



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Scuola di Ingegneria
Dipartimento di Ingegneria dell'Informazione
Dipartimento di Ingegneria Industriale

Corso di Laurea Magistrale in Bioingegneria

Variazioni posturali della perfusione cutanea in pazienti diabetici valutate mediante analisi Wavelet del segnale laser-Doppler

Relatore: Prof. Andrea Bagno

Correlatore: Dott. Romeo Costanzo Martini

Laureanda: Camilla Bonvicini

A.A. 2015/2016

Alla mia famiglia.

Sommario

L'analisi della perfusione cutanea mediante l'acquisizione del segnale di flussimetria laser – Doppler è utile per determinare l'emodinamica del microcircolo. Il segnale acquisito presenta oscillazioni di carattere periodico, dette onde di flowmotion; dall'analisi spettrale di questo segnale è possibile individuare sei intervalli di frequenze associati ad altrettante attività del sistema cardiovascolare: cardiaca, respiratoria, miogena, neurogena, endoteliale dipendente e non dipendente dall'ossido nitrico.

La presente tesi ha avuto come obiettivo la valutazione della variazione del contributo di ciascuna attività nella prova posturale, che prevede il passaggio dell'arto inferiore da clinostatismo a ortostatismo in 17 pazienti diabetici non vasculopatici.

Prima dell'analisi in frequenza, i pazienti sono stati caratterizzati a livello di perfusione cutanea nel tempo e suddivisi sulla base delle diverse patologie.

Nel Capitolo 1 sono illustrati alcuni elementi di fisiologia del sistema cardiovascolare, i concetti di *vasomotion* e *flowmotion* e le possibili complicanze del diabete. Nel Capitolo 2 vengono esposti i principi della flussimetria laser – Doppler. Nel Capitolo 3 vengono richiamate le basi dell'analisi in frequenza e le diverse tipologie di trasformate. Nel Capitolo 4 vengono presentati i pazienti, le caratteristiche dello strumento e del segnale acquisito, le differenti analisi effettuate: nel dominio del tempo e nel dominio della frequenza. Nel Capitolo 5 sono mostrati e discussi i risultati ottenuti. Nel Capitolo 6 vengono tracciate le conclusioni, con qualche spunto per i futuri lavori di ricerca.

Ringraziamenti

Cercare di condensare tutta la gratitudine verso le persone che hanno reso possibile il raggiungimento di questo traguardo è praticamente impossibile, ma voglio fare almeno un tentativo.

Innanzitutto un sentito ringraziamento va al *Prof. Bagno*, per essere stato sempre così disponibile e paziente, per avermi guidata passo passo nella stesura di questa tesi e per tutte le ore che mi ha dedicato: confrontarsi con lui è stato un piacere e uno stimolo continuo.

Grazie al *Dott. Martini*, per il fiume di idee che mi ha proposto durante questi mesi e per il supporto clinico al mio lavoro.

Grazie a tutte le persone che ho conosciuto in questi anni universitari, che sono stati faticosi ma bellissimi: i miei compagni della triennale e i “bioamici” conosciuti alla magistrale. Ognuno di loro mi ha lasciato un pezzettino di sé che porterò sempre nel cuore.

Un grazie speciale a *Carlotta* e *Giulio* per essere stati al mio fianco, negli homework come nei mercoledì sera.

Grazie a tutti i coinquilini che hanno condiviso con me la vita a Padova, perchè dopo delle giornate infinite trovare una piccola famiglia ad aspettarmi mi ha sempre fatta sentire “a casa”. In particolare, grazie ad *Anna* per quest’ultimo anno, per essersi fidata di me e per avermi abbracciata quando ne avevo bisogno.

Grazie a tutte le persone che mi hanno vista crescere e hanno scelto di starmi accanto, a tutti i miei amici e le mie amiche.

Grazie ad *Alessia*, per avermi trasmesso il suo amore per la danza e per avermi sempre fatta sentire “nel posto giusto”, e grazie al mio ballerino *Pietro* che mi ha regalato momenti intensi, divertenti e speciali.

Grazie a *Martina*, la mia “amica 0”, che mi conosce da sempre e che non se ne è mai andata, a cui voglio un bene immenso.

Grazie a *Riccardo*, per avermi regalato il suo cuore e per amarmi con infinita pazienza.

Infine, tutte le parole di questo mondo non basterebbero per esprimere l’immensa gratitudine, la stima e l’amore che provo nei confronti della mia famiglia.

Il grazie più grande va ai miei genitori, a tutto quello che hanno fatto per me e per farmi realizzare i miei sogni, e un grazie speciale al mio “fratellino” *Ettore*, il mio complice cresciuto troppo in fretta, che sarà per sempre la persona più importante.

Indice generale

1. Introduzione	1
1.1 Il sistema cardiovascolare	2
1.2 <i>Vasomotion e flowmotion</i>	4
1.2.1 Attività cardiaca	6
1.2.2 Attività respiratoria	7
1.2.3 Attività miogena	7
1.2.4 Attività neurogena	8
1.2.5 Attività endoteliale	8
1.3 Diabete e complicanze	9
1.3.1 Retinopatia diabetica	10
1.3.2 Nefropatia diabetica	10
1.3.3 Complicanze cardiovascolari	10
1.3.4 Complicanze degli arti inferiori	11
2. La flussimetria laser – Doppler	13
2.1 Effetto Doppler	13
2.1.1 Formulazione matematica	14
2.2 Il flussimetro laser – Doppler	15
2.2.1 Funzionamento del dispositivo	16
2.3 Limiti della flussimetria laser – Doppler	18
3. Analisi in frequenza	21
3.1 La trasformata di Fourier	21
3.1.1 Non idealità dei segnali reali	23
3.1.2 Limiti della trasformata di Fourier	24
3.2 La trasformata di Fourier Short – Time	26
3.2.1 Limiti della trasformata di Fourier Short – Time	27
3.3 La trasformata Wavelet	28
3.3.1 La risoluzione tempo – frequenza	28
3.3.2 L'equazione	29
3.3.3 La mother Wavelet	30
3.3.4 La scala	32
3.3.5 Lo scalogramma	33
3.3.6 Limiti della trasformata Wavelet	35
4. Materiali e metodi	37

4.1 Pazienti	37
4.2 Prova posturale	38
4.3 Acquisizione del segnale	38
4.3.1 Strumento di acquisizione	39
4.3.2 Caratteristiche del segnale	40
4.4 Pre – elaborazione del segnale	41
4.5 Algoritmo per il calcolo della WT	42
4.6 Analisi effettuate	44
4.6.1 Analisi della perfusione nel tempo	44
4.6.2 <i>Odds</i> e <i>odds ratio</i>	45
4.6.3 Analisi multivariata	46
4.6.4 Analisi in frequenza: parametri e t – test	47
4.6.5 PCA	49
5. Risultati e discussione	53
5.1 Perfusione nel tempo	53
5.2 <i>Odds</i> e <i>odds ratio</i>	54
5.3 Analisi multivariata	56
5.3.1 VAR1	57
5.3.2 VAR0	58
5.4 Analisi VAR1 vs VAR0	59
5.4.1 VAR1	59
5.4.2 VAR0	61
5.4.3 Commento ai risultati	62
5.5 Analisi delle patologie nel gruppo VAR1	62
5.5.1 Coronaropatia: CHD1 vs CHD0	62
5.5.2 Infarto: IMA1 vs IMA0	64
5.5.3 Angina: ANGINA1 vs ANGINA0	66
5.5.4 Retinopatia: RETINOPATIA1 vs RETINOPATIA0	68
5.5.5 Nefropatia: AER1 vs AER0	70
5.5.6 Commento ai risultati	72
5.6 Confronto per bande	72
5.6.1 Commento ai risultati	74
5.7 PCA	75
6. Conclusioni	79

Appendice A	83
Appendice B	105
Bibliografia	113

1. Introduzione

In questo elaborato si è analizzato il segnale di perfusione cutanea di pazienti diabetici non vasculopatici acquisito tramite flussimetria Laser Doppler (Laser Doppler Fluxmetry, LDF). Grazie a tale strumento è possibile registrare nel tempo la perfusione del microcircolo cutaneo in PU (unità arbitrarie di perfusione). In particolare, i pazienti sono stati sottoposti ad una prova di tipo posturale, con la sonda LD posizionata sul dorso del piede. Il segnale LD così acquisito presenta un andamento oscillatorio nel tempo, che dipende dalla concomitanza di diverse attività del sistema cardiovascolare sia a livello sistemico che locale; tale andamento è soggetto quindi ad una notevole variabilità intra- ed inter-soggettiva.

Le oscillazioni sono dovute ad un unico evento meccanico che consiste nella contrazione e nel rilassamento dei microvasi cutanei, le cui pareti sono costituite nello strato centrale da cellule muscolari lisce. Tale movimento, denominato *vasomotion*, è ciò che permette il mantenimento di un'adeguata perfusione dei tessuti, ed è controllato da meccanismi che agiscono sui microvasi determinando un processo di autoregolazione della perfusione tissutale, variabile a seconda delle caratteristiche metaboliche [1].

Il segnale è stato valutato in post processing calcolando i parametri relativi al flusso sanguigno misurato nel tempo: Resting Flux (RF), Standing Flux (SF) e variazione percentuale tra SF e RF. Tale analisi è stata utile per la successiva suddivisione dei pazienti in gruppi.

Oltre al dominio del tempo, il segnale è stato analizzato anche nel dominio della frequenza; ciò è stato possibile utilizzando la trasformata Wavelet (WT), che è in grado di fornire lo spettro in frequenza del segnale originale. All'interno di esso è possibile identificare sei bande di frequenza (FB) caratteristiche, legate ad attività di specifiche strutture del sistema cardiovascolare. Tali intervalli sono compresi tra 0.005 e 2 Hz. In particolare, si ha la seguente suddivisione:

- banda **endoteliale NO indipendente** (0.005-0.0095 Hz)
- banda **endoteliale NO dipendente** (0.0095-0.021 Hz)
- banda **neurogena**, relativa al sistema nervoso autonomo simpatico locale (0.021- 0.052 Hz)
- banda **miogena** (0.052-0.145 Hz)
- banda del sistema nervoso autonomo relativo all'attività **respiratoria** (0.145-0.6 Hz)
- banda **cardiaca** (0.6-2 Hz)

Per confrontare i risultati della WT nelle varie bande e nei diversi pazienti sono stati introdotti dei parametri di più facile osservazione, quali Ampiezza e Potenza Assolute e Ampiezza e Potenza

Relative, ottenendo le prime tramite operazioni di media temporale e le seconde mediante normalizzazione. Su tali parametri sono state eseguite analisi di tipo statistico.

L'attenzione è stata rivolta in particolare allo studio della vasocostrizione ortostatica e ad eventuali effetti di patologie cardiache o locali sul microcircolo, e quindi sulla perfusione cutanea.

1.1 Il sistema cardiovascolare

Il sistema cardiovascolare provvede al trasporto e della distribuzione del sangue nei vari organi e tessuti del corpo umano, oltre al trasporto dell'ossigeno e alla rimozione dei prodotti terminali del metabolismo. Inoltre, provvede alla difesa immunitaria, alla termoregolazione, all'idratazione dei tessuti e alla nutrizione degli organi [2]. Tale sistema è composto da una pompa (il cuore) e da condotti di trasporto, distribuzione e scambio, i vasi sanguigni, che sono distinti in arterie, vene e capillari (Figura 1.1).

Il cuore è costituito soprattutto da tessuto muscolare, le cui fibre presentano una distribuzione verticale, obliqua e in misura minore trasversale: tale disposizione assicura la sequenza e la sincronicità della contrazione delle varie strutture, prima i due atri e poi i due ventricoli. Grazie a tali cavità, il cuore riesce a raccogliere ed espellere il sangue in modo modulare: ogni atrio comunica soltanto con il ventricolo sottostante attraverso un orifizio controllato da una valvola, mentre non esistono comunicazioni tra il cuore destro e il cuore sinistro.

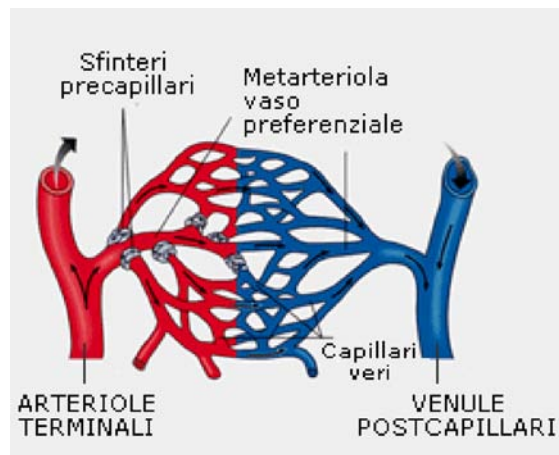


Figura 1.1 - Schema della microcircolazione: arteriole, venule, metarteriole e capillari. Le frecce indicano la direzione del flusso sanguigno.

Si può dire quindi che il sangue si muove attraverso due sistemi circolatori disposti in serie: l'intero sistema cardiovascolare può essere suddiviso in due circuiti, la circolazione polmonare e la circolazione sistemica [3].

Oltre a queste strutture, nella funzione del sistema cardiovascolare sono coinvolti il sistema linfatico, che provvede al trasporto dei liquidi interstiziali, e il sistema nervoso autonomo, che partecipa assieme al sistema endocrino al mantenimento del tono vascolare e quindi della perfusione dei vari organi.

Le arterie presentano tipicamente una struttura trilaminare (Figura 1.2). La *tonaca intima* è lo strato a contatto con il sangue, ed è costituita da un monostrato di cellule endoteliali che proseguono in quelle dei capillari. Lo strato intermedio, o *tonaca media*, è costituito da strati di cellule muscolari lisce, il cui ruolo principale è quello di mantenere il tono vascolare. Attraverso il controllo neuroendocrino ed endoteliale, le cellule muscolari della tonaca media vanno incontro a contrazione e rilassamento. Lo strato esterno, l'*avventizia*, consiste in una matrice extracellulare più lassa, in cui sono occasionalmente presenti fibroblasti, mastociti e terminazioni nervose. Tale strato ha una funzione prettamente protettiva [4].

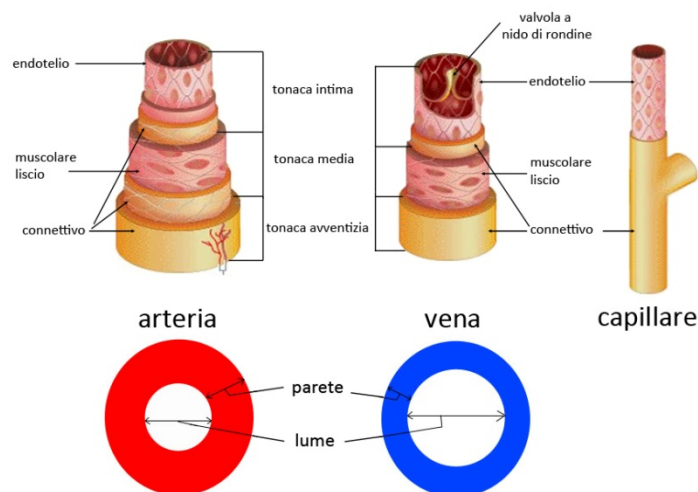


Figura 1.2 - Struttura dei vasi sanguigni: si noti il diverso spessore e la suddivisione in tonache delle pareti vascolari.

Il passaggio tra le piccole arterie e i capillari avviene attraverso delle strutture intermedie denominate arteriole. Le arteriole definiscono l'inizio della cosiddetta microcircolazione, con cui ci si riferisce alle strutture vascolari che sono al di là delle piccole arterie e cioè arteriole, capillari e venule. Fanno parte del sistema microcircolatorio i capillari linfatici, le fibre terminali del sistema nervoso autonomo, le cellule ematiche, la matrice interstiziale e le cellule degli organi perfusi. Le arteriole, il cui diametro varia tra circa 5 e 100 μm , presentano uno strato endoteliale, sino a tre strati di cellule muscolari lisce e uno strato avventiziale. Il tono delle arteriole muscolare regola la pressione e il flusso del sangue attraverso i vari letti arteriosi. Man mano che si prosegue verso i capillari le cellule muscolari lisce riducono i loro strati sino ad arrivare ad un singolo strato discontinuo (le metarteriole).

Al di là delle metarteriole si ritrovano i capillari, strutture molto semplici costituite da un monostrato di cellule endoteliali strettamente sovrapposte ai periciti, elementi simili a cellule muscolari lisce presenti lungo le pareti capillari.

Le venule rappresentano la via di uscita del sangue dalla microcircolazione. Come le arteriole, anch'esse sono formate da tre tonache (intima, media ed avventizia) e man mano che si procede dai capillari verso le piccole vene, le venule presentano un numero di strati di cellule muscolari lisce crescente. Dai capillari si originano quindi le metavenule, aventi cellule muscolari lisce monostrato frammentato; gli strati di cellule muscolari lisce aumentano via via di spessore, passando da piccole vene per arrivare, procedendo verso il cuore, a medie e grandi vene. Le vene hanno una struttura simile alle arterie, presentando però una minor quantità di cellule muscolari lisce e di fibre elastiche, di diametro più grande (Figura 1.3).

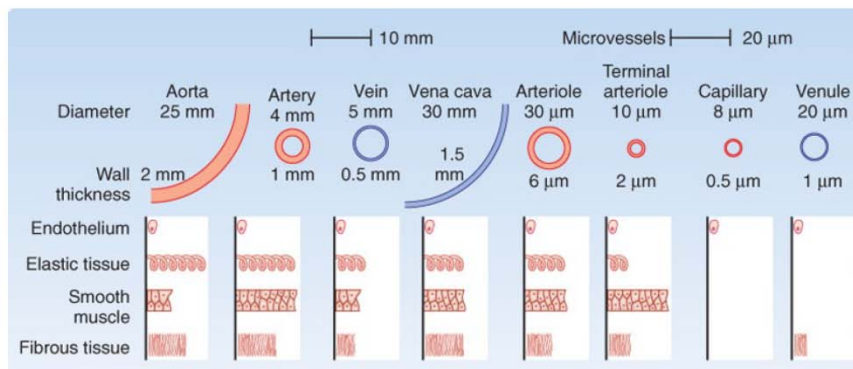


Figura 1.3 - Caratteristiche morfologiche delle strutture vascolari sistemiche: diametro, spessore delle pareti e delle varie tonache costituenti la parete. Le sezioni trasversali dei vasi non sono riportate in scala a causa del notevole divario tra le dimensioni dell'aorta e delle vene cave e quelle dei capillari.

Oltre alla emodinamica microcircolatoria, i microvasi provvedono alle funzioni di filtrazione e riassorbimento. Tale funzione si esplica particolarmente nei capillari e nel tratto iniziale delle venule. La filtrazione e il riassorbimento dei liquidi e delle sostanze nutritive viene regolato attraverso un complesso sistema di equilibrio tra pressione idrostatica e pressione oncologica/osmotica dei tessuti. La pressione idrostatica è maggiore all'inizio dei capillari e minore alla fine delle venule, contrariamente quella osmotico/oncologica.

1.2 Vasomotion e flowmotion

La presenza di cellule muscolari lisce nella parete vascolare e la loro abilità intrinseca di depolarizzarsi periodicamente e autonomamente fanno sì che ci sia una variazione periodica del calibro dei vasi a prescindere dalla frequenza cardiaca. In altre parole, i vasi sanguigni hanno la capacità di contrarsi e rilassarsi e tale evento meccanico prende il nome di *vasomotion*. Nel

microcircolo essa è controllata dalla dinamica dei canali ionici; è un'attività spontanea e ha portato all'ipotesi che le cellule muscolari lisce svolgano un'attività simile a quella delle cellule pacemaker nel cuore. Fenomeni di variazione della pressione ematica all'interno del vaso sono in grado di variare l'attività delle cellule muscolari lisce, soggette anche a un controllo di tipo neuro-endocrino-sistemico. Infatti, ormoni deputati all'incremento della pressione stimolano il contrarsi delle cellule muscolari lisce (ad esempio l'angiotensina II), mentre nel momento in cui si ha un aumento eccessivo del volume ematico il miocardio produce il peptide natriuretico atriale, che provoca il rilassamento delle cellule muscolari lisce [5].

La stimolazione delle cellule muscolari delle pareti del tessuto arteriolare dipende anche dalla concentrazione di ossigeno e anidride carbonica nel sangue: infatti, diminuzioni di ossigeno e di pH inducono vasodilatazione.

L'attività di vasomotion diventa progressivamente più veloce e più ampia al diminuire del diametro del vaso: nella maggior parte dei tessuti questo fenomeno è caratteristica peculiare delle arteriole (Figura 1.4), in cui la frequenza è 10-25 cpm e l'ampiezza può arrivare al 100% del diametro medio [1].

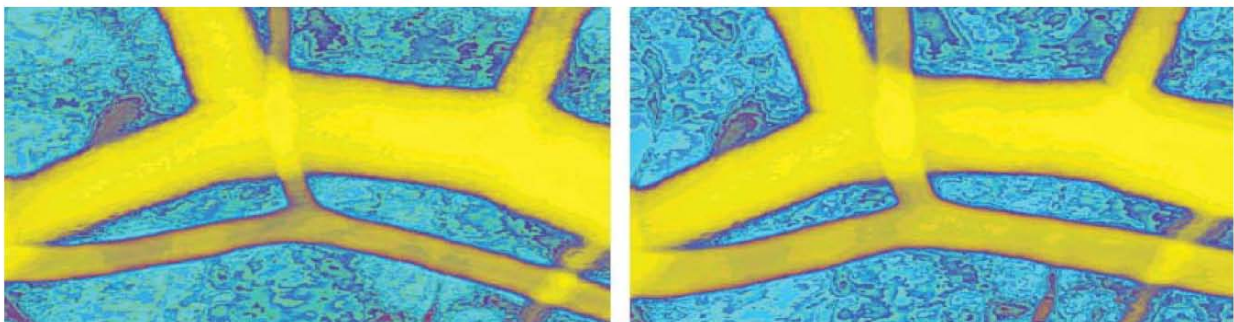


Figura 1.4 - Esempio di vasomotion: a sinistra arteriola di calibro normale, a destra arteriola di calibro aumentato.

La funzione principale del meccanismo di apertura e chiusura del lume vascolare è quella di garantire che la differenza tra pressione arteriosa e venosa attraverso la microcircolazione sia sufficiente per mantenere un flusso sanguigno adeguato per soddisfare le richieste metaboliche attraverso la rete microvascolare. Quindi il mantenimento di una perfusione adeguata a livello dei tessuti è dato da meccanismi di controllo specifici dei microvasi. Questi ultimi permettono che la pressione impressa al sangue dal cuore sia distribuita in modo tale che la pressione capillare superi quella colloidale-osmotica del plasma per consentire uno scambio bilanciato di fluidi tra sangue e tessuto.

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 in grado di propagare il fenomeno di vasomotion a tutto il vaso (Figura 1.5). Inoltre, la contrazione meccanica di una cellula induce anche le cellule adiacenti alla contrazione grazie ad un accoppiamento di tipo meccanico.

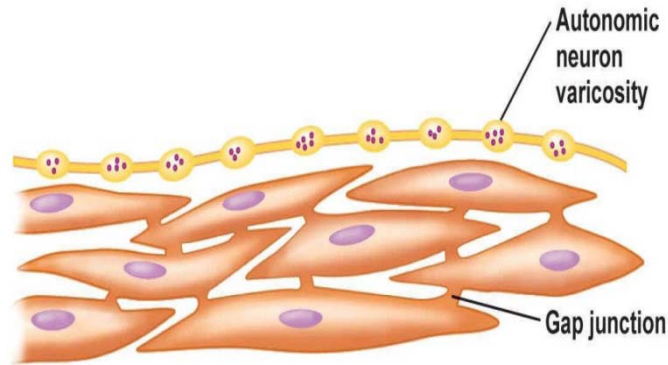


Figura 1.5 - Esempio di tessuto muscolare liscio; cellule vicine sono collegate tra loro mediante gap junction.

La vasomotion provoca una variazione ciclica del flusso sanguigno nei microvasi, che assume un andamento oscillatorio: tale fenomeno è noto con il termine *flowmotion*, e può essere studiato in maniera non invasiva con la flussimetria LD. Analizzando lo spettro in frequenza è possibile descrivere l'attività delle sei diverse *frequency band* (FB), come già descritto in precedenza. In questo modo, si possono analizzare le singole attività coinvolte nel controllo della vasomotion e della flowmotion.

1.2.1 Attività cardiaca

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

L'attività cardiaca è proprio dovuta a questa azione di spinta del cuore, ed è espressione del *cardiac stroke volume*, il "colpo" che la pompa cardiaca imprime alla colonna ematica attraverso i vasi sanguigni. Affinché l'energia cinetica non venga dissipata prima che il sangue abbia raggiunto tutti i distretti corporei, i muscoli delle arterie sono portati a contrarsi in maniera sincrona con il battito cardiaco grazie a collegamenti nervosi. In questo modo la spinta viene propagata, e con essa il sangue, fino ai vasi più sottili che compongono la rete microcircolatoria.

L'attività cardiaca è l'espressione di attività estrinseca alla microcircolazione ma testimonia che il sistema cardiovascolare funziona in maniera unitaria, e che periferia e centro sono in stretta correlazione.

Le oscillazioni del segnale LD associate all'attività cardiaca hanno frequenze comprese tra 0.6 e 2 Hz [6].

1.2.2 *Attività respiratoria*

La respirazione svolge un ruolo fondamentale nella circolazione, poiché con l'atto dell'inspirazione viene impartita una pressione che richiama il sangue attraverso la rete venosa dalla periferia verso il centro. L'attività respiratoria è quindi coinvolta nel ritorno cardiaco e determina il riempimento atriale. Nell'atrio destro sono presenti dei barorecettori che, in relazione al modo in cui vengono stimolati, determinano un aumento o una riduzione della resistenza periferica arteriolare, consentendo di mantenere una pressione sistemica adeguata alle esigenze dell'organismo. Le oscillazioni dovute alla respirazione risentono anche di un contributo nervoso, poiché durante l'inspirazione segnali simpatici inducono la vasocostrizione, aumentando la resistenza periferica e facilitando il ritorno del sangue al cuore. La FB relativa alla frequenza respiratoria identificata dall'analisi Wavelet è quindi espressione del sistema nervoso simpatico di tipo sistemico e anch'essa, come la attività cardiaca, è una attività di controllo della flowmotion di tipo estrinseco.

Le oscillazioni del segnale LD legate all'attività respiratoria hanno una frequenza contenuta nell'intervallo 0.145-0.6 Hz [7].

1.2.3 *Attività miogena*

La maggior parte dei letti vascolari ha la capacità intrinseca di compensare moderati cambiamenti nella pressione di perfusione con piccole variazioni di resistenza vascolare, permettendo che il flusso del sangue rimanga relativamente costante. Tale capacità è dovuta alla risposta contrattile spontanea all'allungamento q delle cellule muscolari lisce, dovuto a sua volta alla tensione normale σ che il flusso ematico esercita sulla parete del vaso. La relazione tra queste due variabili è regolata dalla legge di Hook:

$$\sigma = E \cdot q$$

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

Il riflesso miogeno è anche regolato dalla legge di Laplace, secondo cui la tensione T nella parete è proporzionale al prodotto della pressione idraulica del sangue per il raggio del vaso, con coefficiente di proporzionalità k che dipende dalla forma del condotto:

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

All'aumentare della pressione, affinché sia mantenuta una determinata tensione parietale si deve avere una riduzione del raggio. Ciò conferma l'evidenza sperimentale secondo la quale a pressioni più elevate si verifica un maggior grado di contrazione.

Le oscillazioni del segnale LD legate all'attività miogena hanno frequenza comprese tra 0.052 e 0.145 Hz [8].

1.2.4 Attività neurogena

Il sistema nervoso autonomo ha la capacità di esercitare stimolazioni in relazione a stimoli chimici, fisici e metabolici esclusivamente a livello locale. Diversamente da quelli somatici, i nervi del sistema simpatico esercitano un controllo di tipo continuativo: le cellule muscolari delle pareti vascolari sono infatti ritmicamente sollecitate ed indotte a rilassamento o contrazione a seconda degli ordini provenienti dal sistema nervoso involontario. Ad esempio, la necessità di regolazione della temperatura corporea può avvenire tramite questo meccanismo, che conduce a cambiamenti nella vasomotilità dei microvasi e conseguente vasocostrizione o vasodilatazione periferica: i trasmettitori raggiungono lo strato più interno del vaso tramite diffusione, e la corrente si diffonde da una cellula muscolare all'altra grazie alle gap junction.

Le oscillazioni del segnale LD legate all'attività neurogena hanno una frequenza compresa tra 0.021 e 0.052 Hz [9].

1.2.5 Attività endoteliale

Le cellule del rivestimento più interno dei vasi, cioè quello endoteliale, giocano un ruolo fondamentale nella vasodilatazione. Attraverso l'analisi Wavelet sono state individuate almeno due FB riferibili all'attività endoteliale, una che riguarda l'attività ossido nitrico (NO) dipendente e una riferibile alla attività NO indipendente.

Lo sforzo tensivo σ (che produce lo stiramento delle pareti vascolari), e lo sforzo di taglio τ (dovuto all'attrito con il flusso ematico), attivano questo strato di cellule, promuovendo la sintesi e la liberazione di mediatori vasoattivi come l'ossido nitrico, la cui produzione è favorita oltre che da stimoli meccanici anche da segnali neurotrasmettitori come l'acetilcolina [8].

L'NO che si forma nell'endotelio diffonde attraverso le cellule muscolari lisce, determinandone il rilassamento e quindi un aumento del calibro arteriolare e quindi un incremento della perfusione. L'NO è inattivato dall'emoglobina, al fine di interrompere la vasodilatazione quando il livello di perfusione risulta sufficientemente elevato. La vasodilatazione non NO mediata si esplica attraverso stimoli endoteliali che non interagiscono con il meccanismo sopra descritto, ma attraverso la produzione di AMP ciclico che direttamente agisce sulle cellule muscolari lisce.

Le oscillazioni del segnale LD legate all'attività endoteliale hanno una frequenza compresa tra 0.005 e 0.021 Hz: in particolare, l'attività endoteliale NO indipendente è compresa tra 0.005 e 0.0095 Hz, mentre l'attività NO dipendente è compresa tra 0.0095 e 0.021 Hz [10].

1.3 Diabete e complicanze ¹

Secondo la definizione dell'Organizzazione Mondiale della Sanità, il diabete mellito comprende un gruppo di disordini metabolici di diversa eziologia, che influenza il metabolismo glucidico, lipidico e proteico ed è caratterizzato da iperglicemia cronica, per un difetto della secrezione di insulina o dell'azione dell'insulina, presenti in differente grado.

L'avvento della terapia insulinica ha cambiato la storia del diabete, allungando l'aspettativa di vita dei malati ma riducendone la qualità per lo sviluppo di complicanze croniche. Il diabete induce infatti a lungo termine lo sviluppo progressivo di complicanze a carico dell'apparato vascolare e del sistema nervoso, che sono causa di disabilità e di più elevata morbilità e mortalità.

Classicamente, le complicanze croniche del diabete sono suddivise in *microangiopatiche* e *macroangiopatiche*. Le prime coinvolgono i piccoli vasi, determinandone l'ispessimento della membrana basale; le seconde coinvolgono i grossi vasi, con lesioni spesso non distinguibili da quelle aterosclerotiche dei non diabetici. Tali alterazioni predispongono ad un evento cardiovascolare acuto, che costituisce la causa di morte di circa l'80% dei diabetici.

In altri termini, le complicanze possono essere suddivise in *microvascolari*, a cui appartengono retinopatia e nefropatia, e *macrovascolari*, che comprendono invece cardiopatia, vasculopatia cerebrale, arteriopatia agli arti inferiori. Vasculopatia e neuropatia favoriscono le ulcere agli arti inferiori e concorrono quindi a sviluppare la complicanza del piede diabetico.

Nella macroangiopatia diabetica le alterazioni tipiche dell'invecchiamento (progressivo indurimento e perdita di elasticità delle arterie) compaiono più precocemente, probabilmente come conseguenza della formazione e del deposito di prodotti derivanti dalla glicosilazione non enzimatica nella matrice cellulare. Particolarmente sensibili ai processi di glicosilazione sono le molecole di collagene di tipo IV e la laminina, essenziale per l'integrità strutturale della parete vascolare. Quando sono glicate, tali molecole riducono la capacità di adesione delle cellule endoteliali. L'accumulo dei prodotti tardivi di glicosilazione (AGE) accelera i fenomeni di occlusione arteriosa, ostacolando gli effetti delle sostanze vasodilatatrici: gli AGE alterano quindi la funzionalità endoteliale, favorendo sia una maggiore permeabilità sia l'espressione di un'attività procoagulante, compatibile con l'attivazione di

¹ Le nozioni presentate in questo paragrafo sono tratte da [11]

un processo aterosclerotico. Inoltre, l'NO che riveste un ruolo importante come regolatore endoteliale per l'elevato potere vasodilatatorio, viene prodotto in minor quantità.

1.3.1 Retinopatia diabetica

La durata del diabete e il livello di controllo glicemico sono i maggiori produttori dello sviluppo di retinopatia, che è classificata in due stadi: non proliferativa e proliferativa.

La retinopatia diabetica non proliferativa è caratterizzata da microaneurismi vascolari della retina ed emorragie puntiformi. La progressione è determinata dalla comparsa di modificazioni del calibro dei vasi venosi e anomalie microvascolari intraretiniche, con conseguente perdita di periciti retinici e aumento della permeabilità dei vasi retinici, con alterazione del flusso ematico. La retinopatia diabetica non proliferativa non determina disturbi visivi se la zona della macula non è danneggiata da un edema retinico.

Il carattere distintivo della retinopatia diabetica proliferativa è invece la comparsa di neovascolarizzazione in risposta all'ipossia retinica. Questi vasi neoformati possono rompersi facilmente, determinando emorragie ed eventuale distacco retinico per la formazione di tessuto fibroso.

1.3.2 Nefropatia diabetica

La nefropatia diabetica è la causa principale di insufficienza renale cronica; nei soggetti diabetici la proteinuria è associata a marcata riduzione della sopravvivenza e aumento del rischio di malattia cardiovascolare.

I meccanismi attraverso cui l'iperglicemia cronica determina la malattia renale sono i seguenti: interazione di fattori solubili, alterazioni emodinamiche del microcircolo renale (iperfiltrazione glomerulare, aumentata pressione idrostatica transcappillare glomerulare) e modificazioni strutturali nel glomerulo (ispessimento membrana basale, fibrosi, espansione mesangiale). Alcuni di questi effetti possono essere mediati attraverso i recettori dell'angiotensina.

1.3.3 Complicanze cardiovascolari

La frequenza della patologia cardiovascolare risulta maggiore negli individui affetti da diabete. In particolare, l'infarto miocardico risulta 3-5 volte più frequente e l'assenza di dolore toracico ("ischemia silente") è comune.

L'incidenza dell'insufficienza cardiaca è maggiore; la cardiomiopatia diabetica è determinata da diversi fattori, tra cui l'ischemia miocardica da aterosclerosi, l'ipertensione e le disfunzioni dei miotici cardiaci secondarie all'iperglicemia cronica.

Nei pazienti diabetici, oltre ai generali fattori di rischio per le malattie cardiovascolari, come ad esempio l'ipertensione, l'obesità, il fumo e la mancanza di attività fisica, si ha l'aggiunta di fattori di rischio specifici, che comprendono la microalbuminuria, la proteinuria massiva e un'alterata funzione piastrinica. Inoltre, gli individui con insulino-resistenza e diabete hanno elevati livelli di inibitori dell'attivatore del plasminogeno e di fibrinogeno, favorendo lo sviluppo di trombosi e aumentando il rischio di complicanze cardiovascolari.

1.3.4 Complicanze degli arti inferiori

Le complicanze degli arti inferiori dovute all'iperglicemia cronica, quali ulcere, infezioni e amputazioni, possono essere ricondotte a diversi fattori patogenetici: la neuropatia, le alterazioni biomeccaniche dei piedi, la vasculopatia periferica e la difficoltà nella riparazione delle ferite.

La neuropatia sensoriale periferica interferisce con i normali meccanismi di protezione, consentendo al paziente di sostenere traumi ripetitivi al piede senza avvertire la lesione.

La neuropatia sensitivo-motoria induce un'alterata meccanica della muscolatura pedidia e modificazioni strutturali del piede.

La neuropatia autonoma si manifesta in un alterato circolo ematico superficiale del piede, che promuove secchezza della cute e fessurazioni che non vengono riparate a causa della vasculopatia periferica.

2. La flussimetria laser-Doppler

La flussimetria laser Doppler (LD) è un metodo non invasivo e altamente sensibile per indagare l'andamento della microcircolazione periferica cutanea.

Il flussimetro Laser Doppler (LDF) emette un fascio di luce laser monocromatico a bassa energia direzionato da una fibra ottica, che penetra nel tessuto cutaneo sino ad una profondità di circa 1,5-2 mm: le onde riflesse dalle superfici sottostanti vengono registrate da un sensore. Tutti i globuli rossi che circolano nei microvasi del tessuto analizzato e sono colpiti dalla luce laser determinano uno *shift* in frequenza, concordemente a quanto affermato nella teoria dell'effetto Doppler. L'entità e la distribuzione in frequenza di tale *shift* dipendono dal numero e dalla velocità di spostamento delle cellule ematiche presenti all'interno del volume di tessuto esaminato. Il segnale riflesso ritorna alla sonda, dove viene convertito in segnale elettrico mantenendo le medesime componenti in frequenza. Lo strumento amplifica le onde e determina la differenza di frequenza tra il segnale di partenza e il segnale di arrivo, consentendo in questo modo di determinare la velocità del flusso sanguigno.

L'anatomia della microcircolazione cutanea è composta di due plessi orizzontali situati nel derma, uno superficiale, da cui si originano i capillari, e uno più profondo. Le arteriole ascendenti e le venule discendenti si ramificano in entrambi i plessi: il LDF rileva il movimento delle cellule ematiche che transitano nel microcircolo del plesso superficiale, raggiungendo venule, arteriole e capillari aventi un'area trasversale di 0.002-0.008 mm² [12].

Monitorando il comportamento del microcircolo nel tempo, oltre all'intensità totale e dei singoli impulsi, il LDF è in grado di registrare le variazioni ritmiche che avvengono nel flusso ematico cutaneo, ovvero la *flowmotion* [13].

2.1 Effetto Doppler

La tecnica LD si basa su un principio fisico che regola il comportamento di tutte le onde armoniche, chiamato appunto *effetto Doppler*, dal nome di colui che intuì che le onde sonore cambiano di tonalità se esiste una velocità relativa tra la sorgente e il rilevatore. Fu infatti il fisico austriaco Christian Doppler a verificare nel 1845 tale affermazione attraverso un noto esperimento: fece suonare una banda di musicisti a bordo di un treno. Egli si posizionò vicino ai binari della ferrovia, ascoltando il suono della musica al suo passaggio e confermando che la tonalità del suono era più alta mentre il treno con i musicisti si avvicinava, e più bassa mentre si allontanava. L'ipotesi venne così validata,

anche se fu Hippolyte Fizeau nel 1848 a capire che tale effetto avviene indipendentemente dal tipo di onde elettromagnetiche [14].

2.1.1 Formulazione matematica

Lo *shift Doppler* è definito formalmente come uno spostamento della frequenza dell'onda che avviene quando c'è un movimento relativo tra sorgente e ricevitore. Se il ricevitore e la sorgente si spostano sulla stessa linea, vale la seguente relazione [14]:

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

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

Nel caso in cui 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 si può esprimere la relazione precedente come:

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

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

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

dove λ_s è la lunghezza d'onda del segnale inviato. Il valore di Δf in questo caso è quindi direttamente proporzionale alla velocità relativa tra emettitore e ricevitore.

Nel caso in cui sorgente e ricevitore si muovano in direzioni diverse, influiscono sull'effetto Doppler solo le proiezioni dei vettori velocità sulla retta passante per sorgente e ricevitore. Chiamando α e β gli angoli formati da tali vettori con la retta passante per sorgente e ricevitore, la relazione tra f_r e f_s si riscrive:

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

2.2 Il flussimetro laser Doppler

Per ottenere un segnale Doppler da un fluido, tale fluido deve contenere particelle in grado di riflettere le onde incidenti: nel caso del sangue i globuli rossi costituiscono i principali agenti riflettenti, e si muovono con una velocità di 0.01-10 mm/s. Nel LDF si usa la luce laser, che ha la caratteristica di essere coerente e monocromatica; ciò vuol dire che viene emessa in un fascio concentrato e ad una singola frequenza f_s . La dimensione dei globuli rossi è circa 7-8 μm : poiché la radiazione viene solitamente emessa ad una lunghezza d'onda di circa 0.7 μm , il fatto che i corpuscoli sui quali incide siano più grandi della sua lunghezza d'onda limita i fenomeni di dispersione, favorendo invece la riflessione [15].

La componente del vettore velocità dei globuli rossi che contribuisce all'effetto Doppler, da qui in avanti chiamata v_g , è quella perpendicolare alla cute. I globuli rossi che scorrono nelle parti ascendenti e discendenti delle anse del microcircolo contribuiranno maggiormente all'effetto Doppler rispetto a quelli che scorrono parallelamente alla cute (Figura 2.1).

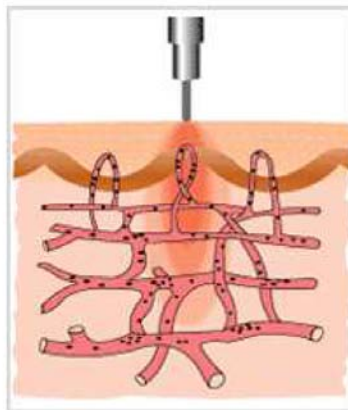


Figura 2.1 - Sezione della cute in cui è rappresentata la profondità di penetrazione della luce laser. Le anse formate dalle arteriole ascendenti e dalle venule discendenti del plesso superficiale sono raggiunte dal fascio, mentre la rete di vasi più in profondità, che costituisce il secondo plesso orizzontale,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

Nell'acquisizione del segnale dal microcircolo cutaneo con LDF il principio della riflessione descritto precedentemente viene applicato due volte [16]:

1. una sonda emettitrice ferma ($v_s = 0$), trasmette la luce laser attraverso la cute alla frequenza f_s , e i globuli rossi che scorrono nel sangue con velocità v_g (positiva se si avvicinano alla cute) ricevono il segnale alla frequenza f_g , che vale:

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

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

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

che, sotto l'ipotesi che $c \gg v_g$, dà

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

Lo *shift* Doppler, calcolato come la differenza tra la frequenza del segnale inviato e la frequenza del segnale ricevuto, risulta essere proporzionale alla velocità v_g dell'agente riflettente e inversamente proporzionale alla lunghezza d'onda λ_s del segnale emesso:

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

La luce complessivamente ricevuta dalla sonda è data da due componenti: una parte formata dalla luce che ha colpito gli oggetti fissi, caratterizzata dalla stessa frequenza della luce trasmessa, mentre l'altra parte sarà caratterizzata da uno *shift* in frequenza, essendo riflessa dai globuli rossi in movimento. La frequenza di questa seconda componente è proporzionale alla velocità media dei globuli rossi che hanno riflesso il raggio laser, mentre l'ampiezza del segnale è proporzionale al loro numero.

2.2.1 Funzionamento del dispositivo

La luce laser emessa dalla sorgente del dispositivo viene trasmessa mediante fibre ottiche che scorrono attraverso una sonda, posta a contatto con la cute. I fotoni incidenti possono essere riflessi, assorbiti o dispersi dalle strutture sottostanti la cute. Un'ulteriore sonda a contatto con la superficie della pelle raccoglie la luce riflessa o diffusa dalle strutture sottostanti, le quali possono essere ferme o in movimento (Figura 2.2) [12, 16].

I riflettori che si muovono non sono solo i globuli rossi, ma anche altri tessuti come per esempio la parete vascolare; anche essi producono uno shift Doppler, ma il segnale da loro prodotto ha ampiezza

molto più grande rispetto a quella causata dai globuli rossi a causa del maggior numero di onde incidenti su di essi. Il movimento di questi tessuti ha generalmente velocità minore del sangue, e quindi vi sarà associato un contributo a bassa frequenza, facilmente eliminabile con un filtro passa-alto.

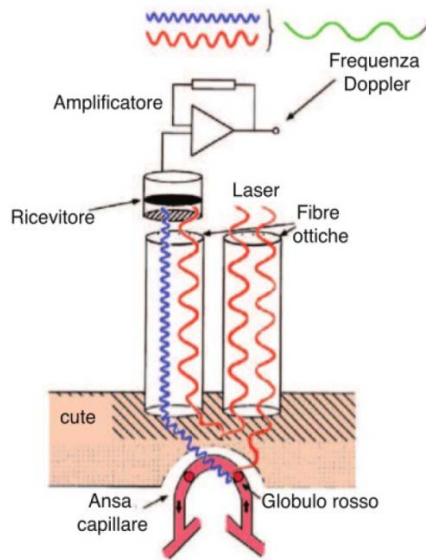


Figura 2.2 - Schema di funzionamento del LDF.

Il segnale misurato dalla sonda è composto da due porzioni di luce riflessa, e presenta il fenomeno della “frequenza di battimento”. Tale fenomeno avviene quando si ha la sovrapposizione di segnali con frequenze simili ma non identiche. L’onda risultante ha frequenza uguale alla media delle frequenze e ampiezza modulata dallo sfasamento dovuto alla differenza delle frequenze. Il segnale risultante ha quindi un’ampiezza che oscilla tanto più velocemente quanto più sono differenti le frequenze [12].

Per procedere con l’analisi di questo segnale, esso viene scomposto nelle sue due componenti *shiftate* e *non shiftate*: come detto in precedenza si effettua un filtraggio passa-alto sulla componente shiftata per eliminare il contributo proveniente dal movimento dai tessuti. Ogni campione del segnale in uscita dallo strumento è proporzionale ai valori di frequenza e ampiezza di questo segnale, e poiché tali valori sono legati alla velocità degli elementi corpuscolati e al loro numero, essi permettono di risalire al valore di perfusione cutanea.

Le misurazioni effettuate sono espresse in unità di perfusione PU, che sono unità arbitrarie [16], e quindi non si è ancora in grado di stabilire i valori assoluti di perfusione. Infatti ciò che viene misurato, il *flux*, non rappresenta una misura assoluta della velocità di cellule del sangue.

