

Università degli Studi di Padova

Scuola di Ingegneria

Dipartimento di Ingegneria dell'Informazione

Dipartimento di Ingegneria Industriale

Corso di Laurea Specialistica in Bioingegneria

Tesi di Laurea

Analisi della perfusione cutanea dopo stimolazione locale ad alta temperatura

Relatore: Prof. Andrea Bagno

Correlatore: Prof. Romeo Costanzo Martini

Laureando: Filippo Fiorin

15 Ottobre 2013

A.A. 2012-2013

Sommario

L'analisi della perfusione cutanea può essere realizzata mediante acquisizione del segnale di flussimetria laser Doppler (LDF). Tale segnale è caratterizzato da oscillazioni periodiche, chiamate *flowmotion*, la cui analisi spettrale permette di identificare sei intervalli di frequenze corrispondenti ad altrettante attività vascolari: endoteliale (dipendente e non dipendente dall'ossido nitrico), neurogena, miogena, respiratoria e cardiaca.

La stimolazione termica locale, inducendo vasodilatazione, è causa di significative variazioni nella perfusione cutanea, dalle quali si può valutare il grado di severità di alcune malattie tra le quali il diabete e, più in generale, le vasculopatie.

La presente tesi ha per obiettivo lo studio dell'influenza della stimolazione termica cutanea locale su ogni singola attività vascolare, tramite l'analisi in frequenza del segnale di perfusione cutanea. Si sono osservati 22 pazienti affetti da arteriopatie, suddivisi in 3 gruppi in base al valore di pressione transcutanea di ossigeno.

Nel Capitolo 1 vengono presentati i concetti di *vasomotion* e *flowmotion*, oltre alle ragioni dell'utilizzo della stimolazione termica nella pratica clinica. Nel Capitolo 2 vengono esposti i principi alla base della flussimetria laser Doppler. Nel Capitolo 3 si espongono le basi teoriche dell'analisi in frequenza, evidenziando come la trasformata wavelet sia lo strumento più adatto per gli scopi di questo lavoro.

Nel Capitolo 4 vengono illustrate le tecniche di analisi e il codice implementato per la parte sperimentale, e conseguentemente nel Capitolo 5 sono presentati i risultati ottenuti. Infine, nel Capitolo 6 vengono tracciate le conclusioni e fornite alcune indicazioni per proseguire l'attività di ricerca.

Indice

Sommario

Capitolo 1	Introduzione	1
1.1	La circolazione sistemica	1
1.2	La circolazione capillare	2
	1.2.1 I vasi	3
	1.2.2 Lo scambio capillare	5
1.3	Il sangue	6
	1.3.1 Proprietà reologiche	6
	1.3.2 Correlazione tra pressione, flusso e resistenza	7
	1.3.3 Il flusso sanguigno	8
	1.3.4 La resistenza vascolare	9
	1.3.5 La pressione sanguigna	9
1.4	Vasomotion e flowmotion: aspetti generali	10
	1.4.1 Vasomotion	11
	1.4.2 Flowmotion	15
1.5	Il riscaldamento locale	16
1.6	Obiettivi dello studio	17
Capitolo 2	La Flussimetria Laser Doppler	19
2.1	L'effetto Doppler	20
	2.1.1 Cenni storici	20
	2.1.2 Spiegazione matematica	21
2.2	Il flussimetro laser Doppler	22
	2.2.1 Principi di funzionamento	23
	2.2.2 Limiti della flussimetria laser doppler	25
Capitolo 3	L'analisi in frequenza	27
3.1	La trasformata di Fourier	27
	3.1.1 Equazione della trasformata	28
	3.1.2 Limiti della FT	30
3.2	La trasformata di Fourier Short Time	31
	3.2.1 Limiti della STFT	33
3.3	La trasformata Wavelet	34
	3.3.1 La risoluzione tempo-frequenza	34
	3.3.2 Equazione della trasformata	35
	3.3.3 La mother wavelet	36

	3.3.4	La scala	37
	3.3.5	Lo scalogramma	39
Capitolo 4		Lavoro Sperimentale	43
	4.1	I pazienti	44
	4.2	Caratteristiche dello strumento	44
	4.3	Durata dell'acquisizione	46
	4.4	Artefatti da movimento	46
	4.5	Il codice	47
	4.5.1	Struttura principale del programma	47
	4.5.2	Inserimento dei dati	47
	4.5.3	Visualizzazione dei dati	48
	4.5.4	Rimozione degli artefatti da movimento	48
	4.5.5	Divisione del segnale LDF in tre segmenti	52
	4.5.6	Applicazione della trasformata wavelet	52
	4.5.7	Calcolo di ampiezza e potenza	54
	4.5.8	Calcolo di ampiezza e potenza relative e perfusione media	55
	4.5.9	Divisione in gruppi ed analisi statistica	56
	4.6	Riassunto dei dati salvati e dei grafici prodotti	57
Capitolo 5		Risultati e discussione	59
	5.1	Gruppo A: Pazienti con $tcpO_2 < 30$	60
	5.2	Gruppo B: Pazienti con $30 < tcpO_2 < 50$	72
	5.3	Gruppo C: Pazienti con $tcpO_2 > 50$	88
	5.4	Dati riassuntivi	104
	5.4.1	Perfusione cutanea e pressione transcutanea di ossigeno	104
	5.4.2	Ampiezza e potenza relative per la banda cardiaca	106
	5.4.3	Ampiezza e potenza relative per la banda miogena	108
	5.4.4	Ampiezza e potenza relative per la banda neurogena	110
	5.4.5	Risultati del test statistico	112
	5.4.6	Distribuzione dei dati all'interno dei singoli gruppi	115
	5.5	Discussione	122
Capitolo 6		Conclusioni	125
Appendice		Il codice delle principali funzioni Matlab usate	127
Bibliografia			141

CAPITOLO 1

Introduzione

Con il termine "perfusione cutanea" si indica la quantità di sangue che passa attraverso il letto capillare di un tessuto nell'unità di tempo.

Il mantenimento di un'adeguata perfusione nei tessuti è il risultato di meccanismi di controllo che operano sia a livello sistemico che a livello locale. Essi sono attuati da un unico evento meccanico: la contrazione e il rilassamento del tessuto muscolare liscio presente nello strato centrale delle pareti vascolari [1]. Questo tipo di attuazione, dalle caratteristiche fortemente dinamiche, è la causa dell'andamento oscillatorio del flusso del microcircolo.

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

Di particolare interesse, nel caso di pazienti affetti da arteriopatie, è misurare la variazione del segnale di perfusione dopo aver eseguito una stimolazione locale di tipo termico sul sito di acquisizione del segnale, perché questo permette di valutare il grado di criticità della malattia.

Uno strumento utile ad analizzare la perfusione cutanea è la trasformata wavelet, grazie alla quale è possibile ricavare dal segnale LDF il corrispondente spettro di frequenza. Secondo la letteratura scientifica, esistono specifici intervalli di frequenza all'interno dei quali si possono misurare il contributo e l'influenza sul microcircolo di sei diverse attività vascolari: cardiaca, respiratoria, miogena, simpatica, endoteliale dipendente e non dipendente dal rilascio di ossido nitrico.

1.1 LA CIRCOLAZIONE SISTEMICA¹

La funzione della circolazione è quella di provvedere alle esigenze dei tessuti fornendo le sostanze nutritive e rimuovendo i prodotti di rifiuto, trasportando gli ormoni da una parte all'altra dell'organismo e consentendo, in generale, il mantenimento di un ambiente ottimale per la sopravvivenza ed il funzionamento cellulare [2].

La circolazione sistemica (Figura 1.1) è costituita da un sistema chiuso di vasi collegati per lo più in serie. Le differenze anatomiche tra le pareti venose e arteriose rende ragione delle diverse funzioni dei due distretti vascolari: il sangue ricco di ossigeno e nutrienti viene trasportato attraverso la rete delle arterie, per cui classicamente le arterie sono descritte come vasi di resistenza, mentre le vene trasportano il sangue carico di anidride carbonica e prodotti di scarto, riportandolo al cuore.

Tra il sistema venoso e quello arterioso si frappongono i capillari che sono il distretto circolatorio più importante poiché solo attraverso la loro parete possono avvenire gli scambi tra tessuti e sangue. L'insieme di questi, delle arteriole e delle venule (di dimensione al di sotto dei 100 μm) costituisce il microcircolo.

1. Le nozioni di fisiologia e anatomia presenti in questo capitolo sono tratte da Arthur C. Guyton, John E. Hall, *Textbook of medical physiology*, Saunders, 12th ed., 2010

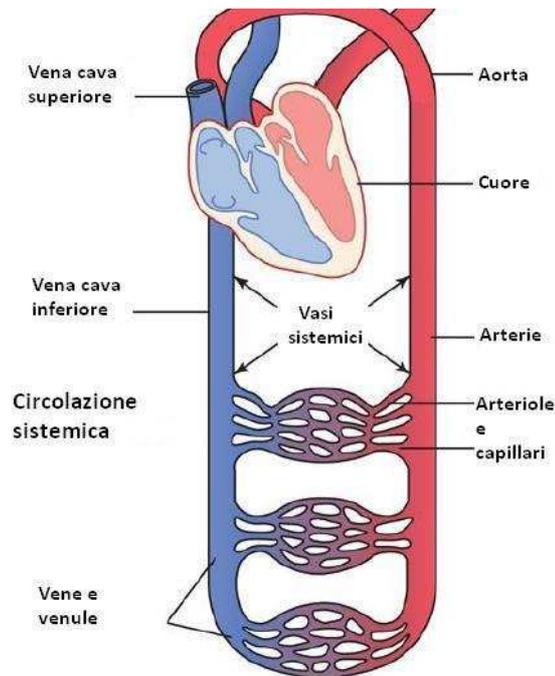


Figura 1.1. Diagramma del sistema circolatorio.

1.2 LA CIRCOLAZIONE CAPILLARE

Nel microcircolo (Figura 1.2) si realizza la funzione più importante della circolazione che consiste nel trasportare i nutrienti ai tessuti e nel rimuovere i cataboliti. Circa 10 miliardi di capillari, con una superficie totale di 500-700 mq, compiono questa funzione in tutto l'organismo ed è raro che una qualsiasi cellula dell'organismo sia distante da un capillare più di 20-30 μm . La buona funzionalità dei tessuti dipende direttamente dall'efficacia di questo processo. Un insufficiente apporto di sostanze nutritive, così come un'inefficace rimozione dei prodotti di scarto del metabolismo, destabilizza le funzioni cellulari, fino a causare la morte della cellula e la necrosi tissutale [2].

L'insieme dei meccanismi che controllano il microcircolo fa sì che la pressione trasmessa al sangue dal cuore sia distribuita in modo che, a livello dei capillari, essa equivalga alla pressione colloidale osmotica del plasma: solo in questa situazione di equilibrio, infatti, lo scambio di fluidi tra i compartimenti vascolare e interstiziale avviene in modo bilanciato. Gli stessi processi garantiscono inoltre che il salto di pressione tra arteriole e venule costituisca per il flusso sanguigno una forza motrice

sufficiente a garantire l'emodinamica microcircolatoria e quindi le necessità metaboliche dei tessuti irrorati.

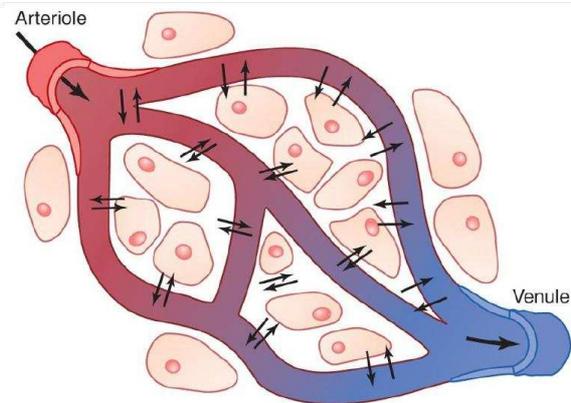


Figura 1.2. Il microcircolo: particolare degli scambi capillari con le cellule.

1.2.1 I VASI

Il microcircolo è formato dalle arteriole, dalle venule e dai capillari (Figura 1.3). Un'unità micro circolatoria è un insieme di vasi che provengono da una singola arteriola. Nel viso e nelle dita spesso si diramano in anastomosi artero-venose, che bypassano il letto capillare costituendo canali diretti tra arteriole e venule, ma che possono anche essere chiusi completamente. In alcuni tessuti, invece, le arteriole si diramano in metarteriole, nelle quali si trovano gli sfinteri precapillari di fibre muscolari lisce, sprovviste di controllo nervoso. Esse proseguono in ampi capillari chiamati "canali preferenziali": questi portano il sangue direttamente nelle vene.

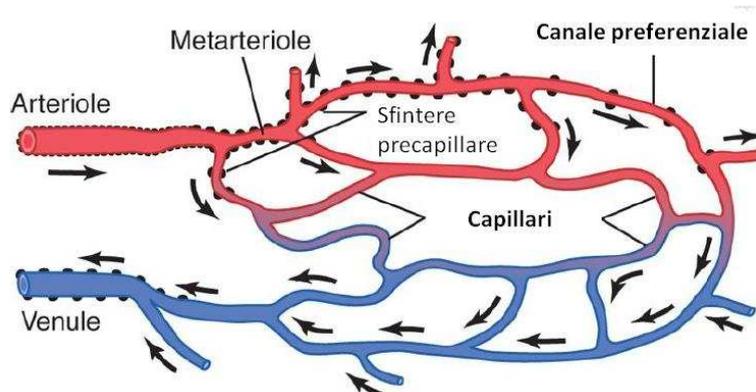


Figura 1.3. Il microcircolo, suddiviso tra arteriole, venule e capillari.

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

- tonaca intima: costituita da cellule endoteliali a contatto con il flusso sanguigno. Le cellule endoteliali fungono da membrana separatrice e, contenendo actina e miosina, sono capaci di moderate risposte contrattili;
- tonaca media: è costituita da strati di cellule muscolari lisce. La loro contrazione produce un restringimento del vaso (vasocostrizione) mentre il loro

rilassamento produce un allargamento del lume (vasodilatazione). Nelle arteriole questo strato è più sviluppato rispetto alle venule, mentre è del tutto assente nei capillari;

- tonaca avventizia: costituita da tessuto connettivo con funzione protettiva, nei quali sono presenti le terminazioni del sistema simpatico.

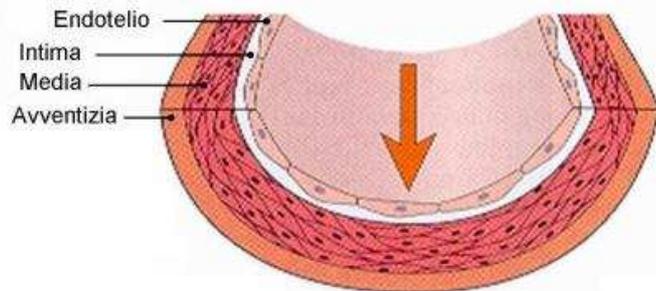


Figura 1.4. Particolare delle tre tonache costituenti la parete di arteriole e venule.

I CAPILLARI

È possibile classificare i capillari a seconda della loro struttura e della loro localizzazione anatomica (Figura 1.5):

- capillari continui, presenti nei muscoli, nel tessuto nervoso e connettivo;
- capillari fenestrati, presenti nel midollo osseo, nei reni e nell'intestino;
- capillari sinusoidi, presenti nel fegato e milza.

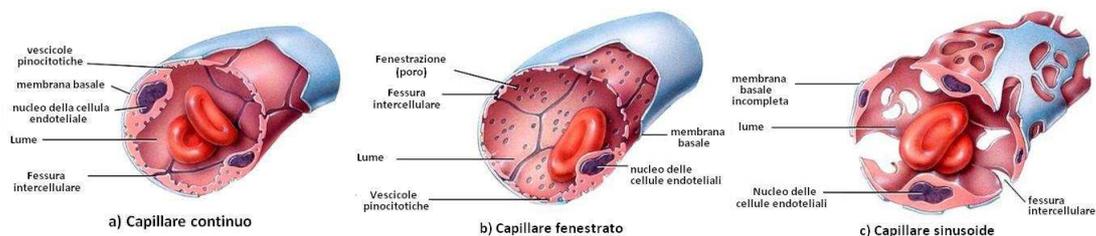


Figura 1.5. I tre diversi tipi di capillari: continuo, fenestrato e sinusoidale.

Le pareti non hanno fibre muscolari, ma sono costituite da un singolo strato di cellule endoteliali piatte, che poggiano sulla membrana basale. Il calibro dei capillari (anche 5 μm) è di poco inferiore a quello del singolo eritrocita (6-8 μm). I globuli rossi quindi passano uno alla volta e vengono deformati. Ad alte velocità procedono separati, mentre a basse velocità tendono ad avvicinarsi formando dei lunghi tratti solo di eritrociti (detti *rouleaux*) e lunghi tratti solo con plasma. Il plasma tra due eritrociti procede a una velocità doppia rispetto al globulo rosso, poiché la sua viscosità è inferiore: questo causa moti convettivi nelle porzioni di plasma posti tra due eritrociti. Il tutto facilita gli scambi di O_2 e soluti tra il capillare e il tessuto.

1.2.2 LO SCAMBIO CAPILLARE

Sono diversi i meccanismi con i quali si verifica lo scambio di sostanze tra sangue e liquido interstiziale dei tessuti (Figura 1.6). Gran parte delle sostanze passa attraverso la membrana endoteliale delle cellule: sostanze liposolubili e molecole di piccole dimensioni la attraversano per diffusione, spinte dalla differenza di concentrazione che esiste tra i due compartimenti separati dalla membrana. Nel caso in cui lo scambio debba avvenire contro gradiente di concentrazione, ioni e piccole molecole polari possono attraversare le membrane all'interno di vescicole, per endocitosi, esocitosi oppure attraverso canali intercellulari. Tutti i capillari sono permeabili all'ossigeno, all'anidride carbonica, al glucosio e a ioni come il Na^+ e Cl^- . Le concentrazioni di tutte queste sostanze nel liquido interstiziale sono quindi pari a quelle del plasma.

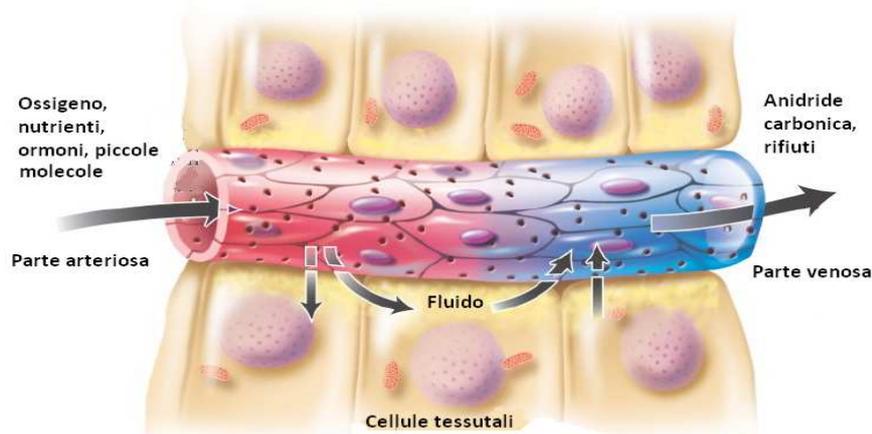


Figura 1.6. Lo scambio capillare

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

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

dell'acqua, e dei soluti in essa disciolti, dai capillari ai tessuti sono quindi quelle idrostatiche del sangue e del liquido interstiziale e quelle osmotiche.

L'equazione di Starling esprime la filtrazione netta J_v [ml/min] in funzione di sei parametri:

$$J_v = K_f([P_c - P_i] - \sigma[\pi_c - \pi_i]) \quad (1.1)$$

dove:

- P_c è la pressione sanguigna che spinge i fluidi contro le pareti, facilitando lo scambio in questa direzione;
- P_i è la pressione idrostatica del tessuto. Questa grandezza è variabile a secondo del distretto anatomico considerato;
- π_i e π_c sono le pressioni colloidali osmotiche interstiziali e capillari;
- K_f è il coefficiente di filtrazione, che tiene conto delle caratteristiche dei vasi.

1.3 IL SANGUE

Il sangue può essere definito come una sospensione di particelle solide (che occupano normalmente circa il 45% del volume disponibile) in un mezzo fluido detto plasma, a sua volta definibile come soluzione colloidale prevalentemente acquosa di particelle per lo più proteiche. Nel plasma si trovano disciolti sali, zuccheri e proteine, mentre la parte corpuscolare è formata principalmente da eritrociti (globuli rossi) e, in parte molto minore, da leucociti (globuli bianchi) e trombociti (piastrine).

I globuli rossi sono cellule prive di nucleo aventi forma di disco biconcavo dal diametro di 7-8 μm . Esso sono costituiti al 35% circa da emoglobina, una proteina che è in grado di legare reversibilmente ossigeno ed anidride carbonica, e che conferisce la tipica colorazione rossa. La percentuale del volume sanguigno occupata dalla componente eritrocitaria si chiama ematocrito: il suo valore normale si situa tra 36,1 e 44,3% per le donne, mentre normalmente per il sesso maschile è più alto (40,7-50,3%); la percentuale restante è occupata dalla frazione liquida, il plasma, leucociti e piastrine.

1.3.1 PROPRIETA' REOLOGICHE

L'equazione che regola le relazione fra la tensione tangenziale τ e velocità di deformazione (cioè di scorrimento del fluido) γ' é la seguente:

$$\tau = \eta \cdot \gamma' \quad (1.2)$$

dove η è la viscosità del fluido.

In un materiale a comportamento ideale newtoniano, questa relazione è lineare, quindi espressa da una retta avente coefficiente angolare pari a η . Il plasma è un fluido

dal comportamento newtoniano, mentre il sangue in generale non può essere considerato un fluido né omogeneo né di tipo newtoniano. In particolare non può essere trattato come omogeneo quando scorre nei vasi della rete capillare, il cui diametro medio è dello stesso ordine di grandezza del diametro e della distanza tra i globuli rossi. Solo quando il diametro del vaso sanguigno supera grosso modo i 100 μm , il sangue può ragionevolmente essere ritenuto un fluido omogeneo. Il suo comportamento reologico, a causa della particolare composizione, è alquanto complesso per cui varia al variare della tipologia dei vasi in cui scorre. Misure sperimentali in vitro hanno mostrato che in generale il comportamento del sangue è assimilabile a quello di un fluido plastico di Bingham. Tuttavia quando il flusso sanguigno è caratterizzato da velocità di deformazione maggiori di circa 60-100 s^{-1} la risposta reologica risulta sostanzialmente newtoniana [3]. Nel distretto arterioso la velocità di deformazione supera usualmente il predetto valore di soglia, ed il sangue viene dunque ritenuto a comportamento newtoniano. Anche nella microcircolazione capillare la velocità di deformazione raggiunge valori elevati, ma gli effetti della presenza dei globuli rossi sulla risposta allo scorrimento non possono essere trascurati. Nella rete venosa, infine, soprattutto nelle grandi vene degli arti inferiori, il valore di soglia della velocità di deformazione può non essere superato, per cui il sangue ha un comportamento reologico di tipo pseudo-plastico, eventualmente dipendente anche dalla durata della sollecitazione tangenziale.

1.3.2 CORRELAZIONE TRA PRESSIONE, FLUSSO E RESISTENZA

Il flusso di sangue attraverso i vasi sanguigni è determinato da due fattori:

- il gradiente di pressione, assimilabile alla differenza di pressione del sangue tra le due capi del vaso, che è la forza che spinge il sangue al suo interno;
- la resistenza vascolare, ovvero la forza che si oppone al sangue di scorrere nei vasi sanguigni. La resistenza è il risultato della frizione tra il sangue che fluisce e l'endotelio intravascolare lungo tutto la direzione del moto.

Il flusso attraverso il vaso può essere calcolato dalla seguente formula, che è un adattamento della legge di Ohm per le tensioni, noto come legge di Darcy (Figura 1.7):

$$Q = \frac{\Delta P}{R} \quad (1.3)$$

dove Q è il flusso di sangue, ΔP è la differenza di pressione ($P_1 - P_2$) tra le estremità del vaso, e R è la resistenza. Questa formula afferma che il flusso è direttamente proporzionale alla differenza di pressione e inversamente proporzionale alla resistenza.

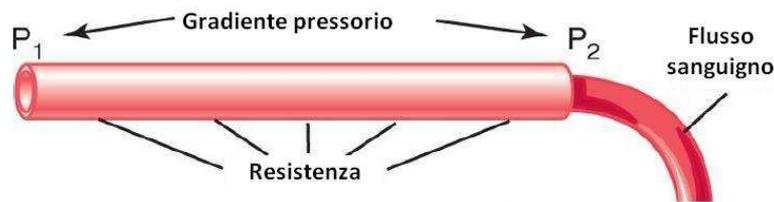


Figura 1.7. Schematizzazione di un tratto di vaso, dove sono indicate le variabili fisiche utilizzate dalla legge di Darcy

1.3.3 IL FLUSSO SANGUIGNO

Con il termine "flusso sanguigno" si indica la quantità di sangue che passa attraverso una certa sezione in un certo periodo di tempo all'interno di un vaso. Il flusso totale nella circolazione intera di una persona adulta a riposo è di circa 5000 ml/min. Questo valore viene chiamato "gittata cardiaca" in quanto è la quantità di sangue pompata nell'aorta dal cuore in un minuto.

MOTO LAMINARE

Quando il sangue fluisce con una velocità elevata attraverso un lungo vaso dalle pareti lisce, le linee di flusso sono rettilinee e mantengono la stessa distanza dalle pareti. Questo tipo di condizione viene chiamato "moto laminare" ed è l'opposto del "moto turbolento", nel quale il sangue scorre in tutte le direzioni del vaso con linee di flusso non parallele all'asse.

In presenza di moto laminare, la velocità del flusso nel centro del vaso sanguigno è maggiore rispetto alle zone più vicine alle pareti (Figura 1.8). Questo è dovuto alle molecole del sangue che toccando le pareti vascolari si muovono lentamente a causa dell'adesione. Il successivo strato di molecole scivola sopra queste, il terzo strato sopra il secondo e così via, finché lo strato più centrale può muoversi più rapidamente rispetto a tutti gli altri per cui si genera il tipico profilo parabolico della velocità del flusso sanguigno.

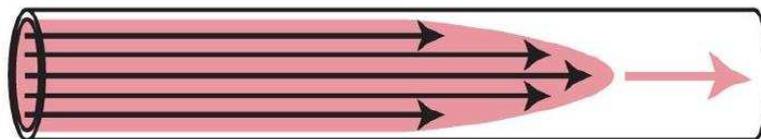


Figura 1.8. Rappresentazione schematica del profilo di velocità parabolico all'interno dei vasi, in condizione di moto laminare.

MOTO TURBOLENTO

Quando la velocità del flusso sanguigno diventa troppo elevata (in genere quando passa attraverso un'ostruzione in un vaso, oppure quando si presenta una curva secca o una superficie ruvida), il flusso passa ad un moto di tipo turbolento. Le linee di flusso diventano disordinate e non più parallele all'asse del vaso, compaiono dei vortici nel flusso chiamati "correnti parassite". La tendenza a sviluppare vortici viene espressa dal

numero di Reynolds (Re): essa è direttamente proporzionale alla velocità di flusso v , al raggio del vaso r , alla densità del sangue ρ , ed è inversamente proporzionale alla viscosità η :

$$Re = \frac{v \cdot 2 \cdot r \cdot \rho}{\eta} \quad (1.4)$$

Quando Re supera il valore di 2000-2500 non si è più in regime laminare: vi è dapprima una zona in cui si ha un andamento intermedio ma oltre 4000 si è sicuramente in presenza di moto turbolento.

1.3.4 LA RESISTENZA VASCOLARE

La resistenza vascolare è l'impedimento allo scorrere del flusso sanguigno in un vaso. Essa non può essere misurata direttamente, ma si può calcolare da misure del flusso e della differenza di pressione, usando una formula derivata dalla legge di Darcy.

Innanzitutto per calcolare il flusso Q si usa la Legge di Poiseuille:

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

dove ΔP è la differenza di pressione tra le sezioni del vaso s_1 e s_2 , r il raggio del vaso, η la viscosità del sangue e L la lunghezza del vaso tra s_1 e s_2 . Sostituendo il flusso così calcolato nella formula derivata dalla legge di Darcy, si ottiene la formula per calcolare la Resistenza R in funzione dei soli parametri η , L , r :

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

Come si può osservare, la resistenza R è inversamente proporzionale alla quarta potenza del raggio, per cui una leggera diminuzione del raggio del vaso comporta un notevole innalzamento della resistenza. Anche un incremento della viscosità aumenta questo valore.

1.3.5 LA PRESSIONE SANGUIGNA

La pressione del sangue viene quasi sempre misurata in millimetri di mercurio (mm Hg) perché il manometro a mercurio è stato usato come riferimento standard per le misure di pressione fin dalla sua invenzione nel 1846 da parte di Poiseuille. La pressione sanguigna indica la forza esercitata dal sangue su una qualsiasi porzione di area della parete del vaso. Perciò quando si dice che la pressione è di 50 mm Hg

significa che la forza esercitata è sufficiente a spingere una colonna di mercurio in direzione opposta alla gravità di 50 mm.

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

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

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

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

stabilisce che la variazione del flusso rispetto alla coordinata assiale corrisponde all'opposto della variazione di area della sezione del vaso nel tempo: da ciò deriva una diminuzione del flusso ematico al dilatarsi delle parete vascolari.

Impulsi meccanici, chimici e nervosi agiscono sul tessuto muscolare presente in alcuni vasi, producendo contrazione o rilassamento, in modo che il flusso non si dissipi lungo l'intero sistema circolatorio. L'andamento oscillatorio del lume vascolare fa sì che localmente (con valori di t e s piccoli) si verifichino variazioni del flusso a carattere pulsatile e globalmente (ovvero con valori di t e s paragonabili alla durata dell'intero percorso) la quantità del flusso possa essere conservata.

1.4 VASOMOTION E FLOWMOTION: ASPETTI GENERALI

Con il termine "vasomotion" si indica la pulsazione dei vasi sanguigni, dalla quale consegue la "flowmotion", ossia l'oscillazione del flusso sanguigno in un organo. Questo fenomeno è stato descritto per la prima volta da Jones nel 1852, basandosi sullo studio delle circolazione nelle ali dei pipistrelli [4].

La vasomotion può essere osservata in vivo solo con un microscopio intravitale, strumento che non è sempre facilmente applicabile all'oggetto di studio (Figura 1.9). Invece la flowmotion è di più facile valutazione attraverso la Flussimetria Laser-Doppler (LDF). Questa tecnica non invasiva permette di quantificare il flusso di globuli rossi all'interno di un piccolo volume di tessuto. Un problema legato a questo tipo di misure è che sono influenzate dai vasi vicini e da fattori della circolazione principale, come le fluttuazioni della pressione sanguigna [1]. Inoltre, la flowmotion misurata non

è necessariamente una conseguenza delle attività ritmiche del vaso specifico dove si effettua la misura, ma rappresenta l'integrazione di diverse attività periodiche di differente origine.

Attraverso l'uso di strumenti d'analisi appropriati, come ad esempio la trasformata wavelet, è stato possibile ricavare dal segnale LDF il corrispondente spettro di frequenza, in modo da identificare le singole componenti che influenzano il segnale, come verrà nel seguito precisato [5].



Figura 1.9. Due fotogrammi di un vaso che si dilata e si contrae nel tempo, producendo la pulsazione tipica della vasomotion.

1.4.1 VASOMOTION

La pulsazione dei vasi avviene tramite la regolazione del tono delle cellule muscolari dei vasi, per cui, soprattutto quelli arteriolari, devono essere provvisti di miocellule. La contrazione o il rilassamento si propaga tra le membrane di cellule adiacenti al tessuto muscolare liscio, collegate tra loro attraverso delle *gap junction*, che permettono lo scambio di potenziali chimici ed elettrici. Inoltre è presente un accoppiamento di tipo meccanico tra cellule vicine, in modo che la contrazione di una provochi lo stesso movimento in quelle adiacenti.

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

La scala di tempo in cui avvengono queste regolazioni deve essere sufficientemente breve e commisurata alle necessità metaboliche delle cellule, che non devono essere private dell'apporto necessario di sangue ossigenato per periodi di tempo più lunghi della loro capacità di sopravvivere in anossia. Il risultato finale della combinazioni di questi processi è la regolazione del tono vascolare che, associato alle proprietà reologiche del sangue, determina la resistenza vascolare.

Una delle conseguenze principali della vasomotion è di modificare la resistenza locale idraulica dei vasi interessati: i vasi dilatati, avendo un diametro medio maggiore, risultano avere una resistenza minore a quella dei vasi inerti.

La pulsazione periodica delle arteriole terminali è significativa per il meccanismo di Starling sullo scambio dei fluidi, a causa delle variazioni di pressione che insorgono durante il processo. Intaglietta studiò questo effetto tramite un modello matematico e determinò che durante la vasomotion, quando il flusso si arresta in un capillare, la pressione al suo interno è in equilibrio con quella delle venule vicine [1]. Sotto questa condizione, l'intero capillare assorbe liquido dalla zona interstiziale. Dunque la vasomotion può essere ritenuta come un meccanismo che aiuta l'assorbimento dovuto alla pressione osmotica colloidale del plasma. Inoltre il movimento della parete arteriolare favorisce il drenaggio del liquido contenuto nei tessuti verso i vasi linfatici. A conferma di ciò si può notare come durante lo stato di anestesia (che inibisce la vasomotion) si verifichi un accumulo di liquidi negli spazi interstiziali. Lo stesso accade anche se il tono vascolare e la pressione sanguigna diminuiscono.

I fattori che influenzano la vasomotion del microcircolo sono di svariata natura e possono essere sia sistemici (per esempio, l'attività cardiaca e quella respiratoria) che locali (per esempio, l'attività miogena, neurogena ed endoteliale). Per ognuna di queste attività è stata individuata una banda di frequenza all'interno dello spettro calcolato a partire dal tracciato del segnale LDF [6][7][8].

ATTIVITA' CARDIACA

Il cuore ha il compito di spingere il sangue verso tutti i tessuti del corpo, dai più vicini fino a quelli periferici, vincendo la resistenza che viene posta dalle pareti vascolari durante il percorso. Affinché la spinta del cuore non si esaurisca prima di raggiungere tutti i distretti corporei, sono presenti dei collegamenti nervosi che portano le miocellule delle arterie a contrarsi in maniera sincrona con il battito cardiaco, propagando la spinta e facendo in modo che il sangue raggiunga i vasi più lontani e sottili.

ATTIVITA' RESPIRATORIA

La respirazione svolge un ruolo fondamentale per la circolazione: con l'inspirazione, infatti, viene impartita al sangue una pressione che lo richiama attraverso la rete venosa dalle zone periferiche verso il centro. La pressione dell'atrio destro diminuisce durante l'inspirazione, mentre la pressione venosa periferica rimane costante durante tutto il ciclo respiratorio. Il ritorno venoso sistemico, che solitamente è il fattore determinante della gittata cardiaca, dipende dalla differenza di pressione tra le vene extratoraciche e la pressione dell'atrio destro. L'inspirazione, aumentando questa differenza, stimola il ritorno venoso. Come per quelle legate all'attività cardiaca, le oscillazioni dovute alla respirazione risentono anche di un contributo nervoso, oltre che di quello pressorio: durante l'inspirazione infatti, segnali simpatici inducono la vasocostrizione, in modo da aumentare la resistenza periferica e facilitare il ritorno del sangue al cuore. La rilevanza di questo fenomeno è proporzionale al livello di

innervazione dei vasi esaminati: si verifica, ad esempio, in maggior misura sui polpastrelli, ed è meno apprezzabile sulla cute di parti meno densamente innervate, come ad esempio l'avambraccio [7].

ATTIVITA' MIOGENA

La maggior parte dei letti vascolari ha la capacità intrinseca di compensare moderati cambiamenti nella pressione di perfusione con piccole variazioni di resistenza vascolare, in modo che il flusso del sangue rimanga relativamente costante. Questa capacità è in parte dovuta alla spontanea risposta contrattile all'allungamento ϵ delle cellule muscolari lisce (Figura 1.10), dovuto alla tensione normale σ che il flusso esercita sulla parete del condotto. La relazione tra queste due variabili è regolata dalla legge di Hook :

$$\sigma = E \cdot \epsilon \quad (1.8)$$

dove E è il modulo elastico longitudinale, in questo caso della parete vascolare. Quando la pressione aumenta, per la (1.8) i vasi sanguigni sono dilatati e le fibre muscolari che circondano i vasi sono quindi estese.

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

$$T = k \cdot \sigma \cdot r \quad (1.9).$$

Secondo la (1.9) la tensione T nella parete è proporzionale al prodotto della pressione idraulica del sangue per il raggio del vaso, con coefficiente di proporzionalità dipendente dalla forma del condotto. All'aumentare della pressione, il mantenimento di una data tensione parietale richiede quindi una diminuzione del raggio.

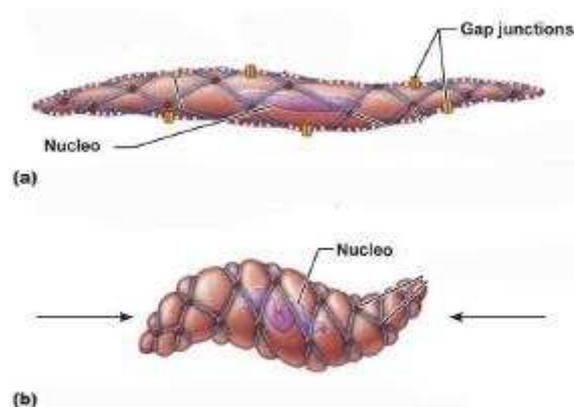


Figura 1.10. Immagine di cellula muscolare liscia distesa (a) e contratta (b).

Queste cellule possono inoltre contrarsi spontaneamente attraverso la dinamica dei canali ionici, sotto l'impulso di cellule muscolari pacemaker.

Questo particolare tipo di cellule si trova soprattutto alle biforcazioni delle arteriole e possiede la caratteristica di depolarizzarsi periodicamente. A temperatura costante, la frequenza di depolarizzazione delle cellule pacemaker è fissa.

Le cellule muscolari delle venule e delle arteriole sono poi dotate di recettori che le rendono in grado di pulsare anche in risposta a stimolazioni di tipo chimico. Il loro rilassamento è indotto, ad esempio, dal peptide natriuretico atriale, prodotto dal miocardio in seguito a un eccessivo aumento del volume ematico. La loro contrazione, invece, può essere stimolata dall'angiotensina II, un ormone deputato all'incremento pressorio che, oltre ad aumentare la resistenza periferica dei vasi, incrementa anche la frequenza e l'intensità delle contrazioni cardiache [9].

Anche le concentrazioni di ossigeno e di anidride carbonica stimolano le cellule del tessuto muscolare dei vasi: i fattori che stimolano la vasodilatazione comprendono, nella maggior parte dei tessuti, la diminuzione della concentrazione di O_2 e di pH. Questi cambiamenti causano il rilassamento delle arteriole e degli sfinteri precapillari; provocano un rilassamento delle miocellule anche gli incrementi della tensione di CO_2 e dell'osmolalità.

ATTIVITÀ NEUROGENA

Il fattore neurogeno è dovuto a stimoli di tipo nervoso che vengono esercitati sulle cellule muscolari. Anche se i vasi resistivi sono i più densamente innervati, tutti i vasi eccetto venule e capillari contengono muscoli lisci e ricevono i nervi motori dalla divisione simpatica del sistema nervoso autonomo. Diversamente da quelli somatici, i nervi del simpatico esercitano un controllo di tipo continuativo: le cellule muscolari dei vasi sono quindi ritmicamente sollecitate, ed indotte al rilassamento o alla contrazione a seconda degli ordini provenienti dal sistema nervoso involontario [10]. I trasmettitori raggiungono lo strato più interno del vaso tramite diffusione e la corrente si diffonde da una cellula muscolare all'altra attraverso le gap junction. Particolari stimoli di tipo psicologico e necessità complessive di regolazione della temperatura corporea comportano vasocostrizione o vasodilatazione periferica attraverso questo meccanismo.

ATTIVITÀ ENDOTELIALE

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

Lo sforzo tensivo σ (che ne produce lo stiramento) e lo sforzo di taglio τ (dovuto all'attrito con il flusso ematico), attivano questo strato di cellule, promuovendo la sintesi e la liberazione di mediatori vasoattivi, come il monossido di azoto (NO),

prostaglandine, trombossani e endoteline. Studi successivi hanno evidenziato che, oltre agli stimoli meccanici, anche neurotrasmettitori come l'acetilcolina agiscono sulle cellule endoteliali stimolando la produzione di NO [11].

L'NO che si forma nell'endotelio diffonde attraverso le cellule muscolari lisce, dove attiva diversi fattori che mediano il rilassamento del tessuto. L'NO è inattivato dall'emoglobina, al fine di interrompere la vasodilatazione quando il livello di perfusione risulta sufficientemente elevato (Figura 1.11).

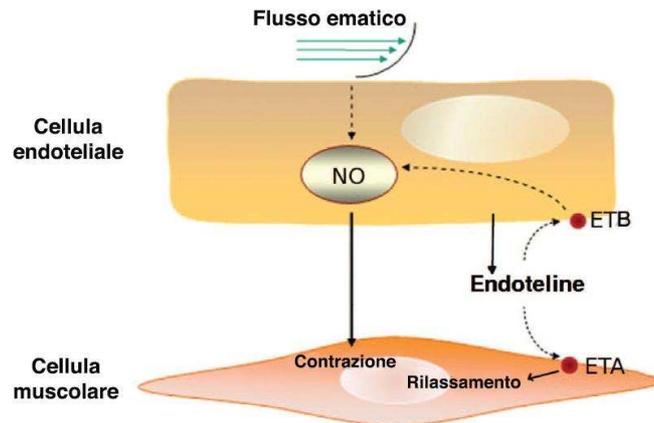


Figura 1.11. Schematizzazione del rilascio di sostanze che controllano la vasodilatazione da parte delle cellule endoteliali.

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

1.4.2 LA FLOWMOTION

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

L'andamento oscillatorio della flowmotion è dovuto anche alla natura periodica delle pompe cardiaca e respiratoria, che spingono il sangue l'una dal centro alla periferia attraverso la rete arteriosa, l'altra dalla periferia al centro attraverso la rete venosa. Da misurazioni del flusso ematico nel microcircolo cutaneo, ottenute in modo non invasivo grazie alla Flussimetria Laser Doppler (LDF), è possibile estrapolare, tramite analisi in frequenza, la presenza e l'importanza di ogni componente dello spettro. Come anticipato alla fine del paragrafo 1.2.1, vari studi si sono focalizzati sui fattori che

influenzano la vasomotion: ad ognuno di questi è stato correlato un intervallo di frequenze della flowmotion, in particolare:

- le oscillazioni del microcircolo legate all'attività cardiaca riflettono le spinte periodiche che il sangue ottiene dal cuore: hanno una frequenza compresa tra 0.6 e 2 Hz, che corrisponde appunto a quella delle pulsazioni del soggetto. Questa corrispondenza è stata verificata tramite acquisizione simultanea del segnale elettrocardiografico [6];
- le oscillazioni del microcircolo legate all'attività respiratoria sono debolmente presenti nel segnale. Hanno una frequenza compresa tra 0.2 e 0.6 Hz, e la corrispondenza con la frequenza respiratoria del soggetto è stata verificata misurando simultaneamente le escursioni polmonari del soggetto [7];
- le oscillazioni del microcircolo legate all'attività miogena hanno una frequenza compresa tra 0.06 e 0.2 Hz [11]. Nel muscolo dell'antro gastrico, nel quale predomina l'attività miogena, le contrazioni si ripetono a frequenza di 0.1 Hz;
- le oscillazioni del microcircolo legate all'attività neurogena hanno una frequenza compresa tra 0.02 e 0.06 Hz. E' stato dimostrato che questo picco scompare totalmente dopo denervazione e dopo simpaticectomia [10];
- le oscillazioni del microcircolo legate all'attività endoteliale hanno una frequenza compresa tra 0.005 e 0.02 Hz: esse sono le più lente attività periodiche riconosciute nella flowmotion. All'inizio si considerava un'unica banda ma in seguito, somministrando dosi di metaboliti delle cellule endoteliali, come NO e di sostanze ad esso antagoniste, e monitorandone gli effetti per un tempo di osservazione lungo (30 minuti circa), è stato possibile individuare due diverse oscillazioni periodiche: una compresa tra 0.005 e 0.0095 e la seconda tra 0.0095 e 0.02 Hz [12].

1.5 IL RISCALDAMENTO LOCALE

Nell'uomo, i vasi sanguigni cutanei sono controllati sia da riflessi neurogenici che da fattori locali. Come affermato in precedenza, uno dei fattori coinvolti nella vasodilatazione è il monossido di azoto (NO). Un potente fattore che controlla la vascolatura cutanea è la temperatura locale dei vasi sanguigni. Un raffreddamento locale provoca vasocostrizione che riduce il flusso di sangue a livelli minimi. Questo vasocostrizione è mediata da un meccanismo di riflessi assonici e richiede il rilascio di norepinefrina dalle terminazioni nervali. Un riscaldamento locale causa, invece, vasodilatazione, con conseguente maggior flusso di sangue [13].

L'aumento del diametro dei vasi non è l'unico modo in cui aumenta il flusso; in condizioni normali (per temperature di circa 20-24 °C) non tutti i capillari hanno sangue che scorre in essi. Il flusso aumenta anche perché, col riscaldamento, ci sono più capillari in cui il sangue viene a scorrere: questo fenomeno viene chiamato

“reclutamento capillare”. Una delle ragioni per cui si verifica l’aumento di flusso con la temperatura è per proteggere la pelle da eventuali danni: un maggior flusso fa sì che il sangue fluisca più velocemente, cosicché nei vasi si mantenga una temperatura inferiore. Quando l’intero corpo subisce un riscaldamento, ad esempio durante l’attività fisica, l’aumento del flusso di sangue favorisce una più efficiente perdita di calore, in modo che la temperatura delle parti più interne del corpo si mantenga su valori salutari [14][15].

Il grado di vasodilatazione indotto da riscaldamento locale è stato proposto e usato come uno strumento clinico per la valutazione delle disfunzioni nei pazienti affetti da diabete e da arteriopatie, anche perché, come si è visto da studi precedenti, la stimolazione termica causa vasodilatazione persino in zone di cute denervate a causa di ustioni o innesti [16][17].

La risposta del flusso di sangue ad un aumento a gradino della temperatura locale è bifasica, con un picco che si presenta dopo pochi minuti, seguito da un nadir, ed infine un fase ritardata di progressiva risalita verso un plateau dopo una decina di minuti (Figura 1.12). La fase primaria è mediata dai sensori recettivi, mentre la fase ritardata sembra dipendere in maggior parte dal rilascio di NO [18].

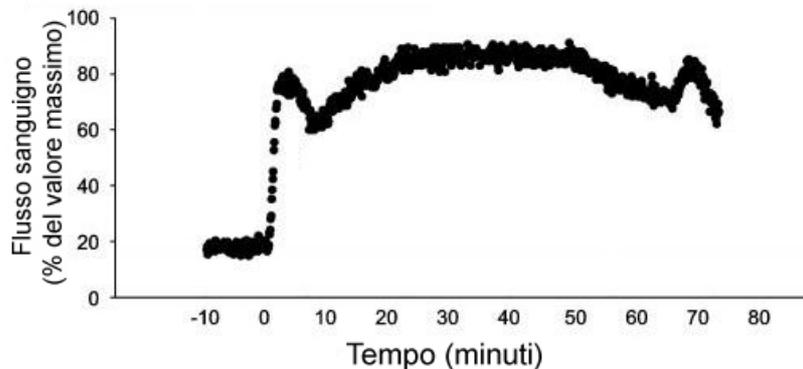


Figura 1.12. Andamento tipico del flusso sanguigno in risposta a riscaldamento locale.

1.6 OBIETTIVI DELLO STUDIO

Nell'ambito del presente lavoro di tesi è stato osservato un gruppo di pazienti arteriopatici ai quali è stata applicata la stimolazione termica locale e contestualmente acquisito il segnale LDF. I tracciati LDF dei pazienti, suddivisi in gruppi a seconda del grado di criticità della arteriopatia (stimata sulla base della pressione di ossigeno transcutanea), sono stati in seguito analizzati in frequenza con la tecnica della trasformata wavelet. L’aspetto peculiare dello studio è che la trasformata non è stata applicata sul segnale intero, ma su tre porzioni consecutive. Infatti all’interno di ciascun segnale sono state individuate tre zone (Figura 1.13):

- la zona iniziale (detta a "temperatura basale") dove il segnale è stazionario e il riscaldamento locale è assente;
- la zona centrale di rapida crescita (detta "transitorio"), dove il segnale aumenta rapidamente fino a raggiungere un picco, in seguito alla attivazione della stimolazione termica;
- la zona finale (detta di a "temperatura di 44° C") dove il segnale raggiunge un plateau e torna ad essere sostanzialmente stazionario.

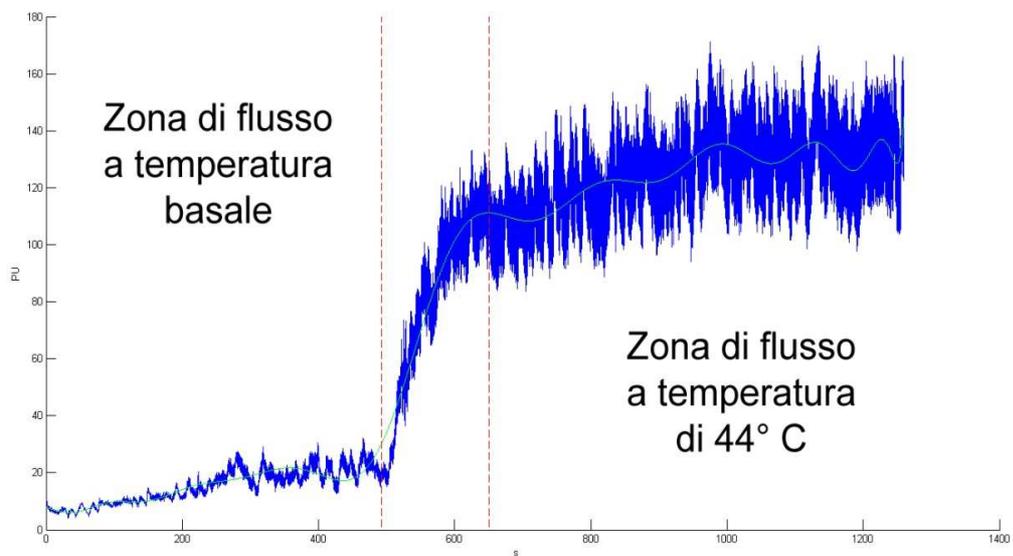


Figura 1.13. Il segnale di perfusione suddiviso nelle tre zone.

Una volta applicata la trasformata wavelet ad ogni singolo segmento di segnale, per ogni paziente si sono misurati i corrispondenti valori di ampiezza e potenza nelle bande di frequenza relative alle attività cardiaca, miogena e simpatica.

Obiettivo di questo studio è di quantificare la variazione delle diverse attività vascolari in seguito alla stimolazione termica locale, associando il tipo e l'entità della variazione alla severità della arteriopatia.

CAPITOLO 2

La Flussimetria Laser Doppler

Uno degli strumenti più usati per misurare il livello di perfusione cutanea è il Flussimetro Laser Doppler: si applica all'esterno della cute, per cui risulta assolutamente non invasivo. Un piccolo cristallo piezoelettrico presente nella sonda, quando viene energizzato con un apparato elettronico appropriato, emette un ultrasuono ad una frequenza di centinaia di cicli al secondo direzionato verso il sangue che fluisce. Una porzione dell'ultrasuono viene riflessa dai globuli rossi presenti nel sangue, che ritorna verso la sonda. Queste onde riflesse hanno una frequenza inferiore delle onde trasmesse originalmente dal cristallo, perché gli eritrociti si stanno allontanando dalla zona di applicazione: questo è quello che comunemente viene chiamato "effetto Doppler".

Una volta che il segnale riflesso ritorna alla sonda, una porzione dell'apparato amplifica le onde e determina la differenza di frequenza tra il segnale di partenza e quello di arrivo, e permette così di determinare la velocità del flusso sanguigno. Monitorando l'andamento del microcircolo nel tempo, oltre all'intensità dei singoli impulsi e totale, il LDF è in grado di registrare le variazioni ritmiche che avvengono nel flusso ematico cutaneo, ovvero la flowmotion.

