Particolari capillari si ritrovano per esempio nel fegato, i cosiddetti sinusoidi epatici (Figura 4).

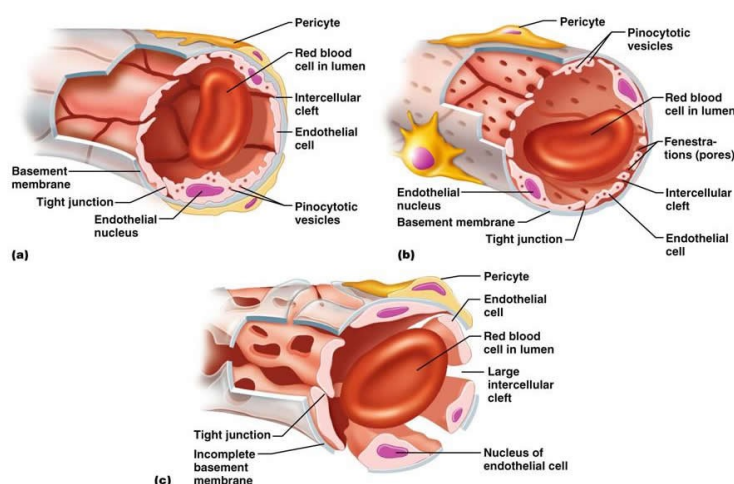


Figura 4: Struttura dei capillari, i tre diversi tipi: (a) capillari continui; (b) capillari fenestrati; (c) capillari discontinui.

Le venule rappresentano la via di uscita del sangue dalla microcircolazione. Come le arteriole, anch'esse sono formate da tre tonache (intima, media ed avventizia) e man mano che si procede dai capillari verso le piccole vene, le venule presentano un numero di strati di cellule muscolari lisce crescente. Dai capillari si originano quindi le metavenule, aventi cellule muscolari lisce monostrato frammentato; gli strati di cellule muscolari lisce aumentano via via di spessore.

Oltre alla emodinamica microcircolatoria, i microvasi provvedono alle funzioni di filtrazione e riassorbimento. Tale funzione si esplica particolarmente nei capillari e nel tratto iniziale delle venule. La filtrazione e il riassorbimento dei liquidi e delle sostanze nutritizie viene regolato attraverso un complesso sistema di equilibrio tra pressione idrostatica e pressione oncologica/osmotica dei tessu-

ti. La pressione idrostatica è maggiore all'inizio dei capillari e minore alla fine delle venule, contrariamente quella osmotico/oncotica.

Dai vasi della microcircolazione, cioè le venule, si passa alle piccole vene e via via, verso il cuore, alle medie e grandi vene. Come già detto, la struttura delle vene è simile a quella delle arterie ma presentano una minore quantità di cellule muscolari lisce e una minore quantità di fibre elastiche, ma di calibro sicuramente più grande. La differenza di calibro e di struttura delle vene è secondaria alla loro funzione. La principale funzione delle vene infatti è il drenaggio del sangue verso il cuore; esse devono pertanto essere strutture di grande capacitanza, poiché il deflusso venoso può subire delle notevoli variazioni in rapporto alle attività fisiche e metaboliche dell'organismo.

1.2 Vasomotion e flowmotion: aspetti generali

Risale al 1852 la prima intuizione del fatto che il controllo locale del flusso sanguigno fosse fortemente variabile nel tempo. A quell'epoca vennero condotti degli studi sui microvasi presenti nelle ali dei pipistrelli [4]. Si osservò che il diametro e il flusso dei vasi hanno delle variazioni ritmiche che vennero definite rispettivamente *vasomotion* e *flowmotion*.

Nel 1984 Intaglietta e Colantuoni descrissero su modello animale di criceto le variazioni cicliche delle arteriole mesenteriche, definendole come espressione delle attività spontanee delle miocellule arteriolari. [5] (Figura 5).

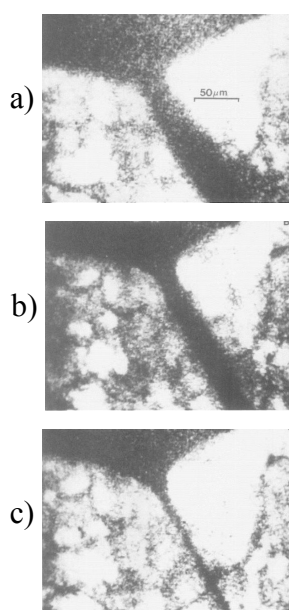


Figura 5: Variazioni cicliche delle arteriole mesenteriche di criceto visibili rispettivamente a a) 1 s, b) 7 s e c) 14 s

Successivamente altri sistemi sono stati sfruttati per valutare gli effetti della *vasomotion*, cioè la *flowmotion*.

Le prime osservazioni eseguite sulla cute umana con LD risalgono agli anni '70-'80 [6]. La Flussimetria LD è in grado di registrare il flusso dei globuli rossi all'interno dei microvasi cutanei in modo non direzionale. Grazie a questa metodica è stato possibile trasportare tutte le conoscenze acquisite sui modelli animali direttamente in vivo e sull'uomo.

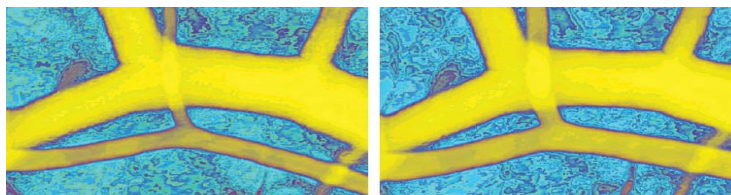
Negli anni '90 sono iniziate le esperienze sullo studio dello spettro del segnale LD. L'analisi in frequenza mediante trasformata di Fourier (FFT) consentiva di individuare le onde della *flowmotion* in base alla loro frequenza che pertanto vennero distinte in onde a bassa frequenza (*low frequency waves*, 1-6 cpm) e ad alta frequenza (*high frequency waves*, 20-70 cpm).

Recenti studi [7] hanno messo in evidenza alcuni intervalli di frequenza caratteristici per il segnale di *flowmotion*, compresi tra 0.005 e 2 Hz e rappresentativi di diverse attività fisiologiche. È stata definita la correlazione tra le diverse bande di frequenza e le attività fisiologiche come descritto nell'Introduzione.

1.3 La vasomotion

La *vasomotion* (Figura 6) avviene grazie alla presenza di cellule muscolari lisce che risiedono a livello della tonaca media delle arteriole. Essa consiste nell'azione di contrazione o rilassamento delle cellule muscolari lisce che determinano la variazione del calibro dell'arteriola a prescindere dalla frequenza cardiaca.

Per propagarsi, la *vasomotion* sfrutta le *gap junction* che collegano tra loro membrane di cellule muscolari lisce adiacenti (Figura 7). Queste giunzioni permettono lo scambio di potenziali chimici ed elettrici in grado di propagare il fenomeno a tutto il vaso. Esiste anche un accoppiamento di tipo meccanico tra le cellule, in modo tale che la contrazione di una determinata cellula provochi la contrazione anche della cellula adiacente.



a)

b)

Figura 6: Esempio di vasomotion. a) arteriola di calibro normale; b) arteriola di calibro aumentato.

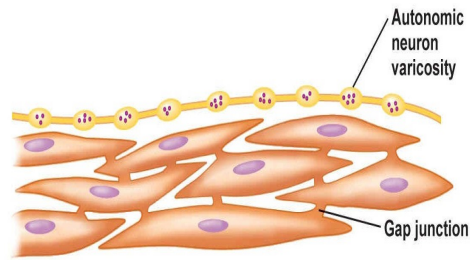


Figura 7: Cellula di tessuto muscolare liscio. Cellule vicine sono collegate da gap junction.

La *vasomotion* del microcircolo è determinata dalla dinamica dei canali ionici. Tale attività è spontanea e ha condotto all'ipotesi che a livello delle cellule muscolari lisce delle cellule arteriolari vi sia una attività simil-pacemaker, tanto da determinare la definizione di cuore periferico. Questo particolare tipo di attività viene esplicita soprattutto a livello delle biforcazioni delle arteriole. In tali zone sono state riscontrate cellule muscolari lisce in grado di depolarizzarsi periodicamente e autonomamente.

Il controllo neuro-endocrino-sistemico e i fenomeni di variazione di pressione ematica all'interno del vaso sono in grado di variare l'attività delle cellule muscolari lisce. Ad esempio il peptide natriuretico atriale prodotto dal miocardio nel momento in cui vi è un eccessivo aumento del volume ematico, provoca il loro rilassamento. Al contrario l'angiotensina II, un ormone deputato all'incremento pressorio che aumenta la resistenza periferica dei vasi e la frequenza e l'intensità delle contrazioni cardiache, stimola la loro contrazione [8].

Un altro tipo di stimolazione delle cellule del tessuto muscolare arteriolare riguarda la concentrazione di ossigeno e di anidride carbonica: diminuzione delle concentrazioni di O_2 e di pH inducono vasodilatazione.

1.4 La *flowmotion*

Il fenomeno della *vasomotion* determina una variazione ciclica del flusso nei microvasi denominato *flowmotion*.

L'analisi della *flowmotion* è stata eseguita sull'uomo grazie alla Flussimetria LD. Tramite l'analisi dello spettro eseguita con trasformata Wavelet è stato possibile identificare differenti FB, come è stato già brevemente descritto in precedenza.

Lo studio della *flowmotion* permette di valutare i fenomeni che determinano la cosiddetta autoregolazione del microcircolo. Ogni organo o tessuto ha la capacità di autoregolare la propria per-

fusione in ragione delle esigenze metaboliche. Grazie all'analisi dello spettro è possibile quindi analizzare le attività sistemiche coinvolte nel controllo della autoregolazione.

Descriveremo adesso singolarmente le attività sistemiche in relazione alle singole FB.

Attività cardiaca

Questo tipo di attività è dovuta all'azione del cuore che spinge il sangue attraverso i microvasi. È espressione del *cardiac stroke volume*, cioè del “colpo” che la pompa cardiaca dà alla colonna ematica attraverso i vasi sanguigni. La spinta cardiaca viene propagata attraverso i vasi sino alla microcircolazione. L'attività cardiaca è l'espressione di attività estrinseca alla microcircolazione ma testimonia che il sistema cardiovascolare funziona in maniera unitaria. Periferia e centro sono in stretta correlazione.

Le oscillazioni del segnale LD legate all'attività cardiaca hanno una frequenza compresa tra 0.6 e 2 Hz [9].

Attività respiratoria

L'attività respiratoria è coinvolta nel ritorno cardiaco e determina il riempimento atriale. A livello dell'atrio destro sono presenti dei barocettori che in relazione alla loro stimolazione determinano un aumento o una diminuzione della resistenza periferica arteriolare, in modo da mantenere la pressione sistemica adeguata alle esigenze dell'organismo. Tali azioni vengono esplicitate attraverso il sistema nervoso autonomo simpatico. Per cui la FB relativa alla frequenza respiratoria identificata dall'analisi Wavelet è, come già detto, espressione dell'attività del sistema nervoso simpatico di tipo sistemico. Anch'essa è espressione di una attività di controllo della *flowmotion* di tipo estrinseco.

Le oscillazioni del segnale LD legate all'attività respiratoria hanno una frequenza compresa tra 0.145 e 0.6 Hz [10].

Attività miogena

L'attività miogena è stata descritta per la prima volta nel 1964 da Folkov. Egli descrisse la spontanea risposta contrattile (Figura 8) all'allungamento q delle cellule muscolari lisce. Questa risposta contrattile è secondaria alla tensione normale σ che il flusso ematico esercita sulla parete del vaso. La relazione tra queste due variabili è regolata dalla legge di Hook :

$$\sigma = E \cdot q$$

dove E è il modulo elastico longitudinale, in questo caso della parete vascolare. Quando la pres-

sione aumenta, i vasi sanguigni sono dilatati e le fibre muscolari che circondano i vasi sono quindi estese.

Il riflesso miogeno è anche regolato dalla legge di Laplace:

$$T = k \cdot \sigma \cdot r$$

La tensione T nella parete è proporzionale al prodotto della pressione idraulica del sangue per il raggio del vaso, con coefficiente di proporzionalità dipendente dalla forma del condotto. All'aumentare della pressione, per mantenere costante una determinata tensione parietale, si deve avere una riduzione del raggio.

Le oscillazioni del segnale LD legate all'attività miogena hanno una frequenza compresa tra 0.052 e 0.145 Hz [11].

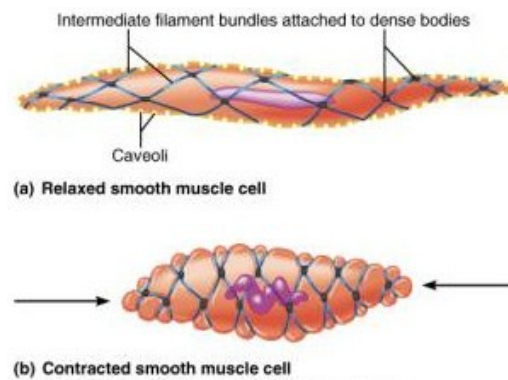


Figura 8: Cellula di tessuto muscolare liscio distesa (a) e contratta (b).

Attività neurogena

Il sistema nervoso autonomo, oltre ad essere influenzato dall'attività respiratoria e dai barocettori sistemici ha la capacità di esercitare stimolazioni locali in relazione a stimoli fisici, chimici e metabolici esclusivamente a livello locale. Il sistema nervoso involontario esercita la sua funzione attraverso la contrazione e il rilassamento delle cellule muscolari lisce della tonaca media. Ad esempio, la necessità di regolazione della temperatura corporea può avvenire tramite questo meccanismo, che porta ad una variazione della vasomotilità dei microvasi.

Le oscillazioni del segnale LD legate all'attività neurogena hanno una frequenza compresa tra 0.021 e 0.052 Hz [12].

Attività endoteliale

Attraverso l'analisi Wavelet sono state individuate due FB riferibili all'attività endoteliale: la

prima riferibile ad attività ossido nitrico (NO) dipendente, la seconda riferibile ad attività non dipendente da NO [11]. L'NO che si forma nell'endotelio diffonde attraverso le cellule muscolari lisce, determinandone il rilassamento e quindi un aumento del calibro arteriolare e quindi un incremento della perfusione. Alla base della produzione endoteliale dell'NO sta lo *shear stress* di parete, per cui un aumento della pressione ematica laterale determina una maggiore pressione sulle cellule endoteliali che scatena la produzione di NO. Questo meccanismo è tipico della prova PORH. La vasodilatazione non NO mediata si esplica attraverso stimoli endoteliali che non interagiscono con il meccanismo sopra descritto, ma attraverso la produzione di AMP ciclico che direttamente agisce sulle cellule muscolari lisce (Figura 9).

Le oscillazioni del segnale LD legate all'attività endoteliale hanno una frequenza compresa tra 0.005 e 0.021 Hz: una compresa tra 0.005 e 0.0095 per cui l'attività endoteliale non è dipendente da NO e la seconda tra 0.0095 e 0.021 Hz nella quale invece è presente la dipendenza da NO [13].

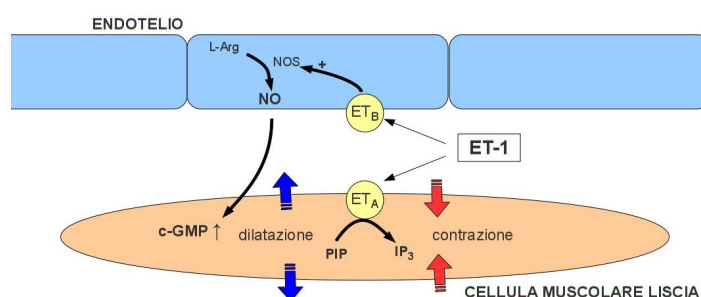


Figura 9: Schematizzazione del rilascio delle sostanze da parte delle cellule endoteliali che regolano vasocostrizione e vasodilatazione.

2 La Flussimetria Laser Doppler

Uno dei metodi utilizzati per indagare il livello di perfusione cutanea in maniera assolutamente non invasiva è la Flussimetria LD.

I principi su cui si basa la metodica LD sono i seguenti: fascio di luce laser a bassa energia, direzionato da una fibra ottica che penetra nella cute sino ad una profondità di circa 1,5-2 mm. Tutte le cellule ematiche che attraversano il tessuto analizzato colpite dalla luce laser determinano uno *shift* in frequenza concordemente con la teoria dell'effetto Doppler. La grandezza e la distribuzione in frequenza di questo *shift* dipendono dal numero e dalla velocità di spostamento delle cellule ematiche presenti all'interno del volume di tessuto esaminato.

Il segnale riflesso ritorna alla sonda e viene convertito in segnale elettrico con le stesse componenti in frequenza. L'apparato amplifica le onde e determina la differenza di frequenza tra il segnale di partenza e quello di arrivo, permettendo così di determinare la velocità del flusso sanguigno. Monitorando l'andamento del microcircolo nel tempo, oltre all'intensità totale e dei singoli impulsi, il LD è in grado di registrare le variazioni ritmiche che avvengono nel flusso ematico cutaneo, ovvero la *flowmotion* [14].

L'anatomia della microcircolazione cutanea comprende due plessi orizzontali: uno superficiale e uno più profondo, entrambi situati nel derma. Dal plesso superficiale si originano i capillari. Il LD rileva il movimento delle cellule ematiche che attraversano i plessi arteriolo-venulari e i capillari [15].

2.1 Effetto Doppler

2.1.1 Cenni storici

Il primo ad osservare questo effetto fu Christian Andreas Doppler nel 1845. Questi fece un famoso esperimento, valutando il suddetto effetto applicato alle onde sonore: si posizionò accanto ai binari della ferrovia e ascoltò il suono emesso da un vagone pieno di musicisti assoldati per l'occasione, mentre il vagone si avvicinava e si allontanava. L'altezza del suono era maggiore quando la sorgente sonora era in avvicinamento, mentre era inferiore quando si stava allontanando (Figura 10).

Pochi anni dopo, nel 1848 anche il francese Hippolyte Fizeau capì che lo stesso effetto era applicabile anche alle onde di tipo elettromagnetico, infatti l'effetto viene a volte chiamato "effetto

Doppler-Fizeau” [16].

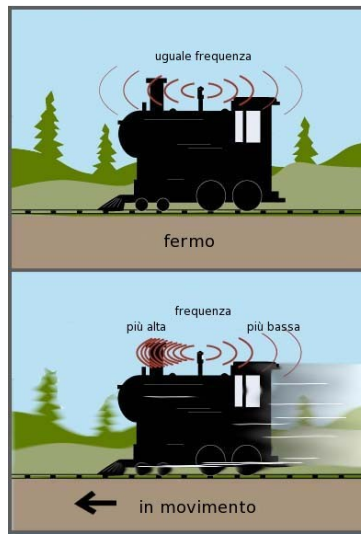


Figura 10: Illustrazione esplicativa dell'Effetto Doppler.

2.1.2 Formulazione matematica

Quando vi è movimento relativo tra la sorgente e il ricevitore, viene prodotto uno spostamento della frequenza dell'onda: tale spostamento è proprio lo *shift* Doppler. Se il ricevitore e la sorgente si spostano sulla stessa linea, vale la seguente relazione [16]:

$$f_r = \frac{c - v_r}{c + v_s} f_s$$

dove v_r è la velocità del ricevitore (considerata positiva se esso si muove verso la sorgente), v_s la velocità della sorgente (considerata positiva se la sorgente si allontana dal ricevitore), e f_r e f_s sono le frequenze dell'onda ricevuta e inviata, e c è la velocità della luce.

Nel caso in cui la velocità c sia significativamente superiore a v_r e v_s come nel caso in esame, considerando c come la velocità della luce, in prima approssimazione la velocità di propagazione dell'onda si può esprimere nel seguente modo:

$$f_r = \left(1 - \frac{v_s - v_r}{c}\right) f_s$$

che dipende solo dalla velocità relativa tra l'emettitore e il ricevitore. Lo *shift* Doppler visto come differenza tra le frequenze del ricevitore e della sorgente $f_r - f_s$ vale quindi:

$$\Delta f = \frac{-v_s - v_r}{c} f_s = \frac{-v_s - v_r}{\lambda_s}$$

dove λ_s è la lunghezza d'onda del segnale inviato. La velocità relativa tra l'emettitore e il ricevitore risulta essere quindi direttamente proporzionale al valore Δf trovato.

Nel caso in cui sorgente e ricevitore non si spostino sulla stessa linea bisogna considerare le proiezioni delle velocità sulla retta passante per sorgente e ricevitore. La formulazione quindi è differente e coinvolge gli angoli che si formano tra i vettori velocità e la retta passante per sorgente e ricevitore:

$$f_r = \left(1 - \frac{v_s \cos(\alpha) - v_r \cos(\beta)}{c}\right) f_s$$

2.2 Il Flussimetro Laser Doppler

Tale dispositivo laser è stato originariamente proposto negli anni Cinquanta da Schawlow e Townes [17] e realizzato sperimentalmente da Maiman [18]. L'uso della flussimetria Doppler per la misura del flusso di sangue nei vasi retinici del coniglio è stato presentato da Riva nel 1972 [19]. La potenza in uscita del laser utilizzata era piuttosto elevata (10 milliWatt) per ottenere un accettabile rapporto segnale-rumore nella misurazione. Tuttavia non era possibile applicare questa elevata potenza agli esseri umani per la valutazione del flusso sanguigno. Il primo ad applicare il Laser Doppler sugli umani fu Stern nel 1975, utilizzando sulla cute un laser a elio-neon a 15 milliWatt [20, 21]. Egli dimostrò come lo *shift* Doppler possa essere sfruttato per quantificare il movimento dei globuli rossi nella pelle. Il sangue è un fluido contenente i globuli rossi che fungono da riflettori delle onde incidenti permettendo di ottenere quindi un segnale Doppler; si conosce la loro velocità di movimento che è di 0.01-10 mm/s.

La luce laser utilizzata è coerente e monocromatica, cioè viene emessa in un fascio concentrato e ad una singola frequenza f_s . Ciò che garantisce che i fenomeni di dispersione siano limitati e che venga invece favorita la riflessione, è il fatto che i globuli rossi hanno una dimensione che varia tra i 7 e gli 8 μm e che la radiazione solitamente emessa ha lunghezza d'onda di circa 0.7 μm : quindi che i corpuscoli su cui incide il segnale luminoso sono più grandi della lunghezza d'onda [22].

Per quanto detto precedentemente, la componente della velocità considerata è quella perpendicolare alla cute. I globuli rossi che scorrono nelle parti ascendenti e discendenti delle anse del microcircolo contribuiranno maggiormente all'effetto Doppler rispetto a quelli che scorrono parallelamente alla cute. Di seguito verrà chiamata v_g la velocità dei globuli rossi.

Il principio della riflessione prima descritto viene applicato due volte nell'acquisizione del segnale dal microcircolo cutaneo [23]:

1. una sonda emettitrice, ferma ($v_s=0$), trasmette la luce laser attraverso la cute. I globuli rossi che scorrono nel sangue (con v_g positiva se si avvicinano alla cute poiché la sorgente è posizionata proprio sulla cute) ricevono il segnale con una frequenza f_g , che quindi vale:

$$f_g = \left(1 - \frac{v_g}{c}\right) f_s = \left(1 - \frac{v_g}{c}\right) f_s$$

2. una sonda riceptrice, ferma ($v_r=0$), riceve attraverso la cute la luce laser riflessa dai globuli rossi, avente frequenza f_g . I globuli rossi, che ora sono gli emettitori, hanno ancora velocità v_g , in questo caso positiva se si allontanano dalla cute, essendo questa luogo del posizionamento del ricevitore; quest'ultima ha quindi segno opposto rispetto all'equazione precedente. La frequenza del segnale ricevuto quindi vale:

$$f_r = \left(1 + \frac{v_g}{c}\right) f_g = \left(1 + \frac{v_g}{c}\right) \left(1 - \frac{v_g}{c}\right) f_s = \left(1 - \frac{v_g^2}{c^2} + 2 \frac{v_g}{c}\right) f_s$$

che, eliminando il termine di secondo grado, sempre sotto l'ipotesi che $c \gg v_g$, dà:

$$f_r = \left(1 + 2 \frac{v_g}{c}\right) f_s$$

Lo *shift* Doppler calcolato come la differenza tra la frequenza del segnale inviato e quella del segnale ricevuto risulta quindi:

$$f_r - f_s = 2 \frac{v_g}{c} f_s = 2 \frac{v_g}{\lambda_s}$$

che è quindi proporzionale alla velocità dell'agente riflettente e inversamente proporzionale alla lunghezza d'onda del segnale emesso.

Considerando la luce complessivamente ricevuta dalla sonda, si possono notare due componenti: una parte è formata dalla luce che ha colpito oggetti fissi e avrà la stessa frequenza della luce trasmessa, un'altra parte invece sarà caratterizzata da uno *shift* in frequenza perché viene riflessa da i globuli rossi in movimento. La frequenza di questa ultima parte, per quanto visto, sarà proporzionale alla velocità media dei globuli rossi che hanno riflesso il raggio laser. L'ampiezza del segnale è proporzionale al loro numero.

2.2.1 Funzionamento del dispositivo

La sorgente del dispositivo emette luce laser sfruttando fibre ottiche che scorrono attraverso la sonda; quest'ultima viene posta a contatto con la cute. Tutte le strutture sottostanti la cute possono ora riflettere, assorbire o disperdere i fotoni incidenti. Lo strumento è composto anche da un'altra

sonda in grado di raccogliere la luce riflessa o diffusa dalle strutture sottostanti che possono essere ferme o in movimento (Figura 11) [15, 23]. Non si muovono solamente i globuli rossi sotto la cute, ma anche altri tessuti come per esempio la parete vascolare; nonostante quest'ultimi producano anch'essi un *shift* Doppler, tuttavia il segnale da loro prodotto ha ampiezza molto più grande rispetto a quella causata dai globuli rossi, poiché c'è un maggior numero di onde incidenti su di essi. Inoltre la velocità di movimento dei tessuti è inferiore a quella del sangue, e vi sarà quindi associato un contributo a bassa frequenza. Tale contributo può essere eliminato grazie ad un filtro di tipo passa-alto.

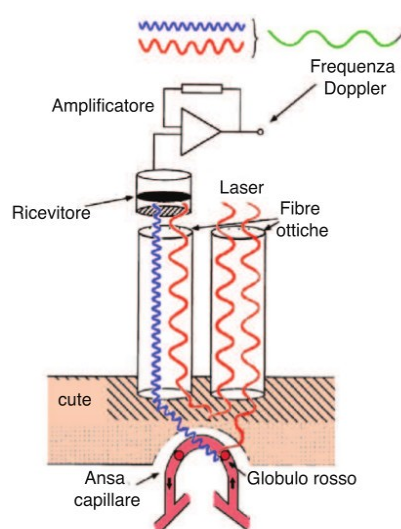


Figura 11: Schema di funzionamento del LDF.

Il segnale misurato dalla sonda è composto da due porzioni di luce riflessa e presenta il fenomeno della “frequenza di battimento”. Tale fenomeno avviene quando si ha a che fare con segnali che hanno frequenze simili ma non identiche. L'onda risultante ha come frequenza la media delle frequenze e l'ampiezza è modulata dallo sfasamento dovuto alla diversità delle frequenze: risulta quindi un segnale con una ampiezza oscillante tanto più velocemente quanto più sono differenti le frequenze.

Si procede poi con l'analisi di questo segnale che presenta le frequenze di battimento, e si scompone nelle sue due componenti *shiftate* e non *shiftate*. Come spiegato si effettua un filtraggio passa alto sulla componente *shiftata* per eliminare il contributo proveniente dal movimento dei tessuti: ogni campione del segnale in uscita dallo strumento è proporzionale ai valori di frequenza ed ampiezza di questo segnale. Poiché si può affermare che questi valori sono legati alla velocità degli

elementi corpuscolati e al loro numero, tali valori permettono di risalire al valore di perfusione cutanea.

Le misurazioni effettuate sono espresse in PU in unità arbitrarie [23]; quindi non si è ancora in grado di stabilire valori assoluti di perfusione e il *flux*, come è chiamato ciò che viene misurato, non rappresenta una misura assoluta della velocità di cellule del sangue.

La misurazione viene effettuata su un determinato volume di tessuto il quale, fissato nella sua componente di area superficiale ma variabile in profondità, è influenzato da diversi fattori [15]: uno riguarda le caratteristiche del tessuto (struttura e densità capillare, pigmentazione, ossigenazione); un secondo fattore riguarda la lunghezza d'onda della sorgente luminosa (se la lunghezza d'onda è breve la capacità di penetrare si esaurisce più in superficie, poiché le onde a frequenza superiore incontrano con maggior probabilità delle particelle riflettenti su cui collidere); infine è utile menzionare la configurazione della sonda (una maggior distanza tra le fibre di trasmissione e ricezione corrisponde a una maggior profondità di tessuto analizzato).

La Flussimetria Laser Doppler sfrutta un sistema ad onda continua e non fornisce informazioni sulla posizione dei globuli rossi riflettenti (se si volesse anche questa informazione bisognerebbe applicare un sistema ad onde pulsate) [22].