La misurazione viene effettuata su un determinato volume di tessuto la cui area superficiale è fissata ma è variabile la sua profondità; questo volume è influenzato da diversi fattori [12]:

- caratteristiche del tessuto: struttura e densità capillare, pigmentazione, ossigenazione;
- lunghezza d'onda della sorgente luminosa: se la lunghezza d'onda è breve la capacità di penetrare è bassa e si esaurisce in superficie, poiché le onde a maggior frequenza tendono a incontrare con maggior probabilità delle particelle riflettenti su cui collidere;
- configurazione della sonda, in particolare la separazione delle fibre: una distanza maggiore tra le fibre di trasmissione e ricezione comporta una maggiore profondità di tessuto analizzato.

Il flussimetro laser Doppler sfrutta un sistema ad onda continua: le onde riflesse o retrodiffuse possono provenire indifferentemente da riflessioni avvenute all'altezza di qualsiasi sezione del raggio laser penetrante. Il LDF non fornisce informazioni sulla posizione dei globuli rossi riflettenti: per ottenere tale informazione bisognerebbe ricorrere ad un sistema ad onde pulsate [15].

2.3 Limiti della flussimetria laser-Doppler

Uno dei problemi che si riscontrano nell'utilizzo del LDF è la mancanza di una misurazione dello zero assoluto dello strumento: molto spesso, anche quando il flusso dei globuli rossi viene ridotto a zero sperimentalmente o chirurgicamente, lo strumento rileva lo stesso un valore di flusso, seppur minimo. Un tempo la causa di questo "zero biologico" era attribuita al moto browniano nel compartimento vascolare e alla motricità della parete cellulare dei globuli rossi. Più recente la si è ricercata nel moto browniano delle macromolecole presenti in sospensione nel compartimento interstiziale [12].

Un altro problema è la mancanza di un *gold standard* per la misura della perfusione di sangue in un tessuto. Inoltre non è definita una quantità fisica assoluta a cui associare il valore di perfusione cutanea, e questo rende le misure ottenute mediante LD di natura relativa. Per tale motivo è necessario un processo di calibrazione e standardizzazione degli strumenti e delle misurazioni, in modo tale che i risultati possano essere confrontati; in questo caso le specifiche sono fornite dalla azienda che produce lo strumento.

Per rendere le misurazioni confrontabili è inoltre necessario che anche la lunghezza d'onda della sorgente luminosa e la configurazione della sonda siano le stesse in ogni misurazione. In più, anche le proprietà del tessuto dovrebbero essere le medesime: tale condizione è però difficilmente realizzabile e non verificabile in maniera diretta.

La tecnica LDF è stata confrontata con altre tipologie di misurazione disponibili ad oggi, come l'isotopo di Xenon, fluoresceina e microsfere radioattive; studi volti alla comparazione di queste diverse tecniche hanno dimostrato che esiste una forte correlazione tra la flussimetria laser-Doppler

e le altre tecnologie. 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 [12].

Uno dei problemi maggiori riguarda però la sensibilità della sonda ai movimenti della zona a cui è applicata: lo spostamento del soggetto su cui si sta acquisendo il segnale LD provoca evidenti artefatti nel segnale acquisito. Al segnale vengono infatti sommati contributi dovuti al movimento che però non corrispondono a caratteristiche del microcircolo.

Questo tipo di artefatto è ben riconoscibile se il movimento è breve e veloce, ed è caratterizzato da picchi molto ampi rispetto al resto del segnale, che si esauriscono velocemente (Figura 2.3). Se invece il movimento è lento, l'artefatto è meno evidente, e risulta possibile confondere il contributo legato allo spostamento del soggetto con il segnale stesso: tale contributo può quindi essere erroneamente confuso con l'attività del microcircolo, portando a risultati non veritieri.

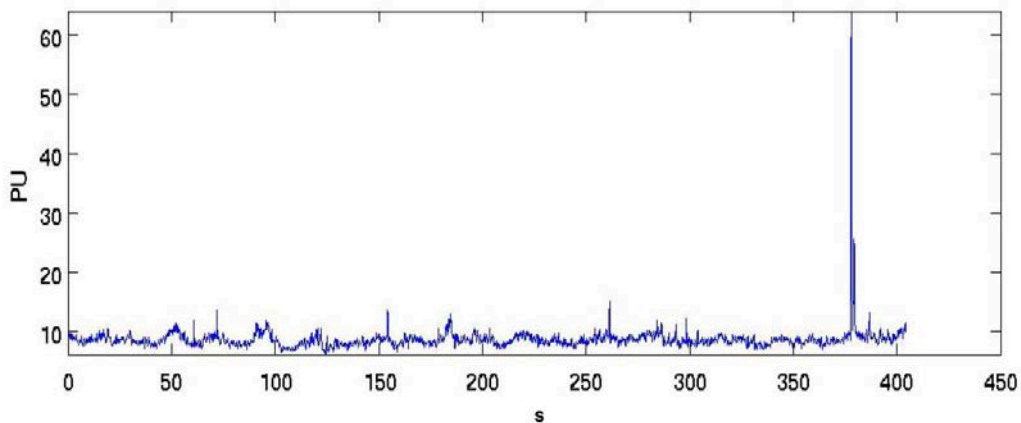


Figura 2.3 - Esempio di artefatto da movimento nel segnale di perfusione cutanea, in corrispondenza del secondo 380.

3. Analisi in frequenza

Lo strumento Laser Doppler utilizzato nell'ambito del presente lavoro fornisce in uscita un segnale campionato a 16 Hz, la cui ampiezza è misurata in unità di perfusione (PU): il segnale è dato quindi da un insieme di campioni che descrivono la perfusione cutanea per ogni istante di campionamento. L'analisi più immediata e di facile interpretazione è quella che riguarda l'andamento nel tempo del segnale, in cui quest'ultimo è rappresentato in un sistema di coordinate avente sull'asse x il tempo e sull'asse y l'ampiezza del segnale. L'analisi nel dominio delle frequenze permette di approfondire la prospettiva da cui si osserva il fenomeno, consentendo di estrarre dal segnale di perfusione un maggiore numero di informazioni. Il grafico che si ottiene in questo caso è lo *spettro di frequenza*, che ha come ascissa l'asse delle frequenze in uno specifico intervallo e come ordinata un valore associato al contributo che ciascuna frequenza fornisce all'intero segnale; lo spettro permette perciò di identificare le frequenze presenti nel segnale. Per passare dal dominio del tempo al dominio delle frequenze è necessaria una trasformazione matematica del segnale originale.

In questo Capitolo verranno enunciate alcune tecniche di trasformazione e verranno messi in evidenza i limiti di ciascuna al fine di giustificare la scelta fatta, cioè quella di utilizzare in questo ambito la trasformata Wavelet. Lo strumento LD utilizzato fornisce in uscita un segnale campionato a 16 Hz, la cui ampiezza è misurata in PU: il segnale è dato quindi da un insieme di campioni che descrivono la perfusione cutanea per ogni istante di campionamento.

3.1 La trasformata di Fourier²

La trasformata di Fourier (FT) è la trasformazione in frequenza più conosciuta, dovuta all'idea del matematico francese Jean Baptiste Joseph Fourier e pubblicata nel 1822 in "Teoria analitica del calore". In questo lavoro egli mostra come un generico segnale possa essere espresso come somma di onde semplici, ciascuna caratterizzata da una frequenza specifica e da un coefficiente che ne modula l'ampiezza.

L'equazione che effettua la FT è la seguente:

$$X(f) = \int_{-\infty}^{+\infty} x(t)e^{-2\pi ft} dt$$

² Le nozioni presentate in questo paragrafo sono tratte da [17]

Poiché l'esponenziale presente nell'integrale può essere riscritto attraverso la formula di Eulero come

$$e^{-j2\pi ft} = \cos(2\pi ft) + j\text{sen}(2\pi ft)$$

per ogni valore di f ciò comporta di moltiplicare l'intero segnale per un'espressione complessa composta da seno e coseno alla frequenza f , e calcolarne l'integrale.

L'idea è che se $x(t)$ contiene una componente ad una certa frequenza \hat{f} , tale componente va a coincidere con i termini sinusoidali alla frequenza \hat{f} , fornendo come prodotto una curva avente un'ampiezza relativamente consistente. Con l'operazione di integrazione tutto questo viene sintetizzato in un unico valore, che viene segnato nello spettro con una determinata 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, il segnale $x(t)$ non contiene quel tipo di onda.

L'unità di misura dell'ampiezza delle frequenze spettrali può essere ricavata dalla definizione di FT, in cui il segnale $x(t)$ è misurato in PU , l'esponenziale $e^{-2\pi ft}$ è adimensionale e il differenziale dt è misurato in secondi. Risulta quindi che $X(f)$ è espresso in $PU \cdot s$, cioè PU/Hz .

L'analisi di un segnale nel dominio del tempo può essere semplificata passando al dominio della frequenza: ad esempio in Figura 3.1 è mostrato 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 con unità di misura arbitraria A.

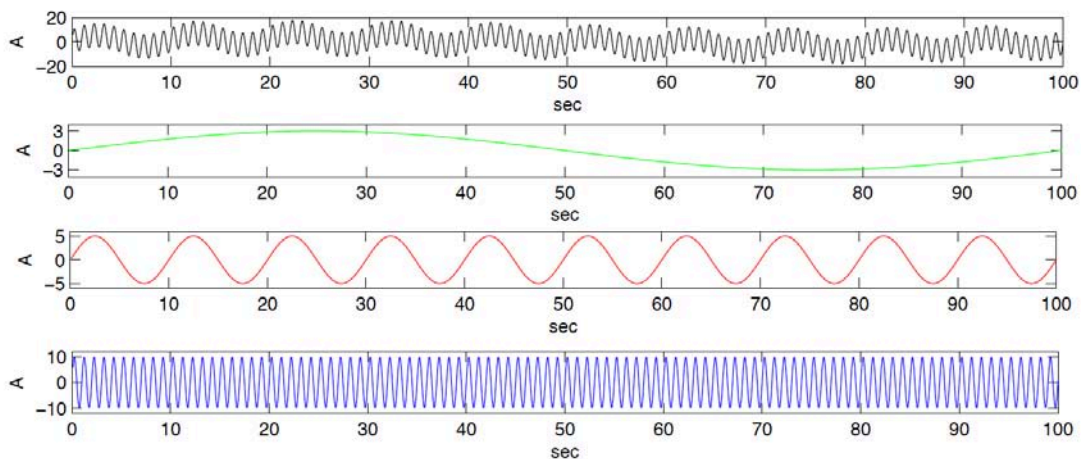


Figura 3.1 - Esempio di come un generico segnale (in nero) possa essere separato nelle tre onde componenti (in verde rosso e blu)

Una volta applicata la FT, rappresentando le coppie frequenza-coefficiente come punti in un nuovo sistema di coordinate avente come ascisse le frequenze e come ordinate i valori dei coefficienti, si ottiene un grafico che indica quali frequenze sono contenute nel segnale e con quale intensità. Tale grafico è lo *spettro* del segnale stesso. Nel caso del segnale sopraccitato, lo spettro consiste in tre spikes a livello delle frequenze relative alle onde che lo compongono (Figura 3.2). L'altezza degli spikes è direttamente proporzionale all'ampiezza delle onde alle quali si riferiscono.

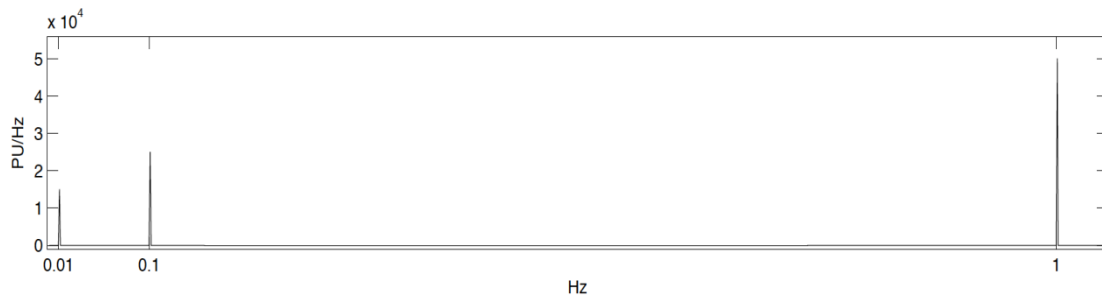


Figura 3.2 - Spettro del segnale di Fig. 3.1, ottenuto tramite la FT.

Nel caso di segnali composti da frequenze di diversi ordini di grandezza, si ricorre alla rappresentazione in scala logaritmica delle ascisse, in quanto la scala lineare non consentirebbe di apprezzare appieno la distribuzione di tutte frequenze dello spettro (Figura 3.3).

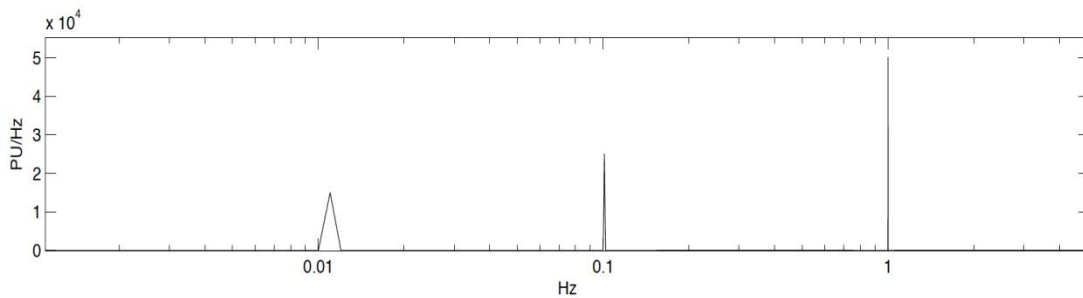


Figura 3.3 - Spettro del segnale di Fig. 3.1, ottenuto tramite la FT e rappresentato con l'asse delle frequenze in scala logaritmica.

3.1.1 Non-idealità dei segnali reali

Le acquisizioni LDF hanno durata limitata, quindi quella che si analizza è una finestra temporale del segnale. La lunghezza di tale finestra influenza la quantità e la qualità delle informazioni che possono essere ottenute: le caratteristiche dello spettro in frequenza sono limitate dal numero di campioni acquisiti N e dalla frequenza di campionamento f_c .

Per segnali reali, dati N e f_c valgono le seguenti proprietà spettrali:

- secondo il teorema di Nyquist-Shannon, l'asse delle frequenze su cui sono localizzate le frequenze spettrali è limitato all'intervallo $[-f_c/2, f_c/2]$. Il valore $f_c/2$ è chiamato *frequenza di Nyquist*, ed è la frequenza massima indagabile per evitare di introdurre aliasing;
- i segnali biologici, essendo reali, presentano la caratteristica di simmetria rispetto all'asse y: l'asse delle frequenze può quindi essere ulteriormente ridotto all'intervallo $[0, f_c/2]$ senza perdita di informazione;
- poiché il numero dei campioni del segnale originario (N) equivale a quello della trasformata, la distanza in frequenza Δf tra due campioni dello stesso spettro, detta risoluzione in frequenza, è pari a

$$\Delta f = \frac{f_c}{N}$$

e tale valore indica anche la frequenza più bassa riconoscibile nel segnale.

Per questo motivo i picchi osservabili nello spettro di Figura 3.3 non hanno natura impulsiva, ma sono degli *spikes* triangolari con un supporto pari a tre campioni. Questo fatto è dovuto proprio alla risoluzione in frequenza limitata del segnale, dovuta a sua volta al limitato numero di campioni N . Infatti, al decrescere di N il supporto del picco tende ad allargarsi, mentre la sua altezza diminuisce. Questa è la ragione per cui, confrontando spettri di segnali aventi un diverso numero di campioni N , a parità di frequenza di campionamento f_c bisogna considerare l'area sottesa dai picchi, e non la loro altezza.

3.1.2 Limiti della trasformata di Fourier

Le informazioni fornite dalla trasformata di Fourier sono calcolate basandosi sull'intero segnale: l'integrale ha infatti estremi a $\pm\infty$. L'onda a frequenza f contribuisce quindi in egual misura allo spettro indipendentemente dalla sua localizzazione nel tempo. Per questa ragione la FT non è adatta nell'analisi di segnali che presentino variazioni nel tempo delle componenti in frequenza, poiché tali variazioni conferiscono al segnale un andamento rumoroso e poco informativo (come nel caso di Figura 3.4, in cui il segnale presenta frequenze variabili di 0.01, 0.1 e 1 Hz).

Per quanto riguarda invece segnali stazionari, cioè composti da onde a frequenze invarianti lungo tutto il segnale, lo spettro ottenuto con FT è corretto e l'interpretazione del grafico è semplice e immediata.

I segnali biologici reali tuttavia non soddisfano mai la condizione di stazionarietà, poiché spesso i meccanismi da cui hanno origine sono attività dinamiche. Nel caso specifico del microcircolo, la dinamicità che sta alla base dei meccanismi di *flowmotion* e *vasomotion* rende impensabile che il

segnale acquisito da LDF sia anche solo approssimativamente stazionario. La non stazionarietà è proprio la causa principale della presenza di rumore sovrapposto al segnale.

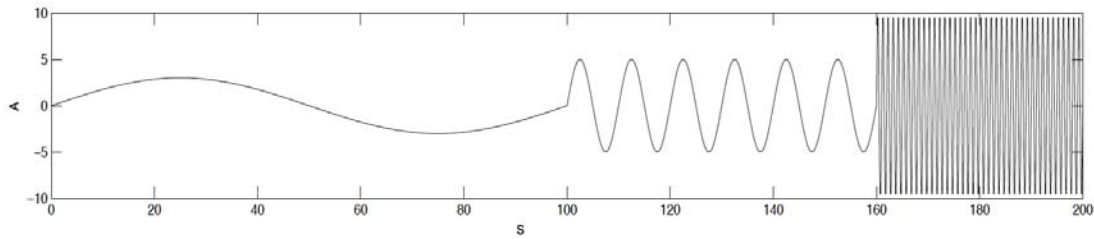


Figura 3.4 - Esempio di segnale non stazionario in cui sono riconoscibili tre componenti in frequenza localizzate in punti differenti nel dominio del tempo.

L'applicazione diretta della FT può comunque lasciare intuire quali siano gli intervalli di frequenze dominanti, sebbene dalla rappresentazione in scala logaritmica dello spettro si evidenzia come le basse frequenze siano indicate con minore precisione (Figura 3.5). Inoltre, questo tipo di trasformata non si interessa della localizzazione temporale delle frequenze, cosa che risulta invece utile nell'analisi di perfusione cutanea.

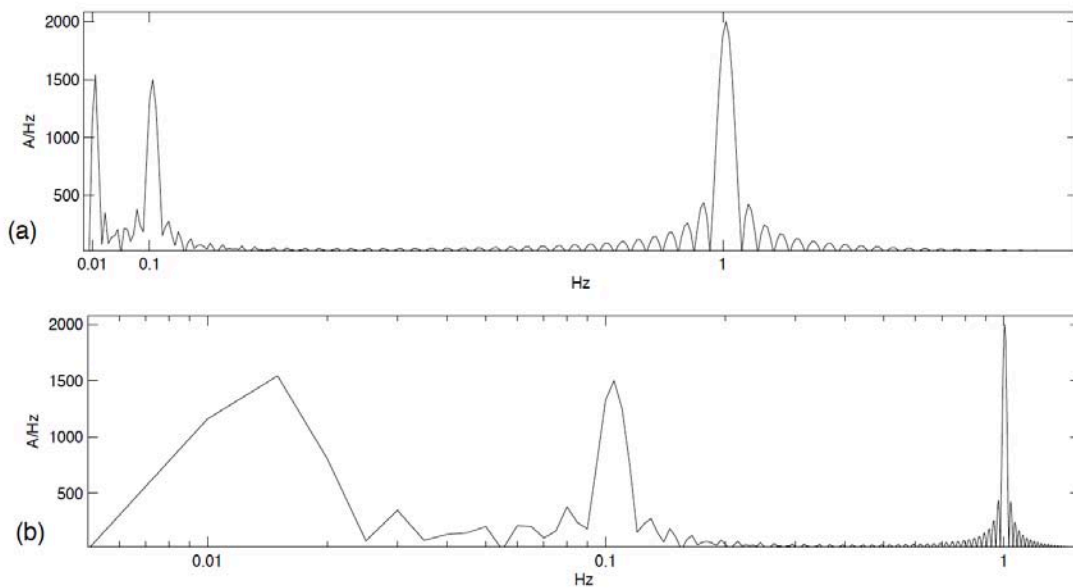


Figura 3.5 - Spettro FT del segnale variabile ad intervalli di Fig.3.4 rappresentato in scala lineare (a) e logaritmica (b).

3.2 La trasformata di Fourier Short Time³

I problemi della non stazionarietà del segnale e della mancata localizzazione nel tempo delle varie componenti in frequenza possono essere superati ricorrendo alla trasformata di Fourier *Short Time* (STFT). Essa prevede di dividere il segnale in intervalli sufficientemente brevi tali che al loro interno il segnale possa essere considerato stazionario: in ciascuno di essi si applicherà poi la FT. In questo modo si ottengono informazioni sia nel dominio della frequenza che in quello del tempo, e le variazioni di frequenza sono localizzate nel tempo.

La formulazione matematica della STFT è la seguente:

$$STFT(\tau, f) = \int x(t)\gamma(t - \tau)e^{-j2\pi ft} dt$$

dove il segnale $x(t)$ è moltiplicato per $\gamma(t - \tau)$, una finestra di durata e forma arbitraria che viene fatta scorrere sul segnale $x(t)$ a passi di τ . Il risultato di questo prodotto permette di “selezionare” solamente la porzione di segnale che si sovrappone alla finestra mobile: un intervallo centrato in τ ed esteso quanto la finestra γ .

La matrice $STFT(\tau, f)$ ottenuta può essere rappresentata in un piano tempo-frequenza, in cui l'asse orizzontale corrisponde al dominio temporale e l'asse verticale corrisponde al dominio delle frequenze. Ogni colonna della matrice contiene lo spettro in frequenza di una particolare posizione della finestra, mentre ogni riga rappresenta il contributo di una determinata frequenza al variare della posizione della finestra del tempo.

Nella Figura 3.6 viene riportato lo stesso segnale visto precedentemente (con frequenza variabile nel tempo, 0.01, 0.1, 1 Hz), con allineata la STFT ottenuta con una finestra di 100 campioni. Si nota in maniera chiara la rappresentazione temporale delle variazioni delle componenti in frequenza. In realtà, osservando la STFT da un'altra prospettiva (Figura 3.7) si nota come siano presenti differenti precisioni per differenti segmenti del segnale. La finestra scelta in questo caso, di ampiezza 100 campioni, risulta quindi adatta per localizzare il picco ad 1 Hz (colore rosso in corrispondenza di tale valore), ma meno adatta per localizzare frequenze più basse: infatti per le frequenze 0.01 e 0.1 si hanno picchi non ben definiti e non localizzati chiaramente.

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

³ Le nozioni presentate in questo paragrafo sono tratte da [18]

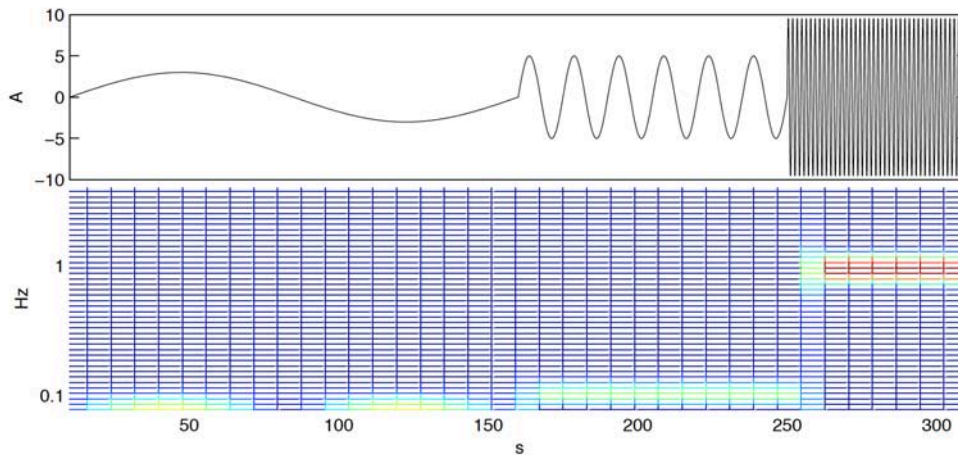


Figura 3.6 - Segnale variabile a intervalli di Fig.3.4 (in alto), allineato alla sua STFT ottenuta con una finestra di 100 campioni (in basso).

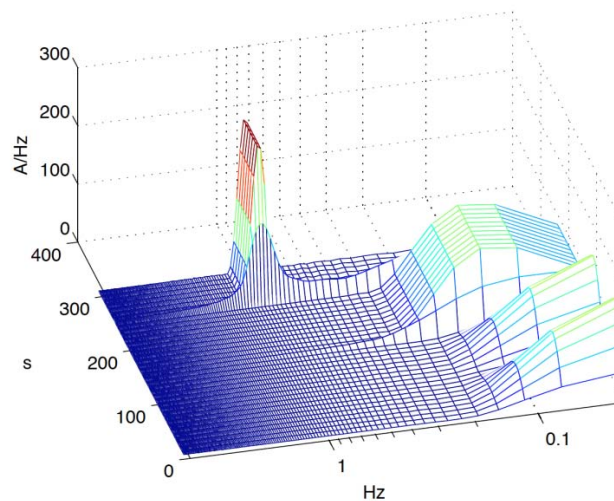


Figura 3.7 - Visione 3D della STFT del segnale variabile a intervalli di Fig.3.4, con asse delle frequenze in scala logaritmica.

3.2.1 Limiti della trasformata di Fourier Short Time

La limitazione principale di questo metodo risiede nel fatto che la lunghezza della finestra γ è prefissata. La lunghezza della finestra è determinante per la risoluzione in frequenza della STFT (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 per garantire che al suo interno il segnale possa essere considerato stazionario.

Nel caso del segnale LDF di perfusione cutanea non è possibile trovare una lunghezza della finestra che permetta di avere contemporaneamente una buona risoluzione e l'ipotesi di stazionarietà verificata, a causa della differenza tra gli ordini di grandezza delle diverse bande di frequenza.

Una possibile soluzione potrebbe essere l'applicazione iterativa dell'algoritmo, utilizzando di volta in volta una finestra adatta a uno specifico intervallo di frequenze e sovrapponendo le informazioni

ottenute ad ogni iterazione. I problemi legati a questa soluzione sono molteplici: tale metodo di analisi porta ad un surplus di informazioni relativo al contenuto in frequenza calcolato al di fuori dell'intervallo specifico della finestra, e inoltre ogni iterazione porta a risultati slegati tra loro e di interpretazione non immediata.

Sarebbe quindi utile trovare un algoritmo in grado di variare la lunghezza della finestra in modo tale da adattarla ad estrapolare informazioni precise relativamente ad uno specifico intervallo di frequenze. Tale approccio è da ricercarsi nell'analisi Wavelet, descritta nel paragrafo seguente.

3.3 La trasformata Wavelet ⁴

L'analisi Wavelet, proposta per la prima volta nel 1981 da Jean Morlet, è lo strumento in grado di superare i limiti che le trasformate FT e STFT presentano nello studio di segnali LDF di perfusione cutanea. L'analisi Wavelet prevede di migliorare la risoluzione tempo-frequenza sfruttando un tipo di finestra ottimale per ogni punto del piano tempo-frequenza: in questo modo ogni evento può essere localizzato al meglio nelle due dimensioni.

3.3.1 La risoluzione tempo-frequenza

Durante l'analisi Wavelet la lunghezza della finestra non è costante. In Figura 3.8 sono riportate le griglie di risoluzione tempo-frequenza per la STFT e per la WT, che delimitano dei rettangoli detti *Heisenberg box*. Secondo il principio di indeterminazione di Heisenberg, l'area di tali rettangoli non può scendere sotto un certo valore che per una definita metodologia di analisi rimane costante.

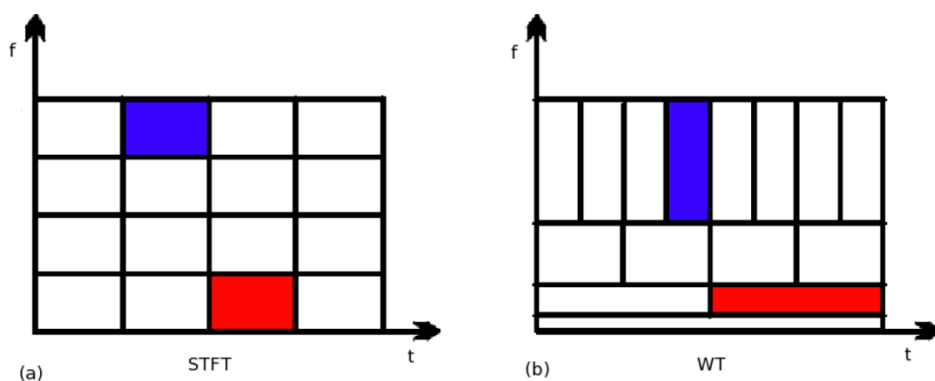


Figura 3.8 - Griglie di risoluzione delle STFT (a) e WT (b). L'area degli Heisenberg box rimane costante, coerentemente con il principio di indeterminazione, ma in (b) vengono modificate le proporzioni fra i lati.

⁴ Le nozioni presentate in questo paragrafo sono tratte da [19]

Confrontando tali grafici si può notare che:

- gli *Heisenberg box* della STFT 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, sarà quindi congruente a quello rosso, che identifica una bassa frequenza. Se le frequenze sono molto diverse tra loro, il valore costante della risoluzione non può essere adatto per entrambe;
- per quanto riguarda la WT, la finestra temporale utilizzata rimane di ampiezza costante solo durante la traslazione lungo l'asse temporale: per ogni riga dell'asse delle frequenze i rettangoli hanno tutti la stessa base. Al variare della frequenza in esame varia però anche la base dei rettangoli: basse frequenze hanno finestre temporali più ampie e quindi corrispondono a rettangoli di base maggiore, mentre frequenze più alte hanno finestre temporali più strette e conseguentemente i relativi rettangoli avranno base minore. Per il principio di Heisenberg ciò comporta che le altezze dei rettangoli varino in modo inversamente proporzionale alle basi. In questo modo l'area dei rettangoli rimane costante, ma variano anche i termini del compromesso di risoluzione per ogni tipo di evento che si vuole studiare. In particolare:
 - le basse frequenze sono misurate in modo molto preciso, essendo isolate da un rettangolo con altezza molto stretta (rosso), a discapito però di una scarsa localizzazione temporale dovuta all'elevata ampiezza della base. Il fenomeno a bassa frequenza è però un fenomeno lento, quindi la precisione nell'identificare il momento esatto in cui avviene è sacrificabile;
 - le alte frequenze sono invece misurate in maniera più precisa nel dominio del tempo, e quindi hanno una localizzazione temporale molto accurata: il rettangolo che le isola ha infatti una base molto stretta (blu). Ciò influisce però negativamente sulla risoluzione in frequenza, poiché il rettangolo ha un'altezza molto elevata; l'incertezza che si ha sul dominio della frequenza è tuttavia sacrificabile, avendo a disposizione un'informazione precisa e corretta sul momento in cui avviene il fenomeno.

3.3.2 L'equazione

L'analisi Wavelet prevede l'utilizzo di una *mother Wavelet* ψ , a cui verranno poi applicate operazioni di traslazione e cambiamento di scala che portano alla formazione di una famiglia di finestre Ψ , definita come:

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

dove s è il fattore di scala misurato in secondi e τ è la traslazione nel tempo, sempre in secondi. Il segnale acquisito viene moltiplicato per tutte queste versioni modificate della *mother Wavelet* e successivamente si calcola l'integrale di tale prodotto, che rappresenta la trasformata Wavelet (WT):

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

L'idea alla base di questa operazione è di ottenere un valore relativamente alto dal prodotto di onde aventi frequenze simili, in maniera analoga a quanto accade con le trasformate basate sul metodo di Fourier. Se l'intervallo considerato del segnale contiene un'onda di frequenza simile a quella della Wavelet, il prodotto sarà direttamente proporzionale al livello di somiglianza e all'ampiezza dell'onda nel segnale. Tale concetto è racchiuso in un unico valore con l'operazione di integrale, che fornisce un risultato che viene salvato in un punto del piano s, τ .

In sintesi, si può dire che la WT mappa il segnale $x(t)$ nel piano tempo-scala, nel quale il valore di ogni punto (s, τ) è associato al risultato dell'integrale precedente ottenuto utilizzando la corrispondente $\hat{\Psi}_{s,\tau}$.

3.3.3 La mother Wavelet

La caratteristica fondamentale di una *mother Wavelet* è di avere un andamento oscillante e una frequenza limitata: l'ampiezza dell'oscillazione, partendo da zero, aumenta fino a raggiungere un valore massimo al centro, per poi diminuire fino a ritornare a zero. Ci sono numerose forme per la finestra da cui ricavare la famiglia di Wavelet, ognuna delle quali è adatta per uno specifico scopo di analisi (Figura 3.9). Di solito, il criterio con cui si sceglie una funzione rispetto ad un'altra è quello di somiglianza con la forma delle onde che si vogliono analizzare.

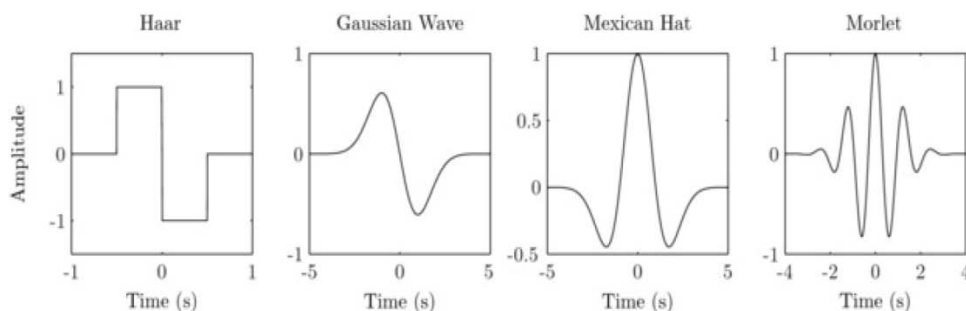


Figura 3.9 - Quattro esempi di possibili forme della mother Wavelet. In ordine da sinistra verso destra: Haar, Gaussian, Mexican hat, Morlet.

Nel caso del segnale LDF di perfusione cutanea, la più adatta per identificare le frequenze di oscillazione del tracciato è la Wavelet di Morlet, rappresentata nella sua parte reale ed immaginaria

e al variare del tempo in Figura 3.10 [8-10,20-23].

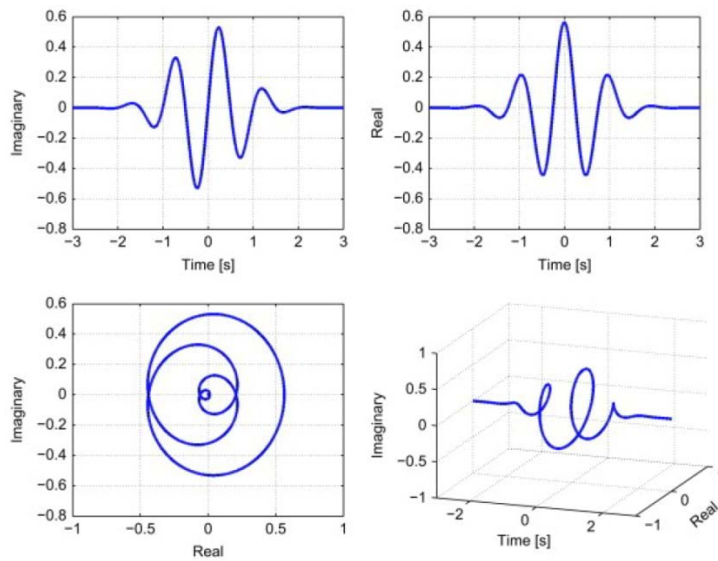


Figura 3.10 – Rappresentazione Morlet complex Wavelet: parte reale, parte immaginaria e loro rappresentazione al variare del tempo.

La Wavelet di Morlet è una funzione Gaussiana modulata da un'onda sinusoidale, e nel dominio del tempo è espressa come:

$$\psi(t) = \frac{B_{f_0}}{\sqrt{2\pi}} \left(e^{j2\pi f_0 t} - e^{-j(2\pi f_0)^2/2} \right) e^{-t^2/2}$$

dove f_0 determina la risoluzione e rappresenta il giusto compromesso tra la corretta localizzazione nel tempo e nella frequenza. La scelta di tale parametro è solitamente basata sull'ispezione visiva della WT, altrimenti viene spesso posta a priori a 1. B_{f_0} è invece una costante di normalizzazione, solitamente posta uguale a 1. Il secondo termine è molto piccolo per valori di $f_0 > 0.5$ e quindi nel caso in esame, in cui $f_0=1$, viene trascurato. L'espressione della Wavelet risulta così semplificata, diventando:

$$\psi(t) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} (e^{j2\pi t}) e^{-t^2/2}$$

Questo tipo di finestrazione consente di massimizzare la risoluzione tempo-frequenza [21].

Dunque la trasformata Wavelet con un determinato fattore di scala s può essere interpretata come un filtro passa banda, in grado di stimare il contributo in frequenza presente in tale banda [20].

3.3.4 La scala

Per l'analisi Wavelet risulta molto importante la scelta del fattore di scala s , per il quale le $\widehat{\Psi}_{s,\tau}$ assumono un valore di frequenza pari a quello che deve essere localizzato nel segnale. Per ogni frequenza analizzata vengono create differenti Wavelet scalate e traslate e traslate in modo adatto a identificare tale frequenza. In Figura 3.11 si possono osservare diverse funzioni Wavelet associate ad altrettanto diverse frequenze: Wavelet a frequenza più elevata porteranno risultati con alta risoluzione temporale a discapito di quella in frequenza e viceversa.

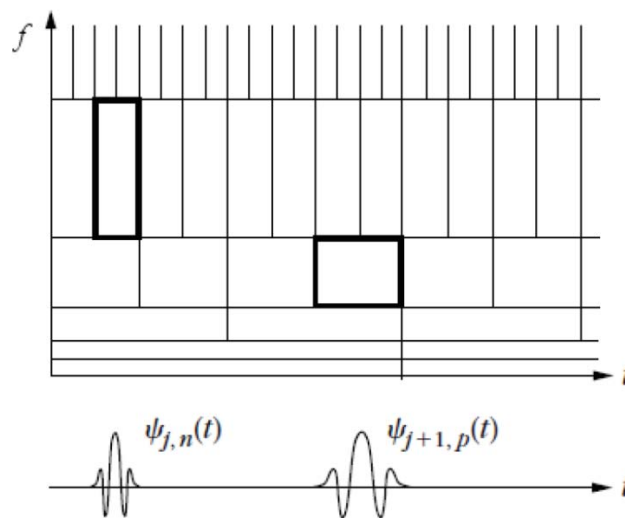


Figura 3.11 – Funzioni Wavelet associate a diversi Heisenberg box della trasformata Wavelet.

La scala e la traslazione sono discretizzate, poiché i dati a disposizione sono campionati e le elaborazioni vengono svolte da un calcolatore. La discretizzazione di τ segue quella svolta nel campionare il segnale, mentre la stessa operazione sulla scala non è così immediata. Infatti, le frequenze dei segnali analizzati sono molto diverse tra loro e ricoprono un intervallo molto ampio, e questo comporta che utilizzare un incremento uniforme della scala non è una scelta corretta. I valori sull'asse delle frequenze sono discretizzati suddividendoli in un insieme finito di punti per i quali viene calcolata effettivamente la WT. Poiché solitamente si sceglie di rappresentare le frequenze su una scala logaritmica, anche la discretizzazione viene eseguita su scala logaritmica.

In [24] viene suggerito di analizzare punti discretizzati secondo la seguente formula:

$$\frac{f_k}{2\pi} = 2^{\frac{k-k_0}{n_v}}$$

dove n_v rappresenta il numero di campioni in cui si vuole suddividere l'intervallo di frequenze delle quali si vuole studiare lo spettro. La discretizzazione comporta problemi di approssimazione numerica della risoluzione determinati da n_v e dall'ampiezza degli intervalli associati ad ogni frequenza: quella che si ottiene è la risoluzione numerica. Il limite superiore per la risoluzione in

frequenza è quindi dato dal minimo tra risoluzione teorica e numerica. Un n_v troppo piccolo può portare a confondere sequenze molto vicine, che vengono riconosciute come unica frequenza più intensa; un n_v troppo elevato può portare ad un aumento dei costi computazionali senza un effettivo miglioramento della risoluzione in frequenza.

Il legame tra la scala s e la frequenza f_s corrispondente è di proporzionalità inversa: valori bassi di scala evidenziano eventi di breve durata e quindi con alta frequenza, mentre con valori di scala più elevata si possono isolare eventi lenti, a bassa frequenza. L'equazione che rappresenta questo legame è la seguente:

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

in cui f_w è la frequenza centrale della Wavelet, che può essere ricavata sfruttando la FT della Wavelet sapendo che tale frequenza corrisponde al punto di picco nel tempo, e f_c è la frequenza di campionamento del segnale.

3.3.5 Lo scalogramma

Lo scalogramma è una rappresentazione grafica tridimensionale che consente la visualizzazione dei coefficienti Wavelet determinati sulla base di diversi segnali. La formula con cui esso viene calcolato è la seguente:

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

dove $W(s, \tau)$ sono i coefficienti complessi calcolati con la WT; il modulo rende tali valori reali e positivi, cosa che non si verificherebbe considerando semplicemente i coefficienti originali, a causa dell'andamento oscillatorio della *mother Wavelet*. Il termine s^2 al denominatore ha invece la funzione di normalizzare le ampiezze della curva.

In Figura 3.12 è riportato un segnale con andamento variabile a tratti e il suo corrispondente scalogramma. Un'ulteriore prospettiva dello scalogramma, riportata in Figura 3.13 mostra come le Wavelet si adattino alla frequenza che stanno analizzando, isolandone al meglio i diversi contributi. Il supporto della curva 3D è costituito dal piano tempo-frequenza, i cui assi x e y sono misurati rispettivamente in secondi e Hz; l'asse verticale indica invece l'ampiezza dei coefficienti. Nel caso dello scalogramma le ampiezze $S(s, \tau)$ sono misurate in PU^2/s , ovvero in $PU^2 \cdot Hz$.

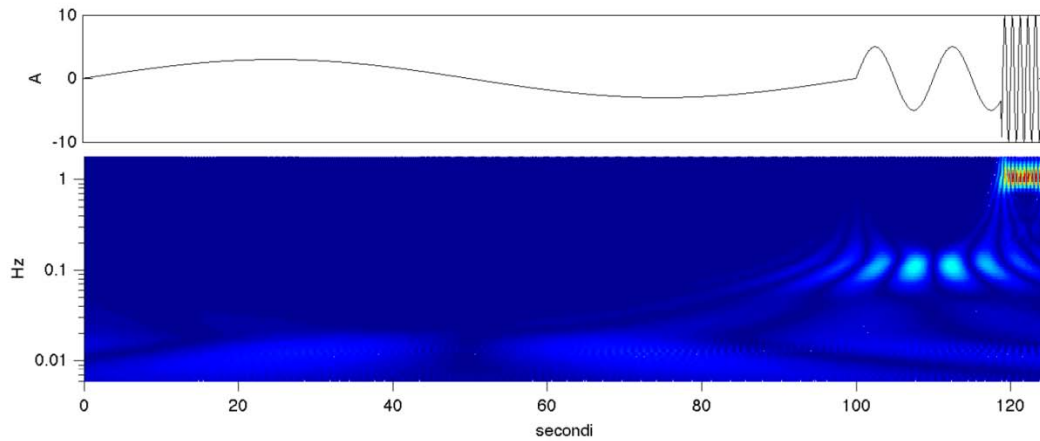


Figura 3.12 – Segnale variabile a tratti e corrispondente scalogramma 2D.

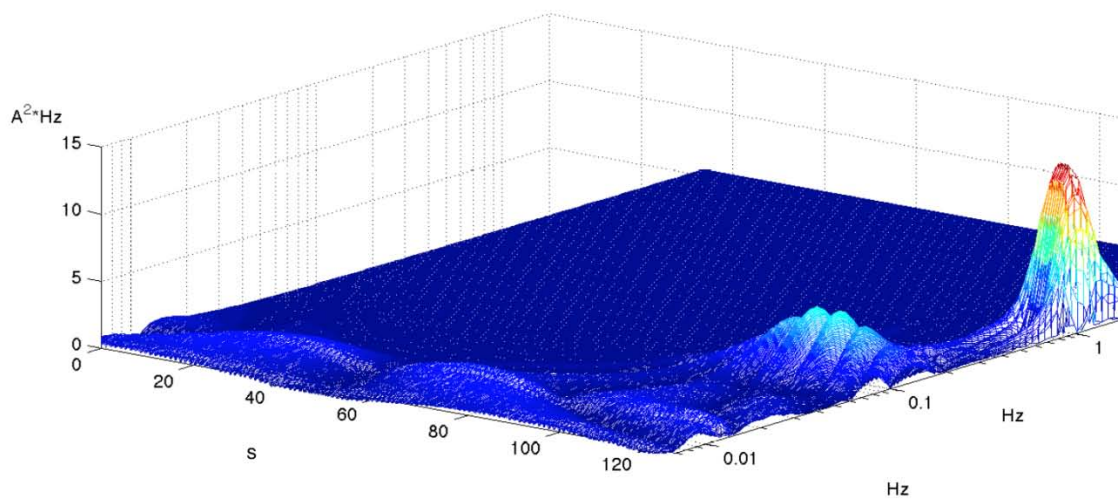


Figura 3.13 – Scalogramma 3D del segnale di Fig. 3.12.

