

POLITECNICO DI MILANO
Scuola di Ingegneria Industriale e Informazione
Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica



DESCRIZIONE DELLE DINAMICHE DI PRESSIONE ARTERIOSA E BATTITO
CARDIACO ATTRAVERSO INDICI SPETTRALI E NON LINEARI DURANTE
ISCHEMIA INTESTINALE PROLUNGATA

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

Tesi di laurea di:
Stefano FERLISI
Matr. 770821

Sommario	7
Summary	11
Capitolo 1	15
1.1 Shock circolatorio e ischemia intestinale.....	15
1.2 Il Sistema Nervoso Autonomo (SNA).....	19
1.3 Obiettivi del lavoro.....	22
Capitolo 2	25
2.1 Protocollo sperimentale.....	25
2.2 Acquisizione del segnale di pressione e preprocessing.....	28
2.2.1 Suddivisione del segnale in finestre di analisi.....	29
2.2.2 Calcolo delle serie di variabilità.....	30
2.2.3 Campionamento del segnale.....	34
2.3 Metodi lineari e non lineari per l'analisi delle serie temporali di variabilità cardiaca.....	36
2.4 Analisi nel dominio del tempo.....	39
2.5 Analisi nel dominio delle frequenze.....	41
2.5.1 Calcolo della potenza nelle bande spettrali.....	42
2.5.2 Linear Mixed Effect model (LME).....	43
2.6 Calcolo dell'Approximate Entropy e della Sample Entropy.....	45
2.7 Corrected Conditional Entropy.....	48
2.8 Analisi statistiche.....	52
Capitolo 3	53
3.1 Caratteristiche della popolazione.....	53
3.1.1 Aritmie cardiache.....	54
3.1.2 Considerazioni generali sullo spettro di potenza.....	58
3.2 Analisi della manovra di occlusione nel dominio del tempo.....	66
3.2.1 Pressione media.....	67
3.2.2 Frequenza cardiaca.....	67
3.2.3 Pressione pulsatoria.....	68
3.3 Analisi della manovra di occlusione nel dominio delle frequenze.....	68
3.3.1 Pressione media.....	68
3.3.2 Ciclo cardiaco.....	73

Indice

3.3.3 Pressione Pulsatoria	77
3.4 Evoluzione verso il collasso: analisi nel dominio del tempo	83
3.4.1 Pressione Media.....	84
3.4.2 Frequenza cardiaca	84
3.4.3 Pressione pulsatoria	85
3.4.4 Confronto tra i gruppi FFPD e SFPD	85
3.5 Evoluzione verso il collasso: Analisi nel dominio delle frequenze	87
3.5.1 Pressione Media.....	87
3.5.2 Ciclo cardiaco	94
3.5.3 Pressione pulsatoria	100
3.5.4 Linear mixed effect model (LME).....	105
3.6 Approximate Entropy	108
3.6.1 Pressione media	108
3.6.2 Ciclo cardiaco	110
3.7 Sample Entropy	112
3.7.1 Pressione media	113
3.7.2 Ciclo cardiaco	114
3.8 Corrected Conditional Entropy.....	116
3.8.1 Pressione media	117
3.8.2 Ciclo cardiaco	118
Capitolo 4.....	121
4.1 Analisi della manovra di occlusione nel dominio del tempo.....	121
4.1.1. Pressione media	121
4.1.2 Frequenza cardiaca	123
4.1.3 Pressione pulsatoria	123
4.2. Analisi della manovra di occlusione nel dominio delle frequenze	124
4.2.1 Pressione media	124
4.2.2 Ciclo cardiaco	125
4.2.3 Pressione pulsatoria	127
4.3 Evoluzione verso il collasso: analisi nel dominio del tempo.....	128
4.3.1 Pressione media	128
4.3.2 Ciclo cardiaco	128
4.3.1 Pressione pulsatoria	129
4.4 Evoluzione verso il collasso: analisi nel dominio delle frequenze	130
4.4.1 Pressione media	130
4.4.2 Ciclo cardiaco	130

Indice

4.4.3 Pressione pulsatoria	131
4.5 Confronto tra FFPD e SFPD	131
4.5.1 Analisi temporale.....	132
4.5.2 Analisi in frequenza.....	133
4.6 Approximate Entropy e Sample Entropy.....	134
4.7 Corrected Conditional Entropy.....	135
4.8 Conclusioni.....	135
4.8.1 Effetti del trattamento farmacologico.....	135
4.8.2 Effetti dell'occlusione delle arterie splanchniche (SAO)	136
4.8.3 Attivazione simpatica indotta dall'ischemia.....	137
4.8.4 Meccanismi alla base del Fast fatal pressure drop.....	137
4.8.5 Utilità dei parametri non lineari.....	139
4.9 Limitazioni.....	139
4.10 Sviluppi futuri.....	140
<i>Bibliografia.....</i>	<i>141</i>

Sommario

Questo lavoro di tesi nasce dalla volontà di integrare e approfondire gli studi svolti da Penn e Schmid-Schonbein (2011) riguardanti i meccanismi coinvolti nella risposta autonoma e nel suo effetto sulla regolazione della funzione cardiovascolare durante ischemia intestinale nel ratto. In studi sperimentali, in cui lo shock è stato indotto tramite ipovolemia o occlusione delle arterie splanchniche (SAO) seguita da ri-perfusione, si è osservato un progressivo abbassamento della pressione arteriosa che porta alla morte nell'arco di poche ore. I meccanismi responsabili di tale evoluzione fatale della patologia non sono ancora del tutto chiari ma diversi studi hanno evidenziato che il danno d'organo susseguente alla ischemia e ri-perfusione intestinale è legato al passaggio di enzimi dal lume alle pareti intestinali ed all'attivazione di mediatori infiammatori (Barroso-Aranda e Schmid-Schonbein, 1989; Penn e Schmid-Schonbein, 2008). Nello studio di Penn e Schmid-Schonbein (2011) sono stati osservati fenomeni di instabilità emodinamica di altra natura; in particolare, un modello animale di SAO non seguita da ri-perfusione ha mostrato che la morte può avvenire anche durante l'ischemia (i) dopo un graduale abbassamento della pressione arteriosa (*Slow Fatal Pressure Drop*, SFPD), oppure (ii) in seguito ad un repentino crollo della pressione arteriosa (*Fast Fatal Pressure Drop*, FFPD). A causare tale evento sarebbe uno scompenso nell'attività del sistema nervoso autonomo (SNA), in

particolare una depressione del tono simpatico accompagnata da un'attività vagale non compensata, la quale, anche se di breve durata, avrebbe come effetto la depressione repentina dell'attività cardiaca. In questi frangenti, se il tono simpatico non viene recuperato prontamente, si raggiungono livelli critici di ipotensione e di bradicardia, nonché di ridotto ritorno venoso e limitata contrattilità ventricolare, il cui effetto netto può consistere in una scomparsa del polso, che risulta fatale in tempi rapidissimi, se non si procede a manovre di rianimazione tempestive.

L'obiettivo principale di questo lavoro di tesi è indagare il ruolo del SNA nella risposta al danno indotto dall'ischemia intestinale protratta e chiarire come una risposta autonoma inadeguata possa determinare un FFPD e quindi la morte. Una più profonda comprensione dei meccanismi alla base del controllo autonomo in un modello animale rappresenta un passaggio fondamentale nella definizione delle implicazioni sistemiche dell'ischemia intestinale, necessario a raccogliere evidenze sperimentali utili allo sviluppo di terapie più efficaci per il trattamento di pazienti umani.

Nel **Capitolo 1** saranno discusse gli effetti sulla circolazione e la funzione cardiovascolare dell'ischemia intestinale indotta tramite occlusione delle arterie splanchniche. Tratteremo brevemente i meccanismi di risposta messi in atto dall'organismo a tale condizione di shock con particolare attenzione al ruolo del Sistema Nervoso Autonomo. Nel corso del capitolo cercheremo di spiegare meccanismi che portano alla morte in seguito alla riperfusione, introdurremo i fenomeni di FFPD e SFPD e presenteremo le ipotesi che sono state avanzate per spiegare questi due fenomeni e che questo lavoro di tesi si propone di verificare.

Nel **Capitolo 2** descriveremo il protocollo sperimentale e le modalità di registrazione dei dati, illustreremo in che modo sono stati trattati i segnali originali di pressione arteriosa prima di essere analizzati. In particolare, ci soffermeremo sull'estrazione delle serie battito-battito di variabilità dal segnale registrato: Pressione Arteriosa Media (PAM), Pressione Pulsatoria (PP) e ciclo cardiaco. Spiegheremo in questo capitolo le scelte riguardanti le finestre temporali su cui è stata svolta l'analisi nel dominio del tempo e della frequenza ed introdurremo gli indici temporali e spettrali utilizzati nelle analisi svolte. Infine, verranno illustrati in dettaglio i metodi di calcolo dell'Approximate Entropy (ApEn), della Sample Entropy (SampEn) e della Corrected Conditional Entropy (CCE).

Nel **Capitolo 3** riporteremo i principali risultati ottenuti mediante l'applicazione dei metodi illustrati nel capitolo precedente. La presentazione dei risultati è suddivisa in due parti: (i) analisi della manovra di occlusione e (ii) evoluzione verso il collasso. Per ciascuna verranno riportati gli indici temporali e quelli spettrali ottenuti, rispettivamente, dell'analisi nel dominio del tempo e dall'analisi nel dominio delle frequenza condotte sulle serie di pressione arteriosa e del periodo cardiaco.

Nel **Capitolo 4**, infine, discuteremo i risultati ottenuti alla luce delle considerazioni di natura teorica ed alle ipotesi di lavoro iniziali esposte nel capitolo introduttivo. La discussione seguirà lo stesso ordine con cui sono stati presentati i risultati nel capitolo 3. Il calcolo degli indici spettrali, insieme all'analisi dei *trend* delle serie di pressione media e del periodo cardiaco, ha permesso di chiarire le dinamiche che derivano dal blocco della circolazione arteriosa addominale. Lo studio approfondito del collasso, tramite le tecniche di analisi presentate nel secondo capitolo, ha permesso, inoltre, di verificare l'ipotesi iniziale e di approfondire il ruolo del sistema nervoso simpatico nei fenomeni di crollo improvviso della pressione arteriosa. In sintesi, si è formulata l'ipotesi dell'intervento di un meccanismo di saturazione per il quale, superata una certa soglia di attivazione, viene indotta la depressione del tono simpatico ed in congiunzione con tale fenomeno, la bilancia simpato-vagale si sposta nel senso di una chiara prevalenza del controllo vagale. La combinazione di questi due fattori si traduce in un aumentato rischio di collasso improvviso

Summary

The aim of this work is to complete the study conducted by Penn and Schmid-Schonbein (2011) about the mechanism involved in the autonomous response and its effect on the regulation of cardiovascular function during gut ischemia in the rat.

Rat models of shock including splanchnic arterial occlusion followed by reperfusion showed a central pressure blood reduction until death. The mechanisms responsible for the fatal evolution of the pathology have not been fully elucidated yet, but several studies have shown that the organ injury following ischemia and reperfusion of the intestines is related to the translocation of digestive enzymes from the lumen into the wall of the intestine and with the activation of inflammatory mediators (Barroso-Aranda e Schmid-Schonbein, 1989; Penn e Schmid-Schonbein, 2008).

Penn and Schmid-Schonbein (2011) have, however, observed in a rat model of shock including SAO that death may occur also, prior to reperfusion, during ischemia (i) after a gradual decrease in blood pressure (slow fatal pressure drop, SFPD) or (ii) with a sudden pressure drop (fast fatal pressure drop, FFPD). Autonomic nervous system (ANS) failure can cause FFPD. In particular, a depressed sympathetic tone with an unbalanced vagal discharge causes a decrease in heart rate. In this instance, if this parasympathetic activity is not quickly balanced by the recovery of the sympathetic tone, arterial pressure

drops, venous return, ventricular contractility and heart rate reaches a critical level until heartbeat failure. Death occurs rapidly without prompt cardiopulmonary resuscitation. The main purpose of this work is to investigate the role of ANS in the circulatory shock and gut ischemia induced by SAO and to clarify how the failure of autonomic control can cause FFPD. Gaining full understanding of the mechanisms underlying the autonomic control in rat model is a fundamental step in the definition of systemic implication of ischemia and it is necessary to collect data for development of better clinical treatments.

The thesis outline is briefly described below:

In **Chapter 1**, will be discussed the effects of ischemia inducted by SAO on circulation and on cardiovascular function. We analyze the physiological reaction to this condition, in particular the role in it of the ANS. We deal with the mechanisms involved in the death after reperfusion. Finally, we introduce the fast fatal drop and slow fatal drop and the hypothesis about the causes of these phenomena.

In **Chapter 2**, we describe 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 we focus the attention on the extraction and analysis of beat-to-beat series of variability derived from the raw signal: Mean Arterial Pressure (MAP), Pulse Pressure (PP) and Heart Period (HP). We explain the criteria for the selection of stationary segments from the raw signals used in both the time-domain analysis and the frequency domain analysis. Furthermore, the algorithms implemented for Approximate Entropy (ApEn), Sample Entropy (SampEn) and Corrected Conditional Entropy (CCE) will be expounded in detail.

Chapter 3 is dedicated to the presentation of the main results of this work. The presentation is organized in two sections, namely (i) analysis of SAO and (ii) analysis of arterial pressure collapse. In each section, time domain indices and frequency domain indices will be reported for MAP, HP and PP. Finally, non linear analysis of pressure collapse will be presented.

In **Chapter 4**, finally, the results will be interpreted in the light of the theoretical observations and the initial hypothesis illustrated in chapter 1. Spectral indices and time domain analysis of beat-to-beat series of mean arterial pressure and heart period allowed us

Summary

to clarify the effects of SAO. The in depth study of cardiovascular collapse through the techniques presented in chapter 2 enabled to verify the initial question on the role of the parasympathetic nervous system. In summary, we formulated the hypothesis the insurgence of a saturation mechanism that induces the depression of the sympathetic tone, beyond a certain threshold of activation. In addition, the sympatho-vagal balance shifts towards a clear prevalence of the vagal control. The combination of these two factors translates in an increased risk of sudden collapse.

Capitolo 1

Introduzione

1.1 Shock circolatorio e ischemia intestinale

Lo studio, oggetto di questa tesi di laurea, sottopone 24 ratti ad un protocollo sperimentale di ischemia intestinale protratta, realizzata mediante l'occlusione delle arterie splancniche (*splanchnic arterial occlusion*, SAO). Tale intervento sperimentale induce nell'animale una condizione di instabilità emodinamica, caratterizzata da oscillazioni di pressione arteriosa e frequenza cardiaca, che configurano una sintomatologia paragonabile a quella che contraddistingue lo stato di shock circolatorio.

