



**Università degli Studi di Padova**

Facoltà di Ingegneria

Corso di Laurea Magistrale in Bioingegneria

tesi di laurea

# Analisi dell'emodinamica del microcircolo cutaneo tramite applicazione della trasformata wavelet

**Relatore:** Prof. Andrea Bagno  
**Correlatore:** Dott. Romeo Costanzo Martini

**Laureanda:** Valentina Ticcinelli

21 aprile 2012

---

# Sommario

L'analisi dell'emodinamica del microcircolo cutaneo può essere attuata mediante acquisizione del segnale di flussimetria laser Doppler (LDF). Tale segnale è caratterizzato da oscillazioni periodiche chiamate *flowmotion* la cui analisi spettrale permette di identificare cinque intervalli di frequenze assegnati ad altrettante attività fisiologiche: endoteliale, neurogena, miogena, respiratoria e cardiaca.

La presente tesi ha per obiettivo l'applicazione della trasformata *wavelet* al segnale LDF per identificare e quantificare il contributo delle diverse attività al variare della condizione microcircolatoria cutanea. Si sono pertanto considerati 3 soggetti sani come riferimento e 20 pazienti affetti da due diversi stadi di arteriopatia periferica (PAD): nei pazienti con PAD non critica, si sono confrontate le condizioni prima e dopo l'induzione di ischemia, mentre nei pazienti più gravi si sono confrontati i segnali acquisiti prima e dopo l'intervento di rivascolarizzazione.

Nel Capitolo 1 vengono presentati i concetti di *vasomotion* e *flowmotion* e la loro evoluzione storica, mentre nel Capitolo 2 vengono esposti i principi alla base della flussimetria laser Doppler. Nel Capitolo 3 si espongono le basi teoriche dell'analisi in frequenza: si discutono le caratteristiche che rendono inadatta la trasformata di Fourier all'analisi del segnale LDF, e si evidenzia come la trasformata *wavelet* sia lo strumento più adatto a questo scopo.

La parte sperimentale, con l'indicazione dei soggetti e dei pazienti, delle caratteristiche dello strumento utilizzato e del codice implementato è presentata nel Capitolo 4.

Il Capitolo 5 riporta i risultati ottenuti, mentre nel Capitolo 6 sono tracciate le conclusioni e suggerite alcune indicazioni per il proseguimento dell'attività di ricerca.

Nell'Appendice sono contenuti i codici di calcolo implementati.

---

# Indice

## Sommario

<b>1</b>	<b>Introduzione</b>	<b>1</b>
1.1	Il microcircolo . . . . .	2
1.1.1	Il sangue . . . . .	3
1.1.2	Grandezze fisiche . . . . .	5
1.1.3	I vasi . . . . .	8
1.1.4	Lo scambio capillare . . . . .	10
1.2	<i>Vasomotion</i> e <i>flowmotion</i> . . . . .	12
1.2.1	Lo sviluppo dei concetti di <i>vasomotion</i> e <i>flowmotion</i> . . . . .	12
1.2.2	La <i>vasomotion</i> . . . . .	14
1.2.3	La <i>flowmotion</i> . . . . .	20
<b>2</b>	<b>La Flussimetria Laser Doppler</b>	<b>23</b>
2.1	L'effetto Doppler . . . . .	24
2.1.1	Fondamenti storici . . . . .	24
2.1.2	Formulazione matematica . . . . .	25
2.2	Il Flussimetro Laser Doppler . . . . .	25
2.2.1	Principi di funzionamento . . . . .	27
2.3	Limiti della flussimetria laser Doppler . . . . .	29
<b>3</b>	<b>L'analisi in frequenza</b>	<b>31</b>
3.1	La trasformata di Fourier . . . . .	31
3.1.1	L'equazione . . . . .	32
3.1.2	Limiti della FT . . . . .	34
3.2	La trasformata di Fourier <i>Short Time</i> . . . . .	36
3.2.1	Limiti della STFT . . . . .	37
3.3	La trasformata <i>wavelet</i> . . . . .	38
3.3.1	La risoluzione tempo-frequenza . . . . .	38
3.3.2	L'equazione . . . . .	39
3.3.3	La <i>mother wavelet</i> . . . . .	40
3.3.4	La scala . . . . .	41
3.3.5	Lo scalogramma . . . . .	43

<b>4</b>	<b>Parte sperimentale</b>	<b>47</b>
4.1	I soggetti . . . . .	47
4.1.1	Risultati da letteratura dell'analisi <i>wavelet</i> su soggetti sani	48
4.1.2	L'arteriopatia periferica . . . . .	48
4.1.3	I pazienti con PAD II sottoposti a iperemia reattiva post-occlusiva	50
4.1.4	I pazienti con PAD III rivascolarizzati . . . . .	51
4.2	L'acquisizione del segnale LDF . . . . .	53
4.2.1	Caratteristiche dello strumento . . . . .	54
4.2.2	Il segnale . . . . .	54
4.2.3	Durata dell'acquisizione . . . . .	56
4.2.4	Artefatti da movimento . . . . .	57
4.3	Il codice . . . . .	58
4.3.1	Struttura funzionale del programma . . . . .	58
4.3.2	Caricamento dei dati . . . . .	58
4.3.3	Rimozione degli artefatti da movimento . . . . .	59
4.3.4	Scelta della scala . . . . .	61
4.3.5	Calcolo dello scalogramma . . . . .	63
4.3.6	<i>Ampiezza Assoluta, Ampiezza Media, Ampiezza Relativa</i> .	63
4.3.7	Esportazione dei risultati . . . . .	67
<b>5</b>	<b>Risultati e discussione</b>	<b>69</b>
5.1	Soggetti sani . . . . .	70
5.1.1	Immagini . . . . .	70
5.1.2	Tabelle . . . . .	73
5.1.3	<i>Boxplot</i> . . . . .	74
5.2	Pazienti con PAD in stadio II sottoposti a PORH . . . . .	75
5.2.1	Immagini . . . . .	75
5.2.2	Tabelle . . . . .	80
5.2.3	<i>Boxplot</i> . . . . .	82
5.3	Pazienti con PAD in stadio III rivascolarizzati . . . . .	83
5.3.1	Immagini . . . . .	83
5.3.2	Tabelle . . . . .	98
5.3.3	<i>Boxplot</i> . . . . .	100
5.4	Confronti tra le AR dei diversi gruppi . . . . .	101
5.5	Discussione . . . . .	104
<b>6</b>	<b>Conclusioni</b>	<b>107</b>
<b>A</b>	<b>Codice della <i>function spike_red</i></b>	<b>109</b>
<b>B</b>	<b>Codice del programma principale</b>	<b>113</b>
	<b>Bibliografia</b>	<b>117</b>

## **INDICE**

---

<b>Elenco delle tabelle</b>	<b>120</b>
<b>Elenco delle figure</b>	<b>122</b>





# Capitolo 1

## Introduzione

Il mantenimento di un'adeguata perfusione nei tessuti è il risultato di meccanismi di controllo che operano sia a livello sistemico che a livello dei microvasi. Essi sono attuati da un unico evento meccanico: la contrazione e il rilassamento del tessuto muscolare liscio presente nello strato centrale delle pareti vascolari [1].

Questo tipo di attuazione, dalle caratteristiche fortemente dinamiche, è la causa dell'andamento oscillatorio del flusso del microcircolo.

È possibile monitorare lo stato di perfusione cutanea mediante misure di flussimetria laser-doppler (LDF): il segnale che se ne ricava viene espresso in unità di perfusione (PU) e assume nel tempo un andamento tipicamente oscillatorio. Le oscillazioni del segnale, la loro entità e la loro frequenza dipendono dal singolo soggetto/paziente e dipendono, ovviamente, dalle condizioni locali di perfusione cutanea.

Grazie alla trasformata wavelet, dal segnale LDF si calcola il corrispondente spettro in frequenza (in  $PU^2 \cdot Hz$ ), all'interno del quale, secondo la corrente letteratura scientifica, si possono identificare cinque intervalli caratteristici (FB, frequency band) compresi tra 0.007 e 1.8  $Hz$ : a ciascun intervallo è attribuita una particolare attività fisiologica e/o di specifiche strutture anatomiche sui microvasi. In particolare, l'attività endoteliale è compresa tra 0.007-0.02  $Hz$ , l'attività neurogena tra 0.02-0.06  $Hz$ , l'attività miogena tra 0.06-0.2  $Hz$ , l'attività respiratoria tra 0.2-0.6  $Hz$ , ed infine l'attività cardiaca tra 0.6-1.8  $Hz$  (Tab. 1.1).

L'analisi dello spettro viene condotta per bande caratteristiche, dal momento che non si possono assegnare a singole frequenze le summenzionate attività. Si definiscono pertanto i seguenti parametri:

- *Ampiezza Media* dell'intero spettro. Per ogni spettro, ovviamente, esiste un unico valore di questo parametro, espresso in  $PU^2 \cdot Hz$ ;
- *Ampiezza Assoluta* di ogni intervallo, calcolata come l'ampiezza media dello spettro all'interno di ciascuna FB. Per ogni spettro esistono cinque valori di questo parametro, espressi in  $PU^2 \cdot Hz$ ;

- *Ampiezza Relativa* di ogni intervallo, cioè il rapporto tra l'*Ampiezza Assoluta* e l'*Ampiezza Media*. Analogamente al precedente, esistono cinque valori di questo parametro per ogni spettro; esso però, risultando dal rapporto di due grandezze omodimensionali, è adimensionale.

Sulla base di queste grandezze, ed in particolare dell'*Ampiezza Relativa*, che rende confrontabili i risultati acquisiti in condizioni diverse e/o da soggetti/pazienti diversi, si procede alla comparazione di spettri ottenuti da segnali LDF.

Attività	Intervallo di frequenze [Hz]
Cardiaca	1.8-0.6
Respiratoria	0.2-0.6
Miogena	0.06-0.2
Neurogena	0.02-0.06
Endoteliale	0.007-0.02

Tabella 1.1. Intervalli di frequenze relativi alle attività che influenzano il microcircolo.

Poichè un forte cambiamento nell'emodinamica (prodotto, ad esempio, da procedure di rivascularizzazione di arti ischemici) non implica altrettanto evidenti variazioni a livello di capillari, comparazioni tra gli spettri del segnale LDF prima e dopo la procedura possono aiutare a valutare la risposta al trattamento delle attività legate al microcircolo ed eventualmente a suggerire la terapia farmacologica più indicata per ristabilire una corretta perfusione fino ai vasi terminali dell'albero circolatorio.

## 1.1 Il microcircolo<sup>1</sup>

La circolazione sistemica ha il fondamentale compito di trasportare le sostanze necessarie ai tessuti del corpo, e, contemporaneamente, di raccoglierne i prodotti di scarto. Il sangue ricco di ossigeno e nutrienti viene trasportato a tutti i distretti corporei attraverso la rete delle arterie, mentre quello carico di anidride carbonica e prodotti di scarto è riportato al cuore dalla rete venosa.

La fittissima rete di vasi venosi e arteriosi costituisce un sistema chiuso: i capillari realizzano il punto di collegamento tra i due circuiti, e, insieme ai vasi di dimensioni inferiori a 100  $\mu\text{m}$ , costituiscono quello che viene chiamato *microcircolo*.

I capillari sono la sede dello scambio di sostanze tra sangue e tessuti. La buona funzionalità dei tessuti dipende direttamente dall'efficacia di questo processo.

<sup>1</sup>Le nozioni fisio-anatomiche riportate in questo paragrafo sono tratte da W. F. Ganong, "Review of medical physiology" [2].

Uno scarso apporto di sostanze nutrienti, così come un inefficace drenaggio dei prodotti di scarto del metabolismo, inficia le funzioni cellulari, fino a causare la morte della cellula e la necrosi tissutale.

L'insieme dei meccanismi che controllano il microcircolo fa sì che la pressione impartita al sangue dal cuore sia distribuita in modo che, a livello dei capillari, essa equivalga alla pressione colloidale osmotica del plasma: solo in questa situazione di equilibrio, infatti, lo scambio di fluidi tra i compartimenti vascolare e interstiziale avviene in modo bilanciato.

Gli stessi processi garantiscono inoltre che il salto di pressione tra arteriole e vene costituisca per il flusso sanguigno una forza motrice sufficiente a garantire l'emodinamica microcircolatoria e quindi le necessità metaboliche dei tessuti irrorati.

### 1.1.1 Il sangue

#### Composizione

Il sangue è un tessuto che si presenta come sospensione: la fase liquida è composta dal plasma, contenente sali, zuccheri e proteine; la fase corpuscolare è formata principalmente dagli eritrociti, che ne costituiscono più del 99,5%; il rimanente materiale corpuscolare è composto da leucociti e piastrine.

I globuli rossi sono cellule prive di nucleo aventi forma di disco biconcavo, dal diametro di di 7-8  $\mu m$ . Essi sono costituiti per il 35% circa da emoglobina, la proteina che lega  $O_2$  e  $CO_2$  e che determina la caratteristica colorazione rossa di questi corpuscoli. Il loro numero è molto variabile, compreso tra circa  $3.5$  e  $6 \cdot 10^6/mm^3$ .

I leucociti hanno dimensioni di circa 10  $\mu m$ , e la loro densità nel sangue è circa 500 volte inferiore a quella degli eritrociti.

Le piastrine hanno densità di  $1.5-4 \cdot 10^5/mm^3$ , hanno una forma tondeggiante e un diametro di circa 2-4  $\mu m$ .

Il rapporto tra fase fluida e corpuscolare si dice ematocrito ed è normalmente compresa fra il 43% ed il 47%.

#### Proprietà reologiche

L'equazione che regola le relazione fra la tensione tangenziale  $\tau$  e velocità di deformazione (cioè di scorrimento del fluido)  $\gamma'$  è la seguente:

$$\tau = \eta \cdot \gamma' \quad (1.1)$$

dove  $\eta$  è la viscosità del fluido.

In un materiale a comportamento ideale newtoniano, questa relazione è lineare, quindi espressa da una retta avente coefficiente angolare pari a  $\eta$ .

Il plasma è un fluido dal comportamento newtoniano. La sua viscosità è quindi indipendente dalla velocità di deformazione, pari a 1.16-1.35 cP a 37°C. Alla stessa temperatura, la viscosità dell'acqua è di 0.59 cP.

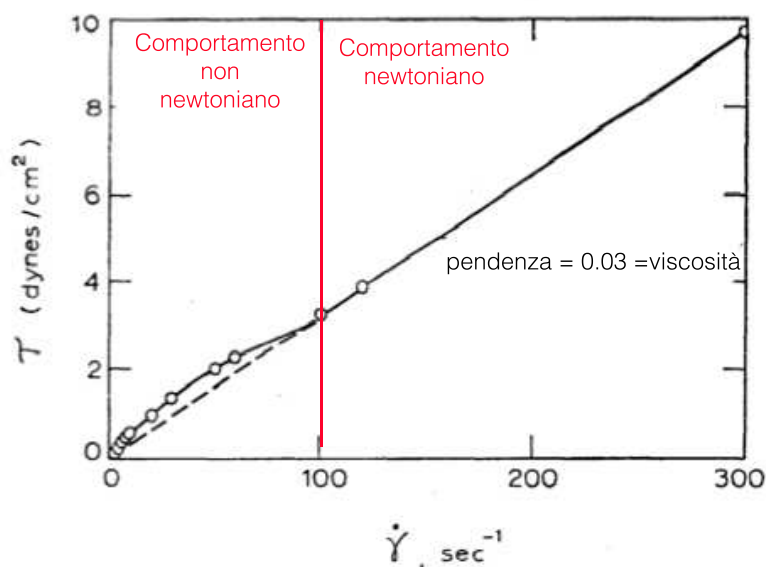


Figura 1.1. Grafico della tensione tangenziale contro la velocità di deformazione tangenziale di un campione di sangue a  $37^\circ\text{C}$ . I punti sovrapposti vicino all'origine denotano il comportamento non lineare del sangue a bassi valori di tensione. Superato il valore di  $\dot{\gamma} = 100$ , si ha comportamento newtoniano.

Al contrario del plasma, a basse pressioni il sangue presenta un comportamento non newtoniano, a causa della considerevole percentuale di fase solida presente, costituita per lo più dai globuli rossi. Nel grafico di Fig. 1.1 è presente infatti un valore di soglia dello sforzo di taglio, al di sotto del quale lo scorrimento del fluido avviene con carattere di intermittenza [3]. Al di sopra di questo valore, il sangue può essere considerato con buona approssimazione un fluido newtoniano. In particolare, la (1.1) indica che a valori maggiori di velocità del flusso sanguigno  $\dot{\gamma}$  corrispondono valori maggiori di tensione applicata alle cellule delle pareti vascolari.

### Carattere del flusso

Quando il sangue scorre attraverso un lungo vaso dalle pareti lisce, le linee di flusso sono rettilinee, e mantengono la stessa distanza dalle pareti del condotto lungo tutto il percorso. Quando si verifica questo tipo di scorrimento, detto *laminare*, le diverse linee di flusso creano un profilo parabolico lungo la sezione del vaso. Questa forma nasce dal fatto che l'attrito con la parete vascolare si oppone allo scorrimento delle molecole del fluido, mantenendole quasi ferme. Lo strato successivo scorre sul precedente, fino ad arrivare alla linea centrale di flusso, in cui si misura la più alta componente di velocità.

Quando la velocità del flusso sanguigno supera un certo valore (ad esempio a causa di una stenosi del vaso o di una curva), il flusso può assumere caratteri di turbolenza, cioè acquistare componenti di velocità non parallele all'asse del condotto (Fig. 1.2).

Il carattere vorticoso di questo tipo di flusso incrementa notevolmente l'attrito complessivo del sangue nel vaso, aumentando la resistenza allo scorrimento.

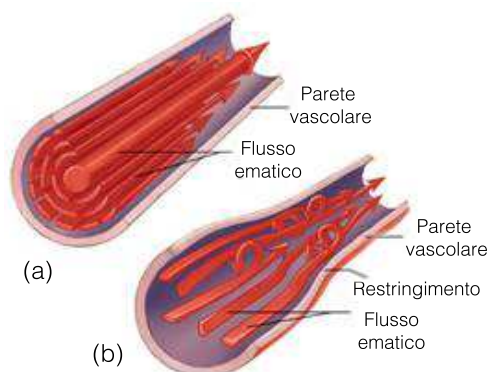


Figura 1.2. Linee di flusso nel caso di moto laminare (a) e turbolento (b). In (a) si può notare il profilo parabolico dei vettori velocità, paralleli tra loro e disposti in anelli concentrici (con il più consistente nel mezzo). In (b) sono rappresentati i vortici e il restringimento che determina la turbolenza.

La tendenza a sviluppare vortici, in altre parole l'esistenza di un regime di flusso turbolento, viene espressa dal numero di Reynolds  $Re$  (1.2): essa aumenta in diretta proporzione alla velocità del flusso  $v$ , al raggio del vaso  $r$ , alla densità del sangue  $\rho$ , ed è inversamente proporzionale alla viscosità  $\eta$ .

$$Re = \frac{v \cdot 2 \cdot r \cdot \rho}{\eta} \quad (1.2)$$

Quando questo numero supera il valore di 2000-2500, si verifica l'instaurarsi di un campo di moto turbolento.

### 1.1.2 Grandezze fisiche<sup>2</sup>

#### Il flusso

Il flusso sanguigno [ $ml/min$ ] è definito come la quantità di sangue che passa in un dato punto della circolazione per un dato periodo di tempo. Questo valore è complessivamente costante in tutto il sistema circolatorio, e nell'adulto è pari a circa  $5000 ml/min$ , valore determinato dalla gittata cardiaca.

<sup>2</sup>In questo paragrafo  $s$  indica l'ascissa curvilinea della corrente

Poiché il flusso è una misura di volume per unità di tempo, il suo valore è esprimibile secondo la seguente equazione:

$$Q = v(s) \cdot A(s) \quad (1.3)$$

dove  $Q$  indica il valore del flusso,  $v$  la velocità, e  $A$  l'area della sezione trasversale del vaso. La velocità del flusso ematico è quindi inversamente proporzionale al valore puntuale dell'area della sezione vascolare che sta attraversando. Così, in condizioni di riposo, la velocità media è di circa  $33 \text{ cm/sec}$  in aorta, mentre è di circa  $0,3 \text{ mm/sec}$  nei capillari.

Il sistema vascolare obbedisce ad un adattamento della legge di Ohm per le tensioni, noto come legge di Darcy:

$$Q = \frac{\Delta P(s_1, s_2)}{R(s_1, s_2)} \quad (1.4)$$

dove  $\Delta P$  è la differenza di pressione tra sue sezioni  $s_1$  e  $s_2$  e  $R$  è la resistenza vascolare.

### La resistenza vascolare

La resistenza, non potendo essere misurata direttamente, viene quantificata sulla base di (1.4) attraverso la misura del flusso sanguigno e della differenza di pressione tra due punti del vaso.

Il valore di resistenza al flusso ematico all'interno di una rete vascolare è funzione di parametri come lunghezza e diametro dei singoli vasi, organizzazione della rete vascolare, caratteristiche fisiche del sangue (viscosità, rapporto tra parti a flusso laminare e flusso turbolento), e forze meccaniche extravascolari che agiscono sul sistema.

Integrando le velocità degli anelli concentrici formati dalle linee di flusso e moltiplicandoli per l'area dell'anello si ottiene la legge di Poiseuille, che lega flusso e differenza di pressione direttamente alla viscosità del sangue  $\eta$ , al raggio  $r$ , e alla lunghezza del vaso  $L$ :

$$Q = \frac{\pi \cdot \Delta P(s_1, s_2) \cdot r(s_1, s_2)^4}{8 \cdot \eta \cdot L(s_1, s_2)} \quad (1.5)$$

Unendo la (1.4) e la (1.5) si ottiene il valore della resistenza vascolare  $R$  espresso in funzione dei tre parametri  $\eta, L, r$ :

$$R(s_1, s_2) = \frac{8 \cdot \eta \cdot L(s_1, s_2)}{\pi \cdot r(s_1, s_2)^4} \quad (1.6)$$

Da questa espressione si nota che il valore della resistenza vascolare è inversamente proporzionale alla quarta potenza del raggio, e direttamente proporzionale alla viscosità del sangue e alla lunghezza del condotto. Una lieve diminuzione

nel diametro di un vaso comporta quindi un consistente innalzamento della resistenza che esso oppone al flusso (e viceversa). Anche un aumento della viscosità comporta l'innalzamento di questo valore (e viceversa).

La maggior parte delle prove sperimentali attualmente disponibili indica che la resistenza vascolare, se monitorata globalmente per un dato periodo di tempo, risulta una proprietà relativamente stabile del sistema, che cambia solo in funzione dell'attività del tessuto e delle sue richieste metaboliche.

### La pressione sanguigna

La pressione sanguigna consiste nella forza per unità di superficie esercitata dal sangue contro le pareti del vaso. Per convenzione, la pressione sanguigna viene misurata in millimetri di mercurio [*mmHg*]. Poiché il cuore pompa il sangue direttamente nell'aorta, in questo distretto si misurano i valori di pressione più elevati: mediamente 120 *mmHg* in fase sistolica e 80 *mmHg* in fase diastolica.

Mano a mano che il sangue scorre verso la periferia, la resistenza vascolare aumenta: la pressione quindi scende progressivamente fino ad arrivare ad un valore quasi nullo allo sbocco della vena cava nell'atrio destro.

Anche la non rigidità delle pareti vascolari gioca un ruolo importante nel determinare i valori di flusso, pressione e resistenza. L'aumentare della pressione, infatti, oltre ad incrementare la velocità del flusso nel condotto, aumenta la tensione applicata ai vasi, secondo la (1.9). L'elasticità delle pareti fa sì che questa pressione comporti una deformazione del vaso, in particolare una dilatazione se le pressioni in gioco sono positive. Questo allargamento del condotto, secondo la (1.6), comporta una diminuzione della resistenza vascolare, che a sua volta, secondo la (1.4) determina un abbassamento della pressione stessa.

L'equazione di continuità applicata ad un tronco di corrente per fluidi incomprimibili

$$\frac{\delta Q}{\delta s} = -\frac{\delta A}{\delta t} \quad (1.7)$$

stabilisce che la variazione del flusso rispetto alla coordinata assiale è pari all'opposto della variazione dell'area della sezione del condotto nel tempo: ne consegue una diminuzione del flusso ematico al dilatarsi delle pareti vascolari.

Ciò che impedisce al flusso di dissiparsi lungo il percorso nell'albero circolatorio risiede nei vasi stessi: impulsi meccanici, chimici e nervosi sono infatti in grado di agire sul tessuto muscolare presente in alcuni vasi, inducendone la contrazione o il rilassamento. L'andamento oscillatorio del lume vascolare fa sì che localmente (ovvero con valori di  $t$  e  $s$  piccoli) si verifichino variazioni del flusso a carattere pulsatile e globalmente (ovvero con valori di  $t$  e  $s$  paragonabili alla durata dell'intero percorso) la quantità del flusso possa essere conservata.

### 1.1.3 I vasi

Le strutture vascolari che compongono il microcircolo si distinguono in arteriole, venule e capillari.

Un'unità microcircolatoria è un insieme di vasi che provengono da un'unica arteriola. Le arteriole del viso e delle dita spesso si diramano in anastomosi artero-venose, che bypassano il letto capillare costituendo canali diretti tra arteriole e venule, ma che possono anche essere chiusi completamente (Fig. 1.3).

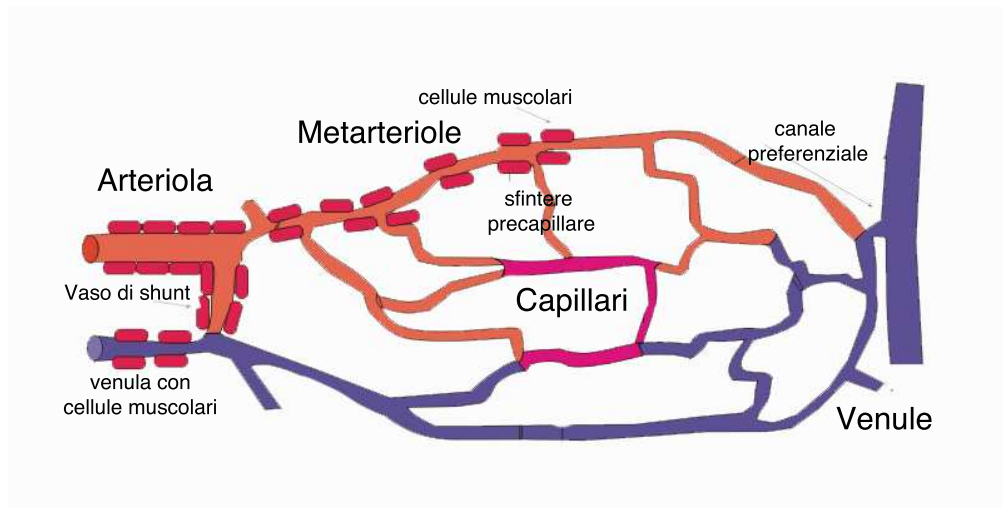


Figura 1.3. Schema di un'unità microcircolatoria, in cui è esplicitata la presenza di tessuto muscolare nella parete delle diverse tipologie di vasi.

In alcuni tessuti le arteriole si diramano in metarteriole, nelle quali si trovano gli sfinteri precapillari di fibre muscolari lisce sprovviste di controllo nervoso. Esse proseguono in ampi capillari chiamati *canali preferenziali*: questi canali portano il sangue direttamente alle vene.

#### Arteriole e venule

Le pareti di arteriole e venule sono composte da tre strati (Fig.1.4):

- *tonaca intima*: costituito da cellule endoteliali a contatto con il flusso ematico. Le cellule endoteliali fungono da membrana separatrice e da tramite, contengono actina e miosina, che le rendono comunque capaci di moderate risposte contrattili;
- *tonaca media*: costituito da strati concentrici di cellule muscolari lisce. La loro contrazione provoca un restringimento del diametro del vaso (vasocostrizione), mentre il loro rilassamento comporta l'effetto opposto (vasodilatazione). Nelle arteriole questo strato è molto più sviluppato rispetto alle



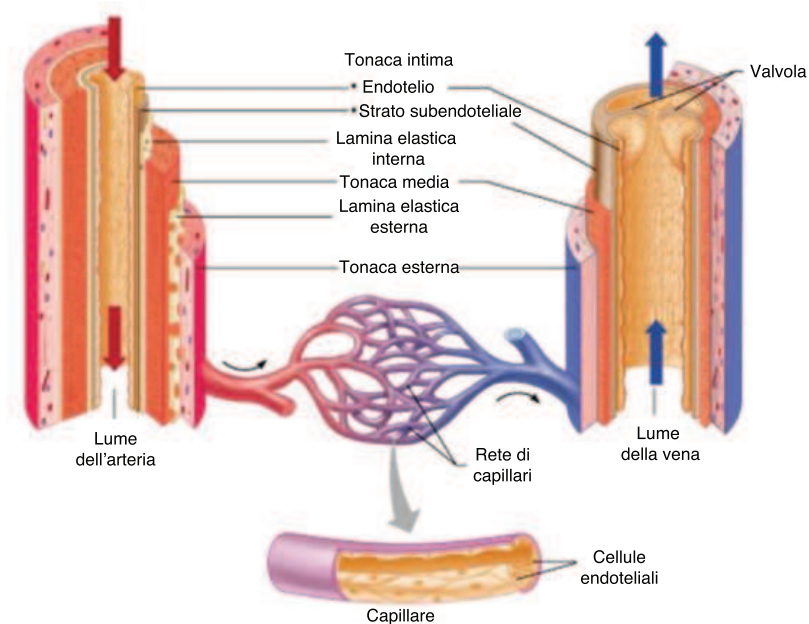


Figura 1.4. Sezione delle strutture dei vasi arteriosi e venosi, in cui si nota la differenza di spessore della tonaca media di vene e arterie, costituita dal tessuto muscolare liscio. I capillari, punto di collegamento dei due sistemi venoso e arterioso, sono formati da un sottile strato di endotelio e tessuto connettivo.

venule. La maggiore capacità delle arteriole di variare le dimensioni del lume è dimostrata anche dalla presenza di lamine elastiche che circondano il tessuto muscolare, assenti nelle venule;

- *tonaca esterna*: costituita da tessuto connettivo con funzione protettiva. In questa tunica sono presenti le terminazioni del sistema simpatico.

## I capillari

I capillari sono costituiti da un sottile strato di cellule endoteliali ( $0,1-1 \mu m$  di spessore) che poggia su una membrana basale: questa conformazione rende la parete ideale per lo scambio di sostanze con i tessuti. Tra le tipologie di capillari, differenziate nei vari tessuti, quelli più abbondanti nella cute sono chiamati capillari *continui* (Fig. 1.5-a), che si trovano anche nel muscolo e nel cervello. A differenza di quelli *finestrati* (Fig. 1.5-b) (presenti nei reni e nell'intestino) e *discontinui* (presenti in fegato milza midollo osseo), i capillari *continui* presentano poche fessure tra le giunzioni endoteliali.

La distanza tra cellule endoteliali è di  $5-30 \text{ nm}$ . Queste strette fessure sono difficili da attraversare per le molecole e gli ioni disciolti. Nel capillari continui la superficie dei pori riempiti d'acqua comprende solo il  $10^{-4}$  della superficie

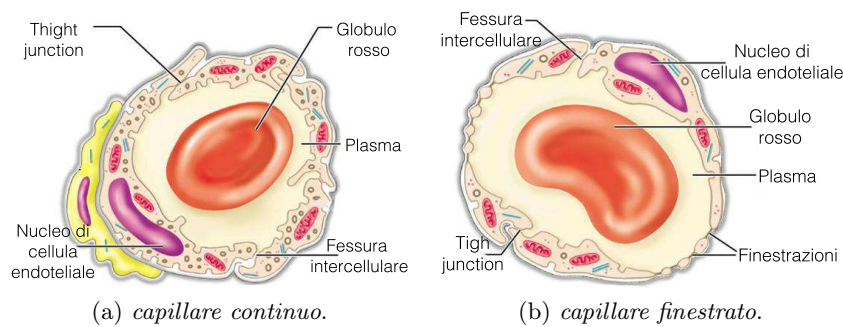


Figura 1.5. Sezioni di capillari che mostrano, oltre al paragone dimensionale con l'eritrocita, come le giunzioni intercellulari dell'epitelio possano essere completamente saldate o lasciare strette fessure. Nella sezione del capillare continuo (a), il tipo più frequente nel letto vascolare della cute, si nota l'assenza delle fenestrazioni.

totale. Questa configurazione fa sì che il controllo dello scambio di fluidi avvenga in modo particolarmente preciso.

Il diametro dei capillari più piccoli è solo di  $5-10 \mu m$ , appena sufficiente perchè gli eritrociti ( $7-10 \mu m$ ) riescano, deformandosi, a passarvi dentro. La lunghezza media di capillari è di  $1 mm$ , e, in condizioni di riposo, il modulo della velocità di scorrimento dei globuli rossi al loro interno è di circa  $1 mm/s$ . La densità capillare è alta, ad esempio, nel tessuto muscolare cardiaco e striato e bassa nella cute.

#### 1.1.4 Lo scambio capillare

I vasi in cui lo scambio di sostanze avviene in modo più importante sono quelli che presentano pareti sottili e che offrono vasta superficie di contatto con il flusso ematico. I vasi di scambio, che consentono il trasporto di sostanze attraverso la parete in entrambe le direzioni, comprendono i capillari e parte dei canali preferenziali e delle venule. Il numero di pori è elevato nelle estremità venose di capillari e venule.

Diversi meccanismi permettono lo scambio di sostanze tra sangue e liquido interstiziale dei tessuti. La maggior parte delle sostanze penetra attraverso la membrana delle cellule dell'endotelio: sostanze liposolubili e molecole di ridotte dimensioni la attraversano per diffusione, spinte dalla differenza di concentrazione che esiste tra i due compartimenti separati dalla membrana. Nel caso in cui lo scambio debba avvenire contro gradiente, ioni e piccole molecole polari possono attraversare le membrane all'interno di vescicole, per endocitosi o esocitosi. Piccole molecole possono muoversi anche attraverso le fessure intercellulari.

Tutti i capillari sono permeabili all' $O_2$ , alla  $CO_2$ , al glucosio e a ioni come  $Na^+$  e  $Cl^-$ . Le concentrazioni di queste sostanze nel liquido interstiziale sono quindi pari a quelle del plasma.

La pressione osmotica che viene esercitata dalle proteine è chiamata *pressione osmotica colloidale*. Essa è generata dalle molecole proteiche più grandi, che non potendo attraversare la parete dei capillari, tendono a trattenere l'acqua all'interno del compartimento in cui si trovano. La concentrazione proteica del fluido del tessuto (circa 2/100 g/ml) è inferiore alla concentrazione di proteine che si misura nel plasma (circa 7/100 g/ml): a causa della diversa concentrazione proteica, la pressione colloidale osmotica esercitata dal plasma è quindi superiore a quella esercitata del liquido interstiziale.

La differenza tra queste due pressioni osmotiche è denominata *pressione oncotica*. Poiché la pressione osmotica colloidale del fluido del tessuto è sufficientemente bassa da poter essere trascurata, la pressione oncotica è essenzialmente uguale alla pressione colloidale osmotica del plasma. Questo valore, costante nei capillari, è stimato in 25 mmHg. Poiché l'acqua si sposta per osmosi dalla soluzione a pressione colloidale superiore verso quella a pressione inferiore, la pressione oncotica favorisce il riassorbimento dell'acqua nei capillari.

Le pressioni che regolano il passaggio dell'acqua, e dei soluti in essa disciolti, dai capillari ai tessuti sono quindi quelle idrostatiche del sangue e del liquido interstiziale e quelle osmotiche (Fig. 1.6). L'equazione di Starling esprime la filtrazione netta  $J_v$  [ml/min] in funzione di sei parametri:

$$J_v = K_f([P_c - P_i] - \sigma[\pi_c - \pi_i]) \quad (1.8)$$

- $P_c$  rappresenta la pressione sanguigna, che preme i fluidi contro le pareti dei capillari, e che quindi promuove lo scambio in questa direzione; la pressione idrostatica è pari a circa 37 mmHg all'estremità arteriolare dei capillari e scende a circa 17 mmHg all'estremità venulare, a causa del volume di fluido che, nel percorrerlo, lascia questo compartimento;
- $P_i$  rappresenta la pressione idrostatica del tessuto. L'entità di questa grandezza è variabile nei distretti anatomici. Ad esempio, con una pressione idrostatica del fluido del tessuto di 3 mmHg, la pressione di filtrazione netta sarebbe  $37-3 = 34$  mmHg all'estremità arteriolare del capillare e  $17-3 = 14$  mmHg a quella venulare;
- $\pi_i$  e  $\pi_c$  sono le pressioni colloidali osmotiche interstiziali e capillari;
- $\sigma$  è il coefficiente di riflessione, che tiene conto del fatto che nei capillari esiste comunque una piccola permeabilità alle proteine. In quelli continui, molto poco permeabili, questo coefficiente è circa pari a 1;
- $K_f$  è il coefficiente di filtrazione, che tiene conto di caratteristiche dei capillari come l'area della superficie di scambio. Un valore elevato di questo parametro indica alta capillarità all'acqua.

A causa dei meccanismi che regolano il passaggio dei fluidi attraverso la parete dei capillari, a monte e a valle di un vaso lo scambio può essere avvenuto

prevalentemente in una direzione, così da determinare una variazione dell'ematocrito tra la sezione di valle e quella di monte del condotto. Dato che la viscosità del sangue è fortemente dipendente dell'ematocrito, questo effetto è di importanza centrale. Intaglietta e Gross determinarono che questa variazione, accompagnata dal carattere pulsatile del flusso e delle pareti vascolari, ha carattere ondulatorio, e che a condizioni di elevato ematocrito corrispondono la presenza di elevata velocità e quindi elevate differenze di pressione transcappillare. Dal momento che a un ematocrito elevato corrisponde a maggiore viscosità, questa variazione temporale sembra anche produrre una migliore perfusione [4].

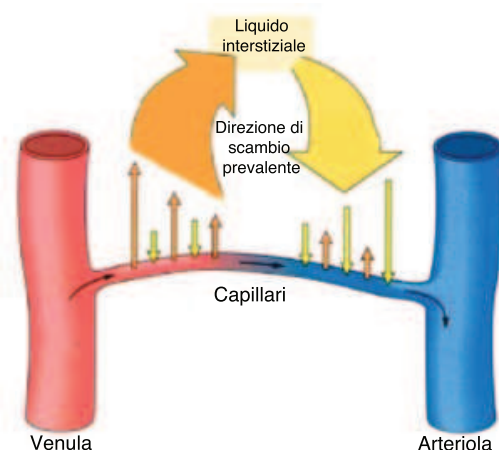


Figura 1.6. Rappresentazione grafica del modello di scambio capillare di Starling, in cui si nota come, lungo il corso del capillare, il passaggio di liquidi dall'interno all'esterno va a diminuire a discapito di quello di senso opposto. Le frecce indicano i passaggi di liquidi lungo il capillare.

