

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

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

Corso di Laurea Magistrale in Bioingegneria

**Analisi della perfusione cutanea
prima e dopo iperemia reattiva
post occlusiva**

Relatore: Prof. Andrea Bagno

Correlatore: Dott. Romeo Costanzo Martini

Laureando: Stefan Octavian Popa

A.A. 2014/2015

Sommario

L'analisi della perfusione cutanea mediante l'acquisizione di un segnale di flussimetria laser-Doppler permette di determinare l'emodinamica del microcircolo cutaneo. Il segnale è caratterizzato da oscillazioni periodiche, dette onde di flowmotion; dalla loro analisi spettrale si possono individuare sei intervalli di frequenze associati ad altrettante attività delle strutture del sistema cardiovascolare: attività cardiaca, attività respiratoria, attività del sistema nervoso autonomo simpatico locale, attività miogena e attività endoteliale non dipendente e dipendente dall'ossido nitrico.

La presente tesi ha per obiettivo lo studio delle variazioni degli intervalli di frequenza rilevati con il segnale laser-Doppler su pazienti con arteriopatia periferica degli arti inferiori sottoposti a prova di iperemia reattiva post occlusiva (PORH) prima e dopo l'applicazione della terapia FREMS. Attraverso la trasformata Wavelet del segnale laser-Doppler sono stati valutati i contributi dei diversi intervalli di frequenza al variare del tempo e attraverso l'analisi della Wavelet Entropy è stata studiata la complessità del contributo dei singoli intervalli di frequenza.

Nel Capitolo 1 vengono introdotti alcuni elementi di fisiologia del sistema cardiovascolare e vengono presentati i concetti di vasomotion e flowmotion e l'arteriopatia periferica occlusiva. Nel Capitolo 2 vengono esposti i principi di funzionamento della flussimetria laser-Doppler. Nel Capitolo 3 si presentano le basi teoriche dell'analisi in frequenza evidenziando come la trasformata Wavelet sia adatta all'analisi dei segnali laser-Doppler. Nel Capitolo 4 si descrive la parte sperimentale: la selezione dei pazienti, la terapia FREMS, la prova PORH e le caratteristiche dello strumento di misura. Nel Capitolo 5 vengono presentati i metodi applicati per l'analisi dei dati e nel Capitolo 6 vengono presentati e discussi i risultati ottenuti. Nel Capitolo 7 vengono tracciate le conclusioni e fornite indicazioni per proseguire l'attività di ricerca.

Ringraziamenti

Desidero ringraziare tutti coloro che mi hanno aiutato nella stesura della tesi con suggerimenti, critiche e osservazioni. In particolar modo desidero ringraziare il Prof. Andrea Bagno, relatore, e il Dott. Romeo Martini, correlatore, per i preziosi insegnamenti e per le numerose ore dedicate alla mia tesi.

Un sentito ringraziamento va a Fabio e agli amici del Murialdo che mi hanno sempre saputo ascoltare e sostenere nei momenti più difficili.

Infine, desidero ringraziare con affetto i miei genitori per il sostegno ed il grande aiuto che mi hanno sempre dato.

Indice

1.	Introduzione	1
1.1.	Il sistema cardiovascolare	1
1.2.	Vasomotion e flowmotion	4
1.2.1.	Attività cardiaca	6
1.2.2.	Attività respiratoria	6
1.2.3.	Attività miogena	7
1.2.4.	Attività neurogena.....	8
1.2.5.	Attività endoteliale.....	8
1.3.	Arteriopatia periferica occlusiva.....	9
1.4.	Obiettivi dello studio	11
2.	La flussimetria laser-Doppler	13
2.1.	Principi di funzionamento.....	13
2.1.1.	Formulazione matematica.....	14
2.2.	Il Funzionamento del flussimetro laser-Doppler	16
2.3.	Limiti della flussimetria laser-Doppler.....	18
3.	Analisi del segnale	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	24
3.2.1.	Limiti della trasformata di Fourier Short Time	26
3.3.	La trasformata Wavelet.....	27
3.3.1.	La risoluzione tempo-frequenza	27
3.3.2.	La formulazione matematica	28
3.3.3.	Lo scalogramma.....	32
3.3.4.	Limiti della trasformata Wavelet	34
4.	Metodi sperimentali	37
4.1.	Pazienti: criteri di selezione	37
4.2.	Terapia FREMS	37
4.3.	La prova di iperemia reattiva post ischemica	38
4.4.	Strumento di misura e acquisizione del segnale	40
5.	Analisi dei dati	43
5.1.	Pre-elaborazione del segnale	43
5.2.	Analisi Wavelet.....	46
5.2.1.	Il padding predittivo.....	47
5.2.2.	Intervallo di frequenze calcolabili	49
5.2.3.	Algoritmo per il calcolo della trasformata Wavelet.....	50
5.3.	Elaborazione dei dati	52
5.3.1.	Analisi dello spettro medio per finestre temporali.....	55
5.3.2.	Wavelet Entropy	56
6.	Risultati e discussione.....	59
6.1.	Prima parte: Analisi dello spettro medio	60
6.2.	Seconda parte: Analisi dello spettro medio per finestre temporali	69
6.3.	Terza parte: Wavelet Entropy	75
7.	Conclusioni	79
	Bibliografia	81

1. Introduzione

In questo lavoro di tesi si analizza il segnale di perfusione cutanea misurato con il Flussimetro Laser Doppler; in special modo, ci si occupa dello studio dei fattori che influiscono sulla perfusione cutanea prima e dopo la prova di iperemia reattiva occlusiva (PORH).

Lo strumento acquisisce un segnale tipicamente oscillatorio espresso in unità arbitrarie (perfusion unit, PU), permettendo di misurare lo stato della perfusione cutanea locale nel tempo. Le oscillazioni della perfusione cutanea sono dovute ai fenomeni di vasomotion: la contrazione e il rilassamento delle cellule muscolari lisce presenti nella tonaca media delle arteriole [1]. È noto dalla letteratura che per il mantenimento di un'adeguata perfusione nei tessuti ci sono diversi meccanismi regolatori che influiscono sulla vasomotion, operanti sia a livello sistemico che a livello di microvasi.

Per studiare tali meccanismi bisogna identificare il contributo delle strutture che regolano il flusso del sangue a partire dalle oscillazioni osservate con lo strumento di misura. Per fare ciò, si utilizza la trasformata Wavelet, applicandola al segnale di perfusione prima e dopo la PORH che, essendo un test di valutazione funzionale, permette di evidenziare la risposta delle strutture cardiovascolari alla ischemia indotta. Infine viene utilizzata la Wavelet Entropy per studiare la complessità.

Il set di dati è composto da 5 pazienti affetti da arteriopatia periferica occlusiva di tipo I, ai quali è stata applicata la terapia FREMS. Questo tipo di analisi permette di osservare quali implicazioni ha questa terapia sui vari soggetti analizzati.

1.1. Il sistema cardiovascolare¹

Il sistema cardiovascolare è composto da tre principali componenti: il cuore, il sistema vascolare e il sangue. Il sistema cardiovascolare in sé è un sistema chiuso in cui il sangue è pompato dal cuore attraverso un insieme di vasi distinti in arterie, vene e capillari e svolge un insieme di funzioni come il trasporto dell'ossigeno e la rimozione dei prodotti terminali del metabolismo, CO₂ compresa. Inoltre provvede

¹ Le nozioni di anatomia e di fisiologia presentate in questo capitolo sono tratte da [2].

anche alla difesa immunitaria, alla termoregolazione, all'idratazione dei tessuti e alla nutrizione degli organi.

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, con le sue componenti simpatica e parasimpatica, che partecipa assieme al sistema endocrino (tiroide, surreni, ipofisi ecc.) al mantenimento del tono vascolare e alla regolazione della perfusione ematica nei vari organi.

L'intero sistema cardiovascolare può essere suddiviso in due circuiti, la circolazione polmonare e la circolazione sistemica (Figura 1.1), ognuna delle quali inizia e finisce al cuore. Le parti destra e sinistra del cuore hanno entrambe due camere: la camera atriale e la camera ventricolare. Su ogni lato del cuore è presente il flusso sanguigno dall'atrio al ventricolo, ma non c'è nessuno collegamento diretto fra atri o fra ventricoli.

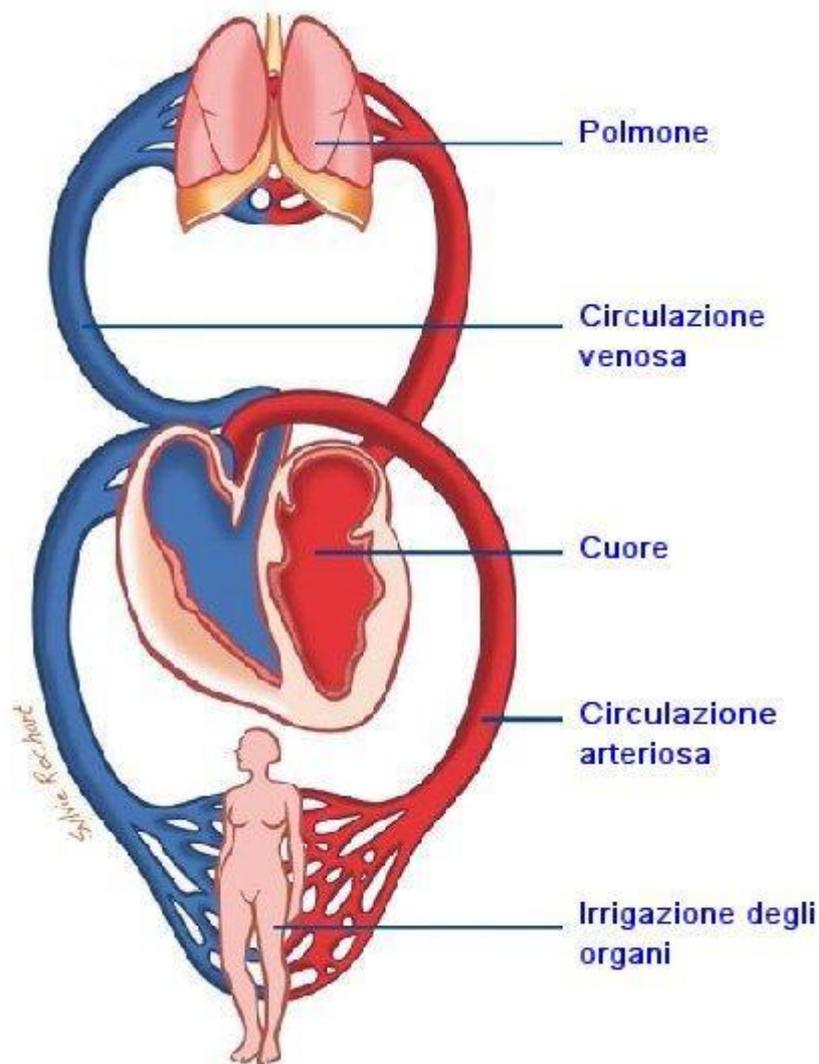


Figura 1.1: Sistema cardiovascolare.

La circolazione polmonare porta il sangue dal ventricolo destro attraverso i polmoni, passando per il microcircolo polmonare, fino all'atrio sinistro. In seguito il sangue viene pompato alla circolazione sistemica attraverso il ventricolo sinistro, per raggiungere tutti gli organi e i tessuti attraverso il microcircolo, per poi tornare al cuore nell'atrio destro. In entrambi i circoli, i vasi che portano il sangue fuori dal cuore si chiamano arterie, mentre quelli che riportano il sangue al cuore si chiamano vene.

Nel circolo sistemico, il sangue lascia il ventricolo sinistro attraverso una grossa arteria, l'aorta, la quale si dirama in vasi sempre più piccoli, prima le arterie poi le arteriole, per dividersi infine in un numero elevatissimo di vasi molto piccoli, i capillari. In seguito i capillari si uniscono per formare dei vasi di diametro sempre più grande, le venule e le vene. Il flusso sanguigno passante per le arteriole, per i capillari e per le venule si chiama *microcircolo* (Figura 1.2).

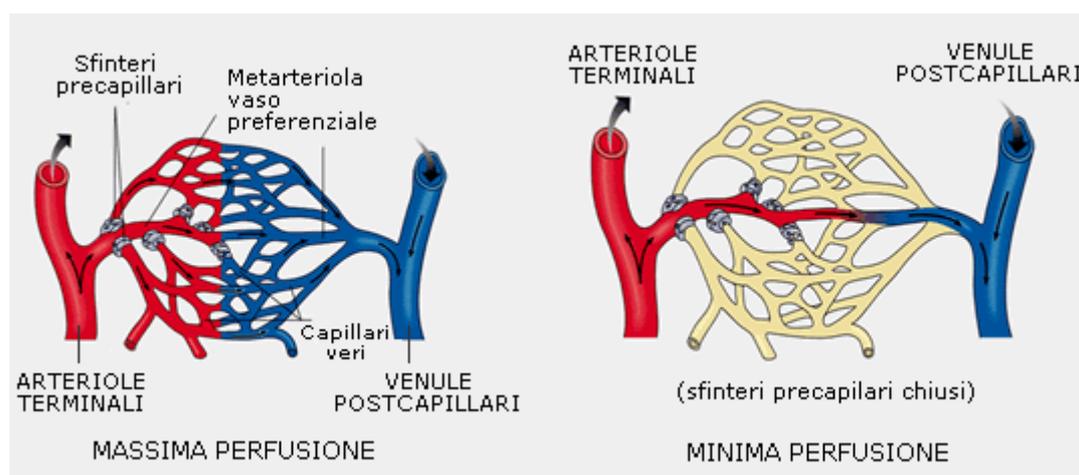


Figura 1.2: Microcircolazione: arteriole, venule e capillari.

Le caratteristiche funzionali e strutturali dei vasi sanguinei cambiano con il loro diametro e la loro successiva diramazione. Tutti i vasi hanno una componente comune l'*endotelio*, uno strato sottile di cellule endoteliali che delimita la superficie interna dei vasi. I capillari sono formati solo dall'*endotelio*, mentre gli altri vasi hanno anche uno strato connettivo, la tonaca avventizia, e uno o più strati di cellule muscolari lisce.

Le cellule endoteliali sono a stretto contatto fra di loro formando una barriera protettiva per prevenire l'interazione tra le cellule sanguinee e i vasi. L'*endotelio* svolge un ruolo critico nel meccanismo di controllo del flusso sanguigno, della regolazione, dell'adesione dei leucociti nella sede d'infiammazione e della crescita delle cellule

muscolari lisce. In più funge anche da barriera contro la diffusione transvascolare dei fluidi e dei soluti presenti nei vasi. È noto in letteratura che l'endotelio intatto produce un fattore che causa il rilassamento delle cellule muscolari lisce dei vasi, l'ossido nitrico (NO). L'ossido nitrico viene rilasciato continuamente dall'endotelio nelle arteriole e contribuisce alla dilatazione delle arteriole a riposo. La produzione di NO può essere stimolata da una varietà di antagonisti endoteliali e dallo *shear stress* risultante da un incremento di flusso sanguigno o di pressione. Oltre a NO, l'endotelio rilascia anche altri vasodilatatori e vasocostrittori.

Le cellule muscolari lisce sono disposte in forma elicoidale o in strati circolari attorno ai vasi e conferiscono una tensione attiva nella parete vascolare regolando il diametro dei vasi. In tanti vasi sono presenti cellule muscolari lisce che hanno una depolarizzazione spontanea. Esse si comportano da pacemaker stimolando le cellule adiacenti fornendo una tensione di background, il tono basale miogeno. La proprietà è molto simile a quella del cuore, ma le caratteristiche contrattili e quelle meccaniche che causano le contrazioni vascolari sono molto diverse da quelle dei muscoli lisci.

1.2. Vasomotion e flowmotion

Il mantenimento di una perfusione dei tessuti adeguata è data da meccanismi di controllo presenti a livello dei vasi sanguinei microscopici, ed è prodotta da un unico evento meccanico: la contrazione e il rilassamento dei vasi che sono dotati di cellule muscolari lisce che determinano la variazione del calibro dei vasi a prescindere dalla frequenza cardiaca.

Come conseguenza di questo processo, la pressione impressa al sangue dal cuore è distribuita in modo tale che la pressione capillare superi la pressione colloid-osmotica del plasma affinché lo scambio di fluidi sia bilanciato tra sangue e tessuto. In più, lo stesso processo garantisce 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 di microvasi [1].

Tale azione di contrazione e rilassamento dei vasi sanguinei (Figura 1.3), che permette la realizzazione di un processo di controllo della perfusione sanguinea locale, prende il nome di *vasomotion*.

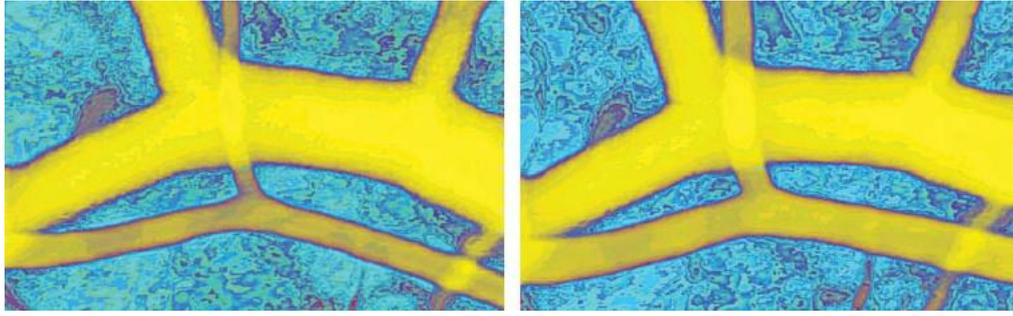


Figura 1.3: Vasomotion di un arteriola.

Per la propagazione dell'evento meccanico di contrazione o di rilassamento, la vasomotion sfrutta le gap junction che collegano tra di loro le membrane di cellule muscolari lisce adiacenti (Figura 1.4). Attraverso queste giunzioni avviene lo scambio di potenziali chimici ed elettrici in grado di propagare il fenomeno di vasomotion a tutto il vaso. In più esiste anche un accoppiamento meccanico tra le cellule, che permette di stimolare attraverso la contrazione di una cellula la contrazione anche di altre cellule ad essa adiacenti.

Nel microcircolo, la vasomotion è controllata dalla dinamica dei canali ionici. Questa attività è spontanea e ha portato all'ipotesi che a livello delle cellule muscolari lisce delle cellule arteriali vi sia un'attività simile alle quella delle cellule pacemaker del cuore. Questa particolare attività si verifica a livello delle biforcazioni delle arteriole, zone in cui sono state riscontrate cellule muscolari lisce in grado di depolarizzarsi periodicamente e autonomamente.

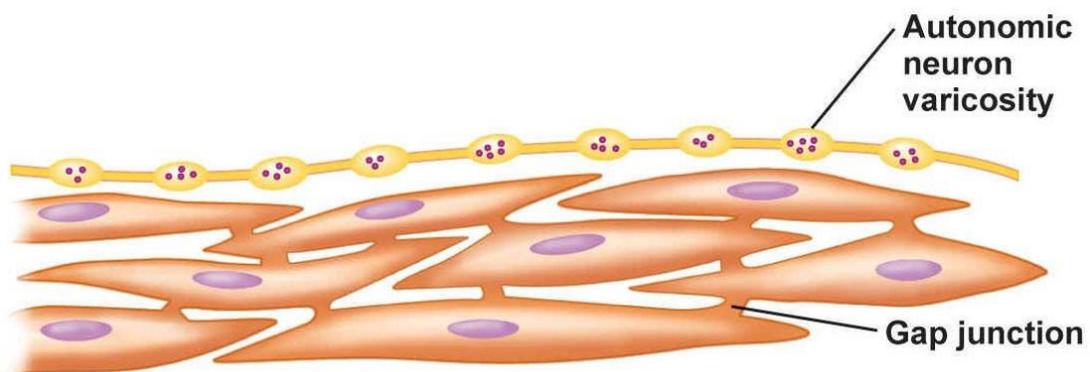


Figura 1.4: Cellule di tessuto muscolare liscio collegate da gap junction.

Un altro tipo di controllo dell'attività delle cellule muscolari lisce è dato dal controllo neuro-endocrino-sistemico e da variazioni di pressione ematica all'interno del

vaso. Per esempio, l'angiotensina II, un ormone deputato all'incremento pressorio, stimola la contrazione delle cellule muscolari lisce, mentre il peptide natriuretico atriale, prodotto dal miocardio nel momento in cui c'è un aumento eccessivo del volume ematica, provoca il rilassamento delle cellule muscolari lisce [3].

La stimolazione delle cellule muscolari lisce è determinata anche dalla concentrazione di ossigeno e di anidride carbonica nel sangue: la diminuzione della concentrazione di ossigeno e di pH induce vasodilatazione.

La variazione ritmica del diametro dei vasi dovuta all'attivazione dei vari meccanismi di controllo instaura un andamento oscillatorio del flusso sanguigno all'interno dei vasi denominato *flowmotion*. Lo studio del fenomeno della flowmotion può essere eseguito grazie alla flussimetria laser-Doppler (LD). Attraverso l'analisi delle varie componenti oscillatorie del segnale acquisito con la flussimetria LD si possono valutare i vari fenomeni che determinano l'autoregolazione del microcircolo. Grazie all'analisi dello spettro del segnale LD è possibile analizzare le attività sistemiche coinvolte nel controllo della autoregolazione.

In seguito si descriveranno le attività sistemiche in relazione alle singole bande di frequenza presenti nello spettro del segnale LD.

1.2.1. Attività cardiaca

Questa attività è causata dall'azione del cuore che spinge il sangue attraverso i microvasi. È espressione del volume di gittata sistolica, spinta che la pompa cardiaca dà alla colonna ematica attraverso i vasi sanguigni. Questa spinta viene propagata attraverso i vasi fino alla microcircolazione testimoniando che il sistema cardiovascolare funziona in maniera unitaria con periferia e centro. Le oscillazioni del segnale LD associate all'attività cardiaca hanno una banda di frequenze compresa tra 0.6 e 2 Hz [4].

1.2.2. Attività respiratoria

La respirazione svolge un ruolo fondamentale nella circolazione: con l'atto dell'inspirare, infatti, viene impartita al sangue una pressione che lo richiama attraverso la rete venosa dalla periferia verso il centro determinando il riempimento atriale. Nell'atrio destro sono presenti dei barocettori che in base alla loro stimolazione determinano un aumento o una diminuzione della resistenza periferica arteriolare per mantenere la pressione sistemica adeguata alle esigenze dell'organismo. Tali azioni vengono esplicitate attraverso il sistema nervoso autonomo simpatico. Quindi anche l'attività respiratoria è un controllo di tipo estrinseco della flowmotion. Le oscillazioni

associate all'attività respiratoria presenti nel segnale LD hanno una banda di frequenze compresa tra 0.145 e 0.6 Hz [5].

1.2.3. Attività miogena

L'attività miogena è stata descritta da Folkov [6] come risposta spontanea contrattile (Figura 1.5) all'allungamento ε delle cellule muscolari lisce. Questa risposta contrattile è causata dalla tensione normale σ che il flusso ematico esercita sulla parete del vaso. La relazione tra tensione normale σ e allungamento ε è descritta dalla legge di Hook:

$$\sigma = E\varepsilon$$

dove E è il modulo elastico longitudinale della parete vascolare. Quando la pressione aumenta, i vasi sanguigni si dilatano e le fibre muscolari che circondano i vasi si estendono.

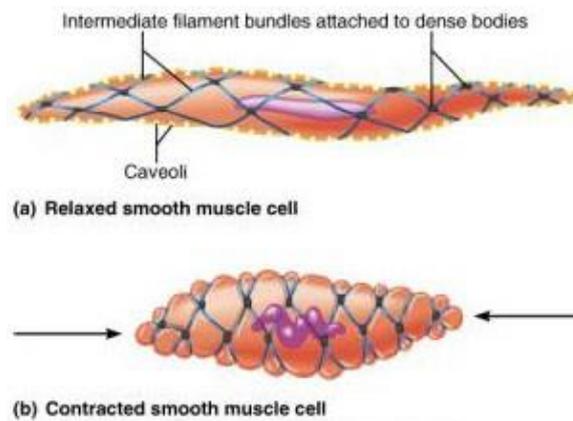


Figura 1.5: Fibra muscolare liscia distesa (a), contratta (b).

Il riflesso miogeno è anche regolato dalla legge di Laplace:

$$T = k\sigma r$$

La tensione T nella parete è proporzionale al prodotto della pressione idraulica del sangue σ per il raggio del vaso r . La costante di proporzionalità k dipende dalla forma del condotto. All'aumentare della pressione si deve avere una riduzione del raggio per mantenere costante una determinata tensione parietale. Le oscillazioni del segnale LD associate all'attività miogena hanno una frequenza compresa tra 0.052 e 0.145 Hz [6].

1.2.4. Attività neurogena

L'attività neurogena è dovuta a stimoli di tipo nervoso che vengono esercitati sulle cellule muscolari. Il sistema nervoso autonomo ha la capacità di esercitare stimolazioni locali in seguito a stimoli fisici, chimici o metabolici presenti a livello locale. Il sistema nervoso autonomo stimola la contrazione e il rilassamento delle cellule muscolari lisce presenti nella tonaca media. Per esempio, nel caso di uno stimolo fisico come la regolazione della temperatura corporea, il sistema nervoso autonomo attiva i meccanismi che portano ad una variazione della vasomotilità dei microvasi. Le oscillazioni del segnale LD associate all'attività neurogena hanno una banda di frequenze compresa tra 0.021 e 0.052 Hz [7].

1.2.5. Attività endoteliale

Con l'analisi Wavelet del segnale LD sono state individuate altre due bande di frequenza associate all'attività endoteliale dei microvasi: la prima relativa all'attività dipendente dall'ossido nitrico (NO) e la seconda all'attività non dipendente da NO [6].

L'ossido nitrico prodotto dall'endotelio diffonde attraverso le cellule muscolari lisce e determina il loro rilassamento con un conseguente aumento del calibro arteriale e della perfusione. La produzione di NO viene stimolata dallo *shear stress* di parete e quindi un aumento della pressione ematica laterale porta ad una maggiore pressione sulle cellule endoteliali scatenando la produzione di NO. Questo meccanismo di controllo è tipico dell'iperemia reattiva, in cui la vasodilatazione non mediata dal NO si manifesta attraverso stimoli endoteliali dovuti alla produzione di AMP ciclico che agisce direttamente sulle cellule muscolari lisce. Le oscillazioni del segnale LD associate all'attività endoteliale sono divise in due bande di frequenza: una associata all'attività endoteliale NO dipendente compresa tra 0.0095 e 0.021 Hz e una all'attività endoteliale NO indipendente compresa tra 0.005 e 0.0095 Hz [8].

