

**POLITECNICO DI MILANO**  
**Facoltà di Ingegneria dei Sistemi**  
Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica



**STUDIO DEL CONTROLLO AUTONOMO IN UN MODELLO  
ANIMALE DI ISCHEMIA INTESTINALE MEDIANTE  
ANALISI DEL BARORIFLESSO CARDIACO**

Relatore: **Prof. Giuseppe BASELLI**  
Correlatori: **Ing. Federico ALETTI**  
**Ing. Manuela FERRARIO**

Tesi di laurea di:  
**Nicolò GAMBAROTTA**  
Matr. 770479

Anno Accademico 2011/2012



# Indice

<b>Sommario</b> .....	<b>1</b>
<b>Summary</b> .....	<b>4</b>
<b>Capitolo 1: Introduzione</b> .....	<b>7</b>
1.1 Relazione fra ischemia intestinale e shock circolatorio .....	7
1.2 Il sistema nervoso autonomo ed il ruolo del parasimpatico.....	10
1.3 Il baroriflesso arterioso .....	12
1.4 Obiettivi del lavoro.....	16
<b>Capitolo 2: Materiali e Metodi</b> .....	<b>18</b>
2.1 Protocollo sperimentale.....	18
2.2 Acquisizione del segnale e preprocessing.....	22
2.3 Analisi nel dominio del tempo .....	25
2.3.1 Andamento dei valori medi.....	25
2.3.2 Heart Rate Characteristics.....	28
2.4 Analisi del baroriflesso .....	31
2.5 Analisi statistica.....	36
<b>Capitolo 3: Risultati</b> .....	<b>38</b>
3.1 Caratteristiche della popolazione .....	38
3.2 Andamento dei valori medi delle serie .....	39
3.3 Heart Rate Characteristics.....	56
3.4 Baroriflesso cardiaco.....	60
<b>Capitolo 4: Discussione e Conclusioni</b> .....	<b>67</b>
4.1 Analisi nel dominio del tempo .....	67
4.2 Heart Rate Characteristics.....	70
4.3 Baroriflesso cardiaco.....	71
4.4 Conclusioni .....	72
4.5 Limitazioni .....	74
4.6 Sviluppi futuri.....	75
<b>Bibliografia</b> .....	<b>76</b>



## **Sommario**

Il presente lavoro si propone di essere un'integrazione agli studi condotti da Penn e Schmid-Schonbein (2011) nell'ambito dello studio dei meccanismi di risposta cardiovascolare a situazioni di shock emorragico ed ischemia intestinale. Da studi precedenti (Barroso-Aranda e Schmid-Schonbein, 1989; Penn e Schmid-Schonbein, 2008) è nota l'elevata mortalità associata alla riperfusione dei tessuti ischemici, e causata dalle lesioni organiche provocate da enzimi digestivi e mediatori infiammatori trasportati dal flusso ematico (Fitzal et al, 2003; Ishimaru et al, 2004; Mitsuoka et al, 2000). Nel lavoro di Penn e Schmid-Schonbein (2011) sono stati tuttavia evidenziati fenomeni di morte improvvisa durante l'ischemia, nei quali meccanismi infiammatori e digestivi non sembrano giocare un ruolo di primo piano. L'ipotesi è che nel crollo dei valori di pressione rivesta un ruolo cardine il sistema nervoso parasimpatico; si ipotizza infatti che la morte improvvisa sia legata ad un meccanismo simile allo shock neurogeno, con una perdita di attività simpatica risultante nella mancata compensazione dell'azione del sistema vagale. Una più profonda comprensione dei meccanismi alla base del controllo autonomico di situazioni ischemiche consentirebbe una più efficace gestione del paziente in tutti

quei casi in cui una riperfusione immediata risulta impossibile o potenzialmente dannosa.

Gli obiettivi del presente lavoro si possono perciò riassumere, alla luce di quanto detto, nell'indagine del ruolo del sistema nervoso autonomo nel controllo cardiovascolare a seguito di occlusione delle arterie splancniche (*Splanchnic Artery Occlusion* – SAO), che causa ischemia intestinale, e di come le condizioni cardiocircolatorie evolvano fino a portare alla morte.

Nel seguito viene brevemente descritta la struttura della tesi.

Nel **Capitolo 1** verrà presentata la relazione tra l'ischemia e l'insorgere di shock circolatorio, e verranno approfonditi i meccanismi che portano alla morte a seguito della riperfusione. Inoltre, sarà brevemente illustrato il funzionamento del sistema nervoso autonomo, al fine di permettere la completa comprensione dei trattamenti farmacologici scelti nella stesura del protocollo sperimentale. Verrà infine affrontato il ruolo del baroriflesso nel mantenimento di livelli fisiologici di pressione arteriosa.

Nel **Capitolo 2** verranno descritti il protocollo sperimentale e le modalità di registrazione dei dati. Saranno inoltre presentate le tecniche implementate per il preprocessing e l'elaborazione dei segnali di pressione arteriosa. In particolare, ci si soffermerà sull'estrazione di serie battito-battito di variabilità dal segnale originario e sulla loro analisi. Verranno illustrati in questo capitolo le scelte riguardanti le finestre temporali su cui è stata svolta l'analisi nel dominio del tempo e gli indici ricavati dalle serie di variabilità. Saranno inoltre presentati gli algoritmi implementati per la stima della sensitività del baroriflesso (modello bivariato e funzione di trasferimento) e per l'analisi dei trend pressori che conducono alla morte (*Heart Rate Characteristics* – HRC), ed i test statistici utilizzati per i confronti tra gruppi di trattamento farmacologico e tra gruppi di comportamento (*Fast Fatal Pressure Drop* – FFPD e *Slow Fatal Pressure Drop* – SFPD).

Nel **Capitolo 3** saranno riportati i principali risultati ottenuti mediante l'applicazione dei metodi illustrati nel capitolo precedente. La presentazione dei

risultati seguirà il medesimo ordine logico con cui sono introdotte le tecniche di analisi nel capitolo 2.

Nel **Capitolo 4**, infine, i risultati saranno commentati alla luce delle considerazioni di natura teorica ed alle ipotesi di lavoro iniziali esposte nel capitolo 1. I risultati ottenuti dall'analisi dei trend delle serie di pressione media, pressione pulsatoria e periodo cardiaco, e dalla stima della sensibilità del baroriflesso supportano l'ipotesi iniziale sul ruolo del sistema parasimpatico. I risultati hanno infatti evidenziato nella fase finale precedente il *Fatal Pressure Drop* la diminuzione della frequenza cardiaca negli animali che vanno incontro a FFPD; l'analisi del baroriflesso ha inoltre mostrato in questi ratti un significativo aumento della sensibilità alle basse frequenze (LF). In virtù di quanto emerso dalle analisi dei trend nel dominio del tempo, si può ipotizzare che tale incremento della sensibilità del controllo della frequenza cardiaca ad opera del baroriflesso sia imputabile ad un tentativo di bilanciare un'eccessiva attività vagale per riportare la pressione a livelli fisiologici.

## **Summary**

This work intends to be an integration to the study conducted by Penn and Schmid-Schonbein (2011), concerning the investigation of the mechanisms underlying the cardiovascular response to situations of hemorrhagic shock and intestinal ischemia. Previous studies (Barroso-Aranda and Schmid-Schonbein, 1989; Penn and Schmid-Schonbein, 2008) have demonstrated that high mortality is related to the reperfusion of ischemic tissues and caused by the transportation of digestive enzymes and inflammatory mediators into the central circulation, via the portal vein; the presence of digestive enzymes and inflammatory mediators away from the intestine leads to remote organ injury and death (Fitzal et al, 2003; Ishimaru et al, 2004; Mitsuoka et al, 2000). Penn and Schmid-Schonbein (2011) have however drawn attention to sudden death phenomena during ischemia (Fast Fatal Pressure Drop –FFPD), in which inflammatory and digestive mechanisms are not directly involved. The hypothesis is that the underlying reason behind the fatal pressure drop is the intervention of the parasympathetic nervous system, triggering a mechanism similar to that of neurogenic shock, a form of hypotension resulting from loss of sympathetic control of vascular tone and uncompensated vagal activity.

Gaining full understanding of the mechanisms underlying the autonomic control of ischemic situations would lead to an improved clinical management of patients in all those circumstances in which an immediate reperfusion is either impossible or potentially dangerous.

The aims of the present work can therefore be summarized in the investigation of the role exerted by the autonomic nervous system in the cardiovascular control following Splanchnic Artery Occlusion (SAO), which causes intestinal ischemia, and of how cardiocirculatory conditions evolve, leading to the death of the animal.

The thesis outline is briefly described in the following.

In **Chapter 1**, the relationships between ischemia and circulatory shock will be depicted and the mechanisms leading to death after the reperfusion of ischemic tissues will be analyzed. Moreover, the physiology of the autonomic nervous system will be briefly illustrated, in order to facilitate full understanding of the pharmacological treatments chosen in drafting the experimental protocol. The role exerted by the baroreflex in maintaining arterial pressure within the physiological range will be finally analyzed in this section.

**Chapter 2** describes the experimental protocol and the data collection procedure. Data preprocessing and elaboration techniques implemented on pressure signals will be illustrated in this section. In particular, the attention will linger on the extraction and analysis of beat-to-beat series of variability derived from the raw arterial pressure signal: Mean Arterial Pressure (MAP), Pulse Pressure (PP) and Heart Period (HP). Criteria used for the selection of segments from the raw signals for the time-domain analysis will be described, along with the indices extrapolated from the beat-to-beat series. Furthermore, the algorithms implemented for baroreflex sensitivity (BRS) assessment (bivariate model; transfer function gain) and pressure trend analysis (Heart Rate Characteristics – HRC) will be expounded in this chapter. Finally, statistical tests used for intra- and inter-group comparisons will be briefly listed.

**Chapter 3** is dedicated to the presentation of the main results of this work, following the same logical order as chapter 2.

In **Chapter 4**, finally, results will be interpreted in light of the theoretical observations and the initial hypothesis illustrated in chapter 1. The results of the MAP, HP and PP trend analysis, along with those obtained from the BRS assessment, support the initial hypothesis on the role of the parasympathetic nervous system. Results have highlighted a decrease in heart rate in the rats of the FFPD group; in addition, the baroreflex analysis has shown a significant increase in the sensitivity calculated in the Low Frequency (LF) band. That being so, we can hypothesize that the increase in BRS is ascribable to an attempt to balance an excessive parasympathetic activity, in order to restore physiological levels of arterial pressure.

# *Capitolo 1*

## **Introduzione**

### ***1.1 Relazione fra ischemia intestinale e shock circolatorio***

Il presente lavoro di tesi si inserisce nel contesto dello studio di shock emorragico ed ischemia intestinale, e dei meccanismi di risposta cardiovascolare che portano a una condizione irreversibile e quindi alla morte. Diversi studi hanno mostrato che un elevato tasso di mortalità è associato alla ri-perfusione dei tessuti ischemici (Barroso-Aranda e Schmid-Schonbein, 1989; Penn e Schmid-Schonbein, 2008), a causa delle lesioni organiche indotte da enzimi digestivi pancreatici e mediatori infiammatori presenti all'interno della parete intestinale e trasportati dal sistema circolatorio (Fitzal et al, 2003; Ishimaru et al, 2004; Mitsuoka et al, 2000) a seguito di ripristino della perfusione del distretto interessato da ischemia. In condizioni fisiologiche, gli enzimi pancreatici attivi sono confinati all'interno del lume enterico, dove svolgono la loro funzione digestiva, grazie alla presenza di un

duplice meccanismo protettivo che ne previene la diffusione all'interno del tessuto della parete intestinale: (i) le cellule epiteliali che costituiscono una barriera e (ii) la secrezione delle cellule mucipare caliciformi che allontana gli enzimi dalla parete, potenziando l'efficacia della barriera epiteliale stessa.

In alcune condizioni, tuttavia, i suddetti meccanismi protettivi vengono meno e gli enzimi digestivi pancreatici sono liberi di penetrare all'interno del tessuto intestinale, nonché all'interno dei vasi che irrorano l'intestino stesso. In particolare, in caso di ischemia l'efficacia della barriera costituita dalle cellule epiteliali viene compromessa a causa di danni morfologici, che consentono l'infiltrazione di molecole, anche di elevato peso, all'interno degli spazi interstiziali della parete. Inoltre, la secrezione mucosa delle cellule caliciformi risulta drasticamente ridotta e ciò consente agli enzimi digestivi di venire a contatto diretto con la superficie microvillosa del lume ed iniziarne la digestione. In alcuni casi, gli enzimi possono essere trasportati fino agli strati muscolari più profondi della parete intestinale, ed entrare così in contatto con la vena porta e quindi in circolo. Indipendentemente dalla condizione ischemica, che determina una diminuzione nella produzione di ATP, fondamentale per il mantenimento della membrana protettiva mucosa, si è riscontrata la presenza di mediatori infiammatori (Schmid-Schonbein, 2009); tali mediatori derivano principalmente dalla presenza di proteasi e lipasi digestive e di acidi grassi liberi generati da processi digestivi. Tra i numerosi mediatori potenzialmente presenti, si ritiene che un ruolo cardine nella sindrome da riperfusione sia svolto dai fattori attivanti le piastrine (*Platelet-Activating Factor*, PAF). A seguito della riperfusione, inoltre, il plasma contiene altre sostanze in grado di agire sul sistema cardiocircolatorio; in particolare, si è riscontrata la presenza di fattori in grado di deprimere l'attività del miocardio (*Myocardial Depressant Factor*, MDF), che si ritiene possano essere rilasciati dal pancreas in condizioni di ischemia (Schmid-Schonbein, 2009).

In aggiunta a tali fenomeni, lo studio condotto da Penn e Schmid-Schonbein (2011) ha evidenziato condizione di instabilità emodinamica già durante l'ischemia, quindi ben prima che il processo infiammatorio sia pienamente sviluppato.

In questi casi, gli enzimi digestivi responsabili della morte post-riperfusione non sono coinvolti, mentre si è ipotizzato un ruolo chiave da parte del controllo del

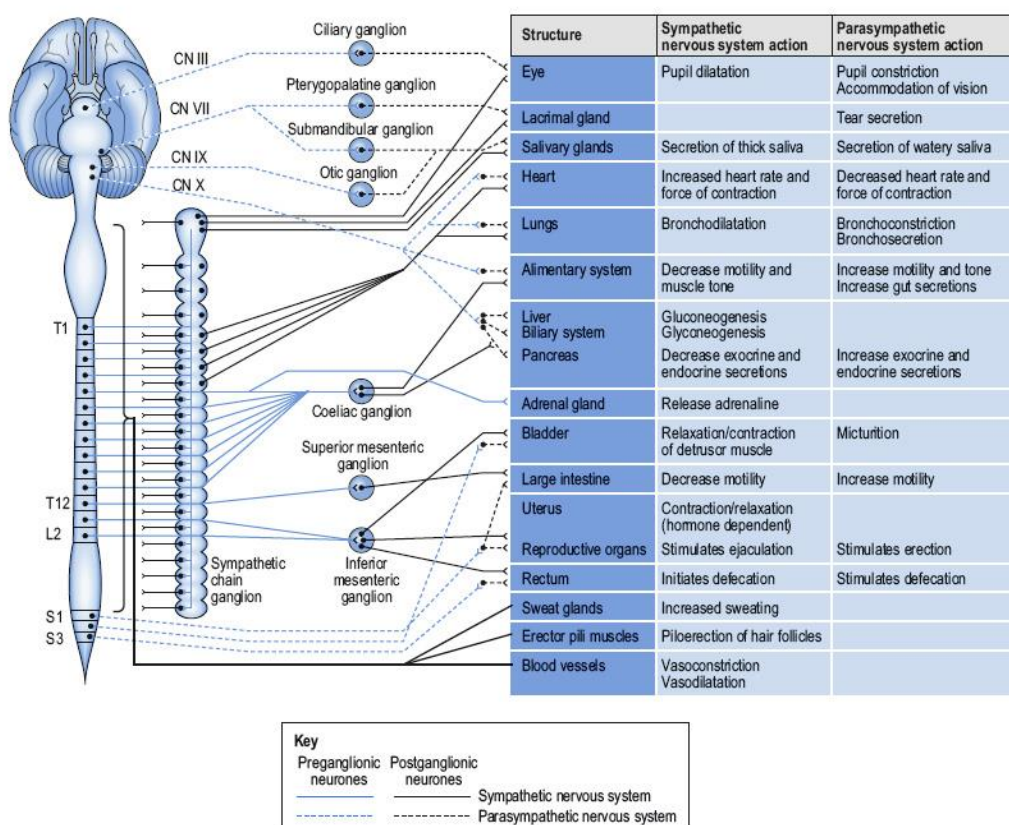
sistema nervoso autonomo (SNA). Negli esperimenti descritti in Penn e Schmid-Schonbein (2011), sono state descritte due diverse progressioni dei valori di pressione arteriosa a seguito dell'occlusione delle arterie splancniche: (i) una diminuzione progressiva che risulta fatale in un arco di tempo di 1÷3 ore (*Slow Fatal Pressure Drop* – SFPD) o (ii) un crollo rapido in un arco di tempo di circa mezz'ora, che determina collasso e morte improvvisa (*Fast Fatal Pressure Drop* – FFPD). Il fallimento nella stabilizzazione della pressione arteriosa da parte del sistema nervoso autonomo si ritiene avere un ruolo fondamentale, in particolare nel caso di FFPDs.

Il sistema nervoso autonomo esercita infatti un controllo di duplice natura sulla pressione arteriosa, tramite l'azione delle sue due branche: (i) il sistema simpatico è responsabile degli aggiustamenti rapidi della pressione, tramite la regolazione delle resistenze periferiche, mentre (ii) il sistema parasimpatico è in grado di abbassare la pressione sistemica e di smorzarne le fluttuazioni indotte dal simpatico, grazie alle terminazioni che vanno ad innervare il miocardio ed il cui ruolo verrà discusso nel successivo paragrafo.

L'ipotesi fondamentale alla base dello studio di Penn e Schmid-Schonbein (2011), di cui questo lavoro si propone di essere un'integrazione, è che le cause dell'improvviso crollo pressorio che caratterizza i FFPDs siano da ricercarsi proprio nell'attività del sistema nervoso autonomo, ed in particolare che si configuri un fenomeno simile allo shock neurogeno pur in assenza di danno al sistema nervoso centrale, con una sintomatologia però comparabile, consistente in una perdita di attività simpatica risultante nella mancata compensazione dell'azione del sistema parasimpatico. Fare piena luce sul ruolo del sistema nervoso autonomo nel controllo di situazioni ischemiche consentirebbe una più efficace gestione del paziente in tutti quei casi in cui una riperfusione immediata risulta impossibile o potenzialmente dannosa per prevenire danno da ischemia e riperfusione. Il protocollo sperimentale basato sulla registrazione invasiva della pressione arteriosa in ratti con occlusione delle arterie splancniche (*splanchnic arterial occlusion* - SAO) è stato sviluppato a questo scopo, ed i diversi gruppi di trattamento farmacologico, che saranno descritti in dettaglio nel capitolo dei metodi, sono stati pensati al fine di evidenziare i meccanismi di controllo che causano morte improvvisa durante ischemia.

## 1.2 Il sistema nervoso autonomo ed il ruolo del parasimpatico

Il sistema nervoso centrale gioca un ruolo chiave nella regolazione cardiovascolare, agendo sia a livello dei vasi periferici che sulla modulazione della funzionalità cardiaca, tramite innervazione diretta o regolazione del rilascio di fattori ormonali. L'innervazione diretta degli organi bersaglio da parte del sistema nervoso autonomo è tuttavia il meccanismo di controllo principale; i segnali efferenti vengono trasmessi attraverso due branche: (i) il sistema nervoso simpatico ed (ii) il sistema nervoso parasimpatico. I nervi simpatici originano nel midollo spinale, nel tratto compreso tra T-1 e L-2, e per quanto riguarda il controllo cardiovascolare raggiungono sia il cuore che i vasi sanguigni tramite la catena simpatica, costituita da neuroni pregangliari colinergici e neuroni postgangliari, salvo rare eccezioni, adrenergici.



**Figura 1.1** Il sistema nervoso autonomo del ratto. Immagine tratta da <http://www.about-pharmacology.com/2012/10/organization-of-autonomic-nervous-system.html> (2012).

Le fibre parasimpatiche lasciano invece il sistema nervoso centrale attraverso i nervi cranici III, VII, IX e X ed i nervi spinali 1°, 2° e 3°; le fibre dirette al cuore, in particolare, decorrono nei nervi vaghi (X paio di nervi cranici), e sono costituite da fibre pregangliari che raggiungono l'organo bersaglio e da brevi fibre terminali postgangliari. Le efferenze del sistema nervoso parasimpatico, a differenza di quanto visto in precedenza per il simpatico, sono dotate, con poche eccezioni, di neuroni sia pregangliari che postgangliari colinergici.

Al fine di comprendere meglio i principi alla base dei trattamenti farmacologici presenti nel protocollo sperimentale che verrà presentato nel dettaglio nel secondo capitolo, è necessario in questo contesto soffermarsi sulle modalità con cui i trasmettitori del sistema nervoso autonomo stimolano gli organi bersaglio. Sulla superficie esterna della membrana cellulare delle cellule effettrici sono presenti recettori altamente specifici; quando il trasmettitore si combina con il recettore, questo può inibire od eccitare la cellula tramite due meccanismi: (i) variazione della permeabilità della membrana cellulare a determinati ioni e (ii) attivazione od inattivazione di specifici enzimi.

I recettori attivati dall'acetilcolina, trasmettitore principalmente parasimpatico, sono di due tipi: (i) recettori muscarinici, presenti sulle cellule effettrici innervate da neuroni postgangliari parasimpatici, e (ii) recettori nicotinici, presenti invece a livello delle sinapsi tra neuroni pregangliari e postgangliari di entrambe le branche del SNA. I recettori adrenergici si classificano invece in recettori alfa, eccitati dalla noradrenalina e dall'adrenalina, e recettori beta, eccitati soltanto dalla noradrenalina. A livello di regolazione cardiovascolare, gli effetti di tali recettori si possono riassumere in: (i) vasocostrizione indotta dall'attivazione di recettori di tipo alfa, (ii) vasodilatazione, cardioaccelerazione ed aumento della contrattilità del miocardio, indotti dall'attivazione di recettori beta (Guyton e Hall, 2002).

I principali effetti della stimolazione parasimpatica del miocardio consistono invece nella diminuzione della frequenza cardiaca e della contrattilità del cuore ed in modo meno marcato in una leggera dilatazione coronarica; la somma di questi tre fattori si traduce in un abbassamento della pressione arteriosa che, come già detto in precedenza, viene mantenuta stabile grazie all'equilibrio tra l'azione delle due branche del sistema nervoso autonomo (SNA) (Guyton e Hall, 2002).

Il sistema parasimpatico si attiva in risposta al transitorio aumento della pressione arteriosa dovuto, nel caso dell'occlusione delle arterie splanchniche, al drastico innalzamento della resistenza opposta dai vasi al flusso sanguigno. Inoltre, nel lavoro di Longhurst et al. (1991) l'ischemia intestinale, riducendo notevolmente il ritorno venoso al cuore, rappresenta una forte stimolazione simpatica che deve essere compensata da un'attivazione parasimpatica, al fine di mantenere un adeguato equilibrio e di smorzare variazioni pressorie eccessivamente marcate e rapide.

Nelle fasi successive all'innalzamento pressorio dovuto all'occlusione arteriosa, si configura una situazione di shock ostruttivo, cioè un'ostruzione al deflusso del sangue dal ventricolo sinistro verso il grande circolo, che provoca una progressiva ipotensione. Il mantenimento dei valori pressori e del riempimento del cuore richiede dunque un intervento sempre più marcato da parte del sistema nervoso simpatico. Un'ipotesi (Penn e Schmid-Schonbein, 2011) è che un'attivazione simpatica intensa, prolungata e continua non sia sostenibile indefinitamente, e che l'improvvisa disattivazione determini un crollo della pressione, recuperabile o meno a seconda dell'intensità dell'azione parasimpatica che risulta non più equilibrata dal sistema simpatico. Alcuni lavori ipotizzano invece che esista una sorta di soglia per l'attivazione simpatica, oltre la quale il continuo stimolo simpatico produce un decremento anziché un aumento del traffico nervoso, quindi una sorta di saturazione (Convertino e Cooke, 2002; Cooke e Convertino, 2002).

### ***1.3 Il baroriflesso arterioso***

L'attività del sistema nervoso autonomo è modulata attraverso numerosi riflessi e vie afferenti. Il baroriflesso arterioso riveste, tra questi, un ruolo di primaria importanza nel mantenimento dell'omeostasi pressoria. Analogamente alla maggioranza dei riflessi che contribuiscono alla regolazione della pressione, si tratta di un meccanismo a feedback negativo, innescato dallo stiramento di barocettori localizzati principalmente a livello del seno carotideo e dell'arco aortico; tali recettori sono costituiti da terminazioni nervose ad efflorescenza, ed inviano le proprie afferenze al tratto solitario del bulbo tramite due vie: (i) i segnali provenienti dai barocettori del seno carotideo vengono trasmessi tramite il nervo di Hering ed il

nervo glossofaringeo, mentre (ii) quelli inviati dai barocettori situati nell'arco aortico raggiungono il bulbo attraverso il nervo vago.

Al fine di ottimizzare il mantenimento della pressione all'interno di un range fisiologico, i barocettori presentano un'intensità di risposta variabile a seconda del livello di pressione arteriosa stesso; in particolare, essi hanno massima sensibilità intorno al valore normale di pressione, dove anche piccole variazioni modificano notevolmente la risposta riflessa. Inoltre, la risposta dei barocettori è tanto più intensa quanto più è rapida la variazione della pressione, indipendentemente dal valore assoluto di quest'ultima.