Il grafico prodotto dall'analisi Wavelet è di semplice interpretazione: esso permette di localizzare efficacemente i diversi contributi in frequenza adattandosi al meglio alle frequenze che compongono il segnale. Sezioni dello scalogramma parallele all'asse del tempo derivano da finestre aventi lo stesso fattore di scala ma traslate nel tempo (variazione di τ): viene quindi indicato come varia il contributo dovuto ad una particolare frequenza lungo il segnale. Nel profilo di ciascuna di ciascuna di tali sezioni si può riconoscere l'andamento della Wavelet che l'ha generata. Sezioni dello scalogramma parallele all'asse della frequenza sono invece ottenute sulla base di una $\overline{\psi_{s,\tau}}$ avente un fissato τ ma scalata tramite variazione di s : descrivono lo spettro di tutte le frequenze del segnale associate a finestre centrate in τ e dipendenti da s . Aumentando il fattore di scala, la finestra si allarga adattandosi al valore di frequenza del quale sta misurando il contenuto.

La visualizzazione bidimensionale dello scalogramma rende più facilmente confrontabili

informazioni di segnali diversi, riducendo le ampiezze a un codice di colori. Inoltre, è utile mediare la matrice dei coefficienti lungo l'asse del tempo, ottenendo un grafico avente per ogni frequenza il valore medio dei coefficienti lungo l'intera durata del segnale, che rappresenta lo *spettro dell'ampiezza* della trasformata Wavelet. Elevando poi al quadrato i coefficienti contenuti nello scalogramma e mediandoli ancora una volta lungo l'asse del tempo, si ottiene lo *spettro della potenza*, utilizzabile anch'esso nel confronto tra segnali differenti. Entrambi questi spettri si esprimono seguendo le precedenti unità di misura: lo spettro dell'ampiezza sarà quindi valutato in $PU \cdot s$, mentre lo spettro della potenza in $PU^2 \cdot s^2$.

3.3.6 Limiti della trasformata Wavelet

Nella formulazione teorica della WT, l'integrazione avviene su segnali di durata infinita e con un intervallo infinito di frequenze. Nel caso dei segnali LDF di perfusione cutanea, i segnali hanno durata limitata e uno spettro limitato dalla frequenza di campionamento (16 Hz), e ciò porta ad un calcolo improprio dei coefficienti della WT in prossimità dei bordi del segnale acquisito. Ad esempio, per il calcolo dei valori dei coefficienti all'istante $t = 0$ si dovrebbe moltiplicare la funzione per i valori antecedenti a tale istante, che però non sono presenti. Questo fenomeno prende il nome di "effetti di bordo" e porta a distorsioni nel calcolo della WT vicino ai bordi [24].

Gli effetti di bordo si verificano in particolare nel momento in cui una parte consistente della funzione Wavelet per cui viene moltiplicato e integrato il segnale risiede al di fuori dell'intervallo di acquisizione. Questo errore dipende dalla frequenza per la quale si vogliono calcolare i coefficienti della WT. Infatti, nella sezione 3.3.4 si è affermato che tra scala e frequenza sussiste una relazione inversamente proporzionale, e ciò implica che le frequenze più basse avranno bisogno di valori di scala più alti per avere una risoluzione adeguata, e quindi di una famiglia di Wavelet più lunghe. Una frequenza minore sarà interessata da una maggiore area con effetti di bordo, che quindi dipendono sia dal tempo che dalla frequenza per cui si vogliono calcolare i coefficienti. La più bassa frequenza indagata in modo affidabile dipende dalla lunghezza del segnale originale, che dovrà essere sufficientemente esteso dal punto di vista temporale; questo aspetto verrà ripreso nella sezione 4.3.2. Per evitare errori di approssimazione severi si procede con un taglio dei coefficienti che si trovano all'estremità dello scalogramma, come si può notare in Figura 3.14: la linea nera delimita il cosiddetto "cono di influenza", e i valori al di fuori di tale linea non vengono sfruttati per il calcolo dello spettro medio per i motivi precedentemente enunciati.

Il cono di influenza è definito come:

$$\{f, t\}_{coi}^{(\varepsilon)} : (f, t) \in \{f, t\}_{coi}^{(\varepsilon)} \Leftrightarrow \varepsilon_b(f, t) \leq \varepsilon$$

dove ε è l'errore di approssimazione accettato e $\varepsilon_b(f, t)$ l'errore di approssimazione calcolato per il coefficiente associato alla determinata frequenza f e al tempo t .

Il cono di influenza ha effetti sul calcolo dello spettro medio che si ottiene mediando i valori dello scalogramma all'interno della sola linea nera: per questo motivo per le alte frequenze si utilizza un numero elevato di valori, mentre al contrario per le basse frequenze si sfruttano pochi valori, riferiti per lo più alla parte centrale del segnale nel tempo.

La forma del cono di influenza risulta maggiormente schiacciata verso i bordi tanto più è grande la durata del segnale acquisito: più lungo è il segnale, minori saranno gli effetti di bordo nel calcolo dello spettro, che verrà mediato su un numero maggiore di valori dello scalogramma.

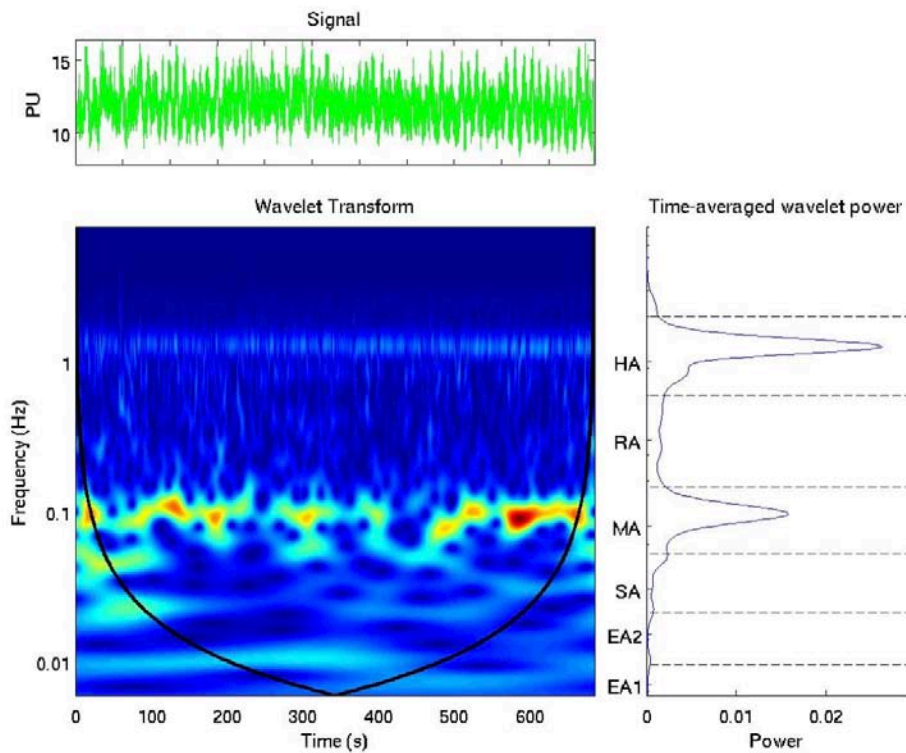


Figura 3.14 – In alto il segnale nel dominio del tempo, in basso a sinistra lo scalogramma in cui il cono di influenza è delimitato dalla linea nera, in basso a destra lo spettro di potenza WT mediata nel tempo.

4. Materiali e metodi

4.1 Pazienti

In questo studio sono stati analizzati 17 pazienti affetti da diabete di tipo 2. Essi sono 11 maschi e 6 femmine, di età compresa tra 34 e 66 anni (età media 53). Tutti i pazienti sono non vascolopatici. Prima dell'acquisizione è stato misurato il valore di emoglobina glicata. Nella seguente tabella sono riportati i parametri riassuntivi dei pazienti.

	SESSO	ETÀ	Terapia	Emoglobina glicata	Anni di diabete (riferiti)
01	M	51	Ipoglicemica	7	7
02	F	47		7	3
03	M	43		8	7
04	F	57		7	5
05	M	61		8	4
06	M	34		7	8
07	M	65		6	7
08	M	66		9	6
09	F	47		6	5
10	F	44		5	7
11	M	49		6	6
12	M	53		7	3
13	M	56		7	5
14	M	66		7	6
15	F	52		8	7
16	M	55		8	4
17	F	57		8	3

Tabella 4.1 – Dati riassuntivi sui pazienti analizzati.

4.2 Prova posturale

La prova posturale si esegue ponendo il paziente in clinostatismo sul lettino e dopo 15 minuti viene invitato ad abbassare la gamba fuori dal lettino sino a raggiungere un angolo di 90° rispetto al piano cardiaco. Tale manovra stimola il riflesso venulo-arteriolo costrittore (VAR) [25]. Il VAR è un riflesso autonomico, simpatico, locale, cutaneo, determinato dalla stimolazione di fibre post-gangliari che innervano le venule e le arteriole [26]. Il ricettore venulare è rappresentato dalle fibre muscolari lisce della parete venulare, l'effettore dalle cellule muscolari lisce della parete arteriolare. In ortostatismo l'aumento della pressione idrostatica della colonna ematica, a livello delle principali vene dell'arto, causa un aumento della pressione idrostatica che a livello dei microvasi cutanei determina lo stretching delle miocellule venulari. Tale evento provoca la stimolazione delle fibre ortosimpatiche post-gangliari con diretta stimolazione delle miocellule arteriolari, determinandone la vasocostrizione. La riduzione del calibro arteriolare cutaneo secondaria alla vasocostrizione ortostatica, riduce l'afflusso ematico all'interno dei capillari cutanei. Questo meccanismo permette quindi di mantenere costante la pressione idrostatica all'interno dei capillari anche in ortostatismo, consentendo quindi una omeostasi degli scambi capillare-tessuto. La mancata vasocostrizione ortostatica provoca un aumento della pressione idrostatica capillare, con secondaria iperpermeabilità ed edema interstiziale e compromissione degli scambi microvasculo-tessutali ed in ultimo sofferenza e morte cellulare.

Il diabete, come è noto, è caratterizzato dalla presenza di numerose complicanze sistemiche particolarmente a livello microcircolatorio, tra cui la retinopatia diabetica e la nefropatia diabetica. Un'altra temibile complicanza del diabete è la neuropatia periferica, che colpisce sia le fibre sensitivo-motorie che neurovegetative. Il sistema nervoso neurovegetativo viene infatti colpito in maniera specifica dal diabete, particolarmente a livello cutaneo, determinando una serie di alterazioni vascolari, cutanee, muscolari ed ossee che causano un quadro ulcerativo neuro-ischemico noto col termine di "piede diabetico".

È stato riportato in letteratura che una delle prime manifestazioni della cosiddetta microangiopatia cutanea diabetica sia proprio l'alterazione delle fibre neurovegetative cutanee.

La prova posturale ha lo scopo di evidenziare precoci alterazioni della reattività posturale, possibile marker di neuropatia autonoma diabetica.

4.3 Acquisizione del segnale

In tutti i pazienti è stato rilevato il segnale LD ponendo la sonda sul dorso del piede tra il terzo e il quarto spazio inter metatarsale. La registrazione è avvenuta al mattino con il paziente a digiuno da almeno 12 ore; al paziente non era permesso assumere tè, caffè o altre bevande eccetto acqua. Al

paziente era inoltre richiesto di ritardare l'assunzione di qualsiasi farmaco fino al termine della procedura.

Il segnale LD è stato registrato con il paziente in clinostatismo dopo 15 minuti di stabilizzazione in una stanza a temperatura controllata di 23°C. Il paziente è stato quindi invitato ad abbassare la gamba a 90° e il segnale è stato registrato continuamente per un intervallo di tempo di circa 9-10 minuti.

4.3.1 *Strumento di acquisizione*

Lo strumento utilizzato per acquisire i segnali di perfusione cutanea è il Periflux System 5000 (Perimed, Stoccolma, Svezia).

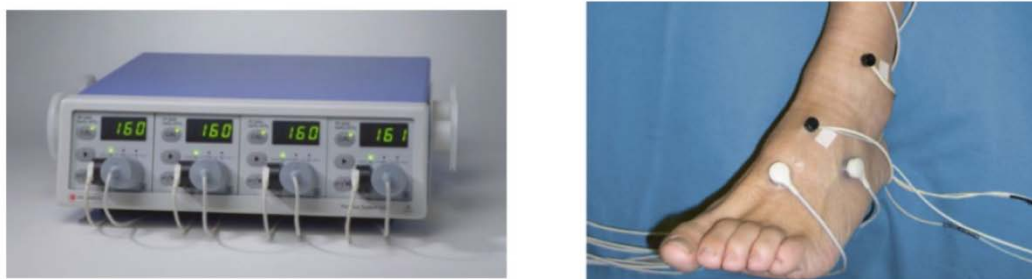


Figura 4.1 - Dispositivo Periflux System 5000 e applicazione della sonda sul dorso del piede.

La struttura modulare di tale dispositivo permette di ottenere varie informazioni sulla microcircolazione cutanea: è composto di diverse unità e vi sono molteplici tipologie di sonde utilizzabili, da scegliere sulla base della specifica applicazione.

Per le acquisizioni analizzate in questo elaborato, la sorgente laser è un diodo allo stato solido che emette nel campo del rosso visibile (energia: 2 mW, lunghezza d'onda: 780 nm). La sonda utilizzata è la Probe 457, che ha una separazione tra le fibre di invio e ricezione di 0.25 mm e, se considerata assieme alle altre caratteristiche della configurazione sperimentale adottata, consente una profondità di misura dell'ordine di 0.5-1 mm. È una sonda dotata di termostato che permette la variazione della temperatura cutanea nel corso delle registrazioni. I segnali vengono acquisiti ad una frequenza di 16 Hz. La strumentazione descritta è collegata ad un particolare software dedicato che ne permette il controllo e la gestione, nonché l'acquisizione del segnale. I dati misurati vengono poi salvati offline in formato Excel con l'informazione di data e ora dell'acquisizione, codice identificativo del paziente, dettaglio dei parametri strumentali e segnale di perfusione.

4.3.2 Caratteristiche del segnale

Il segnale rilevato dallo strumento è espresso in unità arbitrarie di perfusione (PU) e rappresenta il valore di perfusione cutanea del microcircolo nel volume di tessuto esaminato; è proporzionale al prodotto tra velocità media e numero di globuli rossi che attraversano i microvasi della regione in esame.

Il segnale, osservato nel dominio del tempo, presenta un andamento oscillatorio, in cui si possono individuare diverse onde ad altrettanto diverse frequenze. Tale andamento è causato da diversi fattori fisiologici che agiscono contemporaneamente, come già descritto nel Capitolo 1. In particolare, si ricorda che tali frequenze sono da ricondurre ad attività sistemiche e locali delle strutture del sistema cardiovascolare:

- le onde più veloci sono riconducibili all'attività cardiaca; nei segnali analizzati in questo lavoro, essendo i pazienti a riposo, la frequenza dell'attività cardiaca si trova in un intervallo attorno ad 1 Hz;
- le onde più lente e con andamento più variabile sono riconducibili ad altre attività fisiologiche dinamiche (respirazione, attività piogena, neurogena, endoteliale).

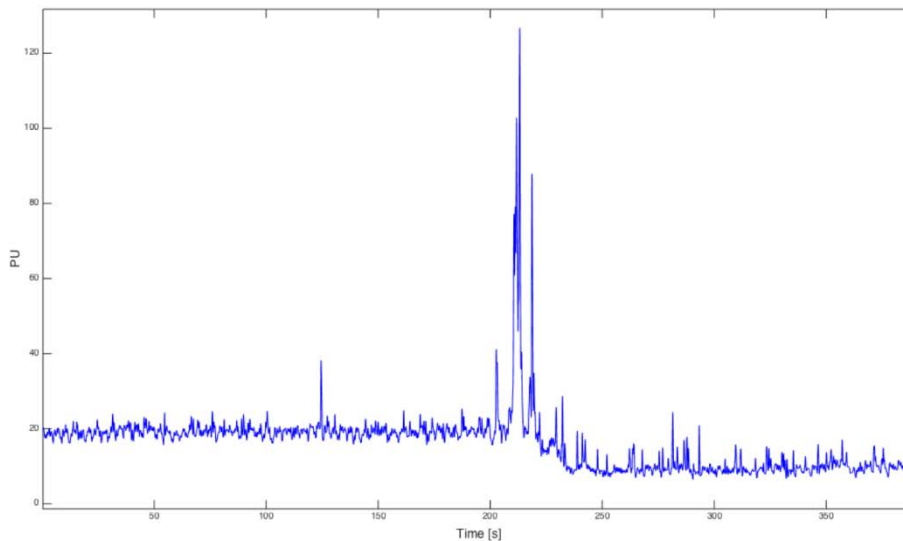


Figura 4.2 - Esempio di segnale LD nel dominio del tempo.

La procedura di analisi del segnale valuta l'andamento delle frequenze mediato nel tempo, durante tutta la durata dell'acquisizione. Naturalmente, più il segnale è lungo, più periodi di una certa frequenza possono essere osservati e più la stima dei coefficienti della trasformata Wavelet risulta affidabile. È importante che la durata dell'acquisizione sia adeguata: infatti, per attenuare le differenze dovute ai singoli eventi si applica l'operazione di media a tutti i coefficienti delle varie

frequenze, e così facendo si evidenziano le caratteristiche presenti in tutta la durata del segnale. Per mediare più periodi, è necessario quindi che il segnale sia sufficientemente lungo.

In letteratura si adotta una regola empirica, nota come “regola del sei”: essa afferma che per non definire un evento come casuale e singolo, esso deve comparire con almeno sei periodi completi nell’arco dell’acquisizione. Questo spiega come mai in questo lavoro spesso risulti impossibile calcolare il contributo della banda endoteliale NO indipendente, la cui frequenza più bassa riscontrabile è di 0.005 Hz e che necessita pertanto di 200 secondi per manifestarsi. Servono dunque almeno 1200 secondi (200 x 6) affinché l’attività endoteliale rispetti la regola del sei: siccome i segnali acquisiti sono di durata molto variabile, nel caso in cui la durata sia minore di 1200 secondi le valutazioni sulle frequenze molto basse potrebbero essere non affidabili, e quindi tale banda (EA1) è stata esclusa dalle successive analisi.

4.4 Pre-elaborazione del segnale

Per fare in modo che l’applicazione della trasformata Wavelet ai segnali di perfusione acquisiti sia efficace, è necessario procedere ad una loro pre-elaborazione: essa consiste in particolare nella eliminazione degli artefatti da movimento, in un *detrending* e un filtraggio per isolare le bande di frequenza di interesse in modo che i risultati non siano influenzati da componenti a frequenze adiacenti alla banda di interesse.

La sonda è molto sensibile agli spostamenti, quindi, a segnale acquisito, si è provveduto all’applicazione di algoritmi atti a eliminare gli artefatti da movimento, visibili sul segnale come *spikes*. Lo spike più evidente è senza dubbio quello che corrisponde al momento in cui il paziente muove la gamba dalla posizione clinostatica alla posizione ortostatica: questo artefatto è stato tagliato dal segnale ancora prima di procedere all’eliminazione vera e propria degli altri artefatti, che comprendono invece i movimenti involontari compiuti dal paziente durante l’acquisizione.

Per questi ultimi si utilizza un processo di sogliatura attorno al trend del segnale di perfusione, che si ottiene effettuando uno smoothing del segnale [27]. La qualità del segnale “pulito” dipende dall’ampiezza della soglia scelta: tanto più piccola è la soglia tanto minore sarà il contenuto informativo residuo del segnale. Per ottimizzare il processo di sfogliatura, si è applicato un algoritmo iterativo: si calcola lo spettro con una soglia iniziale, poi si incrementa la soglia e si calcola il nuovo spettro utilizzando il segnale già sgliato. Si ripete questa procedura finché la variazione percentuale dell’ampiezza massima di due spettri ottenuti in due iterazioni consecutive sia non inferiore al 20%. Il segnale così ottenuto viene sottoposto ai successivi step di pre-elaborazione.

Nel caso della prova posturale il segnale ha una componente media variabile nel tempo con andamento lineare, e ciò potrebbe portare i coefficienti della trasformata Wavelet ad essere influenzati

da un forte bias. Quando si analizzano bande di frequenza molto ampie, infatti, il trend potrebbe introdurre una componente non trascurabile nello spettro di potenza: per evitarlo si rimuove il trend e si filtra il segnale. Per la precisione, si sottrae un fit lineare dai dati dal segnale originale (sia nella parte di acquisizione clinostatica sia in quella ortostatica) e poi si applica un filtro passabasso (0-2 Hz) al segnale. La scelta del filtro passabasso è la più ragionevole in quanto al limite superiore del segnale LD, che si aggira attorno ai 2 Hz, ci potrebbero essere componenti esterne che influiscono sul calcolo dei coefficienti della WT. Bisogna considerare inoltre che i segnali reali sono spesso corrotti da rumore in alta frequenza, e anche questo fattore potrebbe influenzare negativamente il calcolo dei coefficienti della WT.

Il segnale così ottenuto ha bisogno di un'ulteriore modifica per il successivo calcolo dei coefficienti della WT, che prevede la riduzione degli effetti di bordo. Per ottenere questo risultato si ricorre a un *padding predittivo* del segnale, che esegue una predizione dei valori che precedono e seguono l'intervallo di acquisizione del segnale. Si aggiungono quindi agli estremi di tale intervallo valori predetti in base alle caratteristiche dello spettro nei pressi del bordo; tanto maggiore è il tempo su cui il segnale è stato acquisito, tanto maggiore sarà il numero di punti da calcolare fuori dagli estremi del suddetto intervallo.

4.5 Algoritmo per il calcolo della WT

Di seguito vengono illustrati i passi dell'algoritmo utilizzato per il calcolo della trasformata Wavelet implementato in MATLAB nella funzione *wt.m* presente all'interno del pacchetto *Nonlinear Mode Decomposition* fornito dagli autori del lavoro [24]:

1. pre - elaborazione del segnale: eliminazione del trend del segnale LD sottraendo sia nella parte acquisita in clinostatismo che in quella in ortostatismo un fit lineare. Si ha poi un filtraggio nella banda di interesse $[f_{min}, f_{max}]$ Hz, $[0,2]$ Hz nel caso del segnale LD;
2. padding del segnale: calcolo del padding predittivo a destra e a sinistra del segnale acquisito;
3. suddivisione dell'intervallo di frequenze analizzate in piccoli intervalli in base al numero di voci n_v scelto. Tale operazione non dipende dalle caratteristiche del segnale acquisito, quindi si possono confrontare segnali diversi sulla stessa banda di frequenze;
4. calcolo della FFT del segnale: essendo il segnale analizzato un segnale reale, si mettono a zero le ampiezze negative;
5. per ogni frequenza discretizzata f_k per cui viene calcolata la WT :
 - a) se la forma esplicita della trasformata di Fourier della funzione Wavelet è disponibile, si calcolano i valori di tale funzione per i punti dell'intervallo di frequenze calcolate al punto 3.

Se invece è disponibile la forma esplicita della funzione Wavelet nel dominio del tempo, si calcolano i punti nel dominio della frequenza applicando l'algoritmo FFT ai campioni nel tempo della forma esplicita della funzione Wavelet;

- b) per migliorare le prestazioni dell'algoritmo si procede al calcolo della convoluzione tra la funzione Wavelet e il segnale nel dominio del tempo attraverso la trasformata di Fourier: si moltiplicano tra loro le trasformate in frequenza del segnale LD e della funzione Wavelet e poi si calcola l'antitrasformata;
- c) i coefficienti della WT per ogni frequenza al variare del tempo sono quelli ottenuti al punto b) antitrasformando.

Per quanto riguarda l'implementazione, la struttura della funzione *wt.m* è la seguente:

```
[WT, freq, wopt] = wt (sig, fs, Optional:'Property Name',Property Value)
```

I parametri di input obbligatori sono:

- *sig*: segnale per cui si vuole calcolare la WT, che nel caso in esame è il segnale privo di artefatti;
- *fs*: frequenza di campionamento del segnale analizzato, che per il segnale LD è 16 Hz.

I parametri di input opzionali utilizzati sono:

- *f_{min}* e *f_{max}*: definiscono l'intervallo di frequenze per cui viene calcolata la WT. Nel caso in esame tale intervallo è [0.005-2] Hz;
- *padding*: definisce il tipo di padding utilizzato (nessuno, zero, periodic o predictive);
- *Wavelet*: in questo modo si sceglie la funzione Wavelet di Morlet.

La funzione restituisce in output:

- *WT*: matrice dei coefficienti della trasformata Wavelet;
- *freq*: le frequenze corrispondenti alle righe della matrice WT;
- *wopt*: una struttura che contiene i parametri di configurazione utilizzati per il calcolo della WT, utile per le elaborazioni successive poiché permette di ottenere matrici WT simili per segnali diversi semplificando il confronto dei coefficienti WT.

4.6 Analisi effettuate

I segnali LDF acquisiti sono stati considerati sia prima che dopo l'analisi Wavelet, quindi nel dominio del tempo e nel dominio della frequenza.

In primo luogo, si è andata a valutare la perfusione nel tempo e la sua variazione durante la prova posturale, considerando quindi il segnale del flusso: tale analisi è servita a suddividere i pazienti sulla base dell'efficacia della vasocostrizione in due gruppi, VAR1 per i pazienti con vasocostrizione compromessa e VAR0 per pazienti con vasocostrizione efficace.

Successivamente, per tali gruppi si è andato a delineare un "profilo tipo" del paziente appartenente ad essi, osservando le diverse patologie presenti nella storia clinica del paziente; queste ultime sono coronaropatia (CHD), infarto (IMA), angina, Cardio-Vascular disease (CVD), neuropatia, retinopatia, nefropatia (AER). Si è voluto vedere inoltre come gli eventuali danni alla vasocostrizione o l'assenza di essi influiscano sulla presenza delle suddette patologie. Per fare ciò sono state utilizzate le tecniche di analisi degli *odds* e *odds ratio*.

Dopo l'applicazione della trasformata Wavelet, utilizzando il t-test si sono individuate le differenze significative tra clinostatismo e ortostatismo nei parametri di Ampiezza e Potenza Assolute e Relative per tutte le bande di interesse, confrontando in primo luogo i gruppi VAR1 e VAR0, e poi gli ulteriori gruppi ottenuti suddividendo i pazienti VAR1 sulla base delle patologie elencate in precedenza.

Successivamente, è stato effettuato un confronto per bande, andando a valutare le differenze tra i segnali prima in clinostatismo e poi in ortostatismo, per i diversi gruppi considerati.

4.6.1 Analisi della perfusione nel tempo

Subito prima dell'analisi Wavelet, il segnale acquisito viene analizzato in post processing valutando i seguenti parametri, successivamente utilizzati per un'analisi preliminare dei pazienti:

- Resting Flux (RF): segnale LD in clinostatismo
- Standing Flux (SF): segnale LD a gamba abbassata di 90° rispetto al piano cardiaco (ortostatismo)
- variazione percentuale di SF rispetto a RF secondo la formula $100 \cdot (RF - SF)/RF$, quest'ultima espressione del riflesso venulo-arteriolare.

I valori RF e SF sono calcolati mediando i valori di perfusione nelle due porzioni del segnale, rispettivamente l'acquisizione in clinostatismo e ortostatismo. Per quanto riguarda l'espressione del riflesso venulo-arteriolare, essa è utile per capire se la vasocostrizione agisce in maniera corretta. In particolare, se la variazione percentuale nel passaggio da clinostatismo ad ortostatismo supera la soglia del 40% si può dire che la vasocostrizione è efficace; al contrario, se tale variazione assume

valori inferiori al 40% la vasocostrizione è considerata compromessa. Infatti, in un soggetto sano, quando la gamba è posta perpendicolarmente al pavimento si ha una vasocostrizione che diminuisce l'entità del flusso impedendo al sangue di "allagare" i tessuti circostanti, mantenendo una corretta omeostasi degli scambi capillare-tessuto. In un soggetto in cui tale meccanismo è compromesso, l'entità del flusso non diminuisce e la pressione esercitata dal sangue sulle pareti vascolari aumenta: la conseguenza è il passaggio di liquido nello spazio interstiziale, che può causare gonfiore. Eseguendo questa analisi per tutti i pazienti è stato possibile suddividerli nei due gruppi, VAR1 e VAR0.

4.6.2 Odds e odds ratio

Dato un qualsivoglia evento, il termine *odds* definisce il rapporto tra la probabilità che tale evento si verifichi e la probabilità che non si verifichi [28]. È espresso solitamente nella forma "X to Y", dove X e Y sono il numero di casi favorevoli e il numero di casi contrari. Infatti, detti E l'evento e N il numero di casi totali si ottiene:

$$odds = \frac{P(E)}{P(\bar{E})} = \frac{X/N}{Y/N} = \frac{X}{Y}$$

Gli *odds* sono utilizzati nella quantificazione dell'associazione di un dato evento ad una data causa: essi permettono di misurare un qualsiasi rapporto causa-effetto, in cui la causa è la variabile indipendente e l'effetto è la variabile dipendente. In questo lavoro, la misura degli *odds* è stata usata per delineare il profilo caratteristico del paziente VAR1, con vasocostrizione compromessa, e quello del paziente VAR0, con vasocostrizione efficace. In particolare, si è cercato di identificare le patologie maggiormente associate a ciascuno dei due gruppi di pazienti.

Mediante il calcolo degli *odds ratio* (OR) si può poi misurare quanto l'appartenenza al gruppo VAR1 renda prevalente nei pazienti di tale gruppo l'associazione ad una data malattia rispetto ai pazienti del gruppo VAR0. Infatti la misura dei valori di OR permette di determinare il rischio di un particolare risultato se un certo fattore è presente. Nel caso in esame, si vuole stabilire quanto l'assenza di vasocostrizione efficace incida sulla possibilità che si manifesti una determinata malattia.

In generale, data la seguente tabella (in cui *a*, *b*, *c* e *d* rappresentano il numero di pazienti):

	VAR 1	VAR 0
patologia 1	a	b
patologia 0	c	d

l'OR è definito come:

$$OR = \frac{a/c}{b/d} = \frac{(a \times d)}{(b \times c)}$$

Se uno dei valori contenuti nella tabella è pari a 0 (come avviene in alcuni dei casi considerati) si aggiunge 0.5 a ciascuno dei fattori e si procede con il calcolo.

Si possono distinguere 3 casi:

- OR = 1: la vasocostrizione non influenza gli *odds*
- OR > 1: la presenza di una vasocostrizione compromessa è associata a più alti valori di *odds*
- OR < 1: la presenza di una vasocostrizione compromessa è associata a più bassi valori di *odds*.

4.6.3 *Analisi multivariata*

L'analisi multivariata è un insieme di tecniche statistiche che consentono l'analisi simultanea di due o più variabili: tale approccio si rende necessario quando i dati raccolti presentano più caratteristiche per ogni dato. In termini più precisi, ciò avviene quando ogni esperimento ha per risultato non un singolo valore (realizzazione di una singola variabile aleatoria) ma un numero $n > 1$ di risultati, ognuno realizzazione di una diversa variabile aleatoria.

Per ogni variabile è possibile fare analisi statistiche separate; la presenza di tante informazioni suggerisce però che talvolta sono possibili altri modi di analisi, atti a mettere in luce la dipendenza reciproca delle variabili.

L'*analisi delle corrispondenze multiple* fornisce un metodo per la riduzione delle variabili nel caso di variabili categoriali [29]: nel caso in esame, tali variabili sono le diverse patologie riscontrate nei pazienti, e nello specifico sono anche dicotomiche poiché possono assumere solo due valori: 0 se la patologia è assente e 1 se è presente.

Il primo passo consiste nel costruire la cosiddetta “matrice disgiuntiva completa” D , avente tante righe quanti sono i dati a disposizione, quindi i pazienti, e come colonne le diverse patologie. Tale matrice avrà 1 nelle caselle in cui il paziente della determinata riga presenta la patologia della corrispondente colonna.

A partire dalla matrice disgiuntiva si costruisce una matrice quadrata, di tante righe e colonne quante sono le colonne di D , moltiplicando la matrice a sinistra per la sua trasposta D' . Questa matrice

$$B = D'D$$

è detta *matrice di Burt* (o *delle corrispondenze multiple*). Portando la matrice in forma di tabella, è meglio intuibile come in ogni casella siano presenti dei numeri che rappresentano quante volte si è registrata la compresenza delle due patologie.

I possibili valori contenuti nella matrice B sono compresi tra 0 e il numero m di pazienti.

Tale procedura di analisi è applicata separatamente per i gruppi VAR1 (11 pazienti) e VAR0 (6 pazienti).

4.6.4 Analisi in frequenza: parametri e t-test

Dopo la WT, per rendere più accessibili i dati dello scalogramma 3D (Figura 4.3) e per confrontare i risultati ottenuti dalle diverse acquisizioni, si riassumono tali informazioni in grandezze di più facile osservazione. Si tratta di *Ampiezza e Potenza Assolute e Relative*. È stato inoltre calcolato un valore medio di queste grandezze per ogni intervallo di frequenza descritto precedentemente [20].

Per eseguire tale procedura, si utilizza la funzione *wap.m*:

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

Tale funzione riceve in ingresso:

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

Gli output restituiti sono:

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

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

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

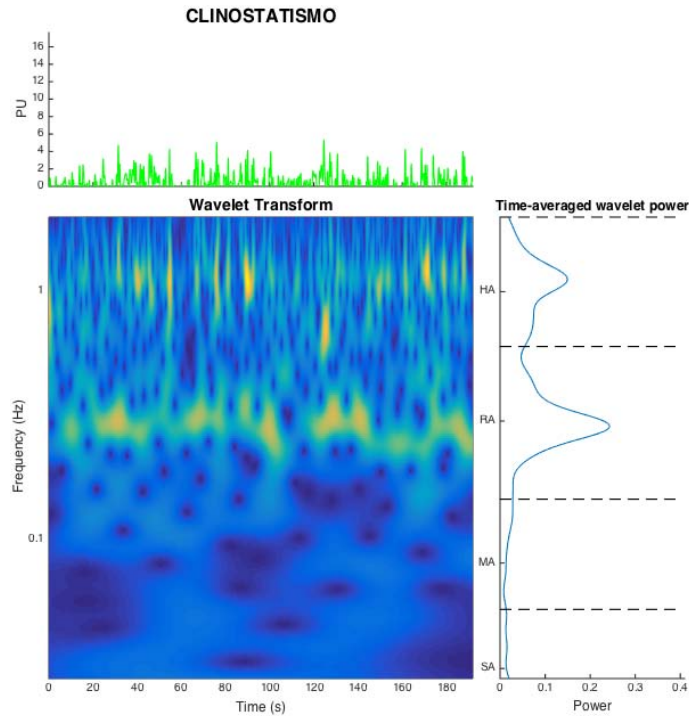


Figura 4.3 - In alto il segnale a cui si applica la WT; in basso a sinistra il corrispondente scalogramma e in basso a destra lo spettro di potenza WT mediato nel tempo.

Al fine di valutare le differenze significative tra le diverse casistiche di analisi, è stato applicato sui dati il t-test, dopo aver verificato con la funzione MATLAB `chi2gof` che i dati avessero distribuzione normale. Tale test determina infatti se i due gruppi di valori inseriti provengano da una distribuzione normale con media nulla e varianza non nota, fornendo in h il risultato del test ($h=0$ se l'ipotesi nulla è valida con un livello di significatività del 5%, $h=1$ altrimenti) e il p-value trovato.

Il t-test è stato applicato nella sua formulazione *paired* o *unpaired* a seconda delle circostanze. In particolare, si è utilizzato il t-test *paired* per il confronto tra clinostatismo e ortostatismo in una stessa banda di interesse (HA, RA, MA, SA) poiché esso prevede il confronto di dati appaiati: in questo caso i due gruppi sono formati dagli stessi soggetti analizzati prima e dopo. Tale condizione non si verifica però per la banda EA2, in quanto per la diversa durata dei segnali acquisiti non sempre si è riusciti ad ottenere il numero di periodi necessari per poter considerare il dato affidabile. Per tale motivo, il numero di segnali della banda EA2 in clinostatismo può essere diverso da quello relativo all'ortostatismo. Ciò ha portato ad utilizzare per questa banda il t-test *unpaired*, che viene utilizzato per gruppi di dati non appaiati.

Successivamente, è stato effettuato un confronto per bande, andando a valutare le eventuali differenze significative tra due gruppi di pazienti (ad esempio VAR1 e VAR0) confrontandoli prima in clinostatismo e poi in ortostatismo. Tale analisi è stata svolta con la formulazione *unpaired* del t-test in quanto si sono confrontati gruppi composti da diversi soggetti.

I test sono stati eseguiti sui valori di ampiezza e potenza assolute e relative, mediate per ogni intervallo di frequenze confrontando le diverse situazioni possibili. Per una visualizzazione migliore dei dati sono stati utilizzati i *boxplot* (Figura 4.4) e in corrispondenza di ogni banda significativa sono stati riportati i p-value calcolati con il t-test (paired o unpaired). I *boxplot* rappresentano la distribuzione dei dati sulla base di cinque valori: il minimo, il primo quartile, la mediana, il terzo quartile e il massimo. Nelle figure, il rettangolo spazia dal primo al terzo quartile ed il segmento interno al rettangolo è la mediana; i valori sotto e sopra il box sono il minimo e il massimo.

Nei *boxplot* riportati in questo elaborato sono stati mantenuti gli outliers: togliendoli infatti si rischiava di avere un numero troppo esiguo di pazienti per ottenere una analisi statistica significativa. Inoltre, per ogni banda di frequenza, sono state calcolate media, mediana e differenze percentuali tra il clinostatismo e l'ortostatismo.

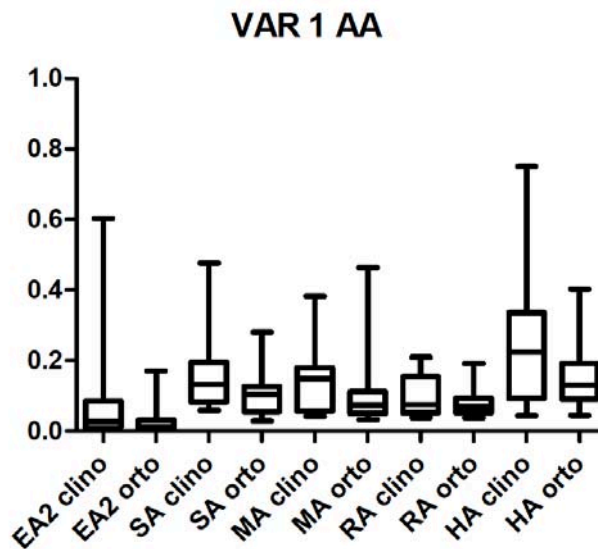


Figura 4.4 - Esempio di boxplot.

4.6.5 PCA

La *Principal Component Analysis* (PCA) è una tecnica di analisi statistica che consente la riduzione della dimensionalità del sistema mantenendo però le informazioni sull'interazione tra le variabili [30]. La PCA trasforma le variabili originali in un set di combinazioni lineari, le componenti principali, che hanno delle proprietà particolari in termini di varianza. Nello specifico, determina una trasformazione lineare ottima di un vettore n -dimensionale x in un altro vettore m -dimensionale y (con $m \leq n$) secondo la relazione:

$$y = Wx$$

La matrice di trasformazione lineare W è progettata al fine di considerare la correlazione statistica tra le variabili della matrice dei dati originali e trovare una rappresentazione ridotta e compatta che ne conservi però le informazioni intrinseche. La manipolazione dei dati originali è basata sul calcolo e sull'analisi della matrice di covarianza, dei suoi autovalori e dei corrispondenti autovettori organizzati in ordine discendente. Gli elementi contenuti nel vettore m -dimensionale y saranno statisticamente indipendenti e in ordine decrescente secondo la diminuzione del contenuto informativo. Questo conduce a una forte riduzione della dimensionalità dei dati attraverso l'eliminazione degli elementi con uno scarso contenuto informativo.

Quindi, tutti i pattern n -dimensionali originali di dati possono essere ottimamente trasformati in pattern di dati in uno spazio di dimensionalità ridotta. In particolare, una matrice può essere proiettata in uno spazio dove le componenti principali sono assi ortogonali che rappresentano la varianza maggiore mostrata dai dati [31].

In questo studio l'analisi delle componenti principali è stata eseguita per rappresentare i valori delle 4 bande HA, RA, MA, SA secondo due assi ortogonali; per eseguire la PCA è stata utilizzata la funzione MATLAB `pca.m` che sfrutta la *Singular Value Decomposition* (SVD), una particolare fattorizzazione di una matrice basata sull'uso di autovalori e autovettori.

Ottenuta la rappresentazione dei valori secondo le componenti principali, è stato possibile eseguire una clusterizzazione dei dati attraverso il clustering *k-means*. Tale tecnica è utilizzata frequentemente per partizionare un insieme di valori in k gruppi in maniera automatica.

Si selezionano k centroidi iniziali dei cluster e poi si vanno a modificare come segue:

1. si assegna la misura al cluster per il quale la distanza tra essa e il centro del cluster è minima;
2. ad ogni passo il centroide viene aggiornato con la media degli elementi che lo costituiscono.

La funzione MATLAB utilizzata è `kmeans.m`, la cui formulazione è la seguente:

$$idx = kmeans(X, k)$$

Data in ingresso la matrice dei dati X e fissato il numero di cluster k , la funzione restituisce come output idx , un vettore di lunghezza pari alle righe della matrice di partenza, che contiene l'indice del cluster a cui appartiene ciascuna osservazione.

È stata applicata la PCA separatamente nei quattro parametri di *Ampiezza e Potenza Assolute e Relative*, con l'intento di perseguire due diversi obiettivi:

- dividendo i valori di tali parametri tra clinostatismo e ortostatismo, vedere se il clustering porta a una suddivisione dei pazienti a seconda dell'efficacia della vasocostrizione (VAR1 e VAR0) o a seconda della presenza di altre patologie;

- suddividere in partenza i pazienti in VAR1 e VAR0 e per ciascuno dei due gruppi vedere se la clusterizzazione separa i valori tra clinostatismo e ortostatismo, almeno per i casi in cui si erano riscontrate differenze significative tra queste due parti del segnale.

5. Risultati e discussione

In questo capitolo sono presentati i risultati ottenuti con le diverse analisi sui segnali LDF acquisiti sui 23 pazienti diabetici non vasculopatici. In primo luogo le analisi effettuate nel dominio del tempo e prima dell'analisi Wavelet, concentrate sulla caratterizzazione dei pazienti sulla base delle patologie riscontrate. Successivamente vengono presentate le analisi statistiche dei parametri Ampiezza e Potenza Assolute e Relative ottenute dopo la WT, per ogni banda di interesse.

5.1 Perfusionione nel tempo

Il primo passo è stato osservare il segnale acquisito nel dominio del tempo e ricavare le informazioni solitamente utilizzate in clinica. Si sono calcolati il valore medio del segnale di perfusione in clinostatismo (Resting Flux, RF) e in ortostatismo (Standing Flux, SF) e la loro differenza percentuale: i pazienti per cui tale differenza è inferiore al 40% sono stati classificati come pazienti con vasocostrizione compromessa, mentre i pazienti per cui la differenza è maggiore di 40% sono caratterizzati da vasocostrizione efficace. Rispettivamente, i due gruppi sono denominati VAR1 e VAR0. Nella seguente tabella sono rappresentati i pazienti con i rispettivi valori di RF e SF, misurati in PU, e la loro differenza percentuale. Nell'ultima colonna i valori 1 o 0 indicano l'appartenenza del paziente a uno dei due gruppi sopra citati.

Paziente	RF (PU)	SF (PU)	$\Delta\%$	VAR
01	19.36	11.36	- 41.34	0
02	7.58	4.27	- 43.65	0
03	9.75	6.82	- 30.07	1
04	5.69	3.04	- 46.60	0
05	6.15	4.69	- 23.78	1
06	2.68	1.69	- 37.13	1
07	9.41	6.63	- 29.59	1
08	35.94	21.57	- 40.01	0
09	6.71	3.52	- 47.49	0
10	23.89	15.28	- 36.02	1
11	5.45	5.36	- 1.67	1
12	17.06	14.16	- 17.01	1
13	29.72	28.73	- 3.34	1
14	7.39	7.20	- 2.53	1
15	29.33	18.37	- 37.37	1
16	17.29	9.06	- 47.59	0
17	6.60	4.93	- 25.35	1

Tabella 5.1 – Suddivisione dei pazienti sulla base dell'efficacia della vasocostrizione ortostatica.

5.2 Odds e odds ratio

La misura degli *odds* è stata usata per delineare il profilo caratteristico del paziente VAR1, con vasocostrizione compromessa, e quello del paziente VAR0, con vasocostrizione efficace. Si ottengono i valori riportati nella seguente tabella:

Patologia	VAR 1	VAR 0
CHD	$7/4 = 1.75$	$0/6 = 0$
IMA	$3/8 = 0.375$	$0/6 = 0$
ANGINA	$5/6 = 0.833$	$0/6 = 0$
CVD	$2/9 = 0.222$	$0/6 = 0$
RETINOPATIA	$7/4 = 1.75$	$3/3 = 1$
NEUROPATIA	$4/1 = 4$	$2/2 = 1$
AER	$4/5 = 0.8$	$3/3 = 1$

Tabella 5.2 – Calcolo degli odds relativi alle patologie in esame.

Valori di *odds* maggiori dell'unità esprimono l'associazione della malattia al gruppo di pazienti considerato; al contrario, valori di *odds* inferiori all'unità indicano la mancata associazione. Ciò consente di tracciare il profilo del "paziente tipo" per ciascuno dei due gruppi come rappresentato nell'istogramma di Figura 5.1.

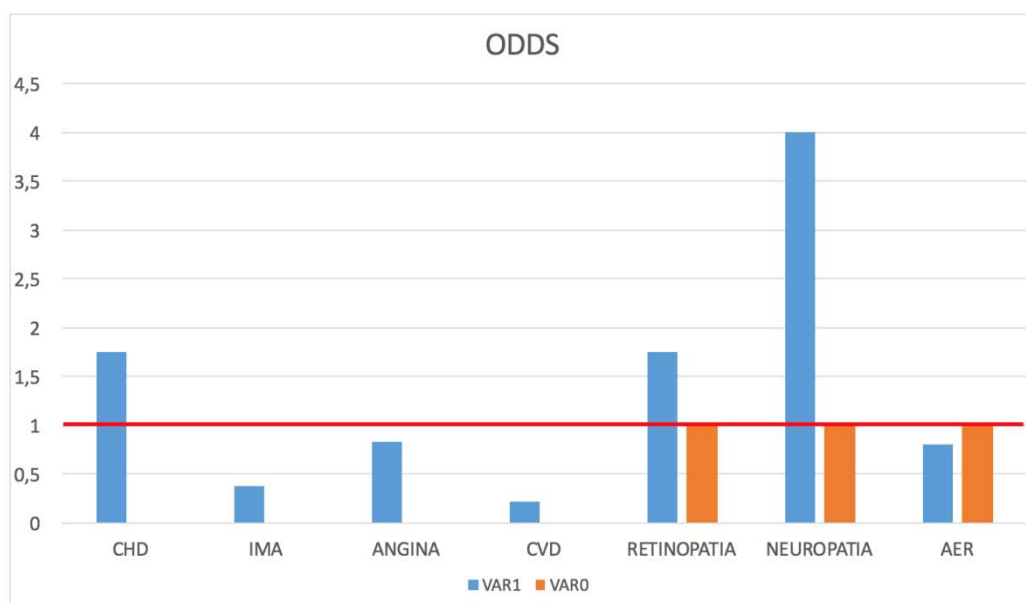


Figura 5.1 - Valori di odds misurati per i pazienti VAR1 e VAR0.