Nella Tabella 1 vengono riportate i vari intervalli di frequenza che compongono il segnale di perfusione cutanea.

Tabella 1: Le bande di frequenza presenti nel segnale di perfusione e relative attività.

Intervallo	Banda di frequenze [Hz]	Attività	Acronimo
I	0.6-2.0	Cardiaca	HA
II	0.145-0.6	Respiratoria	RA
III	0.052-0.145	Miogena	MA
IV	0.021-0.052	Neurogena	SA
V	0.0095-0.021	Endoteliale NO dipendente	EA2
VI	0.005-0.0095	Endoteliale NO indipendente	EA1

1.3.Arteriopatia periferica occlusiva

L'arteriopatia periferica occlusiva (PAOD) è una malattia che colpisce le arterie non coronarie (carotidi, renali e degli arti). Nella maggioranza dei casi, l'eziologia della PAOD è l'aterosclerosi che, generando lo sviluppo di placche, causa stenosi del lume delle arterie con una conseguente ischemia acuta o cronica.

Relativamente alla PAOD degli arti inferiori la classificazione più utilizzata si basa sulla sintomatologia, ed è dovuta a Leriche e Fontaine [9]. Secondo questa classificazione i pazienti vengono divisi in quattro stadi:

- Stadio I: asintomatica, si ha quando la stenosi non è significativa o quando ci sono molti circoli collaterali. I sintomi compaiono solo con sforzi intensi;
- Stadio II: stadio della *claudicatio intermittens*: dolore al polpaccio che insorge durante l'attività fisica. Il dolore è dovuto allo scarso afflusso sanguineo con una relativa ischemia che costringe il paziente ad interrompere l'attività fino al cessare del dolore;
- Stadio III: stadio del dolore a riposo, soprattutto in posizione distesa, che aumenta quando l'arto viene sollevato. Qui inizia la condizione chiamata ischemia critica;
- Stadio IV: presenza di ulcere e gangrena, si ha morte per necrosi del tessuto dell'arto.

Secondo uno studio della National Health and Nutrition Examination Survey condotto negli Stati Uniti su un campione di più di 2000 soggetti con età superiore ai 40 anni [10], i fattori di rischio che contribuiscono alla manifestazione della PAOD sono:

- età: la presenza della PAOD aumenta drasticamente con l'età, colpendo il 14,5% dei soggetti con età superiore ai 70 anni (Figura 1.6);
- ipertensione: è associata a tutte le forme di malattie cardiovascolari, PAOD compresa. Nel caso della PAOD il rischio derivante dall'ipertensione è più basso di quello associato al diabete o al fumo;
- ipercolesterolemia: più del 60% degli individui affetti da PAOD soffrivano di ipercolesterolemia. In questi casi il miglior predittore per l'occorrenza della PAOD risulta essere il rapporto tra lipoproteine ad alta densità e lipoproteine totali;
- fumo: i fumatori presentano un rischio quattro volte superiore di sviluppare PAOD rispetto ai non fumatori. Inoltre, la gravità della PAOD aumenta con il numero di sigarette fumate;
- diabete mellito: nei pazienti diabetici la probabilità di essere affetti da PAOD risulta due volte superiore a quella dei pazienti non diabetici e nel caso della necessità di un'amputazione la probabilità è di almeno cinque volte superiore rispetto ai pazienti non diabetici. In questo studio il 26% dei pazienti con PAOD era diabetico.

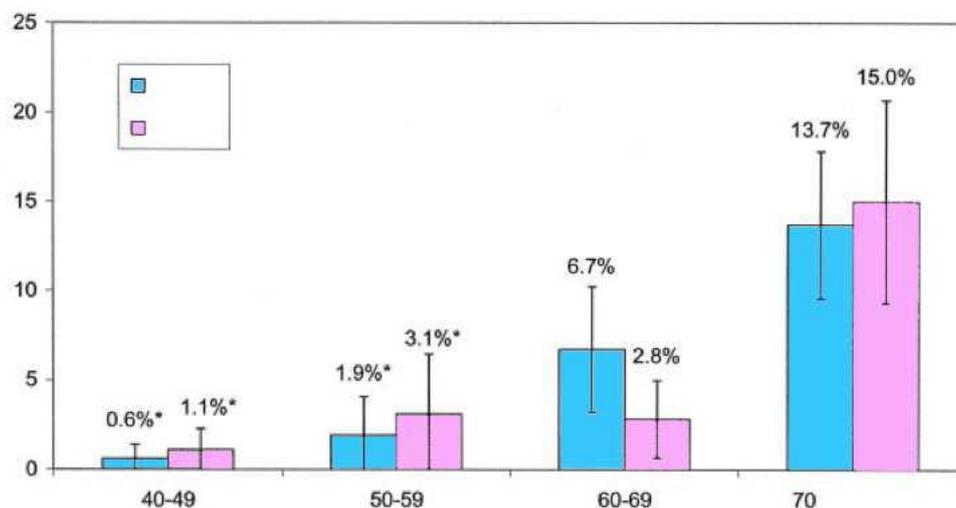


Figura 1.6: Percentuali di incidenza della PAOD in uomini(azzurro) e donne(lilla) statunitensi aventi più di 40.

Nello studio della National Health and Nutrition Examination Survey [10] circa il 95% dei soggetti affetti da PAOD presentava almeno uno dei fattori di rischio sopra citati, e il 72% due o più fattori.

1.4. Obiettivi dello studio

Nel presente lavoro di tesi è stato osservato un gruppo di pazienti arteriopatici ai quali è stata somministrata la terapia FREMS. Questo gruppo è stato sottoposto alla prova funzionale di iperemia reattiva post ischemica (PORH) prima e dopo la somministrazione della terapia FREMS e contestualmente è stato acquisito il segnale di perfusione cutanea con il flussimetro laser-Doppler durante le tre fasi della prova:

- a riposo (detta “basale”) dove il paziente è a riposo e il segnale è stazionario;
- durante l’occlusione, dove il flusso sanguigno viene bloccato e il segnale è quasi nullo (“zero biologico”);
- durante l’iperemia reattiva, dove il flusso sanguigno aumenta rapidamente raggiungendo un picco per poi riassetarsi lentamente a livelli basali.

Le bande di frequenza rilevate dai segnali laser-Doppler durante la fase a riposo e la fase di iperemia reattiva sono state in seguito individuate con la trasformata Wavelet per valutare gli effetti della stimolazione elettrica della terapia FREMS sulle singole attività delle strutture cardiovascolari. In più, le bande di frequenza sono state analizzate anche con la Wavelet Entropy per studiare la complessità del loro contributo nel tempo.

2. La flussimetria laser-Doppler

In questo capitolo vengono descritti i principi di funzionamento della *flussimetria laser-Doppler*, una tecnica che permette di effettuare indagini non invasive sensibili all'andamento del flusso sanguigno della microcircolazione periferica cutanea (Figura 2.1), e viene presentato lo strumento di misura, il flussimetro laser-Doppler (LDF).

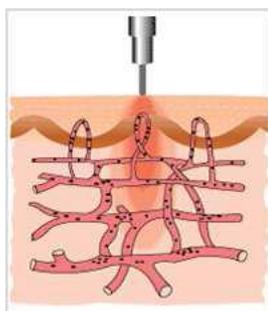


Figura 2.1: Sezione della cute in cui viene mostrata la penetrazione del fascio di luce laser.

2.1. Principi di funzionamento

I principi su cui si basa la flussimetria LD sono quelli della teoria dell'effetto Doppler: le onde che colpiscono oggetti in movimento subiscono uno *shift* in frequenza. In questo tipo di applicazione gli oggetti in movimento che fungono da riflettori sono i globuli rossi che si muovono ad una velocità di 0.01-10 mm/s nei vasi della microcircolazione cutanea.

La microcircolazione cutanea è suddivisa in due plessi orizzontali: uno superficiale e uno più profondo. Le arteriole ascendenti e le venule discendenti si ramificano in entrambi i plessi. Il LDF rileva il movimento dei globuli rossi transitanti nel microcircolo del plesso superficiale, raggiungendo arteriole, venule e capillari aventi una sezione trasversale di 0.002-0.008 mm² [11].

Monitorando il movimento dei globuli rossi nel tempo il LDF è in grado di registrare le variazioni ritmiche che avvengono nel flusso ematico cutaneo, la cosiddetta *flowmotion* [12].

Un fascio di luce laser a bassa energia viene direzionato attraverso una fibra ottica nella cute fino ad una profondità di circa 1.5-2 mm e i globuli rossi che attraversano il volume cutaneo colpito dal fascio monocromatico determinano un *shift*

in frequenza della luce riflessa per via dell'effetto Doppler. La grandezza e la distribuzione in frequenza della luce riflessa dipendono dal numero di globuli rossi e dalla loro velocità nel momento in cui attraversano il volume di tessuto esaminato. Il fascio di luce laser riflesso torna alla sonda e viene convertito in un segnale elettrico con le stesse componenti in frequenza. Lo strumento amplifica le onde e determina la differenza di frequenza tra il segnale di partenza e quello di arrivo, permettendo di calcolare la velocità del flusso sanguineo.

Per garantire che i fenomeni di dispersione siano limitati e che venga favorita la riflessione dei globuli rossi che hanno dimensioni tra 7 e 8 μm , si utilizza una luce laser coerente e monocromatica emessa in un fascio concentrato ad una singola frequenza f_s . La radiazione solitamente emessa ha lunghezza d'onda di circa 0.7 μm in modo da incidere su corpuscoli di dimensioni maggiori della lunghezza d'onda [13].

2.1.1. Formulazione matematica

Formalmente, lo *shift* Doppler è definito come uno spostamento della frequenza di un'onda che avviene quando c'è un movimento relativo tra sorgente e ricevitore e nel caso in cui ricevitore e sorgente si muovono sulla stessa linea, sussiste 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 e v_s sono rispettivamente le velocità del ricevitore e della sorgente e f_r e f_s sono rispettivamente le frequenze dell'onda ricevuta e inviata.

Nel caso in esame c è significativamente superiore a v_r e v_s e sorgente e ricevitore si muovono in direzioni diverse. In questo caso sull'effetto Doppler influiscono solo le proiezioni sulla retta passante per sorgente e ricevitore dei vettori velocità. Chiamando α e β gli angoli che i vettori velocità formano con la retta passante per sorgente e per ricevitore, la relazione tra f_r e f_s la si riscrive:

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

La componente del vettore velocità dei globuli rossi v_g che contribuisce all'effetto Doppler è perpendicolare alla cute. Segue che i globuli rossi che scorrono

nelle parti ascendenti e discendenti delle anse (vedi Figura 2.1) contribuiscono in modo più consistente di quelli che percorrono la parte parallela alla cute.

Nel caso della LDF, l'effetto Doppler si verifica due volte [15]:

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

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

2. una sonda riceptrice ferma ($v_r = 0$) riceve attraverso la cute la luce laser alla frequenza f_g riflessa dai globuli rossi i quali diventano gli emettitori con velocità v_g :

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

Poiché siamo nel caso in cui $c \gg v_g$, si può trascurare il termine di secondo grado e l'equazione finale diventa:

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

dalla quale si ricava lo *shift* Doppler tra segnale inviato e ricevuto, il quale risulta proporzionale alla velocità dell'agente riflettente e inversamente proporzionale alla lunghezza d'onda 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 formata dalla luce che ha colpito corpuscoli fissi e avrà la stessa frequenza della luce trasmessa e un'altra parte che sarà caratterizzata da uno *shift* in frequenza perché viene riflessa dai globuli rossi in movimento. La frequenza di questa ultima parte risulta 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. Il Funzionamento del flussimetro laser-Doppler

Lo strumento di misura ha due sonde a fibre ottiche vicine (Figura 2.2). La prima è la sorgente del dispositivo ed emette luce laser sfruttando le fibre ottiche messe a contatto con la cute. Le strutture sottostanti la cute possono riflettere, assorbire o disperdere i fotoni incidenti. La seconda sonda è in grado di ricevere il fascio di luce riflessa o diffusa dalle strutture sottostanti che possono essere in movimento o ferme [11].

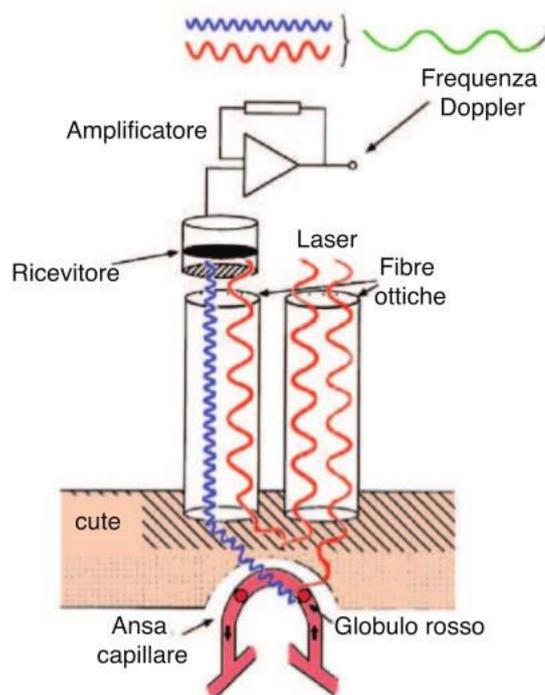


Figura 2.2: Schema di funzionamento del LDF.

I riflettori che si muovono non sono solamente i globuli rossi, ma anche altri tessuti presenti nel volume analizzato, come per esempio la parete vascolare. Questi tessuti producono uno *shift* Doppler che, rispetto a quello causato dai globuli rossi, genera un segnale con ampiezza maggiore, perché c'è un maggior numero di onde incidenti su di essi, e con una frequenza più bassa, perché la loro velocità di movimento è più lenta di quella dei globuli rossi. Il contributo di questi tessuti può essere eliminato con un filtro di tipo passa-alto.

La sonda misura un segnale che è composto da due porzioni di luce riflessa (vedi Figura 2.1) e presenta il fenomeno della frequenza di battimento; esso si verifica quando ci sono segnali con frequenze simili, ma non identiche, che si sovrappongono. L'onda risultante ha frequenza uguale alla media delle frequenze dei segnali sovrapposti e ampiezza modulata dallo sfasamento dovuto alla diversità delle frequenze. Risulta dunque un segnale con ampiezza oscillante tanto più velocemente quanto più sono differenti le frequenze.

Il segnale misurato si scompone nelle sue due componenti shiftate e non shiftate. La componente shiftata viene con un filtro passa-alto per eliminare il contributo proveniente dal movimento dei tessuti. Ogni campione ottenuto in uscita dallo strumento è proporzionale ai valori di frequenza e ampiezza di questo segnale e poiché questi valori sono legati alla velocità e al numero di elementi riflettenti (globuli rossi), si può risalire ai valori di perfusione cutanea.

Le misure effettuate sono espresse in unità di perfusione PU, che sono unità arbitrarie [16] e non si è ancora in grado di stabilire valori assoluti di perfusione. Ciò che viene misurato, il flux, non rappresenta una misura assoluta della velocità delle cellule sanguigne.

La misura viene effettuata su un determinato volume tessutale fissato su un'area superficiale e di profondità variabile. I fattori che influiscono su tale misura dipendono da:

- caratteristiche del tessuto: struttura e densità capillare, pigmentazione, ossigenazione;
- lunghezza d'onda della sorgente luminosa: una lunghezza d'onda breve penetra poco esaurendosi in superficie perché le onde a maggior frequenza tendono ad incontrare con maggior probabilità delle particelle su cui collidere;
- configurazione della sonda: una distanza maggiore tra le fibre di trasmissione e ricezione porta all'analisi del tessuto a maggior profondità.

Il LDF sfrutta un sistema ad onda continua non fornendo alcuna informazione sulla posizione dei globuli rossi riflettenti [17].

2.3.Limiti della flussimetria laser-Doppler

Un problema intrinseco del LDF è la mancanza di una misurazione dello *zero assoluto* dello strumento di misura. Infatti quando il flusso sanguigno viene ridotto a zero, lo strumento rileva comunque un valore di flusso. Inizialmente lo zero biologico era attribuito al moto browniano nel compartimento vascolare e alla motricità della parete cellulare dei globuli rossi, mentre ora si suppone che la causa sia il moto browniano della macromolecole presenti in sospensione nell'interstizio [11].

Un altro problema è legato alla mancanza di un gold standard per la misura della perfusione di sangue in un tessuto che non permette di validare la tecnica laser Doppler. Bisogna ricordare che non è definita una quantità fisica assoluta a cui associare la misura della perfusione di sangue e per questo motivo è necessario un processo standardizzato di calibrazione, in questo caso fornito dalla casa che produce lo strumento. Per rendere comparabili le misure è necessario che la lunghezza d'onda della sorgente luminosa e la configurazione della sonda siano sempre le stesse. In più sarebbe ideale che le proprietà dei tessuti analizzati siano le stesse, ma tali condizioni sono difficilmente realizzabili.

La tecnica LDF è stata confrontata con altre tipologie di misurazione disponibili come l'isotopo di Xenon, la fluoresceina e le microsfere radioattive ed è stato dimostrato che esiste una forte correlazione tra la tecnica LDF e le altre. I coefficienti di correlazione possono variare a seconda dei siti in cui vengono fatte le misure e possono risentire di condizioni estreme di flusso e di valori di ematocrito [11].

Il problema più importante e più difficile da affrontare risiede nel fatto che la sonda è sensibile ai movimenti della zona sulla quale è stata fissata. Se il soggetto sul quale si sta effettuando la misura si muove, al segnale registrato vengono sommati i contributi del movimento, che non corrispondono a caratteristiche del microcircolo, e che sono degli artefatti. Tali artefatti sono facilmente riconoscibili se il movimento è breve e veloce, presentandosi come picchi di grande ampiezza che si esauriscono velocemente nel tempo (Figura 2.3). Nel caso in cui il movimento sia molto lento, il suo contributo al segnale misurato potrebbe essere facilmente confuso con l'attività del microcircolo, generando risultati non veritieri.

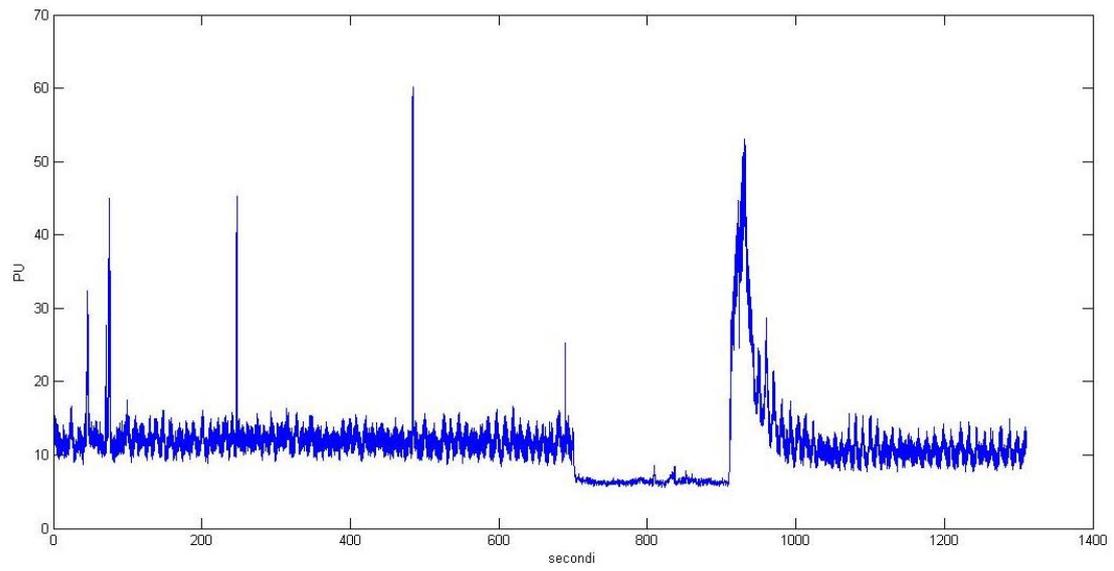


Figura 2.3: Artefatti da movimento nel segnale LDF.

3. Analisi del segnale

Nel caso in esame, il LDF fornisce un segnale campionato a 16 Hz con ampiezza misurata in PU: il segnale è dato da una serie di campioni che descrivono, per ogni istante di campionamento, la perfusione cutanea.

In una prima fase risulta naturale eseguire un'analisi nel dominio del tempo, cioè tracciare il segnale in un sistema di coordinate cartesiane in cui le ascisse rappresentano il tempo e le ordinate rappresentano l'ampiezza del segnale. Sebbene questa rappresentazione sia naturale e di facile interpretazione, non sempre rivela tutte le informazioni contenute nel segnale. Risulta quindi utile applicare una trasformazione matematica del segnale per estrarre informazioni relative al contenuto in frequenza del segnale, che in molti casi evidenzia caratteristiche nascoste ma estremamente utili.

In questo Capitolo vengono enunciati alcuni tipi di trasformate evidenziando i limiti di ciascuna per giustificare la scelta fatta: una trasformata tempo-frequenza come la trasformata Wavelet per estrarre ulteriori informazioni dal segnale LD.

3.1. La trasformata di Fourier²

La trasformata di Fourier è la trasformazione in frequenza più conosciuta, pubblicata nel 1822 in “Teoria analitica del calore” dal matematico francese Jean Baptiste Joseph Fourier. Egli dimostrò che un generico segnale può essere espresso come somma di onde semplici ognuna con una frequenza specifica e un coefficiente che descriva l'ampiezza.

L'equazione che permette di calcolare la trasformata di Fourier per un segnale $x(t)$ è la seguente:

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

L'esponenziale presente nell'integrale può essere riscritto attraverso la formula di Eulero come somma di seno e coseno alla frequenza f :

$$e^{-i2\pi ft} = \cos(2\pi ft) + i \sin(2\pi ft)$$

² Le nozioni presentate in questo paragrafo sono tratte da [18].

e moltiplicando l'intero segnale per questa espressione nel calcolo dell'integrale le componenti del segnale ad una certa frequenza \hat{f} vanno a coincidere con i termini sinusoidali alla frequenza \hat{f} fornendo una curva avente un'ampiezza relativamente consistente. Il risultato dell'integrale sintetizza tutto questo in un unico valore che viene segnato nello spettro con una determinata ampiezza in corrispondenza della frequenza \hat{f} . In base all'ampiezza di ogni componente spettrale risultante dall'integrazione, si può stabilire se il segnale $x(t)$ ha componenti spettrali dominanti alla frequenza \hat{f} o se ha componenti relativamente piccole o addirittura assenti nel caso in cui l'ampiezza risulti nulla.

L'unità di misura dell'ampiezza delle frequenze nello spettro può essere ricavata dalla definizione della trasformata di Fourier in cui il segnale $x(t)$ è misurato in PU, l'esponenziale $e^{-i2\pi ft}$ è adimensionale e il differenziale dt è misurato in secondi. Risulta quindi che $X(f)$ è espresso in $PU \cdot s$, cioè PU/Hz .

In Figura 3.1 viene rappresentato nel dominio del tempo un segnale apparentemente complesso composto dalla somma di tre sinusoidi aventi frequenze di 0.01, 0.1 e 1 Hz e coefficienti di ampiezza 3, 5 e 10 con unità di misura arbitraria A.

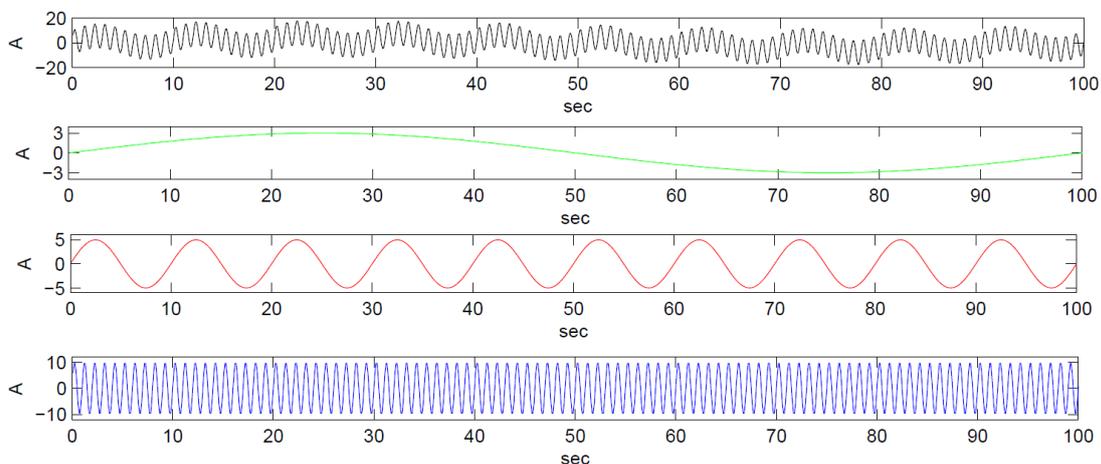


Figura 3.1: Segnale complesso (nero) scomposto nelle tre onde che lo compongono (verde, rosso e blu).

Applicando la trasformata di Fourier si ottiene un nuovo sistema di coordinate avente come ascisse le frequenze e come ordinate i valori dei coefficienti (Figura 3.2). Questa nuova rappresentazione prende il nome di *spettro* e indica quali frequenze sono

contenute nel segnale e con quale intensità. Nel caso del segnale sopra citato, lo spettro presenta tre *spikes* in corrispondenza delle frequenze delle onde che lo compongono, con ampiezze direttamente proporzionali alle ampiezze delle onde a cui si riferiscono.

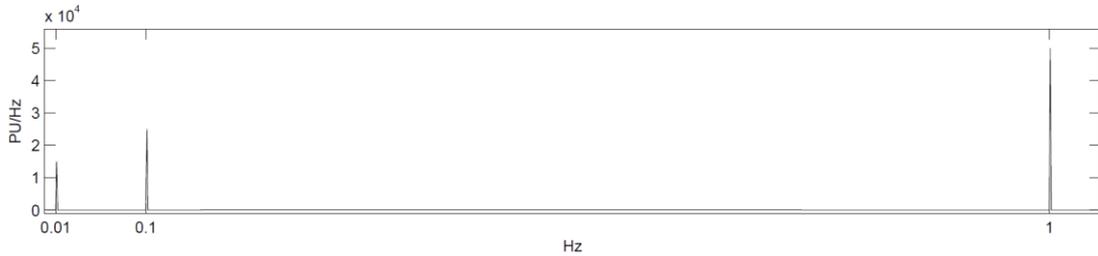


Figura 3.2: Spettro del segnale della Figura 3.1 ottenuto con la trasformata di Fourier.