2.2.2 Limiti nella Flussimetria Laser Doppler

Uno dei problemi che si riscontrano nella misurazione della perfusione cutanea, è la mancanza di uno zero assoluto: infatti molto spesso, nonostante il flusso di globuli rossi venga ridotto in maniera significativa, lo strumento rileva lo stesso un seppur minimo valore di flusso. La causa di questo "zero biologico" un tempo era attribuita sia al moto browniano nel compartimento vascolare che alla motricità della parete cellulare dei globuli rossi; ora invece viene ricercata nel moto browniano delle macromolecole presenti in sospensione nel compartimento interstiziale [15].

Un altro problema riguarda la mancanza di un *gold standard* per la misura della perfusione di sangue in un tessuto. Inoltre è utile ricordare che non è definita una quantità fisica assoluta a cui associare il valore di perfusione cutanea, per cui le misurazioni provenienti dallo strumento sono di natura arbitraria. Per questo motivo è necessario un processo di calibrazione e standardizzazione degli strumenti e delle misurazioni, in modo tale da poter effettuare eventuali confronti tra risultati: in questo caso esse sono fornite dalla casa madre. Per lo stesso motivo per cui vengono applicate calibrazione e standardizzazione, è necessario che anche la lunghezza d'onda della sorgente luminosa e la configurazione della sonda siano le medesime in ogni misurazione. Inoltre le proprietà del tessuto

devono essere le stesse per poter comparare i risultati provenienti da diversi campioni o dal medesimo soggetto ma valutando condizioni differenti. Questa condizione però non è direttamente verificabile e soprattutto risulta difficilmente realizzabile.

La tecnica descritta è stata confrontata con altre tipologie di misurazione ad oggi disponibili come l'isotopo di Xenon, fluoresceina e microsferi radioattive; sono stati effettuati alcuni studi per comparare tali tecniche con la Flussimetria Laser Doppler ed è stato dimostrato che esiste una forte correlazione tra quest'ultima e le misurazioni effettuate con gli altri dispositivi. Tuttavia, i coefficienti di correlazione possono variare a seconda degli organi e dei siti che vengono interessati dalle misure, e possono largamente risentire di condizioni estreme di flusso e valori di ematocrito [15].

Ultimo ma non meno importante è il problema inerente alla sensibilità della sonda ai movimenti della zona sulla quale è fissata; lo spostamento del soggetto sul quale si sta effettuando la rilevazione attraverso LD provoca evidenti artefatti nel segnale acquisito: al segnale vengono sommati contributi dovuti al movimento che ovviamente non corrispondono a caratteristiche del microcircolo. Questo tipo di artefatto è riconoscibile se il movimento è breve e veloce, ed è caratterizzato da picchi di grande ampiezza rispetto al resto del segnale, che si esauriscono velocemente (Figura 12). Diversamente, se il movimento è lento, l'artefatto è meno evidente, e il contributo legato allo spostamento del soggetto si può confondere con il segnale stesso e quindi può essere erroneamente confuso con l'attività del microcircolo, generando risultati non veritieri.

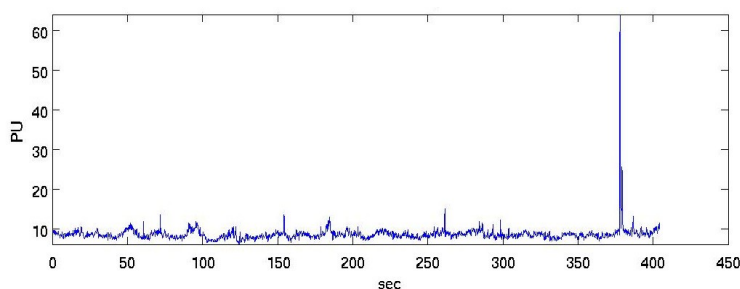


Figura 12: Esempio di artefatto da movimento nel segnale di perfusione cutanea, in corrispondenza del secondo 380.

3 Analisi in frequenza

Lo strumento LD utilizzato fornisce l'ampiezza del segnale di perfusione cutanea, misurato in PU con una frequenza di campionamento di 16 Hz. Il segnale è quindi dato da un insieme di campioni ognuno acquisito in un certo istante di campionamento che corrisponde ad un sedicesimo di secondo. La prima analisi da fare, quella più immediata, riguarda l'andamento nel tempo del segnale, rappresentato in un grafico PU-tempo.

Oltre all'“analisi nel dominio del tempo”, molto spesso si rivela utile una “analisi nel dominio delle frequenze”. Il vantaggio che ne deriva è quello di cambiare la prospettiva con la quale si osserva il medesimo fenomeno. Il grafico che si ottiene in questo caso è lo *spettro* che ha come ascisse l'asse delle frequenze e permette di identificare le frequenze presenti nel segnale. Come detto, per passare dal dominio del tempo a quello delle frequenze è necessaria un'operazione di trasformazione. Nel presente Capitolo verranno enunciate alcune tipologie di trasformazione e verranno messi in evidenza i limiti di ciascuna al fine di giustificare la scelta fatta in questo lavoro di tesi, cioè quella di utilizzare la trasformata Wavelet.

3.1 La trasformata di Fourier

Un generico segnale reale periodico può essere espresso come somma di oscillazioni sinusoidali di ampiezza, frequenza e fase opportune, cioè in una forma che richiama la seguente formula:

$$x(t) = A_0 + A_1 \cos(2\pi f_1 t + \theta_1) + A_2 \cos(2\pi f_2 t + \theta_2) + \dots$$

In particolare, le frequenze di oscillazione includono in generale la “frequenza zero” relativa al termine costante A_0 e sono multiple intere della frequenza fondamentale f_0 cosicché si possa scrivere:

$$x(t) = A_0 + 2 \sum_{k=1}^{\infty} A_k \cos(2\pi k f_0 t + \theta_k)$$

Questa rappresentazione del segnale prende il nome di *Sviluppo in serie di Fourier*; essa permette di rappresentare il segnale reale $x(t)$ come la somma di una costante A_0 e di una serie il cui k -esimo termine, detto k -esima oscillazione armonica, ha ampiezza $A_k > 0$, frequenza $k f_0$ e fase iniziale θ_k .

Evidentemente, ogni segnale reale sarà caratterizzato da particolari insiemi di valori di A_k e θ_k . Devono essere quindi ricavate delle formule utili per il calcolo delle ampiezze e delle fasi

delle varie armoniche. Questo problema fu risolto dal matematico L. Eulero attorno alla fine del 1700 in connessione con lo studio delle corde vibranti, e fu ripreso nel 1822 dal matematico francese Jean Baptiste Joseph Fourier. Questi fu il primo ad intuire l'importanza e la potenza dello *Sviluppo in Serie* sopra citato, che usò nel suo trattato *Théorie analytique de la chaleur* per risolvere questioni di trasmissione del calore.

Richiamando le formule di Eulero delle funzioni trigonometriche, si è in grado di scrivere l'espressione in forma complessa della serie di Fourier come:

$$x(t) = \sum_{k=1}^{\infty} X_k e^{j2\pi k f_0 t}$$

con $X_0 \stackrel{\text{def}}{=} A_0$ $X_k \stackrel{\text{def}}{=} A_k e^{j\theta_k}$, $k=1, 2, \dots$ $X_k = A_{-k} e^{-j\theta_{-k}}$, $k=-1, -2, \dots$

Risulta utile definire inoltre un'espressione per il calcolo del coefficiente X_k ; dopo alcuni passaggi si ottiene il seguente risultato:

$$X_k = \frac{1}{T_0} \int_{-T_0/2}^{T_0/2} x(t) e^{-j2\pi k f_0 t} dt$$

Questo tipo di notazione suggerisce che la conoscenza dell'andamento del segnale $x(t)$ in ambito temporale è di fatto equivalente alla conoscenza della successione dei coefficienti di Fourier X_k in ambito frequenziale.

Queste osservazioni sono fatte su segnali periodici a tempo continuo. Tuttavia molti segnali che si osservano nei fenomeni naturali non sono periodici. Sorge allora immediata la questione della possibilità di ottenere una scomposizione simile alla serie di Fourier anche per i segnali aperiodici. È possibile cioè rappresentare anche un segnale non periodico come una opportuna sovrapposizione di segnali elementari, in particolare sinusoidali? Questo è possibile, e il segnale aperiodico è rappresentabile attraverso l'integrale di Fourier:

$$x(t) = \int_{-\infty}^{+\infty} X(f) e^{j2\pi f t} df$$

Resta da determinare l'espressione della funzione $X(f)$ che compare nell'integrando; questa rappresenta la *trasformata di Fourier* del segnale $x(t)$ e si calcola come:

$$X(f) = \int_{-\infty}^{+\infty} x(t) e^{-j2\pi f t} dt$$

Se la FT fornisce per una determinata frequenza \bar{f} un valore consistente, si dice che il segnale $x(t)$ ha una componente spettrale dominante alla frequenza \bar{f} . Viceversa, se il risultato dell'integrazione è relativamente piccolo, significa che l'onda a frequenza \bar{f} contenuta nel segnale $x(t)$ ha ampiezza ridotta. Se il risultato è pari a zero, invece, il segnale $x(t)$ non contiene

quel tipo di onda. La formulazione vista di $x(t)$ è evidentemente un'equazione di *sintesi* che permette di rappresentare il segnale come sovrapposizione di segnali elementari; la formulazione di $X(f)$ è un'equazione di *analisi* che permette di determinare il peso che le varie componenti frequenziali hanno nella composizione di $x(t)$ [24].

Come si può notare dalla Figura 13 il segnale in alto è composto dalla somma tra le onde rappresentate al di sotto, che hanno frequenze differenti. La trasformata di Fourier è in grado di dire quali sono le frequenze presenti nel segnale e con quale intensità (Figura 14): rappresentando le coppie frequenza-coefficiente come punti di un grafico che ha come ascisse le frequenze e come ordinate i relativi coefficienti, vengono riassunti i risultati appena descritti. Tali grafici sono detti *spettri* e presentano dei picchi in corrispondenza delle frequenze delle onde che compongono il segnale analizzato, di ampiezza proporzionale all'ampiezza delle onde a cui si riferiscono.

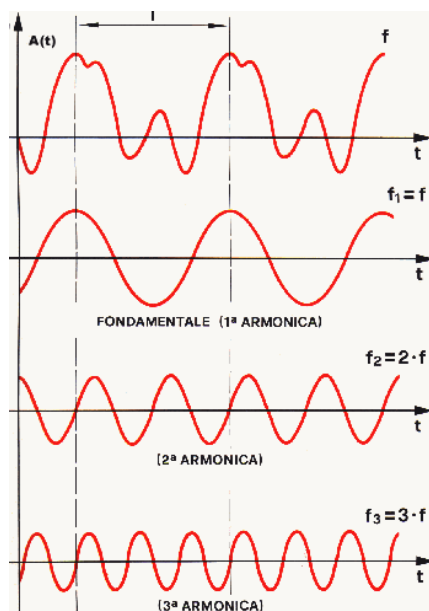


Figura 13: Il segnale in alto risulta dalla somma dei segnali sottostanti.

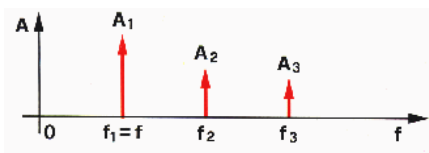


Figura 14: Frequenze presenti nel segnale, spettro ottenuto con FT.

Per quanto riguarda la rappresentazione dello spettro, è doveroso dire che non sempre viene utilizzata una scala lineare, ma molto spesso si sfrutta la scala logaritmica, in grado di apprezzare

meglio la distribuzione delle frequenze che si trovano ad essere anche molto differenti tra loro.

L'unità di misura della trasformata di Fourier $X(f)$ nel caso del segnale di perfusione cutanea in esame risulta essere PU s , essendo $x(t)$ misurato in PU , l'esponentiale adimensionale, e data la presenza dell'integrazione in dt che è misurato in secondi.

3.1.1 Non idealità dovuta all'acquisizione

Le acquisizioni del segnale sono di durata limitata; questo fatto comporta una variazione nella quantità e nella qualità delle informazioni fornite dall'analisi in frequenza. Le caratteristiche dello spettro in frequenza del segnale calcolato dipendono infatti dalla frequenza f_c con la quale viene campionato il segnale e dalla lunghezza dell'acquisizione, quindi dal numero N di campioni disponibili. In particolare valgono le seguenti proprietà:

- l'asse delle frequenze sul quale sono localizzate le componenti spettrali è limitato tra $-f_c/2$ e $+f_c/2$. Questa affermazione è concorde con il *criterio di Nyquist* ed $f=f_c/2$ è la più alta frequenza indagabile;
- l'asse delle frequenze può essere limitato alla sola parte positiva senza perdere informazioni, data la natura reale dei segnali biologici che risultano simmetrici nello spettro rispetto all'asse y ;
- il valore indicativo della risoluzione in frequenza è $\Delta f=f_c/N$ che equivale alla più bassa frequenza riconoscibile nel segnale; essa rappresenta la distanza tra due campioni dello spettro, e deriva dal fatto che il numero di campioni del segnale originale è uguale al numero dei campioni della trasformata;

Bisogna tener presente che nella realtà i picchi non hanno un andamento impulsivo, ma triangolare con un supporto di tre campioni. Diminuendo N , il supporto del picco si allarga e il picco si abbassa, data una determinata f_c . Per questo motivo, nel confrontare spettri di segnali differenti campionati con la stessa frequenza ma avendo a disposizione un diverso numero di campioni, è utile osservare l'area sottesa dai picchi e non la loro altezza.

3.1.2 Limiti della trasformata

La trasformata di Fourier non risulta adatta nell'analisi di segnali che presentano variazioni delle componenti in frequenza nel tempo (come ad esempio quello in Figura 15, che presenta frequenze variabili di 0.01, 0.1 e 1 Hz) che conferiscono un andamento poco informativo e rumoroso. La FT infatti calcola lo spettro basandosi sul segnale intero poiché l'*integrale di Fourier* ha estremi $\pm \infty$ e un'onda ad una determinata frequenza contribuisce allo spettro indipendentemente da dove sia localizzata nel dominio del tempo.

Nel caso in cui il segnale sia stazionario, cioè con onde a frequenze costanti in tutta l'acquisizione, lo spettro calcolato dall'analisi FT risulta corretta. I segnali biologici, nella realtà, non verificano mai questa condizione di stazionarietà, poiché sono generati molto spesso da attività dinamiche. Il segnale di perfusione cutanea, come già detto, è influenzato da diverse attività fisiologiche dinamiche e non è quindi da considerare un segnale di tipo stazionario.

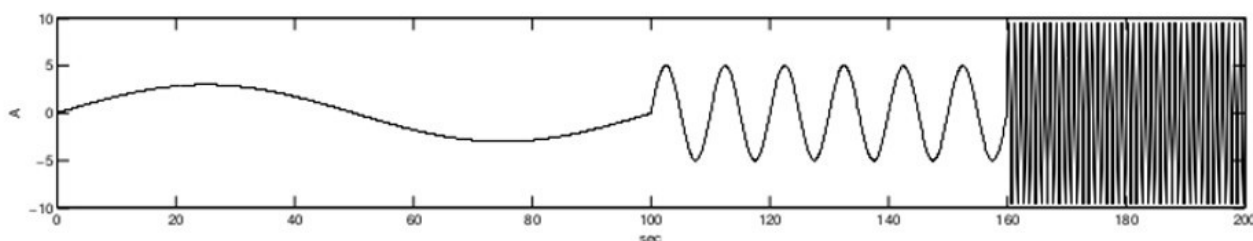


Figura 15 : Esempio di segnale non stazionario in cui sono riconoscibili tre componenti in frequenza localizzate in punti differenti nel dominio del tempo.

Nonostante la FT sia in grado di definire quali siano gli intervalli di frequenza dominanti, anche in un segnale non stazionario, si nota del rumore sovrapposto allo spettro che è riconducibile proprio alla non stazionarietà. Le basse frequenze sono indicate con meno precisione, come si nota dalla rappresentazione dello spettro in scala logaritmica (Figura 16). Questo tipo di trasformata inoltre non si interessa della localizzazione temporale delle frequenze, cosa che risulta utile nell'analisi del segnale di perfusione cutanea.

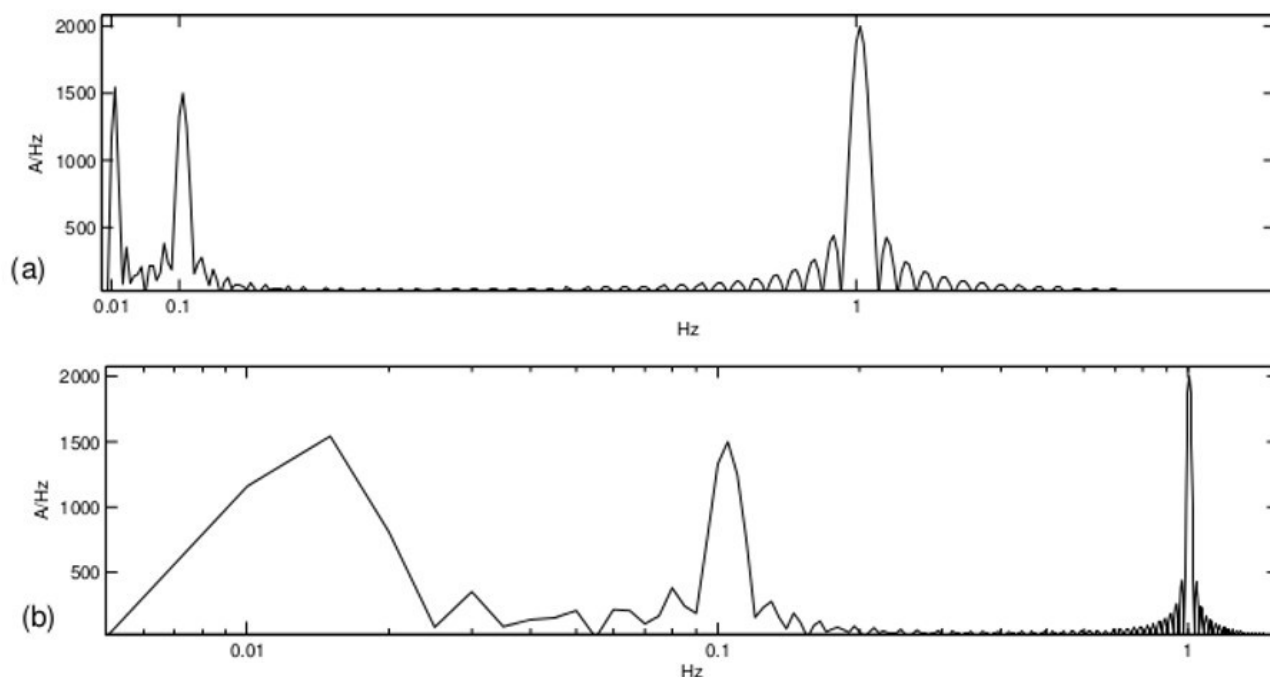


Figura 16 : Spettro da FT del segnale variabile ad intervalli di Figura 15 rappresentato in scala lineare (a), e logaritmica (b).

3.2 La trasformata di Fourier Short Time

I problemi visti precedentemente riguardanti la poca precisione della FT nell'analisi di un segnale non stazionario e l'incapacità di localizzare le variazioni delle componenti in frequenza nel tempo, si ricorre alla trasformata di *Fourier Short Time* (STFT). La STFT divide il segnale da analizzare in segmenti sufficientemente brevi che possono essere considerati stazionari e applica la trasformata FT ad ognuno di questi; in questo modo si è in grado di ottenere informazioni “bi-dimensionali”, sia nel dominio della frequenza che nel dominio del tempo e le variazioni di frequenza sono localizzate nel tempo. Lo spettro sfrutta la seguente formulazione matematica:

$$\text{STFT}(\tau, f) = \int_{-\infty}^{+\infty} x(t) w(t-\tau) e^{-j2\pi ft} dt$$

molto simile alla formulazione vista per la *trasformata di Fourier*, ma in questo caso il segnale $x(t)$ è moltiplicato per la finestra $w(t-\tau)$ di forma e durata arbitraria, che scorre lungo tutto il segnale di passo τ . Il risultato di questo prodotto permette di “selezionare” solamente la porzione di segnale che si sovrappone alla finestra mobile, quindi semplicemente un intervallo centrato in τ ed esteso quanto la finestra w [25].

La matrice $STFT(\tau, f)$ che si ottiene dalla trasformata *Fourier Short Time* può essere rappresentata in un piano tempo-frequenza, con l'asse orizzontale corrispondente al dominio temporale e l'asse verticale corrispondente al dominio delle frequenze; ogni colonna della matrice conterrà lo spettro in frequenza di una determinata posizione della finestra, mentre ogni riga rappresenterà il contributo di una determinata frequenza al variare della posizione della finestra nel tempo.

Nella Figura 17 è riportato lo stesso segnale visto precedentemente (con frequenza variabile nel tempo, 0.01, 0.1, 1 Hz), con allineata la STFT ottenuta con una finestra di 100 campioni. Si nota in maniera chiara la localizzazione temporale delle variazioni delle componenti in frequenza. Tuttavia la localizzazione in frequenza, visibile in Figura 18 raffigurante un'altra prospettiva della STFT, fa notare differenti precisioni nei diversi segmenti del segnale. La finestra scelta per effettuare questa analisi, di ampiezza 100 campioni, è adatta per localizzare il picco alla frequenza di 1 Hz (si nota il colore rosso in corrispondenza di tale valore di frequenza) ma risulta poco adatta per localizzare le frequenze più basse (picchi non ben definiti e non chiara localizzazione delle frequenze 0.01, 0.1 Hz).

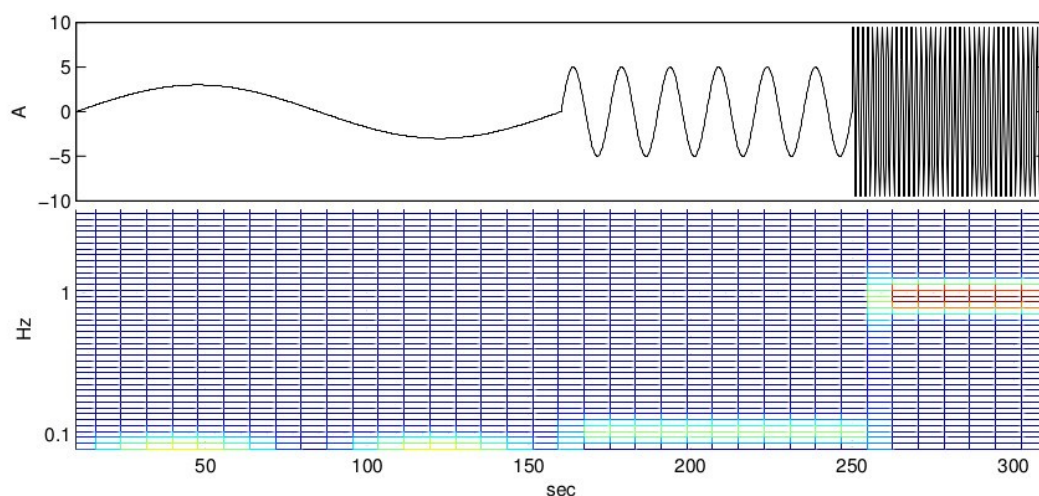


Figura 17: Segnale variabile a intervalli (in alto), allineato alla sua STFT ottenuta con una finestra di 100 campioni (in basso).

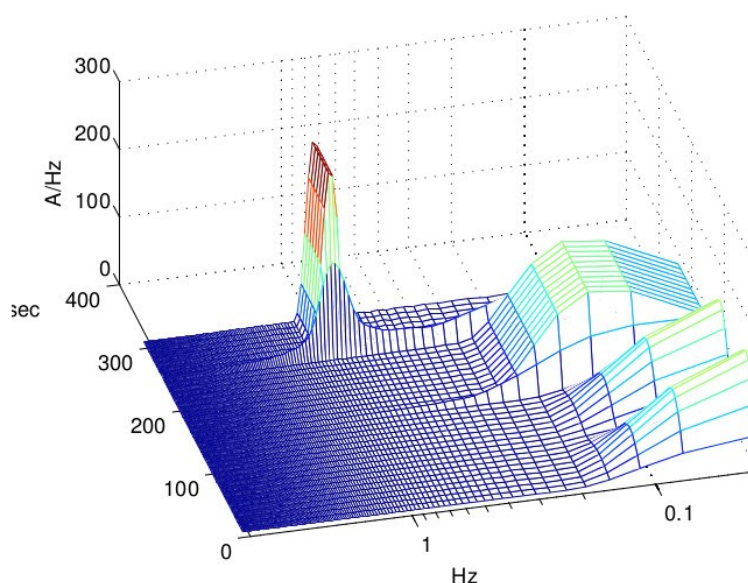


Figura 18: Visione 3D della STFT del segnale variabile a intervalli di Figura 17, con asse delle frequenze in scala logaritmica.

Nonostante ciò, mediando le varie FT ottenute, contenute nelle colonne della matrice in esame, si ottiene una stima dello spettro del segnale avente un livello di risoluzione in frequenza direttamente proporzionale alla lunghezza della finestra scelta.

3.2.1 Limiti della trasformata

In questo tipo di trasformazione, la lunghezza della finestra mobile w è prefissata. La lunghezza della finestra è determinante per una migliore risoluzione in frequenza (poiché, come visto nel paragrafo 3.1.1, è pari a $\Delta f = f_c/N$ con f_c frequenza di campionamento e N numero di campioni), deve essere sufficientemente breve per far valere l'ipotesi di stazionarietà del segnale per poter applicare la FT.

Nel segnale di perfusione cutanea in esame non è possibile trovare una lunghezza della finestra che permetta una buona risoluzione in frequenza e che consenta di mantenere l'ipotesi di stazionarietà di una porzione di segnale, poiché le frequenze valutate variano di diversi ordini di grandezza e il segnale risulta molto variabile. A fronte di questa limitazione, è utile trovare un algoritmo in grado di variare la lunghezza della finestra in modo tale da adattarla ad estrapolare informazioni precise relativamente ad uno specifico intervallo di frequenze. Tale metodologia è da ricercarsi nell'*analisi Wavelet* che verrà descritta nel paragrafo seguente.

3.3 La trasformata Wavelet

I limiti presentati per le trasformate FT e STFT, nel caso del segnale di perfusione cutanea analizzato in questo lavoro di tesi, sono risolti attraverso un altro tipo di analisi, proposta nel 1981 da Jean Morlet: *l'analisi Wavelet*. Come già accennato, questa prevede di migliorare la risoluzione tempo-frequenza, sfruttando un tipo di finestrazione variabile, ottimale per ogni punto del piano tempo-frequenza.

3.3.1 La risoluzione tempo-frequenza

Per capire più a fondo i vantaggi di questo tipo di analisi rispetto alla STFT, in Figura 19 sono riportate le griglie di risoluzione tempo-frequenza per entrambe. L'area sottesa dai rettangoli delimitati da tale griglie, secondo il principio di Heisenberg, non può scendere sotto un certo valore, che per una definita metodologia di analisi rimane costante:

- a) gli Heisenberg box hanno la stessa base e di conseguenza la stessa altezza dato che nell'analisi STFT la durata della finestra è fissata e costante. Il rettangolo che considera una bassa frequenza (blu), è congruente a quello che identifica una alta frequenza (rosso): è evidente che se le frequenze sono molto differenti tra di loro, questo fatto non porta ad una buona risoluzione per entrambe le frequenze considerate;
- b) per quanto riguarda l'analisi Wavelet si può notare come la finestra rimanga di ampiezza costante durante la traslazione lungo l'asse temporale: i rettangoli hanno infatti la stessa base, per ogni riga dell'asse delle frequenze. Tuttavia l'ampiezza della finestra, quindi la base del rettangolo, varia al variare della frequenza in esame: le basse frequenze hanno finestre temporali più ampie quindi corrispondono a rettangoli con base maggiore, mentre frequenze più elevate hanno finestre più strette corrispondenti a rettangoli con base minore. Per mantenere la validità del principio di Heisenberg, cioè mantenere costante l'area sottesa di rettangoli, le altezze devono variare in modo inversamente proporzionale alle basi. In tale maniera si migliora la risoluzione per ogni tipo di evento che si vuole studiare:
 - le basse frequenze sono misurate in modo molto preciso, poiché sono isolate dal rettangolo rosso che ha un'altezza molto stretta, a discapito della scarsa localizzazione temporale dovuta all'elevata ampiezza della base del rettangolo; tuttavia, essendo il fenomeno a bassa frequenza e quindi lento, la precisione nel dire in che momento avvenga è sacrificabile;

- le alte frequenze sono invece misurate in modo più preciso nel dominio del tempo quindi hanno una accurata localizzazione temporale, dovuta al fatto che il rettangolo che le isola ha una base molto stretta; ciò a discapito di una buona risoluzione in frequenza, essendo il rettangolo di altezza molto elevata; tuttavia l'incertezza che si ha nel dominio della frequenza è sacrificabile, avendo però a disposizione una corretta informazione sul momento in cui avviene il fenomeno.