## 1.2 Vasomotion e flowmotion

### 1.2.1 Lo sviluppo dei concetti di *vasomotion* e *flowmotion*<sup>3</sup>

L'intuizione che il controllo locale del flusso ematico comporti una forte variabilità temporale del flusso risale al XIX secolo, quando vennero effettuati studi di microscopia *in vivo* sui microvasi delle ali dei pipistrelli (Fig.1.7) o delle membrane palmari delle rane [5]. Questi lavori permisero di stabilire che sia il diametro dei vasi che il flusso subiscono cambiamenti ritmici. Fu in questa sede che questi fenomeni vennero indicati come *vasomotion* e *flowmotion*. In particolare, il termine *vasomotion* indica la pulsazione dei vasi, mentre il termine *flowmotion* indica il conseguente andamento oscillatorio del flusso ematico al loro interno.

<sup>3</sup>Le informazioni storiche riportate in questo paragrafo sono prevalentemente tratte dal lavoro di M. Intaglietta "Vasomotion and flowmotion: physiological mechanisms and clinical evidence"[1].



Figura 1.7. Le ali dei pipistrelli furono il primo tessuto in cui venne osservata la *vasomotion*

In seguito venne messo a punto un metodo basato sulla video-microscopia, che permise di calcolare la velocità del sangue nei microvasi correlando la distanza percorsa da un globulo rosso con il tempo da esso impiegato per compiere tale spostamento, misurato dal numero di fotogrammi che lo descrivevano [6]. Metodi come questo hanno reso quantificabile il fatto che la velocità del sangue nei microvasi non è costante, ma oscillatoria.

Con tecniche di tipo ottico vennero effettuati studi sulla *vasomotion* della pelle umana, tramite l'osservazione della zona periungueale delle dita delle mani. In questa sede, contrariamente alla quasi totalità degli altri distretti, i capillari giacciono in anse parallele alla cute: questa particolare disposizione permette di osservare il flusso ematico al loro interno attraverso indagini non invasive di tipo microscopico (Fig.1.8). Gli studi effettuati sancirono che anche in questo caso l'andamento del flusso risulta oscillatorio [7].

Le tecniche basate sulla video-microscopia avevano però il grosso limite di poter essere applicate solo in zone in cui il corso dei capillari potesse essere visibile e distinguibile dal resto del contesto circolatorio. Poiché i capillari sono immersi nella cute e scorrono perpendicolarmente alla superficie, queste tecniche non potevano far fronte all'esigenze di quantificare il microcircolo in distretti diversi della zona periungueale.

Fu con l'avvento della Laser Doppler Fluxmetry (LDF) che diventò possibile apprezzare la presenza di un andamento fortemente dipendente dal tempo nella circolazione di piccoli volumi di pelle umana di zone come la fronte, l'a-

vambraccio, e il dorso del piede [1]. Questo metodo non invasivo è in grado infatti di quantificare il flusso dei globuli rossi (calcolato come il prodotto tra il loro numero e la loro velocità) all'interno di un piccolo volume di tessuto, indipendentemente dall'orientazione dei vasi.

Inizialmente, i tracciati LDF venivano analizzati empiricamente, misurando visivamente la frequenza (in cicli al minuto, *cpm*) e l'ampiezza delle onde. Questi studi hanno permesso di identificare due gamme distinte di onde misurabili sulla pelle: quelle più veloci, con una banda ad alta frequenza di 10-20 *cpm*, furono chiamate *onde alfa*; quelle più lente, con una banda di bassa frequenza di 1-3 *cpm*, vennero battezzate *onde beta* [8].

Più recentemente, ad esempio attraverso l'utilizzo della trasformata wavelet, è stato possibile ricavare dal segnale LDF lo spettro corrispondente e quindi analizzare in modo dettagliato le diverse componenti in frequenza della *flowmotion*. Utilizzando questo metodo di analisi, diversi studi affermarono l'esistenza di cinque bande di frequenza (FB) caratteristiche nello spettro del tracciato di LDF cutaneo compreso tra 0.007 e 1.8 *Hz* [9].

Studi successivi [10, 11, 12] misero a fuoco ciascuna FB: stimolando o inibendo una specifica attività fisiologica, e comparando gli spettri ottenuti prima e dopo lo stimolo, fu possibile correlarla al rispettivo intervallo di frequenza che ne riflette l'azione a livello di microcircolo. Conseguentemente, diviene possibile associare condizioni circolatorie patologiche con variazioni dell'andamento della trasformata del segnale LDF nelle cinque FB caratteristiche.

Questo tipo di analisi del segnale LDF, che si realizza attraverso la valutazione non invasiva delle oscillazioni del microcircolo cutaneo, può essere quindi convenientemente applicato per comparare la situazione circolatoria locale in pazienti vasculopatici prima e dopo trattamenti di rivascolarizzazione, mediante il confronto del contenuto delle FB caratteristiche.

### 1.2.2 La *vasomotion*

Poiché l'attuazione del controllo del flusso avviene tramite la regolazione del tono delle cellule muscolari dei vasi, questo compito è limitato ai vasi provvisti di miocellule, quindi soprattutto i vasi arteriolarari.

La propagazione della contrazione o del rilassamento avviene in quanto le membrane di cellule adiacenti del tessuto muscolare liscio sono messe in comunicazione tramite le *gap junction*, che permettono lo scambio di potenziali chimici o elettrici. Inoltre, le cellule adiacenti sono accoppiate anche dal punto di vista meccanico, così che la contrazione di una induca a contrarsi anche quelle adiacenti.

Ulteriori funzionalità emodinamiche che possono influire nel controllo del flusso ematico risiedono nell'andamento tempo-dipendente delle attività dei singoli vasi, i quali effetti, mediati nel tempo e nello spazio, portano al raggiungimento della condizione desiderata.

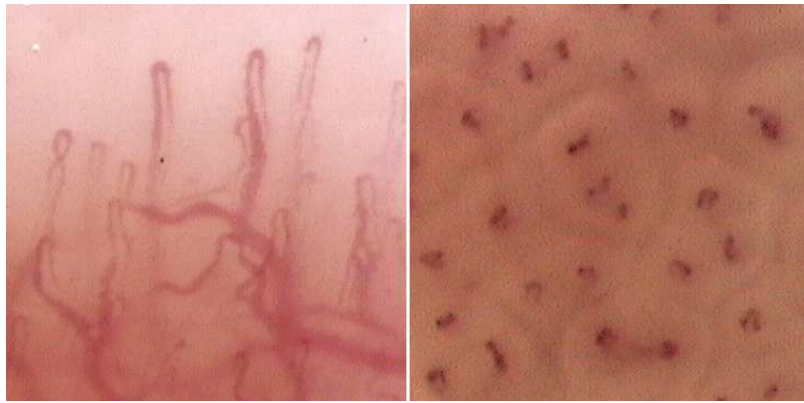


Figura 1.8. Immagini di microcapillaroscopia: a sinistra, capillari del tessuto periungueale; a destra, capillari di un altro distretto cutaneo. I primi, essendo disposti in anse parallele alla cute, permettono di estrapolare informazioni sul flusso ematico da questo tipo di immagini

La scala di tempo in cui avvengono queste regolazioni deve essere breve e in proporzione commisurata alle necessità metaboliche delle cellule, che non devono essere private dell'apporto di sangue ossigenato per periodi più lunghi della loro capacità di sopravvivere in anossia.

Il risultato finale della combinazione di questi processi è la regolazione del tono vascolare che, associato alle proprietà reologiche del sangue (trattate nel paragrafo 1.1.2), determina la resistenza vascolare.

Nella maggior parte dei tessuti, la *vasomotion* è una caratteristica delle arteriole. I vasi più grandi, con un diametro nell'ordine di 50-100  $\mu\text{m}$  presentano contrazioni e rilassamenti luminari a frequenze di 2-3 *cpm* e le oscillazioni raggiungono un'ampiezza del 10-20% del diametro medio. Questa attività diventa progressivamente più veloce e di maggiore ampiezza al diminuire del diametro del vaso. Nelle arteriole terminali la frequenza è 10-25 *cpm* e l'ampiezza dell'oscillazione può arrivare 100% del diametro medio, portando periodicamente all'apertura e alla chiusura di questi vasi. Confrontando i fotogrammi di Fig.1.9, si può notare come il diametro del vaso principale, un'arteriola intestinale, cambi ritmicamente, e come i vasi più piccoli che ne derivano siano alternamente alimentati.

### Effetti

Uno degli effetti principali della *vasomotion* è di modificare la resistenza locale idraulica dei vasi che mostrano tale l'attività, secondo la (1.6): nel confrontare vasi attivi e passivi con lo stesso diametro medio, si nota che il vaso attivo (a causa del più ampio range di dilatazione) mostra sempre una resistenza idraulica inferiore a quella dei vasi inerti.

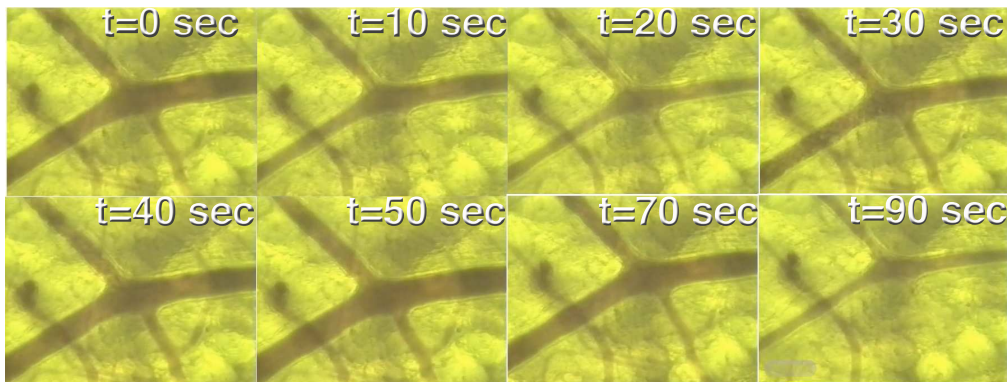


Figura 1.9. Fotogrammi di *vasomotion*, che mostrano come il vaso principale (un'arteriola intestinale) si dilati e si contraiga nel tempo, e come il flusso nei vasi secondari (capillari) venga periodicamente fermato

L'apertura e la chiusura periodica delle arteriole terminali ha un peso significativo sul meccanismo di Starling per lo scambio di fluido (trattato nel paragrafo 1.1.4), a causa delle variazioni di pressione che si verificano durante questo processo. Intaglietta studiò questo effetto mediante un modello matematico e determinò che durante la *vasomotion*, quando il flusso si arresta in un capillare, la pressione al suo interno è in equilibrio con quella delle venule vicine. In questa condizione l'intero capillare assorbe il liquido dalla zona interstiziale. In questo senso, la *vasomotion* può essere considerata come un meccanismo che facilita l'effetto di assorbimento dovuto alla pressione osmotica colloidale del plasma.

Il movimento della parete arteriolare produce poi un effetto meccanico che tende a drenare il liquido contenuto nei tessuti verso i vasi linfatici. A conferma di questa teoria gioca l'evidenza sperimentale che l'anestesia (che inibisce la *vasomotion*) tende a produrre edema, ovvero un accumulo di liquidi negli spazi interstiziali. Lo stesso risultato si verifica anche se il tono vascolare e la pressione sanguigna diminuiscono.

## Cause

I fattori che influenzano la *vasomotion* del microcircolo sono sia sistemici, come l'attività cardiaca e quella respiratoria, che locali. I fattori locali trovano sede nelle pareti dei vasi, e sono costituiti da attività di tipo miogeno, neurogeno, ed endoteliale. Questi fattori agiscono sulle miocellule delle pareti vascolari sia dei vasi resistivi (le arterie), che di quelli capacitivi (le vene), inducendone la contrazione o il rilassamento [2].



### Attività cardiaca

Il cuore ha il compito di generare una pressione sufficiente a spingere il sangue verso tutti i tessuti, anche quelli periferici, vincendo la resistenza che viene opposta dalle pareti vascolari durante il percorso.

Perchè l'energia cinetica non venga completamente dissipata prima che il sangue abbia raggiunto tutti i distretti corporei, collegamenti nervosi portano i muscoli delle arterie a contrarsi in maniera sincrona con il battito cardiaco, propagando la spinta e accompagnando il sangue fino ai vasi più sottili.

### Attività respiratoria

La respirazione svolge un ruolo fondamentale nella circolazione: con l'atto dell'inspirare infatti viene impartita al sangue una pressione che lo richiama attraverso la rete venosa dalla periferia verso il centro. La pressione dell'atrio destro diminuisce durante l'inspirazione mentre la pressione venosa periferica rimane costante durante tutto il ciclo respiratorio. Il ritorno venoso sistemico, che solitamente è il fattore determinante della gittata cardiaca, dipende dalla differenza di pressione tra le vene extratoraciche e la pressione dell'atrio destro. L'inspirazione, aumentando questa differenza, stimola il ritorno venoso

Come per quelle legate all'attività cardiaca, le oscillazioni dovute alla respirazione risentono anche di un contributo nervoso, oltre che di quello pressorio: durante l'inspirazione infatti, segnali simpatici inducono la vasocostrizione, in modo da aumentare la resistenza periferica e facilitare il ritorno del sangue al cuore.

La rilevanza di questo fenomeno è proporzionale al livello di innervazione dei vasi esaminati: si verifica ad esempio in maggior misura sui polpastrelli, ed è meno apprezzabile sulla cute di parti meno densamente innervate, come ad esempio l'avambraccio [11].

### Attività miogena intrinseca

La maggior parte dei letti vascolari ha la capacità intrinseca di compensare moderati cambiamenti nella pressione di perfusione con piccole variazioni di resistenza vascolare, in modo che il flusso del sangue rimanga relativamente costante.

Questa capacità è in parte dovuta alla spontanea risposta contrattile all'allungamento  $\epsilon$  delle cellule muscolari lisce (1.10), dovuto alla tensione normale  $\sigma$  che il flusso esercita sulla parete del condotto. La relazione tra queste due variabili è regolata dalla legge di Hook :

$$\sigma = E \cdot \epsilon \quad (1.9)$$

dove  $E$  è il modulo elastico longitudinale, in questo caso della parete vascolare. Quando la pressione aumenta, per la (1.9) i vasi sanguigni sono dilatati e le fibre muscolari che circondano i vasi sono quindi estese.

L'evidenza sperimentale secondo la quale a pressioni più elevate si verifica un maggior grado di contrazione trova spiegazione nella formula di Laplace:

$$T = k \cdot \sigma \cdot r \quad (1.10)$$

Secondo la (1.10) 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, il mantenimento di una data tensione parietale richiede quindi una diminuzione del raggio.

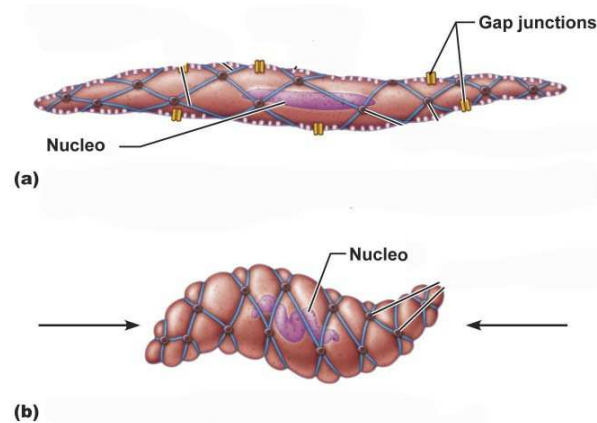


Figura 1.10. Immagine di una cellula di tessuto muscolare liscio, distesa (a) e contratta (b): cellule vicine sono unite dalle *gap junction*

Questo tipo di cellule possono inoltre contrarsi spontaneamente attraverso la dinamica dei canali ionici, sotto l'impulso di cellule muscolari pacemaker. Questo particolare tipo di cellule si trova soprattutto alle biforcazioni delle arteriole, e possiede la caratteristica di depolarizzarsi periodicamente. A temperatura costante, la frequenza di depolarizzazione delle cellule pacemaker è fissa.

Le cellule muscolari delle venule e delle arteriole sono poi dotate di recettori che le rendono in grado di pulsare anche in risposta a stimolazioni di tipo chimico. Il loro rilassamento è indotto, ad esempio, dal peptide natriuretico atriale, prodotto dal miocardio in seguito a un eccessivo aumento del volume ematico. La loro contrazione invece può essere stimolata dall'angiotensina II, un ormone deputato all'incremento pressorio, che, oltre ad aumentare la resistenza periferica dei vasi, incrementa anche la frequenza e l'intensità delle contrazioni cardiache [13].

Anche le concentrazioni di ossigeno e di anidride carbonica stimolano le cellule del tessuto muscolare dei vasi: i fattori che stimolano la vasodilatazione comprendono, nella maggior parte dei tessuti, la diminuzione delle concentrazioni di  $O_2$  e di  $pH$ . Questi cambiamenti causano il rilassamento delle arteriole e

degli sfinteri precapillari. Provocano un rilassamento delle miocellule anche gli incrementi della tensione di  $CO_2$  e dell'osmolalità.

### Attività neurogena

Il fattore *neurogeno* è dovuto all'attività che stimoli di tipo nervoso esercitano sulle cellule muscolari. Anche se i vasi resistivi sono i più densamente innervati, tutti i vasi eccetto venule e capillari contengono muscoli lisci e ricevono i nervi motori dalla divisione simpatica del sistema nervoso autonomo (Fig.1.11).

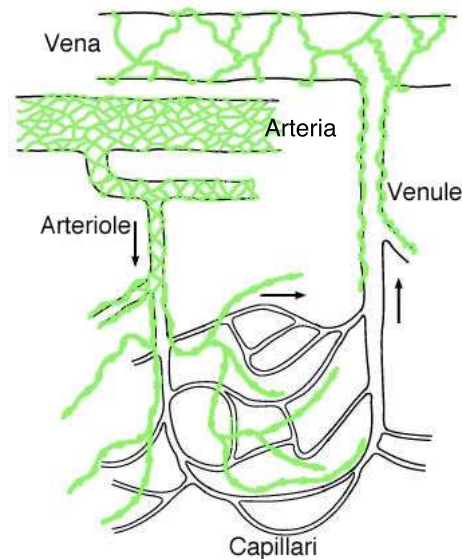


Figura 1.11. Schematizzazione della rete vascolare, che mostra, in verde, i diversi livelli di innervazione di vene e arterie e l'assenza di collegamenti simpatici sulle pareti di venule e capillari

Diversamente da quelli somatici, i nervi del simpatico esercitano un controllo di tipo continuativo: le cellule muscolari dei vasi sono quindi ritmicamente sollecitate, ed indotte al rilassamento o alla contrazione a seconda degli ordini provenienti dal sistema nervoso involontario [14].

I trasmettitori raggiungono lo strato più interno del vaso tramite diffusione, e la corrente si diffonde da una cellula muscolare all'altra attraverso le *gap junction*.

Particolari stimoli di tipo psicologico e necessità complessive di regolazione della temperatura corporea comportano vasocostrizione o vasodilatazione periferica attraverso questo meccanismo.

### Attività endoteliale

Studi risalenti agli anni '80 hanno portato a scoprire che le cellule del rivestimento più interno dei vasi, ovvero quello endoteliale, giocano un ruolo fondamentale

nella vasodilatazione.

Lo sforzo tensivo  $\sigma$  (che ne produce lo stiramento), e lo sforzo di taglio  $\tau$  (dovuto all'attrito con il flusso ematico), attivano questo strato di cellule, promuovendo la sintesi e la liberazione di mediatori vasoattivi, come il monossido di azoto (NO), prostaglandine, trombossani e endoteline. Studi successivi hanno evidenziato che, oltre agli stimoli meccanici, anche segnali neurotrasmettitori come l'acetilcolina agiscono sulle cellule endoteliali stimolando la produzione dell'ossido nitrico (NO) [15].

L'NO che si forma nell'endotelio diffonde attraverso le cellule muscolari lisce, dove attiva diversi fattori che mediano il rilassamento del tessuto (Fig.1.12). L'NO è inattivato dall'emoglobina, al fine di interrompere la vasodilatazione quando il livello di perfusione risulta sufficientemente elevato. Le cellule en-

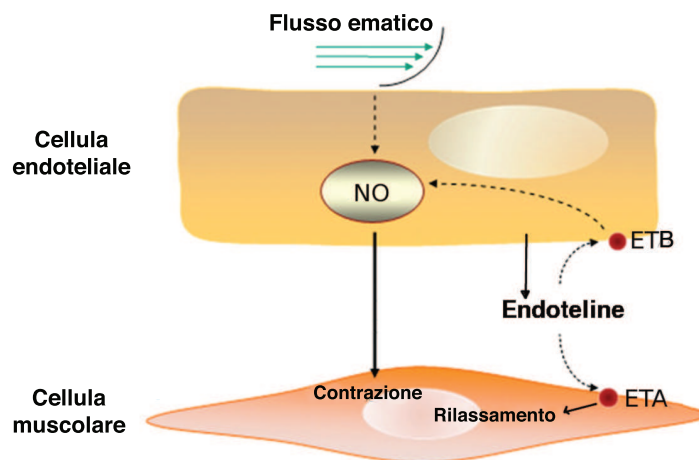


Figura 1.12. Lo sforzo di taglio dovuto al flusso ematico attiva le cellule endoteliali, che sintetizzano e rilasciano NO: un agente rilassante delle cellule muscolari. E' riportato inoltre lo schema di azione delle endoteline, con i due recettori antagonisti

doteliali sintetizzano inoltre sostanze chiamate *endoteline*, tra i più potenti vasoconstrictori attualmente isolati. Questi polipeptidi si legano a due recettori specifici che hanno funzioni contrapposte: ETA e ETB. I primi sono localizzati sulla membrana delle cellule muscolari delle pareti vascolari e la loro attivazione determina vasoconstrizione; gli altri si trovano sulla membrana delle cellule endoteliali e la loro attivazione determina la liberazione di NO, con conseguente vasodilatazione (Fig.1.12).

### 1.2.3 La *flowmotion*

La variazione ritmica del diametro dei vasi instaura, per la (1.7) un andamento oscillatorio del flusso al loro interno. Questo fenomeno, chiamato *flowmotion*, è sincrono con l'attività delle arteriole terminali e si propaga rimanendo visibile anche all'osservazione diretta dei capillari, incapaci di attività di *vasomotion*.

L'andamento oscillatorio della *flowmotion* è dovuto anche alla natura periodica delle pompe cardiaca e respiratoria, che spingono il sangue l'una dal centro alla periferia attraverso la rete arteriosa, l'altra dalla periferia al centro attraverso la rete venosa.

Da misurazioni del flusso ematico nel microcircolo cutaneo, ottenute in modo non invasivo grazie alla Flussimetria Laser Doppler (LDF), è possibile estrapolare, tramite analisi in frequenza, la presenza e l'importanza di ogni componente dello spettro.

Come anticipato alla fine del paragrafo 1.2.1, vari studi si sono focalizzati sui fattori che influenzano la *vasomotion*: ad ognuno di questi è stato correlato un intervallo di frequenze della *flowmotion*, in particolare (come già anticipato in Tab.1.1):

- le oscillazioni del microcircolo legate all'attività cardiaca riflettono le spinte periodiche che il sangue ottiene dal cuore: hanno una frequenza compresa tra 0.6 e 1.8  $Hz$ , che corrisponde appunto a quella delle pulsazioni del soggetto. Questa corrispondenza è stata verificata tramite acquisizione simultanea del segnale elettrocardiografico [10];
- le oscillazioni del microcircolo legate all'attività respiratoria sono debolmente presenti nel segnale. Hanno una frequenza compresa tra 0.2 e 0.6  $Hz$ , e la corrispondenza con la frequenza respiratoria del soggetto è stata verificata misurando simultaneamente le escursioni polmonari del soggetto [11];
- le oscillazioni del microcircolo legate all'attività miogena hanno una frequenza compresa tra 0.06 e 0.2  $Hz$  [15]. Nel muscolo dell'antro gastrico, nel quale predomina l'attività miogena, le contrazioni si ripetono a frequenza di 0.1  $Hz$ ;
- le oscillazioni del microcircolo legate all'attività neurogena hanno una frequenza compresa tra 0.02 e 0.06  $Hz$ . E' stato dimostrato che questo picco scompare totalmente dopo denervazione e dopo simpatectomia [14];
- le oscillazioni del microcircolo legate all'attività endoteliale hanno una frequenza compresa tra 0.007 e 0.02  $Hz$ : esse sono le più lente attività periodiche riconosciute nella *flowmotion*. Sono state identificate somministrando dosi di metaboliti delle cellule endoteliali, come NO e di sostanze ad esso antagoniste, e monitorandone gli effetti [16].



## Capitolo 2

# La Flussimetria Laser Doppler

La Flussimetria Laser Doppler è una tecnica che permette di effettuare indagini non invasive e altamente sensibili dell'andamento della microcircolazione periferica cutanea (Fig.2.1).

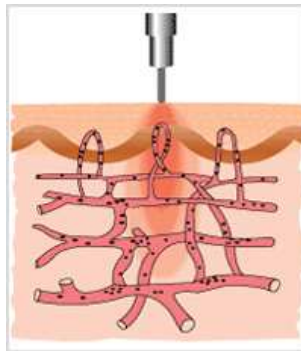


Figura 2.1. Sezione della cute in cui è rappresentata la profondità di penetrazione della luce laser. Le anse formate dalle arteriole ascendenti e dalle venule discendenti del plesso superficiale sono raggiunte dal fascio, mentre la rete di vasi più in profondità, che costituisce il secondo plesso orizzontale, non è oggetto alla misura

Il Flussimetro Laser Doppler (LDF) emette un fascio laser monocromatico a bassa energia che penetra nel tessuto: le onde riflesse dalle superfici sottostanti vengono registrate da un sensore. Secondo la teoria dell'effetto Doppler, le onde che colpiscono oggetti in movimento subiscono uno *shift* in frequenza: in questo tipo di applicazione, tali oggetti sono i globuli rossi che circolano nei microvasi.

Monitorando l'andamento del microcircolo nel tempo, oltre all'intensità dei singoli impulsi e totale, il LDF è in grado di registrare le variazioni ritmiche che avvengono nel flusso ematico cutaneo, ovvero la *flowmotion*.

## L'oggetto della misura

La microcircolazione cutanea è organizzata in due plessi orizzontali: uno superficiale situato circa 1.0-1.5  $mm$  sotto la superficie della pelle e uno più profondo, situato nella zona di collegamento tra cute e sottocute. Arteriole ascendenti e venule discendenti si ramificano in entrambi i plessi (Fig.2.1). Il LDF rileva il movimento di alcuni degli elementi corpuscolati del sangue transitanti nel microcircolo del plesso superficiale, ma non si estende al di là di questi vasi alla profonda del plesso orizzontale sotto il derma (Fig.2.1). I vasi raggiunti sono arteriole, venule e capillari aventi una sezione trasversale di 0.002-0.008  $mm^2$  [17].

## 2.1 L'effetto Doppler

### 2.1.1 Fondamenti storici

La tecnica laser Doppler si basa su un principio fisico che regola il comportamento di tutte le onde armoniche, chiamato appunto *effetto Doppler*.

Il fisico austriaco Christian Doppler per primo intuì che le onde sonore cambino di tonalità se esiste una velocità relativa tra la sorgente e il rilevatore. Nel 1845 egli procedette nella verifica della sua ipotesi attraverso un celeberrimo esperimento: assoldò una banda di musicisti, e li fece suonare a bordo di un treno. Doppler si posizionò accanto ai binari della ferrovia, ed ascoltò il suono della musica al suo passaggio (Fig.2.2). Questo esperimento confermò che la tonalità del suono era più alta mentre i musicisti si avvicinavano, e più bassa mentre si allontanavano, validando la sua ipotesi.

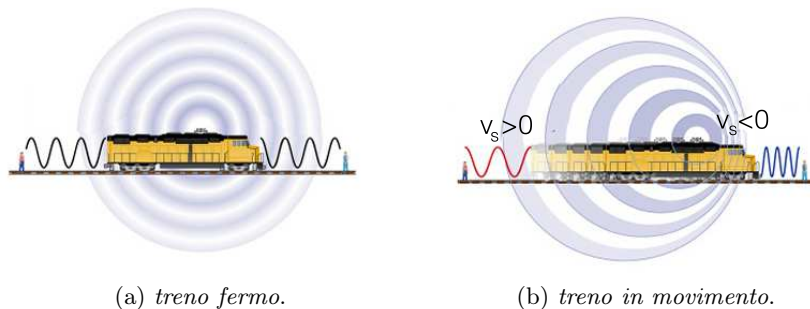


Figura 2.2. Rappresentazione grafica dell'esperimento di Christian Doppler: in (a) il treno è fermo, e la lunghezza d'onda del suono prodotto dall'orchestra è propagato omogeneamente; in (b) il treno è in movimento, e le frequenze percepite dagli osservatori subiscono lo *shift*.

Fu però Hippolyte Fizeau nel 1848 a capire che lo stesso effetto non è limitato al campo sonoro, ma avviene indipendentemente dal tipo di onde elettromagnetiche [18].



### 2.1.2 Formulazione matematica

Formalmente, lo *shift* Doppler è definito come uno spostamento della frequenza dell'onda che avviene quando vi è movimento relativo tra la sorgente e il ricevitore. Quando ricevitore e sorgente si muovono sulla stessa linea, sussiste la seguente relazione [18]:

$$f_r = \frac{c + v_r}{c + v_s} f_s \quad (2.1)$$

in cui  $v_r$  è la velocità del ricevitore (positiva se esso si muove verso la sorgente),  $v_s$  è la velocità della sorgente (positiva se la sorgente si allontana dal ricevitore),  $f_r$  e  $f_s$  sono le frequenze rispettivamente dell'onda ricevuta e inviata, e  $c$  è la velocità di propagazione dell'onda.

Nel caso in cui la velocità  $c$  sia significativamente superiore a  $v_r$  e  $v_s$ , come nel caso qui trattato in cui  $c$  è la velocità della luce, in prima approssimazione la (2.1) può essere espressa come:

$$f_r = \left(1 - \frac{v_s - v_r}{c}\right) f_s \quad (2.2)$$

che dipende solo dalla velocità relativa tra l'emettitore e il ricevitore. Lo shift Doppler  $f_r - f_s$  in questo caso vale:

$$\Delta f = -\frac{v_s - v_r}{c} f_s = -\frac{v_s - v_r}{\lambda_s} \quad (2.3)$$

dove  $\lambda_s$  è la lunghezza d'onda del segnale inviato. Il valore di  $\Delta f$  è in questo caso direttamente proporzionale alla velocità relativa tra l'emettitore e il ricevitore.

Nel caso in cui sorgente e ricevitore si muovano in direzioni diverse, influiscono sull'effetto Doppler solo proiezioni sulla retta passante per sorgente e ricevitore dei vettori velocità.

Chiamando  $\alpha$  e  $\beta$  gli angoli formati da tali vettori con la retta passante per sorgente e ricevitore, la (2.2) si riscrive:

$$f_r = \left(1 - \frac{v_s \cos(\alpha) - v_r \cos(\beta)}{c}\right) f_s \quad (2.4)$$

## 2.2 Il Flussimetro Laser Doppler

L'utilizzo dell'effetto Doppler in campo vascolare è stato introdotto da Stern nel 1975, che per primo dimostrò che lo *shift* Doppler della luce può essere utilizzato per quantificare il movimento dei globuli rossi nella pelle.

Per ottenere un segnale Doppler da un fluido, il fluido deve contenere corpuscoli in grado di riflettere le onde incidenti: nel caso del sangue, i globuli rossi, che si muovono ad una velocità di 0.01-10 *mm/s*, costituiscono i principali agenti riflettenti.

La luce laser ha la caratteristica di essere coerente e monocromatica, il che significa che viene emessa in un fascio concentrato e ad una singola frequenza  $f_s$ . La dimensione di un globulo rosso è circa 7-8  $\mu m$ : poichè la radiazione viene solitamente emessa ad una lunghezza d'onda di circa 0.7  $\mu m$ , il fatto che i corpuscoli sui quali incide il segnale siano più grandi della sua lunghezza d'onda limita i fenomeni di dispersione, favorendo la riflessione [19].

Per la (2.4), la componente del vettore velocità dei globuli rossi che contribuisce all'effetto Doppler è quella perpendicolare alla cute. I globuli rossi che scorrono nelle parti ascendenti e discendenti delle anse di Fig.2.1 contribuiscono quindi in modo più consistente di quelli che ne stanno percorrendo la parte superiore parallela alla cute. Per semplicità, viene qui chiamata  $v_g$  la componente in questione della velocità dei globuli rossi.

Il principio della (2.2) è applicato due volte [20] nell'acquisizione del segnale dal microcircolo cutaneo:

- Prima applicazione del principio: 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) ricevono il segnale con una frequenza  $f_g$ , che per la (2.2) vale:

$$f_g = \left(1 - \frac{-v_g}{c}\right)f_s = \left(1 + \frac{v_g}{c}\right)f_s \quad (2.5)$$

- Seconda applicazione del principio: 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, quindi con segno opposto rispetto all'equazione precedente. La frequenza del segnale ricevuto quindi vale:

$$f_r = \left(1 + \frac{v_g}{c}\right)f_g = \left(1 + \frac{v_g}{c}\right)\left(1 + \frac{v_g}{c}\right)f_s = \left(1 + \frac{v_g^2}{c^2} + 2\frac{v_g}{c}\right)f_s \quad (2.6)$$

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

$$f_r = \left(1 + 2\frac{v_g}{c}\right)f_s \quad (2.7)$$

La differenza in frequenza tra il segnale inviato e quello ricevuto, ovvero lo *shift* Doppler, per la (2.7) vale:

$$f_r - f_s = 2\frac{v_g}{c}f_s = 2\frac{v_g}{\lambda_s} \quad (2.8)$$

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

La luce complessivamente riflessa ricevuta dalla sonda si compone di due porzioni:

- una porzione è costituita dalla luce che ha colpito oggetti fissi, e, a causa della natura elastica del fenomeno, risulta alla stessa frequenza della luce trasmessa;
- l'altra porzione è quella luce che viene riflessa dagli oggetti in movimento, e che quindi ha subito uno *shift* in frequenza. La frequenza di questa parte del segnale sarà, per la (2.8), 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 Principi di funzionamento

La luce laser emessa dalla sorgente è trasmessa mediante fibre ottiche che scorrono attraverso una sonda: la testa della sonda viene posta a contatto con la pelle. Le strutture sottostanti possono riflettere, assorbire o disperdere i fotoni incidenti. Un'altra fibra ottica a contatto con la superficie della pelle (Fig.2.3) raccoglie la luce riflessa o diffusa dalle strutture sia fisse che in movimento [21, 17].

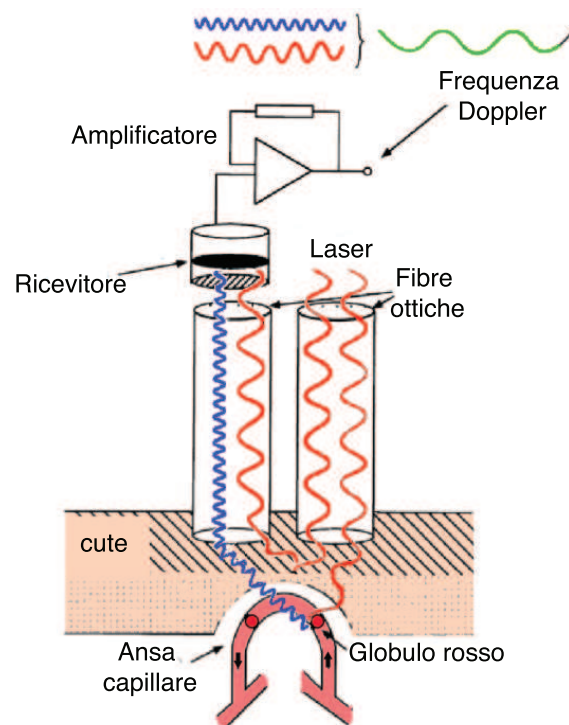


Figura 2.3. Schema di funzionamento del LDF

A muoversi sotto la cute però non sono unicamente i globuli rossi. Anche le onde riflesse da tessuti in movimento come la parete vascolare possono subire uno *shift* Doppler. La riflessione dovuta ai tessuti di solito dà un segnale di ampiezza molto più grande rispetto a quella dovuta agli elementi corpuscolati del sangue, a causa del maggior numero di onde incidenti su di essi; la velocità di movimento del tessuto è generalmente molto inferiore a quella del sangue: per la (2.8) vi sarà quindi associato un contributo a bassa frequenza. Questo contributo può essere soppresso da un filtro passa-alto.

Il segnale risultante, composto dalle due porzioni di luce riflessa, presenta il fenomeno della *frequenza di battimento*. Questo fenomeno è ciò che avviene quando si sovrappongono segnali aventi frequenze simili ma non identiche. L'onda risultante ha come frequenza la media delle frequenze, ma la sua ampiezza è modulata dallo sfasamento dovuto alla diversità delle frequenze: ciò che risulta è un segnale con ampiezza che oscilla tanto più velocemente quanto più le frequenze differiscono [17].

Questo campione misto contenente le frequenze di battimento viene poi analizzato e scomposto nelle sue due componenti *shiftate* e *non-shiftate*. La parte contenente informazioni sullo *shift* viene filtrata attraverso il passa-alto per eliminare i contributi dovuti al movimento dei tessuti: ogni campione del segnale di uscita dallo strumento è proporzionale ai valori di frequenza e ampiezza di questo segnale. Essendo questi parametri legati rispettivamente alla velocità dei globuli rossi e al loro numero, essi sono in grado di quantificare la fornitura ematica tissutale, cioè la perfusione.

Ciò che viene misurato è detto *flux*. A differenza del *flow*, il *flux* non è una misura assoluta della velocità di cellule del sangue. Nessuna corrente versione dello strumento laser Doppler è infatti in grado di fornire valori di perfusione assoluti, come ad esempio *ml/min/g* di tessuto. Attualmente, le misurazioni sono espresse come unità di perfusione (*PU*), che sono arbitrarie [21].

Il volume di misura, fissato nella sua componente di area superficiale ma variabile in profondità, è influenzato dai seguenti fattori [17]:

- le caratteristiche del tessuto, come struttura e densità dei letti capillari, pigmentazione, ossigenazione;
- la lunghezza d'onda della sorgente luminosa, in quanto più breve è la lunghezza d'onda più superficialmente si esaurisce la sua capacità di penetrare il tessuto; ciò si verifica a causa della maggior probabilità che le onde a frequenza superiore hanno di collidere con particelle riflettenti;
- la configurazione della sonda, in particolare la separazione delle fibre, in quanto a una maggior distanza tra le fibre di trasmissione e ricezione corrisponde una maggior profondità di tessuto analizzato.

Il LDF utilizza un sistema ad onda continua: le onde riflesse o retrodiffuse possono provenire indifferentemente da riflessioni avvenute all'altezza di qualsia-

si sezione del raggio laser penetrante. Avendo lo scopo di valutare complessivamente la perfusione tissutale, e non ad esempio di localizzare i vasi, il LDF non fornisce informazioni sulla posizione degli oggetti riflettenti: nel caso in cui si desideri disporre di questo tipo di informazioni è necessario utilizzare un sistema a onde pulsate. [19].