La rappresentazione in scala lineare delle ascisse è poco efficiente in casi in cui le componenti in frequenza hanno ordini di grandezza diversi e una rappresentazione in scala logaritmica permetterebbe una distribuzione migliore delle frequenze sul grafico dello spettro.

3.1.1. Non-idealità dei segnali reali

Le acquisizioni di segnali reali hanno una durata limitata e la lunghezza della finestra temporale sulla quale vengono analizzati influenza la quantità e la qualità delle informazioni che si possono ottenere: lo spettro in frequenza ottenuto è limitato dalla frequenza di campionamento f_c e dal numero di campioni acquisiti N .

Secondo il teorema di Nyquist-Shannon, la frequenza massima rappresentabile per un segnale campionato a frequenza f_c da un segnale analogico senza introdurre il fenomeno di aliasing è $f_c/2$. Quindi lo spettro sull'asse delle frequenze ha la rappresentazione delle componenti solo nell'intervallo $[-f_c/2, f_c/2]$. Data la natura reale dei segnali biologici, si ha una simmetria dello spettro rispetto all'asse delle ordinate e quindi la rappresentazione in frequenza può essere ulteriormente limitata all'intervallo $[0, f_c/2]$ senza perdita di informazioni.

Il numero di campioni disponibili dal segnale originario coincide con il numero di campioni della trasformata di Fourier, definendo così la distanza tra due campioni in frequenza:

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

valore che indica la risoluzione in frequenza della trasformata. Per questo motivo lo spettro in Figura 3.2 non presenta picchi impulsivi, ma degli *spike* a forma triangolare con un supporto pari a tre campioni. Al diminuire del numero di campioni, il supporto del picco si allarga e la sua altezza diminuisce. Quindi quando si devono confrontare spettri con segnali aventi diverso numero di campioni a parità di frequenza di campionamento, si deve valutare l'area sottesa allo *spike* e non la sua altezza.

3.1.2. Limiti della trasformata di Fourier

La trasformata di Fourier calcola lo spettro basandosi sull'intero segnale e un'onda indipendentemente da dove sia localizzata nel dominio del tempo contribuisce in egual misura al calcolo della sua componente in frequenza. Per questo motivo la trasformata di Fourier è adatta per analizzare segnali stazionari e non è adatta ad analizzare segnali con componenti in frequenza variabili nel tempo. Nel caso dei segnali biologici, i quali sono non stazionari perché generati da attività dinamiche che modificano il contenuto in frequenza del segnale al variare del tempo, la trasformata di Fourier evidenzia le componenti in frequenza presenti, ma non permette di ricavare informazioni su quando e come tali componenti si presentino all'interno del segnale analizzato. In più sullo spettro calcolato si nota del rumore sovrapposto allo spettro che è, appunto, riconducibile alla non stazionarietà del segnale analizzato.

3.2. La trasformata di Fourier Short Time³

Per risolvere il problema dell'analisi di segnali non stazionari e per localizzare nel tempo le varie componenti in frequenza, il segnale deve essere diviso in intervalli sufficientemente brevi in modo da essere considerati stazionari, per poi essere analizzati separatamente nel dominio delle frequenze. Questa operazione è compiuta dalla trasformata di Fourier Short Time (STFT), la quale fornisce informazioni spettrali per brevi intervalli di tempo nello spazio tempo-frequenza.

La formulazione matematica della STFT è la seguente:

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

³ Le nozioni presentate in questo paragrafo sono tratte da [19].

dove il segnale $x(t)$ è moltiplicato per $\gamma(t - \tau)$, per poi calcolare la sua trasformata di Fourier. L'espressione $\gamma(t - \tau)$ rappresenta una finestra di durata e forma arbitraria che viene fatta scorrere sul segnale $x(t)$ a passi di τ secondi. Dalla moltiplicazione del segnale con la finestra si ottiene un segnale non nullo solo dove le due parti si sovrappongono. Il segnale non nullo è centrato in τ ed esteso quanto la finestra γ .

La rappresentazione tempo-frequenza di un segnale con la STFT può essere fatta con una matrice in cui i coefficienti per righe si riferiscono alle varie frequenze, mentre quelli per colonne agli istanti temporali: ogni colonna rappresenta lo spettro relativo ad una data posizione della finestra, mentre ogni riga indica la variazione di una certa frequenza allo spostarsi della finestra. Questa matrice può essere rappresentata efficacemente per mezzo di un grafico, come in Figura 3.3, in cui la STFT è stata calcolata con una finestra di 100 campioni. L'intensità di ogni frequenza, il coefficiente ad essa associata nella matrice STFT, viene rappresentata con una scala di colori in cui il rosso indica un valore molto elevato (una componente in frequenza forte) e il blu un valore molto basso. Questo concetto viene evidenziato meglio con una rappresentazione spaziale della STFT (Figura 3.4) in cui l'asse X rappresenta il tempo, l'asse Y la frequenza e l'asse Z l'ampiezza dei campioni calcolati ad un certo istante per una certa frequenza.

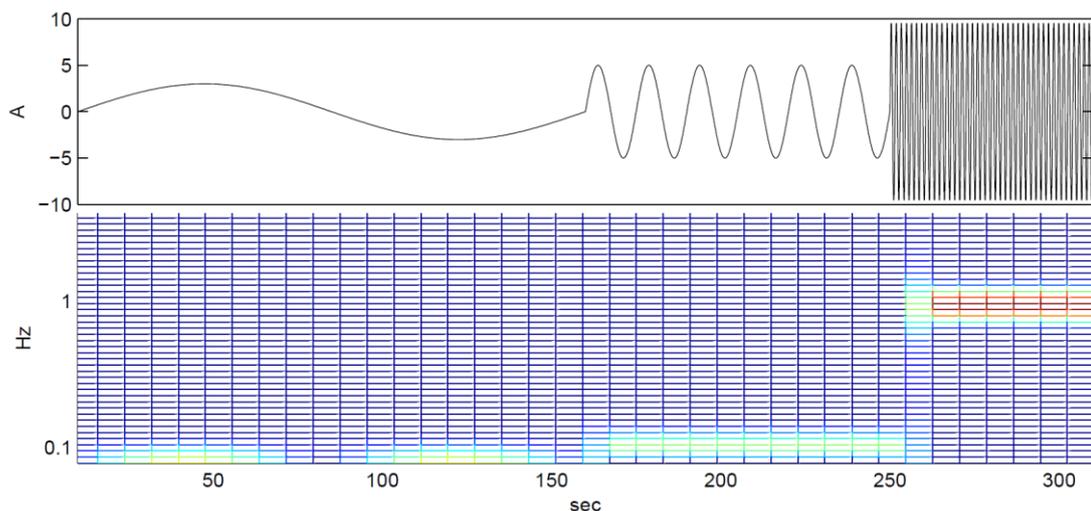


Figura 3.3: Segnale variabile nel tempo (in alto) e la sua STFT con finestra di 100 campioni (in basso).

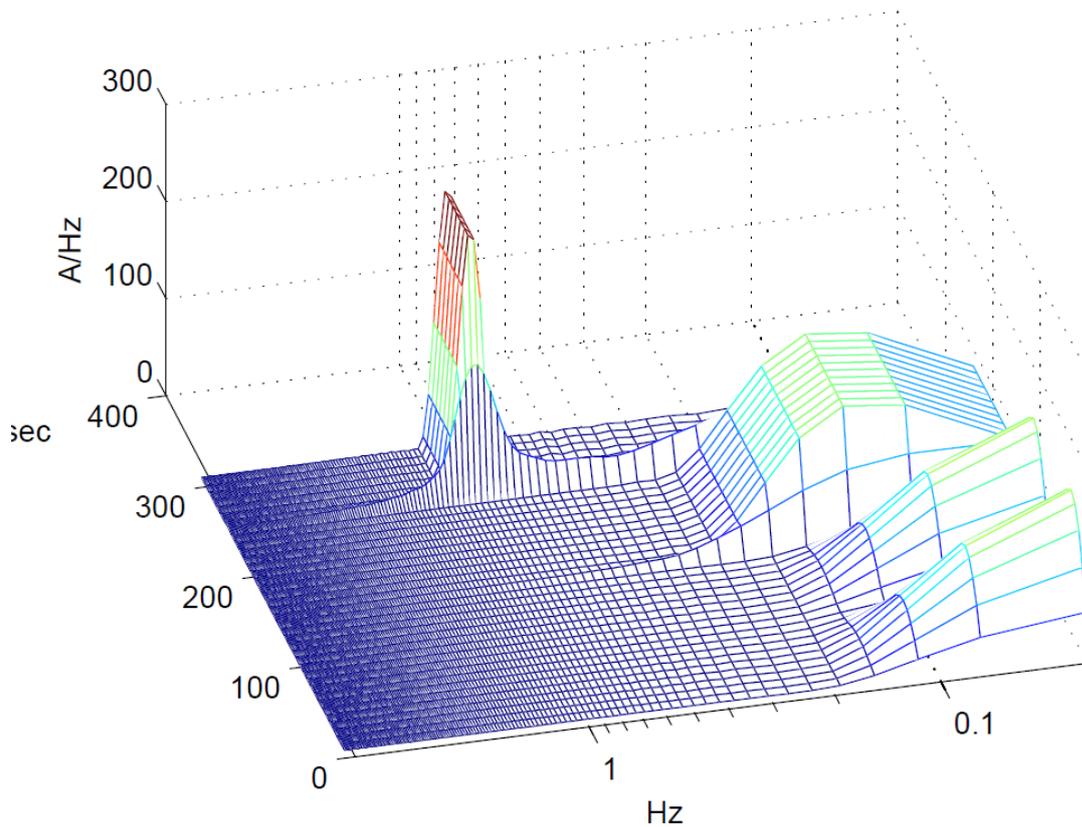


Figura 3.4: Visualizzazione nello spazio della STFT con assi di frequenza in scala logaritmica.

Da questo ultimo grafico si può osservare come la scelta della dimensione della finestra vada bene per localizzare le componenti in alta frequenza con buona risoluzione, mentre per le componenti in bassa frequenza la localizzazione diventa più difficile. Mediando i valori della matrice STFT per righe, cioè la media dei valori ottenuti per una frequenza al variare del tempo, si ottiene una stima dello spettro del segnale con una risoluzione proporzionale alla lunghezza della finestra scelta.

3.2.1. Limiti della trasformata di Fourier Short Time

La limitazione intrinseca di questa trasformata è data dalla dimensione della finestra γ , che è prefissata. La lunghezza della finestra definisce la risoluzione in frequenza della trasformata STFT (come nel caso della trasformata di Fourier la risoluzione minima è f_c/N dove f_c è la frequenza di campionamento e N il numero di campioni della finestra); quindi un maggior numero di campioni dà una miglior risoluzione in frequenza, ma al tempo stesso la finestra deve essere sufficientemente breve per garantire che il segnale in essa contenuto sia stazionario.

Nel caso del segnale acquisito con il LDF gli ordini di grandezza diversi delle frequenze presenti e la loro variabilità nel tempo rendono difficile, se non impossibile,

la scelta di una finestra adeguata per mantenere una buona risoluzione, rispettando l'ipotesi di stazionarietà della porzione di segnale analizzata.

3.3. La trasformata Wavelet⁴

Nel caso di analisi spettrale dei segnali LD, l'analisi Wavelet, proposta nel 1981 da Jean Morlet [20], permette di superare i limiti precedentemente presentati per le trasformate FT e STFT. Rispetto alla STFT, la trasformata Wavelet utilizza una finestrazione variabile in modo da garantire per ogni punto del piano tempo-frequenza la miglior risoluzione.

3.3.1. La risoluzione tempo-frequenza

In Figura 3.5 si può vedere la diversa finestrazione della trasformata Wavelet rispetto alla STFT: le finestre della STFT hanno tutte durata prefissata, mentre nel caso dell'analisi Wavelet la durata non è costante, ma adatta in base alle frequenze analizzate. Il principio di indeterminazione di Heisenberg stabilisce dei vincoli per le aree dei rettangoli delimitati dalle griglie che stabiliscono la finestrazione. Queste aree, le *Heisenberg box*, non possono scendere sotto un certo valore, il quale rimane costante per una definita metodologia di analisi.

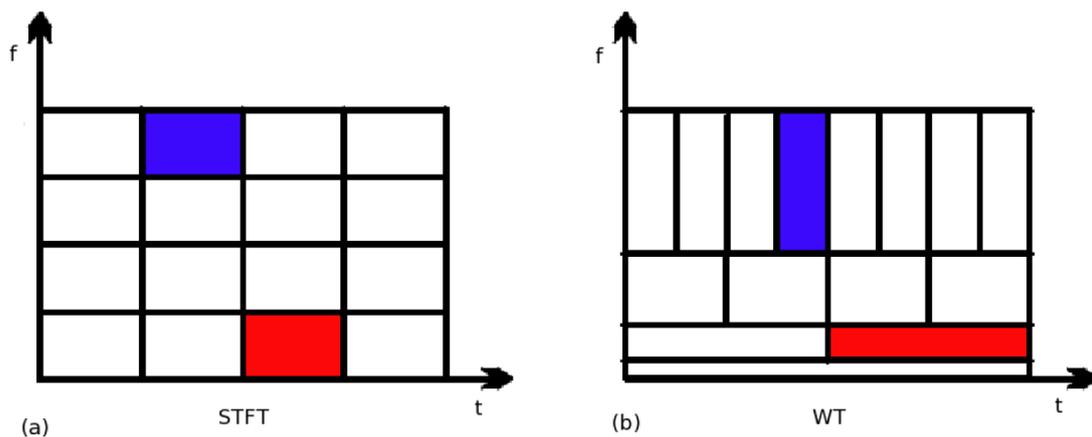


Figura 3.5: Griglie di risoluzione della STFT (a) e della WT (b).

⁴ Le nozioni presentate in questo paragrafo sono tratte da [20].

Dai grafici della Figura 3.5 notare che:

- gli Heisenberg box della STFT (Figura 3.5-a) hanno tutti la lunghezza della base costante a causa della durata prefissata della finestra e di conseguenza hanno anche la stessa altezza, e quindi tutti i rettangoli sono congruenti tra di loro. In questo caso il rettangolo blu viene utilizzato per isolare le alte frequenze e quello rosso per basse frequenze e se le frequenze analizzate sono molto diverse tra di loro, la risoluzione in frequenza non può essere adeguata per le basse frequenze in quanto i rettangoli non le possono isolare bene;
- nel caso della trasformata Wavelet (Figura 3.5-b), la lunghezza della base degli Heisenberg box (durata della finestra temporale) rimane costante solo durante la traslazione lungo la stessa frequenza. Variando frequenza, varia anche la base dei rettangoli e, per il principio di Heisenberg, le altezze dei rettangoli variano in modo inversamente proporzionale rispetto alle basi per mantenere l'area costante. I rettangoli relativi alle basse frequenze (rosso) hanno basi più lunghe rispetto a quelli relativi alle alte frequenze (blu), che portano ad altezze molto strette grazie alle quali si ha una buona risoluzione in frequenza. La base lunga implica una scarsa localizzazione temporale, che è accettabile considerando che descrive un'oscillazione a bassa frequenza, quindi lenta. Viceversa, i rettangoli utilizzati per le alte frequenze hanno una base stretta e un'altezza elevata, che implicano una buona localizzazione temporale delle oscillazioni ma una risoluzione in frequenza meno precisa. In questo modo si riesce a trovare un compromesso in termini di risoluzione per studiare adeguatamente oscillazioni con frequenze molto diverse tra di loro.

3.3.2. La formulazione matematica

L'analisi Wavelet prevede l'utilizzo di un insieme di funzioni derivate da una funzione, la *mother Wavelet*, per definire le finestre per l'analisi tempo-frequenza. Le funzioni derivate si ottengono con operazioni di traslazione e cambiamento di scala della *mother Wavelet* ψ generando una famiglia di finestre così definita:

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

con s fattore di scala misurato in secondi e τ traslazione di tempo sempre in secondi.

Le funzioni derivate dalla *mother Wavelet* vengono moltiplicate per il segnale analizzato e viene calcolato il loro integrale nel tempo, il quale 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, analoga a quella delle trasformate basate sul metodo di Fourier, è di ottenere valori alti dal prodotto di onde con frequenze simili e riassumerlo in un unico valore per mezzo dell'integrale: se l'intervallo considerato contiene un'oscillazione con frequenza simile a quella della Wavelet utilizzata, il valore dell'integrale del prodotto delle due è proporzionale al livello di somiglianza delle due e all'ampiezza dell'oscillazione del segnale e riassume tutto in un unico punto sul piano s, τ [20]. In sintesi la WT effettua una mappatura del segnale $x(t)$ sul piano tempo-frequenza, in cui ad ogni punto (s, τ) è associato il risultato dalla WT ottenuta con la wavelet $\hat{\Psi}_{s,\tau}$ della coppia di punti (s, τ) .

Per quanto riguarda la scelta della *mother Wavelet* ci si può appoggiare a diverse funzioni (Figura 3.6), ognuna delle quali è adatta ad uno specifico scopo di analisi. La caratteristica fondamentale di queste funzioni è quella di avere un andamento oscillatorio e una lunghezza limitata nel tempo: partendo da zero, l'ampiezza dell'oscillazione raggiunge un valore di picco e poi diminuisce fino a tornare a zero.

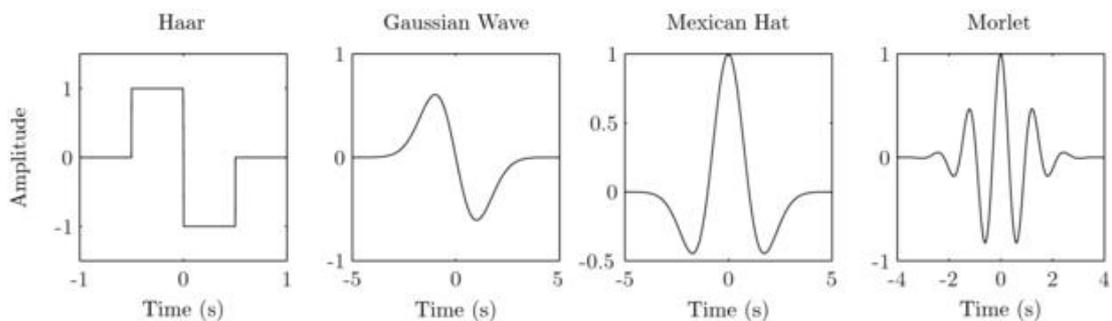


Figura 3.6: Ampiezza di quattro funzioni *mother Wavelet*.

Il criterio di scelta della funzione *mother Wavelet* è quello di somiglianza con la forma delle onde che si vogliono analizzare. In letteratura nel caso del segnale LD è consigliato utilizzare la Wavelet di Morlet in quanto è considerata la più adatta per identificare le frequenze di oscillazione presenti nel segnale [21-24].

La Wavelet di Morlet è una funzione Gaussiana modulata da un'onda sinusoidale e la sua forma nel dominio del tempo (Figura 3.7) è data dalla seguente funzione:

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

dove f_0 determina la risoluzione, B_{f_0} è una costante di normalizzazione che nel nostro caso viene posta a 1. Il parametro di risoluzione f_0 descrive il compromesso che si sceglie tra risoluzione nel dominio del tempo e delle frequenze e solitamente la sua scelta si fa su ispezione visiva e nel nostro caso viene posto uguale a 1. Il secondo termine della $\psi(t)$ è molto piccolo nel caso in cui $f_0 > 0.5$ e quindi viene trascurato.

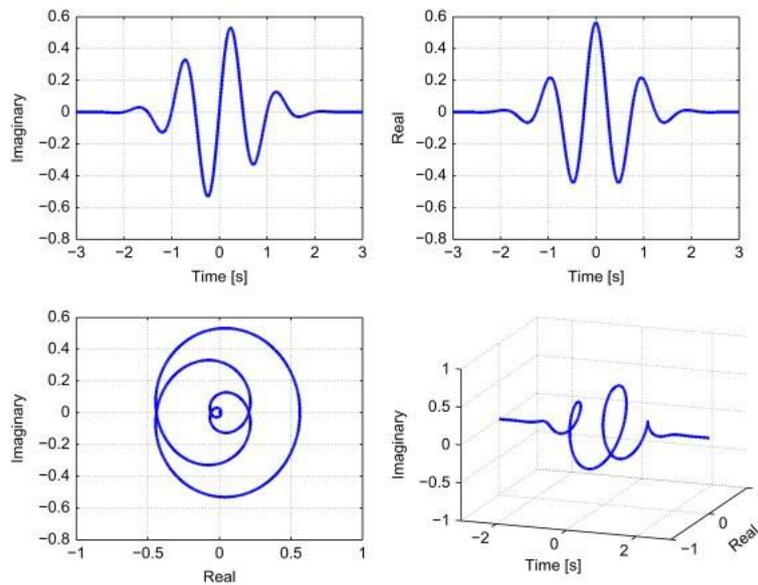


Figura 3.7: Wavelet di Morlet (parte immaginaria, parte reale e loro rappresentazione al variare del tempo).

Considerando la scelta dei parametri, l'espressione della Wavelet di Morlet diventa:

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

forma che permette di massimizzare la risoluzione tempo-frequenza [25].

Per l'analisi Wavelet è molto importante la scelta del fattore di scala s , con il quale si definiscono le frequenze che devono essere identificate con le funzioni derivate dalla *mother Wavelet*. Per ogni frequenza analizzata, viene quindi creata una diversa funzione Wavelet che viene tralata nel tempo. In Figura 3.8 si possono osservare diverse funzioni Wavelet associate a diverse frequenze. Il legame tra il fattore di scala s e la frequenza f_s ad esso associata è di proporzionalità inversa e dipende dalla frequenza di campionamento del segnale f_c e dalla frequenza centrale della Wavelet f_w , cioè dalla frequenza corrispondente all'oscillazione più ampia della funzione Wavelet. L'equazione che associa le frequenze alle scale è la seguente:

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

Poiché le frequenze che compongono il segnale LD coprono un'ampia banda di frequenze si utilizza una scala logaritmica che è in grado di coprire adeguatamente tutte le frequenze analizzate.

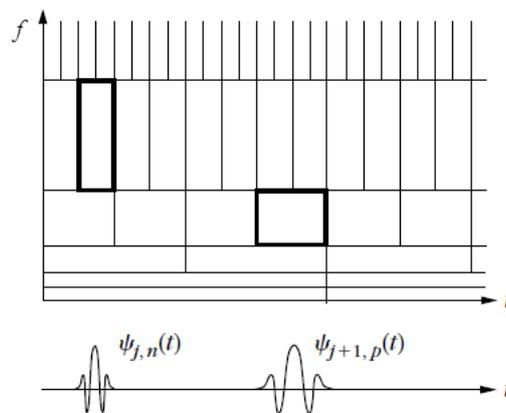


Figura 3.8: Funzioni Wavelet associate a diversi Heisenberg box della trasformata Wavelet.

È utile ricordare che la trasformata Wavelet continua viene discretizzata sia per i valori delle frequenze che per i valori del tempo. La discretizzazione nel tempo τ dipende dal campionamento del segnale, mentre la discretizzazione delle frequenze f_s non è così immediata. I valori sull'asse delle frequenze sono discretizzati suddividendo i valori in un insieme finito di punti per i quali viene effettivamente calcolata la trasformata Wavelet. Poiché si sceglie di utilizzare una scala logaritmica per la rappresentazione delle frequenze, anche la discretizzazione viene eseguita su scala

logaritmica. In [25] viene suggerito di utilizzare 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 voci, ossia il numero di campioni in cui si vuole suddividere l'intervallo di frequenze per cui si vuole studiare lo spettro. Ogni valore puntuale di frequenza riassume il valore complessivo dell'intervallo

$$2\pi \left[2^{\frac{k-k_0-\frac{1}{2}}{n_v}}, 2^{\frac{k-k_0+\frac{1}{2}}{n_v}} \right].$$

Nel caso continuo, la risoluzione in frequenza della WT dipende dalle funzioni Wavelet utilizzate e dai loro parametri (risoluzione teorica), ma per via della discretizzazione delle frequenze compaiono problemi di approssimazione numerica determinate dal numero di voci n_v e dall'ampiezza degli intervalli associati ad ogni frequenza (risoluzione numerica). Il limite superiore per la risoluzione in frequenza è dato dal minimo tra la risoluzione teorica e la risoluzione numerica. Se n_v è troppo piccolo alcune componenti in frequenza vicine si confondono essendo inserite nello stesso intervallo e vengono riconosciute come un'unica componente più intensa. Scegliendo n_v troppo elevato, la risoluzione della WT non può essere migliorata più della risoluzione teorica e si va incontro ad un aumento di costi computazionali senza nessun beneficio in termini di miglioramento della risoluzione in frequenza.

3.3.3. Lo scalogramma

Lo scalogramma è una rappresentazione grafica proposta in letteratura per visualizzare, in maniera semplificata, i coefficienti della WT che sono numeri complessi. Esso si calcola la seguente formula:

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

dove $W(s, \tau)$ sono i coefficienti complessi della WT. Il quadrato del modulo fa in modo che i valori dei coefficienti diventino reali e positivi e la divisione per il quadrato di s permette di normalizzare le ampiezze rispetto alle scale. I grafici dei coefficienti dello scalogramma sono costruiti su tre dimensioni. Il supporto della superficie $S(s, \tau)$ è

costituito dal piano tempo-frequenza con assi misurati in secondi [s] ed Hertz [Hz], mentre l'asse verticale indica l'ampiezza dei coefficienti. Nel caso dello scalogramma, le ampiezze $S(s, \tau)$ sono misurate in $[PU^2/s]$, ovvero in $[PU^2 \cdot Hz]$.

Come si può vedere in Figura 3.8 e Figura 3.9, l'analisi Wavelet si può applicare a segnali non stazionari con componenti in frequenza che variano nel dominio del tempo. In più lo scalogramma fornisce uno strumento di facile interpretazione della trasformata Wavelet che permette di localizzare nel tempo i diversi contributi in frequenza, adattandosi al meglio alle frequenze che compongono il segnale. Le sezioni dello scalogramma parallele all'asse del tempo derivano da finestre che hanno lo stesso fattore di scala e quindi descrivono l'andamento nel tempo della frequenza associata a quel fattore di scala. Le sezioni dello scalogramma parallele all'asse delle frequenze descrivono lo spettro di tutte le frequenze del segnale che sono associate alle finestre di ampiezze dipendenti dalla scala e centrate in un istante temporale prefissato.