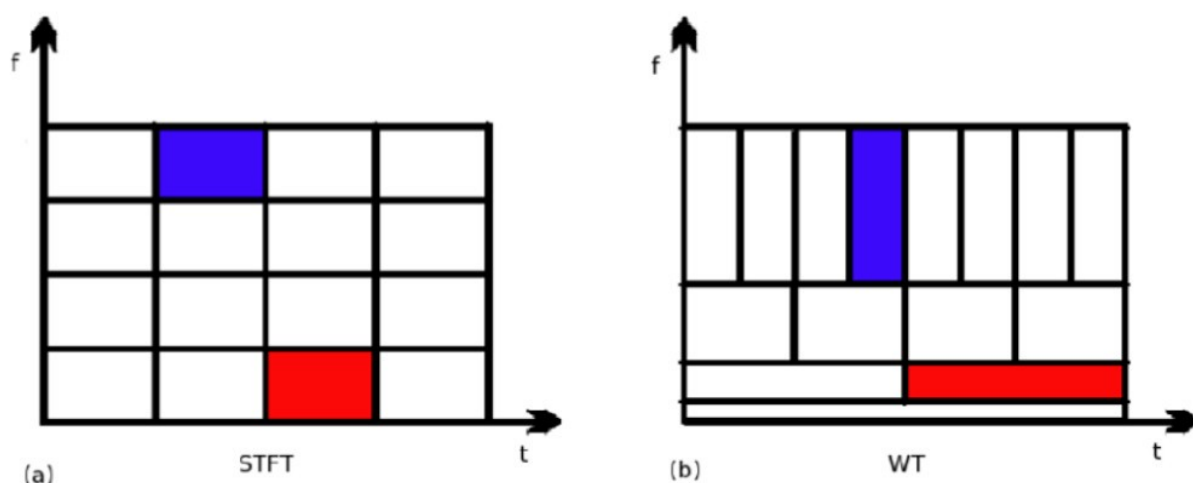


Figura 19: Griglie di risoluzione per la STFT (a) e per la WT (b). Gli Heisenberg box per il principio di indeterminazione mantengono la stessa area, ma nella WT vengono modificate le proporzioni dei lati per migliorare la risoluzione tempo frequenza.

3.3.2 L'equazione

L'algoritmo di analisi Wavelet prevede l'utilizzo di una mother Wavelet, sulla quale vengono applicate operazioni di traslazione e cambiamento di scala, al fine di formare una famiglia di finestre, definita come:

$$\psi_{s,\tau} = \frac{1}{\sqrt{s}} \psi\left(\frac{t-\tau}{s}\right)$$

dove s è il fattore di scala e τ la traslazione nel tempo. Il segnale acquisito viene moltiplicato per tutte queste versioni modificate della mother Wavelet e successivamente viene calcolato l'integrale di questo prodotto. I coefficienti della trasformata Wavelet (WT) si calcolano quindi nel modo seguente:

$$\text{WT}(s, \tau) = \int_{-\infty}^{+\infty} \overline{\psi_{s,\tau}}(t) x(t) dt$$

Tale formulazione effettua la mappatura del segnale $x(t)$ nel piano tempo-scala, per cui il valore di ogni punto nella matrice WT è dato dal risultato dell'integrale appena visto, sfruttando la $\overline{\Psi_{s,\tau}}$ corrispondente. Si otterrà un valore relativamente grande dal prodotto di onde aventi frequenza simile a quella della Wavelet e il valore del prodotto sarà direttamente proporzionale al livello di somiglianza e all'ampiezza dell'onda nel segnale [26].

3.3.3 La mother Wavelet

Per quanto riguarda la scelta della mother Wavelet più adatta all'analisi, si può affermare che ne sono state proposte diverse forme (Figura 20), ognuna delle quali è utile ad un determinato scopo di analisi.

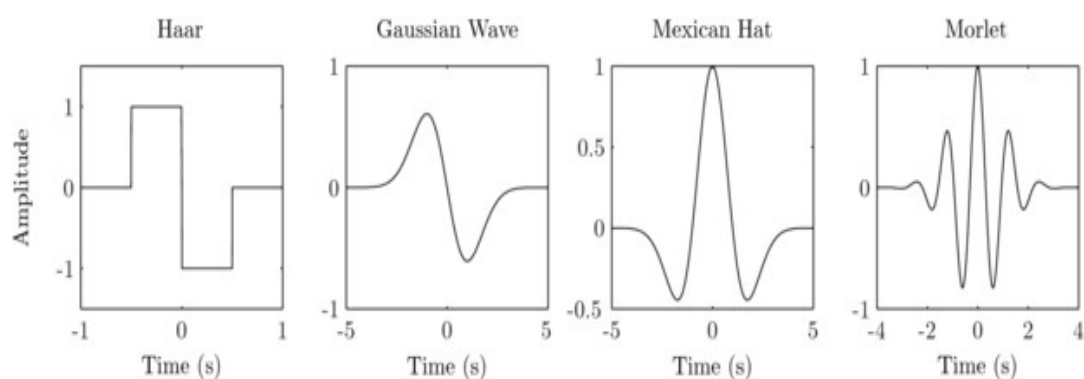


Figura 20: Quattro esempi di possibili forme della mother Wavelet. In ordine: Haar, Gaussian, Mexican hat, Morlet.

La caratteristica fondamentale è quella di avere un andamento oscillante e una lunghezza limitata, il che vuol dire che partendo da zero, l'ampiezza dell'oscillazione raggiunge il valore di picco più alto per poi diminuire fino a tornare a zero. Secondo la letteratura è consigliato avere una mother Wavelet somigliante alla forma d'onda che si deve analizzare. Nel caso in esame, per il segnale di perfusione cutanea, si è scelto di utilizzare la Wavelet di Morlet (Figura 21) [7, 27, 13, 11].

La Morlet Wavelet è una funzione Gaussiana, modulata attraverso un'onda sinusoidale. Nel dominio del tempo, essa viene espressa come:

$$\psi(t) = \frac{B_{f_0}}{\sqrt{2\pi}} (e^{i2\pi f_0 t} - e^{-(2\pi f_0)^2/2}) e^{-t^2/2}$$

dove f_0 è un parametro che determina la risoluzione e rappresenta il giusto compromesso tra la

corretta localizzazione nel tempo e nella frequenza; la scelta di tale parametro è solitamente basata sull'ispezione visiva della WT, o spesso viene posta a priori a $f_0=1$. Per quanto riguarda il valore di B_{f_0} , si afferma che essa è una costante di normalizzazione che solitamente viene posta uguale a 1. Il secondo termine della $\psi(t)$ è solitamente molto piccolo per valori di $f_0>0.5$ e per questo motivo viene molto spesso trascurato; da quanto detto, l'espressione della Wavelet viene semplificata e diventa:

$$\psi(t) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} e^{i2\pi f_0 t} e^{-t^2/2}$$

Tale tipologia di finestatura viene sfruttata per la sua capacità di massimizzare la risoluzione tempo-frequenza [28].

Dunque la trasformata Wavelet con un determinato fattore di scala s può essere interpretata come un filtro passa banda, in grado di stimare il contributo in frequenza presente in tale banda [7].

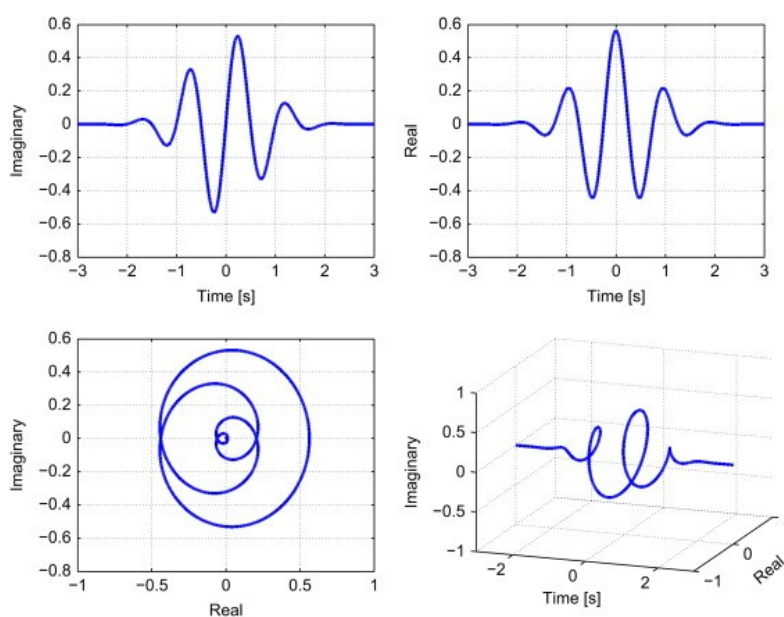


Figura 21: Rappresentazione Morlet complex Wavelet.

3.3.4 La scala

Per questa tipologia di analisi è molto importante la scelta accurata del fattore s , per il quale la famiglia di Wavelet assumono un valore di frequenza pari a quello che devono localizzare nel segnale. Per ogni frequenza analizzata, vengono quindi create differenti Wavelet scalate e traslate in modo adatto a identificare tale frequenza. In Figura 22 si possono notare diverse tipologie di Wave-

let associate a diverse frequenze: Wavelet a frequenza più elevata portano risultati con alta risoluzione temporale a discapito di quella in frequenza, e viceversa.

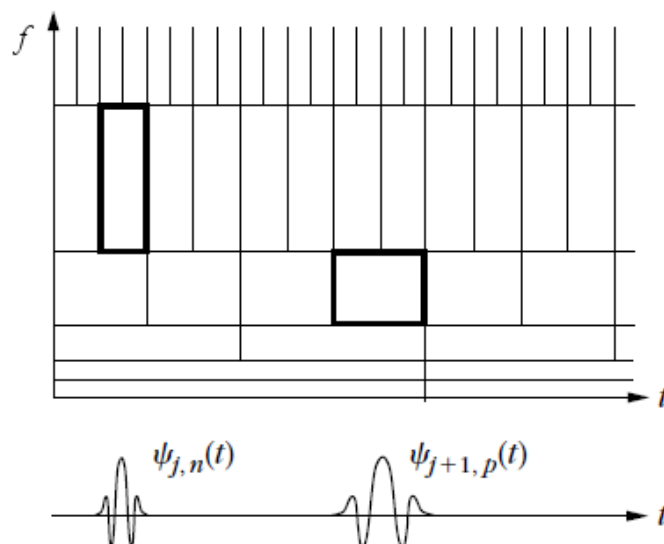


Figura 22: Griglia di risoluzione con gli Heisenberg box della WT: versioni scalate e traslate della mother Wavelet sono associate ai rettangoli corrispondenti.

Risulta utile nella descrizione di questa tipologia di analisi, affermare che la scala e la traslazione non si evolvono in continuo, ma sono discretizzate, essendo i dati a disposizione campionati ed essendo che le elaborazioni vengono svolte da un calcolatore. Per quanto riguarda la discretizzazione del dominio del tempo e quindi di τ , essa segue la discretizzazione svolta nel campionare il segnale, mentre per quanto concerne la discretizzazione della scala, questa non è così immediata. Poiché le frequenze dei segnali analizzati sono molto variabili tra loro e ricoprono un intervallo molto ampio, non è corretto utilizzare un incremento uniforme della scala. Si usa spesso una scala che segua una legge di tipo esponenziale, in grado di coprire adeguatamente tutte le frequenze analizzate. Per capire meglio il problema che si verrebbe a riscontrare utilizzando una scala lineare, si immagini un incremento di 0.05 Hz: questo garantisce una buona risoluzione in frequenza se effettuato attorno a 1 Hz, ma non permette di risolvere adeguatamente le frequenze attorno a 0.01 Hz. Allo stesso qual modo, un incremento di 0.0005 Hz risolverebbe adeguatamente le frequenze attorno a 0.01 Hz ma effettuato attorno a 1 Hz comporterebbe un dispendio eccessivo di risorse poiché sarebbero necessarie 2000 iterazioni per raggiungere da tale frequenza quella di 2 Hz procedendo con questo passo.

Dopo aver delineato le caratteristiche della discretizzazione della scala scelta, si vuole enunciare quale sia il legame tra questa e la frequenza: esso è di proporzionalità inversa, infatti con valori di scala elevati si evidenziano eventi lenti e quindi con bassa frequenza, mentre con valori bassi di scala si isolano eventi di breve durata e quindi con alta frequenza. L'equazione che lega la scala s alla frequenza corrispondente f_s è:

$$f_s = \frac{f_w}{f_c} \cdot \frac{1}{s}$$

dove f_w è la frequenza centrale della Wavelet, ovvero la frequenza corrispondente alla sua più ampia oscillazione, e f_c è la frequenza di campionamento del segnale. Il valore f_w può essere ricavato sfruttando la trasformata di Fourier della Wavelet, considerando il fatto che tale frequenza è corrispondente al punto di picco nel dominio del tempo.

3.3.5 Lo scalogramma

Lo scalogramma è un grafico tridimensionale che permette di visualizzare i coefficienti Wavelet determinati sulla base di diversi segnali. Esso si calcola come il valore assoluto dei numeri complessi trovati attraverso la trasformata Wavelet. In questo modo i valori dei coefficienti sono reali e positivi, cosa che non accadrebbe se si considerassero semplicemente i coefficienti calcolati dalla WT, a causa dell'andamento oscillatorio della mother Wavelet.

Per comprendere al meglio come l'analisi Wavelet sia ben applicabile a segnali non stazionari in cui le componenti in frequenza variano nel dominio del tempo, e per osservare come questo tipo di trasformata sia in grado di localizzare nel tempo i diversi contributi in frequenza, si è scelto di analizzare il segnale di Figura 15 per gli altri tipi di trasformata e di produrre il corrispondente scalogramma (Figura 23 e Figura 24). Si nota come le Wavelet si adattino alla frequenza che stanno analizzando, isolandone al meglio i diversi contributi.

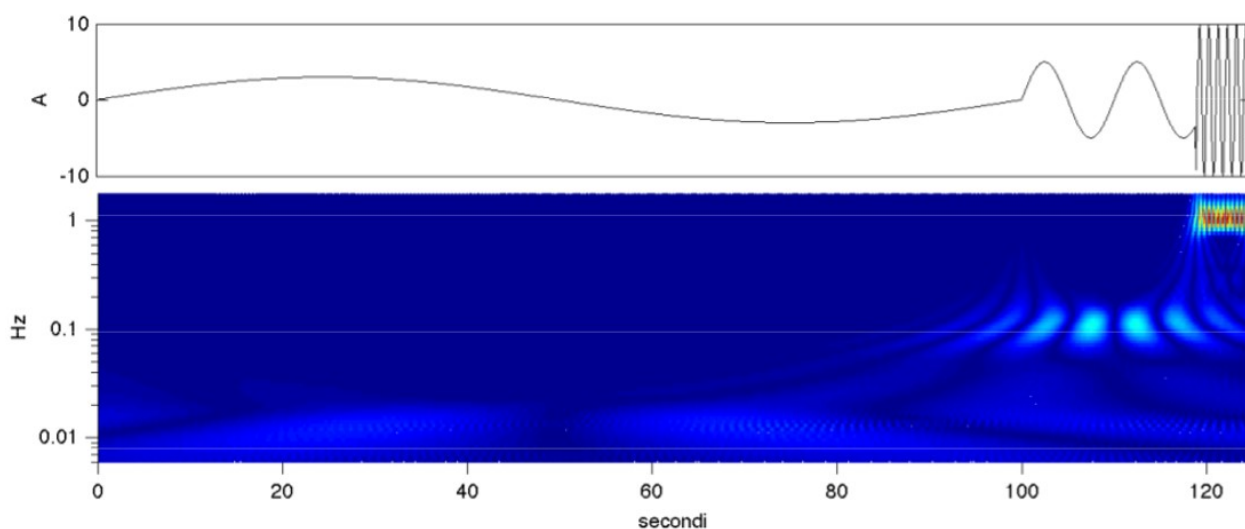


Figura 23: Segnale non stazionario e relativo scalogramma 2D.

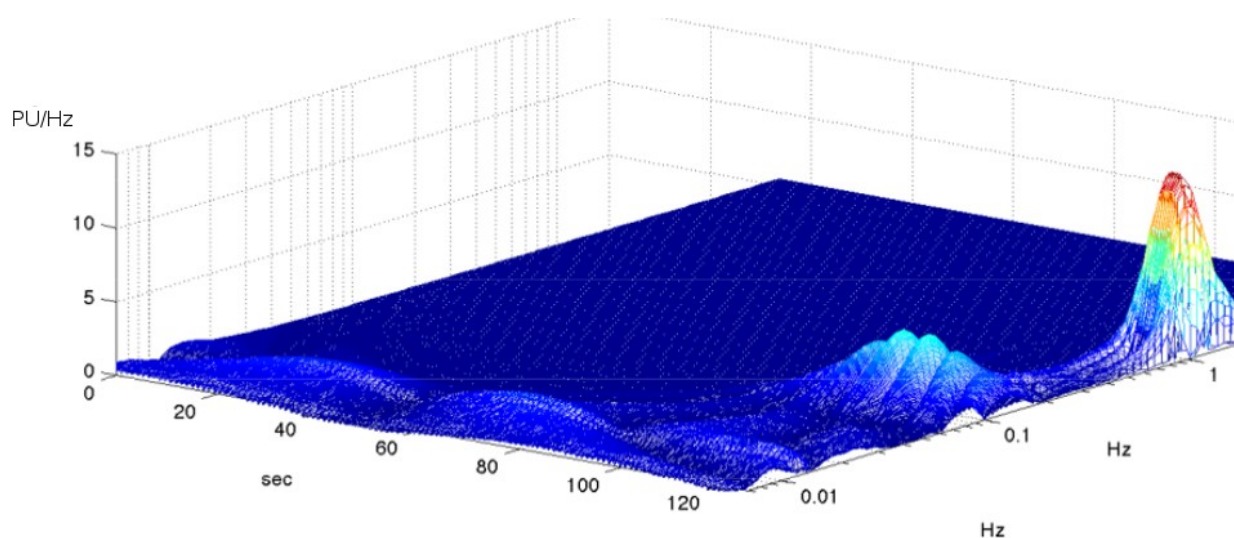


Figura 24: Scalogramma di Figura 23 in prospettiva.

Per quanto riguarda le unità di misura, lo scalogramma si sviluppa lungo un piano avente l'asse corrispondente al dominio del tempo espresso in secondi [s], mentre l'asse corrispondente al dominio delle frequenze è espresso in hertz [Hz]. I coefficienti dello scalogramma sono pertanto in PU s dal momento che il segnale è misurato in PU e nel calcolo dei coefficienti Wavelet vi è un'integrazione lungo l'asse del tempo. Tuttavia, poiché il segnale originale di perfusione cutanea è espresso in una unità di misura arbitrarie, spesso si usa descrivere le grandezze calcolate a partire da questo segnale come Arbitrary Unit [AU].

Il grafico prodotto dall'analisi Wavelet è di facile interpretazione e, come detto, deriva dalla

traslazione nel tempo e dall'allargamento dovuto al variare di s della finestra $\overline{\Psi_{s,\tau}}$. Per la precisione, sezioni dello scalogramma parallele all'asse del tempo, derivano da finestre che hanno lo stesso fattore di scala ma che vengono spostate nel tempo (variazione di τ): viene indicato quindi come varia il contributo dovuto ad una determinata frequenza lungo il segnale. Nel profilo di ognuna di queste sezioni si può riconoscere l'andamento della Wavelet che l'ha generata. Per quanto riguarda le sezioni dello scalogramma parallele all'asse della frequenza invece, si può dire che queste sono ottenute sulla base di una $\overline{\Psi_{s,\tau}}$ avente un τ prefissato, ma che viene scalata tramite variazione di s : viene letto lo spettro di tutte le frequenze, relativo però alla parte di segnale centrata in τ e con l'aumento di s , la finestra si allarga, adattandosi quindi al valore di frequenza del quale sta misurando il contenuto.

Per ridurre tutte le informazioni contenute all'interno dello scalogramma in un unico spettro bidimensionale e per poter quindi più facilmente confrontare informazioni provenienti da segnali differenti, è utile mediare la matrice dei coefficienti appena calcolata lungo l'asse del tempo: si ottiene un grafico avente per ogni valore di frequenza il valore medio dei coefficienti lungo l'intera durata del segnale, che rappresenta lo *spettro dell'ampiezza* della trasformata Wavelet. La WT viene spesso rappresentata in scala logaritmica.

Allo stesso modo, elevando al quadrato i coefficienti contenuti nello scalogramma e mediando ancora una volta lungo l'asse del tempo, si ottiene lo *spettro della potenza*, anche questo utile nel confronto tra segnali differenti. Sia lo *spettro di ampiezza* che lo *spettro di potenza* si esprimono seguendo le unità di misura definite precedentemente, perciò il primo si valuta in PU s e il secondo il $\text{PU}^2 \text{s}^2$. Anche in questo caso, data l'arbitrarietà dell'unità di misura della perfusione cutanea, spesso si usa definire sia lo spettro di ampiezza che di potenza in AU.

3.3.6 Limitazioni e cono di influenza

Si è affermato precedentemente che la relazione tra scala e frequenza è inversamente proporzionale: ciò implica che le frequenze più basse hanno bisogno di valori di scala più alti per essere adeguatamente risolte, quindi di una famiglia di Wavelet più lunghe. Dove le estremità della Wavelet sporgono rispetto agli estremi del segnale acquisito, l'affidabilità del coefficiente calcolato è molto ridotta, cosicché si sceglie di tagliare la trasformata Wavelet in modo da eliminare questi valori di bordo. Per questa ragione la più bassa frequenza indagata in modo affidabile dipende dalla lunghezza del segnale originale: convenzionalmente la larghezza massima della Wavelet utilizzabile

è pari a $1/6$ della lunghezza dell'intero segnale acquisito [29]. Questa restrizione sulla larghezza della Wavelet comporta un taglio dei coefficienti che si trovano alle estremità dello scalogramma, come si può notare anche dalla presenza della linea nera che delimita appunto il cosiddetto “cono di influenza”: i valori al di fuori di questa linea non vengono infatti sfruttati per il calcolo dello spettro medio perché potrebbero risultare poco affidabili a causa delle motivazioni appena enunciate (Figura 25).

Come verrà confermato anche nel Paragrafo 4.2, è facile comprendere che le componenti a frequenza più bassa possono essere evidenziate in modo affidabile solo in segnali sufficientemente lunghi. Tuttavia le acquisizioni contenute nella presente tesi non sono sempre lunghe a sufficienza, per cui le attività endoteliali (associate alle componenti a più bassa frequenza) non sempre vengono rilevate. Come si vede chiaramente in Tabella 2, le attività endoteliali richiedono segnali di durata minima 20 e 10 minuti rispettivamente.

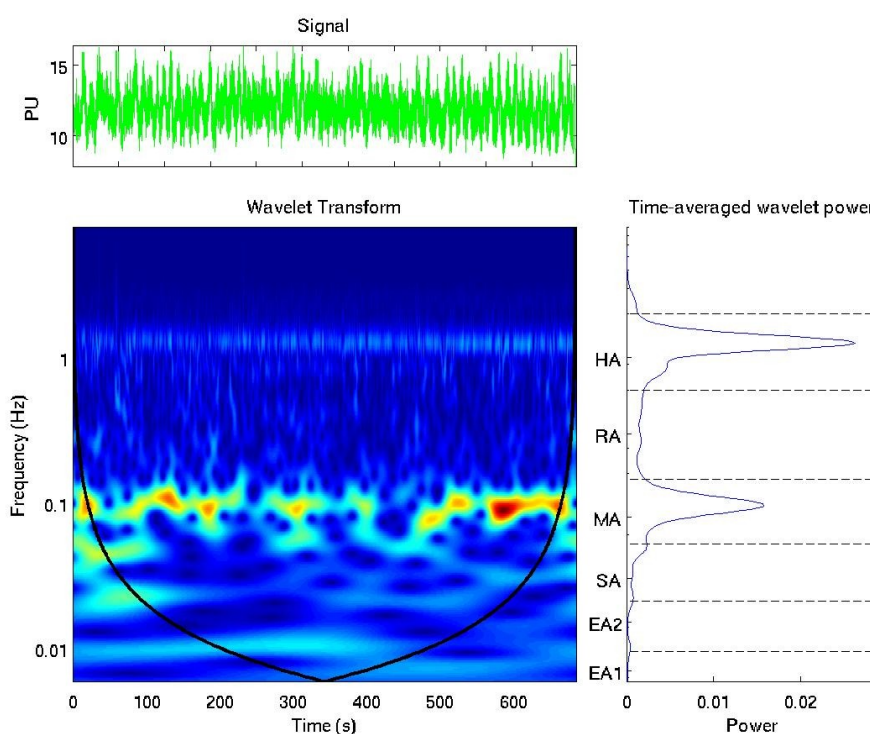


Figura 25: In alto il segnale su cui si applica la WT, in basso a sinistra lo scalogramma, in basso a destra lo spettro di potenza WT mediata nel tempo. La linea nera presente nello scalogramma delimita il cono di influenza.

REGOLA DEL SEI <i>Durata minima = 6 / Frequenza</i>

Attività	Frequenze [Hz]	Durata minima [s]	Durata minima [min]
<i>endoteliale I</i>	0.005-0.0095	1200	20.0
<i>endoteliale II</i>	0.0095-0.02	631	10.5
<i>neurogena</i>	0.02-0.06	300	5.0
<i>miogena</i>	0.06-0.2	100	1.7
<i>respiratoria</i>	0.2-0.6	30	0.5
<i>cardiaca</i>	0.6-1.8	10	0.2

Tabella 2: Intervalli di frequenza e minima durata del segnale acquisito per una rilevazione affidabile.

La presenza del “cono di influenza” ha effetti sul calcolo dello spettro medio che si ottiene mediando i valori dello scalogramma all'interno della sola linea nera: per questa ragione saranno utilizzati un numero elevato di valori per le alte frequenze, mentre si sfrutteranno pochi valori per le basse frequenze, per lo più riferiti alla parte centrale del segnale nel tempo. A tale proposito è utile osservare la forma del cono di influenza: esso infatti si “schiaccia” tanto più verso i bordi quanto maggiore è la lunghezza del segnale acquisito. Pertanto, quanto più lungo è il segnale, tanto minore risultano gli effetti di bordo nel calcolo dello spettro che viene mediato su un numero maggiore di valori dello scalogramma.

Il codice utilizzato presenta dei parametri di default che effettuano la restrizione sulla larghezza della Wavelet: per la precisione, il cono di influenza “taglia” tre periodi della Wavelet in ingresso a destra e tre a sinistra, per rispettare quanto appena osservato (vedi anche Paragrafo 4.2). Nel lavoro in esame tuttavia è stato scelto in taluni casi di modificare il valore della lunghezza massima della Wavelet utilizzabile e quindi di abbandonare detta restrizione per trascurare gli effetti di bordo, come si vedrà nei Paragrafi 4.3.4 e 4.4.3 .

4 Lavoro sperimentale

Nella presente tesi è stato analizzato il segnale di perfusione cutanea proveniente da pazienti arteriopatici. Più precisamente sono stati studiati 5 pazienti affetti da arteriopatía periferica sottoposti a terapia FREMS, osservando le condizioni di perfusione cutanea prima e dopo la prova di iperemia reattiva post-occlusiva. Inoltre sono stati studiati i segnali provenienti da 20 pazienti arteriopatici con ischemia critica degli arti inferiori sottoposti ad una procedura di rivascolarizzazione.

Nel seguito si descriverà lo strumento utilizzato per la rilevazione del segnale di perfusione cutanea e si delinearanno le caratteristiche generali di tale segnale; si spiegherà in che cosa consiste la terapia FREMS e in che cosa concerne la prova di iperemia reattiva post-occlusiva; verranno definite le caratteristiche generali dei pazienti trattati e verrà fornito un esempio del segnale ottenuto, spiegando le scelte fatte in fase di elaborazione. Per quanto riguarda i dati dei pazienti rivascolarizzati, verranno descritte le tipologie di rivascolarizzazione, verranno definite le caratteristiche generali dei pazienti che hanno subito tale intervento e, anche in questo caso, verrà fatto un esempio del segnale ottenuto. L'ultima parte del capitolo descriverà il codice implementato che è comune a entrambe le tipologie di analisi svolte.

4.1 Descrizione dello strumento e acquisizione del segnale

Il segnale di perfusione cutanea è stata acquisito con lo strumento Periflux System 5000 (Figura 26), della ditta Perimed (Stoccolma, Svezia).

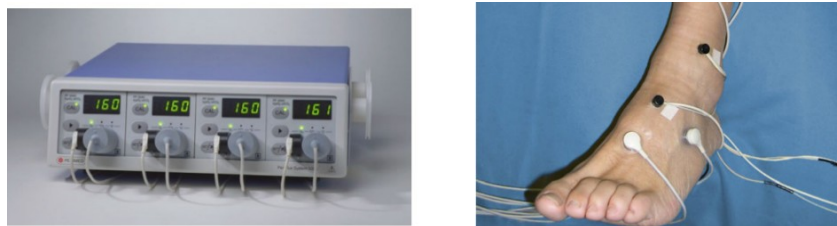


Figura 26: Dispositivo Periflux System 5000 di Perimed e applicazione della sonda sul dorso del piede.

Tale dispositivo si compone di diverse unità e la sua struttura modulare permette di ottenere differenti informazioni relative alla microcircolazione cutanea; esistono inoltre molteplici tipologie di sonde che si possono utilizzare, ognuna adatta ad un particolare tipo di applicazione.