La microcircolazione cutanea è organizzata in due plessi orizzontali: uno superficiale situato circa 1.0-1.5 mm sotto la superficie della pelle e uno più profondo, situato nella zona di collegamento tra cute e sottocute. Arteriole ascendenti e venule discendenti si ramificano in entrambi i plessi (Fig.2.1). Il LDF rileva il movimento di alcuni degli elementi corpuscolati del sangue transitanti nel microcircolo del plesso superficiale, ma non si estende al di là di questi vasi nella parte più profonda del plesso orizzontale sotto il derma (Figura 2.1). I vasi raggiunti sono arteriole, venule e capillari aventi una sezione trasversale di 0.002-0.008 mm² [19].

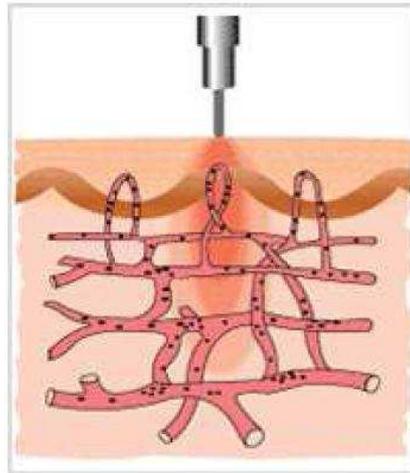


Figura 2.1. Sezione della cute in cui si vede la penetrazione dal fascio di luce laser emesso dal flussimetro.

2.1 L'EFFETTO DOPPLER

L'effetto Doppler è un fenomeno fisico che consiste nel cambiamento apparente della frequenza o della lunghezza d'onda di un'onda percepita da un osservatore che si trova in movimento o in quiete rispetto alla sorgente delle onde, anch'essa in movimento o in quiete. Per quelle onde che si trasmettono in un mezzo, come le onde sonore, la velocità dell'osservatore e dell'emettitore vanno considerate in relazione a quella del mezzo in cui sono trasmesse le onde. L'effetto Doppler totale può quindi derivare dal moto di entrambi, ed ognuno di essi è analizzato separatamente.

2.1.1 CENNI STORICI

L'effetto fu analizzato per la prima volta da Christian Andreas Doppler nel 1845. Per validare la sua intuizione realizzò un esperimento divenuto celeberrimo: si piazzò accanto ai binari della ferrovia, e ascoltò il suono emesso da un vagone pieno di musicisti, assoldati per l'occasione, mentre si avvicinava e poi mentre si allontanava (Figura 2.2). Egli confermò che l'altezza del suono era più alta quando la fonte del suono (ossia il vagone con i musicisti) si stava avvicinando, e più bassa quando si stava allontanando. Successivamente Hippolyte Fizeau scoprì indipendentemente lo stesso effetto nelle onde elettromagnetiche nel 1848 [20].

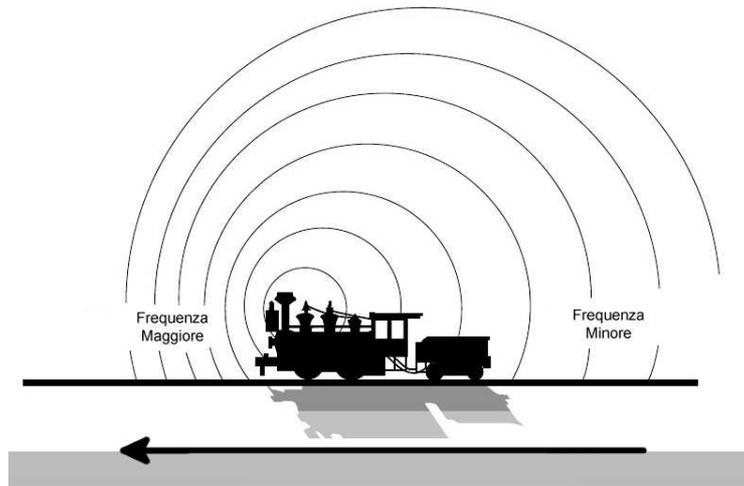


Figura 2.2. Spiegazione visiva dell'effetto Doppler: il treno si sta muovendo verso sinistra, per cui le onde a sinistra hanno una frequenza maggiore, mentre quella a destra una minore.

2.1.2 SPIEGAZIONE MATEMATICA

Lo shift Doppler è definito come uno spostamento della frequenza dell'onda che avviene quando vi è movimento relativo tra la sorgente e il ricevitore. Quando ricevitore e sorgente si muovono sulla stessa linea, sussiste la seguente relazione [20]:

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

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

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

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

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

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

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

caso in cui sorgente e ricevitore si muovano in direzioni diverse, influiscono sull'effetto Doppler solo proiezioni sulla retta passante per sorgente e ricevitore dei vettori velocità. Chiamando α e β gli angoli formati da tali vettori con la retta passante per sorgente e ricevitore, la (2.2) si riscrive:

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

2.2 IL FLUSSIMETRO LASER DOPPLER

L'utilizzo dell'effetto Doppler in campo vascolare è stato introdotto da Stern nel 1975, che per primo dimostrò che lo shift Doppler della luce può essere utilizzato per quantificare il movimento dei globuli rossi nella pelle. Per ottenere un segnale Doppler da un fluido, il fluido deve contenere corpuscoli in grado di riflettere le onde incidenti: nel caso del sangue, i globuli rossi, che si muovono ad una velocità di 0.01-10 mm/s, costituiscono i principali agenti riflettenti.

La luce laser ha la caratteristica di essere coerente e monocromatica, il che significa che viene emessa in un fascio concentrato e ad una singola frequenza f_s . La dimensione di un globulo rosso è circa 7-8 μm : poiché la radiazione viene solitamente emessa ad una lunghezza d'onda di circa 0.7 μm , il fatto che i corpuscoli sui quali incide il segnale siano più grandi della sua lunghezza d'onda limita i fenomeni di dispersione, favorendo la riflessione [21].

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

Il principio della (2.2) è applicato due volte nell'acquisizione del segnale dal microcircolo cutaneo [22]:

- prima applicazione del principio: una sonda emettitrice, ferma ($v_s = 0$), trasmette la luce laser attraverso la cute. I globuli rossi che scorrono nel sangue (con v_g , positiva se si avvicinano alla cute) ricevono il segnale con una frequenza f_g , che per la (2.2) vale:

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

- seconda applicazione del principio: una sonda riceptrice, ferma ($v_r = 0$), riceve attraverso la cute la luce laser riflessa dai globuli rossi, avente frequenza f_g . I globuli rossi, che ora sono gli emettitori, hanno ancora velocità v_g , in questo caso positiva se si allontanano dalla cute, quindi con segno opposto rispetto all'equazione precedente. La frequenza del segnale ricevuto quindi vale:

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

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

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

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

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

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

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

- una porzione è costituita dalla luce che ha colpito oggetti fissi, e, a causa della natura elastica del fenomeno, risulta alla stessa frequenza della luce trasmessa;
- l'altra porzione è quella luce che viene riflessa dagli oggetti in movimento, e che quindi ha subito uno shift in frequenza. La frequenza di questa parte del segnale sarà, per la (2.8), proporzionale alla velocità media dei globuli rossi che hanno riflesso il raggio laser. L'ampiezza del segnale è proporzionale al loro numero.

2.2.1 PRINCIPI DI FUNZIONAMENTO

La luce laser emessa dalla sorgente è trasmessa mediante fibre ottiche che scorrono attraverso una sonda (Figura 2.3): la testa della sonda viene posta a contatto con la pelle. Le strutture sottostanti possono riflettere, assorbire o disperdere i fotoni incidenti. Un'altra fibra ottica a contatto con la superficie della pelle raccoglie la luce riflessa o diffusa dalle strutture sia fisse che in movimento [23][19].

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

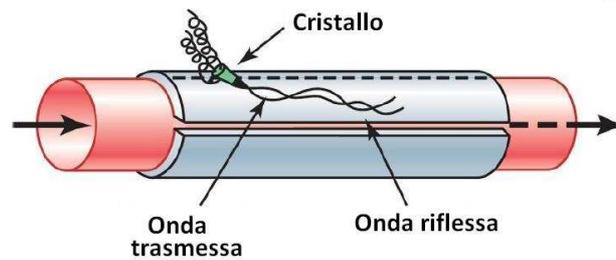


Figura 2.3. Schema di funzionamento del LDF e di come le onde si riflettano in un vaso sanguigno.

Il segnale risultante, composto dalle due porzioni di luce riflessa, presenta il fenomeno della "*frequenza di battimento*". Questo fenomeno è ciò che avviene quando si sovrappongono segnali aventi frequenze simili ma non identiche. L'onda risultante ha come frequenza la media delle frequenze, ma la sua ampiezza è modulata dallo sfasamento dovuto alla diversità delle frequenze: ciò che risulta è un segnale con ampiezza che oscilla tanto più velocemente quanto più le frequenze differiscono [19].

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

Ciò che viene misurato è detto in inglese *flux*. A differenza del *flow*, il *flux* non è una misura assoluta della velocità di cellule del sangue. Nessuna corrente versione dello strumento laser Doppler è infatti in grado di fornire valori di perfusione assoluti, come ad esempio ml/min/g di tessuto. Attualmente, le misurazioni sono espresse come unità di perfusione (PU), che sono arbitrarie [23].

Il volume di misura, fissato nella sua componente di area superficiale ma variabile in profondità, è influenzato dai seguenti fattori [19]:

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

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

raggio laser penetrante. Avendo lo scopo di valutare complessivamente la perfusione tissutale, e non ad esempio di localizzare i vasi, il LDF non fornisce informazioni sulla posizione degli oggetti riflettenti: nel caso in cui si desideri disporre di questo tipo di informazioni è necessario utilizzare un sistema a onde pulsate [21].

2.2.2 LIMITI DELLA FLUSSIMETRIA LASER DOPPLER

Un problema insito nell'utilizzo del LDF è la mancanza di una misurazione dello zero assoluto dello strumento. Succede, infatti, che quando il flusso di globuli rossi viene ridotto a zero, sperimentalmente o da escissione chirurgica, spesso lo strumento rilevi comunque una lettura di flusso. In passato, questo zero biologico è stato attribuito sia al moto browniano nel compartimento vascolare che alla motricità della parete cellulare dei globuli rossi. Più recentemente, la fonte principale dello zero biologico è stata identificata come il moto browniano delle macromolecole presenti in sospensione nel compartimento interstiziale [19].

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

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

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

Affinché si possano completamente comparare i risultati tra misurazioni diverse, però, è necessario che anche le proprietà del tessuto siano le stesse; tale condizione è di più difficile realizzazione e non direttamente verificabile. Tuttavia, la tecnica laser Doppler è stata confrontata con la maggior parte, se non tutte, le altre tecniche attualmente disponibili. Studi comparativi con l'isotopo di Xenon, fluoresceina, e microsfere radioattive hanno dimostrato una forte correlazione con i risultati da LDF. Tuttavia, i coefficienti di correlazione possono variare a seconda degli organi e dei siti che vengono misurati, e possono largamente risentire di condizioni estreme di flusso e valori di ematocrito [19].

Altro problema relativo all'acquisizione del segnale LDF risiede nel fatto che la sonda è sensibile ai movimenti della zona sulla quale è fissata. Se il soggetto sul quale si sta effettuando la misura si muove, al segnale vengono sommati contributi dovuti al movimento che ovviamente non corrispondono a caratteristiche del microcircolo e che sono quindi artefatti. Essi sono facilmente riconoscibili nel caso in cui il movimento sia breve e veloce, presentandosi come picchi che si esauriscono in un paio di secondi ed

hanno ampiezza chiaramente distinguibile dal resto del segnale. Nel caso in cui il movimento sia sufficientemente lento, il suo contributo al segnale potrebbe però essere confuso con i contributi dovuti al microcircolo, e quindi portare a risultati fuorvianti.

CAPITOLO 3

L'ANALISI IN FREQUENZA

Il LDF fornisce in uscita una successione di valori, ognuno dei quali indica l'ampiezza del segnale (in PU) acquisito ogni sedicesimo di secondo. E' naturale quindi rappresentare il segnale nel dominio del tempo, cioè tracciarlo in un sistema di coordinate in cui l'asse x rappresenta il tempo e l'asse y l'ampiezza del segnale. Questa rappresentazione, sebbene sia la più scontata, non sempre risulta la più conveniente: in molti casi infatti le informazioni di maggior interesse sono celate nel contenuto in frequenza del segnale. Il grafico del contenuto in frequenza è chiamato spettro e mostra quali frequenze siano presenti nel segnale. Per ottenere lo spettro è necessario applicare una trasformazione matematica che, a partire dal segnale nel dominio del tempo, fornisca lo stesso segnale nel dominio della frequenza.

3.1 LA TRASFORMATA DI FOURIER²

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

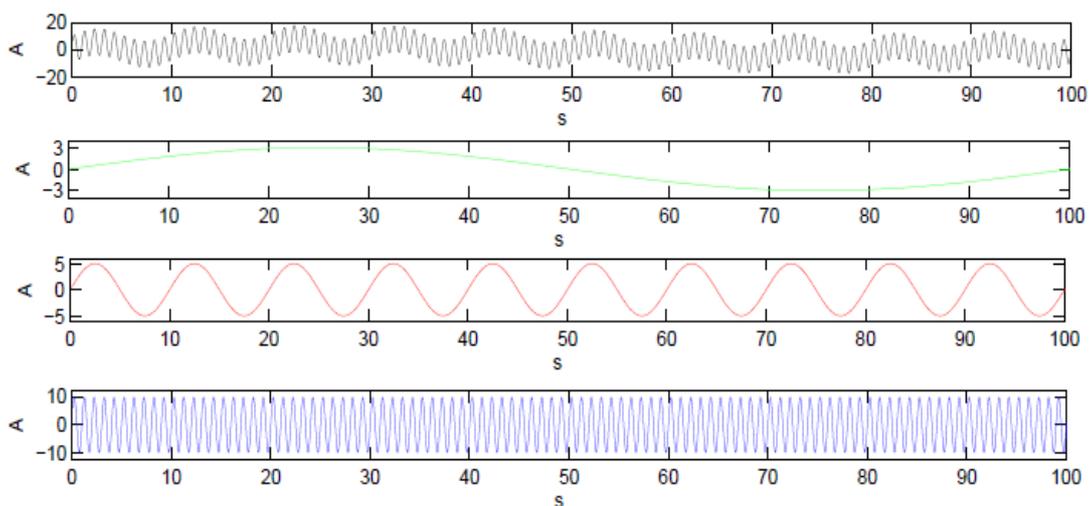


Figura 3.1. Un segnale composto (in nero) diviso nelle sue 3 componenti (in verde, rosso e blu).

2. Le nozioni di teoria presenti in questo paragrafo sono tratte da [24]

Una volta applicata la trasformata di Fourier (FT), rappresentando le coppie frequenza-coefficiente come punti in un nuovo sistema di coordinate (avente le frequenze sull'asse x e i valori dei relativi coefficienti sull'asse y), si ottiene un grafico che indica quali frequenze sono contenute nel segnale e con che intensità, ovvero lo spettro del segnale stesso. Nel caso di Figura 3.1, lo spettro del segnale in nero consiste in tre spikes a livello delle frequenze relative alle onde che lo compongono (Figura 3.2).

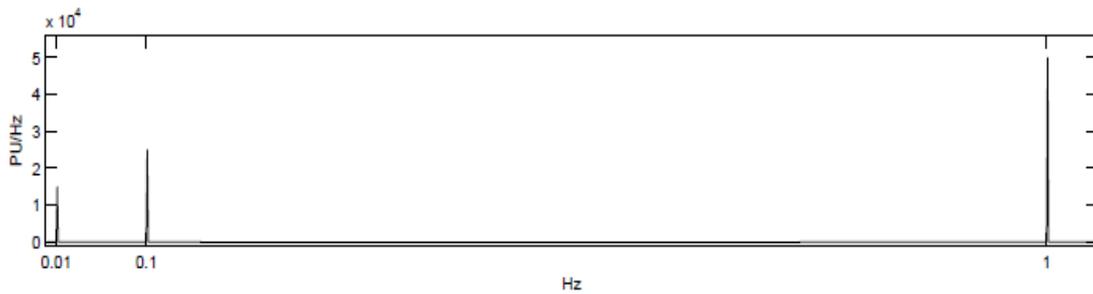


Figura 3.2. Spettro di potenza del segnale di Figura 3.1. ottenuto tramite trasformata di Fourier.

L'altezza degli spikes dello spettro è direttamente proporzionale all'ampiezza delle onde ai quali si riferiscono. Rappresentare in scala lineare l'asse x dello spettro non è la scelta migliore nel caso di segnali composti da frequenze aventi diversi ordini di grandezza (come il segnale in nero in Figura 3.1). Una rappresentazione in scala logaritmica permette di apprezzare meglio la distribuzione delle frequenze, quando esse sono molto diverse tra loro (Figura 3.3).

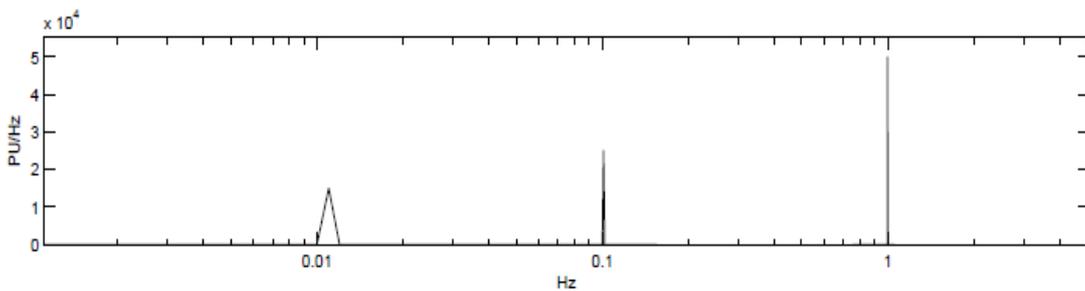


Figura 3.3. Spettro di potenza del segnale di Figura 3.1. rappresentato in scala logaritmica.

3.1.1 EQUAZIONE DELLA TRASFORMATA

L'equazione che effettua la FT è la seguente:

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

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

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

per ogni valore di f la (3.1) moltiplica l'intero segnale per un'espressione complessa composta da seno e coseno alla frequenza f , e ne calcola l'integrale. Il senso di questo passaggio risiede nell'idea che se $x(t)$ contiene una componente ad una certa frequenza \hat{f} , questa componente ed i termini sinusoidali a frequenza \hat{f} vanno a coincidere, e il loro prodotto fornisce una curva avente un'ampiezza relativamente consistente. Tramite l'integrale, questo concetto viene sintetizzato in un unico valore, che viene segnato nel piano frequenza-ampiezza in corrispondenza di \hat{f} .

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

UNITA' DI MISURA

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

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

si ha che $X(f)$ è espresso in PU x secondi, ovvero in PU/Hz.

NON-IDEALITÀ DOVUTE ALLA LIMITATA DURATA DEL SEGNALE

Poiché le acquisizioni LDF hanno durata limitata, quello che si analizza è una finestra temporale del segnale. La lunghezza di questa finestra influenza la quantità e la qualità di informazioni che possono essere estrapolate: le caratteristiche dello spettro sono infatti limitate dalla frequenza di campionamento f_c e dal numero di campioni acquisiti N .

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

- l'asse delle frequenze sul quale sono localizzate le componenti spettrali è limitato tra $-f_c/2$ e $f_c/2$. Questo valore è chiamato frequenza di Nyquist, ed è la più elevata frequenza indagabile;
- la natura reale dei segnali biologici comporta la simmetria dello spettro rispetto all'asse y : l'asse delle frequenze può quindi essere ulteriormente limitato tra 0 e $f_c/2$ senza perdita di informazione;

- poiché il numero dei campioni del segnale originario (N) equivale a quello della trasformata, la distanza in frequenza Δf tra due campioni dello spettro, ovvero la risoluzione in frequenza, risulta pari a

$$\Delta f = f_c/N$$

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

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

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

3.1.2 LIMITI DELLA FT

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

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

Nella realtà dei segnali biologici, la stazionarietà è una condizione mai verificata, in quanto i meccanismi che generano qualsiasi fenomeno sono di natura dinamica. Nel caso del microcircolo, la complessità e la dinamicità dei meccanismi alla base di flowmotion e vasomotion (trattate nel paragrafo 1.2) rendono impensabile il fatto che il segnale LDF possa considerarsi anche approssimativamente stazionario. D'altra parte, utilizzando il LDF, non vi è uno specifico interesse nella localizzazione temporale delle frequenze. Quello che interessa è conoscere quali frequenze siano complessivamente presenti. Anche l'applicazione diretta della FT può quindi lasciar intuire quali siano gli intervalli di frequenze dominanti.

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

l'asse logaritmica evidenzia come le basse frequenze risultino indicate con minore precisione (Figura 3.5).

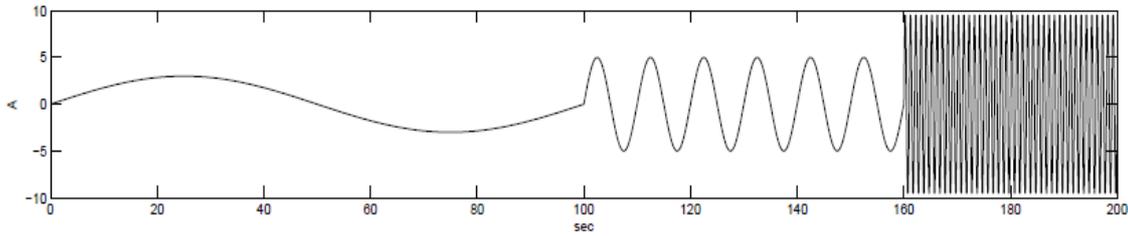


Figura 3.4. Segnale composto dalle stesse onde del segnale in Figura 3.1. ma ad intervalli separati.

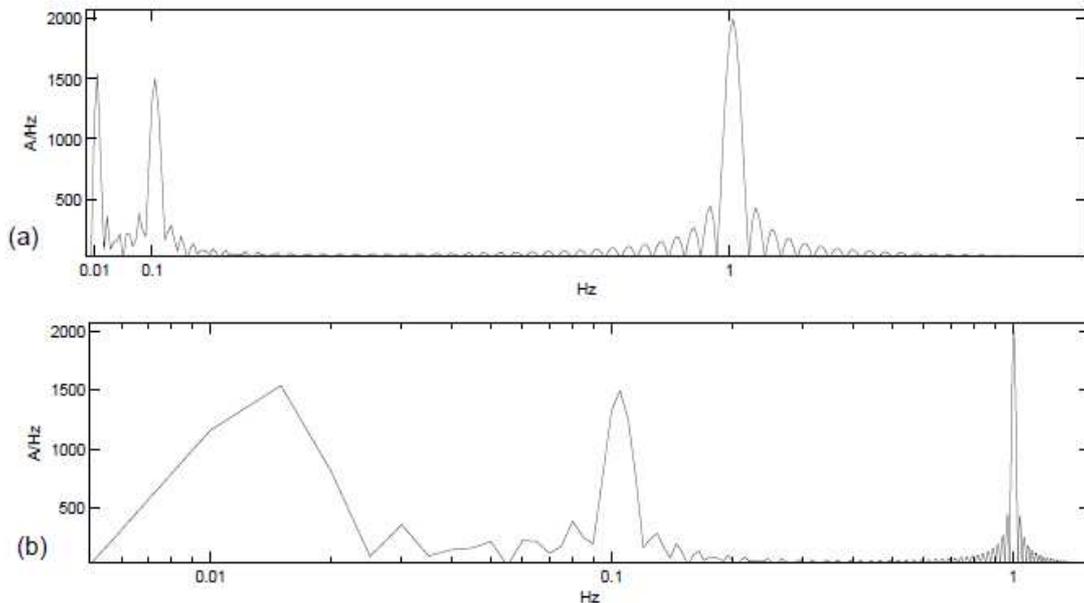


Figura 3.5. Spettro del segnale variabile ad intervalli separati di Figura 3.4. rappresentato in scala lineare (a) e logaritmica (b).

3.2 LA TRASFORMATTA DI FOURIER SHORT TIME³

Per ovviare al problema della non stazionarietà dei segnali e per localizzare le variazioni temporali della composizione in frequenza, il segnale deve essere diviso in finestre più brevi, ed ogni segmento deve essere analizzato separatamente. La trasformata di Fourier *short time* (STFT) compie questa operazione dividendo il segnale in segmenti, e applicando ad ognuno la FT, fornendo quindi informazioni spettrali in un piano tempo-frequenza. In questo modo le variazioni dello spettro possono essere tracciate nel tempo.

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

La formulazione matematica è la seguente:

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

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

Ciò che risulta dal prodotto di $x(t)$ e $\gamma(t - \tau)$ è un segnale non nullo solo dove le due parti si sovrappongono, cioè in un intervallo centrato in τ e esteso quanto la finestra γ . Rappresentando il piano tempo-frequenza con l'asse orizzontale relativo ai tempi e quello verticale alle frequenze, si ha che ogni colonna della matrice STFT contiene lo spettro del segnale relativo a una data posizione della finestra. Ogni riga indica invece come cambia il contenuto relativo a una certa frequenza allo spostarsi della finestra.

In Figura 3.6 è riportato il segnale variabile a intervalli di Figura 3.4, allineato alla sua STFT ottenuta con una finestra di 100 campioni (grafico in basso).

3. Le nozioni di teoria presenti in questo paragrafo sono tratte da [25].

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

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

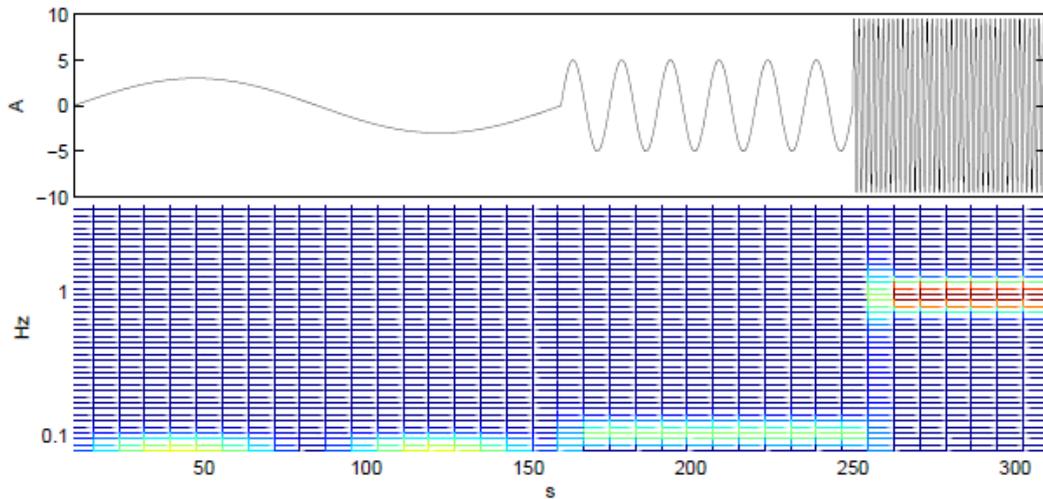


Figura 3.6. Segnale a intervalli variabili di Figura 3.4 (sopra) e (sotto) la sua STFT calcolata su una finestra di 100 campioni.

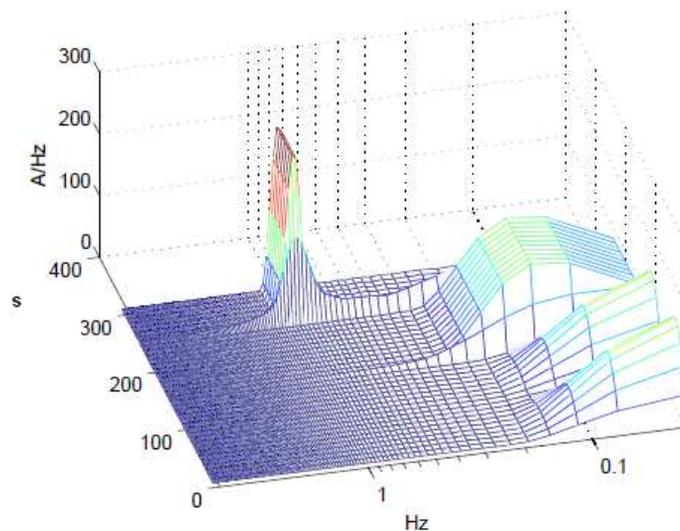


Figura 3.7. Visione 3D della STFT del segnale di Figura 3.4. con rappresentazione in scala logaritmica nell'asse delle frequenze.

3.2.1 LIMITI DELLA STFT

La principale limitazione intrinseca a questo metodo sta nel fatto che la lunghezza della finestra γ è prefissata. La lunghezza della finestra gioca in favore della risoluzione in frequenza (essendo essa pari a f_c/N , dove N è il numero dei campioni considerati e f_c la frequenza di campionamento), ma deve essere sufficientemente breve affinché il segnale in essa contenuto possa essere considerato stazionario. Nel caso del segnale LDF, viste la differenza tra gli ordini di grandezza delle frequenze di Tabella 1.1 e la variabilità del segnale, è impensabile che la stessa finestra possa costituire il miglior compromesso risoluzione-stazionarietà per tutte le bande.

Una soluzione potrebbe essere quella di applicare iterativamente l'algoritmo, utilizzando di volta in volta una finestra adatta a estrapolare informazioni relative ad uno specifico intervallo di frequenze, e sovrapponendo le informazioni ottenute ad ogni iterazione. Questa metodologia di analisi però porta ad un surplus di informazioni, relativo al contenuto in frequenza calcolato al di fuori dell'intervallo per cui la finestra è stata specificamente pensata. Inoltre ogni iterazione porta a risultati slegati tra loro, e di non immediata interpretazione.

3.3 LA TRASFORMATA WAVELET⁴

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

3.3.1 LA RISOLUZIONE TEMPO-FREQUENZA

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

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

Confrontando i due grafici si può notare che:

- gli Heisenberg box di Figura 3.8-a hanno tutti la stessa base e di conseguenza la stessa altezza, a causa della durata prefissata della finestra. Il rettangolo blu, utilizzato per isolare un'alta frequenza, è quindi congruente a quello rosso, utilizzato per isolare una bassa frequenza: se esse sono molto diverse tra loro, il valore costante della risoluzione in frequenza non può essere adatto per entrambe;
- per la WT, la finestra temporale utilizzata rimane la stessa solo durante il completamento della sua traslazione sul segnale: i rettangoli di ogni riga sull'asse delle frequenze in Figura 3.8-b hanno infatti la stessa base. Al variare della frequenza indagata, però, la base dei rettangoli varia: rettangoli di righe corrispondenti a basse frequenze hanno basi più lunghe di quelli relativi alle alte frequenze. Per il suddetto principio di Heisenberg, ciò implica che le altezze dei rettangoli varino in modo inversamente proporzionale alle basi.

4. Le nozioni di teoria presenti in questo paragrafo sono tratte da [26]

In questo modo, pur rimanendo costante l'area dei rettangoli, variano i termini del compromesso di risoluzione per ogni tipo di evento che si vuole studiare. In particolare:

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

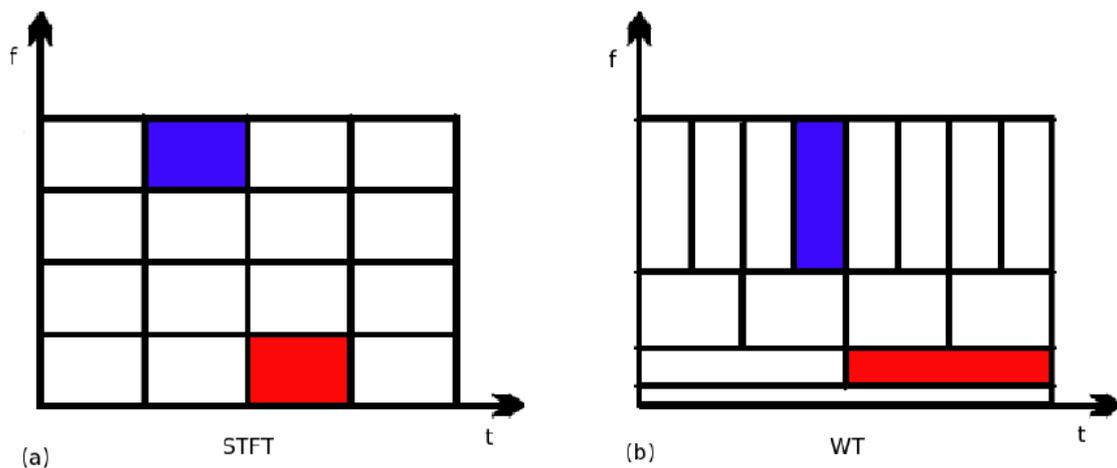


Figura 3.8. Griglie di risoluzione della STFT (a) e WT (b). L'area degli Heisenberg box rimane costante, coerentemente con il principio di indeterminazione, ma in (b) vengono modificate le proporzioni dei lati.

3.3.2 L'EQUAZIONE

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

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

in cui s è il fattore di scala [secondi] e τ la traslazione nel tempo [secondi].

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

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

Analogamente a quanto accade con le trasformate basate sul metodo di Fourier, l'idea alla base di questa operazione è quella che si ottenga un valore relativamente alto dal prodotto di onde aventi frequenze simili: se l'intervallo considerato del segnale contiene un'onda avente frequenza simile a quella della wavelet, il valore del prodotto sarà direttamente proporzionale al livello di somiglianza e all'ampiezza dell'onda nel segnale. L'integrale racchiude poi questo concetto in un unico valore, che viene salvato in un punto del piano s, τ . Si può dire quindi che la (3.6) effettui la mappatura del segnale $x(t)$ nel piano tempo-scala, nel quale il valore di ogni punto (s, τ) è dato dal risultato della (3.6) ottenuto utilizzando la corrispondente $\psi_{s,\tau}$.

3.3.3 LA MOTHER WAVELET

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

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

Nel caso del segnale da LDF, la parte reale della wavelet di Morlet (Fig.3.9- b) è considerata la più adatta per identificare le frequenze di oscillazione del tracciato [5][8][11][12][27][28].

L'equazione di questa curva è:

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

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

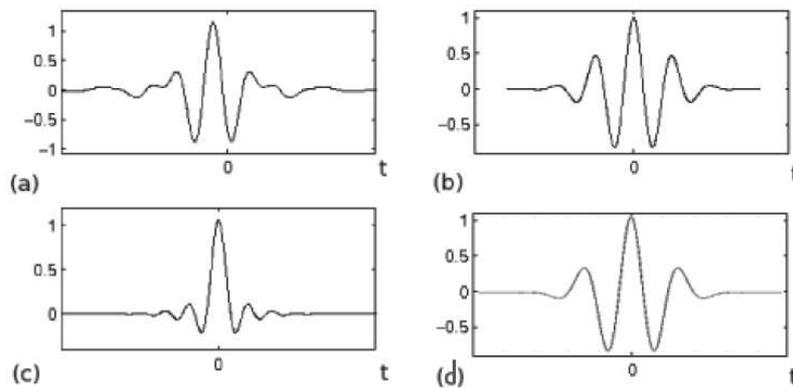


Figura 3.9. Quattro esempi delle possibili forme della mother wavelet: (a) Meyer, (b) Morlet, (c) Mexican hat, (d) Gauss.

3.3.4 LA SCALA

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

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

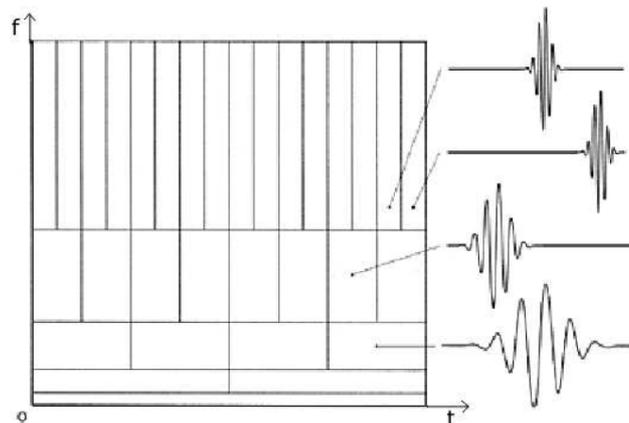


Figura 3.10. Griglia di risoluzione con gli Heisenberg box per la WT: versioni scalate e traslate della *mother wavelet* sono associate ai rettangoli corrispondenti.

DISCRETIZZAZIONE DELLA SCALA

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

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

Si consideri ad esempio un incremento di 0.05 Hz: esso può garantire una buona risoluzione in frequenza se effettuato attorno a 1 Hz, ma non permette di risolvere adeguatamente le frequenze attorno a 0.01 Hz. Al contempo, un incremento di 0.0005 Hz risolverebbe adeguatamente le frequenze intorno a 0.01 Hz, ma effettuato attorno a 1 Hz comporterebbe un dispendio eccessivo di risorse computazionali: sarebbero infatti necessarie 2000 interazioni per raggiungere da tale la frequenza quella di 2 Hz, procedendo con questo step. Incrementare uniformemente s non è però l'unica scelta possibile: nel caso di range molto vasti di frequenze potrebbe convenire, ad esempio, studiare un incremento che obbedisca a una legge di tipo esponenziale.

CORRISPONDENZA SCALA-FREQUENZA

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

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

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

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

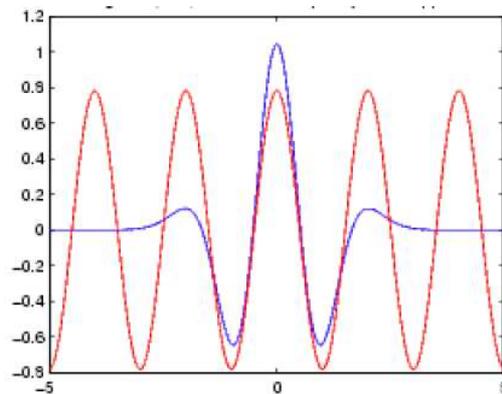


Figura 3.11. Wavelet di derivazione gaussiana (blu) e onda sinusoidale avente frequenza pari alla sua frequenza centrale f_w (in rosso). Le due curve si sovrappongono nella parte centrale della wavelet.

3.3.5 LO SCALOGRAMMA

Per confrontare tra loro i grafici dei coefficienti wavelet, in letteratura ne viene calcolato lo scalogramma [5][8][12]. La formula che lo fornisce è la seguente:

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

Il quadrato del modulo di $W(s, \tau)$ fa sì che i valori dei coefficienti risultino reali e positivi, cosa che non si verifica nella WT a causa dell'andamento oscillante attorno allo zero della wavelet di Morlet; il quadrato di s al denominatore ha invece la funzione di normalizzare le ampiezze della curva. In Figura 3.12 è riportato un segnale dall'andamento variabile a tratti, in corrispondenza al rispettivo scalogramma. In Figura 3.13 è riportata una prospettiva dello scalogramma che evidenzia come le wavelet si adattino alla frequenza che stanno analizzando, isolandone al meglio i contributi.

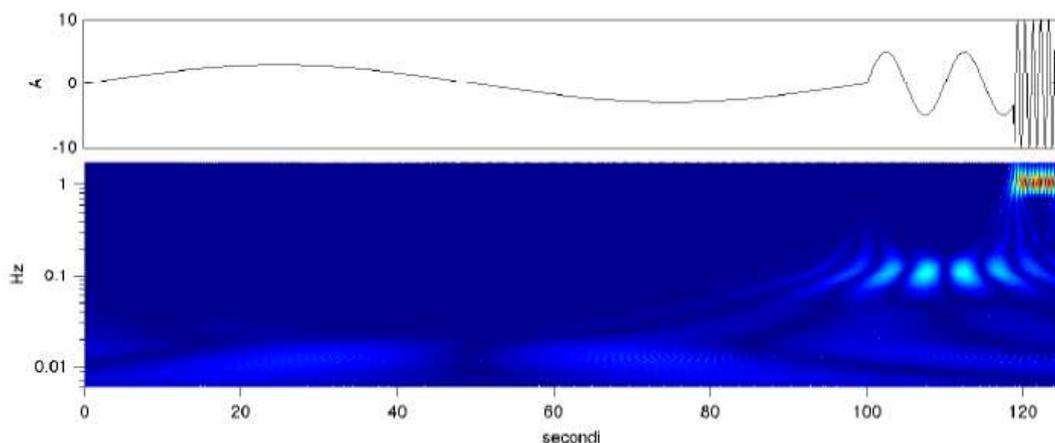


Figura 3.12. Scalogramma risultante dall'applicazione della WT al segnale di Figura 3.4.

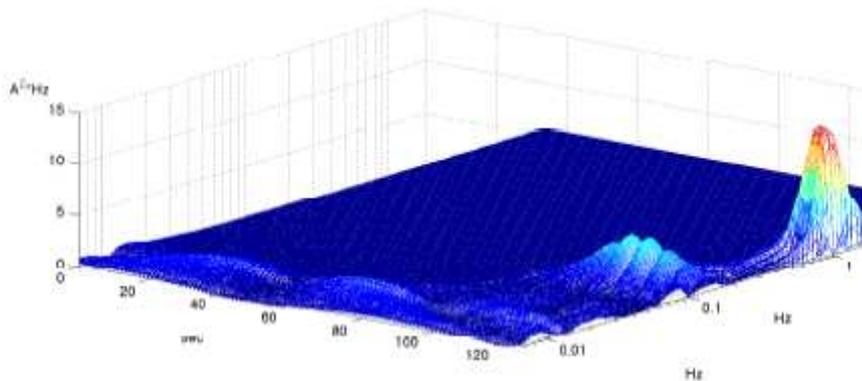


Figura 3.13. Rappresentazione 3D dello scalogramma ottenuto nella Figura 3.12.

UNITÀ DI MISURA

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

Nel caso della WT, poichè:

- $x(t)$ è il segnale originario, ed è misurato in PU;
- ψ è misurata in secondi^{-1/2} (3.5);
- dt è misurato in secondi;

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

Nel caso dello scalogramma, si ha che:

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

quindi, per la (3.9), $S(s, \tau)$ risulta misurato in (PU² \cdot secondi)/secondi² = PU²/secondi ovvero

PU² \cdot Hz.

LETTURA TEMPO-FREQUENZA

Sezioni del grafico di Figura 3.13 parallele all'asse del tempo derivano dall'applicazione della (3.6), in cui una $\psi_{s,\tau}$, avente lo stesso fattore di scala s viene traslata nel tempo (variando τ); il significato di queste sezioni è analogo a quello delle righe della STFT: ognuna di esse indica come varia il contributo dovuto a una certa frequenza lungo il segnale. Nel profilo di ognuna di queste sezioni è riconoscibile la frequenza di oscillazione della wavelet che l'ha generata.

Sezioni del grafico di Figura 3.13 parallele all'asse delle frequenze, relative quindi un tempo fissato, sono composte dai valori ottenuti dalla (3.6) in cui una $\psi_{s,\tau}$, posizionata nello stesso istante $t = \tau$ viene scalata tramite la variazione di s . Quello che si legge in

ognuna di queste sezioni è lo spettro di tutte le frequenze indagate, relativo alla parte di segnale centrata in $t = \tau$: all'aumentare di s la finestra centrata in τ si allarga, adattandosi al valore di frequenza del quale sta misurando il contenuto. La differenza tra una sezione e l'altra indica come cambia lo spettro centrando l'analisi in diversi istanti.

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

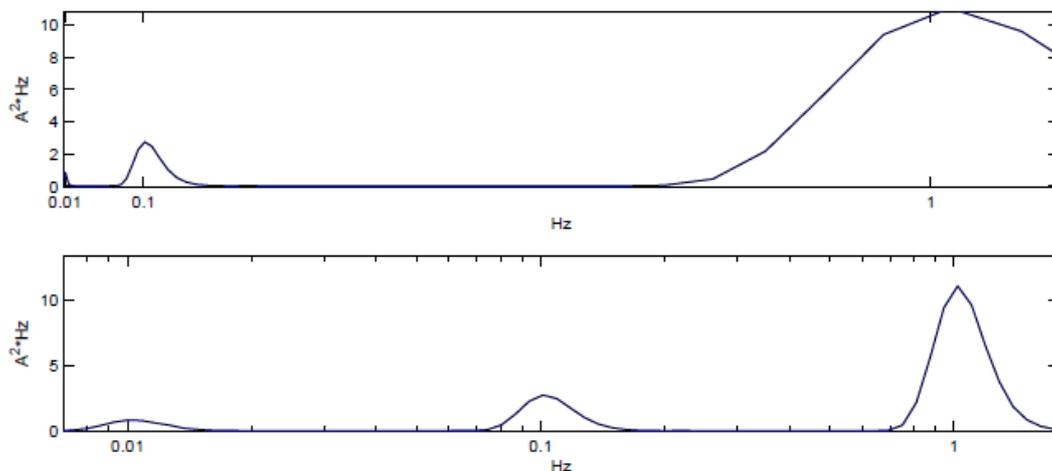


Figura 3.14. Scalogramma di Figura 3.12. mediato lungo l'asse dei tempi, riportato in scala lineare (sopra) e logaritmica (sotto).

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

Confrontando questo grafico con quello di Figura 3.5, ottenuto tramite STFT, è evidente che, applicata a segnali composti da frequenze molto diverse fra loro, la WT fornisce risultati di più semplice interpretazione, soprattutto se rappresentata in scala logaritmica. Questa combinazione di analisi e rappresentazione sarà quindi adottata in seguito durante l'analisi dei dati sperimentali.

CAPITOLO 4

LAVORO SPERIMENTALE

Il lavoro sperimentale si configura come parte di uno studio osservazionale su di un gruppo di pazienti affetti da arteriopatia che si sono recati presso la struttura ospedaliera di Padova nell'anno 2012. Il lavoro è basato sull'acquisizione dei segnali LDF e sulla contestuale registrazione dell'andamento dei segnali di pressione transcutanea di ossigeno ($tcpO_2$) e di anidride carbonica ($tcpCO_2$). In particolare, ai pazienti è stata applicata una sonda termica in grado di riscaldare il sito di applicazione locale fino ad una temperatura di 44° C. In tutti i pazienti le sonde sono state posizionate sulla zona dorsale del piede, in quanto questa zona è critica per tutti gli arteriopatici: la carenza di afflusso sanguigno dovuta ad occlusioni, oltre a causare dolore a livello muscolare, si riflette pesantemente a livello del microcircolo cutaneo.

Il segnale LDF acquisito con questo particolare tipo di esame, che è non invasivo e semplice da eseguire, riflette la variazione di temperatura indotta dalla sonda. Ad una prima osservazione del segnale, si riesce subito a notare quali siano gli effetti derivanti dal riscaldamento locale. Infatti analizzando il segnale di perfusione si può osservare il tipico comportamento bifasico [29], con tre intervalli distinti:

- intervallo a temperatura basale: nella parte iniziale la sonda termica è spenta e il segnale rimane sostanzialmente stabile;
- transitorio: non appena la sonda termica viene accesa e produce il riscaldamento desiderato, il segnale subisce un innalzamento ed ha una fase di crescita più o meno rapida nell'arco di qualche minuto;
- intervallo a temperatura di 44° C: dopo la fase di crescita, il segnale raggiunge una fase di plateau e torna ad essere stabile attorno a valori che però sono più elevati di quelli di partenza.

Su tutti i pazienti è stata eseguita una opportuna rimozione degli artefatti nei segnali registrati, che ha richiesto una procedura ad hoc. Successivamente ogni segnale è stato diviso nei tre intervalli sopracitati ed è stata eseguita l'analisi in frequenza con trasformata Wavelet su ciascuno di essi [5][8][10][11][12][27][28].

In seguito, i pazienti sono stati suddivisi in tre gruppi in base al valore di pressione transcutanea di ossigeno ($tcpO_2$) che, come impone la pratica clinica, viene misurata a 44° C. Si è assunto il valore di 30 mmHg come valore di prima soglia: al di sotto di questo valore i pazienti vengono considerati critici, in quanto i tessuti ricevono una quantità di ossigeno inferiore al fabbisogno, per cui si instaura uno stato di sofferenza nei tessuti del piede, che può portare, nei casi più estremi, a necrosi. Come seconda soglia si è assunto il valore di 50 mmHg che, nella pratica clinica, viene considerato il valore al di sopra del quale i pazienti non hanno problemi gravi ma di lieve entità.

Per ogni gruppo di pazienti (< 30 mmHg, tra 30 e 50 mmHg, > 50 mmHg) sono stati effettuati test statistici, in modo da poter verificare se le differenze nei risultati siano significative o meno.

4.1 I PAZIENTI

Come detto, i 22 pazienti osservati, sia di sesso maschile che femminile, sono stati suddivisi in 3 gruppi:

- *Gruppo A*: 6 pazienti con un valore di $tcpO_2$ inferiore a 30 mmHg.
- *Gruppo B*: 8 pazienti con un valore di $tcpO_2$ compreso tra 30 e 50 mmHg.
- *Gruppo C*: 8 pazienti con un valore di $tcpO_2$ superiore a 50 mmHg.

Per tutti i pazienti è stata effettuata un'acquisizione sola del segnale, di durata superiore ai 20 minuti. La sonda è stata applicata sulla zona dorsale del piede, con il paziente disteso su un lettino per tutta la durata dell'esame.

4.2 CARATTERISTICHE DELLO STRUMENTO

Lo strumento utilizzato per acquisire i segnali analizzati in questo lavoro è il Periflux System 5000, della ditta svedese Perimed. La sorgente laser consiste in un diodo allo stato solido ed emette luce nel campo dei rossi visibili avente energia di 2 mW e 780 nm di lunghezza d'onda. La sonda utilizzata con il Periflux5000, la Probe 457 (Figura 4.8) ha una separazione tra le fibre di invio e di ricezione di 0.25 mm e, insieme alle altre caratteristiche della configurazione sperimentale adottata, comporta una profondità di misura dell'ordine di 0.5-1 mm. Il segnale è campionato a una frequenza di 16 Hz.



Figura 4.1 Lo strumento usato per le acquisizioni: il Periflux 5000 (Perimed, Svezia).

Come si può osservare dalla Figura 4.1 lo strumento presenta 4 moduli separati, che permettono di rilevare 4 segnali diversi: perfusione cutanea, tcpO₂, tcpCO₂ e valore di temperatura imposto alla sonda.

In Tabella 4.1 è riportata la descrizione riassuntiva della configurazione sperimentale adottata per le misurazioni. Il software fornito con lo strumento salva i segnali, ciascuno in una colonna di un foglio Excel, contenente tutte le informazioni sull'acquisizione: data, ora, codice ID del paziente, nome dell'operatore e settaggio dei parametri strumentali. In Figura 4.2 è rappresentata la schermata che compare all'operatore durante l'acquisizione del segnale.

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

Tabella 4.1 Descrizione riassuntiva della configurazione dello strumento Periflux 5000.

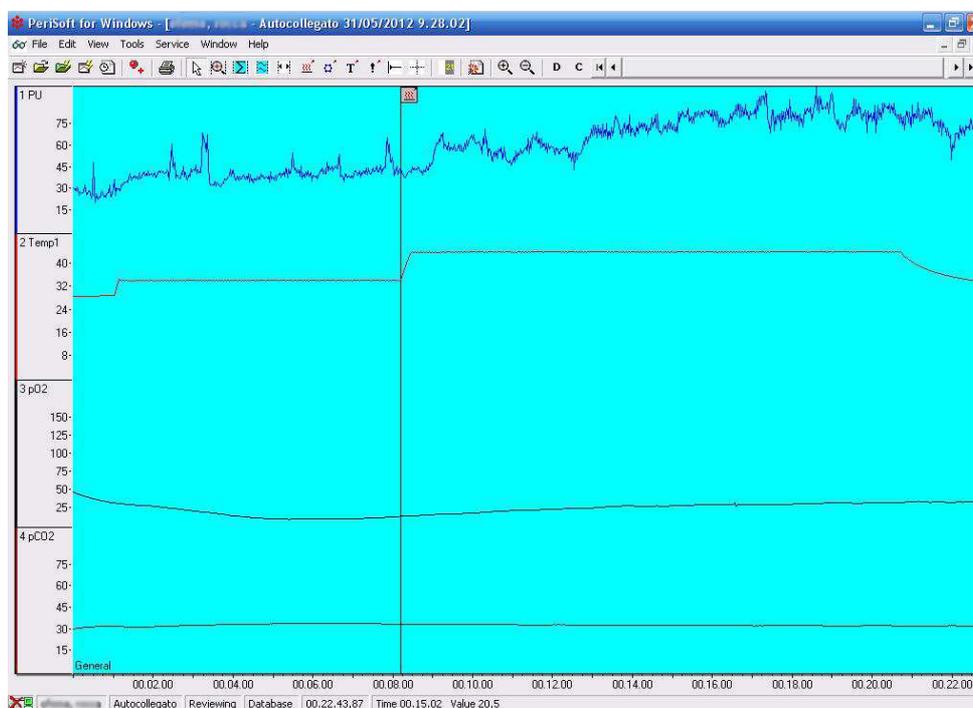


Figura 4.2. Schermata del software usato per l'acquisizione dei dati: si possono distinguere i quattro segnali acquisiti.