Dal bulbo, dove confluiscono i segnali barocettivi inviati dai recettori, segnali di secondo ordine vengono inviati al centro vasocostrittore ed al centro vagale, che risultano così stimolati od inibiti a seconda dei casi: la rilevazione di un aumento della pressione arteriosa provoca l'inibizione del centro vasocostrittore e la stimolazione del centro vagale, mentre il calo della pressione causa una reazione inversa.

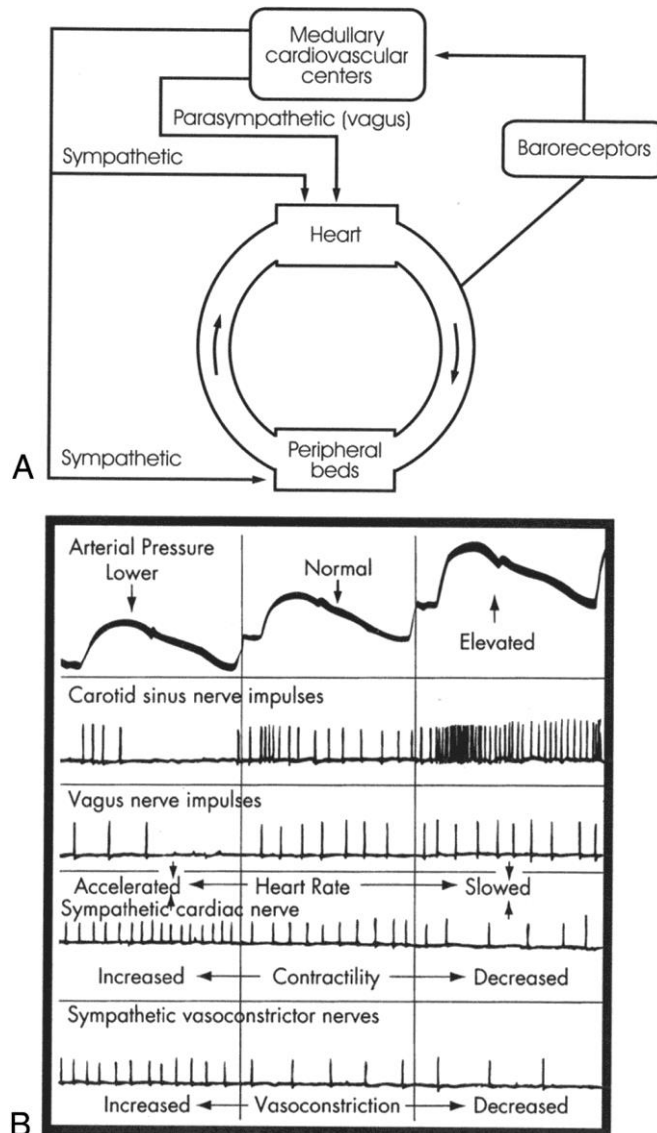
Il baroriflesso arterioso riveste un ruolo di particolare importanza non solamente nella regolazione della pressione in condizioni fisiologiche, ma soprattutto nella gestione di situazioni di shock circolatorio; con tale termine si indica una condizione in cui l'apporto sanguigno all'organismo risulta inadeguato, a causa di una riduzione della gittata cardiaca, di un eccessivo metabolismo corporeo o di un'anomala perfusione dei tessuti. Nel primo di questi casi, le cause possono essere due: (i) la diminuzione della capacità del cuore di pompare sangue o (ii) la diminuzione del ritorno venoso per diminuzione del volume ematico, riduzione del tono vascolare o ostruzione del flusso sanguigno.

In queste condizioni, il baroriflesso arterioso è il principale responsabile del mantenimento della pressione a livelli compatibili con la vita, essendo in grado di evocare risposte nervose, mediate dal sistema simpatico, tanto intense da impedire il crollo della pressione stessa, mascherando così lo stato di shock fino a quando peraltro le condizioni di ipovolemia risultano non compensabili, a meno di intervenire con un'opportuna terapia a base di fluidi ed eventualmente vasopressori, qualora la somministrazione di volumi si riveli insufficiente da sola a mantenere una pressione fisiologica e dunque a garantire la perfusione degli organi. La riduzione

della pressione stimola infatti l'attivazione del sistema nervoso simpatico, che produce tre effetti principali a livello dell'apparato cardiocircolatorio: (i) costrizione delle arteriole con conseguente aumento della resistenza periferica, (ii) costrizione delle vene, al fine di mantenere un ritorno venoso adeguato nonostante la riduzione di volume circolante ed (iii) aumento dell'attività cardiaca, sia in termini di contrattilità che di frequenza cardiaca. Pur essendo in grado di compensare temporaneamente allo stato di shock preservando la pressione arteriosa tramite questi tre meccanismi, il baroriflesso arterioso non è tuttavia altrettanto efficace nel mantenimento di livelli di gittata cardiaca: se la costrizione venosa favorisce il ritorno venoso al cuore, e di conseguenza la gittata cardiaca, l'aumento della resistenza periferica totale si traduce però in un ostacolo nel mantenimento della gittata stessa.

Nel caso dell'occlusione arteriosa, lo stato di shock si manifesta a causa della diminuzione del ritorno venoso legata a due fattori: l'occlusione in sé e l'aumento della permeabilità capillare dovuta alla liberazione di tossine, causata dall'ischemia dei tessuti.

Il protocollo sperimentale adottato nel presente studio e precedentemente pubblicato (Penn e Schmid-Schonbein, 2011), è stato sviluppato a partire da tali considerazioni di carattere fisiologico riguardanti il ruolo del sistema nervoso autonomo sia nella regolazione della pressione arteriosa che nella risposta a situazioni patologiche, e si propone come obiettivo proprio l'indagine della correlazione tra l'occorrenza di morte improvvisa e l'attività autonoma, mediante trattamenti farmacologici mirati ad attenuare o aumentare quest'ultima.



**Figura 1.2** Controllo barocettivo della circolazione. A, Le principali componenti dei riflessi barocettivi sono: (i) una branca afferente, comprendente i barocettori arteriosi situati a livello del seno carotideo e dell'arco aortico, ed i corrispondenti nervi, il nervo glossofaringeo ed il nervo vago; (ii) i centri cardiovascolari situati nel bulbo, deputati a ricevere ed integrare le informazioni sensoriali; e (iii) una branca efferente comprendente le innervazioni simpatiche di cuore e vasi sanguigni ed i nervi parasimpatici diretti al cuore. I barocettori sono stimolati dallo stiramento della parete dei vasi, risultante in un aumento della pressione transluminale. B, gli impulsi generati a livello dei barocettori inibiscono la stimolazione simpatica di vasi e cuore, e facilitano la scarica vagale sul cuore stesso. L'aumento della pressione arteriosa provoca un incremento dell'attività dei barocettori, risultante in un'ulteriore inibizione simpatica ed in una maggiore stimolazione vagale del miocardio; ciò provoca vasodilatazione, venodilatazione e riduzione di frequenza cardiaca, volume sistolico e gittata cardiaca. Il risultato netto è perciò il ritorno della pressione a livelli normali. La diminuzione della pressione arteriosa ha effetti opposti. (Immagine tratta da Crystal G.J., Salem M.R. (2012)).

## 1.4 Obiettivi del lavoro

L'obiettivo del presente lavoro è la verifica delle ipotesi richiamate nei paragrafi precedenti, mediante l'affiancamento di analisi quantitative alle osservazioni, per lo più di natura qualitativa o focalizzate su fenomeni inerenti il danno tissutale e meccanismi su scala molecolare e cellulare riportate nello studio di Penn e Schmid-Schonbein (2011). In particolare, l'attenzione si è focalizzata su tre tipi di analisi:

- Analisi nel dominio del tempo dei valori medi delle serie battito-battito estratte dal segnale pressorio invasivo (*mean arterial pressure* -MAP, *pulse pressure* - PP, *heart period* -HP), al fine di verificare l'eventuale presenza di trend nel periodo successivo all'occlusione arteriosa, e nel periodo compreso tra la fine del suddetto transitorio ed il *Fatal Pressure Drop*. L'obiettivo è di verificare l'esistenza di una possibile relazione intercorrente tra l'andamento di tali segnali ed il trattamento farmacologico, per evidenziare differenze significative nella risposta all'occlusione delle arterie mesenterica superiore e celiaca, causate dall'alterazione del controllo nervoso autonomo.
- Analisi dell'andamento delle serie battito-battito di MAP, PP e HP nel periodo compreso tra il termine del transitorio dovuto all'occlusione delle arterie e l'insorgere del *fatal drop*, mediante l'algoritmo HRC (Heart Rate Characteristics) proposto nel lavoro di Moorman et al (2006). L'obiettivo è di evidenziare differenze significative tra il lento avvicinamento a SFPD e l'improvviso manifestarsi di FFPD. Sono stati inoltre valutati tali indici su finestre temporali di minuti, con l'obiettivo di enfatizzare e caratterizzare da un punto di vista quantitativo eventuali fenomeni di *drop/recovery*.
- Stima del guadagno del baroriflesso cardiaco con diversi metodi e valutazione delle variazioni dello stesso nel periodo di tempo intercorrente tra il termine del transitorio dovuto all'occlusione delle arterie e l'insorgere del *fatal drop*. Sono stati analizzati i trend dei valori del guadagno barocettivo al variare del trattamento farmacologico e del tipo di ipotensione irreversibile, allo scopo di verificare eventuali differenze nel controllo della pressione tra i ratti che vanno incontro a FFPD e quelli che invece presentano SFPD, a sostegno dell'ipotesi di attività parasimpatica non compensata quale causa dei FFPDs.

## *Capitolo 1 – Introduzione*

Per ulteriori dettagli sul protocollo e queste tecniche di analisi, si rimanda al capitolo riguardante i Materiali e Metodi.

## *Capitolo 2*

# **Materiali e Metodi**

### ***2.1 Protocollo sperimentale***

Il protocollo sperimentale è stato studiato e implementato presso il Dipartimento di Bioingegneria dell'Università della California, San Diego, La Jolla, ad opera del Dott. Alexander H. Penn e del Dott. Geert W. Schmid-Schönbein (2011), coadiuvati dai propri collaboratori del Microcirculation Laboratory.

Ratti Wistar maschi, dopo cinque o più giorni di ambientamento presso le strutture del laboratorio, sono stati suddivisi in sette gruppi di studio, di natura modulare al fine di facilitare l'interpretazione dei risultati:

- NoXyl Glucose
- NoXyl Saline
- Xyl Glucose
- Xyl Gly Glucose

- Xyl TSV Glucose
- Xyl Glucose Sham
- Glucose ANGD

Tutti i ratti indistintamente hanno ricevuto anestesia generale (sodio Pentobarbital, 50 mg/kg intramuscolare) e sono stati instrumentati con un catetere nella vena femorale sinistra per l'eventuale somministrazione di anestetico addizionale, quando ritenuto necessario, tramite valutazione dei riflessi e un catetere nell'arteria femorale destra, per la misura della pressione e il prelievo di fluidi. Per quanto riguarda la somministrazione di specifiche sostanze:

- Gli animali appartenenti ai gruppi denominati con la sigla Xyl sono stati tranquillizzati con Xilazina (4 mg/kg intramuscolare, i.m.) 20 minuti prima dell'anestesia.
- I ratti appartenenti al gruppo denominato con la sigla Xyl Gly Glucose sono stati tranquillizzati con Xilazina come il gruppo precedentemente descritto, ma hanno ricevuto 0.5 mg/kg i.m. di Glicopirrolato immediatamente dopo l'iniezione del tranquillante.
- I ratti appartenenti al gruppo Xyl TSV (*Total Subdiaphragmatic Vagotomy*) Glucose sono stati sottoposti a recisione del tronco anteriore e posteriore del nervo vago a livello dell'esofago.
- Gli animali del gruppo Xyl Glucose Sham sono stati invece sottoposti al trattamento con Xilazina ed all'iniezione di glucosio all'interno del lume intestinale, ma non all'occlusione arteriosa.

Una volta anestetizzati e preparati i ratti per l'intervento su tavolo operatorio riscaldato, si è proceduto con il protocollo di ischemia intestinale: l'intestino tenue e l'intestino cieco sono stati esposti a seguito di incisione del ventre degli animali ed avvolti insieme in garza imbevuta di soluzione salina alla temperatura di 37 °C. Le arterie mesenterica superiore e celiaca, che perfondono l'intestino tenue, il fegato, il pancreas, la milza e lo stomaco, sono state quindi isolate con l'utilizzo di nastro ombelicale.

Sono state a questo punto iniettate nel lume intestinale sostanze specifiche per ogni gruppo:

- I ratti appartenenti al gruppo NoXyl Saline hanno ricevuto 6-10 ml di soluzione salina, iniettata in due o tre punti lungo l'intestino tenue fino ad ottenerne il completo riempimento con una modesta distensione della parete.
- Gli animali appartenenti ai gruppi NoXyl Glucose, Xyl Glucose, Xyl Gly Glucose, Xyl TSV Glucose e Xyl Glucose Sham hanno ricevuto una soluzione salina arricchita con 100 mg/ml di glucosio.
- Ai ratti appartenenti al gruppo Glucose ANGD è stata iniettata una soluzione salina contenente 100 mg/ml di glucosio e 2 mg/ml di 6-Amidino-2-Naphthyl p-guanidinobenzoate dimethanesulfonate (inibitore delle proteasi).
- I ratti del gruppo Xyl Gly Glucose hanno ricevuto inoltre, in aggiunta al glucosio, 0.5 mg/kg di glicopirrolato intravenoso.

Le infusioni di tutti i liquidi sono state portate a termine entro i 5 minuti. Solo nel caso del gruppo Xyl Gly Glucose si sono attesi 15 minuti per consentire la stabilizzazione del glicopirrolato, mentre per gli altri animali si è dato avvio alla SAO (*splanchnic artery occlusion*) immediatamente dopo il termine delle iniezioni nel lume intestinale, tramite legatura di piccoli tubi polietilenici alle arterie; i vasi linfatici principali sono stati occlusi contestualmente all'arteria mesenterica superiore a causa della loro vicinanza a quest'ultima.

Gli animali sono quindi stati lasciati indisturbati, osservandone l'evoluzione spontanea, per tutta la durata dell'esperimento fino alla morte, accertata da livelli di MAP inferiori a 20 mmHg e di PP inferiori a 1 mmHg.

Il presente lavoro di tesi è stato svolto sui dati inerenti i ratti appartenenti ai seguenti gruppi:

- NoXyl Glucose, composto da 4 animali, nel seguito indicato come Gruppo A.
- NoXyl Saline, costituito da 7 ratti, nel prosieguo indicato come Gruppo B.
- Xyl Glucose, costituito da 6 ratti, nel seguito indicato come Gruppo C.
- Xyl Gly Glucose, composto da 7 ratti, nel seguito denominato Gruppo D.

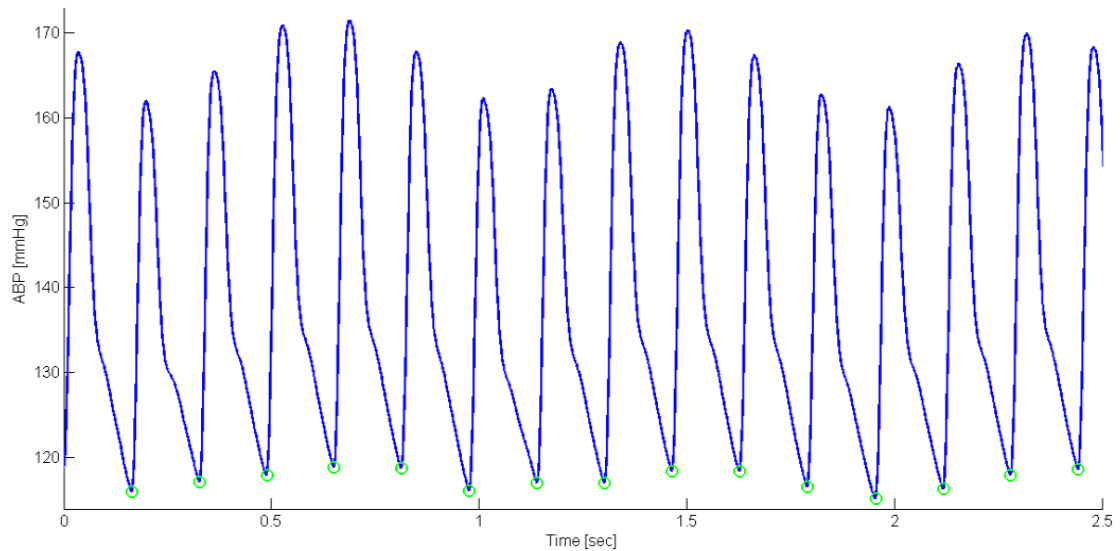
Tale scelta è stata motivata dal fatto che i segnali di pressione arteriosa sono stati registrati con una frequenza di campionamento di 1000 Hz solo in tali gruppi sperimentali, mentre in tutti gli altri la frequenza di acquisizione del segnale era pari solamente a 100 Hz. Come descritto nel lavoro di Bhatia V. *et al.* (2010), frequenze di campionamento inferiori a 1000 Hz non permettono un'analisi corretta della variabilità della pressione arteriosa, data l'impossibilità di identificare in modo robusto le serie temporali di pressione a causa della scarsa fedeltà dell'onda misurata. Di conseguenza, secondo questo criterio basato su dati riportati in letteratura, si è proceduto a scartare i gruppi sperimentali le cui registrazioni non rispettassero i suddetti vincoli sulla frequenza di campionamento.

I gruppi sperimentali sono stati studiati basandosi sulle ipotesi a priori riguardanti gli effetti attesi delle sostanze da somministrare ai ratti durante l'esperimento, secondo il protocollo e le specifiche precedentemente illustrati. La Xilazina è un farmaco sedativo ad assorbimento rapido, appartenente alla classe delle sostanze agoniste dei recettori  $\alpha_2$ -adrenergici. I suoi effetti comprendono bradicardia, ipotensione e depressione della funzione cardiaca. L'azione della Xilazina è pertanto nel complesso di tipo simpatolitico. Il Glicopirrolato è un farmaco muscarinico anticolinergico: blocca i recettori muscarinici, inibendo la trasmissione colinergica. La sua azione è pertanto di tipo parasimpatolitico, simile a quella dell'atropina. Il glucosio ha un'azione di stimolazione parasimpatica, in quanto l'aumento della sua concentrazione ematica produce una stimolazione vagale del pancreas al fine di sintetizzare e rilasciare insulina. Non sono tuttavia presenti in letteratura risultati conclusivi sul fatto che un'attivazione parasimpatica in risposta ad un aumento di glicemia si rifletta anche in una stimolazione marcatamente vagale sull'attività cardiaca e del sistema cardiovascolare (Ferrario et al, 2011; Kanaley et al, 2007).

## 2.2 Acquisizione del segnale e preprocessing

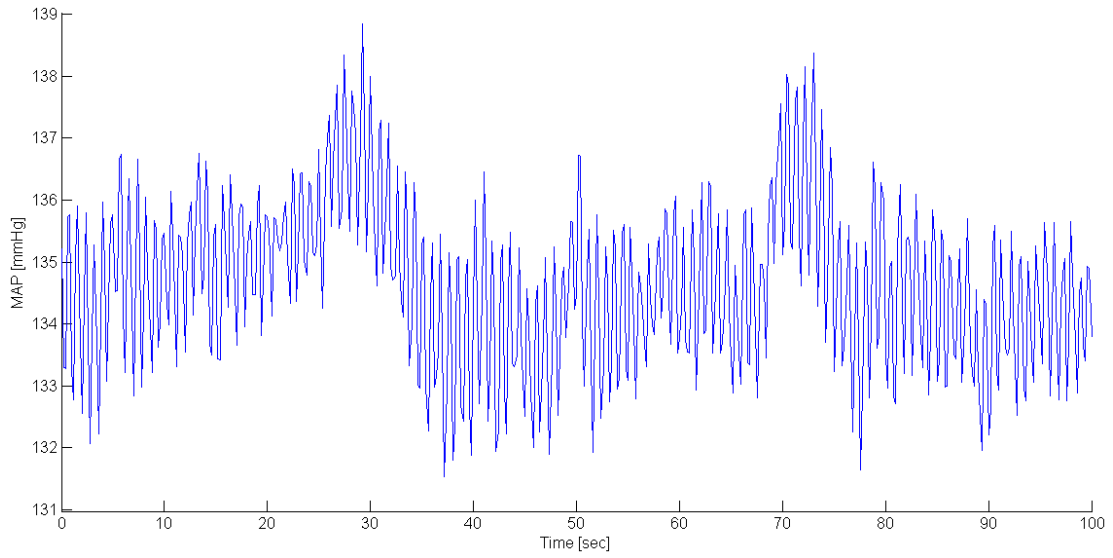
I segnali di pressione arteriosa (*arterial blood pressure*, ABP) sono stati acquisiti tramite catetere inserito nell'arteria femorale destra, campionati alla frequenza di 1000 Hz, e salvati in formato di testo (.txt). Dopo aver importato i dati in ambiente MATLAB<sup>®</sup>, sono stati individuati qualitativamente spezzoni di segnale di scarsa qualità e pattern ricorrenti in tutti i ratti. Sono stati associati tali pattern alle note fornite e quindi alle manovre descritte nel protocollo.

Sono stati quindi individuati gli onset dell'onda pressoria mediante l'applicazione di un algoritmo basato sull'utilizzo della Sum Slope Function (SSF) (Zong et al., 2003). Tale algoritmo converte innanzitutto la forma d'onda di pressione arteriosa, filtrata per eliminare rumore ad alta frequenza, in una SSF, al fine di enfatizzare la pendenza positiva dell'onda stessa eliminandone le altre caratteristiche morfologiche. Si ottiene così una funzione i cui onset, pur coincidendo con quelli della ABP, sono più semplici da identificare in modo automatizzato. L'identificazione è realizzata mediante l'utilizzo di una soglia adattativa per la selezione dei battiti sulla serie SSF ottenuta e di una successiva ricerca locale nell'intorno dei punti fiduciali così identificati, che permette di stabilire l'istante esatto di onset. La soglia per l'identificazione dei picchi viene inizializzata ad un valore pari al 60% di tre volte la media dei primi 8 secondi di segnale, per essere poi adattata ad ogni detezione; per ogni punto della SSF che supera il valore di soglia, viene compiuta una ricerca del minimo e del massimo valore all'interno di una finestra di 160 ms, rispettivamente precedente e successiva al punto di superamento della soglia. La differenza tra i due valori viene utilizzata come criterio per accettare o scartare i battiti identificati; nel caso in cui il battito sia considerato affidabile, l'algoritmo ricerca a ritroso, a partire dal punto di superamento della soglia, l'onset, definito come il punto in cui la funzione SSF supera il valore pari al 1% del massimo successivo. A questo punto, gli onset calcolati vengono adattati all'onda di pressione arteriosa, compensando il ritardo di fase del filtro passa-basso utilizzato inizialmente. Il risultato dell'applicazione dell'algoritmo di detezione dell'onset di pressione ad un breve segmento di segnale è illustrato in figura 2.1.

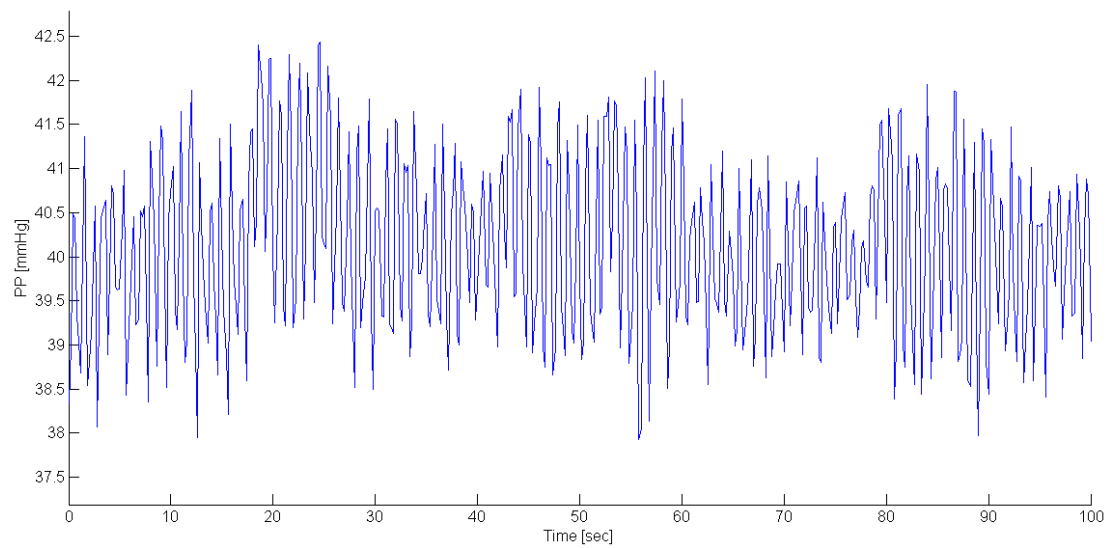


**Figura 2.1** Segnale di pressione arteriosa (mmHg) di un ratto; in evidenza gli onset dell'onda di pressione che hanno consentito di estrarre le serie battito-battito.