Per gli obiettivi della presente tesi, la sorgente laser consiste in un diodo allo stato solido ed

emette nel campo dei rossi visibili con energia di 2 mW e 780 nm di lunghezza d'onda. La sonda utilizzata è la Probe 457 (Figura 27) che ha una separazione tra le fibre di invio e di ricezione di 0.25 mm e, insieme alle altre caratteristiche della configurazione sperimentale adottata, comporta una profondità di misura dell'ordine di 0.5-1 mm; questo tipo di sonda ha anche la capacità di controllare e monitorare la temperatura cutanea, cosa molto importante per la riproducibilità delle misurazioni. Ad ogni soggetto, disteso su un lettino, è stata applicata sul dorso del piede la sonda del LD. Il segnale è campionato ad una frequenza di 16 Hz. Per avere un quadro completo della configurazione sperimentale utilizzata nell'effettuare le misurazioni in questo lavoro sperimentale, si veda la Tabella 3.



Figura 27: Probe 457 (Perimed) utilizzata per acquisire il segnale.

La strumentazione descritta è collegata ad un software dedicato che permette il controllo e la gestione del dispositivo, nonché l'acquisizione del segnale. I dati misurati vengono poi salvati off-line in formato Excel con l'indicazione di ora e data della acquisizione, codice identificativo del paziente, nome dell'operatore, dettaglio dei parametri strumentali e segnale di perfusione.

Configurazione LDF Periflux 5000		
Laser	sorgente	diodo
	energia	2 mW
	lunghezza d'onda	780 nm
Sonda	nome	Probe 457
	distanza fibre	0.25 mm
Volume raggiunto	superficie	1 mm ²
	profondità	0.5-1 mm
Segnale	campionamento	16 Hz

Tabella 3: Descrizione riassuntiva della configurazione sperimentale dello strumento.

4.2 Segnale e durata dell'acquisizione

Il segnale rilevato dallo strumento è espresso in PU ed è rappresentativo del valore di perfusione cutanea del microcircolo nel volume di tessuto esaminato. Esso è proporzionale al prodotto tra il numero e la velocità media dei globuli rossi che attraversano i microvasi della regione di interesse colpita dal raggio laser della sonda.

Il segnale acquisito nel dominio del tempo presenta diverse caratteristiche visibili immediatamente: si nota un aspetto oscillante e sono visibili diverse onde con frequenze differenti. Come noto dalla letteratura [7], questo andamento è causato da diversi fattori fisiologici attivi contemporaneamente. In particolare si possono osservare (Figura 28):

- onde più veloci riconducibili all'attività cardiaca; nel presente lavoro le misurazioni sono state effettuate in condizioni di riposo del paziente, per cui la frequenza di questa attività si trova all'interno di un intervallo stretto attorno ad 1 Hz;
- onde più lente con un andamento più variabile, causate dalle attività fisiologiche dinamiche descritte nel Capitolo 1.

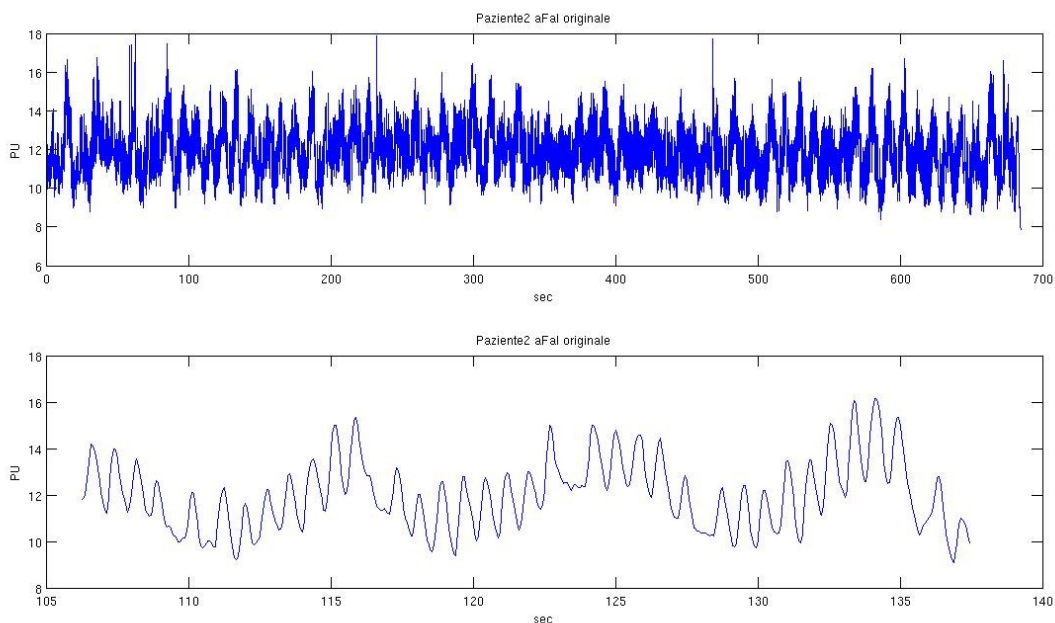


Figura 28: In alto segnale acquisito di 700 secondi dove si notano le onde più lente, in basso zoom del segnale dove si notano le onde più veloci.

Per quanto concerne l'ampiezza del segnale, espressa in unità di perfusione (PU, arbitrarie), si può osservare che questa varia da registrazione a registrazione; per tale motivo non è utile effettuare

confronti diretti tra misurazioni differenti poiché i risultati sarebbero poco attendibili.

Come noto, la frequenza più bassa associata all'attività endoteliale non dipendente da NO è di 0.005 Hz, e necessita di un tempo pari a $1/0.005 = 200$ secondi per manifestarsi; si è in grado quindi di rilevare tale attività su 3200 campioni, essendo la frequenza di campionamento dello strumento di 16 Hz.

La procedura di analisi del segnale valuta l'andamento delle componenti in frequenza mediato nel tempo durante tutta la durata della misurazione. Risulta evidente che più il segnale è esteso temporalmente, più numerosi sono i periodi di un'onda ad una certa frequenza presenti e più affidabile è la stima dei coefficienti della trasformata Wavelet. Attraverso l'operazione di media applicata ai coefficienti di ogni frequenza, si attenuano le diversità dovute ad eventi singoli, evidenziando le caratteristiche che sono presenti in tutta la durata dell'acquisizione. Per questo motivo è importante che la durata dell'acquisizione non sia troppo breve: per mediare più periodi d'onda è utile che il segnale sia sufficientemente lungo. La regola empirica adottata in letteratura per non definire un "evento" come casuale e singolo, dice che questo deve comparire con almeno sei periodi completi nell'arco dell'acquisizione ("regola del sei"); affinché l'attività endoteliale, con la frequenza più bassa, rispetti questa regola, è necessario che la misura sia almeno di $200 \times 6 = 1200$ secondi (vedi Tabella 2). Nel caso in cui l'acquisizione sia di durata minore, le valutazioni fatte sulle basse frequenze potrebbero essere meno affidabili.

Quanto detto è applicabile ad un segnale stazionario, privo di eventi singolari e casuali (gli artefatti da movimento non vengono considerati tali; la loro eliminazione verrà trattata nel paragrafo 4.5.2). Nello studio effettuato i pazienti sono stati sottoposti alla prova di iperemia reattiva post-occlusiva; tale procedura induce la presenza di un transitorio nel segnale di perfusione cutanea, che potrebbe non essere analizzato in maniera adeguata se si tenesse in considerazione la "regola del sei" e si è quindi volutamente scelto di non applicarla. Verrà nel seguito mostrato un esempio dei diversi segnali elaborati.

Le acquisizioni contenute nel presente lavoro sono di durata variabile da paziente a paziente. Ai pazienti è stato chiesto di mantenere una posizione supina immobile, cosa che non risulta possibile a causa del dolore agli arti. Il dolore provoca infatti movimenti involontari che si traducono in artefatti nel segnale acquisito, come è stato accennato nel Capitolo 2 (vedi Figura 12). La sonda è molto sensibile agli spostamenti, per cui i movimenti dei pazienti provocano dei picchi (*spikes*) nel tracciato. Questi sono di ampiezza elevata, ma di durata molto breve e solitamente si esauriscono in pochi secondi. La soluzione più immediata che consiste nel tagliare la parte del segnale che contie-

ne lo *spike* non è consigliabile poiché ridurrebbe la lunghezza complessiva dell'acquisizione. Si è scelto quindi di creare un algoritmo di sogliatura automatico in grado di “attenuare” i valori dei picchi all'interno di un range predefinito. In questo modo si conserva il contenuto informativo del segnale senza alterarne l'analisi in frequenza. L'algoritmo di sogliatura verrà descritto successivamente nella sezione dedicata al commento del codice.

4.3 Prima parte: pazienti trattati con FREMS

4.3.1 Terapia FREMS

La terapia FREMS (*Frequency Rhythmic Electrical Modulation System*) nell'arteriopatia periferica non è ancora standardizzata come terapia routinaria. Alcune osservazioni sperimentali eseguite su pazienti claudicanti hanno evidenziato che tale terapia sia in grado di ridurre il dolore muscolare indotto dallo sforzo. La FREMS è basata sulla stimolazione indolore, attraverso l'applicazione di sequenze di impulsi elettrici rilasciati da elettrodi transcutanei; gli impulsi sono modulati in frequenza ed ampiezza, ad un voltaggio massimo (V1) costante impostato sulla base della soglia di sensibilità di ogni singolo paziente. Il segnale elettrico pulsato viene applicato secondo protocolli specificatamente progettati per ottenere l'effetto desiderato. Il trattamento FREMS è attualmente impiegato per il trattamento delle neuropatie degli arti inferiori e nei trattamenti riabilitativi muscolari. In questa esperienza vengono riportate le variazioni delle FB della *flowmotion* cutanea osservata con LD in una coorte di pazienti arteriopatici periferici.

La stimolazione FREMS è stata applicata mediante l'apparecchiatura APTIVA (Lorenz Lifetech Srl, Casalecchio di Reno, Bologna, Italy) (Figura 29). Tale dispositivo è composto da un neuro-modulatore a 4 canali, ciascuno dei quali presenta 2 uscite connesse ad un elettrodo transcutaneo, mediante il quale avviene l'erogazione della stimolazione elettrica, che viene applicata in 4 distretti periferici differenti. Per il trattamento delle vasculopatie è stato seguito un protocollo terapeutico (Figura 30) consistente in 10 sedute consecutive, ciascuna suddivisa in due fasi: la prima, di durata pari a circa 25 minuti, è caratterizzata dall'applicazione di una sequenza di impulsi che variano sia in frequenza che in ampiezza; la seconda fase, di durata 10 minuti, applica invece impulsi costanti.

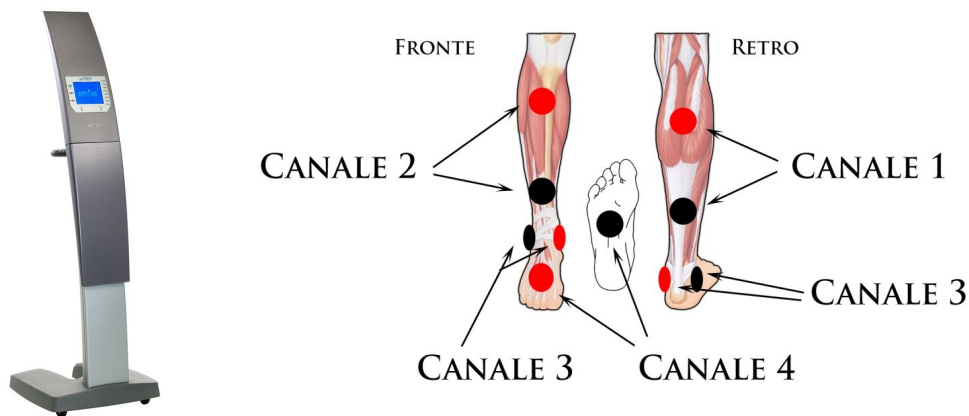


Figura 29: Apparecchiatura FREMS e schema di applicazione degli elettrodi.

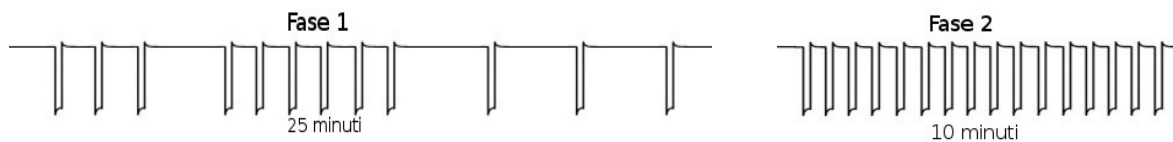


Figura 30: Esempio di applicazione del protocollo per l'erogazione della stimolazione. Fase 1: gli impulsi variano in frequenza e in ampiezza. Fase 2: gli impulsi sono costanti.

Come detto, il voltaggio viene aggiustato individualmente; il voltaggio massimo fornito per ogni canale (V1) è determinato nel momento in cui viene percepita una sensazione di formicolio da parte del paziente (soglia percettiva).

4.3.2 Iperemia reattiva post-occlusiva (PORH)

L'iperemia reattiva post-occlusiva (*Post Occlusive Reactive Hyperaemia*, PORH) viene indotta applicando un manicotto pneumatico all'arto di un soggetto insufflandolo ad una pressione sovrasistolica per una durata di 3 minuti. Lo sgonfiaggio del manicotto determina un incremento della perfusione tissutale che, nel caso della cute, può essere registrata con LD. Il meccanismo fisiologico su cui si basa questa prova è quello dell'induzione di un rapido aumento dello *shear stress* a livello delle cellule endoteliali delle arteriole cutanee, che induce una vasodilatazione endotelio-mediata. I meccanismi della vasodilatazione endotelio-mediata o NO-mediata sono stati descritti nel capitolo riguardante la *flowmotion* [30].

Studi effettuati confrontando il segnale LD registrato prima e dopo l'induzione della PORH in

soggetti sani e in soggetti affetti da arteriopatie periferiche, hanno mostrato innanzitutto che la cinetica delle oscillazioni dopo il rilascio del manicotto è differente, dipendentemente dall'intervallo di frequenza osservato; ciò può far pensare che i fattori che agiscono sull'andamento oscillatorio del flusso sanguigno rispondano in maniera differente all'occlusione [31]. In secondo luogo, è stato notato come vi sia un aumento del tempo necessario per raggiungere il picco di perfusione dopo l'apertura del manicotto e un aumento del tempo di ritorno alla condizione basale nei soggetti affetti da arteriopatia. Gli studi effettuati suggeriscono inoltre che nei soggetti arteriopatici si inneschi un meccanismo atto a compensare la carenza del flusso sanguigno: questa compensazione comprende un aumento dell'attività endoteliale, miogenica e del simpatico. Questi meccanismi tuttavia sembrano non aumentare conseguentemente all'iperemia reattiva nei soggetti malati, portando ad ipotizzare che queste attività siano in un certo qual modo esaurite dall'atto di compensazione appena descritto [32].

4.3.3 Pazienti

In questa prima analisi è stato osservato un ristretto gruppo di pazienti che sono stati trattati con terapia FREMS. Questi pazienti sono affetti da ischemia critica agli arti inferiori, che è lo stadio più avanzato della malattia arteriosa periferica ostruttiva (PAOD): questi pazienti non possono subire un intervento di rivascolarizzazione.

La PAOD è parte della aterosclerosi, malattia pluri-distrettuale che colpisce vari distretti quali quello cardiaco, cerebrale e periferico. Per quanto riguarda epidemiologia, fattori di rischio e terapia si rimanda alle recenti ed aggiornate linee guida della American Heart Association pubblicate nel 2011 [33, 34, 35].

Relativamente all'arteriopatia periferica degli arti inferiori vi sono due classificazioni, una di Fontaine e una di Rutherford. La prima è quella più utilizzata e si basa su una analisi di tipo sintomatologico. L'arteriopatico viene classificato in vari stadi:

- stadio I: stadio asintomatico;
- stadio II: stadio della *claudicatio intermittens*: tipico dolore al polpaccio che insorge con la deambulazione;
- stadio III: stadio del dolore a riposo;
- stadio IV: presenza di ulcere e gangrena.

L'arteriopatia periferica presenta un alto tasso di mortalità per IMA e ICTUS [33, 34, 35].

Nel presente lavoro i pazienti analizzati hanno età media di 77,6 anni, per il 40% soffrono di diabete, per il 60% di ipertensione e per il 30% di ipercolesterolemia.

4.3.4 Caratteristiche del segnale

Va precisato che il segnale di perfusione cutanea analizzato in questa parte del lavoro ha caratteristiche differenti, dipendentemente dal fatto che questo sia stato acquisito prima o dopo la prova di iperemia reattiva post-occlusiva (vedi Paragrafo 4.3.2). Il segnale è stato acquisito dapprima in condizioni basali e successivamente l'acquisizione è stata bloccata nei 3 minuti di occlusione; la misurazione è stata poi ripresa allo sgonfiaggio del manicotto. Queste rilevazioni sono state fatte sia prima che dopo il trattamento con terapia FREMS, ma ciò non influisce sull'andamento del segnale.

A fronte di questa metodica di acquisizione, il segnale ottenuto nei diversi pazienti ha l'andamento visibile nelle figure seguenti (Figura 31).

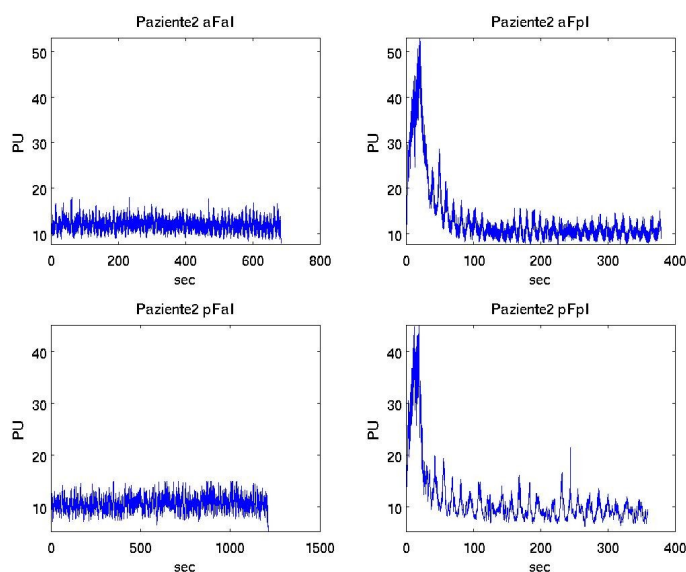


Figura 31: Segnale prima della PORH a sinistra (in alto prima del trattamento FREMS, in basso dopo il trattamento), segnale dopo la PORH a destra (in alto prima del trattamento FREMS, in basso dopo il trattamento).

Si nota come nella prima parte dell'acquisizione il segnale risulti stazionario e non presenti eventi singolari o unici, mostrando diverse frequenze di oscillazione, che come già detto rispecchiano diverse attività fisiologiche che verranno evidenziate attraverso l'analisi Wavelet. Nella seconda

parte dell'acquisizione, invece, il segnale presenta un transitorio, dovuto al rilascio del manico dopo la prova PORH; questa provoca un rapido aumento del valore di perfusione cutanea, evidenziato dalla presenza di un'onda di entità superiore a quelle registrate prima della compressione. Poiché si tratta di un segnale non stazionario, è stata fatta la scelta di modificare i parametri del codice che produce lo scalogramma della trasformata Wavelet in modo tale da ridurre al minimo gli effetti di bordo del cono di influenza (vedi Paragrafo 3.3.6).

4.4 Seconda parte: pazienti rivascolarizzati

4.4.1 Tipologie di rivascolarizzazione

I pazienti analizzati in questa seconda parte del lavoro sono al terzo stadio di Fontaine (vedi paragrafo 4.3.3) e hanno subito una procedura di rivascolarizzazione.

Le procedure di rivascolarizzazione applicate sono state:

1. *endoarterectomia dell'arteria femorale comune* (FEA) consiste nell'asportazione della placca che crea l'occlusione arteriosa. (Figura 32);

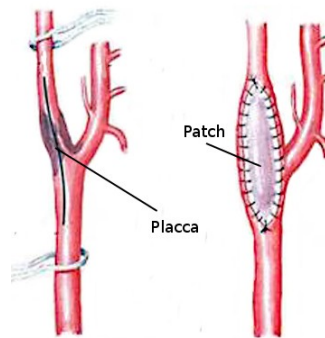


Figura 32: Presenza della placca (a sinistra); rimozione della placca e inserimento di un patch sintetico (a destra).

2. *by-pass* (BP) consiste nell'utilizzo di protesi vascolari che oltrepassino il tratto arterioso ostruito (Figura 33). La protesi può essere biologica o sintetica [36];

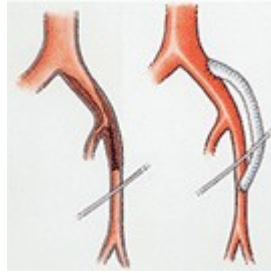


Figura 33: Disegno schematico di by-pass con protesi sintetica (a sinistra si nota la presenza della placca, a destra la presenza della protesi).

3. L'angioplastica percutanea transluminale (PTA) consiste nella dilatazione endovascolare dei tratti di arteria ostruiti attraverso l'uso di un palloncino posto all'estremità di un catetere [36]. Spesso questo intervento viene accompagnato dal posizionamento di uno *stent*, protesi endovascolare metallica che ha lo scopo di impedire la restenosi dell'arteria trattata (Figura 34). Questa tipologia di intervento viene sfruttata nel caso in cui le ostruzioni siano isolate e brevi [37].

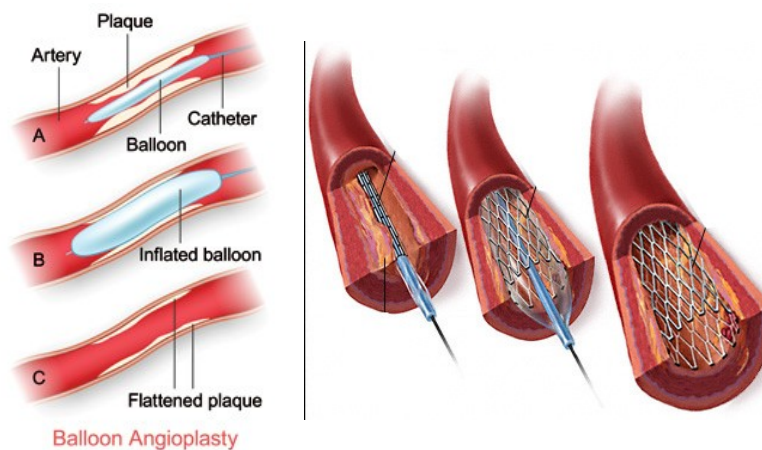


Figura 34: PTA con palloncino (a sinistra), PTA con palloncino e stent (a destra).

4.4.2 Pazienti

In questa sezione sono stati studiati 20 pazienti (inizialmente si disponeva solamente dei dati dei primi 15, successivamente l'indagine è stata estesa con l'aggiunta di altri 5 pazienti), le cui principali caratteristiche sono riassunte nella Tabella 4 e per ogni paziente sono indicati: sesso, età, il tipo di intervento subito. Viene evidenziata la presenza di diabete, ipertensione, dislipidemia e di di-

pendenza dal fumo; vengono segnate le date di acquisizione prima e dopo l'intervento.

ID	SESSO	ETA'	INTERVENTO	DIABETE	IPERTENSIONE	DISLIPIDEMIA	FUMO	Data PRE	Data POST
1	F	75	PTA		x			20/05/09	17/06/09
2	M	58	BP	x	x	x		07/01/10	12/05/10
3	F	87	PTA		x			30/06/10	17/11/10
4	M	48	FEA		x			18/12/09	31/05/10
5	F	79	BP	x	x	x	x	24/07/09	10/05/10
6	F	64	BP		x			07/01/10	16/03/10
7	M	82	PTA		x	x		17/11/09	15/12/09
8	F	74	PTA	x	x	x		20/02/08	24/11/09
9	M	70	PTA	x	x	x		06/05/08	14/07/08
10	F	71	PTA	x	x	x	x	16/04/08	22/05/08
11	F	79	FEA	x	x	x	x	14/04/08	17/06/08
12	M	67	FEA	x	x	x	x	16/06/09	13/11/09
13	F	76	PTA		x			06/07/05	28/04/09
14	M	79	FEA		x	x	x	17/12/09	21/05/10
15	M	61	BP	x	x			15/05/08	03/09/08
16	F	80	BP		x			-	-
17	F	83	BP	x	x			-	-
18	M	67	BP		x	x		-	-
19	M	76	BP		x	x		-	-
20	F	67	PTA	x	x			-	-

Tabella 4: pazienti rivascularizzati analizzati. BP = by-pass; FEA = endoarterectomia dell'arteria femorale; PTA = angioplastica percutanea transluminale.

4.4.3 Caratteristiche del segnale

L'andamento del segnale è quello che si vede in Figura 35 e non presenta transitori o eventi singoli (che non siano eventuali artefatti).

Poichè si tratta di un segnale stazionario (gli artefatti da movimento non vengono considerati tali; la loro eliminazione verrà trattata nel paragrafo 4.5.2), nel settaggio dei parametri che definiscono la finestatura Wavelet, si è deciso dapprima di applicare la “regola del sei” e di considerare pertanto gli effetti di bordo. Tuttavia, allo scopo di ricercare differenze significative tra il segnale acquisito prima e dopo rivascularizzazione, si è scelto di abbandonare la suddetta restrizione: stante

la breve durata di talune acquisizioni, la rigida applicazione della “regola del 6” avrebbe sacrificato il contributo delle oscillazioni più lente. Di conseguenza, l'analisi avrebbe dovuto ignorare la presenza degli eventi legati alle attività endoteliali.

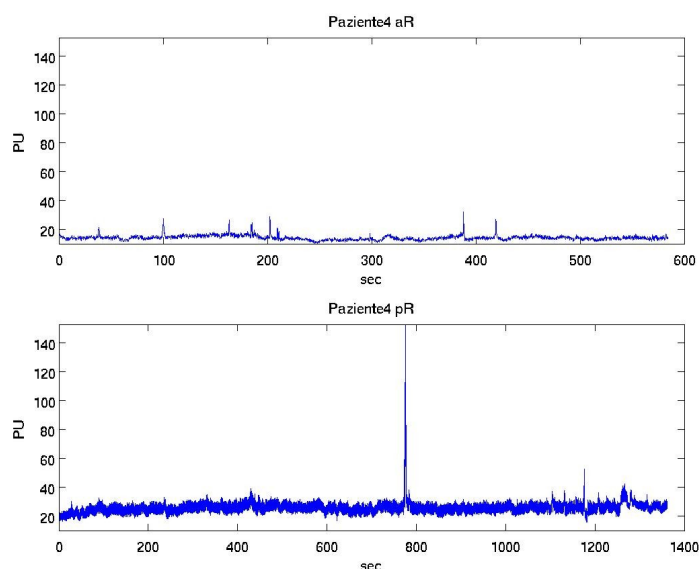


Figura 35: Segnale prima dell'intervento (sopra) e segnale dopo l'intervento (sotto).

4.5 Il codice

Il codice per analizzare i dati forniti dallo strumento è stato scritto in ambiente Matlab e si compone di diversi file *.m* ognuno dei quali svolge un determinato tipo di elaborazione del segnale e calcola diversi parametri che saranno utili nell'analisi statistica svolta nella parte finale. Si andranno ora a descrivere le varie parti di codice, nell'ordine in cui sono state sviluppate. Ciò che verrà descritto è stato applicato sia ai segnali provenienti dai pazienti trattati con terapia FREMS, prima e dopo PORH, sia ai segnali acquisiti dai pazienti rivascolarizzati. Va precisato che nel primo caso sono stati analizzati tutti i quattro casi disponibili: dati prima del trattamento e prima della prova PORH, dati prima del trattamento e dopo PORH, dati dopo il trattamento e prima della prova PORH e infine dati dopo il trattamento e dopo PORH. Nel secondo caso invece è stata fatta l'analisi solamente di due casi: dati prima e dopo l'intervento di rivascolarizzazione.

4.5.1 Caricamento dei dati e plot

I dati di un paziente sono salvati in una colonna di un foglio Excel, come spiegato nel Paragrafo 3.1. Per agevolare il caricamento dei dati nel workspace di Matlab, si è scelto di creare un nuovo file *.xls* che contiene nelle diverse colonne i dati riguardanti i diversi pazienti. Ogni file è composto di due fogli, il primo riguardante la situazione *pre*, il secondo la condizione *post*.