Per shock circolatorio si intende una condizione di inadeguatezza del flusso sanguigno attraverso i vari distretti dell'organismo tanto marcata che i tessuti subiscono danni per l'insufficiente apporto a livello cellulare dell'ossigeno e di altri macronutrienti (Guyton e Hall, 2002).

Alla base di una condizione di shock circolatorio, solitamente, c'è un'inadeguata gittata cardiaca. Una riduzione della gittata cardiaca può essere indotta da diverse cause, in particolare: (i) la diminuzione della capacità del cuore di pompare sangue (in questo caso

di parla di *shock cardiogeno*), oppure (ii) una riduzione del ritorno venoso che può essere dovuta ad un'emorragia ma anche ad una riduzione del tono vascolare o, come nel caso del protocollo sperimentale analizzato in questo lavoro di testi, ad un'ostruzione del flusso sanguigno in qualche punto dell'albero circolatorio.

Nello shock circolatorio si distinguono tre stadi successivi ciascuno dei quali è associato ad un livello di gravità crescente: (i) *Stadio non progressivo (o compensato)* quando i meccanismi compensatori fisiologici sono ancora in grado di garantire il pieno recupero senza l'ausilio della terapia, (ii) *stadio progressivo* in cui le condizioni del soggetto colpito da shock peggiorano progressivamente sino alla morte, (iii) *stadio irreversibile* ovvero quando condizione in cui lo shock è progredito a tal punto che qualsiasi provvedimento terapeutico risulta inefficace. (Guyton e Hall, 2002).

In risposta all'abbassamento di pressione dovuto allo shock i barocettori e i recettori da stiramento dei vasi provocano l'attivazione rapida, nell'arco di pochi secondi, di riflessi simpatici, i quali producono vasocostrizione sistemica ed un aumento marcato dell'attività cardiaca (ritmo del battito e contrattilità). Dopo alcuni minuti, subentrano inoltre gli effetti del rilascio di angiotensina e vasopressina, due ormoni che inducono un'ulteriore costrizione dei vasi periferici ed aumentano la ritenzione renale di liquidi e sale. Inoltre, se la pressione media scende al di sotto di un livello critico (50 mmHg nell'uomo) per cui il sistema nervoso centrale (SNC) viene a trovarsi in debito di ossigeno a causa di una ridotta perfusione cerebrale motivata dallo stato ipotensivo, si registra un'intensa attivazione del sistema nervoso simpatico nel tentativo di impedire la caduta di pressione a livelli troppo bassi.

Quando questi meccanismi di difesa non sono sufficienti a riportare la pressione e la gittata cardiaca ad un livello normale e lo shock progredisce verso una condizione più grave, l'inadeguatezza del flusso sanguigno porta al deterioramento delle strutture stesse del sistema circolatorio e del cuore con la conseguenza che la pressione e la gittata cardiaca diminuiscono ulteriormente provocando a loro volta una riduzione della perfusione tissutale. Si instaura, dunque, un circolo vizioso che aggrava lo stato di shock sino alla morte, in virtù degli effetti congiunti del fallimento di molteplici organi (*multiple organ failure*).

A causa di un apporto di sangue non adeguato al cervello, lo stesso centro vasomotore, localizzato nel bulbo, può divenire progressivamente silente ed a seguito di un completo arresto circolatorio al cervello si ha un'intensa attivazione del sistema simpatico

che tuttavia viene depressa e dopo pochi minuti non si registra più alcuna attività simpatica.

In uno stato avanzato dello shock, a questo quadro si aggiunge la liberazione di sostanze ad azione tossica da parte dei tessuti ischemici che provocano un ulteriore deterioramento del sistema circolatorio. Studi precedenti condotti su modelli animali hanno mostrato che uno shock emorragico indotto dalla SAO (o da ipovolemia prolungata) seguito da ri-perfusione dei tessuti ischemici è associato ad un elevato tasso di mortalità (Barroso-Aranda e Schmid-Schonbein, 1989; Penn e Schmid-Schonbein, 2008). Quello che si osserva è una caduta progressiva della pressione arteriosa che porta l'animale alla morte nel giro di poche ore dopo la ri-perfusione. I meccanismi che determinano tale caduta di pressione e portano alla morte sono ancora alquanto oscuri, ma esiste una robusta evidenza del fatto che siano associati al passaggio di enzimi digestivi pancreatici dal lumen intestinale alle pareti intestinali e di lì al sistema, tramite la circolazione sanguigna, che si ripristina dopo ri-perfusione conseguente all'ischemia negli esperimenti di shock emorragico o anche tramite il drenaggio operato dal sistema linfatico.

In condizioni fisiologiche gli enzimi digestivi sono confinati all'interno del lumen intestinale grazie ad un duplice meccanismo: (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 questi meccanismi di contenimento non sono più efficaci e gli enzimi digestivi aggrediscono le pareti e penetrano all'interno del tessuto intestinale. In alcuni casi, gli enzimi possono giungere sino agli strati muscolari più profondi ed essere immessi nel torrente circolatorio insieme a mediatori infiammatori attraverso la vena porta causando, così, danni ad altri organi.

Si è riscontrata la presenza di mediatori infiammatori (Schmid-Schonbein, 2009) che derivano principalmente dalla presenza di proteasi e lipasi digestive e di acidi grassi liberi generati da processi digestivi. Tra i numerosi mediatori presenti, si ritiene che un ruolo cardine nella sindrome da ri-perfusione sia svolto dai fattori attivanti le piastrine (Platelet-Activating Factor, PAF). A seguito della ri-perfusione, 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).

Oltre questa graduale riduzione della pressione arteriosa che segue la riperfusione dei tessuti dopo l'ischemia indotta dall' ipovolemia o dalla SAO, lo studio condotto da Penn e Schmid-Schonbein (2011) ha mostrato come, già durante l'ischemia, quindi ben prima che si inneschino i processi infiammatori descritti precedentemente, siano presenti fenomeni di instabilità emodinamica. In particolare, Penn e Schmid-Schonbein hanno individuato due comportamenti differenti negli animali sottoposti a SAO non seguita da riperfusione: (i) una diminuzione progressiva della pressione arteriosa che porta alla morte in un arco di tempo di 1÷3 ore denominata *Slow Fatal Pressure Drop* (SFPD), (ii) una repentina caduta di pressione denominata *Fast Fatal Pressure Drop* (FFPD) che in generale si manifesta entro un'ora dalla SAO. In ambedue i casi, si osserva comunque un progressivo e sostenuto calo di pressione arteriosa, il cui studio dettagliato viene affrontato in questa tesi, allo scopo di individuare caratteristiche salienti nella dinamica del segnale pressorio, tali da potere rendere possibile la predizione di un evento fatale.

Secondo l'ipotesi avanzata da Schmid-Schonbein, la causa del crollo improvviso di pressione che caratterizza il FFPD non è associata al passaggio di enzimi intestinali e mediatori infiammatori nel torrente circolatorio ma, piuttosto, ad una sorta di shock neurogeno, senza che vi sia però un danno al sistema nervoso centrale (SNC).

Lo shock neurogeno classico solitamente è dovuto a danni cerebrospinali e determina una perdita del tono simpatico la quale causa la repentina perdita del tono vasomotore, cioè una dilatazione massiva dei vasi soprattutto a carico del sistema venoso, la cui conseguenza è l'abbassamento di pressione e la riduzione del ritorno venoso al cuore che determina a sua volta una riduzione della gittata cardiaca.

Evidenze sperimentali mostrano che un'intensa attivazione del sistema simpatico prolungata nel tempo non possa essere sostenuta e porti inevitabilmente alla morte. Secondo Schmid-Schonbein lo shock neurogeno classico potrebbe essere il meccanismo che determina lo SFPD.

Per quanto riguarda il FFPD, i risultati ottenuti da Schmid-Schonbein suggeriscono che il recupero di un *pressure drop* dipende dal grado di attivazione del sistema parasimpatico. L'ischemia intestinale genera, come più volte sottolineato, un forte stimolo simpatico prolungato nel tempo. Questa situazione è difficilmente sostenibile e si possono verificare dei brevi crolli di attività simpatica, in corrispondenza dei quali il sistema vagale può assumere un chiaro predominio nella regolazione autonoma. Anche qualora tale predominio fosse solo di breve durata, se non compensato da una ripresa di tono simpatico, si può osservare una caduta repentina della pressione arteriosa come effetto del

rallentamento dell'attività cardiaca provocata dallo stimolo parasimpatico. Se si raggiungono livelli critici di ipotensione e di bradicardia, nonché di assente ritorno venoso e limitata contrattilità ventricolare, l'effetto netto può consistere in una scomparsa del polso, che risulta fatale in tempi rapidissimi, se non si procede a manovre di rianimazione tempestive.

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 rianimazione 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 ha incluso il trattamento di diversi gruppi sperimentali con una varietà di interventi farmacologici,, che saranno descritti in dettaglio nel capitolo dei metodi, concepiti al fine di evidenziare i meccanismi di controllo che causano morte improvvisa durante ischemia intestinale protratta.

1.2 Il Sistema Nervoso Autonomo (SNA)

Il sistema nervoso autonomo (SNA) ha il compito di regolare le funzioni vegetative dell'organismo, ossia quelle funzioni che generalmente sono al di fuori del controllo volontario. Una delle caratteristiche principali del SNA è la velocità con cui riesce ad esercitare la sua azione sugli organi bersaglio. Tra i compiti svolti dal SNA uno dei più importanti è il controllo della pressione arteriosa, al fine di garantire una corretta perfusione dei tessuti.

I segnali efferenti provenienti dal sistema nervoso autonomo viaggiano attraverso due porzioni anatomicamente e funzionalmente distinte ma sinergiche, il sistema nervoso simpatico e il sistema nervoso parasimpatico (o vagale).

I nervi simpatici originano nel midollo spinale, nel tratto compreso tra T-2 e L-2. La via simpatica è costituita da due neuroni: un neurone pre-gangliare, che si trova nella porzione medio-laterale della sostanza grigia del midollo spinale, ed un neurone post-gangliare. Quest'ultimo può essere situato o in uno dei gangli paravertebrali, che si trovano all'esterno della colonna vertebrale e costituiscono le catene paravertebrali (destra e sinistra) o in uno dei gangli prevertebrali (celiaco e mesenterico). Dal neurone post-gangliare partono fibre nervose post-gangliari amieliniche che raggiungono gli organi bersaglio.

La maggior parte dell'innervazione parasimpatica decorre lungo i nervi vaghi (X paio di nervi cranici) che si distribuiscono alla regione toracica ed addominale. Anche le fibre nervose del sistema parasimpatico sono costituite da due neuroni, un neurone pre-gangliare e un neurone post-gangliare. Le fibre pre-gangliari, in questo caso decorrono sino all'organo bersaglio dove fanno sinapsi con i neuroni post-gangliari.

Sia nel sistema nervoso simpatico che in quello parasimpatico tutti i neuroni pre-gangliari sono colinergici, cioè utilizzano come neurotrasmettitore l'acetilcolina. Anche i neuroni post-gangliari del sistema nervoso parasimpatico sono in massima parte colinergici. La maggior parte dei neuroni post-gangliari simpatici sono invece adrenergici, cioè utilizzano come neurotrasmettitore la noradrenalina.

L'acetilcolina è in grado di attivare due tipi di recettori, i recettori muscarinici e quelli nicotinici. I primi si trovano in tutte le cellule effettrici che vengono attivate dai neuroni post-gangliari colinergici, sia del sistema parasimpatico che di quello simpatico. I recettori nicotinici invece si trovano nelle sinapsi tra neuroni pre e post-gangliari di entrambe le branche del SNA.

I recettori adrenergici possono essere, anche essi, di due tipi: (i) i recettori *alfa* che vengono attivati sia dalla noradrenalina che dall'adrenalina (ii) i recettori *beta*, questi ultimi differenziati a loro volta in *beta₁* e *beta₂* e che vengono attivati principalmente dall'adrenalina (Guyton e Hall, 2002).

L'innervazione simpatica viene tradizionalmente descritta come una componente che svolge una funzione paura e fuga\attacco (*fright* e *fight or flight*): vasocostrizione, sudorazione, aumento della frequenza cardiaca e della contrattilità del miocardio ne caratterizzano l'effetto. In realtà, la stimolazione simpatica provoca anche effetti inibitori in alcuni organi così come la stimolazione parasimpatica ha effetti eccitatori su alcuni organi.

Al fine di comprendere meglio quanto verrà esposto nel seguito di questo lavoro ci soffermiamo brevemente sugli effetti della stimolazione simpatica e parasimpatica sul cuore, sul sistema circolatorio e sulla pressione arteriosa.

In generale possiamo dire che la stimolazione simpatica del miocardio esalta l'attività cardiaca inducendo un aumento della frequenza e della sua contrattilità. Una stimolazione vagale (parasimpatica) ha invece un effetto opposto.

Per quanto riguarda il circolo sistemico, una stimolazione simpatica induce una costrizione dei vasi sanguigni, in special modo quelli dei visceri addominali, della cute e degli arti. La maggior parte dei vasi sanguigni non sono raggiunti dall'innervazione

parasimpatica, ragione per cui una stimolazione parasimpatica non ha un effetto diretto sul circolo sistemico.

La pressione arteriosa è determinata principalmente da due fattori: (i) la forza di propulsione esercitata dal muscolo cardiaco e (ii) la resistenza che il circolo sistemico oppone al flusso sanguigno. Dunque, sulla base di quanto appena detto circa l'azione del SNA sul cuore e sulla circolazione periferica, possiamo dire che una stimolazione simpatica è in grado di provocare un aumento, anche marcato, della pressione arteriosa. Invece, una stimolazione vagale, che non agisce direttamente sui vasi, ha un effetto meno marcato sulla pressione arteriosa ed è in grado di indurre solamente un modico abbassamento. Tuttavia, una stimolazione parasimpatica vagale molto intensa può a volte provocare una marcata riduzione della frequenza cardiaca con conseguente calo della pressione arteriosa al di sotto dei livelli critici (Guyton e Hall, 2002).

La manovra di occlusione delle arterie splancniche (SAO) determina per effetto meccanico un transitorio innalzamento della pressione arteriosa, ma l'organismo, per cercare di contrastare questo evento, risponde deprimendo il tono simpatico o attivando il sistema nervoso parasimpatico.

Successivamente, l'ischemia intestinale, causata dalla SAO, riducendo notevolmente il ritorno venoso al cuore, induce una forte stimolazione simpatica (Longhurst et al., 1991) che deve essere compensata da un'attivazione parasimpatica, al fine di mantenere un adeguato equilibrio e di smorzare variazioni pressorie eccessivamente marcate e rapide.