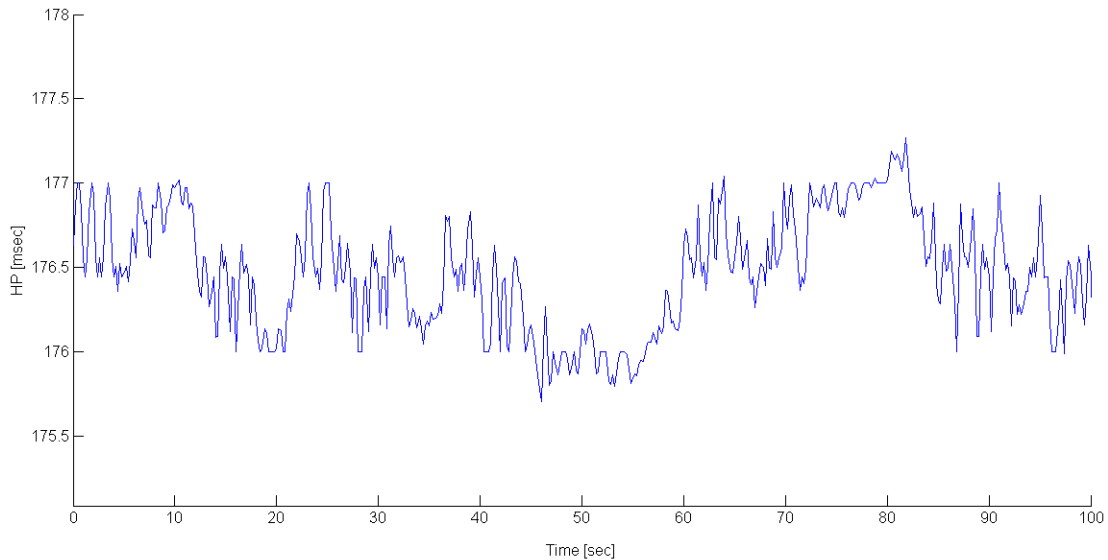
La deteazione degli onset ha consentito poi di ricavare gli istanti di tempo corrispondenti all' occorrenza di pressione sistolica e pressione diastolica e quindi di estrarre dal segnale di pressione arteriosa le serie battito-battito di pressione media (MAP), sistolica (SAP), diastolica (DAP) e pulsatoria (PP), calcolata come differenza fra pressione di fine diastole e pressione sistolica nel ciclo successivo. Non essendo disponibile il segnale ECG, è stata utilizzata la stima del ciclo cardiaco (heart period, HP), che è rappresentata dall'intervallo di tempo tra due onset successivi, cioè la cosiddetta distanza foot-to-foot del segnale ABP. Tale distanza è considerata patragonabile al più comune intervallo RR, cioè la distanza tra due picchi R successivi individuati sul segnale ECG. L'analisi si è poi concentrata, per quanto riguarda la pressione, solamente sulle serie di MAP e PP, in quanto utilizzate già nel lavoro di Penn e colleghi (2011) per monitorare le condizioni degli animali.



**Figura 2.2** Esempio di serie MAP (mmHg) estratta dal segnale ABP.



**Figura 2.3** Esempio di serie PP (mmHg) estratta dal segnale ABP.



**Figura 2.4** Esempio di serie HP (msec) estratta dal segnale ABP.

Il preprocessing delle serie battito-battito è stato principalmente volto all'eliminazione di eventuali battiti ectopici od altre anomalie tramite l'utilizzo di un filtro adattativo basato sull'analisi punto per punto del valore della serie considerata e della differenza di valore tra due successivi battiti (Wessel et al, 2000). Le serie sono state inoltre ricampionate alla frequenza di 5 Hz al fine di ottenere campioni equispaziati nel tempo, tenendo conto della banda dello spettro di variabilità cardiovascolare nel ratto (Japundzic et al., 1990; Cerutti et al., 1991).

## ***2.3 Analisi nel dominio del tempo***

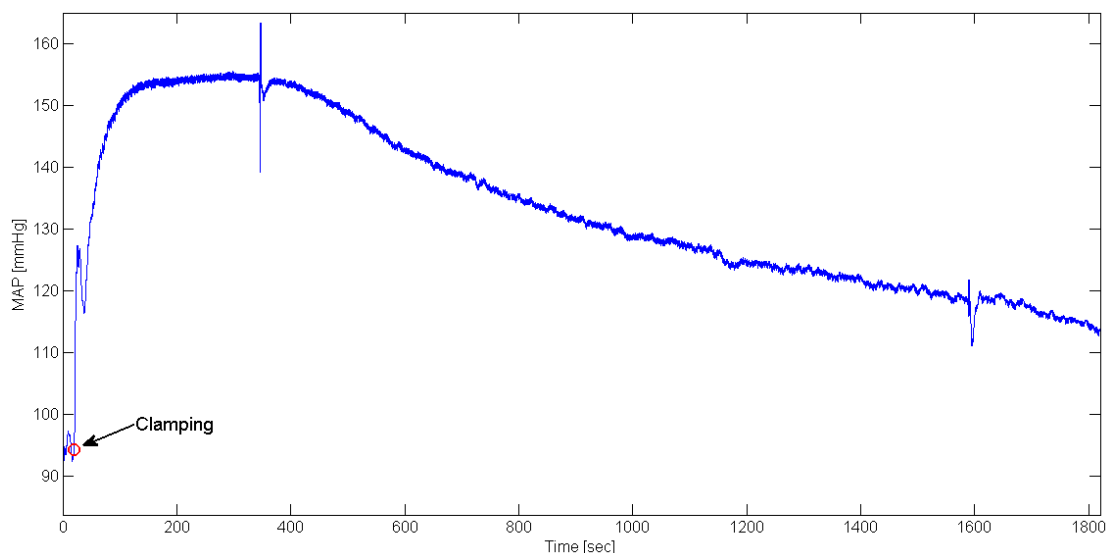
### ***2.3.1 Andamento dei valori medi***

L'analisi nel dominio del tempo è stata svolta su due finestre temporali distinte. Il primo periodo considerato è da alcuni minuti prima fino ai 30 minuti successivi all'occlusione arteriosa. Tale periodo è associato a una risposta transitoria alla manovra, che si è dimostrato empiricamente non essere influenzata ancora dai processi patologici enzimatici innescati dall'ischemia (Chang et al., 2012a,b).

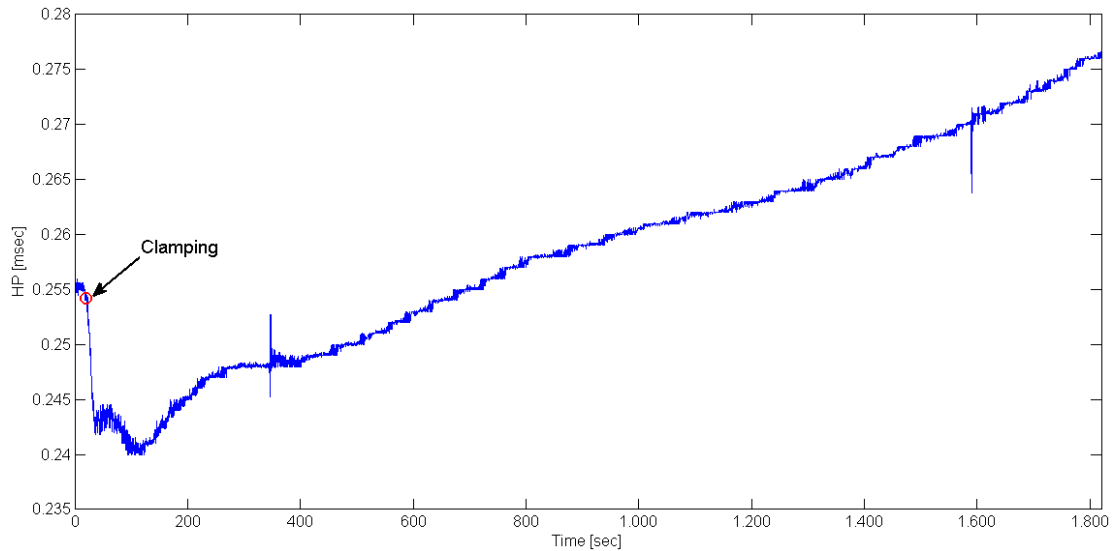
In questa finestra temporale sono state analizzate le serie MAP, PP e HP filtrate e ricampionate. Si è calcolato un valore di riferimento pre clampaggio per ciascuna di queste, attraverso la selezione manuale di un segmento stazionario immediatamente precedente l'occlusione per ogni serie di ogni ratto. I valori di

riferimento sono stati ottenuti come valori medi di tali segmenti, e verranno nel prosieguo indicati con la sigla *pre clamp*.

Come mostrato in figura 2.5, la risposta al clampaggio consiste in un marcato e rapido innalzamento della pressione media, della pressione pulsatoria e, in modo meno evidente, della frequenza cardiaca. Dopo il raggiungimento del valore di picco, i valori di tutte le serie decrescono, raggiungendo un minimo e tendendo poi a stabilizzarsi a livelli simili a quelli pre clampaggio. Si è pertanto ritenuto opportuno quantificare tale risposta sia in termini di valori assoluti, sia in termini di variazioni. Per fare ciò, si è scelto di considerare come valori di riferimento il valore pre clampaggio calcolato come descritto in precedenza, il valore massimo raggiunto nel post clampaggio, il valore minimo successivo al picco ed il valore al termine dei 30 minuti considerati, nel seguito indicato come *Finale*. Per quanto riguarda il segnale HP, sono stati invece considerati il valore pre clampaggio, il minimo successivo, cioè il massimo incremento di frequenza cardiaca, il massimo e il valore finale, essendo l'andamento dell'HP speculare rispetto a quello delle pressioni come mostrato in figura 2.6. Nel prosieguo del lavoro, saranno riportati i risultati riguardanti questa analisi condotta su MAP, PP e HP..



**Figura 2.5** Aumento di MAP in risposta all'occlusione arteriosa.



**Figura 2.6** Crollo dei valori di HP e conseguente incremento della frequenza cardiaca (inverso di HP) in risposta all'occlusione arteriosa.

Come accennato, oltre ai valori assoluti sono state considerate le variazioni assolute e percentuali: in particolare, sono state prese in considerazione (i) la differenza tra il valore massimo ed il valore pre clampaggio, e (ii) le differenze tra i valori minimo e finale ed il valore massimo. È stato inoltre ritenuto importante valutare in termini temporali la risposta al clampaggio; sono stati pertanto calcolati e valutati gli intervalli di tempo intercorrenti tra (i) il clampaggio e l'occorrenza del valore massimo e tra (ii) l'istante corrispondente al valore massimo e l'occorrenza del valore minimo.

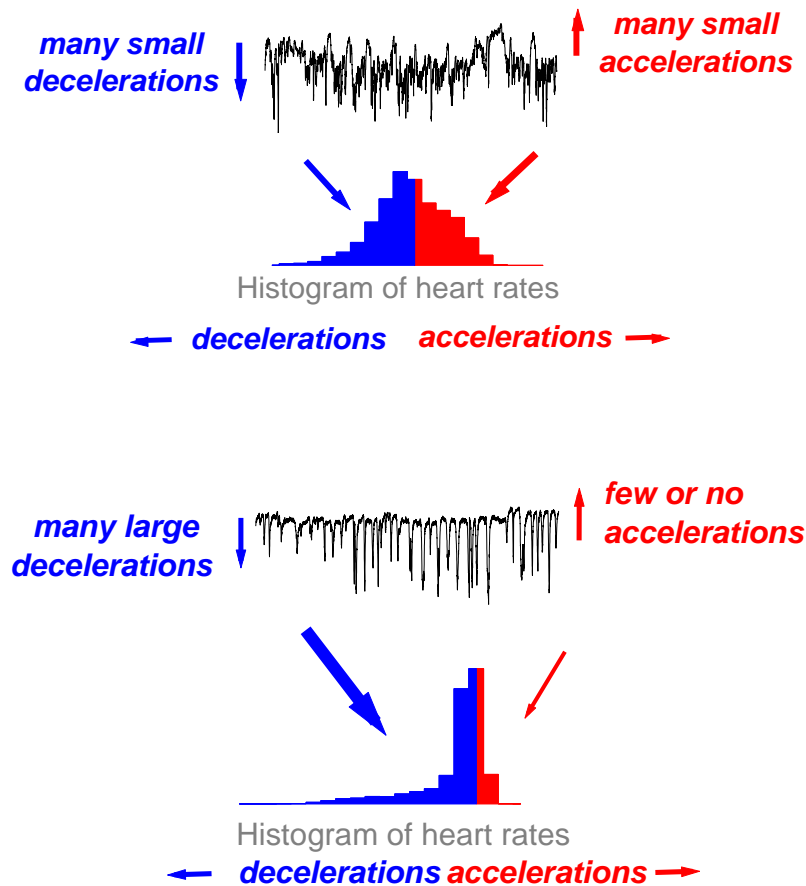
Le analisi sono state svolte considerando i ratti suddivisi nei gruppi A, B, C, D, per valutare le eventuali differenze di reazione al clampaggio indotte dal diverso trattamento farmacologico.

La seconda finestra temporale considerata è invece compresa tra i 30 minuti dopo il clampaggio ed il Fatal Pressure Drop (FPD), il cui istante iniziale è indicato nelle note operatorie ed è stato definito secondo il criterio per cui la MAP decresce fino a raggiungere valori inferiori ai 40mmHg. Tale finestra temporale ha una durata differente per ogni ratto, in dipendenza del tempo di sopravvivenza dell'animale in stato di shock. In questa fase, che porta alla morte od al sacrificio dell'animale al termine delle 4 ore di osservazione, si è ritenuto interessante concentrare l'attenzione non solamente sul diverso comportamento dei ratti a seconda del gruppo di

trattamento di appartenenza, ma piuttosto sui diversi meccanismi che portano a una decrescita di pressione veloce (FFPD) piuttosto che lenta (SFPD). Come per l'analisi del post clampaggio precedentemente descritta, anche in questo caso sono state prese in considerazione le serie MAP, PP e HP filtrate e ricampionate. Per questa seconda finestra temporale si è calcolato per ciascuna serie il valor medio dei primi 6 minuti, indicato con il termine *Valore 30' dopo il clampaggio*. Analogamente, come valore *pre FPD* è stato considerato il valore medio delle serie calcolato sui 6 minuti precedenti la nota fatal pressure drop. Oltre ai valori assoluti è stata presa in considerazione la variazione dei valori delle serie.

### **2.3.2 Heart Rate Characteristics**

L'indice definito col termine *Heart Rate Characteristics* (HRC) è stato proposto e studiato nel contesto dello studio della *Heart Rate Variability* (HRV) neonatale (Moorman et al., 2006). Lo scopo di tale tecnica è quello di individuare e descrivere in modo quantitativo alterazioni dell'HRV in neonati prematuri all'approssimarsi di un evento patologico come la sepsi. In particolare, registrazioni fisiologiche sono caratterizzate da numerose accelerazioni e decelerazioni di modesta entità, mentre in situazioni patologiche si può presentare una ridotta variabilità complessiva accompagnata da brusche decelerazioni. Nel primo caso, l'istogramma che riporta le variazioni del segnale rispetto alla mediana si presenta pressochè simmetrico, mentre nella seconda circostanza gli sbilanciamenti del segnale al di sotto della mediana si riflettono in un istogramma asimmetrico (figura 2.7).



**Figura 2.7:** Serie temporali del segnale di frequenza cardiaca e istogrammi relativi in due tracciati di neonati differenti. Nel riquadro superiore un tracciato normale, nel riquadro inferiore un tracciato alterato da condizioni patologiche (immagine riadattata da Moorman et al., 2006).

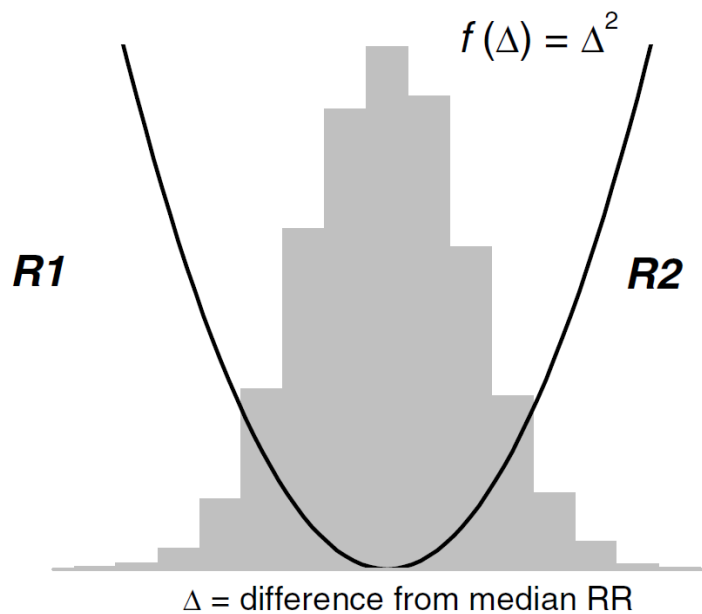
L'indice quantitativo sviluppato a partire dall'analisi dell'istogramma è la *Sample Asymmetry*. Il primo passo dell'algoritmo è la costruzione della funzione quadratica che verrà usata per pesare la deviazione di ciascun intervallo RR dalla mediana, calcolata a partire da un insieme di  $n$  intervalli RR,  $x_1, x_2, \dots, x_n$ . La figura 2.8 rappresenta la funzione quadratica  $r(x_i) = (x_i - m)^2$ , dove  $m$  rappresenta il valore della mediana calcolata sui dati. I due rami della parabola quantificano le deviazioni in termini di aumento (indice R2) e decrescita (indice R1) dell'intervallo RR rispetto alla mediana. Si calcolano dunque le funzioni  $r_1(x_i) = r(x_i)$  per i valori di  $x_i < m$  e 0

altrove, e  $r_2(x_i) = r(x_i)$  per i valori di  $x_i > m$  e 0 altrove. Gli indici  $R1$  e  $R2$  sono calcolati quindi nel seguente modo:

$$R1 = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n r_1(x_i)^2 \quad R2 = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n r_2(x_i)^2 \quad (2.1)$$

$R1$  e  $R2$  sono quantità non negative, che aumentano all'aumentare del numero e/o dell'ampiezza delle deviazioni dalla mediana. Per quanto riguarda le serie RR, intuitivamente, una distribuzione di intervalli intrabattito che è sbilanciata verso la parte destra dell'istogramma per la presenza di intervalli RR lunghi dovuti a decelerazioni avrà un valore di  $R2$  maggiore di  $R1$ .

La *Sample Asymmetry* è definita semplicemente come il rapporto tra decelerazioni ed accelerazioni, ovvero  $R1/R2$ .



**Figura 2.8** Istogramma della distribuzione dei valori intorno alla mediana e, in nero, valore della funzione  $r(x_i) = (x_i - m)^2$ .

La tecnica appena illustrata può essere generalizzata ed ha trovato applicazione nel presente lavoro alle serie MAP, PP e HP; in questo caso non si potrà chiaramente più parlare di accelerazioni e decelerazioni, bensì di episodi ipertensivi o ipotensivi, cioè di sbilanciamenti del segnale al di sopra o al di sotto della mediana.

L'algoritmo HRC è stato applicato, nella finestra temporale compresa tra i 30 minuti dopo la nota di occlusione arteriosa ed il *Fatal Pressure Drop*, alle serie MAP e HP filtrate e ricampionate. Il calcolo della *Sample Asymmetry* è stato svolto con due modalità: (i) sull'intera finestra temporale, per valutare il comportamento dei segnali nel loro complesso, e (ii) su finestra scorrevole della durata di 3 minuti, con sovrapposizione delle finestre del 50%, per verificare la possibilità di utilizzare questo semplice indice per l'individuazione automatica di eventi ipotensivi improvvisi e per caratterizzare i fenomeni di *drop/recovery* presenti in alcuni ratti del gruppo FFPD prima del crollo ipotensivo fatale.

Nel primo caso, alle serie è stato sottratto un trend lineare, che avrebbe potuto inficiare la valutazione degli sbilanciamenti rispetto alla mediana. Il valore di *Sample Asymmetry* è quindi stato calcolato per ogni serie di ogni ratto, assegnato poi al gruppo SFPD o FFPD.

Nel secondo caso, il valore di *Sample Asymmetry* è stato calcolato su finestra scorrevole della durata di 3 minuti, cioè su un intervallo temporale di durata maggiore del fenomeno di *drop/recovery*. Per le serie di pressione, come parametri di interesse sono stati scelti il massimo dei valori del parametro R1/R2 così ottenuti, e la percentuale di valori maggiori di 1, ovvero la proporzione di segmenti di 3 minuti in cui sono prevalenti gli episodi ipotensivi. Per quanto riguarda il segnale di HP, sono stati presi in considerazione il valore minimo di *Sample Asymmetry* e la percentuale di valori inferiori all'unità, che rappresentano episodi di aumento del ritmo cardiaco.

Come per la *Sample Asymmetry* calcolata sull'intera finestra temporale, anche in questo caso i ratti sono stati classificati per l'analisi statistica nei gruppi FFPD e SFPD.

## **2.4 Analisi del baroriflesso**

Il baroriflesso svolge un ruolo chiave nel controllo autonomico della pressione arteriosa; la quantificazione della sua attività è stata pertanto considerata di primaria importanza nel contesto del presente lavoro. L'entità dell'attività del baroriflesso arterioso è espressa dalla sensibilità (*Baroreflex Sensitivity*, BRS),

ovvero dalla variazione del periodo cardiaco in risposta ad un cambiamento unitario della pressione arteriosa (Swenne, 2013), ed è pertanto quantificata in ms/mmHg.

Le tecniche per la stima indiretta della BRS presenti in letteratura sono molteplici, e si distinguono in due grandi categorie: (i) algoritmi nel dominio del tempo e (ii) algoritmi nel dominio delle frequenze. I primi si basano in generale sulla ricerca di serie di battiti in cui la pressione ed il periodo cardiaco presentino un andamento monotono crescente o decrescente; una volta individuata una sequenza idonea, l'algoritmo calcola la pendenza della caratteristica periodo cardiaco-pressione arteriosa. Tecniche di questa natura, tuttavia, hanno lo svantaggio di sottostimare la componente simpatica del baroriflesso. L'applicazione dell'algoritmo ad un numero di battiti ridotto costituisce infatti una sorta di filtraggio passa-alto, e può pertanto causare la perdita di informazione nella banda simpatica (*Low Frequency*, LF).

Gli algoritmi nel dominio delle frequenze sono invece basati sul calcolo della funzione di trasferimento tra periodo cardiaco e pressione arteriosa a partire dagli spettri dei due segnali.

Questa tecnica consente di calcolare la BRS su singole bande di frequenza di interesse, separando così i contributi del sistema simpatico e del sistema parasimpatico alla sensibilità complessiva. Si è pertanto deciso di utilizzare questo approccio per l'analisi del baroriflesso nella finestra temporale compresa tra 30 minuti dopo la nota di occlusione arteriosa ed il *Fatal Pressure Drop*.

In tale finestra si sono prese in considerazione le serie del periodo cardiaco (HP) e della pressione arteriosa sistolica (SAP), entrambe ricampionate e filtrate come già illustrato in precedenza. L'algoritmo per la stima della BRS è stato quindi applicato su una finestra scorrevole di 3 minuti, con overlapping del 50%; ad entrambe le serie è stato sottratto su ogni singola finestra un trend, tramite l'utilizzo di una interpolante di ordine 10. L'algoritmo utilizzato calcola la coerenza quadratica tra SAP e HP, e stima la funzione di trasferimento tra i due segnali. In ogni banda di frequenza di interesse (LF: 0.25-0.75 Hz; HF: 0.76-2.5 Hz) i valori di baroriflesso sono stimati mediando i valori del modulo della funzione di trasferimento alle frequenze di ciascuna banda cui è associato un valore di coerenza superiore a 0.5.

In questo lavoro, la BRS è stata calcolata anche tramite l'utilizzo di un modello bivariato (Yoshino et al., 2005). Il modello bivariato permette di considerare sia la relazione causale di feedback che di feedforward tra le serie RR e SAP. Il meccanismo di feedback  $SAP \rightarrow HP$  rappresenta il baroriflesso cardiaco mentre il meccanismo feedforward  $HP \rightarrow SAP$  rappresenta l'influenza diretta della frequenza cardiaca sulla pressione, che non è mediata dal sistema autonomo ma da un meccanismo di perturbazione che si basa sulla legge di Starling ed il *diastolic runoff*.

Tale tecnica si basa sulla stima di un modello autoregressivo bivariato di ordine 12, descritto dall'equazione vettoriale:

$$\mathbf{Y}[n] = \sum_{k=1}^p \mathbf{A}[k] \mathbf{Y}[n-k] + \mathbf{W}[n] \quad (2.2)$$

Nel caso particolare dell'applicazione di tale modello all'interazione tra SAP e HP, le matrici risultano definite come:

$$\mathbf{A}[k] = \begin{bmatrix} a_{11}[k] & a_{12}[k] \\ a_{21}[k] & a_{22}[k] \end{bmatrix} \quad \mathbf{Y}[k] = \begin{bmatrix} HP[n] \\ SAP[n] \end{bmatrix} \quad \mathbf{W}[n] = \begin{bmatrix} w_{HP}[n] \\ w_{SAP}[n] \end{bmatrix} \quad (2.3)$$

dove i coefficienti della matrice  $\mathbf{A}[k]$  vengono calcolati risolvendo le equazioni di Yule-Walker. Come detto, l'ordine  $p$  del modello è stato fissato a 12. I coefficienti vengono poi utilizzati per il calcolo del guadagno delle funzioni di trasferimento di feedback ( $SAP \rightarrow HP$ ) e feedforward ( $HP \rightarrow SAP$ ):

$$G_{SAP \rightarrow HP}(f) = \frac{A_{12}(f)}{1 - A_{11}(f)} \quad G_{HP \rightarrow SAP}(f) = \frac{A_{21}(f)}{1 - A_{22}(f)} \quad (2.4)$$

dove i coefficienti  $A_{ij}(f)$  sono calcolati nel seguente modo:

$$A_{ij}(f) = \sum_{k=1}^p a_{ij}[k] e^{-j2\pi f k} \quad (2.5)$$

Per ogni banda (LF, HF) si calcolano il valore massimo della funzione coerenza tra HP e SAP ed il guadagno delle due funzioni di trasferimento alle frequenze corrispondenti. Il guadagno della funzione di trasferimento di feedback

(SAP → HP) è utilizzato come misura della sensitività del baroriflesso (Dorantes-Mendez et al., 2013; Wyller et al., 2011).