## 2.3 Limiti della flussimetria laser Doppler

Un problema insito nell'utilizzo del LDF è la mancanza di una misurazione dello *zero assoluto* dello strumento. Succede infatti che quando il flusso di globuli rossi viene ridotto a zero, sperimentalmente o da escissione chirurgica, spesso lo strumento rilevi comunque una lettura di flusso. In passato, questo zero biologico è stato attribuito sia al moto browniano nel compartimento vascolare che alla motricità della parete cellulare dei globuli rossi. Più recentemente, la fonte principale dello zero biologico è stata identificata come il moto browniano delle macromolecole presenti in sospensione nel compartimento interstiziale [17].

Un'altra difficoltà che si pone quando si cerca di valutare la validità della tecnica laser Doppler è che non esiste tuttora un *gold standard* per la misura della perfusione di sangue in un tessuto.

Inoltre, l'impossibilità di associarvi una quantità fisica assoluta rende le misure ottenute tramite strumenti laser Doppler di natura relativa. Il principale prerequisito per confrontare i risultati tra strumenti e misurazioni diverse è l'utilizzo di una procedura standardizzata di calibrazione, in questo caso fornita dalla Perimed.

Oltre alla calibrazione, le condizioni verificabili per rendere comparabili le misure sono che la lunghezza d'onda della sorgente luminosa e la configurazione della sonda siano sempre le stesse.

Perché si possano completamente comparare i risultati tra misurazioni diverse però, è necessario che anche le proprietà del tessuto siano le stesse; tale condizione è più difficilmente realizzabile e non direttamente verificabile.

Tuttavia, la tecnica laser Doppler è stata confrontata con la maggior parte, se non tutte, le altre tecniche attualmente disponibili. Studi comparativi con l'isotopo di Xenon, fluoresceina, e microsfele radioattive hanno dimostrato una forte correlazione con i risultati da LDF. 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 [17].

Altro problema relativo all'acquisizione del segnale risiede nel fatto che la sonda è sensibile ai movimenti della zona sulla quale è fissata. Se il soggetto sul quale si sta effettuando la misura si muove, al segnale vengono sommati contributi dovuti al movimento che ovviamente non corrispondono a caratteristiche del microcircolo, e che sono quindi artefatti. Essi sono facilmente riconoscibili

nel caso in cui il movimento sia breve e veloce, presentandosi come picchi che si esauriscono in un paio di secondi ed hanno ampiezza chiaramente distinguibile dal resto del segnale. Nel caso in cui il movimento sia sufficientemente lento, il suo contributo al segnale potrebbe però essere confuso con i contributi dovuti al microcircolo, e quindi portare a risultati fuorvianti.

## Capitolo 3

# L'analisi in frequenza

Il LDF fornisce in uscita una successione di valori, ognuno dei quali indica l'ampiezza del segnale (in  $PU$ ) acquisito in un certo istante, in particolare ogni sedicesimo di secondo. È naturale quindi rappresentare il segnale nel *dominio del tempo*, cioè tracciarlo in un sistema di coordinate in cui l'asse  $x$  rappresenta il tempo e l'asse  $y$  l'ampiezza del segnale.

Questa rappresentazione, sebbene sia la più naturale, non sempre risulta la più conveniente: in molti casi infatti le informazioni di interesse sono nascoste nel contenuto in frequenza del segnale. Il grafico del contenuto in frequenza è chiamato *spettro*, e mostra quali frequenze esistono nel segnale.

Per ottenere lo spettro è necessario applicare una trasformazione matematica che, a partire dal segnale nel dominio del tempo, fornisca lo stesso segnale nel dominio della frequenza.

### 3.1 La trasformata di Fourier<sup>1</sup>

La trasformazione in frequenza più conosciuta è quella dovuta all'idea del matematico francese Jean Baptiste Joseph Fourier, pubblicata nel 1822 in *“Teoria analitica del calore”*. In questo lavoro egli mostrò come un generico segnale possa essere espresso come somma di onde semplici, caratterizzate ognuna da uno specifico valore di frequenza e da un *coefficiente* che ne modula l'ampiezza. In Fig.3.1 è illustrato come un segnale apparentemente complicato, in nero, sia composto dalla somma di tre onde semplici (in blu, rosso e verde), aventi rispettivamente frequenze di 0.01, 0.1 e 1  $Hz$  e coefficienti di ampiezza di 3, 5 e 10 unità generiche di ampiezza (chiamate  $A$ ).

Una volta applicata la trasformata di Fourier (FT, rappresentando le coppie frequenza-coefficiente come punti in un nuovo sistema di coordinate (avente le frequenze sull'asse  $x$  e i valori dei relativi coefficienti sull'asse  $y$ ), si ottiene un grafico che indica quali frequenze sono contenute nel segnale e con che intensità,

---

<sup>1</sup>Le nozioni teoriche riportate in questo paragrafo sono tratte da [22]

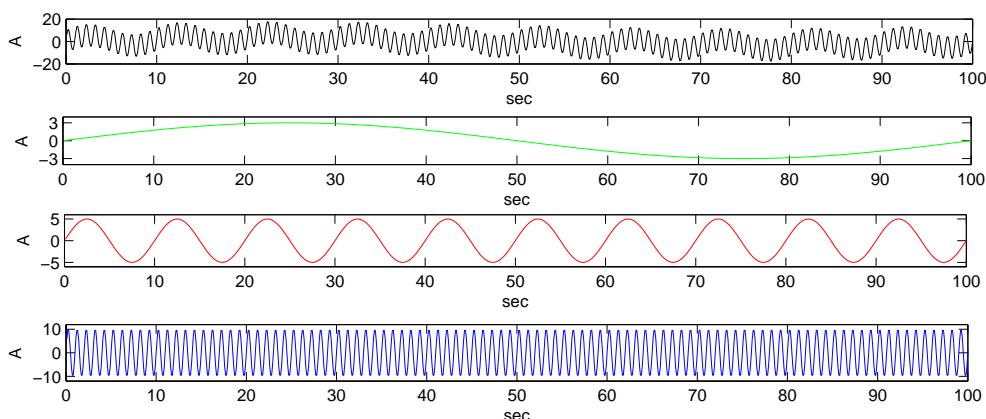


Figura 3.1. Esempio di come un segnale apparentemente complicato (in nero) derivi dalla somma di tre onde semplici (in verde rosso e blu)

ovvero lo *spettro* del segnale stesso. Nel caso di Fig.3.1, lo spettro del segnale in nero consiste in tre *spikes* a livello delle frequenze relative alle onde che lo compongono (Fig. 3.2).



Figura 3.2. Spettro del segnale di Fig.3.1, ottenuto tramite la FT.

L'altezza degli *spikes* dello spettro è direttamente proporzionale all'ampiezza delle onde ai quali si riferiscono.

Rappresentare in scala lineare l'asse  $x$  dello spettro non è la scelta migliore nel caso di segnali composti da frequenze aventi diversi ordini di grandezza (come il segnale in nero in Fig.3.1). Una rappresentazione in scala logaritmica permette di apprezzare meglio la distribuzione delle frequenze, quando esse sono molto diverse tra loro (Fig.3.3)

### 3.1.1 L'equazione

L'equazione che effettua la FT è la seguente:

$$X(f) = \int_{-\infty}^{+\infty} x(t)e^{-i2\pi ft} dt \quad (3.1)$$



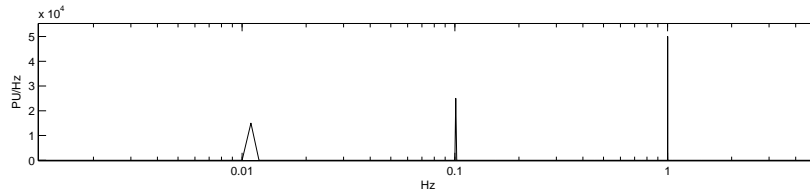


Figura 3.3. Spettro del segnale di Fig.3.1, ottenuto tramite la FT e rappresentato con l'asse delle frequenze in scala logaritmica.

Poichè l'esponenziale nella (3.1) può essere riscritto attraverso la formula di Eulero come

$$e^{-i2\pi ft} = \cos(2\pi ft) + i \operatorname{sen}(2\pi ft) \quad (3.2)$$

per ogni valore di  $f$  la (3.1) moltiplica l'intero segnale per un'espressione complessa composta da seno e coseno alla frequenza  $f$ , e ne calcola l'integrale.

Il senso di questo passaggio risiede nell'idea che se  $x(t)$  contiene una componente ad una certa frequenza  $\hat{f}$ , questa componente ed i termini sinusoidali a frequenza  $\hat{f}$  vanno a coincidere, e il loro prodotto fornisce una curva avente un'ampiezza relativamente consistente. Tramite l'integrale, questo concetto viene sintetizzato in un unico valore, che viene segnato nel piano frequenza-ampiezza in corrispondenza di  $\hat{f}$ .

Se la FT fornisce per  $f = \hat{f}$  un valore consistente, si dice che il segnale  $x(t)$  ha una componente spettrale dominante alla frequenza  $\hat{f}$ . Viceversa, se il risultato dell'integrazione è relativamente piccolo, significa che l'onda a frequenza  $\hat{f}$  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.

### Unità di misura

L'unità di misura dell'asse  $y$  del piano frequenze-ampiezze può essere dedotta scomponendo l'equazione 3.1. Poichè:

- $x(t)$  è il segnale originario, ed è misurato in  $PU$ ;
- $e^{-i2\pi ft}$  è adimensionale;
- $dt$  è misurato in secondi.

si ha che  $X(f)$  è espresso in  $PU \cdot \text{sec}$ , ovvero in  $PU/Hz$ .

### Non-idealità dovute alla limitata durata del segnale

Poichè le acquisizioni LDF hanno durata limitata, quello che si analizza è una finestra temporale del segnale. La lunghezza di questa finestra influenza la quantità e la qualità di informazioni che possono essere estrapolate: le caratteristiche

dello spettro sono infatti limitate dalla frequenza di campionamento  $f_c$  e dal numero di campioni acquisiti  $N$ .

Per segnali reali, campionati con frequenza di campionamento  $f_c$  e con un numero di campioni pari a  $N$  valgono le seguenti proprietà spettrali:

- l'asse delle frequenze sul quale sono localizzate le componenti spettrali è limitato tra  $-f_c/2$  e  $f_c/2$ . Questo valore è chiamato *frequenza di Nyquist*, ed è la più elevata frequenza indagabile;
- la natura reale dei segnali biologici comporta la simmetria dello spettro rispetto all'asse  $y$ : l'asse delle frequenze può quindi essere ulteriormente limitato tra 0 e  $f_c/2$  senza perdita di informazione;
- poichè il numero dei campioni del segnale originario ( $N$ ) equivale a quello della trasformata, la distanza in frequenza  $\Delta f$  tra due campioni dello spettro, ovvero la risoluzione in frequenza, risulta pari a

$$\Delta f = f_c/N \quad (3.3)$$

valore che indica anche la più bassa frequenza riconoscibile nel segnale.

In Fig. 3.3 si può constatare che i picchi non sono di natura puramente impulsiva, ma hanno forma triangolare, ovvero un supporto pari a tre campioni. Questo fatto è dovuto, per la (3.3), alla risoluzione in frequenza  $\Delta f$  limitata, dovuta al limitato numero di campioni  $N$ . Diminuendo  $N$ , il supporto del picco tende ad allargarsi, mentre l'altezza diminuisce.

Quello che si deve considerare per confrontare spettri di segnali aventi diversi numeri di campioni  $N$ , a parità di frequenza di campionamento  $f_c$ , non è quindi l'altezza dei picchi, ma l'area da essi sottesa.

### 3.1.2 Limiti della FT

Le informazioni fornite dalla FT (3.1) sono calcolate basandosi sull'intero segnale, poichè l'integrale ha estremi a  $\pm\infty$ . Ne consegue che l'onda a frequenza  $\hat{f}$  contribuisce in egual misura allo spettro ovunque nel segnale (quindi nel tempo) sia localizzata.

Questo è il motivo per cui la FT non è adatta ad analizzare segnali che hanno componenti in frequenza variabili nel tempo: il variare delle frequenze all'interno del segnale conferisce un andamento rumoroso e poco informativo. Solo nel caso in cui il segnale sia *stazionario* (ovvero composto da onde a frequenze invariabili lungo tutto il segnale, come in Fig.3.1), l'interpretazione del grafico FT è semplice e immediata, come in Fig.3.2.

Nella realtà dei segnali biologici, la stazionarietà è una condizione mai verificata, in quanto i meccanismi che generano qualsiasi fenomeno sono di natura dinamica. Nel caso del microcircolo, la complessità e dinamicità dei meccanismi al-

la base di *flowmotion* e *vasomotion* (trattate nel paragrafo 1.2) rendono impensabile il fatto che il segnale da LDF possa considerarsi anche approssimativamente stazionario.

D'altra parte, utilizzando il LDF, non vi è uno specifico interesse nella localizzazione temporale delle frequenze. Quello che interessa è conoscere quali frequenze siano complessivamente presenti. Anche l'applicazione diretta della FT può quindi lasciar intuire quali siano gli intervalli di frequenze dominanti.

Costruendo un nuovo segnale, composto dalle stesse onde di quello di Fig.3.1, ovvero a 0.01, 0.1 e 1 Hz, ma ad intervalli separati (Fig.3.4), lo spettro dimostra come le frequenze contenute siano comunque riconoscibili (Fig.3.5). Il rumore sovrapposto è dovuto alla non stazionarietà del segnale. La rappresentazione con l'asse logaritmica evidenzia come le basse frequenze risultino indicate con meno precisione (Fig.3.5).

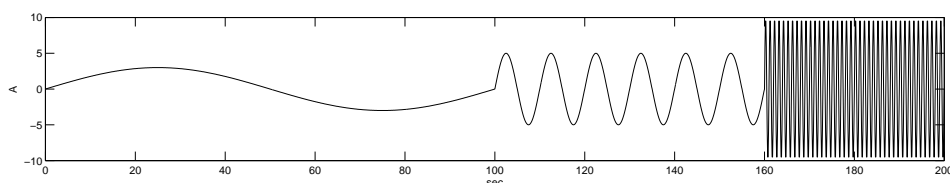


Figura 3.4. Segnale composto dalle stesse onde illustrate in Fig.3.1, ma ad intervalli separati

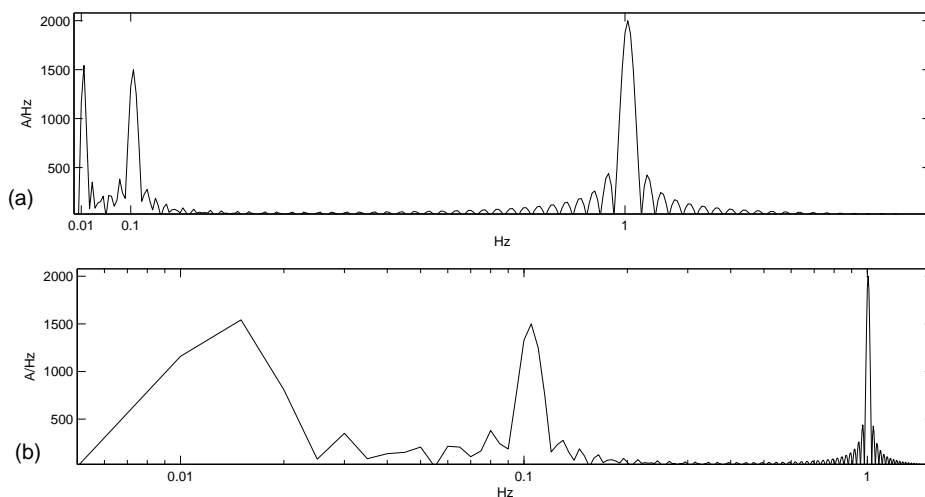


Figura 3.5. Spettro da FT del segnale variabile ad intervalli di Fig.3.4 rappresentato in scala lineare (a), e logaritmica (b)

### 3.2 La trasformata di Fourier *Short Time*<sup>2</sup>

Per ovviare al problema della non stazionarietà dei segnali e per localizzare le variazioni temporali della composizione in frequenza, il segnale deve essere diviso in finestre più brevi, ed ogni segmento deve essere analizzato separatamente.

La trasformata di Fourier *short time* (STFT) compie questa operazione dividendo il segnale in segmenti, e applicando ad ognuno la FT, fornendo quindi informazioni spettrali in un piano tempo-frequenza. In questo modo le variazioni dello spettro possono essere tracciate nel tempo.

La STFT si basa sull'idea che, dato un segnale non stazionario, esso sia divisibile in intervalli di durata *sufficientemente breve* affinché il loro contenuto possa essere considerato stazionario.

La formulazione matematica è la seguente:

$$STFT(\tau, f) = \int x(t)\gamma(t - \tau)e^{-i2\pi ft} dt \quad (3.4)$$

La (3.4) è la (3.1) del segnale  $x(t)$  moltiplicato per  $\gamma(t - \tau)$ . Quest'ultima espressione rappresenta una finestra di forma e durata arbitraria, che viene fatta scorrere sul segnale a passi di  $\tau$  secondi.

Ciò che risulta dal prodotto di  $x(t)$  e  $\gamma(t - \tau)$  è un segnale non nullo solo dove le due parti si sovrappongono, cioè in un intervallo centrato in  $\tau$  e esteso quanto la finestra  $\gamma$ .

Rappresentando il piano tempo-frequenza con l'asse orizzontale relativo ai tempi e quello verticale alle frequenze, si ha che ogni colonna della matrice STFT contiene lo spettro del segnale relativo a una data posizione della finestra. Ogni riga indica invece come cambia il contenuto relativo a una certa frequenza allo spostarsi della finestra.

In Fig.3.6 è riportato il segnale variabile a intervalli di Fig.3.4, allineato alla sua STFT ottenuta con una finestra di 100 campioni (grafico in basso). Si possono notare i diversi andamenti del grafico della STFT in corrispondenza dei diversi intervalli.

In Fig.3.7 un'altra prospettiva del grafico evidenzia tale differenza. Questa visione illustra anche come la localizzazione in frequenza abbia diverse precisioni nei diversi segmenti di segnale: la finestra da 100 campioni sembra più adatta a identificare il picco a 1 Hz, ma troppo breve per localizzare le più basse frequenze.

Mediando poi le FT ottenute per mezzo di queste traslazioni, ovvero le colonne della matrice o le sezioni verticali di Fig.3.6, si ottiene una stima dello spettro del segnale avente un livello di risoluzione in frequenza direttamente proporzionale alla lunghezza della finestra scelta.

---

<sup>2</sup>Le nozioni teoriche riportate in questo paragrafo sono tratte da [23]

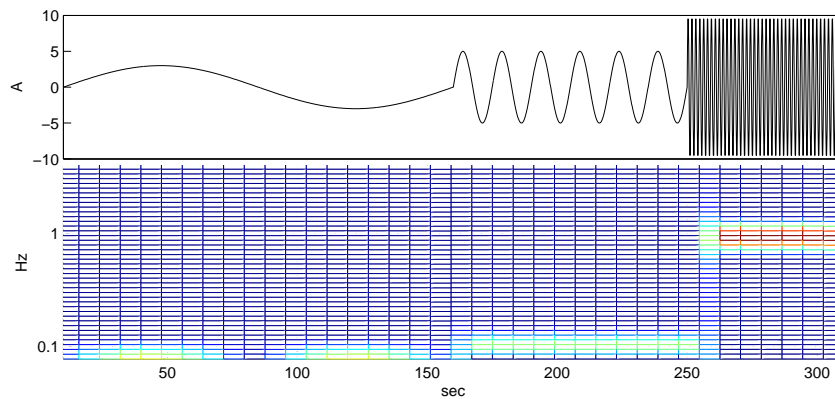


Figura 3.6. Segnale variabile a intervalli di Fig.3.4 (in alto), allineato alla sua STFT ottenuta con una finestra di 100 campioni (in basso).

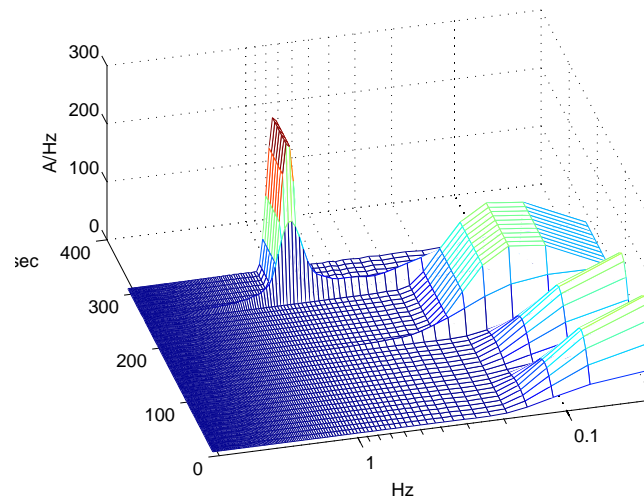


Figura 3.7. Visione 3D della STFT del segnale variabile a intervalli di Fig.3.4, con asse delle frequenze in scala logaritmica.

### 3.2.1 Limiti della STFT

La principale limitazione intrinseca a questo metodo sta nel fatto che la lunghezza della finestra  $\gamma$  è *prefissata*. La lunghezza della finestra gioca in favore della risoluzione in frequenza (essendo essa pari a  $f_c/N$ , dove  $N$  è il numero dei campioni considerati e  $f_c$  la frequenza di campionamento), ma deve essere *sufficientemente breve* affinché il segnale in essa contenuto possa essere considerato stazionario.

Nel caso del segnale LDF, viste la differenza tra gli ordini di grandezza delle frequenze di Tabella 1.1 e la variabilità del segnale, è impensabile che la stessa finestra possa costituire il miglior compromesso risoluzione-stazionarietà per tutte le bande.

Una soluzione potrebbe essere quella di applicare iterativamente l'algoritmo, utilizzando di volta in volta una finestra adatta a estrapolare informazioni relative ad uno specifico intervallo di frequenze, e sovrapponendo le informazioni ottenute ad ogni iterazione.

Questa metodologia di analisi però porta ad un *surplus* di informazioni, relativo al contenuto in frequenza calcolato al di fuori dell'intervallo per cui la finestra è stata specificamente pensata. Inoltre ogni iterazione porta a risultati slegati tra loro, e di non immediata interpretazione.

### 3.3 La trasformata *wavelet*<sup>3</sup>

Gli svantaggi che i metodi precedentemente descritti presentano nel caso di analisi del segnale da LDF, possono essere superati tramite l'utilizzo dell'analisi *wavelet*, proposta da Jean Morlet nel 1981. L'idea che sta alla base di questo metodo è quella di analizzare il contenuto in frequenza del segnale utilizzando il tipo di finestrazione ottimale per ogni punto del piano tempo-frequenza, in modo che ogni evento possa essere localizzato al meglio in entrambe le dimensioni.

#### 3.3.1 La risoluzione tempo-frequenza

Diversamente dalla STFT, in cui la finestra ha una durata prefissata ed è utilizzata per analizzare tutte le frequenze del range di interesse, la lunghezza della finestra non è costante durante l'analisi *wavelet*.

In Fig.3.8 sono riportate le griglie di risoluzione tempo-frequenza per la STFT e per la WT. Il principio di indeterminazione di Heisenberg stabilisce che l'area dei rettangoli formati da queste griglie, chiamati appunto *Heisenberg box*, non può scendere sotto un certo valore, che per una definita metodologia di analisi rimane costante.

Confrontando i due grafici si può notare che:

- gli *Heisenberg box* di 3.8-a hanno tutti la stessa base e di conseguenza la stessa altezza, a causa della durata prefissata della finestra. Il rettangolo blu, utilizzato per isolare un'alta frequenza, è quindi congruente a quello rosso, utilizzato per isolare una bassa frequenza: se esse sono molto diverse tra loro, il valore costante della risoluzione in frequenza non può essere adatto per entrambe;
- per la WT, la finestra temporale utilizzata rimane la stessa solo durante il completamento della sua traslazione sul segnale: i rettangoli di ogni riga

---

<sup>3</sup>Le nozioni teoriche riportate in questo paragrafo sono tratte da [24]

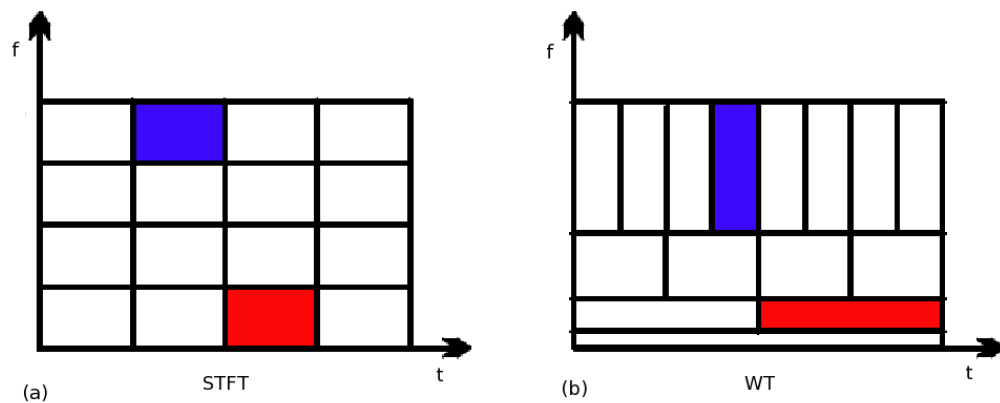


Figura 3.8. Griglie di risoluzione delle STFT (a) e WT (b). L'area degli *Heisenberg box* rimane costante, coerentemente con il principio di indeterminazione, ma in (b) vengono modificate le proporzioni fra i lati

sull'asse delle frequenze in 3.8-b hanno infatti la stessa base. Al variare della frequenza indagata, però, la base dei rettangoli varia: rettangoli di righe corrispondenti a basse frequenze hanno basi più lunghe di quelli relativi alle alte frequenze. Per il suddetto principio di Heisenberg, ciò implica che le altezze dei rettangoli varino in modo inversamente proporzionale alle basi. In questo modo, pur rimanendo costante l'area dei rettangoli, variano i termini del compromesso di risoluzione per ogni tipo di evento che si vuole studiare. In particolare:

- il rettangolo blu, usato per indagare alte frequenze, ha una base stretta, che implica buona risoluzione temporale dell'evento, a discapito di un'altezza più elevata, che implica una risoluzione in frequenza meno precisa. Se l'intervallo che contiene l'altezza fosse 1-1.1  $Hz$ , questa incertezza risulterebbe accettabile a favore di una localizzazione precisa del momento in cui si verifica questa oscillazione;
- il rettangolo rosso ha invece un'altezza molto stretta, grazie alla quale la bassa frequenza di tale oscillazione può essere misurata in modo preciso, ad esempio con un valore compreso tra gli 0.10 e gli 0.11  $Hz$ . La base è più lunga, implicando una scarsa localizzazione temporale dell'oscillazione, ma essendo il fenomeno a bassa frequenza (quindi lento) la precisione nell'indicare quando essa avvenga è sacrificabile.

### 3.3.2 L'equazione

La base di questa metodologia di analisi è la finestra chiamata *mother wavelet*. Operazioni di traslazione e cambiamento di scala generano, a partire dalla *mother wavelet*  $\psi$ , una famiglia  $\Psi$  di finestre definita dalla seguente espressione:

$$\Psi_{s,\tau} = \frac{1}{\sqrt{s}} \psi \left( \frac{t - \tau}{s} \right) \quad (3.5)$$

in cui  $s$  è il fattore di scala [sec] e  $\tau$  la traslazione nel tempo [sec].

Queste versioni modificate della *mother wavelet* vengono moltiplicate per il segnale, e di questo prodotto viene calcolato l'integrale. La trasformata *wavelet* (WT) è data infatti dalla seguente espressione:

$$W(s, \tau) = \int_{-\infty}^{+\infty} \hat{\Psi}_{s,\tau}(t) x(t) dt \quad (3.6)$$

Analogamente a quanto accade con le trasformate basate sul metodo di Fourier, l'idea alla base di questa operazione è quella che si ottenga un valore relativamente alto dal prodotto di onde aventi frequenze simili: se l'intervallo considerato del segnale contiene un'onda avente frequenza simile a quella della *wavelet*, il valore del prodotto sarà direttamente proporzionale al livello di somiglianza e all'ampiezza dell'onda nel segnale. L'integrale racchiude poi questo concetto in un'unico valore, che viene salvato in un punto del piano  $s, \tau$

Si può dire quindi che la (3.6) effettui la mappatura del segnale  $x(t)$  nel piano tempo-scala, nel quale il valore di ogni punto  $(s, \tau)$  è dato dal risultato della (3.6) ottenuto utilizzando la corrispondente  $\hat{\Psi}_{s,\tau}$ .

### 3.3.3 La *mother wavelet*

La caratteristica fondamentale di una *mother wavelet* è quella di avere un andamento oscillante e una lunghezza limitata: partendo da zero, l'ampiezza dell'oscillazione aumenta fino a raggiungere un valore massimo al centro, per poi decrementare fino a ritornare a zero.

Sono state proposte numerose forme per la finestra dalla quale ricavare la famiglia di *wavelet* (Fig. 3.9), ognuna delle quali si adatta ad uno specifico scopo di analisi. Il criterio con il quale viene scelta una funzione piuttosto di un'altra è quello di somiglianza con la forma delle onde che si vogliono localizzare.

Nel caso del segnale da LDF, la parte reale della *wavelet* di Morlet (Fig.3.9-b) è considerata la più adatta per identificare le frequenze di oscillazione del tracciato [9, 12, 16, 25, 15, 26].

L'equazione di questa curva è:

$$\psi(x) = e^{-x^2/2} \cos(5x) \quad (3.7)$$

dalla quale si deduce che la simmetria rispetto all'asse  $y$  dell'oscillazione è dovuta al fattore cosinusoidale, mentre la moltiplicazione per l'esponentiale negativo conferisce la forma decrescente in modulo per  $t > 0$ . Il quadrato presente nell'esponente causa l'andamento simmetricamente crescente in modulo per  $t < 0$ .



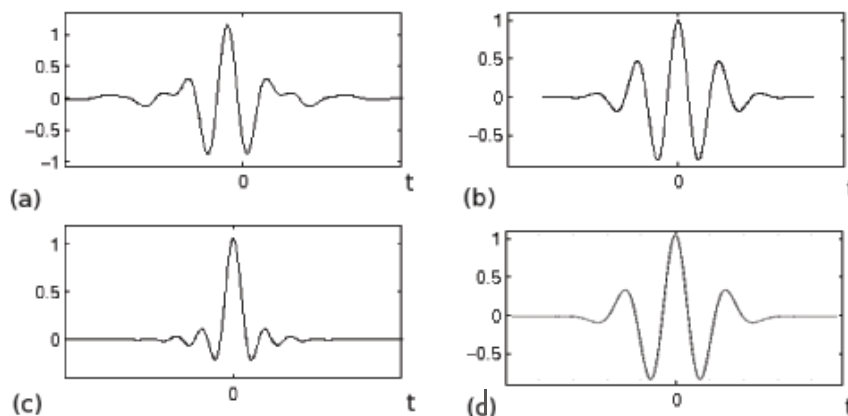


Figura 3.9. Alcune delle possibili forme di *wavelet*: (a) Meyer (b) Morlet (c) Mexican hat (d) Gauss.

### 3.3.4 La scala

E' evidente che, per questo tipo di analisi, è cruciale la scelta del fattore  $s$ , tramite il quale le  $\hat{\Psi}_{s,\tau}$  assumono un valore di frequenza pari a quello che devono localizzare nel segnale. Una scelta sbagliata di  $s$  porterebbe infatti a cercare nel segnale frequenze alle quali non si è interessati.

In Fig.3.10 è riportata la griglia di risoluzione con gli *Heisenberg box*, in cui per alcuni punti del piano sono indicate le *wavelet* corrispondenti, scalate e traslate. Ciò illustra come *wavelet* a frequenza più elevata portino a risultati con alta risoluzione temporale a discapito di quella in frequenza, e viceversa.

#### Discretizzazione della scala

Altro punto fondamentale per l'analisi sta nel fatto che per ottenere la WT tramite un calcolatore, la scala e la traslazione non possono evolversi in un continuo, ma devono essere discretizzate.

Se discretizzare  $\tau$  è naturale, dovendo esso esprimere traslazioni su un segnale campionato, la scelta del passo che definisce l'incremento della scala non è così scontato: nel caso di segnali in cui le frequenze da indagare si trovano in un range molto vasto (come accade per il segnale da LDF), un semplice incremento uniforme di  $s$  non è la scelta migliore.

Si consideri ad esempio un incremento di  $0.05 \text{ Hz}$ : esso può garantire una buona risoluzione in frequenza se effettuato attorno a  $1 \text{ Hz}$ , ma non permette di risolvere adeguatamente le frequenze attorno a  $0.01 \text{ Hz}$ . Al contempo, un incremento di  $0.0005 \text{ Hz}$  risolverebbe adeguatamente le frequenze intorno a  $0.01 \text{ Hz}$ , ma effettuato attorno a  $1 \text{ Hz}$  comporterebbe un dispendio eccessivo di risorse

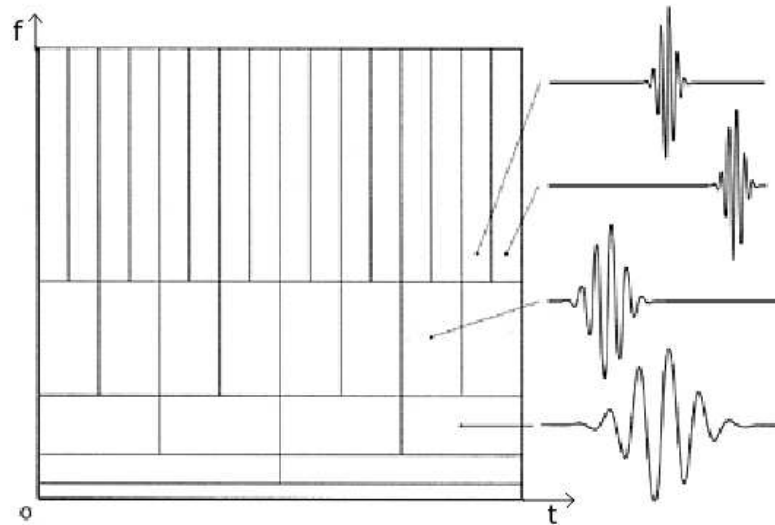


Figura 3.10. Griglia di risoluzione con gli *Heisenberg box* della WT: versioni scalate e traslate della *mother wavelet* sono associate ai rettangoli corrispondenti

computazionali: sarebbero infatti necessarie 2000 interazioni per raggiungere da tale la frequenza quella di  $2 \text{ Hz}$ , procedendo con questo step.

Incrementare uniformemente  $s$  non è però l'unica scelta possibile: nel caso di range molto vasti di frequenze potrebbe convenire, ad esempio, studiare un incremento che obbedisca a una legge di tipo esponenziale.

### Corrispondenza scala-frequenza

Il legame tra scala e frequenza è di proporzionalità inversa: è infatti intuibile che con valori di scala elevati si evidenzino eventi lenti, quindi a basse frequenze, mentre con valori di scala ridotti si vadano a isolare eventi di breve durata, aventi quindi alte frequenze. Il legame inversamente proporzionale è evidente anche ragionando sulle unità di misura:  $s$  è infatti espresso in *sec*, unità reciproca rispetto agli *Hz*.

L'equazione che lega la scala  $s$  alla corrispondente frequenza  $f_s$  è la seguente:

$$f_s = \frac{f_w}{f_c} \cdot \frac{1}{s} \quad (3.8)$$

dove  $f_w$  è la frequenza centrale della *wavelet*, ovvero la frequenza corrispondente alla sua più ampia oscillazione (Fig.3.11), e  $f_c$  la frequenza di campionamento del segnale. Il valore di  $f_w$  può essere ricavato tramite la FT della *wavelet*, in quanto corrisponde alla frequenza relativa al suo punto di picco.

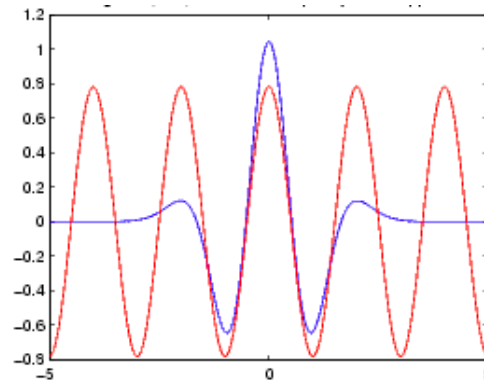


Figura 3.11. *Wavelet* di derivazione gaussiana (in blu) e onda sinusoidale avente frequenza pari alla sua frequenza centrale  $f_w$  (in rosso). Le due curve si sovrappongono nella parte centrale della *wavelet*.

### 3.3.5 Lo scalogramma

Per confrontare tra loro i grafici dei coefficienti *wavelet*, in letteratura ne viene calcolato lo *scalogramma* [9, 12, 16]. La formula che lo fornisce è la seguente:

$$S(s, \tau) = \frac{1}{s^2} |W(s, \tau)|^2 \quad (3.9)$$

Il quadrato del modulo di  $W(s, \tau)$  fa sì che i valori dei coefficienti risultino reali e positivi, cosa che non si verifica nella WT a causa dell'andamento oscillante attorno allo zero della *wavelet* di Morlet; il quadrato di  $s$  al denominatore ha invece la funzione di normalizzare le ampiezze della curva.

In Fig.3.12 è riportato un segnale dall'andamento variabile a tratti, in corrispondenza al rispettivo scalogramma. In Fig.3.13 è riportata una prospettiva dello scalogramma che evidenzia come le *wavelet* si adattino alla frequenza che stanno analizzando, isolandone al meglio i contributi.

### Unità di misura

I grafici dei coefficienti *wavelet* o, analogamente, gli scalogrammi, sono costruiti su tre dimensioni. Il supporto della curva è costituito dal piano tempo-frequenza, avente assi misurati in *sec* e *Hz*, mentre l'asse verticale indica l'ampiezza dei coefficienti.