Da tale grafico si evince come il profilo del "paziente tipo" appartenente al gruppo VAR1 sia caratterizzato dalla presenza di coronaropatia, retinopatia e neuropatia (con un'incidenza maggiore), mentre non presenta CVD o storia pregressa di infarto. Per quanto riguarda invece angina e nefropatia, gli *odds* danno un risultato ~ 1 : ciò indica che per tali patologie la possibilità di esserne affetti è simile alla possibilità di non esserlo. Nel grafico di Figura 2 si mostra quanto pesano le varie patologie in termini di *odds* nel "paziente tipo" del gruppo VAR1.

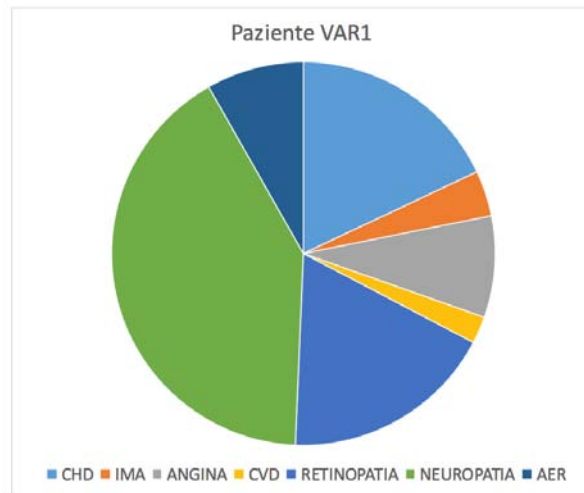


Figura 5.2 - Incidenza delle malattie considerate nel "paziente tipo" del gruppo VAR1.

Per quanto riguarda il gruppo VAR0, il "paziente tipo" è caratterizzato dall'assenza di tutte le patologie cardiache: CHD, IMA, ANGINA, CVD danno infatti tutti *odds* nullo. Per quanto riguarda le altre patologie (retinopatia, neuropatia e nefropatia) nulla si può dire sulla loro prevalenza in quanto il numero di casi favorevoli è uguale al numero di casi contrari, dando un *odds* pari a 1. Nel grafico di Figura 3 è rappresentato il profilo "paziente tipo" del gruppo VAR0".

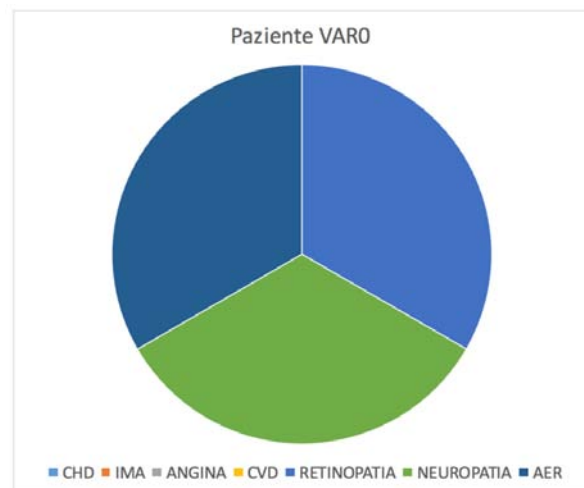


Figura 5.3 - Incidenza delle malattie considerate nel "paziente tipo" del gruppo VAR0.

Nella successiva valutazione degli OR, si ottengono i seguenti risultati:

Patologia	OR
CHD	21.6667
IMA	5.3529
ANGINA	11.00
CVD	3.42
RETINOPATIA	1.75
NEUROPATIA	4
AER	0.8

Tabella 5.3 – Odds Ratio per le patologie in esame.

Ciò significa che nei pazienti del gruppo VAR1 la prevalenza di CHD, IMA, ANGINA, CVD, RETINOPATIA, NEUROPATIA è tanto maggiore rispetto ai pazienti del gruppo VAR0 quanto maggiore dell'unità è il valore di OR. In particolare, l'associazione tra vasocostrizione compromessa e coronaropatia (CHD) è 21,67 volte più alta rispetto a quella con vasocostrizione efficace: pertanto, la coronaropatia è la malattia maggiormente associata alla presenza di un danno alla vasocostrizione. Meno rilevante è invece l'associazione della vasocostrizione compromessa a CVD e RETINOPATIA. Infine, per quanto riguarda AER, essendo $OR < 1$ si può concludere che essa è maggiormente associata ai pazienti del gruppo VAR0.

5.3 Analisi multivariata

L'analisi delle corrispondenze multiple fornisce un metodo per la riduzione delle variabili nel caso di variabili categoriali. Essa consiste nel calcolare la *matrice di Burt* a partire dalla matrice disgiuntiva completa D , secondo la formula $B = D'D$. Tale procedura è stata eseguita separatamente per i due gruppi di pazienti VAR1 e VAR0.

Nella matrice D , le righe rappresentano i pazienti: ciascuno di essi è stato associato ad un codice identificativo a tre cifre, la prima delle quali è 1 per il gruppo VAR1 e 0 per VAR0. I casi in cui non si aveva informazione sulla presenza o meno della malattia sono stati assunti come non caratterizzati dalla particolare patologia, e le caselle corrispondenti sono state quindi riempite con uno 0.

5.3.1 VARI

Per il gruppo dei pazienti con vasocostrizione compromessa (VAR1), la matrice D è ricavata dalla seguente tabella:

Paziente	CHD	IMA	ANGINA	CVD	RETIN	NEURO	AER
103	1	0	1	1	1	0	1
105	1	1	0	0	0	0	0
106	1	1	0	1	0	1	1
107	0	0	0	0	1	0	1
110	1	1	1	0	0	0	0
111	1	0	1	0	1	1	0
112	1	0	1	0	1	0	0
113	0	0	0	0	1	0	0
114	1	0	1	0	1	0	1
115	0	0	0	0	0	1	0
117	0	0	0	0	1	0	0

Tabella 5.4 – Tabella corrispondente alla matrice disgiuntiva D del gruppo VARI.

Dalla precedente tabella, eseguendo la moltiplicazione per la sua trasposta, si ottiene la matrice B :

$$B = D'D = \begin{bmatrix} 7 & 3 & 5 & 2 & 5 & 3 & 3 \\ 3 & 3 & 1 & 1 & 1 & 2 & 1 \\ 5 & 1 & 5 & 1 & 5 & 2 & 2 \\ 2 & 1 & 1 & 2 & 1 & 1 & 2 \\ 5 & 1 & 5 & 1 & 8 & 2 & 3 \\ 3 & 2 & 2 & 1 & 2 & 4 & 1 \\ 3 & 1 & 2 & 2 & 3 & 1 & 4 \end{bmatrix}$$

Convertendo quest'ultima in tabella, si possono valutare le corrispondenze tra le diverse patologie:

	CHD	IMA	ANGINA	CVD	RETIN	NEURO	AER
CHD	7	3	5	2	5	3	3
IMA	3	3	1	1	1	2	1
ANGINA	5	1	5	1	5	2	2
CVD	2	1	1	2	1	1	2
RETIN	5	1	5	1	8	2	3
NEURO	3	2	2	1	2	4	1
AER	3	1	2	2	3	1	4

Tabella 5.5 – Tabella relativa alla matrice B per il gruppo VARI.

Gli elementi sulla diagonale principale rappresentano il numero dei pazienti che presentano la patologia specifica. Le corrispondenze che si verificano maggiormente sono coronaropatia (CHD)-angina con 5 pazienti su 11, coronaropatia-retinopatia con 5 su 11, e angina-retinopatia con 5 su 11.

5.3.2 VAR0

Per il gruppo di pazienti con vasocostrizione efficace (VAR 0), la tabella da cui si ricava la matrice D si costruisce come segue:

Paziente	CHD	IMA	ANGINA	CVD	RETIN	NEURO	AER
001	0	0	0	0	0	1	1
002	0	0	0	0	1	1	0
004	0	0	0	0	0	0	0
008	0	0	0	0	1	0	1
009	0	0	0	0	0	0	0
016	0	0	0	0	1	0	1

Tabella 5.6 – Tabella corrispondente alla matrice disgiuntiva D per il gruppo VAR0.

Eseguendo la moltiplicazione della matrice per la sua trasposta, si ottiene la matrice di Burt:

$$B = D'D = \begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 3 & 1 & 2 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 2 & 1 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 2 & 1 & 3 \end{bmatrix}$$

Convertendo quest'ultima in tabella, si possono valutare le corrispondenze tra le diverse patologie:

	CHD	IMA	ANGINA	CVD	RETIN	NEURO	AER
CHD	0	0	0	0	0	0	0
IMA	0	0	0	0	0	0	0
ANGINA	0	0	0	0	0	0	0
CVD	0	0	0	0	0	0	0
RETIN	0	0	0	0	3	1	2
NEURO	0	0	0	0	1	2	1
AER	0	0	0	0	2	1	3

Tabella 5.7 – Tabella relativa alla matrice B per il gruppo VAR0.

Per tale gruppo di pazienti, caratterizzato dalla totale assenza di patologie cardiache, le patologie locali si distribuiscono in maniera abbastanza uniforme nei vari soggetti.

5.4 Analisi VAR1 vs VAR0

Dopo l'applicazione della WT si sono valutate eventuali differenze significative tra clinostatismo e ortostatismo nei parametri di *Ampiezza* e *Potenza Assolute e Relative*, per ciascuna banda di interesse e per ogni gruppo di pazienti.

La prima analisi è stata fatta nei due macrogruppi VAR1 (11 pazienti) e VAR0 (6 pazienti). Per ciascun gruppo si riportano i boxplot per i quattro parametri analizzati; su tali grafici sono segnalati i *p-value* ottenuti con il t-test per le bande in cui si è riscontrata una differenza significativa. Sono inoltre riportate tabelle riassuntive della significatività riscontrata.

5.4.1 VAR1

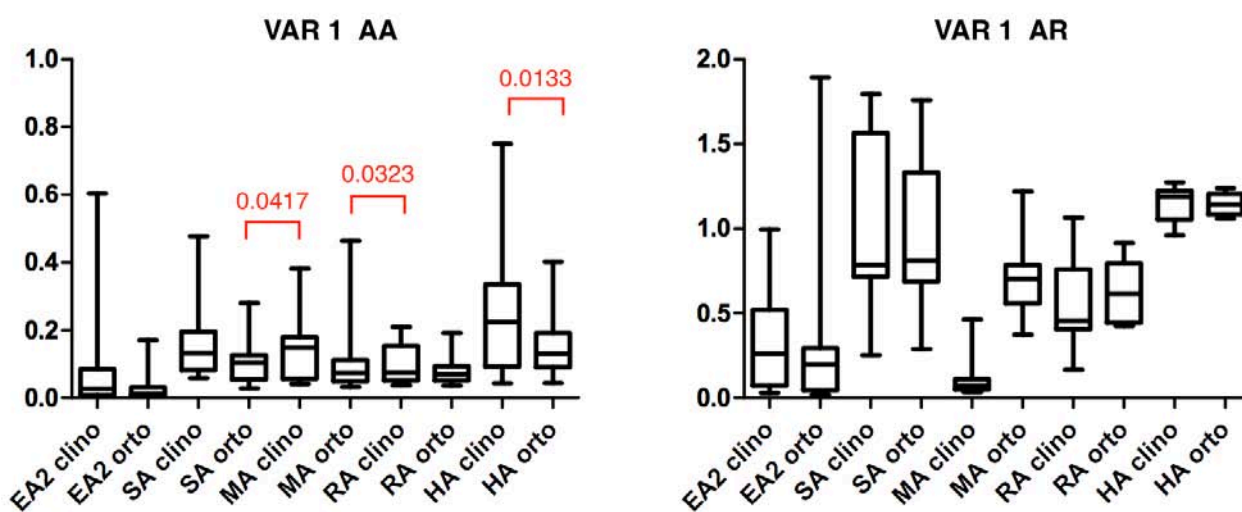


Figura 5.4 – Boxplot per i parametri di Ampiezza Assoluta (*sx*) e Relativa (*dx*) nel gruppo VAR1.

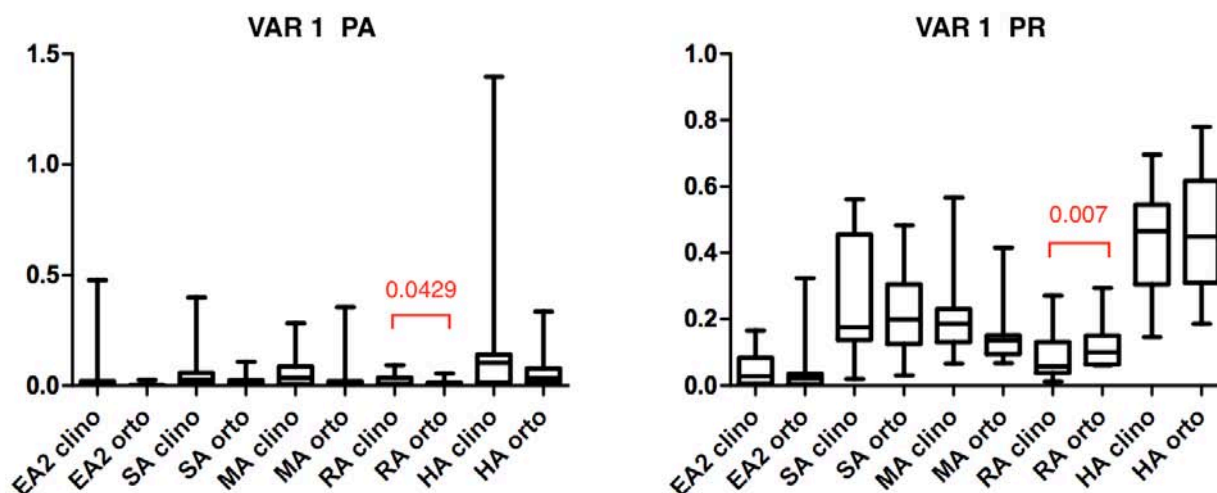


Figura 5.5 – Boxplot per i parametri di Potenza Assoluta (sx) e Relativa (dx) nel gruppo VAR1.

Le differenze significative sono riassunte nella Tabella 5.8. È importante sottolineare come tali variazioni siano dovute al diverso contributo che la particolare banda, associata ad una specifica attività di una struttura del sistema cardiovascolare, ha nel parametro in esame. Ad esempio, nell’Ampiezza Assoluta si ha una importante diminuzione del contributo dell’attività cardiaca nel passaggio da clinostatismo ad ortostatismo.

Banda	AA	AR	PA	PR
HA	0.0133			
RA			0.0429	0.007
MA	0.0323			
SA	0.0417			
EA2				

Tabella 5.8 – Differenze significative del gruppo VAR1.

5.4.2 VAR0

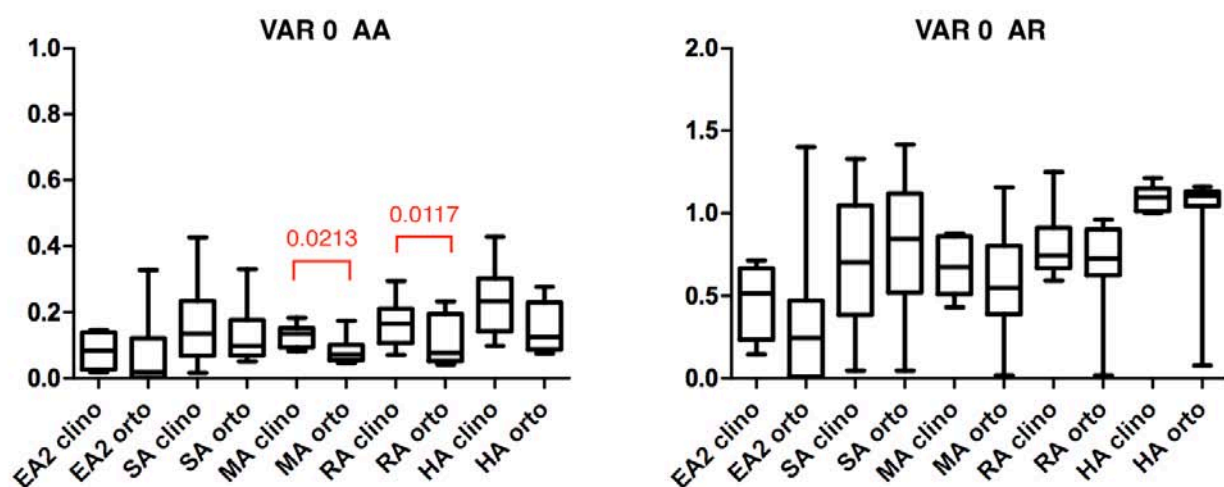


Figura 5.6 – Boxplot per i parametri di Ampiezza Assoluta (sx) e Relativa (dx) per il gruppo VAR0.

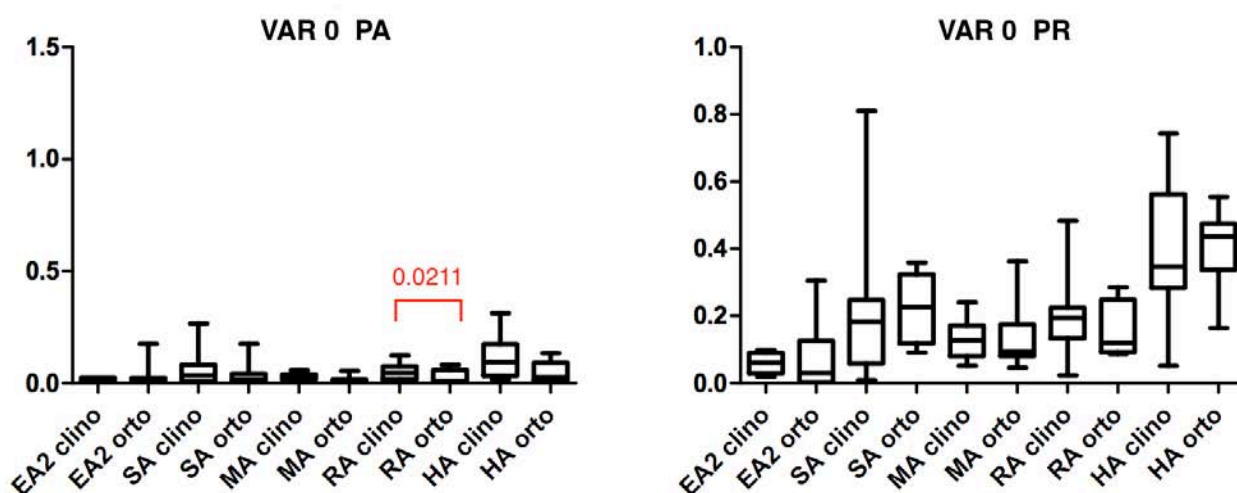


Figura 5.6 – Boxplot per i parametri di Potenza Assoluta (sx) e Relativa (dx) per il gruppo VAR0.

Banda	AA	AR	PA	PR
HA				
RA	0.0117		0.0211	
MA	0.0213			
SA				
EA2				

Tabella 5.9 – Differenze significative nel gruppo VAR0.

5.4.3 Commento ai risultati

In termini del tutto generali, si è notato che nei pazienti con vasocostrizione compromessa (VAR1) si produce una significativa riduzione di alcune delle attività cardiovascolari, mentre nel gruppo di pazienti con vasocostrizione non compromessa (VAR0) le variazioni sono meno evidenti. L'analisi in frequenza rivela pertanto un andamento opposto rispetto a quello riscontrato nell'analisi della perfusione nel tempo, dal momento che nei pazienti VAR1 la riduzione di flusso è meno accentuata rispetto ai pazienti VAR0.

5.5 Analisi delle patologie nel gruppo VAR1

Di seguito sono riportati boxplot e tabelle relativi alla suddivisione dei pazienti del gruppo VAR1 sulla base delle diverse patologie. Rispetto alle precedenti analisi, sono state escluse neuropatia e Cardio-Vascular Disease (CVD) poiché presentano un numero insufficiente di pazienti per poter effettuare un'analisi statistica affidabile.

5.5.1 Coronaropatia: CHD1 (7 pazienti) vs CHD0 (4 pazienti)

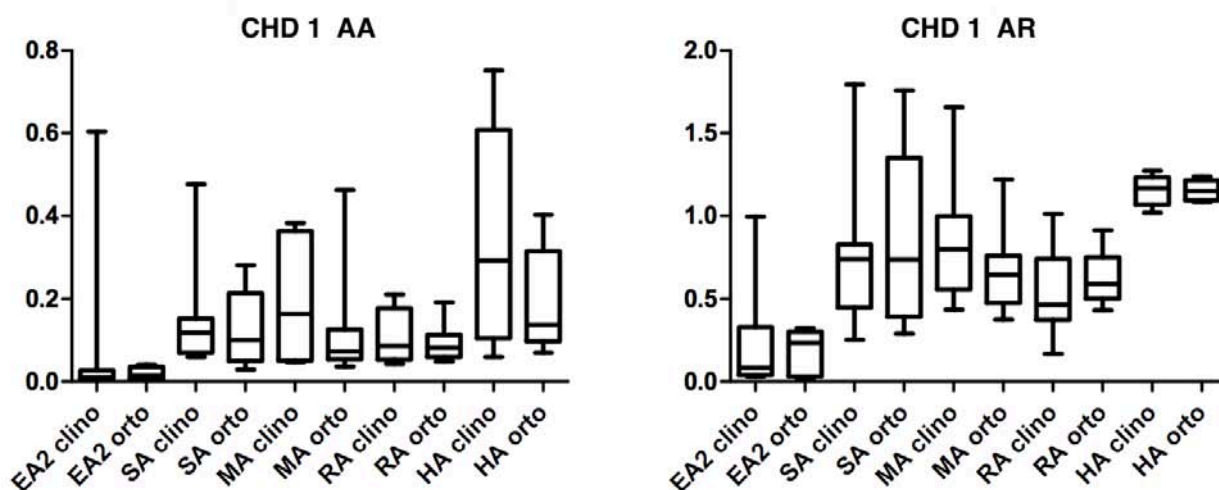


Figura 5.7 – Boxplot per i parametri di Ampiezza Assoluta (sx) e Relativa (dx) per il gruppo CHD1.

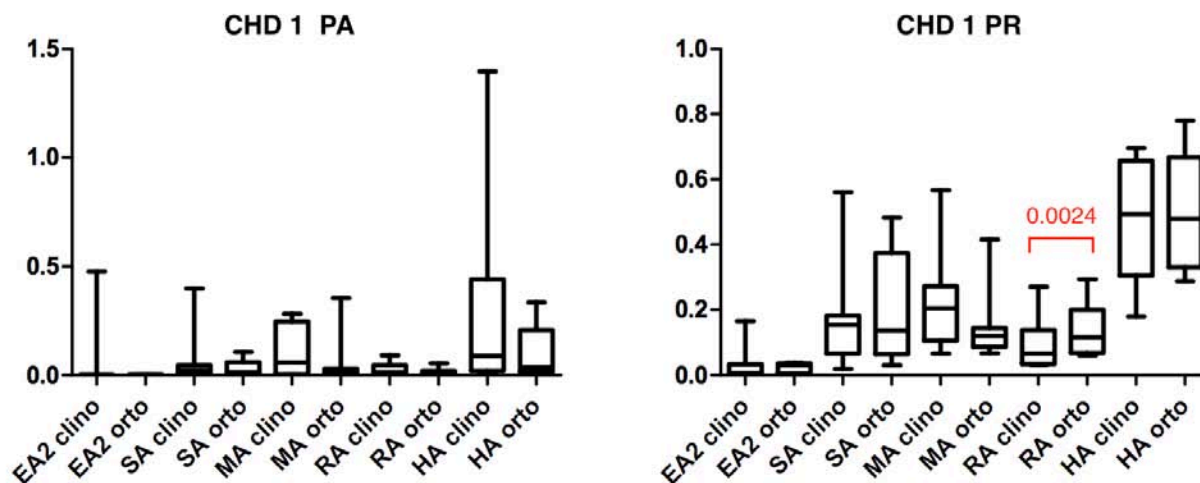


Figura 5.8 – Boxplot per i parametri di Potenza Assoluta (sx) e Relativa (dx) per il gruppo CHD1.

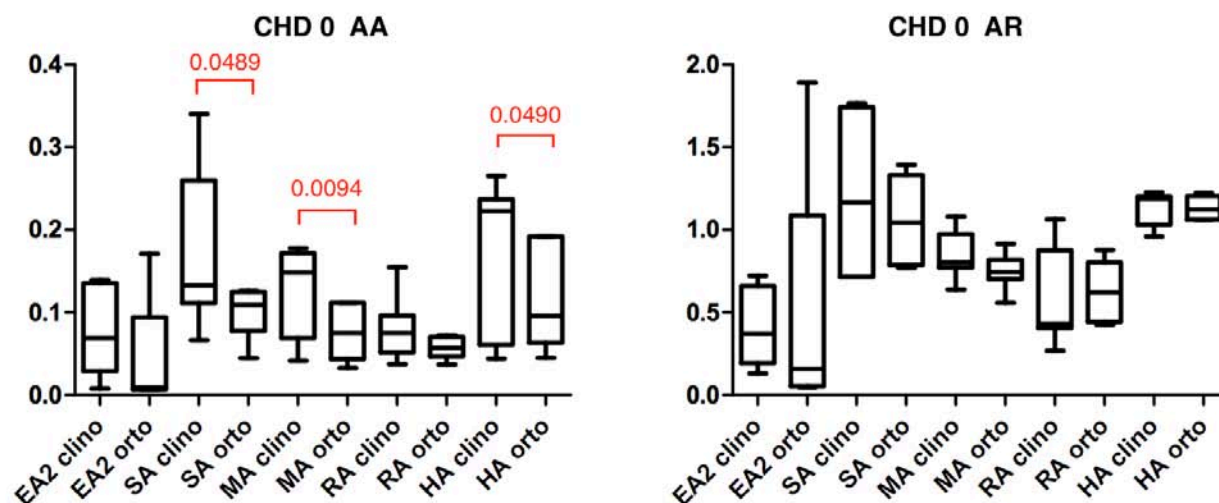


Figura 5.9 – Boxplot per i parametri di Ampiezza Assoluta (sx) e Relativa (dx) per il gruppo CHD0.

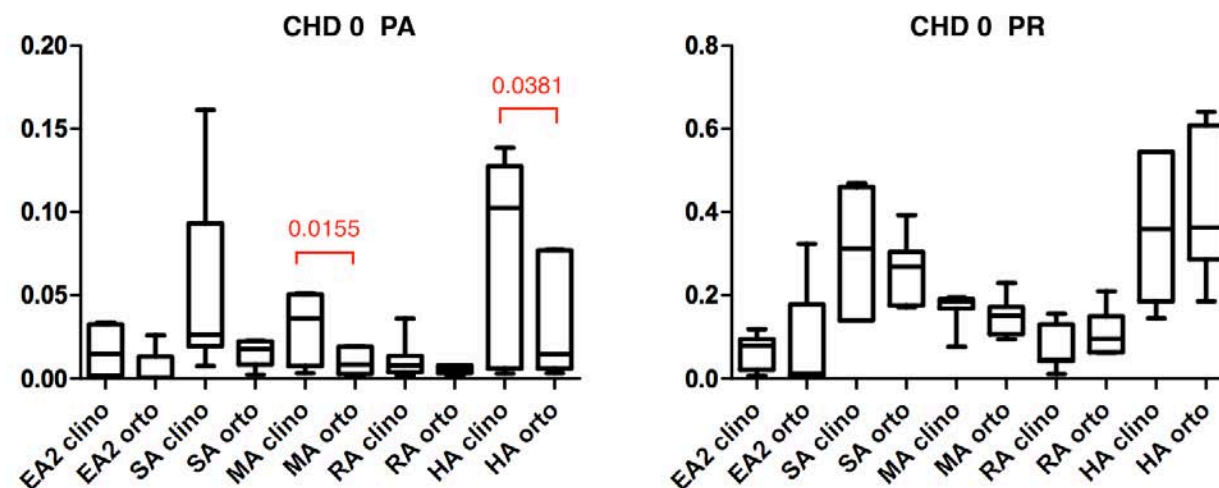


Figura 5.10 – Boxplot per i parametri di Potenza Assoluta (sx) e Relativa (dx) per il gruppo CHD0.

Banda	AA	AR	PA	PR
HA				
RA				0.0024
MA				
SA				
EA2				

Banda	AA	AR	PA	PR
HA	0.0490		0.0381	
RA				
MA	0.0094		0.0155	
SA	0.0489			
EA2				

Tabella 5.10 – Differenze significative (p value < 0.05) in CHD1 e CHD0.

5.5.2 Infarto: IMA1 (3 pazienti) vs IMA0 (8 pazienti)

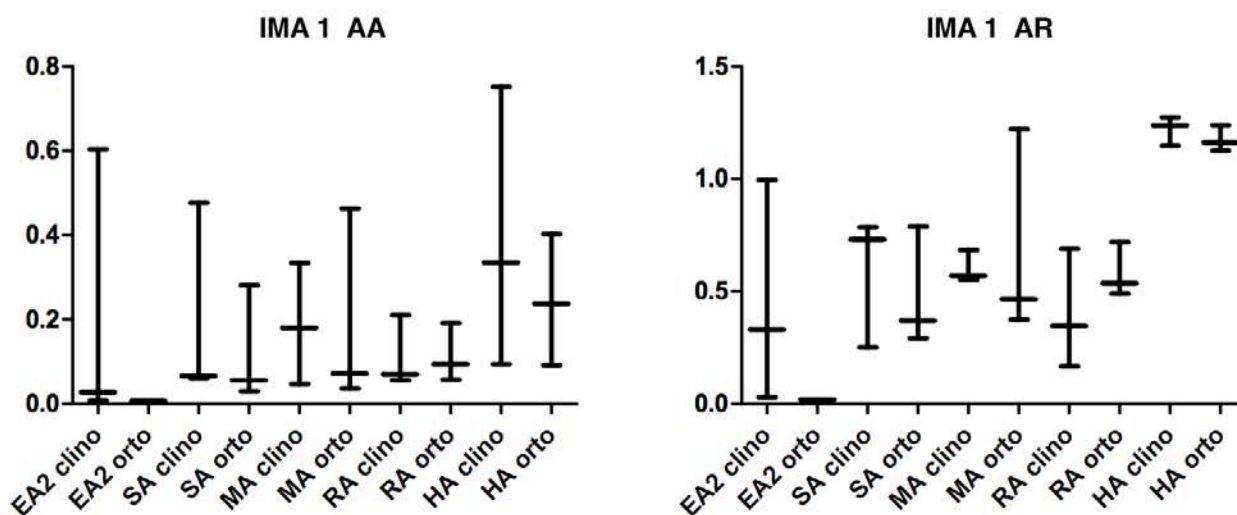


Figura 5.11 – Boxplot per i parametri di Ampiezza Assoluta (sx) e Relativa (dx) per il gruppo IMA1.

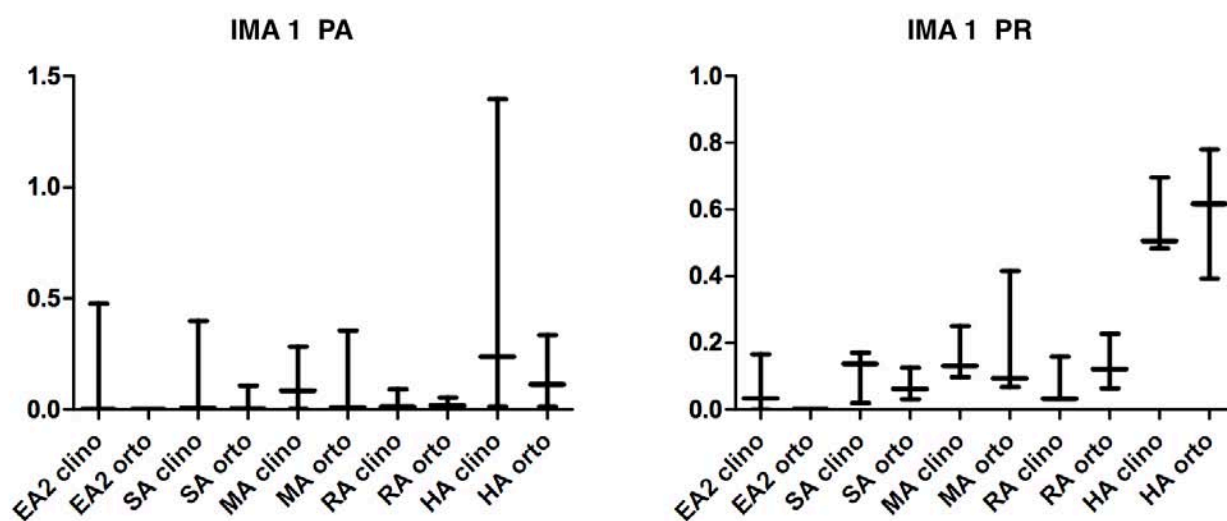


Figura 5.12 – Boxplot per i parametri di Potenza Assoluta (sx) e Relativa (dx) per il gruppo IMA1.

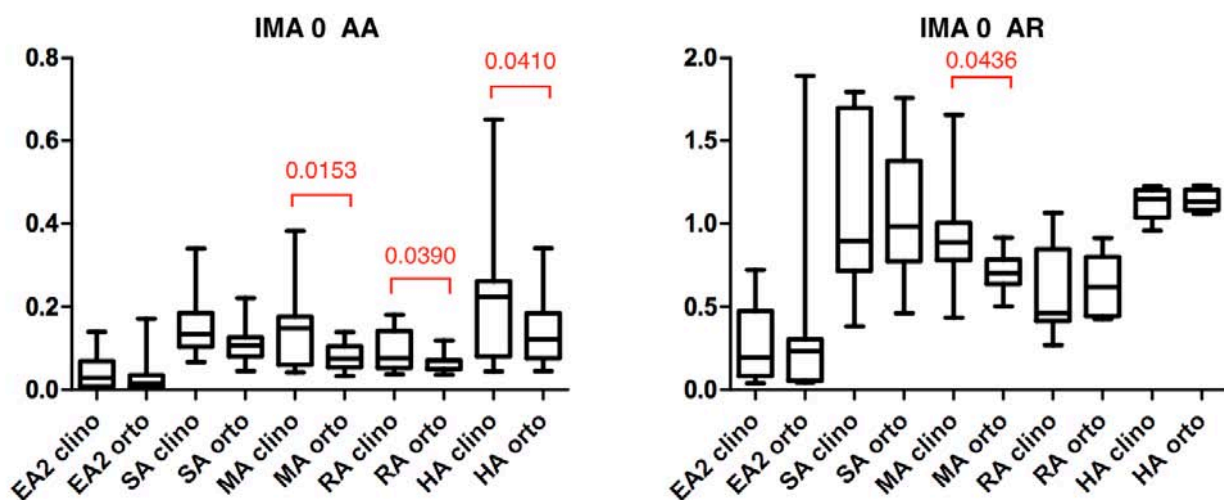


Figura 5.13 – Boxplot per i parametri di Ampiezza Assoluta (sx) e Relativa (dx) per il gruppo IMA0.

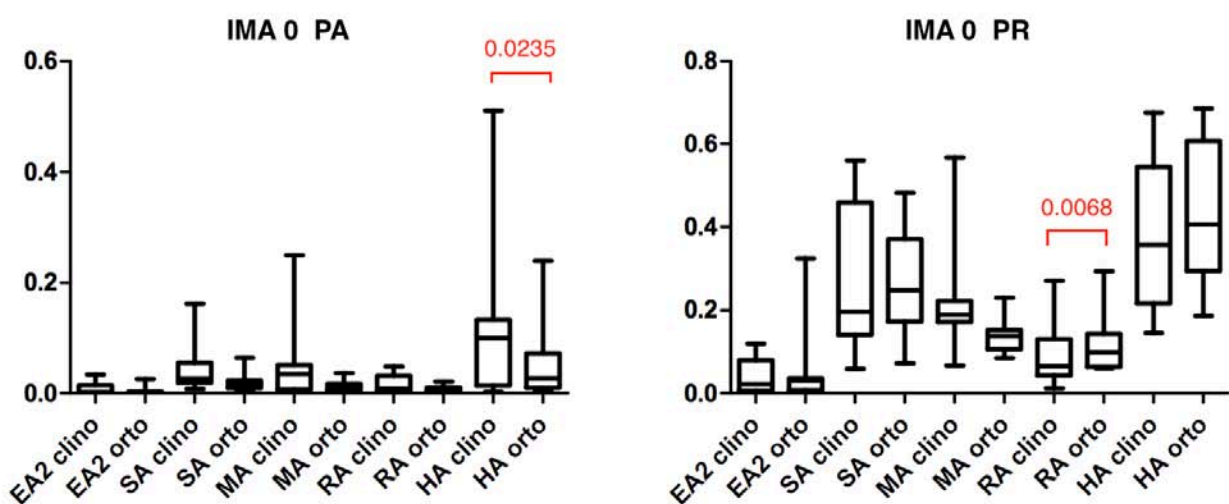


Figura 5.14 – Boxplot per i parametri di Potenza Assoluta (sx) e Relativa (dx) per il gruppo IMA0.

IMA 1				
Banda	AA	AR	PA	PR
HA				
RA				
MA				
SA				
EA2				

IMA 0				
Banda	AA	AR	PA	PR
HA	0.0410		0.0235	
RA	0.0390			0.0068
MA	0.0153	0.0436		
SA				
EA2				

Tabella 5.11 – Differenze significative (p value < 0.05) in IMA1 e IMA0.

5.5.3 Angina: ANGINA1 (5 pazienti) vs ANGINA0 (6 pazienti)

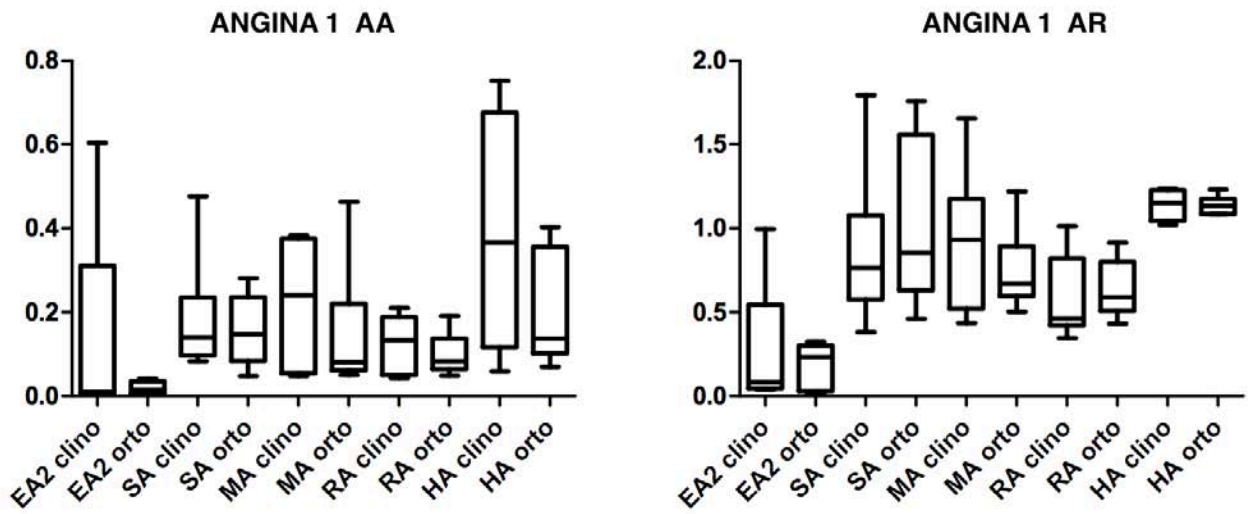


Figura 5.15 – Boxplot per i parametri di Ampiezza Assoluta (sx) e Relativa (dx) per il gruppo ANGINA1.

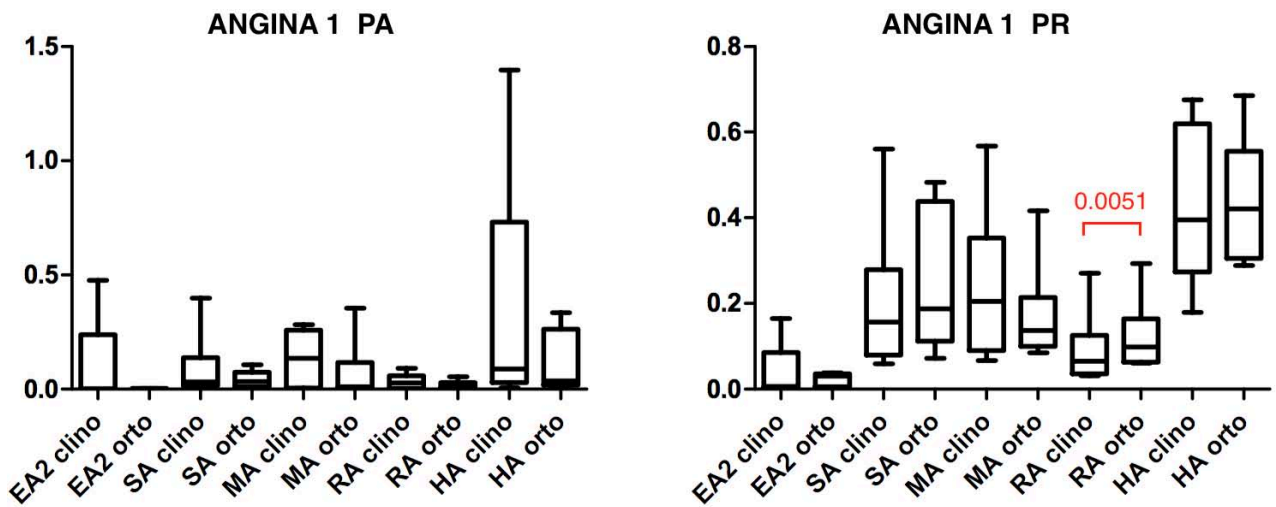


Figura 5.16 – Boxplot per i parametri di Potenza Assoluta (sx) e Relativa (dx) per il gruppo ANGINA0.

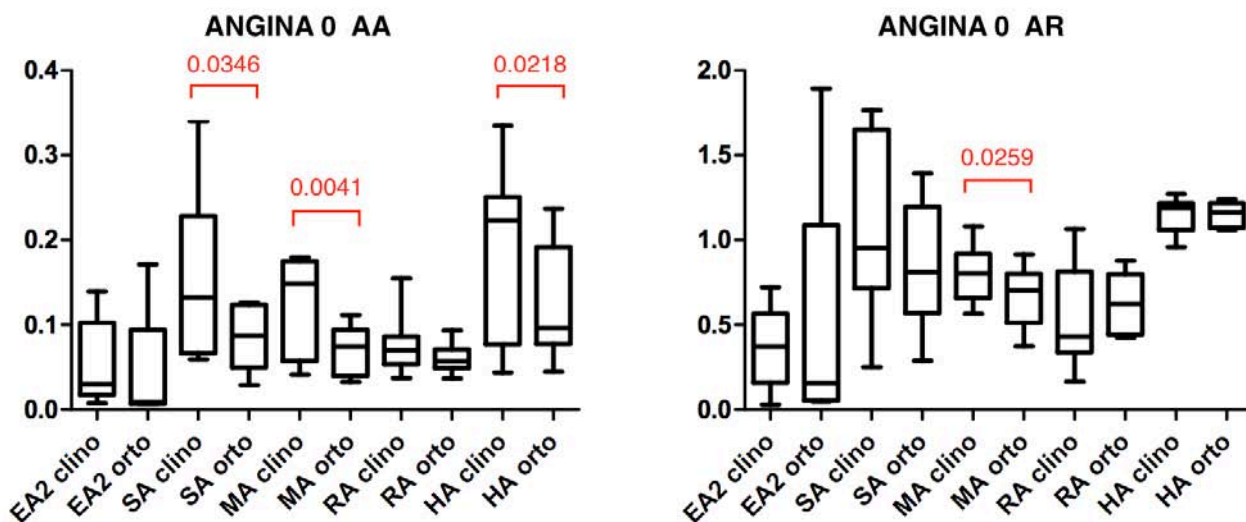


Figura 5.17 – Boxplot per i parametri di Ampiezza Assoluta (sx) e Relativa (dx) per il gruppo ANGINA0.

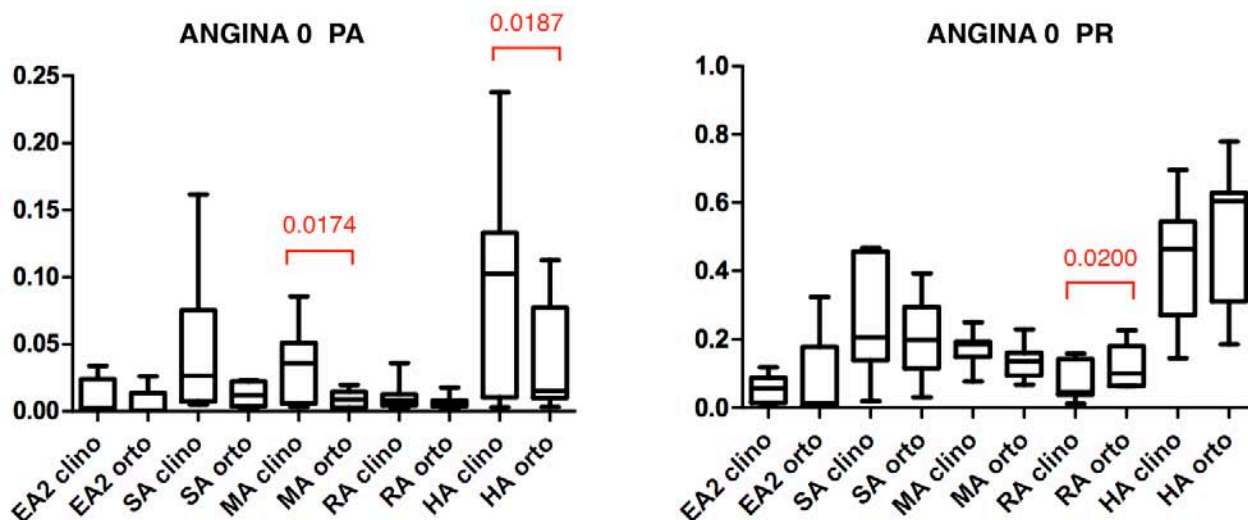


Figura 5.18 – Boxplot per i parametri di Potenza Assoluta (sx) e Relativa (dx) per il gruppo ANGINA0.