4.3 DURATA DELL'ACQUISIZIONE

La più bassa frequenza che si analizza è di 0.005 Hz, quindi una forma d'onda appartenente alla banda epiteliale necessita di un tempo minimo per manifestarsi, pari a $1/0.005 = 200$ secondi; con una frequenza di campionamento di 16 Hz si tratta di circa 3200 campioni. Poiché l'algoritmo di calcolo estrae il comportamento in frequenza medio durante la durata dell'acquisizione, più la registrazione si estende nel tempo più l'andamento estratto si avvicina al vero comportamento medio del segnale: vista la dinamicità del fenomeno, esistono infatti finestre temporali del segnale in cui un'onda avente una certa frequenza può risultare particolarmente ampia o particolarmente ridotta. Mediare tra loro i coefficienti di ogni frequenza relativi alle diverse porzioni di segnale ha lo scopo quindi di attenuarne le diversità dovute a eventi singolari, evidenziandone le caratteristiche comuni dovute a eventi che si ripresentano nel tempo. Per questa ragione, più numerosi sono i periodi di un'onda a una certa frequenza contenuti nel segnale, più affidabile è la stima del relativo coefficiente: a basse frequenze (corrispondenti a periodi lunghi) la brevità del segnale porta a stime della media basate su pochi periodi dell'onda, quindi meno affidabili.

Affinché un'onda sia considerata un evento ripetitivo e non una casualità, è necessario che si manifesti almeno sei volte nel tracciato registrato. Da ciò segue che se si vuole analizzare il segnale, o una sua porzione, fino alla banda epiteliale con la frequenza più bassa è necessario che la durata sia di almeno $200 \times 6 = 1200$ secondi, ovvero 20 minuti. Se la parte di segnale di cui si dispone è di durata inferiore, si potranno analizzare con affidabilità solo le bande di frequenza relative alle attività che presentano frequenze più rapide.

Nell'ambito di questo lavoro, il segnale (di durata complessiva pari a 20 minuti) è stato suddiviso in tre intervalli distinti, per cui non è stato possibile analizzare tramite trasformata wavelet tutte le bande di frequenza: l'analisi ha dovuto escludere l'attività endoteliale, associata alle frequenze più lente.

4.4 ARTEFATTI DA MOVIMENTO

Poiché il segnale LDF è particolarmente sensibile ai possibili disturbi dovuti al movimento, è stato richiesto a ciascun paziente di rimanere immobile durante l'acquisizione. Questa richiesta non è facilmente adempibile in presenza di arteriopatia periferica: la carenza di afflusso sanguigno ai tessuti, soprattutto ai muscoli, provoca infatti dolori a riposo, e la mancanza di movimento dell'arto è un fattore che amplifica questo fenomeno. Questo comporta che il paziente possa compiere inavvertitamente piccoli movimenti con il piede. La sonda, molto sensibile agli spostamenti, registra i movimenti come picchi (spike) nel tracciato, che generalmente terminano nel giro di pochi secondi (Figura 4.3). L'andamento oscillatorio del segnale sembra tuttavia conservarsi, e il picco semplicemente si addiziona al segnale normale.

La rimozione dell'artefatto è una procedura delicata: infatti non è possibile "tagliare" semplicemente la parte del segnale e rimuoverla, perché così facendo si modificherebbe la lunghezza delle oscillazioni; ne deriverebbero informazioni errate da tutte le wavelet che si sovrappongono ai due campioni adiacenti al segnale troncato. La soluzione migliore è quella di costruire un algoritmo che riconosca gli spike e ne riduca l'ampiezza, in modo che il loro contributo pesi il meno possibile nello spettro finale.

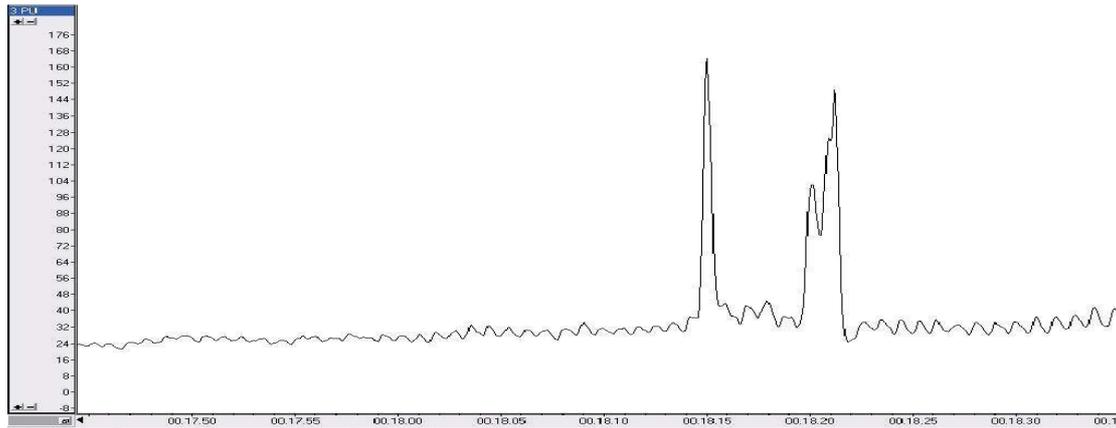


Figura 4.3. Finestra temporale in cui sono presenti due spike dovuti ad artefatti da movimento.

4.5 IL CODICE

4.5.1 STRUTTURA PRINCIPALE DEL PROGRAMMA

Il programma che elabora i dati è stato scritto in ambiente Matlab, ed è strutturato in modo che ad ogni passo dell'analisi corrisponda una precisa sub-routine, al fine di procedere nell'analisi per gradi. I dati in ingresso vengono forniti in formato Excel, direttamente dal programma di acquisizione di dati, in maniera ordinata per colonne.

4.5.2 INSERIMENTO DEI DATI

Tutti i dati di ogni acquisizione si trovavano salvati in un unico foglio Excel, disposti per colonne. Per questo, in Matlab i dati devono essere letti con l'apposito comando `xlsread`.

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

In seguito si sono suddivisi i dati in singoli vettori, contenenti i valori del tracciato LDF di ogni singolo paziente utilizzando i comandi `'eval'` e `'num2str'` per generare automaticamente i nomi delle variabili:

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

Ad ogni vettore è quindi assegnato un nome contenente il numero del paziente al quale si riferiscono. Talvolta il software di acquisizione, nel generare il foglio di dati in Excel, può inserire dei NaN nella coda del segnale. Per questo si è proceduto con una troncatura del segnale in tutti i casi in cui ciò si fosse verificato.

4.5.3 VISUALIZZAZIONE DEI DATI

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

```
1   t=[0: 1/Fc: length(signal)/Fc];
```

4.5.4 RIMOZIONE DEGLI ARTEFATTI DA MOVIMENTO

Da una prima visualizzazione dei dati, si è notato che gli artefatti da movimento di cui si è parlato al paragrafo 4. 4 sono presenti nella totalità delle acquisizioni. In Figura 4.3 si può notare come le onde a frequenze più elevate del segnale oscillino entro un intervallo verticale che segue l'andamento delle onde più lente. Gli spike sono generalmente isolati e si differenziano dal resto del segnale uscendo bruscamente dal suddetto intervallo: qui il segnale compie qualche oscillazione per poi ritornare all'interno del range in modo meno brusco ma comunque rapido.

Si è pensato quindi di scrivere una function chiamata `polyfitting_sing` apposita, chiamata per far compiere al programma i seguenti passaggi:

- approssimare l'intero segnale con una funzione polinomiale che riesca a seguire l'andamento delle onde più lente e che sia influenzata il meno possibile dagli spike (linea rossa continua in Figura 4.4). Il grado di tale funzione che costituisce il compromesso migliore è pari a 20;
- fissare una soglia di tolleranza s che crei un range sopra e sotto la polinomiale oltre il quale il segnale viene identificato come uno spike (linee rosse tratteggiate);
- in seguito si scorre il segnale finché non si incontra un valore x fuori soglia; a questo punto l'algoritmo:
 - salva in un vettore vet il valore x e tutti i successivi, finché il segnale non ritorna entro la soglia;
 - estende vet in modo da comprendere la parte ascendente e quella discendente dello spike, che si trovano ancora entro s ;
 - calcola un coefficiente $coef$ che, moltiplicato per il valore massimo dello spike, lo ridimensiona riportandolo entro la soglia. Tale coefficiente vale

- $coef = s / max_out$; con max_out pari allo scostamento tra il punto di picco e il valore della polinomiale in quel punto;
- moltiplica vet per $coef$, e lo sostituisce al segmento di segnale corrispondente;
- continua a scorrere il segnale fino alla fine. In caso si trovi un altro valore fuori dalla soglia si riapplica l'algoritmo del punto precedente.

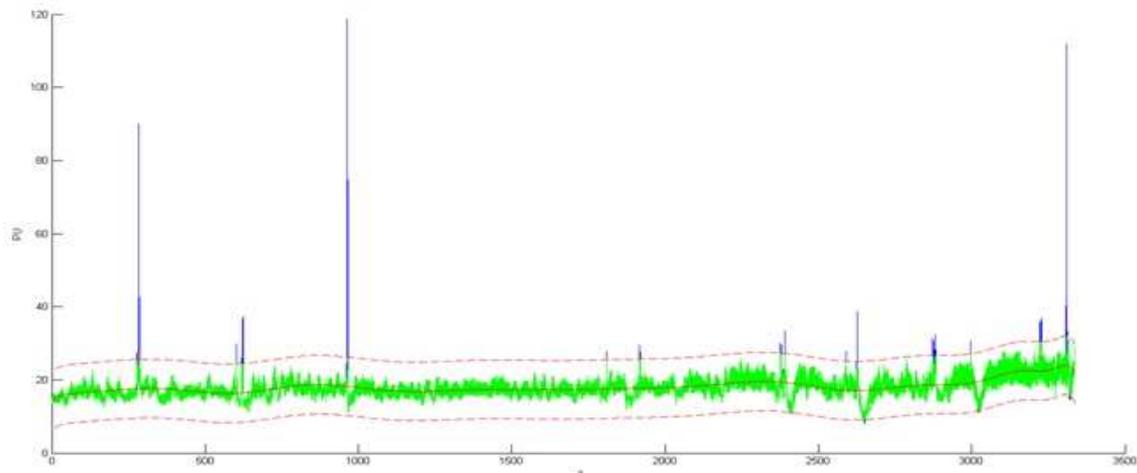


Figura 4.4. Segnale LDF acquisito (in blu), soglie di tolleranza (linee tratteggiate rosse) e, sovrapposto, segnale finale ripulito dagli artefatti (in verde).

Questa procedura si applica perfettamente per segnali di perfusione; per i segnali in cui viene applicata la stimolazione termica, si pone il problema di trovare la soglia ottima. Infatti la function `polyfitting_sing` prevede che il valore di soglia sia univoco, quindi per tracce come quella in Figura 4.5, dove le ampiezze delle onde crescono nel tempo, si pone il problema di scegliere un appropriato valore di soglia.

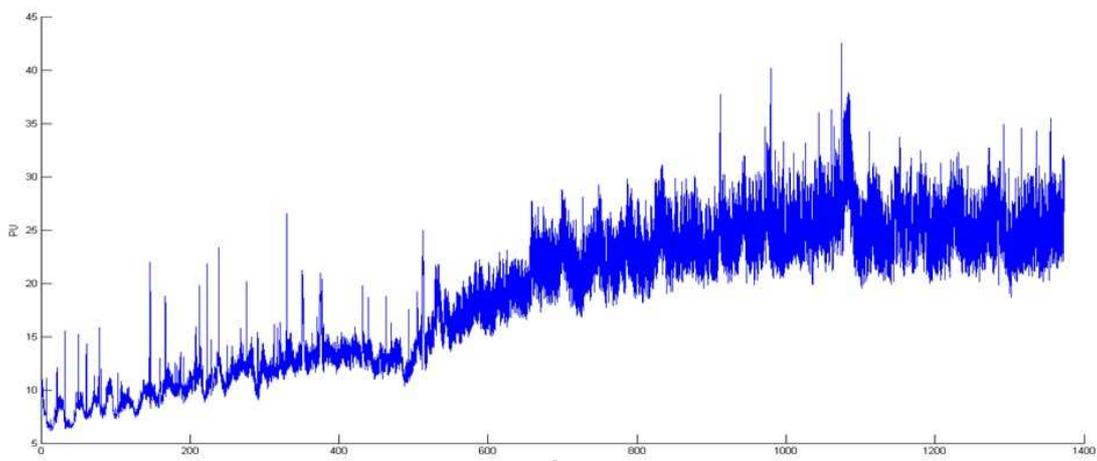


Figura 4.5. Il tipico andamento di un segnale LDF con riscaldamento locale della cute: l'ampiezza del segnale si modifica nel tempo e nel tratto finale è molto più elevata rispetto al tratto iniziale.

Se si prende un valore “piccolo”, basandosi sulla prima parte del segnale, si eliminano in maniera efficace gli spike; nella parte finale non solo si eliminano i picchi dovuti agli artefatti, ma anche parte del segnale che contiene informazioni utili, come si evince dalla Figura 4.6.

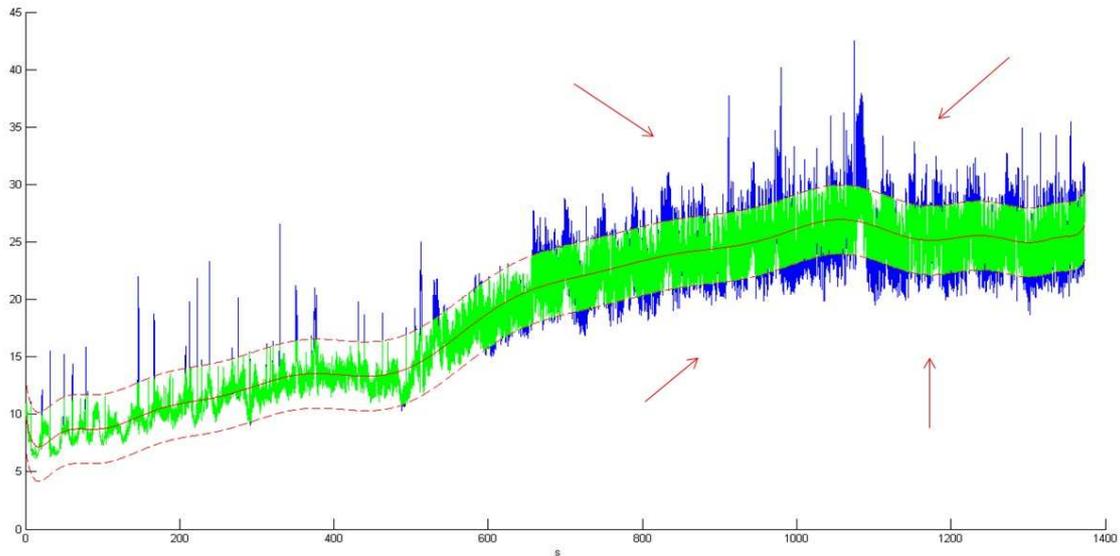


Figura 4.6. Usando un valore di soglia troppo piccolo, nella parte finale del segnale vengono eliminate parti di informazioni utili (indicate dalle frecce rosse).

Prendendo allora un valore “grande”, in modo da non eliminare parte utile del segnale, il metodo si rivela non abbastanza selettivo per la prima parte del segnale, dove gli spike non vengono eliminati ma solo attenuati (Figura 4.7.).

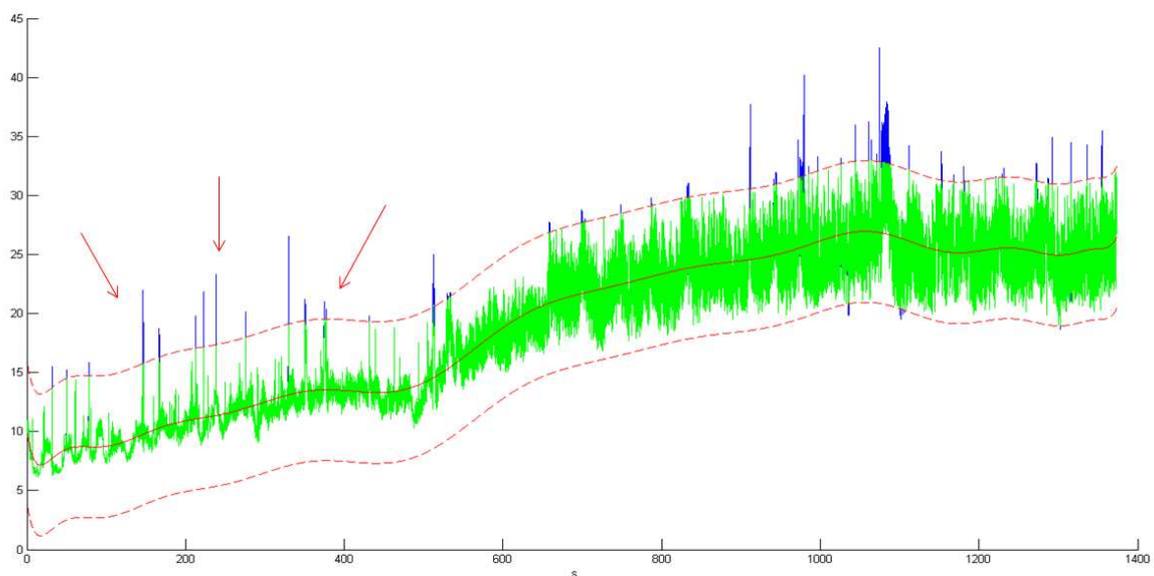


Figura 4.7. Con una soglia troppo grande nella parte iniziale del segnale LDF non si eliminano del tutto gli spike (indicati dalle frecce rosse).

Per ovviare a questi inconvenienti è stata allora messa a punto una procedura che permette di individuare più valori di soglia per un singolo tracciato LDF (Figura 4.8.), in modo che vengano eliminati gli artefatti in maniera efficace senza perdita di informazione.

Questo viene svolto dalla function `adaptive_offset` che agisce sul segnale nel seguente modo:

- divide il segnale in segmenti di lunghezza pari a 2 minuti, ovvero $120 \times 16 = 1920$ campioni ciascuno;
- per ogni segmento calcola la differenza tra il segnale acquisito e il valore corrispondente della polinomiale di grado 20 che approssima il segnale stesso; i valori più alti ottenuti così apparterranno agli spike;
- per trovare il valore di soglia, si calcola il valore medio delle differenze, escludendo i valori ottenuti dagli spike;
- si applica la function `polyfitting_sing` per eliminare gli artefatti, usando come soglia s quella trovata con questo metodo.

L'utente ha la possibilità di aumentare o diminuire la soglia per ogni singolo segmento dopo ispezione visiva, introducendo un coefficiente che viene letto dalla tastiera, in modo da eliminare in maniera ancora più efficace gli spike.

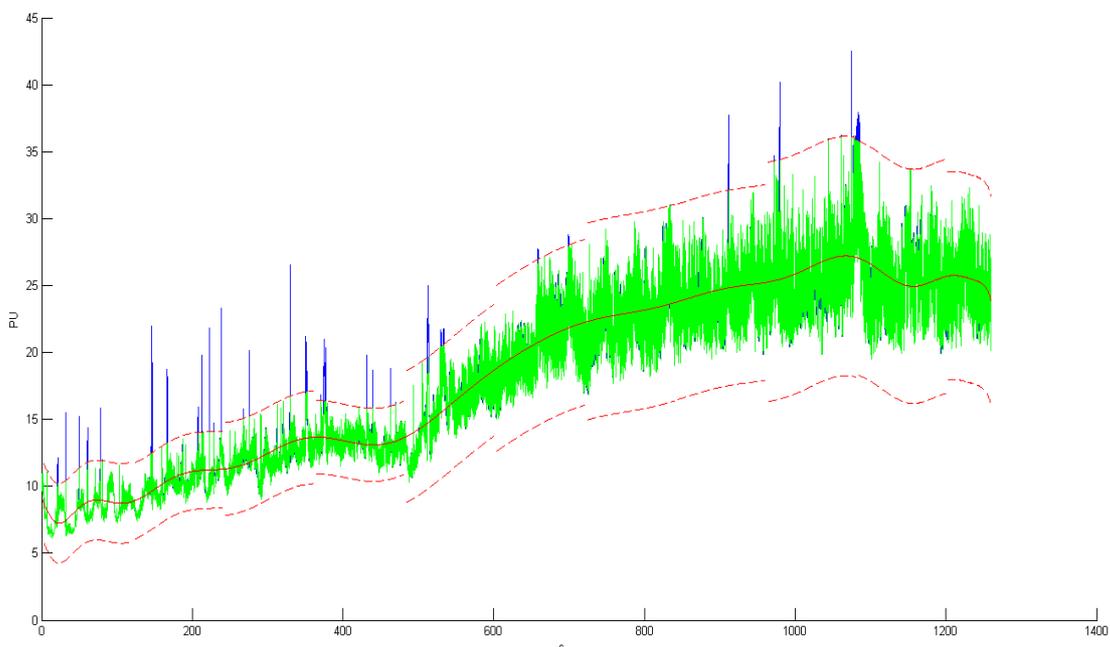


Figura 4.8. Eliminazione degli artefatti con sogliatura multipla.

4.5.5 DIVISIONE DEL SEGNALE LDF IN TRE SEGMENTI

In seguito si è proceduto con la suddivisione del segnale LDF, opportunamente filtrato, nei 3 intervalli caratteristici, come già illustrato nell'introduzione di questo Capitolo (Figura 4.9).

Questo compito viene svolto dalla function chiamata `istant_finder`:

- la prima parte (intervallo a temperatura basale) è di facile individuazione: nei dati registrati dal software di acquisizione è precisato l'istante temporale in cui la sonda termica si attiva ed aumenta la temperatura localmente (chiamato `ist1` nella function di Matlab). Semplicemente si aggiungono gli istanti temporali di tutti i pazienti, fornendoli attraverso un vettore, e il programma esegue il troncamento del segnale LDF;
- la seconda parte (transitorio) parte dall'istante in cui si attiva la sonda termica (`ist1`) e finisce nel momento in cui il segnale smette di crescere. Per individuare questo istante in ogni paziente, il programma procede così: prende la funzione polinomiale calcolata precedentemente, ne calcola la derivata e trova il primo istante in cui essa si annulla dopo che si è accesa la sonda termica. In pratica trova il punto di picco a cui il segnale giunge e lo identifica come istante finale per questa parte (`ist2`);
- la terza parte (intervallo a temperatura di 44° C), banalmente, parte dall'istante calcolato al punto precedente (`ist2`) ed arriva fino alla fine dell'acquisizione.

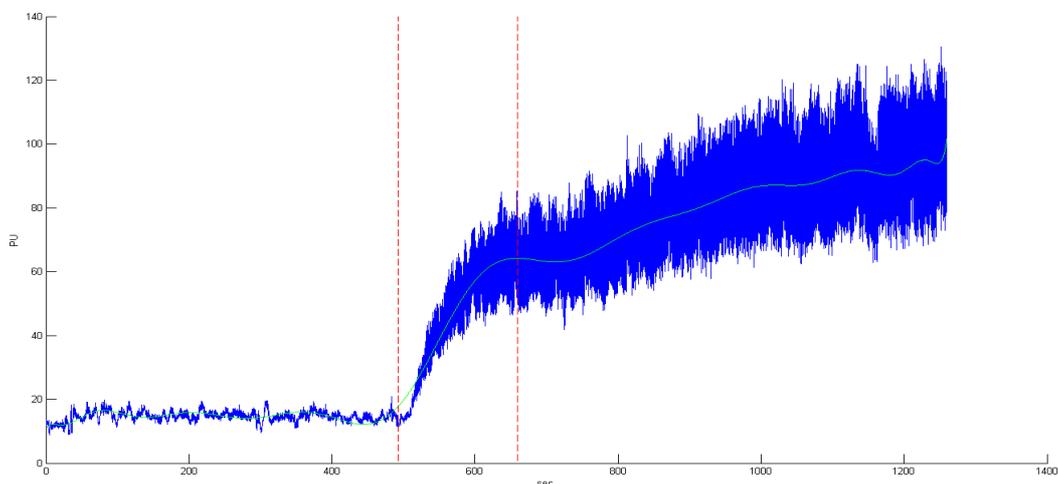


Figura 4.9. Grafico del tracciato LDF suddiviso in 3 intervalli (delimitati dalle linee rosse tratteggiate).

4.5.6 APPLICAZIONE DELLA TRASFORMATATA WAVELET

Dopo aver proceduto con l'individuazione e suddivisione in tre parti del segnale, si passa all'applicazione della trasformata wavelet per ogni singolo segmento. La function `wwt`, messa a punto in collaborazione con il gruppo della Prof.ssa Aneta Stefanovska

(Università di Lancaster, UK), richiede di passare il segnale da analizzare (`SF_Paziente_1`), la frequenza di campionamento (`Fc`) ed eventuali opzioni:

```
1 [WT_Paziente, freq,
wpow]=wwt(SF_Paziente_1,SF_Paziente_1,Fc,'plot','on');
```

e fornisce in output:

- la trasformata wavelet (WT) del segmento di segnale (`WT_Paziente`);
- le frequenze corrispondenti alle righe della WT (`freq`);
- i valori di potenza per ogni frequenza (`wpow`);
- un grafico (Figura 4.10) con tre finestre, ognuna delle quali contiene: il segnale fornito in ingresso, lo scalogramma ottenuto e le potenze calcolate per ogni frequenza. Di default il programma fornisce il grafico, ma è possibile disabilitarlo/abilitarlo tramite il comando opzionale `'plot', 'off/on'`.

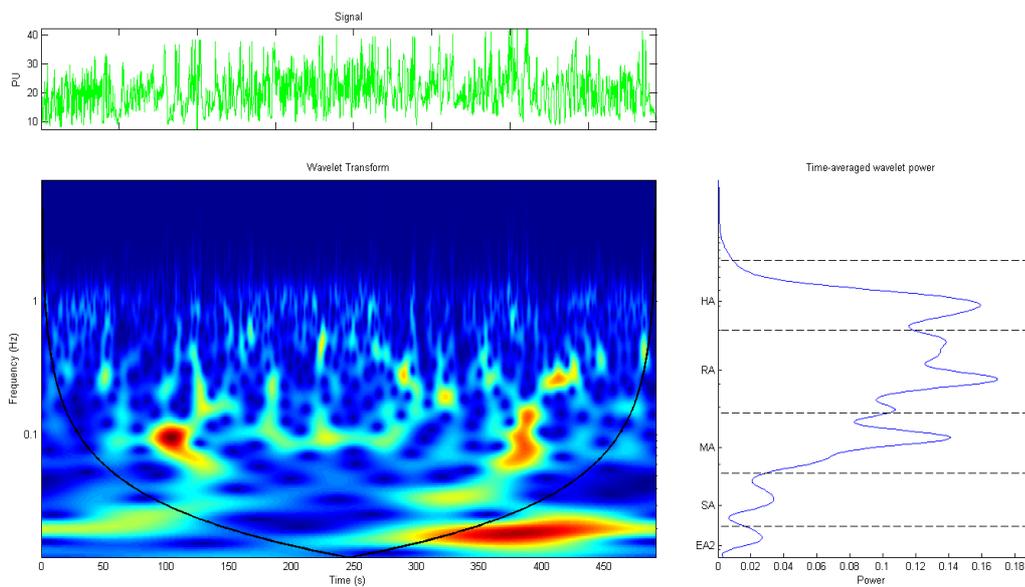


Figura 4.10. Nel riquadro in alto, in verde, è visualizzato il segnale sul quale si applica la WT, nel riquadro più grande, colorato, è presente lo scalogramma, mentre nel grafico in basso a destra sono raffigurati i valori di potenza per ogni frequenza analizzata.

E' interessante notare la linea ondulata nera che compare nello scalogramma: è il "cono di influenza", ossia (come già spiegato nel Capitolo 3) il range di coefficienti della wavelet che vengono utilizzati per calcolare la potenza. I valori al di fuori di questo cono vengono impostati come NaN e trascurati.

All'interno del programma questa function viene usata assieme al comando `eval`, in modo che all'interno di un ciclo `for` sia possibile applicare la WT per tutti i segmenti di tutti i pazienti.

4.5.7 CALCOLO DI AMPIEZZA E POTENZA

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

La function `wap` esegue i calcoli necessari:

```
[wpow,wamp,intpow,intamp]=wap(WT_Paziente,freq,[0.005,0.0095;0.0095,0.02;0.02,0.06;0.06,0.2;0.2,0.6;0.6,2]);
```

In ingresso bisogna fornire:

- i coefficienti della trasformata wavelet calcolati con `wwt (WT_Paziente)`;
- le frequenze corrispondenti (`freq`);
- opzionalmente, i valori degli intervalli di frequenza in cui si vogliono calcolare separatamente ampiezza e potenza.

Nel caso in esame, vengono forniti i valori caratteristici associati alle bande di frequenza (cardiaca, respiratoria, miogena, neurogena, endoteliale 1 ed endoteliale 2), poiché sono quelli su cui si concentra la ricerca.

In uscita la function restituisce:

- la potenza calcolata per ogni frequenza (`wpow`);
- l'ampiezza calcolata per ogni frequenza (`wamp`);
- la potenza calcolata solo per gli intervalli che sono stato immessi come opzione (`intpow`). Nel presente caso si avranno 6 valori;
- l'ampiezza calcolata solo per gli intervalli che sono stato immessi come opzione (`intamp`).

Con poche righe di codice è possibile ottenere un grafico che rappresenta i valori ottenuti sia per l'ampiezza che per la potenza (Figura 4.11) per ogni tratto di segnale:

```
1 figure
2 hold all;
3 plot(freq_1,wamp_1,'b');
4 plot(freq_2,wamp_2,'g');
5 plot(freq_3,wamp_3,'r');
6 ylabel('Amplitude');
7 legend('parte lineare iniziale','parte crescente','parte
finale')
```

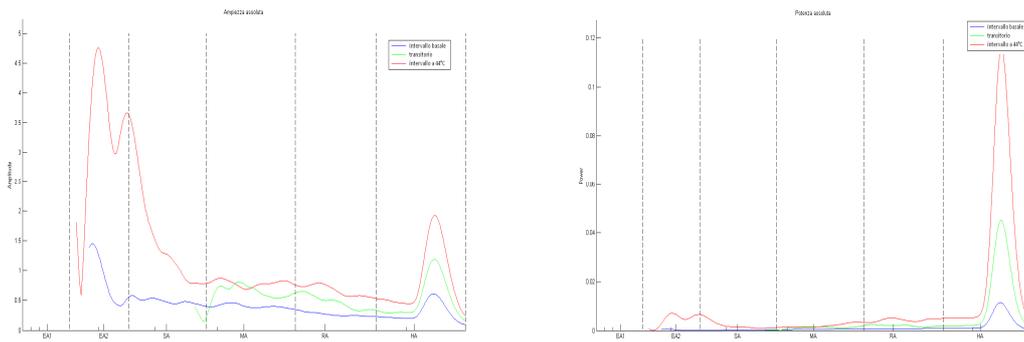


Figura 4.11. Grafico dell'ampiezza (a sinistra) e grafico della potenza (a destra), con l'andamento per ognuno dei 3 intervalli di segnale.

4.5.8 CALCOLO DI AMPIEZZA E POTENZA RELATIVE E PERFUSIONE MEDIA

Per approfondire ulteriormente le analisi ed avere ancor più dati a disposizione, si è proceduto col calcolare anche i valori di ampiezza relativa, potenza relativa e perfusione media per ognuno degli intervalli in cui è stato suddiviso ogni segnale LDF.

Per ottenere ampiezza e potenza relative bastano poche righe di codice, nelle quali si divide il valore di ogni singola banda per la somma dei valori di tutte le bande.

Ad esempio, per la potenza relativa della banda cardiaca (HA) si è proceduto così:

```

1   intpow_TOT_HA=intpow_1(6) +intpow_2(6) +intpow_3(6);
2   intpow_1_rel_HA= intpow_1(6)/intpow_TOT_HA;
3   intpow_2_rel_HA= intpow_2(6)/intpow_TOT_HA;
4   intpow_3_rel_HA= intpow_3(6)/intpow_TOT_HA;

```

Per la perfusione media di ogni intervallo di segnale, si è usata la funzione mean presente nel database di Matlab, e si è ottenuto un valore medio per la parte iniziale e per la parte finale, mentre per la parte centrale lo si è tralasciato, vista la sua scarsa significatività. E' stato prodotto anche un grafico (Figura 4.12) che permette di visualizzare i valori così calcolati.

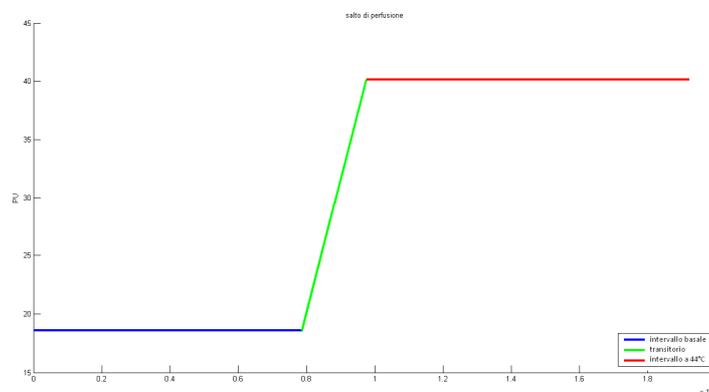


Figura 4.12. Grafico rappresentante i valori medi di perfusione, e il relativo salto che si ottiene tramite il riscaldamento locale.

4.5.9 DIVISIONE IN GRUPPI ED ANALISI STATISTICA

Una volta eseguiti i calcoli ed estratti i valori utili sulla totalità dei pazienti in esame, si è proceduto nella suddivisione dei dati nei tre gruppi (< 30 mmHg, tra 30 e 50 mmHg, > 50 mmHg), in modo da poter poi eseguire un'analisi di tipo statistico.

Tramite la function `boxplot_maker`, si sono presi i valori fin qui calcolati (opportunamente salvati passo dopo passo tramite il comando `save`) e divisi in vettori in modo da avere i dati suddivisi in gruppi omogenei. Dopo aver fatto ciò, il passo successivo è stato di produrre dei boxplot (Figura 4.13) per ogni gruppo relativo ai valori di ampiezza relativa, potenza relativa, perfusione media calcolati nei 3 intervalli del segnale LDF.

Ad esempio, per la banda cardiaca, relativamente al Gruppo A:

```
1 figure
2 boxplot(intpow_HA_under30)
3 title('boxplot delle 3 parti di segnale - Banda cardiaca -
  POTENZA - Pazienti con tcpO2 < 30')
```

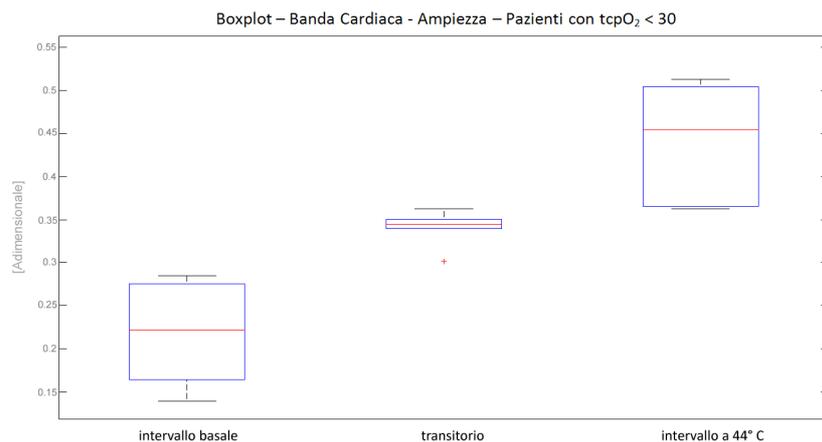


Figura 4.13. Boxplot relativo alla potenza della banda cardiaca per il Gruppo A (Pazienti con $tcpO_2 < 30$).

Come ultimo passo, al fine di valutare la significatività statistica della differenza tra le mediane di ogni gruppo, il test di Wilcoxon è stato applicato ai vettori di dati omologhi per gli stessi segmenti di segnale. In Matlab è presente già il comando `ranksum` che esegue i calcoli e fornisce in output il valore binario h ($h=1$, i dati sono significativamente diversi; $h=0$, l'ipotesi che siano distribuzioni di dati diverse viene rifiutata) e il p value così calcolato.

Ecco sempre un esempio di come è stata applicata relativamente alla potenze della banda cardiaca:

```
1 [p1 h1]= ranksum(intpow_HA_gruppoA(:,1),intpow_HA_gruppoB(:,1));
2 [p2 h2]= ranksum(intpow_HA_gruppoA(:,2),intpow_HA_gruppoB(:,2));
3 [p3 h3]= ranksum(intpow_HA_gruppoA(:,3),intpow_HA_gruppoB(:,3));
```

```

4 [p4 h4]= ranksum(intpow_HA_gruppoB(:,1),intpow_HA_gruppoC(:,1));
5 [p5 h5]= ranksum(intpow_HA_gruppoB(:,2),intpow_HA_gruppoC(:,2));
6 [p6 h6]= ranksum(intpow_HA_gruppoB(:,3),intpow_HA_gruppoC(:,3));

```

4.6 RIASSUNTO DEI DATI SALVATI E DEI GRAFICI PRODOTTI

Alla fine dell'esecuzione dell'intero programma, con tutte le function elencate precedentemente (paragrafo 4.5), sono state prodotte e salvate le seguenti figure per ogni paziente:

- il grafico del segnale LDF ripulito dagli artefatti di movimento e con le relative soglie di tolleranza usate;
- il grafico del segnale LDF ripulito dagli artefatti di movimento, suddiviso nei 3 intervalli ;
- un riquadro contenente 3 grafici: lo scalogramma ottenuto con la WT, il segnale su cui è stato calcolato, e lo spettro di potenza ottenuto, per ognuno dei 3 intervalli;
- il grafico dell'ampiezza calcolata per ogni frequenza;
- il grafico della potenza calcolata per ogni frequenza;
- Il grafico rappresentante i valori di perfusione media nei tratti iniziale e finale, con la relativa variazione di perfusione ;
- il boxplot comparativo della distribuzione di ampiezza per ogni gruppo, relativo alle 3 bande di frequenza considerate;
- il boxplot comparativo della distribuzione di potenza per ogni gruppo, relativo alle 3 bande di frequenza considerate;
- il boxplot comparativo della distribuzione di perfusione per ogni gruppo, relativo alle 3 bande di frequenza considerate;
- Il boxplot comparativo degli intervalli all'interno della stessa banda, per ogni gruppo.

Inoltre il programma, alla fine di ogni function, ha proceduto nel salvare i dati, per cui alla fine si trovano nel workspace di Matlab i seguenti valori per ogni paziente:

- segnale LDF ripulito dagli artefatti di movimento;
- gli istanti di inizio e fine del transitorio;
- i coefficienti della trasformata wavelet;
- le frequenze associate ai coefficienti della trasformata wavelet;
- la potenza calcolata negli intervalli delle bande associate alle attività fisiologiche;
- l'ampiezza calcolata negli intervalli delle bande associate alle attività fisiologiche;
- la perfusione media dell'intervallo a temperatura basale e a 44° C;
- i valori p value ottenuti dal test di Wilcoxon.

CAPITOLO 5

RISULTATI E DISCUSSIONE

Nel seguito vengono esposti i risultati dell'analisi effettuata per tutti i pazienti oggetti dello studio. In particolare, per ogni paziente e per ogni intervallo del segnale (a temperatura basale, transitorio, a 44° C), vengono riportati: il segnale LDF filtrato, il corrispondente scalogramma, la variazione di perfusione, l'ampiezza e la potenza per tutte le bande di frequenza.

Dopo aver esposto i dati di ogni paziente, per ogni gruppo di pazienti vengono riportati i valori medi e, sotto forma di boxplot, le distribuzioni dei valori di ampiezza e potenza per la banda cardiaca, neurogena e miogena, oltre ai dati di perfusione. Vengono poi riportati i p-value che indicano la significatività statistica delle differenze nei valori registrati.

Oltre al confronto tra i tre gruppi di pazienti, si è proceduto a rilevare le eventuali variazioni nelle attività vascolari a seguito della stimolazione termica all'interno di ogni singolo gruppo: la significatività delle eventuali variazioni viene anche in questo caso valutata mediante test statistico.

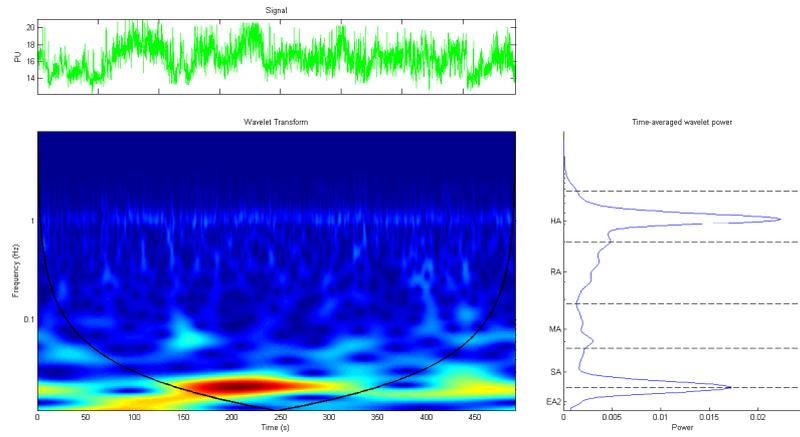
Si ricorda che i pazienti sono stati suddivisi in 3 gruppi:

- *Gruppo A*: 6 pazienti con un valore di $tcpO_2$ inferiore a 30 mmHg;
- *Gruppo B*: 8 pazienti con un valore di $tcpO_2$ compreso tra 30 e 50 mmHg;
- *Gruppo C*: 8 pazienti con un valore di $tcpO_2$ superiore a 50 mmHg.

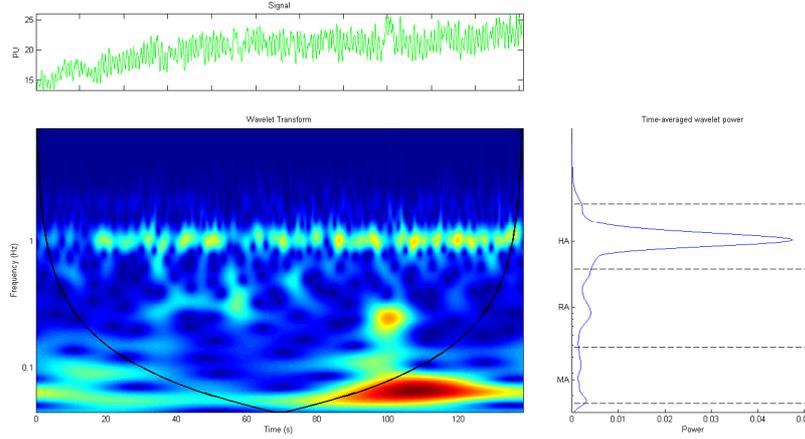
Per tutti i pazienti è stata effettuata un'acquisizione sola del segnale, di durata superiore ai 20 minuti. La sonda è stata applicata sulla zona dorsale del piede, con il paziente disteso su un lettino per tutta la durata dell'esame.

5.1 GRUPPO A: Pazienti con tcpO₂ < 30

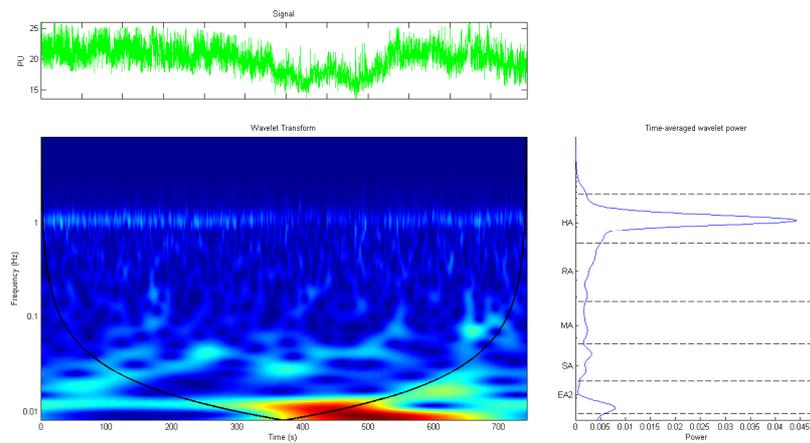
Paziente n°1



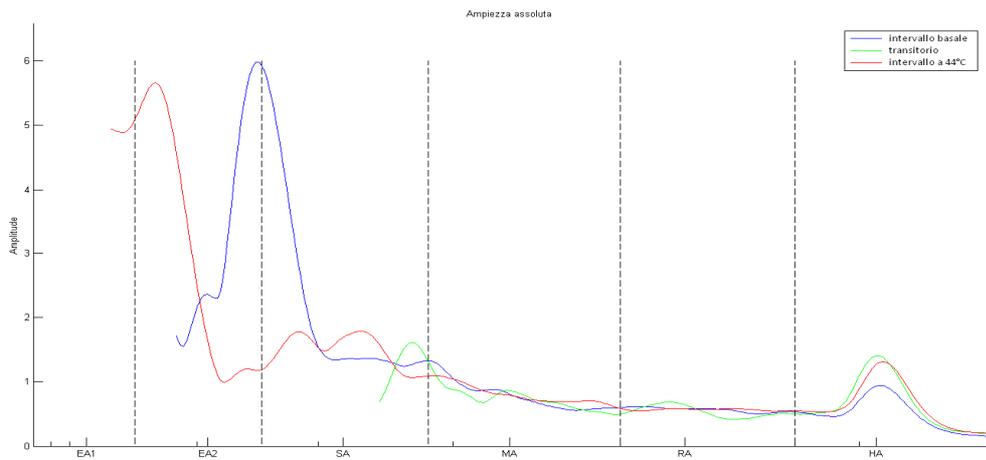
a) Intervallo a temperatura basale



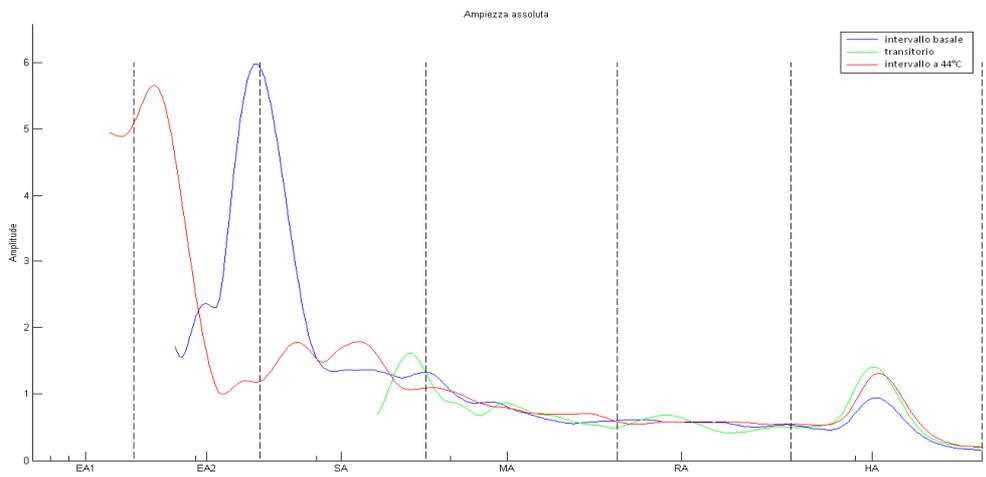
b) Transitorio



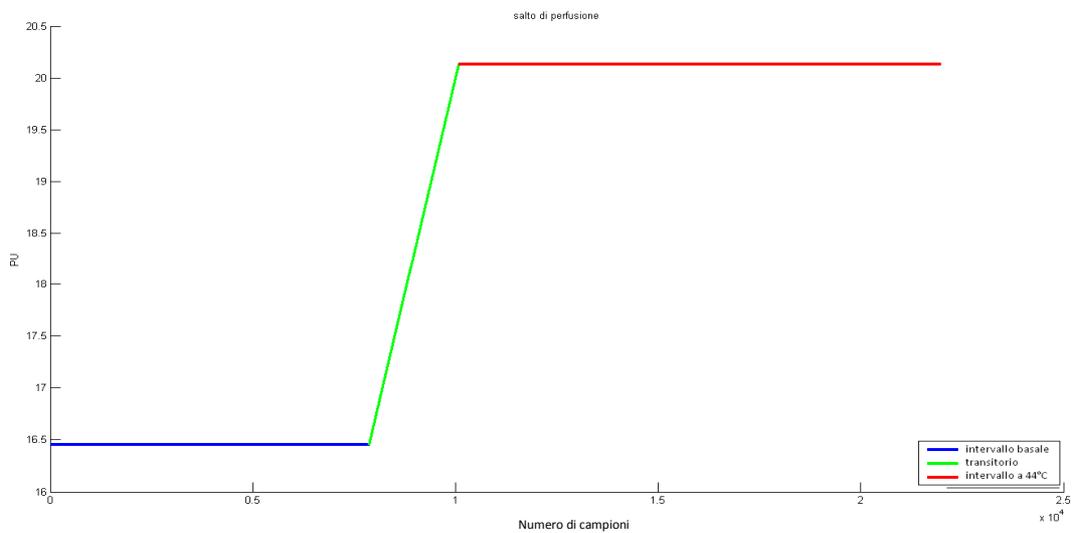
c) Intervallo a 44° C



d) Ampiezza assoluta, calcolata sull'intero segnale

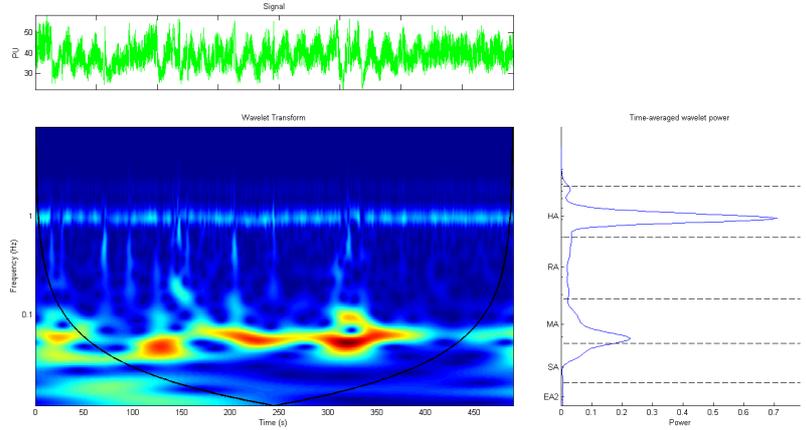


e) Potenza assoluta, calcolata sull'intero segnale

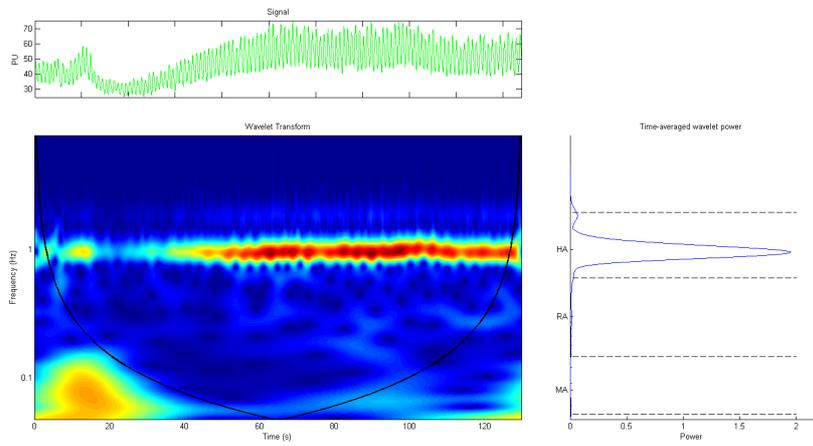


f) Variazione di perfusione tra il valore medio registrato tra l'intervallo a temperatura basale e a 44° C