Nel caso della WT, poichè:

- $x(t)$  è il segnale originario, ed è misurato in *PU*;
- $\Psi$  è misurata in  $\text{sec}^{-1/2}$  (3.5);
- $dt$  è misurato in *sec*;

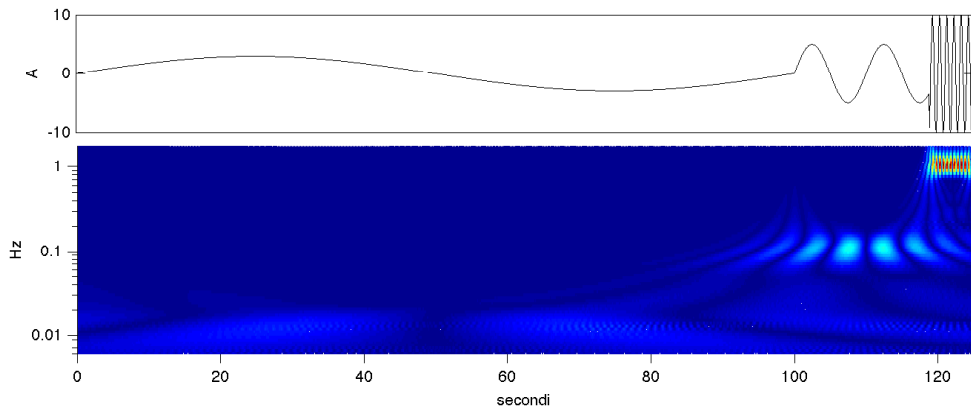


Figura 3.12. Segnale variabile a tratti e relativo scalogramma

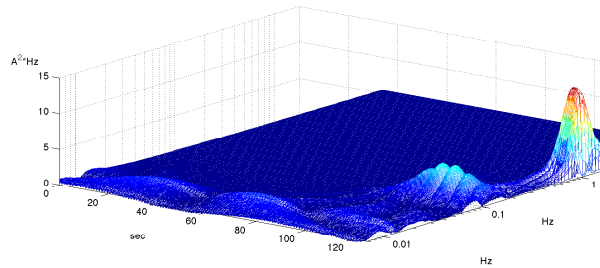


Figura 3.13. Scalogramma di Fig.3.12 in prospettiva

si ha, per la (3.6), che  $W(s, \tau)$  è espresso in  $PU \cdot sec^{1/2}$ , ovvero in  $PU/Hz^{1/2}$ .

Nel caso dello scalogramma, si ha che:

- $W(s, \tau)$  è misurato in  $PU \cdot sec^{1/2}$ ;
- $s$  è misurato in  $sec$ ;

quindi, per la (3.9),  $S(s, \tau)$  risulta misurato in  $(PU^2 \cdot sec)/sec^2 = PU^2/sec$  ovvero  $PU^2 \cdot Hz$

### Lettura tempo-frequenza

Sezioni del grafico di Fig.3.13 parallele all'asse del tempo derivano dall'applicazione della (3.6), in cui una  $\hat{\Psi}_{s, \tau}$  avente lo stesso fattore di scala  $s$  viene tralata nel tempo (variando  $\tau$ ); il significato di queste sezioni è analogo a quello delle righe della STFT: ognuna di esse indica come varia il contributo dovuto a

una certa frequenza lungo il segnale. Nel profilo di ognuna di queste sezioni è riconoscibile la frequenza di oscillazione della *wavelet* che l'ha generata.

Sezioni del grafico di Fig.3.13 parallele all'asse delle frequenze, relative quindi un tempo fissato, sono composte dai valori ottenuti dalla (3.6) in cui una  $\hat{\Psi}_{s,\tau}$  posizionata nello stesso istante  $t = \tau$  viene scalata tramite la variazione di  $s$ . Quello che si legge in ognuna di queste sezioni è lo spettro di tutte le frequenze indagate, relativo alla parte di segnale centrata in  $t = \tau$ : all'aumentare di  $s$  la finestra centrata in  $\tau$  si allarga, adattandosi al valore di frequenza del quale sta misurando il contenuto. La differenza tra una sezione e l'altra indica come cambia lo spettro centrando l'analisi in diversi istanti.

Per un confronto più immediato tra WT di segnali diversi, lo scalogramma viene mediato lungo l'asse del tempo: quello che ne deriva è un grafico 2D in cui ogni punto indica la media del contenuto ad una certa frequenza lungo il segnale (Fig.3.14).

Frequenze che si conservano portano a valori consistenti nello scalogramma mediato, mentre frequenze che compaiono solo in porzioni del segnale portano ad un valor medio più attenuato.

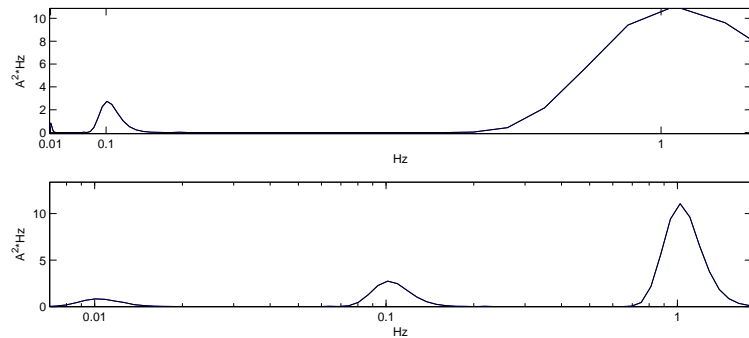


Figura 3.14. Scalogramma di Fig.3.12 mediato lungo l'asse dei tempi, riportato in scala lineare e logaritmica.

Confrontando questo grafico con quello di Fig. 3.5, ottenuto tramite STFT, è evidente che, applicata a segnali composti da frequenze molto diverse fra loro, la WT fornisce risultati di più semplice interpretazione, soprattutto se rappresentata in scala logaritmica.

Questa combinazione di analisi e rappresentazione sarà quindi adottata in seguito durante l'analisi dei dati sperimentali.



## Capitolo 4

# Parte sperimentale

In questo studio sono stati acquisiti i segnali LDF in un gruppo di soggetti sani, e confrontati con quelli di un gruppo di pazienti affetti da PAD agli arti inferiori di stadio II e III. I pazienti in stadio II sono stati sottoposti all'esame di iperemia reattiva post-occlusiva, mentre sui pazienti con PAD in stadio III sono state effettuate diverse procedure di rivascolarizzazione: le acquisizioni *pre* e *post* sono state confrontate fra loro.

I segnali LDF, ottenibili in modo semplice e non invasivo, sono in grado di fornire informazioni sulla condizione microcircolatoria relativa al punto di applicazione della sonda. Nel caso di pazienti affetti da patologie arteriose periferiche (PAD), questo distretto costituisce un punto critico per la qualità di vita del soggetto: la carenza di afflusso sanguigno dovuta a occlusioni in grandi arterie, oltre a causare dolore a livello muscolare, si riflette pesantemente a livello del microcircolo cutaneo.

In questo studio, la misurazione del segnale LDF è stata utilizzata come metodo di monitoraggio della microcircolazione della zona dorsale del piede del soggetto, sano o affetto da diverse forme di PAD. In quest'ultimo caso si è eseguita un'analisi di tipo comparativo, al fine di indagare come le modifiche nell'emodinamica indotte dai trattamenti eseguiti si riflettano a livello cutaneo.

La WT è stata poi applicata per effettuare l'analisi in frequenza dei tracciati (preprocessati da un algoritmo di riduzione degli artefatti da movimento), con un set di parametri tale da centrare l'indagine nel range indicato dalla letteratura [9, 11, 12, 14, 15, 16, 25, 26, 27, 28, 29, 30] (vedi Tab1.1).

Analisi di tipo statistico hanno poi valutato quali risultati si sono potuti considerare significativi: su di essi sono state formulate ipotesi interpretative di tipo fisio-patologico.

### 4.1 I soggetti

Tre tipologie di soggetti sono state coinvolte:

- 3 soggetti sani, maschi, non fumatori, di età compresa fra 29 e 33 anni;
- 5 pazienti affetti da ischemia non critica agli arti inferiori, nei quali è stata indotta iperemia reattiva post-occlusiva (PORH).
- 15 pazienti affetti da ischemia critica agli arti inferiori, che si sono sottoposti a interventi di rivascularizzazione;

Dai soggetti sani è stato acquisito un solo segnale. Dai pazienti affetti da patologie alle arterie periferiche sono state acquisiti due tracciati: la prima acquisizione ha avuto luogo prima del trattamento, la seconda dopo il trattamento. Disporre di queste due registrazioni ha reso possibile confrontare il contenuto in frequenza dei segnali, attribuendone le diversità alle modifiche dell'emodinamica apportate dal trattamento.

#### 4.1.1 Risultati da letteratura dell'analisi *wavelet* su soggetti sani

Lo spettrogramma mediato relativo al segnale LDF acquisito a riposo da soggetti sani, secondo la letteratura [9, 11, 12, 14, 15, 16, 25, 26, 27, 28], dovrebbe essere caratterizzato dalla presenza di cinque picchi (Fig.4.1-b): anche se le posizioni dei picchi differiscono da un soggetto all'altro, ognuno di essi si trova generalmente a ricadere in un intervallo di Tab.1.1. Ciò evidenzia il fatto che, in un soggetto sano in condizioni di riposo, le frequenze delle oscillazioni relative ad ogni attività tendono a conservarsi durante l'acquisizione (Fig.4.1-a).

Le ampiezze relative e assolute di ogni intervallo sono comunque variabili tra i soggetti e tra i diversi distretti anatomici da cui può essere acquisito il segnale.

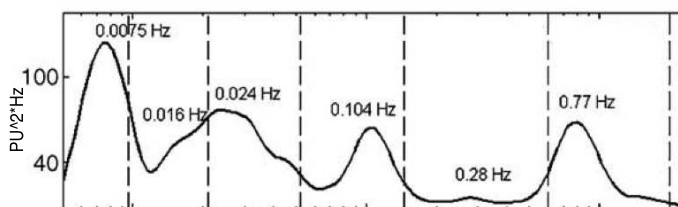


Figura 4.1. Scalogramma e 2D di un soggetto sano [15]

#### 4.1.2 L'arteriopatia periferica

Per arteriopatia periferica si intende la malattia che colpisce le arterie non coronarie (carotidi, renali e degli arti). Nel 90% dei casi, la etiologia della PAD è l'aterosclerosi che, generando lo sviluppo di 'placche', causa stenosi del lume delle arterie. La rottura della superficie delle placche determina aterotrombosi,



ovvero una trombosi sulla 'placca'; questo evento induce ostruzione dell'arteria con secondaria ischemia dei tessuti irrorati.

### Classificazione

La classificazione più utilizzata della PAD è basata sulla sintomatologia, ed è dovuta a Leriche e Fontaine (1954). I pazienti vengono divisi in quattro 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, soprattutto in posizione distesa, che aumenta quando l'arto viene sollevato;
- stadio IV; stadio dei danni tissutali: presenza di ulcere e gangrena.

### Cause

Secondo uno studio condotto dalla *National Health and Nutrition Examination Survey* negli Stati Uniti su più di 2000 soggetti aventi più di 40 anni [31], i fattori di rischio che contribuiscono all'insorgere di PAD sono:

- *età*: l'insorgere di PAD aumenta drammaticamente con l'età del soggetto, arrivando a colpire il 14.5% dei soggetti con più di 70 anni (Fig.4.2);

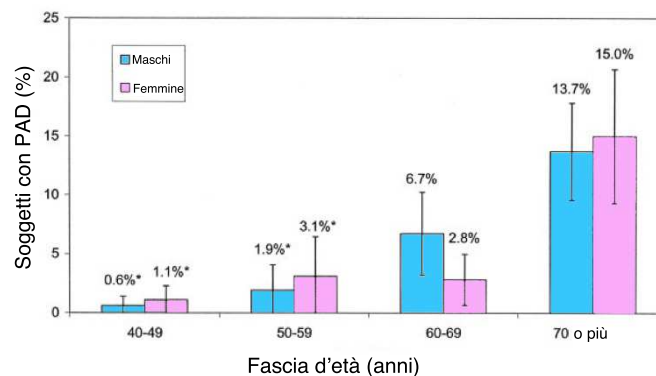


Figura 4.2. Percentuali di incidenza della PAD in uomini e donne statunitensi aventi più di 40 anni, secondo lo studio di Selvin [31].

- *ipertensione*: un'elevata pressione arteriosa è correlata ad un aumento del rischio di insorgenza di placche aterosclerotiche, e quindi dello sviluppo di PAD. L'ipertensione è associata a tutte le forme di malattie cardiovascolari,

tra cui la PAD. Tuttavia, il rischio relativo per lo sviluppo di PAD per l'ipertensione è meno alto di quello associato al diabete o al fumo;

- *ipercolesterolemia* oltre il 60% degli individui con PAD coinvolti nello studio soffrivano di ipercolesterolemia. In uno studio di Framingham, un livello di colesterolo a digiuno superiore a  $7 \text{ mmol/L}$  ( $270 \text{ mg/dL}$ ) è stato associato ad un raddoppio della incidenza della PAD sintomatica: il rapporto tra le lipoproteine ad alta densità e le lipoproteine totali è comunque considerato il migliore predittore per l'occorrenza della PAD;
- *fumo*: il rapporto tra fumo e PAD è stato riconosciuto dal 1911, quando Erb ha riferito che la malattia era tre volte più comune tra i fumatori rispetto ai non fumatori: è stato suggerito che l'associazione tra fumo e PAD può essere ancora più forte di quella tra fumo e malattia coronarica, e la gravità della PAD tende ad aumentare con il numero di sigarette fumate. Nel complesso, i fumatori hanno un rischio quattro volte maggiore di sviluppare PAD sintomatica rispetto ai non fumatori;
- *diabete mellito*: molti studi hanno mostrato un'associazione tra diabete mellito e lo sviluppo della PAD. Nel complesso, la PAD sintomatica è circa due volte più comune tra i pazienti diabetici che tra i pazienti non diabetici. La più alta probabilità di incorrere nella necessità di un'amputazione è di cinque a dieci volte nei diabetici rispetto ai non diabetici. Il 26% dei pazienti con PAD coinvolti nello studio era diabetico;

Complessivamente, circa il 95% dei soggetti affetti da PAD soffriva di almeno uno di questi fattori di rischio, e il 72% di due o più.

#### 4.1.3 I pazienti con PAD II sottoposti a iperemia reattiva post-occlusiva

I cinque soggetti affetti da PAD di stadio II stati sottoposti a un esame chiamato *iperemia reattiva post-occlusiva* (PORH).

Questa procedura si esegue durante l'acquisizione del segnale dal LDF, e consiste nella compressione della durata di 3 minuti della gamba del soggetto tramite un manicotto pneumatico ad una pressione superiore a quella sistolica.

Diversi meccanismi sono coinvolti nella risposta microcircolatoria della pelle all'ischemia. L'accumulo di adenosina, un metabolita vasodilatatore, nella pelle ischemica, e il rilassamento della muscolatura liscia vasale dovuto alla ridotta pressione trasmurale nei vasi venosi, distali rispetto al sito di arresto circolatorio, sono considerati i principali meccanismi responsabili dell'iperemia post-ischemica cutanea. Recenti scoperte hanno inoltre dimostrato che la PORH nella cute è in parte mediata da alcune prostaglandine, vasodilatatori prodotti dalle cellule endoteliali in risposta allo *shear stress* [35].

La risposta microcircolatoria al termine della compressione è caratterizzata dalla presenza di un'onda di entità superiore a quelle registrate prima della compressione. Le caratteristiche di quest'onda, e le modalità di ritorno ad un segnale normale, possono fornire indicazioni sulla salute del microcircolo [29, 30].

Infatti, la misurazione quantitativa dell'iperemia post-ischemica nella cute non fornisce informazioni né sui meccanismi per i quali avviene né, soprattutto, sulla sua efficacia nel favorire l'ottimale distribuzione del flusso di sangue al letto microvascolare della pelle. Lo studio delle diverse componenti della *flowmotion* seguente all'ischemia nella cute può invece fornire informazioni sui meccanismi coinvolti nella PORH, e sulla sua efficienza nel garantire un'adeguata perfusione di sangue al tessuto.

### Risultati da letteratura dell'esame in soggetti sani e con PAD

L'induzione della PORH, condotta in soggetti sani, ha comportato un aumento statisticamente significativo dell'ampiezza delle oscillazioni del flusso sanguigno dopo l'occlusione: si è trovato che, a seconda dell'intervallo di frequenza le oscillazioni del flusso del sangue hanno mostrato una cinetica differente dopo il rilascio del manicotto: il tempo necessario per raggiungere la ampiezza massima delle oscillazioni è diverso per ciascuno degli intervalli di frequenza esaminati. Ciò può essere dovuto al fatto che gli effettori delle oscillazioni del flusso di sanguigno reagiscono in modo diverso ai 3 minuti di ischemia [30].

Questa diversità può essere quindi utilizzata per caratterizzare i processi che avvengono nel letto microvascolare, e può fornire informazioni aggiuntive sui cambiamenti nei sistemi che regolano il flusso del sangue periferico in entrambe le condizioni normali e patologiche.

Nei pazienti affetti da PAD, sottoposti all'esame, si verifica un aumento del tempo necessario al raggiungimento del picco di flusso post-ischemia, così come un aumento del tempo impiegato per il recupero della perfusione basale, e una pendenza inferiore della curva PORH.

Tutti i dati suggeriscono che nei pazienti affetti da PAD si inneschi durante la patologia un meccanismo di compensazione alla carenza del flusso, legato ad un aumento delle attività endoteliali, miogeniche e del simpatico. Durante l'iperemia reattiva, questi meccanismi (già incrementati), sembrano non essere in grado di generare un ulteriore aumento nelle ampiezza con la stessa proporzione che si verifica per i soggetti sani [29].

#### 4.1.4 I pazienti con PAD III rivascolarizzati

Quindici soggetti affetti da PAD di stadio III sono stati coinvolti in questo studio. I loro dati anagrafici, compresi nome e cognome, non sono noti se no al personale sanitario. I soggetti vengono perciò identificati mediante un codice ID. Il gruppo aveva le seguenti caratteristiche:

- 7 di loro erano donne, 8 erano uomini;

- l'età media dei soggetti era di  $70.2(\pm 10.9)$  anni;
- il 74% di loro soffriva di ipertensione arteriosa, il 62% di diabete, il 47% di ipercolesterolemia e il 53% era ex-fumatore.

### Le tipologie di rivascularizzazione

Le tipologie di intervento effettuate si dividono in tre categorie:

- l'endoarterectomia dell'arteria femorale (FEA) è stata eseguita in 4 pazienti: questo tipo di intervento consiste nell'asportazione della placca occlusiva insieme alla porzione di parete arteriale malata (Fig.4.3).

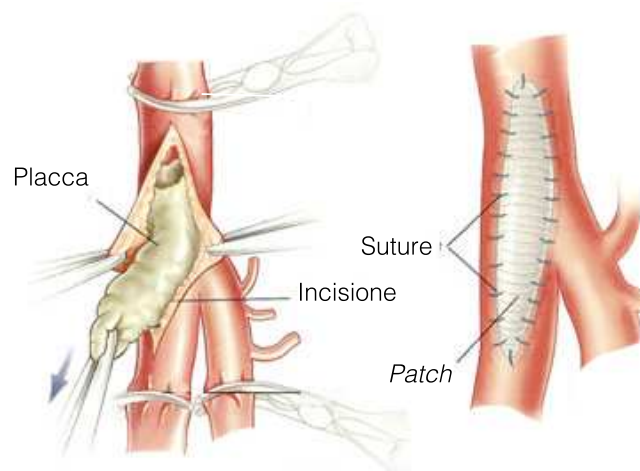


Figura 4.3. Riapertura del lume tramite endoarterectomia: a sinistra è illustrata la rimozione della placca, a destra il patch sintetico che sostituisce la porzione di arteria rimossa.

L'endoarterectomia è la pratica di rivascularizzazione più datata, e negli anni ha subito una considerevole riduzione soprattutto per la difficoltà di esecuzione. Anche la presenza di calcificazioni estese o di alto rischio operatorio ne scoraggiano l'impiego [32];

- un intervento di *by-pass* (BP) è stato effettuato in 4 pazienti: questa tecnica prevede di utilizzare segmenti vascolari protesici per aggirare punti della circolazione in cui sono presenti gravi ostruzioni (Fig.4.4).

La protesi può essere di natura venosa autologa, oppure di origine sintetica. I tempi operatori sono più brevi rispetto alla FEA, caratteristica che rende questo tipo di intervento più adatto a soggetti anziani o con alto rischio operatorio [32];

- una procedura di rivascularizzazione chiamata *angioplastica percutanea transluminale* (PTA) è stata eseguita in 7 pazienti: questa tecnica è un'alternativa meno invasiva alla chirurgia, e consente di dilatare segmenti di arteria ostruiti utilizzando un catetere avente all'estremità un palloncino [33] (Fig.4.5-a). In alcuni casi, si può verificare la necessità di applicare alle pareti vascolari, tramite l'apertura di un secondo palloncino, uno *stent*, ovvero una struttura cilindrica a maglie metalliche che ha lo scopo di mantenere aperta l'arteria trattata (Fig.4.5-b).

Il catetere, introdotto nella rete circolatoria dopo anestesia locale attraverso un'arteria dell'inguine, viene posizionato in corrispondenza del segmento di arteria da dilatare. Il palloncino viene quindi gonfiato, provocando lo schiacciamento dell'ostruzione sulle pareti dell'arteria, e quindi la riapertura del lume (Fig.4.6).

Il successo di questa tecnica è paragonabile a quello dell'intervento chirurgico di rivascularizzazione [34], soprattutto nel caso in cui le ostruzioni siano isolate, brevi e concentriche.

## 4.2 L'acquisizione del segnale LDF

Al soggetto, disteso su un lettino, è stata applicata sul dorso del piede la sonda del LDF.

Per i soggetti sani e rivascularizzati, l'acquisizione è avvenuta senza l'utilizzo di ulteriori apparecchiature.

Per i soggetti in cui si è valutata la PORH, una seconda acquisizione è stata effettuata in concomitanza con l'induzione dell'occlusione, registrando il segnale successivo all'ischemia per una durata di 280 *sec*.

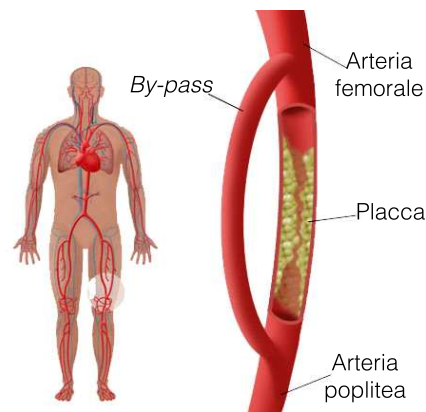


Figura 4.4. *By-pass* femoro-popliteo: a sinistra è indicato il distretto corporeo in cui si opera; a destra è schematizzato l'intervento: il *by-pass* aggira la placca collegando le due arterie.

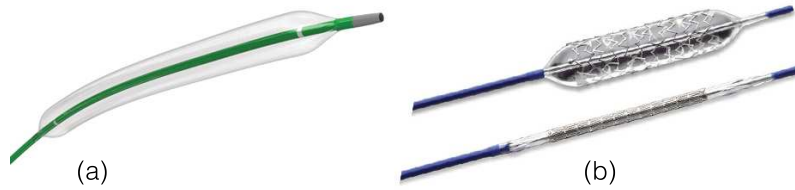


Figura 4.5. Catetere per PTA con palloncino (a) e con *stent*, aperto e chiuso (b).

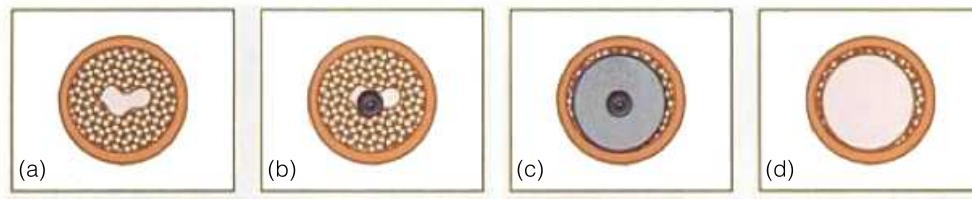


Figura 4.6. Fasi della PTA: lume vascolare ostruito (a); posizionamento del catetere (b); apertura del palloncino (c); lume vascolare riaperto (d).

#### 4.2.1 Caratteristiche dello strumento <sup>1</sup>

Lo strumento utilizzato per acquisire i segnali analizzati in questo lavoro è il il Peiflux System 5000, della ditta svedese Perimed (Fig.4.7).

La sorgente laser consiste in un diodo allo stato solido, ed emette luce nel campo dei rossi visibili avente energia di  $2 \text{ mW}$  e  $780 \text{ nm}$  di lunghezza d'onda.

La sonda utilizzata con il Periflux5000, la Probe 457 (Fig.4.8) ha una separazione tra le fibre di invio e di ricezione di  $0.25 \text{ mm}$  e, insieme alle altre caratteristiche della configurazione sperimentale adottata, comporta una profondità di misura dell'ordine di  $0.5\text{-}1 \text{ mm}$ .

Il segnale è campionato a una frequenza di  $16 \text{ Hz}$ .

In Tab.4.1 è riportata la descrizione riassuntiva della configurazione sperimentale adottata per le misurazioni.

Il software fornito con questo strumento salva il segnale in una colonna di un foglio Excel, contenente tutte le informazioni sull'acquisizione: data, ora, codice ID del paziente, nome dell'operatore e settaggio dei parametri strumentali.

#### 4.2.2 Il segnale

Ogni campione del segnale, come precisato nel paragrafo 2.2.1, è quindi una grandezza proporzionale al prodotto tra il numero e la velocità media dei globuli

<sup>1</sup>Le informazioni tecniche e le immagini riportate in questo paragrafo sono tratte dal sito [www.perimed-instruments.com](http://www.perimed-instruments.com)



Figura 4.7. Lo strumento Periflux5000 (Perimed), utilizzato per acquisire i segnali

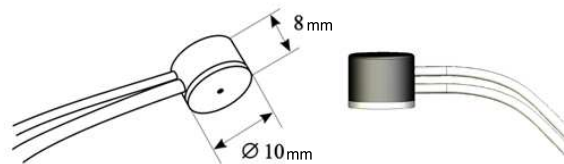


Figura 4.8. Immagini della sonda Probe 457 (Perimed), utilizzata per acquisire i segnali

rossi transianti nella zona attraversata dal raggio laser, espresso in  $PU$ .

Il segnale nel dominio del tempo ha un aspetto oscillante, composto da onde a diverse frequenze (Fig.4.9):

- le più riconoscibili sono le onde più veloci, dovute all'attività cardiaca (Fig. 4.9-c): anche se questa attività ha un'intrinseca variabilità, con il soggetto in stato di riposo la sua frequenza rimane confinata in uno stretto intervallo localizzato attorno a  $1 Hz$ ;
- osservando il segnale con livelli minori di ingrandimento, sono intuibili anche alcune onde portanti più lente (Fig.4.9-b): il loro andamento è più variabile, essendo esse il riflesso di attività che evolvono dinamicamente (trattate nel paragrafo 1.2.2).

Configurazione del LDF <i>Periflux5000</i>		
<b>Laser</b>	sorgente	diodo
	energia	2 mW
	lunghezza d'onda	780 nm
<b>Sonda</b>	nome	Probe 457
	distanza fibre	0.25 mm
<b>Volume raggiunto</b>	superficie	1 mm <sup>2</sup>
	profondità	0.5-1 mm
<b>Segnale</b>	campionamento	16 Hz

Tabella 4.1. Descrizione riassuntiva della configurazione sperimentale dello strumento

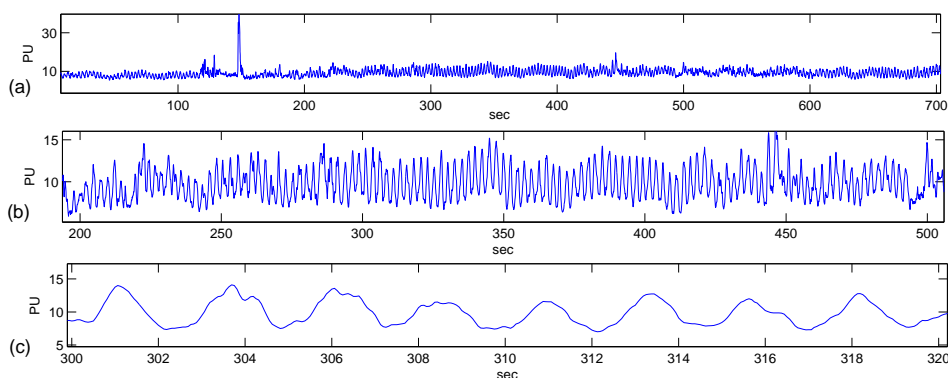


Figura 4.9. Segnale da LDF nel dominio del tempo: (a) visione complessiva della durata di 700 sec; (b) finestra di 300 sec nella quale si distinguono le onde veloci e delle onde più lente; (c) finestra di 20 sec che evidenzia l'andamento delle onde veloci.

L'ampiezza del segnale è molto variabile tra le diverse registrazioni: essendo le *PU* unità arbitrarie, valutazioni dirette di queste registrazioni rischiano di non fornire risultati attendibili circa la reale condizione microcircolatoria, e vanno quindi evitate.

### 4.2.3 Durata dell'acquisizione

Poiché il LDF è particolarmente sensibile al movimento, è stato richiesto a ciascun soggetto di rimanere immobile. Questa richiesta non è facilmente adempibile nel caso di presenza delle forme più gravi di PAD: la carenza di afflusso sanguigno ai tessuti periferici, soprattutto ai muscoli, provoca infatti forti dolori, e la mancanza di movimento dell'arto è un fattore che amplifica questo fenomeno.

Quello che si è verificato è che, dopo un certo intervallo di tempo, il paziente era costretto ad abbandonare la posizione supina per facilitare l'afflusso di sangue



ai piedi. Non è stato possibile quindi decidere a priori la durata dell'esame, e mantenerla costante per tutte le registrazioni.

Poiché la frequenza più bassa alla quale si è interessati è di  $0.007\text{ Hz}$ , è fondamentale che nel segnale compaia almeno un periodo dell'onda avente tale frequenza: la durata minima dell'acquisizione è quindi di almeno  $1/0.007 \simeq 143\text{ sec}$ , che a  $16\text{ Hz}$  corrispondono a circa 2300 campioni.

Poiché l'algoritmo di calcolo estrae il comportamento in frequenza medio durante la durata dell'acquisizione, più la registrazione si estende nel tempo più l'andamento estratto si avvicina al vero comportamento medio del segnale: vista la dinamicità del fenomeno, esistono infatti finestre temporali del segnale in cui un'onda avente una certa frequenza può risultare particolarmente ampia o particolarmente ridotta. Mediare tra loro i coefficienti di ogni frequenza relativi alle diverse porzioni di segnale ha lo scopo quindi di attenuarne le diversità dovute a eventi singolari, evidenziandone le caratteristiche comuni dovute a eventi che si ripresentano nel tempo. Per questa ragione, più numerosi sono i periodi di un'onda a una certa frequenza contenuti nel segnale, più affidabile è la stima del relativo coefficiente: a basse frequenze (corrispondenti a periodi lunghi) la brevità del segnale porta a stime della media basate su pochi periodi dell'onda, quindi meno affidabili.

#### 4.2.4 Artefatti da movimento

Nell'immagine del segnale di Fig. 4.9-a, si nota un picco di altezza molto più elevata rispetto all'andamento complessivo del segnale, e decisamente non imputabile a fenomeni di tipo microcircolatorio.

Questo tipo di artefatto è dovuto a movimenti del soggetti. Soprattutto in presenza di gravi forme di PAD, il dolore ischemico porta il paziente a compiere inavvertitamente, durante l'acquisizione, piccoli movimenti impulsivi con il piede.

Essendo la sonda sensibile al movimento, questi "scatti" vengono registrati nel segnale come picchi molto elevati che si esauriscono generalmente in un paio di secondi. L'andamento oscillatorio del segnale sembra comunque conservarsi e addizionarsi al picco (Fig. 4.10).

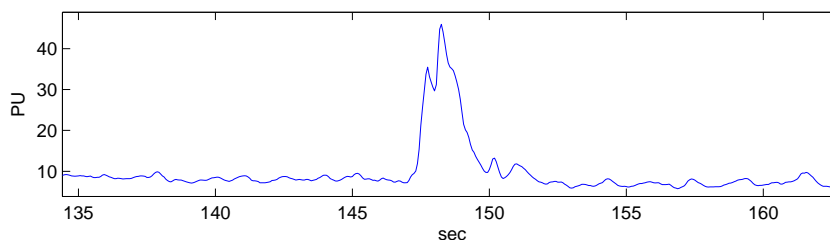


Figura 4.10. Finestra di 30 sec del segnale di Fig.4.9 che evidenzia un artefatto.

Eliminare semplicemente gli intervalli contenenti gli *spike* “tagliandoli” dal segnale non sarebbe una buona soluzione: essendo lo scopo dell’analisi estrarre le informazioni in frequenza, rimuovere parti di segnale modificerebbe la lunghezza delle oscillazioni; ne deriverebbero informazioni errate da tutte le *wavelet* che si sovrappongono ai due campioni adiacenti al segnale troncato. Quello che si è fatto, è stato scrivere e applicare un algoritmo che, fissata una soglia, riconosca gli *spike* e ne riduca l’ampiezza, in modo che loro contributo artificioso al grafico dei coefficienti pesi il meno possibile sullo spettro medio finale.

## 4.3 Il codice

### 4.3.1 Struttura funzionale del programma

Il programma che elabora i dati è stato scritto in ambiente Matlab ed è stato strutturato in modo da eseguire un confronto tra due acquisizioni relative allo stesso soggetto<sup>2</sup>.

Per facilitare il cambiamento di variabili dovuto alle diverse tipologie di soggetti che si vogliono analizzare, l’esecuzione del programma parte richiedendo l’immissione di una stringa che li identifica. Alla stringa immessa è stato fatto corrispondere il set di parametri per il caricamento, come il nome del file e numero e nomi dei vettori di output.

Il programma poi richiede di specificare se si voglia analizzare una sottoclasse di soggetti, possibilità che risulta utile nel caso in cui si vogliono elaborare i dati di un solo un soggetto, o di una particolare sottocategoria di soggetti (ad es. dividendoli per sesso, fattori di rischio, tipo di intervento). Inoltre, nel caso in cui si scelga di analizzare i soggetti sani, il programma non esegue le istruzioni di comparazione tra *pre* e *post*.

### 4.3.2 Caricamento dei dati

I dati di ogni acquisizione si trovavano salvati in un foglio Excel, nominato con il codice ID del paziente. Per questo motivo, non è possibile fornire come input al programma direttamente la serie di questi file. Si è scelto pertanto di estrarre manualmente le singole colonne contenenti i dati di interesse (cioè i valori di LDF in *PU*), raggruppandole in un unico file:

- i file relativi ai pazienti rivascolarizzati e sottoposti a PORH è composto da due fogli: uno contenente i dati della condizione *pre*, e uno contenente quelli della condizione *post*. Ovviamente allo stesso paziente è stato fatto corrispondere lo stesso numero di colonna nei due fogli;
- il file che contiene le acquisizioni dei soggetti sani contiene un unico foglio.

Il contenuto dei fogli Excel è caricato in Matlab attraverso il comando `'xlsread'`:

---

<sup>2</sup>Il codice completo della parte principale del programma è riportato in Appendice ??

```
1 dati=xlsread('nome_file.xls','nome_foglio');
```

Poiché ad ogni acquisizione corrisponde un diverso numero di campioni, la matrice `dati` risultante ha un numero di colonne pari al numero di soggetti `n` al quale il foglio fa riferimento, e un numero di righe pari all'acquisizione più lunga. Alle celle che inevitabilmente non contengono valori (ovvero le parti terminali delle colonne relative alle acquisizioni più brevi), viene assegnato il valore `NaN`.

Poiché questa struttura non risulta adatta alle successive operazioni, si è scelto di convertire ogni colonna del file in un vettore utilizzando i comandi `'eval'` e `'num2str'` per generare automaticamente i nomi delle variabili:

```
1 for i=1:n
2     eval(['A' num2str(i) '=dati(:,i)']);
3 end
```

Ad ogni vettore è quindi assegnato un nome contenente il numero del soggetto al quale si riferiva, ed un prefisso indicante l'antecedenza (es: `A1`) o la posteriorità (es: `P1`) al trattamento. Le code contenenti i `NaN` sono state troncate.

### Visualizzazione dei dati

Per poter plottare i dati su di un asse espresso in secondi, si è costruito un vettore `t` contenente la discretizzazione dell'asse del tempo corrispondente alla frequenza di campionamento `Fc` pari a  $16\text{ Hz}$ :

```
1 t=[0: 1/Fc: max_l/ Fc];
```

con `max_l` pari al numero di campioni dell'acquisizione più lunga.

### 4.3.3 Rimozione degli artefatti da movimento

Da una prima visualizzazione dei dati, si è notato che gli artefatti da movimento di cui si è parlato al paragrafo 4.2.4 sono presenti in gran parte delle acquisizioni.

In Fig.4.9-b, si può notare come le onde a frequenze più elevate del segnale oscillino entro un intervallo verticale che segue l'andamento delle onde più lente. Gli *spike* sono generalmente isolati (Fig.4.9-a) e si differenziano dal resto del segnale uscendo bruscamente dal suddetto intervallo: qui il segnale compie qualche oscillazione per poi ritornare all'interno del range in modo meno brusco ma comunque rapido.

Si è pensato quindi di scrivere la *function* `spike_red`<sup>3</sup>, per far compiere al programma i seguenti passaggi:

- approssimare l'intero segnale con una funzione polinomiale che riesca a seguire l'andamento delle onde più lente e che sia influenzata il meno possibile dai brevi *spike* (linea rossa continua in Fig.4.11). Il grado di tale funzione che costituisce il compromesso migliore è pari a 20;

---

<sup>3</sup>il codice completo relativo alla *function* `spike_red` è riportato in Appendice 1

- fissare una soglia di tolleranza  $s$  che crei un range sopra e sotto la polinomiale oltre il quale il segnale è considerato *spike* (linee rosse tratteggiate in Fig.4.11)<sup>4</sup>;

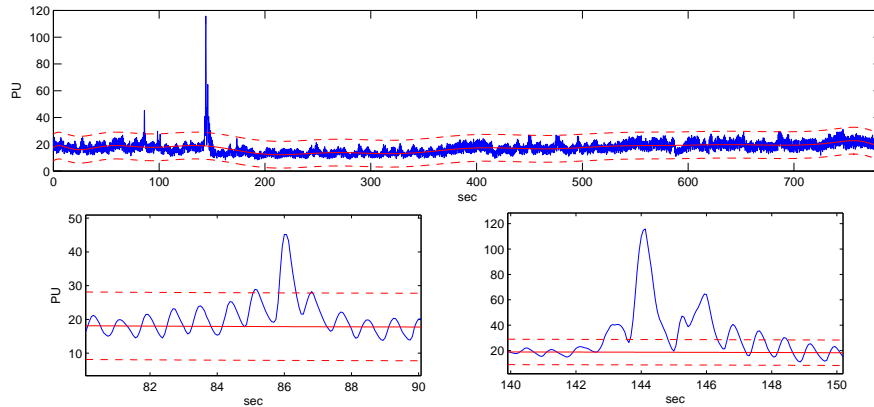


Figura 4.11. Segnale (in blu) e funzione polinomiale che ne approssima l'andamento (in rosso continuo). In rosso tratteggiato è indicata la soglia oltre la quale il segnale è considerato *spike*. I riquadri in basso sono una visione ingrandita del primo (a sinistra) e del secondo *spike* (a destra) che compaiono lungo il segnale.