Viene utilizzato il comando Matlab `xlsread`, che carica in una matrice i dati provenienti dal foglio Excel:

```
dati=xlsread('file.xlsx', 'numero foglio');
```

La matrice dati che si forma avrà tante colonne quanti i pazienti analizzati e il numero di righe corrisponderà al numero di campioni del segnale più lungo acquisito. Chiaramente le colonne corrispondenti ad acquisizioni più corte rispetto al numero di righe della matrice, conterranno dei NaN in coda. Si è quindi provveduto ad attuare un procedimento che eliminasse questi valori e sono stati creati dei vettori, uno per ogni paziente, contenenti solo le informazioni utili. Sono state sfruttate le funzioni `eval` e `num2str` di Matlab in modo tale da assegnare ai vari vettori un nome contenente il numero corrispettivo dell'ID del paziente:

```
for i=1:n_paz
    eval(['Paziente' num2str(i) '=dati(1:end,i)']);
end
```

Questi vettori sono poi salvati all'interno di una cartella *data* che conterrà tutti i dati utili per le future elaborazioni. Vengono calcolati e salvati anche il numero dei pazienti, la frequenza di campionamento dello strumento e il corrispondente tempo di campionamento:

```
n_paz=size(dati,2); %numero di pazienti equivale alle colonne dei dati
Fc=16; %Frequenza di campionamento
Tc=1/Fc; %Periodo di campionamento

save data/Fc Fc
save data/n_paz n_paz
save data/Tc Tc
```

La parte di codice successiva si occupa della rappresentazione grafica del segnale acquisito sfruttando la funzione `plot`, creando e salvando per ogni paziente diverse figure composte da alcuni quadranti, ognuno dei quali è rappresentativo di una determinata acquisizione. Per ogni vettore di campioni acquisiti è stato creato il corrispondente vettore dei tempi di acquisizione:

```
eval(['plot(0:Tc:(Tc*(length(Paziente' num2str(i) '_aFaI)-1)), Paziente'  
num2str(i) '_aFaI, '-b')'])
```

Per migliorare il confronto tra i diversi plot è stata accomunata la scala tra i grafici del medesimo paziente.

4.5.2 Eliminazione artefatti da movimento

Come descritto precedentemente, i segnali acquisiti possono contenere alcuni artefatti, causati dal movimento del paziente durante la rilevazione. La procedura per l'attenuazione degli artefatti da movimento si basa su un algoritmo in grado di ridimensionare le corrispondenti parti di segnale. Osservando che le onde a frequenze più elevate del segnale oscillano entro un intervallo verticale che segue l'andamento delle onde più lente, l'algoritmo ha lo scopo di attenuare gli *spike* all'interno di questo intervallo.

Per effettuare questo procedimento è stata sfruttata la funzione *adaptive_offset_aut.m* che a sua volta chiama la funzione *polyfitting_sing.m*, assieme alla funzione *wwt.m* che verrà descritta nel dettaglio nel paragrafo seguente.

La funzione *polyfitting_sing.m* che produce il segnale ripulito, senza picchi, dapprima approssima l'intero segnale con una funzione polinomiale che segue l'andamento delle onde più lente; successivamente, fissata una soglia di tolleranza s che crea un range sopra e sotto la polinomiale oltre il quale il segnale è considerato *spike*, si scorre il segnale finché non si incontra un valore fuori soglia. Vengono valutati tutti i valori del segnale al di fuori della soglia e questi vengono moltiplicati per un coefficiente calcolato in modo tale che questo sia in grado di ridimensionare il segnale e di farlo rientrare dentro la soglia definita.

La funzione *adaptive_offset_aut.m* ha come output il segnale sogliato con le relative bande di tolleranza per gli *spike*, permettendo la visualizzazione completa della procedura di sogliatura (Figura 36).

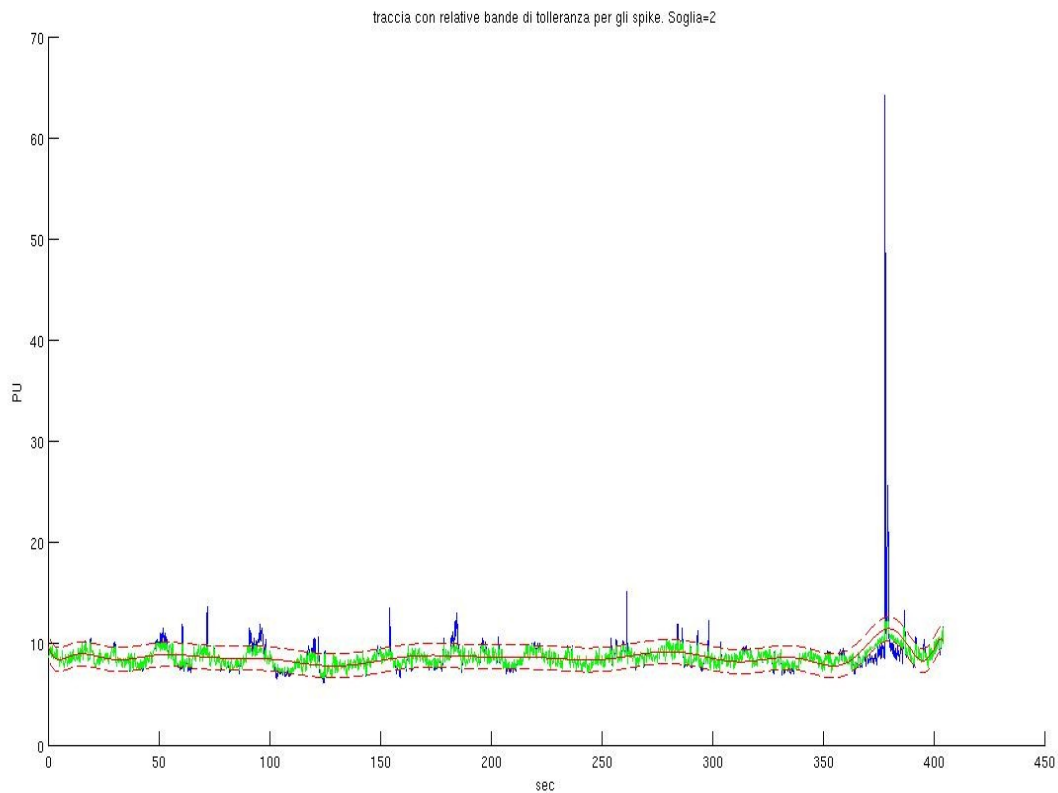


Figura 36: Traccia originale in blu, traccia sogliata in verde, polinomio e bande di tolleranza in rosso.

La soglia s menzionata non viene fissata in maniera manuale, ma viene definita automaticamente dall'algorithm attraverso un processo iterativo. Alla base della scelta della soglia ottimale vi è l'osservazione dello spettro della potenza mediata nel tempo prodotto dall'analisi Wavelet del segnale ed in particolare la valutazione del picco più alto di tale spettro; tali valori vengono prodotti grazie alla funzione `wwt.m`. Inizialmente viene assegnato alla soglia il valore 1 e successivamente questa viene incrementa di 1 finché la differenza percentuale tra i picchi di due spettri di potenza calcolati consecutivamente non è sotto il 20%.

Dopo aver eseguito questa procedura, vengono salvati i dati ottenuti, in particolare il vettore contenente i campioni del segnale filtrato e i dati inerenti la trasformata Wavelet; inoltre si salvano le immagini degli scalogrammi. Vengono sfruttate le funzioni `save` e `saveas` di Matlab:

```
eval(['save dataF/SF_Paziente' num2str(i) ' SF_Paziente' num2str(i)])
eval(['save dataF/WT_Paziente' num2str(i) ' WT_Paziente' num2str(i)])
eval(['save dataF/freq' num2str(i) ' freq' num2str(i)])

saveas(gcf, ['WTfigure/WT' num2str(i) '.jpg'])
```

4.5.3 *Function wwt.m*

Questa funzione analizza il segnale in ingresso attraverso la trasformata Wavelet. La struttura della funzione è la seguente:

```
[WT, freq, Optional:wpow, coib]=wwt(signal, fs, Optional:'PropertyName', PropertyValue)
```

dove, per quanto riguarda gli input:

- `signal` – segnale in ingresso, nel caso in esame si tratta del segnale privo di artefatti;
- `fs` – frequenza di campionamento;

le opzioni che sono state utilizzate sono:

- `'plot'` : `'on'` – visualizza il segnale su cui si è svolta l'analisi, lo scalogramma della WT con una linea che denota il cono di influenza, e la potenza Wavelet mediata nel tempo ;
- `'CutEdges'` : `{'on'}|'off'` – che, se impostato `'on'`, vengono sostituiti i coefficienti Wavelet al di fuori del cono di influenza con dei NaN, se impostato `'off'` si ottiene la WT completa.

Per quanto riguarda gli output invece:

- `WT` – trasformata Wavelet;
- `freq` – frequenze corrispondenti alle righe di WT;
- `wpow` – potenza della trasformata WT mediata nel tempo; calcolata solo sui coefficienti all'interno del cono di influenza se `'CutEdges'` è `'on'`, su tutti i coefficienti se `'CutEdges'` è `'off'`;
- `coib` – definisce i bordi del cono di influenza;

Il grafico che si ottiene dopo l'analisi, e avendo impostando `'plot', 'on'` è raffigurato nella Figura 37.

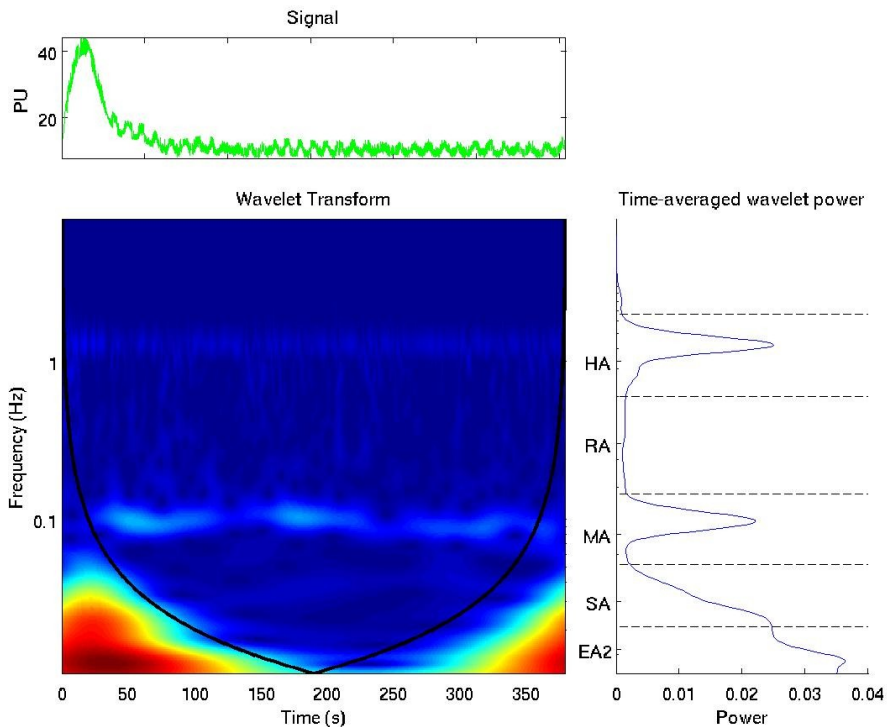


Figura 37: Plot ottenuto dalla function *wwt.m*: in alto il segnale su cui si applica la WT, in basso a sinistra lo scalogramma, in basso a destra la potenza WT mediata nel tempo.

Scelta dei parametri

All'interno del codice il parametro `bnd` permette di modificare la larghezza della Wavelet definendo quanti periodi di questa vengono tagliati nell'applicazione del cono di influenza.

Sono state fatte scelte differenti in base alla tipologia di segnale analizzato e ai risultati ottenuti durante lo svolgimento del lavoro: per i pazienti trattati con FREMS, per quanto detto nel Paragrafo 4.3.4, è stato impostato `bnd=2` e `'CutEdges'='off'`; per i pazienti rivascularizzati è stata effettuata dapprima la scelta di porre `bnd=3` e `'CutEdges'='on'` date le caratteristiche del segnale, successivamente si è deciso di settare `bnd=2` e `'CutEdges'='off'` per le motivazioni enunciate nel Paragrafo 4.4.3.

4.5.4 Analisi di potenza e ampiezza al variare del tempo

Lo spettro della potenza visualizzato dal *plot* prodotto dalla funzione *wwt.m* è mediato nel tempo. Tuttavia per un'analisi accurata del segnale è stato scelto di osservare lo spettro dell'ampiezza e della potenza anche per ogni istante di campionamento. La procedura che permette questa vi-

sualizzazione è composta da un ciclo `for` che "spazzola" le colonne della matrice dei coefficienti della trasformata WT e fornisce un grafico a barre con lo spettro in frequenza per ogni campione acquisito. Nell'immagine sono presenti anche delle linee tratteggiate verticali che delimitano le bande di frequenza rappresentative delle diverse attività fisiologiche di cui si è parlato nel Capitolo 1 (Figura 38). Di seguito il codice scritto per la rappresentazione dello spettro dell'ampiezza, analogamente è stato sviluppato quello per lo spettro della potenza:

```
figure()
for j=1:size(WT,2)
    bar(freq, abs(WT(:,j))), hold on
    plot(0,ylim) % serve per avere i v1-7 alti tutta la figura
    v1=vline(0.005,'--k',[]);
    v2=vline(0.0095,'--k',[]);
    v3=vline(0.021,'--k',[]);
    v4=vline(0.06,'--k',[]);
    v5=vline(0.2,'--k',[]);
    v6=vline(0.6,'--k',[]);
    v7=vline(2,'--k',[]);
    set(gca,'Ylim',[0,1.1*ylim],'Yscale','linear','Xlim',
    [0.005,2],'XScale','log','XTick',[0.005 0.007 0.0095 0.015 0.02 0.035
    0.06 0.1 0.2 0.3 0.6 1 2],'XTickLabel',
    {'0.005','EA1','0.0095','EA2','0.02','SA','0.06','MA','0.2','RA','0.6','HA
    ','2'});
    xlabel('Freq [Hz]')
    ylabel('Amplitude [PU/Hz]')
    eval(['title(['Ampiezza: abs(WTPaziente' num2str(i) '_{aFaI}) al
    campione' num2str(j)])'])
    hold off
    pause(0.001)
end
```

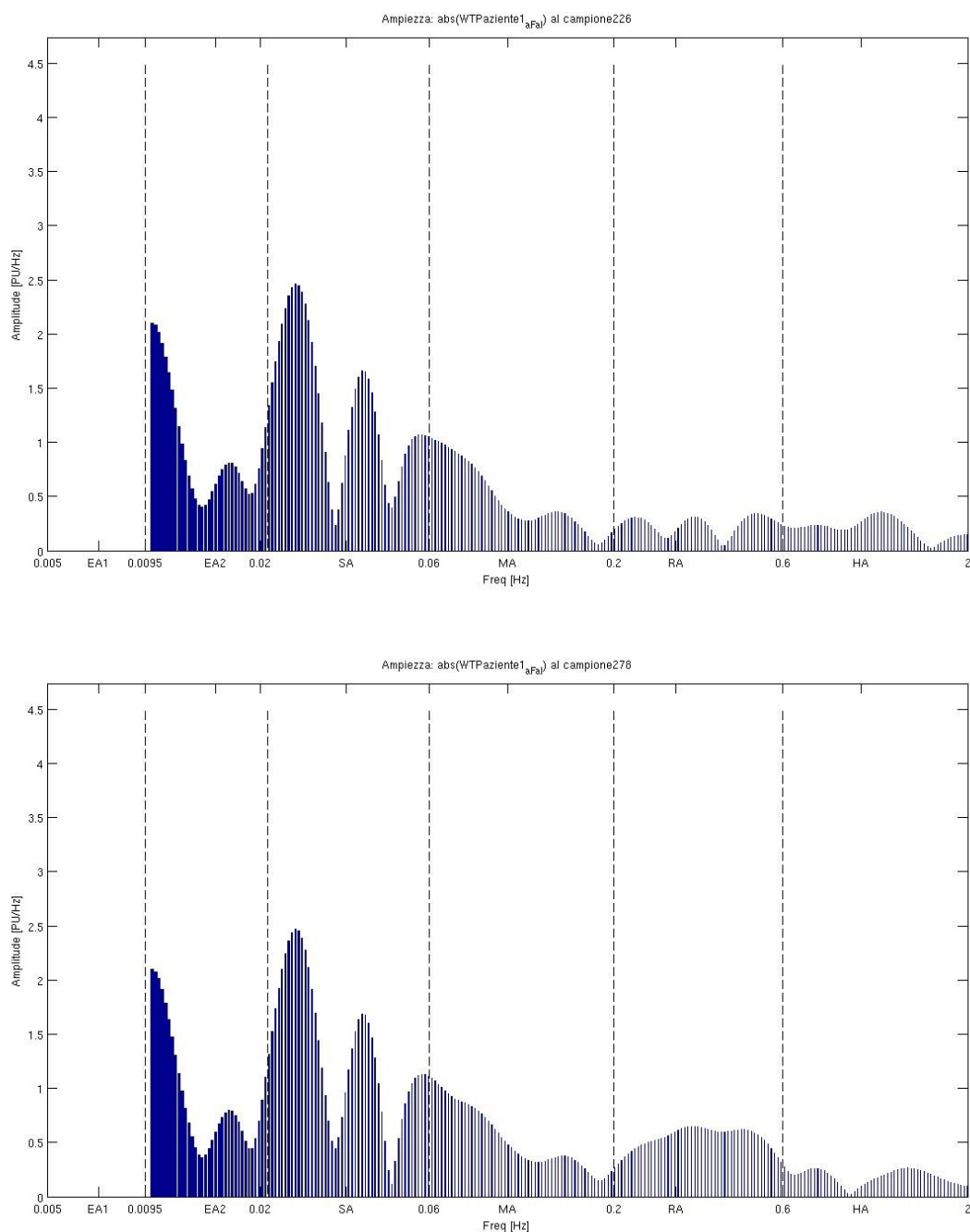


Figura 38: Grafico a barre dello spettro dell'ampiezza della WT in due diversi istanti di campionamento (campione 226 sopra, campione 278 in basso).

4.5.5 Ampiezza e potenza assoluta, media e relativa e confronti

Per poter analizzare in maniera più immediata i dati forniti dallo scalogramma 3D e per poter confrontare i risultati ottenuti, è utile riassumere tali informazioni in grandezze di più facile osser-

vazione. Si tratta della *Potenza e dell'Ampiezza Assolute, Medie e Relative*; è stato inoltre calcolato un valore medio di queste grandezze per ogni intervallo di frequenza descritto precedentemente.

La funzione sfruttata per eseguire tale procedura, è *wap.m*:

```
[wpow, wamp, Optional:intpow, intamp]=wap(WT, freq, Optional:freqint)
```

Questa riceve in ingresso

- WT – la matrice dei coefficienti della trasformata Wavelet;
- freq – frequenze corrispondenti alle righe della matrice WT;
- freqint – parametro opzionale che definisce gli intervalli per cui calcolare il valore medio di ampiezza e potenza intpow e intamp.

Gli output forniti sono:

- wpow – potenza Wavelet per ogni frequenza freq fornita;
- wamp – ampiezza Wavelet calcolata per ogni frequenza freq;
- intpow, intamp – output opzionali che contengono potenza e ampiezza di ogni intervallo di frequenza definito dal parametro freqint.

Wpow, wamp, intpow, intamp calcolate dalla funzione sono potenze e ampiezze cosiddette *assolute*. Queste sono calcolate mediando i valori dello scalogramma nel tempo. A partire da questi valori, è possibile ottenere il valore *Ampiezza Media* mediando il vettore delle *Ampiezze Assolute* (attraverso la funzione mean). Da questi due valori, *Ampiezza Assoluta* e *Ampiezza Media*, è possibile calcolare il valore dell'*Ampiezza Relativa*, trovata semplicemente normalizzando il primo valore rispetto al secondo.

Allo stesso modo si opera per quanto riguarda *Potenza Assoluta, Media e Relativa*.

```
% Ampiezza Media
eval(['wampM' num2str(i) '_aFaI=mean(wamp' num2str(i) '_aFaI);'])
eval(['AM=wampM' num2str(i) '_aFaI;'])
% Ampiezza Relativa
eval(['wampR' num2str(i) '_aFaI=wampA' num2str(i) '_aFaI./wampM' num2str(i)
'_aFaI;'])
```

Tuttavia, per poter svolgere un'analisi di tipo statistico sui risultati ottenuti, è necessario fare un'ulteriore semplificazione che consiste nel ricavare il valore medio di ampiezza e potenza in ogni banda di frequenza. Si avrà quindi un valore di *Ampiezza e Potenza, Assoluta e Relativa*, per ogni banda caratteristica: endoteliale NO indipendente (EA1), endoteliale NO dipendente (EA2), neurogena (SA), miogena (MA), respiratoria (RA), cardiaca (HA).

Tutti questi valori trovati sono salvati in appositi vettori, che renderanno più agevoli le procedure successive.

Ampiezza Assoluta:

AA_EA1 : contiene in ogni colonna il valore dell'*Ampiezza Assoluta* della banda endoteliale NO indipendente di un paziente;

AA_EA2 : contiene in ogni colonna il valore dell'*Ampiezza Assoluta* della banda endoteliale NO dipendente di un paziente;

AA_SA : contiene in ogni colonna il valore dell'*Ampiezza Assoluta* della banda neurogena di un paziente;

AA_MA : contiene in ogni colonna il valore dell'*Ampiezza Assoluta* della banda miogena di un paziente;

AA_RA : contiene in ogni colonna il valore dell'*Ampiezza Assoluta* della banda respiratoria di un paziente;

AA_HA : contiene in ogni colonna il valore dell'*Ampiezza Assoluta* della banda cardiaca di un paziente.

Allo stesso modo si procede per l'*Ampiezza Relativa* (AR_x), per la *Potenza Assoluta* (PA_x) e per quella *Relativa* (PR_x).

Per quanto concerne la parte grafica, sono stati prodotti dei *plot* che mettono a confronto i risultati ottenuti analizzando i segnali acquisiti prima e dopo il trattamento, prime e dopo PORH e prima e dopo la procedura di rivascolarizzazione. Nelle successive figure, oltre alla rappresentazione dello spettro di *Ampiezza e Potenza Assoluta e Relativa* al variare della frequenza, viene indicato il valore medio di queste in ogni intervallo di frequenza (Figura 39)

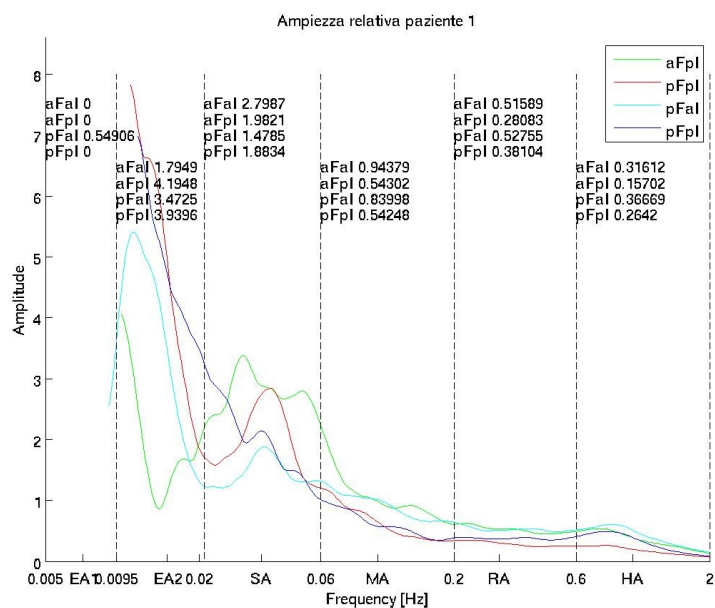


Figura 39: Grafico delle ampiezze relative in paziente trattato con FREMS prima e dopo PORH.

Per quanto riguarda i pazienti rivascolarizzati è stato prodotto un ulteriore risultato: è stato calcolato lo spettro medio tra gli spettri di potenza e ampiezza di tutti i pazienti (per alcune frequenze non erano presenti i valori per tutti i pazienti, il valore medio è stato calcolato solo tra quelli disponibili). Il grafico ottenuto riassuntivo di questa procedura è rappresentato nella Figura 40. Anche in questo caso sono stati svolti gli stessi confronti descritti precedentemente.

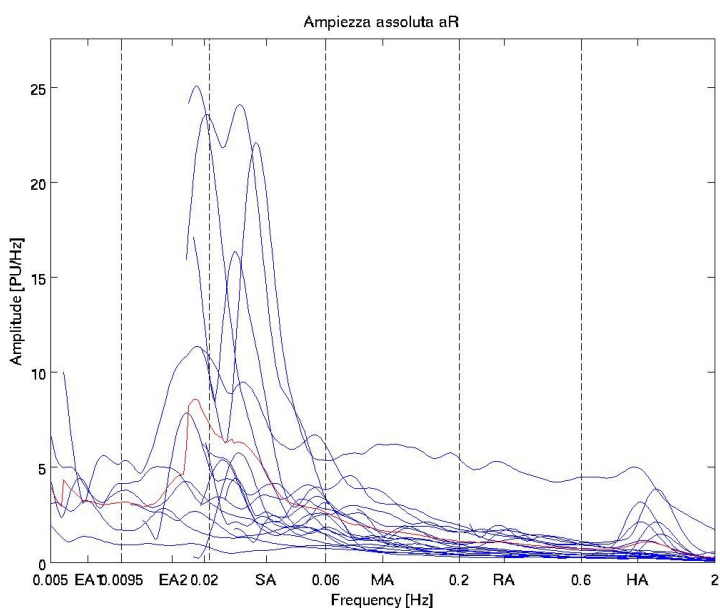


Figura 40: Spettri di Ampiezza Assoluta di tutti i pazienti in blu e spettro di ampiezza medio in rosso.

4.5.6 Test statistici e boxplot

Al fine di valutare le differenze significative tra le diverse casistiche di analisi, sono stati applicati due test statistici sui dati, in particolare il t-test e il test di Wilcoxon. Il primo determina se i due gruppi di dati inseriti provengono da una distribuzione normale con media nulla e varianza non nota fornendo in h il risultato decisionale del test ($h=0$ se l'ipotesi nulla è valida con un livello di significatività del 5%, $h=1$ altrimenti) e il p -value trovato. Il secondo invece considera come ipotesi nulla che i due gruppi di dati inseriti provengano da una distribuzione continua con uguale mediana; anche in questo caso si ottiene in uscita il valore del p -value.

```
[h, pt]=ttest(x, y);
[pw]=ranksum(x, y);
```

I test sono stati eseguiti sui dati di *Ampiezza e Potenza Assolute Medie e Relative*, per ogni intervallo di frequenze confrontando le differenti situazioni possibili. I p -value ottenuti sono stati salvati. Per una migliore visualizzazione dei dati sono stati prodotti i *Boxplot* e in corrispondenza di ogni banda di frequenza significativa sono stati inseriti i valori dei p -value calcolati (Figura 41). Sono state calcolate le mediane per ogni intervallo di frequenza e la differenza percentuale tra le diverse casistiche di analisi.

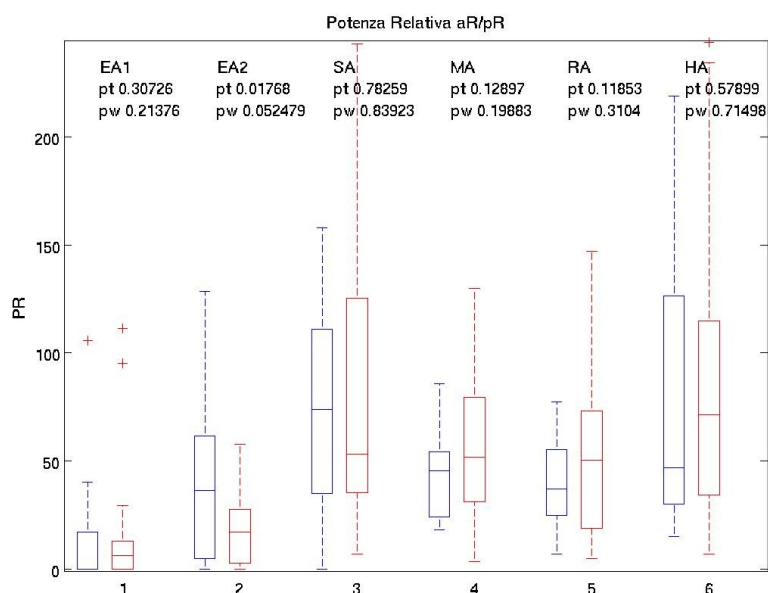


Figura 41: Boxplot con p -value calcolato con t-test e Wilcoxon test.

5 Risultati e discussione

Nel seguito sono riportati i risultati ottenuti dall'elaborazione dei segnali per i 5 pazienti trattati con terapia FREMS (nelle varie combinazioni, prima e dopo FREMS e prima e dopo PORH) e successivamente per i 20 pazienti rivascolarizzati. Si precisa che in primo luogo sono stati analizzati solamente 15 pazienti e, come giustificato nei paragrafi 4.4.3 e 4.5.3, i risultati sono stati ottenuti dapprima ponendo il parametro $bnd=3$, e poi $bnd=2$; successivamente, il campione è stato esteso con l'aggiunta di dati provenienti da ulteriori 5 pazienti mantenendo $bnd=2$.

Per una più immediata comprensione dei risultati, si è scelto di visualizzare i *Boxplot* di *Ampliezza e Potenza Assoluta e Relativa* con i corrispondenti *p-value* calcolati con i test statistici descritti nel paragrafo 4.5.6, per ogni intervallo di frequenza associato alle differenti attività vascolari. Nel seguito, saranno riportati alcuni commenti e saranno evidenziate le differenze significative riscontrate. È necessario precisare che le eventuali differenze significative misurate nella bande endoteliale non dipendente da NO non vengono di norma prese in considerazione stante l'esiguo numero di valori sulle quali esse vengono calcolate.