ANG 1				
Banda	AA	AR	PA	PR
HA				
RA				0.0051
MA				
SA				
EA2				

ANG 0				
Banda	AA	AR	PA	PR
HA	0.0218		0.0187	
RA				0.0200
MA	0.0041	0.0259	0.0174	
SA	0.0346			
EA2				

Tabella 5.12 – Differenze significative (p value < 0.05) in ANGINA1 e ANGINA0.

5.5.4 Retinopatia: RETINOPATIA1 (7 pazienti) vs RETINOPATIA0 (4 pazienti)

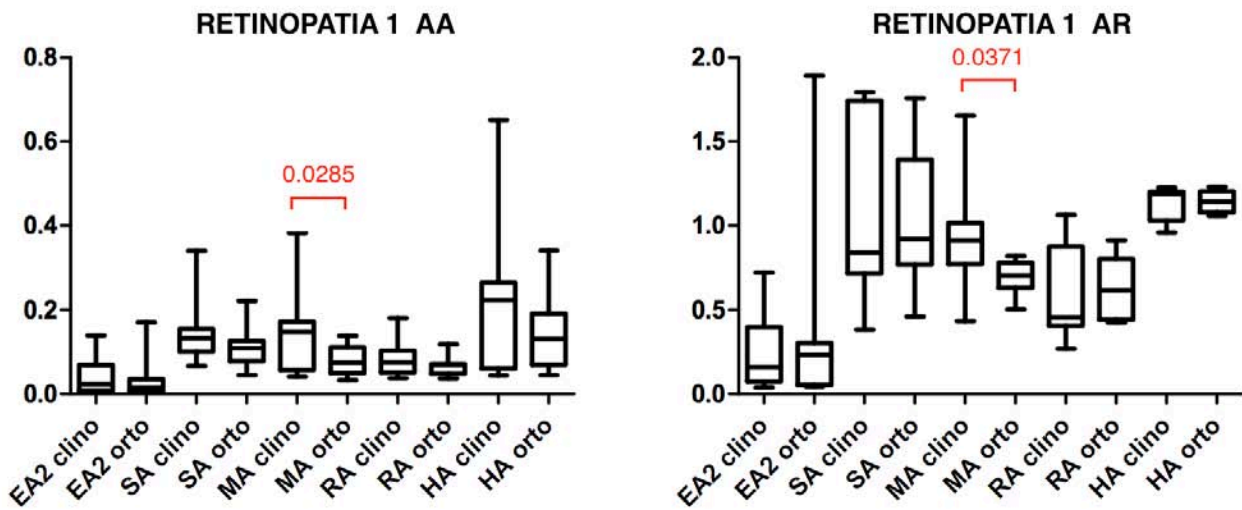


Figura 5.19 – Boxplot per i parametri di Ampiezza Assoluta (sx) e Relativa (dx) per il gruppo RETINOPATIA1.

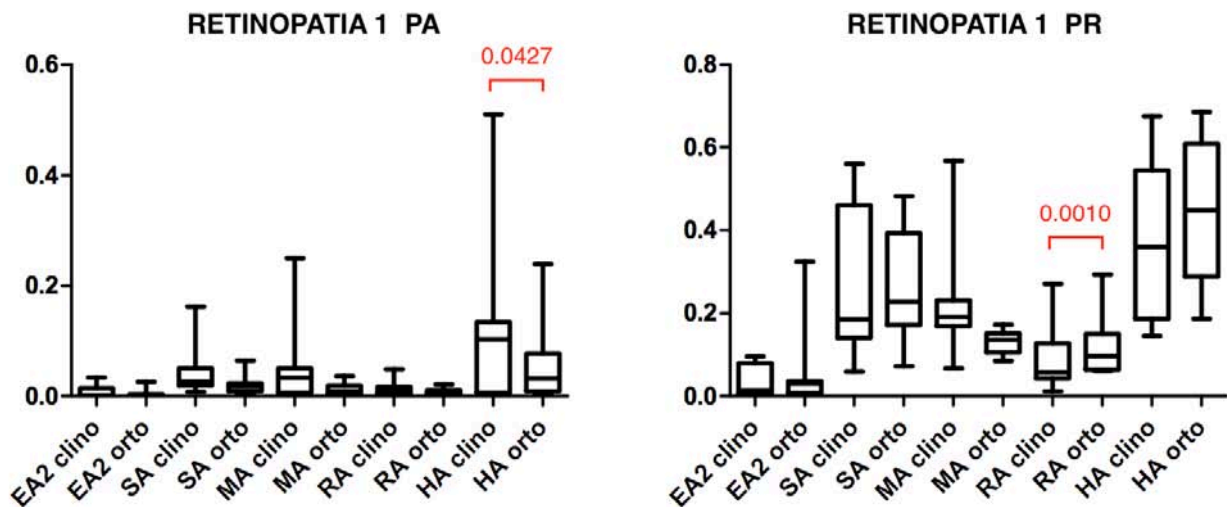


Figura 5.20 – Boxplot per i parametri di Potenza Assoluta (sx) e Relativa (dx) per il gruppo RETINOPATIA1.

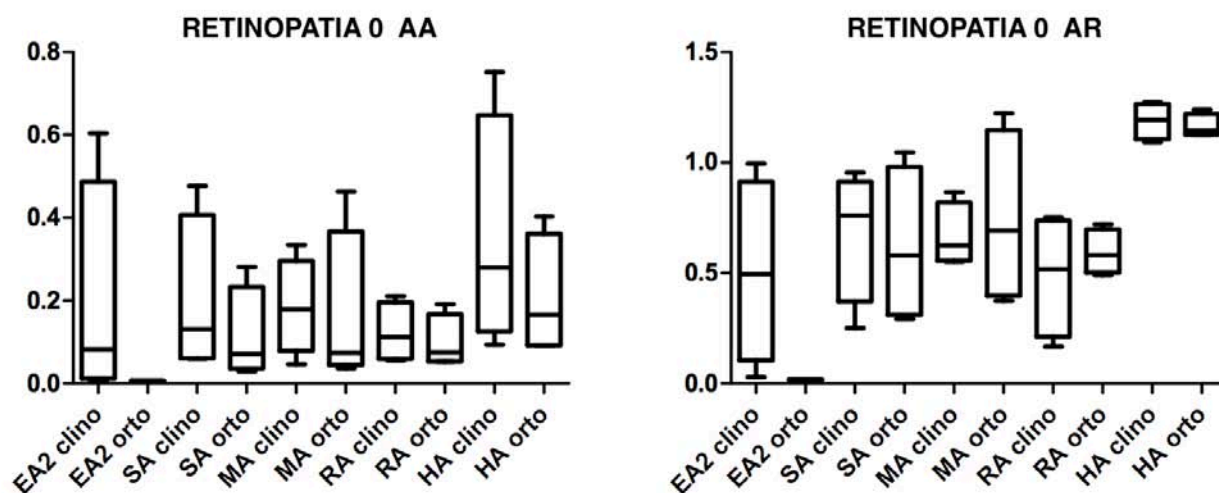


Figura 5.21 – Boxplot per i parametri di Ampiezza Assoluta (*sx*) e Relativa (*dx*) per il gruppo RETINOPATIA0.

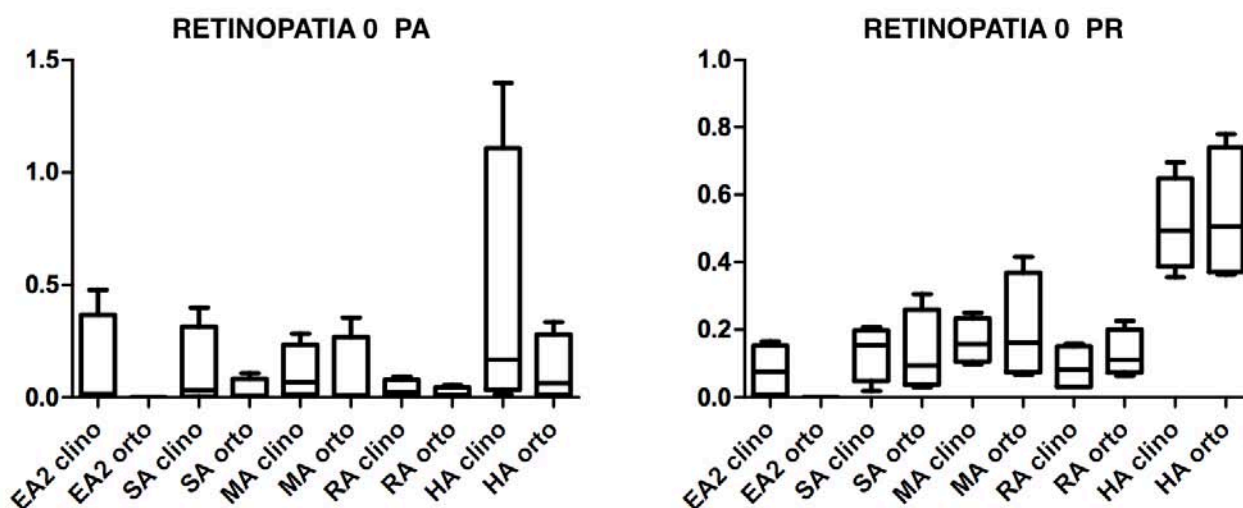


Figura 5.22 – Boxplot per i parametri di Potenza Assoluta (*sx*) e Relativa (*dx*) per il gruppo RETINOPATIA0.

RET 1				
Banda	AA	AR	PA	PR
HA			0.0427	
RA				0.0100
MA	0.0285	0.0371		
SA				
EA2				

RET 0				
Banda	AA	AR	PA	PR
HA				
RA				
MA				
SA				
EA2				

Tabella 5.13 – Differenze significative (*p value* < 0.05) in RETINOPATIA1 e RETINOPATIA0.

5.5.5 Nefropatia: AER1 (4 pazienti) vs AER0 (5 pazienti)

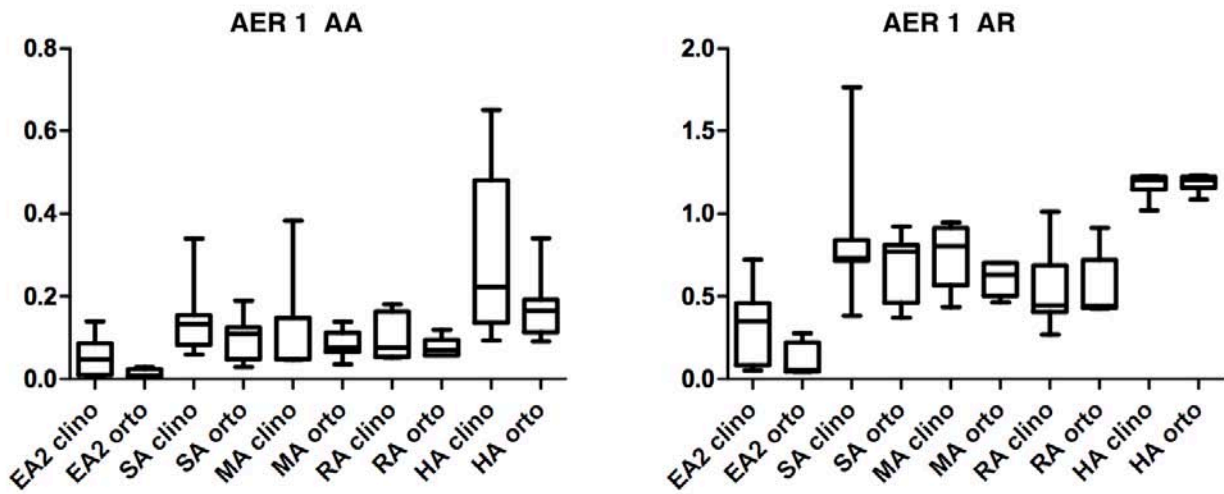


Figura 5.23 – Boxplot per i parametri di Ampiezza Assoluta (sx) e Relativa (dx) per il gruppo AER1.

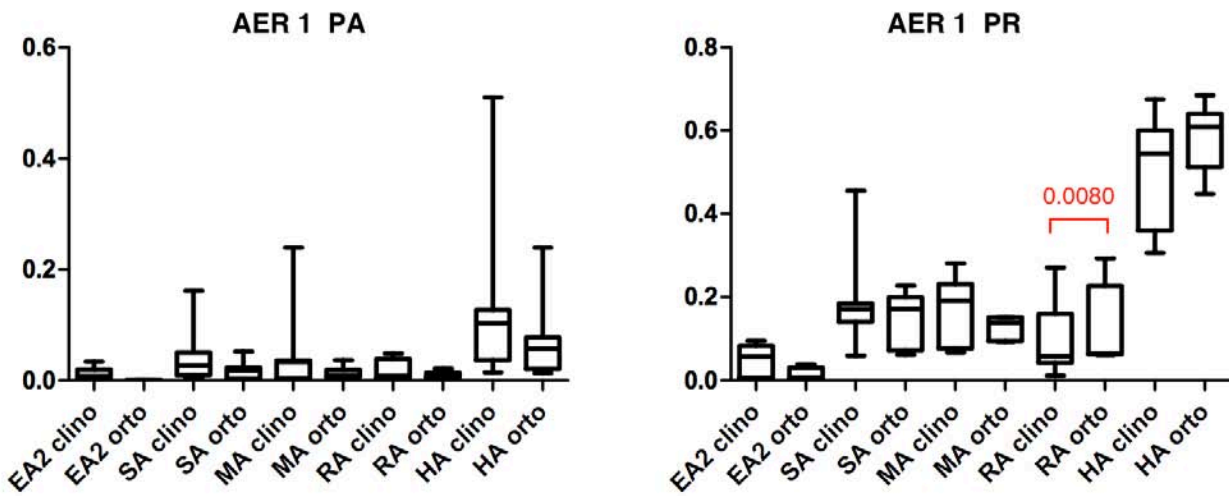


Figura 5.24 – Boxplot per i parametri di Potenza Assoluta (sx) e Relativa (dx) per il gruppo AER1.

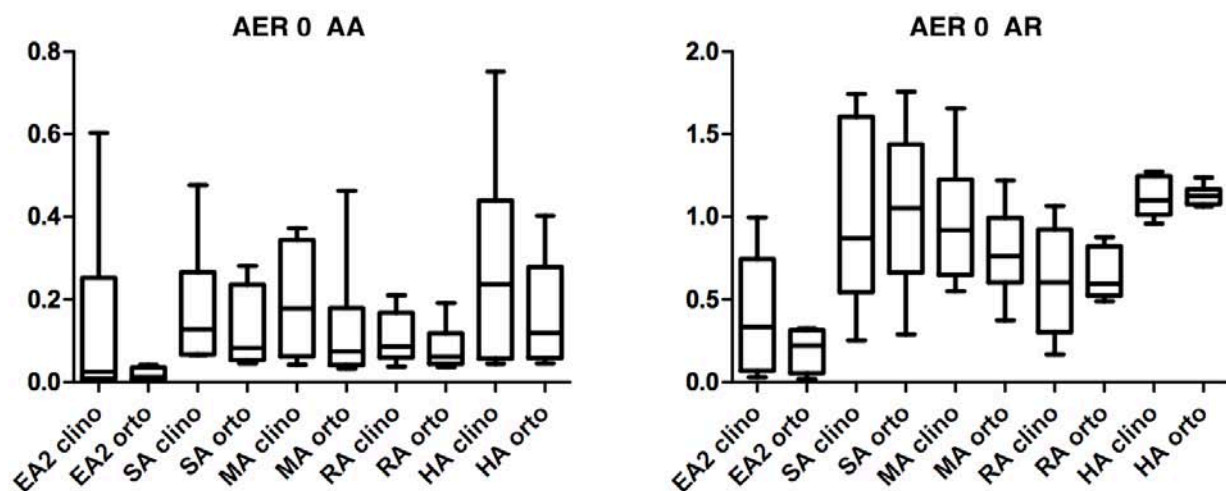


Figura 5.25 – Boxplot per i parametri di Ampiezza Assoluta (sx) e Relativa (dx) per il gruppo AER0.

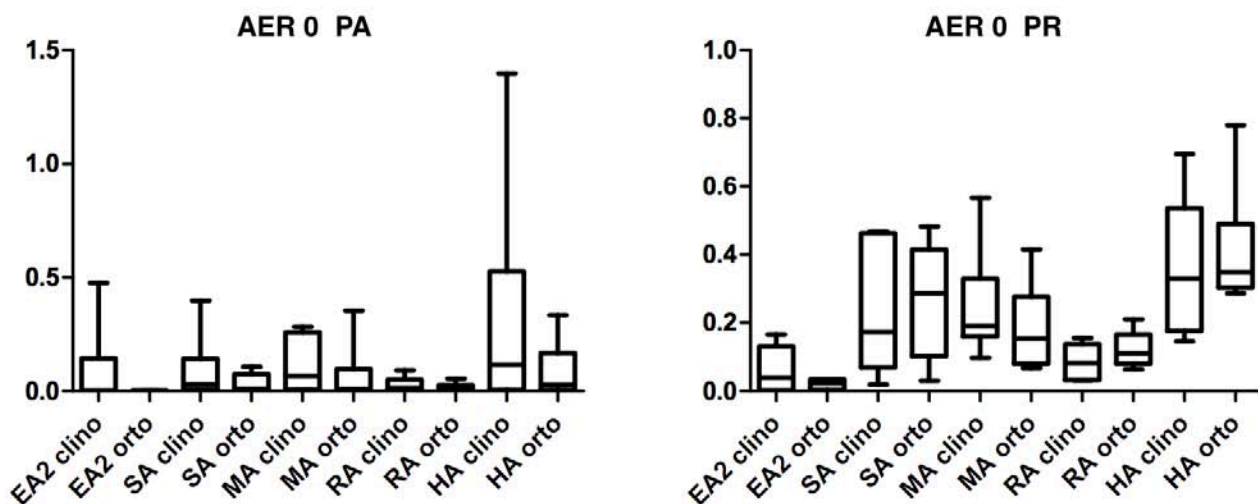


Figura 5.26 – Boxplot per i parametri di Potenza Assoluta (sx) e Relativa (dx) per il gruppo AER0.

RET 1				
Banda	AA	AR	PA	PR
HA				
RA				0.0080
MA				
SA				
EA2				

RET 0				
Banda	AA	AR	PA	PR
HA				
RA				
MA				
SA				
EA2				

Tabella 5.13 – Differenze significative (p value < 0.05) in AER1 e AER0.

5.5.6 Commento ai risultati

La prima patologia analizzata è la coronaropatia (CHD). A livello di flusso, si è notato che tutti i pazienti con coronaropatia presentano vasocostrizione ortostatica compromessa. Se si analizzano i segnali in frequenza, si vede come il gruppo di pazienti che presenta le riduzioni significative nei parametri analizzati e che quindi rispecchia il comportamento del macrogruppo con vasocostrizione patologica, è quello classificato come CHD 0, ovvero i non coronaropatici.

Lo stesso comportamento si evidenzia per le altre cardiopatie considerate (IMA, ANGINA, CVD): le diminuzioni significative dei contributi delle frequenze riguardano i pazienti che non presentano la specifica patologia.

Andando invece a considerare le patologie “locali” come nefropatia (AER) e retinopatia, si nota un comportamento diverso rispetto alle cardiopatie considerate in precedenza. Infatti, in questo caso i gruppi di pazienti che manifestano danno a carico della retina presentano riduzioni significative delle componenti analizzate in frequenza, mentre lo stesso fatto non si verifica nei soggetti che non presentano tale patologia.

Per quanto riguarda la nefropatia, si ha una sola variazione significativa nel parametro di potenza relativa, riscontrata nel gruppo di soggetti AER1, caratterizzati dunque da tale patologia.

Si è quindi visto come un danno locale al microcircolo periferico, che si può rilevare da una compromissione della vasocostrizione e, dal punto di vista delle frequenze, da una riduzione significativa dei parametri analizzati, può essere associato anche ad altri tipi di patologie, sempre “locali”. Lo stesso non può dirsi per le cardiopatie, che presentano un comportamento “opposto”, manifestando significatività nella differenza tra clinostatismo e ortostatismo nei soggetti non caratterizzati dalla patologia in esame.

5.6 Confronto per bande

Dopo aver analizzato le differenze nel passaggio da clinostatismo a ortostatismo, è stato effettuato un confronto per bande, valutando le eventuali differenze significative tra due gruppi di pazienti (ad esempio VAR1 e VAR0) confrontandoli prima in clinostatismo e poi in ortostatismo. Tale analisi è stata svolta con *unpaired* t-test in quanto si sono confrontati gruppi composti da un numero diverso di soggetti. Sono state esaminate tutte le patologie nominate in precedenza, escluso CVD poiché il gruppo CVD1 è formato da soli 2 pazienti; di seguito sono riportate le tabelle (da Tabella 5.14 a Tabella 5.19) in cui la differenza significativa è segnalata dal valore del *p-value*. Per ciascun gruppo di pazienti è inoltre indicata la numerosità. In Appendice A sono riportati anche i boxplot per ciascuna casistica di analisi.

VAR 1 (11 pazienti) vs VAR 0 (6 pazienti)

CLINO					ORTO				
Banda	AA	AR	PA	PR	Banda	AA	AR	PA	PR
HA					HA				
RA	0.0155	0.0398	0.0304	0.0102	RA				
MA					MA				
SA					SA				
EA2					EA2				

Tabella 5.14 – Differenze significative (p value < 0.05) in VAR1 e VAR0 tra clino e ortostatismo.

CHD 1 (7 pazienti) vs CHD 0 (4 pazienti)

CLINO					ORTO				
Banda	AA	AR	PA	PR	Banda	AA	AR	PA	PR
HA					HA				
RA					RA				
MA					MA				
SA					SA				
EA2					EA2				

Tabella 5.15 – Differenze significative (p value < 0.05) in CHD1 e CHD0 tra clino e ortostatismo.

IMA 1 (3 pazienti) vs IMA 0 (8 pazienti)

CLINO					ORTO				
Banda	AA	AR	PA	PR	Banda	AA	AR	PA	PR
HA					HA				
RA					RA			0.0303	
MA					MA				
SA					SA		0.0334		0.0227
EA2					EA2				

Tabella 5.16 – Differenze significative (p value < 0.05) in IMA1 e IMA0 tra clino e ortostatismo.

ANGINA 1 (5 pazienti) vs ANGINA 0 (6 pazienti)

CLINO					ORTO				
Banda	AA	AR	PA	PR	Banda	AA	AR	PA	PR
HA					HA				
RA					RA				
MA			0.0416		MA				
SA					SA			0.0477	
EA2					EA2				

Tabella 5.17 – Differenze significative (p value < 0.05) in ANGINA1 e ANGINA0 tra clino e ortostatismo.

RETINOPATIA 1 (7 pazienti) vs RETINOPATIA 0 (4 pazienti)

CLINO					ORTO				
Banda	AA	AR	PA	PR	Banda	AA	AR	PA	PR
HA					HA				
RA					RA				
MA					MA				
SA					SA				
EA2					EA2				

Tabella 5.18 – Differenze significative (p value < 0.05) in RETINOPATIA1 e RETINOPATIA0 tra clino e ortostatismo.

AER 1 (4 pazienti) vs AER 0 (5 pazienti)

CLINO					ORTO				
Banda	AA	AR	PA	PR	Banda	AA	AR	PA	PR
HA					HA				0.0420
RA					RA				
MA					MA				
SA					SA				
EA2					EA2				

Tabella 5.19 – Differenze significative (p value < 0.05) in VAR1 e VAR0 tra clino e ortostatismo.

5.6.1 Commento ai risultati

Nell'analisi della totalità dei pazienti suddivisi sulla base della vasocostrizione, si nota che le differenze significative sono limitate alla banda respiratoria analizzata in clinostatismo, per tutti i parametri di interesse.

Per le cardiopatie si può notare come le differenze significative, ove presenti, siano limitate ai parametri di potenza tranne in un caso: in ortostatismo l'indice IMA presenta una variazione significativa nel parametro di ampiezza relativa nella banda neurogena (SA).

Per quanto riguarda la coronaropatia, l'analisi separata dei due gruppi aveva evidenziato una marcata presenza di differenze significative nel gruppo di soggetti CHD0; tali differenze però non si ripropongono in questa analisi, che infatti ha come risultato un'assenza di variazioni significative nel confronto clino-clino come in quello orto-orto. Si potrebbe pertanto concludere che la differenza per quanto riguarda questa patologia non è tanto nei due segnali in clinostatismo o nei due segnali in ortostatismo presi separatamente, quanto proprio nel passaggio dall'uno all'altro.

Lo stesso si può dire per le patologie locali, in quanto, eccetto un valore significativo trovato in ortostatismo nella potenza relativa della banda HA per la nefropatia, non sono state riscontrate variazioni significative negli altri parametri e nelle altre bande, né per la retinopatia né per la nefropatia stessa.

5.7 PCA

Di seguito vengono riportati due grafici rappresentativi delle due analisi svolte, per il parametro di Ampiezza Assoluta. La prima analisi è svolta separatamente per clinostatismo e ortostatismo, nel tentativo di separare i pazienti sulla base delle patologie (Figura 5.27 e Figura 5.28). Per la seconda, i pazienti vengono suddivisi in VAR1 e VAR0 e per entrambi i gruppi si tenta di separare i valori in clinostatismo dai valori in ortostatismo (Figura 5.29 e Figura 5.30). I grafici ottenuti per gli altri parametri (Ampiezza Relativa, Potenza Assoluta e Relativa) sono riportati in Appendice B.

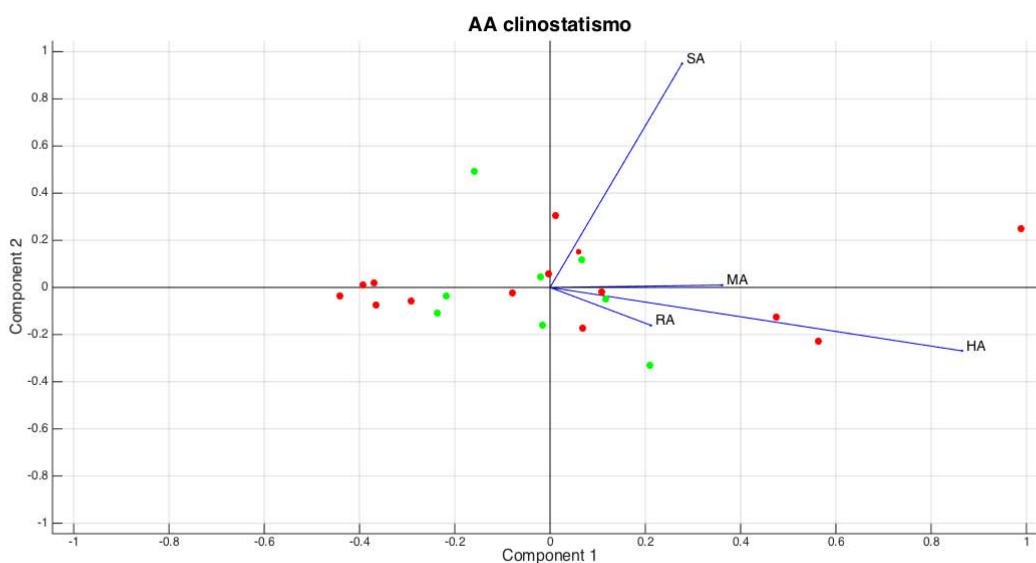


Figura 5.27 – Rappresentazione di Ampiezza Assoluta secondo le componenti principali dei pazienti VAR1 (rossi) e VAR0 (verdi) in clinostatismo.

5. Risultati e discussione

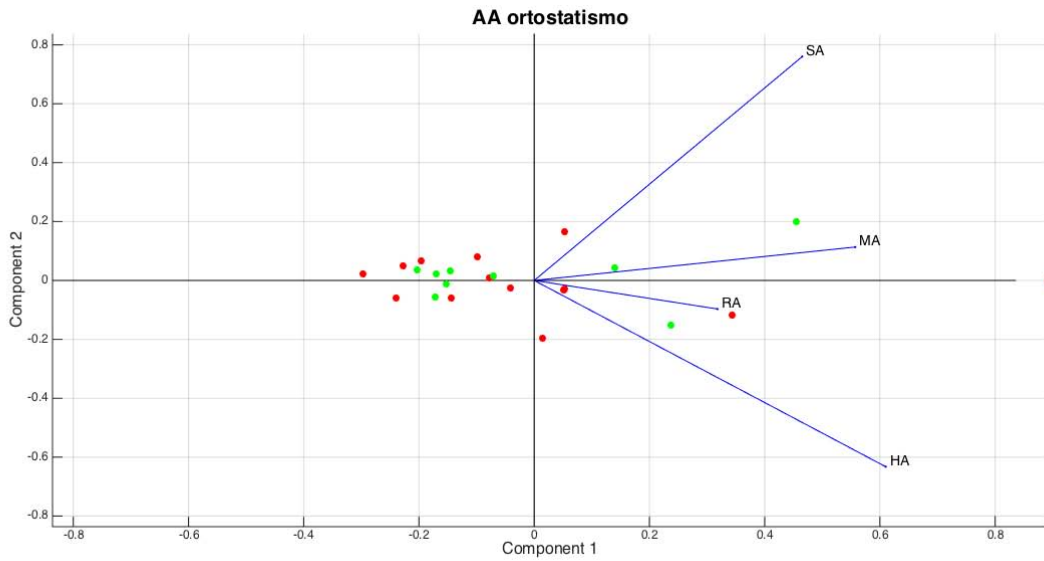


Figura 5.28 – Rappresentazione di Ampiezza Assoluta secondo le componenti principali dei pazienti VAR1 (rossi) e VAR0 (verdi) in ortostatismo.

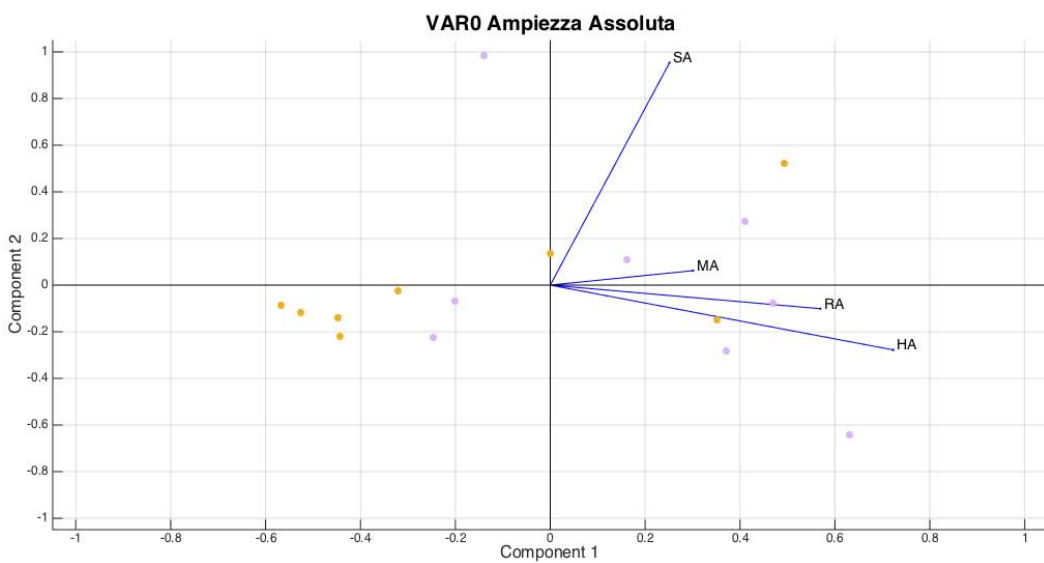


Figura 5.29 – Rappresentazione di Ampiezza Assoluta secondo le componenti principali del gruppo VAR0: clinostatismo (viola) e ortostatismo (giallo).

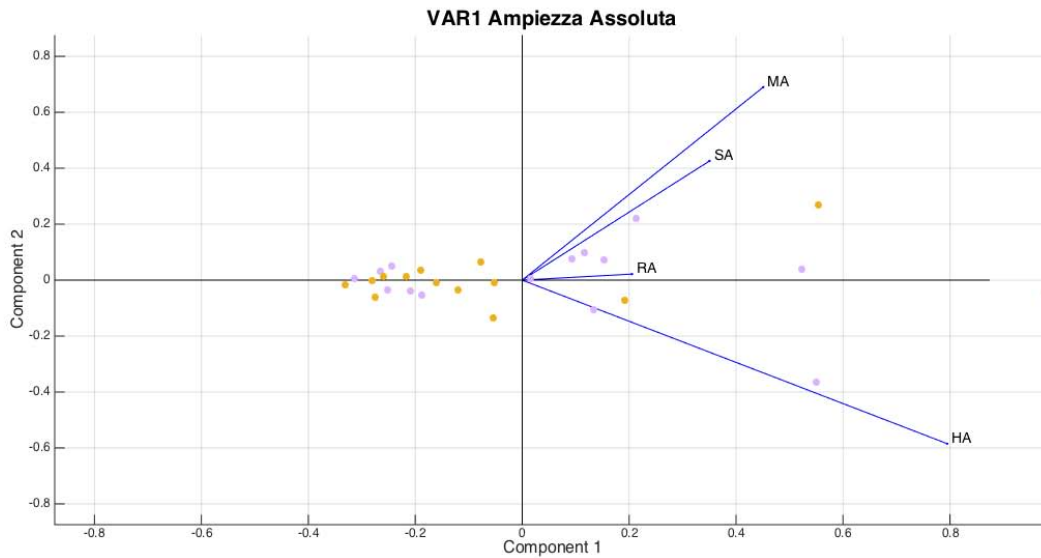


Figura 5.29 – Rappresentazione di Ampiezza Assoluta secondo le componenti principali del gruppo VAR1: clinostatismo (viola) e ortostatismo (giallo).

Come si evince da tali grafici, entrambe le analisi non hanno portato al risultato sperato: nel primo caso, infatti, non è possibile separare in due cluster distinti i pazienti caratterizzati da VAR0 e VAR1. Nel secondo caso, partendo dalla totalità del segnale non è possibile separare tra loro i valori di clinostatismo e ortostatismo, anche nei casi in cui con il t-test aveva riscontrato una differenza significativa.

6. Conclusioni

In questo lavoro è stata analizzata la perfusione cutanea in 17 pazienti diabetici non vasculopatici durante una prova di tipo posturale; tale prova è consistita nel variare la posizione dell'arto (gamba) da clinostatica a ortostatica. La sonda Laser Doppler è stata applicata alla cute del piede del paziente e con essa sono stati acquisiti i segnali di perfusione in entrambe le posizioni.

Per un'analisi preliminare dei pazienti sono stati calcolati in post processing i valori di Resting Flux (RF), Standing Flux (SF) e la variazione percentuale di SF rispetto a RF. Con tale parametro si sono suddivisi i pazienti in due gruppi: il gruppo di pazienti con vasocostrizione patologica (diminuzione del flusso inferiore al 40%) e il gruppo di pazienti con vasocostrizione efficace (riduzione maggiore del 40%), indicati rispettivamente con VAR1 e VAR0.

Successivamente, è stato delineato il profilo caratteristico del paziente appartenente a questi due gruppi considerando le patologie che si manifestano con maggiore frequenza tra: coronaropatia (CHD), infarto (IMA), angina, Cardio-Vascular Disease (CVD), retinopatia, neuropatia, nefropatia (AER). Per fare questo è stata utilizzata la tecnica degli *odds*, calcolati come rapporto tra il numero di pazienti affetti dalla malattia e il numero di pazienti che non la presentano. Si è visto come il "paziente tipo" appartenente al gruppo VAR1 sia caratterizzato dalla presenza di coronaropatia, retinopatia e neuropatia, mentre non presenta storia pregressa di infarto o CVD. Per quanto riguarda nefropatia e angina, queste hanno la stessa possibilità di manifestarsi e di non manifestarsi.

Analizzando il gruppo VAR0, è emerso invece come il paziente caratterizzato da una vasocostrizione efficace non presenti patologie cardiache; non si può dire nulla sulla prevalenza o meno delle patologie locali associate al microcircolo.

Considerando la presenza o meno delle patologie sopra elencate, è stata effettuata un'analisi delle corrispondenze multiple, separatamente per VAR1 e VAR0, per trovare quali corrispondenze si verificano con maggiore probabilità nei due gruppi. In particolare, è emerso che per il gruppo VAR1 le corrispondenze più frequenti sono angina-coronaropatia, angina-retinopatia e retinopatia-coronaropatia. Per quando riguarda invece il gruppo VAR0, caratterizzato dall'assenza di patologie cardiache, le patologie locali si distribuiscono in maniera uniforme nei diversi pazienti.

Dopo queste analisi è stata applicata la trasformata Wavelet al segnale di perfusione cutanea, caratterizzato da oscillazioni periodiche, dette onde di flowmotion. Attraverso l'analisi spettrale è stato possibile suddividere tali oscillazioni in sei bande di frequenza, associate ad altrettante attività

del sistema cardiovascolare: cardiaca, respiratoria, miogena, neurogena, endoteliale NO–dipendente e NO–indipendente.

Dagli spettri mediati nel tempo sono stati calcolati i parametri di *Ampiezza* e *Potenza Assolute* e *Relative*, ed è stata applicata un'analisi statistica a ciascun parametro per ogni banda di frequenza, suddividendo dapprima i pazienti secondo l'efficacia della vasocostrizione (VAR1 vs VAR0) e poi, a partire dal gruppo VAR1, suddividendoli sulla base della presenza o meno delle altre patologie. L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando il t – test, nella sua versione *paired* o *unpaired* a seconda che i dati fossero o meno appaiati. Non è stato possibile eseguire tali analisi per le patologie CVD e neuropatia, a causa della scarsa numerosità dei pazienti.

Per quanto riguarda il primo confronto, VAR1 vs VAR0, è emerso come le differenze significative siano presenti in numero maggiore nel gruppo VAR1, presentando quindi un comportamento opposto rispetto a quello che si verificava nell'analisi del solo flusso. Infatti, mentre il gruppo VAR1 presenta una variazione di flusso in alcuni casi molto inferiore al 40%, analizzando le frequenze si vede come esse varino molto di più rispetto al gruppo VAR0, che invece presentava variazioni di flusso almeno maggiori del 40%. È doveroso ricordare che le differenze significative evidenziate con il t – test riguardano variazioni del contributo dell'attività cardiovascolare corrispondente alla particolare banda di frequenza rispetto all'attività complessiva.

Il confronto eseguito sulle altre patologie ha mostrato risultati discordanti a seconda che si trattasse di patologie cardiache o locali. Per le patologie cardiache si nota infatti come i pazienti che presentano le variazioni significative nei parametri analizzati, rispecchiando il comportamento del macrogruppo di partenza (VAR1), sono quelli che non presentano la particolare patologia.

Andando invece a considerare le patologie “locali” si nota un comportamento diverso rispetto alle cardiopatie considerate in precedenza. Infatti, in questo caso i gruppi di pazienti che manifestano danno locale presentano variazioni significative delle componenti analizzate in frequenza, mentre lo stesso fatto non si verifica nei soggetti che non presentano la determinata patologia.

Quindi si è visto come un danno locale al microcircolo periferico, associabile a una compromissione della vasocostrizione e a una riduzione significativa dei parametri analizzati, può essere connesso anche ad altri tipi di patologie, sempre "locali". Non si può dire la stessa cosa per le cardiopatie, che presentano infatti un comportamento “opposto”, manifestando significatività nella differenza tra clinostatismo e ortostatismo nei soggetti non caratterizzati dalla patologia in esame.

Successivamente è stato effettuato un confronto tra i segnali in clinostatismo appartenenti a due gruppi opposti (ad esempio VAR1 e VAR0) e un confronto tra i segnali in ortostatismo. Tale analisi è stata eseguita per tutte le diverse suddivisioni dei pazienti, secondo VAR, CHD, IMA, angina, retinopatia e AER. Le differenze significative sono quasi del tutto assenti: pertanto si può affermare

che la differenza tra i vari gruppi non sta singolarmente in clinostatismo o ortostatismo, ma nel modo in cui avviene il passaggio tra queste due condizioni.

Infine, è stata eseguita un'analisi delle componenti principali dei parametri di *Ampiezza* e *Potenza* in due diversi casi: suddividendo i segnali in clinostatismo e ortostatismo e clusterizzando per vedere se si riuscivano a separare i pazienti VAR1 dai pazienti VAR0, e suddividendo i pazienti in VAR1 e VAR0 e vedendo se si riuscivano a collocare in due cluster separati i valori di clinostatismo e ortostatismo. In entrambi i casi non si è ottenuto il risultato sperato.

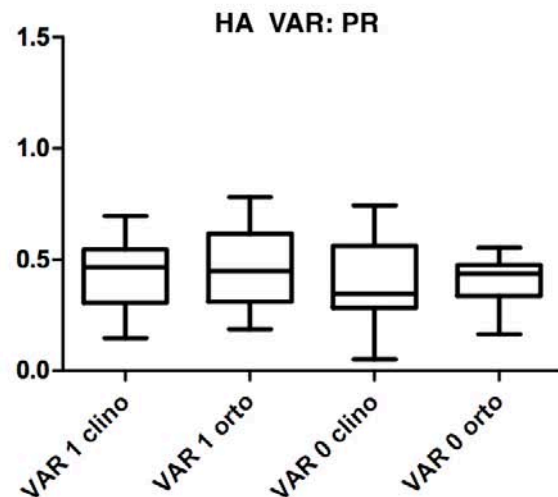
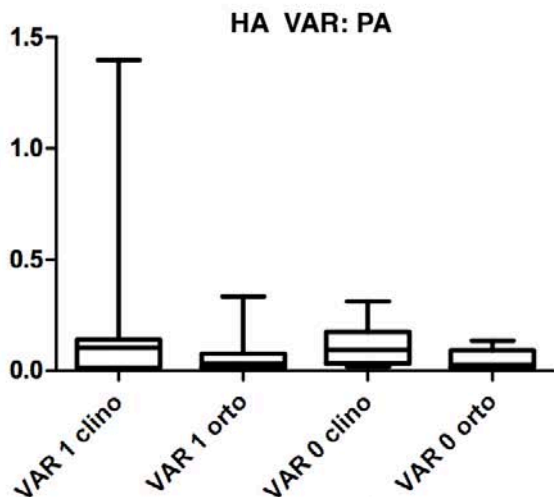
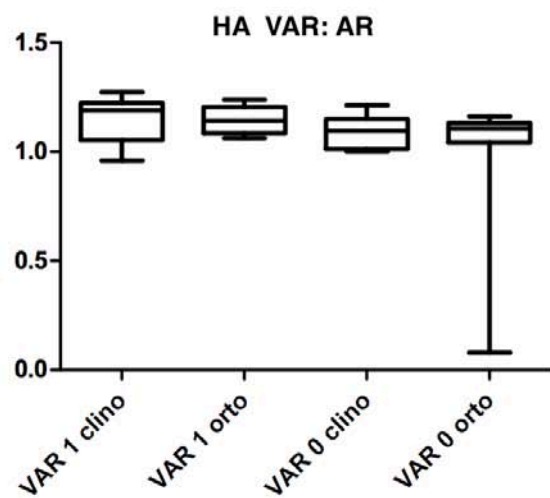
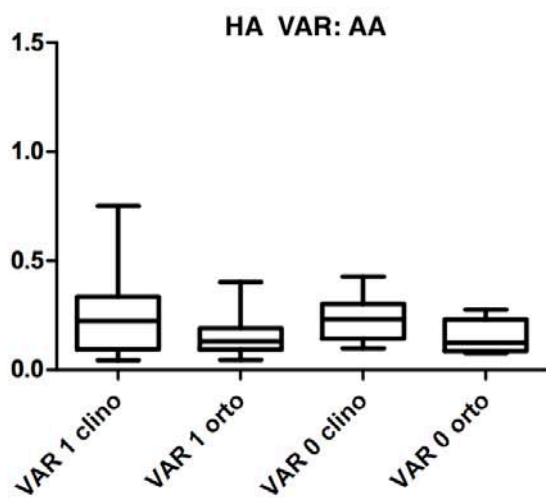
In uno studio futuro sarà quindi interessante ampliare il gruppo di pazienti analizzati e cercare di rendere uniforme la durata dell'acquisizione del segnale.