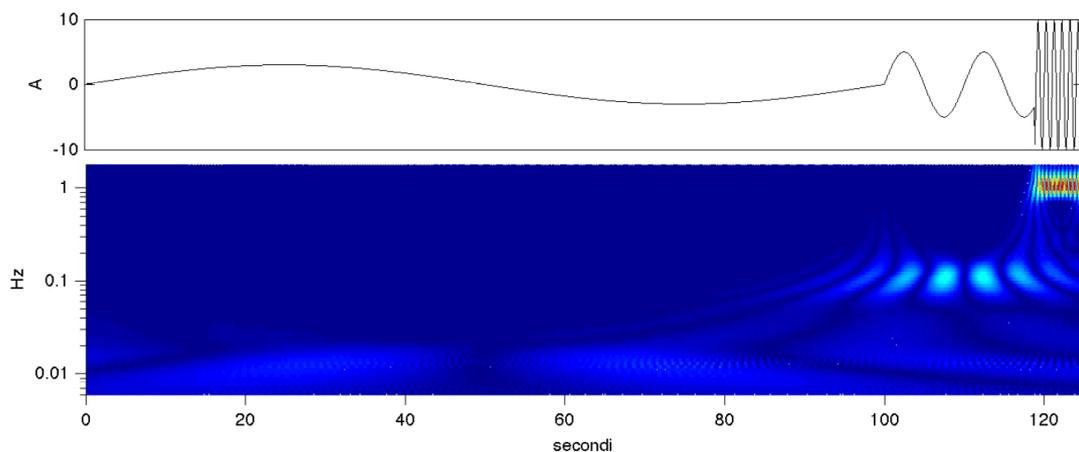


Figura 3.9: Segnale non stazionario e suo scalogramma 2D.

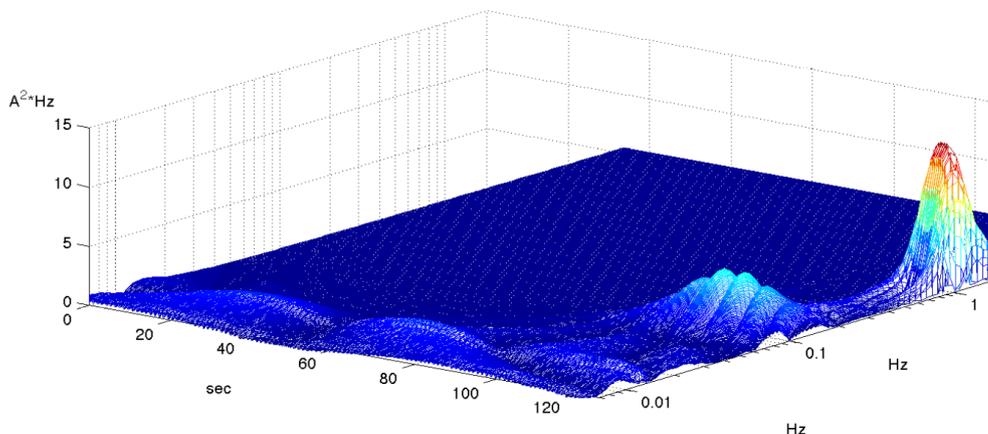


Figura 3.10: Scalogramma 3D del segnale di Figura 3.9.

Il contenuto informativo dello scalogramma è molto ricco e difficile da sfruttare per confrontare segnali differenti. Per ovviare a questo problema si può visualizzare lo scalogramma bidimensionale riducendo le ampiezze a un codice di colori. In più si possono mediare i valori lungo l'asse del tempo ottenendo un grafico avente per ogni valore di frequenza la potenza media lungo l'intera durata del segnale, che rappresenta lo *spettro della potenza*. Allo stesso modo si può calcolare il valore assoluto dei coefficienti della WT e mediarli nel tempo per ottenere lo *spettro dell'ampiezza* della WT. Utilizzando le unità di misura precedentemente definite, le ordinate dello spettro dell'ampiezza e dello spettro delle potenze si esprimono rispettivamente in $PU \cdot s$ e $PU^2 \cdot s^2$.

3.3.4. Limiti della trasformata Wavelet

Teoricamente l'integrazione nel caso della WT viene effettuata su segnali infiniti nel tempo con una banda infinita di frequenze. Nel caso in esame i segnali hanno durata finita e uno spettro limitato dalla frequenza di campionamento del LDF; di conseguenza i coefficienti della WT vengono calcolati impropriamente in prossimità dei bordi del segnale acquisito (vicino a $t = 0$ e a $t = t_{max}$). Per esempio nel caso in cui si devono calcolare i coefficienti WT per valori all'istante $t = 0$, nel momento in cui si deve calcolare il prodotto tra la funzione Wavelet e il segnale, si dovrebbe moltiplicare la funzione per valori del segnale precedenti all'istante 0, valori che appunto non ci sono. Questo fenomeno che porta a distorsioni del calcolo della WT vicino ai bordi prende il nome di *effetti di bordo* [25].

Gli effetti di bordo si verificano nel caso in cui buona parte della funzione Wavelet per la quale viene moltiplicato ed 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: una frequenza più bassa, che richiede una maggiore finestra nel tempo per la funzione Wavelet, è associata ad una maggiore area con effetti di bordo. Risulta, quindi, che gli effetti di bordo dipendono sia dal tempo che dalla frequenza per cui si vogliono calcolare i coefficienti e la zona che delimita un certo errore di approssimazione prefissato ha la forma di un cono. Da qui nasce la definizione di *cono di influenza* rappresentato in Figura 3.11 con una curva nera e definito come:

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

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

Il problema degli effetti di bordo verrà ripreso nel Capitolo 5 dove saranno mostrati i problemi pratici che si devono affrontare nell'applicazione della trasformata Wavelet a segnali di perfusione cutanea acquisiti con il LDF.

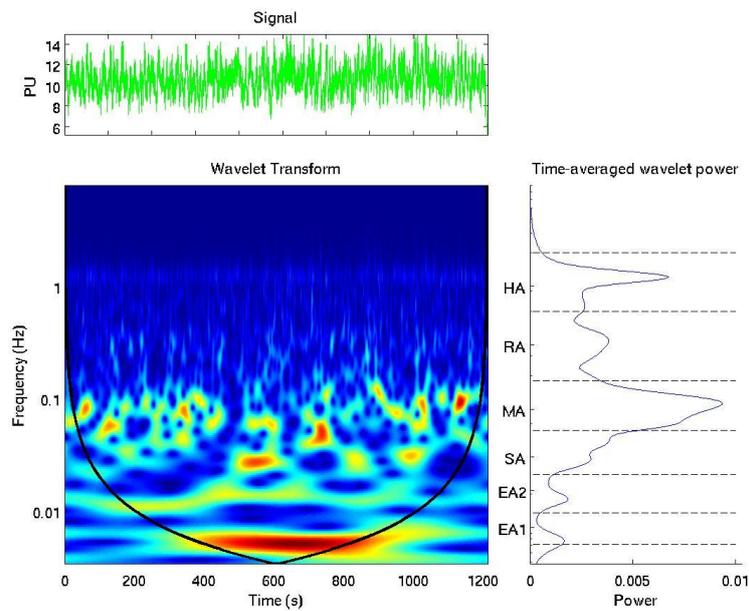


Figura 3.11: In alto il segnale nel dominio del tempo, in basso lo scalogramma delimitato dal cono di influenza e in basso a destra lo spettro di potenza mediato nel tempo.

4. Metodi sperimentali

4.1. Pazienti: criteri di selezione

Per lo studio preliminare degli effetti della terapia FREMS su paziente affetti da arteriopatia obliterante periferica di stadio II, sono stati selezionati cinque pazienti di età 74 ± 4 anni. Tutti i pazienti selezionati soffrivano di *claudicatio intermittens* lieve o moderata, che permetteva loro di camminare per 400-600 metri durante il test da sforzo su tapis roulant. La patologia era presente da più di un anno e presentavano un indice pressorio caviglia braccio tra 0.76 e 0.84, definito in letteratura come patologico. Nessun paziente era affetto da diabete mielite o da scompenso cardiaco cronico. Altri criteri di esclusione sono stati la presenza di qualsiasi evento clinico passato di coronaropatia, modifiche ECG ischemiche durante l'esercizio, dolore ischemico a riposo dell'arto inferiore e la presenza di ulcere cutanee da insufficienza arteriosa.

Questo studio è stato approvato dall'Azienda Ospedaliera – Università degli Studi di Padova come uno studio osservazionale non controllato, con l'obiettivo di analizzare gli effetti della terapia FREMS applicata a pazienti vasculopatici in parallelo con terapia farmacologica standard.

4.2. Terapia FREMS

La terapia FREMS (*Frequency Rhythmic Electrical Modulation System*) è basata sulla stimolazione elettrica indolore attraverso elettrodi transcutanei. Tale stimolazione avviene per mezzo di impulsi elettrici modulati in ampiezza e frequenza; il voltaggio massimo viene impostato sulla base della soglia di sensibilità di ogni paziente.

La terapia FREMS viene attualmente utilizzata per il trattamento delle neuropatie degli arti inferiori e per i trattamenti riabilitativi muscolari. Nel caso dell'arteriopatia periferica, questa terapia non è stata ancora inserita come terapia routinaria anche se osservazioni sperimentali eseguite su pazienti claudicanti hanno evidenziato una riduzione del dolore indotto da sforzo.

Il dispositivo utilizzato per la stimolazione FREMS, APTIVA (Lorenz Lifetech Srl, Casalecchio di Reno, Bologna, Italia), è composto da un neuromodulatore a 4 canali,

ciascuno dei quali ha 2 uscite connesse ad un elettrodo transcutaneo. L'elettrodo transcutaneo eroga la stimolazione elettrica che viene applicata a 4 distretti differenti (Figura 4.1).

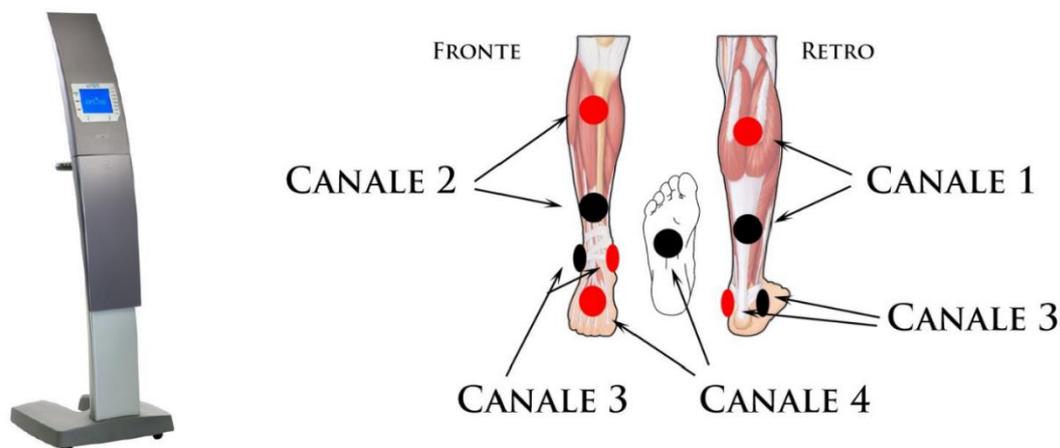


Figura 4.1: Apparecchiatura APTIVA e schema di applicazione degli elettrodi per pazienti PAOD.

Per i pazienti selezionati è stato seguito un protocollo terapeutico della durata di 10 sedute consecutive (una al giorno), ciascuna delle quali suddivisa in due fasi (Figura 4.2): fase 1 (25 minuti) caratterizzata da impulsi che variano in ampiezza e in frequenza e fase 2 (10 minuti) caratterizzata da impulsi con frequenza e ampiezza costanti. I quattro canali sono stati collegati per mezzo degli elettrodi transcutanei posizionati sulla cute della gamba come in Figura 4.1: il canale 1 vicino all'arteria poplitea, il canale 2 vicino all'arteria tibiale anteriore, il canale 3 in prossimità del malleolo e infine il canale 4 sul piede.

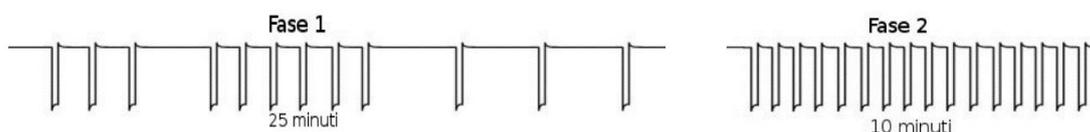


Figura 4.2: Esempio protocollo terapeutico: impulsi modulati in ampiezza e frequenza (fase 1) e costanti (fase 2).

4.3. La prova di iperemia reattiva post ischemica

La prova di iperemia reattiva post-occlusiva (*Post-occlusive Reactive Hyperemia*, PORH) è una prova di tipo funzionale che consiste nell'aumentare il flusso

di perfusione cutanea locale in seguito ad una breve occlusione per valutare la risposta di adattamento del microcircolo ad uno stimolo e per individuare i cambiamenti complessivi dei meccanismi responsabili del corretto funzionamento del flusso ematico locale [26].

La prova consiste nella compressione dell'arto del soggetto tramite un manicotto pneumatico ad una pressione superiore a quella sistolica, per una durata stabilita, per indurre uno stato di occlusione temporanea con successivo arresto del flusso sanguigno che porta ad una condizione di ischemia. In seguito al rilascio dell'occlusione, il flusso sanguigno viene ristabilito ed una fase di iperemia reattiva si sviluppa [27]. Durante la fase di iperemia reattiva, il segnale di perfusione raggiunge un picco e successivamente ritorna al valore dello stato a riposo. Le caratteristiche di questo segnale e le modalità di ritorno ad un segnale normale, possono fornire indicazioni sullo stato della funzione microvascolare [27,28].

Nella prova PORH combinata con la LDF, la riproducibilità della misura è variabile, dipendendo sia dalla zona della cute in cui si esegue la misura, che dalla temperatura della pelle che gioca un ruolo importante nel flusso sanguigno a riposo.

Un altro problema si verifica nel momento in cui si vogliono confrontare i dati di esperimenti PORH diversi in quanto non esiste uno standard definito. La durata dell'occlusione varia da uno a quindici minuti e, nella maggior parte dei casi, è di cinque minuti. In più, diverse pressioni di occlusione vengono applicate in un intervallo che va da 160 a 220 mmHg: ciò non influisce sulla risposta all'occlusione purché la pressione del manicotto superi la pressione sistolica del sangue [29]. Quindi durante la conduzione della prova bisogna prestare particolare attenzione anche alle condizioni dell'ambiente oltre a quelle del paziente per evitare un bias metodologico. Infatti, la durata dell'occlusione, la temperatura della pelle a riposo e il sito di misurazione (pelle glabra o meno) influiscono sui valori e sulla loro affidabilità durante la prova [29].

Dopo aver messo i pazienti a riposo in posizione supina, la prova PORH è stata effettuata misurando il flusso sanguigno durante le seguenti tre fasi: a riposo (baseline), durante la fase di occlusione e durante la fase di iperemia reattiva (Figura 4.3). La prima fase è durata in media 20 minuti ed è servita a misurare il flusso a riposo. La seconda fase è durata 5 minuti per misurare lo "zero biologico". Dopo la fase di occlusione, il segnale è stato acquisito per altri 5 - 8 minuti per avere un'evoluzione completa della dinamica del flusso in seguito all'iperemia reattiva.

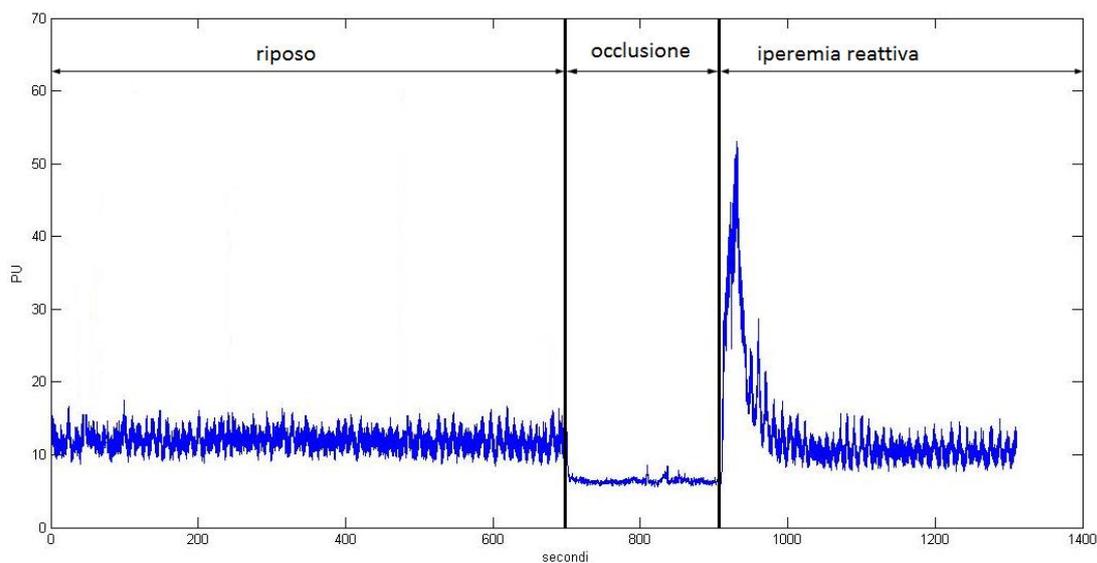


Figura 4.3: Segnale di perfusione durante le tre fasi della PORH: riposo, occlusione, iperemia reattiva.

Il manicotto pneumatico è stato posizionato a livello del malleolo e gonfiato ad una pressione di 30 mmHg superiore alla pressione arteriale massima.

La prova PORH è stata applicata ai pazienti prima e dopo la somministrazione della terapia FREMS, per valutare gli effetti della stimolazione elettrica sul funzionamento del letto vascolare cutaneo, confrontando il segnale LD acquisito durante la fase di iperemia reattiva con quello della fase a riposo.

4.4. Strumento di misura e acquisizione del segnale

Lo strumento utilizzato per acquisire i segnali di perfusione cutanea durante la prova PORH è il Periflux System 5000 della ditta Perimed (Stoccolma, Svezia). Il dispositivo è composto da quattro moduli che permettono di ottenere diverse informazioni relative alla microcircolazione cutanea: perfusione cutanea, tcpO₂, tcpCO₂ e valore di temperatura imposto alla sonda.

La sorgente laser dello strumento è un diodo allo stato solido che emette un cono di luce nello spettro dei rossi visibili con energia di 2 mW e lunghezza d'onda di 780 nm. La sonda utilizzata per le misure è la Probe 457 (Figura 4.4) che ha una separazione tra le fibre ottiche di invio e di ricezione di 0.25 mm, che assieme alle caratteristiche sopra citate, permette di misurare la perfusione cutanea ad una profondità di 0.5-1 mm. Una caratteristica importante di questa sonda è quella di controllare e monitorare la temperatura cutanea; caratteristica che permette di effettuare misurazioni riproducibili

nelle stesse condizioni nel caso in cui non si disponga di una stanza a temperatura controllata.

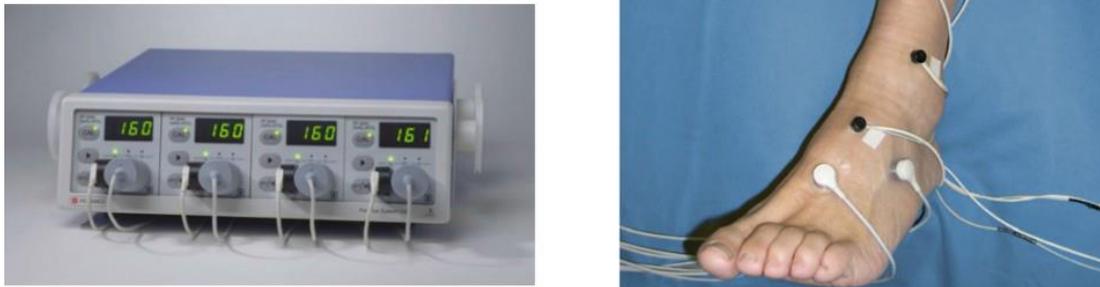


Figura 4.4: Periflux System 5000 e Probe 457 applicata al dorso del piede.

La misura è stata effettuata applicando la sonda sul dorso del piede di ogni soggetto. Il segnale di perfusione cutanea è stato acquisito dal LDF per tutta la durata della prova PORH con un campionamento a 16 Hz. Il segnale acquisito dallo strumento è stato salvato in formato Excel con indicazione dell'ora e della data dell'acquisizione, codice identificativo del paziente, dettaglio dei parametri strumentali, segnale di perfusione e marker dell'inizio delle tre fasi della prova PORH.

Il segnale di perfusione cutanea è espresso in PU e quantifica il valore di perfusione nel microcircolo presente nel volume di tessuto colpito dal fascio laser del LDF. È proporzionale sia al numero che alla velocità media dei globuli rossi che attraversano i microvasi del volume di tessuto analizzato. Dall'ispezione visiva si notano subito evidenti oscillazioni del segnale e sono visibili diverse componenti in frequenza (Figura 4.5). Come citato nel Capitolo 1, tali oscillazioni sono causate dalla attività di diverse strutture cardiovascolari attive contemporaneamente.

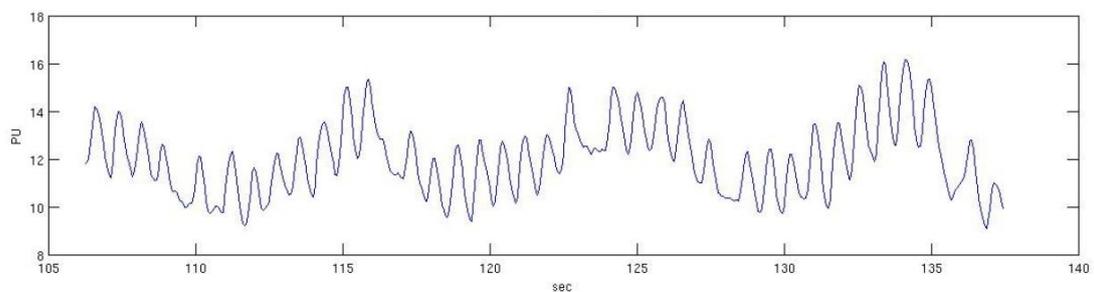


Figura 4.5: Sezione del segnale di perfusione cutanea.

Lo strumento di misura è particolarmente sensibile a disturbi dovuti al movimento e per questo motivo è stato richiesto a ciascun paziente di rimanere immobile durante tutta l'acquisizione. Per pazienti affetti da PAOD tale richiesta è difficilmente rispettata perché essi possono compiere inavvertitamente piccoli movimenti con il piede per via dello scarso afflusso di sangue ai tessuti. In questo caso la sonda misura dei picchi molto grandi (*spike*), che si estinguono nel arco di pochi secondi. La soluzione più semplice consiste nel tagliare la parte del segnale che contiene gli *spike*: così facendo però si accorcia la lunghezza del segnale e si perde la continuità dell'acquisizione, che sono fondamentali nello studio delle oscillazioni più lente. Si è scelto di attenuare i valori degli *spike* in modo da portarli all'interno di un intervallo di valori fisiologici. In questo modo si mantengono il contenuto informativo e la continuità delle oscillazioni che compongono il segnale acquisito senza alterare l'analisi in frequenza.

5. Analisi dei dati

Lo scopo di questo Capitolo è quello di mostrare i diversi problemi pratici che si devono affrontare nell'applicazione della trasformata Wavelet a segnali di perfusione cutanea acquisiti con il LDF. Vengono mostrate in ordine di applicazione le tecniche di pre-elaborazione del segnale: prima l'eliminazione degli *spike* dovuti a movimenti involontari dei pazienti, poi l'eliminazione dei trend e infine il filtraggio del segnale nella banda di interesse in cui la WT viene calcolata. Inoltre viene spiegata la tecnica di *padding* utilizzata per ridurre gli effetti di bordo sul calcolo della WT. Per concludere vengono spiegate le tecniche di analisi statistica e l'algoritmo Matlab utilizzato per calcolare la WT.

5.1. Pre-elaborazione del segnale

Per ottenere una trasformata Wavelet più affidabile è necessario effettuare una pre-elaborazione del segnale di perfusione studiato. Questa consiste nell'eliminazione degli *spike* dovuti a movimenti involontari dei pazienti, nell'eliminazione dei trend e nel filtraggio del segnale nella banda di interesse in cui la WT viene calcolata, in modo che le caratteristiche del segnale a tali frequenze non siano influenzate da valori medi di perfusione e da componenti in frequenza adiacenti alla banda di interesse.

Come suggerito in [30], per la riduzione degli artefatti di tipo *spike* si utilizza un processo di sogliatura attorno al trend del segnale di perfusione.

Il trend del segnale è stato ottenuto effettuando uno *smoothing* del segnale con la funzione di Matlab "smooth". È stata scelta la versione robusta della regressione lineare che utilizza la stima ai minimi quadrati pesati per trovare il fit ottimo di una funzione polinomiale di secondo ordine. In questa versione robusta l'algoritmo calcola il polinomio ottimo su intervalli che hanno lunghezza uguale al 5% della lunghezza del segnale acquisito, assegnando peso nullo ai valori che sono fuori da sei volte la deviazione standard dei valori contenuti in tali intervalli. I valori dei campioni che sono fuori dalla soglia definita attorno al trend del segnale vengono considerati come artefatti e la loro ampiezza viene attenuata per farla rientrare nell'intervallo prestabilito (Figura 5.1). La qualità del segnale ripulito dipende dall'ampiezza della soglia scelta: a una minore soglia corrisponde un minor contenuto informativo del segnale. Per ottimizzare il processo di sogliatura, si applica un algoritmo iterativo: si utilizza una soglia iniziale

e si calcola lo spettro del segnale, successivamente si incrementa il valore di soglia e si ricalcola lo spettro del segnale sogliaiato. Questa procedura viene ripetuta finché la variazione percentuale dell'ampiezza massima di due spettri ottenuti in due iterazioni successive non è inferiore al 20%. Arrivati a questo punto il processo di sogliaatura si ferma e il segnale così ottenuto (Figura 5.2) è sottoposto ai passi successivi di pre-elaborazione.

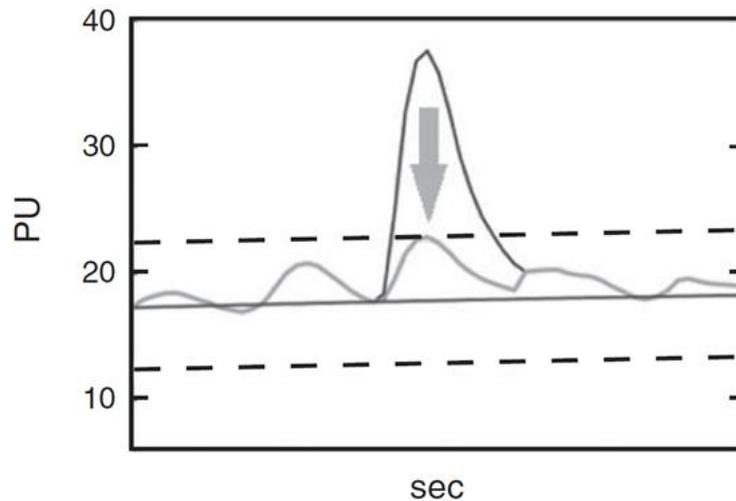


Figura 5.1: Attenuazione di uno spike.