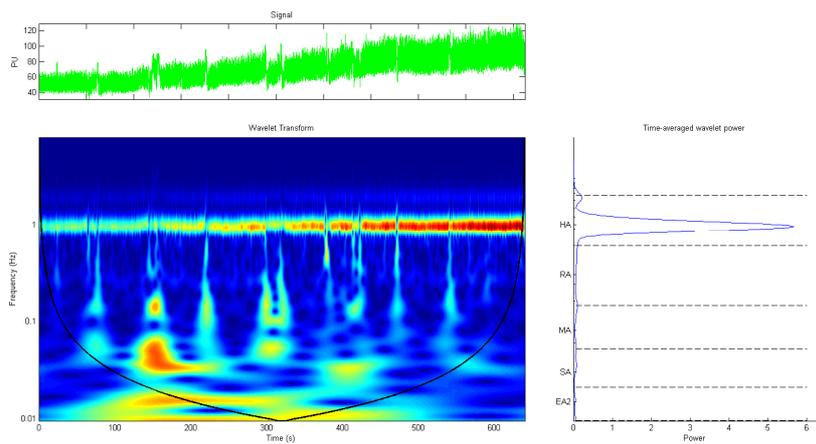
Paziente n°2



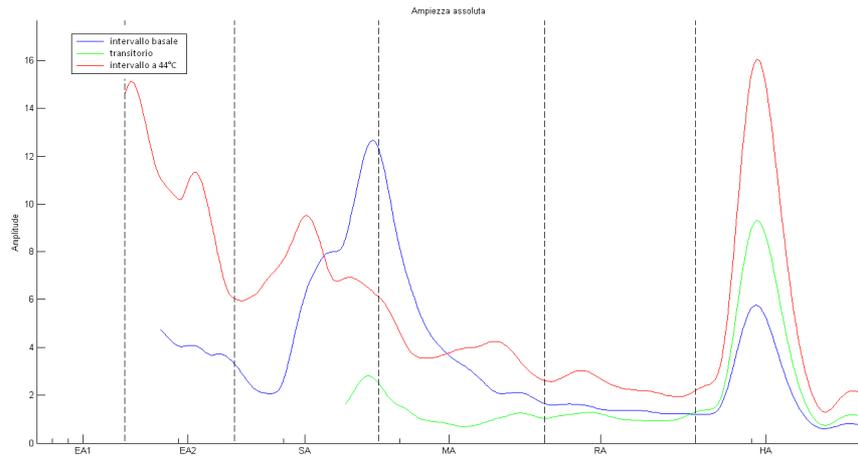
a) Intervallo a temperatura basale



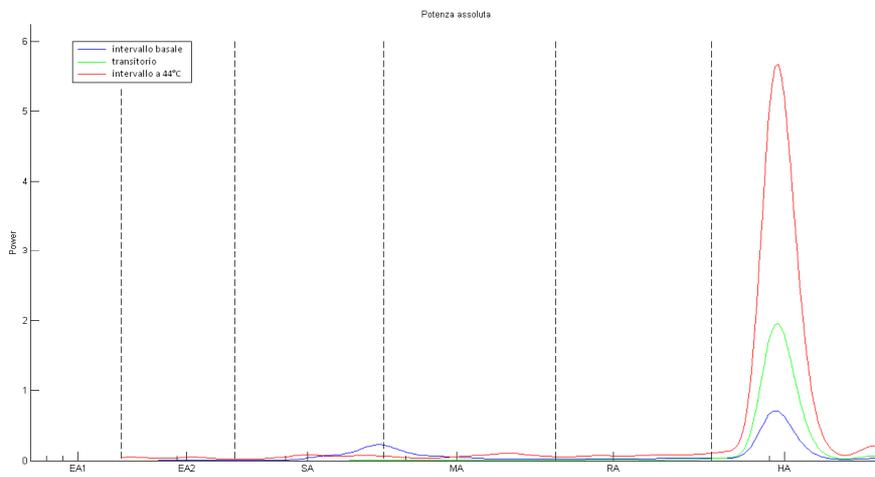
b) Transitorio



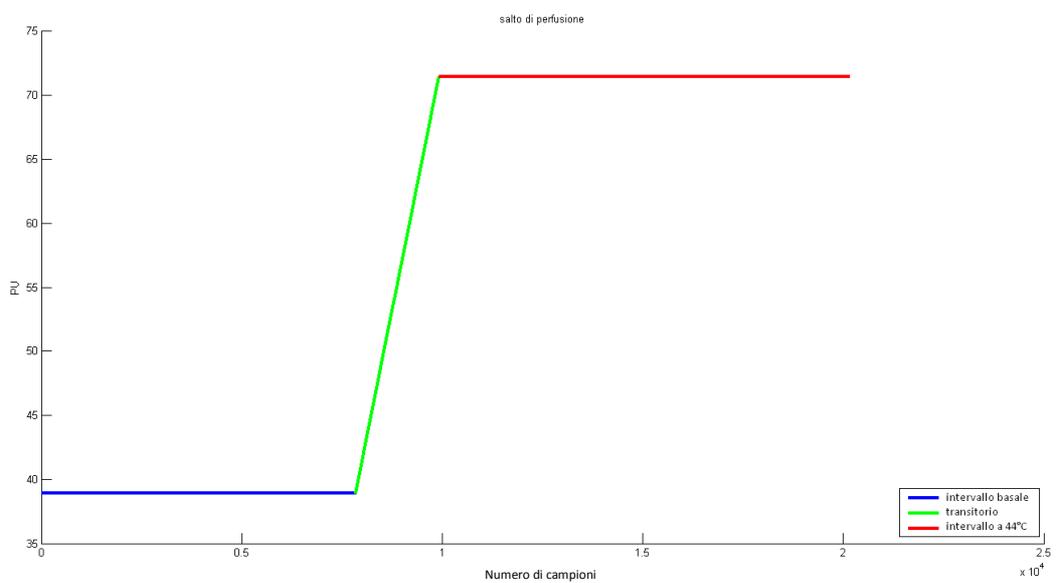
c) Intervallo a 44° C



d) Ampiezza assoluta, calcolata sull'intero segnale

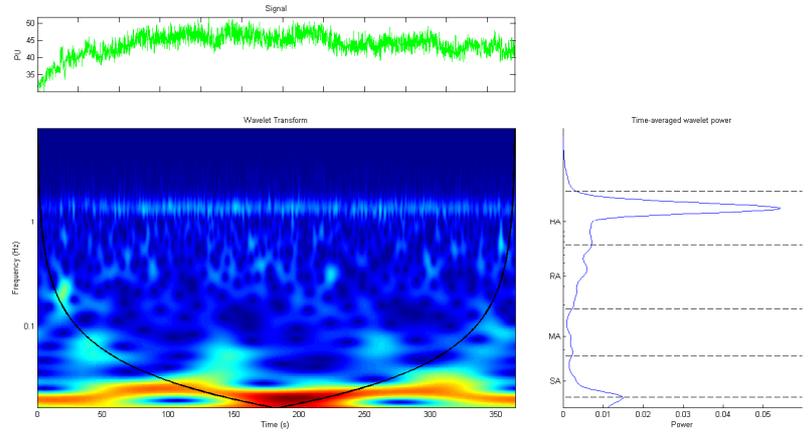


e) Potenza assoluta, calcolata sull'intero segnale

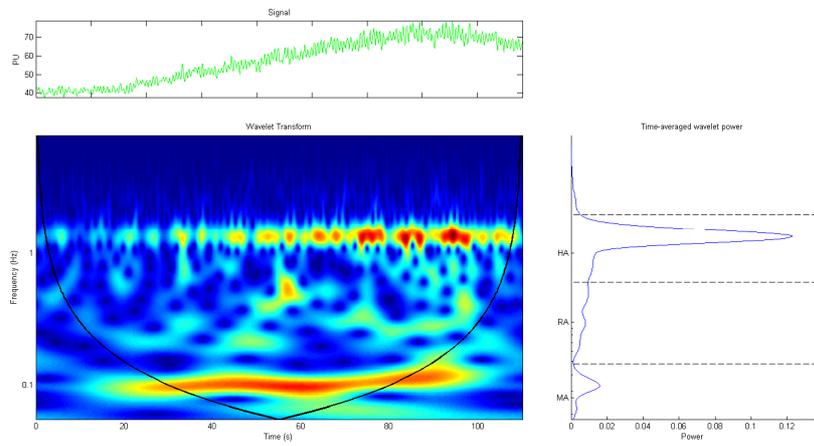


f) Variazione di perfusione tra il valore medio registrato tra l'intervallo a temperatura basale e a 44° C

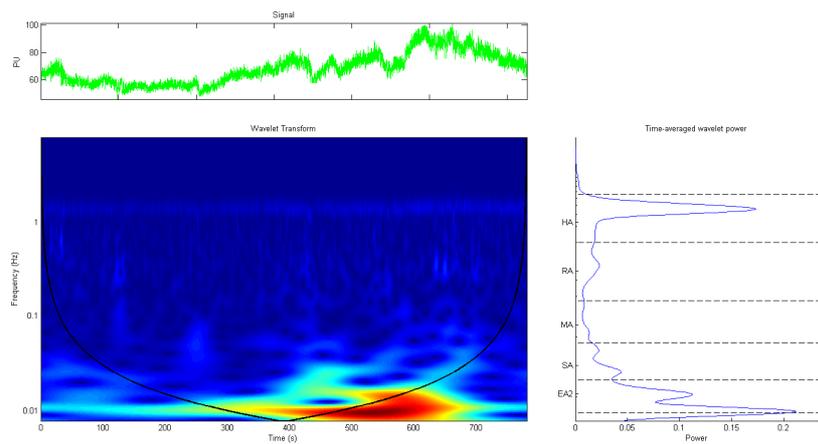
Paziente n°3



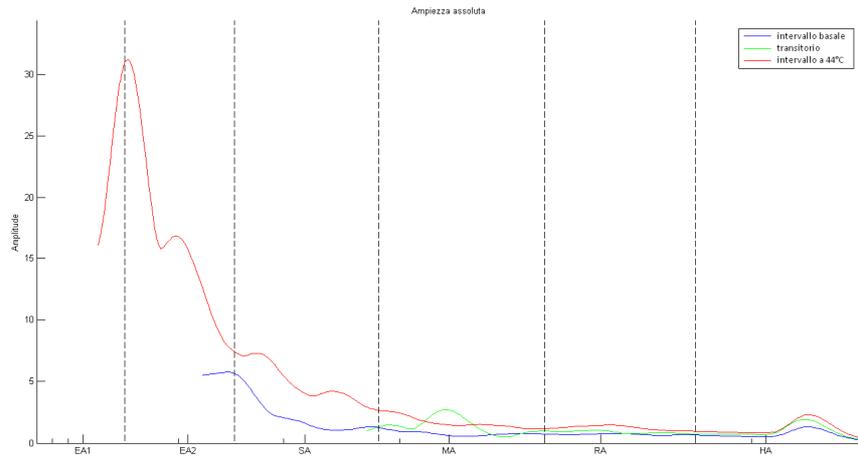
a) Intervallo a temperatura basale



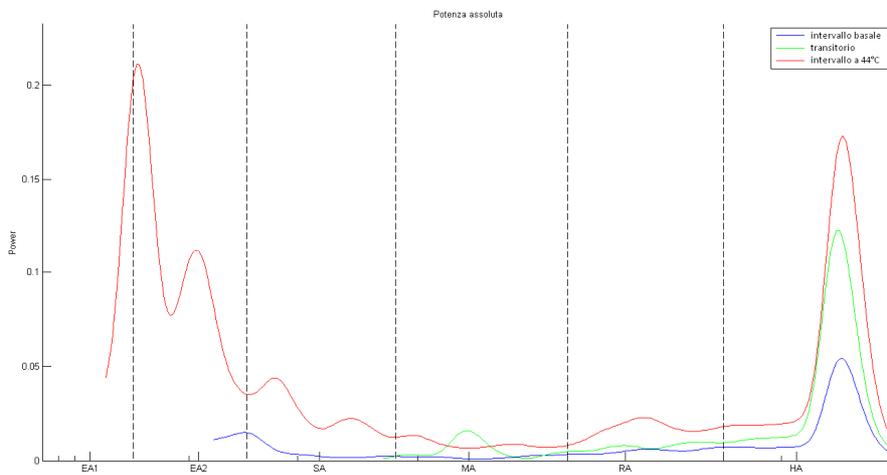
b) Transitorio



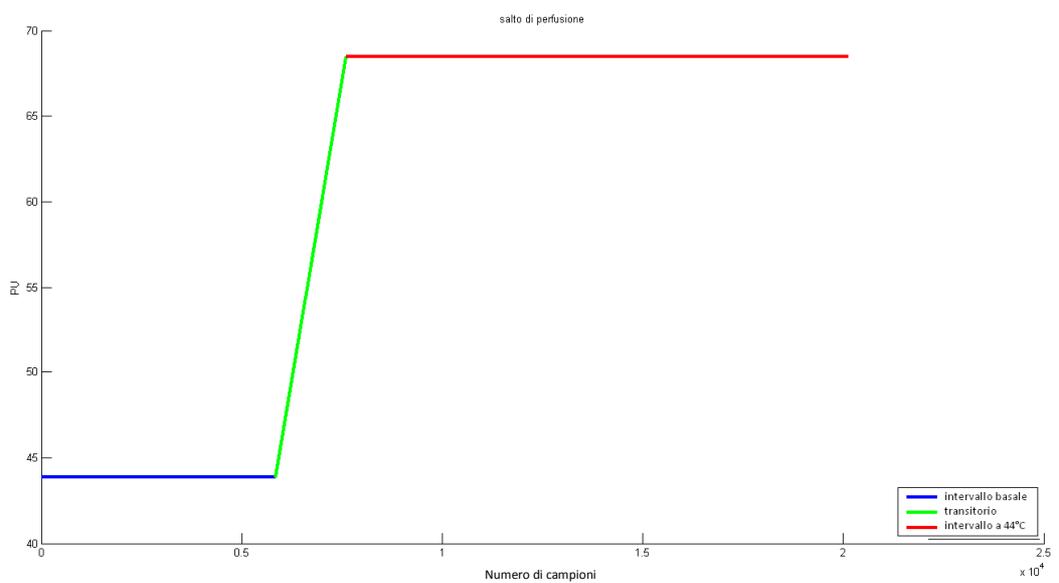
c) Intervallo a 44° C



d) Ampiezza assoluta, calcolata sull'intero segnale

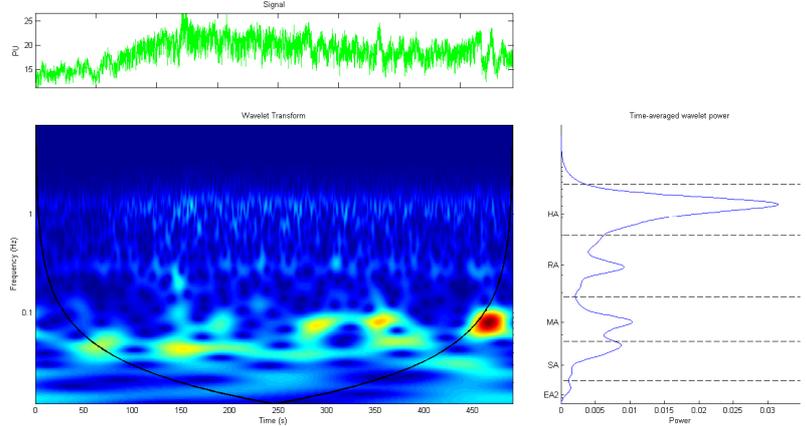


e) Potenza assoluta, calcolata sull'intero segnale

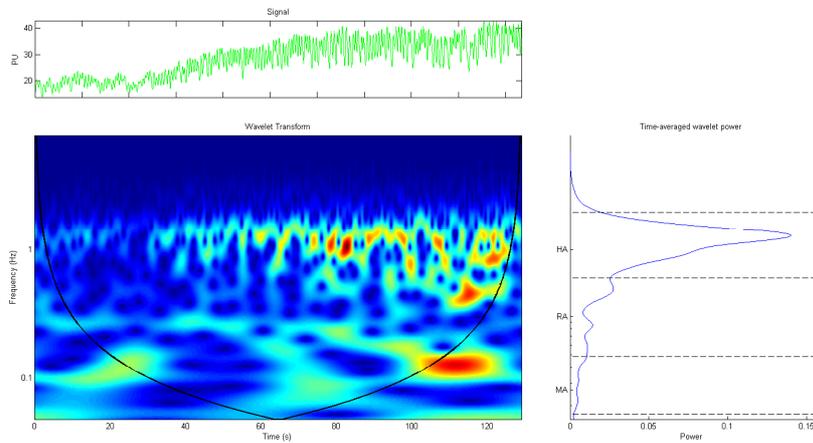


f) Variazione di perfusione tra il valore medio registrato tra l'intervallo a temperatura basale e a 44° C

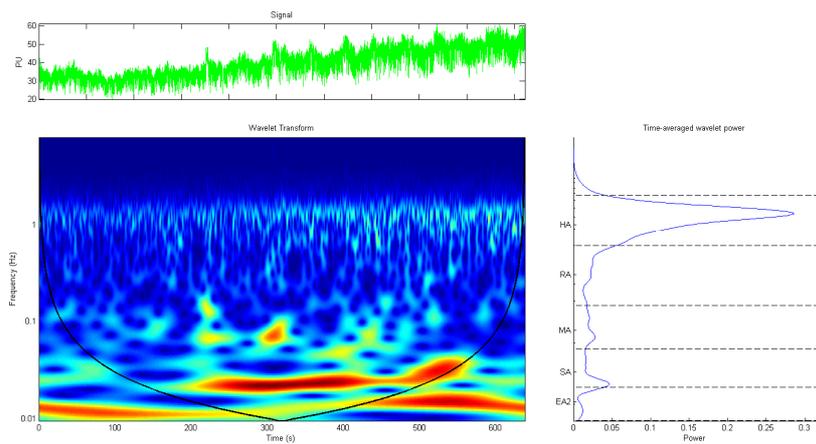
Paziente n°4



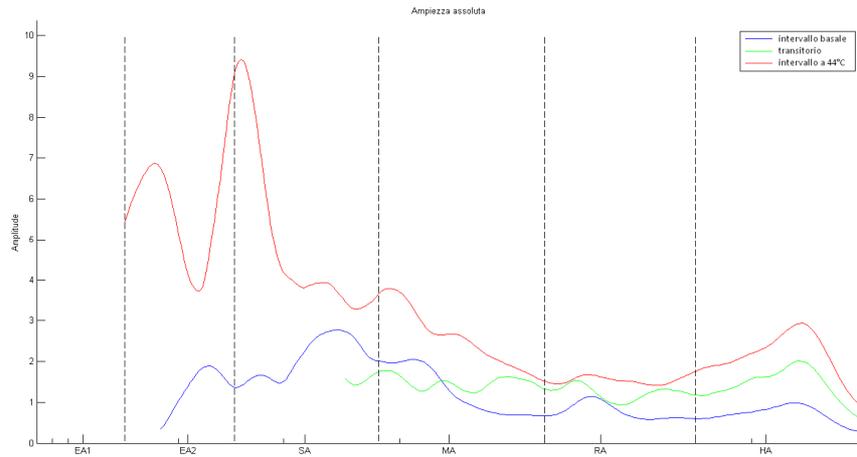
a) Intervallo a temperatura basale



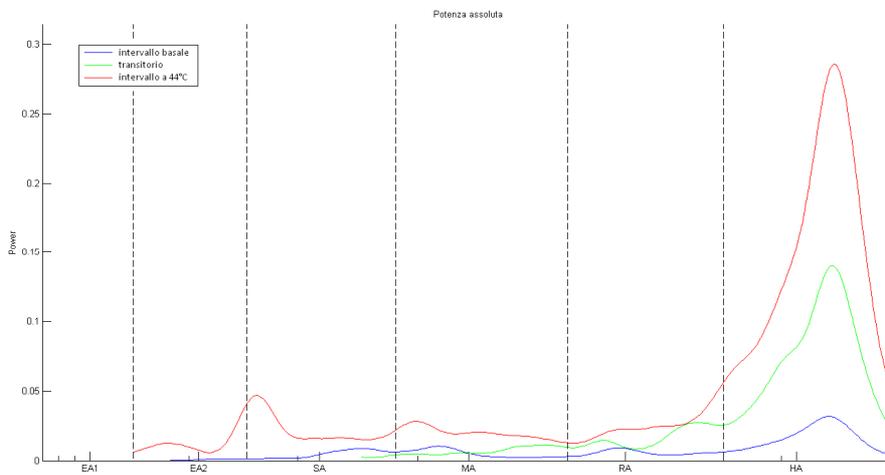
b) Transitorio



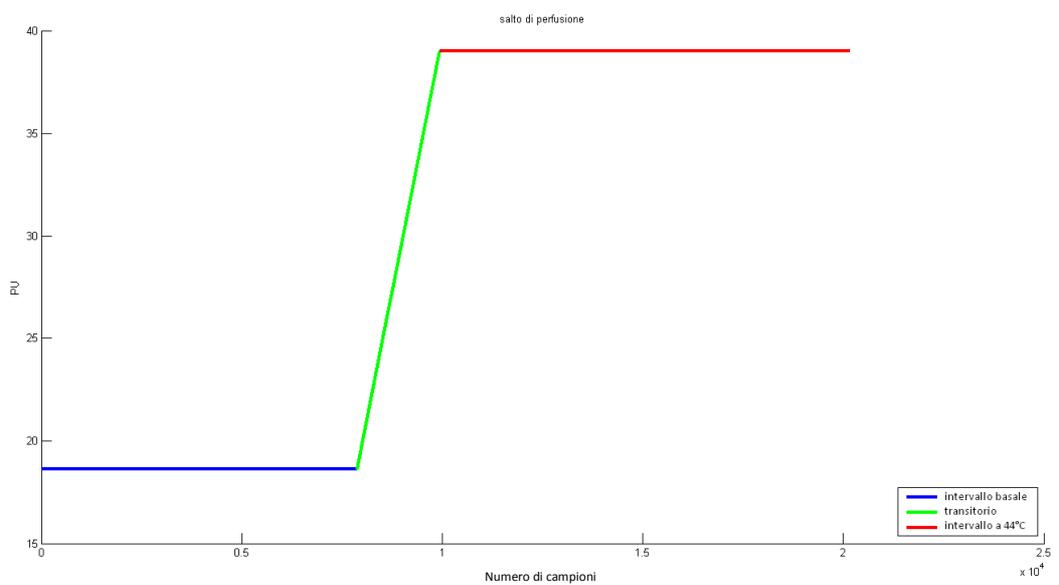
c) Intervallo a 44° C



d) Ampiezza assoluta, calcolata sull'intero segnale

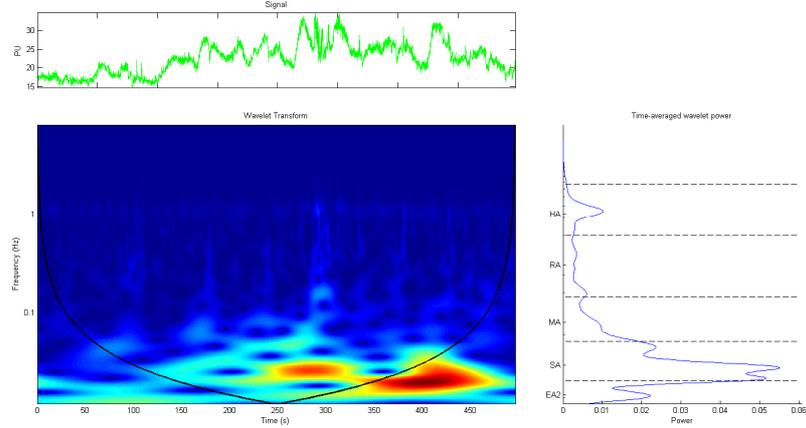


e) Potenza assoluta, calcolata sull'intero segnale

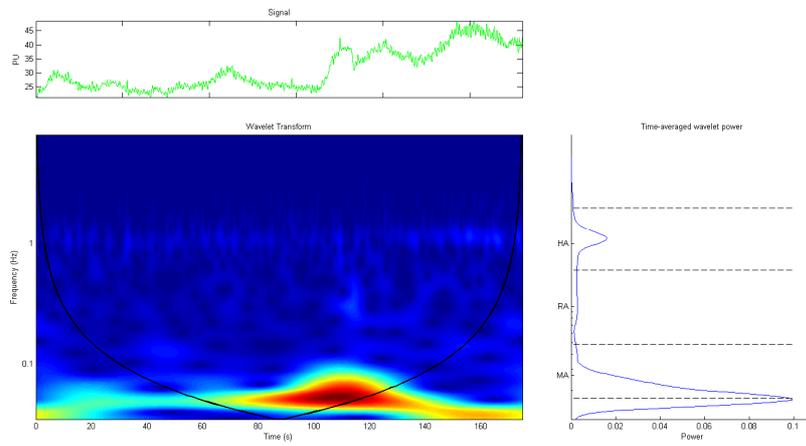


f) Variazione di perfusione tra il valore medio registrato tra l'intervallo a temperatura basale e a 44° C

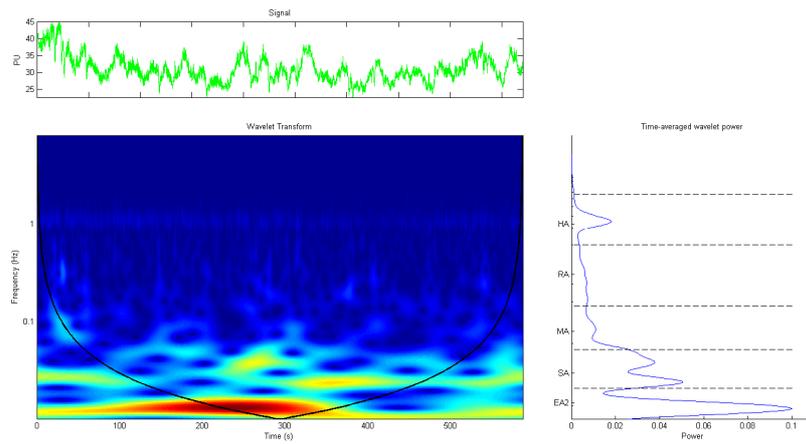
Paziente n°5



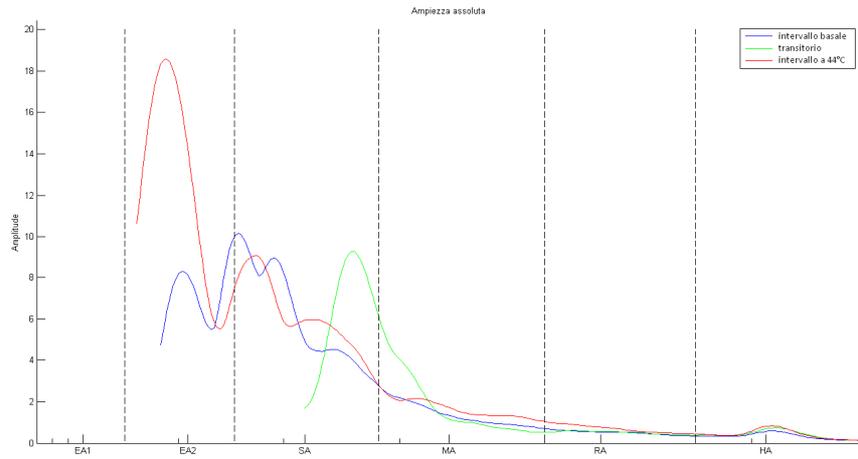
a) Intervallo a temperatura basale



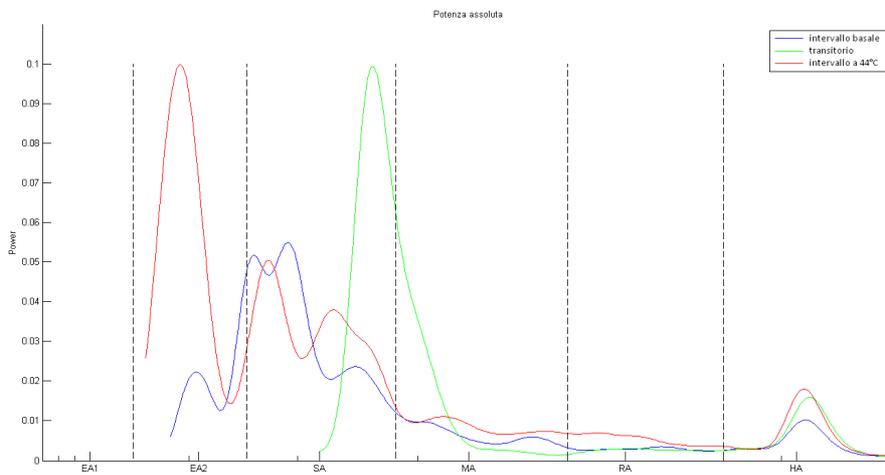
b) Transitorio



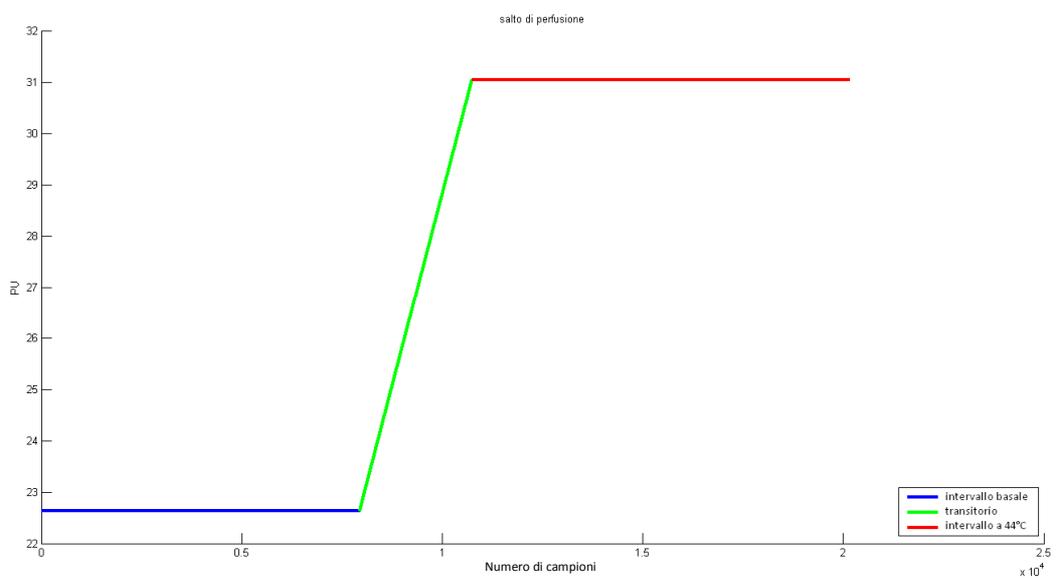
c) Intervallo a 44° C



d) Ampiezza assoluta, calcolata sull'intero segnale

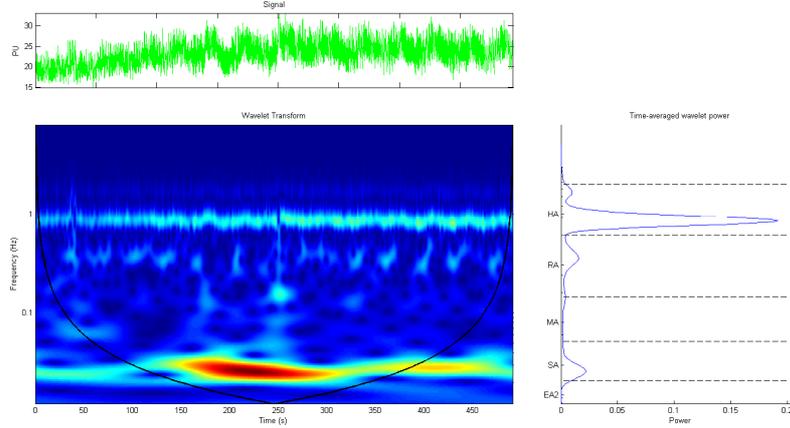


e) Potenza assoluta, calcolata sull'intero segnale

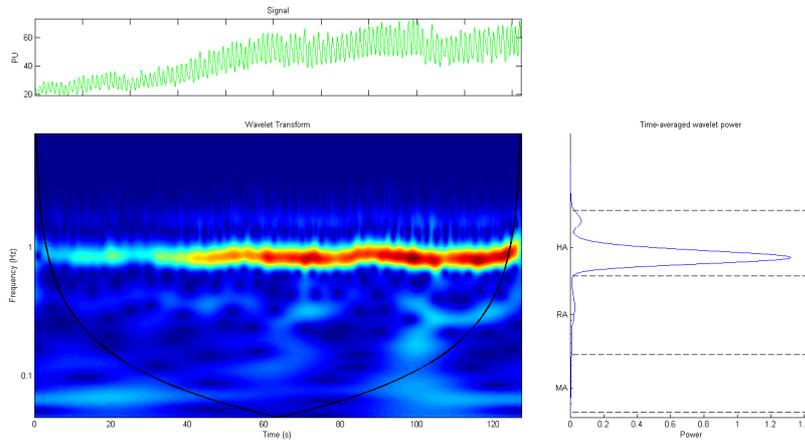


f) Variazione di perfusione tra il valore medio registrato tra l'intervallo a temperatura basale e a 44° C

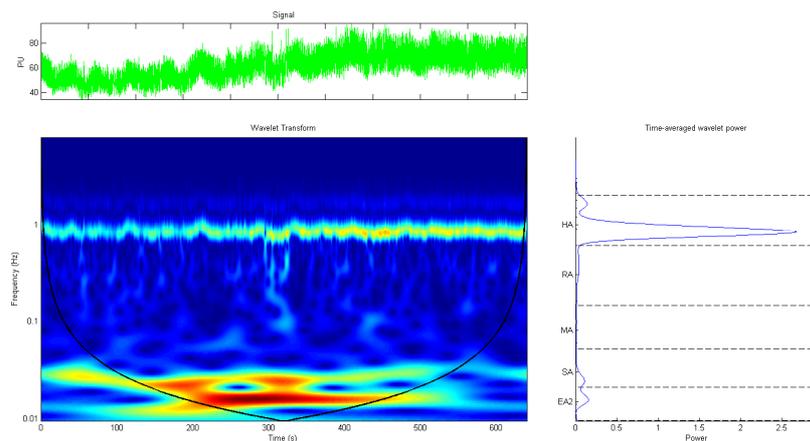
Paziente n°6



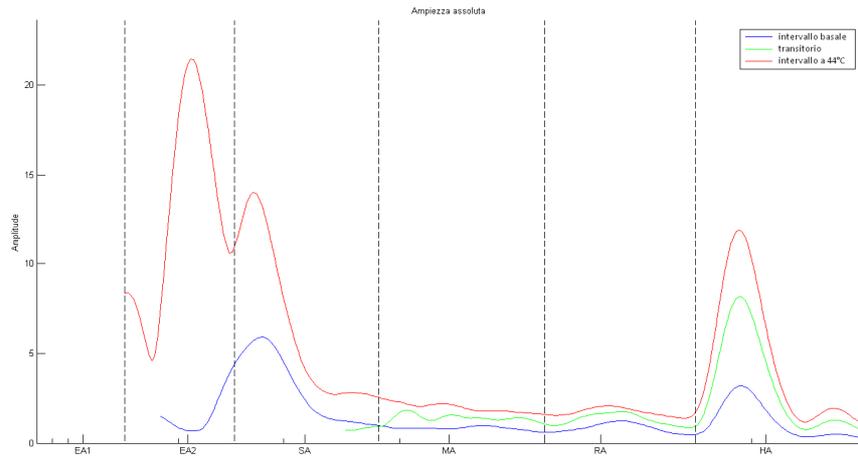
a) Intervallo a temperatura basale



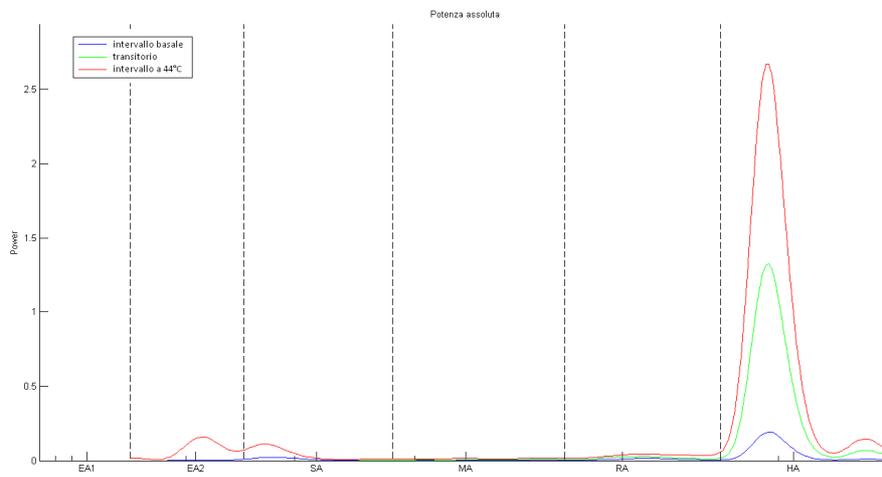
b) Transitorio



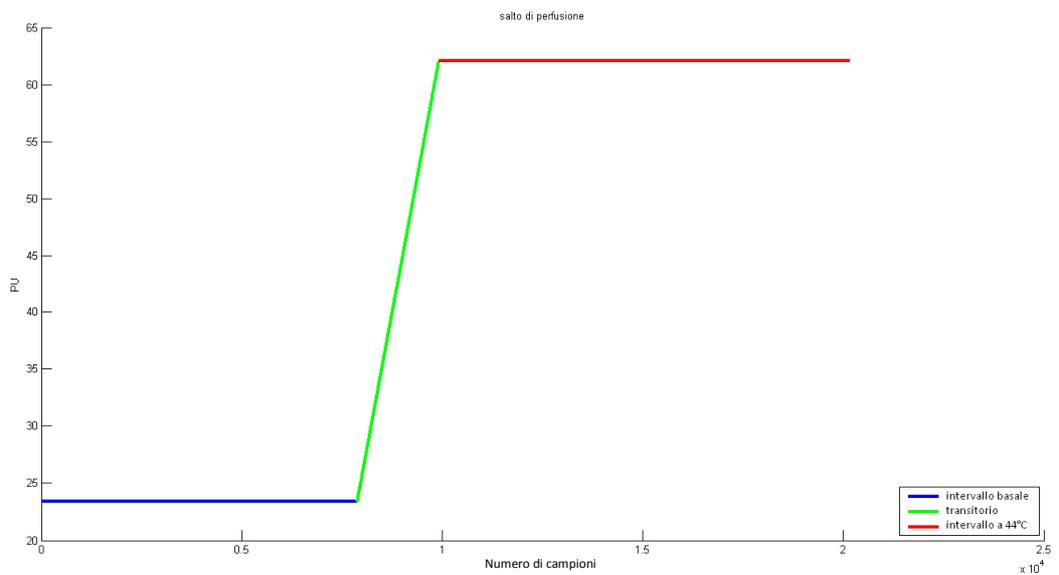
c) Intervallo a 44° C



d) Ampiezza assoluta, calcolata sull'intero segnale



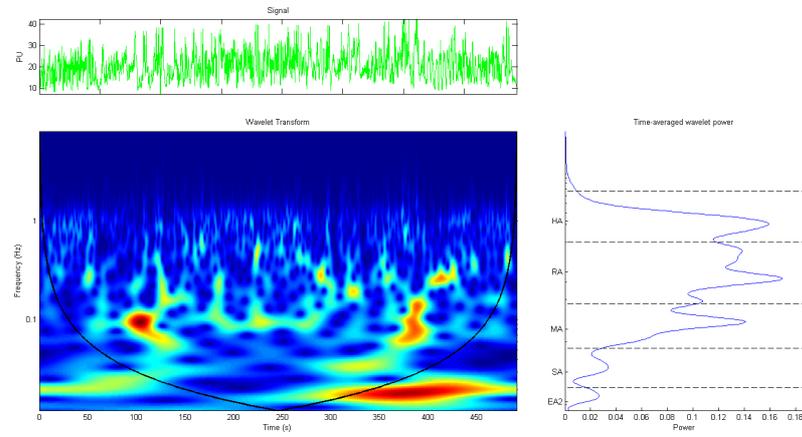
e) Potenza assoluta, per ogni zona di segnale



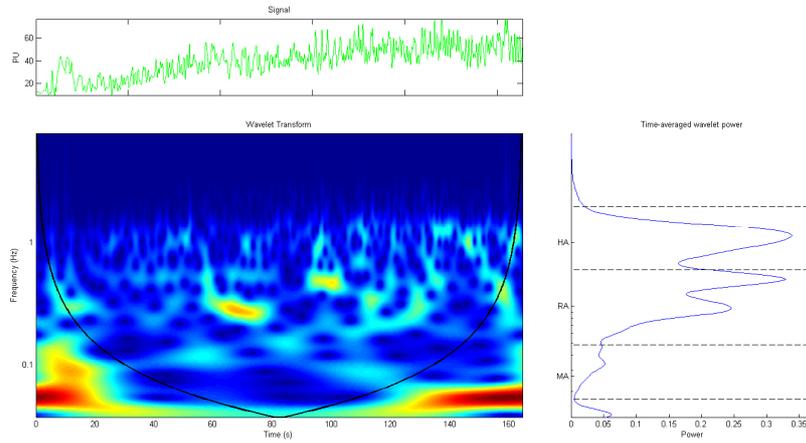
f) Variazione di perfusione tra il valore medio registrato tra l'intervallo a temperatura basale e a 44° C

5.2 GRUPPO B: Pazienti con $30 < \text{tcpO}_2 < 50$

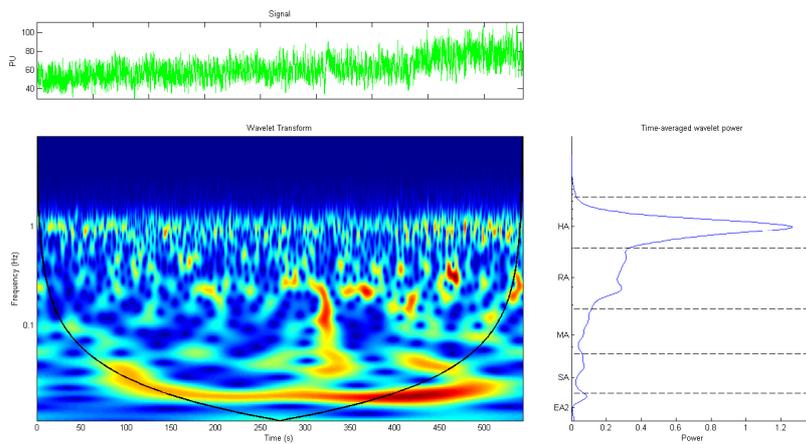
Paziente n°7



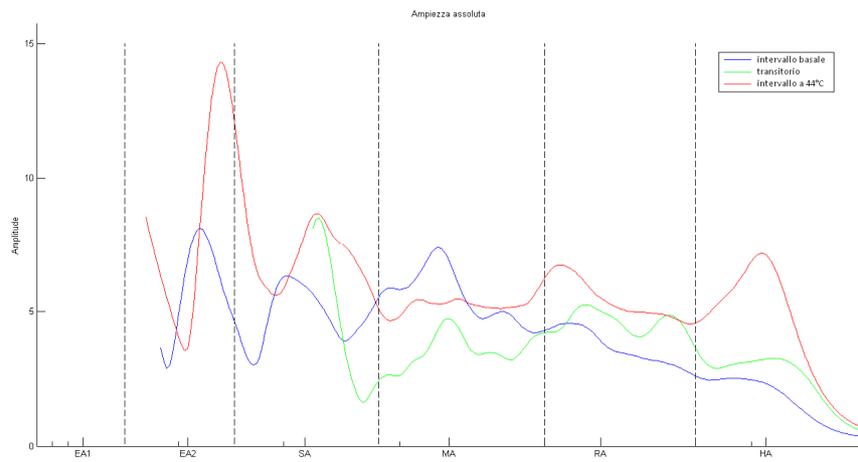
a) Intervallo a temperatura basale



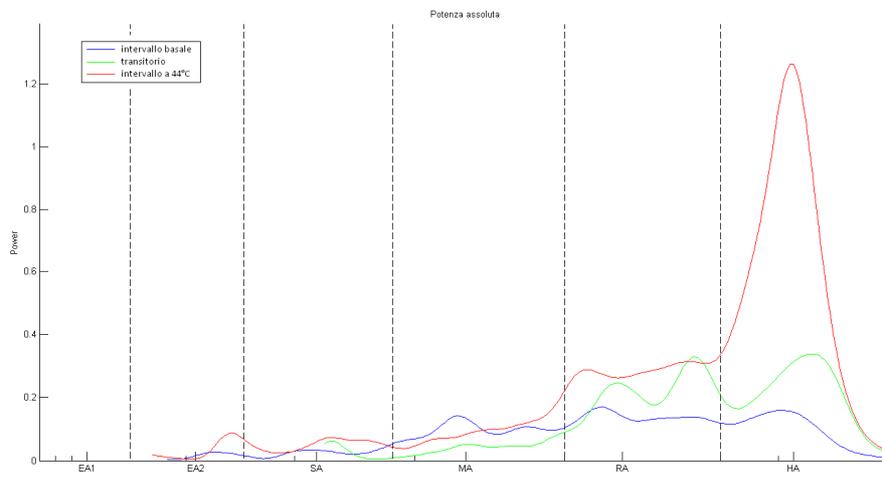
b) Transitorio



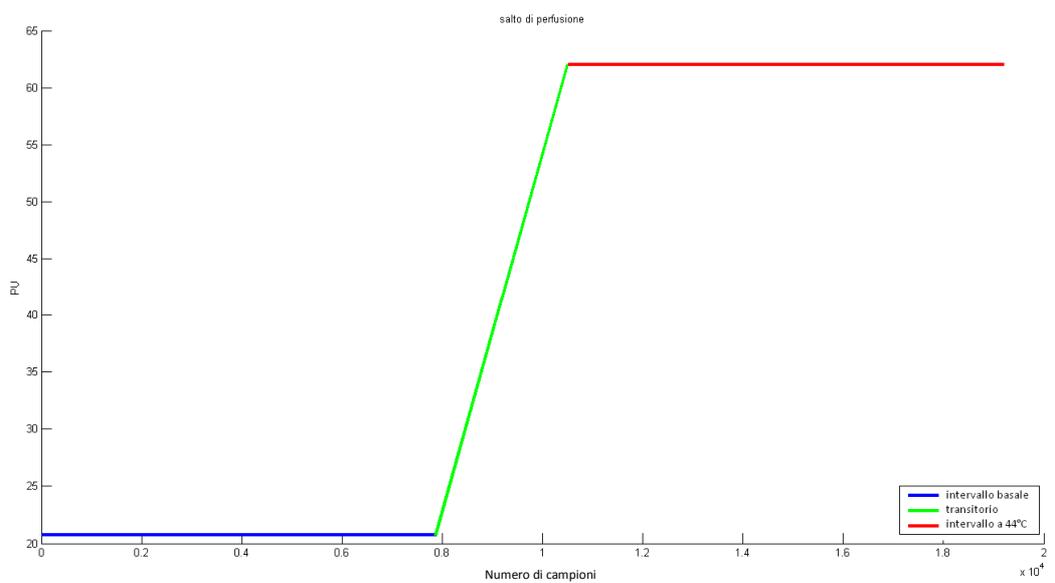
c) Intervallo a 44° C



d) Ampiezza assoluta, calcolata sull'intero segnale

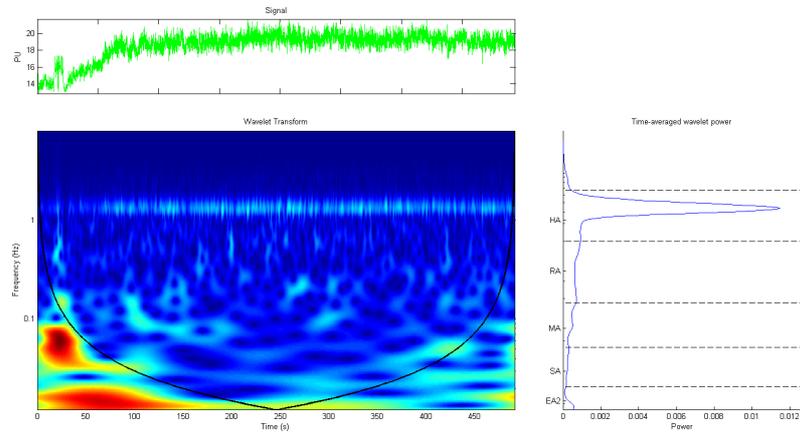


e) Potenza assoluta, calcolata sull'intero segnale

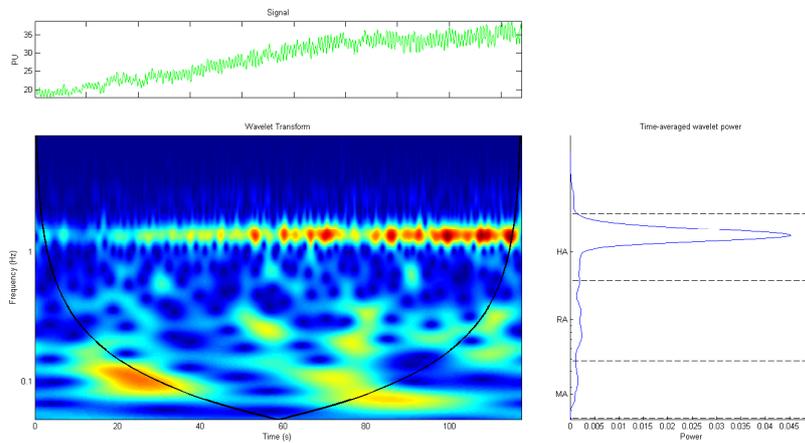


f) Variazione di perfusione tra il valore medio registrato tra l'intervallo a temperatura basale e a 44° C