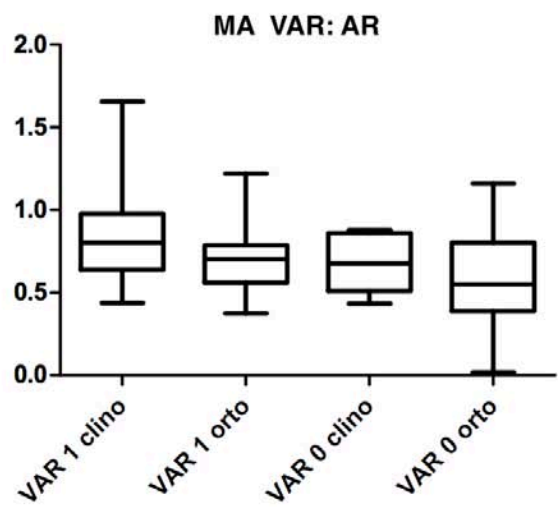
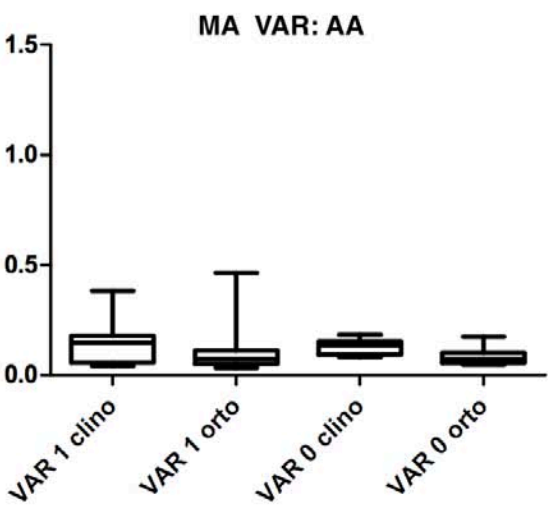
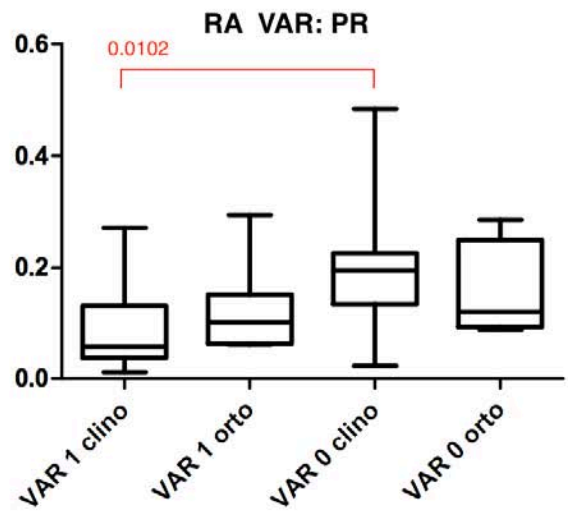
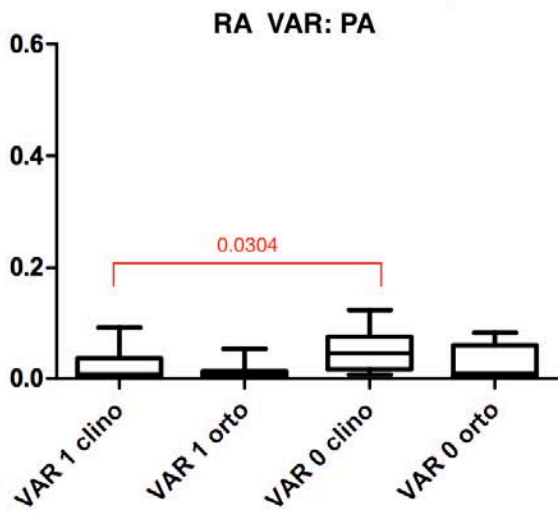
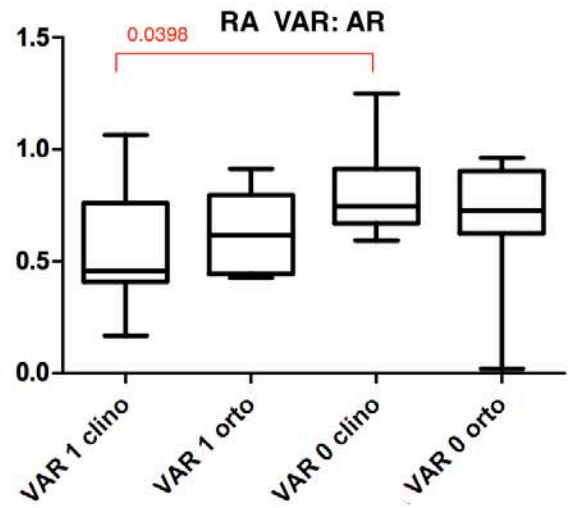
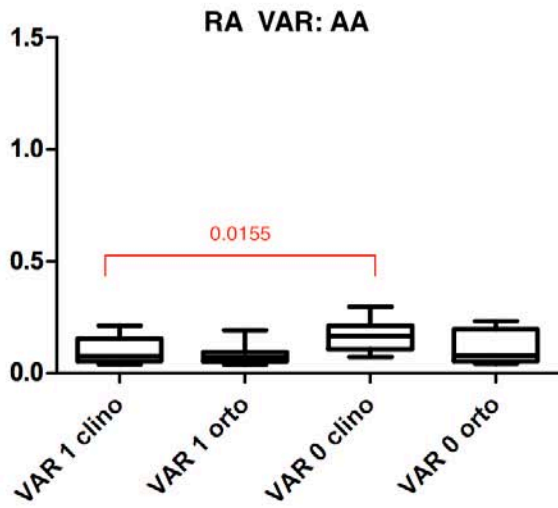
Appendice A

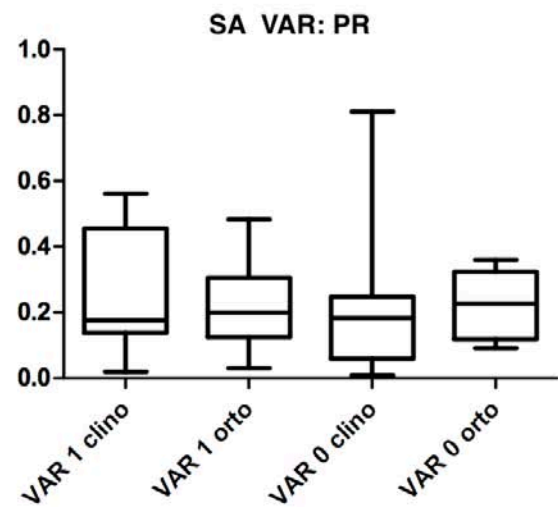
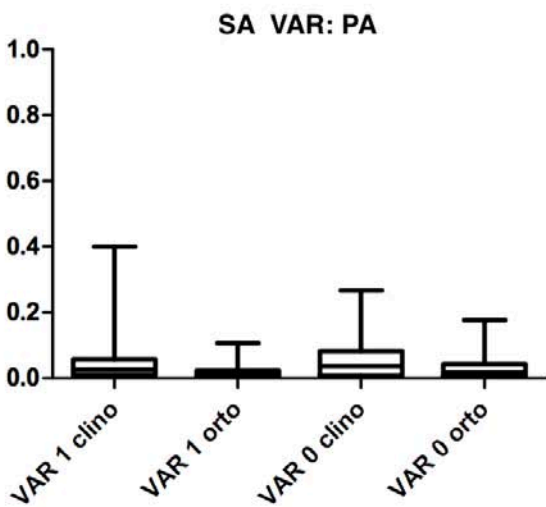
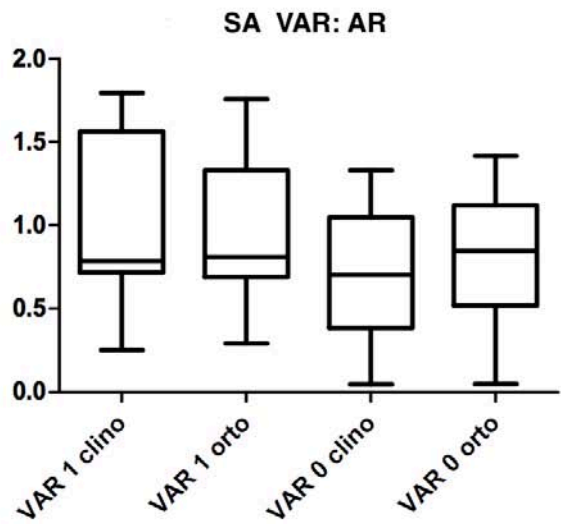
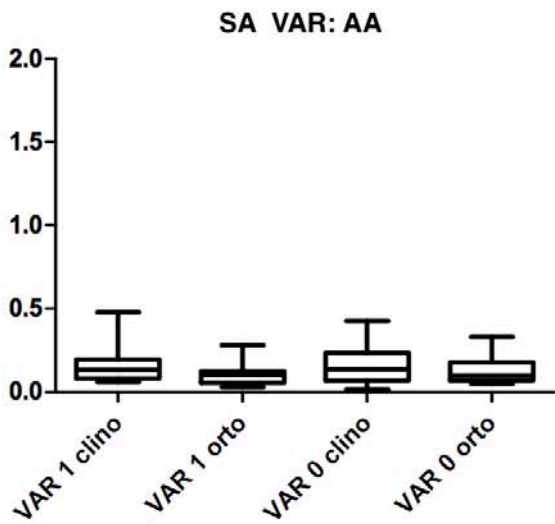
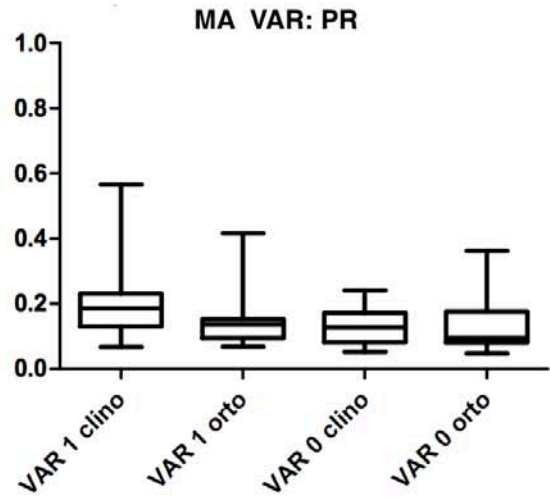
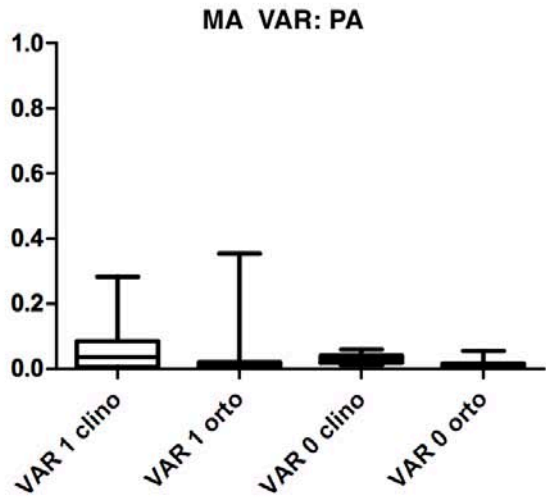
In questa sezione sono illustrati i *boxplot* ottenuti nel confronto tra bande, le cui tabelle riassuntive sono riportate nel paragrafo 5.6; su di essi sono indicati i valori di *p-value* < 0.05.

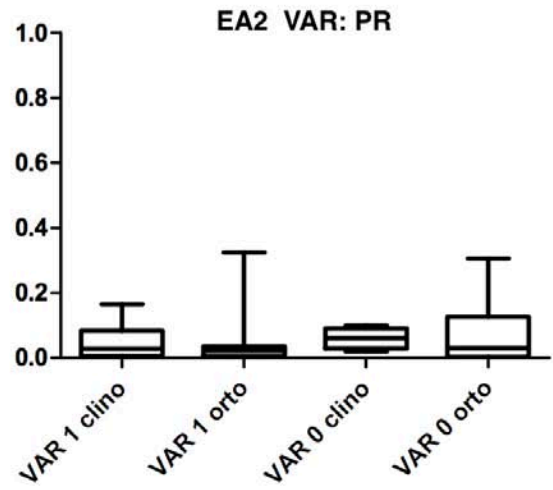
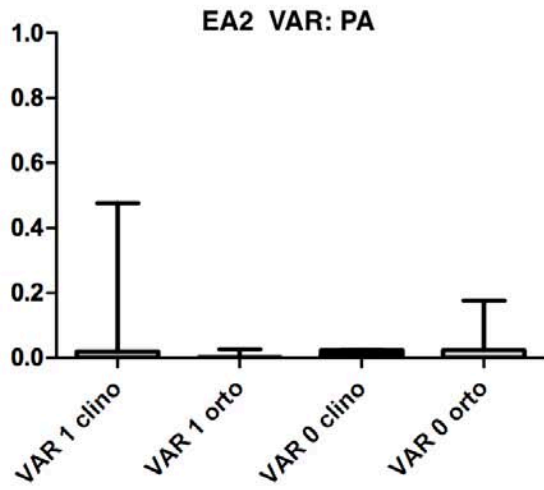
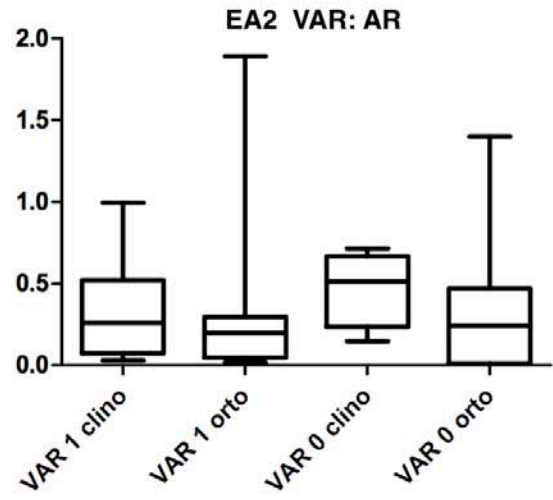
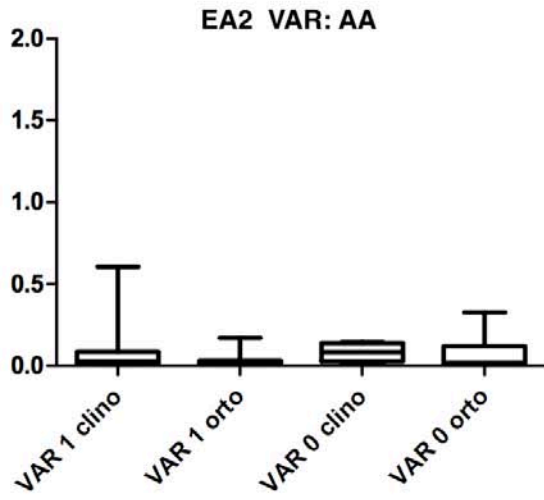
Sono riportati nell'ordine i *boxplot* per VAR, CHD, IMA, ANGINA, RETINOPATIA, AE, e rispettivamente sono rappresentati prima i grafici dell'*Ampiezza* (*Assoluta e Relativa*) e poi quelli della *Potenza* (*Assoluta e Relativa*), per ciascuna banda di frequenza: HA, RA, MA, SA, EA2.

VAR1 vs VAR0

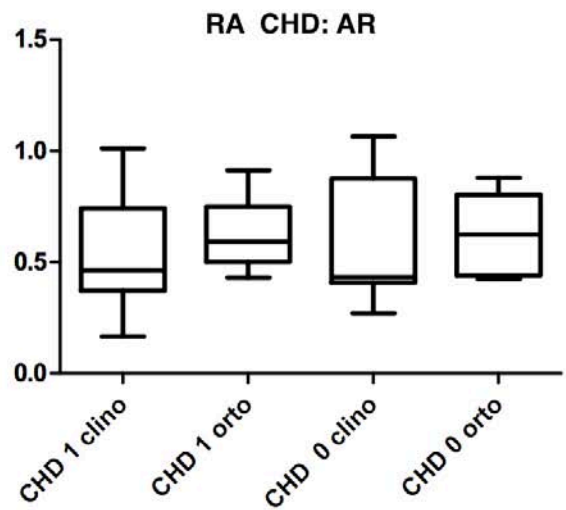
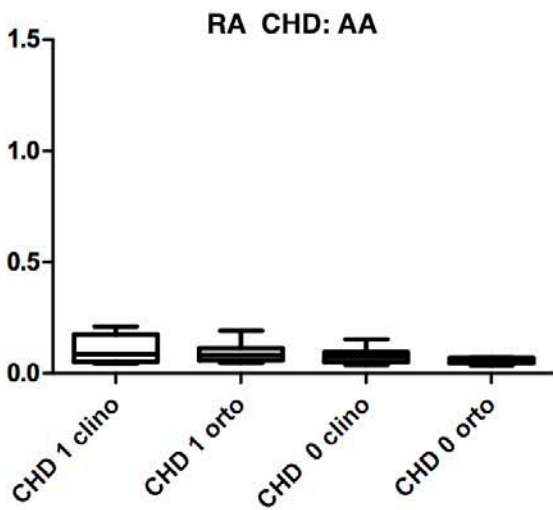
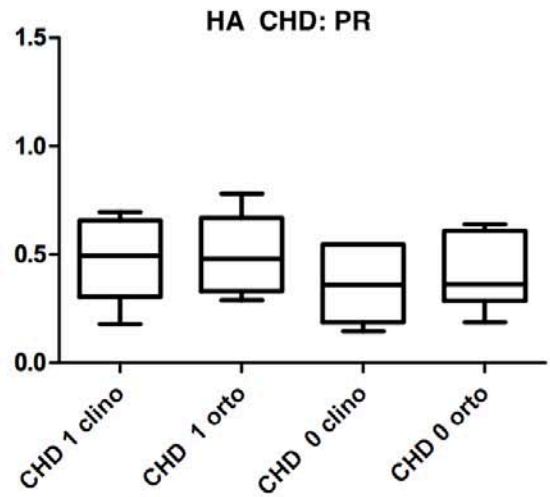
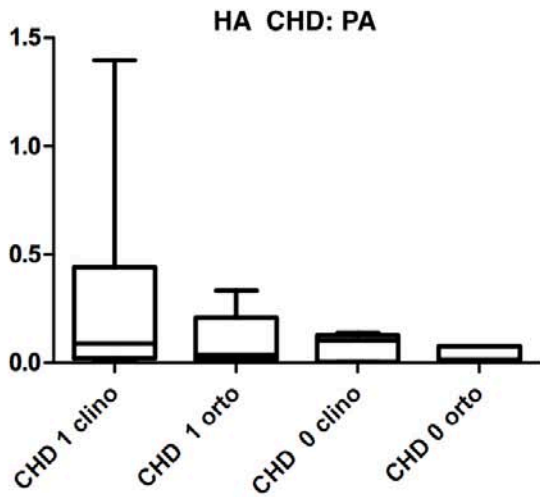
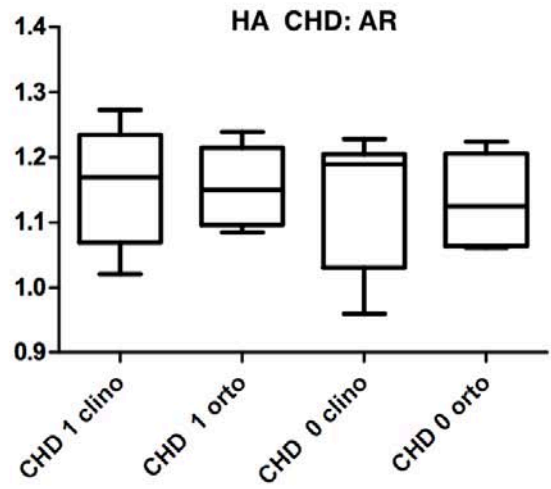
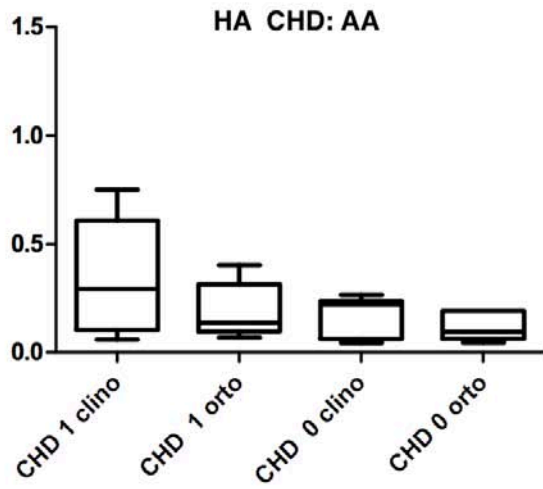


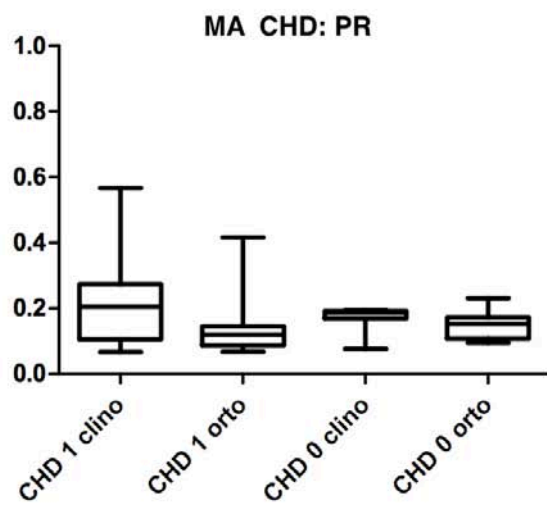
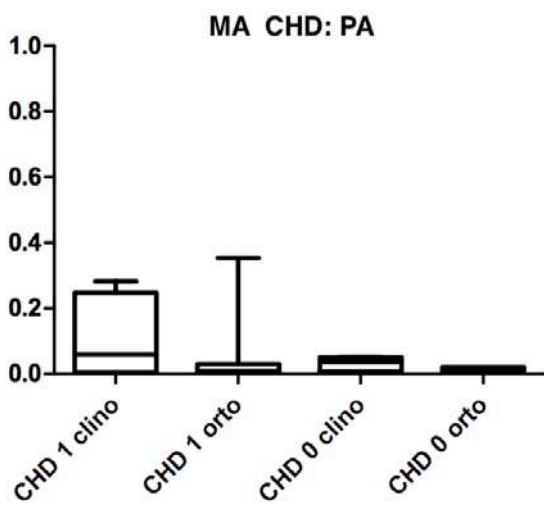
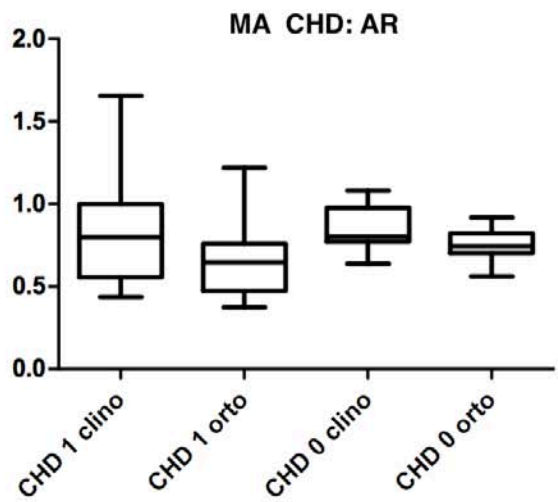
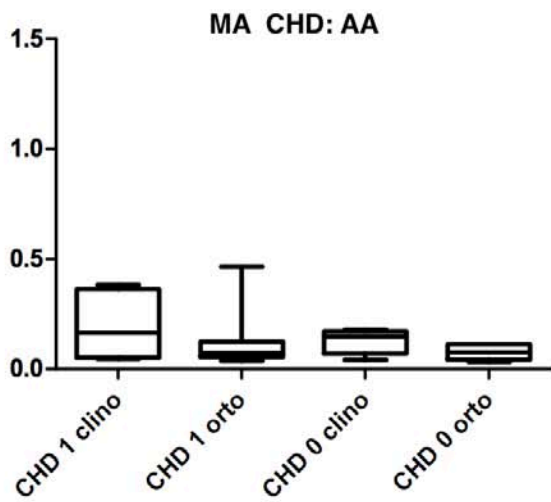
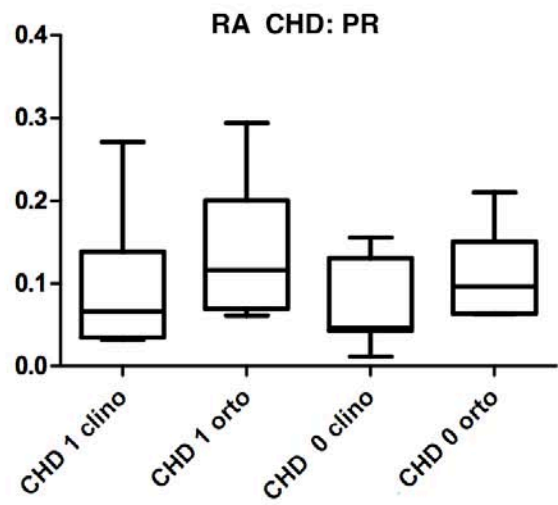
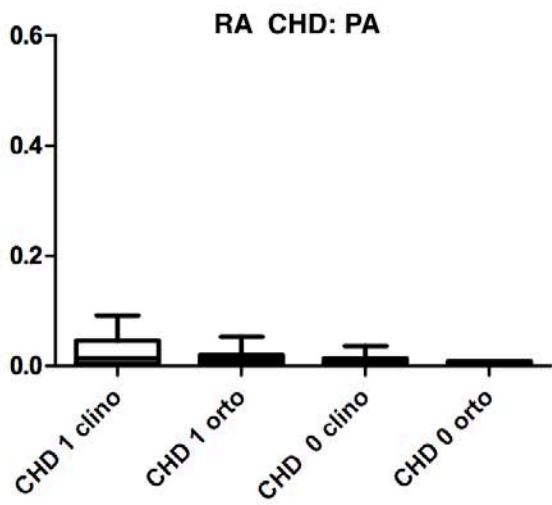


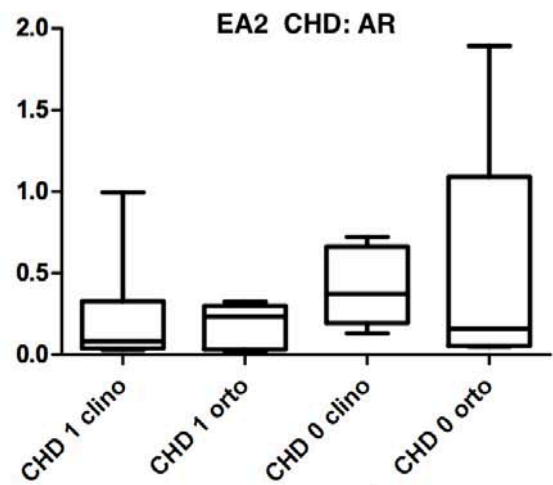
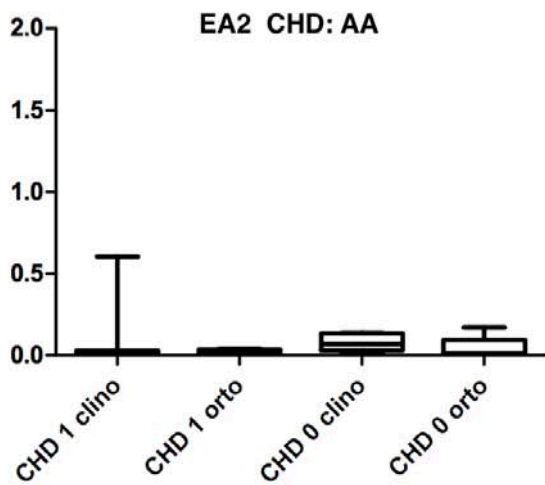
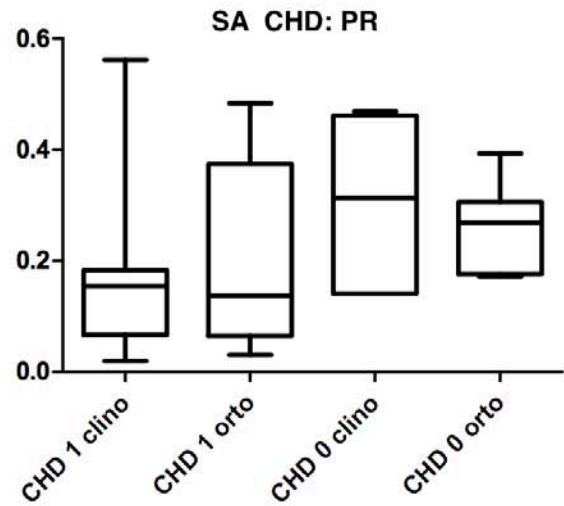
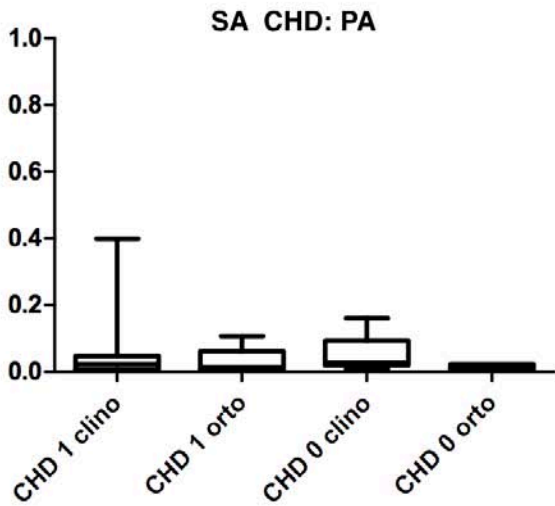
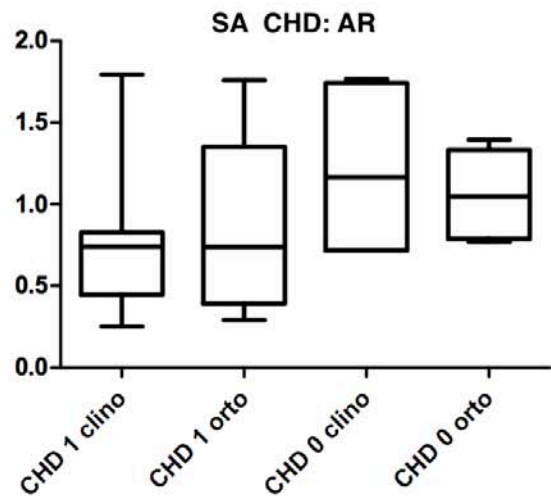
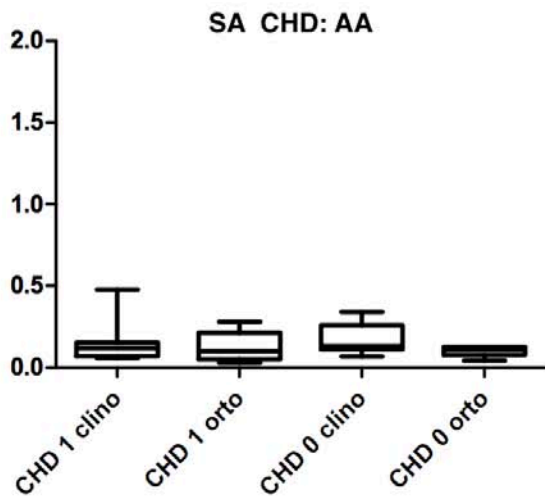


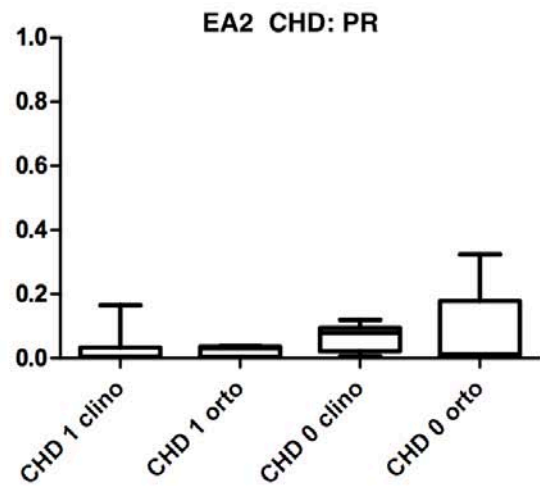
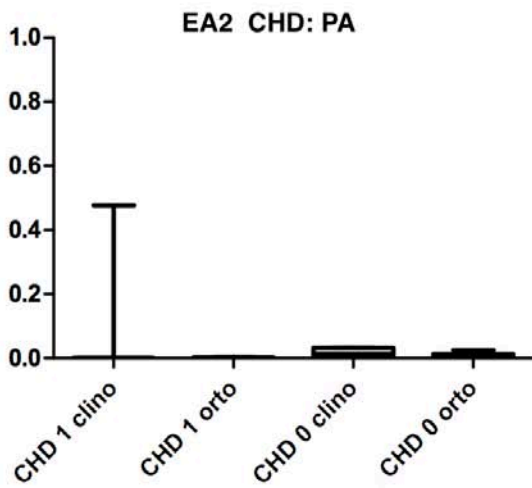


CHD1 vs CHD0

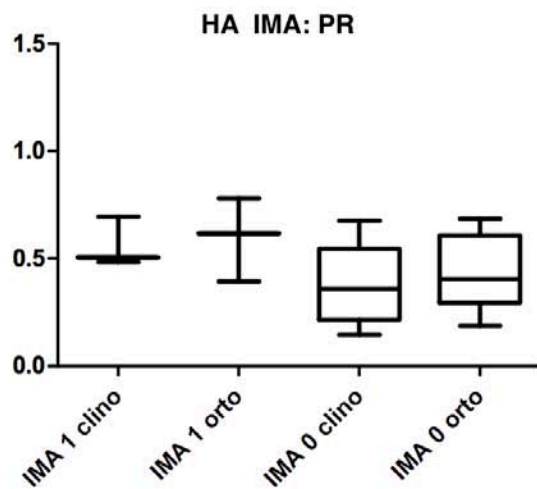
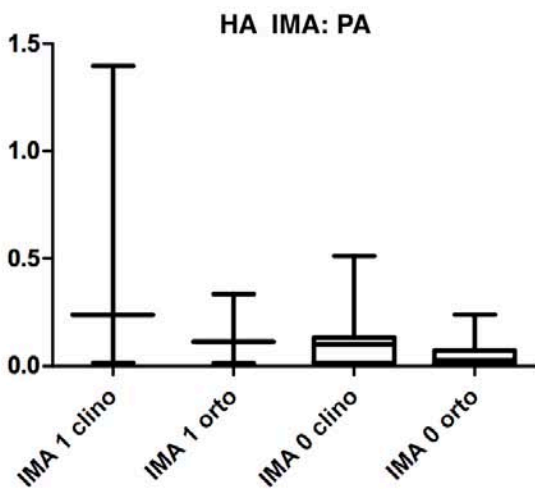
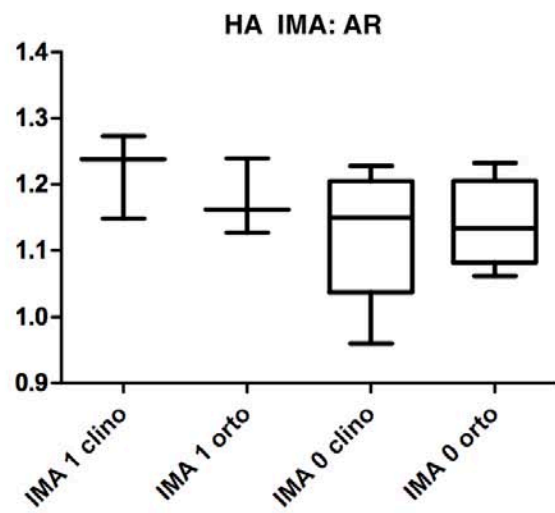
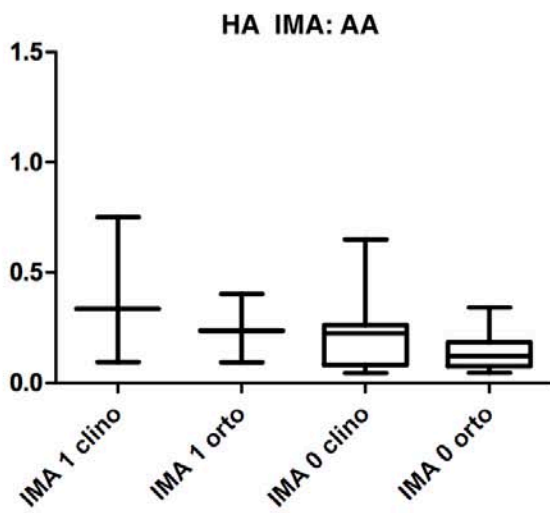


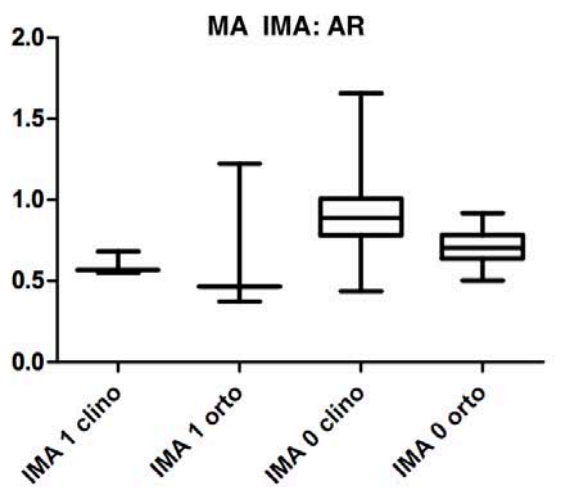
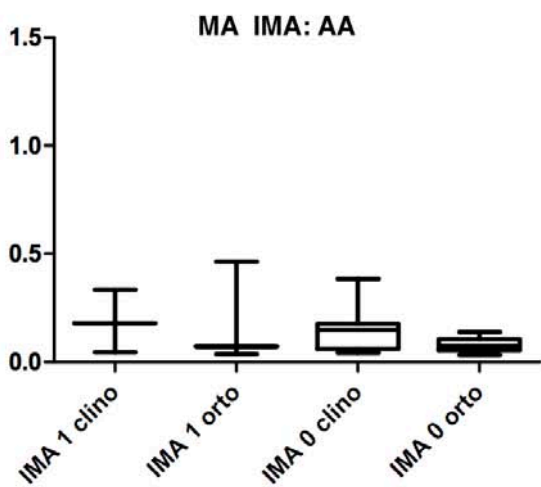
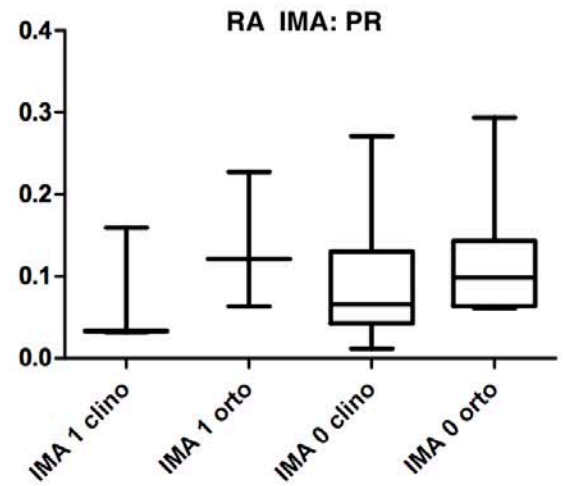
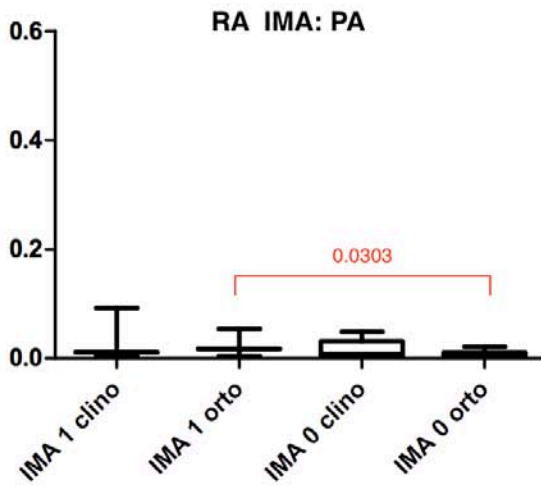
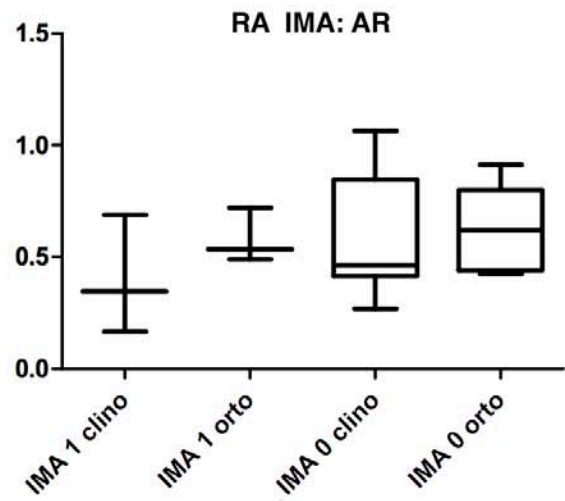
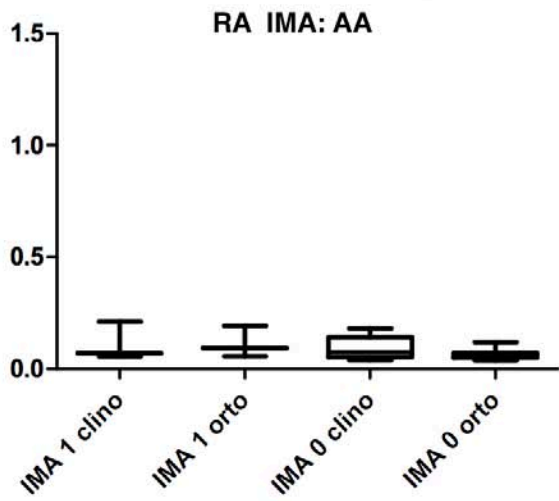


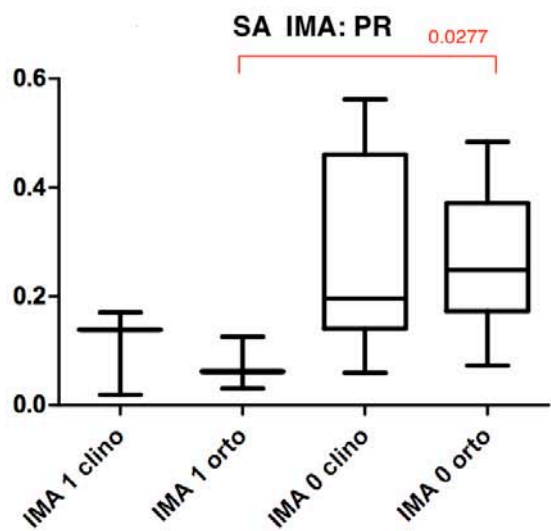
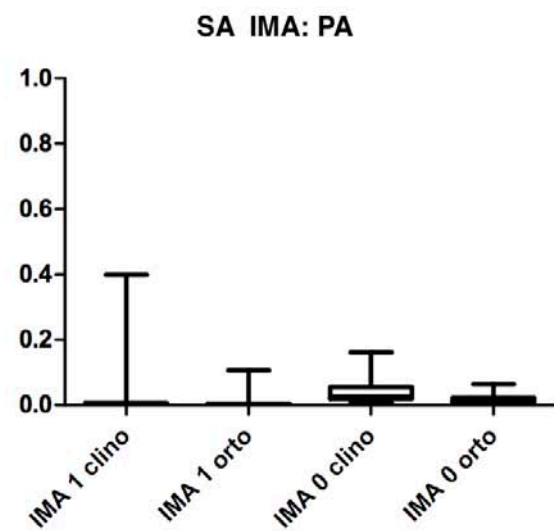
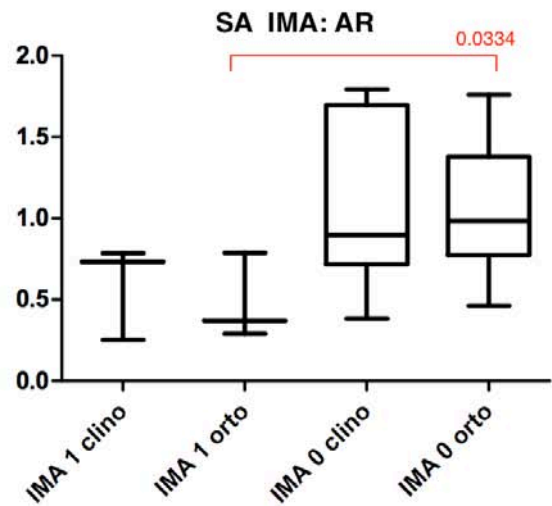
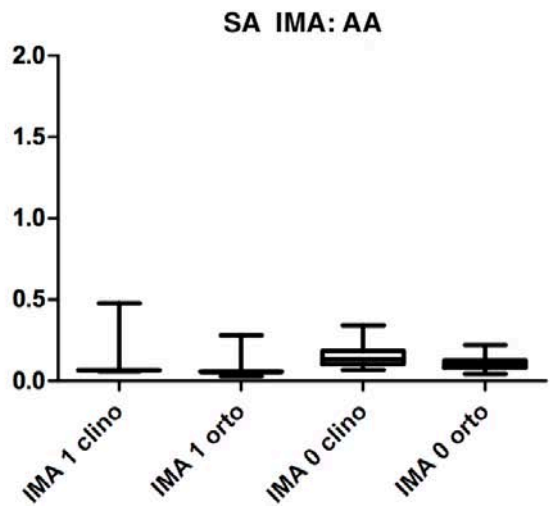
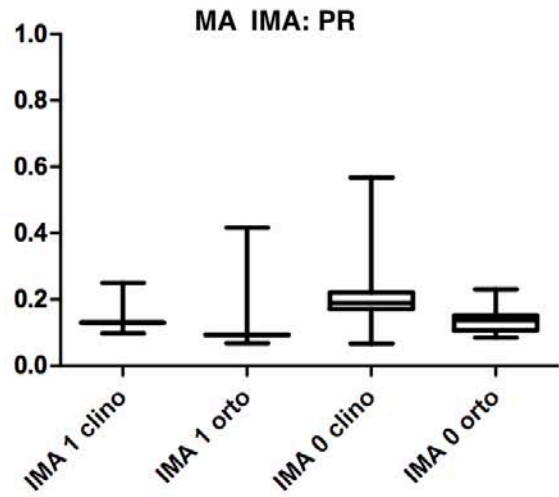
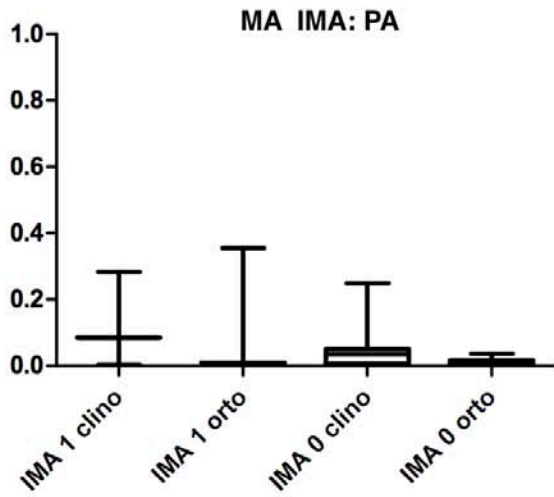