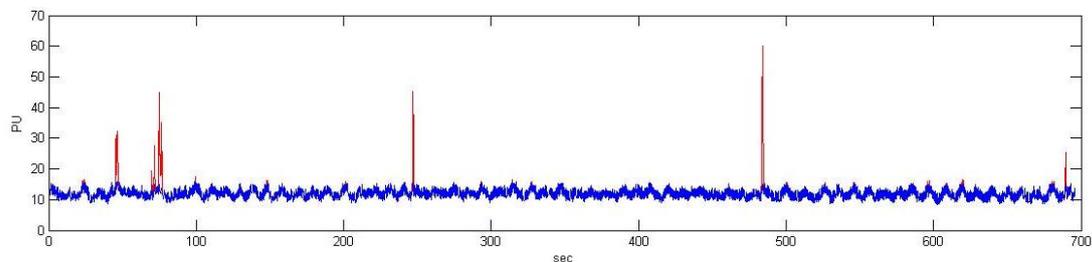


Figura 5.2: Segnale LD senza artefatti (blu) e spike eliminati (rosso).

Nel caso in cui un segnale abbia una componente media variabile nel tempo con un trend lineare, o come nella fase di iperemia reattiva un andamento biesponenziale, i coefficienti della WT potrebbero essere influenzati da un forte bias. Tutto questo si potrebbe verificare perché il trend introduce una componente non trascurabile nello spettro in potenza quando si analizzano bande di frequenza molto ampie [25]. Per evitare ciò, bisogna rimuovere i trend e filtrare il segnale prima di procedere con l'analisi Wavelet. Questo approccio introduce solo piccole distorsioni indesiderate allo spettro del segnale così come si può osservare in Figura 5.3 (d, g) e (e, h) per un segnale simulato. Si

potrebbe eseguire l'eliminazione del trend del segnale sottraendo al segnale originale una sua versione filtrata con un filtro a media mobile, che però eliminerebbe le componenti in bassa frequenza che nel caso in esame sono utili. Per via delle caratteristiche di questo filtro e per i suoi effetti di bordo, si potrebbero introdurre più distorsioni allo spettro in frequenza rispetto alla semplice sottrazione del trend. Quindi si sceglie di sottrarre il trend al segnale originale e successivamente applicare un filtraggio passa-basso al segnale.

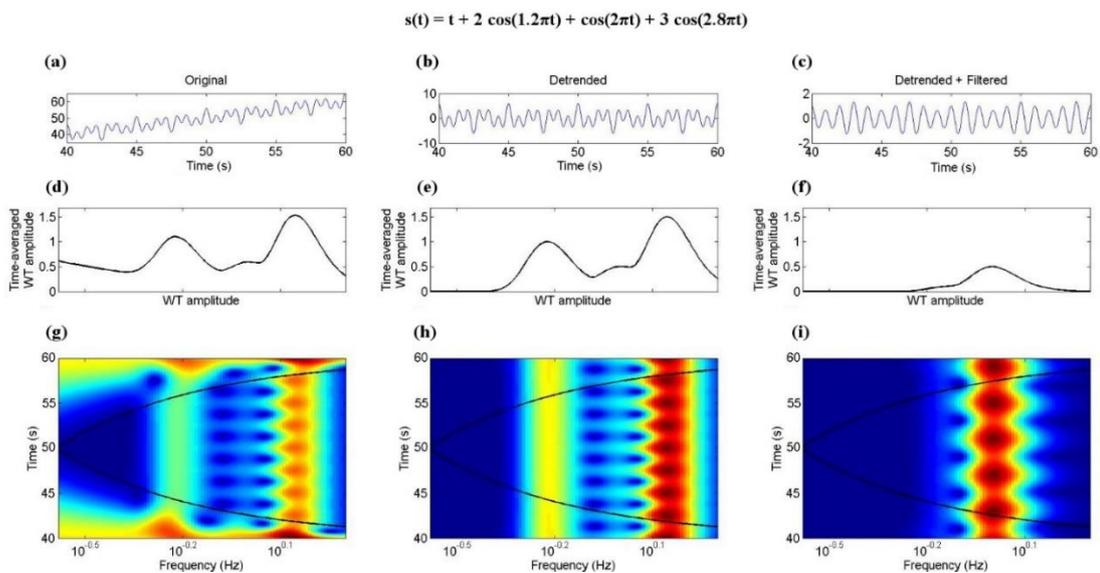


Figura 5.3: Confronto delle trasformate WT del segnale originale (a), del segnale senza trend (b) e del segnale filtrato e senza trend (c), con rispettivi spettri di ampiezza mediati nel tempo e loro trasformate Wavelet.

Utilizzando la WT per l'analisi di un segnale di perfusione, si è solitamente interessati solo per un intervallo ben definito di valori: 0.005 – 2 Hz. Per via dell'allargamento dei picchi di frequenza dovuto alla risoluzione in frequenza della WT, si potrebbero verificare contributi significativi da parte di alcune componenti che sono presenti fuori dalla banda di interesse. Come si può vedere in Figura 5.3, la componente centrale è fortemente corrotta dalle due componenti adiacenti e filtrando il segnale solo nella banda di interesse si ha la descrizione dello spettro della componente centrale. Una situazione analoga si verifica anche nel caso del segnale LD in cui al limite superiore della banda di interesse, attorno alla frequenza di 2 Hz, ci potrebbero essere componenti esterne che influiscono sul calcolo dei coefficienti della WT. In più, i segnali reali, e quindi anche quelli LD, sono spesso corrotti da rumore in alta frequenza che potrebbe

influire negativamente sulla WT e quindi il filtraggio passa-basso risulta la scelta adeguata. Nel caso del segnale di perfusione acquisito durante la PORH, per la parte a riposo basta sottrarre un fit lineare dei dati, mentre per la parte di iperemia reattiva, come suggerito in [26], è necessario sottrarre il fit di una funzione biesponenziale (Figura 5.4):

$$f(t) = \frac{ab}{a-b}(e^{-bt} - e^{-at}).$$

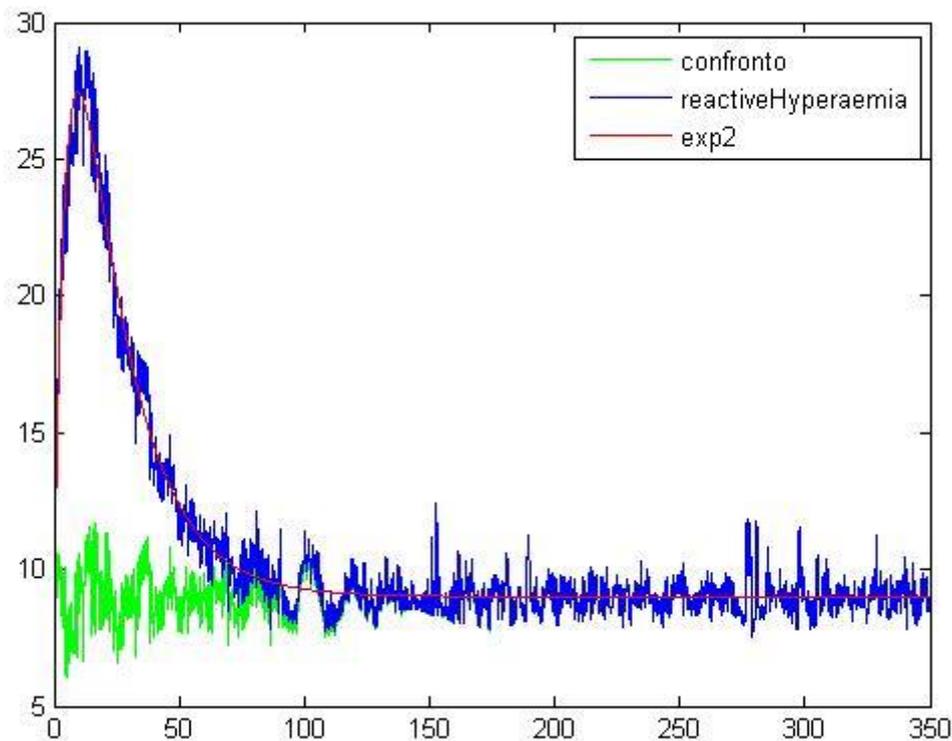


Figura 5.4: Fit biesponenziale (rosso) del segnale LD durante l'iperemia reattiva post ischemica (blu) e segnale ottenuto in seguito alla sottrazione del contributo medio (verde).

5.2. Analisi Wavelet

Prima di procedere con il calcolo dei coefficienti della WT, si fa un *padding* del segnale LD per ridurre gli effetti di bordo. Nel caso dei segnali LD si è scelto di utilizzare il *padding predittivo*, una tecnica che fa predizione sui valori antecedenti e successivi a quelli dell'intervallo di acquisizione del segnale. Nel caso della WT per ridurre gli effetti di bordo non interessa predire l'andamento preciso del segnale, ma basta capire quali

sono le caratteristiche del segnale vicino ai bordi dell'intervallo di acquisizione. Poiché la WT studia le proprietà oscillatorie del segnale al variare del tempo, un possibile approccio è dato dalla predizione del segnale basandosi sullo spettro locale presente ai bordi del segnale. Questo approccio non rappresenta la scelta migliore in assoluto perché nel caso di segnali molto complessi come quelli di perfusione, è difficile prevedere la struttura precisa del segnale e quindi anche la sua forma fuori dall'intervallo di acquisizione.

5.2.1. Il padding predittivo

L'obiettivo del *padding* predittivo è la riduzione degli effetti di bordo aggiungendo agli estremi dell'intervallo di acquisizione del segnale valori predetti sulla base delle caratteristiche dello spettro nella vicinanza del bordo. Considerato il segnale $s(t)$, si analizza la sua estensione oltre il limite superiore, cioè per $t > T$. Basandosi sulle considerazioni fatte nel paragrafo precedente, il modo più semplice per predire il segnale è quello di utilizzare una somma di armoniche che continuano a descrivere al meglio lo spettro del segnale per $t > T$. In questo caso si sceglie di descrivere il segnale con il seguente modello:

$$s(t_n) = x(t_n) + \sigma v(t_n) = a_0 + \sum_{m=1}^M [a_m \cos \omega_m t_n + b_m \sin \omega_m t_n] + \sigma v(t_n)$$

dove M rappresenta l'ordine del modello scelto, $v(t_n)$ rappresenta un processo aleatorio che descrive il rumore bianco gaussiano con varianza unitaria e $x(t_n)$ rappresenta il segnale privo di rumore sotto forma di somma di sinusoidi.

Una volta identificati i parametri del modello c_m, φ_m, ω_m , si può procedere con la predizione del segnale per valori di $t > T$. Ci sono diversi metodi dedicati all'interpolazione di segnali descritti con modelli sinusoidali [31], molto precisi nella stima dei parametri del modello, ma molto dispendiosi dal punto di vista computazionale. Si preferisce utilizzare un metodo meno oneroso computazionalmente, descritto in [25], che produce la stima dei parametri delle diverse sinusoidi che compongono il segnale $s(t_n)$ semplicemente fittando iterativamente il segnale con le corrispettive sinusoidi.

Utilizzando la tecnica dei minimi quadrati, sono stati stimati i parametri che minimizzano i residui del modello $q_0 + q_1 \cos \omega t_n + q_2 \sin \omega t_n$ rispetto al valore ω e

trovando il minimo locale per cui si ha il fit migliore dei dati. Il valore ω per cui si ha il minimo locale è assegnato a ω_m e i parametri q_1 e q_2 vengono assegnati a a_m e b_m rispettivamente. Questa procedura viene ripetuta iterativamente per $M - 1$ volte utilizzando al posto di $s(t_n) = s^{(1)}(t_n)$ il segnale $s^{(m)}(t_n)$, che è dato dal segnale originale al quale vengono sottratte tutte le armoniche stimante durante le iterazioni precedenti:

$$s^{(m)}(t_n) = s(t_n) - \sum_{i=1}^m s^{(i)}(t_n).$$

Per velocizzare e ottimizzare l'algoritmo, si sceglie di partire dal valore di ω_m che rappresenta il picco più grande nello spettro di Fourier del segnale. Un problema di questo algoritmo è quello di modellizzare i segnali non stazionari acquisiti con il LDF con segnali stazionari. Per predire al meglio il segnale, si sceglie di trovare i parametri del modello utilizzando solo le caratteristiche locali del segnale vicino ai bordi. Questo può essere fatto utilizzando la stima ai minimi quadrati pesati, in cui il peso varia in modo da pesare di più i campioni vicino ai bordi rispetto a quelli più lontani. Si sceglie di utilizzare una funzione esponenziale decrescente per descrivere i pesi di ogni campione: i campioni vicino al bordo avranno pesi elevati e allontanandosi sempre di più dal bordi i pesi diminuiscono in maniera esponenziale.

Per la scelta dell'ordine adeguato M del modello sinusoidale si utilizza il criterio BIC (*Bayesian Information Criterion*), il quale in questo contesto presenta prestazioni migliori rispetto al criterio di Akaike [32]. Il miglior ordine del modello viene ricavato durante il processo iterativo, calcolando ad ogni iterazione l'indice BIC e fermando la procedura se due valori consecutivi sono più grandi del minimo corrente. Per segnali complessi come il segnale LD, il criterio BIC potrebbe scegliere ordini molto grandi del modello portando a costi computazionali molto elevati. Per evitare ciò si limita superiormente al numero massimo di picchi possibili che è uguale alla metà del numero di frequenza per cui vengono calcolati i coefficienti della WT.

La procedura sopra citata riguarda la parte di segnale per $t > T$. Analogamente si può procedere anche per $t < 0$ invertendo la sequenza di campioni ($s(t) = s(T - t)$) e ripetendo la stessa procedura.

L'ultimo problema da affrontare nell'utilizzo del *padding* è stabilire il numero di punti da calcolare fuori dall'intervallo di acquisizione. Sono necessari tanti punti

quanti mancano agli estremi del segnale da abbinare ai punti della funzione Wavelet; ad una maggior intervallo temporale della funzione corrisponde un maggior numero di punti da calcolare fuori dagli estremi dell'intervallo di acquisizione del segnale.

5.2.2. Intervallo di frequenze calcolabili

I limiti teorici per l'intervallo di frequenze $[f_{min}, f_{max}]$ per cui si possono calcolare i coefficienti della WT sono dati dalle caratteristiche del segnale analizzato. Dato il segnale $s(t)$ campionato ad una frequenza f_c per T secondi, i suoi limiti teorici per l'intervallo di frequenze analizzabili sono i seguenti:

$$f_{min} \geq \frac{1}{T}, f_{max} \leq \frac{f_s}{2}.$$

Il limite superiore è dato dal teorema di Nyquist-Shannon (vedi Capitolo 3), mentre la scelta del limite inferiore si basa sulla logica che una sinusoidale non può essere studiata se non si ha una sua oscillazione completa. Dal punto di vista statistico, per avere una misura affidabile e per descrivere il processo aleatorio, è consigliato avere almeno sei oscillazioni della componente in frequenza (*regola del sei*):

$$f_{min}^{(stat)} = \frac{6}{T}.$$

Nel caso del segnale LD la frequenza di campionamento è di 16 Hz e la durata minima del segnale deve essere tale da permettere il calcolo delle componenti secondo la regola del sei. Nella Tabella 2 sono elencate le durate minime delle acquisizioni LDF necessarie per garantire un'analisi adeguata delle varie bande di frequenza che caratterizzano il segnale.

Tabella 2: Durata minima dell'acquisizione per analizzare almeno 6 oscillazioni.

Attività	Frequenze [Hz]	Durata minima [s]	Durata minima [min]
Cardiaca	0.6-2.0	10	0.2
Respiratoria	0.145-0.6	30	0.5
Miogena	0.052-0.145	100	1.7
Neurogena	0.021-0.052	300	5.0
Endoteliale NO dipendente	0.0095-0.021	631	10.5
Endoteliale NO indipendente	0.005-0.0095	1200	20.0

5.2.3. Algoritmo per il calcolo della trasformata Wavelet

In seguito vengono spiegati i passi dell'algoritmo utilizzato per il calcolo della trasformata Wavelet che è stato implementato in Matlab [25] e parzialmente modificato per adattarlo al segnale LD acquisito durante la prova PORH:

1. pre-elaborazione del segnale: eliminazione del trend del segnale LD sottraendo un fit lineare nel caso dell'acquisizione a riposo e sottraendo un fit biesponenziale nel caso della fase di iperemia reattiva; filtraggio del segnale 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 della finestra del segnale acquisito;
3. suddivisione dell'intervallo di frequenze analizzate $[f_{min}, f_{max}]$ in piccoli intervalli in base al numero di voci n_v scelto. Poiché questa divisione non dipende dalle caratteristiche del segnale acquisito, è possibile confrontare segnali diversi sulla stessa banda di frequenze;
4. calcolo della FFT del segnale mettendo a zero le ampiezze delle frequenze negative dato che il segnale analizzato è reale;
5. per ogni frequenza discretizzata f_k per cui viene calcolata la WT:
 - a. se è disponibile la forma esplicita della trasformata di Fourier della funzione Wavelet basta calcolare 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 delle frequenze applicando l'algoritmo FFT ai campioni nel tempo della forma esplicita della funzione Wavelet;
 - b. per migliorare le prestazioni dell'algoritmo si calcola la convoluzione tra il segnale nel dominio del tempo e la funzione Wavelet attraverso la trasformata di Fourier: si moltiplicano tra di loro le trasformate nel dominio delle frequenze del segnale LD e della funzione Wavelet e poi si calcola la loro antitrasformata;

- c. i coefficienti della WT per ogni frequenza al variare del tempo sono i coefficienti ottenuti al punto b antitrasformando.

Questo algoritmo è stato implementato in Matlab nella funzione *wt.m* presente all'interno del pacchetto Nonlinear Mode Decomposition fornito dagli autori del lavoro [25]. La struttura di questa funzione è la seguente:

```
[WT,freq,Optional:wopt]=wt(sig,fs,Optional:'PropertyName',PropertyValue)
```

I parametri di input obbligatori sono:

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

I parametri di input opzionali utilizzati sono:

- fmin e fmax – che definiscono la frequenza minima e massima per cui viene calcolata la WT, 0.005 e 2 Hz nel caso in esame;
- padding – che definisce il tipo di padding utilizzato: nessuno, zero, periodic o predictive;
- Wavelet – per scegliere la funzione Wavelet di Morlet;

Per quanto riguarda gli output, la funzione fornisce:

- WT – la matrice dei coefficienti della trasformata Wavelet;
- freq – le frequenze corrispondenti alle righe della matrice WT;
- wopt – una struttura che contiene tutti i parametri di configurazione utilizzati per il calcolo della WT. Questi parametri sono utili per le elaborazioni successive perché permettono di ottenere matrici WT simili per segnali diversi semplificando il confronto dei coefficienti WT.

5.3. Elaborazione dei dati

L'analisi visiva degli scalogrammi non è immediata e non consente di quantificare le caratteristiche della condizione micro circolatoria: ciò rende difficile il confronto dei risultati ottenuti dall'analisi Wavelet prima e dopo il trattamento PORH.

In prima battuta i risultati della analisi Wavelet vengono plottati per mezzo dello scalogramma in un grafico bidimensionale. Poiché lo scalogramma è una matrice avente in ogni riga i valori relativi a una determinata frequenza e in ogni colonna i valori dello spettro per un determinato istante, si sceglie di plottare i dati per agevolare l'interpretazione delle caratteristiche del segnale LD come in Figura 5.5: nella parte superiore vengono plottati i segnali nel dominio del tempo relativi alla fase di riposo e alla fase di iperemia reattiva; sotto i segnali, vengono plottati gli scalogrammi che hanno per ascissa il tempo espresso in secondi, per ordina le frequenze espresse in Hertz e le ampiezze dei coefficienti WT espresse con un codice a colori; a destra dello scalogramma viene plottato lo spettro medio di potenza che contiene i valori dei coefficienti WT dello scalogramma mediati nel tempo.

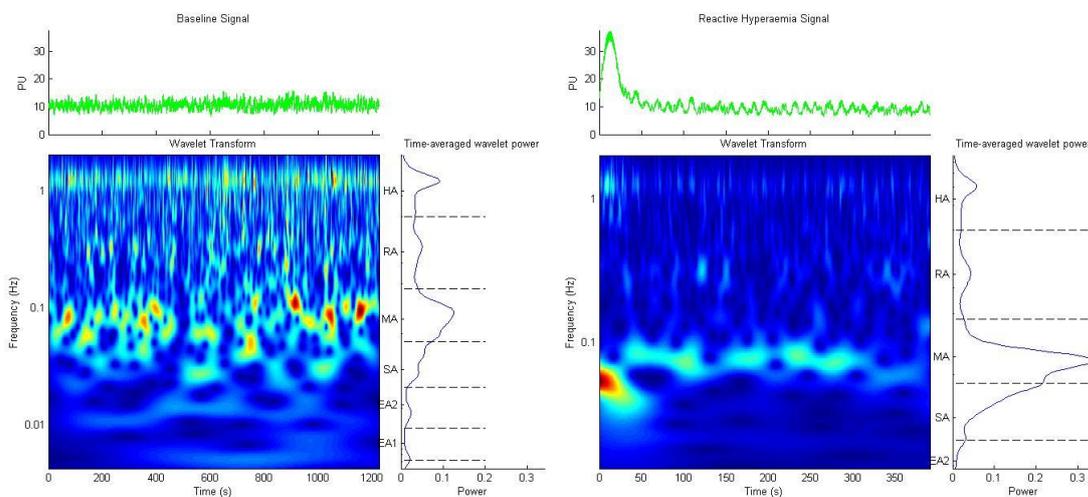


Figura 5.5: Scalogramma della trasformata Wavelet.

Questa disposizione rende più intuitiva l'analisi visiva, soprattutto nella fase di iperemia reattiva, permettendo di associare le componenti in frequenza agli istanti temporale in base all'andamento del segnale LD: fase di salita, picco massimo e fase di riassetamento del segnale. Lo spettro medio di potenza permette di confrontare rapidamente gli ordini di grandezza delle componenti in frequenza del segnale nella fase

a riposo con il segnale nella fase di iperemia. Sono stati plottati separatamente anche gli spettri di ampiezza e di potenza come citato nel Capitolo 3.

Queste visualizzazioni risultano efficaci per un'analisi visiva dei singoli segnali, ma per un confronto tra il gruppo di soggetti prima e dopo l'applicazione della terapia FREMS risulta non efficace. Per ovviare a questo problema vengono introdotti i seguenti indici mediati nel tempo per una data banda di frequenze come suggerito in [33]:

- Potenza media assoluta (PA):

$$P(f_1, f_2) = \frac{1}{t} \int_0^t \int_{1/2\pi f_2}^{1/2\pi f_1} \frac{1}{s^2} |W(s, \tau)|^2 ds d\tau;$$

- Potenza media relativa (PR):

$$P_{rel}(f_1, f_2) = \frac{P(f_1, f_2)}{P_{tot}};$$

- Ampiezza media assoluta (AA):

$$A(f_1, f_2) = \frac{1}{t} \int_0^t \frac{1}{f_2 - f_1} \int_{1/2\pi f_2}^{1/2\pi f_1} \frac{1}{s^2} W(s, \tau) ds d\tau;$$

- Ampiezza media relativa (AR):

$$A_{rel}(f_1, f_2) = \frac{A(f_1, f_2)}{A_{tot}};$$

dove $W(s, \tau)$ sono i coefficienti della WT, (f_1, f_2) è la banda di frequenze per cui viene calcolato l'indice e P_{tot} ed A_{tot} rappresentano rispettivamente la potenza media e l'ampiezza media su tutta la banda di frequenze del segnale analizzato.

Dalla WT calcolata con Matlab, si hanno a disposizione un insieme discreto di valori e questo porta a introdurre una discretizzazione delle formule degli indici sopra citati trasformando gli integrali in sommatorie.

Gli indici sopra descritti possono essere calcolati per ogni banda caratteristica del segnale a riposo: cardiaca (HA), respiratoria (RA), miogena (MA), neurogena (SA), endoteliale NO dipendente (EA2) e endoteliale NO indipendente (EA1). Nel caso del segnale di iperemia reattiva la banda EA1 è assente per via della durata troppo breve dell'acquisizione e quindi si sceglie di calcolare gli indici delle prime 5 bande di

frequenza per poter confrontare tra di loro i segnali a riposo e i segnali di iperemia reattiva.

Al fine di valutare le differenze che si presentano nella perfusione cutanea prima e dopo la somministrazione della terapia FREMS, vengono fatti i confronti descritti in Tabella 4 per ogni singolo soggetto. Tali confronti vengono valutati anche con il t-test, il quale determina se la differenza tra i dati provenienti da due gruppi è significativamente diversa da zero in base al p-value trovato e al livello di significatività α scelto per il test. Nel caso in cui il p-value sia inferiore al valore α , si verifica l'ipotesi nulla H_0 : "la differenza tra i dati confrontati è significativamente diversa da zero", altrimenti si verifica l'ipotesi alternativa H_1 : "la differenza tra i dati confrontati non è significativamente diversa da zero".

Tabella 3: Confronti effettuati tra i segnali di perfusione prima e dopo la somministrazione della terapia FREMS.

Prima della somministrazione della FREMS				
Iperemia reattiva			Riposo	
FI i	PA	Confrontato con	FI i	PA
	PR			PR
	AA			AA
	AR			AR
Dopo la somministrazione della FREMS				
Iperemia reattiva			Riposo	
FI i	PA	Confrontato con	FI i	PA
	PR			PR
	AA			AA
	AR			AR
Iperemia reattiva				
Dopo la FREMS			Prima della FREMS	
FI i	PA	Confrontato con	FI i	PA
	PR			PR
	AA			AA
	AR			AR

Tali confronti vengono rappresentati per mezzo di boxplot nei quali, in corrispondenza di ogni banda di frequenza, sono stati inseriti i valori dei p-value calcolati con il t-test. Questo tipo di confronto valuta lo spettro medio del segnale di perfusione dando una informazione su quanto mediamente sono diversi i contributi delle

bande di frequenza delle varie attività che influiscono sulla perfusione cutanea, ma non dà informazioni relative al loro andamento nel tempo. Tali informazioni sono molto utili nello studio della fase di iperemia reattiva, perché permettono di quantificare il contributo della varie attività nelle diverse fasi di iperemia reattiva, soprattutto nel confronto della fase iniziale, in cui si verifica il picco di perfusione, con la fase di riassetto della perfusione a un livello prossimo a quello di riposo. Per un'analisi di questo tipo lo spettro medio viene valutato su piccoli intervalli di acquisizione del segnale.