Il modello bivariato permette pertanto di stimare non solamente l'effetto di feedback esercitato dalla pressione arteriosa sul periodo cardiaco tramite il baroriflesso, ma anche l'effetto meccanico diretto della componente cardiaca sul segnale di pressione. Come nel caso della tecnica basata sul calcolo della funzione di trasferimento, l'algoritmo è stato applicato alla finestra temporale compresa tra il trentesimo minuto successivo all'occlusione arteriosa ed il FPD ('finestraFPD'). Anche in questo caso è stata utilizzata una finestra scorrevole della durata di 3 minuti, con overlapping del 50%, e le serie sono state private del trend con l'utilizzo di un'interpolante di ordine 10.

Entrambe le tecniche sono state inoltre applicate ad una singola finestra temporale della durata di 3 minuti all'inizio dell'intero protocollo, cioè prima dell'infusione di farmaci e dell'occlusione, per ottenere un valore di riferimento, nel prosieguo indicato come *baseline*. Per valutare l'evoluzione del baroriflesso nell'avvicinamento al FPD, sono stati presi in considerazione i valori iniziale e finale di BRS della 'finestraFPD' sopra descritta. Come valore iniziale, in seguito indicato come 'Valore 30' dopo il clampaggio', è stata utilizzata la media dei valori dei primi 6 minuti, mentre come valore finale, nel seguito indicato come 'Valore Pre-FPD', è stata considerata la media degli ultimi 6 minuti precedenti il FPD.

Nel valutare il baroriflesso arterioso, è stato ritenuto utile considerare sia la classificazione dei ratti in base al gruppo di trattamento farmacologico, sia la suddivisione nei gruppi FFPD e SFPD, per valutare il ruolo del baroriflesso stesso nel determinare la morte improvvisa dell'animale piuttosto che un lento calo dei parametri vitali.

### **Linear Mixed Effect model (LME).**

Il trend del baroriflesso è stato analizzato anche utilizzando il metodo del *Linear Mixed Effect model* (LME). In statistica è considerato un *effetto* tutto ciò che influenza il valore di una variabile in uscita per un certo insieme di variabili indipendenti o predittori. Gli effetti vengono inseriti nei parametri del modello. I cosiddetti effetti fissi (*Fixed Effects*) rappresentano i parametri del modello associati

alla popolazione, che si suppongono essere i medesimi ad ogni misurazione. La stima dei *fixed effects* è l'obiettivo dei tradizionali modelli autoregressivi. Gli effetti *random* rappresentano invece la variabilità soggettiva all'interno di una popolazione, e sono pertanto inseriti all'interno del modello sottoforma di rumore additivo con distribuzione e covarianza specificate.

I *mixed-effects model* tengono in considerazione sia gli effetti fissi che casuali, e rappresentano perciò un compromesso tra l'ignorare la suddivisione della popolazione in gruppi ed il creare un modello specifico per ciascuno di essi.

Supponiamo di avere  $m$  gruppi distinti  $i=1, \dots, m$ ; per tenere in considerazione nel modello l'informazione del gruppo si può scrivere la risposta  $j$  nel gruppo  $i$  nel seguente modo:

$$y_{ij} = f(\Phi, x_{ij}) + \varepsilon_{ij} \quad (2.6)$$

dove  $y_{ij}$  è la risposta,  $x_{ij}$  è il vettore dei predittori,  $\Phi$  è il vettore dei parametri del modello e  $\varepsilon_{ij}$  è l'errore. Spesso  $x_{ij}$  è semplicemente il tempo di osservazione  $t_{ij}$ . Gli errori sono comunemente considerati indipendenti e identicamente e normalmente distribuiti con varianza costante. La stima dei parametri in  $\Phi$  descrive la popolazione assumendo che quei parametri siano gli stessi per tutti i gruppi. Se tuttavia i parametri variano per i gruppi, il modello diventa:

$$y_{ij} = f(\Phi_i, x_{ij}) + \varepsilon_{ij} \quad (2.7)$$

Nei *mixed-effects model*,  $\Phi_i$  può essere una combinazione di *fixed* e *random effects*:

$$\Phi_i = \beta + b_i \quad (2.8)$$

dove  $\beta$  rappresenta i *fixed effects* e  $b_i$  i *random effects*, la cui stima permette la descrizione di specifici gruppi.

In questo lavoro, l'effetto fisso sul baroriflesso è legato all'appartenenza dei ratti ad uno dei due macro-gruppi distinti secondo l'outcome dell'esperimento, ossia FFPD o SFPD, mentre il contributo random al segnale è legato alla variabilità soggettiva del singolo animale.

In questo lavoro è stato scelto un modello lineare, definito come:

$$y_{ij} = (\varphi_1 + v\varphi_2)t_{ij} + \varphi_3 \quad (2.9)$$

dove  $y_{ij}$  rappresenta il valore della variabile d'uscita, in questo caso la sensitività del baroriflesso, del soggetto  $i$ -esimo all'istante di tempo  $j$ -esimo;  $v$  contiene predittori gruppo-dipendenti;  $\bar{\varphi} = [\varphi_1 \ \varphi_2 \ \varphi_3]$  è il vettore contenente i parametri del modello, costituiti dalla somma di effetti fissi ed effetti random. Il modello può pertanto essere riscritto per mettere in evidenza i due contributi, come:

$$y_{ij} = ((\beta_1 + b_{1i}) + v(\beta_2 + b_{2i}))t_{ij} + (\beta_3 + b_{3i}) \quad (2.10)$$

dove  $\beta$  rappresenta il contributo degli effetti fissi, mentre le variabili  $b$  costituiscono la componente random dei coefficienti del modello.

L'algoritmo restituisce, a partire da questo modello, una stima degli effetti fissi e degli effetti casuali; tali stime vengono poi utilizzate per interpolare i dati, tramite un modello dei valori di sensitività di ogni singolo ratto, al fine di ottenere una visualizzazione dell'effetto random legato alla variabilità individuale (figure 3.23 e 3.24).

## 2.5 Analisi statistica

I dati, dove non specificamente indicato, sono stati espressi come (media  $\pm$  deviazione standard). Il confronto tra i gruppi di trattamento A, B, C e D è stato svolto mediante test ANOVA ad una via per ciascun indice, e sono stati considerati significativi  $p$ -values  $<0.05$ . Per ciascun gruppo sperimentale A, B, C e D, il confronto tra le diverse epoche è stato eseguito mediante test ANOVA a una via per misure ripetute e per ciascun indice. I post-hoc comparisons sono stati effettuati con il metodo di Tukey-Kramer per evidenziare le differenze tra coppie di gruppi.

Nel caso della classificazione dei ratti nei due gruppi SFPD e FFPD, i confronti tra questi sono stati eseguiti mediante un t-test disaccoppiato a due code. Per il confronto del valore di un indice nelle due sole epoche, cioè *30' dopo il clampaggio e preFPD*, è stato utilizzato un t-test accoppiato a due code.

Nei casi in cui i dati sono stati espressi come mediana (25° percentile , 75° percentile), i confronti tra i gruppi di trattamento A, B, C e D sono stati svolti mediante l'analisi della varianza a una via di Kruskal-Wallis, mentre nel caso della classificazione nei gruppi FFPD e SFPD è stato utilizzato il Wilcoxon Rank Sum test. All'interno di ciascun gruppo, il confronto tra differenti epoche è stato eseguito mediante l'applicazione del Wilcoxon Signed Rank test.

## Capitolo 3

# Risultati

### 3.1 Caratteristiche della popolazione

La popolazione studiata è costituita complessivamente da 24 ratti Wistar maschi, suddivisi in quattro differenti gruppi di trattamento come mostrato in tabella 3.1.

**Tabella 3.1** Numerosità dei gruppi sperimentali ed incidenza di *Fast Fatal Pressure Drop* (FFPD) in ciascun gruppo.

Gruppo Sperimentale	Numero Ratti	FFPD	SFPD
<b>A: NoXyl Glucose</b>	4	1	3
<b>B: NoXyl Saline</b>	7	3	4
<b>C: Xyl Glucose</b>	6	2	4
<b>D: Xyl Gly Glucose</b>	7	0	7

### 3.2 Andamento dei valori medi delle serie

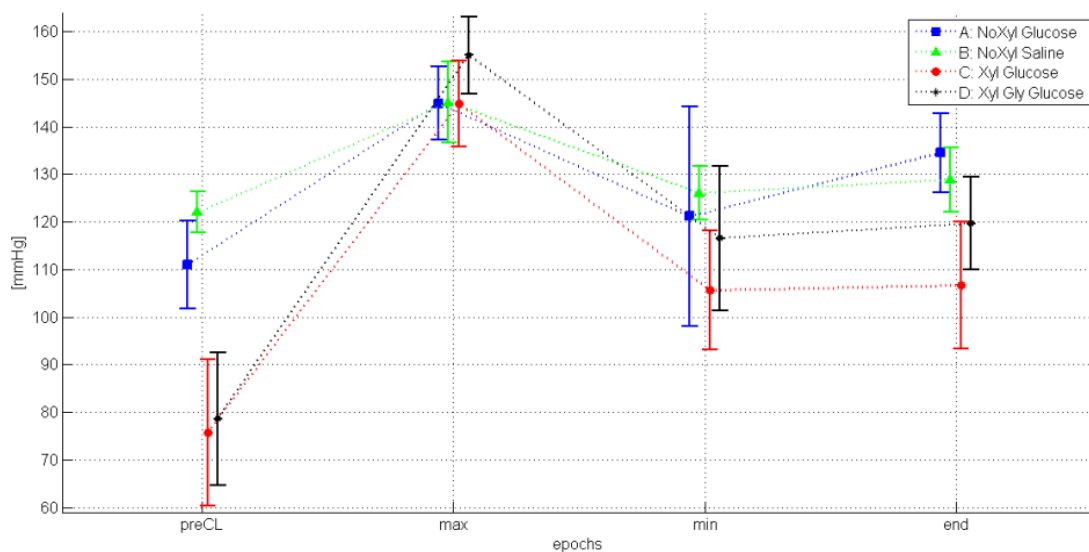
Come già illustrato nel precedente capitolo, l'analisi si è inizialmente concentrata sull'andamento delle serie battito-battito estratte dal segnale pressorio. In particolare, sono state considerate due distinte finestre temporali: (i) una prima finestra di analisi, della durata di circa 30 minuti, selezionata a partire dall'istante corrispondente alla nota di occlusione delle arterie, ed (ii) una seconda finestra, di ampiezza variabile, compresa tra il trentesimo minuto successivo all'occlusione arteriosa ed il *fatal drop*.

Nel prosieguo del capitolo vengono riportati i risultati ottenuti dall'analisi dei valori assoluti e delle variazioni delle serie in esame. Tutti i risultati riportati sono espressi, salvo dove diversamente indicato, nel formato  $\text{media} \pm \text{deviazione standard}$ . Vengono riportati per primi i risultati riguardanti la prima finestra temporale dopo il clampaggio, che offrono una descrizione della risposta transitoria all'occlusione arteriosa.

Come mostrato in figura 3.1 e tabella 3.2, per tutti i gruppi sperimentali (A, B, C, D) i valori di pressione media subiscono un significativo aumento dopo la manovra di occlusione ed un significativo calo nei minuti successivi. Infatti, sia i valori minimi che il valore registrato 30 minuti dopo la SAO sono significativamente inferiori al valore massimo riportato.

Per quanto riguarda i confronti tra i singoli gruppi, i valori di pressione media registrati prima dell'occlusione sono significativamente inferiori nei due gruppi trattati con Xilazina, C e D, come previsto data la somministrazione di un farmaco agonista dei recettori adrenergici  $\alpha_2$ .

I valori di MAP massima e MAP minima non risultano significativamente diversi tra i quattro gruppi sperimentali. La manovra di occlusione arteriosa porta infatti i ratti a raggiungere valori massimi di pressione media simili, indipendentemente dalle manovre farmacologiche precedenti. Si noti che i gruppi C e D mostrano un aumento più marcato della pressione rispetto ai gruppi A e B, come verrà messo in evidenza successivamente nell'analisi dei trend di variazione della pressione.



**Figura 3.1** Andamento dei valori medi di MAP (mmHg) nei 30 minuti successivi all’occlusione arteriosa nei diversi gruppi di trattamento farmacologico.

**Tabella 3.2** Valori medi di MAP (mmHg) per ciascun gruppo e per ciascuna epoca considerata (prima del clampaggio, valore massimo successivo al clampaggio, valore minimo e valore finale nei 30 minuti successivi al clampaggio).

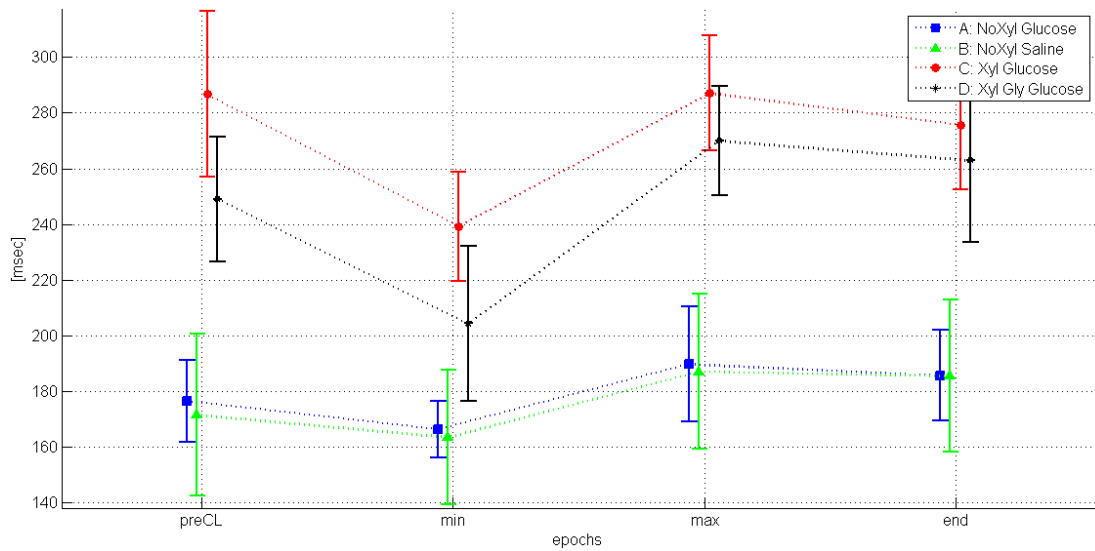
	Pre Clamp.*	Valore Massimo	Valore Minimo	Valore Finale*	ANOVA per misure ripetute
<b>A</b>	111 ± 9	145 ± 8 <sup>a</sup>	121 ± 23 <sup>b</sup>	134 ± 8 <sup>a</sup>	<0,01
<b>B</b>	122 ± 4	145 ± 9 <sup>a</sup>	126 ± 6 <sup>b</sup>	129 ± 7 <sup>b</sup>	<0,01
<b>C</b>	76 ± 15 <sup>#, §</sup>	145 ± 9 <sup>a</sup>	106 ± 12 <sup>a, b</sup>	107 ± 13 <sup>#, §, a, b</sup>	<0,01
<b>D</b>	79 ± 14 <sup>#, §</sup>	155 ± 8 <sup>a</sup>	117 ± 15 <sup>a, b</sup>	120 ± 10 <sup>a, b</sup>	<0,01

Confronti tra i diversi gruppi in ciascuna epoca: \*1-way ANOVA p-value<0.01, <sup>#</sup>post hoc comparisons p-value <0.05 vs gruppo A, <sup>§</sup>post hoc comparisons p-value <0.05 vs gruppo B. Confronti tra le diverse epoche: <sup>a</sup>post hoc comparisons p-value <0.05 vs pre clampaggio, <sup>b</sup>post hoc comparison p-value <0.05 vs valore massimo.

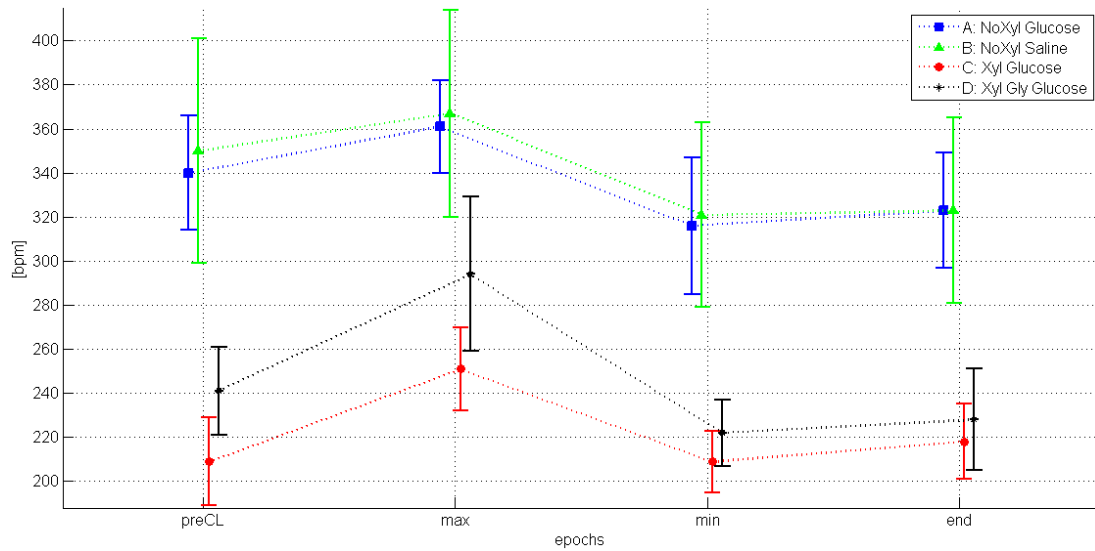
Analogamente alla pressione media, anche la durata del ciclo cardiaco risulta profondamente influenzata dalla somministrazione di Xilazina, come evidenziato nelle figure 3.2 e 3.3. Le differenze tra i gruppi di trattamento sono risultate statisticamente significative in tutte le fasi considerate. In particolare, i valori di HP sono risultati significativamente maggiori in tutte le fasi nei due gruppi trattati con Xilazina, in accordo con l’effetto bradicardico di quest’ultima.

Per quanto riguarda le differenze tra le fasi, solo i gruppi C e D hanno mostrato una diminuzione significativa di HP, ovvero un aumento della frequenza

cardiaca. Tutti i gruppi hanno invece mostrato un significativo aumento di HP rispetto al valore minimo registrato immediatamente dopo la manovra di clampaggio.



**Figura 3.2** Andamento dei valori medi di HP (msec) nei 30 minuti successivi all'occlusione arteriosa nei diversi gruppi di trattamento farmacologico.



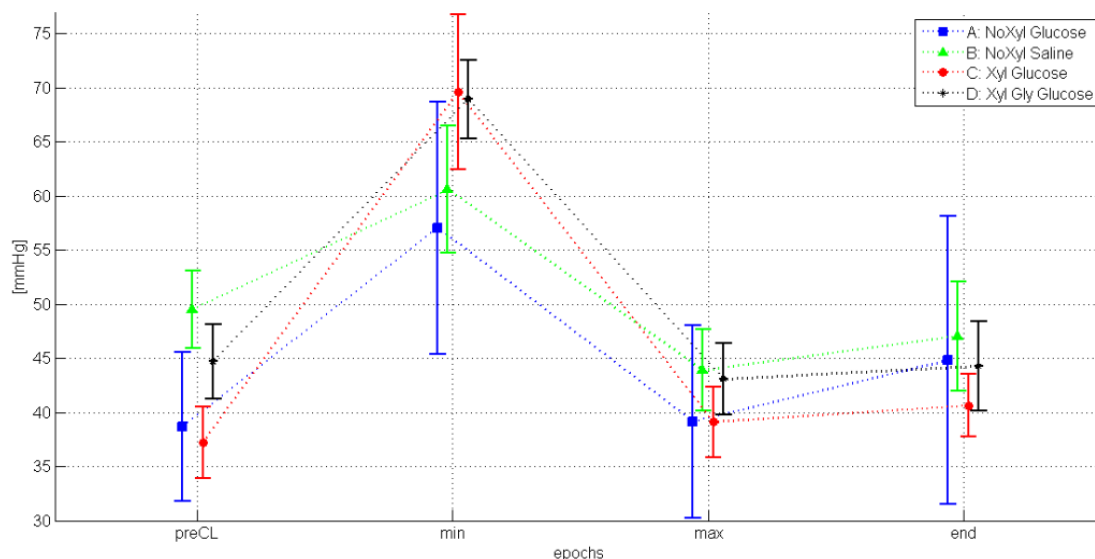
**Figura 3.3** Andamento dei valori medi di frequenza cardiaca espressa in bpm (HR) nei 30 minuti successivi all'occlusione arteriosa nei diversi gruppi di trattamento farmacologico.

**Tabella 3.3** Valori medi di HP (msec) per ciascun gruppo e per ciascuna epoca considerata (prima del clampaggio, valore minimo successivo al clampaggio, valore massimo e valore finale nei 30 minuti successivi al clampaggio).

	<b>Pre Clamp. *</b>	<b>Valore Minimo*</b>	<b>Valore Massimo*</b>	<b>Valore Finale*</b>	<b>ANOVA per misure ripetute</b>
<b>A</b>	176 ± 15	166 ± 10	190 ± 21 <sup>b</sup>	186 ± 16	<0,05
<b>B</b>	171 ± 29	163 ± 24	187 ± 28 <sup>a,b</sup>	186 ± 27 <sup>a,b</sup>	<0,01
<b>C</b>	287 ± 30 <sup>#, §</sup>	239 ± 20 <sup>#, §, a</sup>	287 ± 21 <sup>#, §, b</sup>	276 ± 23 <sup>#, §, b</sup>	<0,01
<b>D</b>	249 ± 22 <sup>#, §</sup>	204 ± 28 <sup>#, §, a</sup>	270 ± 20 <sup>#, §, b</sup>	263 ± 30 <sup>#, §, b</sup>	<0,01

Confronti tra i diversi gruppi in ciascuna epoca: \*1-way ANOVA p-value<0.01, <sup>#</sup>post hoc comparisons p-value <0.05 vs gruppo A, <sup>§</sup>post hoc comparisons p-value <0.05 vs gruppo B. Confronti tra le diverse epoche: <sup>a</sup>post hoc comparisons p-value <0.05 vs pre clampaggio, <sup>b</sup>post hoc comparisons p-value <0.05 vs valore minimo.

L'analisi dell'andamento dei valori di PP nei trenta minuti successivi all'occlusione (fig. 3.4) non ha evidenziato differenze altrettanto marcate tra i gruppi di trattamento. Solo il gruppo C mostra valori di PP inferiori rispetto ai gruppi B e D. Risultano statisticamente significative le differenze tra i valori di pre clampaggio e i valori massimi raggiunti dopo l'occlusione in tutti i gruppi sperimentali; tale aumento è seguito da un calo dei valori dei valori di PP, che risultano significativamente inferiori rispetto al valore massimo registrato.



**Figura 3.4** Andamento dei valori di PP (mmHg) nei 30 minuti successivi all'occlusione arteriosa nei diversi gruppi di trattamento farmacologico.

**Tabella 3.4** Valori medi di PP (mmHg) per ciascun gruppo e per ciascuna epoca considerata (prima del clampaggio, valore massimo successivo al clampaggio, valore minimo e valore finale nei 30 minuti successivi al clampaggio).

	Pre Clamp. *	Valore Massimo <sup>o</sup>	Valore Minimo	Valore Finale	ANOVA per misure ripetute
<b>A</b>	39 ± 7 <sup>§</sup>	57 ± 12 <sup>a</sup>	39 ± 9 <sup>b</sup>	45 ± 13 <sup>b</sup>	<0,01
<b>B</b>	50 ± 4	61 ± 6 <sup>a</sup>	44 ± 4 <sup>b</sup>	47 ± 5 <sup>b</sup>	<0,01
<b>C</b>	37 ± 3 <sup>§, †</sup>	70 ± 7 <sup>a</sup>	39 ± 3 <sup>b</sup>	41 ± 3 <sup>b</sup>	<0,01
<b>D</b>	45 ± 3	69 ± 4 <sup>a</sup>	43 ± 3 <sup>b</sup>	44 ± 4 <sup>b</sup>	<0,01

Confronti tra i diversi gruppi in ciascuna epoca: \*1-way ANOVA p-value <0.01, <sup>o</sup>1-way ANOVA p-value <0,05, <sup>§</sup>post hoc comparisons p-value <0.05 vs gruppo B, <sup>†</sup>post hoc comparison p-value <0,05 vs gruppo D.

Confronti tra le diverse epoche: <sup>a</sup>post hoc comparisons p-value <0.05 vs pre clampaggio, <sup>b</sup>post hoc comparisons p-value <0.05 vs valore massimo.

I risultati dell'analisi degli intervalli di tempo intercorrenti tra l'occlusione arteriosa ed i punti caratteristici del segnale considerati in precedenza sono riportati per le tre serie di interesse nelle tabelle 3.5, 3.6 e 3.7. L'analisi non ha fornito differenze statisticamente significative tra i gruppi, a causa anche dell'alta variabilità intragruppo.

**Tabella 3.5** Intervalli di tempo (sec) tra l'occlusione arteriosa ed il raggiungimento dei valori massimo (Tmax) e minimo (Tmin) di MAP. I valori sono riportati come mediana (25° percentile;75° percentile).