Come è stato precedentemente detto, lo shock circolatorio e l'ischemia intestinale provocano una progressiva ipotensione. Per mantenere la pressione al di sopra di un livello critico e compensare la condizione di shock il sistema nervoso risponde con un'intensa attivazione simpatica che deve essere mantenuta per un tempo prolungato. L'ipotesi avanzata da Schmid-Schonbein è che tale attivazione simpatica intensa, prolungata e continua non sia sostenibile, sicché è ipotizzata l'insorgenza di una situazione di instabilità del tono simpatico: si manifestano momenti di depressione dell'attività simpatica durante i quali si assiste ad un abbassamento repentino di pressione che può essere recuperato (fenomeni di *drop end recovery*) o meno (FFPDs) a seconda del livello di attivazione parasimpatica. Si giunge comunque ad una situazione di shock neurogeno in cui il sistema simpatico non è più in grado di sostenere questa condizione e la pressione scende progressivamente al di sotto del livello critico (SFPDs).

1.3 Obiettivi del lavoro

L'obiettivo di questo lavoro di tesi è quello di verificare le ipotesi presentate nei paragrafi precedenti di questo capitolo introduttivo. In particolare, si vuole indagare il ruolo differente svolto dal sistema nervoso autonomo nei fenomeni del fast fatal pressure drop (FFPD) e dello slow fatal pressure drop (SFPD), approfondendo e completando le analisi svolte sulla pressione arteriosa (Gambarotta, 2013) e sul *cardiac output* (Cruanes Aguilar, 2013), al fine di integrare i risultati relativi al ruolo del sistema nervoso parasimpatico nel FFPD studio proposti dall'articolo di Penn e Schmid-Schonbein (2011). In particolare sono state svolte le seguenti analisi:

- Analisi temporale dei valori medi delle serie battito-battito estratte dal segnale pressorio, *mean atrial pressure* (MAP), *heart period* (HP), *pulse pressure* (PP) sia nei minuti che seguono l'occlusione delle arterie splancniche (SAO) sia nella finestra temporale compresa tra il trentesimo minuto dopo la SAO, momento in cui si suppone che gli effetti transitori dovuti a tale manovra siano esauriti, e l'evento di fatal pressure drop. Lo scopo è verificare l'esistenza di una possibile relazione intercorrente tra l'andamento delle serie temporali ed il trattamento farmacologico che causa un'alterazione del controllo nervoso autonomo. Inoltre queste analisi sono servite a verificare e supportare i risultati ottenuti dalle analisi nel dominio delle frequenze ed il calcolo dell'entropia.
- Analisi nel dominio delle frequenze delle serie battito-battito estratte da MAP, HP, PP sia nei minuti che seguono l'occlusione delle arterie splancniche sia nella finestra temporale compresa tra il trentesimo minuto dopo la SAO. A tale scopo sono stati calcolati gli spettri di potenza sia tramite *fast fourier transform* (FFT) sia tramite un modello parametrico autoregressivo (AR) e sono state calcolate le potenze nelle bande spettrali *very low frequency* (VLF), *low frequency* (LF) e *high frequency* (HF) per ciascuno spettro. Sono stati inoltre calcolati i parametri LF%, HF% e il rapporto LF/HF i cui andamenti sono stati analizzati applicando il *linear mixed effect model* (LME).
- Sono stati applicati diversi metodi di calcolo dell'entropia alle serie di variabilità di MAP e HP. In particolare sono stati calcolati i valori dell'Approximate Entropy (ApEn), della Sample Entropy (SampEn) e della *Corrected Conditional Entropy*

(CCE) nel periodo di tempo intercorrente tra il termine del transitorio dovuto all'occlusione delle arterie e l'insorgere del fatal drop. Il fine è analizzare in che modo il trattamento farmacologico influenza la regolarità delle serie battito-battito e verificare se il calcolo di questi indici non lineari può integrare le analisi descritte precedentemente e fornire informazioni utili per comprendere le cause che determinano i FFPDs.

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 disegnato 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*.

I segnali di pressione arteriosa sono stati ricavati da ratti di sesso maschile della specie *Wistar*. Tutti i ratti utilizzati, prima di essere sottoposti alla procedura chirurgica prevista dall'esperimento, hanno ricevuto anestesia generale (sodium pentobarbital, 50 mg/kg i.m.). Durante la procedura chirurgica la temperatura corporea è stata mantenuta utilizzando un tavolo operatorio riscaldato.

I ratti utilizzati hanno ricevuto un diverso trattamento farmacologico e sono stati di conseguenza divisi in quattro gruppi sperimentali (denominati A, B, C e D):

Tabella 2.1 Numerosità dei gruppi sperimentali e trattamento farmacologico

Gruppo	N. ratti	Trattamento farmacologico
A	4	Glucosio
B	7	Salina
C	6	Xilazina e glucosio
D	7	Xilazina, Glicopirrolato e glucosio

I ratti dei gruppi C e D hanno ricevuto 4 mg/kg di Xilazina intramuscolare (i.m.). I ratti del gruppo D hanno ricevuto inoltre 0.5 mg/Kg di Glicopirrolato i.m. immediatamente dopo l'iniezione di Xilazina.

Per ciascun animale è stato inserito un catetere nella vena femorale sinistra e un secondo catetere nell'arteria femorale destra. Il primo è servito per l'iniezione di boli anestetici supplementari, se necessario, secondo quanto indicato dal test dei riflessi. Il secondo è servito per registrare il segnale di pressione e prelevare campioni di sangue. Durante l'esperimento è stato prelevato un campione di sangue arterioso, da cui è stato ricavato il plasma per misurare i livelli ematici di glucosio.

Gli animali di tutti e quattro i gruppi sono stati sottoposti alla seguente procedura chirurgica. È stata praticata un'incisione sul ventre per estrarre l'intestino tenue e il cieco ed entrambi sono stati posti tra due garze imbevute di soluzione salina alla temperatura di 37° ed adagiati a fianco dell'animale dopo essere stati coperti con un telino di plastica per mantenere la temperatura corporea. L'arteria mesenterica superiore e quella celiaca che garantiscono l'apporto di sangue all'intestino, al fegato, al pancreas, allo stomaco ed alla milza sono state isolate tramite un nastro ombelicale. A questo punto sono state iniettate direttamente nel lume intestinale sostanze specifiche per ciascun gruppo:

- I ratti appartenenti al gruppo B hanno ricevuto 6-10 ml di salina alla temperatura di 37°
- I ratti appartenenti ai gruppi A, C e D hanno ricevuto una soluzione salina arricchita con 100 mg/ml di glucosio. I ratti appartenenti al gruppo D, inoltre, hanno ricevuto 0.5 mg/kg aggiuntivi di Glicopirrolato endovena.

Il volume di fluido iniettato è stato regolato in modo da permettere a quest'ultimo di distribuirsi lungo l'intera lunghezza del tratto intestinale senza che vi fosse un eccessivo

stretching delle pareti intestinali. L'iniezione di fluido nel lume è stata completata in un tempo inferiore ai cinque minuti.

La Xilazina è un farmaco sedativo ad assorbimento rapido, appartenente alla classe delle sostanze agoniste dei recettori α_2 -adrenergici. I suoi effetti comprendono bradicardia, ipotensione e depressione della funzione cardiaca. L'azione della Xilazina è pertanto nel complesso di tipo simpatolitico (Klide et al., 1975; Hsu et al., 1985). Il Glicopirrolato è un farmaco muscarinico anticolinergico: blocca i recettori muscarinici, inibendo la trasmissione colinergica. La sua azione è pertanto di tipo vagolitico, simile a quella dell'atropina (Sneyd e Berry, 1991). 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).

Dopo pochi secondi dal termine dell'iniezione, è stato dato inizio alla SAO (splanchnic aretry occlusion) ad esclusione del gruppo D (Xyl Gly glucose) per il quale si sono attesi quindici minuti per permettere al Glicopirrolato somministrato per endovena di stabilizzarsi. A causa della loro vicinanza all'arteria mesenterica superiore, anche i vasi linfatici principali sono stati occlusi. Uno studio pilota condotto su 3 ratti ha mostrato che il peso dell'intestino dei ratti, compreso il suo contenuto, non varia a causa di perdite di fluido durante le due ore di ischemia. Si è esclusa per tanto l'ipotesi che la caduta della pressione sanguigna sia dovuta a perdite di fluido dal lume intestinale. Ogni animale è stato quindi lasciato indisturbato sul tavolo operatorio per tutta la durata dell'esperimento. La morte è stata dichiarata nel momento in cui il valore della pressione arteriosa media (MAP) è scesa al di sotto dei 20 mmHg con una pressione pulsatoria (PP) inferiore ad 1 mmHg.

Il dataset originale comprendeva altri tre gruppi di ratti:

- *Xyl TSV glucose*
- *Xyl glucose Sham*
- *Glucose ANGD*

I ratti appartenenti al primo di questi tre gruppi sono stati sottoposti a TSV (*Total Subdiaphragmatic Vagotomy*) ovvero la recisione del tronco posteriore ed anteriore del nervo vago a livello dell'esofago ed hanno ricevuto il trattamento farmacologico con Xilazina. I ratti appartenenti al gruppo *Xyl glucose Sham* hanno ricevuto il trattamento farmacologico con Xilazina e sono stati sottoposti all'iniezione di glucosio nel lume intestinale, ma non sono stati sottoposti a SAO. I ratti appartenenti all'ultimo di questi tre gruppi, *glucose ANGD*, sono stati sottoposti all'iniezione nel lume intestinale di una soluzione salina contenente 100 mg/ml di glucosio e 2 mg/ml di 6-Amidino-2-Naphthyl p-guanidinobenzoate dimethanesulfonate, un inibitore delle proteasi.

In questo lavoro non sono stati analizzati i segnali di pressione registrati dai ratti appartenenti a questi tre gruppi sperimentali. Questa scelta è stata motivata dal fatto che tali registrazioni hanno una frequenza di campionamento di soli 100 Hz diversamente dai gruppi denominati A, B, C e D, presentati precedentemente e che sono stati utilizzati integralmente in questo lavoro, per i quali la frequenza di campionamento del segnale di pressione è di 1000 Hz.

Nel seguito per fare riferimento a ciascun gruppo si useranno le lettere A,B,C e D, assegnate ad ognuno dei gruppi, come riportato in tabella 2.1. Inoltre si utilizzerà la dicitura *NoXyl* per fare riferimento ai ratti che non hanno ricevuto il trattamento farmacologico con Xilazina (gruppi A e B) e la dicitura *Xyl* per fare riferimento ai ratti che hanno ricevuto questo trattamento farmacologico (gruppi C e D).

2.2 Acquisizione del segnale di pressione e preprocessing

Durante l'esecuzione del protocollo descritto nel paragrafo precedente, per ciascun animale, è stato acquisito il segnale di pressione arteriosa tramite un catetere inserito nell'arteria femorale destra. Il segnale è stato registrato con una frequenza di campionamento pari a 1000 Hz. Il dataset originale consisteva di un file in formato .txt per ciascun topo, contenente la registrazione del segnale pressorio e delle annotazioni circa le manovre effettuate durante il protocollo. Dopo aver importato i dati in ambiente MATLAB® si è proceduto, con l'aiuto delle note, ad identificare sui segnali di pressione i pattern dovuti alle manovre effettuate durante il protocollo, in particolare l'occlusione delle arterie e le manovre di pulizia del catetere.

2.2.1 Suddivisione del segnale in finestre di analisi

A questo punto si è proceduto ad individuare e selezionare tratti di segnale corrispondenti a diverse fasi del protocollo ed utili alle analisi da effettuare. In particolare, sono stati individuati uno spezzone di *baseline* e due fasi temporali: (i) la prima ha come istante iniziale la nota di occlusione delle arterie ed una durata di 30 minuti circa, (ii) la seconda è compresa tra il trentesimo minuto dopo la SAO e la nota che segnala l'inizio del fatal pressure drop. La stima dell'onset della FPD è molto semplice per i ratti appartenenti al Gruppo FFPD in quanto si osserva una brusca caduta di pressione (collasso cardiovascolare) nell'arco di pochi minuti (o addirittura secondi). Per i ratti appartenenti al gruppo SFPD spesso non vi è una transizione così netta che possa identificare con certezza la fase di FPD. In questi casi è stato individuato il cambiamento di pendenza più marcato nell'involuppo della serie MAP ed è stato considerato quello come onset.

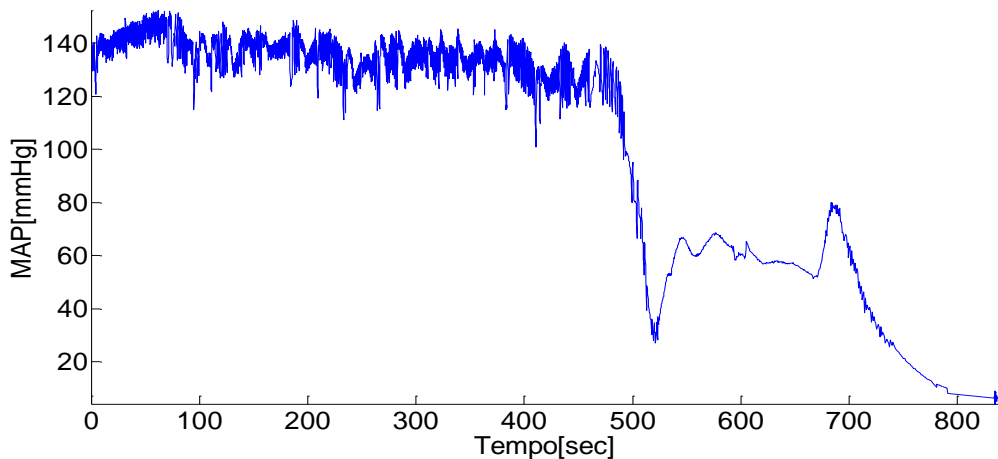


Figura 2.1 Esempio di FFPD sulla serie MAP(mmHg).

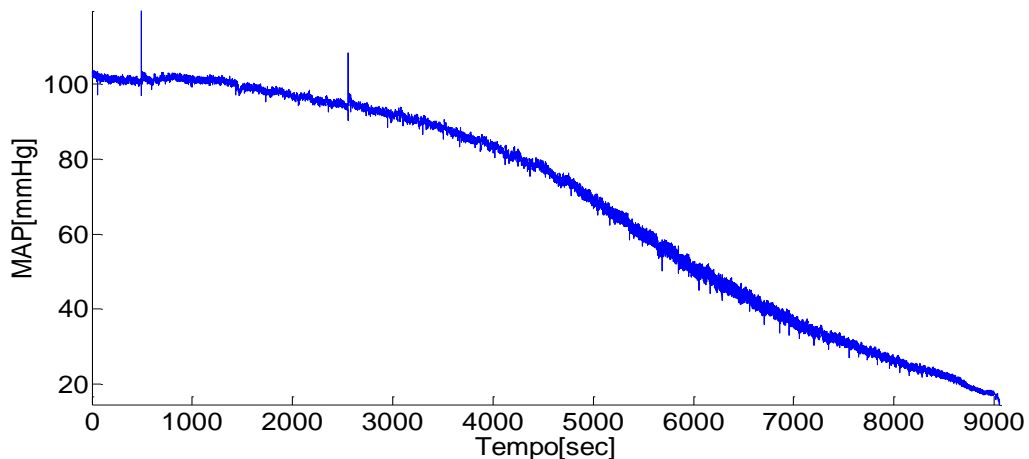


Figura 2.2 Esempio di SFPD sulla serie MAP(mmHg).