Per analizzare ulteriormente il comportamento dei contributi delle singole bande viene infine utilizzata la Wavelet Entropy.

5.3.1. Analisi dello spettro medio per finestre temporali

Con questa tecnica si suddivide il segnale in finestre consecutive della durata di 50 secondi e si calcola la potenza assoluta per ogni finestra in parte. La scelta della lunghezza delle finestre non è arbitraria e come si può vedere in Figura 5.6, questa durata permette di isolare il picco di perfusione dovuto all'iperemia reattiva senza compromettere troppo l'ampiezza della banda di frequenze analizzabili. Come spiegato nel Capitolo 3, la frequenza minima analizzabile dipende dalla durata del segnale analizzato e una durata di 50 secondi permette di analizzare lo spettro nell'intervallo compreso tra 0.02 e 2 Hz, intervallo che comprende le quattro bande di frequenza più veloci: cardiaca, respiratoria, miogena e neurogena.

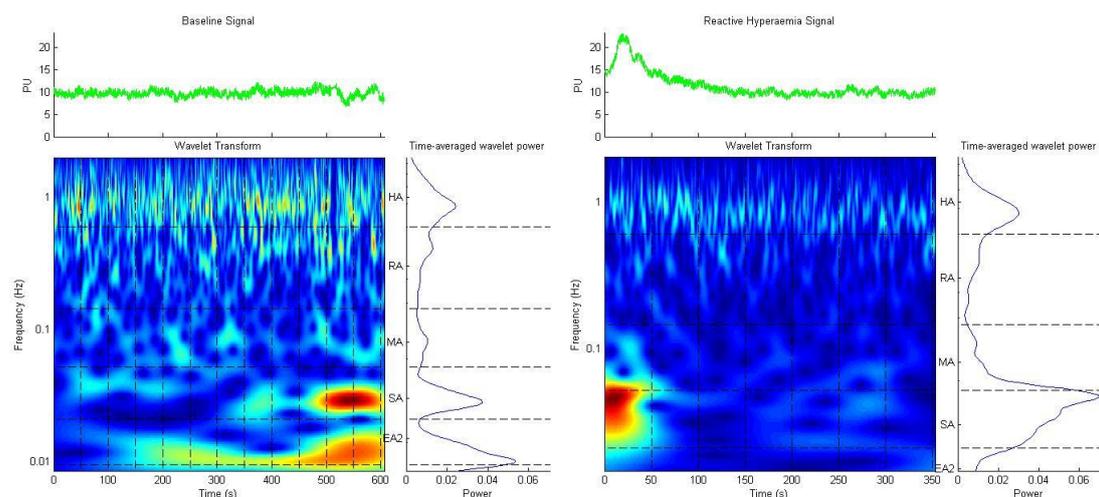


Figura 5.6: Finestratura del segnale in intervalli di 50 secondi (rettangoli neri tratteggiati).

Le potenze assolute calcolate per il segnale a riposo e durante l'iperemia reattiva vengono plottate in grafici a barre (Figura 5.7) in cui i quattro gruppi rappresentano le quattro bande di frequenza analizzate, mentre le barre dello stesso colore sono associate a diversi intervalli temporali come descritti nella leggenda della Figura 5.7. Con questo tipo di rappresentazione si possono fare osservazioni sui contributi delle varie bande di frequenza nel tempo, analizzando un numero inferiore di valori rispetto allo scalogramma escludendo però l'attività endoteliale dall'analisi. In più si possono fare osservazioni sulle variazioni percentuali nel tempo.

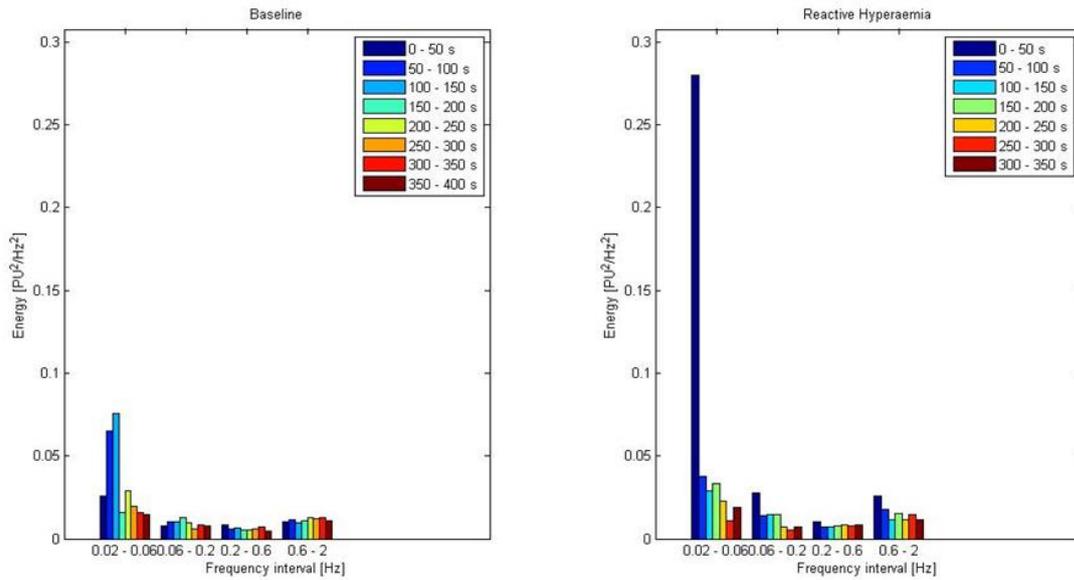


Figura 5.7: Potenza assoluta calcolata per le quattro bande di frequenza analizzate: cardiaca, respiratoria, miogena e neurogena al variare della finestra temporale.

5.3.2. Wavelet Entropy

La Wavelet Entropy (WEn) viene utilizzata per quantificare il contenuto informativo dei valori dei coefficienti delle singole frequenze calcolate con la WT e quindi la complessità delle singole bande. La definizione di WEn si basa sull'entropia di Shannon [34] e per ogni frequenza f_i viene definita come:

$$WEn(f_i) = - \sum_{t=0}^T \omega_n(f_i, t)^2 \log \omega_n(f_i, t)^2$$

Nella definizione di WEn la distribuzione di probabilità utilizzata dall'entropia di Shannon viene sostituita da $\omega_n(f_i, j)$ che viene definita come la normalizzazione per

ogni frequenza dei coefficienti della WT al quadrato, in modo che la somma dei ω_n per ogni frequenza sia uno:

$$\omega_n(f_i, t) = \frac{|\omega(f_i, t)|^2}{\sum_{t=0}^T |\omega(f_i, t)|^2}$$

dove $\omega(f_i, j)$ rappresenta il valore del coefficiente WT della frequenza f_i all'istante j .

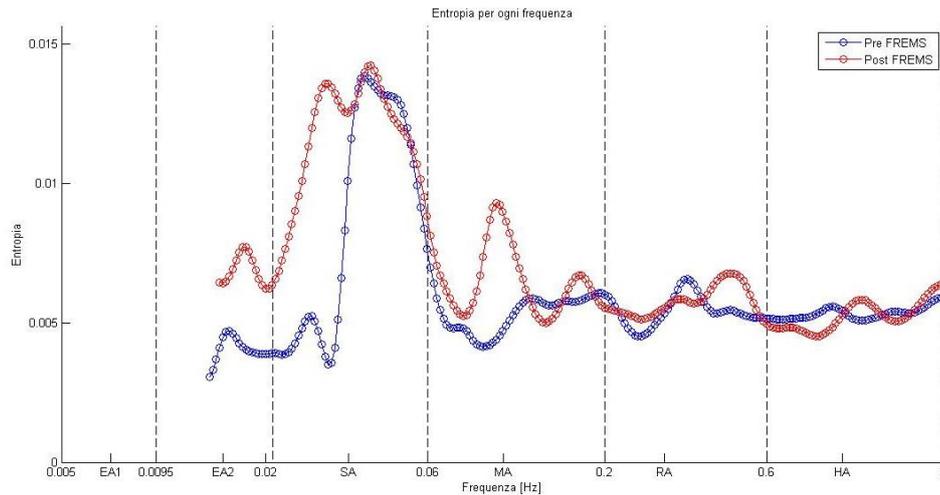


Figura 5.8: Wavelet Entropy calcolata per ogni frequenza.

In Figura 5.8 viene rappresentato un grafico nel quale, in ascissa sono rappresentate le frequenze e in ordinata i valori di WEn associati alle frequenze. Questo tipo di grafico permette di confrontare, frequenza per frequenza, i valori di WEn prima e dopo l'applicazione della terapia FREMS. A valori più grandi di WEn corrisponde una maggiore irregolarità della serie temporale di campioni di una data frequenza.

6. Risultati e discussione

In questo capitolo sono riportati i risultati ottenuti dall'elaborazione dei segnali per i 5 pazienti trattati con la terapia FREMS. Nella prima parte, per ogni soggetto, vengono riportati il segnale di perfusione a riposo e durante l'iperemia reattiva, i relativi scalogrammi e gli spettri di potenza mediati nel tempo, calcolati prima e dopo la somministrazione della terapia FREMS. Infine vengono riportati i boxplot degli indici PA, PR, AA e AR confrontati secondo la Tabella 3 che hanno un p-value del t-test inferiore al 5%. Si preferisce presentare solo questi boxplot per ridurre il numero di indici da confrontare.

Nella seconda parte vengono rappresentati per ogni paziente i grafici a barre delle potenze assolute calcolate per le quattro bande di frequenza più veloci al variare della finestra temporale. Anche in questo caso sono confrontati i risultati del segnale LD a riposo e durante l'iperemia reattiva, sia prima che dopo la somministrazione della terapia FREMS.

Infine, nella terza parte vengono rappresentati i grafici dell'entropia Wavelet calcolata per ogni frequenza del segnale LD durante l'iperemia reattiva; prima vengono confrontati i valori ottenuti prima e dopo la FREMS per ogni singolo paziente e infine vengono confrontati i valori medi dei 5 soggetti.

6.1. Prima parte: Analisi dello spettro medio

Paziente n°1

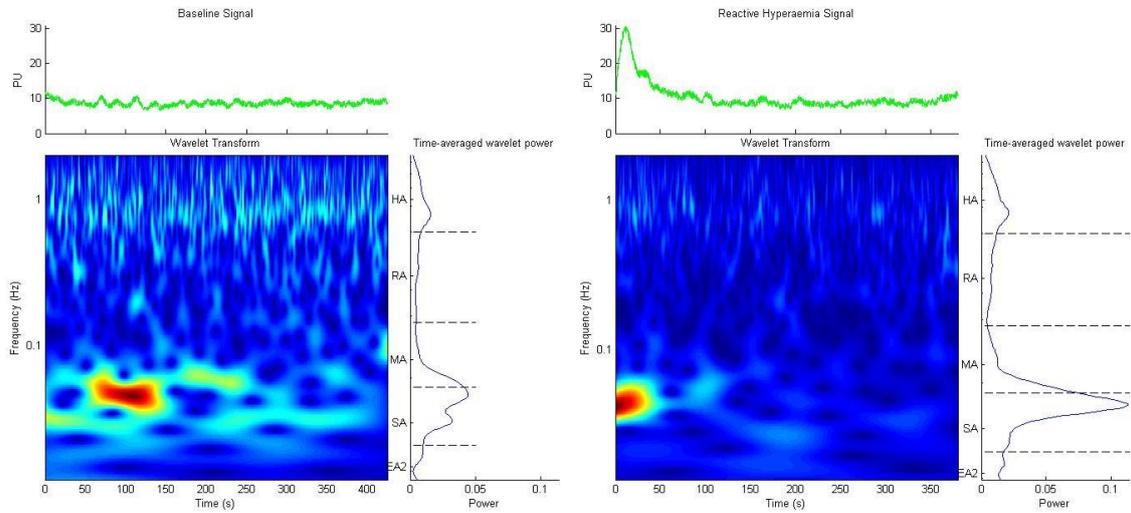


Figura 6.1: Paziente 1 prima della terapia FREMS.

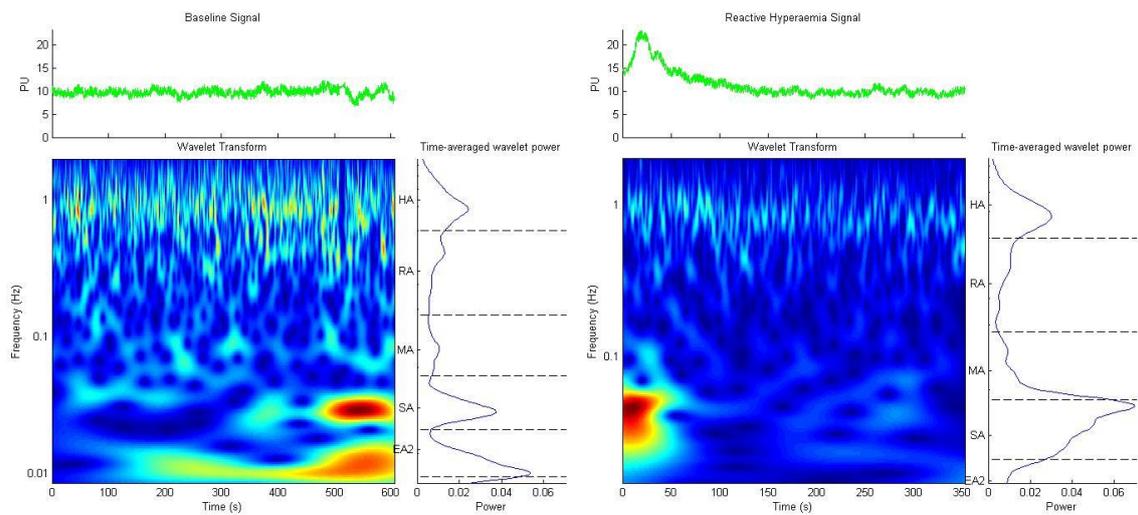


Figura 6.2: Paziente 1 dopo la terapia FREMS.

Paziente n°2

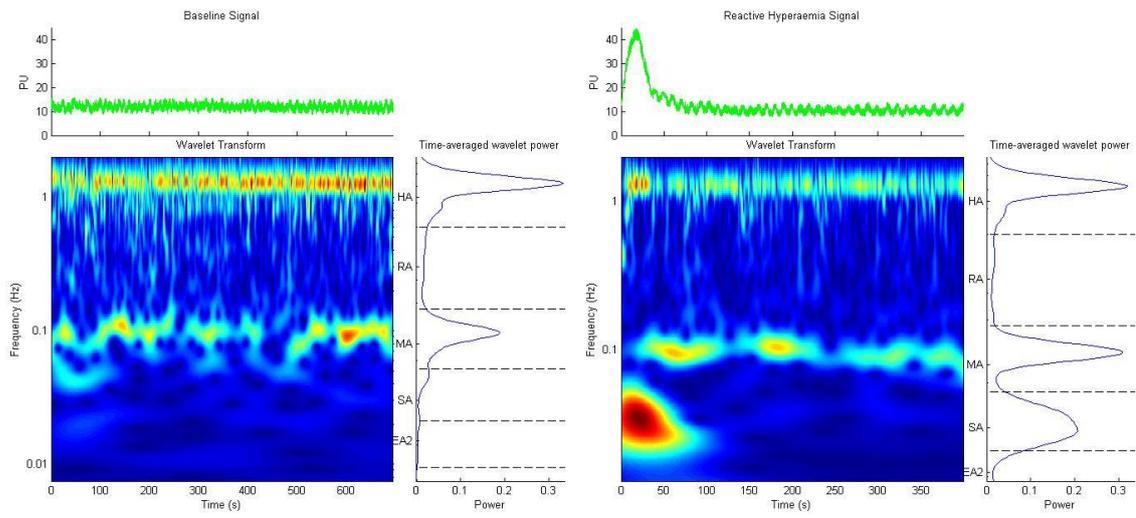


Figura 6.3: Paziente 2 prima della terapia FREMS.

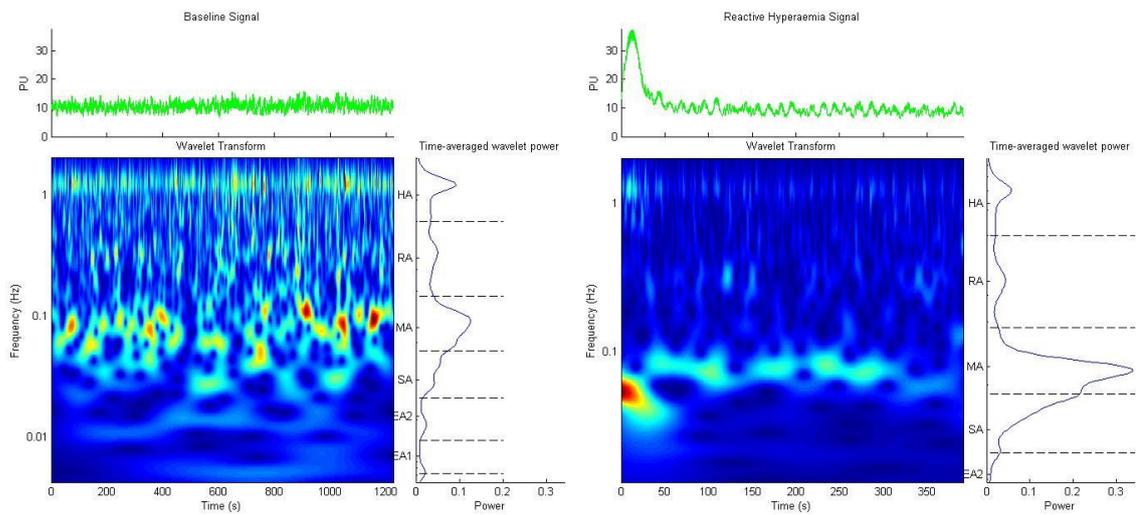


Figura 6.4: Paziente 2 dopo la terapia FREMS.

Paziente n°3

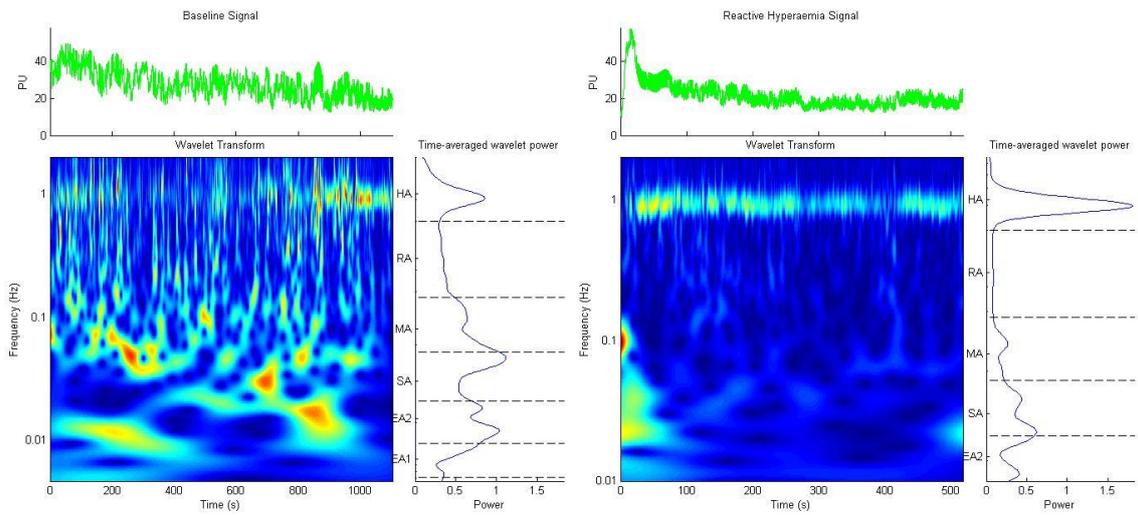


Figura 6.5: Paziente 3 prima della terapia FREMS.

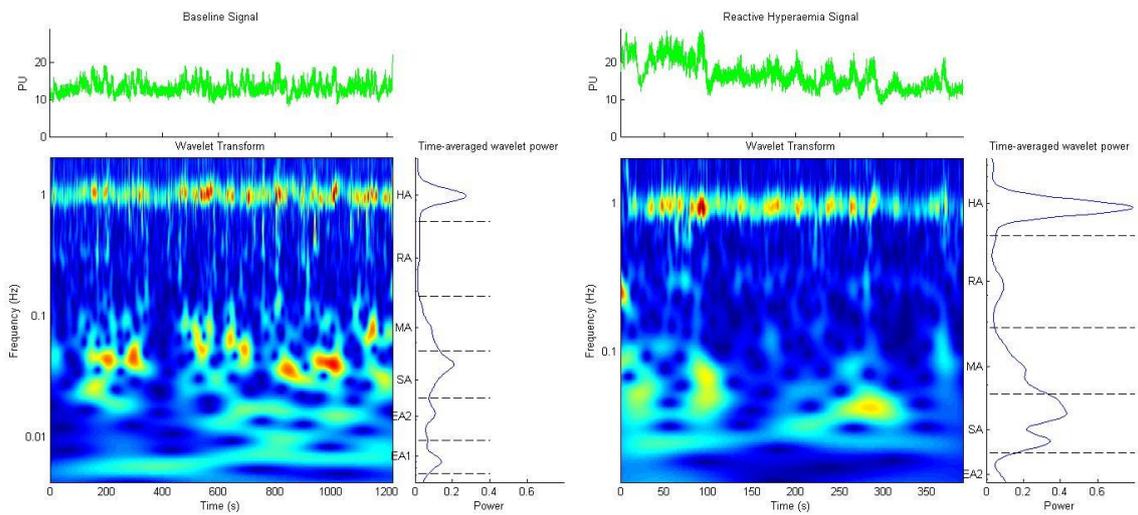


Figura 6.6: Paziente 3 dopo la terapia FREMS.

Paziente n°4

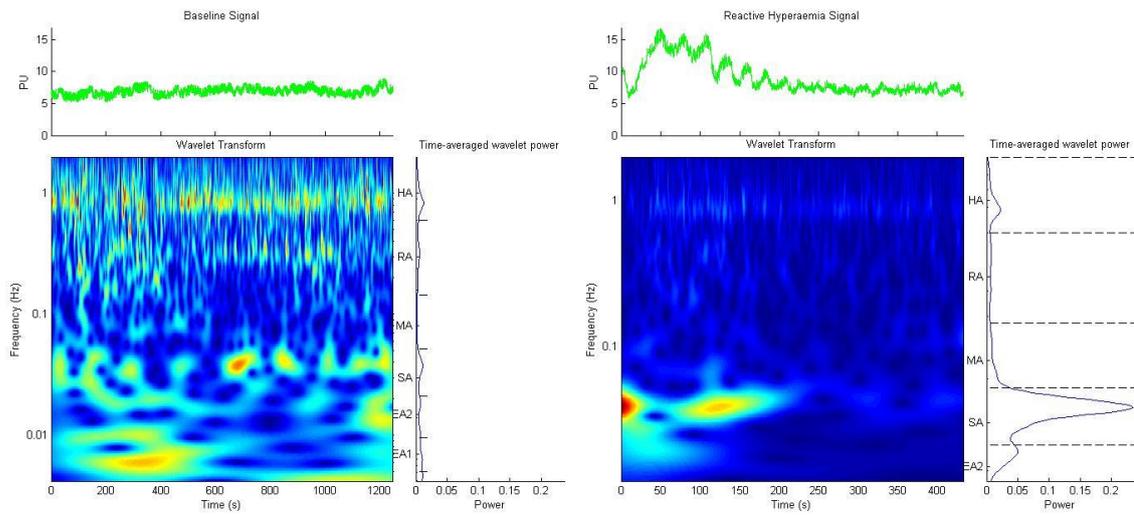


Figura 6.7: Paziente 4 prima della terapia FREMS.

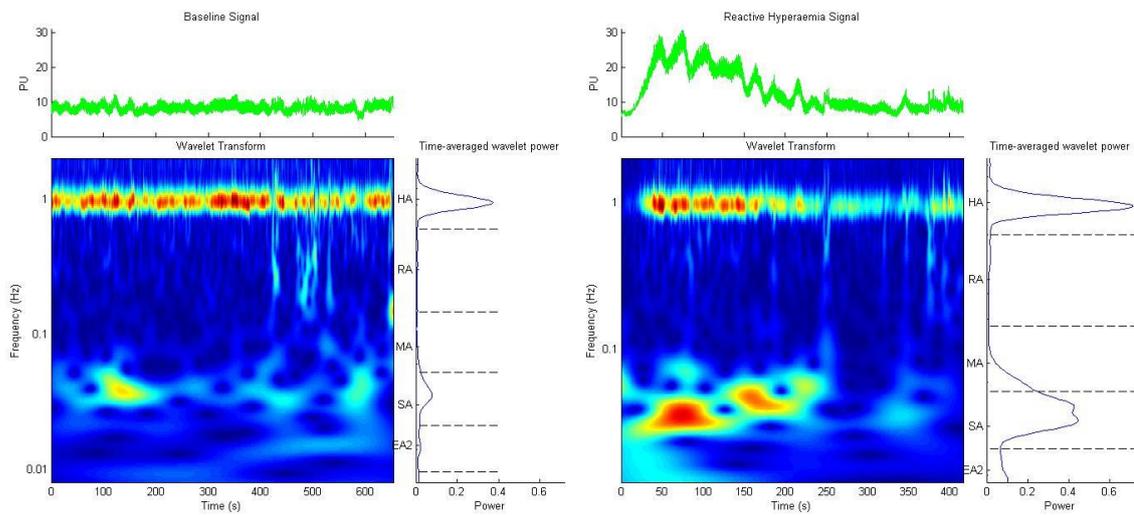


Figura 6.8: Paziente 4 dopo la terapia FREMS.