- scorrere il segnale finchè non si incontra un valore  $x$  fuori soglia; a questo punto l'algoritmo compie i seguenti passi:
  - salva in un vettore `vet` il valore  $x$  e tutti i successivi, finchè il segnale non ritorna entro  $s$ ;
  - estende `vet` in modo da comprendere la parte ascendente e quella discendente dello *spike*, che si trovavano ancora entro  $s$ ;
  - calcola un coefficiente `coef` che, moltiplicato per il valore massimo dello *spike*, lo ridimensiona riportandolo entro la soglia. Tale coefficiente vale:
 

```
1 coef=s/max_out;
```

 con `max_out` pari allo scostamento tra il punto di picco e il valore della polinomiale in quel punto;
  - moltiplica `vet` per `coef`, e lo sostituisce al segmento di segnale corrispondente;
- continuare a scorrere il segnale finchè non si incontra un altro valore fuori soglia, per il quale si applica l'algoritmo del punto successivo.

<sup>4</sup>Il set dei parametri da salvare per i diversi tipi di soggetti, richiamato automaticamente dal programma, comprende anche una matrice contenente le soglie scelte per le singole acquisizioni.

Il segnale in verde di Fig.4.12 è il frutto di questo procedimento. Nella visione globale si nota come l'andamento del segnale risulti conservato (verde e blu sono perfettamente sovrapposti), ad eccezione delle zone contenenti artefatti. Nei riquadri ingranditi si apprezza il risultato dell'algoritmo: gli *spike* sono riportati entro la soglia, senza generare brusche soluzioni di continuità del naturale andamento del segnale.

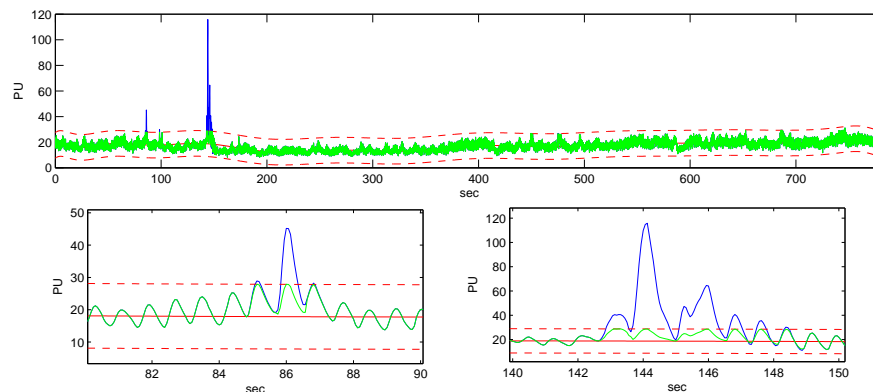


Figura 4.12. Segnale originale (in blu), modificato dall'algoritmo (in verde) e funzione polinomiale che ne approssima l'andamento (in rosso continuo). In rosso tratteggiato è indicata la soglia oltre la quale il segnale è considerato *spike*. I riquadri in basso sono una visione ingrandita del primo (a sinistra) e del secondo *spike* (a destra) che compaiono lungo il segnale.

#### 4.3.4 Scelta della scala

Il range di frequenze alle quali si è interessati si estende da `freq_min=0.007` a `freq_max=1.8 Hz` (vedi Tab.1.1). Le problematiche che si sono dovute affrontare relative alla determinazione della scala sono due:

- trovare l'esatto range di scala corrispondente all'intervallo di frequenze che si desiderano analizzare;
- discretizzare i valori della scala in modo che le informazioni estratte risultino uniformemente distribuite nell'intervallo.

##### Delimitare la scala

Quanto al primo problema, Matlab fornisce una funzione chiamata `scal2frq` che, noti la scala `s`, il tipo di *mother wavelet* `tipo` e la frequenza di campionamento `fc`, si invoca con la seguente istruzione:

```
1 freq=scal2frq(scala, tipo, 1/fc);
```

In questo studio  $1/f_c$  è pari a  $1/16$  e il tipo è 'mor1' (che sta per Morlet).

Matlab non fornisce la funzione inversa, una sorta di 'frq2scale' che, nota la frequenza, indichi la scala da adottare. Basandosi sulla (3.8), è però possibile calcolare questa corrispondenza, note la frequenza di campionamento  $f_c$  e la frequenza centrale della *wavelet*  $f_w$ : la frequenza centrale di 'mor1', però, non è nota.

Questo passaggio è stato affrontato nel modo seguente:

- si è ricavato, utilizzando 'scal2frq', il valore di  $f_s$  corrispondente a una scala prefissata (ad esempio con  $s=1$ ), con il seguente comando

```
1 fs=scal2frq(1,'mor1',1/16);
```

- noto  $f_s$ , per  $s=1$ , attraverso la (3.8) si è ricavato il valore di  $f_w$ , pari a  $f_c \cdot f_s$ ;
- noto  $f_w$ , si sono calcolati attraverso la (3.8) i due valori della scala corrispondenti agli estremi dell'intervallo delle frequenze, attraverso le seguenti operazioni:

```
1 scala_min=fw/fc/freq_max;
2 scala_max=fw/fc/freq_min;
```

### Discretizzare la scala

A questo punto, definito l'intervallo entro il quale deve variare la scala, è stata affrontata la questione della discretizzazione di tale variazione. Si è notato che:

- poiché il modo migliore per visualizzare gli spettri è rappresentare l'asse delle frequenze in scala logaritmica, la scelta migliore era definire un incremento delle frequenze di tipo esponenziale, così da rendere equidistanti i campioni dello spettro;
- gli intervalli di Tab.1.1 dividono l'asse rappresentato in scala logaritmica in parti uguali. Questa scelta garantisce quindi anche un uguale numero di campioni spettrali per ogni intervallo: si è deciso di campionare 20 valori di frequenze per intervallo, per un totale di 100 campioni;
- l'esponente che applicato a  $scala\_min$  fornisce  $scala\_max$ , è pari a:

```
1 exp_max=log(scala_max)/log(scala_min);
```

dovendo l'esponente variare tra 1 e  $exp\_max$  con 100 passi omogenei, l'incremento  $inc$  da applicare ad ogni step è dato da

```
1 inc=(exp_max-1)/99;
```

- il vettore `scala` di 100 elementi si calcola quindi come:

```
1 for i=1:100
2     scala(i)=scal_min^(1+inc*(i-1));
3 end
```

nel quale si verifica che il primo e l'ultimo valore sono `scal_min` e `scal_max`;

- le frequenze corrispondenti sono finalmente date dalla seguente istruzione:

```
1 freq=scal2frq(scala, 'morl', 1/16);
```

Nel vettore `freq`, il primo e l'ultimo valore risultano esattamente 0.007 e 1.8.

### 4.3.5 Calcolo dello scalogramma

Definita la scala e attenuati i picchi, il programma procede con i seguenti passi:

- ad ogni segnale viene sottratta la propria media, così che, come la *wavelet*, esso oscilli attorno allo zero;
- il risultato viene posto in ingresso alla function `'cwt'`, che, implementando la (3.6), fornisce i valori dei coefficienti *wavelet*. I comandi che calcolano e salvano le matrici dei coefficienti relative a ogni registrazione (es: `A1_coefs`), per gli `n` soggetti, hanno la seguente sintassi:

```
1 for i=1:n
2     A1_coefs =cwt(A1-mean(A1), scala, 'morl');
3 end
```

- lo scalogramma (es: `A1_scal`) si ottiene, secondo la (3.9) elevando al quadrato i coefficienti e dividendoli per il valore della scala al quale corrispondono :

```
1 for j=1:100
2     A1_scal =A1_coefs(j,:).^2/scala(j);
3 end
```

### 4.3.6 Ampiezza Assoluta, Ampiezza Media, Ampiezza Relativa

Il semplice confronto visivo dei grafici 3D risulta però poco immediato, e non consente di quantificare le caratteristiche della condizione microcircolatoria; si rende per tanto necessario definire delle grandezze che in sé riassumano le informazioni di interesse contenute negli scalogrammi. Tali grandezze sono:

- *Ampiezza Assoluta*
- *Ampiezza Media*
- *Ampiezza Relativa*

### *Ampiezza Assoluta*

La letteratura scientifica [9, 11, 12, 14, 15, 16, 25, 26, 27, 28, 29, 30] suggerisce anzitutto di mediare lo scalogramma lungo l'asse del tempo, ottenendo un grafico 2D che associa ad ogni valore di frequenza la corrispondente *Ampiezza Media* dello scalogramma. I valori ottenuti sono chiamati *Ampiezze Assolute* (AA), e descrivono come l'energia del segnale si distribuisce nell'intervallo di frequenze, con valori collegati all'effettiva ampiezza delle singole oscillazioni (Fig.4.13-a).

Questo vettore (es: A1\_AA) è calcolato con il seguente comando:

```
1 A1_AA=mean(A1_scal, 2);
```

### *Ampiezza Media*

Come da letteratura, si estrae la grandezza chiamata *Ampiezza Media* (AM), pari alla media delle AA (es: A1\_AM):

```
1 A1_AM=mean(A1_AA);
```

In Fig.4.13-a il valore della AM A1\_AM è indicato dalla linea orizzontale rossa.

Note le AA e la AM, si normalizzano le prime rispetto alla seconda, ottenendo un vettore, avente media unitaria, di valori adimensionali chiamati *Ampiezze Relative* (Fig.4.13-b), che rendono confrontabili gli scalogrammi diversi a prescindere dall'entità delle oscillazioni misurate in *PU*.

Questo vettore (es: A1\_RA) è calcolato con il seguente codice:

```
1 A1_AR=A1_AA/A1_AM;
```

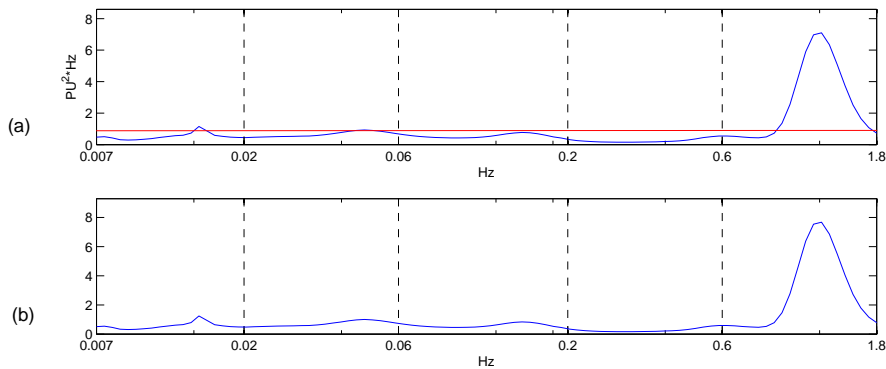


Figura 4.13. (a) *Ampiezze Assolute* (curva in nero) e *Ampiezza Media* (linea in rosso) dello scalogramma di Fig.4.13; (b) *Ampiezze Relative*.



### Visualizzazione degli scalogrammi

Lo scalogramma, che si ricorda essere una matrice avente in ogni riga i valori relativi a una certa frequenza e in ogni colonna quelli relativi al momento del segnale in cui è centrata la *wavelet*, viene visualizzato tramite la funzione di Matlab 'mesh'. L'asse delle frequenze è impostato in scala logaritmica.

Per evidenziare la diretta relazione tra segnale, scalogramma 3D e scalogramma 2D, i risultati dell'elaborazione di ogni segnale sono stati visualizzati come in Fig.4.14.

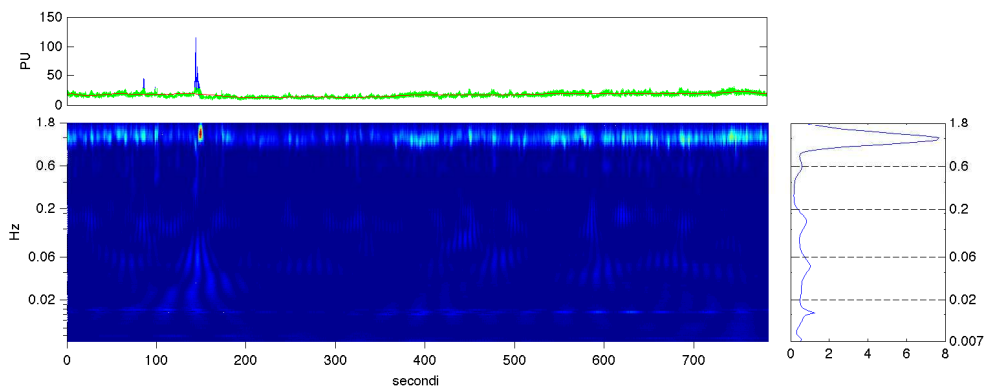


Figura 4.14. Visualizzazione dei risultati dell'elaborazione di un segnale LDF: in alto è riportato l'andamento del segnale originale (in blu) al quale è sovrapposto il risultato dell'algorithm di riduzione degli *spike* (verde) e la polinomiale che ne approssima l'andamento (in rosso); in basso, sulla stessa scala temporale, è visualizzato il corrispondente scalogramma 3D e, a destra, sulla stessa scala delle frequenze, il grafico delle AR.

Partendo da un intervallo del segnale, è possibile conoscere l'entità del suo contenuto in frequenza semplicemente osservando la porzione di scalogramma 3D che vi è verticalmente allineata. Analogamente, per conoscere quale sia l'andamento temporale che ha portato a un certo valore del grafico delle AR, è sufficiente osservare la corrispondente porzione di scalogramma orizzontalmente allineata.

### Grandezze estratte da ogni scalogramma

Poichè il fine dell'indagine è confrontare il contenuto in frequenza degli intervalli di frequenze di Tab1.1, in letteratura viene compiuta un'ulteriore semplificazione: viene definita *Ampiezza Relativa di un intervallo* (ARi) la media delle AR nell'intervallo considerato. Analogamente viene definita anche l'*Ampiezza Assoluta di un intervallo*. I parametri finali che vengono forniti dall'elaborazione di un segnale sono quindi 11:

- il valore della AM dello scalogramma;

- i valori delle  $AA_i$ , ovvero:
  - $AA_i$  dell'intervallo legato all'attività endoteliale ( $AA_e$ );
  - $AA_i$  dell'intervallo legato all'attività neurogena ( $AA_n$ );
  - $AA_i$  dell'intervallo legato all'attività miogena ( $AA_m$ );
  - $AA_i$  dell'intervallo legato all'attività respiratoria ( $AA_r$ );
  - $AA_i$  dell'intervallo legato all'attività cardiaca ( $AA_c$ );
- i valori delle  $AR_i$ , ovvero:
  - $AR_i$  dell'intervallo legato all'attività endoteliale ( $AR_e$ );
  - $AR_i$  dell'intervallo legato all'attività neurogena ( $AR_n$ );
  - $AR_i$  dell'intervallo legato all'attività miogena ( $AR_m$ );
  - $AR_i$  dell'intervallo legato all'attività respiratoria ( $AR_r$ );
  - $AR_i$  dell'intervallo legato all'attività cardiaca ( $AR_c$ );

A partire dal vettore  $AA$  di 100 valori (es:  $A1\_AA$ ), i valori medi dei suddetti intervalli, aventi 20 campioni ciascuno, vengono calcolati dal seguente codice e inseriti nel vettore  $A1\_AA_i$ :

```

1 A1_AAi(i)=A1_AA(1:20);
2 A1_AAi(2)=A1_AA(21:40);
3 A1_AAi(3)=A1_AA(41:60);
4 A1_AAi(4)=A1_AA(61:80);
5 A1_AAi(5)=A1_AA(81:100);

```

Per ottenere i valori delle  $AR_i$ , si divide il vettore delle  $AA_i$  (es:  $A1\_AA_i$ ) per la  $AM$  corrispondente (es:  $A1\_AM$ ):

```

1 A1_AR(i)=A1_AA(i)/A1_AM;

```

Nel caso in esame, al codice è richiesto di effettuare un confronto fra segnali acquisiti dallo stesso paziente in condizioni diverse: ad esempio prima (*pre*) e dopo (*post*) un intervento di rivascularizzazione, o PORH.

Pertanto, i valori delle  $AR_i$  dei segnali pre-trattamento sono incorporati in un'unica matrice  $AR_i\_A$ , avente 5 colonne e  $n$  righe. Analogamente viene fatto per la seconda acquisizione, in una matrice  $AR_i\_P$ . Allo stesso modo vengono create le matrici  $AA_i\_A$  e  $AA_i\_P$ .

La distribuzione dei valori contenuti in ogni colonna delle due matrici è visualizzata tramite *boxplot* (uno per le  $AA$  e uno per le  $RA$ ), affiancando i *box* relativi alle distribuzioni pre e post di ogni intervallo di frequenze.

### Calcolo delle variazioni

Da questo punto del programma, vengono effettuate le stesse operazioni sulle le due matrici `AAi` e `ARi`. Le sole `AAi` vengono prese come esempio.

Per quantificare le variazioni della distribuzione in frequenza nelle 5 bande che si verifica tra la condizione pre e la condizione post sono state calcolate le mediane dei valori di ogni colonna delle matrici `AAi_A` e `AAi_P`, contenenti le `AAi`, utilizzando la funzione `'median'` e salvando i risultati in due vettori, rispettivamente chiamati `AAi_A_mediane` e `AAi_P_mediane`:

```
1 for i=1:5
2     AAi_A_mediane(i)=median(AAi_A(:,i));
3     AAi_P_mediane(i)=median(AAi_P(:,i));
4 end
```

La variazione percentuale tra elementi corrispondenti tra i due vettori è stata poi salvata nel vettore `AAi_variazione`.

```
1     AAi_variazione=
2     (AAi_P_mediane-AAi_A_mediane)./AAi_A_mediane*100;
```

Al fine di valutare la significatività statistica della differenza tra le mediane, il test di Wilcoxon è stato applicato alle colonne corrispondenti delle matrici `AAi_A` e `AAi_P`. In Matlab la funzione che esegue tale calcolo è chiamata `'ranksum'`. I valori dei p-value relativi a ogni colonna sono stati salvati nel vettore `Wilc_AA`:

```
1 for i=1:5
2     Wilc_AA(1,i)=ranksum(AAi_A(:,i), AAi_P(:,i));
3 end
```

#### 4.3.7 Esportazione dei risultati

Per ogni esecuzione del programma, le figure prodotte e salvate sono state:

- un grafico riassuntivo dell'elaborazione di ogni segnale (Fig.4.14);
- un grafico in cui, per ogni soggetto, si sono sovrapposte delle AA prima e dopo il trattamento;
- un grafico in cui, per ogni soggetto, si sono sovrapposte delle AR prima e dopo il trattamento;
- il *boxplot* comparativo della distribuzione delle `ARi`.
- il *boxplot* comparativo della distribuzione delle `ARi`.
- il *boxplot* comparativo della distribuzione delle `AM`.

Inoltre, si è previsto che il programma produca, tramite la funzione `printf`, due file in formato di testo contenenti un riassunto dei risultati per le AA e per le AR. Per le AA i valori riportati sono:

- i valori delle AAI di ogni soggetto prima e dopo il trattamento (ovvero le matrici `AAi_A` e `AAi_P`) e le rispettive AM;
- le loro mediane in ogni intervallo (ovvero i vettori `AAi_A_mediane` e `AAi_P_mediane`);
- la variazione percentuale tra le mediane per ogni intervallo, prima e dopo il trattamento (ovvero il vettore `AAi_variazione`);
- i valori del p-value forniti dal test statistico di Wilcoxon (ovvero il vettore `Wilc_AA`).

Gli stessi parametri sono riportati nel file che riassume l'analisi delle AR, eccetto le AM che, per definizione, risultano essere pari a 1.

## Capitolo 5

# Risultati e discussione

Nel seguito vengono riportati i risultati relativi ai soggetti sani (soggetti da 1 a 3), ai pazienti con PAD stadio II sottoposti a PORH (da 4 a 8) e ai pazienti con PAD stadio III rivascolarizzati (da 9 a 23).

Per ogni individuo sono riportati il segnale, lo scalogramma, le AR e il confronto degli andamenti delle AA e delle AR prima e dopo trattamento.

Vengono poi riportati in forma di tabella i dettagli dei risultati numerici e la loro significatività statistica, e in forma di *boxplot* le distribuzioni dei valori delle AA, AM e AR.

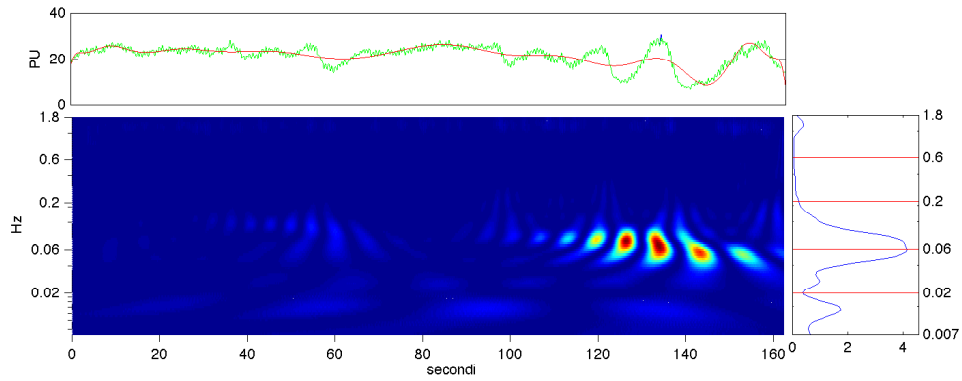
Per le AR, vengono calcolati i *p-value* che indicano la significatività statistica delle diversità tra le distribuzioni nei diversi gruppi:

- sani e patologici di stadio II;
- sani e patologici di stadio III, *pre-rivascolarizzazione*;
- sani e patologici di stadio III, *pre-rivascolarizzazione*;

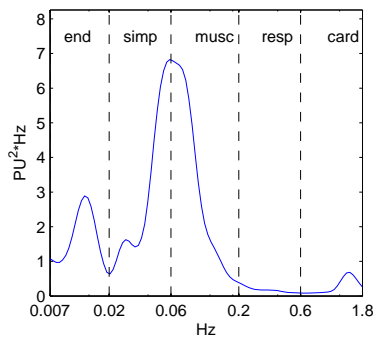
## 5.1 Soggetti sani

### 5.1.1 Immagini

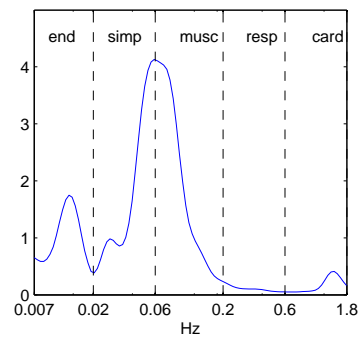
Soggetto n°1



(a) *Segnale, scalogramma e AR*



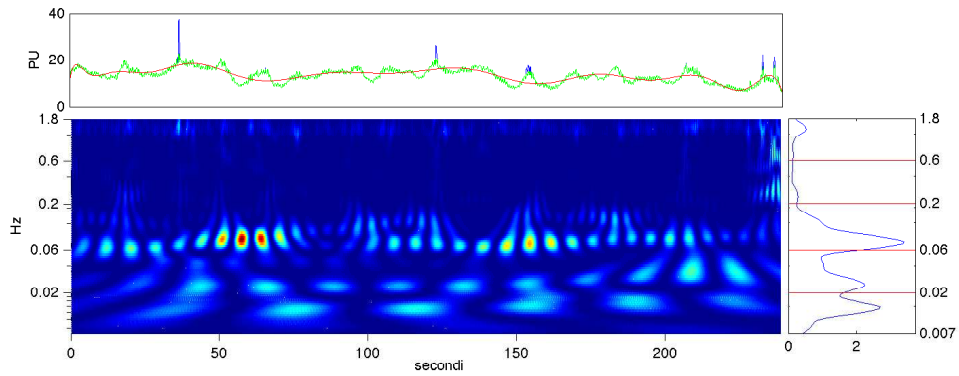
(b) *Ampiezze Assolute*



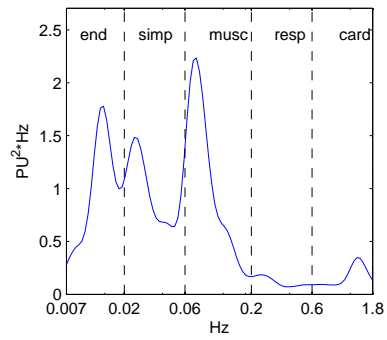
(c) *Ampiezze Relative*

Figura 5.1. Soggetto 1: segnale, scalogramma e AR (A). Andamenti delle AA (b) e delle AR (c).

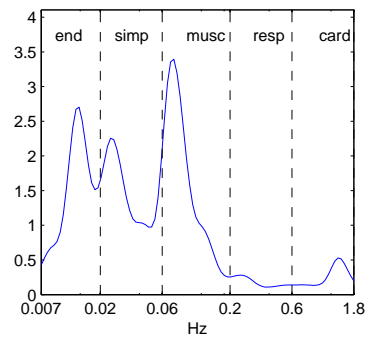
## Soggetto n°2



(a) Segnale, scalogramma e AR



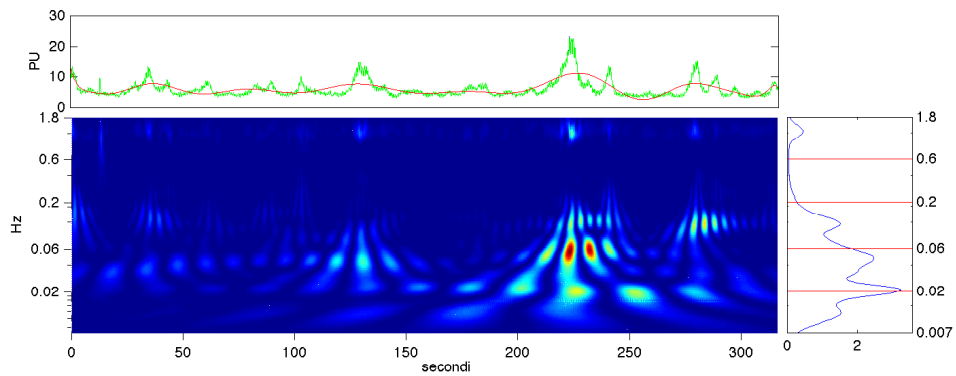
(b) Ampiezze Assolute



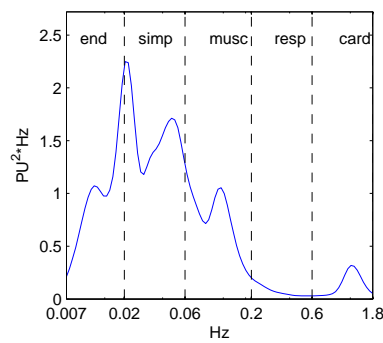
(c) Ampiezze Relative

Figura 5.2. Soggetto 2: segnale, scalogramma e AR (A). Andamenti delle AA (b) e delle AR (c).

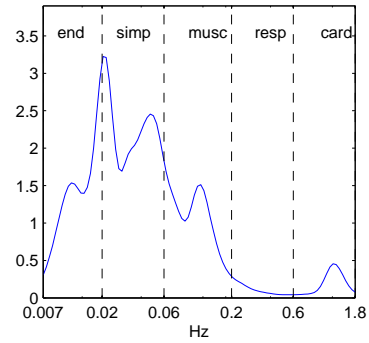
## Soggetto n°3



(a) Segnale, scalogramma e AR



(b) Ampiezze Assolute



(c) Ampiezze Relative

Figura 5.3. Soggetto 3: segnale, scalogramma e AR (A). Andamenti delle AA (b) e delle AR (c).



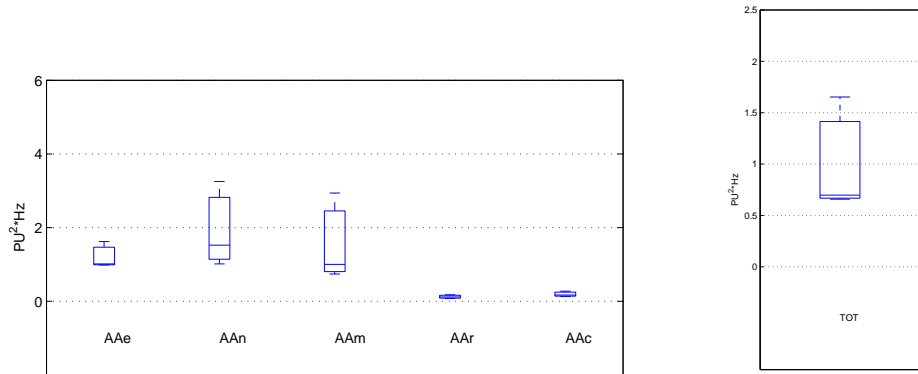
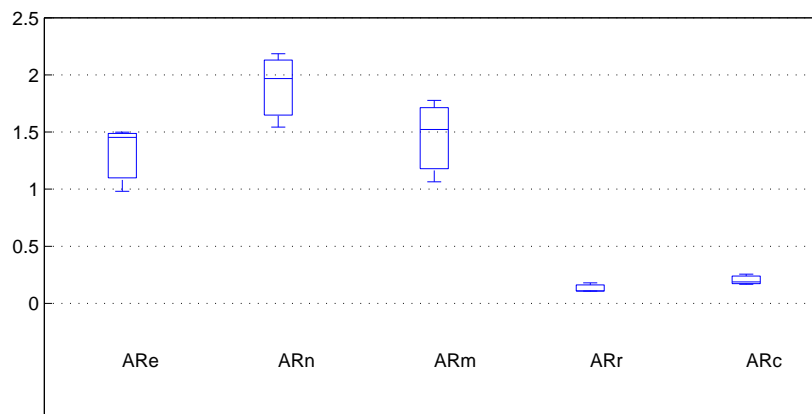
## 5.1.2 Tabelle

Tabella 5.1. Soggetti sani: *Ampiezza Assoluta* degli intervalli e *Ampiezza Media* di ogni segnale [ $PU^2 \cdot Hz$ ]

sogg.	AAe	AA <sub>n</sub>	AA <sub>m</sub>	AA <sub>r</sub>	AA <sub>c</sub>	AM
1	1.62	3.25	2.94	0.18	0.28	1.65
2	0.99	1.02	1.00	0.12	0.176	0.66
3	1.01	1.52	0.74	0.07	0.13	0.70

Tabella 5.2. Soggetti sani: *Ampiezze Relative* degli intervalli di ogni segnale

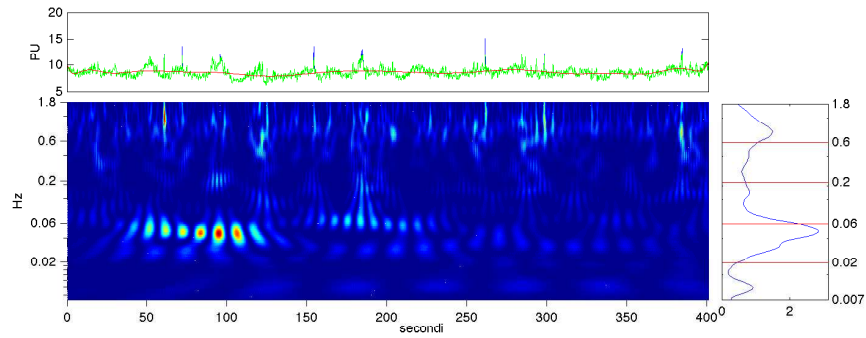
sogg.	AR <sub>e</sub>	AR <sub>n</sub>	AR <sub>m</sub>	AR <sub>r</sub>	AR <sub>c</sub>
1	0.98	1.97	1.78	0.11	0.17
2	1.50	1.54	1.52	0.18	0.26
3	1.45	2.18	1.06	0.11	0.19

5.1.3 *Boxplot*(a) *Ampiezze Assolute*(b) *Ampiezze Medie*(c) *Ampiezze Relative*Figura 5.4. Soggetti sani: *Ampiezze Assolute* (a), *Ampiezze Medie* (b) e *Ampiezze Relative* (c)

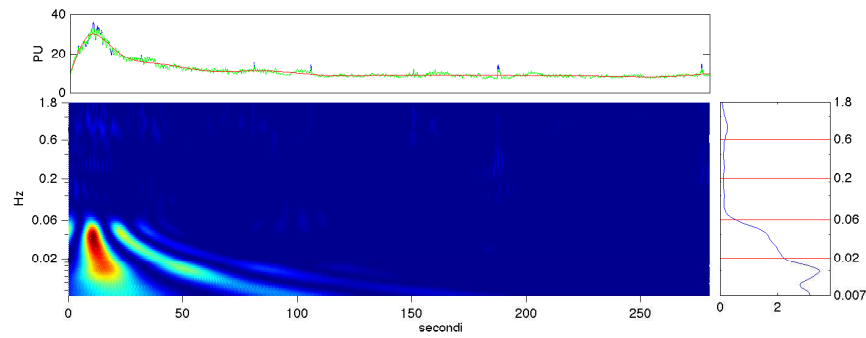
## 5.2 Pazienti con PAD in stadio II sottoposti a PORH

## 5.2.1 Immagini

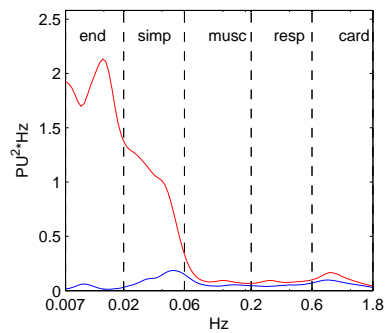
Paziente n°4



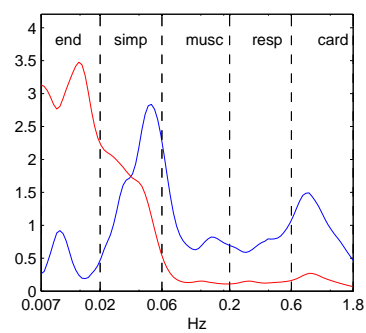
(a) Segnale, scalogramma e AR, pre



(b) Segnale, scalogramma e AR, post



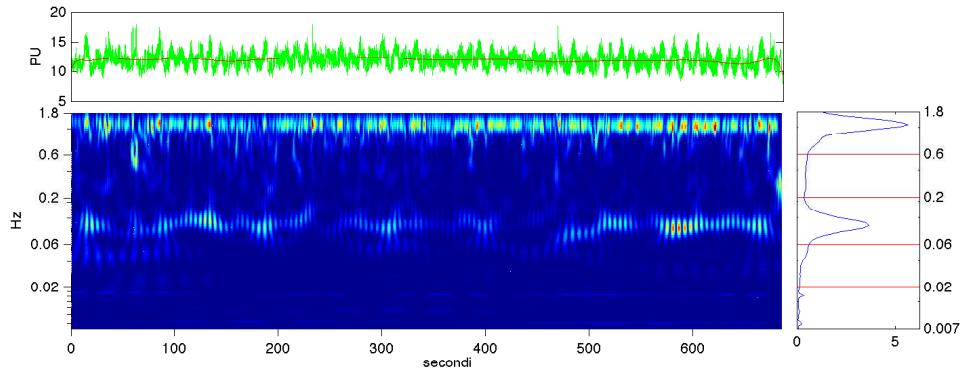
(c) Ampiezze Assolute



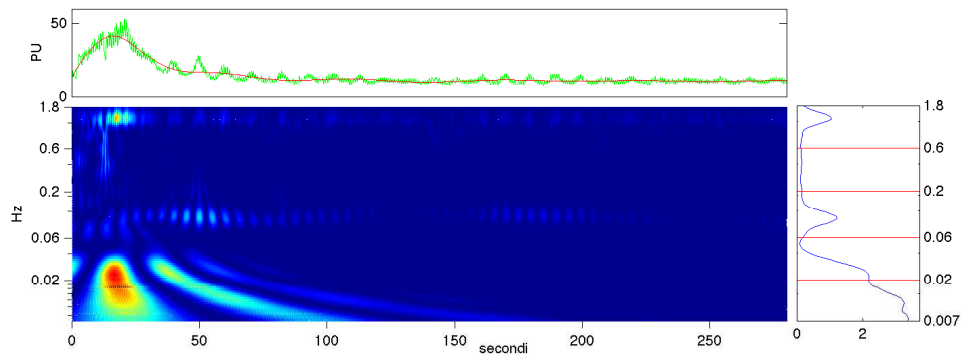
(d) Ampiezze Relative

Figura 5.5. Paziente 4: segnale, scalogramma e AR *pre* (a) e *post*-ischemia (b). Confronto fra gli andamenti delle AA (c) e delle AR (d) prima (linea blu) e dopo (linea rossa) l'ischemia indotta.

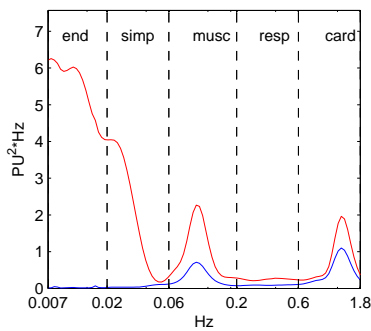
## Paziente n°5



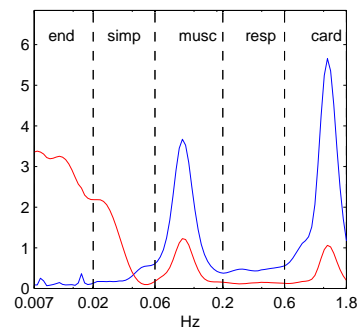
(a) Segnale, scalogramma e AR, pre



(b) Segnale, scalogramma e AR, post



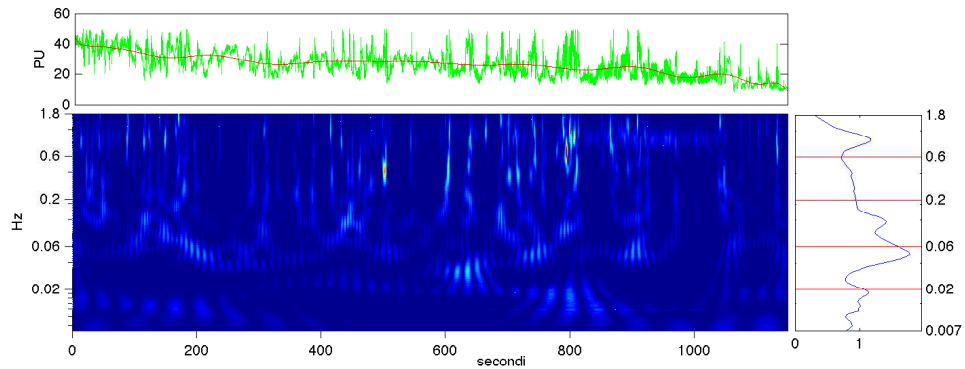
(c) Ampiezze Assolute



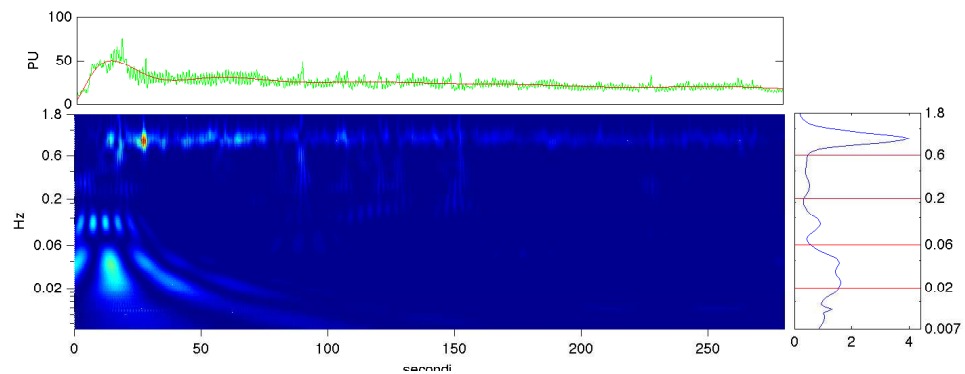
(d) Ampiezze Relative

Figura 5.6. Paziente 5: segnale, scalogramma e AR *pre* (a) e *post*-ischemia (b). Confronto fra gli andamenti delle AA (c) e delle AR (d) prima (linea blu) e dopo (linea rossa) l'ischemia indotta.