	<b>Tmax</b>	<b>Tmin*</b>	<b>Tmin - Tmax</b>
<b>A</b>	284 (101 , 601)	1253 (888 , 1636)	665 (552 , 965)
<b>B</b>	174 (126 , 155)	1404 (788 , 1534)	1250 (560 , 1410)
<b>C</b>	139 (125 , 178)	1725 (1709 , 1778)	1600 (1510 , 1600)
<b>D</b>	214 (194 , 256)	1774 (1733 , 1779)	1510 (1472 , 1570)

Confronto tra gruppi: \*one way Kruskal-Wallis test p-value <0.05.

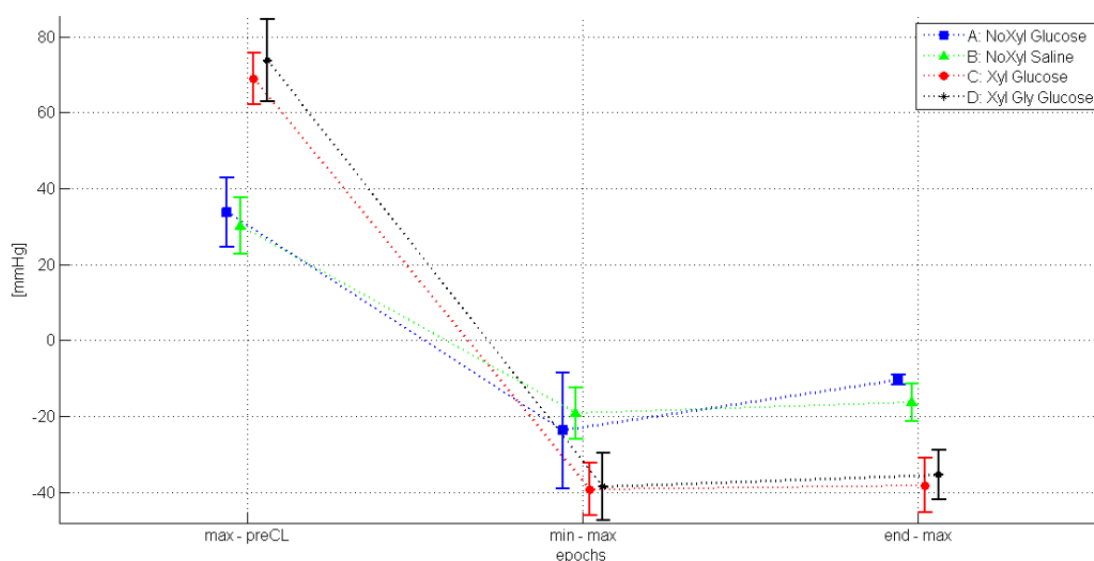
**Tabella 3.6** Intervalli di tempo (sec) tra l'occlusione arteriosa ed il raggiungimento dei valori minimo (Tmin) e massimo (Tmax) di HP. I valori sono riportati come mediana (25° percentile;75° percentile).

	<b>Tmin</b>	<b>Tmax</b>	<b>Tmax - Tmin</b>
<b>A</b>	128 (25 , 386)	1416 (1188 , 1516)	1010 (740 , 1275)
<b>B</b>	49 (33 , 63)	1553 (1459 , 1709)	1490 (1410 , 1670)
<b>C</b>	25 (25 , 27)	895 (802 , 1155)	870 (770 , 1130)
<b>D</b>	64 (54 , 85)	1662 (1445 , 1772)	1580 (1388 , 1683)

**Tabella 3.7** Intervalli di tempo (sec) tra l'occlusione arteriosa ed il raggiungimento dei valori massimo (Tmax) e minimo (Tmin) di PP. I valori sono riportati come 'mediana (25° percentile;75° percentile).

	<b>Tmax</b>	<b>Tmin</b>	<b>Tmin - Tmax</b>
<b>A</b>	286 (140 , 435)	821 (735 , 1125)	600 (553 , 798)
<b>B</b>	118 (102 , 480)	1535 (760 , 1542)	940 (400 , 1440)
<b>C</b>	116 (114 , 126)	1769 (1676 , 1774)	1580 (1560 , 1650)
<b>D</b>	246 (192 , 328)	1591 (1429 , 1744)	1345 (1083 , 1428)

Vengono ora riportate per completezza le variazioni di MAP calcolate tra le varie epoche.



**Figura 3.5** Variazioni del valore di MAP (mmHg) nei 30 minuti successivi all'occlusione arteriosa nei diversi gruppi di trattamento farmacologico.

**Tabella 3.8** Variazioni del valore di MAP (mmHg) per ciascun gruppo e per ciascuna epoca considerata (valore massimo rispetto al valore pre clampaggio, valore minimo e valore finale rispetto al valore massimo).

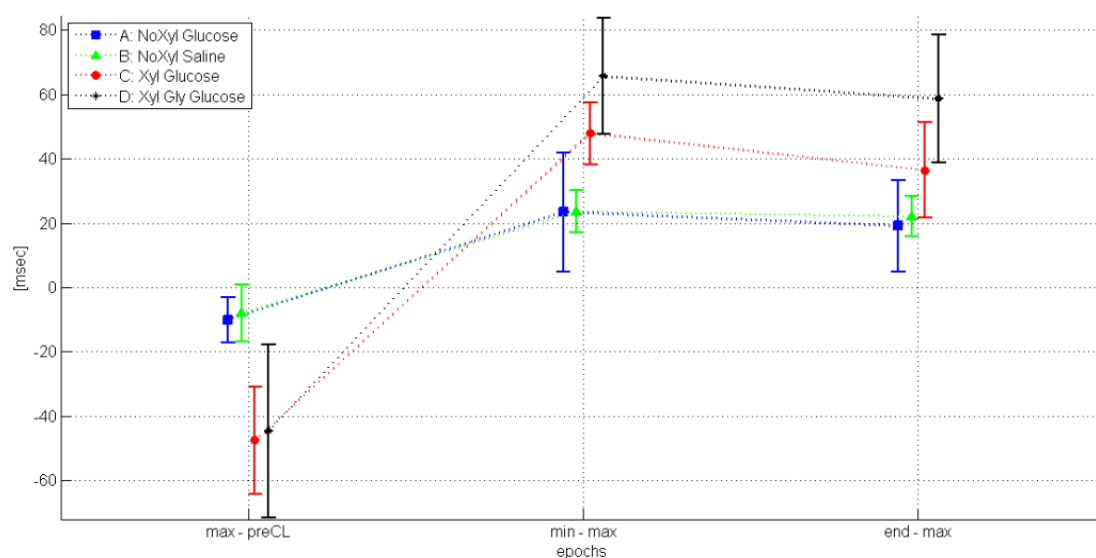
	Valore Massimo – Pre Clamp. *	Valore Minimo – Valore Massimo*	Valore Finale – Valore Massimo*	ANOVA per misure ripetute
<b>A</b>	34 ± 9	-24 ± 15 <sup>a</sup>	-10 ± 1 <sup>a</sup>	<0,01
<b>B</b>	30 ± 8	-19 ± 7 <sup>a</sup>	-16 ± 5 <sup>a</sup>	<0,01
<b>C</b>	69 ± 7 <sup>#, §</sup>	-39 ± 7 <sup>§, a</sup>	-38 ± 7 <sup>#, §, a</sup>	<0,01
<b>D</b>	74 ± 11 <sup>#, §</sup>	-39 ± 9 <sup>§, a</sup>	-35 ± 6 <sup>#, §, a</sup>	<0,01

Confronti tra i diversi gruppi in ciascuna epoca: \*1-way ANOVA p-value <0.01, <sup>#</sup>post hoc comparisons p-value <0.05 vs gruppo A, <sup>§</sup>post hoc comparisons p-value <0.05 vs gruppo B. Confronti tra le diverse epoche: <sup>a</sup>post hoc comparisons p-value <0.05 vs  $\Delta$ iniziale=Valore massimo - PreClampaggio.

Come riportato in precedenza, i gruppi trattati con Xilazina (C e D) presentano variazioni di MAP significativamente maggiori rispetto ai gruppi cui non viene somministrato simpatolitico. I valori di variazione di MAP del gruppo B (ratti trattati solo con infusione di soluzione salina), differiscono in modo significativo da quelli dei gruppi C e D in ogni fase, mentre il gruppo A presenta un andamento che

si discosta meno da quello dei gruppi con Xilazina. Quest'ultimo risultato potrebbe essere spiegato con l'ipotesi di attivazione parasimpatica legata alla somministrazione di glucosio.

Il medesimo risultato è stato ottenuto analizzando le variazioni di periodo cardiaco (figura 3.6 e tabella 3.9). Anche in questo caso infatti i ratti trattati con Xilazina (gruppi C e D) presentano mediamente variazioni significativamente maggiori rispetto agli animali degli altri due gruppi sperimentali.



**Figura 3.6** Variazioni del valore di HP (msec) nei 30 minuti successivi all'occlusione arteriosa nei diversi gruppi di trattamento farmacologico.

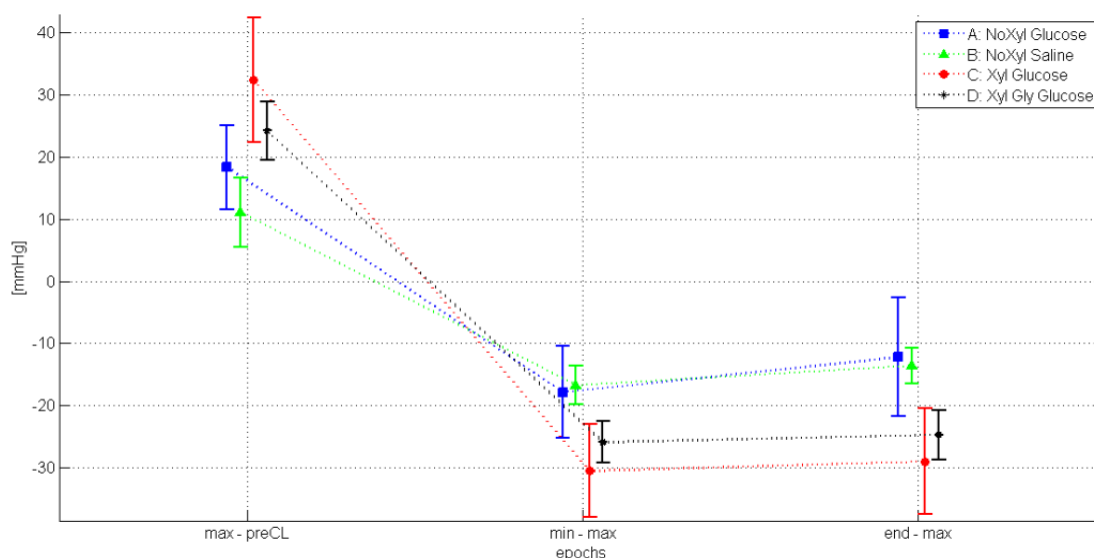
**Tabella 3.9** Variazioni del valore di HP (msec) per ciascun gruppo e per ciascuna epoca considerata (valore minimo rispetto al valore pre clampaggio, valore massimo e valore finale rispetto al valore minimo).

	Valore Minimo – Pre Clamp. *	Valore Massimo – Valore Minimo*	Valore Finale – Valore Minimo*	ANOVA per misure ripetute
<b>A</b>	-10 ± 7	23 ± 18 <sup>a</sup>	19 ± 14 <sup>a</sup>	<0,05
<b>B</b>	-8 ± 9	24 ± 7 <sup>a</sup>	22 ± 6 <sup>a</sup>	<0,01
<b>C</b>	-48 ± 17 <sup>#</sup>	48 ± 10 <sup>a</sup>	37 ± 15 <sup>a</sup>	<0,01
<b>D</b>	-45 ± 27 <sup>#, §</sup>	66 ± 18 <sup>#, §, a</sup>	59 ± 20 <sup>#, §, a</sup>	<0,01

Confronti tra i diversi gruppi in ciascuna epoca: \*1-way ANOVA p-value <0.01, #post hoc comparisons p-value <0.05 vs gruppo A, §post hoc comparisons p-value <0.05 vs gruppo B.

Confronti tra le diverse epoche: <sup>a</sup>post hoc comparisons p-value <0.05 vs  $\Delta$ iniziale=Valore massimo - PreClampaggio.

Infine, anche la pressione pulsatoria ha fatto registrare variazioni significativamente maggiori nei gruppi trattati con Xilazina in tutte le epoche considerate (figura 3.7), ed in particolare negli animali appartenenti al gruppo C.



**Figura 3.7** Variazioni del valore di PP (mmHg) nei 30 minuti successivi all'occlusione arteriosa nei diversi gruppi di trattamento farmacologico.

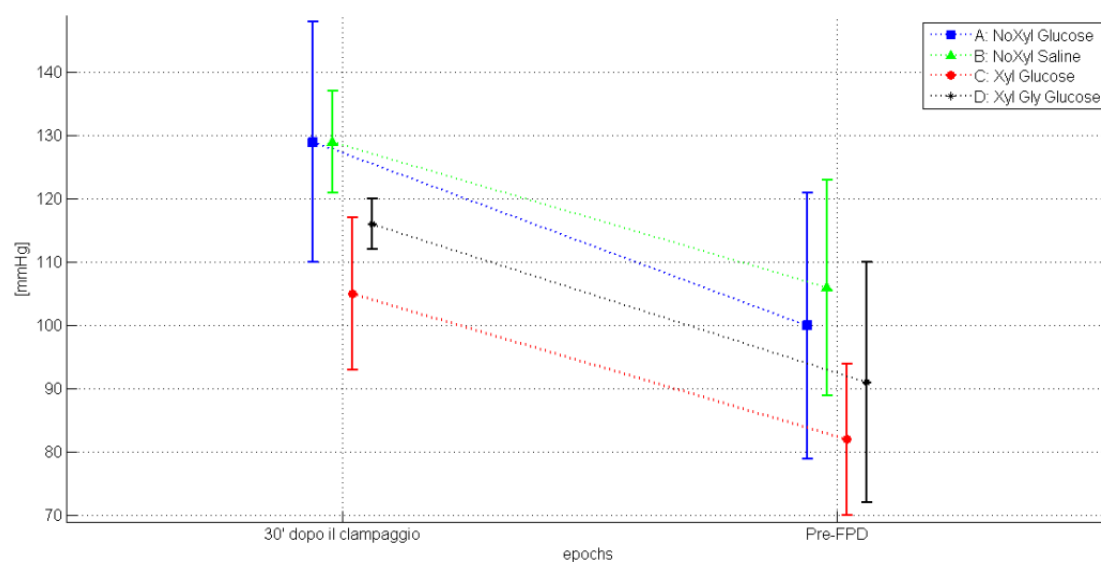
**Tabella 3.10** Variazioni del valore di PP (mmHg) per ciascun gruppo e per ciascuna epoca considerata (valore massimo rispetto al valore pre clampaggio, valore minimo e valore finale rispetto al valore massimo).

	Valore Massimo – Pre Clamp. *	Valore Minimo – Valore Massimo*	Valore Finale – Valore Massimo*	ANOVA per misure ripetute
<b>A</b>	18 ± 7	-18 ± 7 <sup>a</sup>	-12 ± 10 <sup>a</sup>	<0,01
<b>B</b>	11 ± 6	-17 ± 3 <sup>a</sup>	-14 ± 3 <sup>a</sup>	<0,01
<b>C</b>	32 ± 10 <sup>#, §</sup>	-31 ± 7 <sup>#, §, a</sup>	-29 ± 9 <sup>#, §, a</sup>	<0,01
<b>D</b>	24 ± 5 <sup>§</sup>	-25 ± 4 <sup>a</sup>	-25 ± 4 <sup>#, a</sup>	<0,01

Confronti tra i diversi gruppi in ciascuna epoca: \*1-way ANOVA p-value <0.01, <sup>#</sup>post hoc comparisons p-value <0.05 vs gruppo A, <sup>§</sup>post hoc comparisons p-value <0.05 vs gruppo B.

Confronti tra le diverse epoche: <sup>a</sup>post hoc comparisons p-value <0.05 vs  $\Delta$ iniziale=Valore massimo - PreClampaggio.

L'analisi dei trend delle serie battito-battito nella seconda finestra temporale, cioè dai 30 minuti successivi alla manovra SAO all'evento di *fatal pressure drop* (FPD) è stata condotta sia considerando i diversi trattamenti farmacologici, come per i risultati già riportati precedentemente, sia considerando una classificazione basata sulla velocità dell'evento.



**Figura 3.8** Andamento dei valori medi di MAP (mmHg) per ogni gruppo di trattamento farmacologico. Il valore iniziale è ottenuto per ogni ratto come media di 6 minuti di segnale, compresi tra 30 e 36 minuti dopo l'occlusione delle arterie. Il valore 'Pre-FPD' è ottenuto per ogni topo come media degli ultimi 6 minuti di segnale precedenti il Fatal Pressure Drop.

**Tabella 3.11** Valori medi di MAP (mmHg) per ciascun gruppo e per ciascuna epoca considerata (30 minuti dopo il clampaggio e prima dell'evento *Fatal Pressure Drop*, FPD).

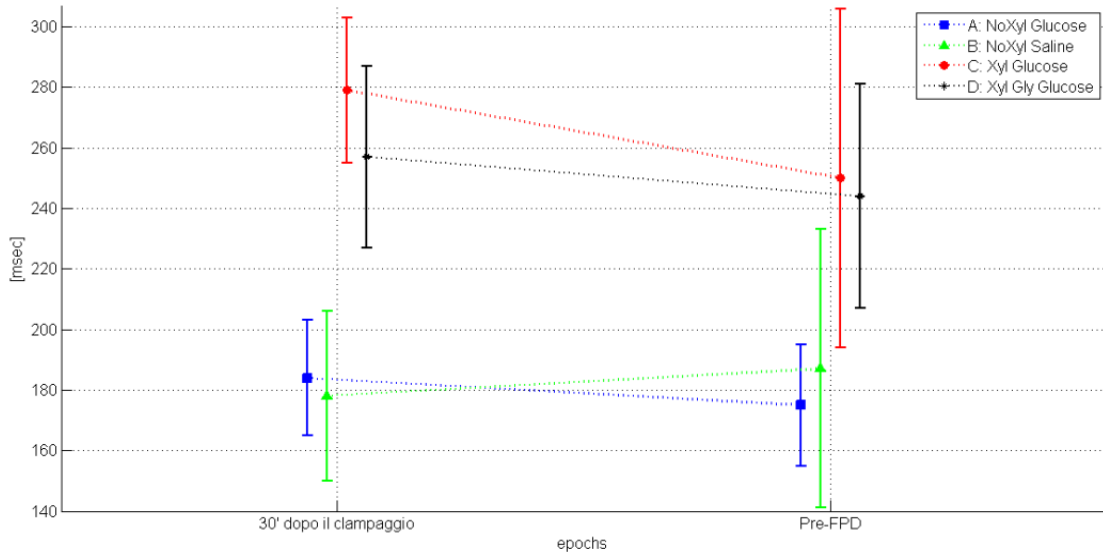
Gruppo	30' dopo clamp. <sup>o</sup>	Pre-FPD	$\Delta = \text{PreFPD} - 30'$ dopo clamp
A	129 ± 19	100 ± 21 <sup>a</sup>	-29 ± 13
B	129 ± 8	106 ± 17 <sup>b</sup>	-23 ± 14
C	105 ± 12 <sup>#,§</sup>	82 ± 12 <sup>b</sup>	-23 ± 11
D	116 ± 4	91 ± 19 <sup>b</sup>	-25 ± 9

Confronti tra i diversi gruppi in ciascuna epoca: <sup>o</sup>1-way ANOVA p-value <0.05, <sup>#</sup>post hoc comparisons p-value <0.05 vs gruppo A, <sup>§</sup>post hoc comparisons p-value <0.05 vs gruppo B.

Confronto tra epoche: <sup>a</sup>paired t-test p-value <0.05 vs epoca iniziale (30 minuti dopo il clampaggio), <sup>b</sup>paired t-test p-value <0.01 vs epoca iniziale (30 minuti dopo il clampaggio).

Nel caso della MAP, solamente i valori iniziali risultano significativamente differenti tra i vari gruppi; in particolare, il gruppo C presenta valori significativamente inferiori rispetto ai gruppi A e B (non trattati con Xilazina) mentre il gruppo D non differisce in modo significativo da nessuno degli altri gruppi sperimentali.

I valori di HP risultano invece significativamente differenti tra i ratti trattati con Xilazina e quelli non trattati. Gli animali dei gruppi C e D presentano infatti valori di HP maggiori sia all'inizio della finestra temporale analizzata sia nel periodo precedente il fatal drop (figura 3.9, tabella 3.12). Tuttavia i valori di tali gruppi sono inferiori ai 300 bpm (figura 3.10) e mostrerebbero quindi bradicardia. Nessuna differenza significativa è risultata tra le due epoche in nessun gruppo sperimentale.

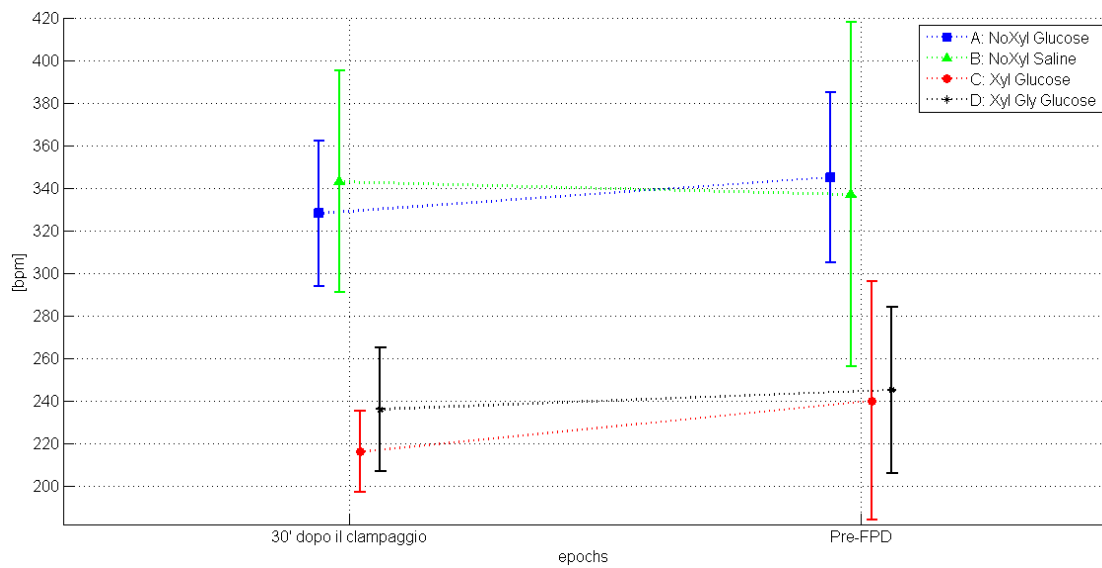


**Figura 3.9** Andamento dei valori medi di HP (msec) per ogni gruppo di trattamento farmacologico.

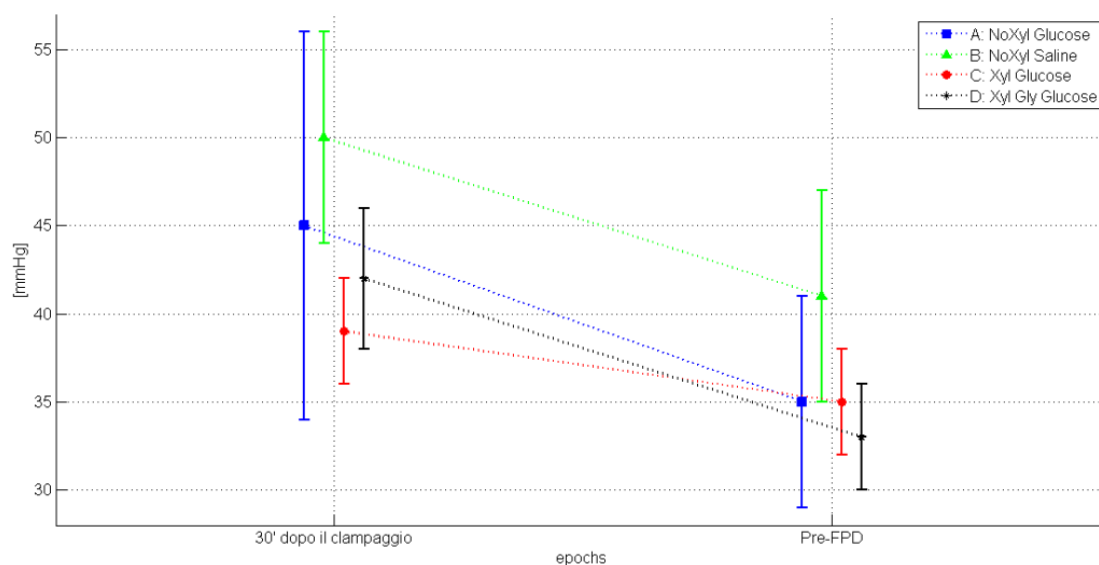
**Tabella 3.12** Valori medi di HP (msec) per ciascun gruppo e per ciascuna epoca considerata (30 minuti dopo il clampaggio e prima dell'evento *Fatal Pressure Drop*, FPD).

Gruppo	30' dopo clamp.*	Pre-FPD <sup>o</sup>	$\Delta$ =PreFPD - 30' dopo clamp
A	184 ± 19	175 ± 20 <sup>a</sup>	-9 ± 3
B	178 ± 28	187 ± 46	9 ± 23
C	279 ± 24 <sup>#, §</sup>	250 ± 56	-29 ± 43
D	257 ± 30 <sup>#, §</sup>	244 ± 37	-13 ± 30

Confronti tra i diversi gruppi in ciascuna epoca: \*1-way ANOVA p-value <0,01, <sup>o</sup>1-way ANOVA p-value <0.05, <sup>#</sup>post hoc comparisons p-value <0.05 vs gruppo A, <sup>§</sup>post hoc comparisons p-value <0.05 vs gruppo B. Confronto tra epoche: <sup>a</sup> paired t-test p-value <0.05 vs epoca iniziale (30 minuti dopo il clampaggio).