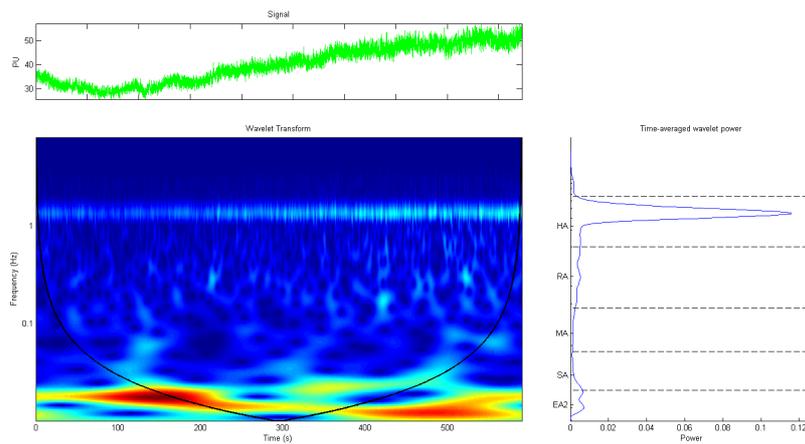
Paziente n°8



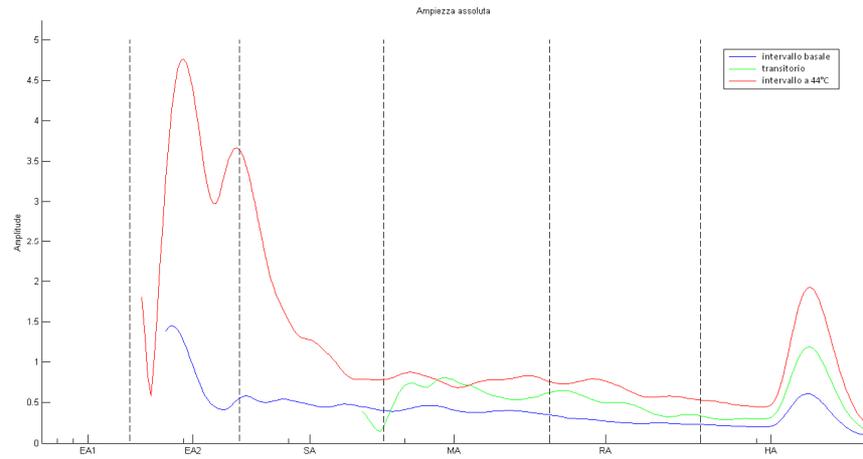
a) Intervallo a temperatura basale



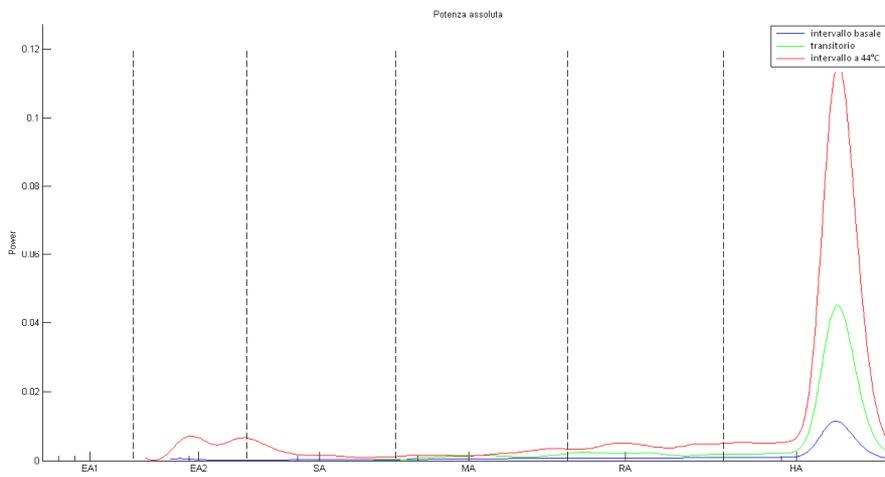
b) Transitorio



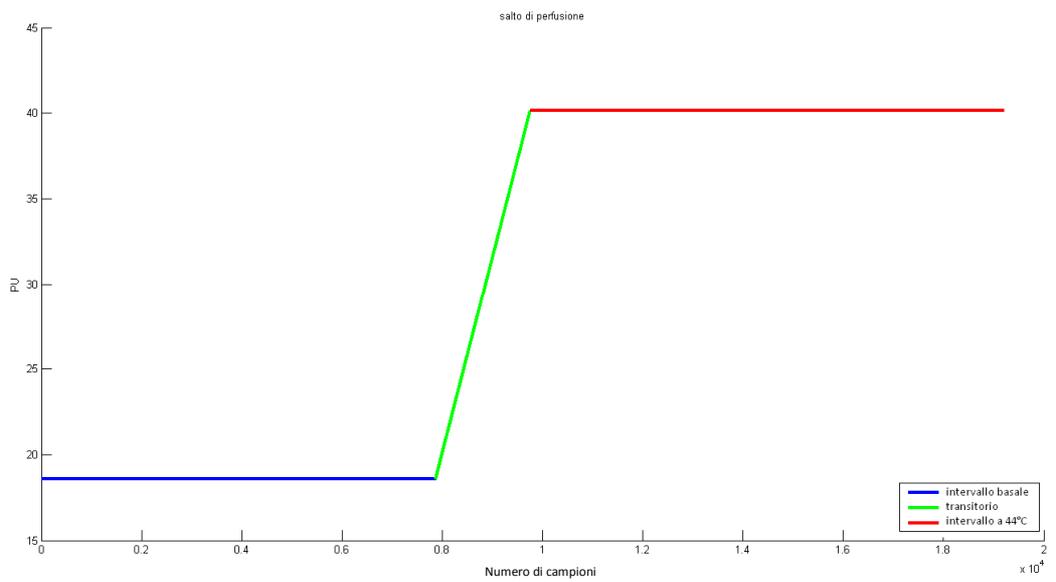
c) Intervallo a 44° C



d) Ampiezza assoluta, calcolata sull'intero segnale

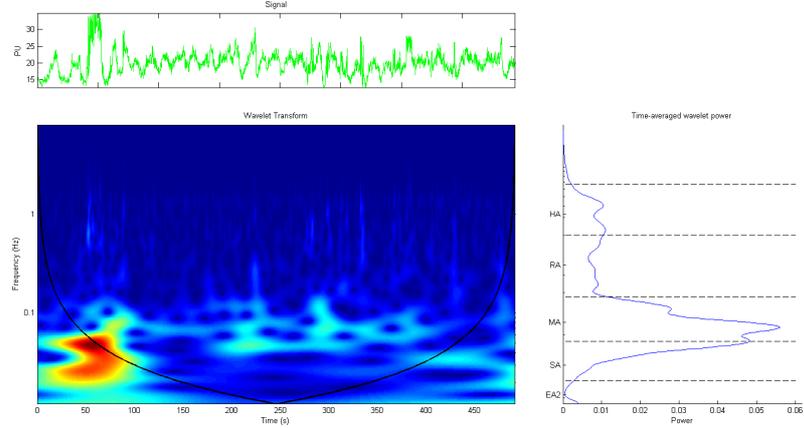


e) Potenza assoluta, calcolata sull'intero segnale

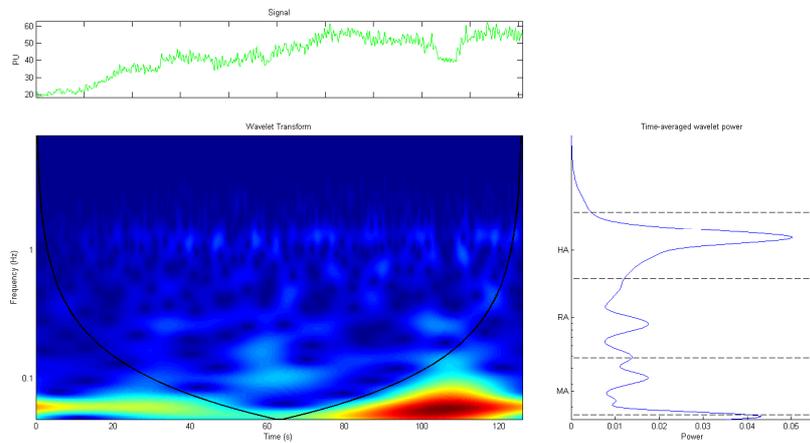


f) Variazione di perfusione tra il valore medio registrato tra l'intervallo a temperatura basale e a 44° C

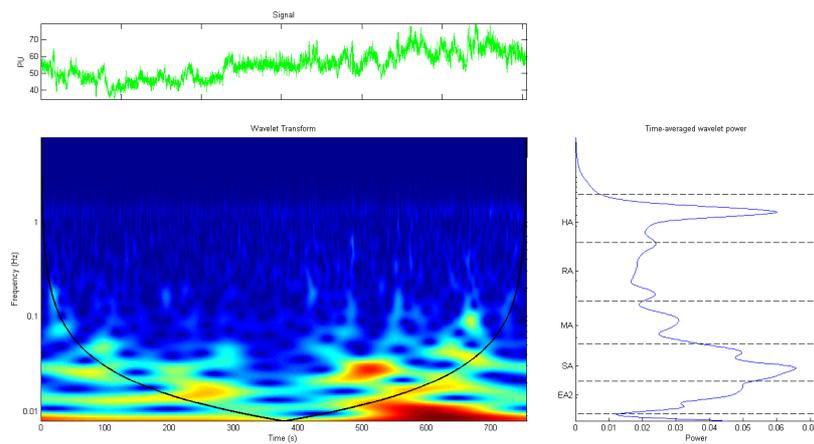
Paziente n°9



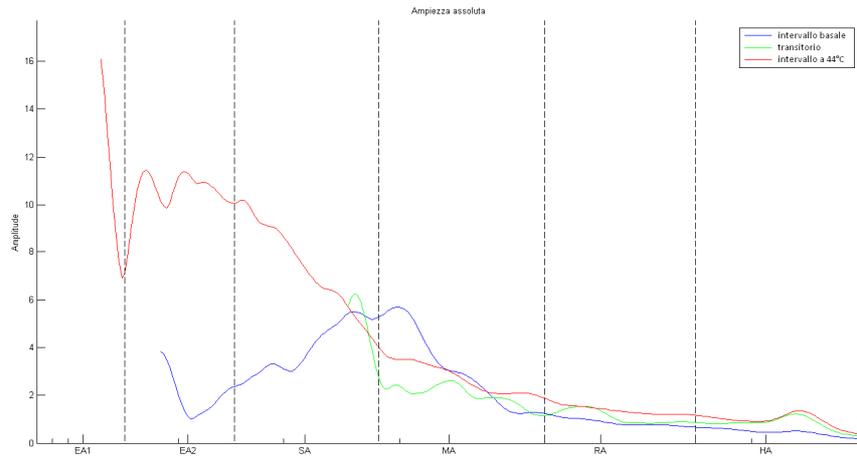
a) Intervallo a temperatura basale



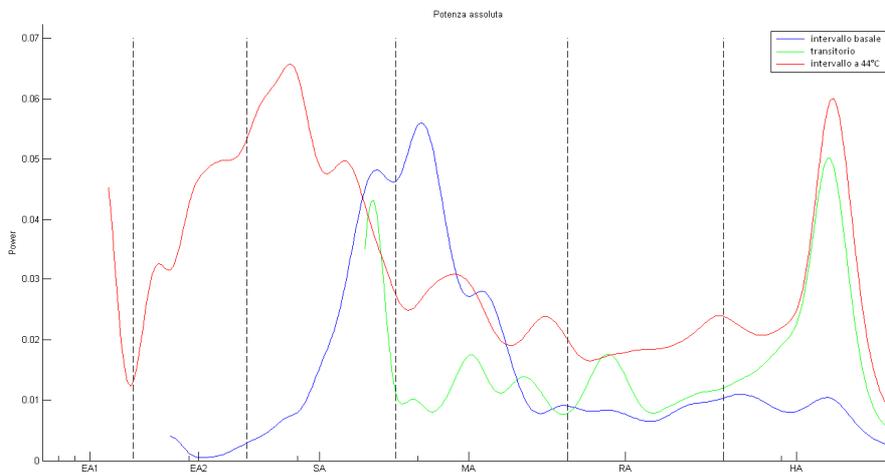
b) Transitorio



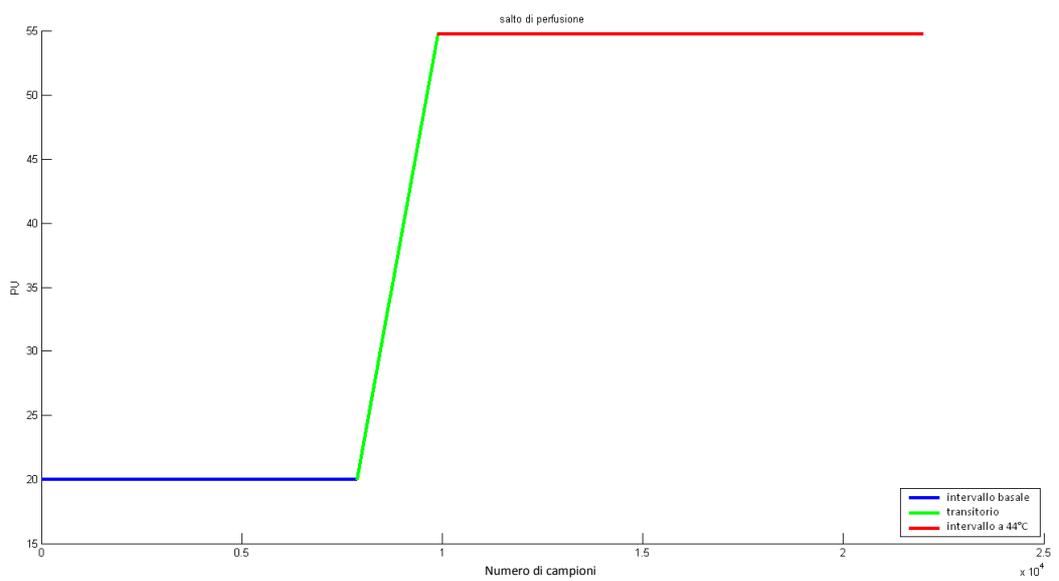
c) Intervallo a 44° C



d) Ampiezza assoluta, calcolata sull'intero segnale

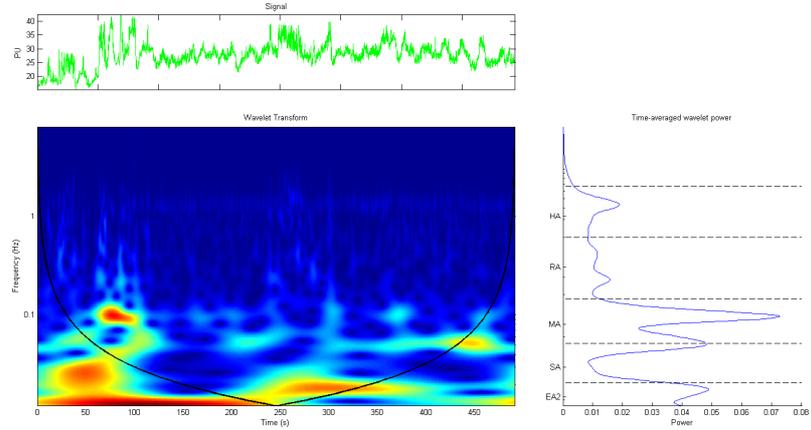


e) Potenza assoluta, calcolata sull'intero segnale

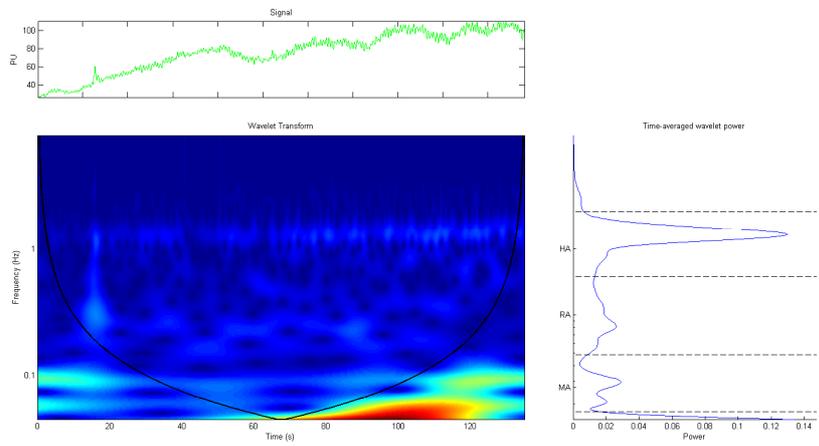


f) Variazione di perfusione tra il valore medio registrato tra l'intervallo a temperatura basale e a 44° C

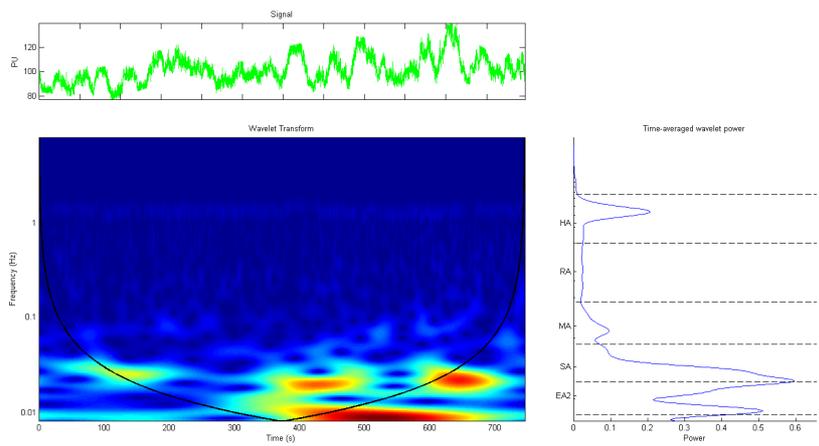
Paziente n°10



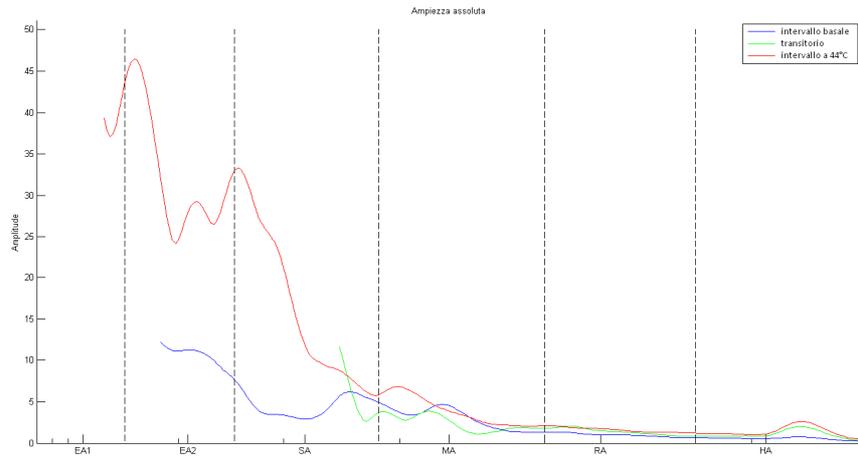
a) Intervallo a temperatura basale



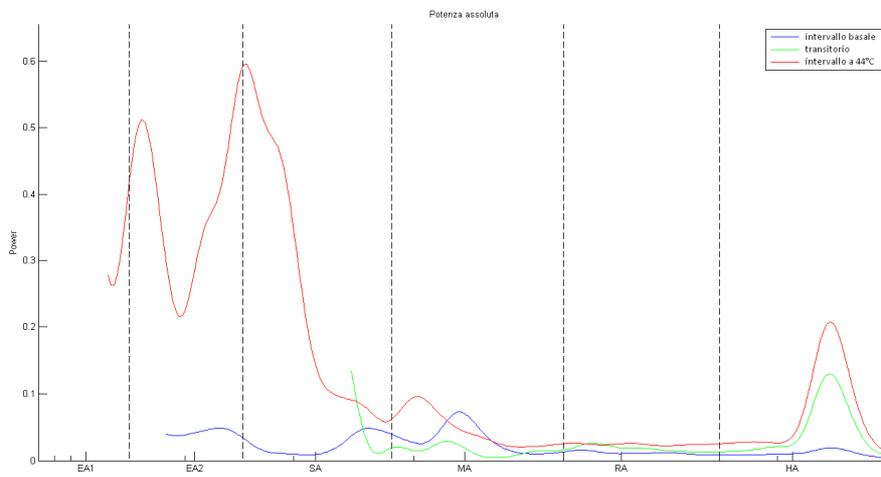
b) Transitorio



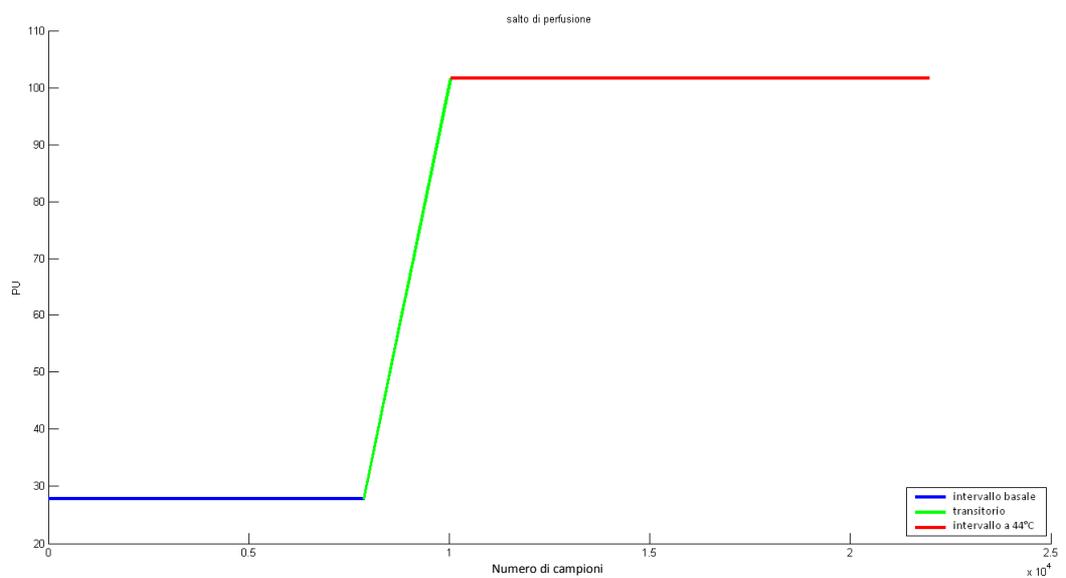
c) Intervallo a 44° C



d) Ampiezza assoluta, calcolata sull'intero segnale

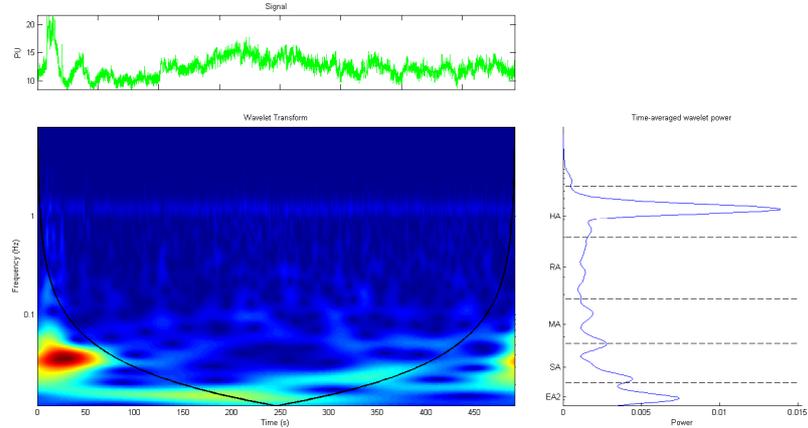


e) Potenza assoluta, calcolata sull'intero segnale

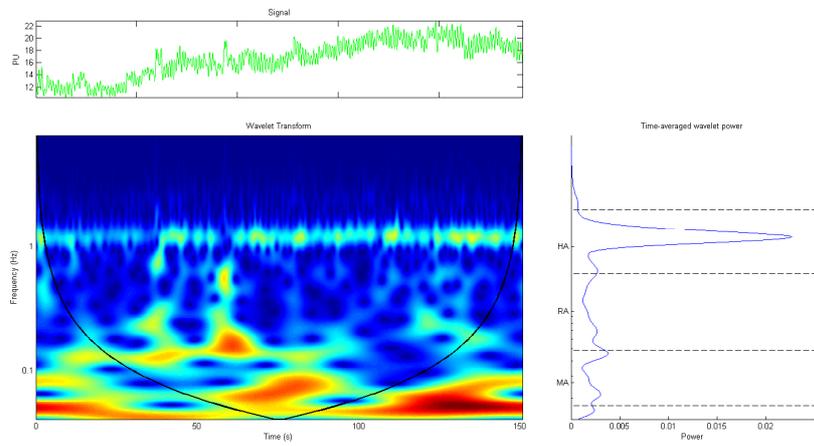


f) Variazione di perfusione tra il valore medio registrato tra l'intervallo a temperatura basale e a 44° C

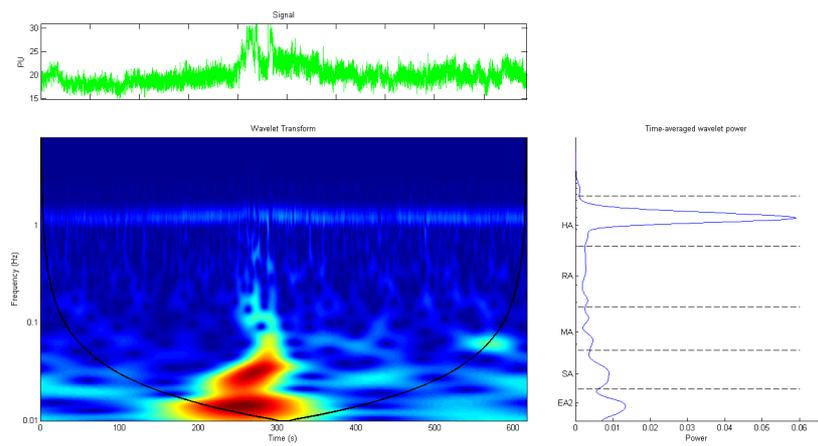
Paziente n°11



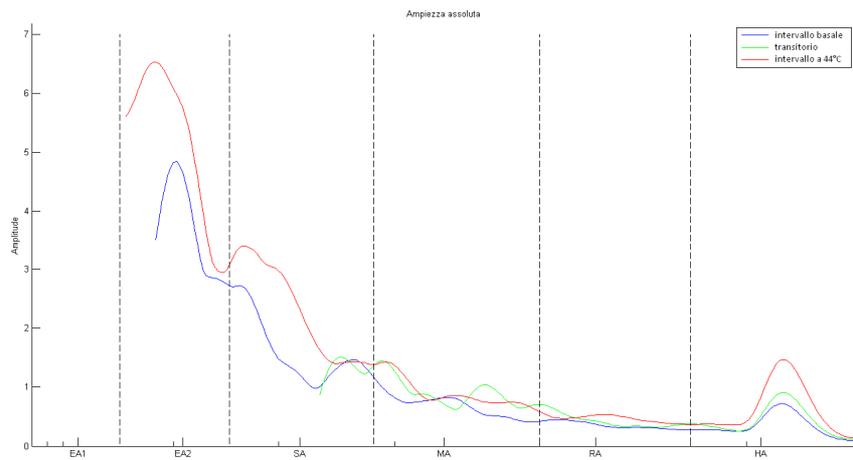
a) Intervallo a temperatura basale



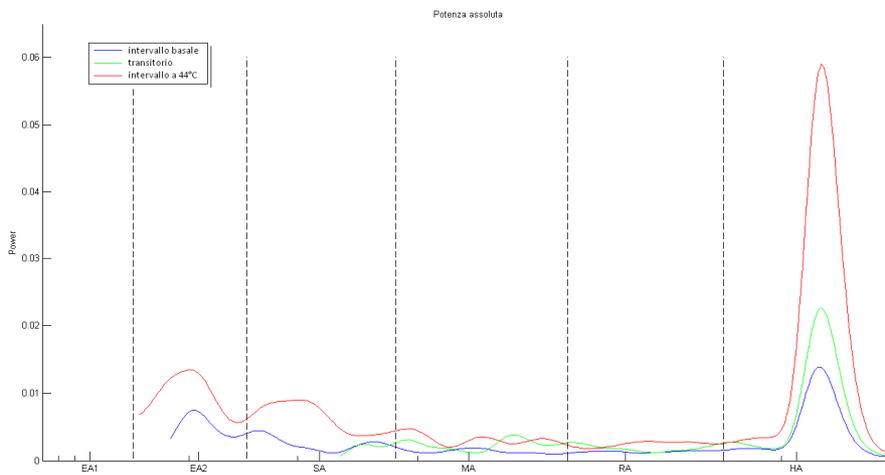
b) Transitorio



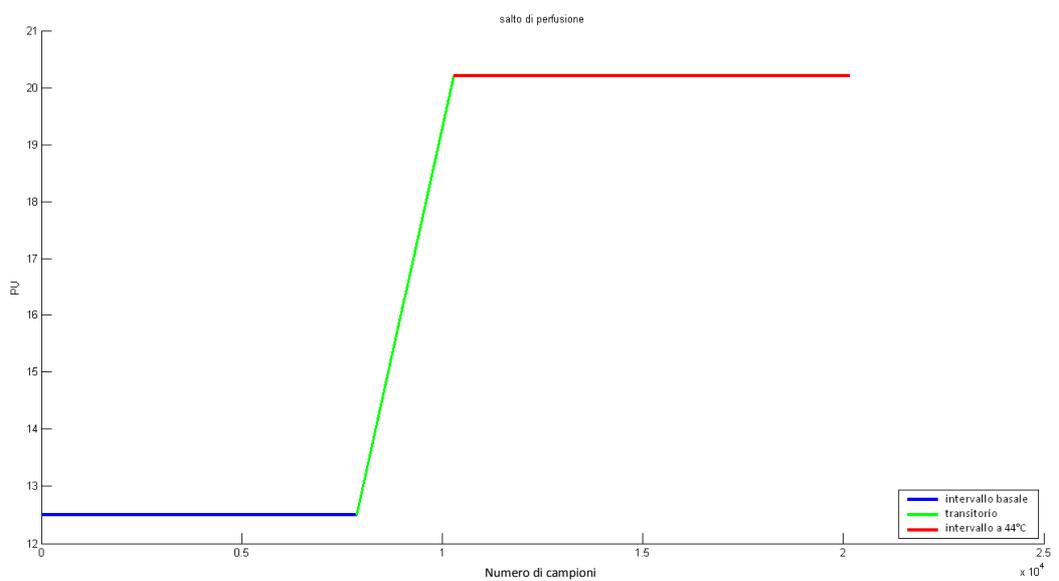
c) Intervallo a 44° C



d) Ampiezza assoluta, calcolata sull'intero segnale

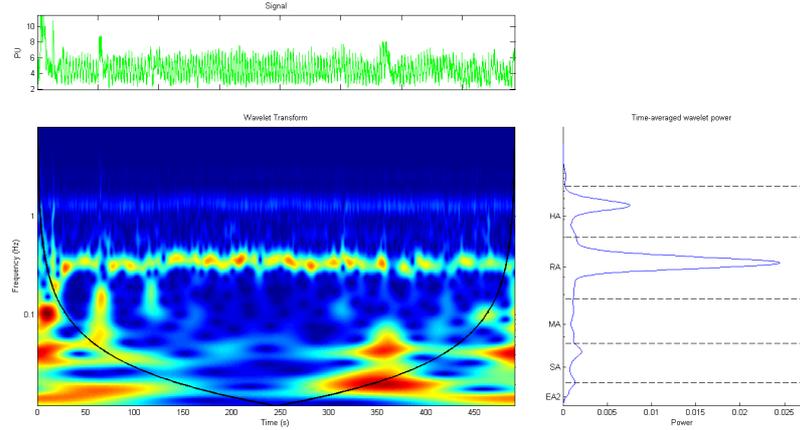


e) Potenza assoluta, calcolata sull'intero segnale

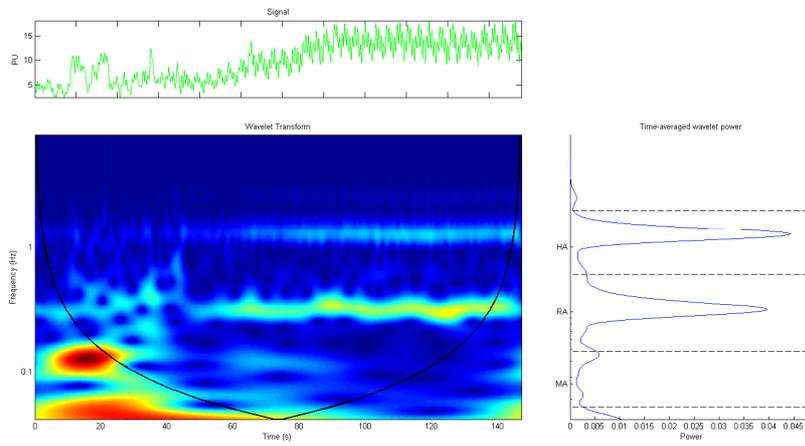


f) Variazione di perfusione tra il valore medio registrato tra l'intervallo a temperatura basale e a 44° C

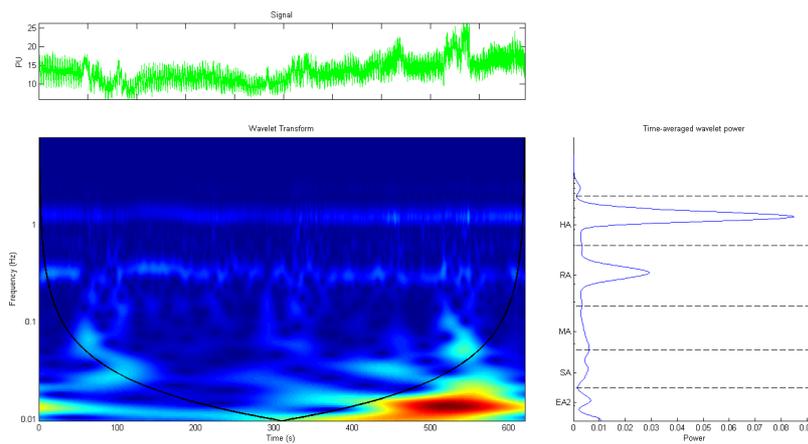
Paziente n°12



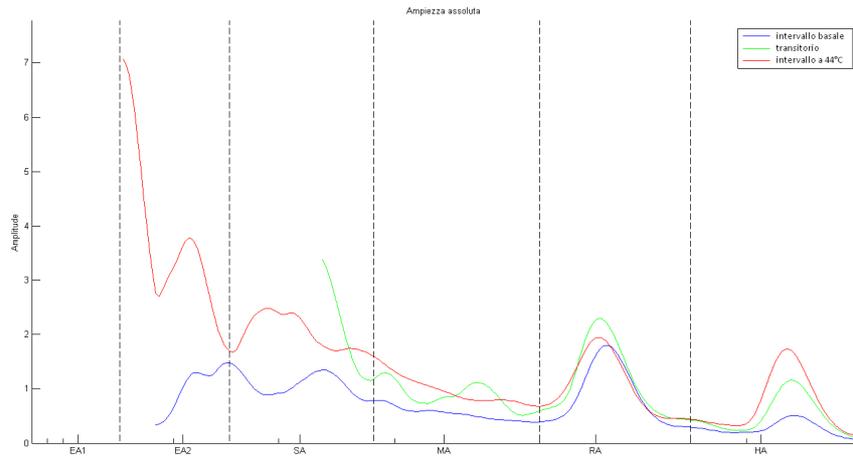
a) Intervallo a temperatura basale



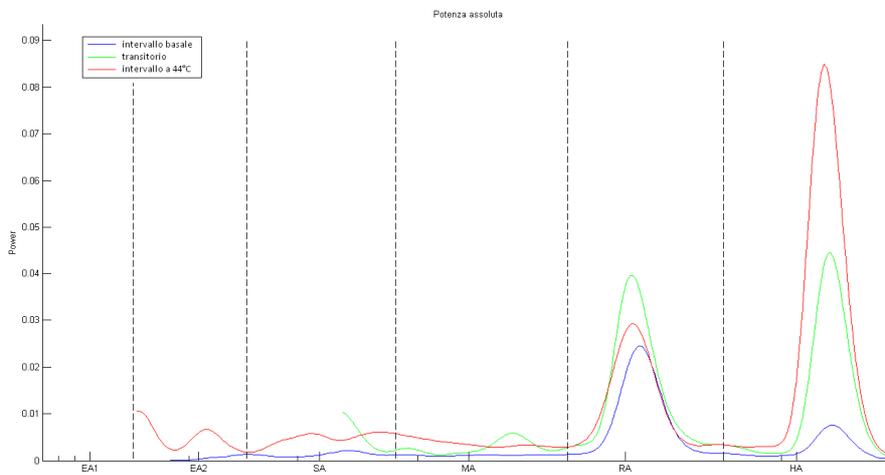
b) Transitorio



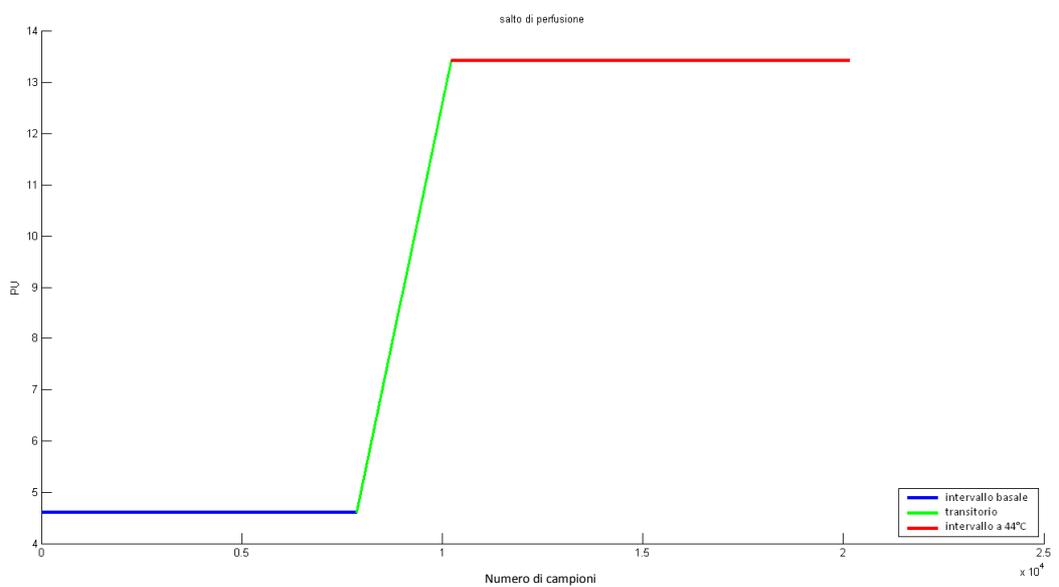
c) Intervallo a 44° C



d) Ampiezza assoluta, calcolata sull'intero segnale

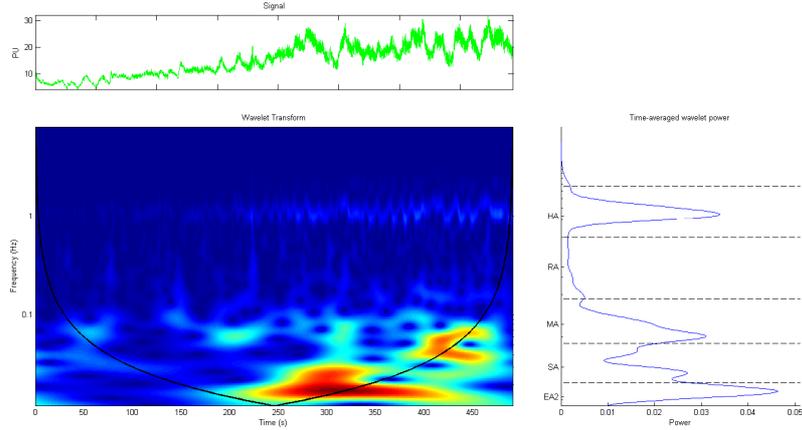


e) Potenza assoluta, calcolata sull'intero segnale

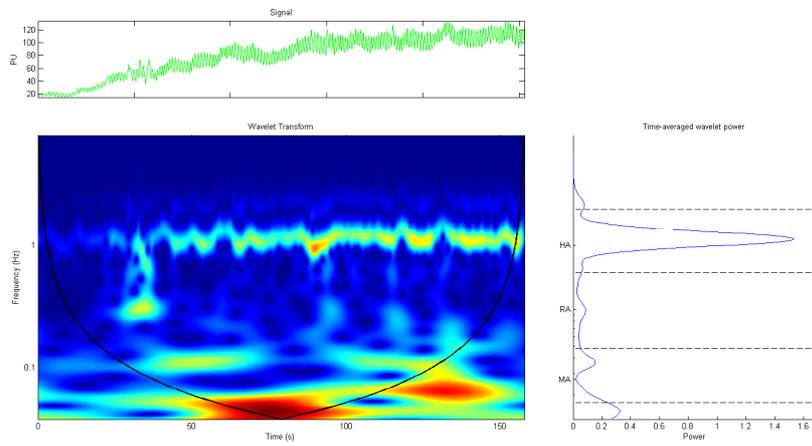


f) Variazione di perfusione tra il valore medio registrato tra l'intervallo a temperatura basale e a 44° C

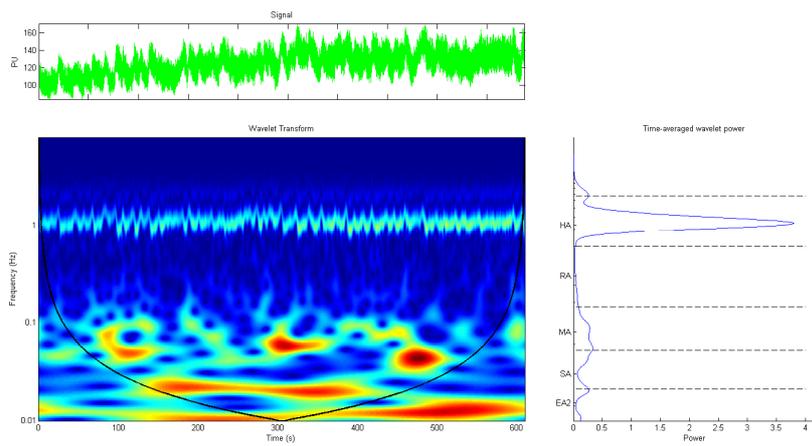
Paziente n°13



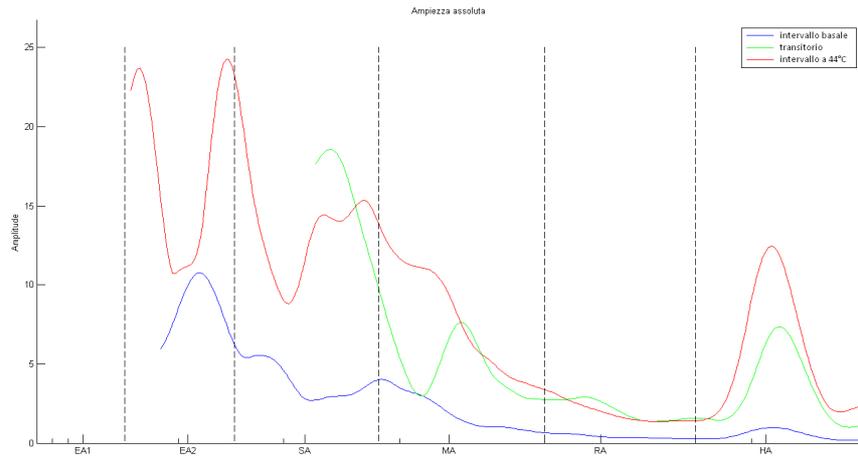
a) Intervallo a temperatura basale



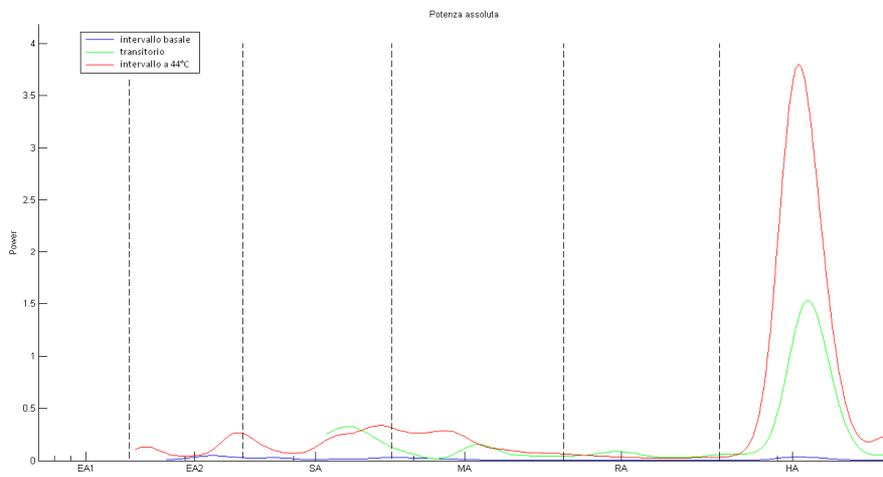
b) Transitorio



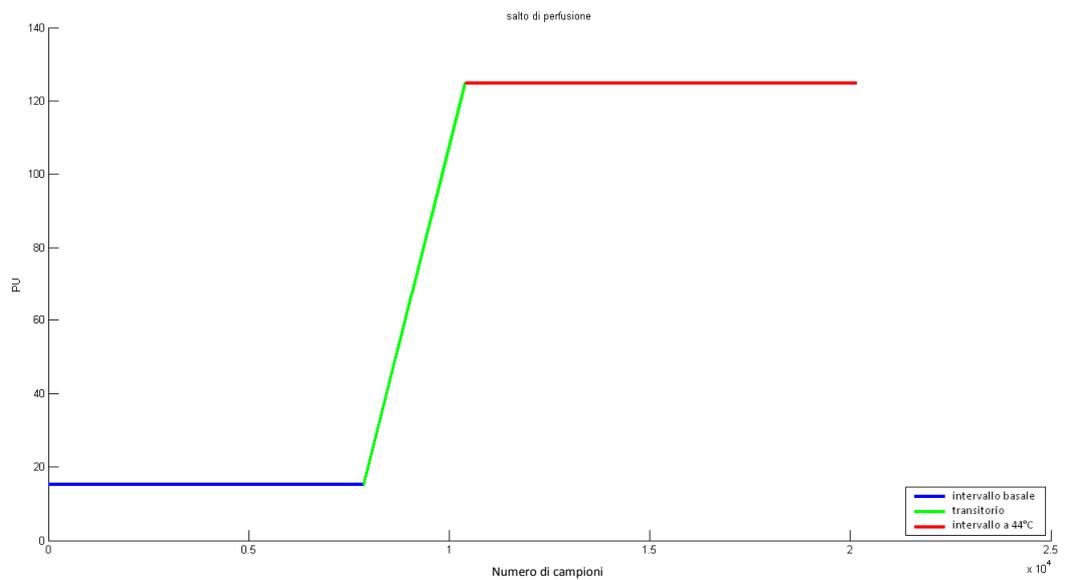
c) Intervallo a 44° C



d) Ampiezza assoluta, calcolata sull'intero segnale

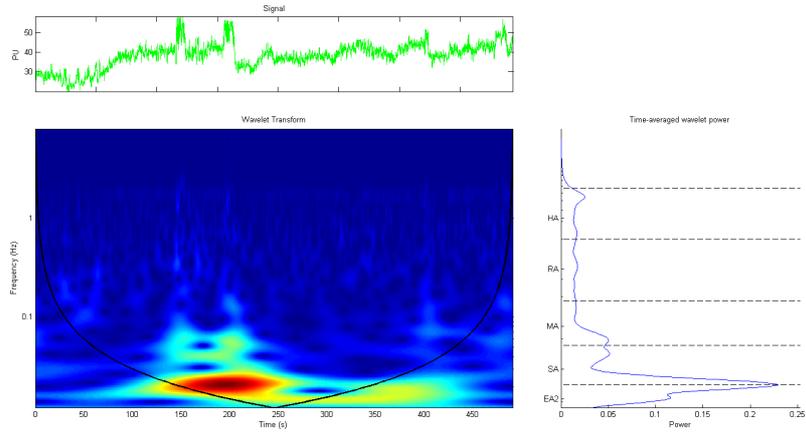


e) Potenza assoluta, calcolata sull'intero segnale

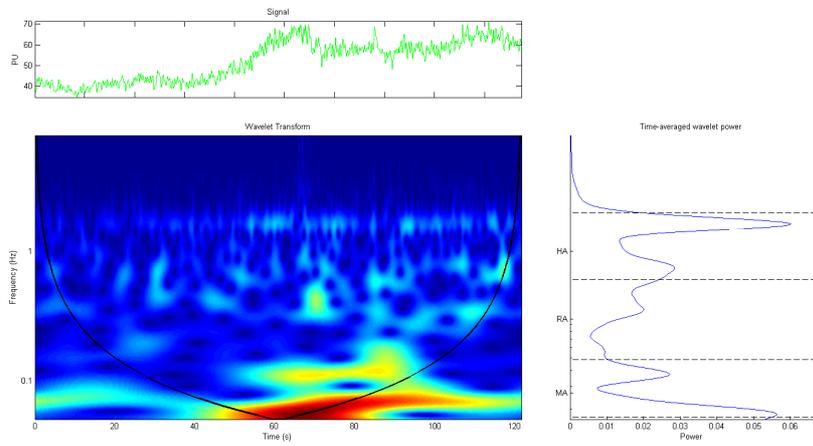


f) Variazione di perfusione tra il valore medio registrato tra l'intervallo a temperatura basale e a 44° C

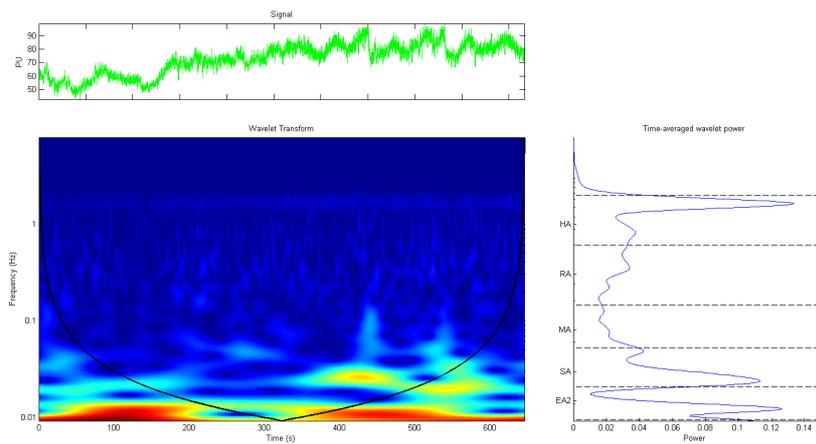
Paziente n°14



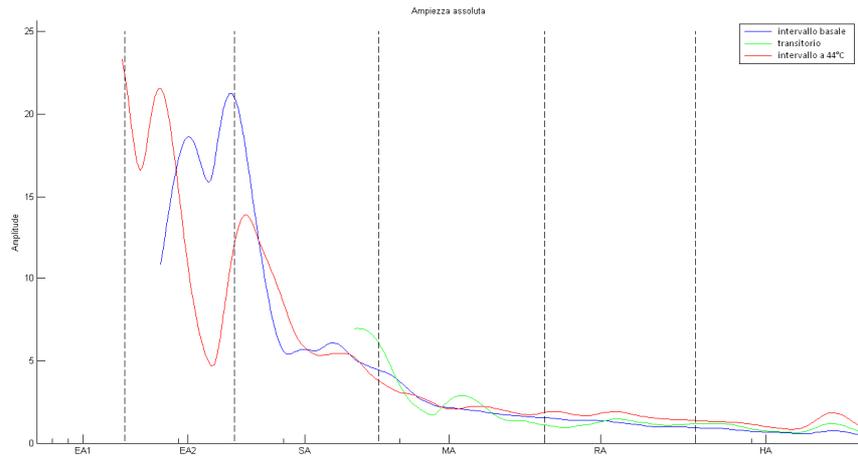
a) Intervallo a temperatura basale



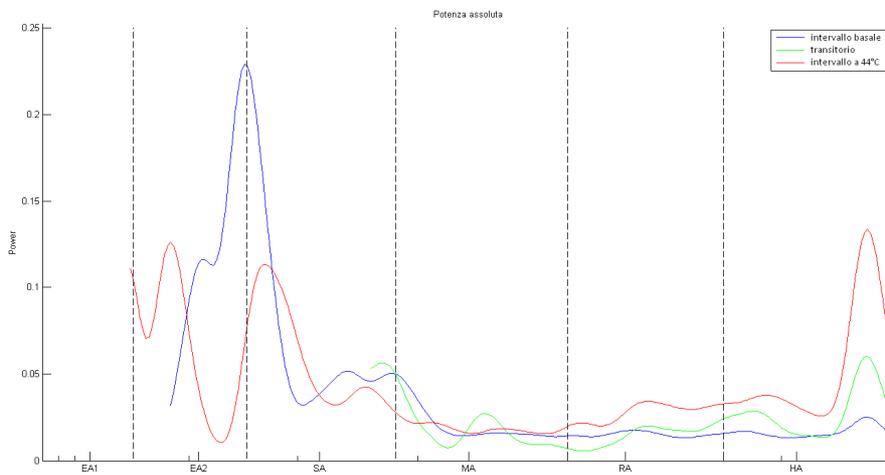
b) Transitorio



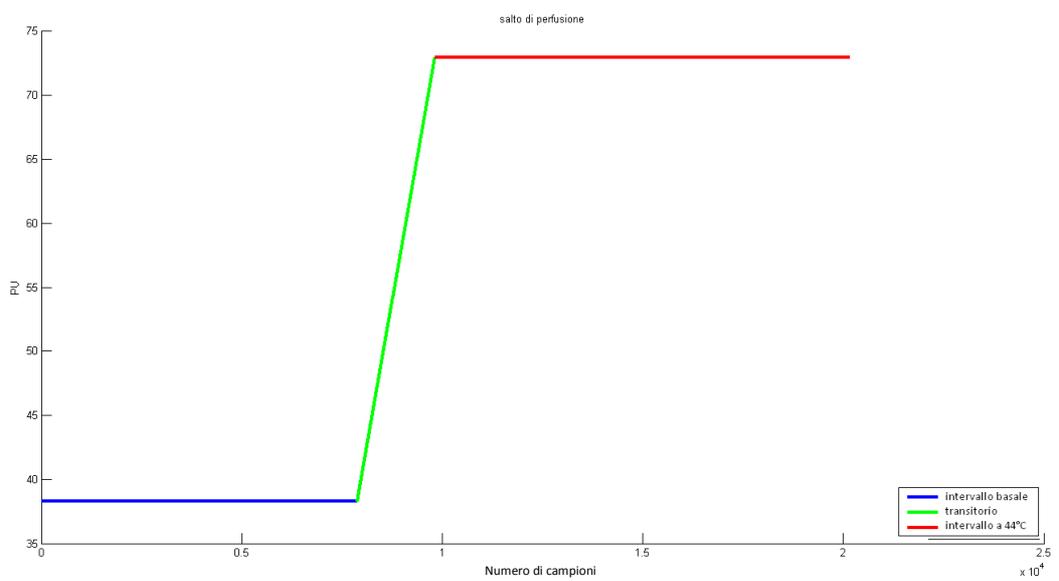
c) Intervallo a 44° C



d) Ampiezza assoluta, calcolata sull'intero segnale



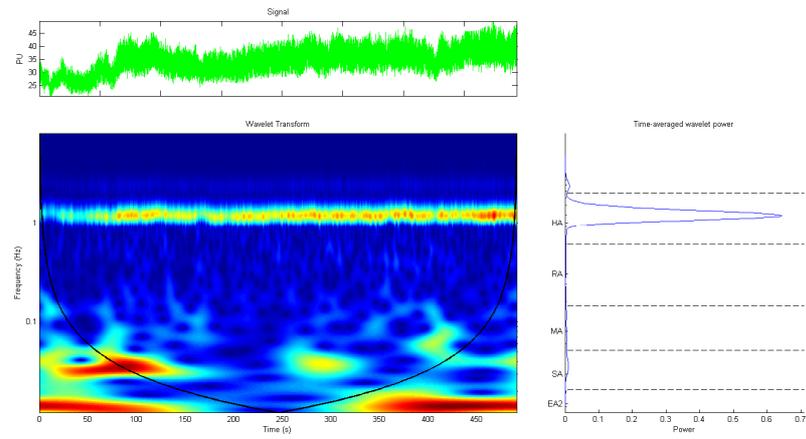
e) Potenza assoluta, calcolata sull'intero segnale