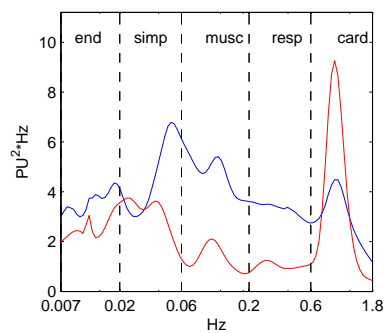
## Paziente n°6



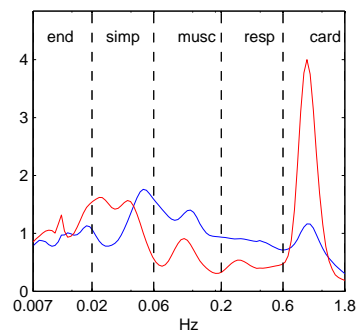
(a) Segnale, scalogramma e AR, pre



(b) Segnale, scalogramma e AR, post



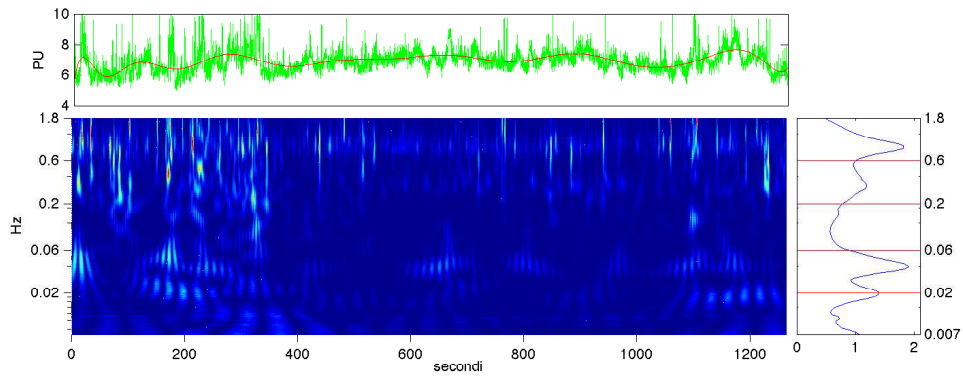
(c) Ampiezze Assolute



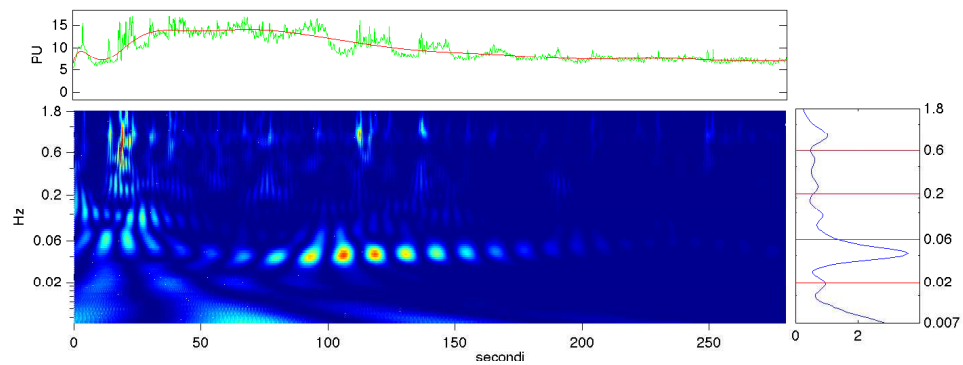
(d) Ampiezze Relative

Figura 5.7. Paziente 6: segnale, scalogramma e AR *pre* (a) e *post*-ischemia (b). Confronto fra gli andamenti delle AA (c) e delle AR (d) prima (linea blu) e dopo (linea rossa) l'ischemia indotta.

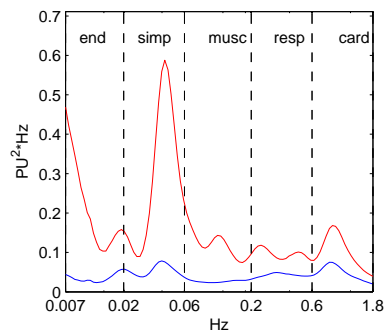
## Paziente n°7



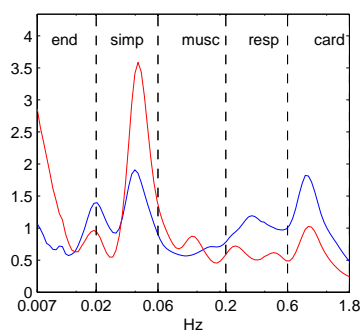
(a) Segnale, scalogramma e AR, pre



(b) Segnale, scalogramma e AR, post



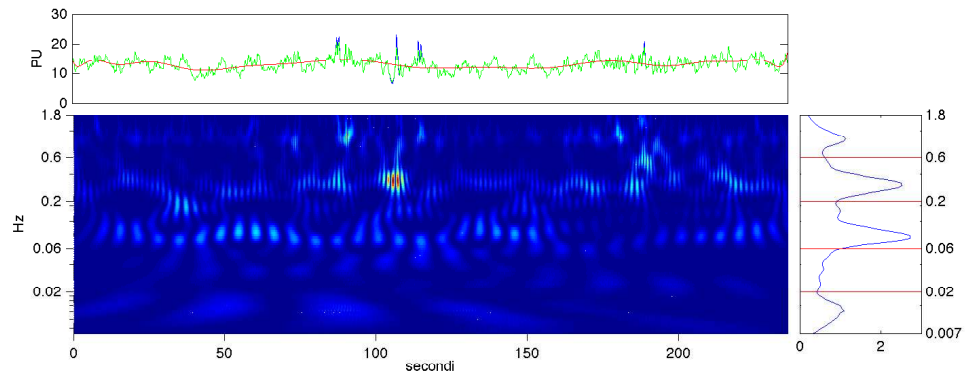
(c) Ampiezze Assolute



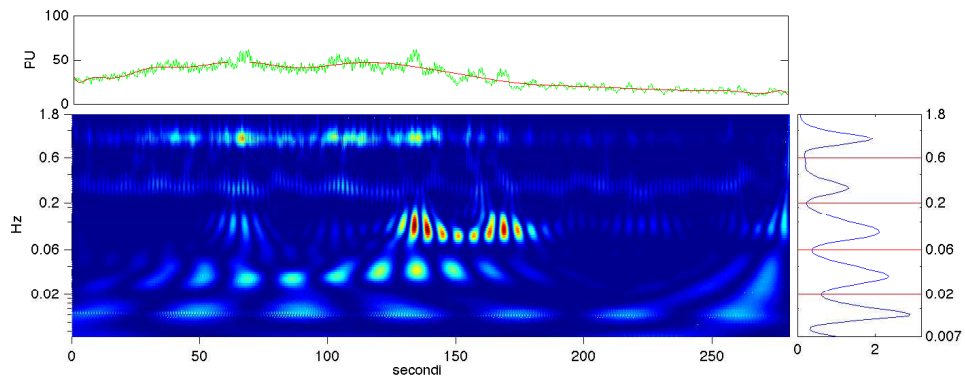
(d) Ampiezze Relative

Figura 5.8. Paziente 7: segnale, scalogramma e AR *pre* (a) e *post*-ischemia (b). Confronto fra gli andamenti delle AA (c) e delle AR (d) prima (linea blu) e dopo (linea rossa) l'ischemia indotta.

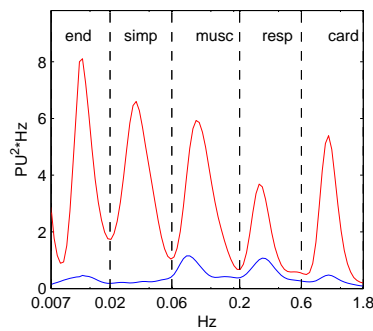
## Paziente n°8



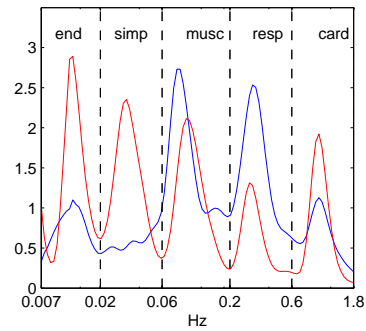
(a) Segnale, scalogramma e AR, pre



(b) Segnale, scalogramma e AR, post



(c) Ampiezze Assolute



(d) Ampiezze Relative

Figura 5.9. Paziente 8: segnale, scalogramma e AR *pre* (a) e *post-ischemia* (b). Confronto fra gli andamenti delle AA (c) e delle AR (d) prima (linea blu) e dopo (linea rossa) l'ischemia indotta.

## 5.2.2 Tabelle

Tabella 5.3. Pazienti con PAD II sottoposti a PORH: *Ampiezza Assoluta* degli intervalli e *Ampiezza Media* di ogni segnale [ $PU^2 \cdot Hz$ ]

paz.	<i>pre</i>						<i>post</i>					
	AAe	AAAn	AAAm	AAr	AAc	AM	AAe	AAAn	AAAm	AAr	AAc	AM
4	0.03	0.12	0.06	0.05	0.07	0.06	1.83	0.95	0.10	0.08	0.11	0.61
5	0.02	0.06	0.33	0.09	0.47	0.19	5.42	1.77	1.03	0.25	0.79	1.85
6	3.61	4.71	4.7	3.31	3.85	0.33	2.60	3.01	1.34	1.03	3.61	2.31
7	0.04	0.05	0.03	0.04	0.05	0.04	0.21	0.29	0.12	0.10	0.10	0.16
8	0.30	0.26	0.66	0.61	0.27	0.42	3.59	3.06	3.22	1.64	1.97	2.80

Tabella 5.4. Pazienti con PAD II sottoposti a PORH: mediane delle *Ampiezze Assolute* di ogni intervallo, variazioni percentuali tra *pre* e *post* rivascolarizzazione e valori del *p-value*.

	AAe	AAAn	AAAm	AAr	AAc
Mediane <i>pre</i> [ $PU^2 \cdot Hz$ ]	0.04	0.12	0.33	0.09	0.27
Mediane <i>post</i> [ $PU^2 \cdot Hz$ ]	2.6	1.77	1.03	0.25	0.79
Variazione [%]	7160	1350	211	178	191
<i>p-value</i>	0.15	0.15	0.55	0.55	0.42



Tabella 5.5. Pazienti con PAD II sottoposti a PORH: *Ampiezze Relative* degli intervalli di ogni segnale

paz.	<i>pre</i>					<i>post</i>				
	ARe	ARn	ARm	ARr	ARc	ARe	ARn	ARm	ARr	ARc
4	0.47	1.87	0.86	0.74	1.06	2.98	1.55	0.16	0.13	0.18
5	0.13	0.33	1.69	0.46	2.39	2.93	0.96	0.55	0.13	0.43
6	0.94	1.22	1.22	0.86	0.76	1.12	1.30	0.58	0.44	1.56
7	0.87	1.30	0.65	1.03	1.16	1.30	1.78	0.71	0.59	0.62
8	0.73	0.62	1.56	1.45	0.64	1.28	1.29	1.15	0.58	0.70

Tabella 5.6. Pazienti con PAD II sottoposti a PORH: mediane delle *Ampiezze Relative* di ogni intervallo, variazioni percentuali tra *pre* e *post* rivascolarizzazione e valori del *p-value*.

	ARe	ARn	ARm	ARr	ARc
Mediane <i>pre</i>	0.72	1.22	1.22	0.86	1.06
Mediane <i>post</i>	1.30	1.30	0.58	0.44	0.62
Variazione [%]	79.0	6.21	-52.6	-48.3	-41.4
<i>p-value</i>	0.008	0.42	0.06	0.03	0.15

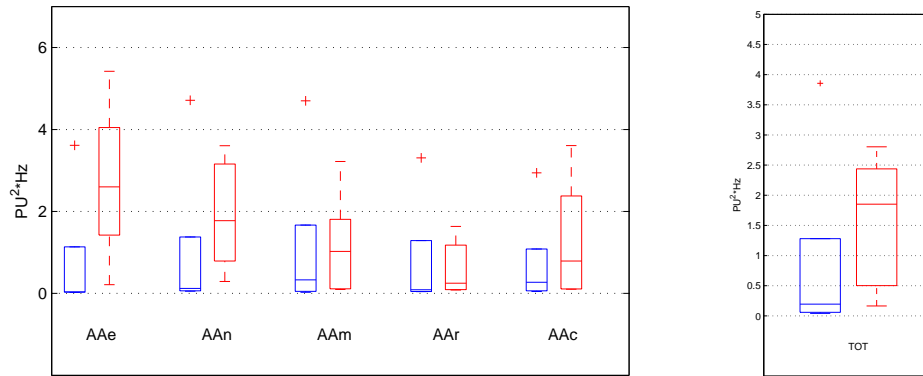
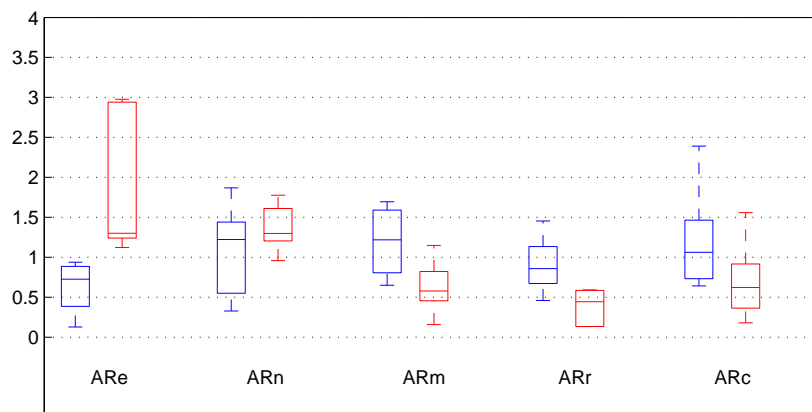
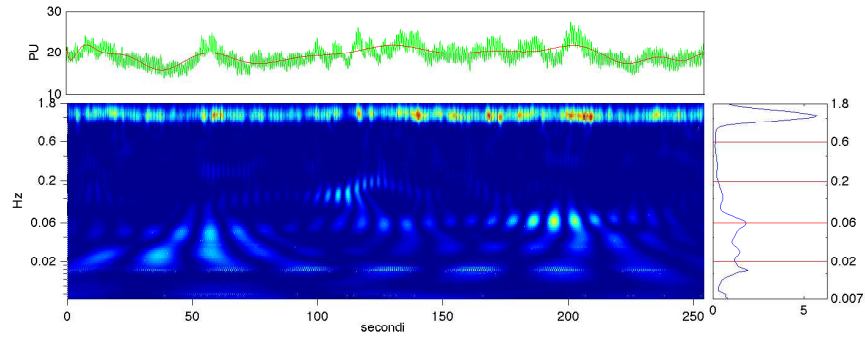
5.2.3 *Boxplot*(a) *Ampiezze Assolute*(b) *Ampiezze Medie*(c) *Ampiezze Relative*

Figura 5.10. Pazienti con PAD II sottoposti a PORH: distribuzione dei valori delle *Ampiezze Assolute* (a), *Ampiezze Medie* (b) e *Ampiezze Relative* (c)

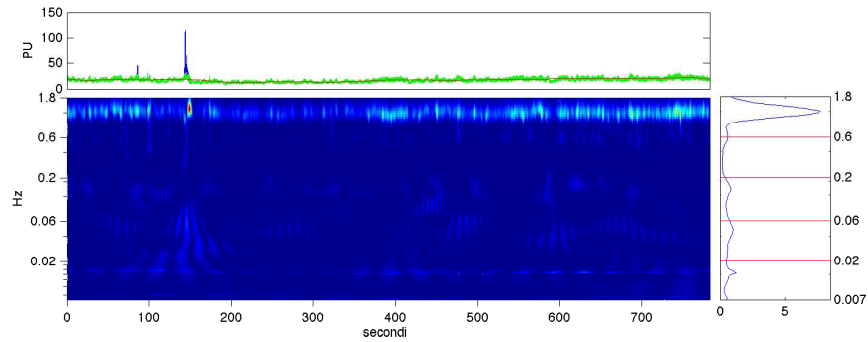
## 5.3 Pazienti con PAD in stadio III rivascolarizzati

### 5.3.1 Immagini

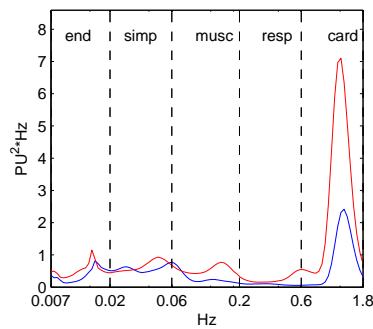
#### Paziente n°9



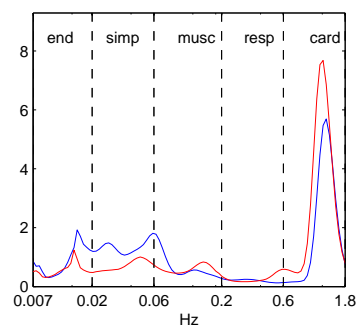
(a) Segnale, scalogramma e AR, pre



(b) Segnale, scalogramma e AR, post



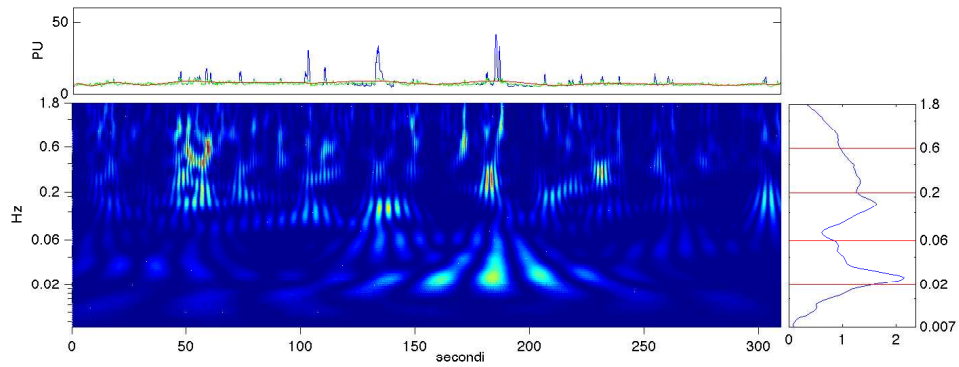
(c) Ampiezze Assolute



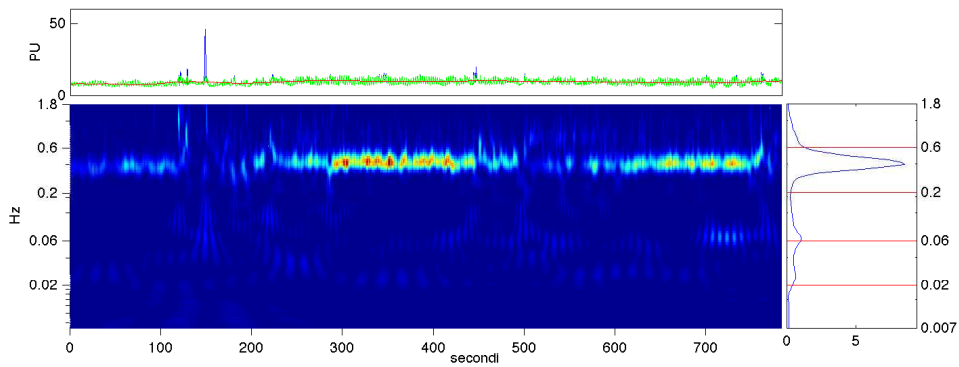
(d) Ampiezze Relative

Figura 5.11. Paziente 9: segnale, scalogramma e AR *pre* (a) e *post*-rivascolarizzazione (b). Confronto fra gli andamenti delle AA (c) e delle AR (d) prima (linea blu) e dopo (linea rossa) rivascolarizzazione.

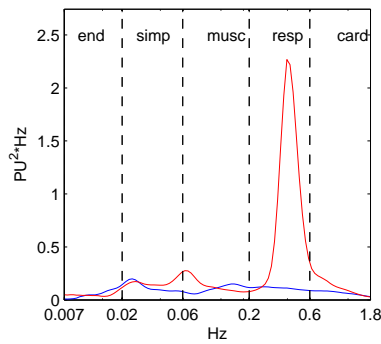
## Paziente n°10



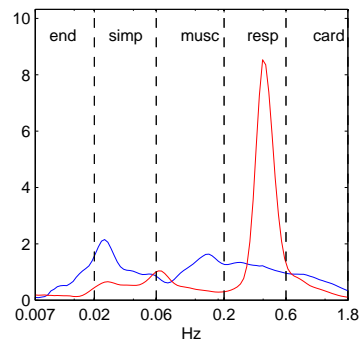
(a) Segnale, scalogramma e AR, pre



(b) Segnale, scalogramma e AR, post



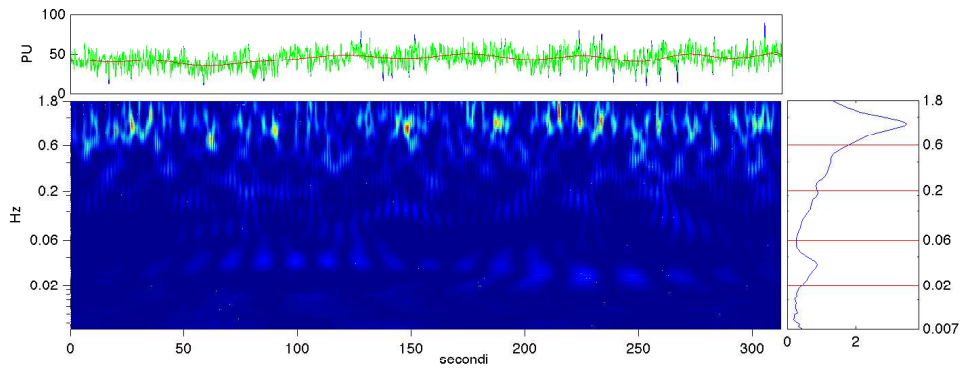
(c) Ampiezze Assolute



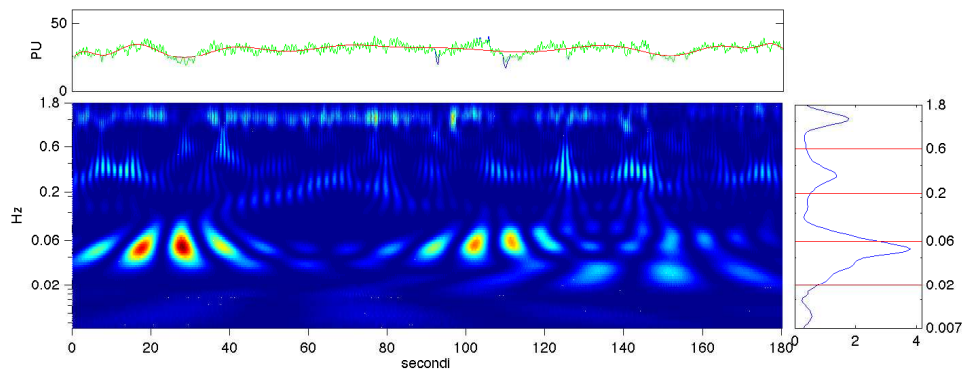
(d) Ampiezze Relative

Figura 5.12. Paziente 10: segnale, scalogramma e AR *pre* (a) e *post*-rivascolarizzazione (b). Confronto fra gli andamenti delle AA (c) e delle AR (d) prima (linea blu) e dopo (linea rossa) rivascolarizzazione.

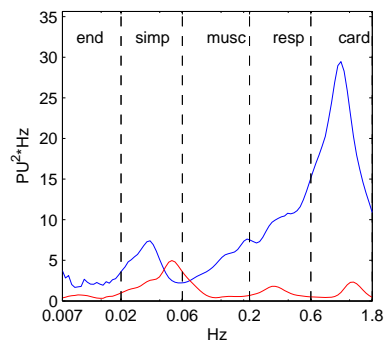
## Paziente n°11



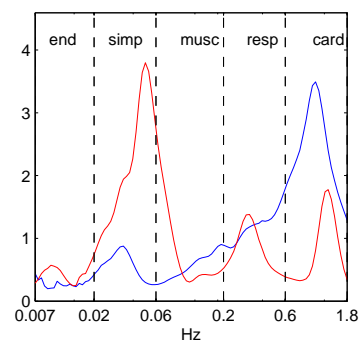
(a) Segnale, scalogramma e AR, pre



(b) Segnale, scalogramma e AR, post



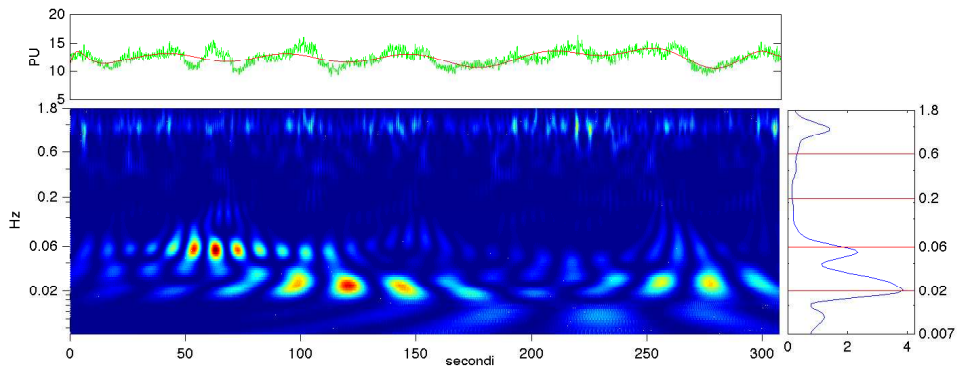
(c) Ampiezze Assolute



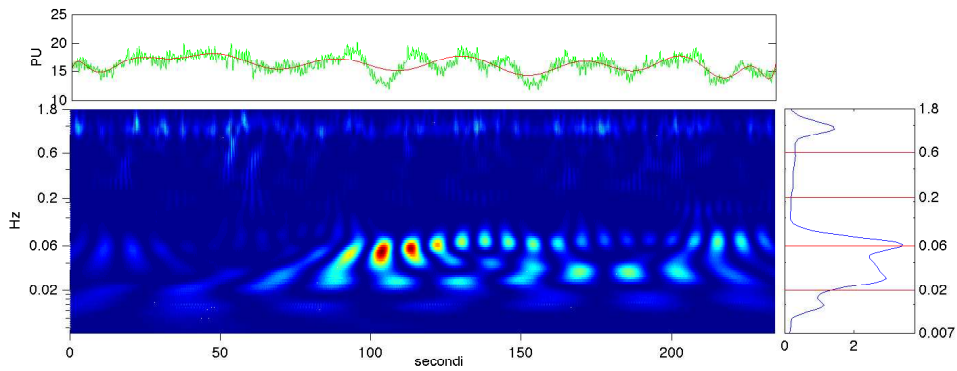
(d) Ampiezze Relative

Figura 5.13. Paziente 11: segnale, scalogramma e AR *pre* (a) e *post*-rivascularizzazione (b). Confronto fra gli andamenti delle AA (c) e delle AR (d) prima (linea blu) e dopo (linea rossa) rivascularizzazione.

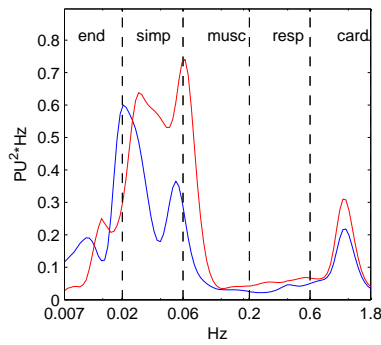
## Paziente n°12



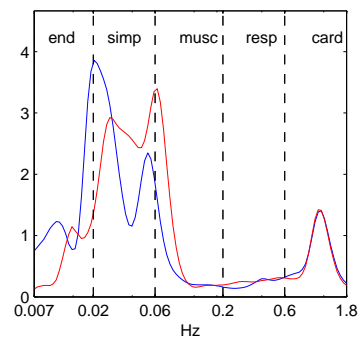
(a) Segnale, scalogramma e AR, pre



(b) Segnale, scalogramma e AR, post



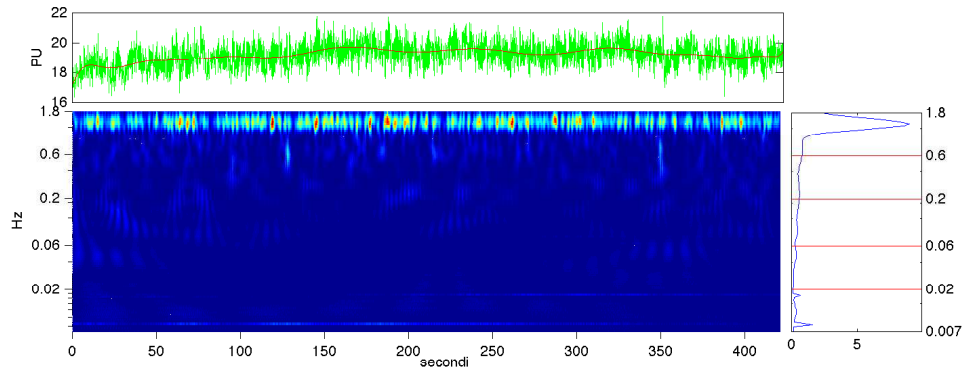
(c) Ampiezze Assolute



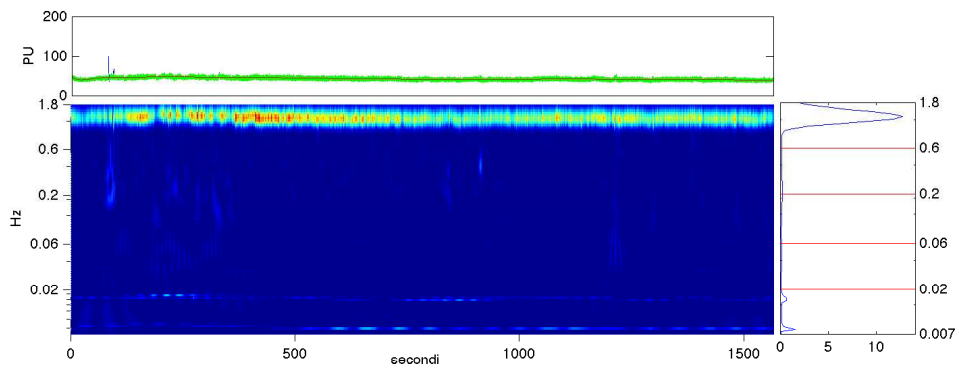
(d) Ampiezze Relative

Figura 5.14. Paziente 12: segnale, scalogramma e AR *pre* (a) e *post*-rivascularizzazione (b). Confronto fra gli andamenti delle AA (c) e delle AR (d) prima (linea blu) e dopo (linea rossa) rivascularizzazione.

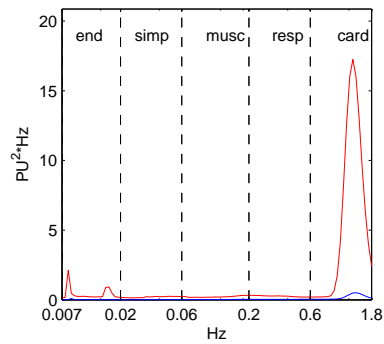
## Paziente n°13



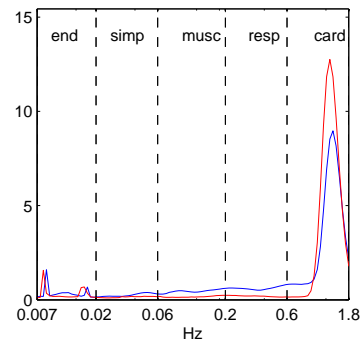
(a) Segnale, scalogramma e AR, pre



(b) Segnale, scalogramma e AR, post



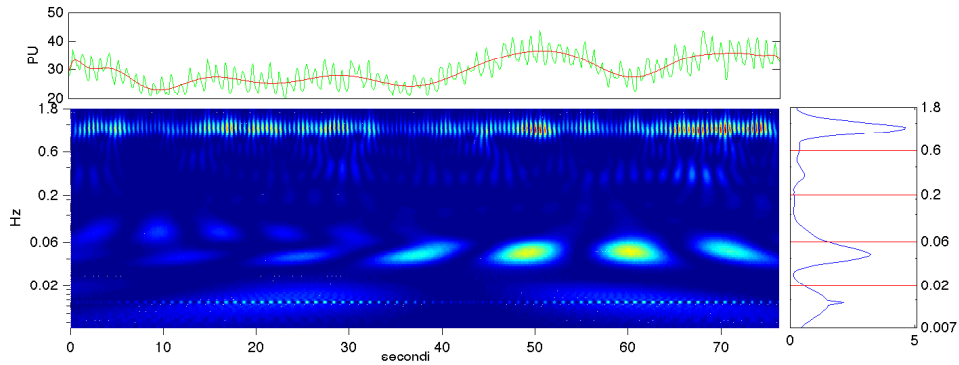
(c) Ampiezze Assolute



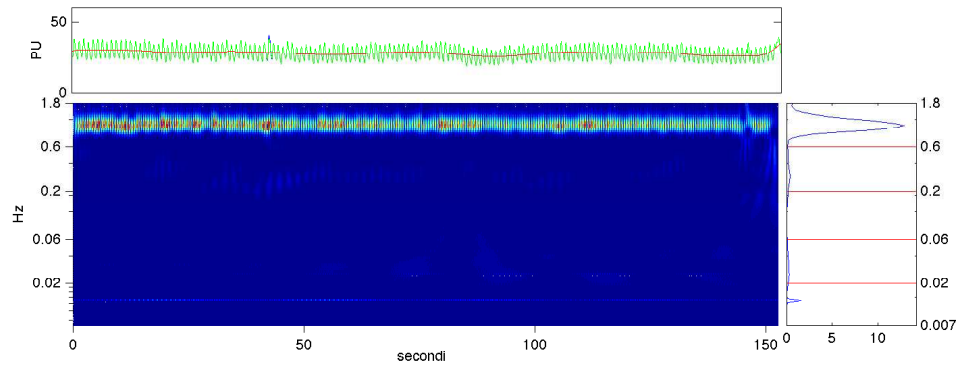
(d) Ampiezze Relative

Figura 5.15. Paziente 13: segnale, scalogramma e AR *pre* (a) e *post*-rivascolarizzazione (b). Confronto fra gli andamenti delle AA (c) e delle AR (d) prima (linea blu) e dopo (linea rossa) rivascolarizzazione.

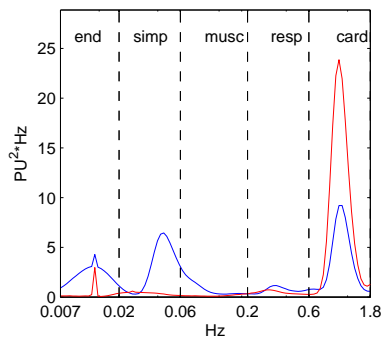
## Paziente n°14



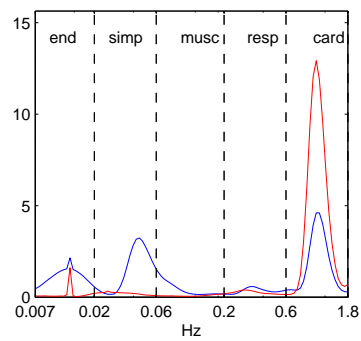
(a) Segnale, scalogramma e AR, pre



(b) Segnale, scalogramma e AR, post



(c) Ampiezze Assolute

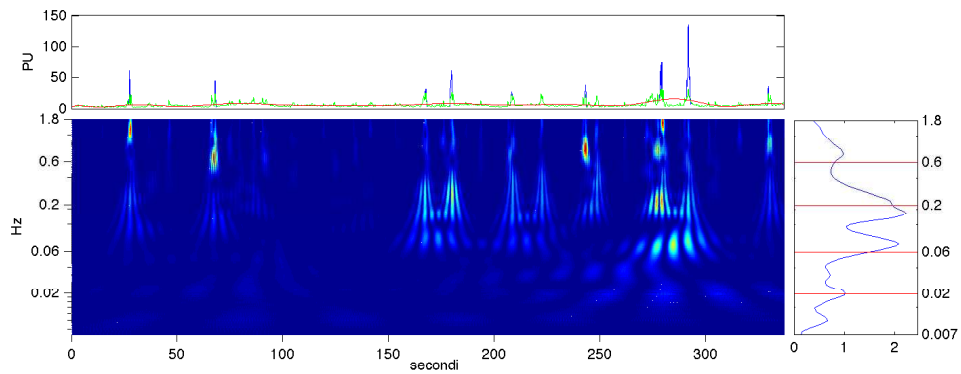


(d) Ampiezze Relative

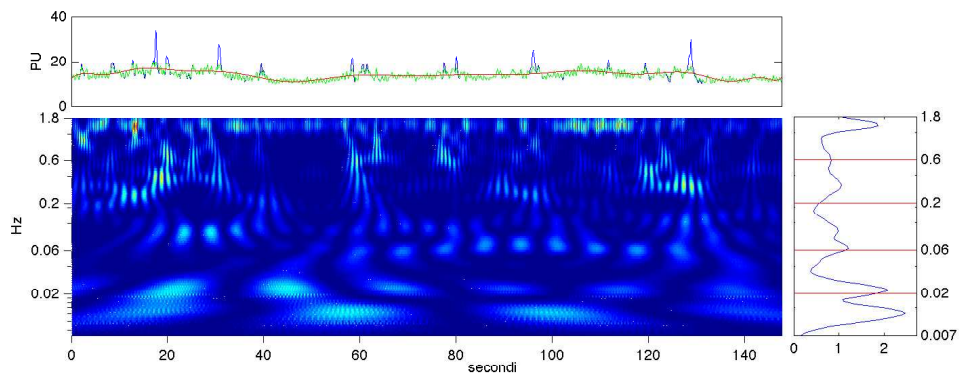
Figura 5.16. Paziente 14: segnale, scalogramma e AR *pre* (a) e *post*-rivascolarizzazione (b). Confronto fra gli andamenti delle AA (c) e delle AR (d) prima (linea blu) e dopo (linea rossa) rivascolarizzazione.