**Figura 3.10** Andamento dei valori medi di HR (bpm) per ogni gruppo.



**Figura 3.11** Andamento dei valori medi di PP (mmHg) per ogni gruppo di trattamento farmacologico.

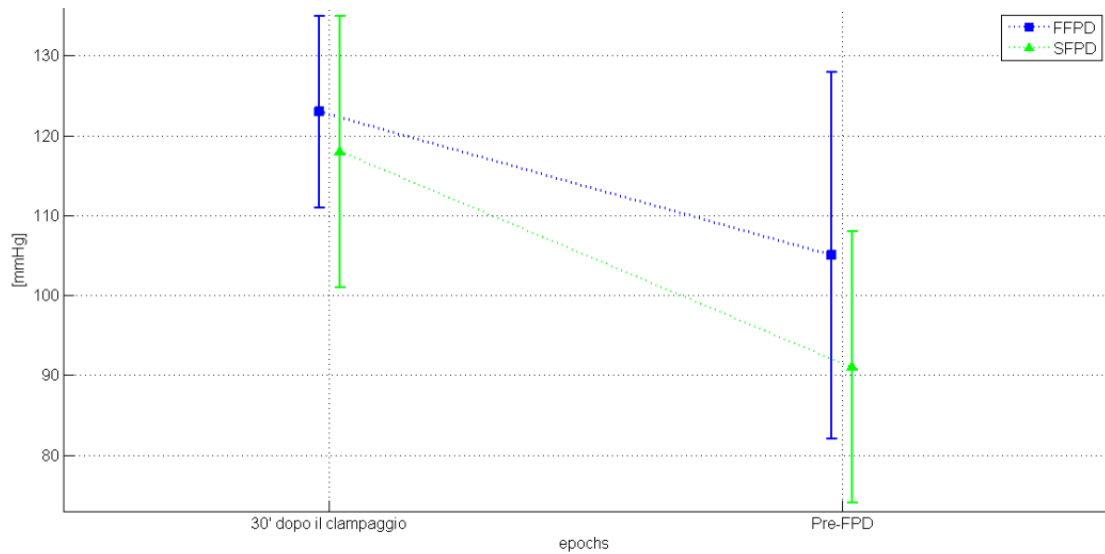
I valori iniziali e pre-PPD della PP sono risultati significativamente diversi solo nel gruppo D. Differenze significative sono risultate tra i gruppi trattati con Xilazina ed il gruppo B, trattato con la sola soluzione salina. Il gruppo A, cui è stato somministrato solo glucosio, non differisce invece in modo significativo dai gruppi C e D (figura 3.11, tabella 3.13).

**Tabella 3.13** Valori medi di PP (mmHg) per ciascun gruppo e per ciascuna epoca considerata (30 minuti dopo il clampaggio e prima dell'evento *Fatal Pressure Drop*, FPD).

Gruppo	30' dopo clamp. <sup>°</sup>	Pre-PPD <sup>°</sup>	$\Delta = \text{PrePPD} - 30' \text{ dopo clamp}$
<b>A</b>	45 ± 11	35 ± 6	-10 ± 12
<b>B</b>	50 ± 6	41 ± 6	-9 ± 10
<b>C</b>	39 ± 3 <sup>§</sup>	35 ± 3	-4 ± 4
<b>D</b>	42 ± 4 <sup>§</sup>	33 ± 3 <sup>§, b</sup>	-10 ± 4

Confronti tra i diversi gruppi in ciascuna epoca: <sup>°</sup>1-way ANOVA p-value <0.05, <sup>#</sup>post hoc comparisons p-value <0.05 vs gruppo A, <sup>§</sup>post hoc comparisons p-value <0.05 vs gruppo B.

Confronto tra epoche: <sup>b</sup> paired t-test p-value <0.01 vs epoca iniziale (30 minuti dopo il clampaggio).



**Figura 3.12** Andamento dei valori medi di MAP (mmHg) nei due gruppi di comportamento.

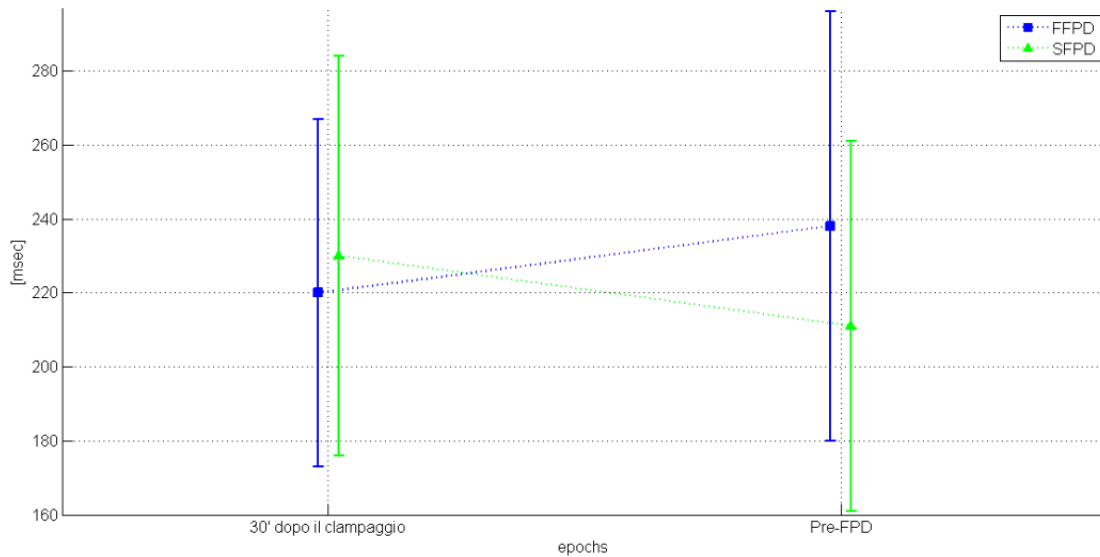
La classificazione degli animali sulla base del tipo di FPD, ossia confrontando FFPD e SFPD, non ha fornito alcuna differenza significativa per quanto riguarda i trend di MAP (figura 3.12, tabella 3.14). Tuttavia, per entrambi i gruppi si è ottenuta una significativa diminuzione della MAP nella fase *pre-FPD* rispetto ai valori iniziali della finestra temporale considerata.

**Tabella 3.14** Valori medi di MAP (mmHg) per ciascun gruppo e per ciascuna epoca considerata (30 minuti dopo il clampaggio e prima dell'evento *Fatal Pressure Drop*, FPD)

Gruppo	30' dopo clamp.	Pre-FPD	$\Delta = \text{PreFPD} - 30'$ dopo clamp
<b>FFPD</b>	123 ± 12	105 ± 23 <sup>a</sup>	-19 ± 15
<b>SFPD</b>	118 ± 17	91 ± 17 <sup>b</sup>	-27 ± 9

Confronto tra epoche: <sup>a</sup>paired t-test p-value<0.05 vs epoca iniziale (30 minuti dopo il clampaggio),  
<sup>b</sup>paired t-test p-value<0.01 vs epoca iniziale (30 minuti dopo il clampaggio)

Come riportato in tabella 3.15, il gruppo SFPD presenta una variazione significativamente differente tra le due epoche rispetto al gruppo FFPD: una diminuzione significativa (aumento della frequenza cardiaca) in SFPD e un incremento (diminuzione dell'HR) in FFPD, sebbene i valori riportati dai due gruppi non siano risultati significativamente diversi nelle singole epoche.



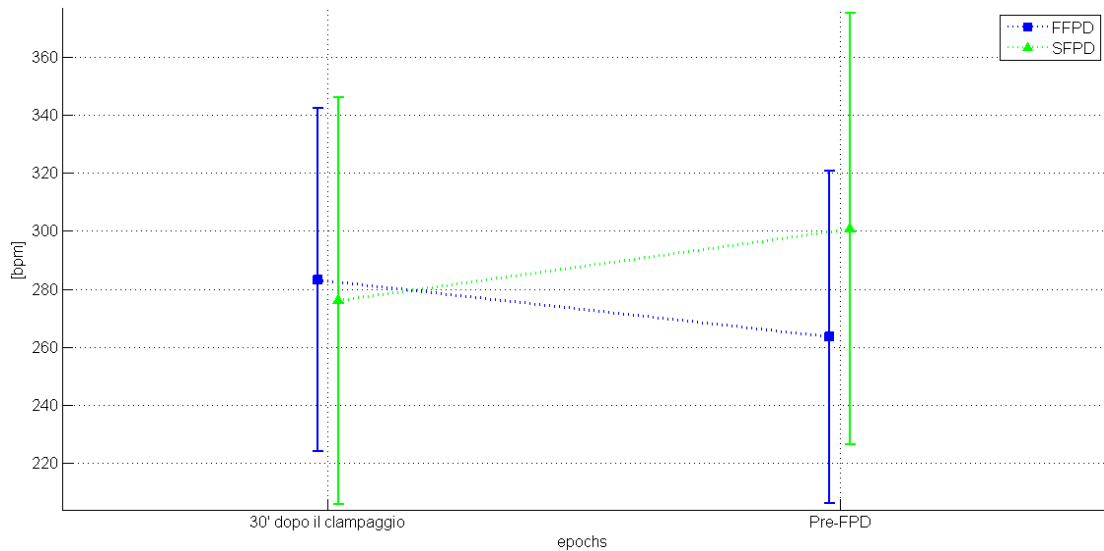
**Figura 3.13** Andamento dei valori di HP (msec) nei due gruppi di comportamento.

**Tabella 3.15** Valori medi di HP (msec) per ciascun gruppo e per ciascuna epoca considerata (30 minuti dopo il clampaggio e prima dell'evento *Fatal Pressure Drop*, FPD)

Gruppo	30' dopo clamp.	Pre-FFPD	$\Delta = \text{PreFFPD} - 30'$ dopo clamp*
<b>FFPD</b>	220 ± 47	238 ± 58	18 ± 27
<b>SFPD</b>	230 ± 54	211 ± 50 <sup>b</sup>	-19 ± 27

Confronto tra gruppi: \*unpaired t-test p-value <0.01

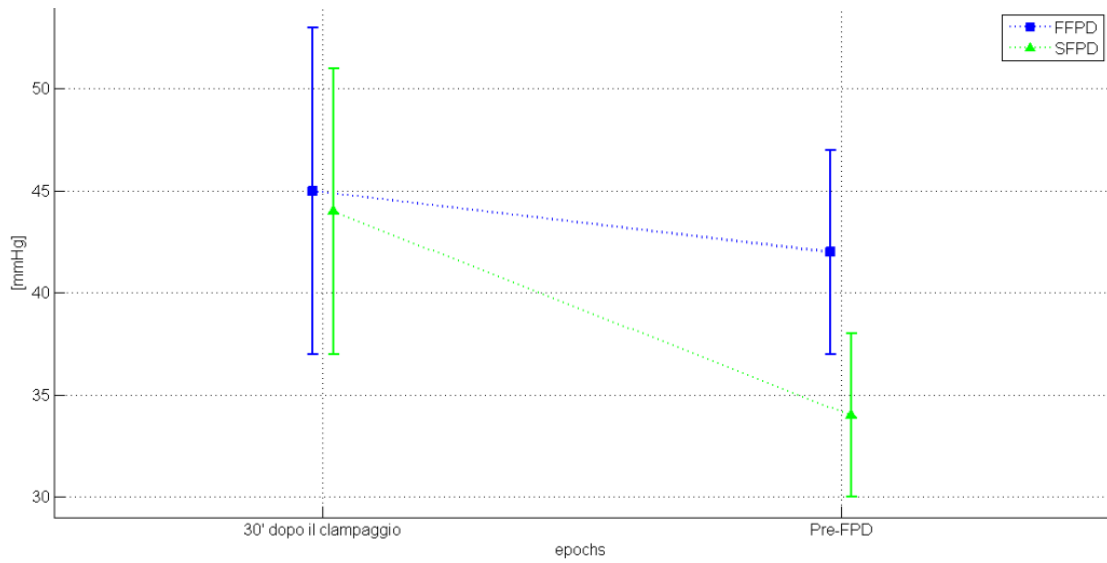
Confronto tra epoche: <sup>b</sup>paired t-test p-value <0.01 vs epoca iniziale (30 minuti dopo il clampaggio).



**Figura 3.14** Andamento dei valori di HR (bpm) nei due gruppi di comportamento.

Il trend crescente di HP, ovvero una diminuzione della frequenza cardiaca (HR) nei ratti del gruppo FFPD suggerisce, in accordo con le ipotesi iniziali, la presenza di attività parasimpatica che, se non compensata, può essere la causa dell'improvviso crollo dei parametri vitali.

Infine, l'analisi del trend della PP ha evidenziato differenze significative tra i due gruppi: i ratti appartenenti al gruppo FFPD mantengono pressochè invariata la pressione pulsatoria fino al momento del collasso. I ratti appartenenti al gruppo SFPD mostrano invece un progressivo e significativo calo della PP nell'approssimarsi al FPD (figura 3.15 e tabella 3.16).



**Figura 3.15** Andamento dei valori di PP nei due gruppi di comportamento.

**Tabella 3.16** Valori medi di PP (mmHg) per ciascun gruppo e per ciascuna epoca considerata (30 minuti dopo il clampaggio e prima dell'evento *Fatal Pressure Drop*, FPD)

Gruppo	30' dopo clamp.	Pre-FFPD*	$\Delta = \text{PreFFPD} - 30' \text{ dopo clamp}^*$
<b>FFPD</b>	45 ± 8	42 ± 5	-3 ± 8
<b>SFPD</b>	44 ± 7	34 ± 4 <sup>b</sup>	-10 ± 7

Confronto tra gruppi: \*unpaired t-test p-value <0.01, FFPD vs SFPD.

Confronto tra epoche: <sup>b</sup>paired t-test p-value <0.01 vs epoca iniziale (30 minuti dopo il clampaggio).

### 3.3 Heart Rate Characteristics

Per l'applicazione dell'algoritmo HRC (Moorman, 2006) si è considerata la classificazione degli animali sulla base del tipo di fatal drop, L'analisi dei risultati ottenuti dall'applicazione di tale algoritmo alle serie battito-battito sull'intera finestra temporale compresa fra trenta minuti dopo l'occlusione arteriosa e l'insorgere del fatal drop ha fornito i risultati riportati in tabella 3.17.

L'indice R1/R2 (*sample asymmetry*) è risultato statisticamente significativo solo per la serie HP.

**Tabella 3.17** Valori del parametro R1/R2 per ciascuna serie battito-battito nell'epoca considerata (da 30 minuti dopo il clampaggio all'evento *Fatal Pressure Drop*, FPD)

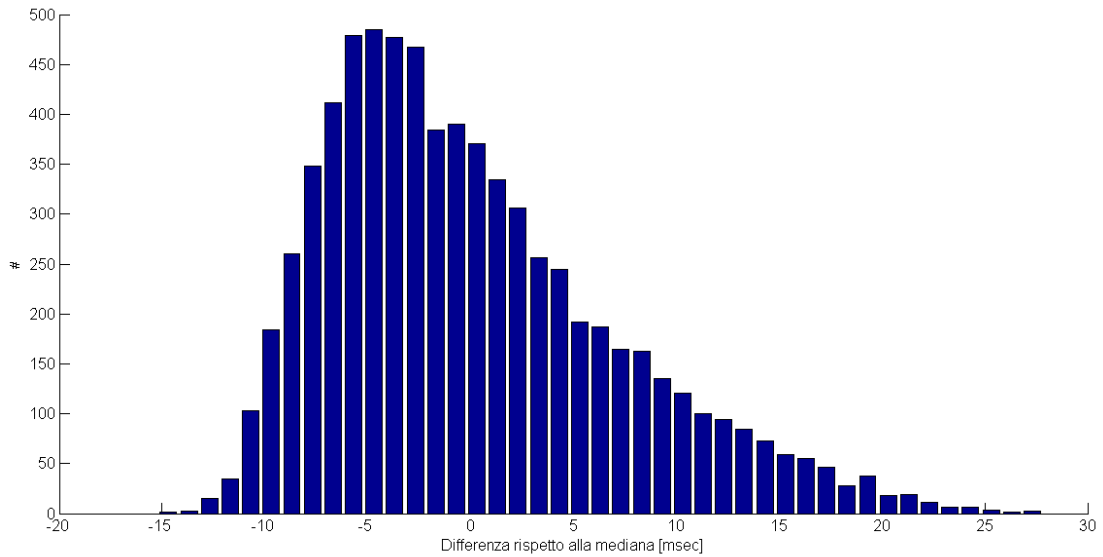
Gruppo	R1/R2 HP*	R1/R2 MAP	R1/R2 PP
<b>FFPD</b>	0.76 ± 0.57	3.02 ± 2.87	1.89 ± 2.47
<b>SFPD</b>	1.94 ± 1.27	1.47 ± 1.29	1.10 ± 1.16

Confronto tra gruppi: \*unpaired t-test p-value <0.05, FFPD vs SFPD.

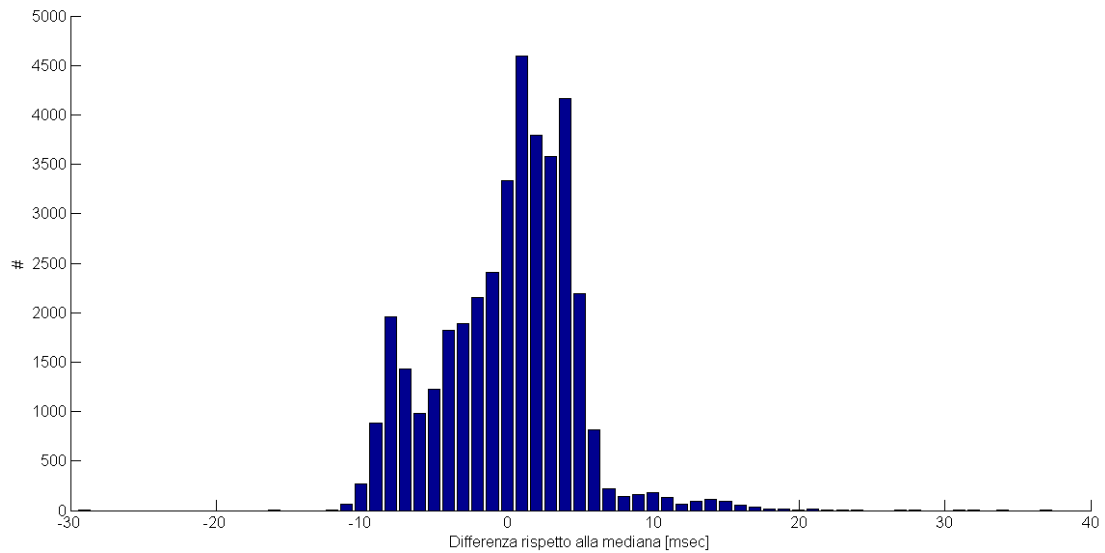
Il parametro R1/R2 rappresenta il rapporto tra il numero di campioni del segnale il cui valore si trova al di sotto della mediana ed il numero di campioni al di sopra della stessa. Valori di tale parametro maggiori di uno sono pertanto indicativi di uno sbilanciamento del segnale verso una diminuzione della pressione, nel caso della MAP, o verso un'aumento della frequenza cardiaca (diminuzione dell'HP), nel caso di HP. I valori riportati nella tabella 3.17 evidenziano perciò che, all'approssimarsi del *fatal drop*, i ratti del gruppo FFPD presentano episodi di diminuzione della frequenza cardiaca (aumento dell'HP) che rendono il rapporto R1/R2 inferiore all'unità; al contrario, i ratti appartenenti al gruppo SFPD presentano un valore di *sample asymmetry* >1 e sono quindi caratterizzati da uno sbilanciamento verso l'aumento della frequenza cardiaca (diminuzione dell'HP).

Per quanto riguarda la pressione, in entrambi i gruppi l'andamento di MAP risulta sbilanciato verso una diminuzione della pressione (valori di R1/R2>1), con valori maggiori per i topi del gruppo FFPD, sebbene la differenza non sia risultata statisticamente significativa.

Nelle figure seguenti sono riportati a titolo esemplificativo alcuni istogrammi ottenuti tramite l'applicazione dell'algoritmo HRC alle serie MAP e HP di alcuni ratti.

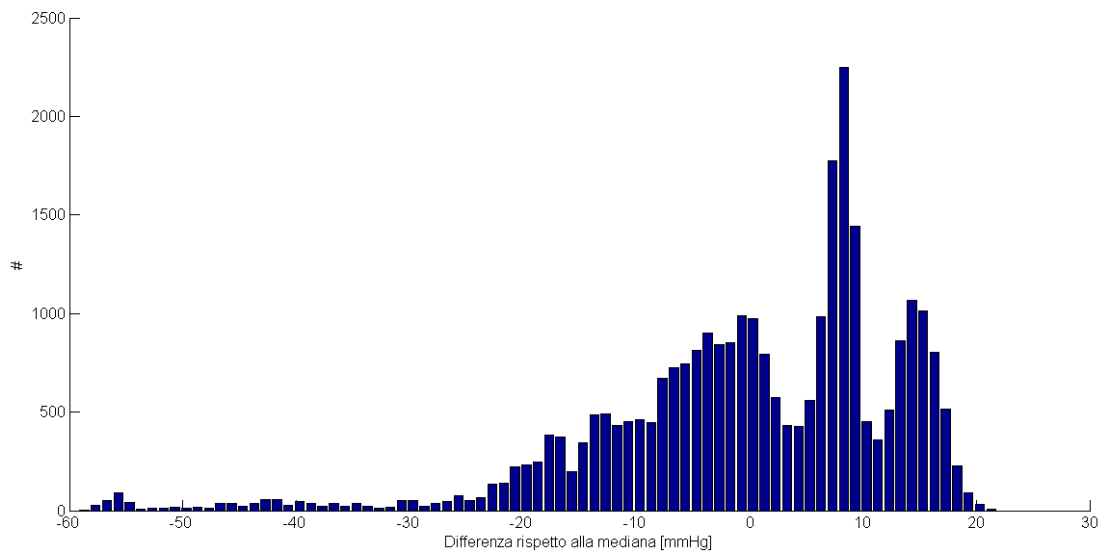


**Figura 3.16** Istogramma della distribuzione delle differenze dei valori di HP rispetto alla mediana in un ratto del gruppo FFPD.

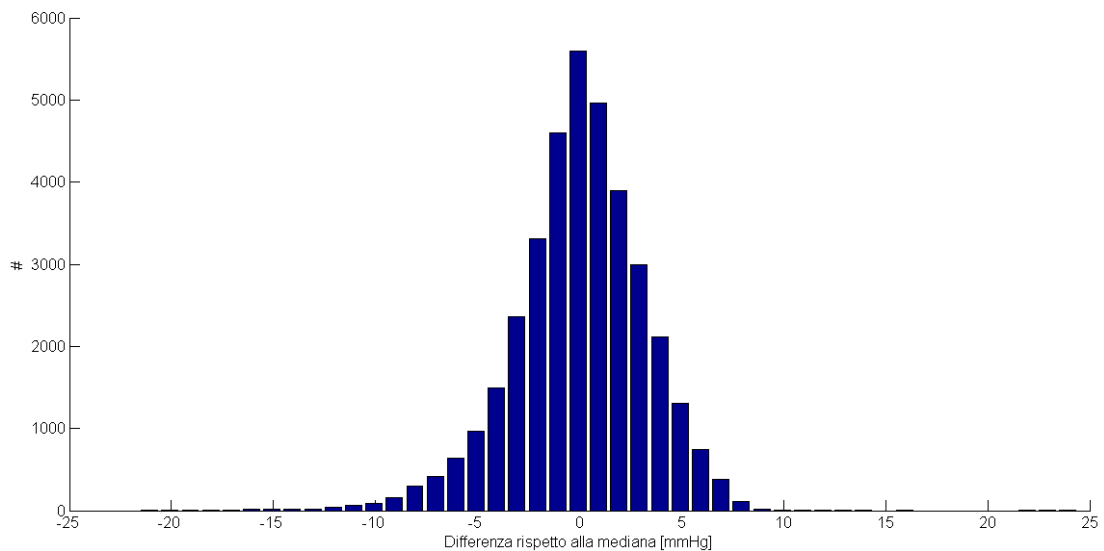


**Figura 3.17** Istogramma della distribuzione delle differenze dei valori di HP rispetto alla mediana in un ratto del gruppo SFPD.

La figura 3.16 mostra un istogramma maggiormente sbilanciato verso valori di HP maggiori della mediana, che indica il prevalere di episodi di diminuzione della frequenza cardiaca.



**Figura 3.18** Istogramma della distribuzione di valori di MAP rispetto alla mediana in un ratto del gruppo FFPD, calcolato con l’algoritmo HRC.



**Figura 3.19** Istogramma della distribuzione di valori di MAP rispetto alla mediana in un ratto del gruppo SFPD, calcolato con l’algoritmo HRC.

Analogamente, per le serie MAP si mostra un caso in cui un ratto SFPD presenta un istogramma pressochè simmetrico rispetto alla mediana, in linea con il valore del rapporto R1/R2, vicino all'unità. Il ratto FFPD presenta invece un istogramma sbilanciato in modo evidente verso valori inferiori alla mediana, ovvero il prevalere di eventi di calo di pressione (con una riduzione fino a 60mmHg).

L'applicazione dell'algoritmo HRC a finestre scorrevoli della durata di 3 minuti come descritto nel capitolo precedente, non ha fornito alcun risultato statisticamente significativo, né per quanto riguarda i valori massimi e minimi del parametro R1/R2, né per quanto riguarda la percentuale di valori maggiori di uno (tabella 3.18 e 3.19).