Dato che il protocollo non prevedeva la registrazione del segnale durante la fase di baseline, per sopperire a tale mancanza, è stato selezionato un segmento di segnale precedente all'esposizione delle viscere ed all'isolamento delle arterie. In questa fase, tutti i ratti erano già sotto anestesia generale ed i ratti appartenenti ai gruppi trattati con: i) Xilazina e ii) Xilazina e Glicopirrolato, avevano ricevuto l'iniezione di tali sostanze per via endovenosa. La durata dei segmenti analizzati è variabile da un ratto all'altro (90-180 sec), in base alla qualità e alla disponibilità di segnale stazionario.

Le due fasi temporali a cui si faceva riferimento sono state suddivise in sotto finestre scorrevoli (*running window*) della durata di 180 secondi con un *overlapping* del 50%.

Per ciascun segmento del segnale di pressione ottenuto nelle fasi del protocollo sopracitate sono stati individuati i punti fiduciarì relativi agli onset delle onde pressorie e quelli corrispondenti ai tempi delle pressioni diastoliche e delle pressioni sistoliche delle medesime onde. In base a questi sono stati calcolati i valori della seguenti serie:

- Pressione arteriosa media (MAP)
- Pressione arteriosa sistolica (SAP)
- Pressione arteriosa diastolica (DAP)
- Pulse pressure (PP)

Inoltre, sulla base degli onset delle onde pressorie è stata ricavata una stima della serie degli intervalli RR, la serie degli *heart periods* (HP).

Per individuare gli onset delle onde pressorie è stata utilizzata la funzione *wabp.m* (*ABP waveform onset detector*) originariamente scritta dal Dr. Wei Zong (2003). Per il calcolo delle serie è stata utilizzata la funzione *abpfeature.m* (*ABP waveform feature extractor*) originariamente scritta da James Sun. Inoltre, è stata utilizzata la funzione *jsqi.m* per individuare quei segmenti che contenevano valori anomali degli onset o delle serie calcolate. Tutte le funzioni sono state opportunamente modificate per adattarle alla frequenza di campionamento dei segnali di pressione da noi utilizzati (1000Hz), alla frequenza cardiaca dei ratti ed al loro intervalli di valori di pressione.

2.2.2 Calcolo delle serie di variabilità

La funzione *wabp.m* implementa un algoritmo per la determinazione degli onset delle onde di pressione. Il segnale viene convertito in una *slope sum function* (SSF).

Successivamente, una soglia adattativa applicata alla SSF e una strategia di ricerca dei massimi e dei minimi locali permettono di individuare gli onsets delle onde pressorie accuratamente.

L'algoritmo prevede tre passi fondamentali: (i) un filtraggio passa-basso del segnale di pressione, (ii) il calcolo della SSF tramite finestra del segnale, (iii) una serie di condizioni per individuare l'onset.

Il filtraggio passa-basso ha il compito di eliminare il rumore ad alta frequenza che potrebbe essere presente sul segnale di pressione. La funzione utilizza un filtro ricorsivo del secondo ordine. La funzione di trasferimento del filtro e la risposta in frequenza sono le seguenti:

$$H(z) = \frac{(1-z^{-5})^2}{(1-z^{-2})^2} \quad (2.1)$$

$$|H(\omega T)| = \frac{\sin^2(3\omega T)}{\sin^2\left(\frac{\omega T}{2}\right)} \quad (2.2)$$

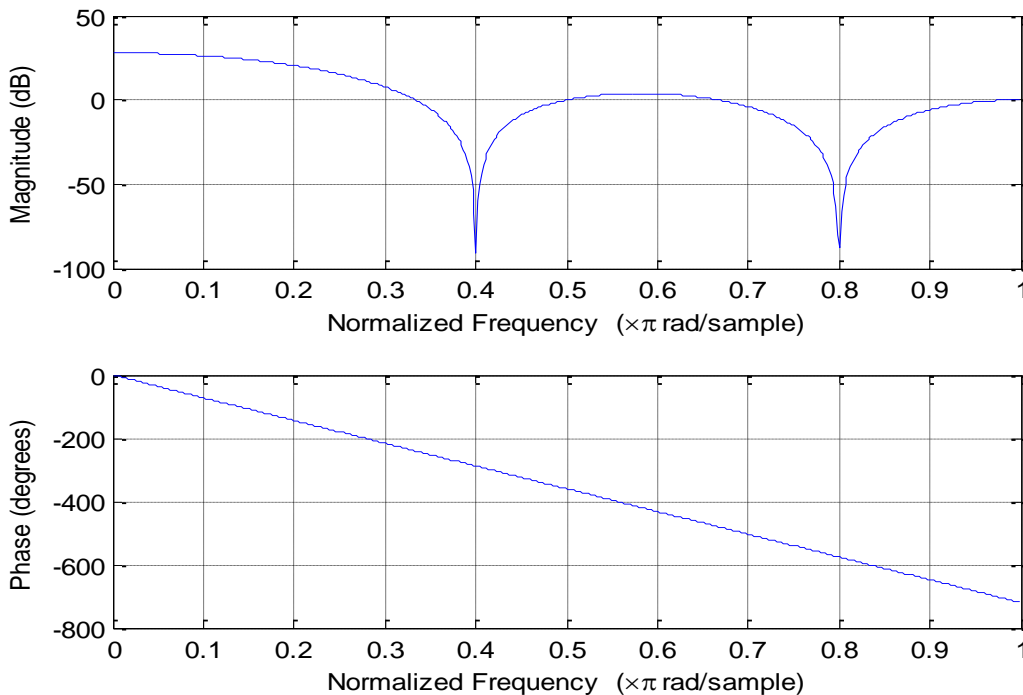


Figura 2.3 Risposta in frequenza e fase del filtro

La frequenza di taglio a -3db è di circa 65Hz e il guadagno a 0 Hz è di circa 27 db per una frequenza di campionamento di 1000 Hz. Il ritardo di gruppo introdotto dal filtro è di 4 campioni.

La slope sum function ha il compito di individuare il fronte di salita dell'onda pressoria e di sopprimere il resto dell'onda di pressione. La SSF finestrata e pesata è descritta dalla funzione:

$$z_i = \sum_{k=i-w}^i \Delta u_k \quad (2.3)$$

Dove $\Delta u_k = \begin{cases} \Delta y_k, & \Delta y_k > 0 \\ 0, & \Delta y_k \leq 0 \end{cases}$; w è la lunghezza della finestra; y_k è il segnale di pressione filtrato come descritto in precedenza.

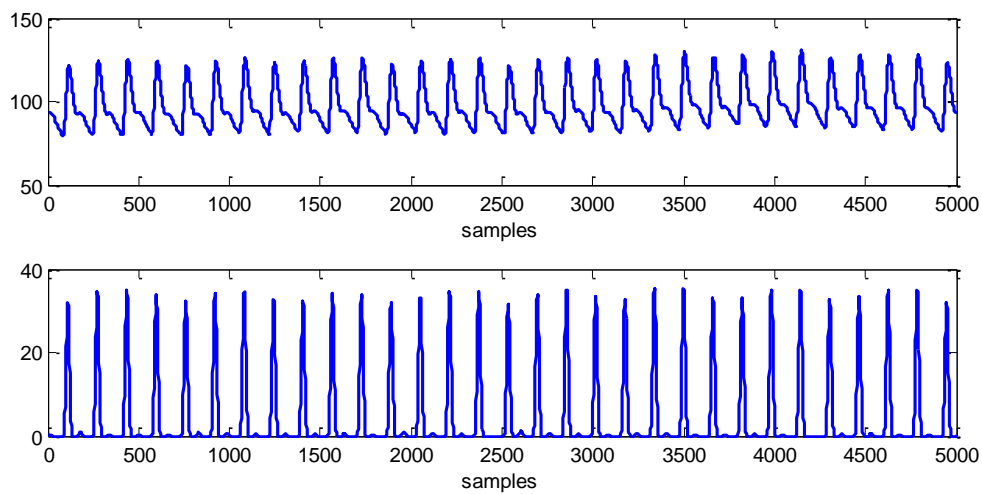


Figura2.4 Segnale di pressione arteriosa (in alto) e segnale SSF ricavato da questo (in basso).

L'onset delle onde del segnale SSF coincide con quello delle corrispondenti onde pressorie ed è più semplice da individuare in maniera automatica. Per individuare gli onset delle onde del segnale SSF si procede in questo modo: si utilizza una soglia adattativa per individuare le onde del segnale SSF di ampiezza adeguata e quindi, non appena viene individuato un punto sopra soglia, si procede alla ricerca dell'onset.

La soglia viene inizializzata ad un valore pari a 3 volte il valor medio dei primi 8 secondi del segnale SSF (8000 campioni) e viene aggiornata ogni volta che viene individuato un massimo del segnale SSF. Non appena la soglia viene superata si cercano il minimo e il massimo locale all'interno di una finestra di 320 ms (320 campioni) centrata nel punto in cui la soglia è stata superata (il valore della finestra è stato modificato rispetto alla versione originale per adattarlo alla frequenza di campionamento del segnale e alla frequenza cardiaca del ratto). La pulsazione viene accettata solo se la differenza tra il minimo e il massimo supera un certo valore di soglia. Nello specifico, quando una

pulsazione supera il test e viene selezionata, l'algoritmo ricerca l'onset in una finestra di 160 ms precedente al punto di superamento della soglia. L'onset viene individuato nel punto in cui la derivata prima locale del segnale SSF supera l'1.0% del valore del massimo locale precedentemente individuato.

A partire dalla serie degli istanti di onset delle onde pressorie (OT (k)) individuati da *wabp.m* la funzione *abpfeature.m* individua i massimi e i minimi del segnale di pressione (pressioni sistoliche e diastoliche) e gli istanti di tempo a cui questi occorrono. In questo modo, l'algoritmo permette di ricavare le serie di pressione (MAP, SAP, DAP e PP) e una stima della serie RR.

La funzione implementa una ricerca dei massimi e dei minimi locali all'interno di una finestra di 200 ms centrata nell'istante di onset OT(k) dell'onda pressoria individuato da *wabp.m*. Trovati i valori delle pressioni sistoliche ($P_{sys}(k)$ in mmHg) e diastoliche ($P_{diast}(k)$ in mmHg) e i corrispondenti istanti di occorrenza (T_{sys} e T_{diast}) i valori delle altre serie vengono calcolati in questo modo:

- $PP(k) = P_{sys}(k) - P_{diast}(k)$
- $Beat\ period(k) = OT(k) - OT(k-1)$
- MAP(K) è calcolato come valor medio dell'intervallo di ABP compreso tra OT(k) e OT(k+1)

La funzione *jSQL.m* (*ABP waveform quality index*) permette di individuare dei valori numerici anormali nelle serie battito-battito MAP, SAP, DAP, PP e HP, nella serie degli onset e degli altri punti fiduciali stimati da *abpfeature.m* e *wabp.m* che sono state descritte precedentemente. Anche questa funzione è stata scritta James Sun e fa parte di un set di funzioni per la detezione dei punti fiduciali del segnale di pressione dell'uomo campionato a 125 Hz. Per utilizzare questa funzione sulle nostre serie sono stati modificati gli intervalli di normalità per adeguarli a quelli del ratto. L'algoritmo implementato da *jSQL* esegue un controllo su ciascun valore delle serie precedentemente dette per verificare che esso rispetti i seguenti intervalli di normalità riportati in tabella 2.2.

Tabella 2.2 Intervalli di normalità nel ratto per le serie MAP, SAP, DAP,PP, HP e HR.

variabile	intervalli di normalità
Pressione	20 - 300 mmHg
Mean atrial pressure (MAP)	30 - 200 mmHg
Heart rate (HR)	20 - 400 bpm
Pulse pressure (PP)	> 10 mmHg
Pressione sistolica	beat-to-beat change < 20 mmHg
Pressione diastolica	beat-to-beat change < 20 mmHg
Heart period (HP)	beat-to-beat change < 1/2 sec
Onset	beat-to-beat change < 20 mmHg

La funzione *jSQI* fornisce in uscita la percentuale di battiti scartati in un certo tratto di segnale analizzato. E' stato scelto di ritenere valide per le analisi successive solamente gli spezzoni per cui la percentuale di battiti scartati è pari a zero. Si è adottato questo criterio molto restrittivo per individuare ed eliminare quegli spezzoni che contenevano le manovre di pulizia del catetere. Si è osservato che tali manovre inducono una distorsione del segnale all'inizio e alla fine della manovra e, successivamente, un gap di circa 10 ÷ 12 battiti. Nella maggior parte dei casi, tuttavia, *jSQI* rileva solamente un intervallo beat to beat anomalo perché di fatto durante la manovra il segnale non viene registrato e la funzione *wabp.m* individua correttamente l'onset dell'onda pressoria precedente al *gap* dovuto alla manovra e quello dell'onda pressoria immediatamente successiva al *gap*

2.2.3 Campionamento del segnale

Le serie ottenute tramite la funzione *abp_features.m* sono state campionate alla frequenza di 5 Hz utilizzando la funzione *makera.m* al fine di ottenere campioni equi spaziatati nel tempo tenendo conto della banda di frequenza dello spettro di variabilità cardiovascolare del ratto (Japundzic et al., 1990; Cerutti et al., 1991). Le analisi presentate in questo lavoro sono state condotte sulle serie battito-battito campionate.