Paziente n°5

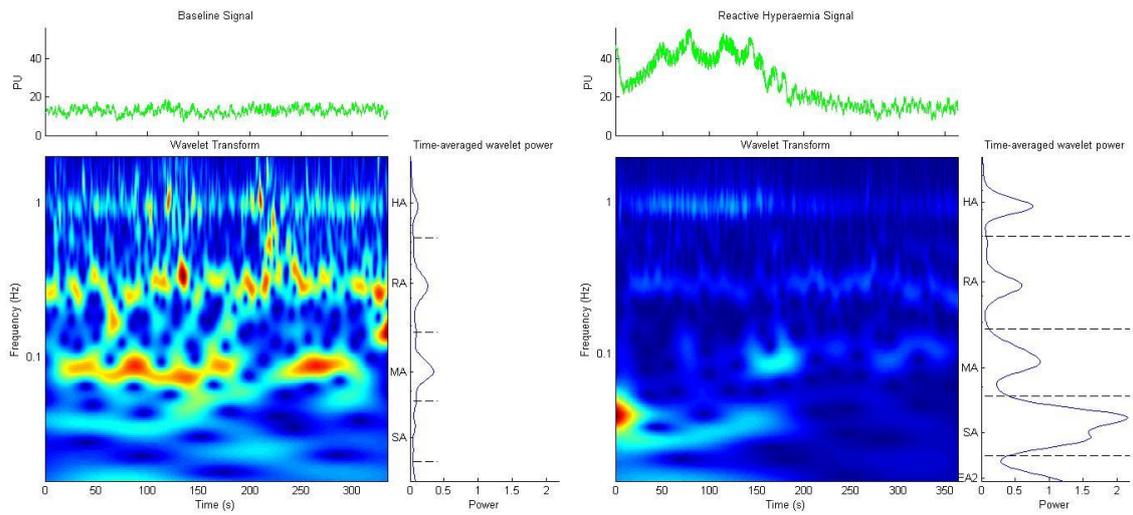


Figura 6.9: Paziente 5 prima della terapia FREMS.

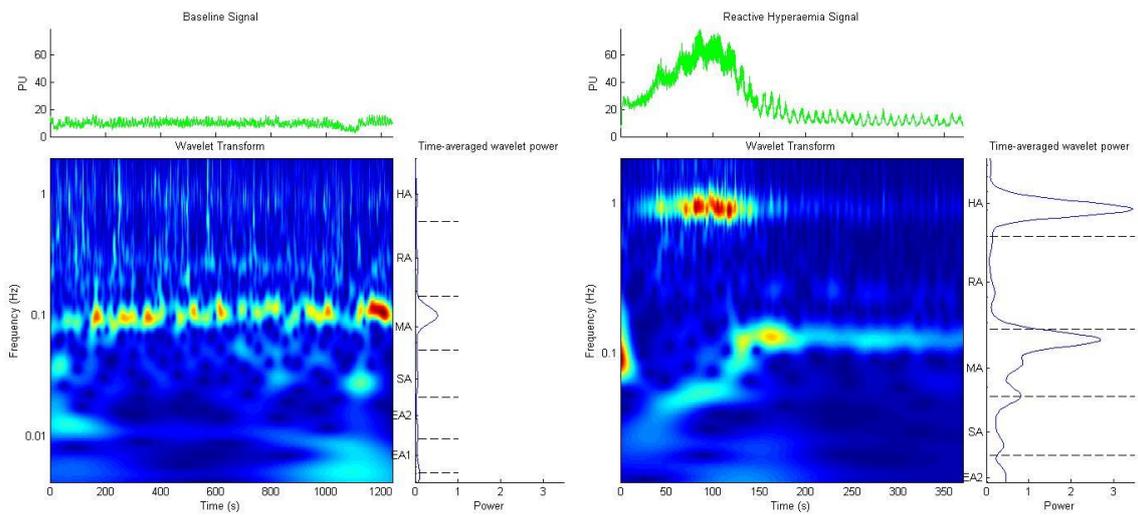


Figura 6.10: Paziente 5 dopo la terapia FREMS.

Boxplot prima della FREMS – confronto riposo/iperemia reattiva

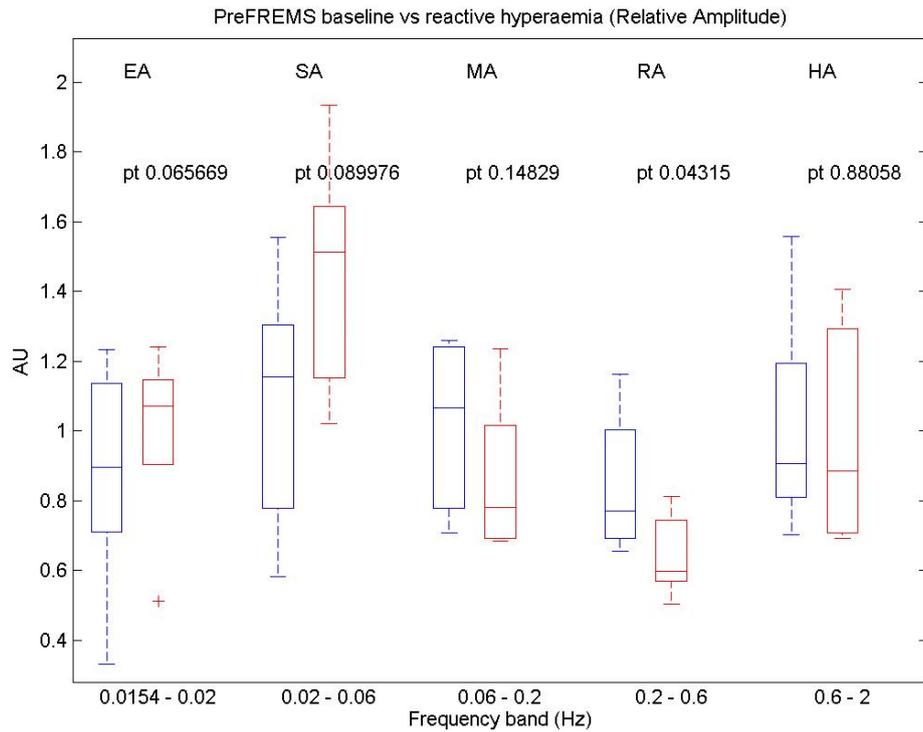


Figura 6.11: Boxplot di AR - confronto riposo/iperemia reattiva prima della FREMS.

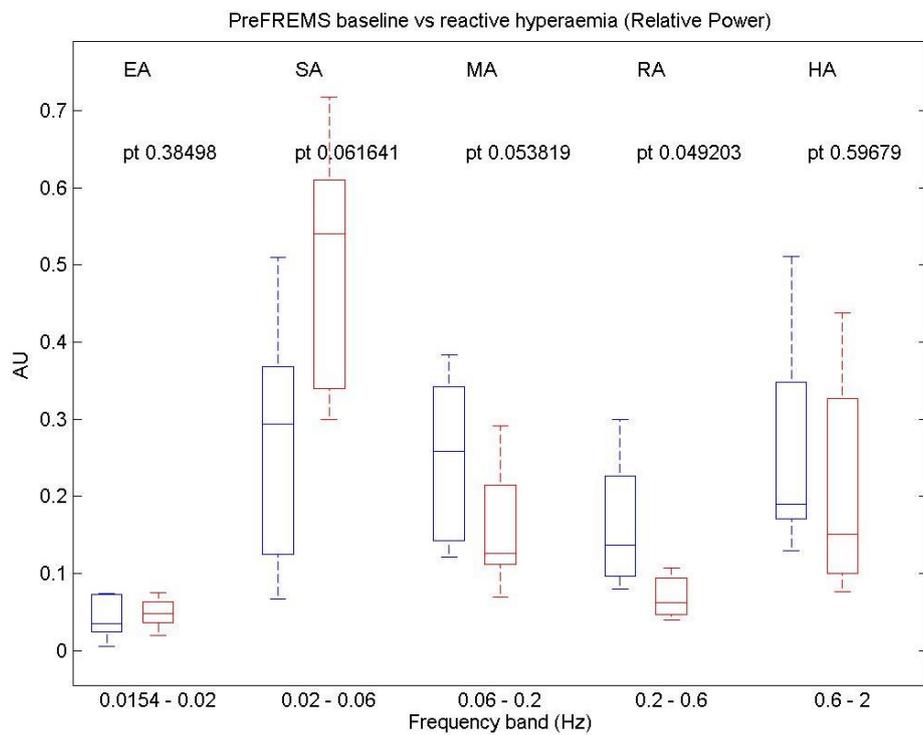


Figura 6.12: Boxplot di PR - confronto riposo/iperemia reattiva prima della FREMS

Boxplot dopo la FREMS – confronto riposo/iperemia reattiva

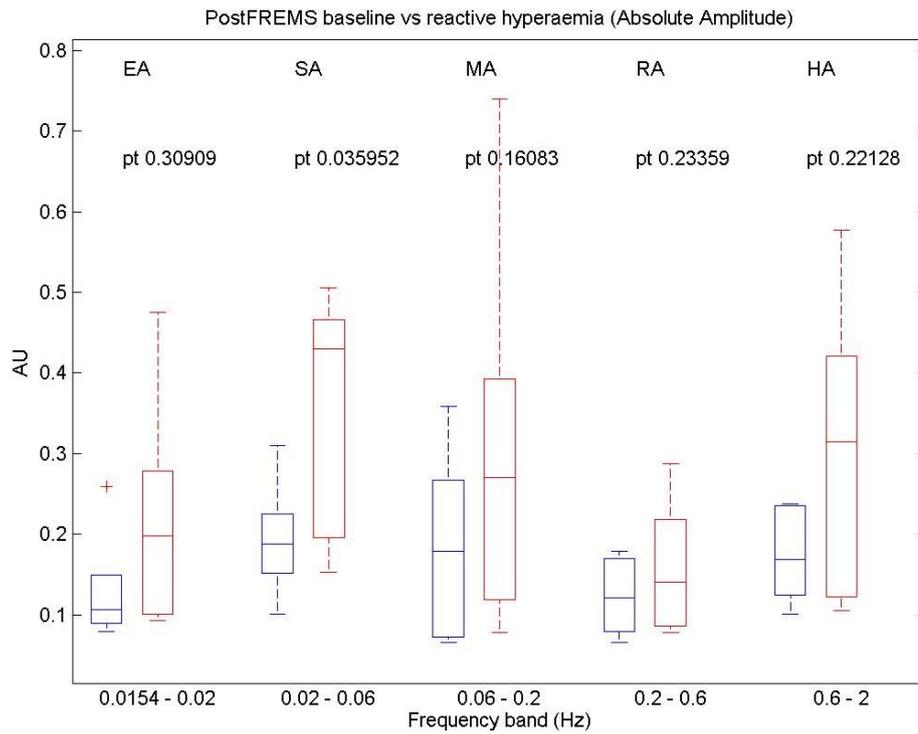


Figura 6.13: Boxplot di AA - confronto riposo/iperemia reattiva dopo la FREMS.

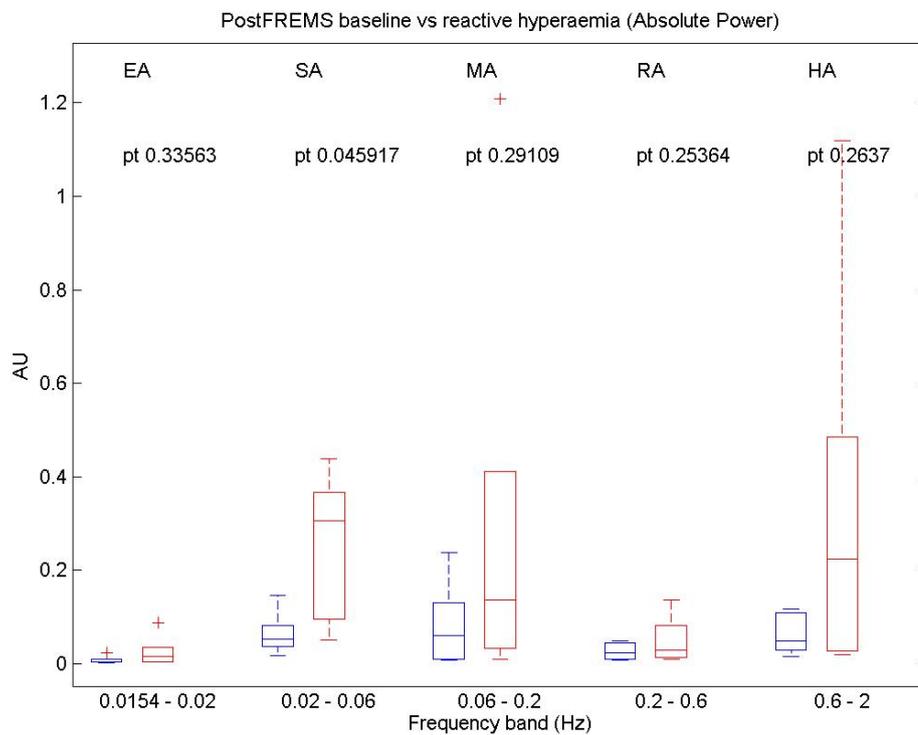


Figura 6.14: Boxplot di PA - confronto riposo/iperemia reattiva dopo la FREMS.

Boxplot iperemia reattiva – confronto prima/dopo FREMS

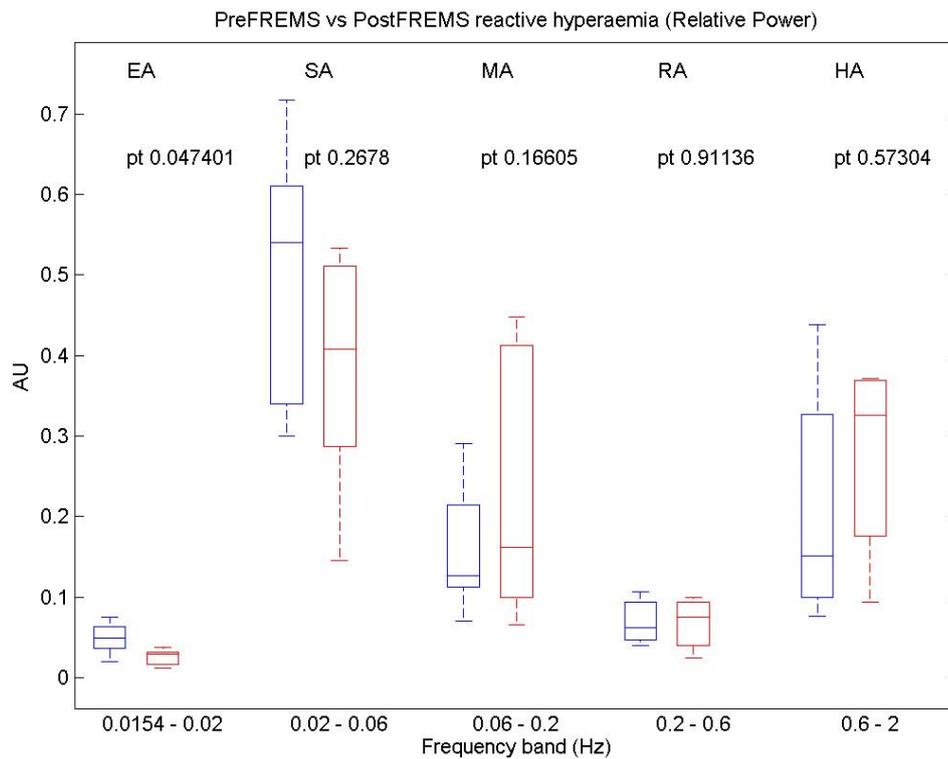


Figura 6.15: Boxplot di PR - confronto iperemia reattiva prima e dopo la FREMS.

Tabella 4: Valori medi e variazione % degli indici di confronto con differenze significative (p-value <0.05)

Prima della somministrazione della FREMS					
FI		Riposo	Iperemia reattiva	delta %	p-value
II	AR	0.7722	0.598	-22.56	0.0431
II	PR	0.1372	0.0618	-54.96	0.0492
Dopo la somministrazione della FREMS					
FI		Riposo	Iperemia reattiva	delta %	p-value
IV	AA	0.1874	0.4296	129.21	0.0359
	PA	0.0529	0.30579	477.50	0.0459
Iperemia reattiva					
FI		Prima della FREMS	Dopo la FREMS	delta %	p-value
V	PR	0.04865	0.02905	-40.28	0.0474

Nella Tabella 5 sono riportati i valori medi e la variazione percentuale delle differenze significative trovate confrontando gli indici PA, PR, AA e AR secondo lo schema descritto in Tabella 4. Dal confronto degli indici calcolati prima della somministrazione della FREMS sono state riscontrate differenze significative per AR e PR della banda associata all'attività respiratoria, caratterizzate da un decremento in entrambi i casi: -22.56% e -54.96%. Questo può essere correlato ad una diminuzione della frequenza respiratoria causata dal lungo periodo passato dai pazienti in posizione supina.

Dopo la somministrazione della terapia FREMS, sono state riscontrate differenze significative nella banda associata all'attività neurogena in cui sia AA che PA hanno subito un incremento, del 129.21% e del 477.50% rispettivamente, nella fase di iperemia reattiva rispetto alla fase a riposo. In questo caso si può ipotizzare che la stimolazione elettrica operata dalla FREMS migliori la risposta dell'attività neurogena alla occlusione.

Dal confronto degli indici calcolati durante la fase di iperemia reattiva prima e dopo la somministrazione della terapia FREMS, è stata riscontrata una variazione nella banda associata all'attività delle cellule endoteliali NO-dipendente con una diminuzione del 40,28% della potenza relativa dopo la somministrazione della terapia.

6.2. Seconda parte: Analisi dello spettro medio per finestre temporali

Paziente n°1

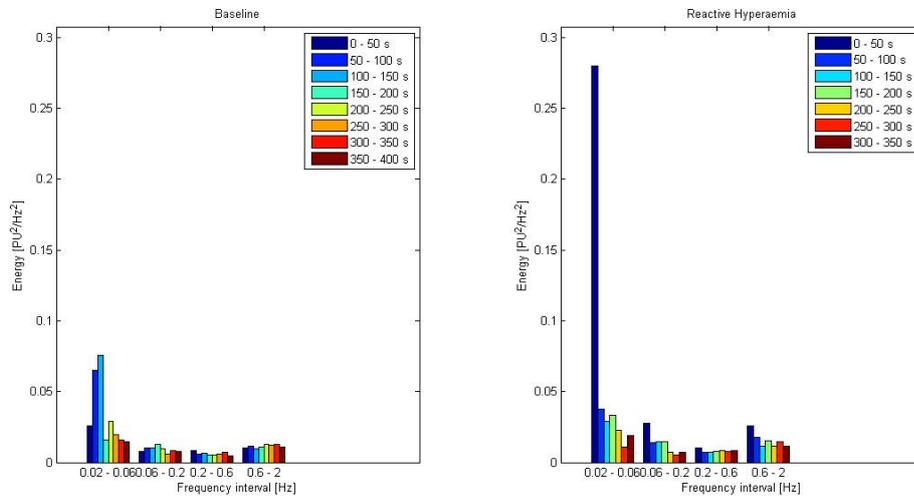


Figura 6.16: Paziente 1 prima della terapia FREMS: grafico a barre della PA.

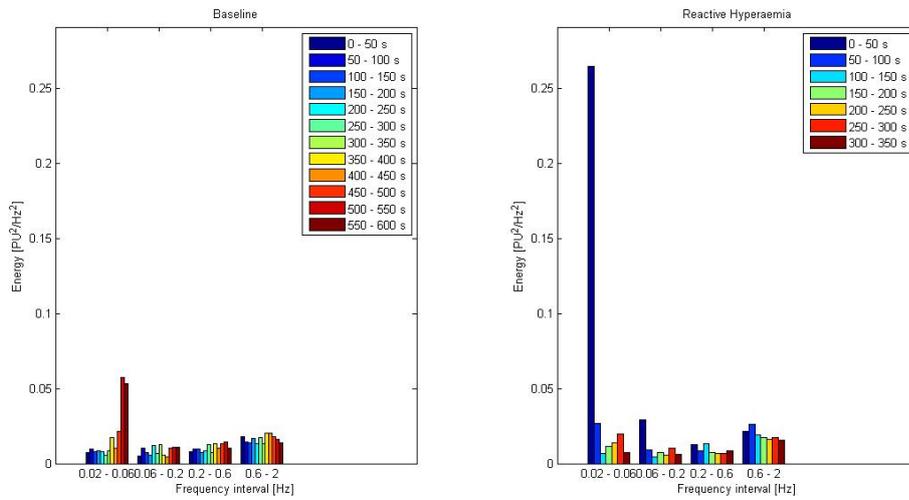


Figura 6.17: Paziente 1 dopo la terapia FREMS: grafico a barre della PA.

Paziente n°2

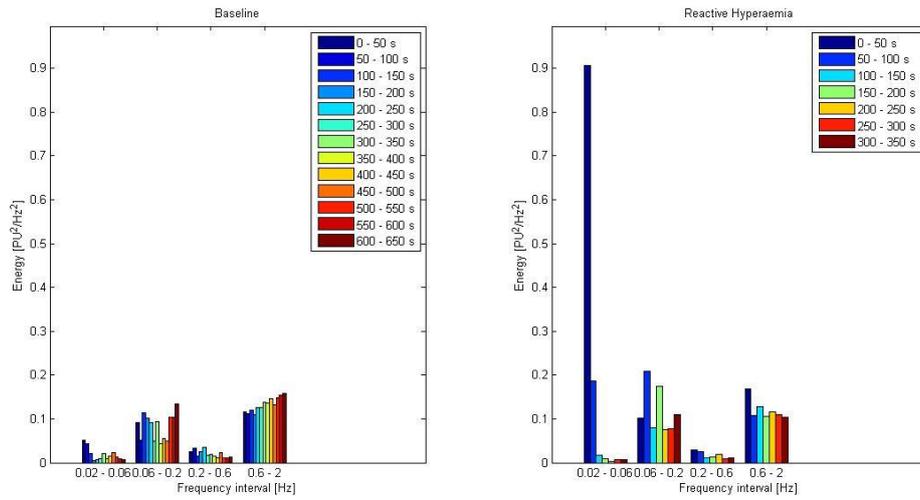


Figura 6.18: Paziente 2 prima della terapia FREMS: grafico a barre della PA.

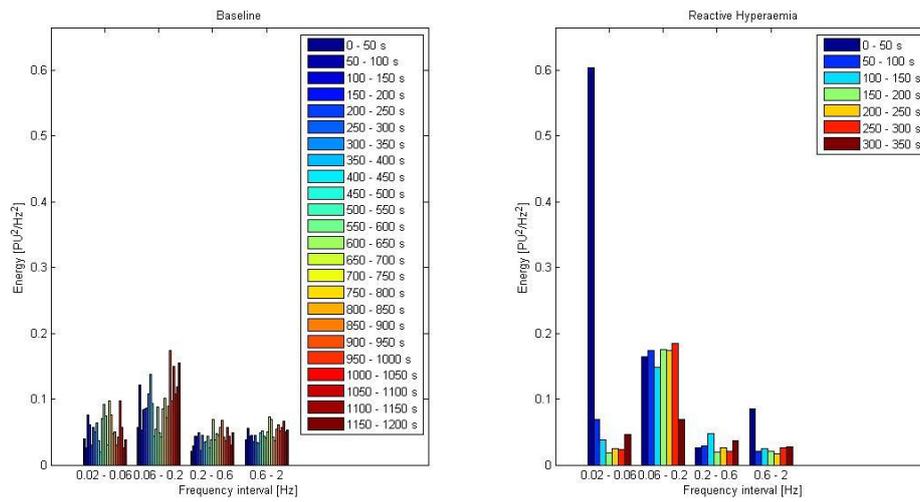


Figura 6.19: Paziente 2 dopo la terapia FREMS: grafico a barre della PA.

Paziente n°3

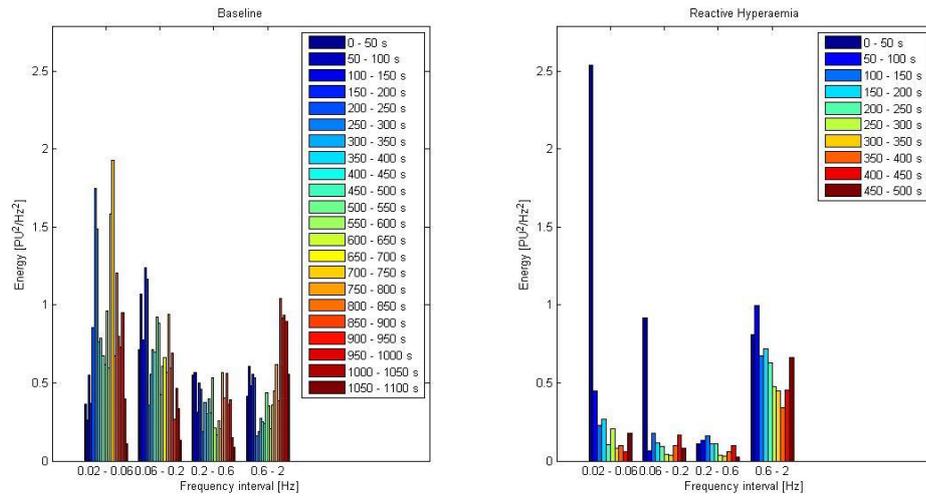


Figura 6.20: Paziente 3 prima della terapia FREMS: grafico a barre della PA.

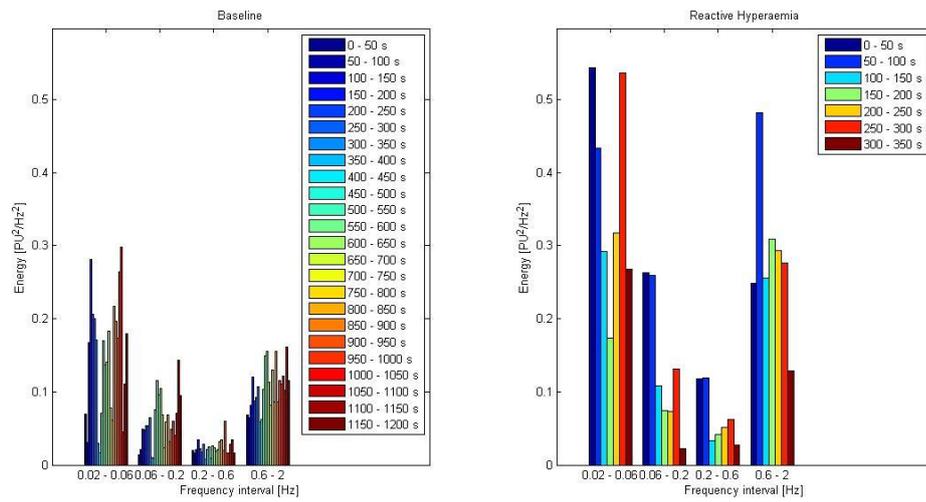


Figura 6.21: Paziente 3 dopo la terapia FREMS: grafico a barre della PA.