5.1 Prima parte: pazienti trattati con FREMS

Di seguito sono riportati i risultati ottenuti per i pazienti affetti da PAOD, trattati con terapia FREMS e sottoposti a PORH.

Ante FREMS – Ante/Post PORH:

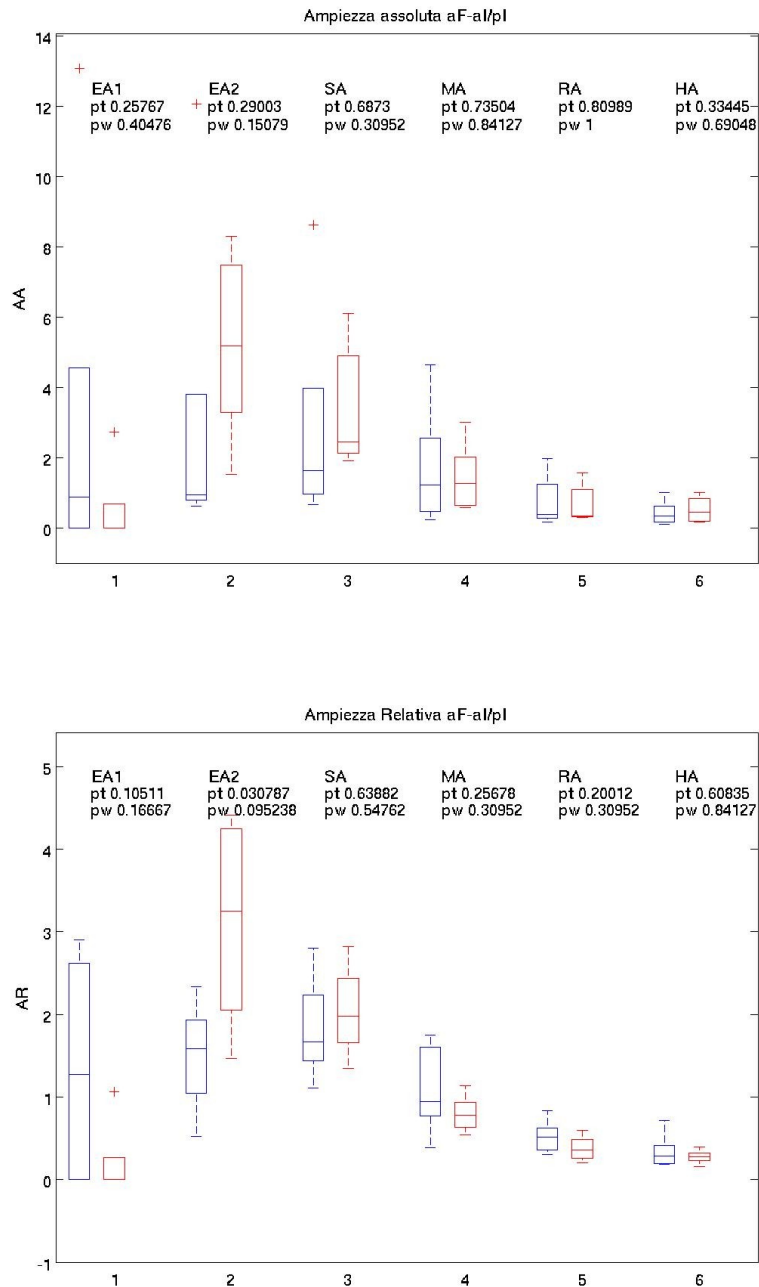


Figura 42: Boxplot di Ampiezza Assoluta e Relativa Ante FREMS – Ante/Post PORH

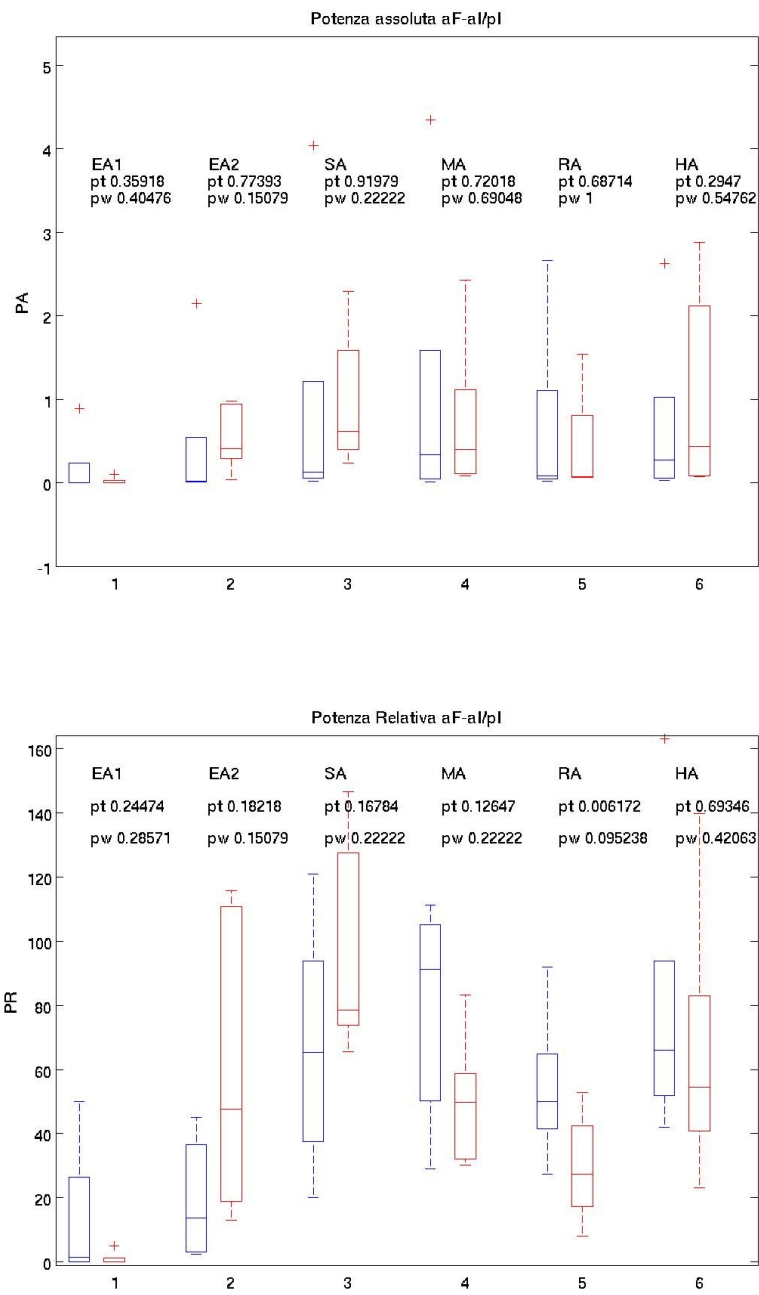


Figura 43: Boxplot di Potenza Assoluta e Relativa Ante FREMS – Ante/Post PORH

Post FREMS – Ante/Post PORH:

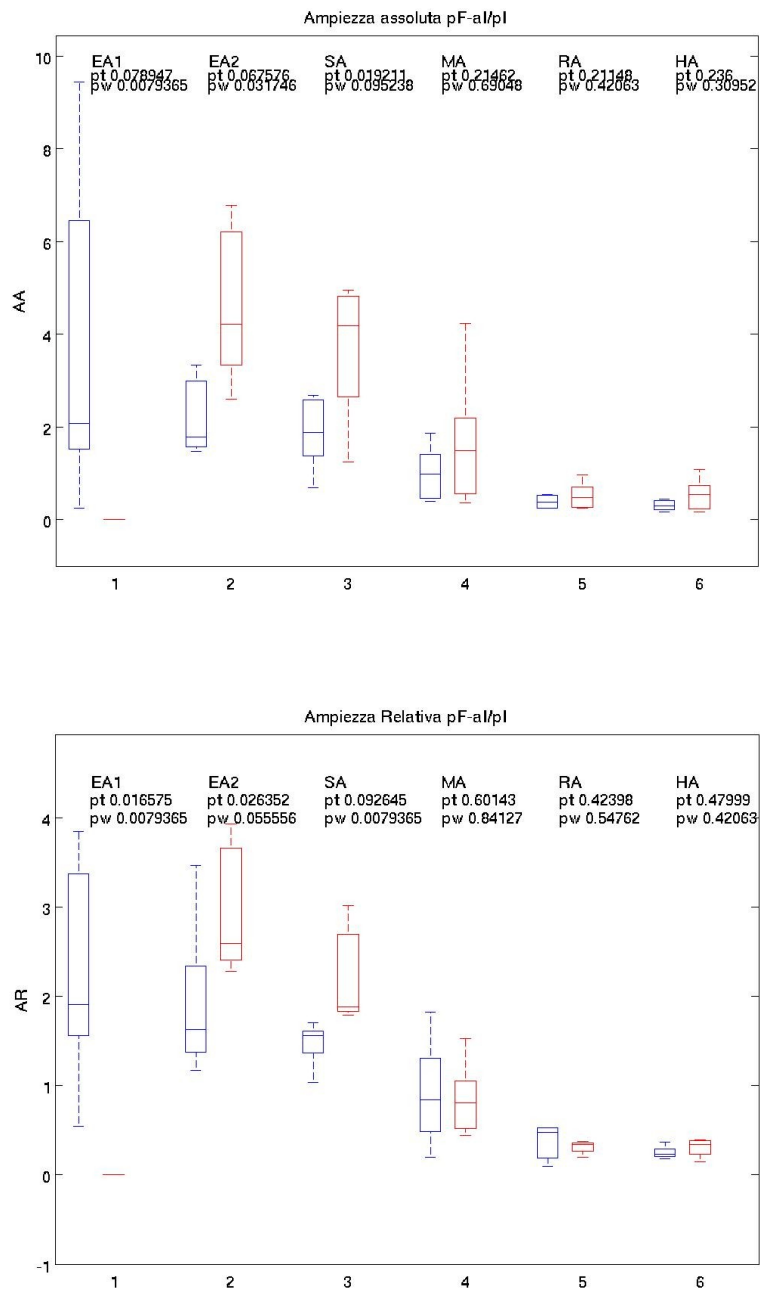


Figura 44: Boxplot di Ampiezza Assoluta e Relativa Post FREMS – Ante/Post PORH

5 Risultati e discussione

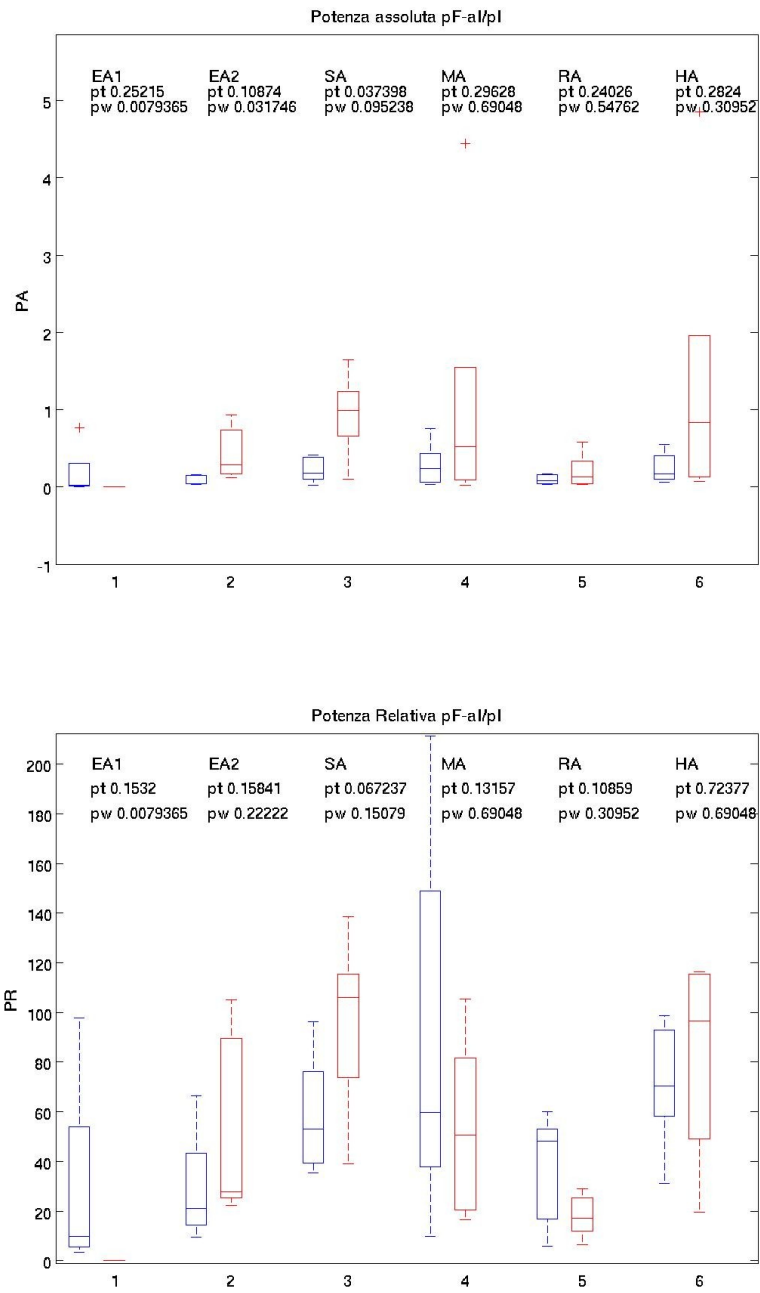


Figura 45: Boxplot di Potenza Assoluta e Relativa Post FREMS – Ante/Post PORH

Ante PORH – Ante/Post FREMS:

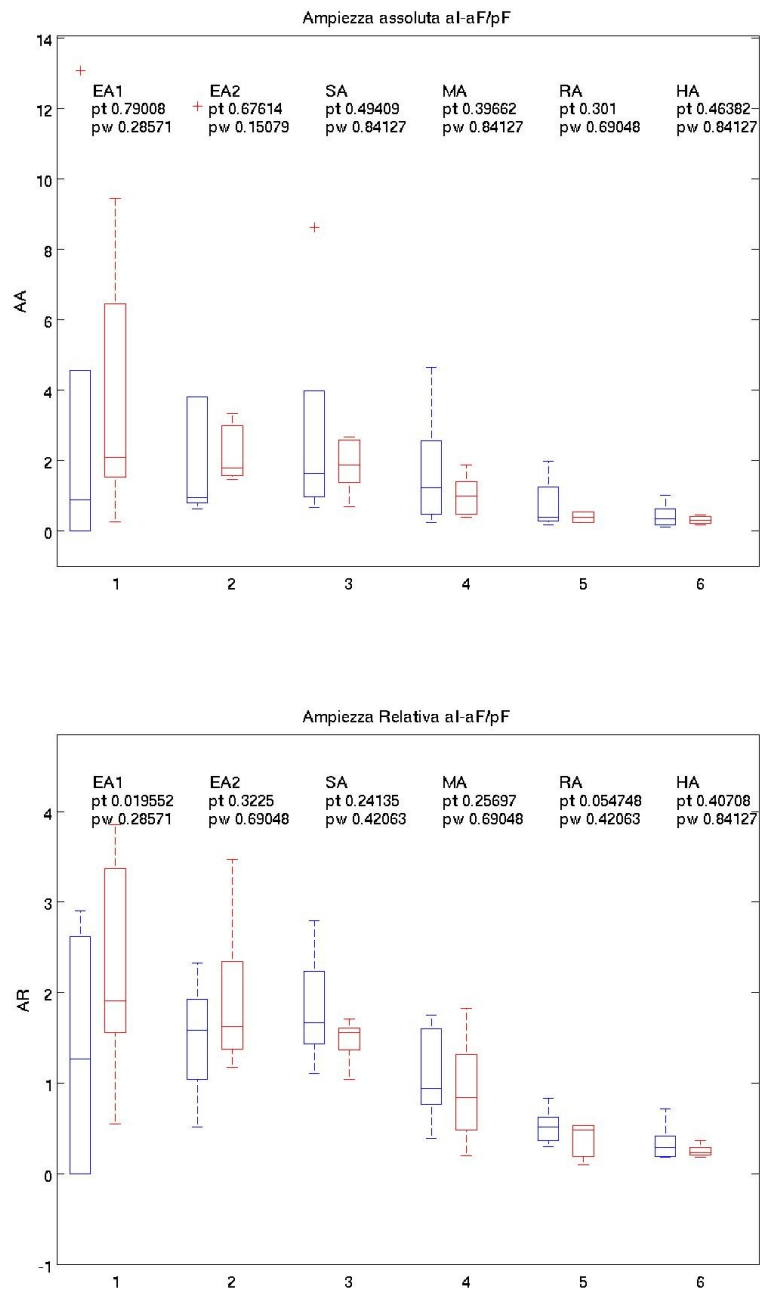


Figura 46: Boxplot di Ampiezza Assoluta e Relativa Ante PORH – Ante/Post FREMS

5 Risultati e discussione

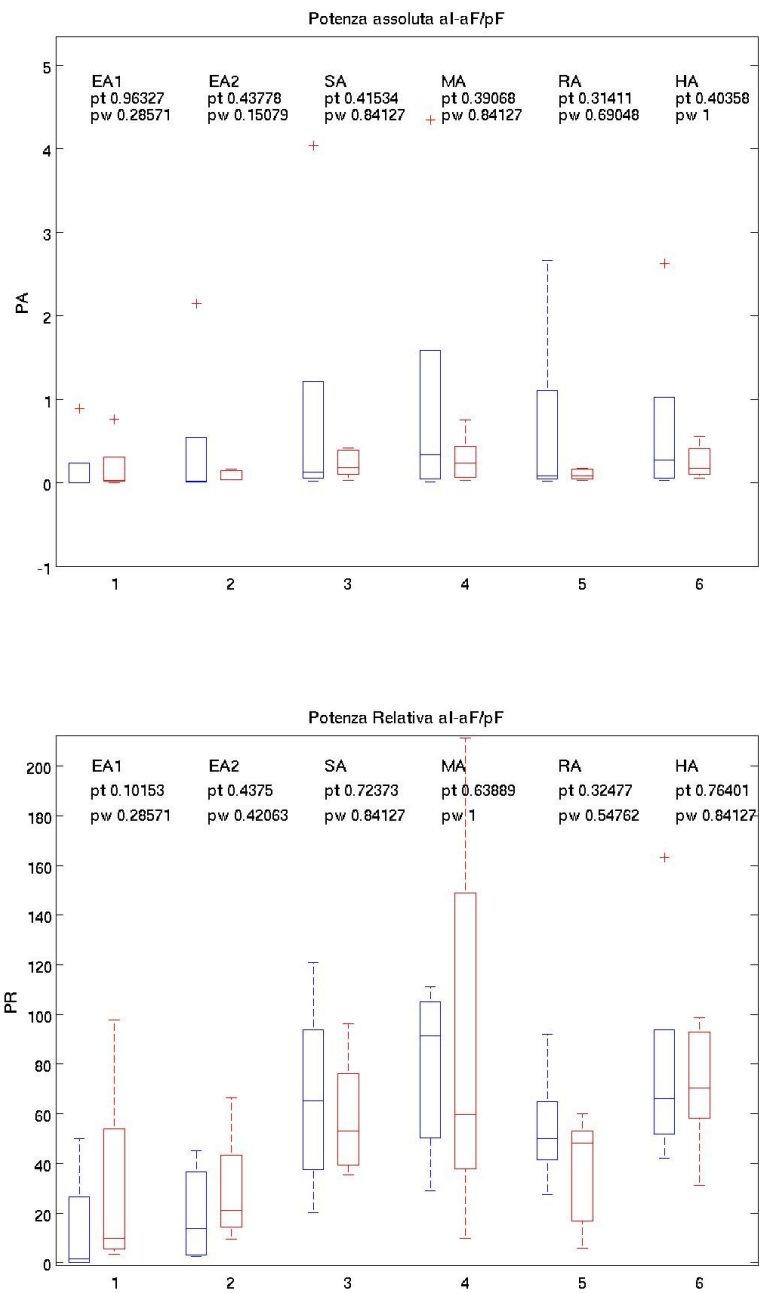


Figura 47: Boxplot di Potenza Assoluta e Relativa Ante PORH – Ante/Post FREMS

Post PORH – Ante/Post FREMS:

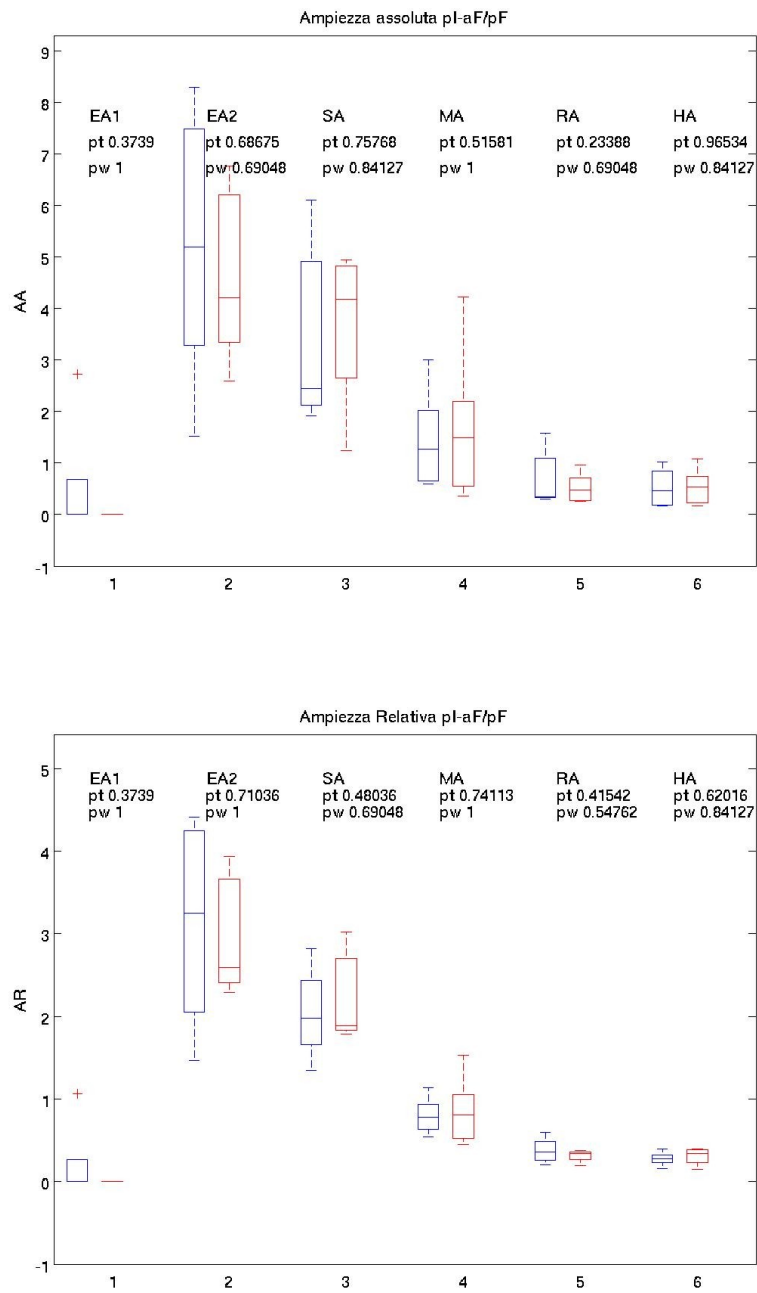


Figura 48: Boxplot di Ampiezza Assoluta e Relativa Post PORH – Ante/Post FREMS

5 Risultati e discussione

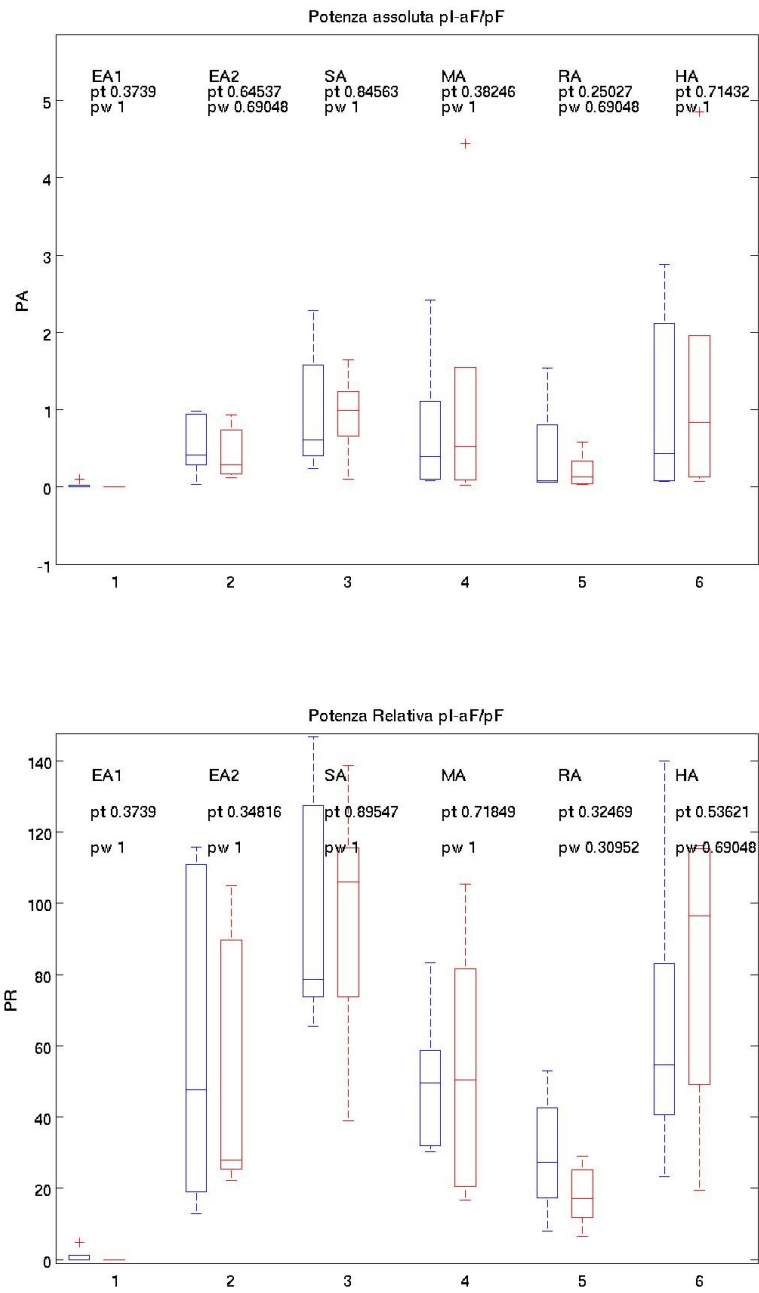


Figura 49: Boxplot di Potenza Assoluta e Relativa Post PORH – Ante/Post FREMS

Si possono così riassumere le differenze significative trovate confrontando i dati misurati nelle diverse condizioni (Tabella 5):

DIFFERENZE SIGNIFICATIVE (p -value < 0,05)

		Intervallo di frequenza	Parametro	p -value	Mediana		
					Ante	Post	$\Delta\%$
ante PORH	ante/dopo FREMS	Endoteliale NO-indipendente	<i>Ampiezza Relativa</i>	0.019*	1.27	1.91	50
		Endoteliale NO-dipendente	<i>Ampiezza Relativa</i>	0.0307*	1.58	3.25	105
ante FREMS	ante/dopo PORH	Respiratoria	<i>Potenza Relativa</i>	0.006*	50.05	27.36	-45
		Endoteliale NO-dipendente	<i>Ampiezza Assoluta</i>	0.0317**	1.78	4.21	136
		Neurogena		0.019*	1.87	4.18	123
dopo FREMS	ante/dopo PORH	Endoteliale NO-dipendente	<i>Ampiezza Relativa</i>	0.026*	1.63	2.59	59
		Neurogena		0.007**	1.56	1.88	21
		Endoteliale NO-dipendente	<i>Potenza Assoluta</i>	0.03**	0.04	0.29	604
		Neurogena		0.04*	0.18	0.99	456

Tabella 5: Differenze significative misurate in ampiezza e potenza (relative e/o assolute) prima e dopo FREMS, prima e dopo PORH, per i diversi intervalli di frequenza. * p -value calcolato con t -test e **con test di Wilcoxon.

Prima e dopo la terapia FREMS, le differenze sono significative comparando i valori di *Ampiezza Relativa* prima della prova PORH nell'intervallo di frequenza relativo all'attività endoteliale NO-indipendente, rilevando una differenza percentuale sulla mediana del 50%. Altre differenze significative si notano comparando i valori di *Potenza Relativa* e *Ampiezza Relativa* prima e dopo la

prova PORH, senza aver applicato il trattamento FREMS, e riguardano l'attività respiratoria e l'attività endoteliale NO-dipendente, caratterizzate da un decremento del 45% nel primo caso, e di un aumento del 105% nel secondo. Questo conferma il fatto che l'incremento del flusso sanguigno dovuto all'iperemia sollecita maggiormente l'attività delle cellule endoteliali NO-dipendente.