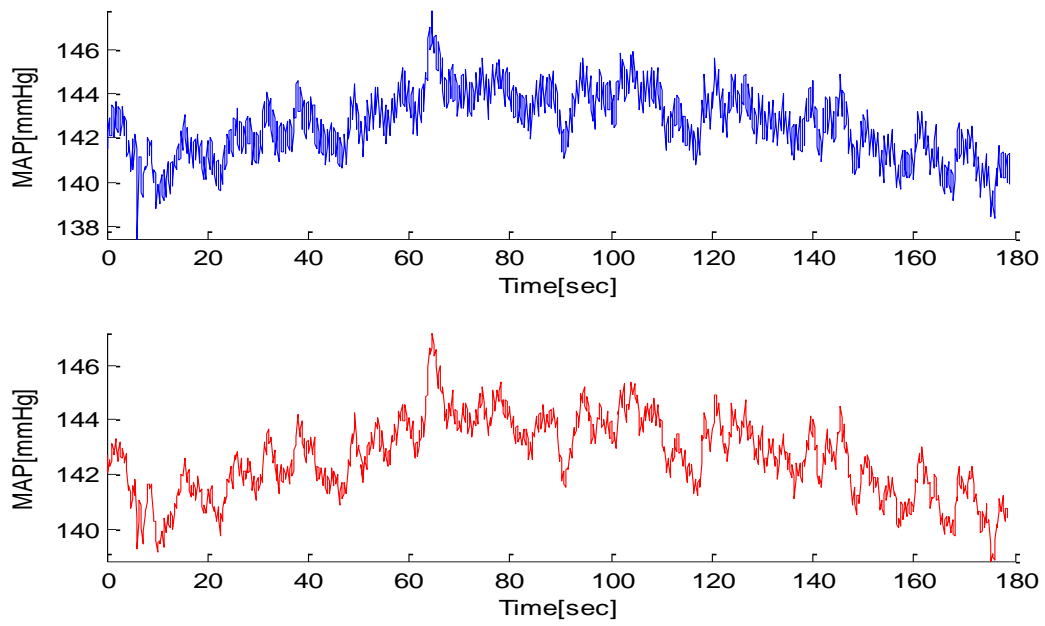


Figura 2.5 Esempio di segnale MAP (mmHg). In alto è rappresentata la serie originale, in basso la serie dopo il campionamento.

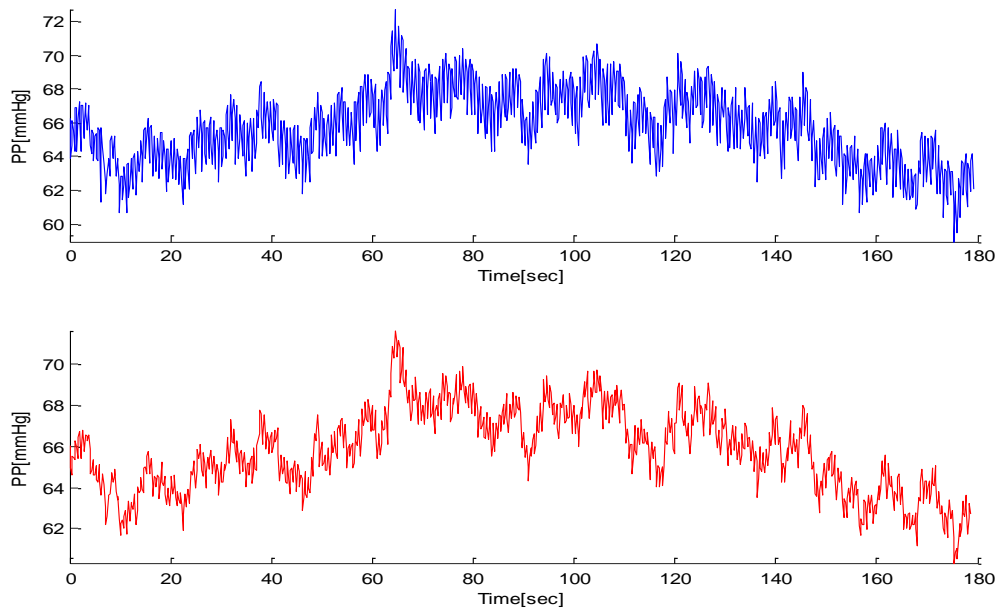


Figura 2.6 Esempio di segnale PP (mmHg). In alto è rappresentata la serie originale, in basso la serie dopo il campionamento.

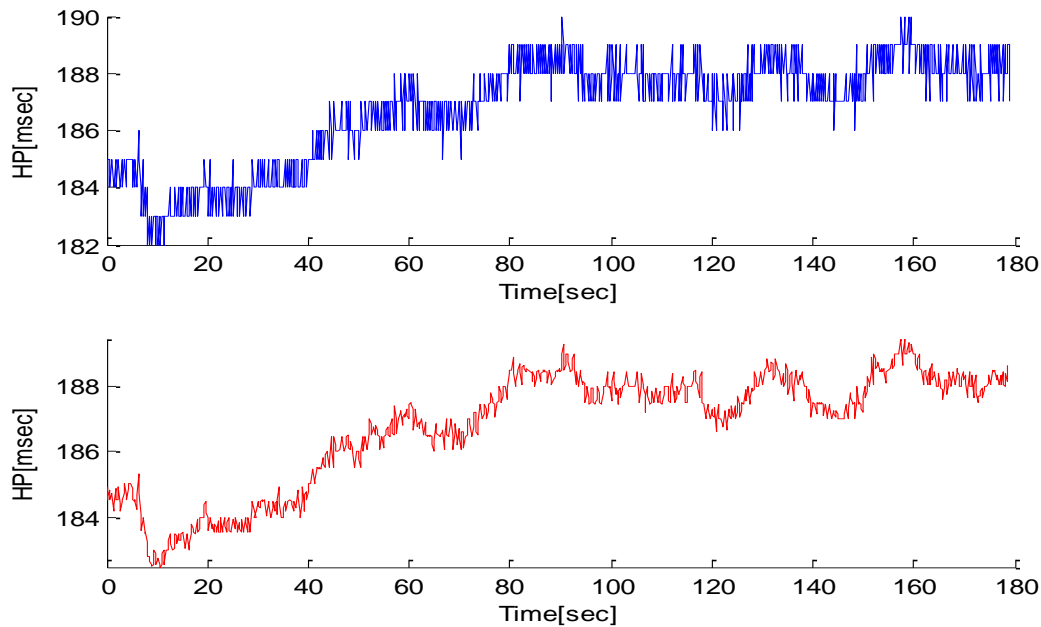


Figura 2.7 Esempio di segnale HP (msec). In alto è rappresentata la serie originale, in basso la serie dopo il campionamento.

2.3 Metodi lineari e non lineari per l'analisi delle serie temporali di variabilità cardiaca

Metodi lineari per l'analisi dell' *heart rate variability* (HRV), sia nel dominio del tempo che della frequenza, sono stati applicati nell'uomo e le linee guida sono stabilite dalla *task force of European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology* (1996).

I parametri temporali non permettono di distinguere il contributo simpatico e quello parasimpatico alla variabilità cardiaca. In particolare, per l'uomo, le *low frequency* (0.04 - 0.15 Hz) sono associate all'attività del sistema nervoso autonomo simpatico mentre le *high frequency* (0,15 - 0.4 Hz) sono associate all'attività del sistema nervoso autonomo parasimpatico. Il primo metodo utilizzato per stimare la densità spettrale di potenza (PSD) è stato la *Fast Fourier Transform* (FFT). Oggi si preferiscono metodi di stima parametrica della PSD basati su modelli autoregressivi (AR) che non sono affetti dalla *spectral leakage* e garantiscono una migliore risoluzione delle frequenze. Un aspetto fondamentale dell'utilizzo di modelli AR è la scelta dell'ordine p del modello, molti studi sono stati condotti per stabilire quale fosse l'ordine p più appropriato per l'analisi dell'HRV. Molti studi in letteratura utilizzano $p=16$ (Akaike, 1969; Boardman et al, 2002).

Dunque l'analisi spettrale delle serie battito-battito risulta essere un mezzo efficace per indagare il funzionamento del sistema nervoso autonomo adatto agli scopi di questo lavoro di tesi.

I segnali biologici non hanno un andamento lineare, se non per brevi tratti, e sono caratterizzati da un'estrema variabilità sia in condizioni fisiologiche che patologiche. La quantificazione di alcune proprietà dei segnali e delle loro variazioni costituisce un aiuto alla comprensione della fisiologia ed è in grado di fornire informazioni cliniche e diagnostiche. Tuttavia, nell'analisi di questi segnali, bisogna confrontarsi con una serie di problemi che non sempre sono facilmente risolvibili: per esempio, il sistema che genera il segnale è ignoto (modelli a scatola nera) e le registrazioni dei segnali sono affette da rumore sia endogeno (dovuto all'attività di altri apparati dell'organismo) che esogeno. Molti metodi di analisi non lineare forniscono comunque un indice relativamente affidabile anche in assenza di caratteristiche deterministiche del segnale.

Metodi non lineari di analisi sono stati applicati alle serie di variabilità cardiaca e distinguiamo due categorie di metodi non lineari: (i) quelli che forniscono indici che descrivono il comportamento scalare di un sistema e (ii) quelli che forniscono indici che descrivono la complessità di un sistema. Alla prima categoria di indici appartengono la dimensione frattale, la $1/f$ slope, e gli indici forniti dalla *dretended fluctuation analysis*. Alla seconda categoria appartengono invece tutti quei metodi associati alla ricostruzione della dinamica del sistema in uno spazio detto di *embedding*. Tra questi citiamo il calcolo della dimensione di correlazione, che indica la dimensione dello spazio delle fasi, il calcolo degli esponenti di Liapunov, che indicano la sensibilità del sistema alle condizioni iniziali, e vari metodi di calcolo dell'entropia, come l'Approximate Entropy (ApEn) e la *Conditional Entropy* (CE), che forniscono una stima della complessità del sistema (Goncalves et al., 2012; Acharya et al. 2006).

Per comprendere meglio quanto verrà descritto nel corso del capitolo successivo approfondiamo la descrizione della seconda categoria di indici. Un sistema dinamico è descritto da due equazioni, l'equazione di stato e l'equazione delle uscite:

$$\dot{x}(t) = f(x(t)) \tag{2.4}$$

$$y(t) = g (x(t)) \tag{2.5}$$

Nella (1.1) $\dot{x}(t) = [x_1(t), x_2(t), \dots, x_n(t)]$ è il vettore che contiene le n variabili di stato che governano il sistema e $f(\cdot)$ è una funzione delle variabili di stato che descrive l'evoluzione temporale del sistema. Nella 1.2 $y(t)$ è la variabile di uscita che viene misurata durante l'esperimento, nel nostro caso è la pressione arteriosa. La funzione $g(t)$ descrive la dipendenza dell'uscita $y(t)$ dal vettore di stato.

Dunque, per conoscere completamente la dinamica di un sistema, dovremmo misurare l'evoluzione nel tempo di tutte le n variabili di stato. Nella maggior parte dei casi questo non è possibile poiché non è noto quali e quante siano le variabili di stato e non è noto il modello che genera l'uscita $y(t)$ (modelli a *scatola nera*).

Durante gli anni '80 e '90 sono stati proposti e sviluppati numerosi indici per caratterizzare il comportamento caotico di alcune serie temporali, in particolare per descrivere il comportamento degli *strani attrattori* che possono spiegare le dinamiche a lungo termine di un segnale. Se assumiamo che il sistema dinamico non lineare che ha generato la serie stia su un *attrattore* è possibile ricostruire quest'ultimo utilizzando il metodo delle coordinate ritardate (*time delay reconstruction*). Il teorema di Takens (1981), infatti, ci assicura che le dinamiche ricostruite in un sottospazio (m -dimensionale) dello spazio degli stati (n -dimensionale), detto spazio di *embedding*, sono geometricamente simili a quelle originali purché la dimensione di embedding m sia adeguata; esistono cioè delle proprietà invarianti che caratterizzano la dinamica del sistema e possono essere ricostruite e misurate utilizzando le categorie di indici (i) e (ii) a cui abbiamo fatto riferimento precedentemente. Tuttavia, anche per sistemi caotici di bassa dimensione, è necessario un gran numero di punti per ottenere la convergenza di indici dimensionali e degli algoritmi di calcolo dell'entropia.

La *time delay reconstruction* è la base di partenza per il calcolo dell'ApEn e della CE. Entrambi questi metodi di calcolo dell'entropia sono stati utilizzati in questo lavoro di tesi e verranno descritti dettagliatamente nel seguito.

L'ApEn è un indice statistico, sempre positivo, in grado di quantificare la regolarità e la complessità di una serie numerica e si presta ad essere applicato ad una grande varietà di segnali fisiologici e di interesse clinico. Intuitivamente possiamo dire che l'ApEn valuta la probabilità condizionata che due sequenze simili per m punti siano simili anche per $m+1$ punti. L'ApEn è strettamente legata all'entropia di Kolmogorov-Sinai (K-S) ed è sviluppata a partire dai lavori di Grassberger e Procaccia (1991) ed a quelli di Eckmann and Ruelle (1985). Nonostante le similarità nell'algoritmo di calcolo, l'ApEn non è un valore approssimato dell'entropia K-S. (Pincus 1990). Rispetto ai precedenti metodi di

calcolo dell'entropia l'ApEn risulta essere un metodo di misura robusto anche in presenza di rumore e di artefatti, anche di lunga durata, e richiede un numero di campioni ridotto per garantire la convergenza; inoltre restituisce un valore finito sia per processi deterministici che per processi stocastici, tutte caratteristiche fondamentali per applicare l'algoritmo di calcolo dell'ApEn alle serie di variabilità cardiaca che presentano sia una componente deterministica che una stocastica. Diversi studi nell'uomo (Pincus et Al. 1991; Pincus e Keefe, 1992; Pincus et Al. 1993) e in modelli animali (Gonçalves et Al., 2013) hanno mostrato che una decrescita significativa dell'ApEn è associata a diverse patologie ed all'invecchiamento compatibilmente con l'ipotesi che una maggiore regolarità dei segnali biologici è spesso indice di uno stato patologico (Pincus, 1994). La selezione dei parametri m e r risulta essere di fondamentale importanza nel calcolo dell' ApEn; sono stati proposti dei valori di riferimento per questi parametri (Pincus, 1995).

Per questo lavoro di tesi sono stati utilizzati altri due metodi di misura dell'entropia: la *Sample Entropy* (SampEn) sviluppata da Richman e collaboratori (2000) e la *conditional entropy* (CE) proposta da Papoulis (1984), il cui metodo di calcolo è stato corretto (Porta et al. 1998). L'algoritmo di calcolo della Sample Entropy deriva direttamente da quello dall' ApEn e la differenza principale è che non vengono contati i *self-matches*. La SampEn è stata sviluppata per superare alcune limitazioni dell'ApEn: l'ApEn è influenzata dal numero di campioni disponibili per il calcolo ed un numero insufficiente di campioni porta a sottostimare l'entropia (Richman et al, 2000). Anche la CE è stata proposta al fine di ovviare ai problemi di stima della complessità dovuti alla disponibilità di un numero esiguo di campioni. La correzione apportata all'algoritmo di calcolo della CE inoltre permette di superare il problema della scelta a priori della dimensione di embedding m .

2.4 Analisi nel dominio del tempo

Per ognuna delle serie battito-battito (MAP, DAP,SAP, PP e HP) ottenute dai segmenti del segnale di pressione arteriosa in ciascuna delle fasi del protocollo analizzate, come descritto nel paragrafo precedente, sono stati calcolati il valor medio, la deviazione standard, la mediana e i valori del primo e del terzo quartile.