Paziente n°4

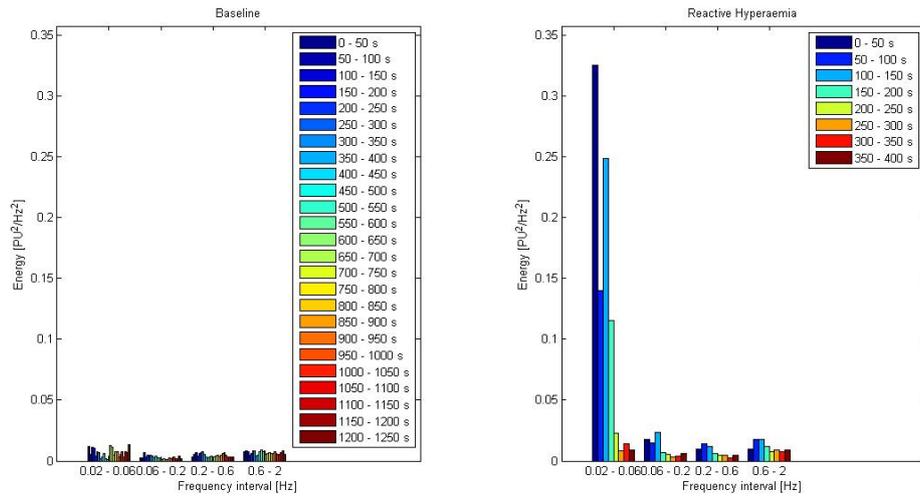


Figura 6.22: Paziente 4 prima della terapia FREMS: grafico a barre della PA.

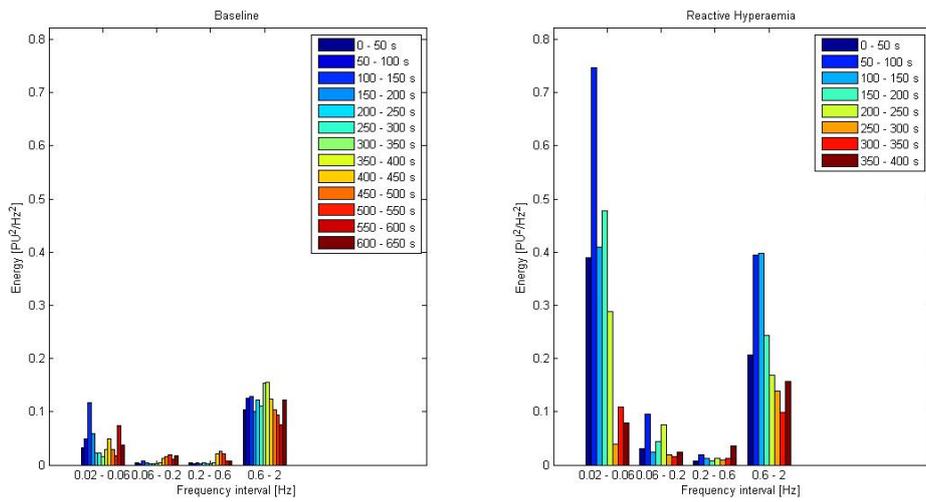


Figura 6.23: Paziente 4 dopo la terapia FREMS: grafico a barre della PA.

Paziente n°5

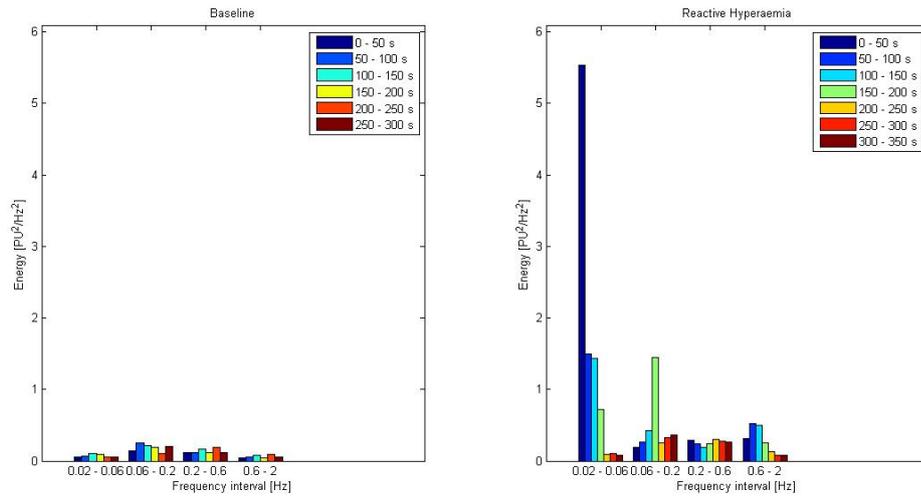


Figura 6.24: Paziente 5 prima della terapia FREMS: grafico a barre della PA.

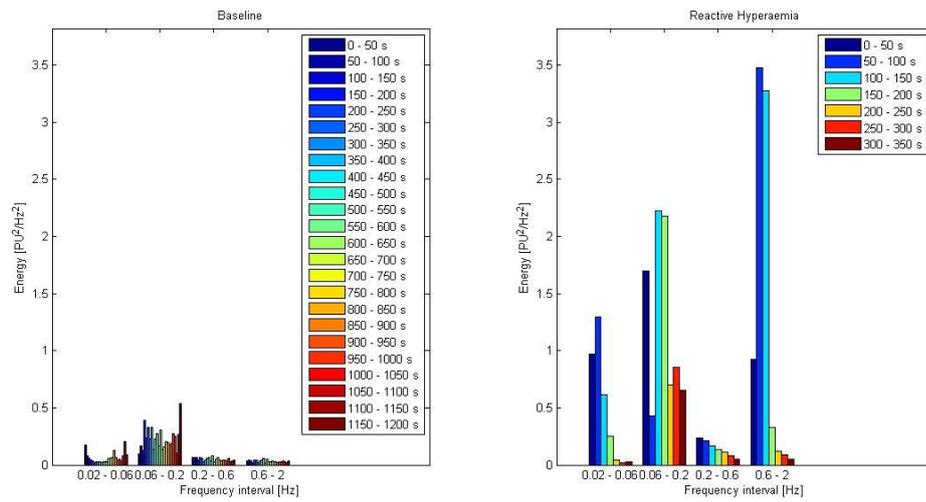


Figura 6.25: Paziente 5 dopo la terapia FREMS: grafico a barre della PA.

Dall'analisi dei grafici a barre delle potenze assolute si può osservare che, generalmente, quelle calcolate per le singole finestre nella fase di riposo sono più basse rispetto a quelle della fase di iperemia reattiva. Nella fase di iperemia reattiva, in tutti i pazienti analizzati, c'è un incremento delle potenze assolute di tutte le bande di frequenza che diminuisce al passare del tempo. In particolar modo, la banda di frequenze associata all'attività neurogena in prossimità del picco massimo presenta un incremento notevole rispetto alla fase a riposo e rispetto ai valori della fase di riassetamento della perfusione.

Questo tipo di analisi conferma l'utilità della prova PORH per studiare la risposta in seguito ad una sollecitazione delle attività che controllano la flowmotion e mostra che la banda associata all'attività neurogena subisce la maggiore variazione di potenza nel tempo durante questo tipo di prova funzionale.

6.3. Terza parte: Wavelet Entropy

Paziente n°1

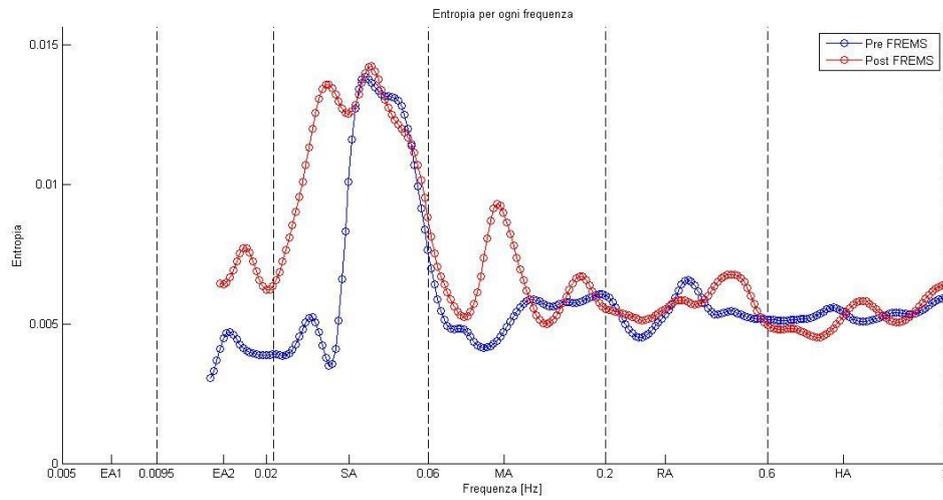


Figura 6.26: Paziente 1 confronto entropia Wavelet prima e dopo la terapia FREMS.

Paziente n°2

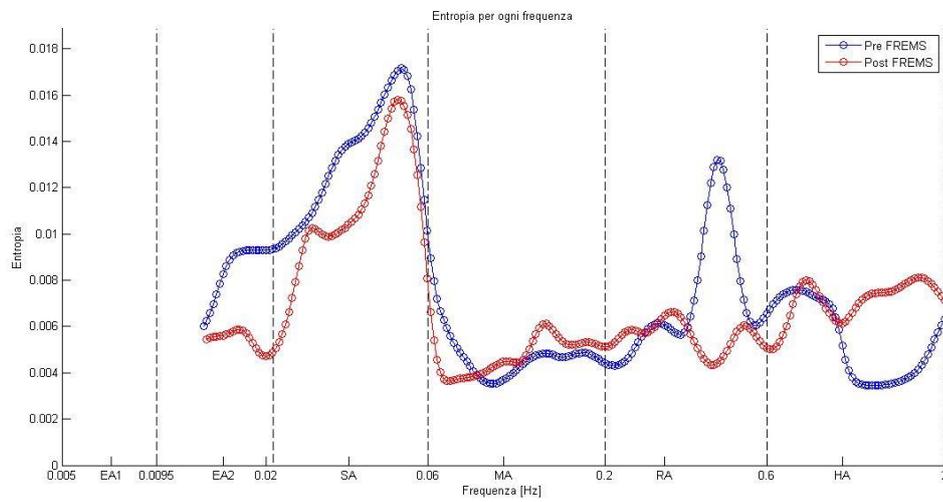


Figura 6.27: Paziente 2 confronto entropia Wavelet prima e dopo la terapia FREMS.

Paziente n°3

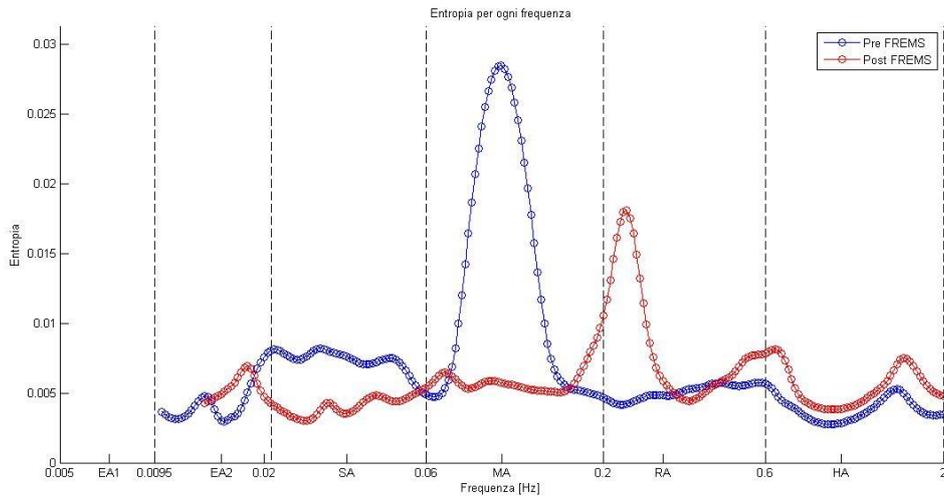


Figura 6.28: Paziente 3 confronto entropia Wavelet prima e dopo la terapia FREMS.

Paziente n°4

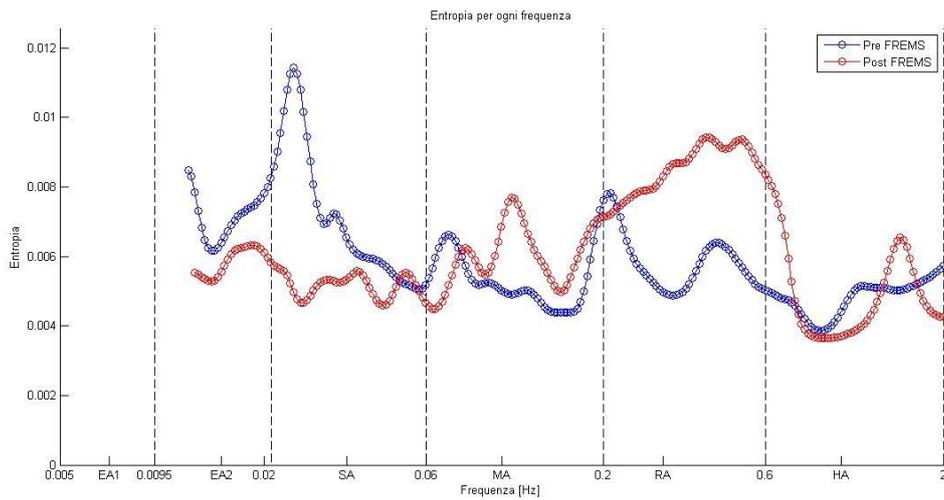


Figura 6.29: Paziente 4 confronto entropia Wavelet prima e dopo la terapia FREMS.

Paziente n°5

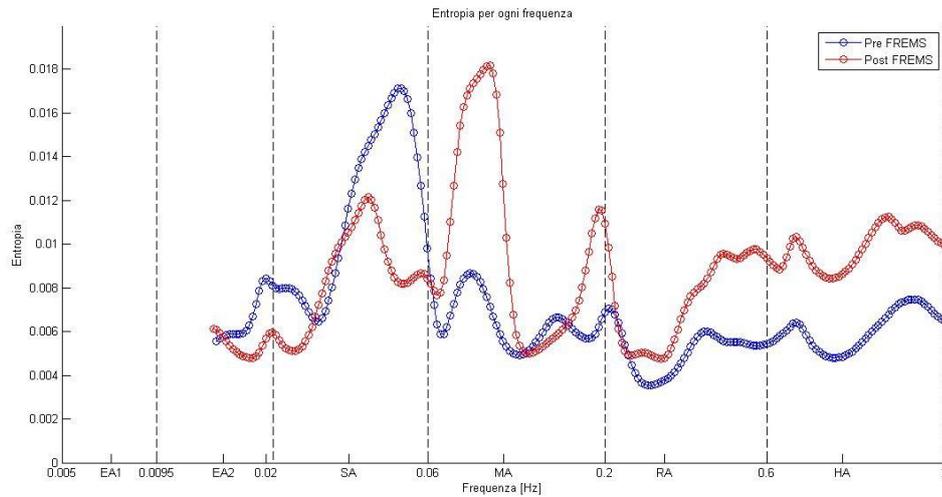


Figura 6.30: Paziente 5 confronto entropia Wavelet prima e dopo la terapia FREMS.

Valori medi

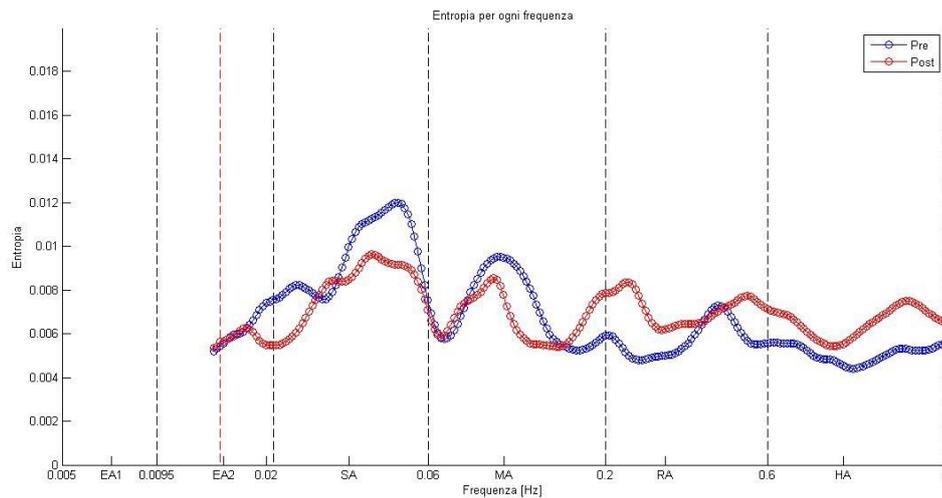


Figura 6.31: Confronto valori medi entropia Wavelet durante l'iperemia reattiva prima e dopo la terapia FREMS.

Dal confronto dei valori di entropia Wavelet ottenuti durante l'iperemia reattiva risulta che le frequenze associate all'attività neurogena e all'attività miogena hanno valori più elevati rispetto alle altre attività. Mediamente i valori di entropia nella banda dell'attività cardiaca e dell'attività respiratoria risultano più alti dopo l'applicazione della terapia FREMS, mentre i valori di entropia dell'attività miogena e dell'attività neurogena risultano più bassi dopo l'applicazione della terapia. I valori dell'attività endoteliale NO-dipendente rimangono quasi invariati.

Ricordando che a valori più grandi di WEn corrisponde una maggiore irregolarità della serie di campioni di una data frequenza, si può affermare che in seguito alla terapia FREMS i contributi correlati all'attività miogena e all'attività neurogena tendono ad essere più regolari nel tempo durante l'iperemia reattiva post ischemica.

7. Conclusioni

Il segnale acquisito dal flussimetro laser-Doppler permette di monitorare il livello di perfusione cutanea. Tale segnale è espresso in unità di misura arbitrarie (PU) e presenta un andamento oscillatorio, definito *flowmotion*, che varia da soggetto a soggetto. Tramite l'analisi in frequenza è possibile identificare le componenti oscillatorie presenti nel segnale acquisito e, come viene suggerito dalla letteratura scientifica, assegnare a sei diversi intervalli di frequenza le attività di una determinata struttura del sistema cardiovascolare: l'attività cardiaca tra 0.6 e 2 Hz, l'attività respiratoria tra 0.145 e 0.6 Hz, l'attività miogena tra 0.052 e 0.145 Hz, l'attività neurogena tra 0.021 e 0.052 Hz, l'attività endoteliale NO-dipendente tra 0.0095 e 0.021 Hz e infine l'attività endoteliale NO-indipendente tra 0.005 e 0.0095 Hz.

È stato mostrato che l'analisi Wavelet è adatta per l'elaborazione dei segnali di perfusione cutanea permettendo di localizzare temporalmente le componenti in frequenze del segnale analizzato. Sono stati mostrati i limiti della trasformata Wavelet applicata a segnali reali e sono presentati i vari passi per la pre-elaborazione del segnale: riduzione degli artefatti da movimento, eliminazione dei trend, filtraggio del segnale e infine il *padding* predittivo per ridurre gli effetti di bordo nel calcolo dei coefficienti della trasformata Wavelet. Sono stati successivamente calcolati gli spettri di potenza mediati nel tempo, ottenuti dalla trasformata Wavelet. Per osservare l'evoluzione nel tempo dei contributi in frequenze, sono stati calcolati gli spettri di potenza mediati nel tempo su finestre brevi del segnale LD. Dagli spettri mediati nel tempo sono state calcolate le potenze assolute e relative e le ampiezza assolute e relative per i sei intervalli di frequenza ed è stata fatta una loro analisi statistica. Infine è stata calcolata la Wavelet Entropy per studiare la complessità dei contributi di ogni banda di frequenze.

Sono stati analizzati pazienti affetti da arteriopatia periferica occlusiva sottoposti al test PORH che permette di valutare l'adattamento della microcircolazione cutanea in risposta ad un evento ischemico. Confrontando la perfusione cutanea nella fase di iperemia reattiva con la fase a riposo, è stato possibile identificare le attività cardiovascolari maggiormente sollecitate.

Il test PORH ha permesso di valutare l'efficacia del trattamento FREMS, confrontando i segnali di perfusione acquisiti prima e dopo il trattamento FREMS. Dall'analisi Wavelet si è potuto osservare un miglioramento dell'attività neurogena, che permette di ipotizzare che la stimolazione elettrica FREMS migliori la risposta dell'attività neurogena. Dall'analisi della potenza assoluta su finestre di segnale, si è potuto osservare che nella fase iniziale dell'iperemia reattiva il contributo dell'attività neurogena è molto maggiore rispetto alle altre attività. L'analisi della Wavelet Entropy ha mostrato una diminuzione dell'entropia nelle bande di frequenza neurogena e miogena, evidenziando una maggiore regolarità del contributo di tali attività nel tempo.

In uno studio futuro sarà interessante approfondire come i contributi delle varie attività evolvono nel tempo, per capire meglio la fisiopatologia del microcircolo. Sarà inoltre interessante estendere lo studio degli effetti del trattamento FREMS ad un numero maggiore di pazienti, per incrementare la significatività statistica dei risultati ottenuti. Inoltre sarà utile aumentare la durata delle acquisizioni in modo da poter analizzare anche le attività associate alle strutture vascolari caratterizzate dalle oscillazioni più lente.

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] J. K. Li, “Dynamics of the Vascular System”, World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., Feb 2004.
- [4] A. Stefanovska and P. Kroelj, “Correlation integral and frequency analysis of cardiovascular functions”, *Open Systems and Information Dynamics archive*, 1997, 4.
- [5] 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.
- [6] P. Kvandal, S. A. Landsverk, A. Bernjak, A. Stefanovska, H. D. Kvernmo, and K. A. Kirkebøen, “Low-frequency oscillations of the laser doppler perfusion signal in human skin”, *Microvascular Research*, 2006, 72: 120 – 127.
- [7] 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.
- [8] H. D. Kvernmo, A. Stefanovska, K. A. Kirkebøen, and K. Kvernebo, “Oscillations in the human cutaneous blood perfusion signal modified by endothelium-dependent and endothelium-independent vasodilators”, *Microvascular Research*, 1999, 57: 298 – 309.
- [9] R. Fontaine, M. Kim, R. Kieny, “Die chirurgische Behandlung der peripheren Durchblutungsstörungen”, “(Surgical treatment of peripheral circulation disorders)”, *Helvetica Chirurgica Acta*, vol. 21, 5/6, 1954, pp. 499–533.

- [10] E. Selvin and T. P. Erlinger, "Prevalence of and risk factors for peripheral arterial disease in the United States: Results from the national health and nutrition examination survey, 1999-2000," *Circulation*, 2004, 110:738-743.
- [11] C. M. Choi and R. G. Bennett, "Laser dopplers to determine cutaneous blood flow", *Dermatol Surg*, 2003, 29.
- [12] M. F. Swiontkowski, "Laser Doppler Flowmetry—Development and Clinical Application." *The Iowa orthopaedic journal*, 1991, 11: 119-126.
- [13] H. Albrecht, N. Damaschke, M. Borys, and C. Tropea, "Laser Doppler and Phase Doppler Measurement Techniques", Springer-Verlag, 1 ed., Dec 2002.
- [14] D. Halliday, R. Resnick, and K. S. Kraner, "Fisica 2", CEA, 3 ed., Jun 2004.
- [15] J. G. Webster, "Medical Instrumentation. Application and Design", John Wiley and Sons, Inc, 5 ed., Dec 2010.
- [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] H. Albrecht, N. Damaschke, M. Borys, and C. Tropea, "Laser Doppler and Phase Doppler Measurement Techniques", Springer-Verlag, 1 ed., Dec 2002.
- [18] G. Cariolaro, G. Pierobon, and G. Calvagno, "Segnali e sistemi", McGraw-Hill, Gen 2005.
- [19] S. Qian and D. Chen, "Joint Time-Frequency Analysis, Methods and Applications", Academic Press, Dec 2011.
- [20] S. Mallat, "A Wavelet tour of signal processing", Academic Press, 3 ed., Dec 2008.
- [21] M. Bracic and A. Stefanovska, "Wavelet-based analysis of human blood-flow dynamics", *Bulletin of Mathematical Biology*, 1998, 60: 919 – 935.
- [22] P. Kvandal, S. A. Landsverk, A. Bernjak, A. Stefanovska, H. D. Kvernmo, and K. A. Kirkebøen, "Low-frequency oscillations of the laser doppler perfusion signal in human skin", *Microvascular Research*, 2006, 72: 120 – 127.

- [23] H. D. Kvernmo, A. Stefanovska, K. A. Kirkebøen, and K. Kvernebo, “Oscillations in the human cutaneous blood perfusion signal modified by endothelium-dependent and endothelium-independent vasodilators”, *Microvascular Research*, 1999, 57: 298 – 309.
- [24] A. Stefanovska, M. Bracic, and H. D. Kvernmo, “Wavelet analysis of oscillations in the peripheral blood circulation measured by laser doppler technique”, *IEEE Transaction on Biomedical Engineering*, 1999, 46: 1230 – 1239.
- [25] 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.
- [26] JL. Cracowski, CT. Minson, M. Salvat-Melis, JR. Halliwill, “Methodological issues in the assessment of skin microvascular endothelial function in humans”, *Trends Pharmacol Sci*, 2006, 27: 503–508.
- [27] I. V. Tikhonova, A. V. Tankanag, and N. K. Chemeris, “Time–amplitude analysis of skin blood flow oscillations during the post-occlusive reactive hyperemia in human”, *Microvascular Research*, 2010, 80: 58–649.
- [28] M. Rossi, S. Bertuglia, M. Varanini, A. Giusti, G. Santoro, and A. Carpi, “Generalised wavelet analysis of cutaneous flowmotion during post-occlusive reactive hyperaemia in patients with peripheral arterial obstructive disease”, *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 2005, 59: 233–239.
- [29] M. Roustit, JL. Cracowski, “Non-invasive assessment of skin microvascular function in humans: an insight into methods”, *Microcirculation*, 2012, 19(1):47-64.
- [30] V. Ticcinelli, A. Bagno, and 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
- [31] P. Stoica, R. L. Moses, “Spectral analysis of signals”, Pearson/Prentice Hall Upper Saddle River, NJ, 2005.
- [32] G. Schwarz, “Estimating the dimension of a model”, *Ann. Stat.* 6, 1978, 461–464.

[33] M. Bracic and A. Stefanovska, “Wavelet-based Analysis of Human Blood-flow Dynamics”, *Bulletin of Mathematical Biology*, 1998, 60, 919–935

[34] V. E Papaioannou, I. G Chouvarda, N. K Maglaveras and I. A Pneumatikos, “Temperature variability analysis using wavelets and multiscale entropy in patients with systemic inflammatory response syndrome, sepsis, and septic shock”, *Critical Care* 2012, 16:R51