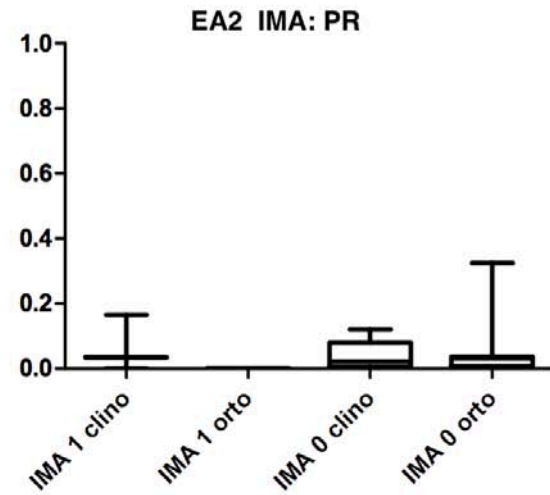
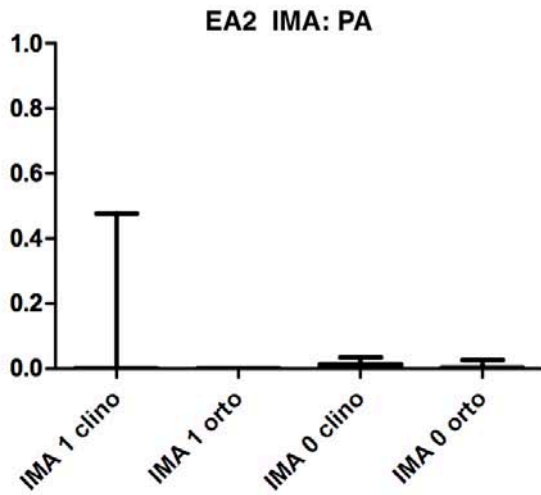
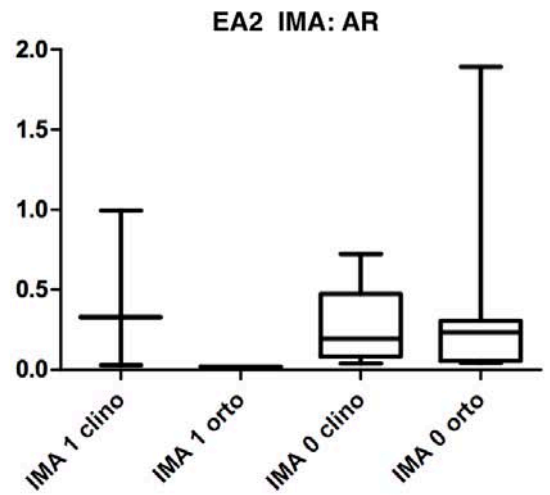
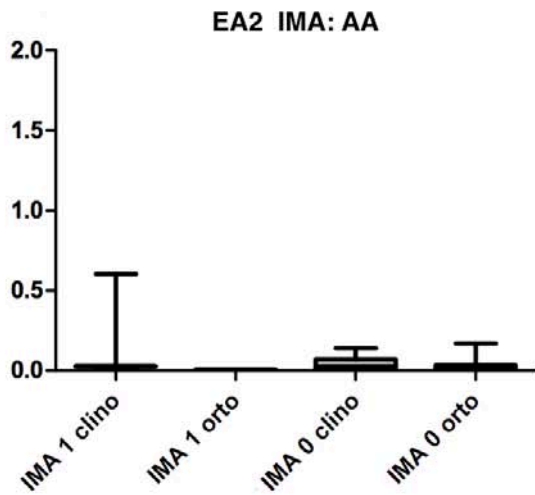


IMA1 vs IMA0

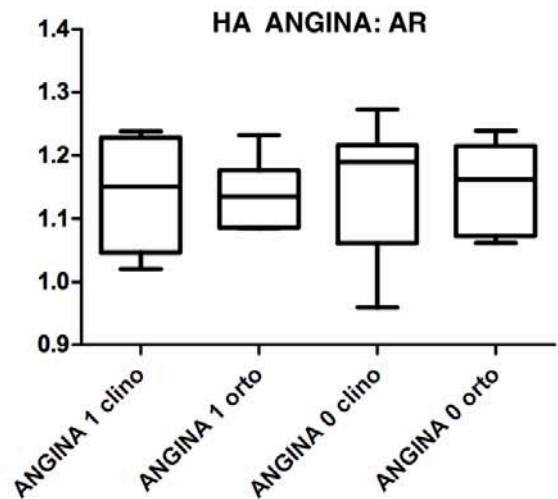
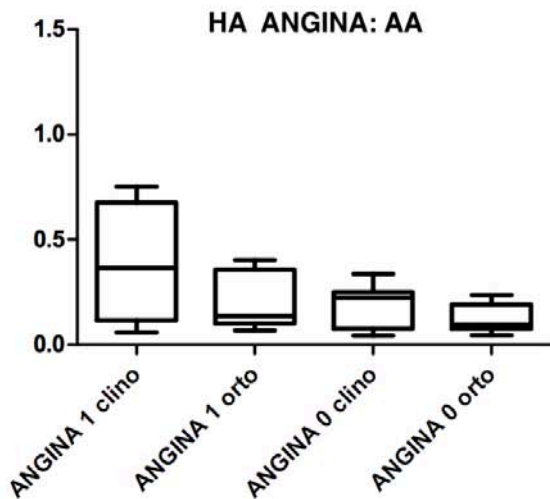


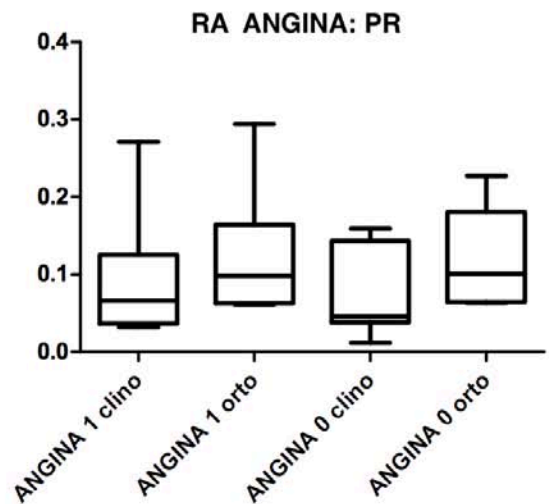
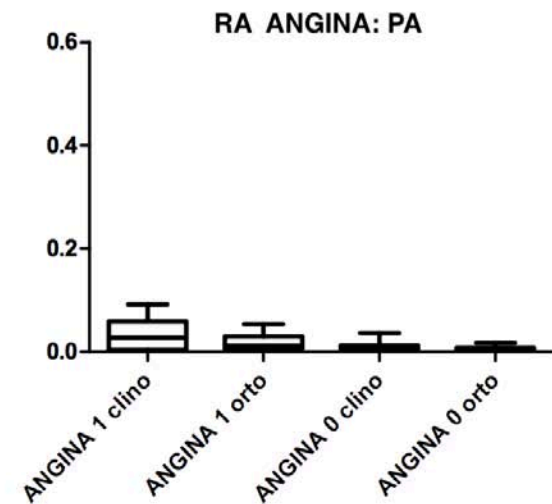
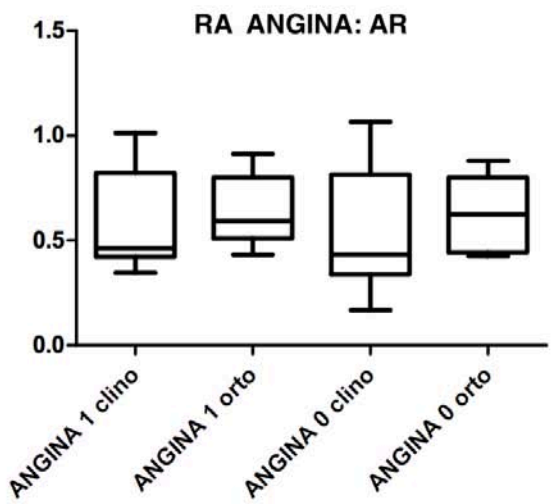
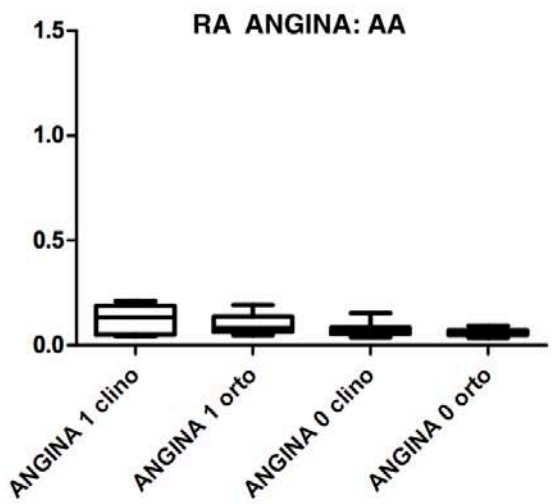
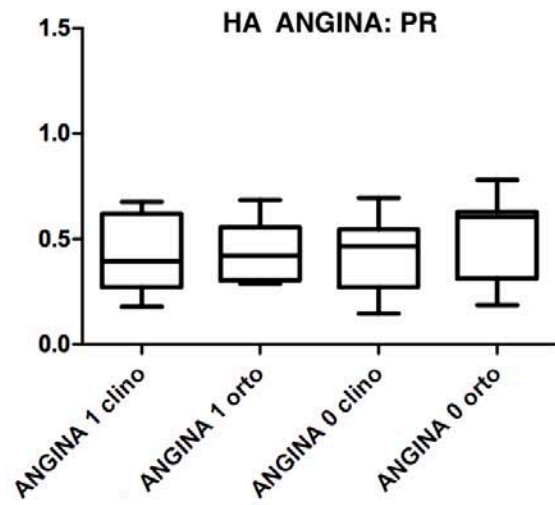
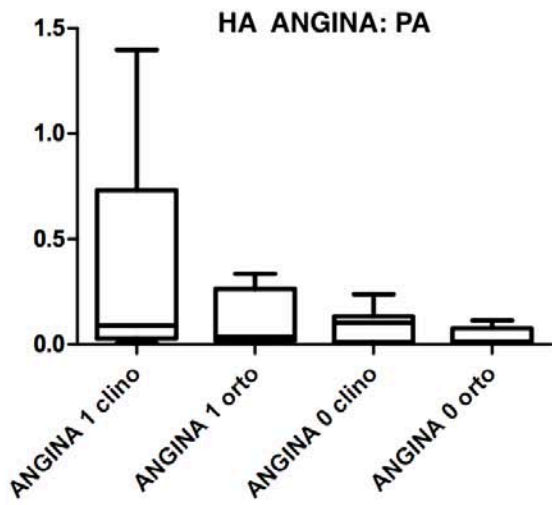


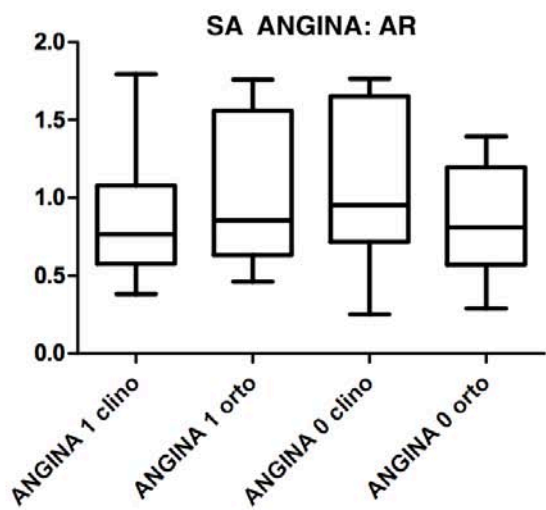
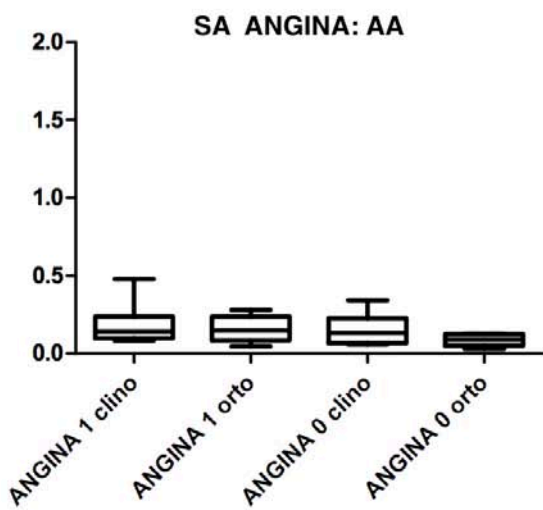
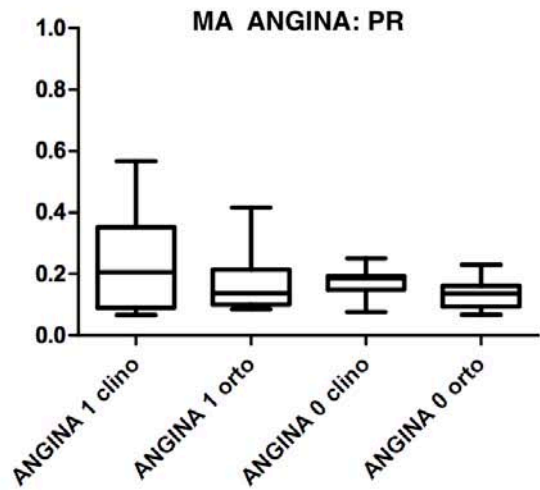
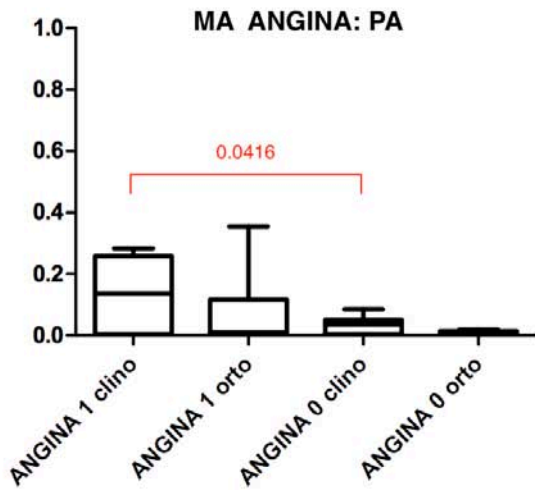
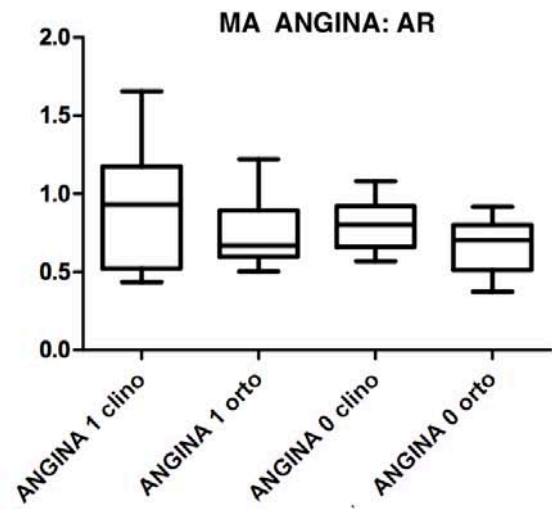
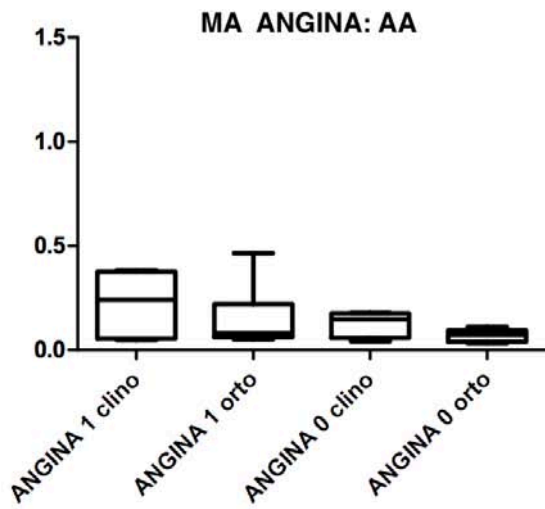


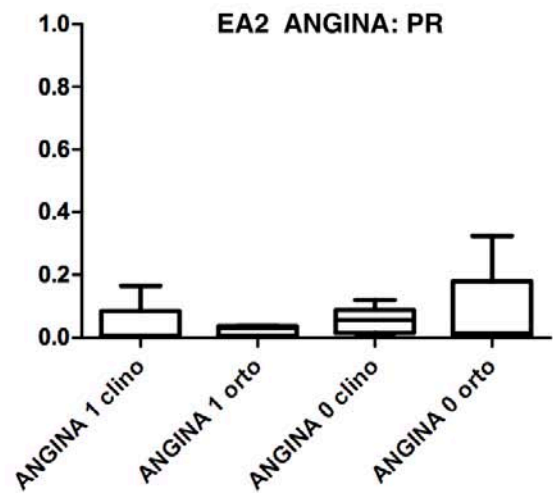
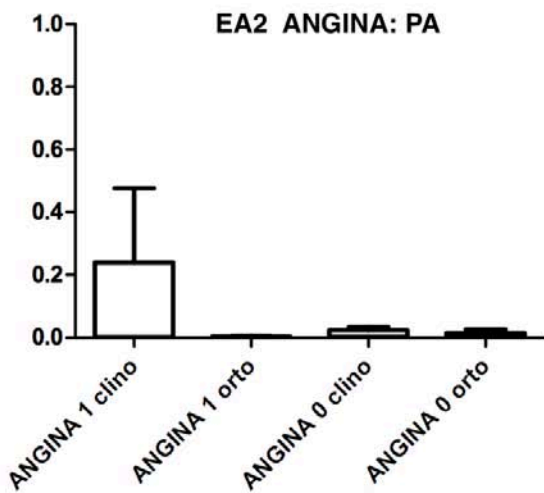
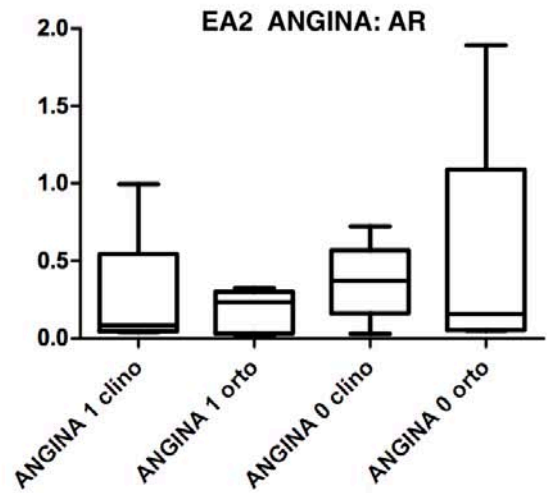
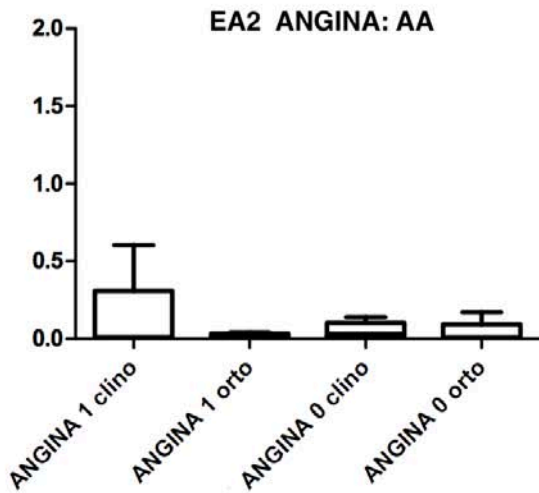
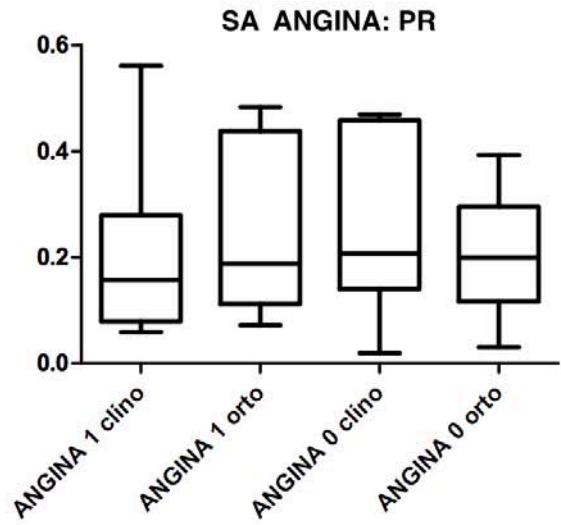
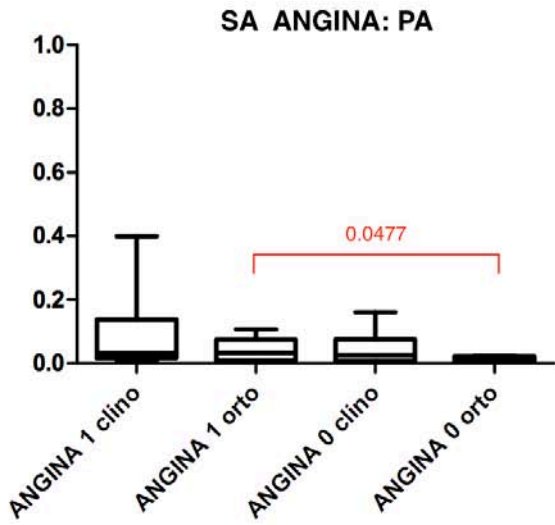


ANGINA1 vs ANGINA0

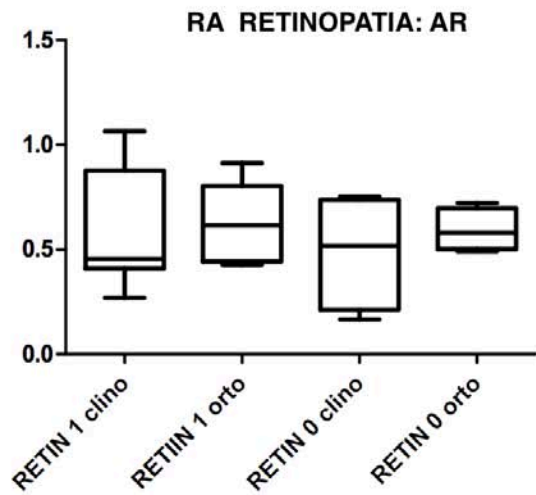
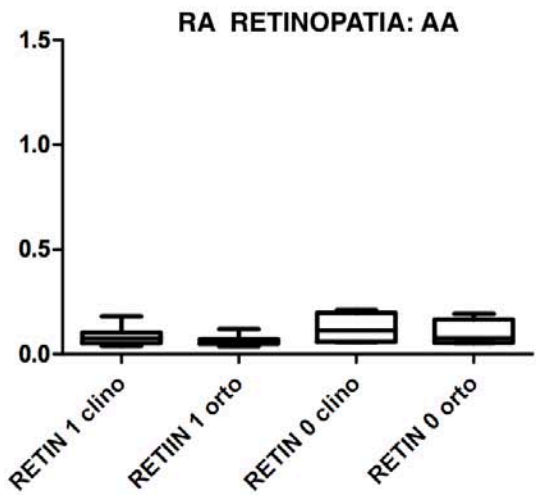
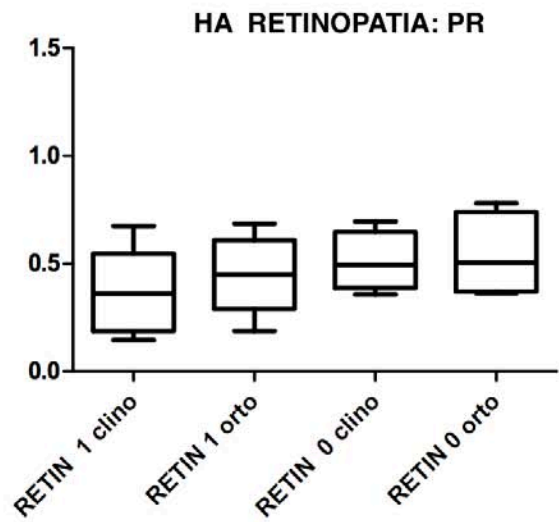
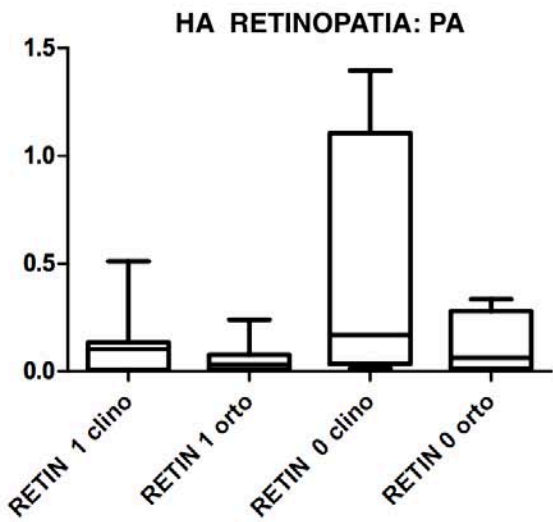
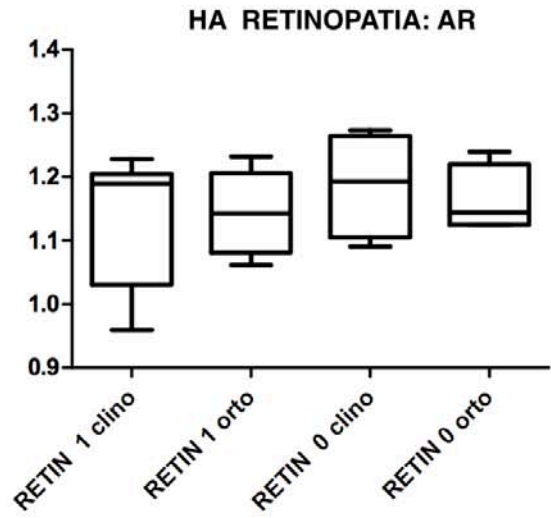
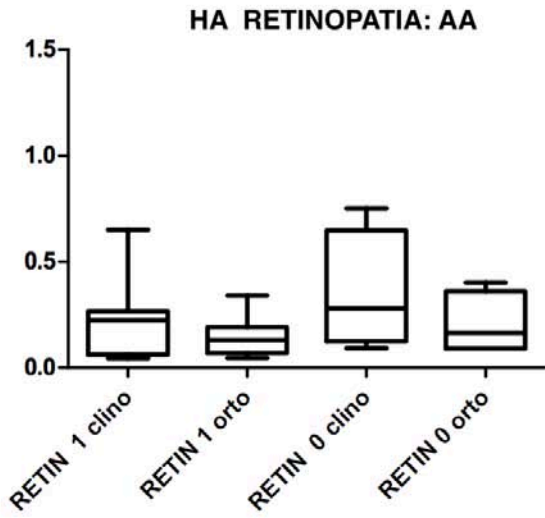


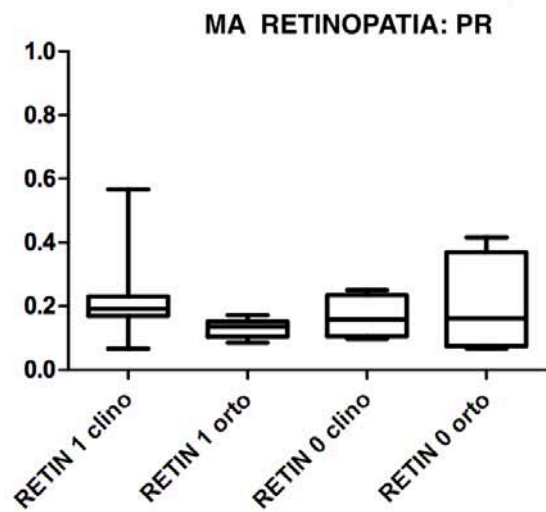
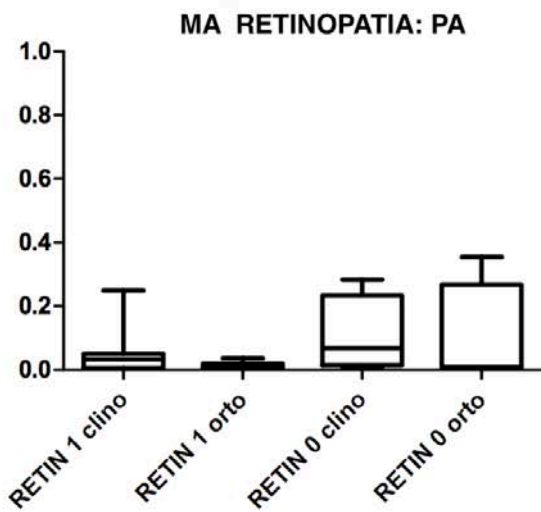
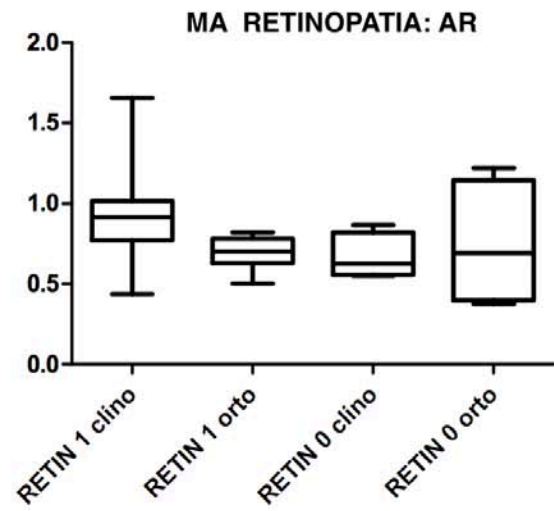
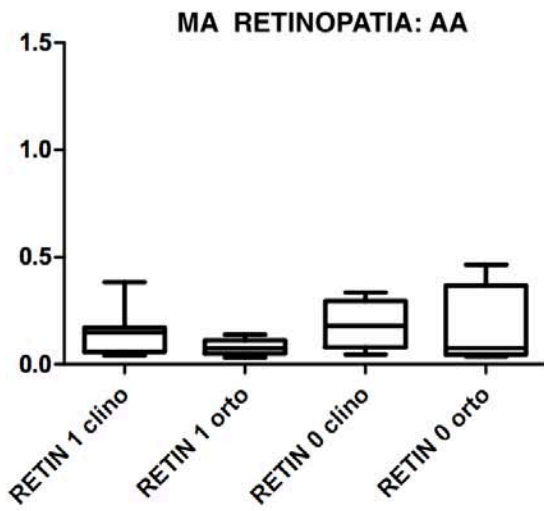
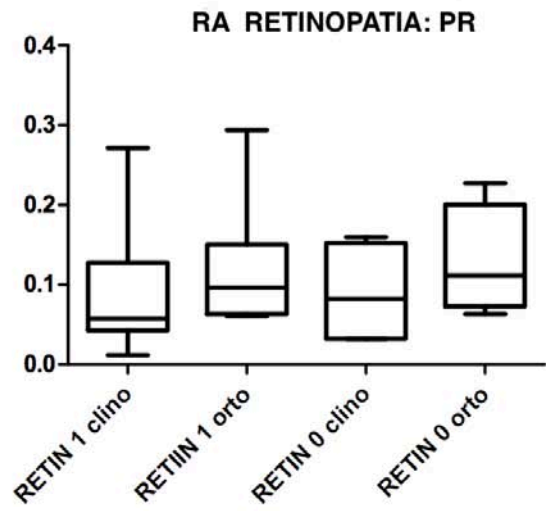
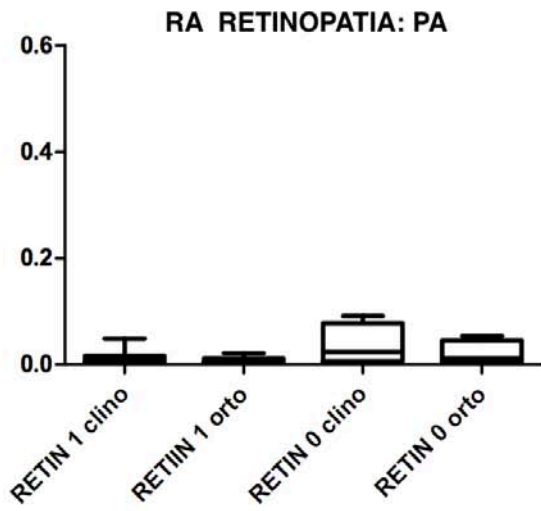


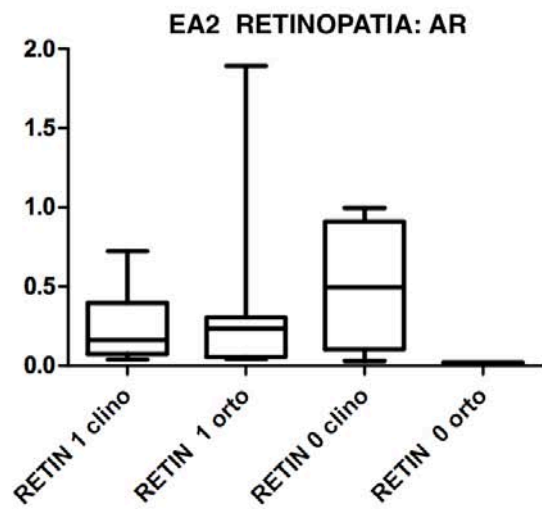
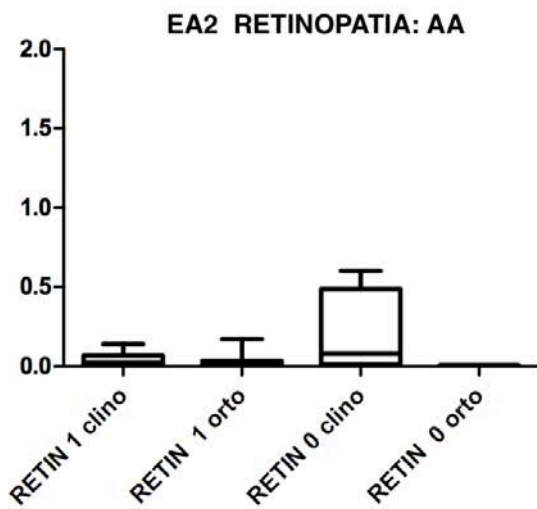
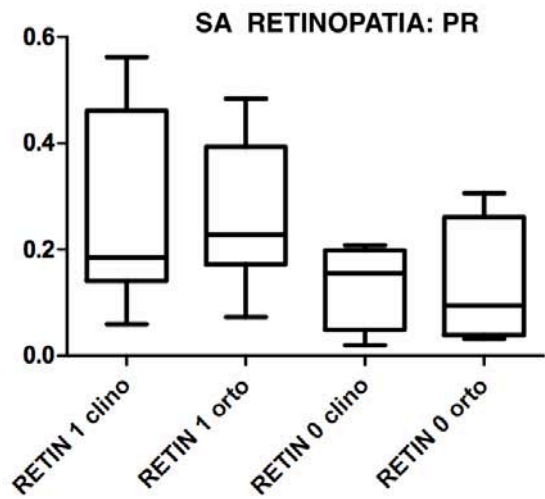
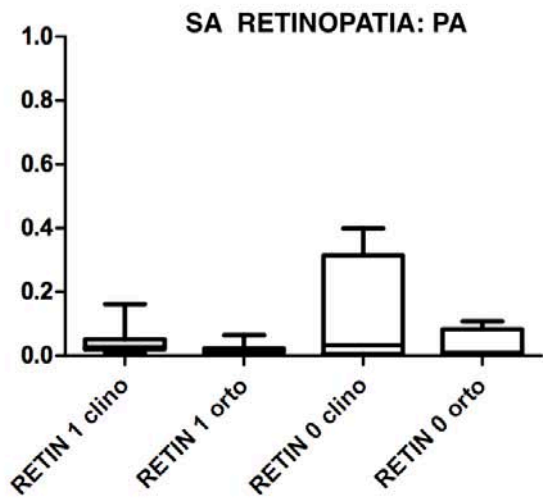
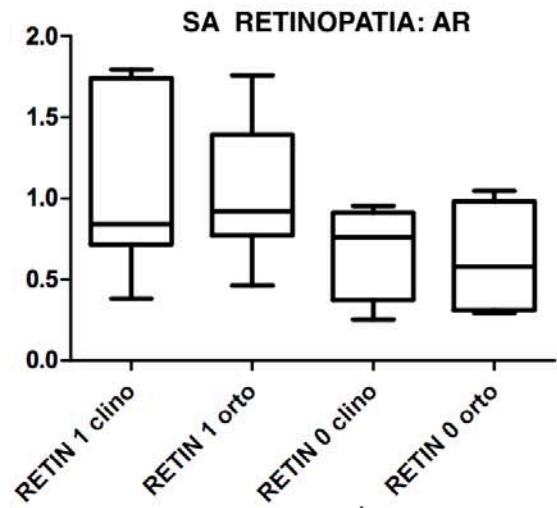
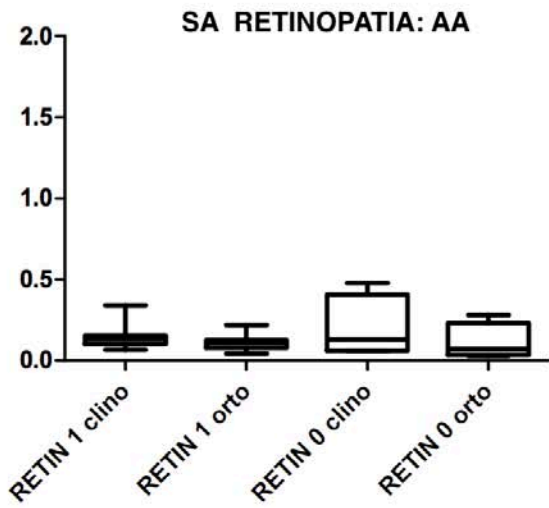


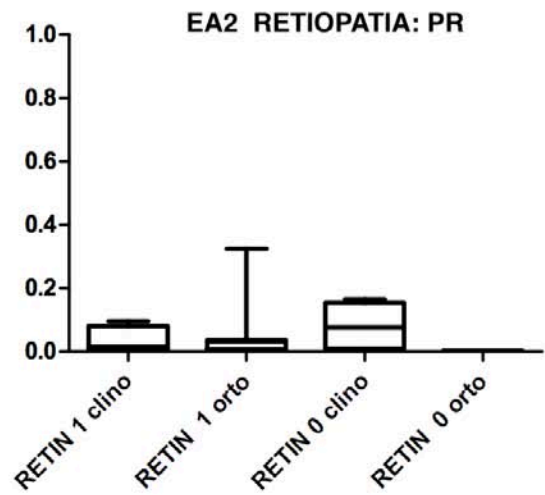
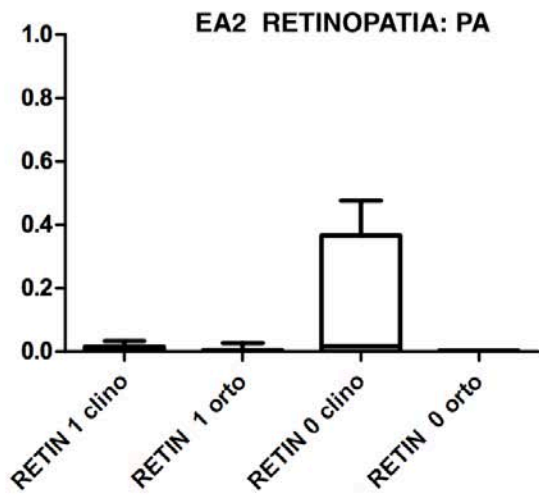


RETINOPATIA1 vs RETINOPATIA0

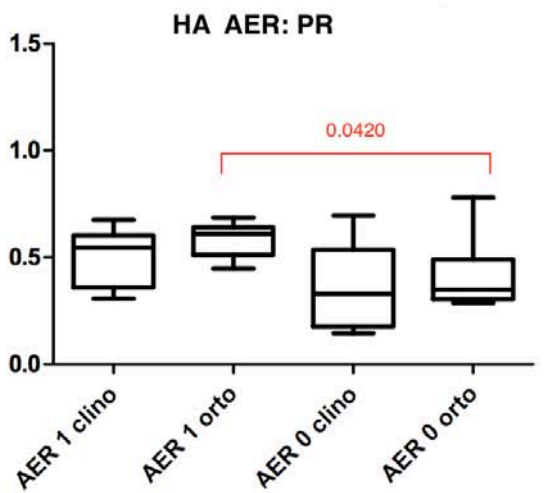
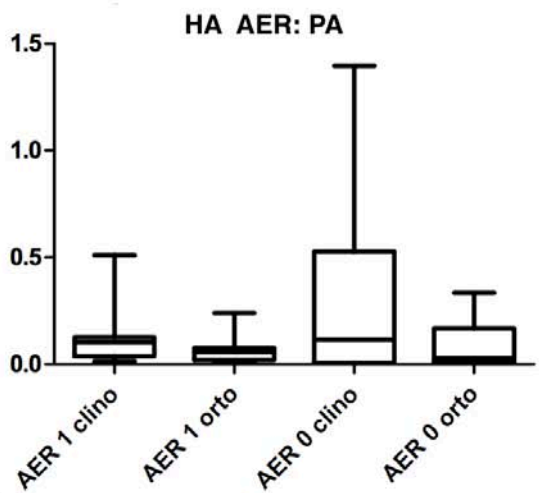
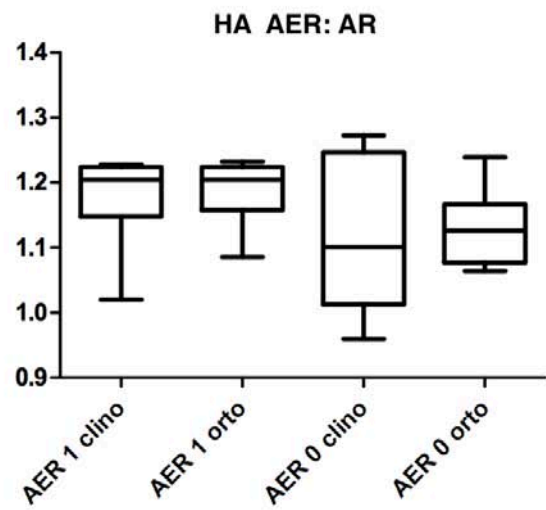
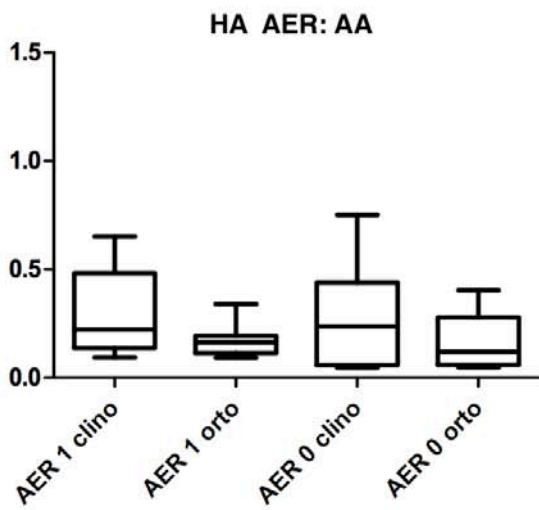


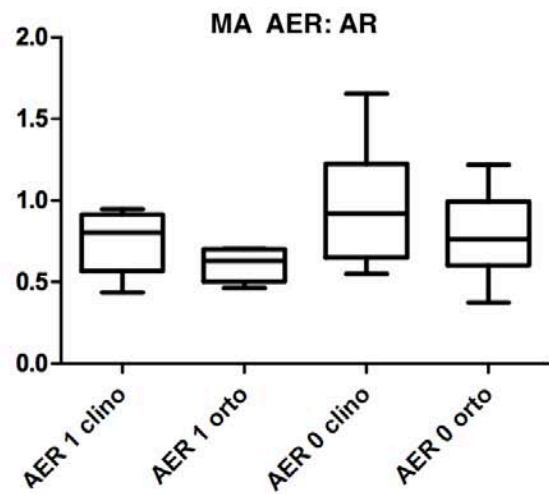
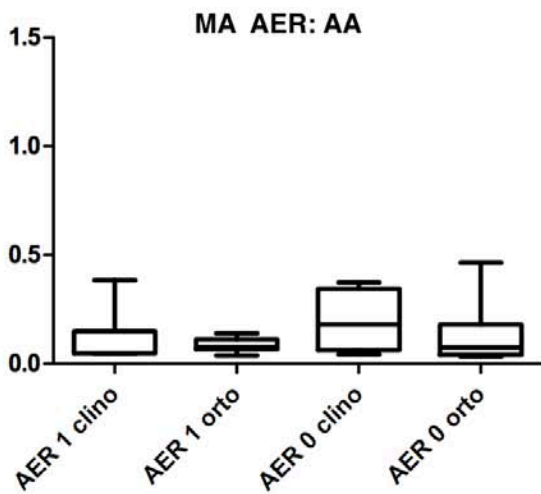
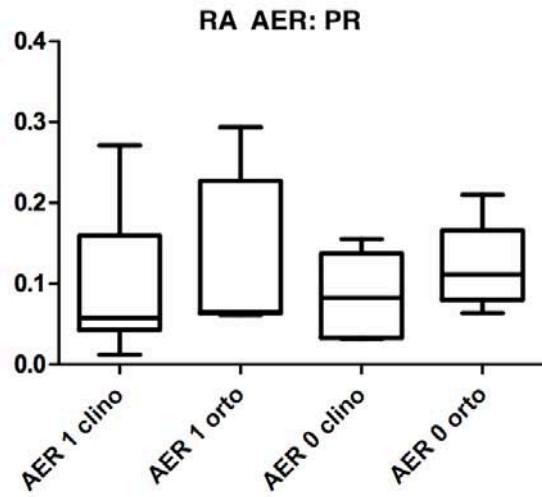
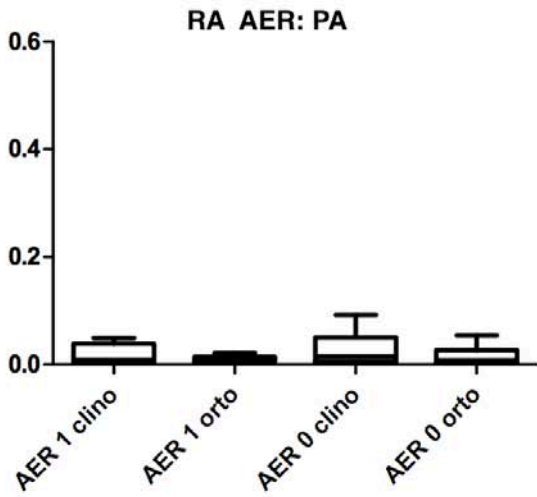
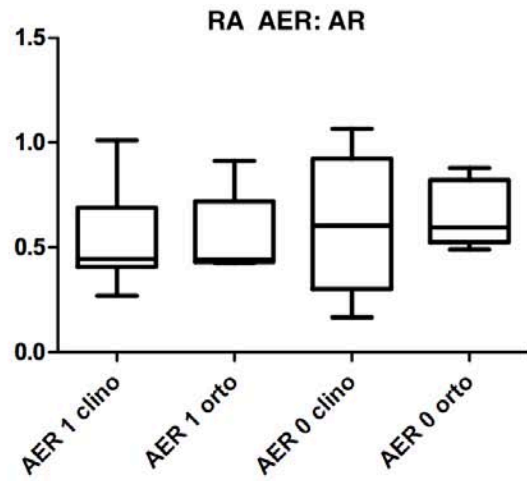
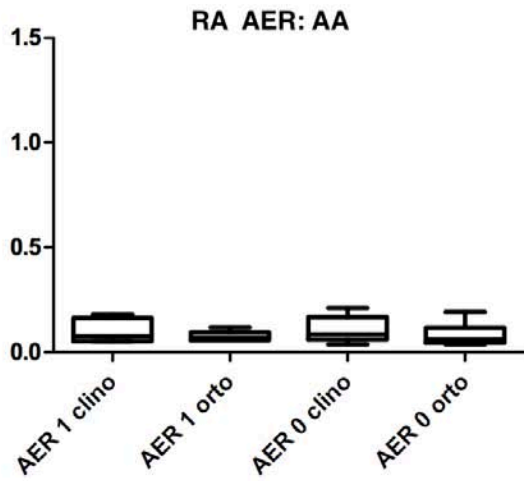