Come mostrato in figura 2.6, la risposta all'occlusione consiste in un repentino e marcato aumento della pressione media, della pressione pulsatoria e della frequenza cardiaca. Una volta raggiunto un valore di picco, i valori delle serie tendono a stabilizzarsi ed a tornare ad un livello simile a quello di baseline. In particolare, nel periodo successivo

all'occlusione delle arterie sono state considerate quattro finestre della durata di 180 secondi ciascuna con un overlapping del 50% per un totale di 7.5 minuti. Come onset è stato considerato il punto in cui l'innalzamento di pressione dovuto alla occlusione delle arterie splancniche era esaurito. I valori medi ottenuti da queste quattro finestre sono stati a loro volta mediati. Nel seguito, con la sigla *post clamp* si fa riferimento a tale valore mediato.

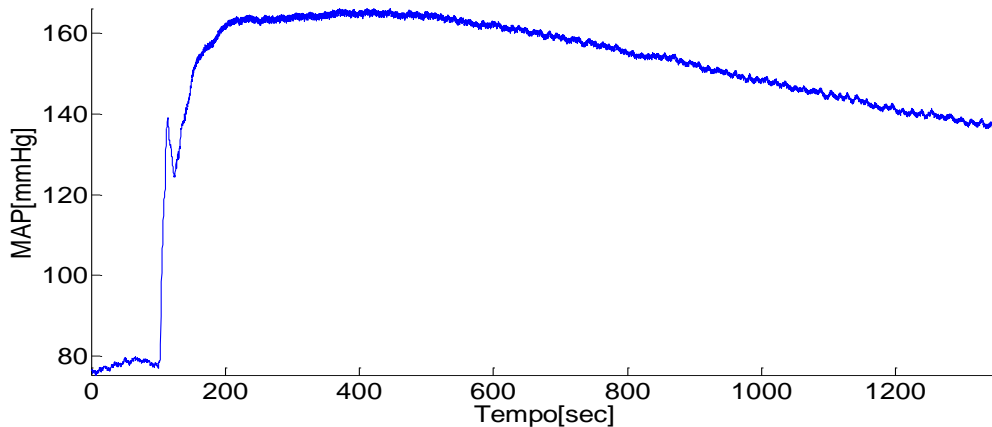


Figura 2.8 Andamento della serie MAP in seguito alla SAO.

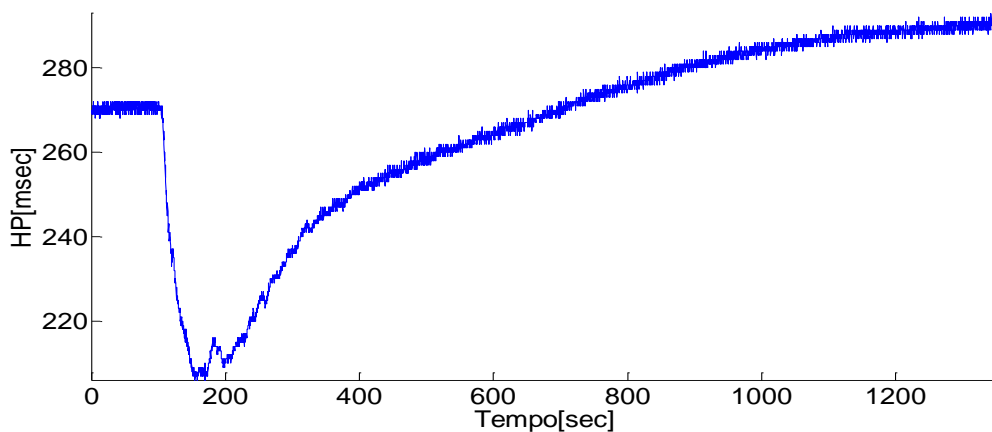


Figura 2.9 Andamento della serie HP in seguito alla SAO.

In maniera simile si è proceduto per quanto riguarda l'analisi della fase successiva al trentesimo minuto dopo l'occlusione: sono stati mediati i valori delle prime tre finestre successive a tale istante e quelli delle tre finestre che precedono la nota che segnala l'inizio del FPD. Nel seguito si fa riferimento a tali valori mediati rispettivamente con le sigle *30' post clamp* e *pre-FPD*. Per entrambe le finestre le analisi sono state svolte tenendo conto

delle suddivisione dei ratti nei quattro gruppi A, B, C e D, descritti precedentemente, per valutare gli effetti del diverso tipo di trattamento farmacologico.

Per la fase che precede il FPD è stata adottata per le analisi anche una seconda suddivisione degli animali basata sulla velocità con cui avviene la decrescita di pressione, veloce (Fast fatal pressure drop, *FFPD*) o lenta (Slow fatal pressure drop, *SFPD*). La motivazione è quella di indagare, se esistono, i meccanismi di fallimento del controllo nervoso autonomo della circolazione che portano a un brusco crollo di pressione.

2.5 Analisi nel dominio delle frequenze

Per ognuna delle serie ottenute dai segmenti di segnale di pressione arteriosa in ciascuna delle fasi del protocollo (baseline, trenta minuti successivi alla SAO, fase precedente al FPD) sono stati calcolati i valori dello spettro di potenza sia tramite *Fast Fourier Transform* (FFT) che tramite un metodo di stima parametrico di tipo autoregressivo (AR). Nel secondo caso è stata utilizzata la funzione *ARspectrum.m* che ricava una stima della funzione di autocorrelazione del segnale. Ciascun campione della funzione di autocorrelazione è calcolato utilizzando lo stesso numero di campioni del segnale.

Ad eccezione del caso della fase di baseline in cui la finestra ha una durata variabile, le finestre di analisi hanno una durata di 180 secondi ed un overlapping del 50%, come precedentemente spiegato nel paragrafo 2.2.1. In tutti i casi si è adottata una finestrazione rettangolare del segnale.

Per ciascuna serie temporale, al fine di eliminare eventuali trend non lineari presenti, prima di calcolare lo spettro di potenza si è proceduto al calcolo dell'interpolante di ordine 10 della serie battito-battito analizzata che è stato sottratto alla serie stessa per ottenere una serie depurata da tali trend che altrimenti avrebbero inficiato il risultato dell'analisi spettrale.

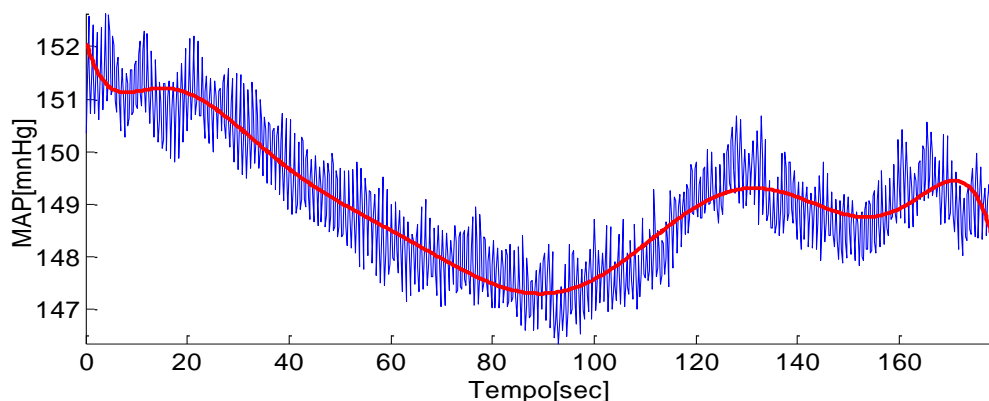


Figura 2.10 Esempio di interpolazione della serie MAP. In rosso l'interpolante di ordine 10.

Lo spettro autoregressivo è stato calcolato utilizzando il numero massimo di punti disponibile, cioè 1024 punti per le finestre di 180 secondi. Sulla base di quanto riportato in letteratura (Akaike, 1969; Boardman et al, 2002) e di precedenti applicazioni, l'ordine massimo del modello autoregressivo, richiesto dalla funzione *ARspectrum.m*, è stato impostato a 20.

2.5.1 Calcolo della potenza nelle bande spettrali

Per ciascuno spettro sono stati calcolati i valori di potenza nelle bande very low frequency (VLF), low frequency (LF) e high frequency (HF) tramite integrazione. Sulla base di studi ed applicazioni precedenti (Japundzic et al., 1990; Cerutti et al., 1991; Julien et al., 1995), le bande spettrali sono definite nel modo seguente:

- VLF: 0.003 Hz - 0.25 Hz
- LF: 0.25 Hz - 0.75 Hz
- HF: 0.75 Hz – 2.5 Hz

Inoltre sono stati calcolati i seguenti parametri:

- *Low frequency* percentuali normalizzate (LF%) definite come:

$$LF / (P_{tot} - VLF) \quad (2.6)$$

- *High frequency* percentuali normalizzate (HF%) definite come:

$$HF / (P_{tot} - VLF) \quad (2.7)$$

- Rapporto tra *low frequency* e *high frequency*
- *Low frequency* e *High frequency* integrate (LF + HF)
- La Potenza totale.

Per le successive analisi statistiche, come esposto in precedenza per le analisi nel dominio del tempo, nel caso della fase immediatamente successiva all'occlusione delle arterie, sono stati considerati i valori delle potenze nelle bande VLF, LF, HF ed il valore di ciascun parametro relativi alle prime quattro finestre (7,5 minuti successivi all'esaurimento

dell' *initial rise* della MAP). Tali valori sono stati a loro volta mediati. Nel seguito si fa riferimento a tali valori mediati con al sigla *Post Clamp*.

Nel caso della fase precedente al fatal drop sono stati considerati i valori delle potenze in VLF, LF, HF e il valore di ciascun parametro relativi alle prime tre finestre (i 6 minuti immediatamente successivi al trentesimo minuto post clampaggio) e quelli relativi alle ultime tre finestre (i 6 minuti precedenti all'inizio del fatal pressure drop). Nel seguito si fa riferimento a tali valori con le sigle *30' minuti post clamp* e *pre-FPD rispettivamente*. Nel caso della fase di baseline, avendo a disposizione una singola finestra, i valori non sono stati mediati. Nel seguito si fa riferimento a tale valore con la dicitura *Baseline (BL)*.

Qualora le finestre sopracitate contenessero artefatti dovuti alla pulizia del catetere o anomalie del ritmo cardiaco sono state considerate per il calcolo delle medie le finestre immediatamente successive o immediatamente precedenti, a seconda del caso, che non presentassero tali anomalie.

Per le analisi statistiche è stata adottata una suddivisione dei ratti nei gruppi A, B, C e D in base al trattamento farmacologico subito. Anche in questo caso, nell'analisi del periodo che precede il FPD, le analisi sono state condotte anche considerando la suddivisione dei ratti basata sulla velocità con cui la pressione decresce ovvero distinguendo i ratti nei due gruppi SFPD e FFPD indipendentemente dal trattamento farmacologico.

2.5.2 Linear Mixed Effect model (LME).

Si è scelto di approfondire l'analisi in frequenza applicando il *Linear Mixed Effect model* (LME) ad alcuni dei parametri ricavati dall'analisi spettrale descritta nel paragrafo precedente. In particolare si è scelto di studiare l'andamento dei parametri *Low Frequency* percentuali normalizzate (LF%), *High Frequency* percentuali normalizzate (HF%) e del rapporto LF/HF nella fase precedente al FPD. Tali parametri, essendo normalizzati, presentano una minore disomogeneità tra i soggetti e una minore variabilità intra soggetto e pertanto si prestano meglio a questo tipo di analisi.

Un *mixed model* è un modello statistico che tiene conto sia degli effetti fissi (*fixed effect*) sia degli effetti stocastici (*random effect*) che influenzano il valore di una variabile in uscita. I primi sono legati all'intera popolazione oppure a determinati fattori sperimentali controllati e ripetibili, quindi si suppone che influenzino ogni misurazione nello stesso modo. I *random effects*, invece, sono associati ad ogni singola misurazione

sperimentale e rappresentano la variabilità soggettiva all'interno di una popolazione, sono inseriti nel modello sotto forma di rumore additivo (Lindstrom et Bates, 1990).

In generale il *linear mixed effect model* per la j-esima osservazione dell'i-esimo individuo è definita come:

$$y_{ij} = f(\boldsymbol{\phi}_i, \mathbf{x}_{ij}) + \varepsilon_{ij} \quad (2.8)$$

dove y_{ij} è la j-esima uscita dell'i-esimo individuo, \mathbf{x}_{ij} è il vettore delle predizioni per la j-esima uscita dell'i-esimo individuo, $f()$ è una funzione non lineare del vettore delle predizioni e del vettore dei parametri $\boldsymbol{\phi}_i$ che ha lunghezza r ed ε_{ij} è un rumore additivo che ha distribuzione normale. Si noti che il vettore dei parametri $\boldsymbol{\phi}_i$ può variare da un individuo all'altro.

Il vettore dei parametri $\boldsymbol{\phi}_i$ può anche essere scritto nella forma:

$$\boldsymbol{\phi}_i = \mathbf{A}_i \boldsymbol{\beta} + \mathbf{B}_i \mathbf{b}_i \quad (2.9)$$

$$\mathbf{b}_i \sim N(\mathbf{0}, \sigma^2 \mathbf{D}) \quad (2.10)$$

Dove $\boldsymbol{\beta}$ è un vettore di lunghezza p che contiene i parametri fissi della popolazione, \mathbf{b}_i è un vettore di lunghezza q che permette di inserire nel modello i random effect associati all'individuo i-esimo, \mathbf{A}_i e \mathbf{B}_i sono due matrici di coefficienti associate rispettivamente agli effetti fissi e a quelli random di dimensioni $r \times p$ e $r \times q$ e $\sigma^2 \mathbf{D}$ è la matrice di covarianza.

Pertanto un modello LME che tiene in considerazione sia gli effetti fissi che random può essere scritto come segue:

$$y_{ij} = f(\mathbf{A}_i \boldsymbol{\beta} + \mathbf{B}_i \mathbf{b}_i, \mathbf{x}_{ij}) + \varepsilon_{ij} \quad (2.11)$$

Se il dataset, come nel nostro caso, prevede una distinzione in gruppi degli individui la matrice \mathbf{A}_i può essere scelta diversamente per ciascun gruppo, in questo modo si possono considerare effetti fissi differenti per ognuno dei diversi gruppi.

Nel nostro caso gli effetti fissi sui parametri LF%, HF% e sul rapporto LF/HF sono legati all'appartenenza dell'animale ad uno dei due gruppi FFPD e SFPD, mentre gli effetti random sull'uscita del segnale sono dovuti alla variabilità del singolo animale.