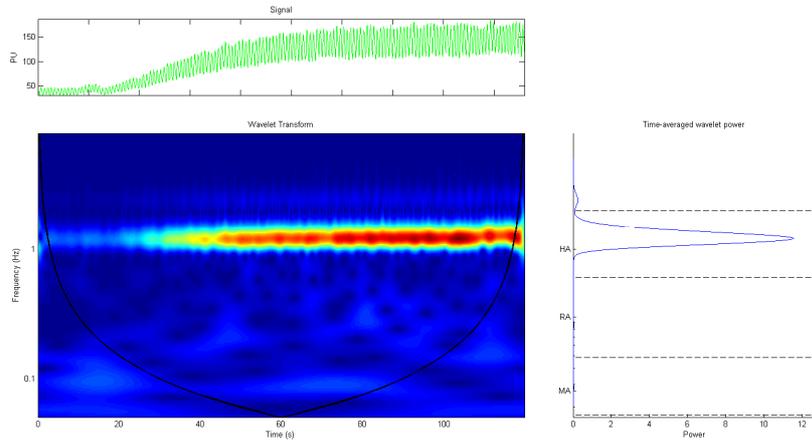
f) Variazione di perfusione tra il valore medio registrato tra l'intervallo a temperatura basale e a 44° C

5.3 GRUPPO C: pazienti con tcpO₂ > 50

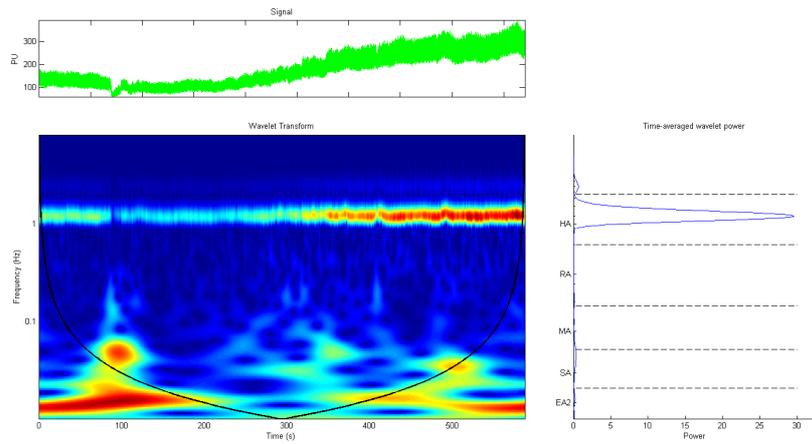
Paziente n°15



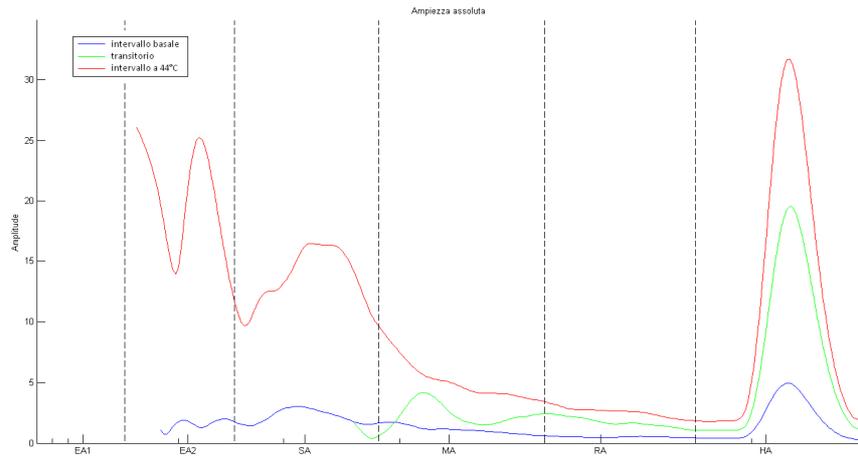
a) Intervallo a temperatura basale



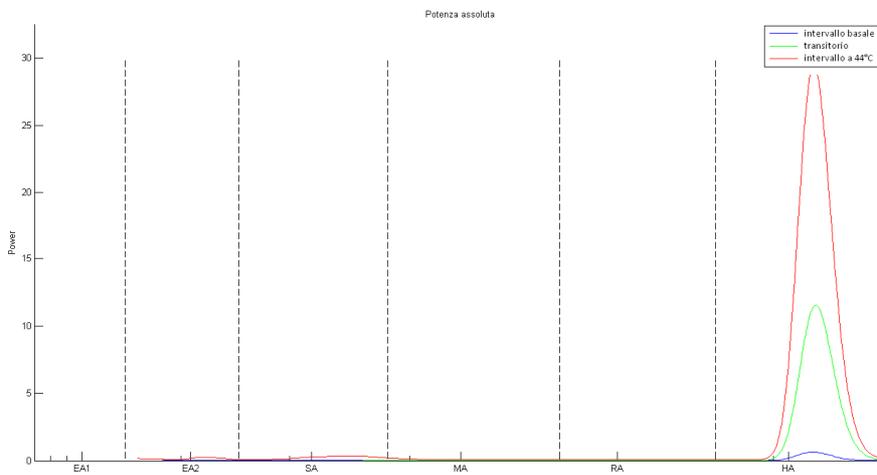
b) Transitorio



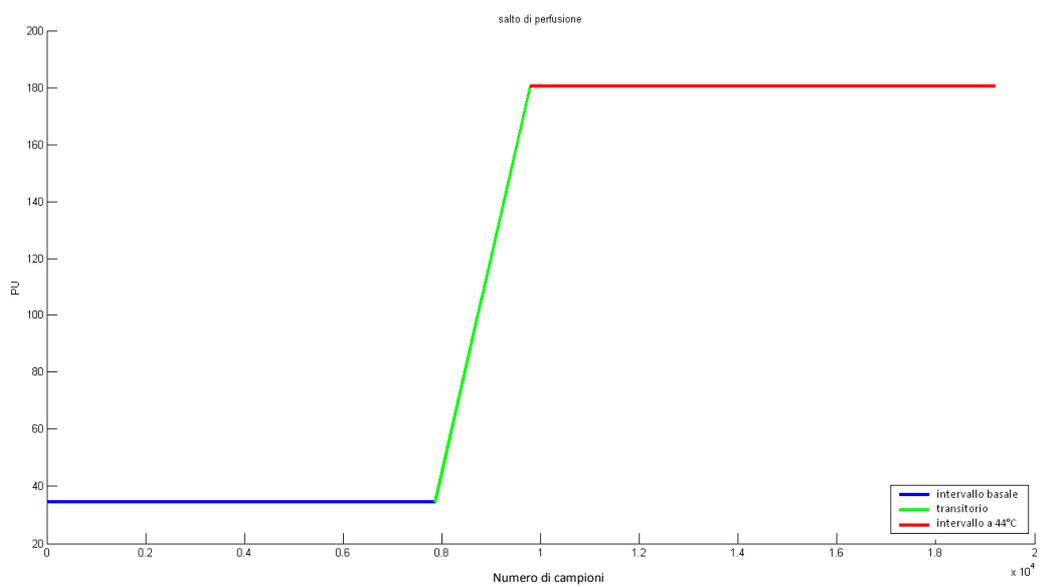
c) Intervallo a 44° C



d) Ampiezza assoluta, calcolata sull'intero segnale

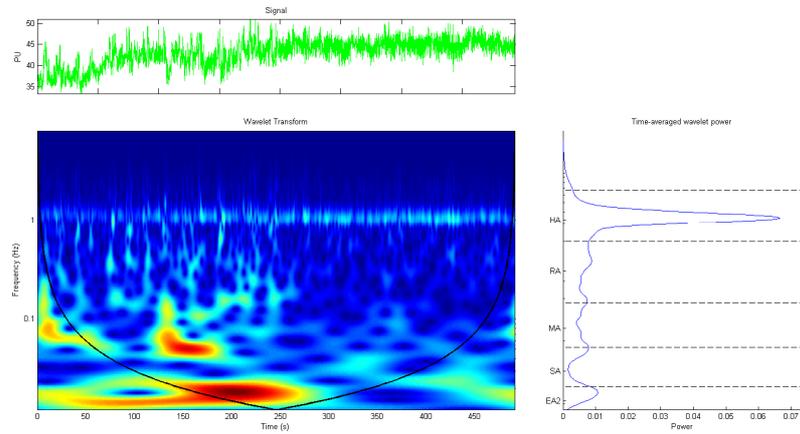


e) Potenza assoluta, calcolata sull'intero segnale

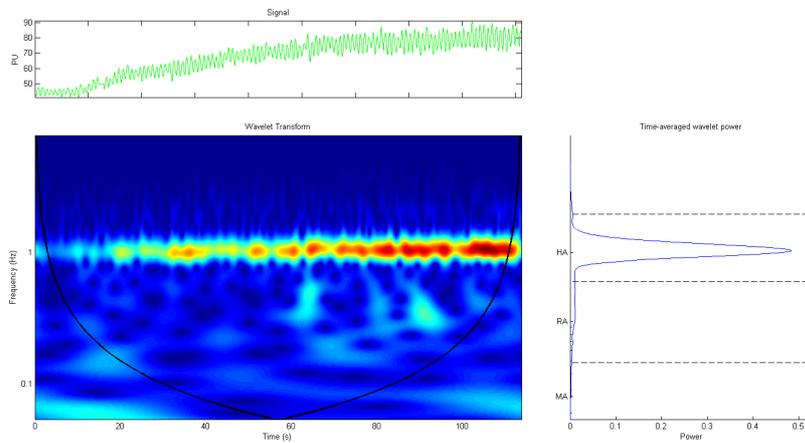


f) Variazione di perfusione tra il valore medio registrato tra l'intervallo a temperatura basale e a 44° C

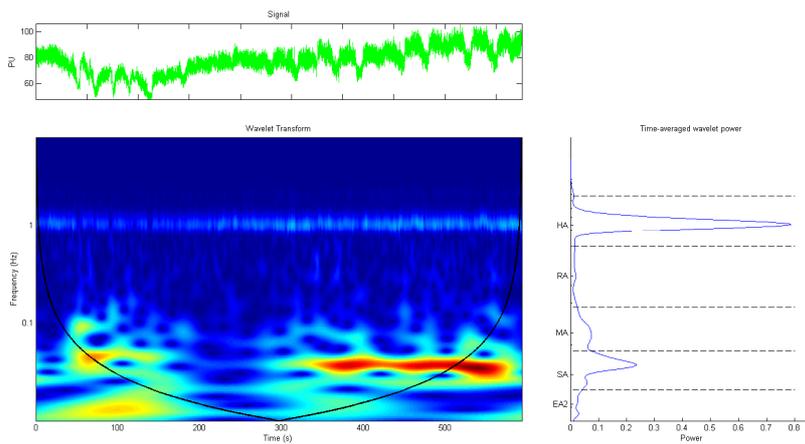
Paziente n°16



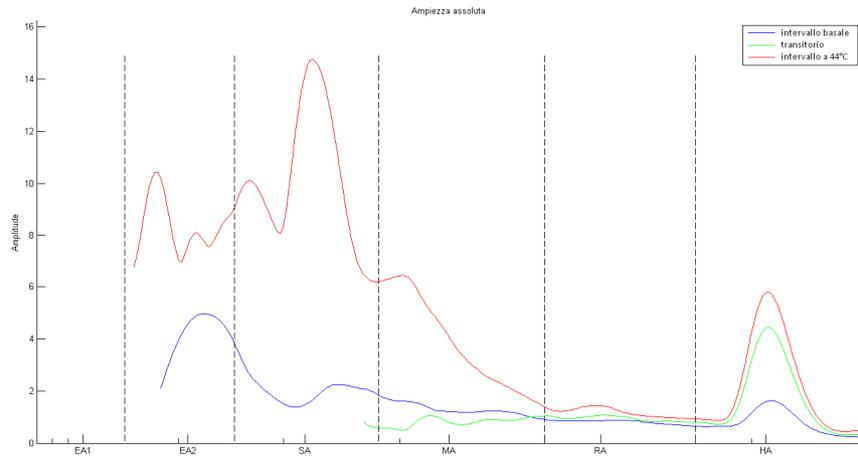
a) Intervallo a temperatura basale



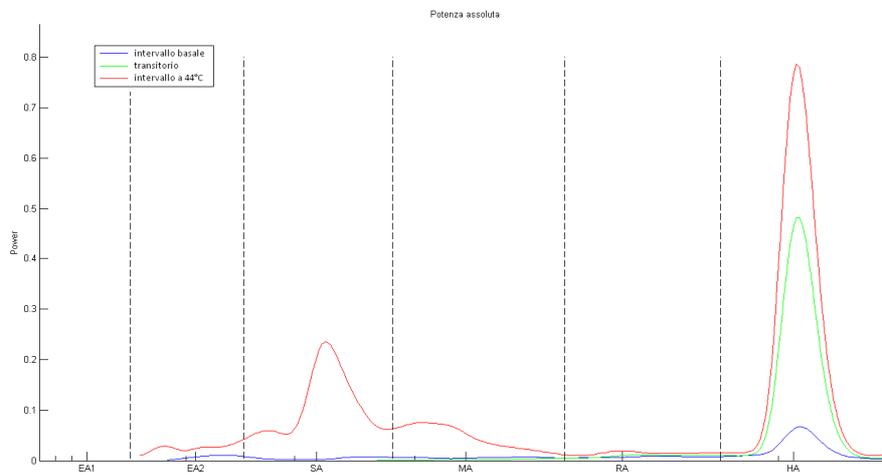
b) Transitorio



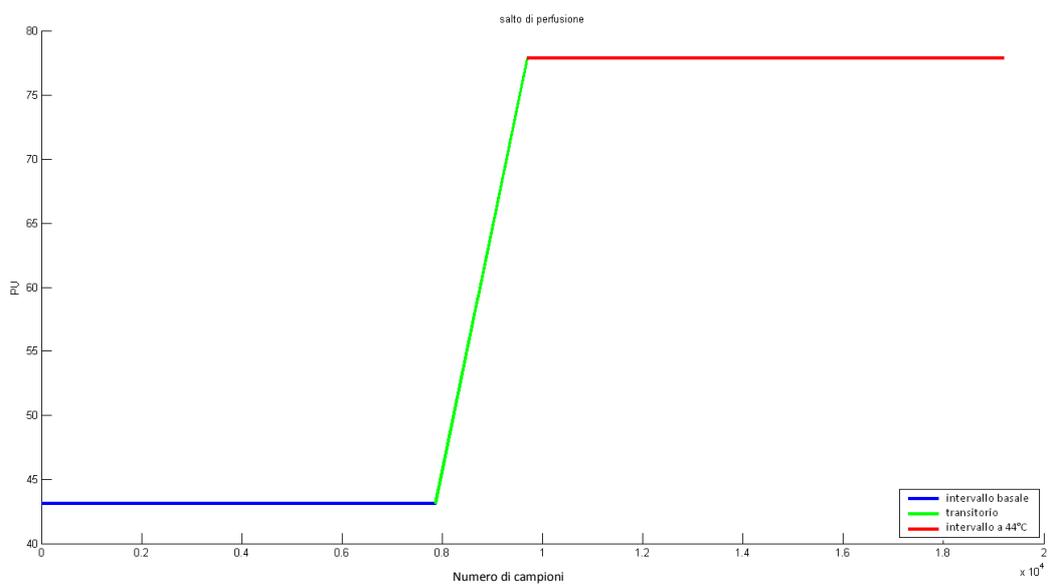
c) Intervallo a 44° C



d) Ampiezza assoluta, calcolata sull'intero segnale

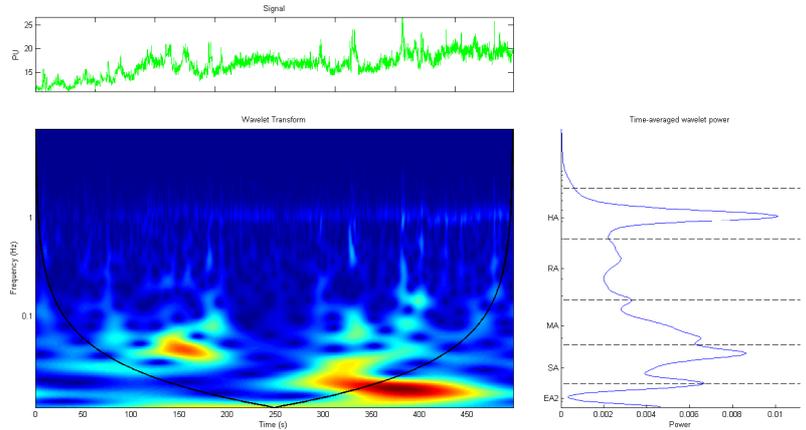


e) Potenza assoluta, calcolata sull'intero segnale

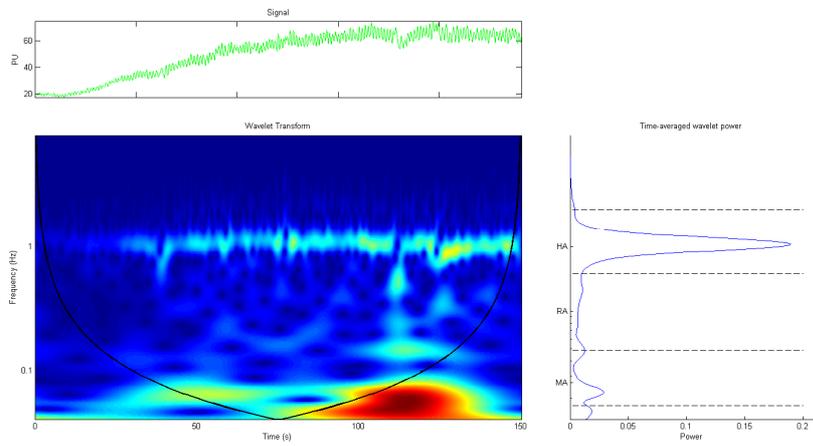


f) Variazione di perfusione tra il valore medio registrato tra l'intervallo a temperatura basale e a 44° C

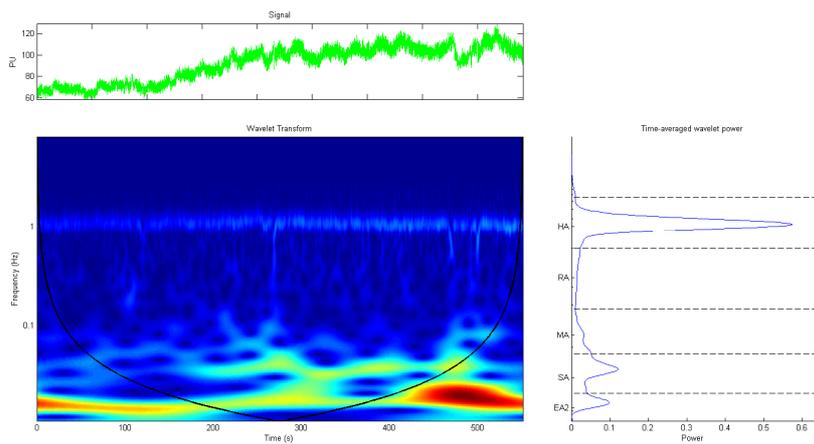
Paziente n°17



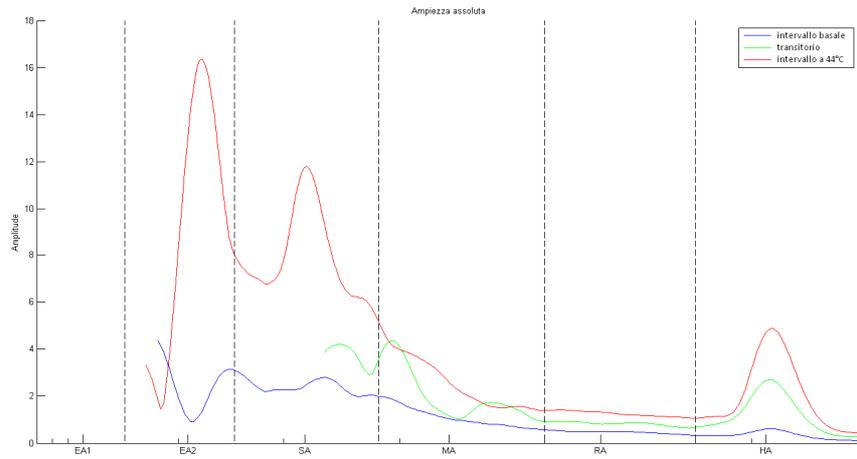
a) Intervallo a temperatura basale



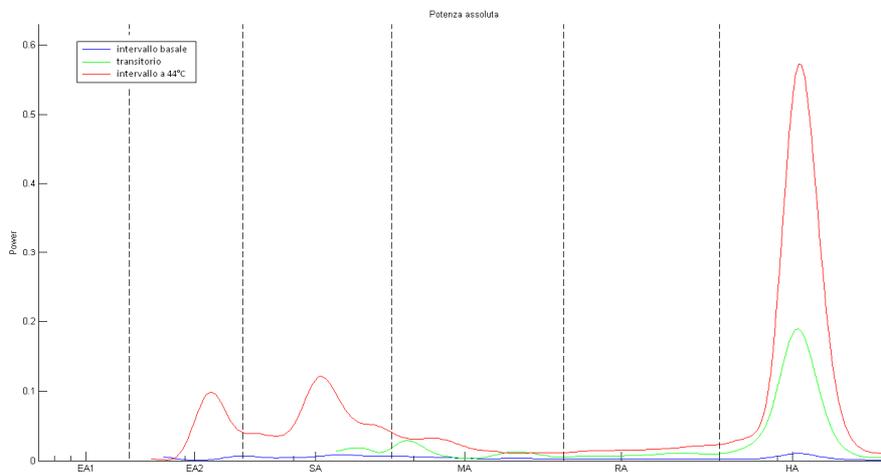
b) Transitorio



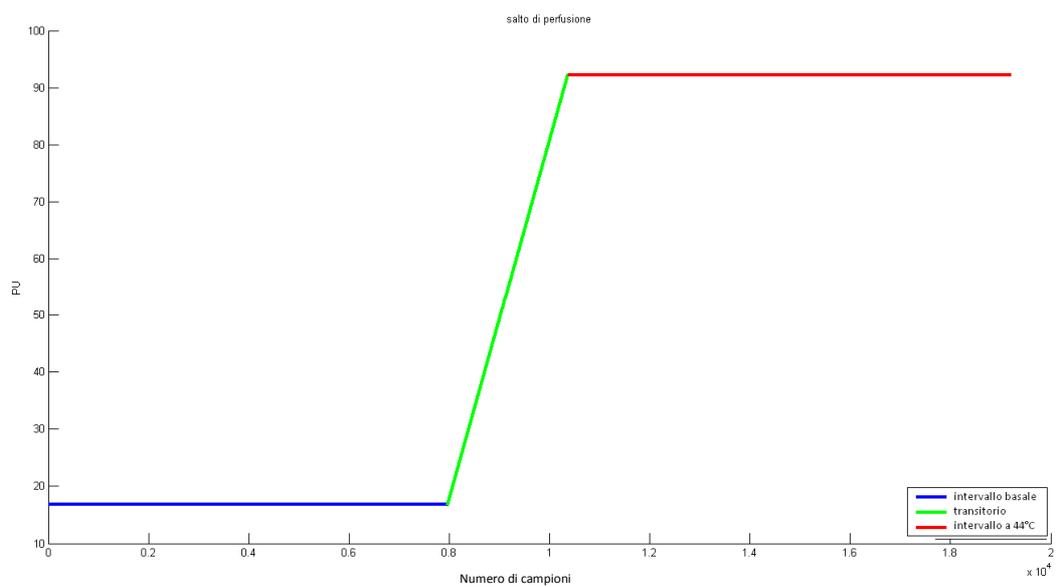
c) Intervallo a 44° C



d) Ampiezza assoluta, calcolata sull'intero segnale

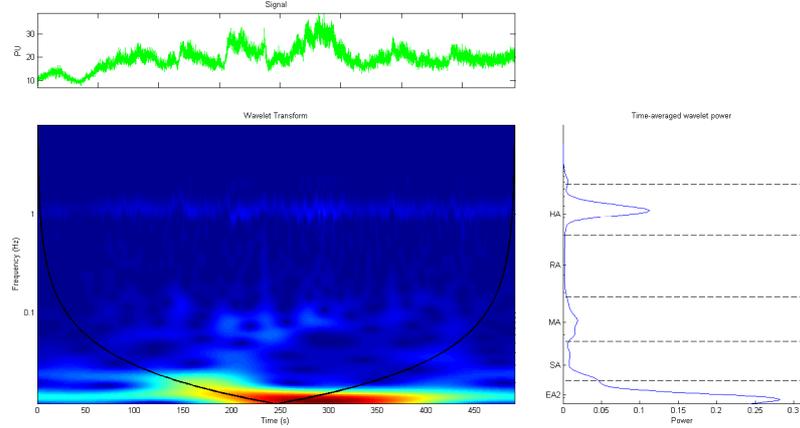


e) Potenza assoluta, calcolata sull'intero segnale

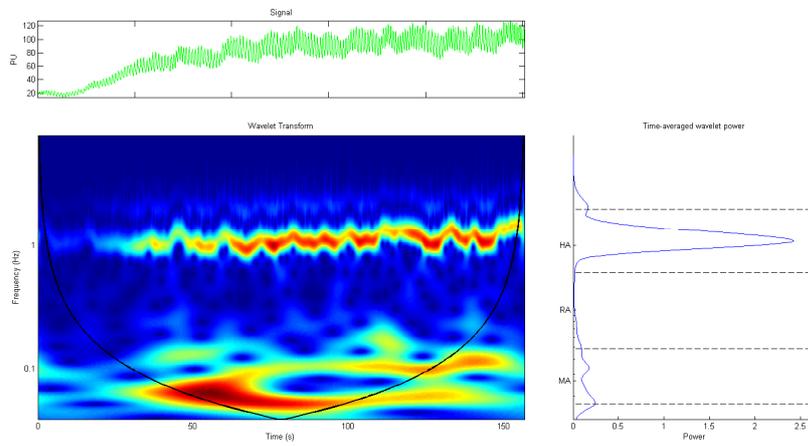


f) Variazione di perfusione tra il valore medio registrato tra l'intervallo a temperatura basale e a 44° C

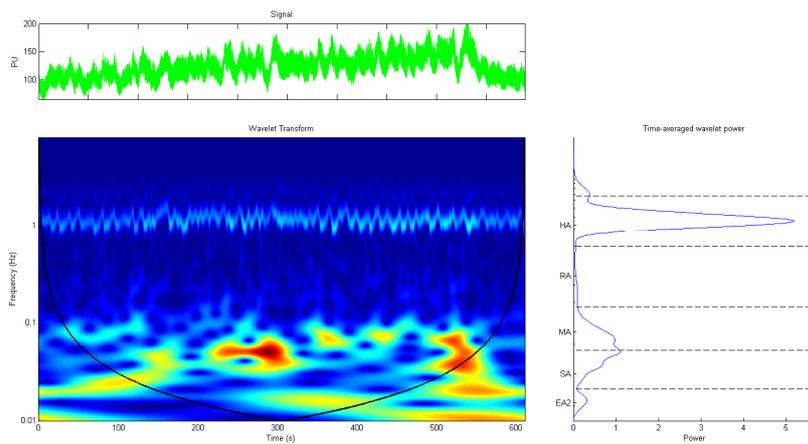
Paziente n°18



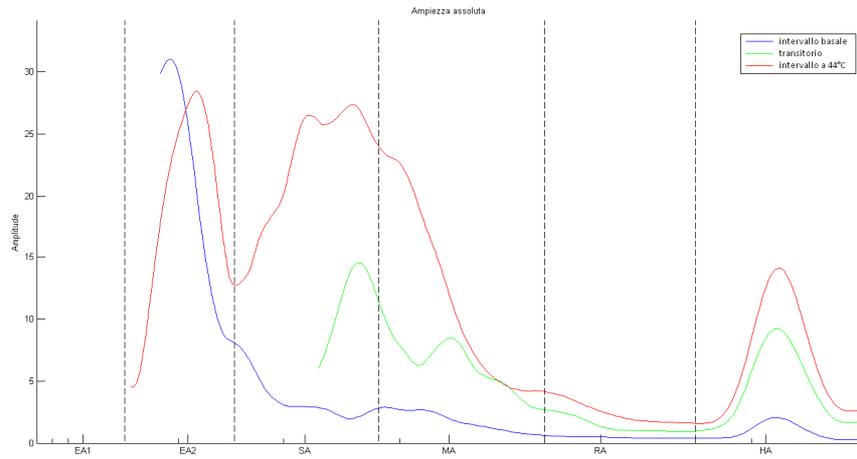
a) Intervallo a temperatura basale



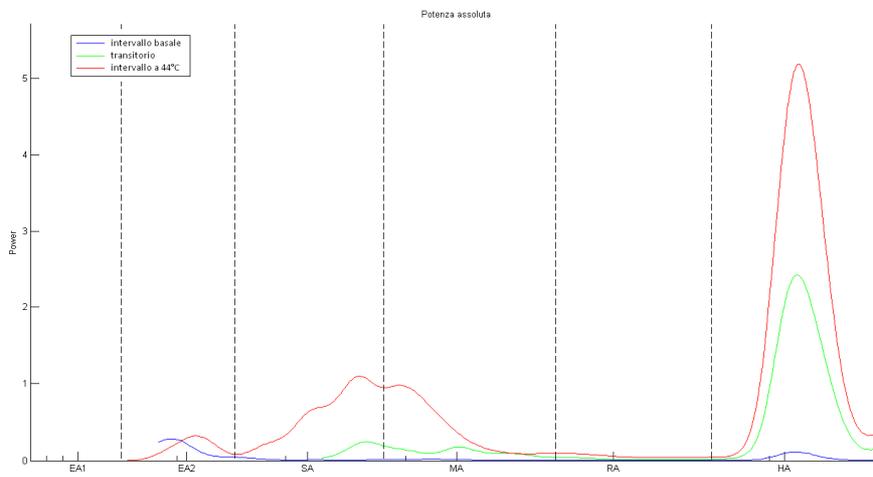
b) Transitorio



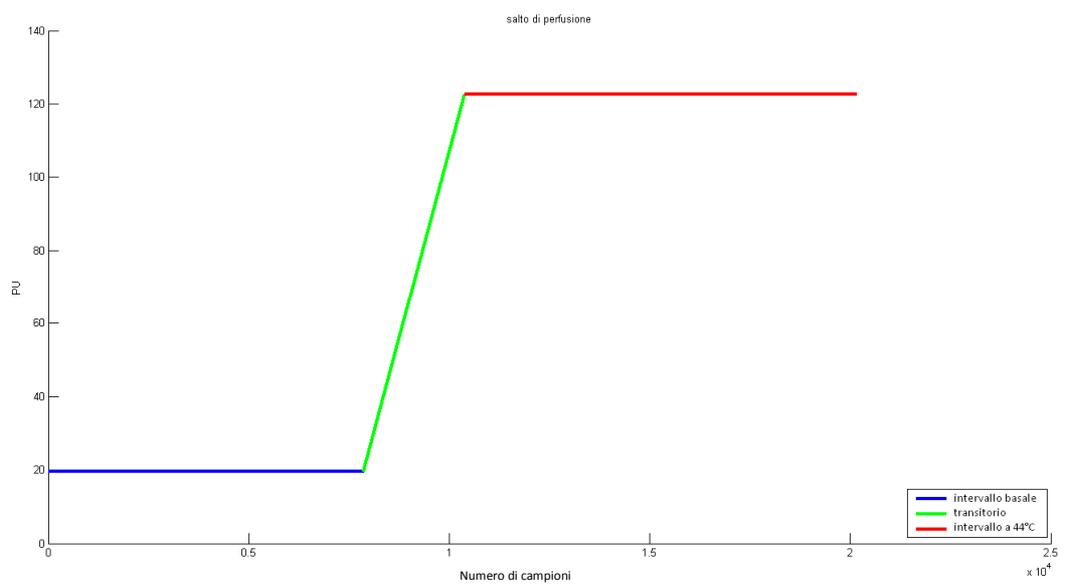
c) Intervallo a 44° C



d) Ampiezza assoluta, calcolata sull'intero segnale

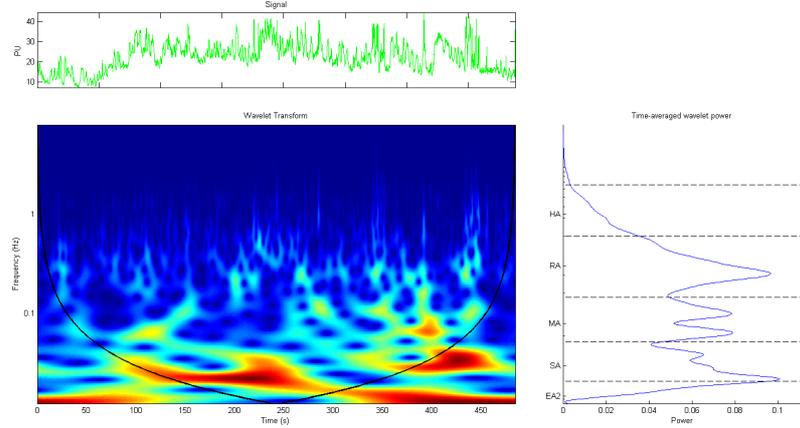


e) Potenza assoluta, calcolata sull'intero segnale

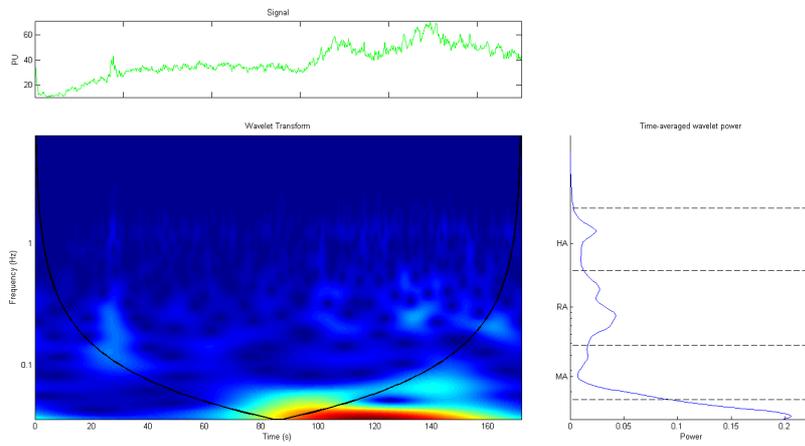


f) Variazione di perfusione tra il valore medio registrato tra l'intervallo a temperatura basale e a 44° C

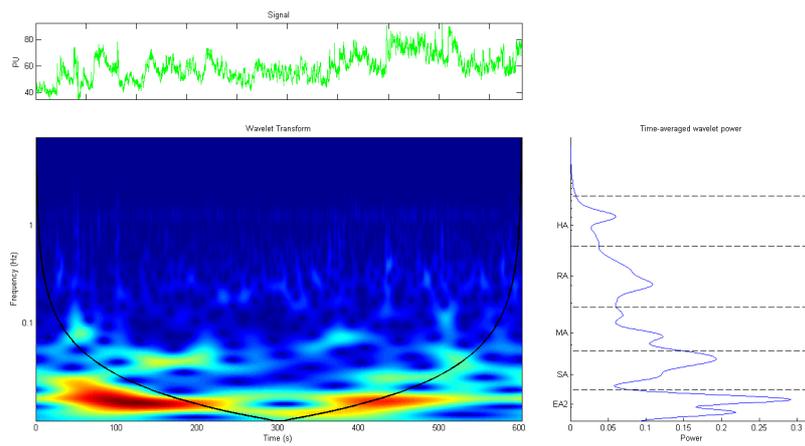
Paziente n°19



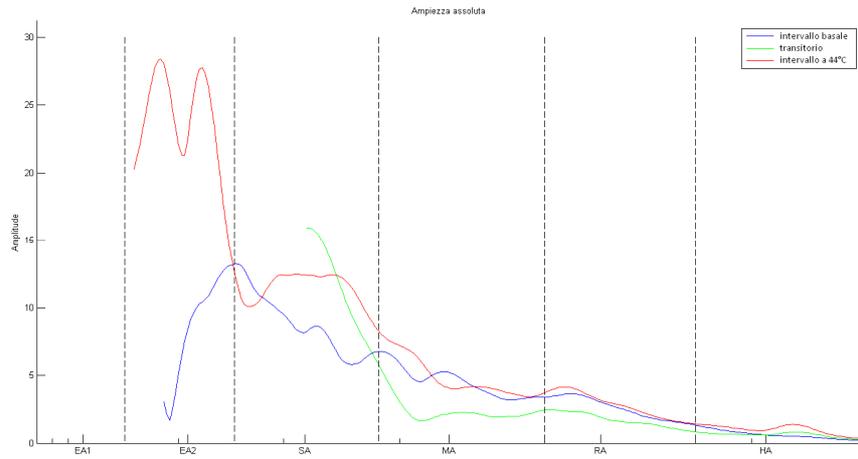
a) Intervallo a temperatura basale



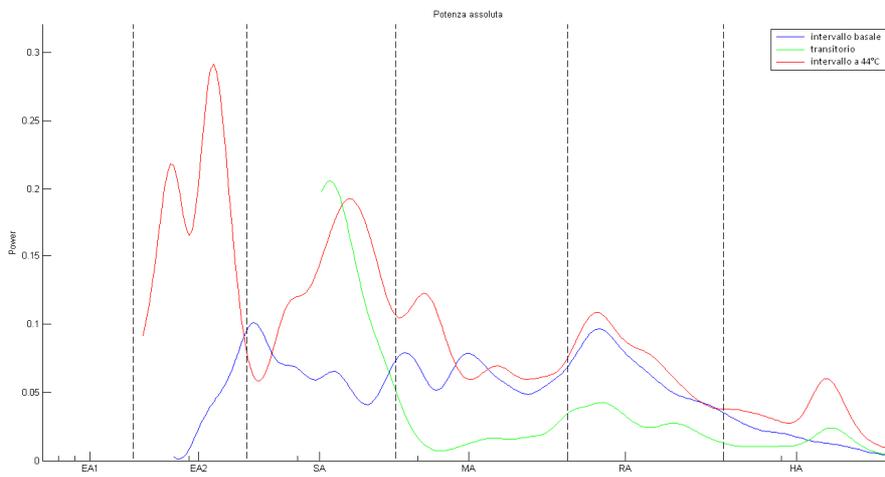
b) Transitorio



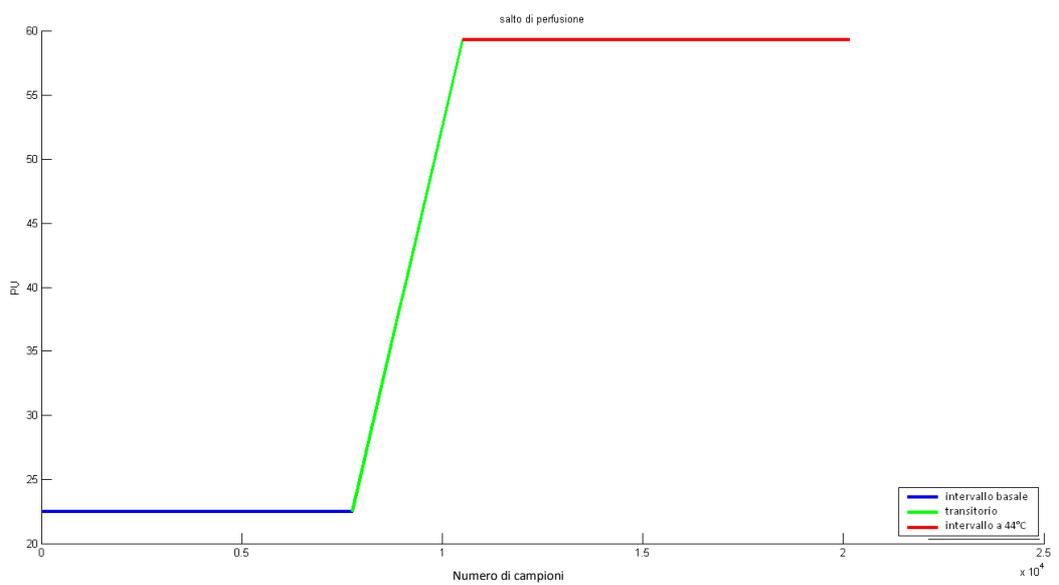
c) Intervallo a 44° C



d) Ampiezza assoluta, calcolata sull'intero segnale

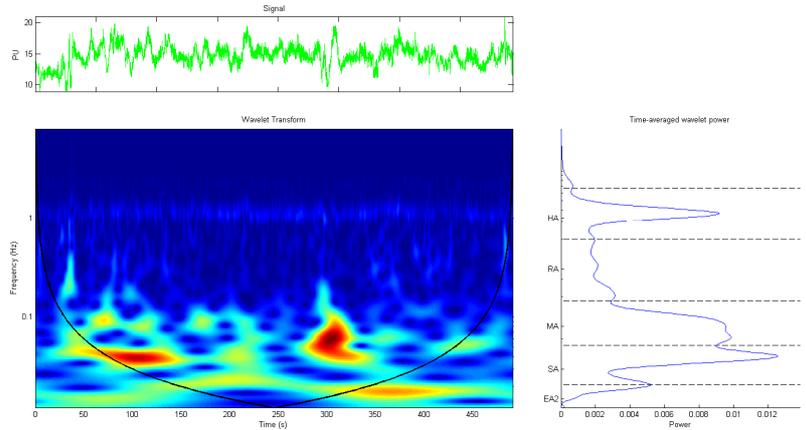


e) Potenza assoluta, calcolata sull'intero segnale

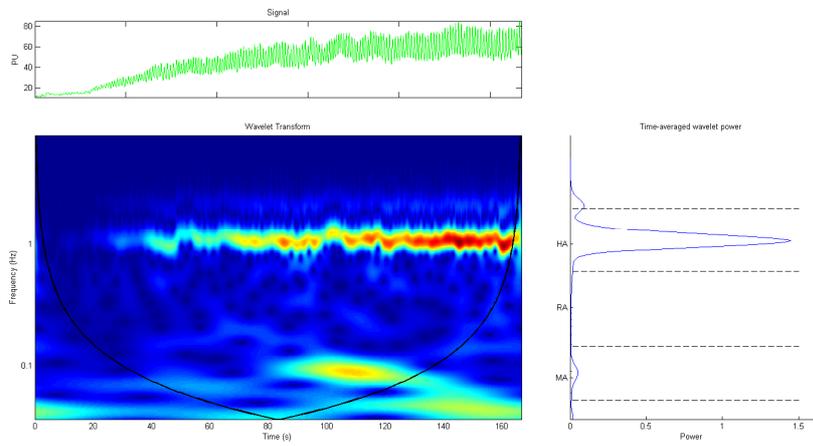


f) Variazione di perfusione tra il valore medio registrato tra l'intervallo a temperatura basale e a 44° C

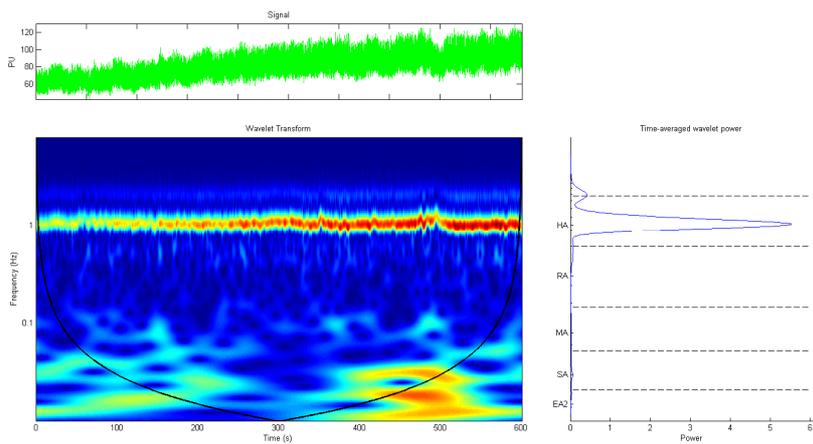
Paziente n°20



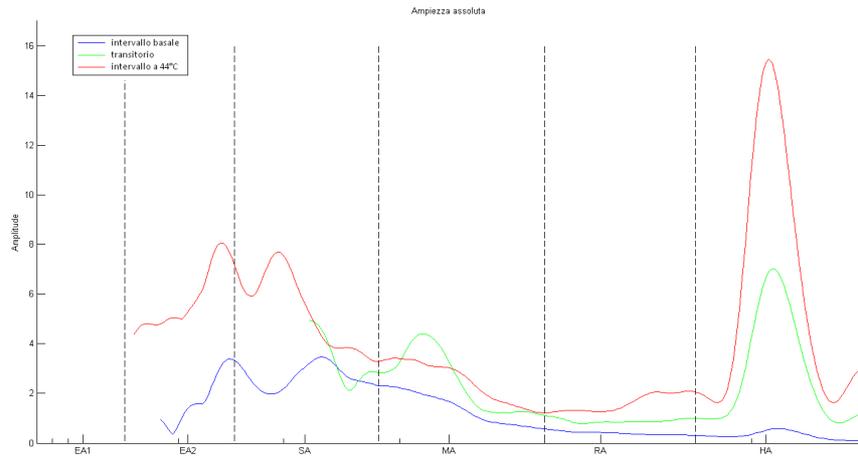
a) Intervallo a temperatura basale



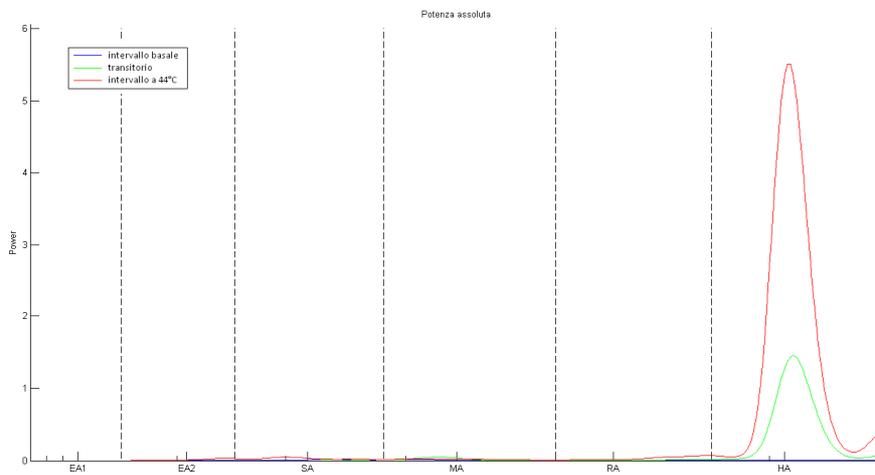
b) Transitorio



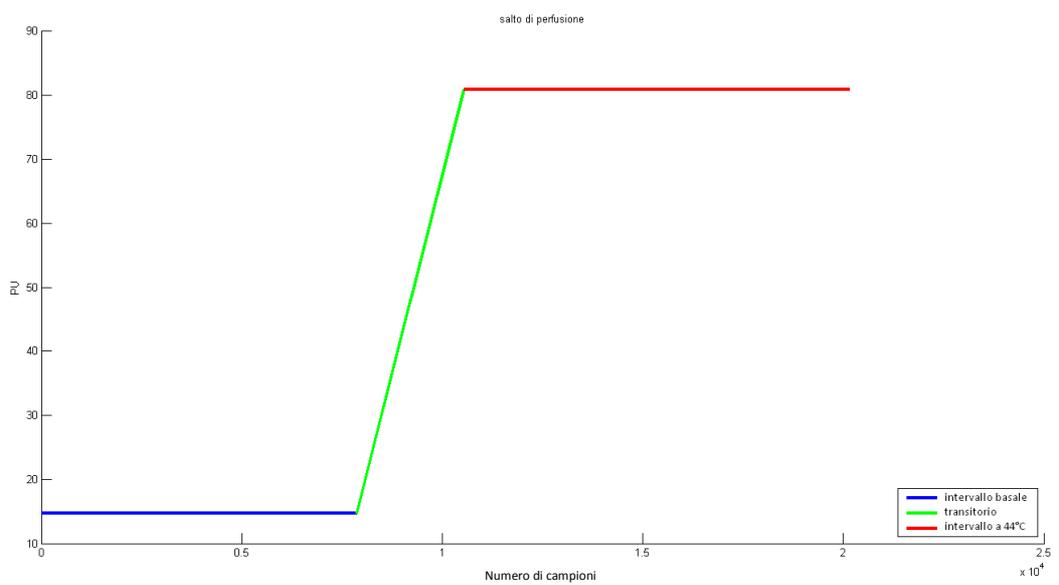
c) Intervallo a 44° C



d) Ampiezza assoluta, calcolata sull'intero segnale

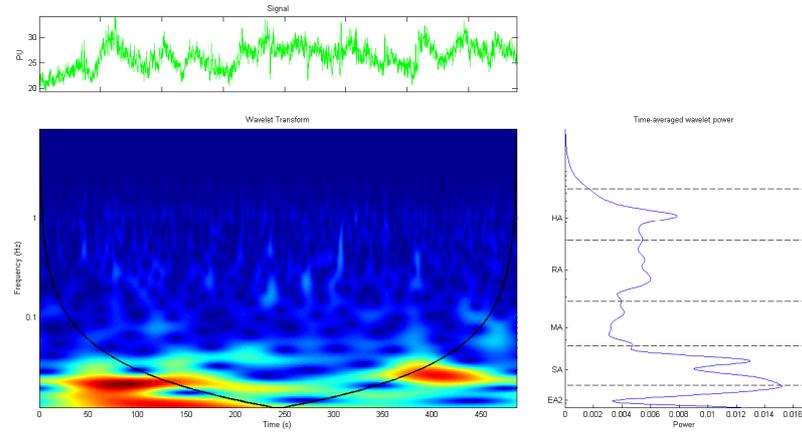


e) Potenza assoluta, calcolata sull'intero segnale

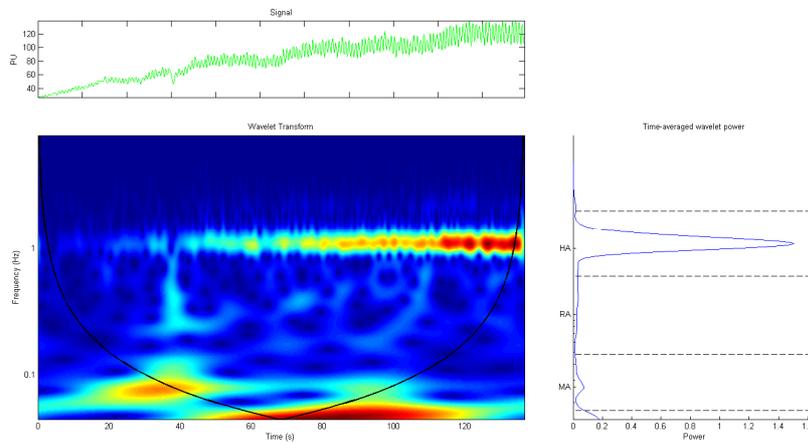


f) Variazione di perfusione tra il valore medio registrato tra l'intervallo a temperatura basale e a 44° C