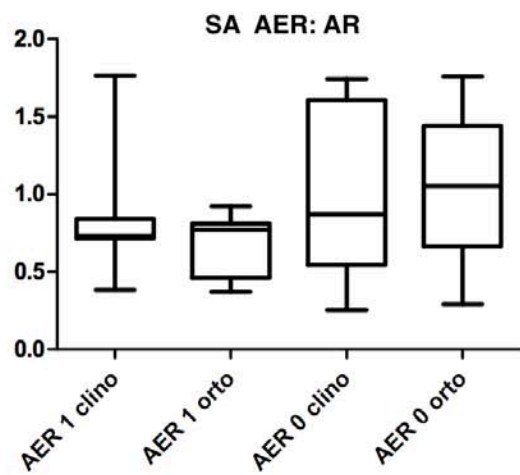
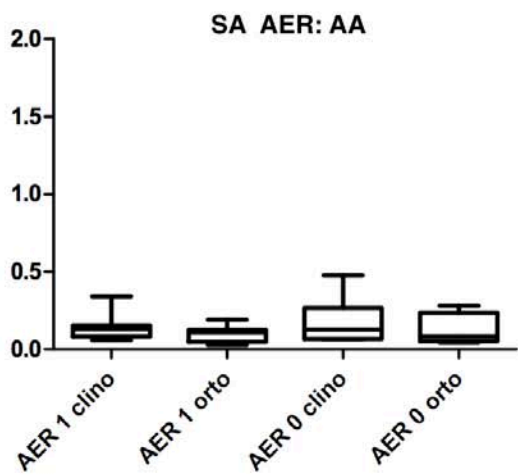
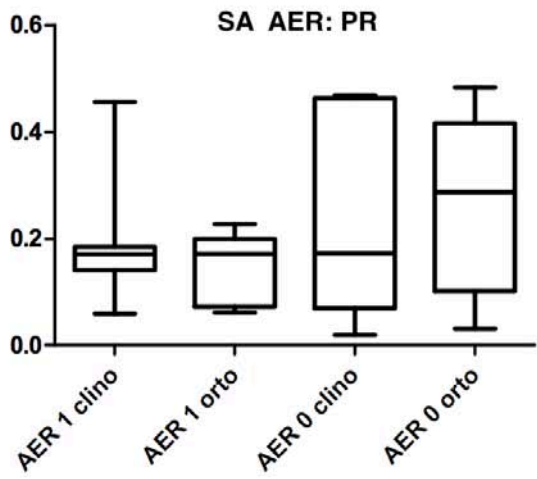
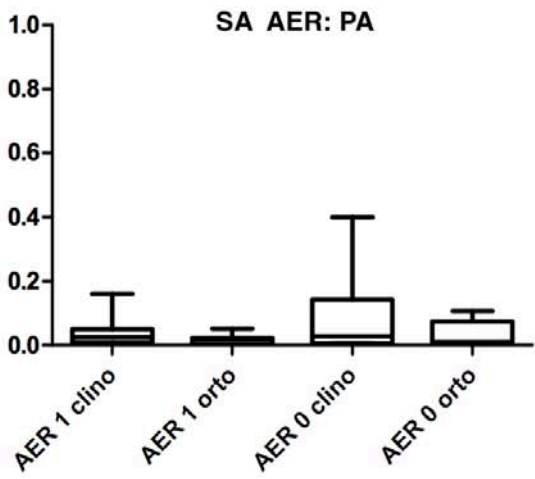
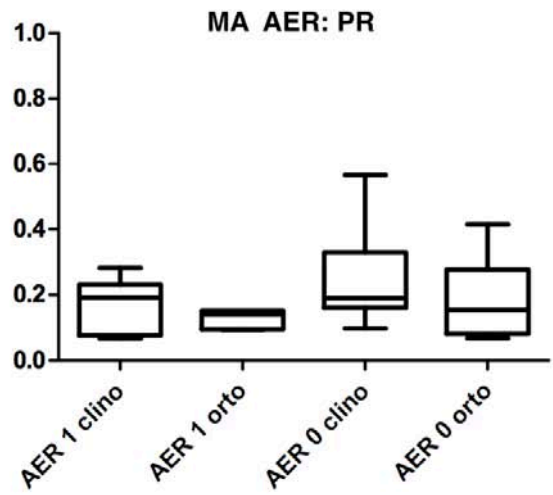
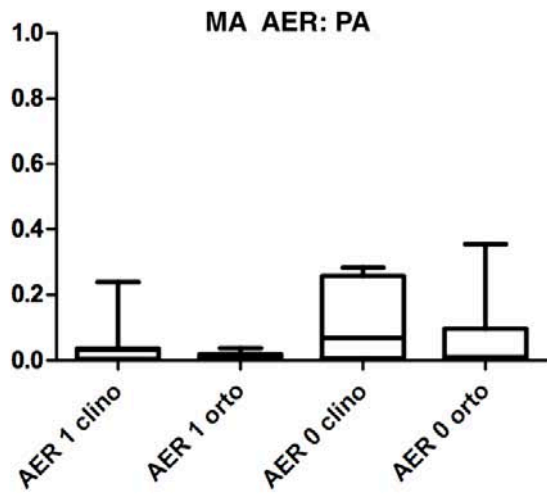


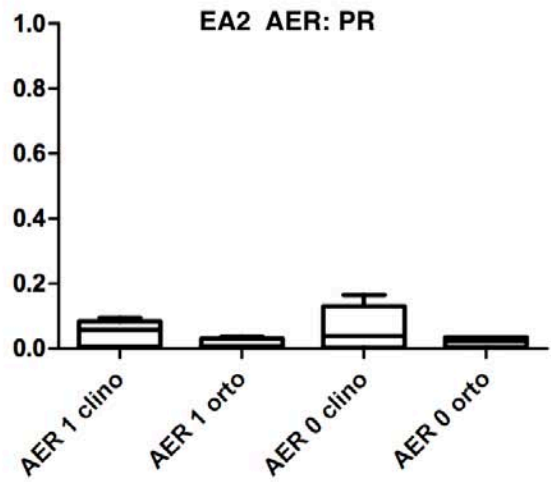
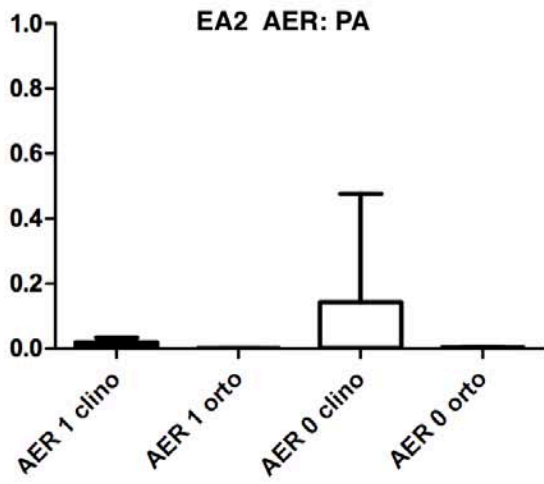
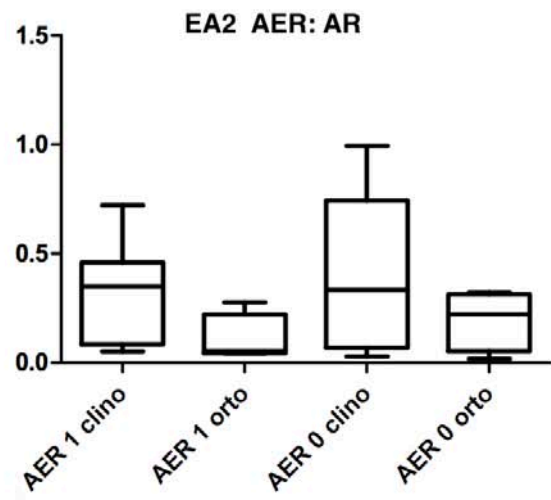
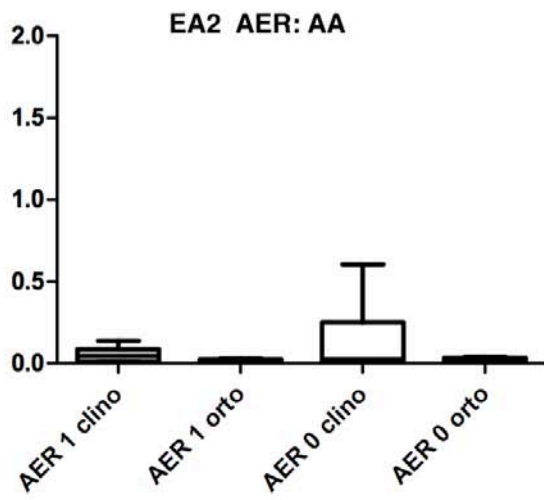


AER1 vs AER0







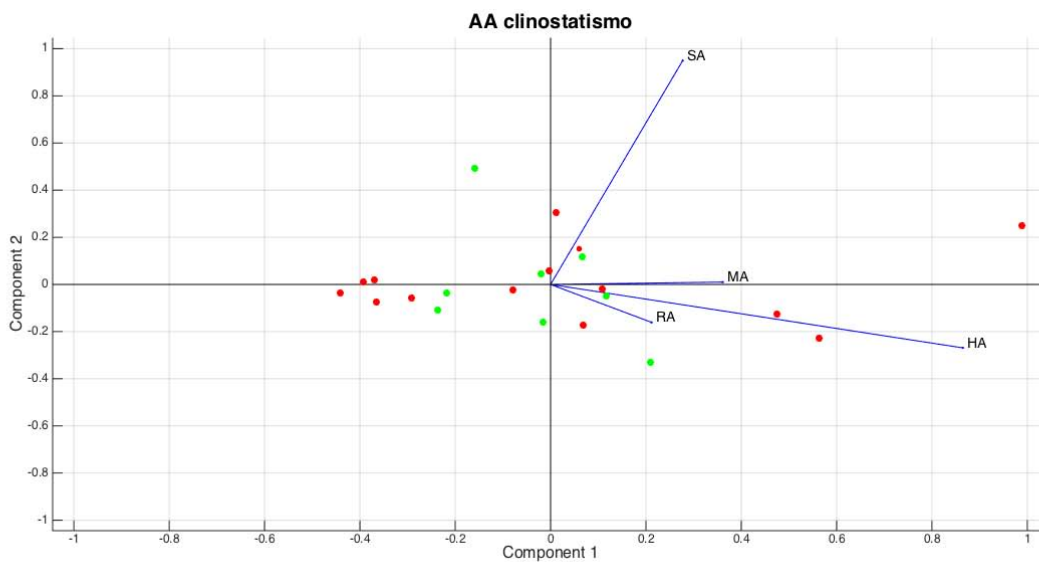


Appendice B

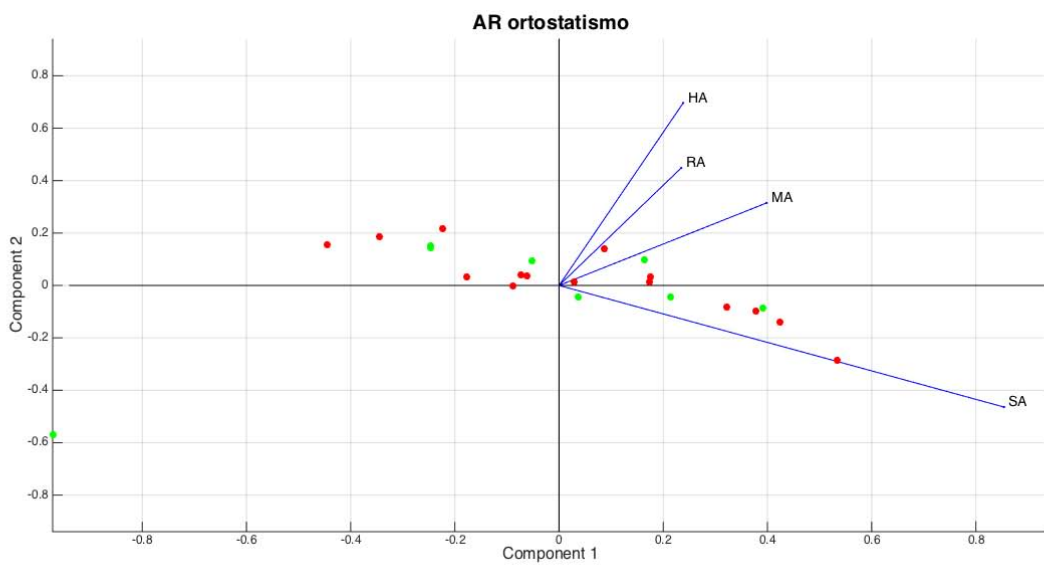
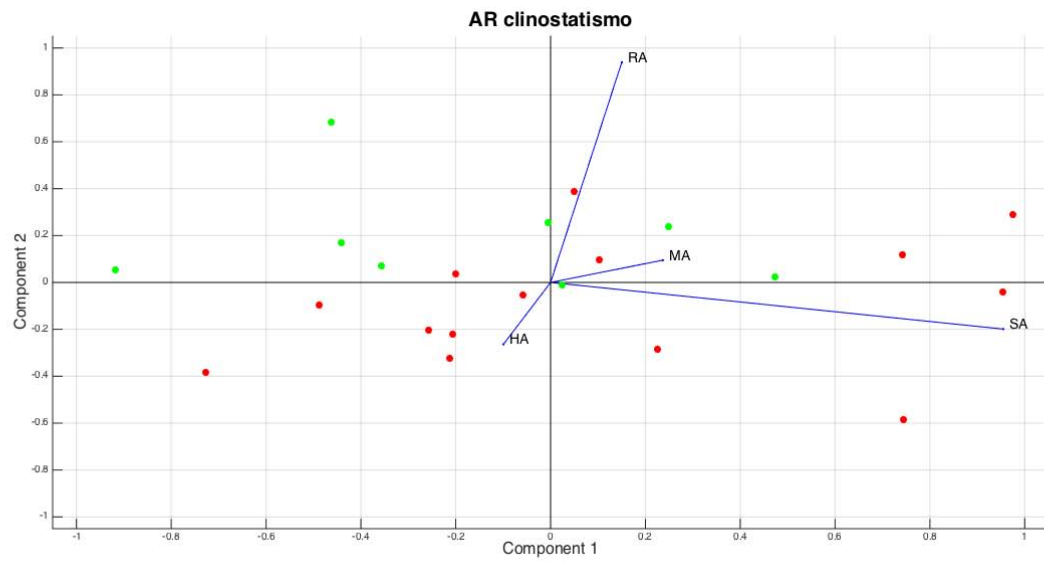
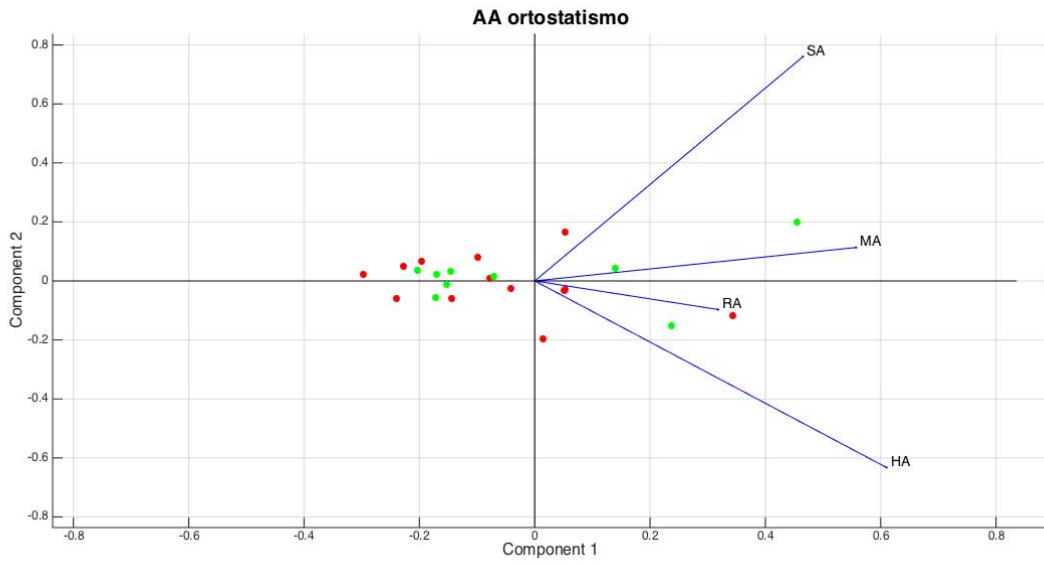
In questa sezione sono contenuti i grafici ottenuti con la PCA. Nel paragrafo B.1 sono riportati i grafici ottenuti suddividendo i segnali in clinostatismo e ortostatismo, per ogni parametro analizzato: in verde sono indicati i pazienti VAR1 e in rosso i pazienti VAR0.

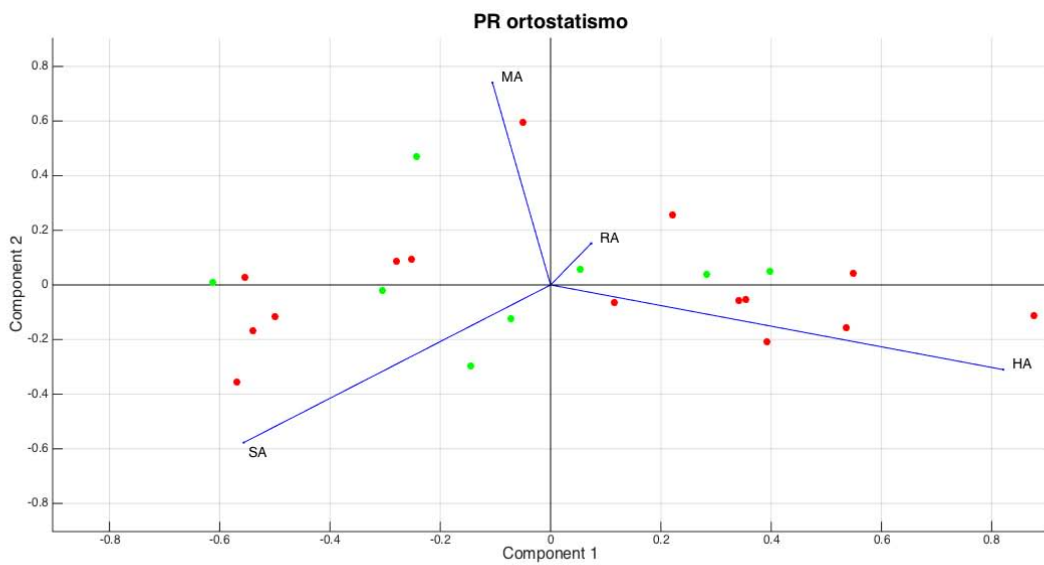
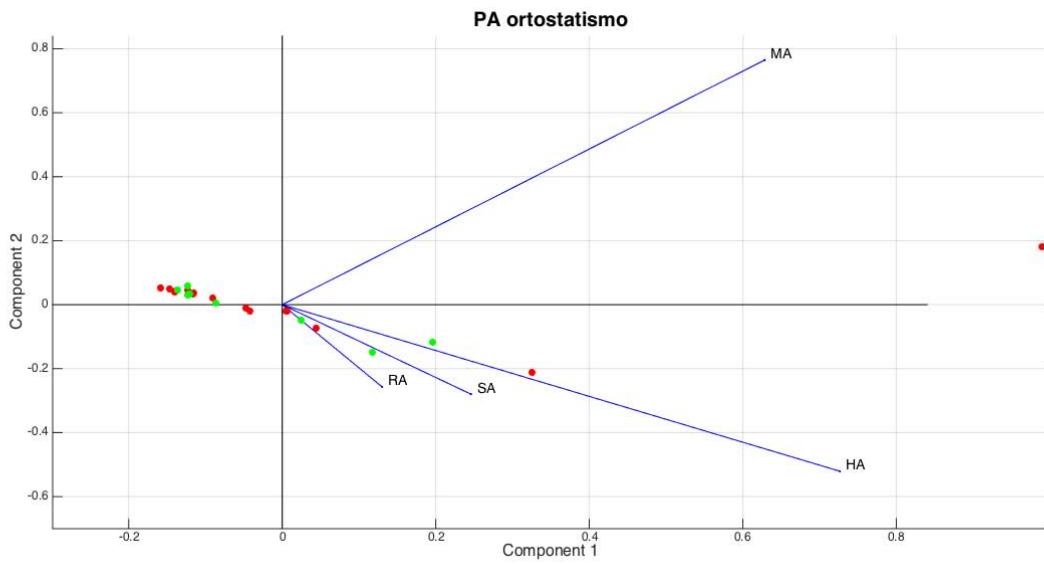
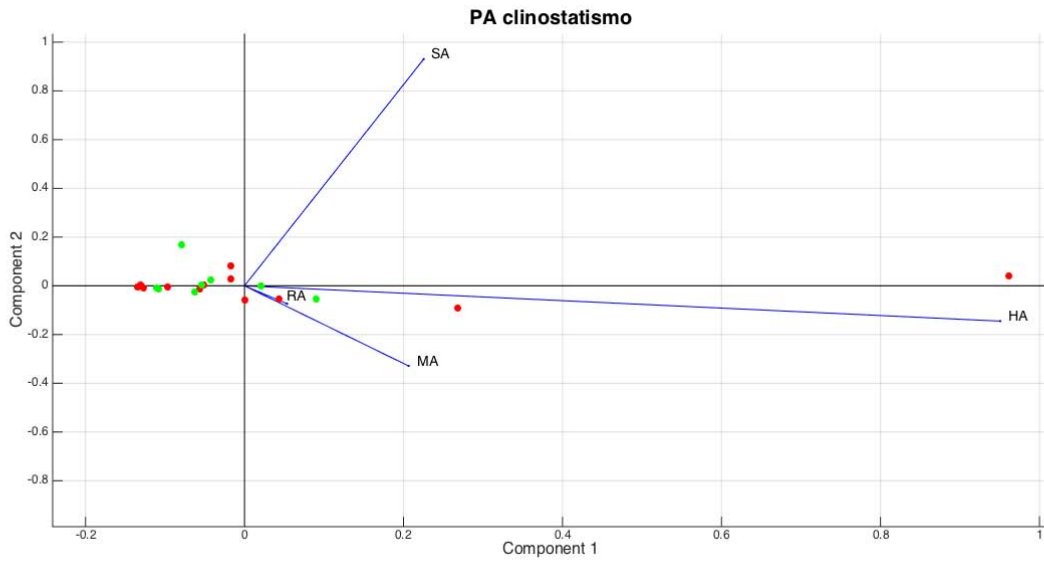
Nel paragrafo B.2 sono illustrati i grafici ottenuti partendo dalla suddivisione in VAR1 e VAR0: in viola sono indicati i valori del segnale in clinostatismo, in giallo i valori in ortostatismo.

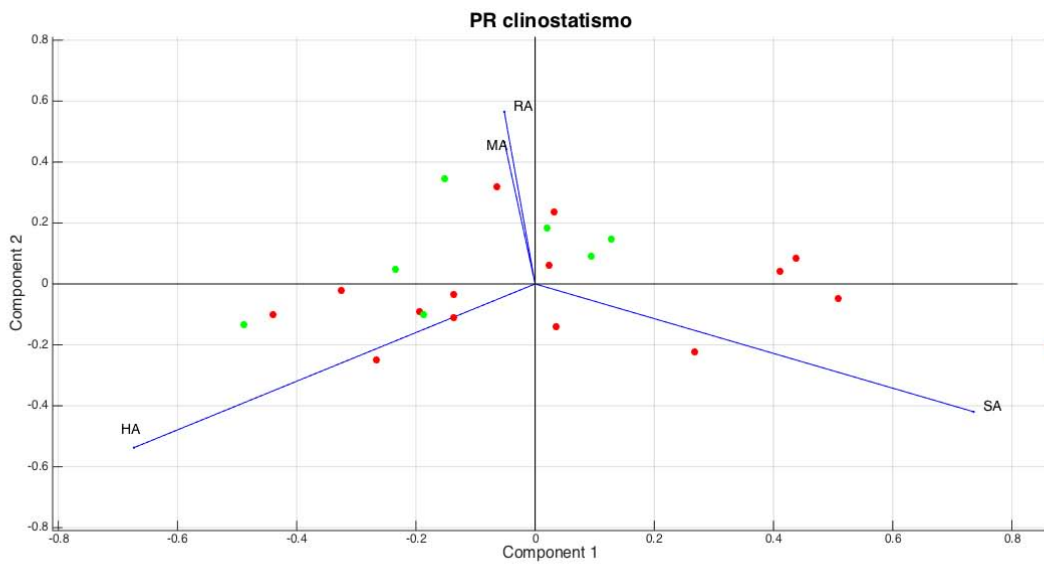
B.1 VAR1 vs VAR0



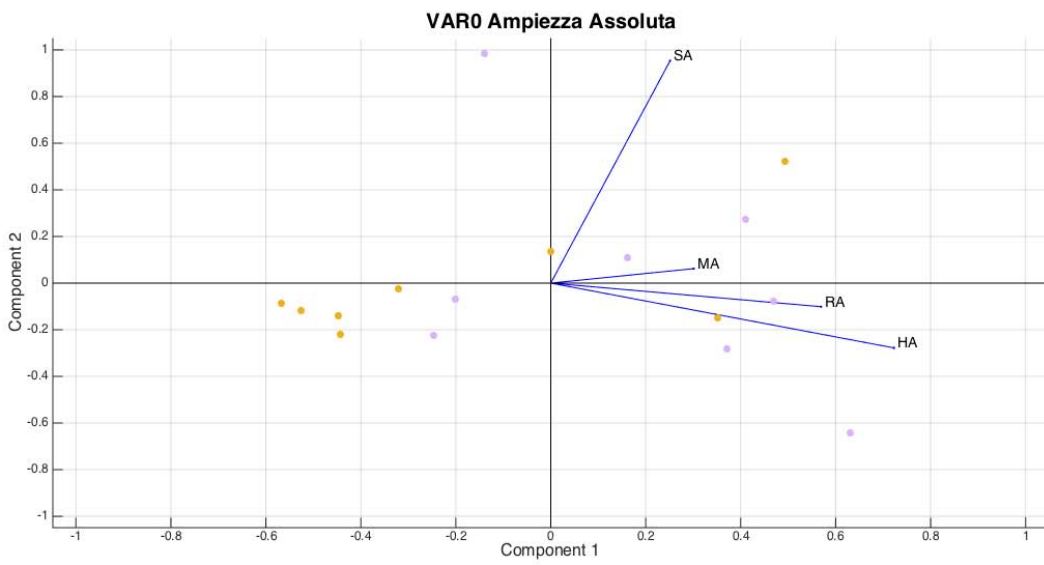
Appendice B

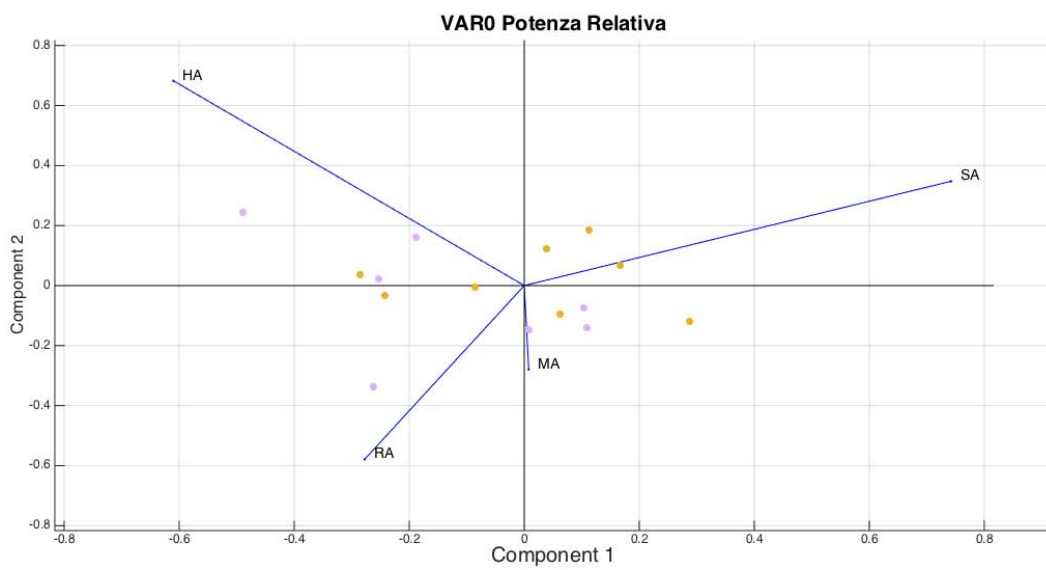
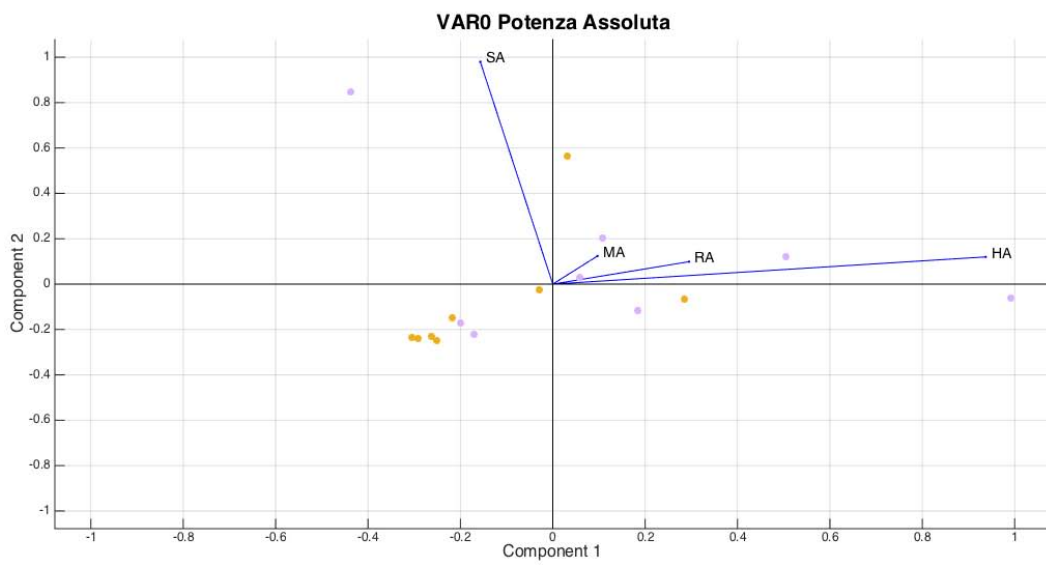
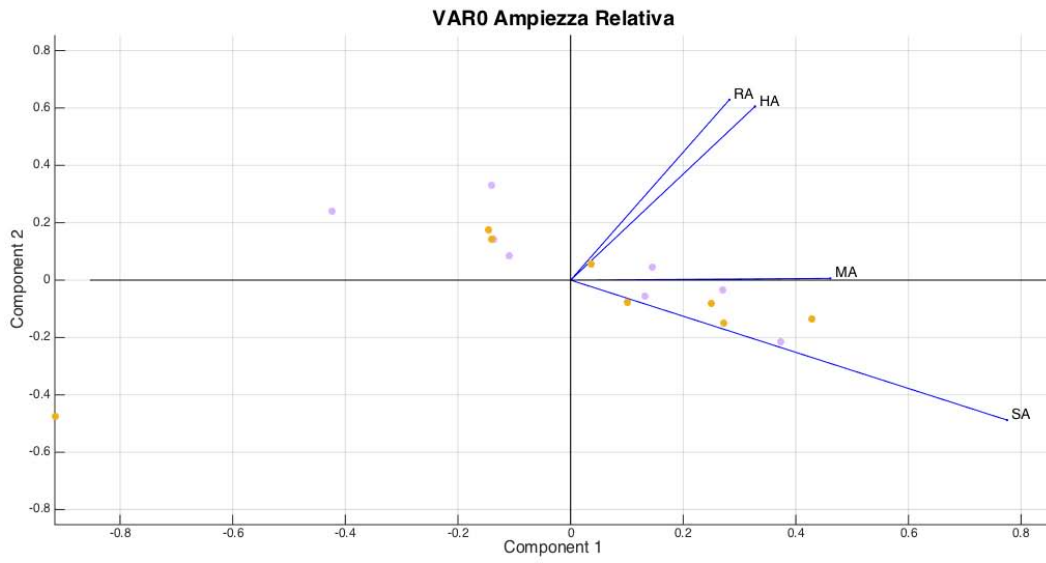




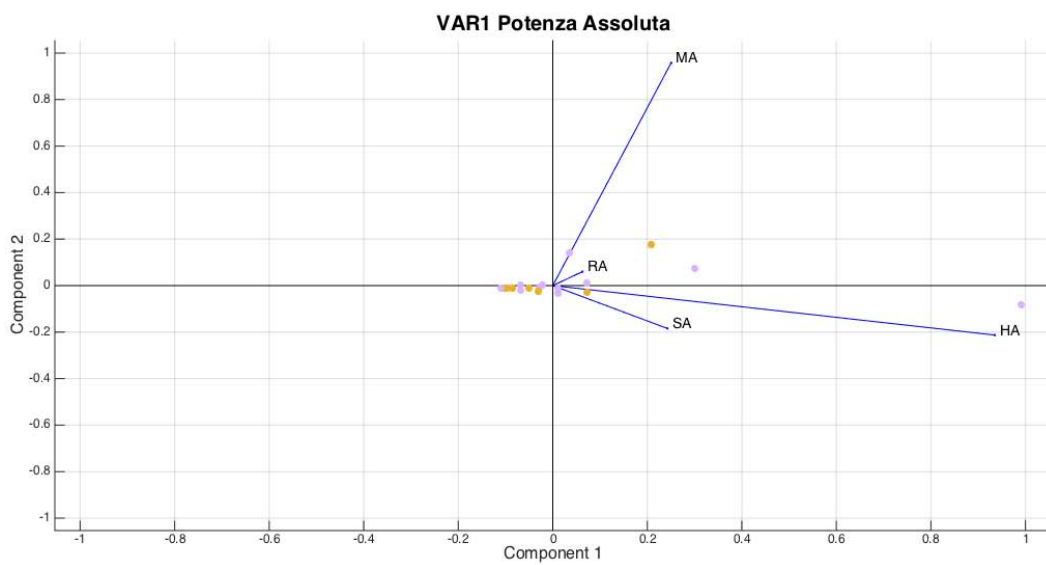
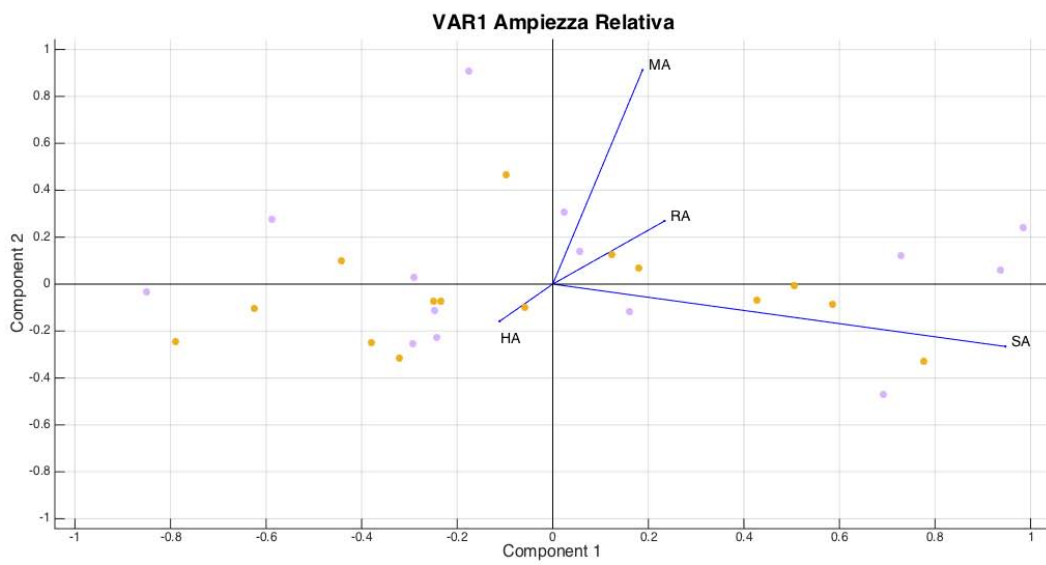
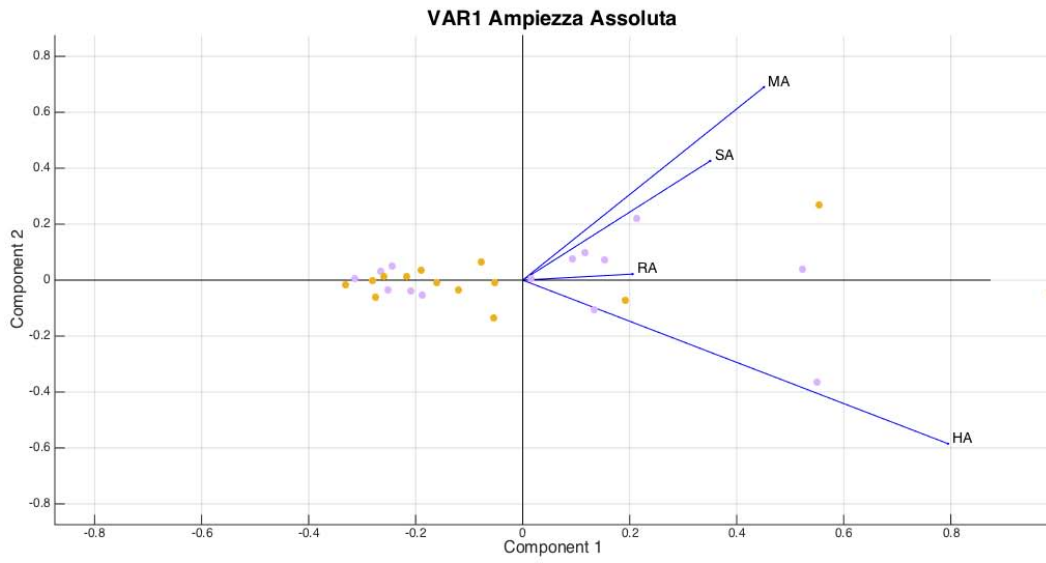


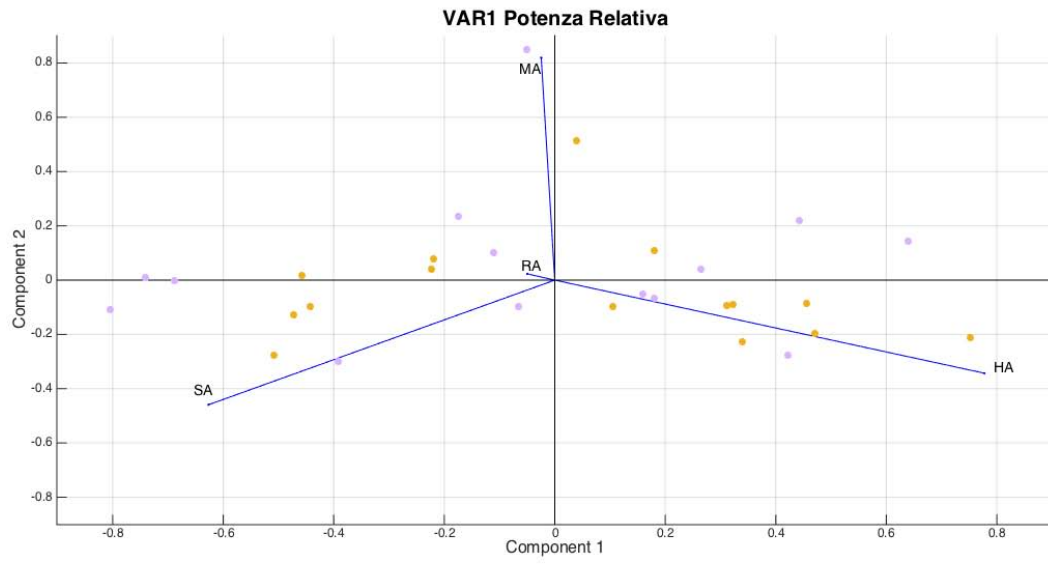
B.2 Clinostatismo vs ortostatismo





Appendice B





Bibliografia

- [1] M. Intaglietta, *Vasomotion and flowmotion: physiological mechanisms and clinical evidence*, Vasc Med, 1990, 10.
- [2] A. C. Guyton, J.E. Hall, *Textbook of medical physiology*, Saunders, 12th ed. 2010.
- [3] S. Dalla Volta, L. Daliento, R. Razzolini, *Malattie del cuore e dei vasi*, McGraw Hill, 3rd ed. 2005
- [4] A. Fauci, E. Braunwald, D. Kasper, S. Hauser, D. Longo, J. L. Jameson, J. Loscalzo, *Harrison – Principi di Medicina Interna*, McGraw Hill, 17th ed. 2011, vol. II
- [5] J. K. Li, *Dynamics of the Vascular System*. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., Feb 2004.
- [6] A. Stefanovska and P. Kroelj, *Correlation integral and frequency analysis of cardiovascular functions*, Open Systems and Information Dynamics archive, 1997, 4.
- [7] 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.
- [8] P. Kvandal, S. A. Landsverk, A. Bernjak, A. Stefanovska, H. D. Kvernmo, and K. A. Kirkeboen, *Low-frequency oscillations of the laser doppler perfusion signal in human skin*, Microvascular Research, 2006, 72: 120 – 127.
- [9] 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.
- [10] H. D. Kvernmo, A. Stefanovska, K. A. Kirkeboen, 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.

[11] G. Faglia, P. Beck – Peccoz, *Malattie del Sistema Endocrino e del Metabolismo*, McGraw Hill, 4th ed. 2006

[12] C. M. Choi and R. G. Bennett, *Laser dopplers to determine cutaneous blood flow*, *Dermatol Surg*, 2003, 29.

[13] M. F. Swiontkowski, *Laser Doppler Flowmetry - Development and Clinical Application*. The Iowa orthopaedic journal, 1991, 11: 119-126.

[14] D. Halliday, R. Resnick, and K. S. Kraner, *Fisica 2*. CEA, 3 ed., Jun 2004.

[15] H. Albrecht, N. Damaschke, M. Borys, and C. Tropea, *Laser Doppler and Phase Doppler Measurement Techniques*, Springer-Verlag, 1 ed., Dec 2002.

[16] S. Sarnik, I. Hofirek, and O. Sochor, *Laser doppler fluxmetry*, *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 2007, 151(1): 143 – 146.

[17] G. Cariolaro, G. Pierobon, and G. Calvagno, *Segnali e sistemi*. McGraw- Hill, Gen 2005.

[18] S. Qian and D. Chen, *Joint Time-Frequency Analysis, Methods and Applications*. Academic Press, Dec 2011.

[19] S. Mallat, *A wavelet tour of signal processing*. Academic Press, 3 ed., Dec 2008.

[20] M. Bracic and A. Stefanovska, *Wavelet-based analysis of human blood-flow dynamics*, *Bulletin of Mathematical Biology*, 1998, 60: 919-935.

[21] 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.

[22] 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.

[23] 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.

[24] D. Iatsenko, P. V. E. McClintock, and A. Stefanovska, *Linear and synchrosqueezed time-frequency representations revisited. Part I: Overview, standards of use, related issues and algorithms*, arXiv preprint arXiv:1310.7215, 2013.

[25] O. Henriksen, *Local nervous mechanism in regulation of blood flow in human subcutaneous tissue*. *Acta Physiol Scand* 1976; 97: 385-91.

[26] A. A. K. Hassan, J. E. Tooke, *The mechanism of the postural vasoconstrictor response in the human foot*. *Clin Sci* 1988; 75: 379-87.

[27] V. Ticcinelli, A. Bagno, R. Martini, *Preliminary study of laser – Doppler perfusion signal by wavelet transform in patients with critical limb ischemia before and after revascularization*, *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 2014; 1; 58: 415-28

[28] L.V. Fulton, F. A. Mendez, N.D. Bastian, R. M. Musal, *Journal of Statistics education*, 20, 3

[29] R. Ricci, *Appunti di Statistica*, Università di Firenze, Facoltà di Psicologia, 2002-2003

[30] D. L. Massart, B. G. M. Vanderginste, S. N. Deming, Y. Michotte, L. Kaufman, *Chemometrics: a Textbook*, Elsevier, New York, 1988

[31] I. Jolliffe, *Principal Component Analysis*, Springer – Verlag, New York, 1986