E' stato scelto un modello lineare definito come:

$$y_{ij} = (\varphi_1 + v\varphi_2) t_{ij} + \varphi_3 \quad (2.12)$$

dove y_{ij} rappresenta il valore della variabile in uscita, ovvero uno dei tre parametri (LF%, HF% o LF/HF) per il soggetto i -esimo all'istante j -esimo, v contiene i predittori gruppo-dipendenti, $\varphi = [\varphi_1 \ \varphi_2 \ \varphi_3]$ è il vettore contenete i parametri del modello, associati sia agli effetti fissi che a quelli random. È possibile riscrivere il modello nella forma seguente per mettere in evidenza la componente deterministica e quella stocastica di ciascun parametro:

$$y_{ij} = ((\beta_1 + b_{1i}) + v(\beta_2 + b_{2i})) t + (\beta_3 + b_{3i}) \quad (2.13)$$

dove il vettore $\beta = [\beta_1 \ \beta_2 \ \beta_3]$ rappresenta la componente deterministica del vettore φ dei parametri ed è associata agli effetti fissi che sono i medesimi per ciascun ratto i , mentre il vettore $b = [b_{1i} \ b_{2i} \ b_{3i}]$ rappresentala la componente stocastica del vettore φ , è associata agli effetti random ed è differente per ciascun ratto.

2.6 Calcolo dell'Approximate Entropy e della Sample Entropy

Diversi metodi di misura dell'entropia sono stati proposti e studiati nell'ambito dell'analisi non lineare di sistemi complessi. In generale, il concetto di entropia è legato al disordine di un sistema e alla sua predicibilità: maggiore è l'entropia di un sistema inferiore è il suo grado di ordine. L'entropia è dunque un indice del comportamento caotico di un sistema.

Ci sono diversi metodi per il calcolo dell'entropia, dei quali il più conosciuto è noto come calcolo dell'entropia di Shannon (SE), definita dalla seguente formula:

$$H(X) = - \sum_i p(x_i) \log p(x_i) \quad (2.14)$$

Dove X rappresenta la realizzazione di una variabile stocastica discreta che può assumere un certo valore all'interno di un set di valori Θ secondo una certa funzione di probabilità $p(x_i) = P\{X = x_i\}$, $x_i \in \Theta$.

Al fine di permettere un'applicazione più vasta della misura dell'entropia Pincus propose l'Approximate Entropy (ApEn). Il calcolo dell'indice ApEn si presta, infatti, a molte applicazioni in cui la lunghezza delle serie numeriche da analizzare risulta ridotta ed inoltre è adatta all'analisi di serie temporali affette da rumore. Per questi motivi l'Approximate Entropy ha trovato applicazione nell'ambito biomedico per approfondire lo studio delle serie di variabilità cardiaca sia nell'uomo che in modelli animali.

Al fine di approfondire i risultati ottenuti con i metodi di analisi descritti nei precedenti paragrafi si è proceduto al calcolo dell'Approximate Entropy e della Sample Entropy secondo l'algoritmo descritto nel seguito.

Fissato un numero intero positivo m ed un numero reale positivo r , dati N valori $\{x(i)\}$ di una serie temporale, l'algoritmo per il calcolo dell'indice ApEn prevede di creare un set di $N-m+1$ vettori $\{u(i)\}$ dove ciascun vettore ha m componenti scalari. L' i -esimo vettore è dunque formato dalle componenti $u(i)=[x(i), \dots, x(i+m-1)]$. Si procede calcolando la distanza $d[u(i), u(j)]$ tra ciascuna coppia di vettori appartenenti al set precedentemente descritto definita come la differenza massima tra le rispettive componenti scalari dei due vettori.

$$d[u(i), u(j)] = \max_{k=1, \dots, m} (|u(i+k-1) - u(j+k-1)|) \quad (2.15)$$

Quindi viene calcolata la funzione di correlazione:

$$C_i^m(r) = (\text{numero di vettori } j \text{ t. c. } d[u(i), u(j)] \leq r) / (N - m + 1) \quad (2.16)$$

Tale quantità misura la frequenza di pattern che hanno una durata di m campioni con una certa tolleranza r . La media del logaritmo naturale di $C_i^m(r)$ è definita come:

$$\phi^m(r) = (N - m + 1)^{-1} \sum_{i=1}^{N-m+1} \ln(C_i^m(r)) \quad (2.17)$$

L'Approximate Entropy è definita come :

$$ApEn(m, r) = \lim_{N \rightarrow \infty} [\phi^m(r) - \phi^{m+1}(r)] \quad (2.18)$$

Se in numero di campioni N è finito l'entropia può essere stimata come:

$$ApEn(m, r, N) = [\Phi^m(r) - \Phi^{m+1}(r)] \quad (2.19)$$

Intuitivamente l'Approximate Entropy valuta la probabilità condizionata che due sequenze simili per m punti siano simili anche per $m+1$ punti e può essere vista come una quantità logaritmica che indica la presenza di pattern ripetuti all'interno della serie, quindi una misura logaritmica della regolarità e del livello di ordine di una serie temporale.

L'indice $ApEn(m, r, N)$ possiede molti vantaggi rispetto ad altri metodi di calcolo dell'entropia, come ad esempio l'entropia di Kolmogorov-Sinai (K-S). Non essendo influenzata dalla presenza di rumore con una intensità inferiore ad r e risultando più robusta in presenza di artefatti anche di lunga durata, il calcolo dell' $ApEn(m, r, N)$ restituisce un risultato attendibile anche con un numero di punti limitato e, infine, rappresenta una quantità finita sia per processi stocastici che per processi deterministici. Queste caratteristiche rendono l'indice $ApEn$ applicabile a serie di medie dimensioni affette da rumore, come le serie di variabilità che sono oggetto del nostro lavoro.

Pincus e Goldberger (1994) hanno notato che decrementi dell'Approximate Entropy sono spesso collegati a quelli della deviazione standard (SD) dell'RR. Tuttavia, hanno suggerito che si può minimizzare l'effetto di questa correlazione scegliendo opportunamente il parametro r come una certa percentuale fissa della deviazione standard della serie analizzata. Secondo calcoli che si basano sia su considerazioni teoriche che su applicazioni cliniche, hanno concluso per un valore di N compreso tra 100 e 5000 e per m pari a 2 ed r compreso tra 0.1 SD e 0.25SD, il calcolo dell'indice produce risultati statisticamente validi per applicazioni all'HRV nell'uomo (Pincus, 1995).

Tuttavia l' $ApEn(m, r, N)$ calcolata nel modo appena descritto risulta leggermente sottostimata a causa del fatto che nel calcolo della quantità $C_i^m(r)$ vengono contati anche i *self-matching*, ovvero tutti quei casi in cui $i=j$. Per questo motivo è stata introdotta la Sample Entropy (Richman e Moorman, 2000).

La SampEn è una misura dell'entropia calcolata in maniera analoga a quella dell' $ApEn$, ma la differenza principale tra le due misure consiste nel fatto che nel calcolo dell'indice SampEn non vengono contati i *self-matching*.

Nel nostro caso, sulla base di lavori precedenti (Gonçalves et al., 2012), si è scelto di calcolare sia l' $ApEn(m, r, N)$ che la $SampEn(m, r, N)$ per $m=2$ mentre per il parametro

r è stato considerato il seguente set di valori: 0.1SD, 0.15SD, 0.2SD, 0.6SD, 0.9SD e 1.2SD. Sia l'Approximate Entropy che la Sample Entropy sono state calcolate per le serie battito-battito della pressione media e dell'heart period ricavate dal segnale pressorio come spiegato nel paragrafo 2.1, utilizzando le serie temporali campionate alla frequenza di 5 Hz come descritto.

Il numero N di punti utilizzati per il calcolo dell'ApEn (m, r, N) e della SampEn (m, r, N) è sempre superiore ad 890. Per semplicità, nel seguito si ometterà la dipendenza dal numero di campioni N e si utilizzeranno le diciture ApEn (m, r) e SampEn (m, r) per far riferimento rispettivamente all'Approximate Entropy ed alla Sample Entropy. Per il calcolo è stata utilizzata in MATLAB[®] la funzione *ApSampEN.m* che implementa l'algoritmo descritto precedentemente in questo paragrafo.

Si è scelto di effettuare questo tipo di analisi non lineare solamente per il periodo temporale che va dal trentesimo minuto dopo l'occlusione delle arterie sino alla nota che segnala l'evento di FPD. Questa finestra temporale è stata suddivisa in sotto finestre della durata di 3 minuti con overlapping del 50%; per ciascuna finestra è stato calcolato il valore dell'indice ApEn e dell'indice SampEn per il set di valori di r riportato in precedenza. Per ciascun ratto il calcolo di questi indici è stato effettuato anche per il segmento di baseline, ricavato come descritto nel paragrafo 2.2.1, al fine di avere un valore di riferimento in una condizione precedente all'occlusione delle arterie splanchniche e alla condizione di ischemia provocata da quest'ultima.

In particolare, si è scelto di confrontare il valore dell'indice ApEn e dell'indice SampEn dei primi tre minuti del suddetto periodo temporale precedente all'evento di FPD con i rispettivi valori dell'ApEn e della SampEn negli ultimi tre minuti. Nel seguito, con la dicitura *30' post clamp* si fa riferimento alla prima finestra di durata tre minuti e con la dicitura *Pre-FD* si fa riferimento all'ultima finestra di durata tre minuti precedente all'evento di *fatal drop*.

2.7 Corrected Conditional Entropy

Si è deciso di completare l'analisi non lineare delle serie battito-battito MAP e HP calcolando anche un terzo indice dell'entropia, la *corrected conditional entropy* (CCE).

Il primo passo dell'algoritmo per calcolare la CCE consiste in una normalizzazione dei valori della serie per ridurla ad un processo con media nulla e varianza unitaria:

$$x(i) = X(i) - E[X(i)]/std[X(i)] \quad (2.20)$$

Dove $X(i)$ è la serie originale costituita da N campioni.

A partire dalla serie normalizzata si costruisce uno spazio delle fasi m -dimensionale (*time delay reconstruction*, Takens, 1981). Si costruiscono quindi $N-m+1$ vettori, ciascuno dei quali contiene m campioni della serie, questo significa che ciascun vettore rappresenta un pattern di durata m campioni: $x_m(i) = [x(i), x(i-1), \dots, x(i-m+1)]$. Ed è rappresentato da un punto nello spazio delle fasi.

La *Conditional Entropy* (CE) è definita dalla seguente equazione:

$$E(m/m-1) = \sum_{m-1} p_{m-1} \sum_{m/m-1} p_{m/m-1} \log p_{m/m-1} \quad (2.21)$$

In cui p_{m-1} indica la probabilità di individuare il pattern $x_m(i)$, $p_{m/m-1}$ indica la probabilità condizionata che, dato il pattern $x_{m-1}(i)$, sega a questo l' m -esimo campione del pattern $x_m(i)$. Questa definizione deriva direttamente da quella dell'entropia di Shannon (2.12). infatti la CE può essere vista come la variazione dell'SE rispetto ad m :

$$E(m/m-1) = E(m) - E(m-1) \quad (2.22)$$

La stima della CE può essere ottenuta approssimando la (2.22):

$$\hat{E}(m/m-1) = \hat{E}(m) - \hat{E}(m-1) \quad (2.23)$$

In cui $\hat{E}(m)$ e $\hat{E}(m-1)$ rappresentano la stima della SE rispettivamente in uno spazio di *embedding* m -dimensionale ed $(m-1)$ -dimensionale. $\hat{E}(m)$ può essere calcolata approssimando la probabilità contenuta in (2.14) con le frequenze di ciascun campione. Per calcolarle si quantizza la serie $x(i)$ in ζ livelli di ampiezza $r = (x_{\max} - x_{\min}) / \zeta$. La quantizzazione della serie $x(i)$ corrisponde a suddividere lo spazio delle fasi in M iper-cubi di lato r . Ciascun pattern di lunghezza m è rappresentato un punto nello spazio degli stati m -dimensionale, due punti all'interno di uno stesso iper-cubo hanno una distanza inferiore ad r e ciò equivale a dire che, fissata una soglia di tolleranza r , i pattern rappresentati dai

punti che si trovano all'interno di uno stesso iper-cubo sono simili tra loro. Contando il numero di punti all'interno di un iper-cubo ottengo le frequenze per calcolare la (2.23).

La CE calcolata secondo questo algoritmo mostra diverse limitazioni: la frequenza dei pattern calcolata in questo modo dipende dal numero di campioni della serie N e dal numero di livelli di quantizzazione ζ , dunque $\hat{E}(m/m - 1)$ è una funzione di m , N e ζ .

In particolare un numero limitato di campioni N porta a sottostimare la CE poiché, al diminuire di N , aumenta il numero di punti che vengono a trovarsi da soli all'interno di un iper-cubo; lo stesso accade all'aumentare di m .

Un numero N di campioni superiore a ζ^{m+1} garantisce che, anche in presenza di rumore, in media ogni iper-cubo contenga più di un singolo punto in ogni spazio delle fasi di dimensione inferiore a m (Porta et al., 1998).

Al fine di superare i problemi associati alla disponibilità di un numero limitato di campioni ed evitare la scelta apriori della dimensione di embedding m è stata introdotta una correzione nella procedura di calcolo della CE. In particolare il metodo proposto si basa sulla ricerca del minimo della funzione Corrected Conditional Entropy(CCE):

$$CCE(m) = \hat{E}(m/m - 1) + E_c(m) \quad (2.24)$$

La CCE è una funzione della dimensione di *embedding* m ed è composta da due termini: la CE ed un termine correttivo così definito:

$$E_c(m) = perc(m) \cdot \hat{E}(1) \quad (2.25)$$

Dove $perc(m)$ indica la percentuale di punti che si trovano da soli all'interno di un iper-cubo e $\hat{E}(1)$ il valore stimato della SE per $m=1$. Quest'ultimo rappresenta il valore della CE per un rumore bianco che ha la stessa distribuzione di probabilità della serie considerata.

Le componenti della CCE hanno un andamento opposto all'aumentare di m , la prima componente decresce all'aumentare di m la seconda, invece, cresce all'aumentare di m . Di conseguenza, la CCE presenta un minimo, il quale è considerato come la migliore stima della CE (figura 2.11).