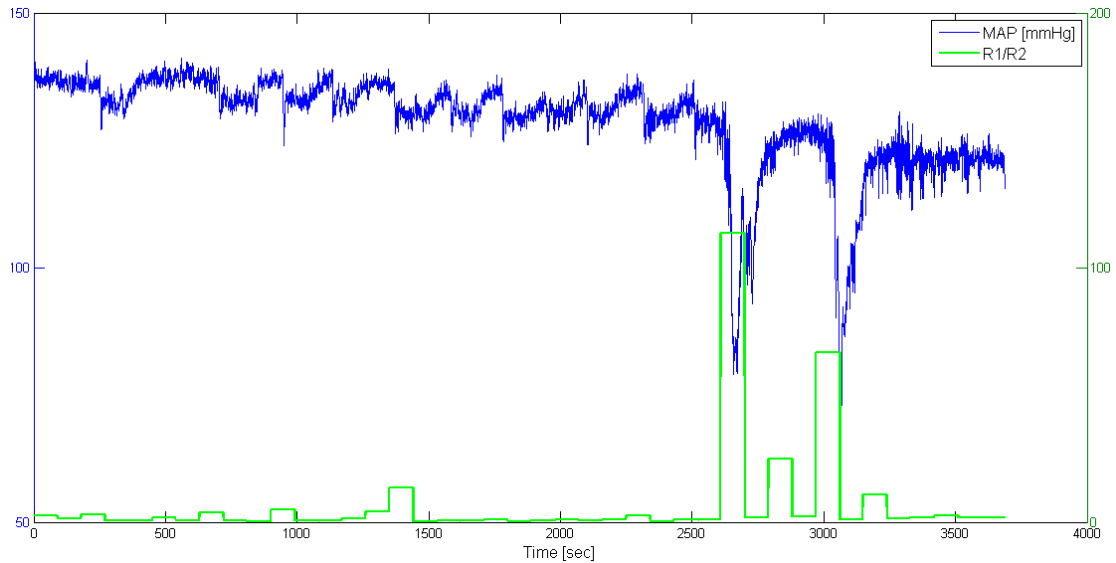
**Tabella 3.18** Valori massimi/minimi del parametro R1/R2 per ciascuna serie battito-battito nel periodo considerato (da 30 minuti dopo il clampaggio al Fatal Pressure Drop, FPD).

<b>Gruppo</b>	<b>Valore minimo R1/R2 HP</b>	<b>Valore massimo R1/R2 MAP</b>	<b>Valore massimo R1/R2 PP</b>
<b>FFPD</b>	0.13 ± 0.09	29,27 ± 50,21	4,76 ± 3,27
<b>SFPD</b>	0.09 ± 0.09	17,33 ± 27,52	9,14 ± 12,16

**Tabella 3.19** Percentuale di valori di R1/R2 maggiori/minori di uno per ciascuna serie battito-battito nel periodo considerato (da 30 minuti dopo il clampaggio al Fatal Pressure Drop, FPD).

<b>Gruppo</b>	<b>% R1/R2 HP &lt;1</b>	<b>% R1/R2 MAP &gt;1</b>	<b>% R1/R2 PP &gt;1</b>
<b>FFPD</b>	55 ± 25	60 ± 21	66 ± 29
<b>SFPD</b>	56 ± 10	66 ± 19	78 ± 16

L'indice R1/R2 emerge tuttavia come potenzialmente adeguato ad individuare in modo automatizzato e a caratterizzare i fenomeni di caduta pressoria che sono stati individuati in alcuni dei ratti FFPD (figura 3.20).



**Figura 3.20** Applicazione dell’algoritmo HRC alla serie di MAP su finestra scorrevole di 3 minuti, overlapping 50%. In verde il valore del parametro R1/R2, che presenta un picco in corrispondenza delle finestre temporali relative ai fenomeni di drop/recovery della pressione.

### 3.4 Baroriflesso cardiaco

I valori di baroriflesso sono stati stimati ad inizio protocollo (*baseline*) e nella finestra temporale compresa tra 30 minuti dopo l’occlusione delle arterie ed il fatal drop, e sono stati analizzati sia considerando la classificazione dei ratti in gruppi di trattamento farmacologico, sia considerandone la classificazione in base al tipo di *fatal drop*. Non è stata invece fatta alcuna stima del baroriflesso nei 30 minuti successivi all’occlusione arteriosa, in quanto ritenuti un periodo di tempo necessario alla stabilizzazione degli effetti transitori dell’occlusione, durante i quali si manifestano progressivamente, per esempio, le conseguenze legate alla risposta infiammatoria indotta dall’ischemia intestinale. I valori ottenuti con il modello bivariato non hanno mostrato differenze significative tra i quattro gruppi sperimentali in nessuna delle epoche considerate, e non hanno mostrato variazioni significative tra le diverse epoche (tabelle 3.20 e 3.21), sia nella banda LF che nella banda HF.

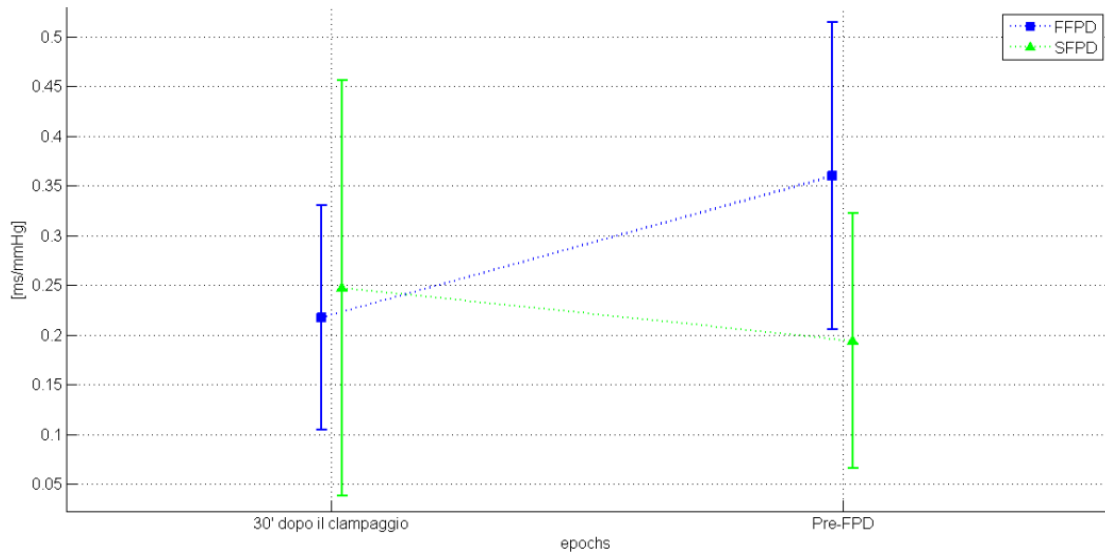
**Tabella 3.20** Valori medi del guadagno del baroriflesso (ms/mmHg) stimato nella banda LF per ciascun gruppo e per ciascuna epoca considerata (Baseline, 30 minuti dopo il clampaggio e prima dell'evento *Fatal Pressure Drop*, FPD), calcolati mediante modello bivariato.

Gruppo	Baseline	30' dopo clamp.	Pre-FPD
A	0.27 ± 0.22	0.16 ± 0.10	0.18 ± 0.10
B	0.32 ± 0.34	0.20 ± 0.09	0.21 ± 0.16
C	0.25 ± 0.21	0.39 ± 0.30	0.35 ± 0.18
D	0.35 ± 0.63	0.20 ± 0.13	0.19 ± 0.11

**Tabella 3.21** Variazione del guadagno del baroriflesso (ms/mmHg) stimato nella banda LF per ciascun gruppo.

Gruppo	30' dopo clamp. - Baseline	Pre-FPD - Baseline	Pre-FPD - 30' dopo clamp
A	-0.091 ± 0.118	-0.071 ± 0.143	0.019 ± 0.025
B	-0.115 ± 0.399	-0.104 ± 0.420	0.011 ± 0.134
C	0.128 ± 0.376	-0.089 ± 0.361	-0.039 ± 0.246
D	-0.150 ± 0.562	-0.153 ± 0.640	-0.003 ± 0.180

I valori del baroriflesso stimato con il modello bivariato nella banda LF sono risultati invece significativamente differenti tra i gruppi FFPD e SFPD, sia in termini di valori assoluti, sia in termini di variazione degli stessi tra le epoche considerate (tabella 3.22): i ratti appartenenti al gruppo FFPD presentano mediamente un guadagno maggiore rispetto a quelli appartenenti al gruppo SFPD nell'epoca *preFPD*. Nessuna differenza significativa è stata ottenuta nella banda HF (tabella 3.23).



**Figura 3.21** Andamento del valore di guadagno LF nei due gruppi in avvicinamento al Fatal Pressure Drop.

**Tabella 3.22** Valori medi del guadagno del baroriflesso (ms/mmHg) stimato nella banda LF per ciascun gruppo e per ciascuna epoca considerata (Baseline, 30 minuti dopo il clampaggio e prima dell'evento *Fatal Pressure Drop*, FPD), calcolati mediante modello bivariato.

Gruppo	Baseline	30' dopo clamp.	Pre-FPD*
<b>FFPD</b>	0.22 ± 0.19	0.22 ± 0.11	0.36 ± 0.15 <sup>b</sup>
<b>SFPD</b>	0.33 ± 0.44	0.25 ± 0.21	0.19 ± 0.12

Confronto tra gruppi: \*unpaired t-test p-value <0.05, FFPD vs SFPD.

Confronto tra epoche: #ANOVA per misure ripetute p-value <0.05, <sup>b</sup>paired t-test p-value <0.01 vs 30' dopo il clampaggio.

**Tabella 3.23** Valori medi del guadagno del baroriflesso (ms/mmHg) stimato nella banda HF per ciascun gruppo e per ciascuna epoca considerata (Baseline, 30 minuti dopo il clampaggio e prima dell'evento *Fatal Pressure Drop*, FPD), calcolati mediante modello bivariato.

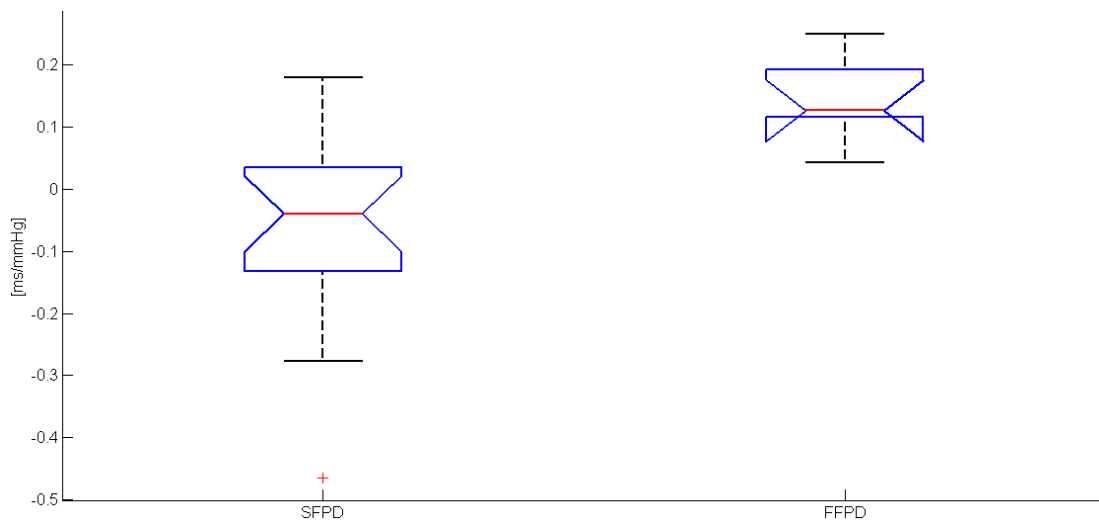
Gruppo	Baseline	30' dopo clamp.	Pre-FPD
<b>FFPD</b>	0.22 ± 0.19	0.32 ± 0.26	0.35 ± 0.21
<b>SFPD</b>	0.33 ± 0.44	0.26 ± 0.23	0.30 ± 0.44

L'analisi statistica della variazione di guadagno tra le epoche considerate conferma la differente attività del baroriflesso nei due gruppi in avvicinamento al momento del Fatal Pressure Drop, evidenziando due trend significativamente differenti ed opposti: il gruppo FFPD presenta infatti un trend crescente, al contrario del gruppo SFPD il cui guadagno nella banda LF tende a diminuire nella finestra considerata (figura 3.22 e tabella 3.24).

**Tabella 3.24** Variazione di guadagno del baroriflesso (ms/mmHg) stimato nella banda LF per ciascun gruppo tra ogni epoca considerata.

Gruppo	30' dopo clamp. - Baseline	Pre-FPD - Baseline	Pre-FPD - 30' dopo clamp*
<b>FFPD</b>	-0.004 ± 0.272	0.138 ± 0.283	0.142 ± 0.072
<b>SFPD</b>	-0.079 ± 0.454	-0.132 ± 0.467	-0.053 ± 0.157

Confronto tra gruppi: \*unpaired t-test p-value <0.01, FFPD vs SFPD.



**Figura 3.22** Variazione del guadagno del baroriflesso stimato nella banda LF nei due gruppi nel periodo compreso tra 30 minuti dopo il clampaggio e l'evento Fatal Pressure Drop, FPD.

L'analisi dei valori di baroriflesso ottenuti con il metodo della funzione di trasferimento non ha evidenziato differenze significative tra gruppi di trattamento farmacologico, come riportato nella tabella 3.25. I risultati non sono risultati significativi anche nel caso della classificazione dei ratti nei gruppi FFPD e SFPD (tabelle 3.26 e 3.27).

**Tabella 3.25** Valori medi del guadagno del baroriflesso (ms/mmHg) stimato nella banda LF per ciascun gruppo e per ciascuna epoca considerata (Baseline, 30 minuti dopo il clampaggio e prima dell'evento *Fatal Pressure Drop*, FPD), calcolati con il metodo della funzione di trasferimento. I dati sono espressi in mediana (25° percentile, 75° percentile).

Gruppo	Baseline	30' dopo clamp.*	Pre-FPD*
A	0.37 (0.33 , 0.52)	0.39 (0.24 , 0.62)	0.24 (0.12 , 0.45)
B	0.48 (0.33 , 0.63)	0.27 (0.20 , 0.51)	0.19 (0.17 , 0.63)
C	0.94 (0.72 , 1.40)	2.13 (1.27 , 2.57)	2.26 (1.08 , 3.98)
D	0.73 (0.49 , 0,87)	0.68 (0.59 , 1.10)	0.74 (0.58 , 1.64)

Confronto tra gruppi: \*Kruskal-Wallis test p-value <0.05.

**Tabella 3.26** Valori medi del guadagno del baroriflesso (ms/mmHg) stimato nella banda LF per ciascun gruppo e per ciascuna epoca considerata (Baseline, 30 minuti dopo il clampaggio e prima dell'evento *Fatal Pressure Drop*, FPD), calcolati con il metodo della funzione di trasferimento. I dati sono espressi in mediana (25° percentile, 75° percentile).

Gruppo	Baseline	30' dopo clamp.	Pre-FPD
FFPD	0.63 (0.28 , 1.04)	0.698 (0.37 , 1.55)	1.08 (0.34 , 3.48)
SFPD	0.68 (0.45 , 0.91)	0.67 ( 0.30 , 1.07)	0.58 (0.35 , 1.38)

**Tabella 3.27** Valori medi del guadagno del baroriflesso (ms/mmHg) stimato nella banda HF per ciascun gruppo e per ciascuna epoca considerata (Baseline, 30 minuti dopo il clampaggio e prima dell'evento *Fatal Pressure Drop*, FPD), calcolati con il metodo della funzione di trasferimento. I dati sono espressi in mediana (25° percentile, 75° percentile).

Gruppo	Baseline	30' dopo clamp.	Pre-FPD
FFPD	1.12 (0.65 , 1.49)	1.26 (1.01 , 1.51)	1.08 (0.65 , 2.49)
SFPD	0.76 (0.58 , 0.95)	0.91 ( 0.63 , 1.05)	0.58 (0.32 , 0.97)

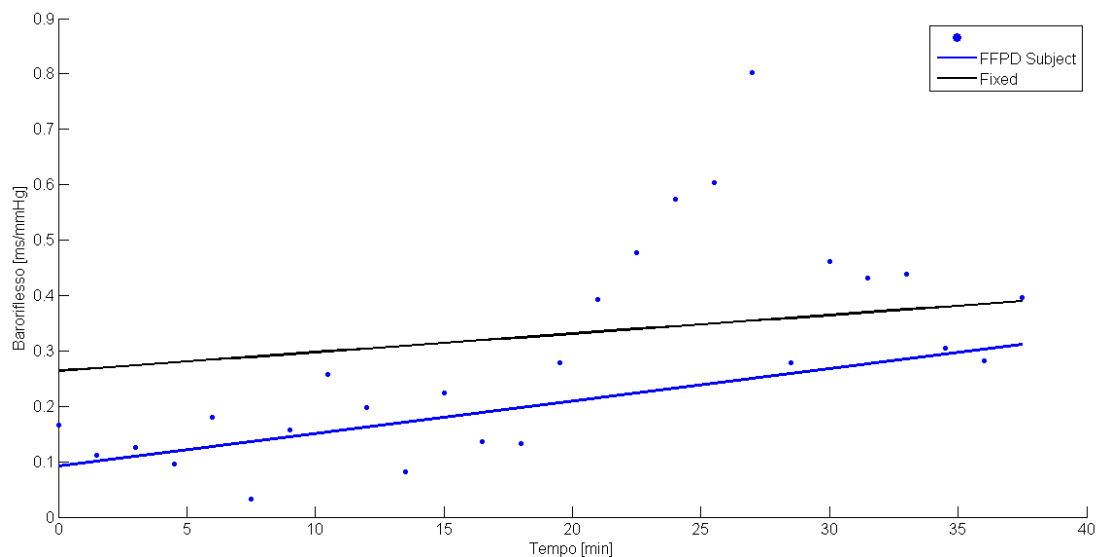
Il comportamento del baroriflesso è stato analizzato anche considerando la serie di valori stimati sugli spezzoni da tre minuti in cui è stata suddivisa la finestra temporale considerata. Sono stati considerati i valori ottenuti con il modello bivariato e stimati nella banda LF. Come si nota nelle figure di seguito riportate i ratti del

gruppo FFPD hanno un numero inferiore di valori di BRS perchè la durata di tale finestra è inferiore.

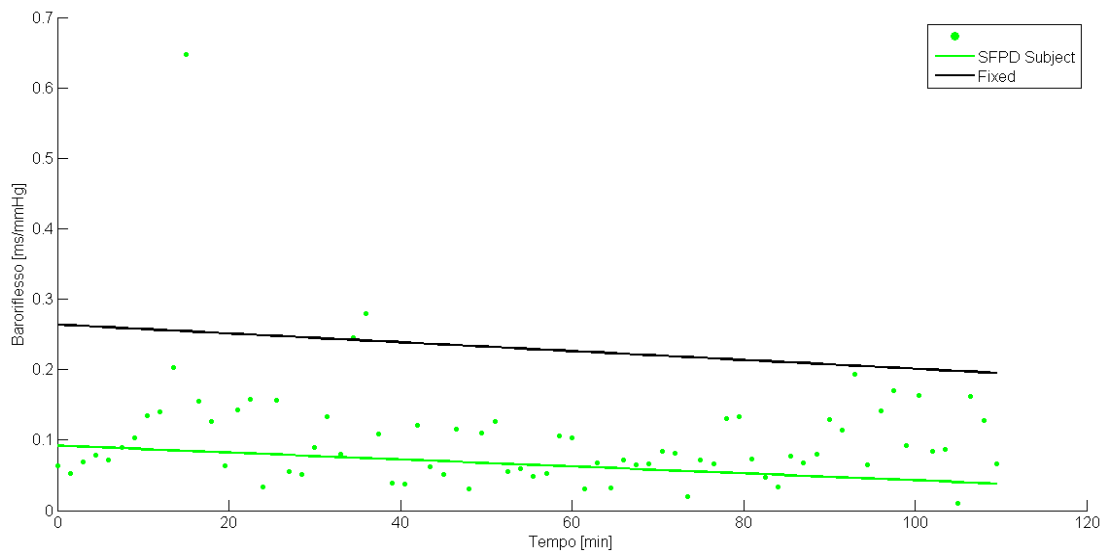
Il metodo Linear Mixed Effect Model ha permesso di ottenere due pendenze differenti per i gruppi FFPD e SFPD, in particolare una pendenza positiva per il primo gruppo ( $0.003 \frac{ms}{mmHg}$ ) e prossima allo zero per il secondo ( $-0.0006$

$\frac{ms}{mmHg}$ ).

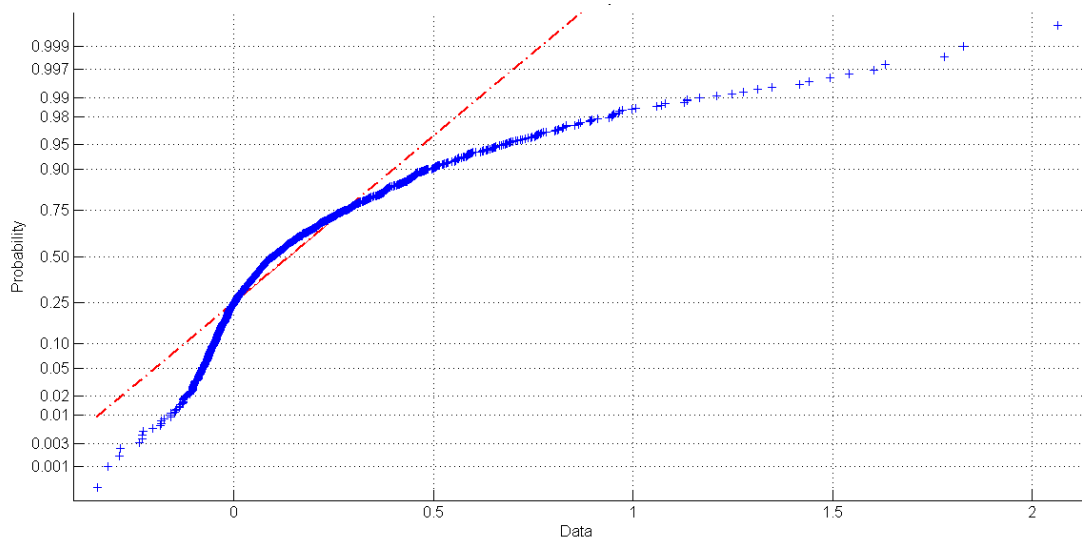
Le figure 3.23 e 3.24 mostrano i valori e le pendenze relative alle distribuzioni dei valori del baroriflesso (in nero si riporta la pendenza relativa al gruppo di appartenenza del ratto considerato mentre in blu la pendenza relativa al singolo soggetto).



**Figura 3.23** Analisi del trend del baroriflesso mediante Linear Mixed Effect Model. In nero la stima dell'effetto fisso dovuto all'appartenenza del ratto al gruppo FFPD. In blu la variabilità soggettiva dovuta al singolo ratto.



**Figura 3.24** Analisi del trend del baroriflesso mediante Linear Mixed Effect Model. In nero la stima dell'effetto fisso dovuto all'appartenenza del ratto al gruppo SFPD. In verde la variabilità soggettiva dovuta al singolo ratto.



**Figura 3.25** Normal Probability Plot dei residui. In rosso la retta che unisce il primo e terzo quartile dei dati e rappresenta una distribuzione normale teorica. In blu sono riportati i valori dei residui, ovvero le differenze tra il reale valore della sensibilità ed il valore stimato dal modello lineare. L'allontanamento dei dati dalla retta esprime un allontanamento dalla distribuzione normale.

## *Capitolo 4*

# **Discussione e Conclusioni**

### ***4.1 Analisi nel dominio del tempo***

I risultati ottenuti dall'analisi nel dominio del tempo delle serie MAP, PP e HP hanno in primo luogo consentito di verificare l'affidabilità dei metodi utilizzati per l'estrazione delle serie stesse dal segnale di pressione arteriosa. I valori di frequenza cardiaca e pressione media riscontrati sono infatti risultati in linea con quanto riportato in letteratura. In particolare, prima dell'occlusione arteriosa sono stati ottenuti, nei ratti non sedati con Xilazina, valori di frequenza cardiaca contenuti in un intervallo di 284-420 bpm, e valori di pressione arteriosa media compresi tra 101 e 126 mmHg. Tali valori risultano confrontabili con quanto riportato nei lavori di letteratura (Davis e Morris, 1993; Olfert et al. 1993; Baldrige et al. ,2002 e Julien et al., 1995) in cui sono presentati i valori fisiologici dei principali parametri emodinamici nei ratti utilizzati in protocolli sperimentali.