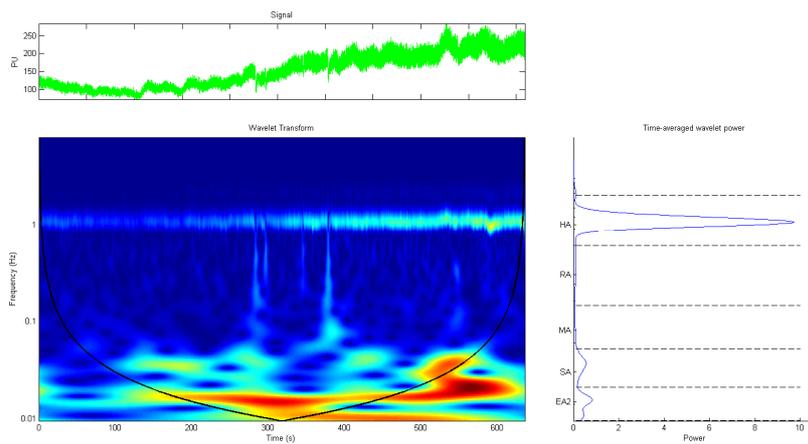
Paziente n°21



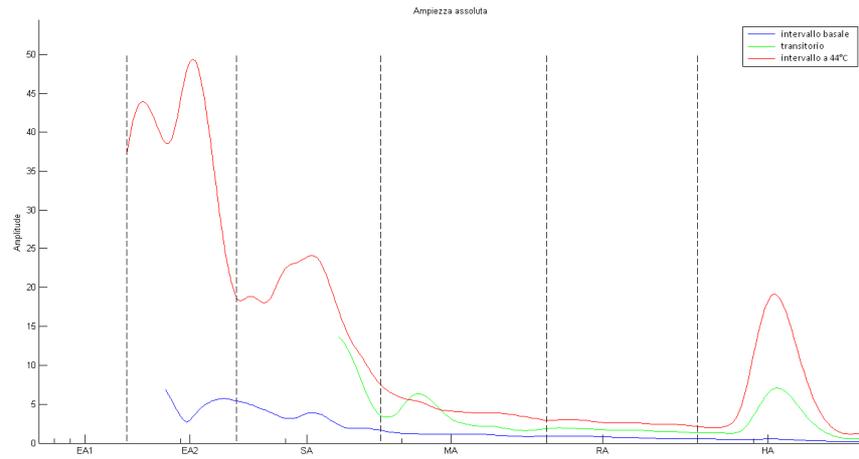
a) Intervallo a temperatura basale



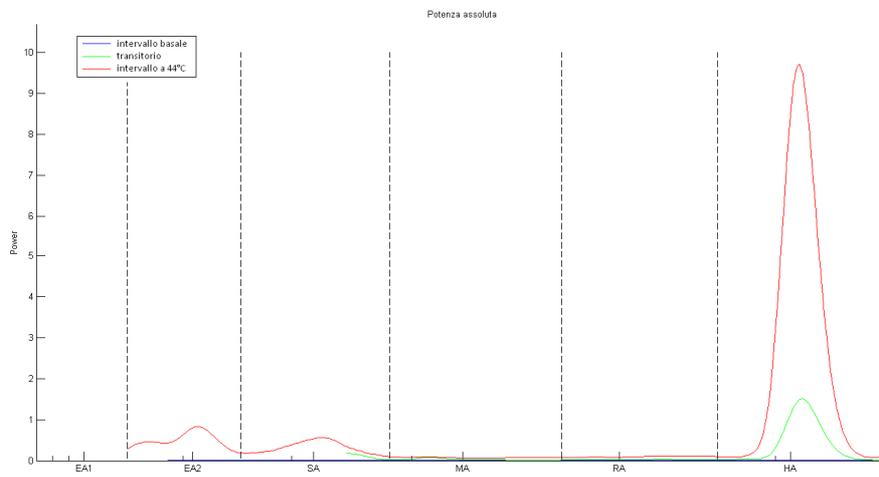
b) Transitorio



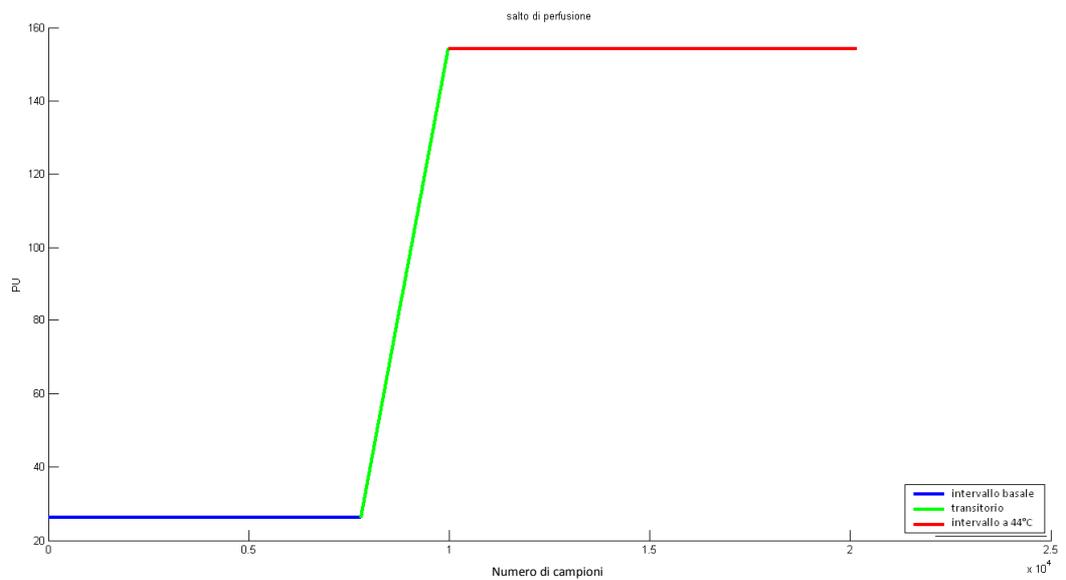
c) Intervallo a 44° C



d) Ampiezza assoluta, calcolata sull'intero segnale

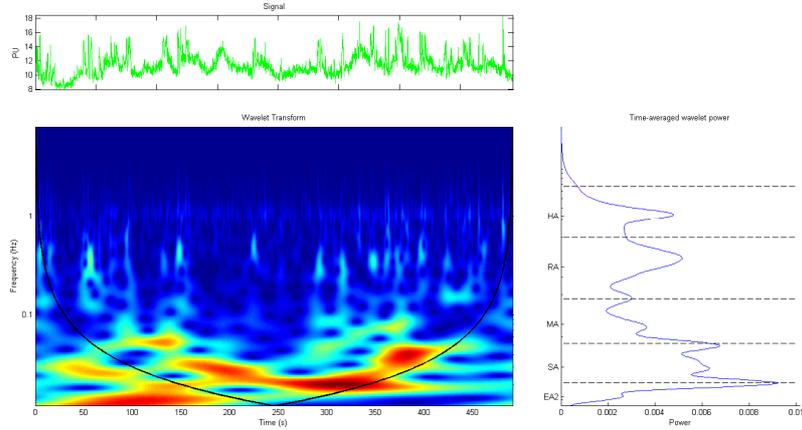


e) Potenza assoluta, calcolata sull'intero segnale

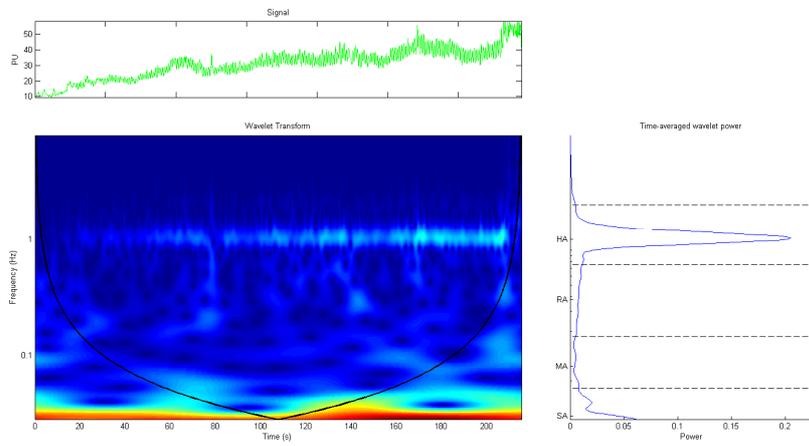


f) Variazione di perfusione tra il valore medio registrato tra l'intervallo a temperatura basale e a 44° C

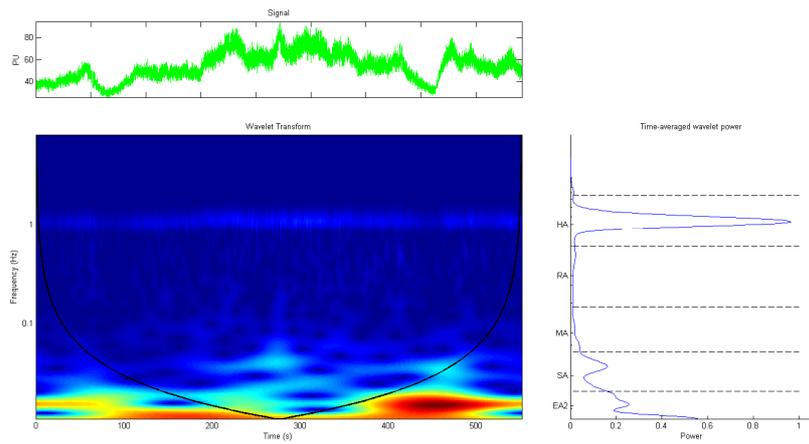
Paziente n°22



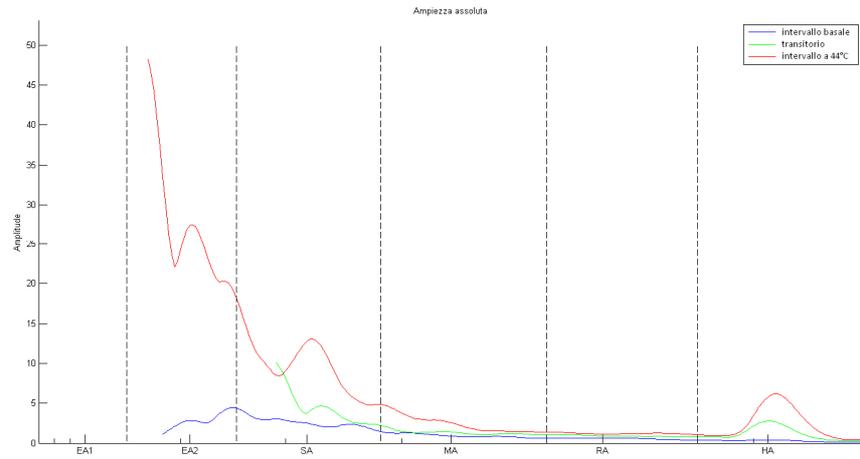
a) Intervallo a temperatura basale



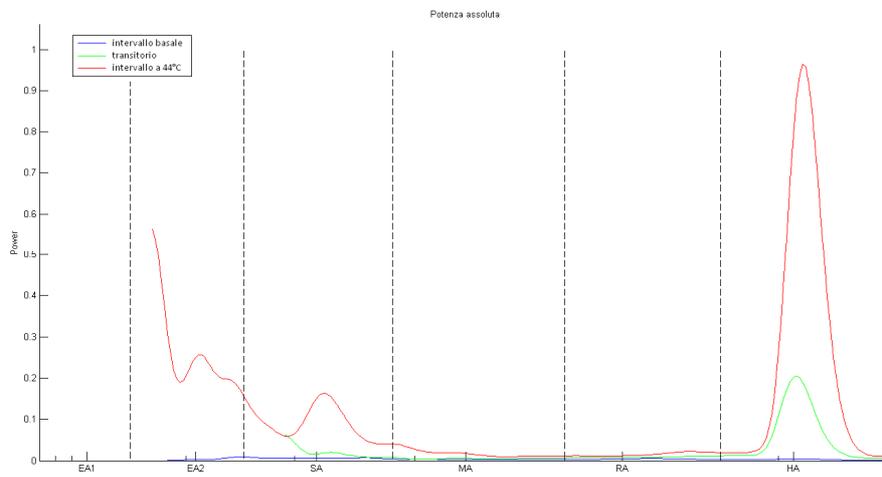
b) Transitorio



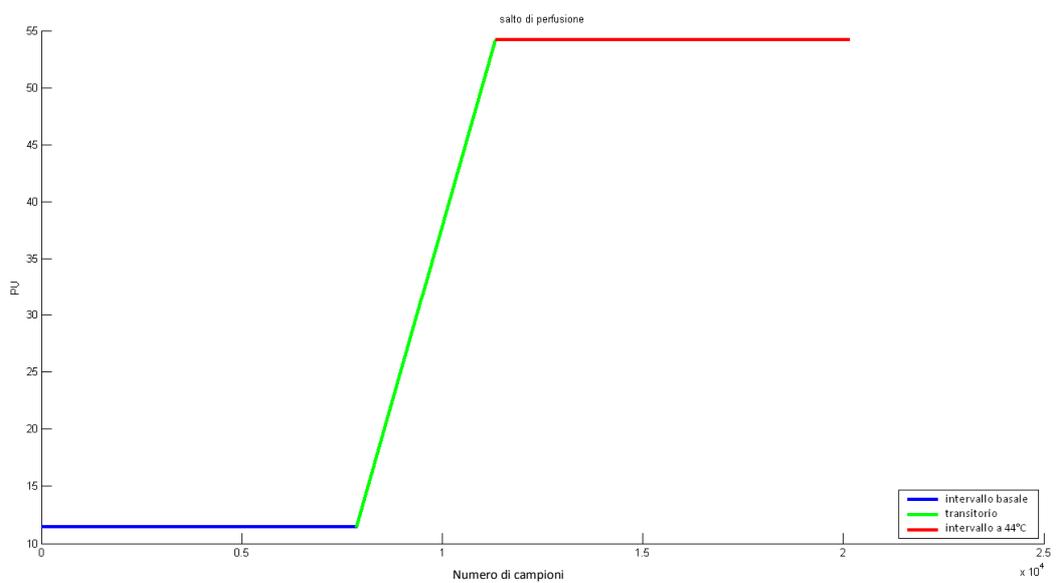
c) Intervallo a 44° C



d) Ampiezza assoluta, calcolata sull'intero segnale



e) Potenza assoluta, calcolata sull'intero segnale



f) Variazione di perfusione tra il valore medio registrato tra l'intervallo a temperatura basale e a 44° C

5.4 DATI RIASSUNTIVI

5.4.1 PERFUSIONE CUTANEA E PRESSIONE TRANSCUTANEA DI OSSIGENO

Gruppo A	tcpO ₂ [mmHg]	PU basale	PU 44°C	Variazione %
Paziente n°1	28,442	16,5	20	21,21
Paziente n°2	21,79	39,5	72	82,28
Paziente n°3	20,63	44	68,5	55,68
Paziente n°4	2,075*	18,5	38,5	108,11
Paziente n°5	23,926	22,5	31	37,78
Paziente n°6	25,94	24	62,5	160,42

media	24,15	27,50	48,75	77,58
deviazione standard	3,15	11,45	21,75	51,10

Gruppo B	tcpO ₂ [mmHg]	PU basale	PU 44°C	Variazione %
Paziente n°7	47,974	21	62	195,24
Paziente n°8	31,189	18,5	40	116,22
Paziente n°9	35,339	20	55	175,00
Paziente n°10	46,997	28	102	264,29
Paziente n°11	32,959	12,5	20	60,00
Paziente n°12	49,011	4,5	13,5	200,00
Paziente n°13	41,382	16	125,5	684,38
Paziente n°14	33,264	38,5	73	89,61

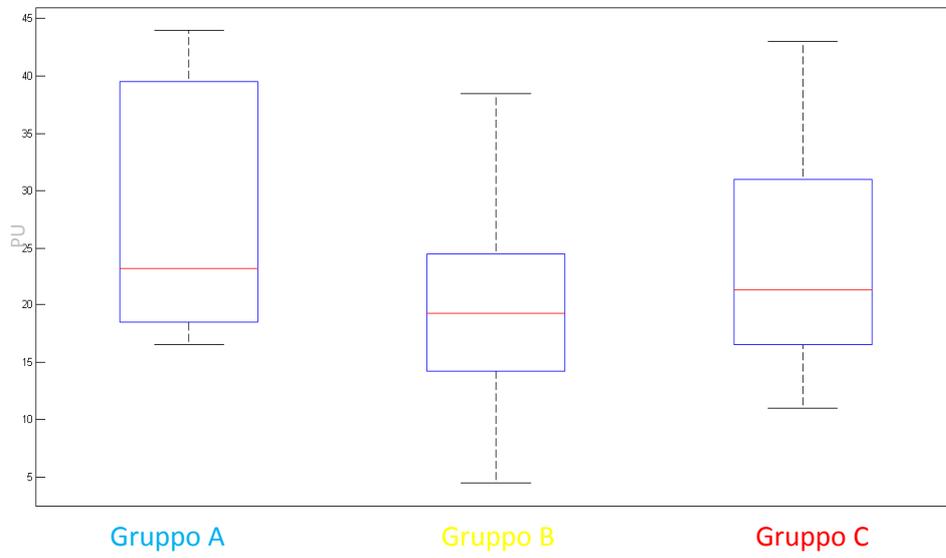
media	39,76	19,88	61,38	223,09
deviazione standard	7,46	10,16	38,54	197,82

Gruppo C	tcpO ₂ [mmHg]	PU basale	PU 44°C	Variazione %
Paziente n°15	79,529	36	180	400,00
Paziente n°16	55,725	43	77,5	80,23
Paziente n°17	60,913	18	93,5	419,44
Paziente n°18	67,383	20	123	515,00
Paziente n°19	61,035	22,5	59	162,22
Paziente n°20	62,744	15	81	440,00
Paziente n°21	52,124	26	154	492,31
Paziente n°22	58,899	11	53,5	386,36

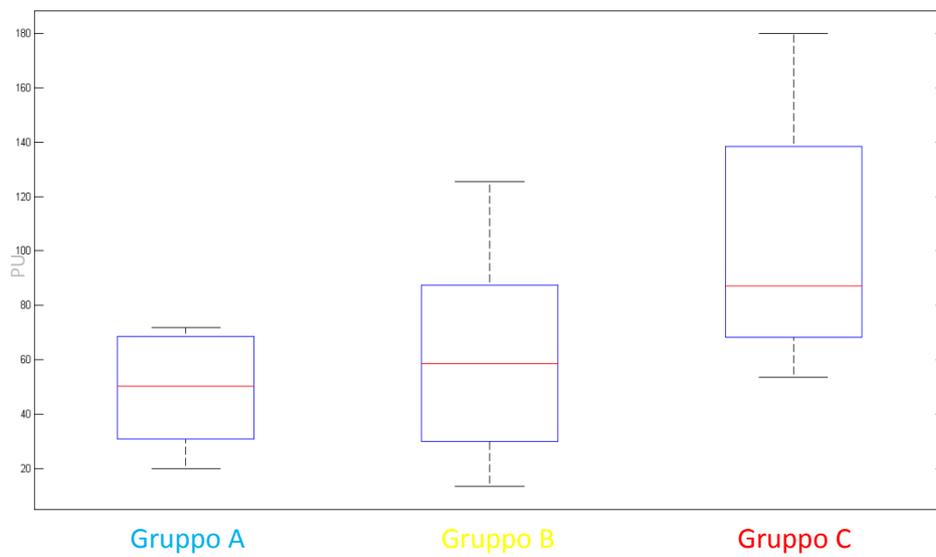
media	62,29	23,94	102,69	361,95
deviazione standard	8,32	10,78	45,58	156,35

* valore escluso dal calcolo della media, perché frutto di un'impresione nel processo di acquisizione del dato

Perfusione cutanea – Intervallo basale



Perfusione cutanea – Intervallo 44° C



5.4.2 AMPIEZZA E POTENZA RELATIVE PER LA BANDA CARDIACA

Gruppo A	AMPIEZZA			POTENZA		
	basale	transitorio	44° C	basale	transitorio	44° C
Paziente n°1	0,2748	0,3626	0,3627	0,0895	0,3584	0,5521
Paziente n°2	0,1954	0,3008	0,5038	0,0950	0,2462	0,6588
Paziente n°3	0,2471	0,3396	0,4133	0,1636	0,3414	0,4950
Paziente n°4	0,1646	0,3406	0,4948	0,0707	0,3172	0,6121
Paziente n°5	0,2841	0,3505	0,3654	0,2545	0,3570	0,3886
Paziente n°6	0,1391	0,3486	0,5124	0,0463	0,3129	0,6408

media	0,2175	0,3405	0,4421	0,1199	0,3222	0,5579
Dev. st.	0,0600	0,0211	0,0701	0,0767	0,0419	0,1026

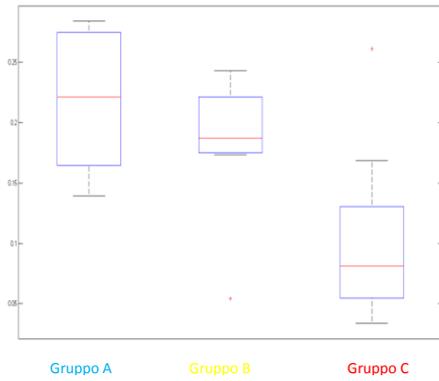
Gruppo B	AMPIEZZA			POTENZA		
	basale	transitorio	44° C	basale	transitorio	44° C
Paziente n°7	0,1949	0,3030	0,5021	0,1073	0,2357	0,6570
Paziente n°8	0,1732	0,3168	0,5101	0,0722	0,2609	0,6670
Paziente n°9	0,2029	0,3788	0,4183	0,1455	0,3966	0,4579
Paziente n°10	0,1787	0,3604	0,4609	0,0895	0,3584	0,5521
Paziente n°11	0,2426	0,2993	0,4581	0,1583	0,2443	0,5974
Paziente n°12	0,1770	0,3465	0,4765	0,0702	0,3308	0,5990
Paziente n°13	0,0540	0,3601	0,5859	0,0124	0,3063	0,6813
Paziente n°14	0,2395	0,3209	0,4396	0,1727	0,2886	0,5387

media	0,1829	0,3357	0,4814	0,1035	0,3027	0,5938
Dev. st.	0,0586	0,0296	0,0519	0,0537	0,0568	0,0759

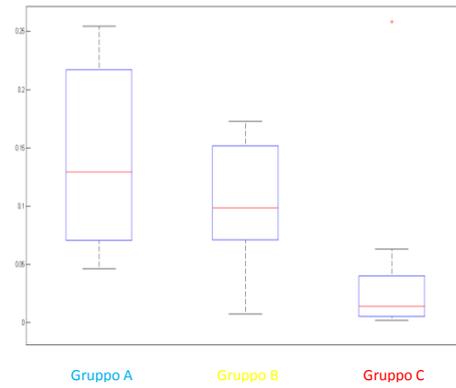
Gruppo C	AMPIEZZA			POTENZA		
	basale	transitorio	44° C	basale	transitorio	44° C
Paziente n°15	0,0885	0,3489	0,5627	0,0155	0,2758	0,7087
Paziente n°16	0,1684	0,3611	0,4704	0,0632	0,3554	0,5814
Paziente n°17	0,0923	0,3330	0,5747	0,0175	0,2615	0,7210
Paziente n°18	0,0740	0,3603	0,5656	0,0124	0,3063	0,6813
Paziente n°19	0,2609	0,2834	0,4557	0,2582	0,2045	0,5372
Paziente n°20	0,0337	0,3158	0,6505	0,0019	0,2205	0,7777
Paziente n°21	0,0391	0,2836	0,6774	0,0019	0,1504	0,8477
Paziente n°22	0,0699	0,2999	0,6302	0,0085	0,1833	0,8082

media	0,1034	0,3233	0,5734	0,0474	0,2447	0,7079
Dev. st.	0,0759	0,0323	0,0798	0,0874	0,0678	0,1072

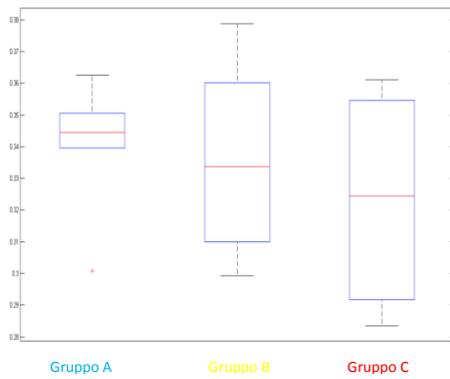
Banda Cardiaca – Ampiezza – Intervallo basale



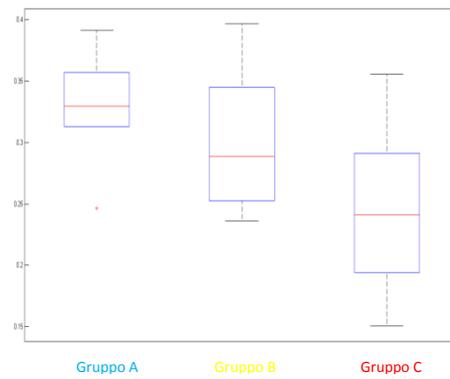
Banda Cardiaca – Potenza – Intervallo basale



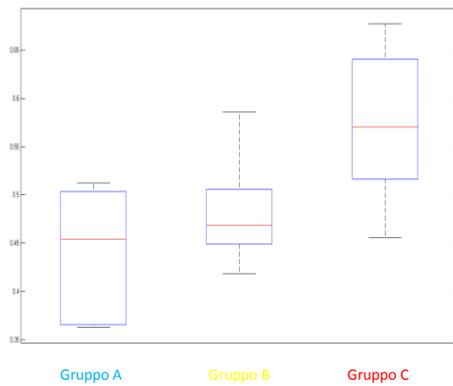
Banda Cardiaca – Ampiezza – Transitorio



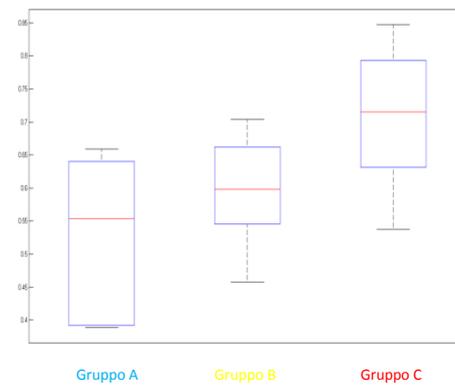
Banda Cardiaca – Potenza – Transitorio



Banda Cardiaca – Ampiezza – Intervallo 44° C



Banda Cardiaca – Potenza – Intervallo 44° C



5.4.3 AMPIEZZA E POTENZA RELATIVE PER LA BANDA MIOGENA

Gruppo A	AMPIEZZA			POTENZA		
	basale	transitorio	44° C	basale	transitorio	44° C
Paziente n°1	0,3432	0,3277	0,3290	0,3605	0,3272	0,3123
Paziente n°2	0,4073	0,1248	0,4680	0,4425	0,0332	0,5243
Paziente n°3	0,2114	0,3620	0,4266	0,1171	0,3514	0,5315
Paziente n°4	0,2196	0,2971	0,4832	0,1533	0,2131	0,6336
Paziente n°5	0,2951	0,3321	0,3729	0,2401	0,4374	0,3225
Paziente n°6	0,1968	0,3317	0,4714	0,1065	0,2790	0,6146

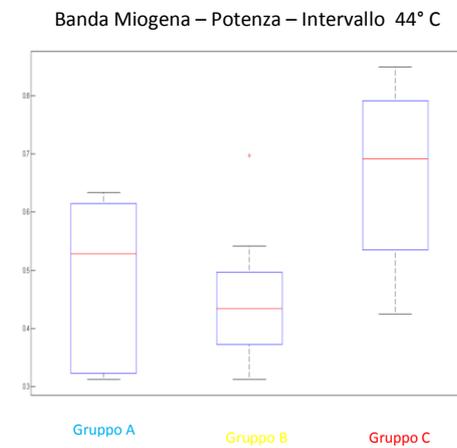
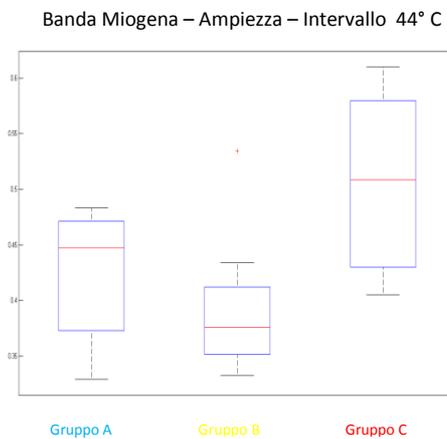
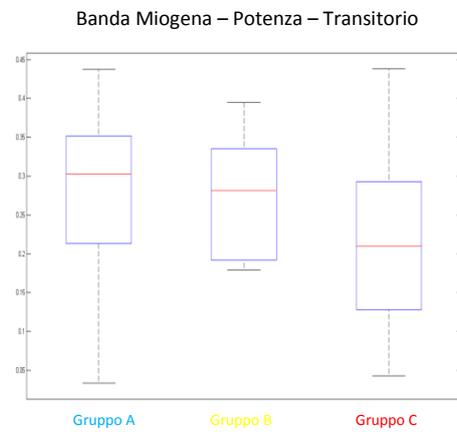
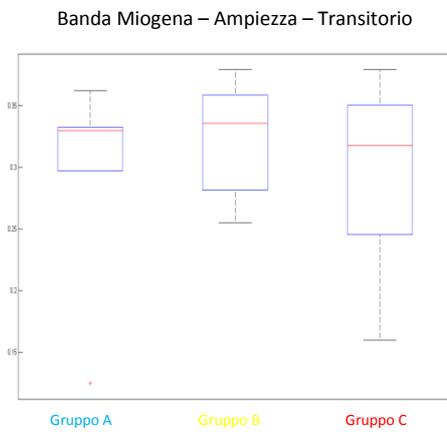
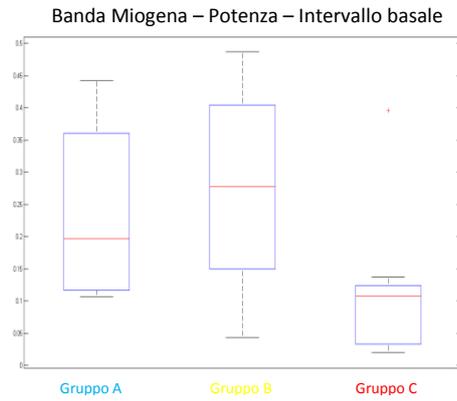
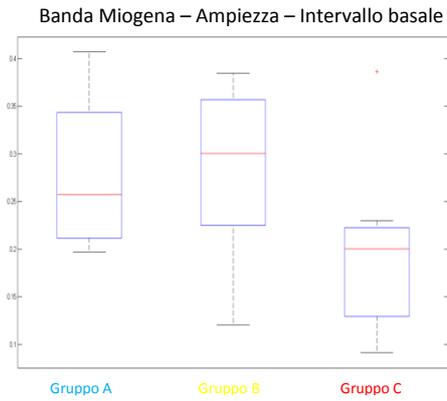
media	0,2789	0,2959	0,4252	0,2367	0,2736	0,4898
Dev. st.	0,0845	0,0863	0,0622	0,1385	0,1395	0,1405

Gruppo B	AMPIEZZA			POTENZA		
	basale	transitorio	44° C	basale	transitorio	44° C
Paziente n°7	0,3737	0,2547	0,3716	0,4173	0,1789	0,4037
Paziente n°8	0,2193	0,3466	0,4340	0,1375	0,3214	0,5411
Paziente n°9	0,3851	0,2825	0,3324	0,4871	0,2010	0,3118
Paziente n°10	0,3400	0,2802	0,3797	0,3921	0,1827	0,4552
Paziente n°11	0,2706	0,3705	0,3589	0,1988	0,3481	0,4530
Paziente n°12	0,2307	0,3792	0,3901	0,1621	0,3948	0,4431
Paziente n°13	0,1206	0,3452	0,5341	0,0430	0,2597	0,6972
Paziente n°14	0,3307	0,3256	0,3437	0,3572	0,3028	0,3400

media	0,2838	0,3231	0,3931	0,2744	0,2737	0,4556
Dev. st.	0,0906	0,0457	0,0649	0,1590	0,0811	0,1211

Gruppo C	AMPIEZZA			POTENZA		
	basale	transitorio	44° C	basale	transitorio	44° C
Paziente n°15	0,1260	0,2841	0,5899	0,0324	0,1467	0,8209
Paziente n°16	0,2299	0,1602	0,6100	0,1071	0,0428	0,8501
Paziente n°17	0,1950	0,3511	0,4539	0,1084	0,3159	0,5757
Paziente n°18	0,0912	0,3391	0,5697	0,0198	0,2177	0,7625
Paziente n°19	0,3866	0,2069	0,4064	0,3962	0,1094	0,4944
Paziente n°20	0,2154	0,3792	0,4054	0,1374	0,4385	0,4241
Paziente n°21	0,1326	0,3498	0,5176	0,1374	0,4385	0,4241
Paziente n°22	0,2052	0,2957	0,4991	0,1108	0,2014	0,6878

media	0,1977	0,2958	0,5065	0,1312	0,2389	0,6300
Dev. st.	0,0909	0,0767	0,0800	0,1159	0,1470	0,1740



5.4.4 AMPIEZZA E POTENZA RELATIVE PER LA BANDA NEUROGENA

Gruppo A	AMPIEZZA			POTENZA		
	basale	transitorio	44° C	basale	transitorio	44° C
Paziente n°1	0,4897	0,1384	0,3719	0,6401	0,0820	0,2779
Paziente n°2	0,4622	0,0534	0,4843	0,5202	0,0133	0,4665
Paziente n°3	0,3042	0,0285	0,6673	0,1692	0,0063	0,8245
Paziente n°4	0,3046	0,0751	0,6203	0,1643	0,0249	0,8108
Paziente n°5	0,3545	0,2697	0,3758	0,3476	0,2857	0,3666
Paziente n°6	0,3044	0,0336	0,6619	0,1780	0,0037	0,8283

media	0,3699	0,0998	0,5303	0,3366	0,0693	0,5958
Dev. st.	0,0848	0,0923	0,1380	0,2044	0,1099	0,2541

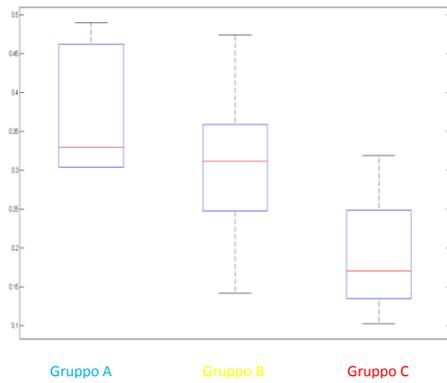
Gruppo B	AMPIEZZA			POTENZA		
	basale	transitorio	44° C	basale	transitorio	44° C
Paziente n°7	0,3346	0,1665	0,4990	0,2823	0,1291	0,5886
Paziente n°8	0,2508	0,0302	0,7190	0,0890	0,0051	0,9059
Paziente n°9	0,3671	0,1350	0,4980	0,3405	0,1055	0,5539
Paziente n°10	0,2455	0,1055	0,6490	0,0975	0,0447	0,8579
Paziente n°11	0,3504	0,1534	0,4962	0,2472	0,0731	0,6797
Paziente n°12	0,2884	0,2496	0,4620	0,2016	0,2612	0,5372
Paziente n°13	0,1419	0,3221	0,5361	0,0583	0,3235	0,6181
Paziente n°14	0,4735	0,1155	0,4110	0,5590	0,0696	0,3713

media	0,3065	0,1597	0,5338	0,2344	0,1265	0,6391
Dev. st.	0,0989	0,0901	0,1012	0,1652	0,1101	0,1745

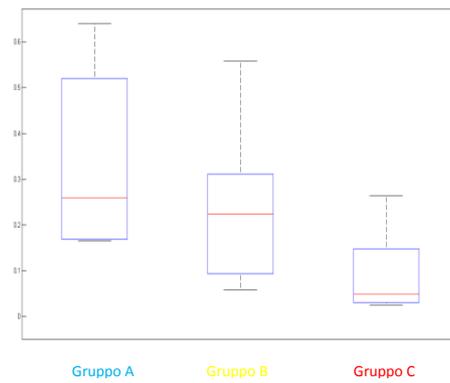
Gruppo C	AMPIEZZA			POTENZA		
	basale	transitorio	44° C	basale	transitorio	44° C
Paziente n°15	0,1340	0,0129	0,8531	0,0247	0,0007	0,9745
Paziente n°16	0,1722	0,0100	0,8178	0,0431	0,0005	0,9563
Paziente n°17	0,1975	0,1549	0,6475	0,0818	0,0790	0,8393
Paziente n°18	0,1029	0,2019	0,6952	0,0255	0,1098	0,8647
Paziente n°19	0,3190	0,2596	0,4214	0,2635	0,2637	0,4728
Paziente n°20	0,2996	0,2125	0,4880	0,2126	0,1590	0,6283
Paziente n°21	0,1360	0,1539	0,7101	0,0337	0,0938	0,8725
Paziente n°22	0,1700	0,2199	0,6101	0,0542	0,1196	0,8362

media	0,1914	0,1532	0,6554	0,0924	0,1033	0,8056
Dev. st.	0,0784	0,0940	0,1488	0,0928	0,0853	0,1705

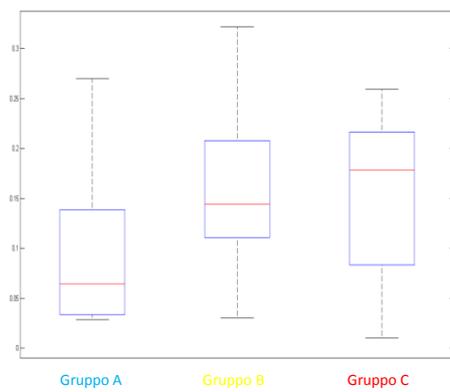
Banda Neurogena – Ampiezza – Intervallo



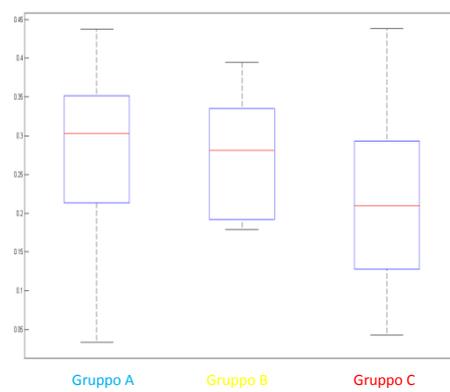
Banda Neurogena – Potenza – Intervallo basale



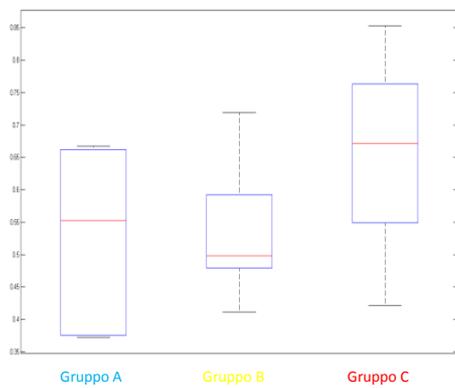
Banda Neurogena – Ampiezza – Transitorio



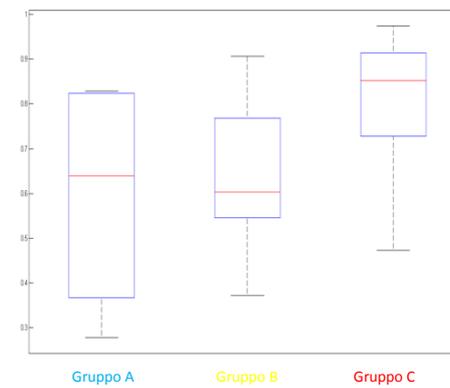
Banda Neurogena – Potenza – Transitorio



Banda Neurogena – Ampiezza – Intervallo 44°



Banda Neurogena – Potenza – Intervallo 44° C



5.4.5 RISULTATI DEL TEST STATISTICO

Gruppo A vs Gruppo B	Incremento	%	p-value
AMP Banda cardiaca - intervallo basale	-0.0347	-15.93	0,4136
AMP Banda cardiaca - transitorio	-0.0047	-1.38	0,8518
AMP Banda cardiaca - intervallo 44° C	0.0394	8.9	0,4808
POW Banda cardiaca - intervallo basale	-0.0164	-13.69	0,4908
POW Banda cardiaca - transitorio	-0.0195	-6.05	0,4136
POW Banda cardiaca - intervallo 44° C	0.0359	6.43	0,4136
AMP Banda miogena - intervallo basale	0.0049	1.77	0,8588
AMP Banda miogena - transitorio	0.0272	9.18	0,8518
AMP Banda miogena - intervallo 44° C	-0.0321	-7.55	0,8576
POW Banda miogena - intervallo basale	0.0377	15.94	0,6620
POW Banda miogena - transitorio	0.0001	0.04	0,6657
POW Banda miogena - intervallo 44° C	-0.0342	-6.97	0,6691
AMP Banda neurogena - intervallo basale	-0.0634	-17.14	0,2824
AMP Banda neurogena - transitorio	0.0599	60.07	0,2910
AMP Banda neurogena - intervallo 44° C	0.0035	0.66	0,2788
POW Banda neurogena - intervallo basale	-0.1021	-30.35	0,4136
POW Banda neurogena - transitorio	0.0572	82.46	0,2284
POW Banda neurogena - intervallo 44° C	0.0433	7.27	0,5728
Perfusione cutanea – intervallo basale	-7.6250	-27.73	0,1918
Perfusione cutanea – intervallo 44° C	12.6250	25.89	0,6950

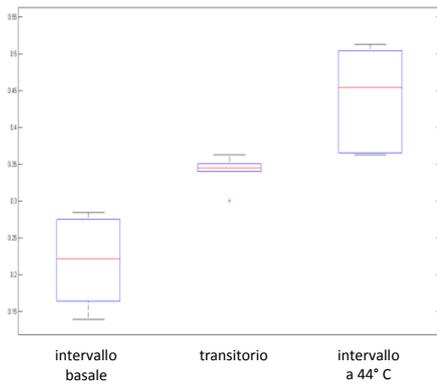
Gruppo B vs Gruppo C	Incremento	%	p-value
AMP Banda cardiaca - intervallo basale	-0.0795	-43.48	0,0499
AMP Banda cardiaca - transitorio	-0.0125	-3.71	0,5054
AMP Banda cardiaca - intervallo 44° C	0.0920	19.10	0,0499
POW Banda cardiaca - intervallo basale	-0.0561	-54.22	0,0482
POW Banda cardiaca - transitorio	-0.0580	-19.15	0,1304
POW Banda cardiaca - intervallo 44° C	0.1141	19.21	0,0499
AMP Banda miogena - intervallo basale	-0.0861	-30.33	0,0830
AMP Banda miogena - transitorio	-0.0273	-8.45	0,0830
AMP Banda miogena - intervallo 44° C	0.1134	28.86	0,0830
POW Banda miogena - intervallo basale	-0.1432	-52.19	0,207
POW Banda miogena - transitorio	-0.0348	-12.72	0,3823
POW Banda miogena - intervallo 44° C	0.1743	38.26	0,207
AMP Banda neurogena - intervallo basale	-0.1151	-37.56	0,0281
AMP Banda neurogena - transitorio	-0.0065	-4.08	0,0281
AMP Banda neurogena - intervallo 44° C	0.1216	22.78	0,0281
POW Banda neurogena - intervallo basale	-0.142	-60.59	0,0207
POW Banda neurogena - transitorio	-0.0232	-18.35	0,9591
POW Banda neurogena - intervallo 44° C	0.1665	26.05	0,1049
Perfusione cutanea – intervallo basale	4.0625	20.44	0,5930
Perfusione cutanea – intervallo 44° C	41.3125	67.31	0,1049

Gruppo A vs Gruppo C	Incremento	%	p-value
AMP Banda cardiaca - intervallo basale	-0.1142	-52.48	0,02
AMP Banda cardiaca - transitorio	-0.0172	-5.05	0,3450
AMP Banda cardiaca - intervallo 44° C	0.1313	29.71	0,02
POW Banda cardiaca - intervallo basale	-0.0725	-60.48	0,0293
POW Banda cardiaca - transitorio	-0.0775	-24.04	0,03
POW Banda cardiaca - intervallo 44° C	0.15	28.88	0,02
AMP Banda miogena - intervallo basale	-0.0812	-29.10	0,1079
AMP Banda miogena - transitorio	-0.0001	-0.04	0,1200
AMP Banda miogena - intervallo 44° C	0.0813	19.12	0,1173
POW Banda miogena - intervallo basale	-0.1055	-44.57	0,0813
POW Banda miogena - transitorio	-0.0347	-12.68	0,4136
POW Banda miogena - intervallo 44° C	0.1402	28.61	0,0813
AMP Banda neurogena - intervallo basale	-0.1785	-48.26	0,0047
AMP Banda neurogena - transitorio	0.0534	53.53	0,0047
AMP Banda neurogena - intervallo 44° C	0.1252	23.60	0,0047
POW Banda neurogena - intervallo basale	-0.2442	-72.55	0,02
POW Banda neurogena - transitorio	0.0339	48.97	0,5729
POW Banda neurogena - intervallo 44° C	0.2098	35.21	0,0293
Perfusione cutanea – intervallo basale	-3.5625	-12.95	0,5135
Perfusione cutanea – intervallo 44° C	53.975	110.64	0,0200

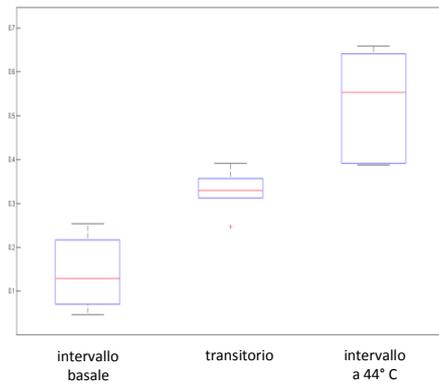
5.4.6 DISTRIBUZIONE DEI DATI ALL'INTERNO DEI SINGOLI GRUPPI

Si procede ora misurando i valori di ampiezza e potenza relativi ai tre intervalli identificati lungo il segnale LDF, per ciascuna delle bande di frequenza analizzate, all'interno di ciascun gruppo di pazienti. Di seguito vengono riportati i grafici partendo dal gruppo A: nella colonna di sinistra sono presenti i valori in ampiezza, nella colonna a destra i valori in potenza. Infine, vengono riportati i risultati ottenuti dalla applicazione del test statistico di Wilcoxon, con i relativi p-value.