Dopo la somministrazione della terapia FREMS, si notano dei cambiamenti nell'attività delle cellule endoteliali NO-dipendente e in quella neurogena per quanto riguarda l'*Ampiezza Assoluta* (differenza percentuale del 136% e del 123%), *Ampiezza Relativa* (differenza percentuale del 59% e del 21%) e *Potenza Assoluta* (differenza percentuale del 604% e del 456%).

Nel loro insieme, questi risultati consentono di ipotizzare l'incremento di alcune attività vascolari a seguito della applicazione della terapia FREMS: in particolare, prima e dopo la prova di iperemia reattiva, si registrano variazioni importanti nelle bande associate alle attività endoteliale e neurogena.

5.2 Seconda parte: pazienti rivascularizzati

Di seguito sono riportati i risultati ottenuti dai pazienti affetti da PAOD e rivascularizzati.

Campione di 15 pazienti:

– **bnd=3**

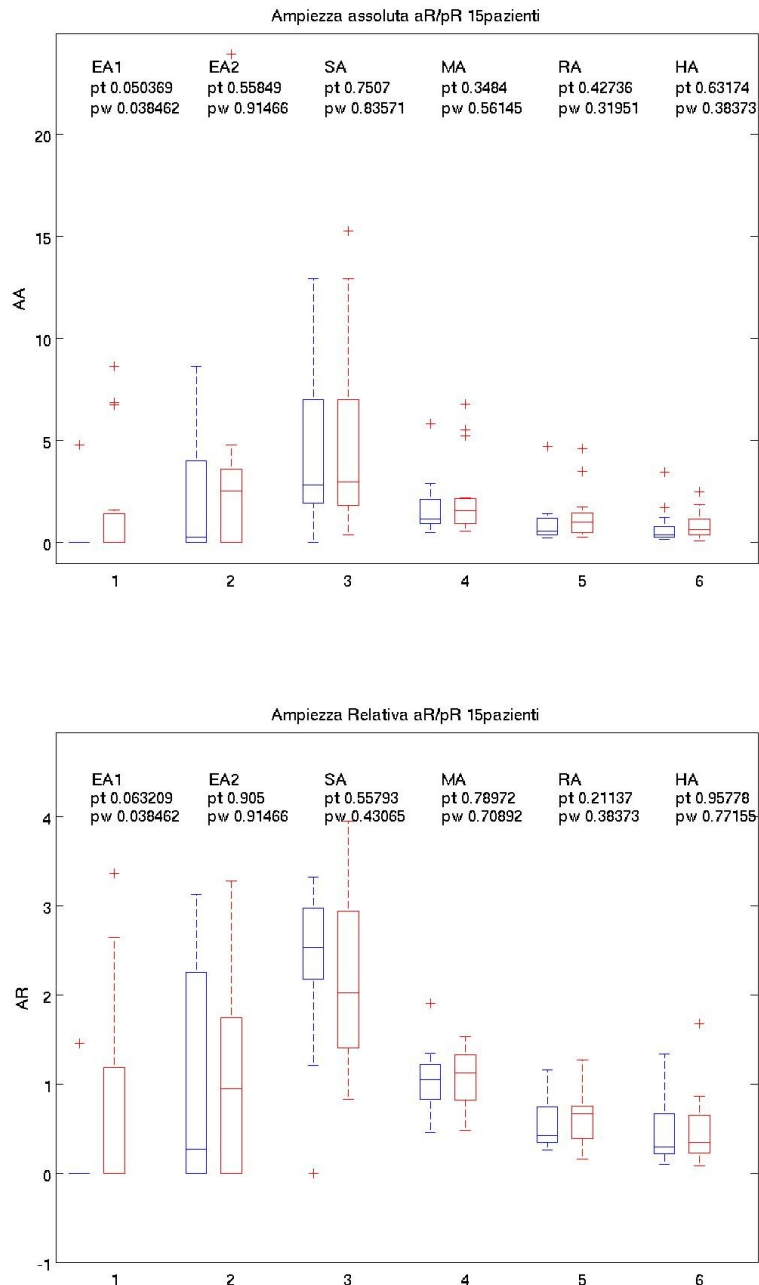


Figura 50: Boxplot di Ampiezza Assoluta e Relativa Ante/Post Rivascularizzazione (campione 15 pazienti, bnd=3)

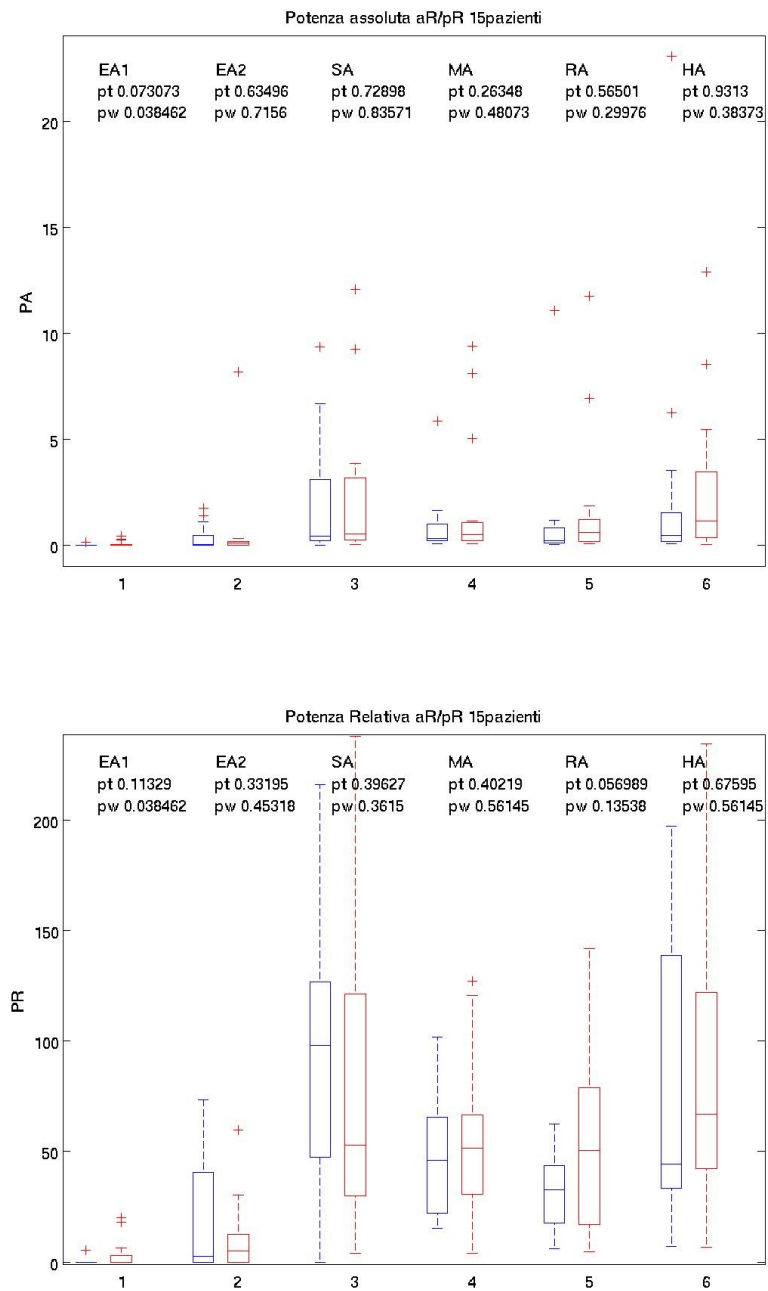


Figura 51: Boxplot di Potenza Assoluta e Relativa Ante/Post Rivascularizzazione (campione 15 pazienti, bnd=3)

In questa analisi non viene riscontrata nessuna differenza significativa (con un livello di significatività del 5%).

- bnd=2

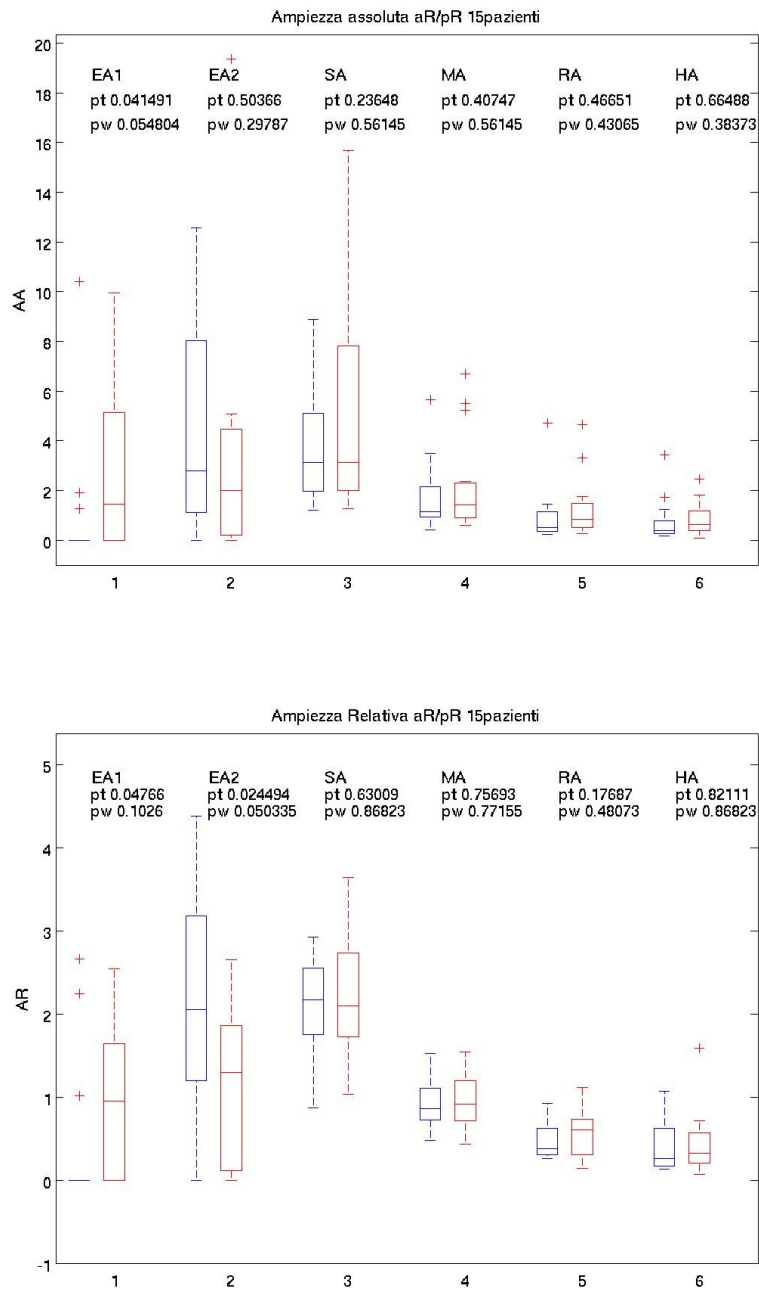


Figura 52: Boxplot di Ampiezza Assoluta e Relativa Ante/Post Rivascularizzazione (campione 15 pazienti, bnd=2)

5 Risultati e discussione

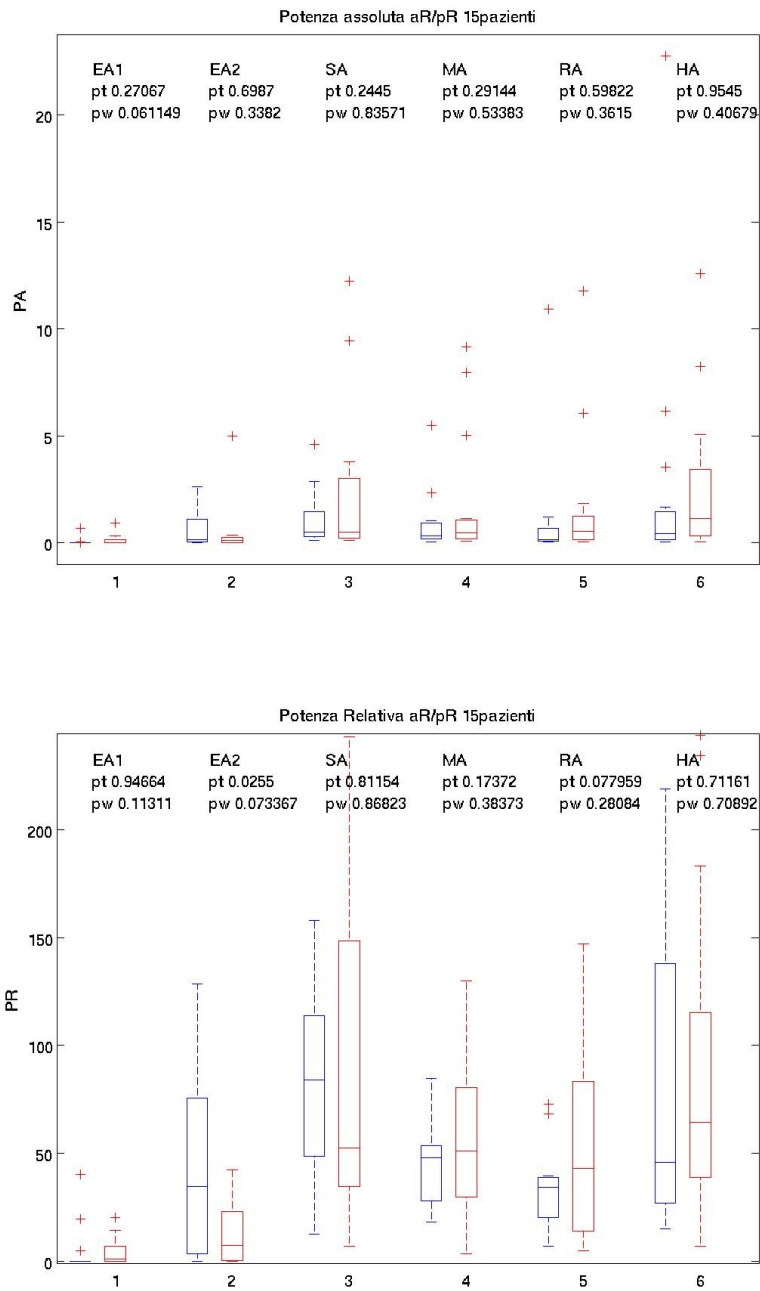


Figura 53: Boxplot di Potenza Assoluta e Relativa Ante/Post Rivascolarizzazione (campione 15 pazienti, $bnd=2$)

Da questi risultati si riscontrano solamente due differenze significative, entrambe misurate sulla banda di frequenza associata all'attività endoteliale dipendente da NO (Tabella 6):

DIFFERENZE SIGNIFICATIVE ($p\text{-value} < 0,05$)

<i>Intervallo di frequenza</i>	<i>Parametro</i>	<i>p-value</i>	<i>Ante</i>	<i>Mediana</i>	
				<i>Post</i>	$\Delta\%$
Endoteliale NO-dipendente	<i>Ampiezza Relativa</i>	0.024	2.05	1.30	-37
Endoteliale NO-dipendente	<i>Potenza Relativa</i>	0.026	34.60	7.38	-79

Tabella 6: Differenze significative misurate in ampiezza e potenza (relative e/o assolute) prima e dopo rivascolarizzazione, per i diversi intervalli di frequenza sul gruppo di 15 pazienti. p-value calcolato con t-test.

Per quanto concerne i parametri di *Ampiezza e Potenza Relativa*, si nota la presenza di *p-value* inferiori a 0.05 per l'intervallo di frequenza compreso tra 0.0095 e 0.021 Hz, relativo all'attività endoteliale dipendente da NO con un decremento percentuale del 37% e del 79% rispettivamente: ciò suggerisce che l'intervento di rivascolarizzazione subito dai pazienti sfavorisca l'attività delle cellule endoteliali non dipendente da NO.

L'indagine è stata successivamente estesa, aggiungendo dati provenienti da altri 5 pazienti. Di seguito sono evidenziati i risultati ottenuti.

Campione di 20 pazienti

- **bnd=2**

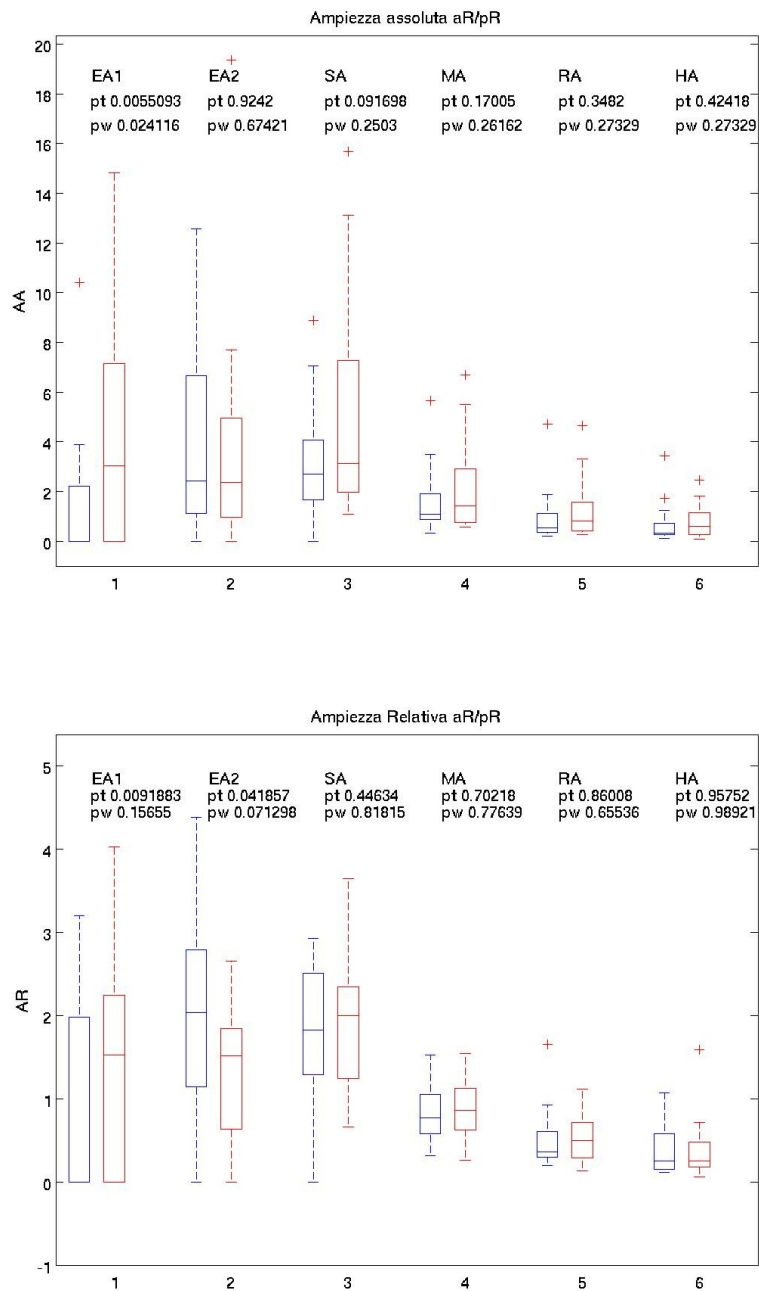


Figura 54: Boxplot di Ampiezza Assoluta e Relativa Ante/Post Rivascolarizzazione (campione 20 pazienti, bnd=2)

5 Risultati e discussione

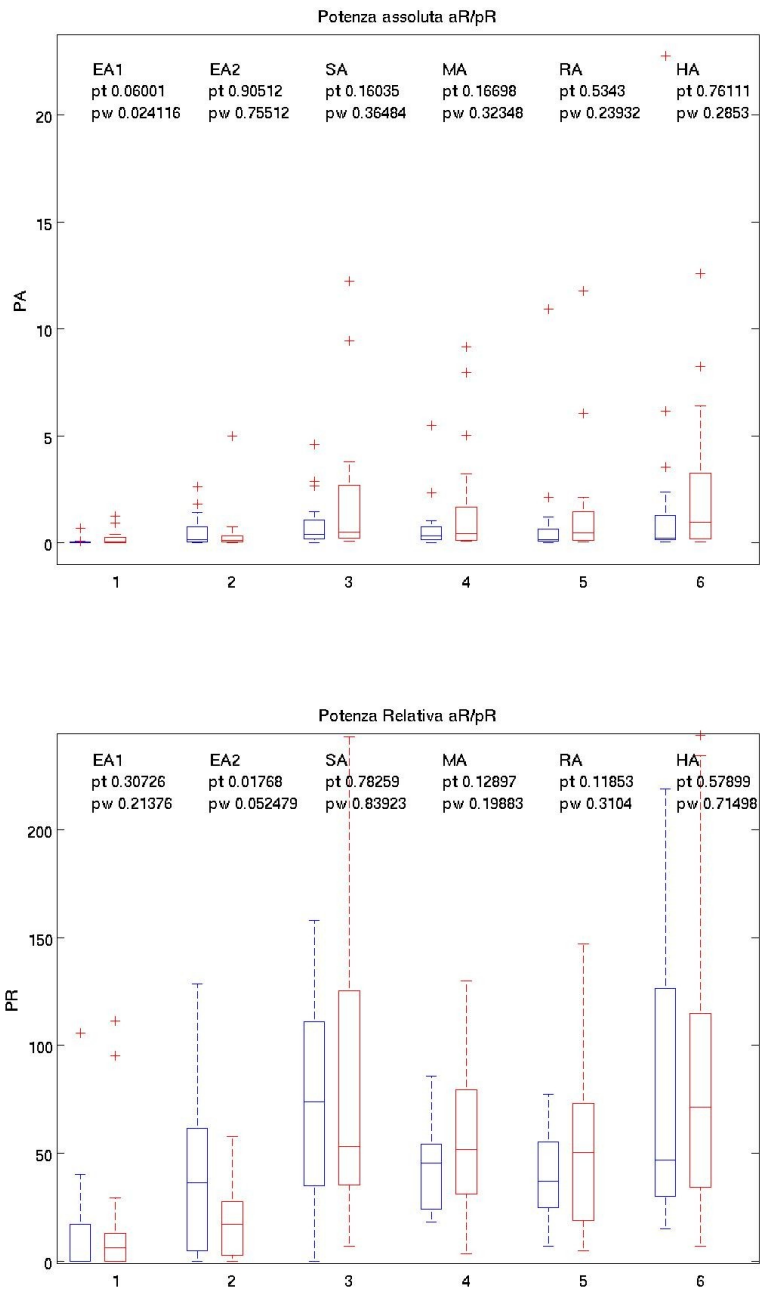


Figura 55: Boxplot di Potenza Assoluta e Relativa Ante/Post Rivascularizzazione (campione 20 pazienti, $bnd=2$)

L'estensione del gruppo di pazienti permette di confermare i risultati precedentemente acquisiti: si rilevano infatti alcune differenze significative, negli stessi intervalli di frequenza e osservando i medesimi parametri dell'analisi svolta precedentemente sul campione di 15 pazienti (Tabella 7).

DIFFERENZE SIGNIFICATIVE (p -value < 0,05)

<i>Intervallo di frequenza</i>	<i>Parametro</i>	<i>p-value</i>	<i>Mediana</i>		
			<i>Ante</i>	<i>Post</i>	$\Delta\%$
Endoteliale NO-dipendente	<i>Ampiezza Relativa</i>	0.042	2.03	1.52	-25
Endoteliale NO-dipendente	<i>Potenza Relativa</i>	0.018	36.48	16.90	-54

Tabella 7: Differenze significative misurate in ampiezza e potenza (relative e/o assolute) prima e dopo rivascolarizzazione, per i diversi intervalli di frequenza sul gruppo di 20 pazienti. p -value calcolato con t -test.

L'osservazione della tabella ed in particolare dei parametri di *Ampiezza Relativa* e *Potenza Relativa* suggerisce che la procedura di rivascolarizzazione sfavorisca l'attività endoteliale NO-dipendente: i p -value ottenuti dall'analisi statistica hanno un valore inferiore al 5%, e la differenza percentuale tra le mediane nella condizione Ante e Post rivascolarizzazione risulta pari a -25% e -54% rispettivamente.

In Appendice sono riportati di dati analitici di tutti i 20 pazienti rivascolarizzati calcolati in termini di *Ampiezza* e *Potenza Assolute* e *Relative* per ogni FB.

Spettri medi a confronto (campione di 20 pazienti, bnd=2)

Come spiegato nel Paragrafo 4.5.5, in questa parte del lavoro sono stati osservati i valori di *Ampiezza e Potenza Assolute e Relative*, mediati sugli spettri calcolati per tutti i 20 pazienti confrontando i risultati trovati prima e dopo l'intervento di rivascolarizzazione. Di seguito sono presentati i grafici prodotti.

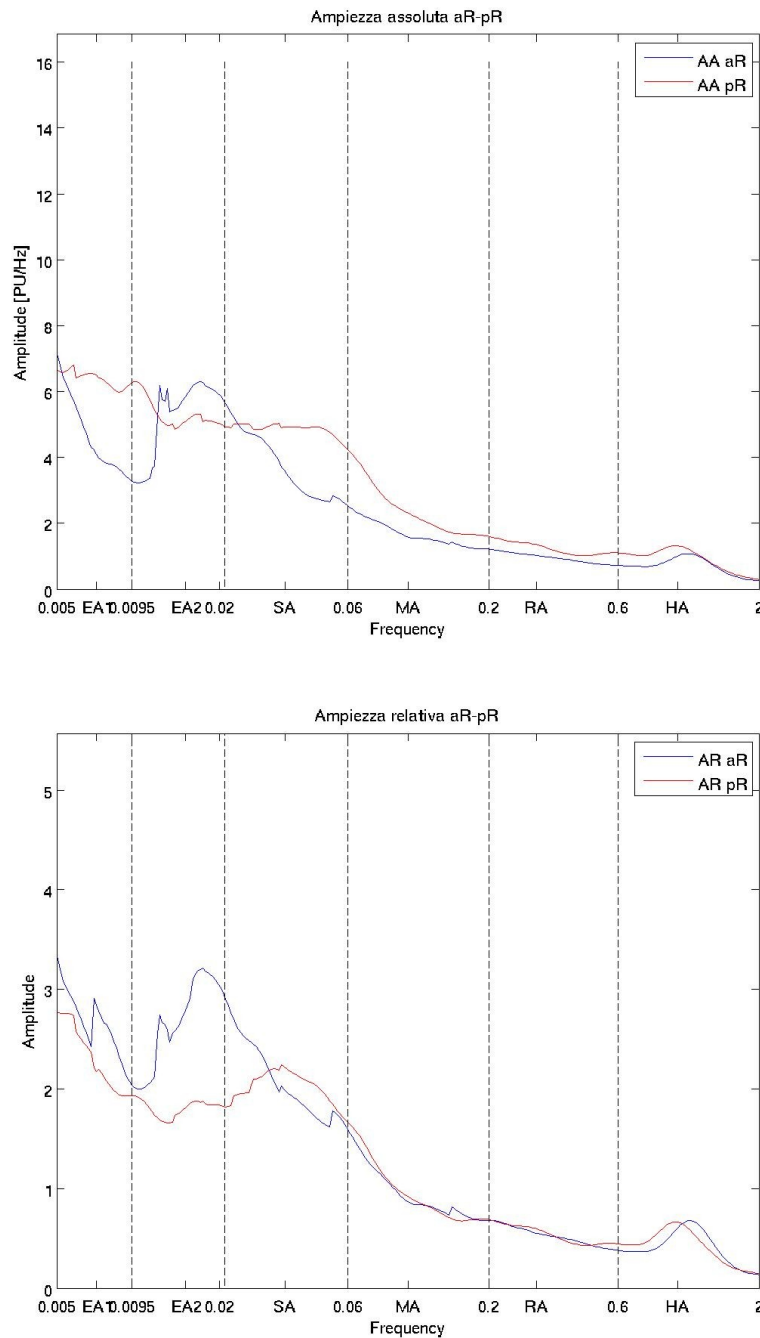


Figura 56: Spettri medi di Ampiezza Assoluta e Relativa nella condizione Ante (blu) e Post (rosso) rivascolarizzazione.