I ratti trattati con la Xilazina (gruppi C e D) hanno mostrato nella fase precedente l'occlusione arteriosa valori di pressione media sensibilmente inferiori, compresi tra 59 e 96 mmHg, rispetto agli animali che non hanno ricevuto il farmaco, in accordo con quanto riportato in letteratura riguardo agli effetti della somministrazione di sostanze agoniste dei recettori  $\alpha_2$ -adrenergici sull'apparato cardiocircolatorio (Hsu et al., 1985; Klide et al., 1975; Sanford e Colby, 1980). Inoltre, gli animali di questi medesimi gruppi hanno mostrato valori di frequenza cardiaca mediamente inferiore rispetto agli animali non trattati con Xilazina durante l'intero esperimento, con valori compresi tra 176 e 355 bpm in tutte le epoche considerate. Entrando maggiormente nel dettaglio della suddivisione tra i diversi gruppi di trattamento farmacologico, la somministrazione di Glicopirrolato (Sneyd e Berry, 1991) nel gruppo D ha mostrato effetti sia sui valori di periodo cardiaco, sia sui valori pressori. Sono stati infatti registrati, durante il transitorio successivo all'occlusione arteriosa, valori di frequenza cardiaca (205-355 bpm) maggiori rispetto a quelli dei ratti trattati con Xilazina ma non trattati con vagolitico (189-288 bpm) (gruppo C); inoltre, i valori di pressione pulsatoria non differiscono in modo significativo da quelli dei gruppi A e B in alcuna epoca del transitorio, così come i valori di pressione media a transitorio concluso, ovvero 30 minuti dopo l'occlusione ( $120 \pm 10$  mmHg vs  $131 \pm 8$  mmHg).

Come anticipato nel secondo capitolo, non vi sono in letteratura prove definitive a sostegno di un'azione vagotonica del glucosio sull'apparato cardiocircolatorio; i ratti non trattati con Xilazina ed a cui è stato somministrato glucosio hanno fatto registrare valori di pressione pulsatoria inferiori rispetto a quelli del gruppo B (NoXyl Saline) e confrontabili con quelli dei gruppi trattati con Xilazina in tutte le epoche considerate. Tali animali hanno inoltre mostrato, sia per quanto riguarda i valori assoluti, sia per quanto riguarda i trend, un comportamento intermedio tra quello del gruppo B e quello dei gruppi C e D. Non sono tuttavia presenti in letteratura evidenze di una regolazione parasimpatica della pressione pulsatoria che possano indirizzare questi risultati a sostegno dell'azione vagotonica del glucosio.

Tutti i gruppi, indipendentemente dal trattamento farmacologico, hanno riportato valori di picco della pressione arteriosa, a seguito del clampaggio arterioso, fra loro confrontabili. Tale allineamento nei valori si può giustificare come l'effetto di una risposta simpatica residua, generata dall'ischemia (Fu e Longhurst, 1998; Huang e Longhurst, 1994; Rendig et al., 1994). Infatti, pur essendo la Xilazina nota per i suoi effetti simpatolitici, il dosaggio utilizzato in questo studio (4 mg/kg) non è sufficiente per giustificare un blocco simpatico totale (l'effetto del Rompun, nome commerciale di un farmaco della Bayer corrispondente al principio attivo della Xilazina, si prevede che sia completo per dosaggi, nel ratto, compresi fra 10 e 15 mg/kg). Pertanto, in presenza del forte stimolo simpatico rappresentato dall'ischemia e della non completezza del blocco simpatico dovuto al ridotto dosaggio di Xilazina, i risultati presentati suggeriscono che vi sia una responsività residua del sistema simpatico e che questa prevalga rispetto all'effetto inibitore del farmaco.

Le serie MAP, HP e PP sono state inoltre valutate nella finestra temporale compresa tra 30 minuti dopo l'occlusione arteriosa ed il *Fatal Pressure Drop*; l'analisi del differente comportamento dei ratti appartenenti al gruppo FFPD rispetto a quelli appartenenti al gruppo SFPD, ha in particolare fornito risultati interessanti al fine di far luce sulla natura dei meccanismi coinvolti nella morte improvvisa. In particolare, è stato evidenziato come i ratti FFPD presentino un decremento di pressione media e pulsatoria meno marcato rispetto ai ratti SFPD (figura 3.12 e 3.15). Come evidenziato dall'analisi del trend di HP, questi ultimi reagiscono al calo pressorio incrementando la frequenza cardiaca, nel tentativo di riportare la pressione a livelli fisiologici. Gli animali appartenenti al gruppo FFPD, al contrario, nell'approssimarsi al *Fatal Pressure Drop* riportano un decremento della frequenza cardiaca. Questo risultato appare coerente con l'ipotesi, formulata da Penn et al. (2011), di un meccanismo vagale responsabile del collasso improvviso che caratterizza gli animali FFPD, dal momento che un'attivazione vagale avrebbe, tra le sue implicazioni, anche un rallentamento del battito. L'incremento dell'attività del sistema nervoso parasimpatico potrebbe in tal modo contribuire a spiegare l'improvviso crollo pressorio ed il collasso di questi animali.

In parallelo con le considerazioni proposte da Penn (2011) sull'ipotesi di un ruolo del sistema vagale, occorre considerare anche, in un contesto di valutazione della cosiddetta bilancia simpato-vagale, quello che potrebbe essere il ruolo del sistema simpatico. Il mantenimento della pressione, nel corso di un progressivo deterioramento della funzionalità cardiovascolare e del suo controllo, potrebbe essere imputato alla capacità del sistema simpatico di compensare gli effetti scatenati dall'ischemia attraverso un incremento della resistenza periferica e possibilmente una stabilizzazione della frequenza cardiaca, posto che il controllo baroriflesso della frequenza sia almeno in parte mantenuto, pur sotto anestesia. L'attivazione simpatica che potrebbe spiegare il mantenimento della stabilità emodinamica potrebbe non rivelarsi sufficiente in presenza dell'instaurarsi della prevalenza del sistema vagale, non solo per un' incrementata attività parasimpatica, ma anche per il possibile insorgere di due meccanismi ipotizzati in letteratura e riportati in precedenza: (i) l'insostenibilità di un'attivazione simpatica protratta indefinitamente nel tempo o (ii) la saturazione del sistema simpatico, impossibilitato ad attivarsi al di sopra di una certa soglia.

Inoltre, ad ulteriore sostegno dell'ipotesi di un coinvolgimento del sistema parasimpatico nel crollo improvviso di pressione, il trattamento dei ratti con Glicopirrolato, cioè un di un vagolitico, si è dimostrato efficace nel prevenire il manifestarsi di FFPD (nessuno dei 7 animali che hanno ricevuto glicopirrolato ha infatti sofferto di collasso cardiovascolare e morte improvvisa).

## ***4.2 Heart Rate Characteristics***

L'analisi della *Heart Rate Characteristics* (HRC) è stata svolta con un duplice intento: (i) caratterizzare i trend complessivi delle serie MAP, HP e PP che portano alla morte dell'animale, e (ii) sviluppare una tecnica di individuazione automatica dei fenomeni di *drop/recovery* della pressione media mostrati da alcuni dei ratti appartenenti al gruppo FFPD.

Nel primo caso, il metodo utilizzato ha confermato quanto evidenziato dall'analisi nel dominio del tempo riguardo il trend della frequenza cardiaca; è stato dunque possibile quantificare da un punto di vista matematico la prevalenza, nei ratti

del gruppo FFPD, di episodi di bradicardia o rallentamento della frequenza cardiaca, ed in quelli del gruppo SFPD di episodi di tachicardia o aumento della frequenza cardiaca. Tale prevalenza dei primi piuttosto che dei secondi, si riflette complessivamente nel trend della frequenza cardiaca, positivo per gli animali SFPD e negativo per quelli FFPD. Questo risultato supporta ulteriormente l'ipotesi di un differente coinvolgimento del sistema nervoso parasimpatico nel controllo cardiovascolare nei due gruppi.

I fenomeni di crollo ed immediato recupero della pressione sono stati imputati, nella fase di stesura delle ipotesi di lavoro, ad una transitoria attenuazione dell'attività simpatica, e dunque all'effetto di una possibile attività vagale non compensata; un fenomeno dunque analogo al *Fast Fatal Pressure Drop* che porta l'animale alla morte, ma con un crollo pressorio di minore entità e dunque recuperabile grazie ad una tempestiva riattivazione del sistema nervoso simpatico. L'analisi della HRC applicata al segnale di pressione ha dimostrato di poter essere una potenziale soluzione per la caratterizzazione di tali fenomeni, come risulta evidente dalla figura 3.20. Affinché questa tecnica possa essere implementata in modo automatico per l'identificazione dei crolli pressori, è tuttavia necessario perfezionare le soglie in modo da separare questi fenomeni dalle normali oscillazioni legate alla variabilità fisiologica del segnale.

### **4.3 Baroriflesso cardiaco**

L'analisi dei risultati dell'analisi della sensitività del baroriflesso ha permesso una stima dei valori di sensitività che sono risultati coerenti con quanto riportato nei lavori di Su e Miao (2002) e di Yoshino et al. (2005). I risultati hanno evidenziato una differenza significativa tra i gruppi FFPD e SFPD; in particolare, gli animali appartenenti al primo gruppo hanno mostrato un trend positivo di sensitività del baroriflesso nella banda LF, mentre i ratti appartenenti al secondo non hanno fatto registrare alcun trend statisticamente significativo nell'avvicinarsi al *Fatal Pressure Drop*. Questo risultato può essere interpretato alla luce delle considerazioni e delle ipotesi esposte nei paragrafi precedenti riguardo al ruolo del sistema parasimpatico nella morte improvvisa di alcuni animali. Supportati anche dall'assenza di un

marcato trend del baroriflesso nei ratti trattati con vagolitico, possiamo ipotizzare che l'aumento della sensibilità in banda LF rappresenti un tentativo di compensazione simpatica della possibile attivazione vagale. La diminuzione della pressione media, che nei ratti SFPD è contrastata dall'aumento della frequenza cardiaca indotto dall'azione del baroriflesso, negli animali appartenenti al gruppo FFPD è invece accompagnata da una contestuale diminuzione di frequenza cardiaca. L'aumento di sensibilità potrebbe di conseguenza essere dovuto all'apparente inefficacia del riflesso barocettivo ed avere per obiettivo il ripristino di livelli fisiologici di pressione, agendo sul periodo cardiaco. A sostegno di quanto ipotizzato, l'azione del baroriflesso si riflette sulla pressione media, che nei ratti FFPD viene mantenuta a livelli più alti grazie alla vasocostrizione indotta dall'attività simpatica, nonostante la progressiva bradicardia/rallentamento del ritmo cui gli animali vanno incontro.

#### **4.4 Conclusioni**

Riassumiamo in questa sezione le considerazioni più rilevanti fatte nei precedenti paragrafi sulla base dei risultati ottenuti:

- I valori di pressione e durata del ciclo cardiaco ottenuti per i ratti non trattati con Xilazina sono risultati confrontabili con quanto riportato in letteratura (Davis e Morris, 1993; Olfert et al. 1993; Baldrige et al. ,2002 e Julien et al., 1995).
- I valori di pressione media e di frequenza cardiaca sono risultati inferiori nei ratti trattati con Xilazina, coerentemente con quanto noto dalla letteratura riguardo gli effetti di sostanze agoniste dei recettori  $\alpha_2$ adrenergici sull'apparato cardiocircolatorio (Hsu et al., 1985; Klide et al., 1975; Sanford e Colby, 1980). A seguito dell'insorgere dell'ischemia, i valori di MAP sono tuttavia risultati confrontabili fra tutti i gruppi; tale risultato suggerisce il mantenimento di una certa responsività simpatica anche nei gruppi trattati con Xilazina, probabilmente a causa del ridotto dosaggio somministrato agli animali (4 mg/kg).

- Il trend dei valori di pressione media e pressione pulsatoria nell'avvicinamento alla morte dell'animale ha evidenziato decrementi inferiori per i ratti del macro-gruppo FFPD, a sostegno dell'ipotesi di compensazione simpatica fino al crollo irreversibile della pressione, legato a: (i) insostenibilità di un'attivazione simpatica eccessivamente prolungata nel tempo, oppure (ii) disattivazione del sistema simpatico al raggiungimento di una determinata soglia di attività.
- La diminuzione di frequenza cardiaca rilevata nei ratti del macro-gruppo FFPD all'approssimarsi del *Fatal Pressure Drop* è coerente con l'ipotesi di un meccanismo vagale alla base della morte improvvisa; tale ipotesi è inoltre supportata dal comportamento dei ratti trattati con Glicopirrolato, un parasimpatolitico, nessuno dei quali ha presentato FFPD.
- A sostegno dell'esistenza di un meccanismo vagale è anche la prevalenza nei ratti FFPD di episodi di diminuzione della frequenza cardiaca nell'avvicinamento alla morte, evidenziata dall'applicazione dell'algoritmo HRC.
- L'aumento della sensibilità del baroriflesso in banda LF nei ratti appartenenti al gruppo FFPD può essere interpretato come un tentativo di compensazione simpatica della possibile attivazione vagale. Come detto, la diminuzione della pressione media è accompagnata, in questi animali, da una contestuale diminuzione di frequenza cardiaca. L'aumento di sensibilità potrebbe di conseguenza essere dovuto all'apparente inefficacia del riflesso barocettivo ed avere per obiettivo il ripristino di livelli fisiologici di pressione, mediante l'azione sulla frequenza cardiaca. A sostegno di quanto ipotizzato, l'azione del baroriflesso si riflette sulla pressione media, che nei ratti FFPD viene mantenuta a livelli più alti grazie alla vasocostrizione indotta dall'attività simpatica, nonostante la progressiva bradicardia/rallentamento del ritmo cui gli animali vanno incontro. L'aumento della sensibilità nella banda LF va inoltre a rafforzare l'ipotesi di responsività simpatica residua negli animali trattati con Xilazina.

### ***4.5 Limitazioni***

Una delle potenziali limitazioni del presente lavoro è rappresentata dal numero di animali inclusi nello studio. Il paper pubblicato da Penn et al. (2011), che riportava una serie di dati ottenuti dall'esperimento considerato in questa tesi, includeva un numero di animali ben superiore per ciascuno dei quattro gruppi di ratti studiati. Tuttavia, solo per gli animali inclusi nella presente tesi sono state raccolte misure di pressione sufficientemente fedeli (frequenza di campionamento 1000 Hz) per eseguire le analisi che sono state presentate.

Un altro elemento potenzialmente critico è rappresentato dalle caratteristiche dei gruppi di animali previsti dal design sperimentale. L'interpretazione dei risultati ottenuti, avrebbe potuto beneficiare di gruppi di trattamento più modulari, in modo da avere tra due differenti gruppi la variazione di un solo parametro del trattamento; sarebbe ad esempio risultato utile disporre di un gruppo trattato con Xilazina e soluzione salina per isolare gli effetti della Xilazina da quelli legati alle altre sostanze, ed analogamente di un gruppo di ratti trattati con il solo Glicopirrolato.

La presenza di altre misure sperimentali avrebbe inoltre permesso di avere un quadro più completo della fisiopatologia associata con l'ischemia intestinale. Per esempio, di estremo interesse sarebbe stato poter contare su misure continue di flusso aortico, che avrebbero permesso di ottenere informazioni sulla regolazione battito-battito dello stroke volume, così da complementare le osservazioni proposte in questo lavoro sulla frequenza cardiaca.

#### ***4.6 Sviluppi futuri***

I risultati ottenuti sono coerenti con le ipotesi di lavoro delineate nella fase iniziale, ma suggeriscono l'importanza di ulteriori analisi sui dati a disposizione, al fine di rafforzare gli elementi a sostegno degli argomenti portati a conclusione del lavoro. In particolare, l'analisi spettrale delle serie estratte dal segnale pressorio risulta di sicuro interesse ed utilità, al fine di comprendere in modo più completo i meccanismi di attivazione del sistema nervoso autonomo e di spostamento degli equilibri della bilancia simpato-vagale. Inoltre, l'interpretazione dei dati risulterebbe notevolmente arricchita dalla possibilità di valutare congiuntamente serie estratte dal segnale pressorio e stime indirette di *cardiac output* e *stroke volume*, che consentirebbero di avere una visione più completa del comportamento del cuore e del suo controllo nervoso.

## **Bibliografia**

Barroso-Aranda J., Schmid-Schonbein G.W. (1989). Transformation of neutrophils as indicator of irreversibility in hemorrhagic shock. *American Journal of Physiology*, 257 (3): 846-852.

Baldrige B.R., Burgess D.E., Zimmerman E.E., Carrol J.J., Spinkle A.G., Speakman R.O., Li S.-G., Brown D.R., Taylor R.F., Dworkin S., Randall D.C. (2002). Heart rate – arterial blood pressure relationship in conscious rat before vs after spinal cord transection. *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 283: 748-756.

Bhatia V., Rarick K.R., Stauss H.M. (2010). Effect of the data sampling rate on accuracy of indices for heart rate and blood pressure variability and baroreflex function in resting rats and mice. *Physiological Measurement*, 31: 1185-1201.

Cerutti C., Gustin M.P., Paultre C.Z., Lo M., Julien C., Vincent M., Sassard J. (1991). Autonomic nervous system and cardiovascular variability in rats: a spectral analysis approach. *American Journal of Physiology – Heart Circulation Physiology*, 261: 1292-1299.

## *Bibliografia*

Chang M., Kistler E.B., Schmid-Schonbein G.W. (2012<sup>a</sup>). Disruption of the mucosal barrier during gut ischemia allows entry of digestive enzymes into the intestinal wall. *Shock*, 37(3): 297-305.

Chang M., Kistler E.B., Schmid-Schonbein G.W. (2012<sup>b</sup>). Breakdown of mucin as barrier to digestive enzymes in the ischemic rat small intestine. *Plos One*, 7(6): e40087.

Convertino V.A., Cooke W.H. (2002). Relationship between stroke volume and sympathetic nerve activity: new insights about autonomic mechanisms of syncope. *Journal of Gravitational Physiology*, 9: 63-66.

Cooke W.H., Convertino V.A. (2002). Association between vasovagal hypotension and low sympathetic neural activity during presyncope. *Clinical Autonomic Research*, 12: 483-486.

Cooke W.H., Ryan K.L, Convertino V.A. (2004). Lower body negative pressure as a model to study progression to acute hemorrhagic shock in humans. *Journal of Applied Physiology*, 96:1249-1261.

Crystal G.J., Salem M.R. (2012). The Bainbridge and the “reverse” Bainbridge reflexes: history, physiology, and clinical relevance. *Anesthesia & Analgesia*, 114(3): 520-532.

Davies B., Morris T. (1993). Physiological parameters in laboratory animals and humans. *Pharmaceutical Research*, 10 (7): 1093-1095.

Dorantes-Mendez G., Aletti F., Toschi N., Canichella A., Dauri M., Coniglione F., Guerrisi M., Signorini M.G., Cerutti S., Ferrario M. (2013). Baroreflex sensitivity variations in response to propofol anesthesia: comparison between normotensive and hypertensive patients. *Journal of Clinical Monitoring and Computing*.

Ferrario M., Raimann J.G., Thijssen S., Signorini M.G., Kruse A., Diaz-Buxo J.A., Cerutti S., Levin N.W., Kotanko P. (2011). Effects of dialysate glucose concentration on heart rate variability in chronic hemodialysis patients: results of a prospective randomized trial. *Kidney and Blood Pressure Research*, 34: 344-349.

## *Bibliografia*

Fitzal F., Delano F.A., Young C., Rosario H.S., Junger W.G., Schmid-Schonbein G.W. (2003). Pancreatic enzymes sustain systemic inflammation after an initial endotoxin challenge. *Surgery*, 134 (3): 446-456.

Fu L.W., Longhurst J.C. (1998). Role of 5-HT<sub>3</sub> receptors in activation of abdominal sympathetic C fibre afferents during ischaemia in cats. *Journal of Physiology*, 509(3): 729-740.

Guyton A.C., Hall J.E. (2002). *Fisiologia Medica* (II edizione), EdiSES.

Hsu W.H., Lu Z.X., Hembrough F.B. (1985). Effect of xylazine on heart rate and arterial blood pressure in conscious dogs, as influenced by atropine, 4-aminopyridine, doxapram, and yohimbine. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 186(2): 153-156.

<http://www.about-pharmacology.com/2012/10/organization-of-autonomic-nervous-system.html> (2012).

Huang H.S., Longhurst J.C. (1994). Cardiovascular reflexes during abdominal ischemia in cats. *American Journal of Physiology*, 267: 97-106.

Ishimaru K., Mitsuoka H., Unno N., Inuzuka K., Nakamura S., Schmid-Schonbein G.W. (2004). Pancreatic proteases and inflammatory mediators in peritoneal fluid during splanchnic arterial occlusion and reperfusion. *Shock*, 22 (5): 467-471.

Japundzic N., Grichois M.-L., Zitoun P., Laude D., Elghozi J.-L. (1990). Spectral analysis of blood pressure and heart rate in conscious rats: effects of autonomic blockers. *Journal of the Autonomic Nervous System*, 30: 91-100.

Julien C., Zhang Z.-Q., Cerutti C., Barrés C. (1995). Hemodynamic analysis of arterial pressure oscillations in conscious rats. *Journal of the Autonomic Nervous System*, 50: 239-252.

Kanaley J.A., Baynard T., Franklin R.M., Weinstock R.S., Goulopoulou S., Carhart R. Jr., Ploutz-Snyder R., Figueroa A., Fernhall B. (2007). The effects of a glucose load and sympathetic challenge on autonomic function in obese women with and without type 2 diabetes mellitus. *Metabolism*, 56 (6): 778-785.

## *Bibliografia*

- Klide A.M., Calderwood H.W., Soma L.R. (1975). Cardiopulmonary effects of xylazine in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 36(7): 931-935.
- La Rovere M.T., Pinna G.D., Raczak G. (2008). Baroreflex sensitivity: measurement and clinical implications. *Annals of noninvasive electrocardiology*, 13 (2): 191-207.
- Laude D., Elghozi J.-L., Girard A., Bellard E., Bouhaddi M., Castiglioni P., Cerutti C., Cividjan A., Di Rienzo M., Fortrat J.-O., Janssen B., Karemaker J.M., Lefthériotis G., Parati G., Persson P.B., Porta A., Quintin L., Regnard J., Rüdiger H., Stauss H.M. (2002). Comparison of various techniques used to estimate spontaneous baroreflex sensitivity (the EuroBaVar study). *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 286: 226-231.
- Longhurst J.C, Rotto D.M, Kaufman M.P., Stahl G.L. (1991). Ischemically sensitive abdominal visceral afferents: response to cyclooxygenase blockade. *American Journal of Physiology*, 261 (6): 2075-2081.
- Mitsuoka H., Kistler E.B., Schmid-Schonbein G.W. (2000). Generation of in vivo activating factors in the ischemic intestine by pancreatic enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 97 (4): 1772-1777.
- Moorman J.R., Lake D.G., Griffin M.P. (2006). Heart Rate Characteristics monitoring for neonatal sepsis. *IEEE transactions on biomedical engineering*, 53 (1).
- Olfert E.D., Cross B.M., McWilliam A.A. (1993). Guide to the care and use of experimental animals. Canadian Council on Animal Care.
- Penn A.H., Schmid-Schonbein G.W. (2008). The intestine as source of cytotoxic mediators in shock: free fatty acids and degradation of lipid-binding proteins. *American Journal of Physiology-Heart Circulation Physiology*, 294 (4): 1779-1792.
- Penn A.H., Schmid-Schonbein G.W. (2011). Severe intestinal ischemia can trigger cardiovascular collapse and sudden death via a parasympathetic mechanism. *Shock*, 36 (3): 251-262.

## *Bibliografia*

- Pinna G.D., Maestri R., Raczak G., La Rovere M.T. (2002). Measuring baroreflex sensitivity from the gain function between arterial pressure and heart period. *Clinical science*, 103: 81-88.
- Rendig S.V., Chahal P.S., Longhurst J.C. (1997). Cardiovascular reflex responses to ischemia during occlusion of celiac and/or superior mesenteric arteries.. *American Journal of Physiology*, 272(2 Pt 2): 791-796.
- Sanford T.D., Colby E.D. (1980). Effect of xylazine and ketamine on blood pressure, heart rate and respiratory rate in rabbits. *Laboratory Animal Science*, 30(3): 519-523.
- Schmid-Schonbein G.W. (2009). Inflammation and autodigestion hypothesis. *Microcirculation*, 16 (4): 289-306.
- Sneyd J.R., Berry A. (1991). Effect of preinduction Glycopyrrolate on the hemodynamic response to anesthesia with Propofol. *Anesthesia & Analgesia*, 72: 831-834.
- Stauss H.M., Moffit J.A., Chapleau M.W., Abboud F.M., Johnson A.K. (2006). Baroreceptor reflex sensitivity estimated by the sequence technique is reliable in rats. *American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology*, 291: 482-483.
- Su D.F., Miao C.Y. (2002). Arterial baroreflex function in conscious rats. *Acta Pharmacologica Sinica*, 23 (8): 673-679.
- Swenne A.C. (2013). Baroreflex Sensitivity: mechanisms and measurement. *Netherlands Heart Journal*, 21 (2): 58-60.
- Tanaka M., Nishikawa T. (2005). The concentration-dependent effects of general anesthesia on spontaneous baroreflex indices and their correlations with pharmacological gains. *Anesthesia & Analgesia*, 100: 1325-1332.
- Wessel N., Voss A., Malberg H., Ziehm Ch., Voss H.U., Schirdewan A., Meyerfeldt U., Kurths J. (2000). Nonlinear analysis of complex phenomena in cardiological data. *Herzschrittmachertherapie & Elektrophysiologie*, 11(3): 159-173.

## *Bibliografia*

Wyller V.B., Barbieri R., Saul P.J. (2011). Blood pressure variability and closed-loop baroreflex assessment in adolescent chronic fatigue syndrome during supine rest and orthostatic stress. *European Journal of Applied Physiology*, 111: 497-507.

Yoshino K., Hayawaka M., Niki E., Matsuoka K. (2005). Closed-loop analysis of cardiovascular variability in rats under restraint stress. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, 119: 61-66.

Young C.N., Davisson R.L. (2011). In vivo assessment of neurocardiovascular regulation in the mouse: principles, progress, and prospects. *American Journal of Physiology-Heart Circulation Physiology*, 301: 654-662.

Zong W., Heldt T., Moody G.B., Mark R.G. (2003). An open-source algorithm to detect onset of arterial blood pressure pulses. *Computers in Cardiology*, 30: 259-262.