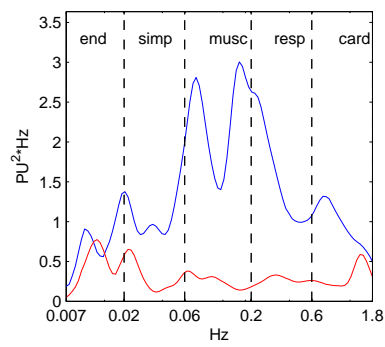
## Paziente n°15



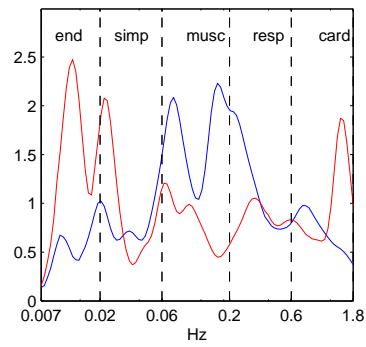
(a) Segnale, scalogramma e AR, pre



(b) Segnale, scalogramma e AR, post



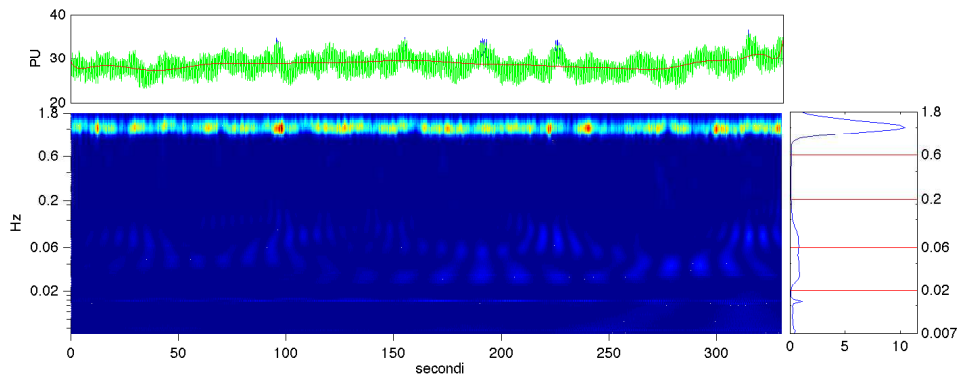
(c) Ampiezze Assolute



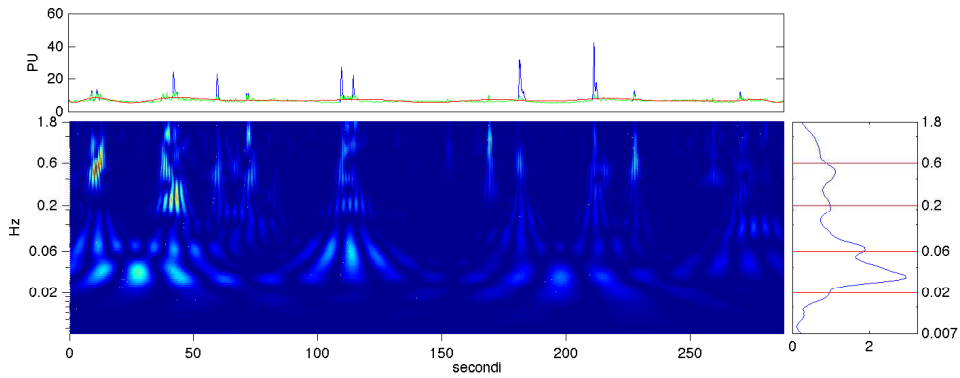
(d) Ampiezze Relative

Figura 5.17. Paziente 15: segnale, scalogramma e AR *pre* (a) e *post*-rivascolarizzazione (b). Confronto fra gli andamenti delle AA (c) e delle AR (d) prima (linea blu) e dopo (linea rossa) rivascolarizzazione.

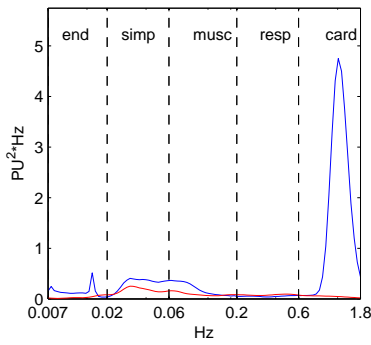
## Paziente n°16



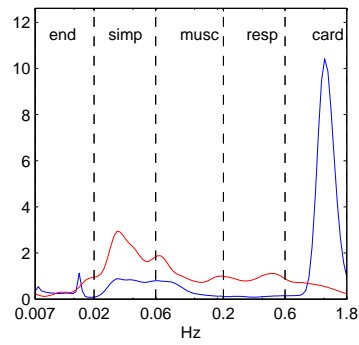
(a) Segnale, scalogramma e AR, pre



(b) Segnale, scalogramma e AR, post



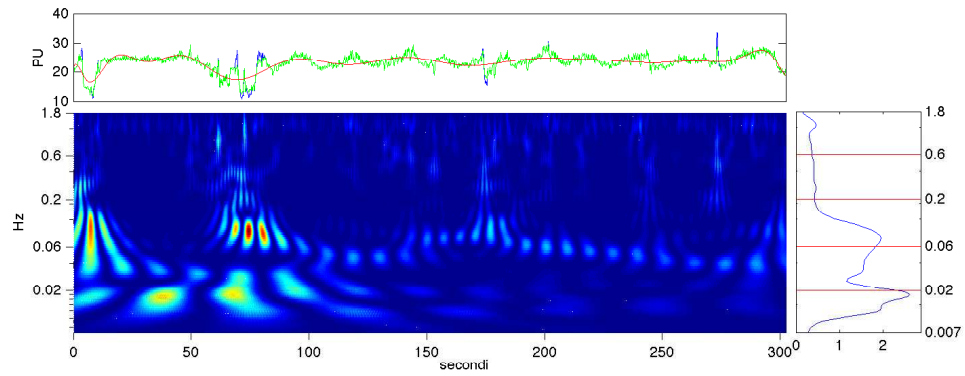
(c) Ampiezze Assolute



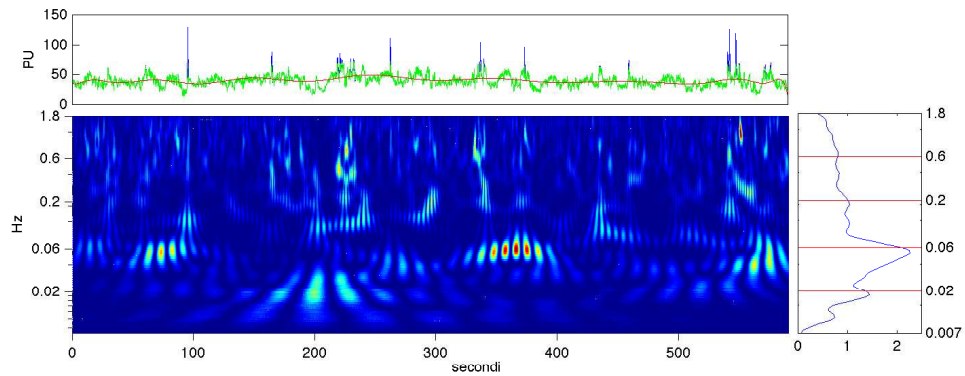
(d) Ampiezze Relative

Figura 5.18. Paziente 16: segnale, scalogramma e AR *pre* (a) e *post*-rivascolarizzazione (b). Confronto fra gli andamenti delle AA (c) e delle AR (d) prima (linea blu) e dopo (linea rossa) rivascolarizzazione.

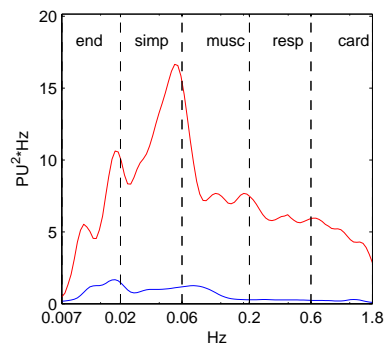
## Paziente n°17



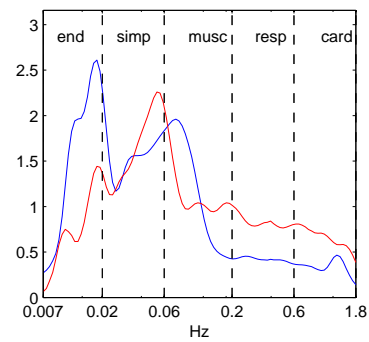
(a) Segnale, scalogramma e AR, pre



(b) Segnale, scalogramma e AR, post



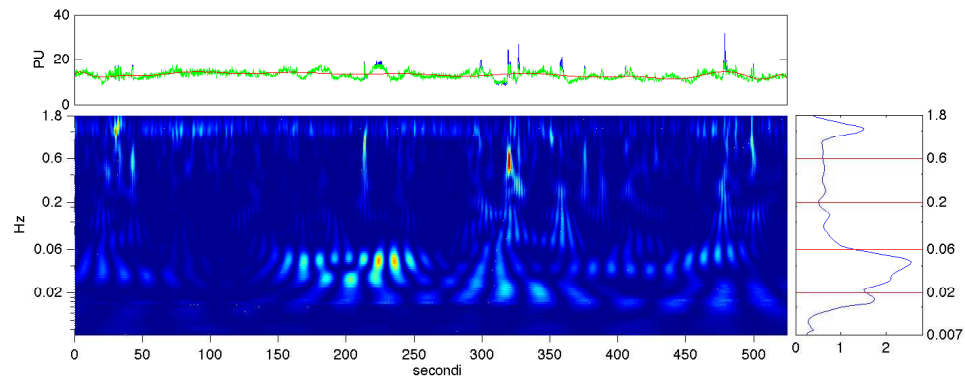
(c) Ampiezze Assolute



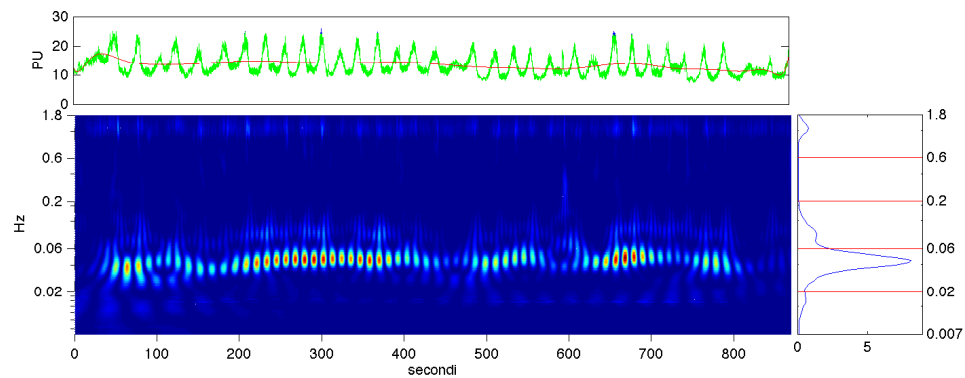
(d) Ampiezze Relative

Figura 5.19. Paziente 17: segnale, scalogramma e AR *pre* (a) e *post*-rivascolarizzazione (b). Confronto fra gli andamenti delle AA (c) e delle AR (d) prima (linea blu) e dopo (linea rossa) rivascolarizzazione.

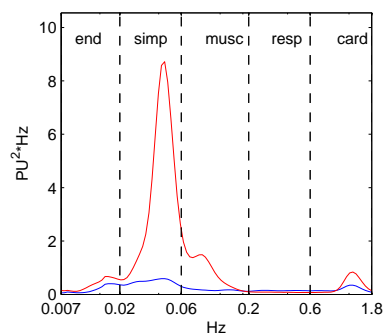
## Paziente n°18



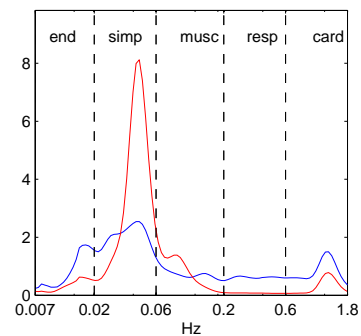
(a) Segnale, scalogramma e AR, pre



(b) Segnale, scalogramma e AR, post



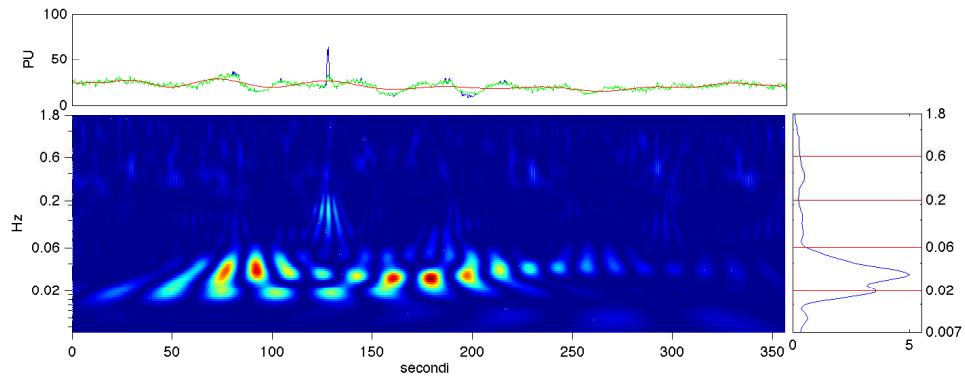
(c) Ampiezze Assolute



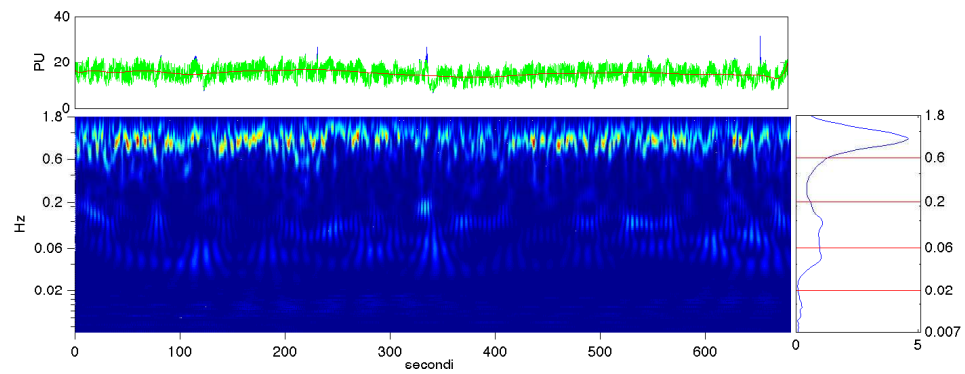
(d) Ampiezze Relative

Figura 5.20. Paziente 18: segnale, scalogramma e AR *pre* (a) e *post*-rivascolarizzazione (b). Confronto fra gli andamenti delle AA (c) e delle AR (d) prima (linea blu) e dopo (linea rossa) rivascolarizzazione.

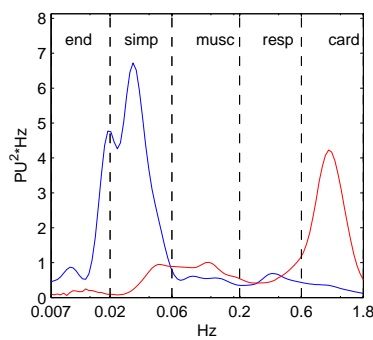
## Paziente n°19



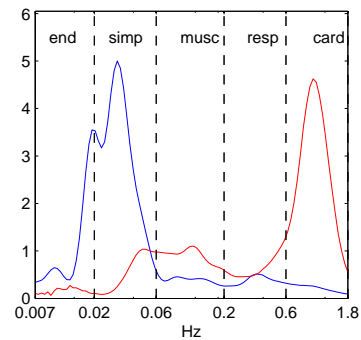
(a) Segnale, scalogramma e AR, pre



(b) Segnale, scalogramma e AR, post



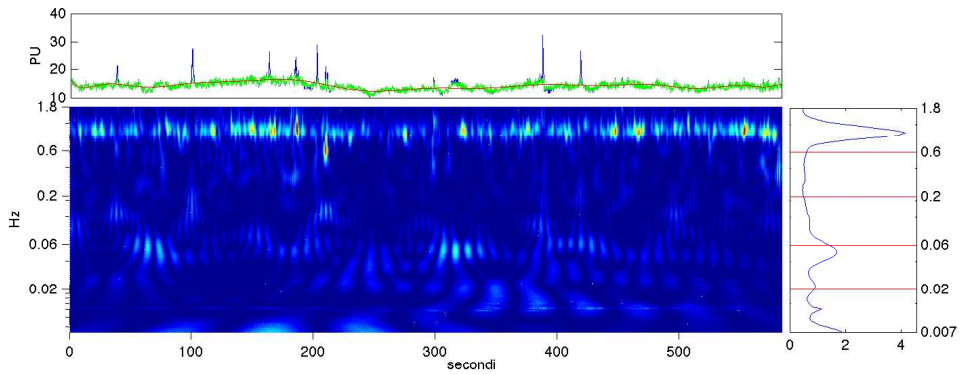
(c) Ampiezze Assolute



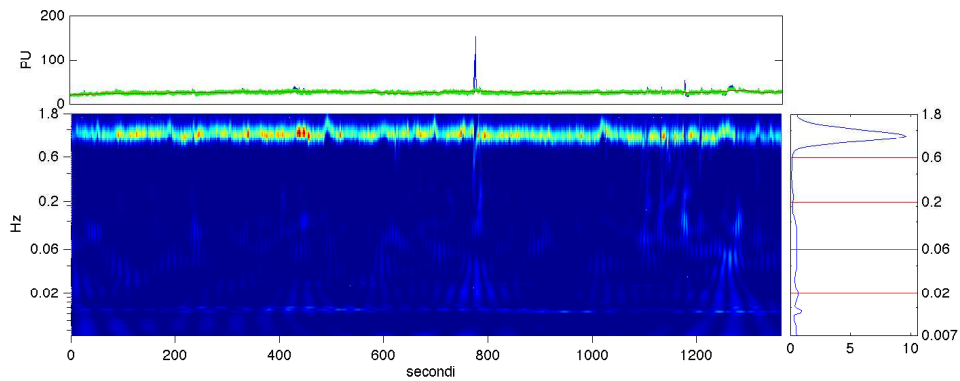
(d) Ampiezze Relative

Figura 5.21. Paziente 19: segnale, scalogramma e AR *pre* (a) e *post*-rivascolarizzazione (b). Confronto fra gli andamenti delle AA (c) e delle AR (d) prima (linea blu) e dopo (linea rossa) rivascolarizzazione.

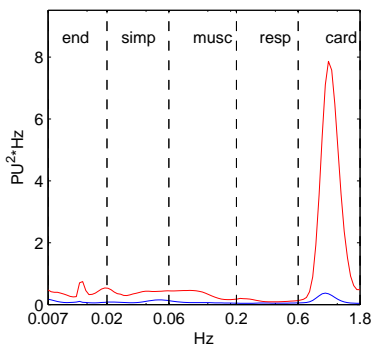
## Paziente n°20



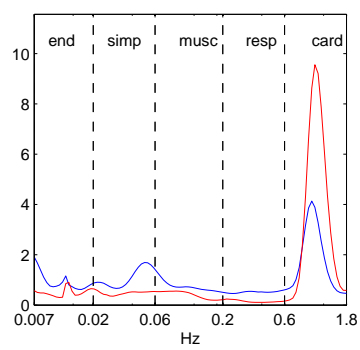
(a) Segnale, scalogramma e AR, pre



(b) Segnale, scalogramma e AR, post



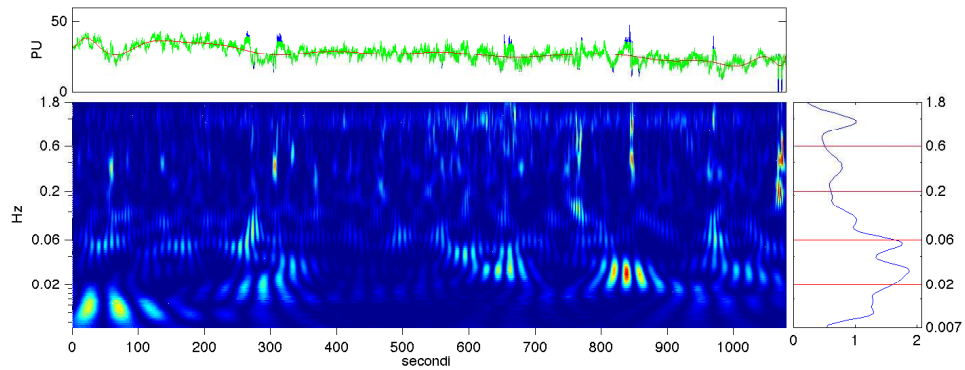
(c) Ampiezze Assolute



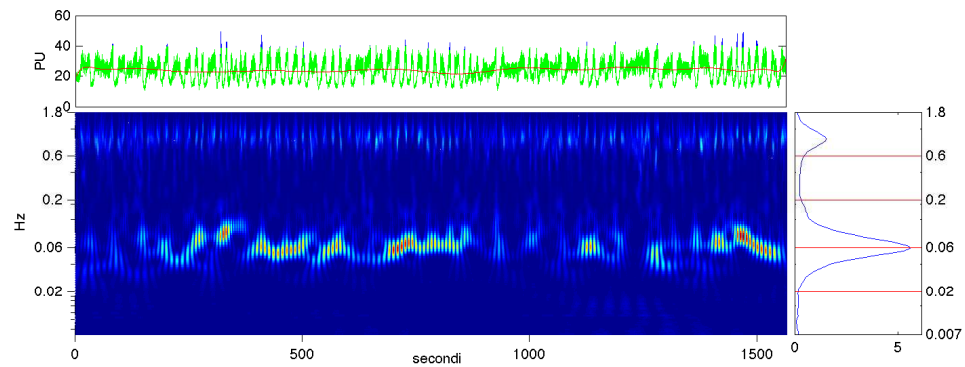
(d) Ampiezze Relative

Figura 5.22. Paziente 20: segnale, scalogramma e AR *pre* (a) e *post*-rivascularizzazione (b). Confronto fra gli andamenti delle AA (c) e delle AR (d) prima (linea blu) e dopo (linea rossa) rivascularizzazione.

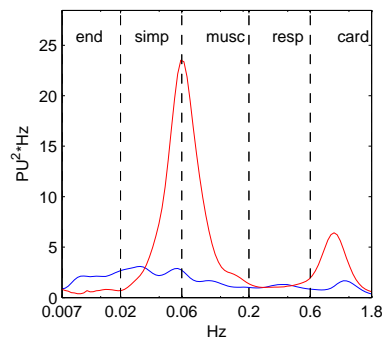
## Paziente n°21



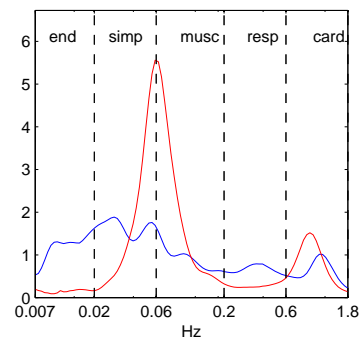
(a) Segnale, scalogramma e AR, pre



(b) Segnale, scalogramma e AR, post



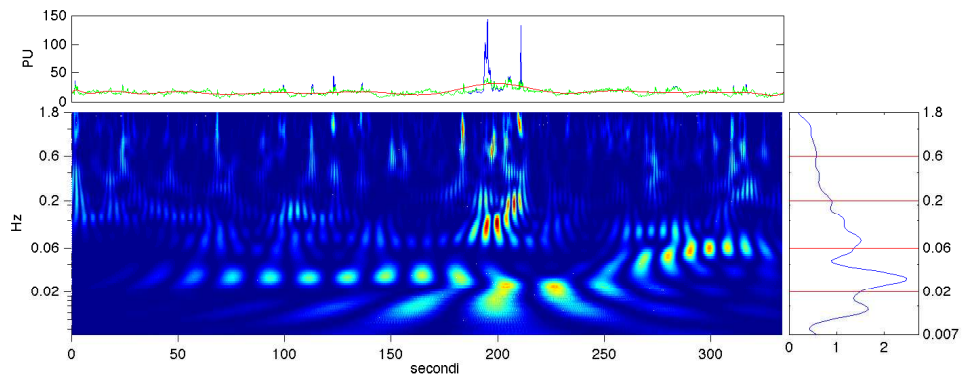
(c) Ampiezze Assolute



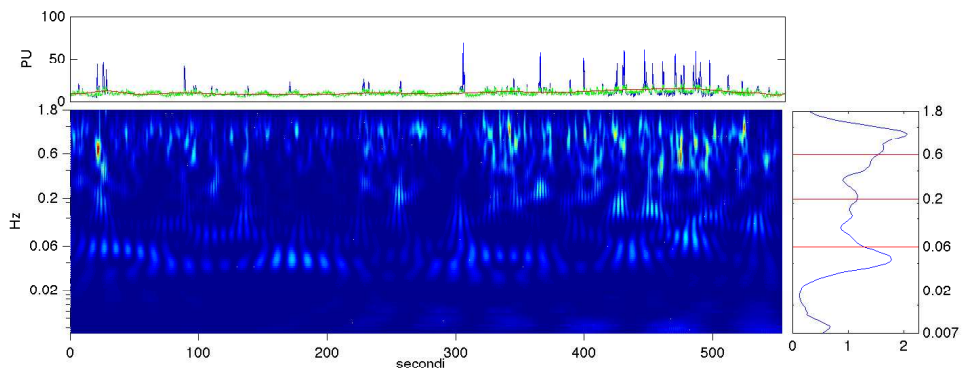
(d) Ampiezze Relative

Figura 5.23. Paziente 21: segnale, scalogramma e AR *pre* (a) e *post*-rivascolarizzazione (b). Confronto fra gli andamenti delle AA (c) e delle AR (d) prima (linea blu) e dopo (linea rossa) rivascolarizzazione.

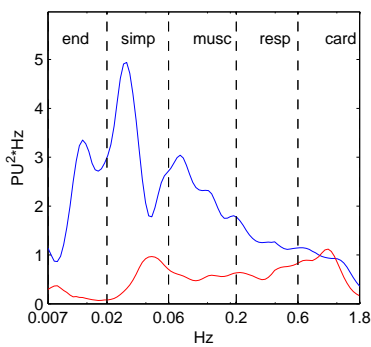
## Paziente n°22



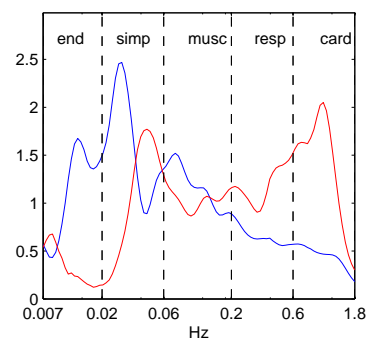
(a) Segnale, scalogramma e AR, pre



(b) Segnale, scalogramma e AR, post



(c) Ampiezze Assolute

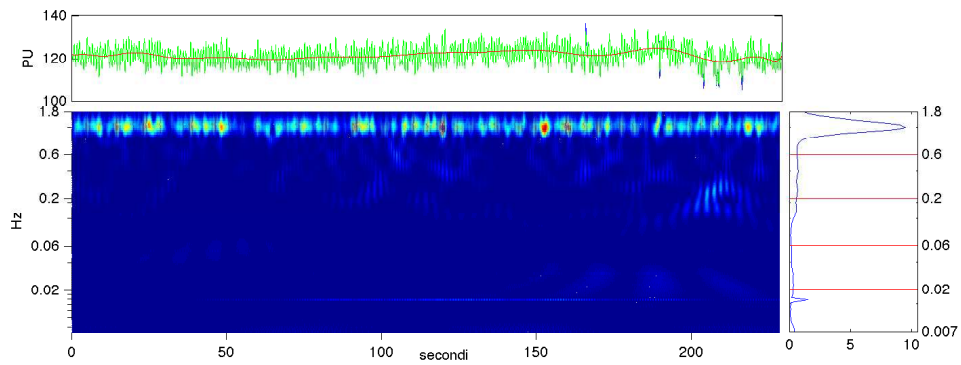


(d) Ampiezze Relative

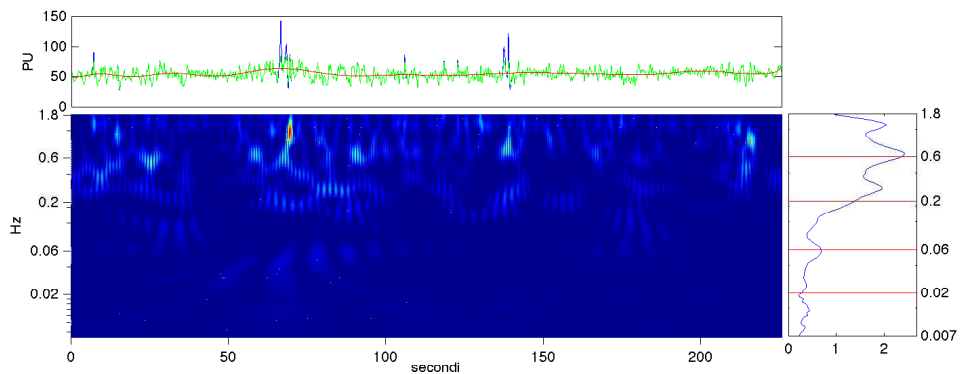
Figura 5.24. Paziente 22: segnale, scalogramma e AR *pre* (a) e *post*-rivascolarizzazione (b). Confronto fra gli andamenti delle AA (c) e delle AR (d) prima (linea blu) e dopo (linea rossa) rivascolarizzazione.



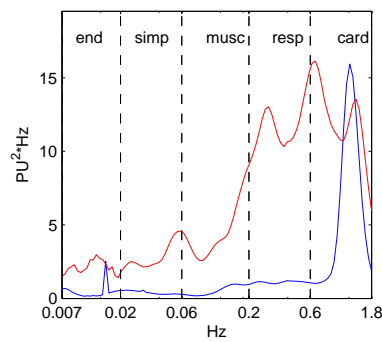
## Paziente n°23



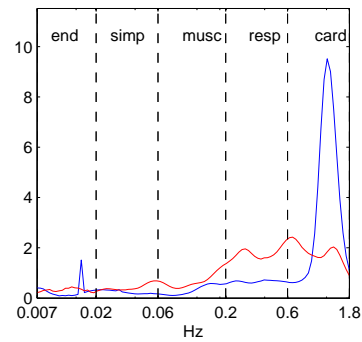
(a) Segnale, scalogramma e AR, pre



(b) Segnale, scalogramma e AR, post



(c) Ampiezze Assolute



(d) Ampiezze Relative

Figura 5.25. Paziente 23: segnale, scalogramma e AR *pre* (a) e *post*-rivascolarizzazione (b). Confronto fra gli andamenti delle AA (c) e delle AR (d) prima (linea blu) e dopo (linea rossa) rivascolarizzazione.

## 5.3.2 Tabelle

Tabella 5.7. Pazienti con PAD III rivascolarizzati: *Ampiezza Assoluta* degli intervalli e *Ampiezza Media* di ogni segnale [ $PU^2 \cdot Hz$ ]

paz.	<i>pre</i>						<i>post</i>					
	AAe	AA <sub>n</sub>	AA <sub>m</sub>	AA <sub>r</sub>	AA <sub>c</sub>	AM	AAe	AA <sub>n</sub>	AA <sub>m</sub>	AA <sub>r</sub>	AA <sub>c</sub>	AM
9	0.52	0.67	0.55	0.25	2.64	0.42	0.37	0.58	0.25	0.09	0.82	0.92
10	0.05	0.17	0.13	0.85	0.13	0.09	0.059	0.12	0.11	0.11	0.07	0.26
11	0.59	2.91	0.93	1.08	1.05	8.43	2.45	4.66	4.77	10.10	20.20	1.31
12	0.14	0.59	0.16	0.06	0.14	0.15	0.23	0.35	0.06	0.03	0.11	0.21
13	0.41	0.21	0.22	0.27	5.66	0.05	0.02	0.01	0.03	0.04	0.19	1.35
14	0.30	0.36	0.15	0.46	7.97	1.99	2.21	2.95	0.76	0.69	3.38	1.84
15	0.44	0.29	0.25	0.27	0.31	1.34	0.74	1.14	2.30	1.60	0.96	0.31
16	0.03	0.17	0.09	0.08	0.05	0.45	0.14	0.32	0.18	0.05	1.59	0.08
17	5.54	12.30	8.04	6.13	4.83	0.64	0.97	1	0.75	0.27	0.21	7.37
18	0.36	3.79	0.81	0.08	0.32	0.23	0.19	0.47	0.16	0.14	0.19	1.07
19	0.14	0.53	0.83	0.59	2.48	1.34	1.56	3.85	0.52	0.50	0.29	0.91
20	0.42	0.39	0.33	0.13	2.84	0.09	0.08	0.10	0.064	0.047	0.16	0.82
21	0.64	8.80	7.13	1.20	3.38	1.63	1.97	2.70	1.44	1.09	1.01	4.23
22	0.18	0.59	0.56	0.65	0.75	2.00	2.25	3.22	2.34	1.31	0.89	0.54
23	2.11	2.95	4.44	11.70	12.10	1.67	0.47	0.39	0.55	1.10	5.86	6.65

Tabella 5.8. Pazienti con PAD III rivascolarizzati: mediane delle *Ampiezze Assolute* di ogni intervallo, variazioni percentuali tra *pre* e *post* rivascolarizzazione e valori del *p-value*.

	AAe	AA <sub>n</sub>	AA <sub>m</sub>	AA <sub>r</sub>	AA <sub>c</sub>
Mediane <i>pre</i> [ $PU^2 \cdot Hz$ ]	0.47	0.58	0.52	0.27	0.83
Mediane <i>post</i> [ $PU^2 \cdot Hz$ ]	0.41	0.59	0.55	0.46	2.48
Variazione [%]	-14	1.42	4.2	70.2	200
<i>p-value</i>	0.56	0.80	0.53	0.59	0.28

Tabella 5.9. Pazienti con PAD III rivascolarizzati: *Ampiezze Relative* degli intervalli di ogni segnale

paz.	<i>pre</i>					<i>post</i>				
	ARe	ARn	ARm	ARr	ARc	ARe	ARn	ARm	ARr	ARc
9	0.89	1.36	0.60	0.20	1.95	0.56	0.72	0.59	0.27	2.90
10	0.64	1.28	1.16	1.20	0.72	0.20	0.644	0.49	3.19	0.47
11	0.29	0.55	0.57	1.19	2.40	0.45	2.22	0.71	0.83	0.80
12	1.48	2.26	0.36	0.22	0.69	0.66	2.69	0.74	0.26	0.65
13	0.34	0.26	0.46	0.62	3.33	0.30	0.15	0.16	0.20	4.19
14	1.10	1.48	0.38	0.35	1.69	0.16	0.20	0.08	0.25	4.32
15	0.55	0.84	1.71	1.19	0.71	1.42	0.94	0.78	0.85	1.00
16	0.30	0.70	0.40	0.11	3.49	0.41	2.03	1.05	0.94	0.57
17	1.52	1.56	1.17	0.42	0.33	0.75	1.67	1.09	0.83	0.65
18	0.84	2.02	0.71	0.61	0.83	0.33	3.53	0.76	0.08	0.30
19	1.16	2.86	0.39	0.37	0.22	0.15	0.58	0.90	0.65	2.71
20	0.93	1.10	0.71	0.52	1.73	0.51	0.48	0.40	0.15	3.45
21	1.20	1.65	0.88	0.66	0.61	0.15	2.08	1.69	0.28	0.80
22	1.13	1.61	1.17	0.65	0.44	0.33	1.09	1.02	1.18	1.37
23	0.28	0.23	0.36	0.66	3.50	0.32	0.44	0.67	1.76	1.81

Tabella 5.10. Pazienti con PAD III rivascolarizzati: mediane delle *Ampiezze Relative* di ogni intervallo, variazioni percentuali tra *pre* e *post* rivascolarizzazione e valori del *p-value*.

	ARe	ARn	ARm	ARr	ARc
Mediane <i>pre</i>	0.89	1.36	0.60	0.61	0.83
Mediane <i>post</i>	0.33	0.94	0.74	0.65	1.0
Variazione [%]	-62.2	-30.8	23.5	6.64	20.8
<i>p-value</i>	0.01	0.74	0.71	1	0.71

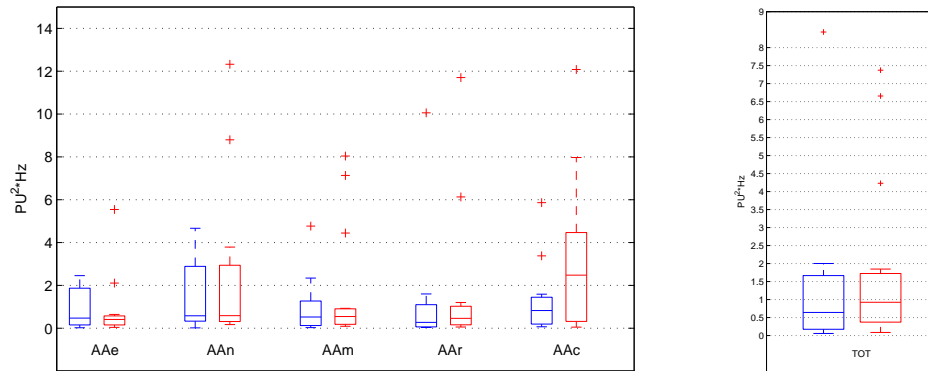
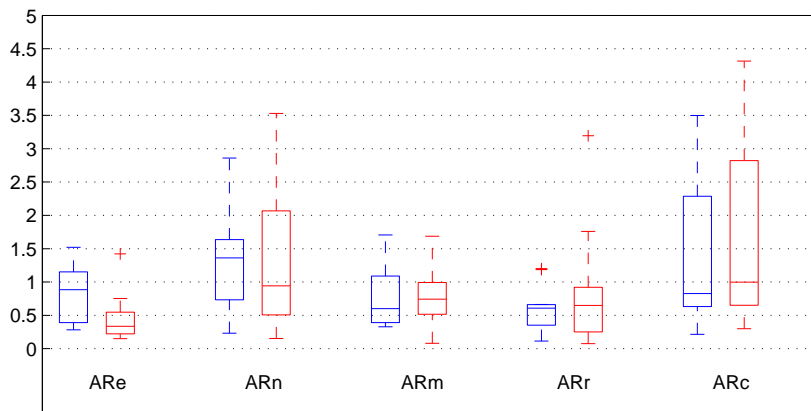
5.3.3 *Boxplot*(a) *Ampiezze Assolute*(b) *Ampiezze Medie*(c) *Ampiezze Relative*

Figura 5.26. Pazienti con PAD III rivascularizzati: distribuzione dei valori delle *Ampiezze Assolute* (a), *Ampiezze Medie* (b) e *Ampiezze Relative* (c)

## 5.4 Confronti tra le AR dei diversi gruppi

### Sani e patologici di stadio II

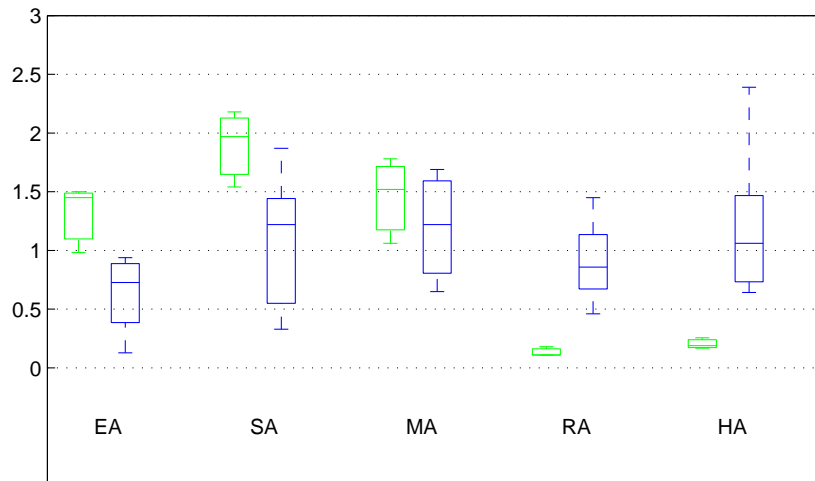


Figura 5.27. Confronto tra le AR dei soggetti sani (verde) e con PAD II (blu)

Tabella 5.11. Mediane delle *Ampiezze Relative* di ogni intervallo, variazioni percentuali tra sani e patologici di stadio II e valori del *p-value*.