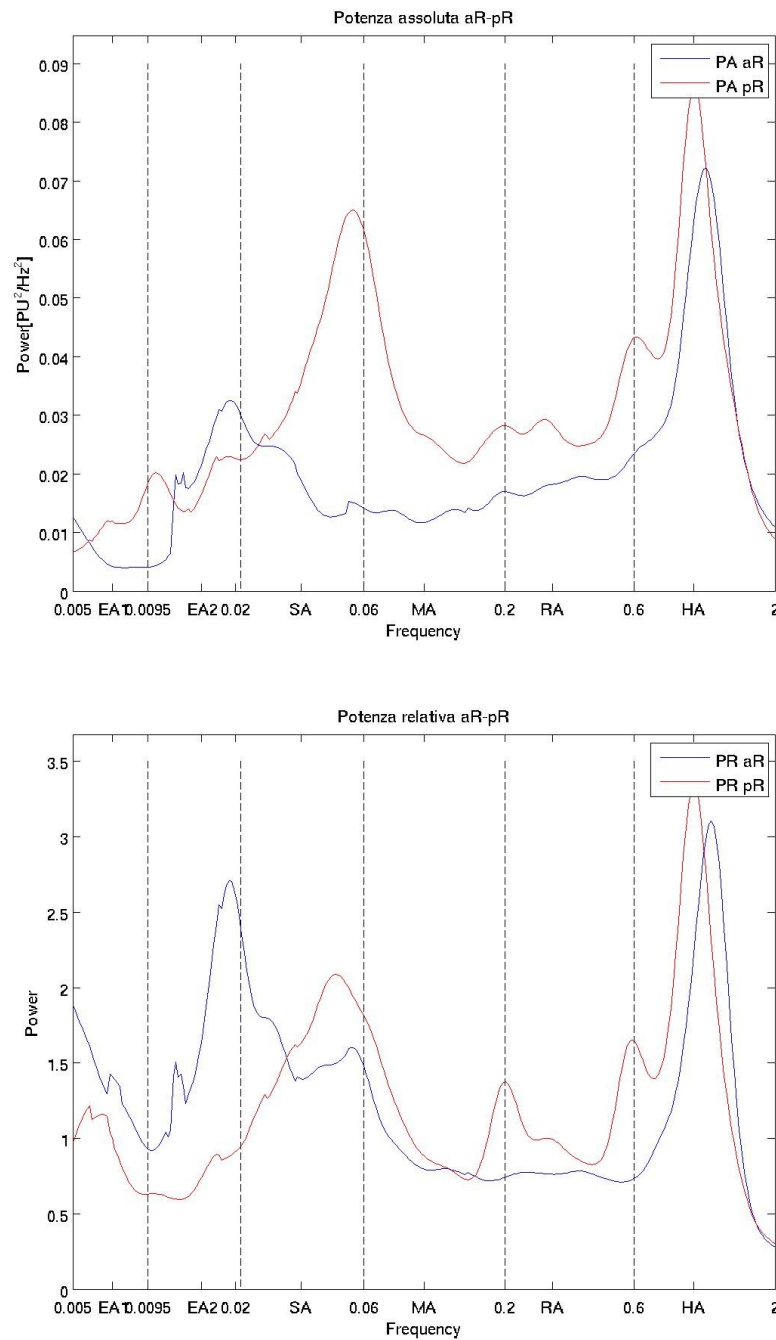


Figura 57: Spettri medi di Potenza Assoluta e Relativa nella condizione Ante (blu) e Post (rosso) rivascularizzazione.

I risultati suggeriscono che la procedura di rivascularizzazione provochi cambiamenti nella distribuzione delle componenti in frequenza, probabilmente correlati alle variazioni del contributo delle diverse attività vascolari nella *vasomotion*. Come si può notare dai grafici appena riportati, il confronto ante- e post-rivascularizzazione tra gli spettri medi di ampiezza e di potenza, evidenzia

uno *shift* laterale delle componenti in frequenza prevalenti. Ciò autorizza ad ipotizzare un cambiamento nel meccanismo di controllo della *vasomotion*, che dalla banda endoteliale si sposta verso la banda neurogena.

6 Conclusioni

Il segnale acquisito attraverso la tecnica LDF (*Laser Doppler Flowmetry*) è un indicatore del livello di perfusione cutanea, espresso in unità di misura arbitrarie (PU, *perfusion unit*); esso presenta un andamento oscillatorio che prende il nome di *flowmotion* e risulta indicativo del livello di funzionamento della complessiva attività vascolare. Con l'analisi in frequenza è possibile identificare le componenti oscillatorie presenti all'interno del segnale acquisito. La letteratura suggerisce di associare diversi intervalli di frequenza a diverse attività di un preciso distretto anatomico, in particolare l'attività cardiaca, respiratoria, miogena, neurogena, endoteliale NO-dipendente ed endoteliale NO-indipendente.

Si è visto come l'analisi in frequenza di tipo multidimensionale ottenuto mediante la trasformata Wavelet, sia adatta all'elaborazione di segnali come quello di perfusione cutanea: permette infatti di localizzare temporalmente le diverse componenti in frequenza rilevate con un adeguato compromesso tra la risoluzione nel tempo e nella frequenza.

Il segnale è stato elaborato per permettere una corretta analisi con la trasformata Wavelet, essendo ripulito da eventuali artefatti da movimento. Sono stati successivamente visualizzati gli spettri di *Potenza e Ampiezza* e sono state fatte alcune analisi di tipo statistico sui risultati ottenuti.

Nel presente lavoro di tesi sono stati analizzati pazienti affetti da vasculopatia periferica occlusiva: in primo luogo si sono trattati pazienti non rivascolarizzabili, sottoposti a terapia FREMS e alla prova di iperemia reattiva post-occlusiva; in seconda battuta sono stati elaborati segnali provenienti da soggetti che hanno subito una procedura di rivascolarizzazione. L'analisi effettuata aveva lo scopo di evidenziare eventuali variazioni delle attività vascolari, valutando le differenze prima e dopo l'applicazione della terapia FREMS (prima e dopo la prova PORH), e prima e dopo l'intervento di rivascolarizzazione.

I risultati ottenuti dall'analisi statistica suggeriscono diverse considerazioni. Per quanto riguarda la prima parte, si può affermare che indipendentemente dal trattamento FREMS, dopo l'applicazione della PORH vengono stimulate le cellule endoteliali NO-dipendenti, mentre dopo il trattamento FREMS si nota un incremento anche dell'attività neurogena; vi è inoltre una variazione nella stimolazione del sistema nervoso autonomo relativo all'attività respiratoria prima della terapia FREMS e un aumento dell'attività delle cellule endoteliali non dipendenti da NO prima dell'iperemia.

In merito all'indagine effettuata su pazienti prima e dopo la procedura di rivascolarizzazione,

viene evidenziata una variazione nella stimolazione dell'attività endoteliale NO-dipendente. Osservando gli spettri dell'Ampiezza e della Potenza mediati tra quelli di tutti i pazienti analizzati, si notano delle variazioni nella distribuzione delle frequenze, causati probabilmente da cambiamenti nel meccanismo di controllo della *vasomotion*: tutto ciò è sottolineato da uno *shift* dello spettro che dalla banda endoteliale si sposta verso la banda neurogena.

In futuro sarà utile aumentare la durata delle acquisizioni in modo tale da indagare con più precisione anche le frequenze più lente, come quelle associate all'attività endoteliale. Sarà inoltre interessante estendere l'analisi ad un numero maggiore di pazienti in modo tale da incrementare la significatività statistica dei risultati.

Appendice

AMPIEZZA ASSOLUTA						
Ante-Rivascolarizzazione (aR)						
	<i>Endoteliale NO-indipendente</i>	<i>Endoteliale NO-dipendente</i>	<i>Neurogena</i>	<i>Miogena</i>	<i>Respiratoria</i>	<i>Cardiaca</i>
Paziente 1	-	0,96	2,85	1,74	1,44	1,71
Paziente 2	-	9,87	7,04	3,49	1,45	0,60
Paziente 3	10,42	8,03	5,33	2,18	1,08	0,61
Paziente 4	1,91	2,06	1,59	0,66	0,32	0,28
Paziente 5	-	8,84	6,61	1,36	0,86	0,35
Paziente 6	1,27	3,36	3,12	0,92	0,48	0,31
Paziente 7	-	5,33	3,68	1,15	0,47	0,27
Paziente 8	-	1,01	2,56	0,92	0,31	0,84
Paziente 9	-	12,58	4,49	2,20	0,92	0,38
Paziente 10	-	-	1,20	2,10	1,16	1,25
Paziente 11	-	-	1,90	0,92	0,37	0,17
Paziente 12	-	2,80	2,19	0,41	0,22	0,20
Paziente 13	-	8,02	8,88	5,64	4,70	3,42
Paziente 14	-	1,45	1,72	0,99	0,51	0,20
Paziente 15	-	2,08	3,54	1,10	0,38	0,62
Paziente 16	2,53	2,01	1,06	0,53	0,31	0,25
Paziente 17	3,87	3,94	3,41	1,45	0,78	0,29
Paziente 18	3,22	1,22	0,49	0,32	0,20	0,12
Paziente 19	3,50	3,64	1,83	0,80	0,54	0,25
Paziente 20	-	-	-	1,09	1,89	1,01
<i>Mediana_aR</i>	-	2,44	2,70	1,09	0,53	0,33
Post-Rivascolarizzazione (pR)						
	<i>Endoteliale NO-indipendente</i>	<i>Endoteliale NO-dipendente</i>	<i>Neurogena</i>	<i>Miogena</i>	<i>Respiratoria</i>	<i>Cardiaca</i>
Paziente 1	-	1,94	8,04	5,24	4,64	2,47
Paziente 2	3,30	2,72	4,10	2,37	1,44	0,68
Paziente 3	7,97	5,09	13,11	5,49	1,50	1,19
Paziente 4	5,60	4,07	2,64	1,20	0,44	1,10
Paziente 5	1,45	1,99	3,21	2,15	1,09	1,10
Paziente 6	3,73	4,61	8,40	1,81	0,35	0,39
Paziente 7	9,95	19,35	15,68	6,68	3,32	1,61
Paziente 8	-	1,66	2,02	0,59	0,27	0,12
Paziente 9	-	-	2,00	1,42	0,72	0,41
Paziente 10	-	-	1,91	0,82	0,83	1,83
Paziente 11	-	-	1,27	0,71	0,65	0,42
Paziente 12	-	0,76	3,14	0,66	0,26	0,23
Paziente 13	-	-	7,17	1,50	1,06	0,63
Paziente 14	2,15	3,06	1,83	1,42	0,80	0,09
Paziente 15	7,09	4,81	2,96	1,25	1,74	0,58
Paziente 16	2,80	1,87	1,18	0,55	0,41	0,25
Paziente 17	7,63	6,95	4,88	3,45	2,05	1,74
Paziente 18	4,42	1,20	1,08	0,59	0,32	0,12
Paziente 19	14,83	7,71	3,11	1,21	0,61	0,29
Paziente 20	7,22	6,96	7,36	3,97	1,66	1,06
<i>Mediana_pR</i>	3,05	2,35	3,12	1,42	0,82	0,60
<i>Δ% Mediana (pR-aR)/aR</i>	-	-3,54	15,52	29,67	55,05	81,67

AMPIEZZA RELATIVA						
Ante-Rivascolarizzazione (aR)						
	<i>Endoteliale NO-indipendente</i>	<i>Endoteliale NO-dipendente</i>	<i>Neurogena</i>	<i>Miogena</i>	<i>Respiratoria</i>	<i>Cardiaca</i>
Paziente 1	-	0,60	1,78	1,09	0,90	1,07
Paziente 2	-	2,89	2,06	1,02	0,43	0,17
Paziente 3	2,66	2,05	1,36	0,56	0,28	0,16
Paziente 4	2,24	2,42	1,87	0,77	0,38	0,33
Paziente 5	0,00	3,39	2,54	0,52	0,33	0,14
Paziente 6	1,01	2,68	2,48	0,73	0,38	0,25
Paziente 7	-	3,35	2,31	0,72	0,29	0,17
Paziente 8	-	1,07	2,71	0,97	0,33	0,88
Paziente 9	-	4,37	1,56	0,77	0,32	0,13
Paziente 10	-	-	0,87	1,52	0,84	0,90
Paziente 11	-	-	2,92	1,41	0,57	0,26
Paziente 12	-	3,27	2,56	0,48	0,26	0,23
Paziente 13	-	1,57	1,74	1,10	0,92	0,67
Paziente 14	-	1,83	2,17	1,24	0,64	0,26
Paziente 15	-	1,63	2,77	0,86	0,29	0,49
Paziente 16	2,87	2,29	1,21	0,60	0,35	0,29
Paziente 17	2,01	2,04	1,77	0,75	0,41	0,15
Paziente 18	3,20	1,21	0,48	0,31	0,20	0,11
Paziente 19	1,94	2,02	1,02	0,44	0,30	0,14
Paziente 20	-	-	-	0,96	1,65	0,88
Mediana_aR	-	2,03	1,83	0,77	0,36	0,25
Post-Rivascolarizzazione (pR)						
	<i>Endoteliale NO-indipendente</i>	<i>Endoteliale NO-dipendente</i>	<i>Neurogena</i>	<i>Miogena</i>	<i>Respiratoria</i>	<i>Cardiaca</i>
Paziente 1	-	0,47	1,93	1,26	1,12	0,59
Paziente 2	1,69	1,39	2,10	1,21	0,74	0,35
Paziente 3	1,53	0,98	2,51	1,05	0,29	0,23
Paziente 4	2,54	1,85	1,20	0,54	0,20	0,50
Paziente 5	0,95	1,30	2,09	1,40	0,71	0,72
Paziente 6	1,51	1,87	3,40	0,73	0,14	0,16
Paziente 7	1,36	2,65	2,15	0,92	0,45	0,22
Paziente 8	-	2,30	2,80	0,81	0,37	0,16
Paziente 9	-	-	2,17	1,54	0,78	0,45
Paziente 10	-	-	1,65	0,71	0,72	1,58
Paziente 11	-	-	2,05	1,14	1,05	0,68
Paziente 12	-	0,81	3,34	0,70	0,27	0,24
Paziente 13	-	-	3,64	0,76	0,54	0,32
Paziente 14	1,68	2,39	1,42	1,11	0,62	0,07
Paziente 15	2,46	1,67	1,03	0,44	0,61	0,20
Paziente 16	2,73	1,82	1,15	0,54	0,40	0,25
Paziente 17	2,02	1,84	1,29	0,91	0,54	0,46
Paziente 18	4,02	1,09	0,98	0,53	0,29	0,11
Paziente 19	3,15	1,64	0,66	0,26	0,13	0,06
Paziente 20	1,74	1,68	1,77	0,95	0,40	0,26
Mediana_pR	1,52	1,52	1,99	0,86	0,50	0,25
$\Delta\%$ Mediana (pR-aR)/aR	-	-25,42	9,06	12,06	36,60	-0,79

POTENZA ASSOLUTA						
Ante-Rivascolarizzazione (aR)						
	<i>Endoteliale NO-indipendente</i>	<i>Endoteliale NO-dipendente</i>	<i>Neurogena</i>	<i>Miogena</i>	<i>Respiratoria</i>	<i>Cardiaca</i>
Paziente 1	-	0,05	0,46	0,61	1,14	6,14
Paziente 2	-	1,80	2,88	2,35	1,19	0,85
Paziente 3	0,68	0,90	1,42	0,91	0,64	0,77
Paziente 4	0,03	0,06	0,12	0,09	0,06	0,18
Paziente 5	-	1,41	2,66	0,36	0,41	0,25
Paziente 6	0,02	0,15	0,49	0,18	0,14	0,20
Paziente 7	-	0,57	0,75	0,34	0,12	0,15
Paziente 8	-	0,02	0,31	0,20	0,05	1,67
Paziente 9	-	2,61	1,46	1,03	0,56	0,43
Paziente 10	-	-	0,30	0,94	0,67	3,53
Paziente 11	-	-	0,24	0,16	0,08	0,06
Paziente 12	-	0,16	0,27	0,04	0,03	0,08
Paziente 13	-	1,16	4,61	5,50	10,94	22,78
Paziente 14	-	0,04	0,16	0,19	0,16	0,10
Paziente 15	-	0,13	0,61	0,29	0,08	0,87
Paziente 16	0,03	0,05	0,06	0,07	0,06	0,16
Paziente 17	0,08	0,20	0,61	0,47	0,34	0,19
Paziente 18	0,09	0,03	0,01	0,02	0,02	0,03
Paziente 19	0,06	0,17	0,19	0,12	0,17	0,13
Paziente 20	-	-	0,00	0,57	2,15	2,38
<i>Mediana_aR</i>	-	0,14	0,39	0,31	0,16	0,23
Post-Rivascolarizzazione (pR)						
	<i>Endoteliale NO-indipendente</i>	<i>Endoteliale NO-dipendente</i>	<i>Neurogena</i>	<i>Miogena</i>	<i>Respiratoria</i>	<i>Cardiaca</i>
Paziente 1	-	0,19	3,20	5,02	11,78	12,60
Paziente 2	0,10	0,10	0,82	1,14	1,24	1,13
Paziente 3	0,33	0,37	9,45	7,97	1,23	3,59
Paziente 4	0,17	0,22	0,36	0,34	0,13	2,95
Paziente 5	0,01	0,05	0,52	0,88	0,60	2,55
Paziente 6	0,08	0,28	3,81	0,80	0,08	0,33
Paziente 7	0,93	4,99	12,25	9,18	6,06	5,06
Paziente 8	-	0,05	0,21	0,08	0,05	0,03
Paziente 9	-	-	0,22	0,43	0,30	0,31
Paziente 10	-	-	0,24	0,12	0,40	8,24
Paziente 11	-	-	0,11	0,09	0,23	0,39
Paziente 12	-	0,03	0,52	0,13	0,03	0,11
Paziente 13	-	-	2,48	0,57	0,64	0,81
Paziente 14	0,03	0,11	0,20	0,47	0,55	0,03
Paziente 15	0,26	0,31	0,51	0,36	1,85	1,43
Paziente 16	0,04	0,05	0,08	0,07	0,11	0,17
Paziente 17	0,41	0,59	1,14	2,20	2,13	6,39
Paziente 18	0,17	0,03	0,08	0,08	0,07	0,05
Paziente 19	1,24	0,75	0,52	0,32	0,23	0,18
Paziente 20	0,27	0,65	2,88	3,21	1,71	2,58
<i>Mediana_pR</i>	0,06	0,11	0,52	0,45	0,48	0,97
<i>Δ% Mediana (pR-aR)/aR</i>	-	-19,98	33,95	43,08	189,99	326,34

POTENZA RELATIVA						
Ante-Rivascolarizzazione (aR)						
	<i>Endoteliale NO-indipendente</i>	<i>Endoteliale NO-dipendente</i>	<i>Neurogena</i>	<i>Miogena</i>	<i>Respiratoria</i>	<i>Cardiaca</i>
Paziente 1	-	1,60	14,98	19,73	36,79	199,02
Paziente 2	-	59,45	94,95	77,41	39,37	28,13
Paziente 3	40,24	53,58	84,16	53,87	38,14	45,95
Paziente 4	19,59	34,60	73,78	51,72	34,28	107,33
Paziente 5	-	83,58	158,07	21,20	24,33	15,12
Paziente 6	4,85	39,79	132,77	47,76	38,83	54,61
Paziente 7	-	87,08	114,85	51,28	18,75	22,28
Paziente 8	-	2,13	40,97	25,96	6,78	219,00
Paziente 9	-	128,37	71,87	50,63	27,44	21,36
Paziente 10	-	-	12,55	39,05	27,96	146,69
Paziente 11	-	-	110,44	75,42	37,46	26,40
Paziente 12	-	81,17	138,51	18,14	13,31	42,69
Paziente 13	-	7,21	28,81	34,35	68,33	142,23
Paziente 14	-	16,82	73,81	84,67	72,90	44,24
Paziente 15	-	18,27	87,84	42,11	11,64	124,81
Paziente 16	26,72	43,21	52,56	54,60	49,53	128,31
Paziente 17	14,35	36,98	111,27	85,83	61,93	35,57
Paziente 18	105,80	35,98	15,30	22,48	25,12	32,15
Paziente 19	22,99	63,46	70,34	43,29	60,63	47,99
Paziente 20	-	-	-	20,49	77,47	85,79
<i>Mediana_aR</i>	-	36,48	73,79	45,52	37,12	46,97
Post-Rivascolarizzazione (pR)						
	<i>Endoteliale NO-indipendente</i>	<i>Endoteliale NO-dipendente</i>	<i>Neurogena</i>	<i>Miogena</i>	<i>Respiratoria</i>	<i>Cardiaca</i>
Paziente 1	-	1,61	26,83	42,02	98,64	105,51
Paziente 2	7,05	7,38	58,43	81,27	87,85	80,00
Paziente 3	5,45	5,96	153,98	129,87	20,12	58,43
Paziente 4	14,24	18,53	29,82	28,28	10,37	243,68
Paziente 5	1,01	3,66	37,15	63,57	42,92	183,32
Paziente 6	4,87	17,59	243,21	51,08	4,92	21,23
Paziente 7	7,89	42,13	103,44	77,51	51,18	42,71
Paziente 8	-	36,95	147,19	52,52	33,32	22,61
Paziente 9	-	-	44,70	89,56	61,40	64,42
Paziente 10	-	-	6,72	3,52	11,42	234,38
Paziente 11	-	-	33,54	26,80	69,42	116,04
Paziente 12	-	9,03	178,77	44,19	11,94	37,35
Paziente 13	-	-	149,04	34,03	38,32	48,84
Paziente 14	7,07	30,75	52,58	124,83	147,13	6,85
Paziente 15	20,12	24,51	40,28	28,37	145,86	112,66
Paziente 16	29,41	34,06	54,60	50,64	76,76	113,35
Paziente 17	11,14	16,22	31,30	60,44	58,48	175,75
Paziente 18	111,29	17,58	53,98	54,17	49,75	31,23
Paziente 19	95,21	57,82	40,17	24,69	17,55	13,53
Paziente 20	8,22	19,77	87,29	97,38	51,92	78,43
<i>Mediana_pR</i>	6,25	16,90	53,28	51,80	50,47	71,43
<i>Δ% Mediana (pR-aR)/aR</i>	-	-53,67	-27,80	13,79	35,94	52,08

Bibliografia

- [1] M. Intaglietta, “Vasomotion and flowmotion: physiological mechanisms and clinical evidence”, *Vasc Med*, 1990, 101 – 112.
- [2] R. M. Koeppen, R. M. Berne, M. N. Levy and A. B. Stanton, *Physiology Fifth Edition*. Copyright Elsevier., 2005.
- [3] W. F. Ganong, *Review of medical physiology*, McGraw Hill, 22th ed., 2001.
- [4] T. W. Jones, “Discovery that the veins of the bat’s wing are endowed with rhythmical contractility and that onward flow of blood is accelerated by each contraction”, *Trans R Soc*, 1852, 142: 131 – 136.
- [5] A. Colantuoni, S. Bertuglia, M. Intaglietta, “Quantitation of rhythmic diameter changes in arterial microcirculation”, *American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology*, 1984, Vol. 245 no. H508-H517.
- [6] B. Fagrell, M. Intaglietta, and J. Östergren, “Relative hematocrit in human skin capillaries and its relation to capillary blood flow velocity”, *Microvascular Research*, 1980, 20: 327 – 335.
- [7] M. Bracic and A. Stefanovska, “Wavelet-based analysis of human blood-flow dynamics”, *Bulletin of Mathematical Biology*, 1998, 60: 919 – 935.
- [8] J. K. Li, *Dynamics of the Vascular System*. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., Feb 2004.
- [9] A. Stefanovska and P. Kroelj, “Correlation integral and frequency analysis of cardiovascular functions”, *Open Systems and Information Dynamics archive*, 1997, 4.
- [10] M. E. Muck-Weymann, H. P. Albrecht, A. Hager, D. Hiller, O. P. Hornstein, and R. D. Bauer, “Respiratory-dependent laser doppler flux motion in different skin areas and its meaning to autonomic nervous control of the vessels of the skin”, *Microvascular Research*, 1996, 52: 69 – 78.
- [11] P. Kvandal, S. A. Landsverk, A. Bernjak, A. Stefanovska, H. D. Kvernmo, and K. A. Kirkebøen, “Low-frequency oscillations of the laser doppler perfusion signal in human skin”, *Microvascular Research*, 2006, 72: 120 – 127.
- [12] T. Soderstrom, A. Stefanovska, M. Veber, and H. Svensson, “Involvement of sympathetic nerve activity in skin blood flow oscillations in humans”, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003, 284: H1638 – H1646.
- [13] H. D. Kvernmo, A. Stefanovska, K. A. Kirkebøen, and K. Kvernebo, “Oscillations in the human cutaneous blood perfusion signal modified by endothelium-dependent and endothelium-independent vasodilators”, *Microvascular Research*, 1999, 57: 298 – 309.
- [14] M. F. Swiontkowski, “Laser Doppler Flowmetry—Development and Clinical Application.” *The Iowa orthopaedic journal*, 1991, 11: 119-126.
- [15] C. M. Choi and R. G. Bennett, “Laser dopplers to determine cutaneous blood flow”, *Dermatol Surg*, 2003, 29.

- [16] D. Halliday, R. Resnick, and K. S. Kraner, *Fisica 2*. CEA, 3 ed., Jun 2004.
- [17] A. L. Schawlow and C. H. Townes, “Infrared and Optical Lasers”. *Phys. Review*, 1958, 112: 1940 – 1958.
- [18] T. H. Maiman, “Stimulated Optical Radiation in Ruby”. *Nature*, 1960, 187: 493 – 494.
- [19] C. Riva, B. Ross and G. B. Benedict, “Laser Doppler Measurements of Blood Flow in Capillary Tubes and Retinal Arteries”, *Invest. Ophthalmol.*, 1972, 11: 936 – 944.
- [20] M. D. Stern, P. D. Brown, R. Parma, R. W. Osgood, R. L. Bowman, and J. L. Stein, “Measurement of Renal Cortical and Medullary Blood Flow by Laser Doppler Spectroscopy in the Rat”, *Am. J. Physiol.*, 1979, 236: 680 – 687.
- [21] M. D. Stern, D. S. L. Lappe, P. D. Bowen, J. E. Chimosky, G. A. Holloway Jr, and J. H. Stein, “Continuous Measurement of Tissue Blood Flow by Laser Doppler Spectroscopy”, *Am. J. Physiol.*, 1977, 232(4): h447 – h448.
- [22] H. Albrecht, N. Damaschke, M. Borys, and C. Tropea, “Laser Doppler and Phase Doppler Measurement Techniques”, *Springer-Verlag*, 1 ed., Dec 2002.
- [23] S. Sarnik, I. Hofirek, and O. Sochor, “Laser doppler fluxmetry”, *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 2007, 151(1): 143 – 146.
- [24] M. Luise, G. Vitetta, et al., *Teoria dei segnali*, McGraw-Hill, 2009.
- [25] S. Qian and D. Chen, “Joint Time-Frequency Analysis, Methods and Applications”, *Academic Press*, Dec 2011.
- [26] S. Mallat, “A Wavelet tour of signal processing”, *Academic Press*, 3 ed., Dec 2008.
- [27] A. Stefanovska, M. Bracic, and H. D. Kvernmo, “Wavelet analysis of oscillations in the peripheral blood circulation measured by laser doppler technique”, *IEEE Transaction on Biomedical Engineering*, 1999, 46: 1230 – 1239.
- [28] D. Iatsenko, P. V. E. McClintock, and A. Stefanovska, “Linear and synchrosqueezed time-frequency representations revisited. Part I: Overview, standards of use, related issues and algorithms.”, *arXiv preprint arXiv:1310.7215*, 2013.
- [29] V. Ticcinelli, A. Bagno, and R. Martini. "Wavelet analysis of the Laser Doppler perfusion signal in patients with peripheral arterial disease before and after revascularisation", *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 2012.
- [30] M. Rossi, A. Carpi, F. Galetta, F. Franzoni, and G. Santoro, “The investigation of skin blood flowmotion: a new approach to study the microcirculatory impairment in vascular diseases?”, *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 2006, 60: 437 – 442.
- [31] I. V. Tikhonova, A. V. Tankanag, and N. K. Chemeris, “Time–amplitude analysis of skin blood flow oscillations during the post-occlusive reactive hyperemia in human”, *Microvascular Research*,

2010, 80: 58–649.

[32] M. Rossi, S. Bertuglia, M. Varanini, A. Giusti, G. Santoro, and A. Carpi, “Generalised Wavelet analysis of cutaneous flowmotion during post-occlusive reactive hyperaemia in patients with peripheral arterial obstructive disease”, *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 2005, 59: 233–239.

[33] J. A. Dormandy, R. B. Rutherford, “TransAtlantic Inter-Society Concensus (TASC), management of peripheral arterial disease (PAD)”, *J Vasc Surg*, 2000 , 31(1 part 2): S1–S287.

[34] L. Norgren, W. R. Hiatt, J. A. Dormandy, M. R. Nehler, K. A. Harris and F.G.R. Fowkes, “Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II)”, *Eur. J Vasc. Endovasc. Surg*, 2007, 33:S1-S70 TASC II.

[35] A. T. Hirsch, Z. J. Haskal, N. R. Hertzner, C. W. Bakal, M. A. Creager, J. L. Halperin et al., “ACC/AHA 2005 guidelines for the management of patients with peripheral arterial disease (lower extremity, renal, mesenteric, and abdominal aortic): Executive summary a collaborative report from the American Association for Vascular Surgery/Society for Vascular Surgery, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Society for Vascular Medicine and Biology, Society of Interventional Radiology, and the ACC/AHA Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Develop Guidelines for the Management of Patients With Peripheral Arterial Disease) endorsed by the American Association of Cardiovascular and Pulmonary Rehabilitation; National Heart, Lung, and Blood Institute; Society for Vascular Nursing; TransAtlantic Inter-Society Consensus; and Vascular Disease Foundation”, *J Am Coll Cardiol*, 2006, 47(6): 1239–1312.

[36] A. Venbrux, "Percutaneous prosthetic by-pass graft and method of use." *U.S. Patent*, 1995, 5: 443 – 497.

[37] P. W. Serruys, P. de Jaegere, F. Kiemeneij, et al. “A comparison of balloon-expandable-stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease”, *N Engl J Med*, 1994, 331:489 – 495.