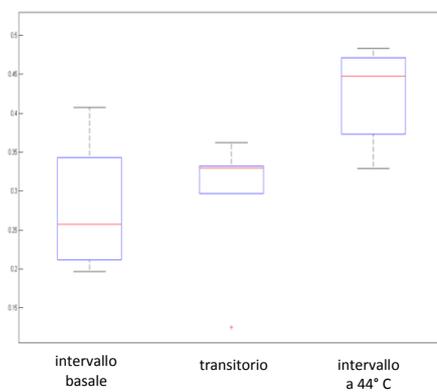
Banda Cardiac – Ampiezza – Gruppo A



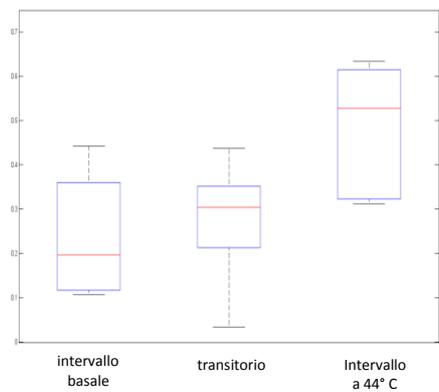
Banda Cardiac – Potenza – Gruppo A



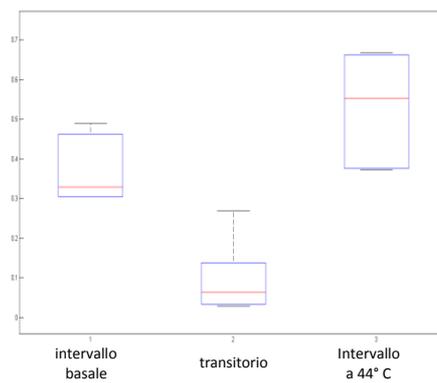
Banda Miogena – Ampiezza – Gruppo A



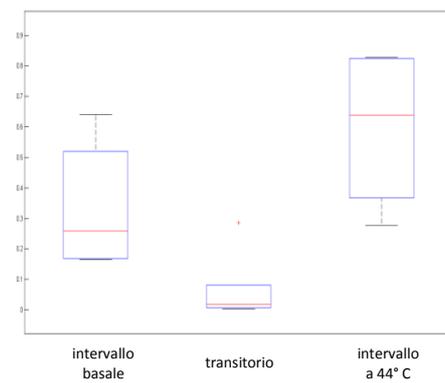
Banda Miogena – Potenza – Gruppo A



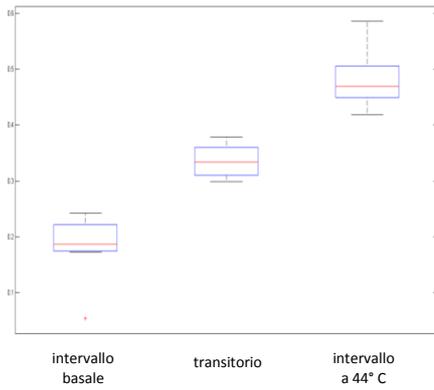
Banda Neurogena – Ampiezza – Gruppo A



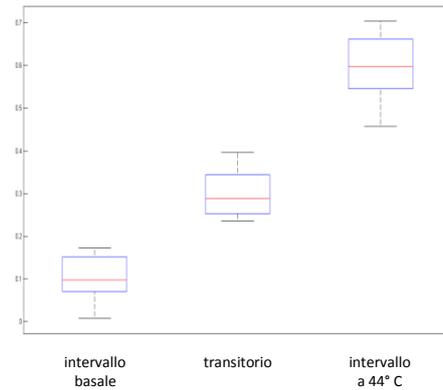
Banda Neurogena – Potenza – Gruppo A



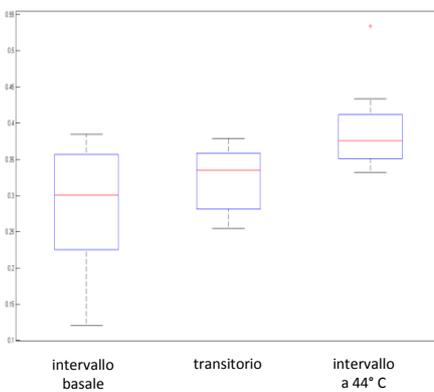
Banda Cardiac – Ampiezza – Gruppo B



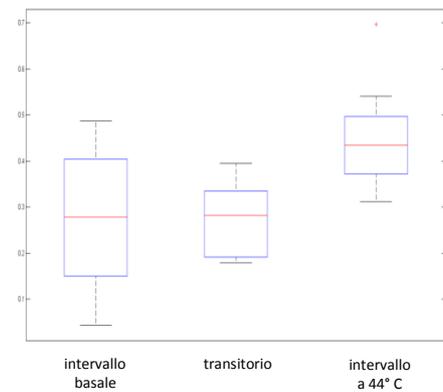
Banda Cardiac – Potenza – Gruppo B



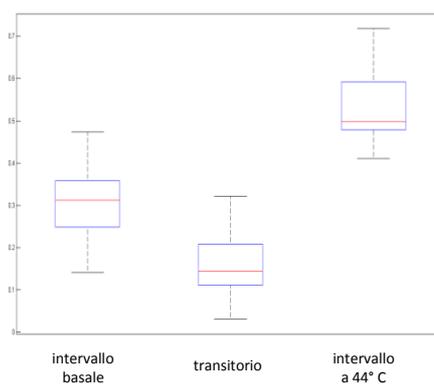
Banda Miogena – Ampiezza – Gruppo B



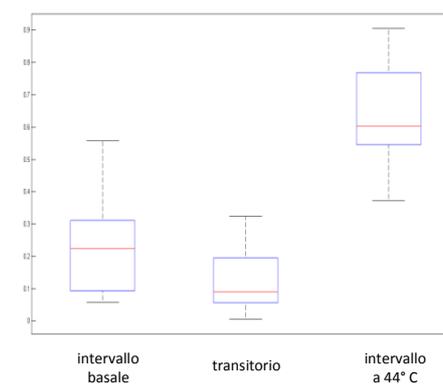
Banda Miogena – Potenza – Gruppo B



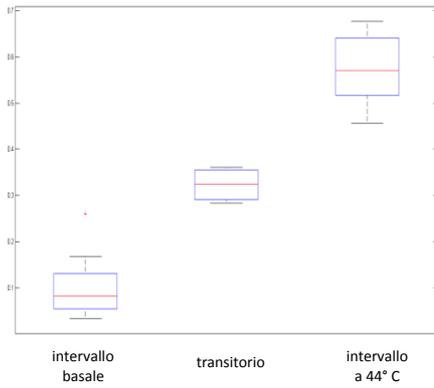
Banda Neurogena – Ampiezza – Gruppo B



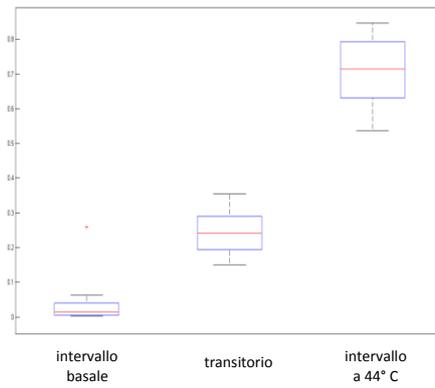
Banda Neurogena – Potenza – Gruppo B



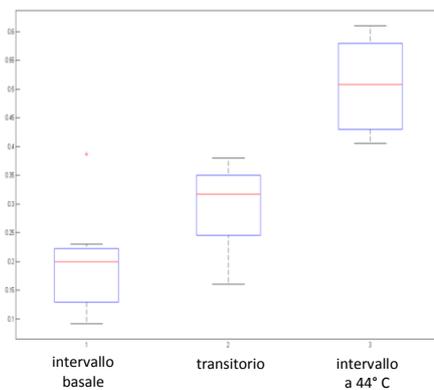
Banda Cardiaca – Ampiezza – Gruppo C



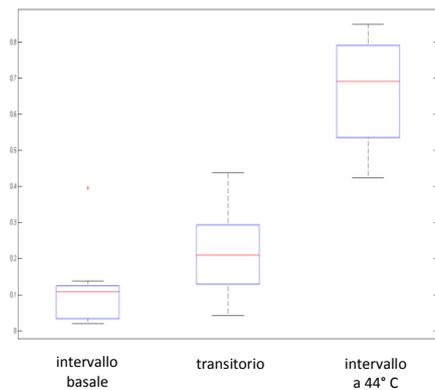
Banda Cardiaca – Potenza – Gruppo C



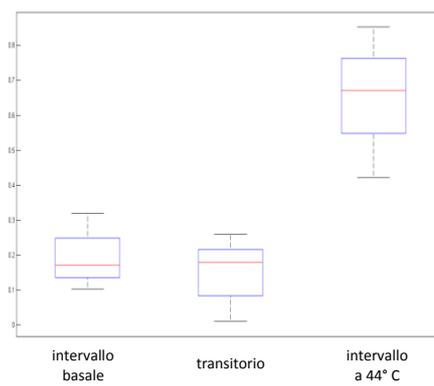
Banda Miogena – Ampiezza – Gruppo C



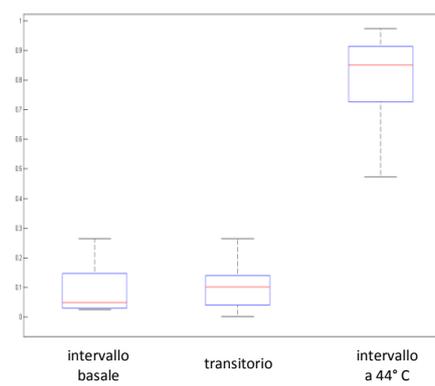
Banda Miogena – Potenza – Gruppo C



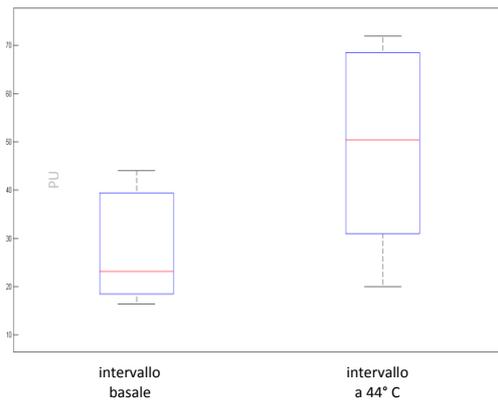
Banda Neurogena – Ampiezza – Gruppo C



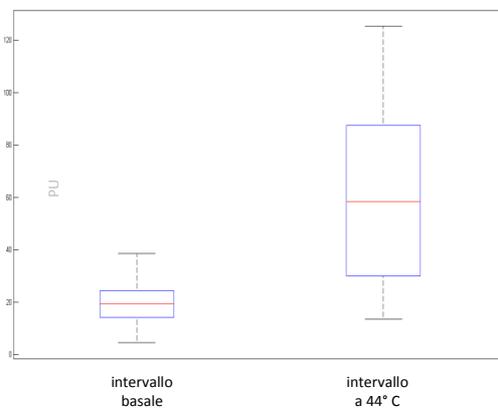
Banda Neurogena – Potenza – Gruppo C



Perfusione cutanea – Gruppo A



Perfusione cutanea – Gruppo B



Perfusione cutanea – Gruppo C

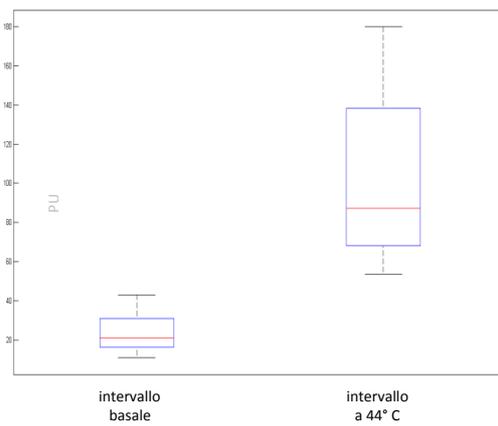


Tabella dei valori ottenuti nel confronto tra intervalli nella stessa banda

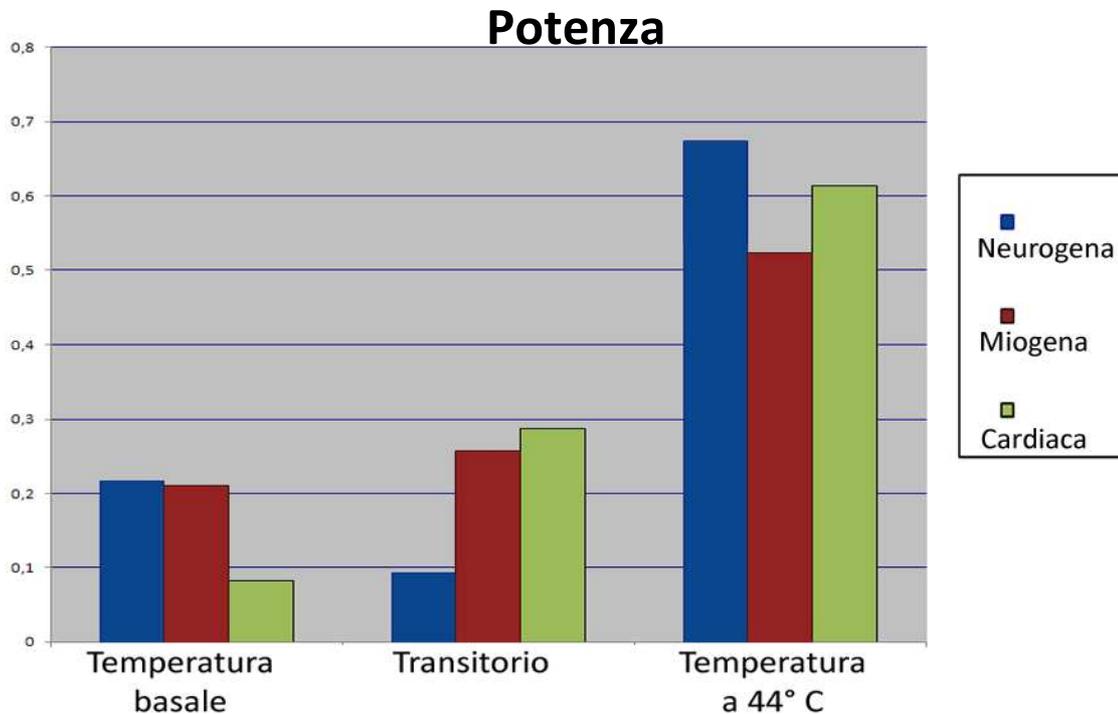
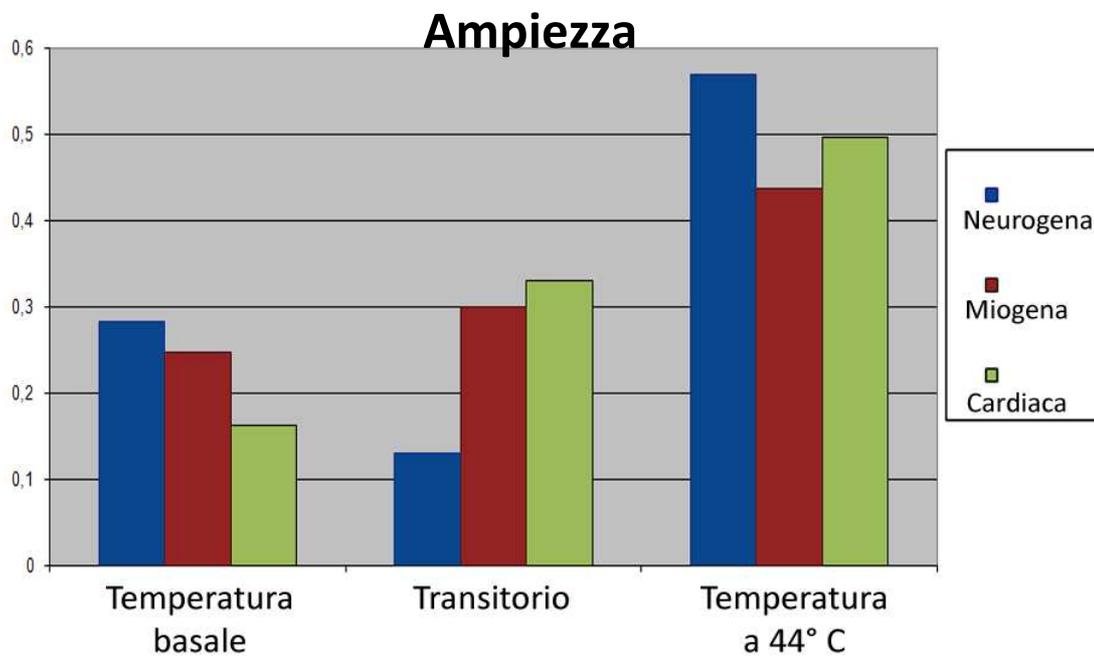
GRUPPO A		Incremento % (p-value)	
	<i>intervallo basale vs transitorio</i>	<i>transitorio vs intervallo a 44°C</i>	<i>intervallo basale vs intervallo a 44°C</i>
Banda cardiaca - Ampiezza	56.52 (0,022)	29.85 (0,022)	103.23 (0,0022)
Banda cardiaca - Potenza	168.63 (0,0043)	73.16 (0,0043)	365.17 (0,0022)
Banda miogena - Ampiezza	6.09 (0,6991)	43.69 (0,0152)	52.45 (0,0152)
Banda miogena - Potenza	15.58 (0,8182)	79.05 (0,0649)	106.95 (0,0260)
Banda neurogena - Ampiezza	-73.02 (0,0022)	431.40 (0,0022)	43.33 (0,0411)
Banda neurogena - Potenza	-79.40 (0,152)	759.48 (0,0043)	77.01 (0,0931)

GRUPPO B		Incremento % (p-value)	
	<i>intervallo basale vs transitorio</i>	<i>transitorio vs intervallo a 44°C</i>	<i>intervallo basale vs intervallo a 44°C</i>
Banda cardiaca - Ampiezza	83.60 (1,5540 · 10 ⁻⁴)	43.40 (1,5540 · 10 ⁻⁴)	163.29 (1,5540 · 10 ⁻⁴)
Banda cardiaca - Potenza	192.42 (1,5540 · 10 ⁻⁴)	96.16 (1,5540 · 10 ⁻⁴)	473.65 (1,5540 · 10 ⁻⁴)
Banda miogena - Ampiezza	13.81 (0,4418)	21.66 (0,0281)	38.48 (0,0499)
Banda miogena - Potenza	-0.25 (1)	66.48 (0,008)	66.05 (0,0207)
Banda neurogena - Ampiezza	-47.89 (0,0104)	234.19 (1,5540 · 10 ⁻⁴)	74.14 (0,0011)
Banda neurogena - Potenza	-46.04 (0,1949)	405.29 (1,5540 · 10 ⁻⁴)	172.61 (6,2160 · 10 ⁻⁴)

GRUPPO C		Incremento % (p-value)	
	<i>intervallo basale vs transitorio</i>	<i>transitorio vs intervallo a 44°C</i>	<i>intervallo basale vs intervallo a 44°C</i>
Banda cardiaca - Ampiezza	212.77 (1,5540 · 10 ⁻⁴)	77.38 (1,5540 · 10 ⁻⁴)	454.81 (1,5540 · 10 ⁻⁴)
Banda cardiaca - Potenza	977.44 (0,0019)	-208.47 (1,554 · 10 ⁻⁴)	1393.8 (1,5540 · 10 ⁻⁴)
Banda miogena - Ampiezza	49.57 (0,065)	71.25 (1,5540 · 10 ⁻⁴)	156.14 (1,5540 · 10 ⁻⁴)
Banda miogena - Potenza	82.07 (0,0499)	163.72 (3,1080 · 10 ⁻⁴)	380.19 (1,5540 · 10 ⁻⁴)
Banda neurogena - Ampiezza	-19.95 (0,8785)	327.80 (1,5540 · 10 ⁻⁴)	242.42 (1,5540 · 10 ⁻⁴)
Banda neurogena - Potenza	11.77 (0,6454)	680.12 (1,5440 · 10 ⁻⁴)	771.95 (1,5540 · 10 ⁻⁴)

	Incremento % di perfusione cutanea (p-value) <i>intervallo basale vs intervallo a 44°C</i>
GRUPPO A	77.27 % (0,132)
GRUPPO B	408.80 % (0,016)
GRUPPO C	328.98 % (1,5540 · 10 ⁻⁴)

Grafici comparativi delle componenti divise per intervalli di temperatura (per tutti i pazienti)



5.5 DISCUSSIONE

In generale, la stimolazione termica produce un effetto incrementale su tutte le componenti analizzate (cardiaca, miogena, neurogena), sia in termini di ampiezza che di potenza, con valori che aumentano passando dall'intervallo a temperatura basale a quello a temperatura di 44° C.

Partendo dai dati di perfusione cutanea, si possono delineare alcuni risultati utili nel confronto tra i tre gruppi di pazienti. Il valore relativo all'intervallo a temperatura basale non è un dato significativamente diverso tra i tre gruppi, che pur avendo un valore medio diverso, hanno una distribuzione di dati molto simile tra loro, come viene confermato anche dal test statistico.

Più interessanti sono i valori ottenuti per la parte finale del segnale, l'intervallo a 44° C. Infatti il valore di perfusione aumenta in maniera più marcata nei pazienti considerati meno critici, com'era lecito aspettarsi: in altre parole, fra il valore di perfusione cutanea misurato nell'intervallo basale e quello misurato a 44° C vi è un incremento percentuale tanto maggiore quanto più moderato è il grado di severità della arteriopatia.

Nell'intervallo a 44° C, vi è una differenza statisticamente significativa tra il valore di perfusione cutanea nel gruppo A e nel gruppo C: si passa da un valore medio di 48,75 PU a 102,69 PU.

Nel confronto tra i tre gruppi di pazienti si deve premettere che il test statistico non restituisce alcuna differenza significativa tra il gruppo A e il gruppo B, né in termini di ampiezza/potenza delle diverse bande di frequenza, né in termini di perfusione cutanea.

Per quanto concerne i valori di ampiezza e potenza relative, calcolate per ciascuna banda dello spettro, si ottengono risultati significativi. In particolare, nella banda cardiaca il valore di ampiezza nell'intervallo a temperatura basale tende a scendere man mano che il valore di tcpO₂ cresce (partendo dal gruppo A fino a C): il test statistico dimostra che la distribuzione di valori del gruppo A è significativamente diversa dal Gruppo C. Nel transitorio, si hanno valori medi simili per i tre gruppi (il test statistico non fornisce differenze significative), mentre nell'intervallo a 44° C il valore di ampiezza cresce al crescere del valore di tcpO₂, con una differenza statisticamente rilevante.

I valori di potenza hanno comportamento simile a quelli di ampiezza, con l'unica differenza che, anche nel transitorio, si ha una differenza statisticamente significativa tra Gruppo A e Gruppo C, con valori che diminuiscono al diminuire della tcpO₂. Inoltre i valori registrati nei 3 intervalli del segnale crescono nel tempo: dalla temperatura basale fino a 44° C, sia ampiezza che potenza aumentano. Da questo consegue che, per la banda cardiaca, la stimolazione termica produce un significativo incremento di

attività, tanto più marcato quanto più il paziente presenta valori di tcpO₂ lontani dal patologico (infatti il gruppo C ha i valori più alti).

L'interpretazione dei dati relativi alla banda miogena è meno sicura dal momento che, sia in ampiezza che in potenza, i test statistici non rivelano differenza tra i gruppi; semplicemente osservando i valori medi si nota un comportamento diverso tra i due gruppi estremi, A e C. Per poter trarre conclusioni affidabili sarebbe però necessario avere un maggiore numero di campioni (pazienti) in modo da limitare l'influenza degli outliers e ripetere il test statistico. Osservando i valori rilevati nei tre intervalli di segnale, essi rimangono costanti nel tempo per l'intervallo a temperatura basale e il transitorio, mentre sono significativamente più alti a 44° C: ciò denota come la risposta allo stimolo per l'attività miogena si presenti in maniera ritardata rispetto a quella cardiaca, in cui il cambiamento da un intervallo all'altro è notevole (e significativo statisticamente).

Analizzando la banda neurogena sia in ampiezza che in potenza, si osserva come il valore alla temperatura basale tenda a diminuire al crescere del valore di tcpO₂ (con differenze significative). Purtroppo per la parte del transitorio non è possibile fare un'analisi efficace, in quanto si riescono ad analizzare solo le frequenze più veloci e non l'intera banda di frequenza, vista la breve durata di questo intervallo.

E' interessante rilevare che nella banda neurogena, in ampiezza e potenza i valori maggiori si ottengono nell'intervallo a 44° C: diventa pertanto l'attività prevalente. Da letteratura ci si aspetterebbe una predominanza della componente miogena, visto che la fase di plateau dopo il picco è mediata da riflessi non simpatici, presenti in pazienti denervati con ustioni gravi o con cicatrici profonde. Questo si spiega facilmente osservando la durata delle acquisizioni: i tracciati hanno una durata di poco più di 20 minuti, mentre gli esperimenti svolti in letteratura hanno una durata tra i 60 e 80 minuti, con una fase di plateau lunga almeno 50 minuti. Per quanto riguarda la presente attività sperimentale, si sta analizzando la parte iniziale del fenomeno e, quindi, l'attività miogena non ha ancora preso il sopravvento su quella neurogena.

CAPITOLO 6

CONCLUSIONI

La flussimetria laser Doppler (LDF) fornisce un segnale che indica il livello di perfusione cutanea. Tramite l'analisi in frequenza è possibile scomporre le oscillazioni periodiche di cui il segnale è composto e, come suggerisce la letteratura, assegnare ad ogni intervallo di frequenza l'attività correlata ad un preciso distretto anatomico.

Per i pazienti affetti da arteriopatia, uno strumento di indagine utile a valutarne la criticità è dato dall'acquisizione del segnale LDF prima, durante e dopo aver riscaldato localmente la zona di acquisizione tramite una sonda termica.

Nella presente tesi è stato possibile valutare gli effetti del riscaldamento locale sul segnale LDF acquisito in tre gruppi di pazienti suddivisi in base alla severità della arteriopatia. L'analisi è stata effettuata dopo aver suddiviso il segnale LDF in tre intervalli: un intervallo iniziale a temperatura basale, un intervallo centrale transitorio di rapida crescita del segnale in cui viene attivata la sonda termica, ed un intervallo finale a temperatura di 44°C in cui il segnale torna ad essere stazionario.

In particolare, lo strumento utilizzato per l'analisi in frequenza è la trasformata Wavelet che fornisce un ottimo compromesso tra risoluzione in frequenza e stazionarietà del segmento analizzato.

I dati ottenuti permettono, nel loro insieme, non solo di confermare le evidenze presenti in letteratura, ma anche e soprattutto di proporre un approccio quantitativo alla stima delle attività vascolari (cardiaca, miogena, neurogena) sollecitate mediante stimolazione termica. A seguito della stimolazione termica, differenze significative nelle attività vascolari, valutate mediante test statistico, sono presenti sia tra i diversi gruppi di pazienti, sia all'interno dei singoli gruppi.

Un risultato evidente è la reattività del distretto cardiaco alla stimolazione, che aumenta la sua attività in termini di maggiore ampiezza e potenza, con variazioni tanto più marcate quanto più maggiore è il valore di $tcpO_2$. Per la banda miogena, invece, sembra che lo stimolo termico produca una risposta più lenta, in quanto non si vedono differenze nei primi due intervalli (basale e transitorio), mentre si hanno una maggiore ampiezza e potenza nell'intervallo a temperatura di 44° C. Infine, altro risultato rilevante è l'elevata attività del distretto neurogeno nell'intervallo a 44° C, dove si registra un aumento dell'ampiezza e della potenza, che conferma i risultati presenti in altri studi.

In futuro sarà interessante estendere l'analisi ad un numero maggiore di pazienti, in modo da ridurre l'influenza degli outliers. Sarà inoltre opportuno incrementare la durata dell'analisi, nei limiti di sopportabilità per i pazienti, per indagare anche le attività vascolari relative alle frequenze più lente, associate al distretto endoteliale.

APPENDICE

CODICE DELLE PRINCIPALI FUNZIONI MATLAB USATE

Function polyfitting_sing

```
% INPUT:
% A è il segnale da filtrare
% numero è il numero del paziente
% offset è il vettore che contiene le soglie scelte per tutti i
pazienti
% OUTPUT:
% Asogliata: il segnale senza i picchi
% a è la funzione polinomiale che lo approssima
%

function [Asogliata a]=polyfitting_sing(A,numero,offset)
L=max(size(A));
x=1:L;
coef_pol=polyfit(x',A,20);
pol=polyval(coef_pol,x);
a=pol';
sd=std(A);

soglia_up=pol+offset(1,numero);
soglia_down=pol-offset(1,numero);
Asogliata=(zeros(size(A)));
C=1; % mettiti nel primo campione
while C<L % finchè non è finito il segnale
    vet=[];

    if A(C)>=soglia_up(C) % se il valore in C supera la soglia
        vet=[]; % inizializza vet
        vet_sx=[];
        vet_dx=[];
        c=0; % inizia il conto di quanti escono
        while A(C+c) >=soglia_up(C+c) && C+c<L % finchè sei sopra e
non è finito il segnale
            c=c+1; %incrementa
            vet(c)=A(C+c-1); %salva il valore in vet
        end % o è finito il segnale o sono dentro soglia

        k=C-1;
        i=1;
        while k>1 && A(k)- A(k-1)>=0 && A(k)>soglia_down(k)
            vet_sx(i)=A(k);
            i=i+1;
            k=k-1;
        end
        vet_sx=fliplr(vet_sx);
        k=C+length(vet);
        i=1;

        while k<length(A) && A(k)-A(k+1)>=0 && A(k)>soglia_down(k)
            vet_dx(i)=A(k);
            i=i+1;
```

```

        k=k+1;
    end

    [Mm I]=max(vet);

    coef=offset(1,numero)/(Mm-pol(C+I-1)); %trovo coef che mi
rende picco = a soglia

    for j=1:max(size(vet)) %multiplico vet per coef
        Asogliata(C+j-1)=pol(C+j-1) + (A(C+j-1)-pol(C+j-1))*coef;
% pol + (A-pol)*sd/(A-pol)
    end

    for j=1:max(size(vet_sx)) %multiplico vet per coef
        Asogliata(C+j-1-length(vet_sx))=pol(C+j-1-length(vet_sx))
+ (A(C+j-1-length(vet_sx))-pol(C+j-1-length(vet_sx)))*coef; % pol +
(A-pol)*sd/(A-pol)
    end

    for j=1:max(size(vet_dx)) %multiplico vet per coef
        Asogliata(C+j-1+length(vet))=pol(C+j-1+length(vet)) +
(A(C+j-1+length(vet))-pol(C+j-1+length(vet)))*coef; % pol + (A-
pol)*sd/(A-pol)
    end

elseif A(C)<=soglia_down(C)
    vet=[]; %inizializza vet
    vet_sx=[];
    vet_dx=[];
    c=0;
    while A(C+c) <=soglia_down(C+c)
        if C+c<L
            c=c+1;
            vet(c)=A(C+c-1);
        elseif C+c==L
            c=c+1;
            vet(c)=A(C+c-1);
            break
        else
            break
        end
    end
    k=C-1;
    i=1;

    while k>1 && A(k)- A(k-1)<=0 && A(k)<soglia_up(k)
        vet_sx(i)=A(k);
        i=i+1;
        k=k-1;
    end
    vet_sx=fliplr(vet_sx);
    k=C+length(vet);
    i=1;

    while k<length(A) && A(k)-A(k+1)<=0 && A(k)<soglia_up(k)
        vet_dx(i)=A(k);
        i=i+1;
    end

```

```

        k=k+1;
    end

    [m I]=min(vet) ;
    coef=offset(1,numero)/(pol(I+C-1)-m);
    for j=1:max(size(vet))
        Asogliata(C+j-1)=pol(C+j-1)-(-A(C+j-1)+pol(C+j-1))*coef;
    end
    for j=1:max(size(vet_sx)) %multiplico vet per coef
        Asogliata(C+j-1-length(vet_sx))=pol(C+j-1-length(vet_sx))
- (-A(C+j-1-length(vet_sx))+pol(C+j-1-length(vet_sx)))*coef; % pol +
(A-pol)*sd/(A-pol)
    end

    for j=1:max(size(vet_dx)) %multiplico vet per coef
        Asogliata(C+j-1+length(vet))=pol(C+j-1+length(vet)) - (-
A(C+j-1+length(vet))+pol(C+j-1+length(vet)))*coef; % pol + (A-
pol)*sd/(A-pol)
    end

else
    Asogliata(C)=A(C);
end
if size(vet)==0
C=C+1;
else
    C=C+max(size(vet))+length(vet_dx);
end
Asogliata(L)=A(L);

end

```

Function adaptive_offset

```
% divide il segnale in segmenti prefissati lunghi 2min ciascuno
% richiede l'immissione del fattore moltiplicativo di soglia da parte
% dell'utente e visualizza la traccia, normale e ripulita dagli spike.
% NB tutte le tracce vengono tagliate ai 21 minuti
% INPUT: signal e Fs sono il tracciato e la sua frequenza di
campionamento,
% soglia è il valore per cui la soglia viene moltiplicata
% OUTPUT: SF_signal e' la traccia ripulita dagli spike
```

```
function SF_signal= adaptive_offset (signal,Fs,soglia)
% visualizza la traccia acquisita
figure
hold on
plot([0:1/Fs:(length(signal)-1)/Fs],signal,'-b')
xlabel('sec')
ylabel('PU')
title('traccia')
% taglio tutti i segnali dopo 1260 secondi (21 minuti)
L_signal=length(signal);
if L_signal>20160
    signal_20=signal(1:20160,:);
else signal_20=signal;
end

L=max(size(signal_20));
x=1:1:L;
coef_pol=polyfit(x',signal_20,20);
poly=polyval(coef_pol,x);
pol=poly';
passo=120*Fs;
diff=abs(signal_20(1:(passo*1),:)-pol(1:(passo*1),:));
ordinato=ordina(diff);
% tengo il 95% delle differenze, elimino il 5% contenente gli spike
ordinato_buono=ordinato(1:(0.95*passo),:);

valore= soglia*mean(ordinato_buono);

[Asogliata polinomio]=polyfitting_sing(signal_20,1,valore);

%segment_1=signal(1:istante(1,:));
Asogliata_1=Asogliata(1:(passo*1));
polinomio_1=polinomio(1:(passo*1));

figure
hold on
plot([0:1/Fs:(length(signal_20)-1)/Fs],signal_20,'-b')
plot([0:1/Fs:(length(Asogliata_1)-1)/Fs],Asogliata_1,'-g')
plot([0:1/Fs:(length(Asogliata_1)-1)/Fs],polinomio_1+valore,'--r')
plot([0:1/Fs:(length(Asogliata_1)-1)/Fs],polinomio_1-valore,'--r')
plot([0:1/Fs:(length(Asogliata_1)-1)/Fs],polinomio_1,'-r')
xlabel('sec')
```

```

ylabel('PU')
title('traccia con relative bande di tolleranza per gli spike')
Asogliata(1:passo,:)=Asogliata_1(1:passo,:);

for i=2:10
    diff_=abs(signal_20((passo*(i-1))+1:(passo*i),:)-pol((passo*(i-1)+1):(passo*i),:));
    ordinato_=ordina(diff_);
    % tengo il 90% delle differenze, elimino il 5% contenente gli spike
    ordinato_buono_=ordinato_(1:(0.95*passo),:);
    valore_= soglia*mean(ordinato_buono_);
    [Asogliata_ polinomio]=polyfitting_sing(signal_20,1,valore_);
    eval(['Asogliata_' num2str(i) '=Asogliata_((passo*(i-1)+1):(passo*i));']);
    eval(['polinomio_' num2str(i) '=polinomio((passo*(i-1)+1):(passo*i));']);
    hold on
    eval(['plot([(passo*(i-1))+1]/Fs:1/Fs:(passo*i)/Fs,Asogliata_' num2str(i) ', '-g')'])
    eval(['plot([(passo*(i-1))+1]/Fs:1/Fs:(passo*i)/Fs,polinomio_' num2str(i) '+valore_,'--r')'])
    eval(['plot([(passo*(i-1))+1]/Fs:1/Fs:(passo*i)/Fs,polinomio_' num2str(i) '-valore_,'--r')'])
    eval(['plot([(passo*(i-1))+1]/Fs:1/Fs:(passo*i)/Fs,polinomio_' num2str(i) ', '-r')'])

    eval(['Asogliata((passo*(i-1))+1):(passo*i)=Asogliata_' num2str(i) ';']);
end

% parte finale del segnale
diff=abs(signal_20((passo*10)+1:end,:)-pol((passo*10)+1:end,:));
ordinato=ordina(diff);
len=length(diff);
% tengo il 90% delle differenze, elimino il 5% contenente gli spike
ordinato_buono=ordinato(1:(0.95*len),:);
valore= soglia*mean(ordinato_buono);

[Asogliata_ polinomio_]=polyfitting_sing(signal_20,1,valore);
%segment_1=signal(1:istante(1,:));
Asogliata_f=Asogliata_((passo*10)+1:end,:);
polinomio_f=polinomio_((passo*10)+1:end,:);

hold on
plot([(passo*10)+1]/Fs:1/Fs:(length(signal_20))/Fs,Asogliata_((passo*10)+1:end,:), '-g')
plot([(passo*10)+1]/Fs:1/Fs:(length(signal_20))/Fs,polinomio_f+valore, '--r')
plot([(passo*10)+1]/Fs:1/Fs:(length(signal_20))/Fs,polinomio_f-valore, '--r')
plot([(passo*10)+1]/Fs:1/Fs:(length(signal_20))/Fs,polinomio_f, '-r')
hold off
Asogliata((passo*10)+1:end,:)=Asogliata_f;

SF_signal=Asogliata;
end

```

Function `istant_finder`

```
% Trova l'istante temporale dove finisce la fase di salita del segnale
% l'istante è il punto in cui si annulla la derivata della polinomiale
% INPUT: signal e Fs sono il tracciato da dividere e la sua freq. di
% campionamento, ist1 è l'istante in cui comincia la fase di salita
% OUTPUT: ist2 è l'istante in cui finisce la fase di salita
```

```
function [ist2]= istant_finder (signal,Fs,ist1)
ist1=ist1*Fs;
L=max(size(signal));
x=1:1:L;
coef_pol=polyfit(x',signal,20);
poly=polyval(coef_pol,x);
pol=poly';

figure
hold on
plot([0:1/Fs:(length(signal)-1)/Fs],signal,'-b')
plot([0:1/Fs:(length(signal)-1)/Fs],pol,'-g')
xlabel('sec')
ylabel('PU')
title('traccia con individuazione della zona centrale')
```

```
% vettore degli esponenti
n = length(coef_pol)-1:-1:1;
% creo il vettore
dx = zeros(1,length(n));
% calcolo la derivata come  $f'(x) = n*x^{(n-1)}$ 
dx = coef_pol(1:end-1).*n;

dpoly=polyval(dx,x);
dpol=dpoly';

% trovo il punto di massimo dopo l'istante di partenza ist1
for i=2:L
    if abs(dpol(i-1,:)+dpol(i,:))<abs(dpol(i-1,:))
        if ist1<i
            break
        end
    end
end
ist2=i/Fs;
v2=vline(ist1/Fs,'--r');
v3=vline(ist2,'--r');

end
```

Function wwt

```

%[WT,freq,Optional:wpow,coib]=wwt(signal,fs,Optional:'PropertyName',PropertyVa
lue)
%
% signal - signal for which to calculate wavelet transform
% fs - sampling frequency
%
% Properties:
% 'fmin' - minimal frequency (default is determined by maximum physical scale,
%         i.e. when wavelet contain all signal)
% 'fmax' - maximum frequency (default is Nyquist frequency = fs/2)
% 'nv' - number of voices, which determines how fine is frequency scale, so
%        next frequency equals previous one multiplied on 2^(1/nv) (default =
32)
% 'f0' - wavelet central frequency, which determines time-frequency resolution
%        (default = 1)
% 'RelTol' - relative tolerance (e.g. 0.01 means 1%), which specifies cone
%            of influence (i.e. range of wavelet coefficients which are
%            determined up to this accuracy; all others are set as NaNs,
%            unless 'CutEdges' is not set to 'off'); (default is around
0.0014)
% 'mode': {'frequencies'} - returns WT with frequencies (default)
%          'scales' - returns WT with scales
% 'plot': 'on'|{'off'} - if 'on' plots uncutted WT together with line denoting
%                    its cone of influence (if RelTol is unspecified shows
%                    cone of influence for 0.14% accuracy); if wpow is
%                    demanded as output, plots also wavelet power
% 'Progress': {'on'}|'off' - display or not progress information
% 'CutEdges': {'on'}|'off' - determine should WT coefficients be set to
%                    NaNs out of the cone of influence (specified by
%                    'RelTol'); to obtain full WT (although border
%                    coefficients will be not precisely determined)
%                    set it to 'off'
% 'Detrend': {'on'}|time-window in seconds|'off'
%            - detrend signal (subtract its moving average) or not
%            before calculation of its WT; it is needed to get rid
%            of the effect of oscillations with frequencies lower
%            than the minimal one {fmin} (e.g. different trends)
%            on the WT coefficients at frequencies of interest;
%            detrending window equals (1/{fmin}) seconds (but can
%            be set manually, although not recommended)
%
%
% Output:
% WT - wavelet transform (matrix FNxL, where FN is the number of frequencies
%       and L is the length of a signal in samples)
% freq - frequencies corresponding to rows of WT
% wpow - time-averaged wavelet power at each frequency (analog of Fourier
%         transform but accounting for time-variable dynamics); it is
calculated
%         only from the cone of influence if 'CutEdges' is 'on' and from the
%         whole WT (which is less accurate) if 'CutEdges' is 'off'
% coib - minimal distance from the signal borders at each frequency to have
%         predefined accuracy RelTol, specifying cone of influence borders
%         (i.e. if coib(5)=10, then only WT(5,1+10:L-10) are determined up
%         to a specified accuracy)
%
%
% Note: WT are already transformed from scales to frequencies, to obtain WT
%       over scales do: WT=flipud(WT), and scales are: a=flipud(f0./freq)
%       (cone of influence borders for scales then will be also
coib=flipud(coib))
%-----Copyright-----

```

```

% NMD Toolbox (latest version is available at:
http://www.physics.lancs.ac.uk/research/nbmphysics/diats/nmd)
% Author: Dmytro Iatsenko
(http://www.physics.lancs.ac.uk/research/nbmphysics/diats)
%
% Related articles:
% D. Iatsenko, A. Stefanovska and P.V.E. McClintock,
% "Nonlinear Mode Decomposition: a noise-robust, adaptive, decomposition
% method based on the synchrosqueezed wavelet transform" (2012)
% /preprint: arXiv:1207.5567/
%-----

function [WT,freq,varargout] = wwt(signal,raw,fs,varargin)
old_signal=signal;
L=length(signal); signal=signal(:);
%Default parameters
fmin=[]; fmax=fs/2; nv=32; f0=1; bnd=3; Progress='on'; PlotMode='off';
CutEdges='on'; DetrMode='on';
%Update if user defined
for vn=1:nargin-3
    if strcmp(varargin{vn},'fmin'), fmin=varargin{vn+1}; end
    if strcmp(varargin{vn},'fmax'), fmax=varargin{vn+1}; end
    if strcmp(varargin{vn},'nv'), nv=varargin{vn+1}; end
    if strcmp(varargin{vn},'f0'), f0=varargin{vn+1}; end
    if strcmp(varargin{vn},'RelTol'), RelTol=varargin{vn+1}; end

    if strcmp(varargin{vn},'plot'), PlotMode=varargin{vn+1}; end
    if strcmp(varargin{vn},'Progress'), Progress=varargin{vn+1}; end
    if strcmp(varargin{vn},'CutEdges'), CutEdges=varargin{vn+1}; end
    if strcmp(varargin{vn},'Detrend'), DetrMode=varargin{vn+1}; end
end
%Determine cone of influence (in which WT and SWT is determined up to
specified accuracy)
if exist('RelTol','var')
    if RelTol>=1, bnd=0;
    else bnd=fzero(@(x)((1-erf(x.^2/sqrt(2)))/(1+erf(x.^2/sqrt(2)))-
RelTol),1); bnd=bnd^2;
    end
end

if isempty(fmin), fmin=2*bnd*fs*f0/L; end

%Detrend signal to get rid of the effect of oscillations with
frequency lower than fmin
if strcmp(DetrMode,'on'), signal=wtdestr(signal,fs,1/fmin);
elseif isnumeric(DetrMode), signal=wtdestr(signal,fs,DetrMode);
end

%Define scales
SN=nv*floor(log2(L)); % maximum number of scales
a=(2.^((1:SN)/nv))/fs; % scales (dependent on fs)
a(a<f0/fmax | a>f0/fmin)=[];
SN=length(a);

WT=zeros(SN,L)*NaN; coib=zeros(SN,1);

%Without padding

```

```

NL=L; n1=0; n2=0;
%If using some padding
%NL=2^(nextpow2(L+1)); n1=floor((NL-L)/2); n2=ceil((NL-L)/2);
%signal=[flipud(signal(1:n1));signal(:);flipud(signal(L-n2+1:L))];
%symmetric padding
%signal=[zeros(n1,1);signal(:);zeros(n2,1)]; %zero padding

fx=fft(signal,NL); % Fourier transform of a signal
%Cf0=sqrt(2/(pi*f0)); %multiplier for the use with NMD
Cf0=1/sqrt(sqrt(pi)*(1+exp(-(2*pi*f0)^2)-2*exp(-3*(2*pi*f0)^2/4)));
%original multiplier
fwt=@(om)sqrt(2*pi)*Cf0*(exp(-2*pi^2*(f0-om).^2)-exp(-
2*pi^2*(f0^2+om.^2))); % Morlet wavelet Fourier transform
Nq=ceil((NL+1)/2); ff=[(0:Nq-1),-fliplr(1:Nq)]*fs/NL; ff=ff(:); %
frequencies in Fourier transform
if strcmp(Progress,'on'), pos=0; fprintf('Calculating wavelet
transform (%d scales from %3.3f to %3.3f): ',SN,a(1),a(end)); end
for sn=1:SN
    M=ceil(a(sn)*2*bnd*fs); M=M+mod(M,2); coib(sn)=M/2; % determine
cone of influence edges
    out=sqrt(a(sn))*ifft(fx.*fwt(a(sn)*ff),NL); % calculate wavelet
transform at each time by taking inverse Fourier transform of the
multiplication of wavelet and signal Fourier transforms (and
multiplying on dt to recover integral)
    WT(sn,1:L)=out(1+n1:NL-n2);

    if strcmp(Progress,'on') && floor(100*sn/SN)>floor(100*(sn-1)/SN)
        cstr=num2str(floor(100*sn/SN));
        fprintf([repmat('\b',1,pos),cstr,'%']; pos=length(cstr)+1;
    end
end

if strcmp(Progress,'on')
    if nargout>2 && strcmp(CutEdges,'on'), fprintf('\nTransforming to
frequencies, cutting unphysical coefficients and calculating
power...');
    elseif strcmp(CutEdges,'off'), fprintf('\nTransforming to
frequencies and calculating power...');
    else fprintf('\nTransforming to frequencies...');
    end
end
WT=flipud(WT); freq=flipud(f0./a(:)); coib=flipud(coib);

%Calculate optional outputs
if nargout>2 % time-averaged wavelet power (energy)
    if strcmp(CutEdges,'on')
        varargout{1}=zeros(SN,1);
        for fn=1:SN, varargout{1}(fn)=(2^(1/nv)-
1)*(freq(fn)/f0).*mean(abs(WT(fn,1+coib(fn):L-coib(fn))).^2,2); end
    else varargout{1}=(2^(1/nv)-1)*(freq/f0).*mean(abs(WT).^2,2);
    end
end
if nargout>3, coib(2*coib-L==0)=floor((L-1)/2); varargout{2}=coib; end
% wavelet energy (power)

%Plotting WT if specified
if strcmp(PlotMode,'on')

```

```

    scrsz=get(0,'ScreenSize');
figure('Position',[scrsz(3)/4,scrsz(4)/4,scrsz(3)/2,scrsz(4)/2]);
pc=pcolor(0:1/fs:(L-1)/fs,freq,abs(WT)); title('Wavelet
Transform'); ylabel('Frequency (Hz)'); xlabel('Time (s)');
set(gca,'YTick',[0.001 0.01 0.1 1],'YTickLabels',{0.001, 0.01, 0.1,
1})
    ib=find(2*coib-L>=0,1,'last'); if isempty(ib), ib=1; end
    hold all; plot([(coib(end:-1:ib)-1);L-coib(ib:end)]/fs,[freq(end:-
1:ib);freq(ib:end)]),'-k','LineWidth',2);
    xlim([0,(L-1)/fs]); ylim([freq(1),freq(end)]);
set(pc,'EdgeColor','none'); set(gca,'YScale','log');
if nargin>2
    set(gca,'Position',[0.1,0.1,0.5,0.6]);
    axn=axes('Position',[0.65,0.1,0.25,0.6]); title('Time-averaged
wavelet power'); hold all;
    plot(axn,varargout{1},freq);
    v1=hline(0.005,'--k',' ');
    v2=hline(0.0095,'--k',' ');
    v3=hline(0.021,'--k',' ');
    v4=hline(0.052,'--k',' ');
    v5=hline(0.145,'--k',' ');
    v6 =hline(0.6,'--k',' ');
    v7= hline(2,'--k',' ');
    set(axn,'YLim',[freq(1),freq(end)],'YScale','log','YTick', [
0.007 0.015 0.03 0.08 0.3 1],'YTickLabel',{'EA1','EA2', 'SA', 'MA',
'RA', 'HA'},'XLim',[0,1.1*max(varargout{1})]); xlabel('Power');
    hold all;
    axn2=axes('Position',[0.1,0.78,0.5,0.16]);
    plot(axn2,raw,'b'), axis tight, ylim('auto');
    hold on
    plot(axn2,old_signal,'g'), axis tight, title('Signal');
    set(axn2, 'XTickLabel',{'}); ylabel('PU');

    end
end

if strcmp(CutEdges,'on') % cut unphysical coefficients
    coib(2*coib-L>0)=L/2;
    ovL=round(2*sum(coib)); frn=zeros(ovL,1); ttn=zeros(ovL,1); qn=0;
    for fn=1:SN, cL=2*coib(fn); if cL>0, frn(1+qn:qn+cL)=fn;
ttn(1+qn:qn+cL)=[1:ceil(cL/2),(L-floor(cL/2)+1):L]'; qn=qn+cL; end,
end
    lid=sub2ind([SN,L],frn,ttn); WT(lid)=NaN;
end
if strcmp(Progress,'on'), fprintf('\n'); end

end

%Detrending function
function dsig=wtdetr(sig,fs,tw)

window=round(fs*tw);
window=window+(1-mod(window,2)); %make window odd to have exact middle
point
hw=ceil(window/2);

```

```
%Fast moving average using cumulative sum
cumsig=cumsum(sig/window); smsig=sig;
smsig(1+hw:end-hw)=(cumsig(1+window:end-1)-cumsig(1:end-window-1));

%Moving average near the borders using variable window size
np=(1:2:window)';
smsig(1:hw)=window*cumsig(1:2:window)./np;
smsig(end-hw+1:end)=window*(cumsig(end)-cumsig(end-window:2:end-1))./np(end:-1:1);

dsig=sig-smsig; dsig=dsig-mean(dsig);

end
```

Function wap

```

% [wpow,wamp,Optional:intpow,intamp]=wap(WT,freq,Optional:freqint)
%
% WT - wavelet coefficients (FNxTN matrix, where FN is frequency index
and TN is time index)
% freq - corresponding frequencies
% freqint - frequency intervals for which calculate intpow and intamp
%           (should be RNx2 matrix, with rows corresponding to
intervals
%           and two columns specifying their boundaries)
%
% wpow - wavelet power (energy) for each frequency
% wamp - wavelet amplitude for each frequency
% intpow - wavelet power in each frequency interval specified by
freqint
% intamp - wavelet amplitude in each frequency interval specified by
freqint
%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
% Example:
[wpow,wamp,intpow,intamp]=wap(WT,freq,[0.6,2;0.145,0.6;0.145,2])
% given a some signal wavelet transform (WT) and corresponding
frequencies
% (freq) calculates wavelet power (wpow) and amplitude (wamp) for each
% frequency and also returns overall wavelet power (intpow) and
amplitude
% (intamp) in the frequency intervals from 0.6 to 2 Hz, from 0.145 to
0.6
% Hz and from 0.145 to 2 Hz (overall from two previous intervals).
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

```

```

function [wpow,wamp,varargout] = wap(WT,freq,varargin)

% determine frequency scaling (logarithmic or linear) and spacings
(doms)
if std(freq(2:end)./freq(1:end-1))<std(freq(2:end)-freq(1:end-1)),
doms=(mean(freq(2:end)./freq(1:end-1))-1)*freq(:); %logarithmic
else doms=ones(length(freq),1)*mean(freq(2:end)-freq(1:end-1)); end
%linear

find(isnan(abs(WT(1,:)))==0);
wpow=nanmean(abs(WT).^2,2).*doms;
wamp=nanmean(abs(WT),2);

if nargin>2 && ~isempty(varargin{1})
    fb=varargin{1}; %frequency intervals
    if size(fb,1)==2 && size(fb,2)~=2, fb=fb'; end %if intervals are
2xRN instead of RNx2 matrix
    RN=size(fb,1);
    intpow=zeros(RN,1); intamp=zeros(RN,1);
    for rn=1:RN
        fint=find(freq>fb(rn,1) & freq<=fb(rn,2)); %indices of current
frequency interval
        intpow(rn)=sum(wpow(fint));
        %intpow(rn)=sum(wpow(fint).*doms(fint))/(fb(rn,2)-fb(rn,1));

```

```
        intamp(rn)=sum(wamp(fint).*doms(fint))/(fb(rn,2)-fb(rn,1));
    end
end

if nargout>2, varargout{1}=intpow; end
if nargout>3, varargout{2}=intamp; end

end
```

BIBLIOGRAFIA

- [1] M. Intaglietta, "Vasomotion and flowmotion: physiological mechanisms and clinical evidence," *Vasc Med*, 1990, 101.
- [2] Arthur C. Guyton, John E. Hall, "Textbook of medical physiology", *Saunders*, 12th ed., 2010
- [3] E. Merrill, "Rheology of blood," *Physiological Review*, 1969, 49-4.
- [4] T. W. Jones, "Discovery that the veins of the bat's wing are endowed with rhythmical contractility and that onward flow of blood is accelerated by each contraction," *Trans R Soc*, 1852, 142
- [5] M. Bracic and A. Stefanovska, "Wavelet-based analysis of human blood-flow dynamics," *Bulletin of Mathematical Biology*, 1998, 60: 919-935.
- [6] A. Stefanovska and P. Kroelj, "Correlation integral and frequency analysis of cardiovascular functions," *Open Systems and Information Dynamics archive*, 1997, 4.
- [7] M. E. Muck-Weymann, H. P. Albrecht, A. Hager, D. Hiller, O. P. Hornstein, and R. D. Bauer, "Respiratory-dependent laser doppler flux motion in different skin areas and its meaning to autonomic nervous control of the vessels of the skin," *Microvascular Research*, 1996, 52: 69-78.
- [8] A. Stefanovska, M. Bracic, and H. D. Kvernmo, "Wavelet analysis of oscillations in the peripheral blood circulation measured by laser Doppler technique," *IEEE Transaction on Biomedical Engineering*, 1999, 46: 1230-39.
- [9] J. K. Li, "Dynamics of the Vascular System". *World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.*, Feb 2004.
- [10] 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
- [11] P. Kvandal, S. A. Landsverk, A. Bernjak, A. Stefanovska, H. D. Kvernmo, and K. A. Kirkebøen, "Low-frequency oscillations of the laser Doppler perfusion signal in human skin," *Microvascular Research*, 2006, 72: 120-127.

- [12] 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.
- [13] D.L. Kellogg, JR., Y.Liu, I.F. Kosiba, and D. O'Donnell, "Role of nitric oxide in the vascular effects of local warming of the skin in humans", *J Appl Physiol*, 1999: 1185-1190.
- [14] Johnson JM, O'Leary DS, Taylor WF, and Kosiba W., "Effect of local warming on forearm reactive hyperemia". *Clin Physiol* 6: 337–346, 1986.
- [15] Gooding KM, Hannemann MM, Tooke JE, Clough GF, Shore AC. "Maximum Skin Hyperaemia Induced by Local Heating: Possible Mechanisms". *J Vasc Res*. 2006 Feb 22 ; 43(3):270-277
- [16] Aulick, L. H., D. W. Wilmore, J. A. D. Mason, and J. B. A. Pruitt, "Influence of the burn wound on peripheral circulation in thermally injured patients" , *Am. J. Physiol*, 1977, 233: H520-H526.
- [17] Freund, P. R., G. L. Bregelmann, L. B. rowell, L. Engrav and D. M. Heinbach, "Vasomotor control in healed grafted skin in humans", *J Appl. Physiol*, 1981, 51: 168-171.
- [18] C. T. Minson, L. T. Berry and M. J. Joyner, "Nitric oxide and neutrally mediated regulation of skin blood flow during local heating", *J. Appl. Physiol.*, 2001, 91: 1619-1626.
- [19] C. M. Choi and R. G. Bennett, "Laser dopplers to determine cutaneous blood flow," *Dermatol Surg*, 2003, 29.
- [20] D. Halliday, R. Resnick, and K. S. Kraner, "Fisica 2". *CEA*, 3 ed., Jun 2004.
- [21] H. Albrecht, N. Damaschke, M. Borys, and C. Tropea, "Laser Doppler and Phase Doppler Measurement Techniques". *Springer-Verlag*, 1 ed., Dec 2002
- [22] J. G. Webster, "Medical Instrumentation. Application and Design". *John Wiley and Sons, Inc*, 5 ed., Dec 2010.
- [23] S. Sarnik, I. Hofirek, and O. Sochor, "Laser doppler fluxmetry," *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 2007, 151(1):143–146.

- [24] G. Cariolaro, G. Pierobon, and G. Calvagno, "Segnali e sistemi". *McGraw-Hill*, Gen 2005.
- [25] S. Qian and D. Chen, "Joint Time-Frequency Analysis, Methods and Applications". *Academic Press*, Dec 2011
- [26] S. Mallat, "A wavelet tour of signal processing". *Academic Press*, 3 ed., Dec 2008.
- [27] S. A. Landsverk, P. Kvandal, T. Kjelstrup, U. Benko, A. Bernjak, A. Stefanovska, H. D. Kvernmo, and K. A. Kirkeboen, "Human skin microcirculation after brachial plexus block evaluated by wavelet transform of the laser doppler flowmetry signal," *Anesthesiology*, 2006, V 105, No 3.
- [28] H. D. Kvernmo, A. Stefanovska, M. Bracic, K. A. Kirkebøen, and K. Kvernebo, "Spectral analysis of the laser doppler perfusion signal in human skin before and after exercise," *Microvascular Research*, 1998, 56: 173–182
- [29] S. Golay, C. Haerberli, A. Delacroix, L. Liaudet, P. Kucera, B. Waeber and F. Feihl, "Local heating of human skin causes hyperemia without mediation by muscarinic cholinergic receptors or prostanoids", *J. Appl. Physiology* 97, 2004, 1781-1786