	ARe	ARn	ARm	ARr	ARc
Mediane sani	1.45	1.97	1.52	0.11	0.19
Mediane stadio II	0.73	1.22	1.22	0.86	1.06
Variazione [%]	-50	-38	-20	682	460
<i>p-value</i>	0.04	0.07	0.57	0.04	0.04

## Sani e patologici di stadio III

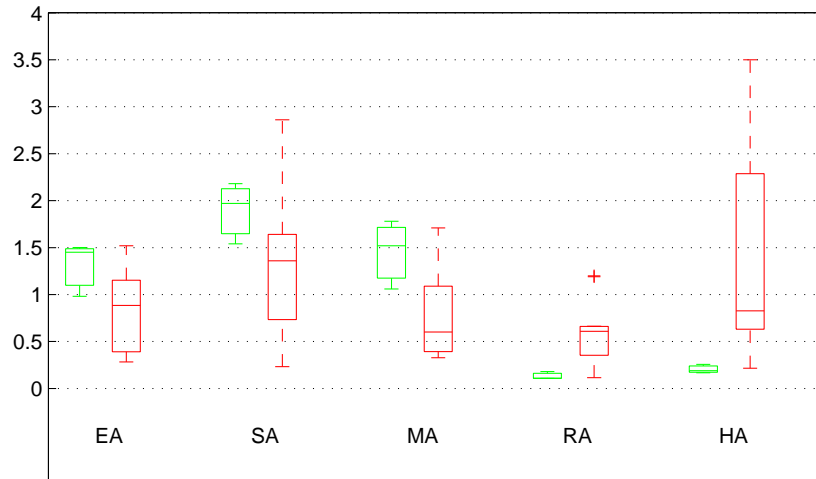


Figura 5.28. Confronto tra le AR dei soggetti sani (verde) e con PAD III (rosso)

Tabella 5.12. Mediane delle *Ampiezze Relative* di ogni intervallo, variazioni percentuali tra sani e patologici di stadio III e valori del *p-value*.

	AR <sub>e</sub>	AR <sub>n</sub>	AR <sub>m</sub>	AR <sub>r</sub>	AR <sub>c</sub>
Mediane sani	1.45	1.97	1.52	0.11	0.19
Mediane stadio III	0.88	1.36	0.60	0.61	0.83
Variazione [%]	-40	-31	-61	454	337
<i>p-value</i>	0.13	0.20	0.04	0.005	0.005

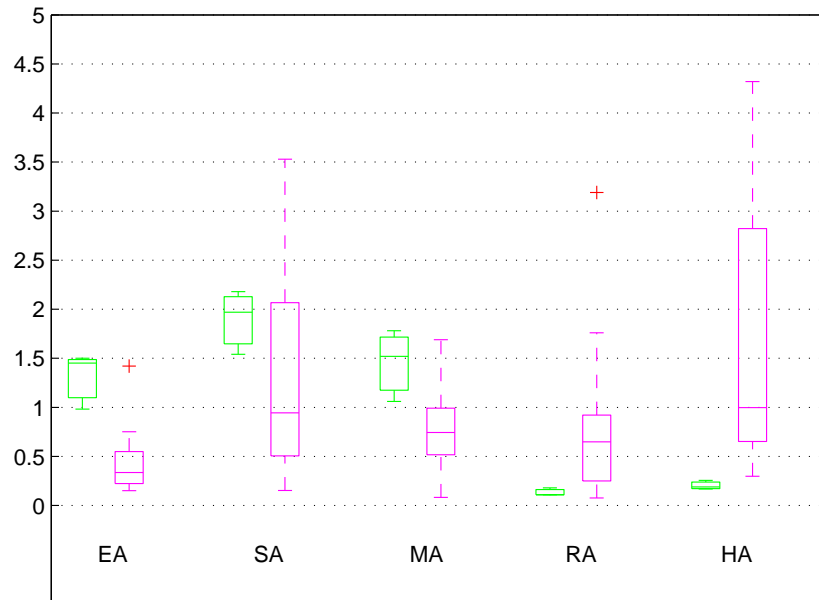
Sani e patologici di stadio III, *post-rivascolarizzazione*

Figura 5.29. Confronto tra le AR dei soggetti sani (verde) e con PAD III post rivascolarizzazione (magenta)

Tabella 5.13. Mediane delle *Ampiezze Relative* di ogni intervallo, variazioni percentuali tra sani e patologici di stadio III *post-rivascolarizzazione* e valori del *p-value*.

	ARe	ARn	ARm	ARr	ARc
Mediane sani	1.45	1.97	1.52	0.11	0.19
Mediane stadio III <i>post-riv.</i>	0.33	0.94	0.74	0.65	1.00
Variazione [%]	-77	-52	-51	410	426
<i>p-value</i>	0.005	0.36	0.017	0.03	0.003

### Confronto completo

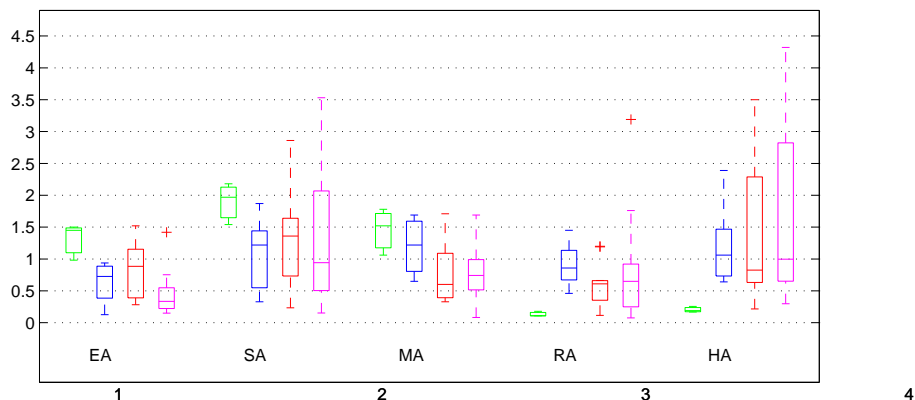


Figura 5.30. Confronto tra le AR dei soggetti sani (verde), con PAD II (blu), con PAD III (rosso), con PAD III post rivascolarizzazione (magenta)

## 5.5 Discussione

### Confronto fra i soggetti sani e i pazienti

L'analisi in frequenza conferma quanto riportato in letteratura riguardo ai soggetti sani, ovvero la marcata presenza delle componenti a basse frequenze AR<sub>e</sub> AR<sub>n</sub> AR<sub>m</sub> e della componente cardiaca (Fig.5.4). Appare meno evidente il contributo imputabile all'attività respiratoria.

E' questa la tipica distribuzione spettrale che deve fungere da riferimento per il medico quando si vogliono trattare i pazienti affetti da PAD dopo rivascolarizzazione.

I segnali acquisiti sui soggetti sani (da 1 a 3) appaiono evidentemente diversi se confrontati con i segnali acquisiti sui pazienti con PAD allo stadio II e allo stadio III, prima e dopo rivascolarizzazione (Fig 5.30).

I valori del *p-value* indicano che le differenze sono significative nella maggior parte degli intervalli di frequenze (Tab. 5.11, 5.12, 5.13).

In particolare, sembra che la presenza della patologia comporti una ridistribuzione del contenuto in frequenza, diminuendo le componenti relative alle onde endoteliali, neurogene e miogene (dovute quindi a fattori di controllo locale) in favore di una maggior presenza delle onde veloci dovute alla respirazione e al battito cardiaco.



### I pazienti con PAD II sottoposti a PORH

I risultati acquisiti sui pazienti da 4 a 8, affetti da forme meno gravi di PAD (classe II), devono essere interpretati diversamente. In questi casi, infatti, il ridotto afflusso di sangue è prodotto da un'occlusione indotta per tre minuti e rimossa all'avvio dell'acquisizione del segnale LDF. Va quindi evidenziato il fatto che il segnale contiene la risposta dinamica all'iperemia, a differenza di quanto accade per i pazienti rivascolarizzati, per i quali il segnale è riferito a condizioni stazionarie. Ciò che si valuta è pertanto la risposta del microcircolo all'iperemia post-occlusiva (PORH), ovvero all'istantaneo aumento di sangue nel distretto di interesse.

Nei segnali LDF relativi alla condizione post-occlusiva dei pazienti da 4 a 8 (da Fig.5.5-b a Fig.5.9-b) a si può facilmente identificare nel tratto iniziale il rapido aumento della perfusione dovuto alla rimozione dell'occlusione indotta (transitorio). Nei diversi pazienti la perfusione torna poi alla stazionarietà con dinamiche diverse, rintracciabili negli scalogrammi 3D.

Dai risultati di Tab.5.6 si può affermare che la PORH comporta differenze significative nelle *Ampiezze Relative* dell'attività endoteliale (ARe) e respiratoria (ARr), con *p-value* rispettivamente pari a 0.008 e 0.03. In particolare le mediane subiscono un incremento del 79% per le ARe, ed un decremento del 48.3% per le ARr. Sono da segnalare, anche se non significative dal punto di vista statistico, le variazioni delle mediane di ARm (-52.6%) e ARc (-41.4%).

Ciò conferma quanto è possibile valutare qualitativamente dagli scalogrammi, nei quali è evidente l'iniziale contributo dell'attività locale, che però si esaurisce una volta cessato il transitorio.

### I pazienti con PAD III rivascolarizzati

Per quanto concerne i risultati ottenuti dai pazienti da 9 a 23, il confronto fra la condizione microcircolatoria prima e dopo il trattamento di rivascolarizzazione evidenzia aspetti meritevoli di alcune considerazioni.

L'unica differenza statisticamente significativa (*p-value* = 0.01) si riscontra in Tab.5.10 tra le *Ampiezze Relative* dell'intervallo di frequenze assegnate all'attività endoteliale (ARe), che registrano una diminuzione delle mediane pari al 62.2%. Sebbene non significativo, un analogo decremento dell'attività endoteliale emerge anche dal confronto delle *Ampiezze Assolute* (AAe) pari al 14%.

Con riferimento alla distribuzione delle AA, riportata in Fig.5.26, si nota che, mentre le altezze dei box corrispondenti agli intervalli di frequenza assegnati alle attività neurogena, miogena e respiratoria (AA<sub>n</sub>, AA<sub>m</sub>, AA<sub>r</sub>) si conservano, le altezze dei box relativi alle attività endoteliale (AA<sub>e</sub>) e cardiaca (AA<sub>c</sub>) subiscono una evidente variazione: sembra che, a seguito della rivascolarizzazione, nel segnale LDF prevalgano, in termini di ampiezza, le oscillazioni dell'attività cardiaca a scapito dell'attività endoteliale.

In termini di AR, il ridotto contributo dell'attività endoteliale si traduce in una redistribuzione dell'energia del segnale tra le altre bande di frequenza, anche se non si registrano nei segnali acquisiti altre differenze significative.

In sintesi, i risultati dimostrano una diminuita attività delle cellule endoteliali in seguito alla rivascolarizzazione, pur se ottenuta con procedure diverse. Questa evidenza può essere spiegata considerando che tali cellule, per lungo tempo esposte ad un regime di flusso sanguigno ridotto a causa della PAD, vengono rapidamente sollecitate da una maggiore portata sanguigna alla quale non sono altrettanto rapidamente in grado di adattarsi. Si può pertanto affermare che la procedura di rivascolarizzazione, che pure permette al paziente di migliorare la propria qualità di vita grazie a una considerevole diminuzione del dolore ischemico, non rende la condizione microcircolatoria più vicina a quella di un soggetto sano (Fig. 5.29).

## Capitolo 6

# Conclusioni

La flussimetria laser Doppler (LDF) permette di monitorare lo stato di perfusione cutanea generando un segnale, in unità di perfusione arbitrarie ( $PU$ ), caratterizzato da un andamento oscillatorio. Le oscillazioni periodiche del segnale vengono chiamate *flowmotion*: esse variano da soggetto a soggetto, e rispecchiano la condizione locale di perfusione cutanea.

La letteratura scientifica suggerisce di ricercare, all'interno del segnale, contributi di attività fisiologiche diverse in diverse bande di frequenze. In particolare, l'attività endoteliale risulta compresa tra 0.007-0.02  $Hz$ , l'attività neurogena tra 0.02-0.06  $Hz$ , l'attività miogena tra 0.06-0.2  $Hz$ , l'attività respiratoria tra 0.2-0.6  $Hz$ , ed infine l'attività cardiaca tra 0.6-1.8  $Hz$  (vedi Tab. 1.1).

La presente tesi ha avuto come obiettivo la valutazione dei segnali LDF acquisiti sia su soggetti sani che su pazienti affetti da forme più o meno gravi di arteriopatia periferica (PAD). In alcuni casi si è confrontata la condizione microcircolatoria prima e dopo rivascolarizzazione, in altri casi prima e dopo l'induzione di ischemia.

Allo scopo di identificare i contributi delle diverse bande di frequenze, è stato implementato uno specifico algoritmo per applicare la trasformata *wavelet* al segnale LDF, che lo converte adeguatamente dal dominio del tempo al dominio della frequenza e che quantifica il contenuto di ciascuna banda.

I risultati confermano che l'analisi del segnale LDF eseguita con metodica *wavelet* sia sicuramente più interessante e approfondita rispetto ad altre metodiche di analisi dello spettro, come la FFT. Il programma implementato è stato infatti pensato per adattarsi al meglio alle caratteristiche del segnale da analizzare, sia in termini di frequenze che di necessità di riduzione degli artefatti.

Grazie alla scelta della scala, ogni campione dello spettro deriva da un calcolo del coefficiente WT effettuato utilizzando la finestra di lunghezza più appropriata per ogni frequenza, attuando quindi il miglior compromesso tra risoluzione in frequenza e stazionarietà del segmento analizzato.

La discretizzazione della scala, porta ad ottenere uno spettro i quali campioni risultano equamente distribuiti nel range di frequenze di interesse, ed, in

particolare, in ogni intervallo associato a una specifica attività compare lo stesso numero di campioni.

I dati ottenuti, sia sui soggetti sani che sui pazienti, dimostrano l'efficacia dell'approccio metodologico applicato all'analisi spettrale del segnale LDF. Non solo, ma nei pazienti rivascolarizzati i risultati acquisiti suggeriscono di operare una valutazione critica del risultato delle procedure di rivascolarizzazione; sembra infatti possibile affermare che, al di là della scomparsa del dolore ischemico, le procedure applicate non permettano di ripristinare una condizione microcircolatoria più vicina a quella valutata nei soggetti sani.

In futuro sarà opportuno estendere il metodo di analisi esposto nella presente tesi ad un campione più ampio di soggetti sani e di pazienti, con il proposito di ottenere risultati di maggior significatività statistica. A questo riguardo può essere utile ricordare che tra il Dipartimento di Ingegneria Industriale e l'Unità Operativa Complessa di Angiologia dell'Azienda Ospedaliera di Padova è in atto una collaborazione scientifica per la prosecuzione del presente studio.

## Appendice A

# Codice della *function* **spike\_red**

```
1 % function che identifica e attenua l'ampiezza dei picchi
2 % presenti nel segnale
3
4 % input:
5
6 %     A=segnale
7 %     num= numero del soggetto
8 %     offset= vettore delle soglie
9
10 % output:
11 %     Asogliata=segnale con picchi attenuati
12 %     a=polinomiale che approssima il segnale (per
13 %     le immagini)
14
15 function [Asogliata a]=spike_red(A, numero,offset)
16
17 L=max(size(A));
18 x=1:1:L;
19 coef_pol=polyfit(x',A,20);
20 pol=polyval(coef_pol,x);
21 a=pol';
22 soglia_up=pol+offset(1,numero);
23 soglia_down=pol-offset(1,numero);
24 Asogliata=(zeros(size(A)));
25
26 C=1; %           si posiziona nel primo campione
27 while C<L+1 %   finchè non è finito il segnale
28     vet=[];
29
30     if A(C)>=soglia_up(C) %   se il valore in C supera la soglia
31
32         vet=[]; %           inizializza i vettori
33             vet_sx=[];
34             vet_dx=[];
```

```

35         c=0; %                inizia il conto degli outers
36
37     while A(C+c) >=soglia_up(C+c) && C+c<L %
38         c=c+1; %                incrementa il contatore se sopra soglia
39         vet(c)=A(C+c-1); %
40     end % o è finito il segnale o si è rientrati nella soglia
41
42     k=C-1;
43     i=1;
44
45     while k>1 && A(k)- A(k-1)>=0 && A(k)>soglia_down(k) %
46         vet_sx(i)=A(k); %     estendi la selezione alla parte
47         i=i+1; %                crescente del picco, entro soglia
48         k=k-1;
49     end
50
51     vet_sx=fliplr(vet_sx);
52     k=C+length(vet);
53     i=1;
54
55     while k<length(A) && A(k)-A(k+1)>=0 && A(k)>soglia_down(k)
56         vet_dx(i)=A(k); %     estendi la selezione alla parte
57         i=i+1; %                decrescente del picco, entro soglia
58         k=k+1;
59     end
60
61     [M I]=max(vet);
62     %trova coef che ridimensiona il picco
63     coef=offset(1,numero)/(M-pol(C+I-1));
64
65     for j=1:max(size(vet)) %     moltiplica vet per coef
66         Asogliata(C+j-1)=pol(C+j-1) + (A(C+j-1)-pol(C+j-1))*coef;
67     end
68
69     for j=1:max(size(vet_sx)) %     moltiplica vet_sx per coef
70         Asogliata(C+j-1-length(vet_sx))=pol(C+j-1-
71         length(vet_sx)) + (A(C+j-1-length(vet_sx))-pol(C+j-1-
72         length(vet_sx)))*coef;
73     end
74
75     for j=1:max(size(vet_dx))+1 %     moltiplica vet_dx per coef
76         Asogliata(C+j-1+length(vet))=pol(C+j-1+length(vet)) +
77         (A(C+j-1+length(vet))-pol(C+j-1+length(vet)))*coef;
78     end
79
80     elseif A(C)<=soglia_down(C) %     Analogo al precedente,
81     %     ma per outers sotto la soglia minima
82         vet=[];
83         vet_sx=[];
84         vet_dx=[];
85         c=0;
86
87         while A(C+c) <=soglia_down(C+c)

```

```

88         if C+c<L
89             c=c+1;
90             vet(c)=A(C+c-1);
91         elseif C+c==L
92             c=c+1;
93             vet(c)=A(C+c-1);
94             break
95         else
96             break
97         end
98     end
99
100     k=C-1;
101     i=1;
102
103     while k>1 && A(k)- A(k-1)<=0 && A(k)<soglia_up(k)
104         vet_sx(i)=A(k);
105         i=i+1;
106         k=k-1;
107     end
108
109     vet_sx=fliplr(vet_sx);
110     k=C+length(vet);
111     i=1;
112
113     while k<length(A) && A(k)-A(k+1)<=0 && A(k)<soglia_up(k)
114         vet_dx(i)=A(k);
115         i=i+1;
116         k=k+1;
117     end
118
119     [m I]=min(vet) ;
120     coef=offset(1,numero)/(pol(I+C-1)-m);
121
122     for j=1:max(size(vet))
123         Asogliata(C+j-1)=pol(C+j-1)-(-A(C+j-1)+pol(C+j-1))*coef;
124     end
125
126     for j=1:max(size(vet_sx))
127         Asogliata(C+j-1-length(vet_sx))=pol(C+j-1-
128 length(vet_sx)) - (-A(C+j-1-length(vet_sx))+pol(C+j-1-
129 length(vet_sx)))*coef;
130     end
131
132     for j=1:max(size(vet_dx))
133         Asogliata(C+j-1+length(vet))=pol(C+j-1+length(vet)) -
134 (-A(C+j-1+length(vet))+pol(C+j-1+length(vet)))*coef;
135     end
136
137 else
138     Asogliata(C)=A(C); % valore entro soglia
139 end
140

```

```
141         if size(vet)==0      %se non ha trovato outliers, incrementa C di 1
142             C=C+1;
143     else
144         C=C+length(vet)+length(vet_dx); %se ha trovato outliers,
145         %             incrementa C del vettore sostituito
146     end
147
148 end
```



## Appendice B

# Codice del programma principale

```
1
2 clc
3 close all
4 clear all
5
6 % categorie di pazienti (per operazione)
7 %b=bypass e=endoarteriectomia p=profundoplastica
8
9 b= [1 11 12 15]; e= [3 6 7 9 10 14 16]; p=[2 4 5 13];
10
11 %scelta della tipologia di soggetti
12 tipo= input('che tipo di soggetti si vogliono caricare?\n (RIVASC POHR)\n', 's');
13
14 %indicazione del sottoinsieme di pazienti
15 a=input('sottoinsieme di pazienti?');
16
17 %RIVASCOLARIZZAZIONE
18 if strcmp(tipo,'RIVASC')
19
20 %caricamento dei dati
21
22     [A1r, A2r, A3r, A4r, A5r, A6r, A7r, A8r, A9r, A10r, A11r,A12r, A13r, A14r,
23     A15r, A16r, P1r, P2r, P3r, P4r, P5r, P6r, P7r, P8r, P9r, P10r, P11r, P12r,
24     P13r, P14r, P15r, P16r]=carica(dati_excel);
25
26     offset=[8 2 22 5 10 10 17 7 5 5 4 7 2 10 10 11;
27             10 4 8 5 10 10 3 5 3 24 10 7 7 16 5 22];
28
29 %PORH
30 elseif strcmp(tipo,'POHR')
31
32 %caricamento dei dati
33     [A1r, A2r, A3r, A4r, A5r, P1r, P2r, P3r, P4r, P5r]=
34     carica(dati_excel);
35     offset=[12 100 100 100 6;
36             4 100 100 100 100];
37 end
```

```

38
39 z=length(a);
40
41 % riduzione dei picchi
42 for i=1:tot
43     eval(['[A' num2str(i) ', a' num2str(i) ']=
44           spike_red(A' num2str(i) 'r(:,1), i, offset(1,:)); '])
45     eval(['[P' num2str(i) ', p' num2str(i) ']=
46           spike_red( P' num2str(i) 'r(:,1), i, offset(2,:)); '])
47 end
48
49 % determinazione della scala
50 freq_min=0.007;
51 freq_max=1.8;
52 maxex=100;
53 f_s=scal2frq(1, 'morl', 1/16);
54 f_w=16*f_s/1;
55 scala_min=f_w/freq_min/16;
56 scala_max=f_w/freq_max/16;
57
58 % discretizzazione della scala
59 scala=zeros(1,maxex);
60 exp_max=log(scala_max)/log(scala_min);
61 deltaexpo=exp_max-1;
62
63 for i=1:maxex
64     scala(i)=sc_m^(1+deltaexpo*(i-1)/(maxex-1));
65 end
66 scala=fliplr(scala);
67
68 % frequenze corrispondenti
69
70 type='morl';
71 freq=scal2frq(scala,type,1/16);
72
73 % inizializzazione matrici
74 A_AA=zeros(z,maxex);
75 A_AR=zeros(z,maxex);
76 P_AA=zeros(z,maxex);
77 P_AR=zeros(z,maxex);
78 A_AM=zeros(z,1);
79 P_AM=zeros(z,1);
80
81 % operazioni sui pre
82 k=1;
83 for i=a
84     eval(['A=A' num2str(i) '(:,1);']);
85     % calcolo dei coefficienti wavelet
86     eval(['A' num2str(i) 'coefs = cwt(A-mean(A), scala,type);']);
87     % calcolo dello scalogramma
88     for j=1:maxex
89         eval(['A' num2str(i) 'coefs_norm(j,:)=
90               A' num2str(i) 'coefs(j,:)./scala(j).^0.5;'])

```

```

91     end
92     eval(['A' num2str(i) 'scal=A' num2str(i) 'coefs_norm.^2;'])
93     % Ampiezze Assolute
94     eval(['A_AA(k,:)=mean(abs(A' num2str(i) 'scal),2);'])
95     % Ampiezze Medie
96     A_AM(k)=mean(A_AA(k,:));
97     % Ampiezze Relative
98     A_AR(k,:)=A_AA(k,:)/A_AM(k);
99     k=k+1;
100 end
101
102 % operazioni sui post
103     k=1;
104 for i=a
105     eval(['P=P' num2str(i) '(:,1);']);
106     % calcolo dei coefficienti wavelet
107     eval(['P' num2str(i) 'coefs = cwt(P-mean(P), scala,type);']);
108     % calcolo dello scalogramma
109     for j=1:maxex
110         eval(['P' num2str(i) 'coefs_norm(j,:)=
111             P' num2str(i) 'coefs(j,:)./scala(j).^0.5;'])
112     end
113     eval(['P' num2str(i) 'scal=P' num2str(i) 'coefs_norm.^2;'])
114     % Ampiezze Assolute
115     eval(['P_AA(k,:)=mean(abs(P' num2str(i) 'scal),2);'])
116     % Ampiezze Medie
117     P_AM(k)=mean(P_AA(k,:));
118     % Ampiezze Relative
119     P_AR(k,:)=P_AA(k,:)/P_AM(k);
120     k=k+1;
121 end
122
123
124 % valori medi delle Ampiezze per ogni intervallo
125 A_AAi=zeros(z,5);
126 A_ARi=zeros(z,5);
127 P_AAi=zeros(z,5);
128 P_ARi=zeros(z,5);
129
130 for i=1:z
131     for j=1:5
132         A_AAi(i,j)=mean(A_AA(i,20*(j-1)+1:20*j));
133         A_ARi(i,j)=mean(A_AR(i,20*(j-1)+1:20*j));
134         P_AAi(i,j)=mean(P_AA(i,20*(j-1)+1:20*j));
135         P_ARi(i,j)=mean(P_AR(i,20*(j-1)+1:20*j));
136     end
137 end
138
139 % mediane e delle variazioni pre-post
140 A_AA_mediane=zeros(1,5);
141 A_AR_mediane=zeros(1,5);
142 P_AR_mediane=zeros(1,5);
143 P_AA_mediane=zeros(1,5);

```

```
144 AAi_variazione=zeros(1,5);
145 ARi_variazione=zeros(1,5);
146 for i=1:5
147     A_AA_mediane(i)=median(A_AAi(:,i));
148     A_AR_mediane(i)=median(A_ARi(:,i));
149     P_AR_mediane(i)=median(P_ARi(:,i));
150     P_AA_mediane(i)=median(P_AAi(:,i));
151     AAi_variazione(i)=(P_AR_mediane(i)-A_AR_mediane(i))./A_AR_mediane(i)*100;
152     ARi_variazione(i)=(P_AA_mediane(i)-A_AA_mediane(i))./A_AA_mediane(i)*100;
153 end
154
155 %valori del Wilcoxon test
156 Wilc_AR=zeros(1,5);
157 Wilc_AA=zeros(1,5);
158 for i=1:5
159     Wilc_AR(1,i)=ranksum(A_ARi(:,i), P_ARi(:,i));
160     Wilc_AA(1,i)=ranksum(A_AAi(:,i), P_AAi(:,i));
161 end
162
163 %fogli di testo riassuntivi
164 foglio_risultati_AA();
165 foglio_risultati_AR();
166
167 %figure
168 crea_figure();
```

# Bibliografia

- [1] M. Intaglietta, "Vasomotion and flowmotion: physiological mechanisms and clinical evidence," *Vasc Med*, 1990, 101.
- [2] W. F. Ganong, *Review of medical physiology*. McGraw Hill, 22th ed., May 2001.
- [3] E. Merrill, "Rheology of blood," *Physiological Review*, 1969, 49-4.
- [4] M. Intaglietta and J. Gross, "Time dependent rheological properties in capillaries due to arteriolar vasomotor activity," *Microcirculation*, 1981, 1: 161-72.
- [5] 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.
- [6] E. F. Shih and S. L. Jen, "A video system for measuring the blood flow velocity in microvessels," *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 1978, BME-25: 295 - 297.
- [7] 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.
- [8] U. Hoffmann, E. Schneider, and A. Bollinger, "Flow motion waves with high and low frequency in severe ischaemia before and after percutaneous transluminal angioplasty," *Cardiovasc Res.*, 1990, 24: 711-8.
- [9] M. Bracic and A. Stefanovska, "Wavelet-based analysis of human blood-flow dynamics," *Bulletin of Mathematical Biology*, 1998, 60: 919-935.
- [10] A. Stefanovska and P. Kroelj, "Correlation integral and frequency analysis of cardiovascular functions," *Open Systems and Information Dynamics archive*, 1997, 4.
- [11] 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.
- [12] 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: 1230-39.
- [13] J. K. Li, *Dynamics of the Vascular System*. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., Feb 2004.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] C. M. Choi and R. G. Bennett, "Laser dopplers to determine cutaneous blood flow," *Dermatol Surg*, 2003, 29.
- [18] D. Halliday, R. Resnick, and K. S. Kraner, *Fisica 2*. CEA, 3 ed., Jun 2004.
- [19] H. Albrecht, N. Damaschke, M. Borys, and C. Tropea, *Laser Doppler and Phase Doppler Measurement Techniques*. Springer-Verlag, 1 ed., Dec 2002.
- [20] J. G. Webster, *Medical Instrumentation. Application and Design*. John Wiley and Sons, Inc, 5 ed., Dec 2010.
- [21] S. Sarnik, I. Hofirek, and O. Sochor, "Laser doppler fluxmetry," *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 2007, 151(1):143-146.
- [22] G. Cariolaro, G. Pierobon, and G. Calvagno, *Segnali e sistemi*. McGraw-Hill, Gen 2005.
- [23] S. Qian and D. Chen, *Joint Time-Frequency Analysis, Methods and Applications*. Academic Press, Dec 2011.
- [24] S. Mallat, *A wavelet tour of signal processing*. Academic Press, 3 ed., Dec 2008.

- [25] S. A. Landsverk, P. Kvandal, T. Kjelstrup, U. Benko, A. Bernjak, A. Stefanovska, H. D. Kvernmo, and K. A. Kirkeboen, "Human skin microcirculation after brachial plexus block evaluated by wavelet transform of the laser doppler flowmetry signal," *Anesthesiology*, 2006, V 105, No 3.
- [26] H. D. Kvernmo, A. Stefanovska, M. Bracic, K. A. Kirkebøen, and K. Kvernebo, "Spectral analysis of the laser doppler perfusion signal in human skin before and after exercise," *Microvascular Research*, 1998, 56: 173–182.
- [27] C. Aalkjær, D. Boedtkjer, and V. Matchkov, "Vasomotion – what is currently thought?," *Acta Physio*, 2011, 202: 253–269.
- [28] A. Stefanovska, "Complex but not complicated cardiovascular and brain interactions," *IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine*, 2007: 25–29.
- [29] 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.
- [30] 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.
- [31] E. Selvin and T. P. Erlinger, "Prevalence of and risk factors for peripheral arterial disease in the united states : Results from the national health and nutrition examination survey, 1999–2000," *Circulation*, 2004, 110:738–743.
- [32] R. Dionigi, *Chirurgia*. Masson, 4 ed., 2006.
- [33] F. Mazzeo, *Trattato di clinica e terapia chirurgica*. Piccin-Nuova Libreria, 2001.
- [34] M. Söderström, E. Arvela, M. Korhonen, and K. Halmesmäki, "Infrapopliteal percutaneous transluminal angioplasty versus bypass surgery as first-line strategies in critical leg ischemia: A propensity score analysis," *Annals of Surgery*, 2010, 252(5):765–773.
- [35] 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.
- [36] A. Colantuoni, S. Bertuglia, and M. Intaglietta, "Quantitation of rhythmic diameter changes in arterial microcirculation," *Am J Physiol*, 1984, 246: H508–17.





# Elenco delle tabelle

1.1	Intervalli di frequenze . . . . .	2
4.1	Configurazione sperimentale dello strumento . . . . .	56
5.1	Risultati sani: <i>Ampiezze Assolute e Medie</i> . . . . .	73
5.2	Risultati sani: <i>Ampiezze Relative</i> . . . . .	73
5.3	Risultati PAD II (PORH): <i>Ampiezze Assolute e Medie</i> . . . . .	80
5.4	Risultati PAD II (PORH): <i>Variazioni Ampiezze Assolute</i> . . . . .	80
5.5	Risultati PAD II (PORH): <i>Ampiezze Relative</i> . . . . .	81
5.6	Risultati PAD II (PORH): <i>Variazioni Ampiezze Relative</i> . . . . .	81
5.7	Risultati PAD III (Rivasc.): <i>Ampiezze Assolute e Medie</i> . . . . .	98
5.8	Risultati PAD III (Rivasc.): <i>Variazioni Ampiezze Assolute</i> . . . . .	98
5.9	Risultati PAD III (Rivasc.): <i>Ampiezze Relative</i> . . . . .	99
5.10	Risultati PAD III (Rivasc.): <i>Variazioni Ampiezze Relative</i> . . . . .	99
5.11	Confronti tra AR: sani e PAD II . . . . .	101
5.12	Confronti tra AR: sani e PAD III . . . . .	102
5.13	Confronti tra AR: sani e PAD III post-riv. . . . .	103



# Elenco delle figure

1.1	Grafico del comportamento quasi newtoniano del sangue . . . . .	4
1.2	Moto laminare e turbolento all'interno di un vaso . . . . .	5
1.3	Schema di un'unità microcolatoria . . . . .	8
1.4	Diagramma delle pareti vascolari . . . . .	9
1.5	Sezioni di capillari . . . . .	10
1.6	Modello di scambio capillare di Starling . . . . .	12
1.7	Rete circolatoria delle ali di pipistrello . . . . .	13
1.8	Immagini di microcapillaroscopia . . . . .	15
1.9	Fotogrammi di <i>vasomotion</i> arteriolare . . . . .	16
1.10	Cellula di tessuto muscolare liscio . . . . .	18
1.11	Schema di innervazione della rete vascolare . . . . .	19
1.12	Schema di attivazione delle cellule endoteliali . . . . .	20
2.1	Vasi raggiunti dal LDF . . . . .	23
2.2	Effetto Doppler acustico . . . . .	24
2.3	Schema di funzionamento del LDF . . . . .	27
3.1	Segnale composto da somma di onde . . . . .	32
3.2	Spettro da FT di un segnale ideale . . . . .	32
3.3	Spettro da FT di un segnale ideale in scala logaritmica . . . . .	33
3.4	Segnale variabile a intervalli . . . . .	35
3.5	Spettro da FT di un segnale variabile ad intervalli . . . . .	35
3.6	STFT e segnale corrispondente . . . . .	37
3.7	STFT, visione 3D . . . . .	37
3.8	<i>Heisenberg box</i> delle STFT e WT . . . . .	39
3.9	Alcune forme di <i>wavelet</i> . . . . .	41
3.10	<i>Heisenberg box</i> e <i>wavelet</i> corrispondenti . . . . .	42
3.11	Corrispondenza scala-frequenza . . . . .	43
3.12	Segnale variabile a tratti e scalogramma . . . . .	44
3.13	Scalogramma in prospettiva . . . . .	44
3.14	Scalogramma mediato . . . . .	45
4.1	Scalogramma 2D di un soggetto sano . . . . .	48

4.2	Percentuali di incidenza della PAD . . . . .	49
4.3	Riapertura del lume tramite endoarterectomia . . . . .	52
4.4	<i>By-pass</i> femoro-popliteo . . . . .	53
4.5	Catetere per PTA con palloncino e <i>stent</i> . . . . .	54
4.6	Riapertura del lume tramite PTA . . . . .	54
4.7	Lo strumento Periflux5000 . . . . .	55
4.8	La sonda Probe 457 . . . . .	55
4.9	Segnale da LDF . . . . .	56
4.10	Artefatto da movimento nel segnale da LDF . . . . .	57
4.11	Segnale originale, funzione polinomiale e valore di soglia . . . . .	60
4.12	Segnale modificato dall' algoritmo <i>spike_red</i> . . . . .	61
4.13	<i>Ampiezze Assolute</i> , <i>Ampiezza Media</i> e <i>Ampiezza Relativa</i> . . . . .	64
4.14	Segnale, scalogramma 3D e 2D . . . . .	65
5.1	Sani: sogg.1 . . . . .	70
5.2	Sani: sogg.2 . . . . .	71
5.3	Sani: sogg.3 . . . . .	72
5.4	Sani: <i>boxplot</i> . . . . .	74
5.5	PAD II (PORH): paz.4 . . . . .	75
5.6	PAD II (PORH): paz.5 . . . . .	76
5.7	PAD II (PORH): paz.6 . . . . .	77
5.8	PAD II (PORH): paz.7 . . . . .	78
5.9	PAD II (PORH): paz.8 . . . . .	79
5.10	PAD II (PORH): <i>boxplot</i> . . . . .	82
5.11	PAD III (Rivasc.): paz.9 . . . . .	83
5.12	PAD III (Rivasc.): paz.10 . . . . .	84
5.13	PAD III (Rivasc.): paz.11 . . . . .	85
5.14	PAD III (Rivasc.): paz.12 . . . . .	86
5.15	PAD III (Rivasc.): paz.13 . . . . .	87
5.16	PAD III (Rivasc.): paz.14 . . . . .	88
5.17	PAD III (Rivasc.): paz.15 . . . . .	89
5.18	PAD III (Rivasc.): paz.16 . . . . .	90
5.19	PAD III (Rivasc.): paz.17 . . . . .	91
5.20	PAD III (Rivasc.): paz.18 . . . . .	92
5.21	PAD III (Rivasc.): paz.19 . . . . .	93
5.22	PAD III (Rivasc.): paz.20 . . . . .	94
5.23	PAD III (Rivasc.): paz.21 . . . . .	95
5.24	PAD III (Rivasc.): paz.22 . . . . .	96
5.25	PAD III (Rivasc.): paz.23 . . . . .	97
5.26	PAD III (Rivasc.): <i>boxplot</i> . . . . .	100
5.27	Confronti tra AR: sani e PAD II . . . . .	101
5.28	Confronti tra AR: sani e PAD III . . . . .	102
5.29	Confronti tra AR: sani e PAD II . . . . .	103

5.30 Confronti tra AR: tutti . . . . .	104
--	-----