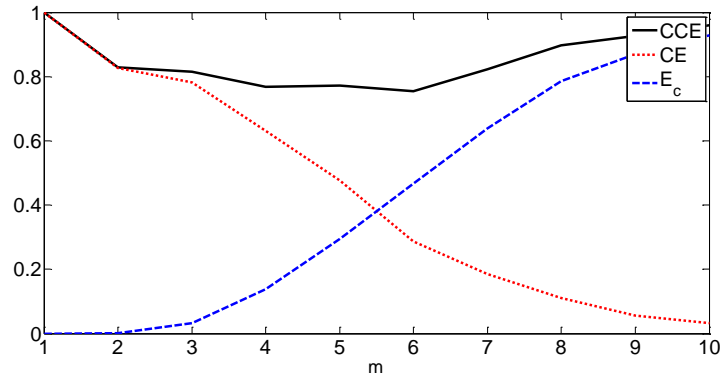


Figura 2.11 Andamento delle componenti della CCE in funzione della dimensione di embedding m

Anche in questo caso si è scelto di applicare questo metodo di calcolo dell'entropia alle serie battito-battito MAP e HP per il periodo temporale che va dal trentesimo minuto dopo l'occlusione delle arterie sino alla nota che segnala l'evento di FPD. Questa finestra temporale è stata suddivisa in sotto finestre della durata di tre minuti con overlapping del 50%, per ciascuna finestra è stato calcolato il valore della CCE tramite l'algoritmo appena descritto. Per ciascun ratto il calcolo della CCE è stato effettuato anche per il segmento di baseline, ricavato come descritto nel paragrafo 2.2.1, al fine di avere un valore di riferimento in una condizione precedente all'occlusione delle arterie splancniche e alla condizione di ischemia provocata da quest'ultima.

In particolare, si è scelto di confrontare il valore della CCE nei primi tre minuti del suddetto periodo temporale precedente all'evento di FPD con il valore negli ultimi tre minuti. Nel seguito con la dicitura *30' post clamp* si fa riferimento alla prima finestra di durata tre minuti e con la dicitura *Pre-FD* si fa riferimento all'ultima finestra di durata 3 minuti precedente all'evento di fatal drop.

Per il calcolo della CCE è stata utilizzata la funzione *reg.m* che implementa l'algoritmo descritto nel corso di questo paragrafo. La funzione chiede in ingresso il valore massimo della dimensione di embedding m_{max} ed il numero di livelli ζ per effettuare la quantizzazione del segnale. Sulla base di studi ed applicazioni precedenti (Porta et Al, 1998) è stato impostato $m_{max} = 10$ e $\zeta = 6$. Il numero N di campioni di ciascun serie battito-battito per cui è stato effettuato il calcolo della CCE è sempre superiore ad 800.

2.8 Analisi statistiche

I dati relativi all'analisi temporale ed al calcolo dell'entropia (ApEn, SampEn e CE) sono espressi nella forma *media ± deviazione standard*. Il confronto tra i gruppi A,B,C e D è stato svolto utilizzando per ciascun indice il test ANOVA ad una via. Sono stati considerati significativi p-values inferiori a 0,05. Per gli indici che hanno mostrato differenze significative dei valori per almeno uno dei quattro gruppi è stato condotto un *post hoc comparisons* test per comprendere quali gruppi avessero valori medi significativamente differenti dagli altri. Il criterio utilizzato per le comparazioni multiple è il “*Tukey's honestly significant difference criterion*”.

Nel confronto tra i due macrogruppi FFPD e SFPD nelle due epoche *30' post clamp* e *pre-FPD* sono stati utilizzati t-tests disaccoppiati a due code.

Per ciascun gruppo A,B, C,D e per i gruppi FFPD e SFPD i confronti tra i valori in due epoche temporali sono stati svolti utilizzando t-test accoppiati a due code e sono stati considerati significativi p-values inferiori a 0,05.

I dati relativi all'analisi in frequenza sono espressi nella forma *mediana (25° percentile, 75° percentile)*. Per ciascuna fase oggetto dell'analisi (*baseline, postclamp, 30' post clamp, pre-FPD*), per confrontare i valori delle potenze nelle bande VLF, LF e HF ed i parametri ricavati da queste (LF%, HF% e LF/HF) tra i quattro gruppi di trattamento, è stata condotta un'analisi delle varianze ANOVA *Kruskal Wallis* ad una via.

In questo caso il criterio utilizzato per le comparazioni multiple è stato il “*Tukey's least significant difference*” (LSD).

Per confrontare i dati relativi all'analisi in frequenza dei due macrogruppi FFPD e SFPD nelle due epoche *30' post clamp* e *pre-FPD* è stato utilizzato il *Wilcoxon Rank Sum* test.

Nel caso dei dati relativi all'analisi in frequenza, per ciascun gruppo A,B, C,D e per i gruppi FFPD e SFPD i confronti tra i valori in due epoche temporali sono stati svolti utilizzando il *Wilcoxon Signed Rank test*, sono stati considerati significativi p-values inferiori a 0,05.

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: Composizione dei gruppi sperimentali ed incidenza del FFPD in ciascun gruppo

Gruppo	Numero ratti	FFPD	SFPD
A: <i>NoXyl Glucose</i>	4	1	3
B: <i>NoXyl Saline</i>	7	3	4
C: <i>Xyl glucose</i>	6	2	4
D: <i>Xyl Gly Glucise</i>	7	0	7

Tutti i ratti presenti del *dataset* originale sono stati sottoposti al protocollo sperimentale descritto nel capitolo precedente. Alcuni dei segnali analizzati presentano, tuttavia, delle irregolarità o degli artefatti, dovuti ad esempio alla pulizia del catetere che

veniva effettuata quando ritenuta necessaria. Quando tali irregolarità si sono presentate in tratti del segnale fondamentali per l'analisi che questo lavoro si propone di effettuare, tali spezzoni di segnale sono stati esclusi dall'analisi intrapresa per il singolo ratto.

Inoltre alcuni ratti mostrano pesanti alterazioni del ritmo cardiaco in alcuni tratti del segnale incompatibili con le tecniche di analisi che questo lavoro utilizza (vd. par. 3.1.1). Questi due motivi hanno portato in alcuni casi ad escludere dei ratti dalle analisi statistiche che vengono presentate in questo capitolo. La tabella seguente riporta il numero di ratti di ciascun gruppo utilizzati per le analisi statistiche in ogni epoca del protocollo analizzata.

Tabella 3.2: Numerosità dei gruppi sperimentali in ciascuna delle epoche analizzate

Gruppo	Baseline	Post clamp	30' post cl.	Pre-FPD
A: NoXyl Glucose	3	3	4	3
B: NoXyl Saline	7	7	6	4
C: Xyl glucose	5	5	4	4
D: Xyl Gly Glucose	6	6	6	5

3.1.1 Aritmie cardiache

Nel presente paragrafo vengono presentati alcuni casi di alterazioni del ritmo cardiaco riscontrate in alcuni animali in diverse fasi del protocollo. La tabella 3.3 riporta, per ciascun gruppo e ciascuna epoca, il numero di animali che presenta alterazioni del ritmo cardiaco.

Tabella 3.3: Numero dei casi di aritmia per ciascun gruppo in ciascuna delle epoche analizzate

	Baseline		Post Clamp		30' post		Pre-FD	
	<i>FFPD</i>	<i>SFPD</i>	<i>FFPD</i>	<i>SFPD</i>	<i>FFPD</i>	<i>SFPD</i>	<i>FFPD</i>	<i>SFPD</i>
A	0/1	0/3	0/1	0/3	0/1	0/3	0/1	1/3
B	0/3	0/4	0/3	0/4	0/3	1/4	0/3	2/4
C	1/2	0/4	2/2	1/4	1/2	0/4	1/2	1/4
D	0	1/7	0	1/7	0	1/7	0	2/7

Un'analisi approfondita dei segnali ha permesso di individuare due ratti, appartenenti rispettivamente ai gruppi C e D, che manifestano un marcato disturbo del ritmo presente nel tratto di *baseline* e che persiste durante tutte le fasi del protocollo. Con i

dati in nostro possesso è impossibile determinare se tale condizione fosse preesistente o se tali disturbi del ritmo siano insorti in seguito al trattamento previsto dal protocollo.

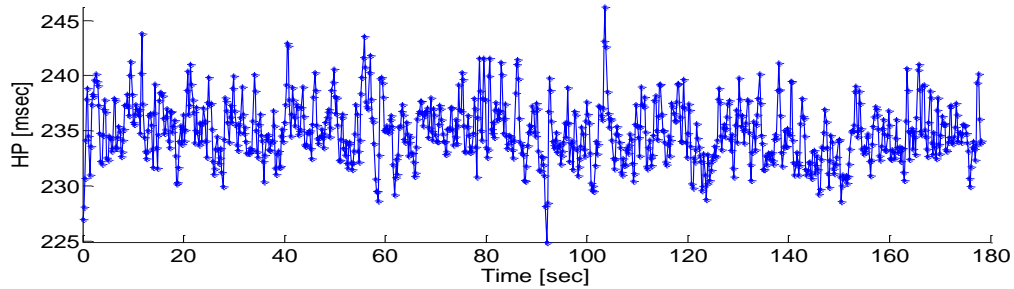


Figura 3.1 Tratto della serie HP del ratto C4 (FFPD) nell'epoca di *baseline* che presenta una marcata aritmia

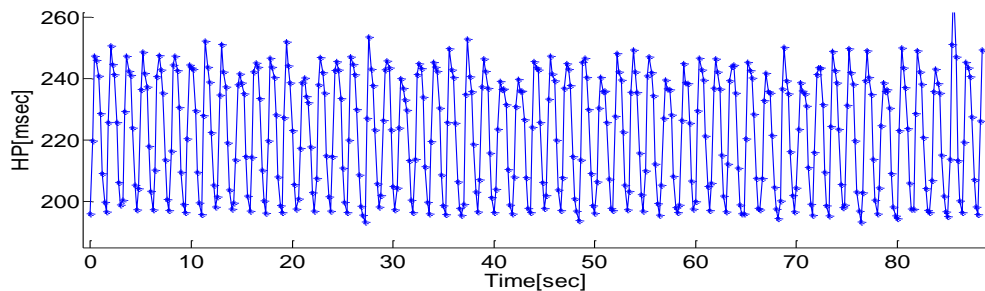


Figura 3.2 Tratto della serie HP del ratto D6 (SFPD) nell'epoca di *postclamp* che presenta una aritmia trigemina

Un altro ratto appartenente al gruppo C mostra delle alterazioni del ritmo cardiaco nei minuti seguenti all'occlusione delle arterie.

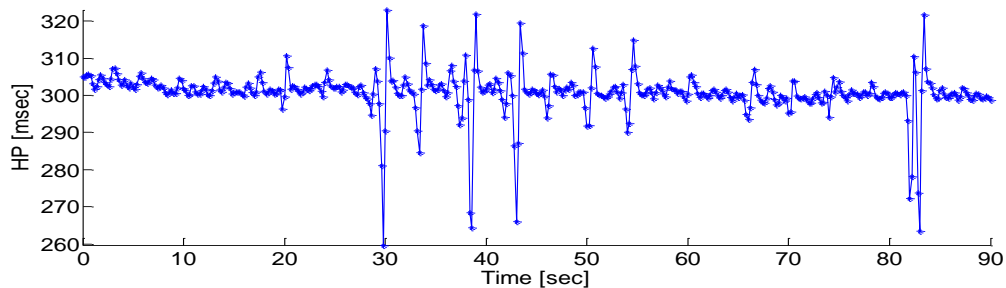


Figura 3.3 Tratto della serie HP del ratto C1 (FFPD) nell'epoca di post clamp che presenta episodi di aritmia

Secondo i parametri riportati in tabella 2.2 alcuni ratti dei gruppi A e B, non trattati con Xilazina, mostrano una marcata tachicardia nei minuti che precedono l'evento di fatal pressure drop.

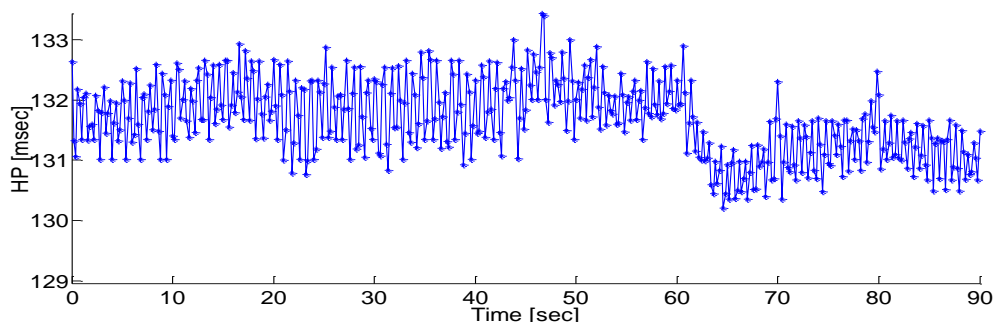


Figura 3.4 Tratto della serie HP del ratto B6 (SFPD) nell'epoca di *pre-FD* che presenta una marcata tachicardia

Due ratti appartenenti ai gruppi C e D mostrano dei brevi episodi di bradicardia associati a fenomeni di drop and recovery della pressione media (MAP).

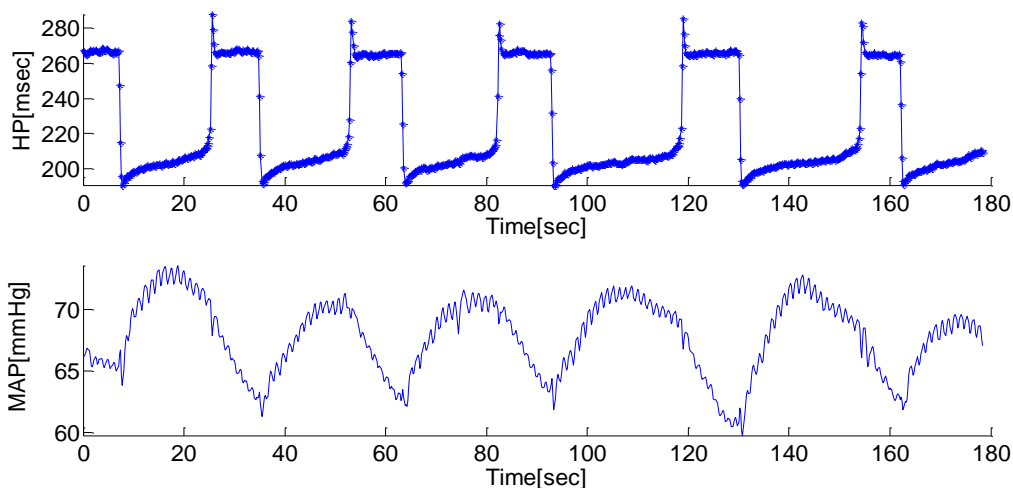


Figura 3.5 Nel riquadro in alto tratto della serie HP del ratto C6 (SFPD) nell'epoca di *pre-FD* che presenta episodi ripetuti di bradicardia. Nel riquadro in basso tratto corrispondente della serie MAP con episodi di drop and recovery.

Come si può notare in figura 3.5, ad una caduta della pressione media (MAP) di circa 10-15 mmHg corrisponde un allungamento del periodo cardiaco (HP) di circa 80 msec e dunque una decelerazione del ritmo cardiaco. Sembra essere presente una certa regolarità nel presentarsi di questo fenomeno e nella sua durata (circa 15 sec). Si noti inoltre che i cambiamenti nella serie HP sono molto più repentini di quelli della serie MAP che invece sembrerebbe adattarsi lentamente alla decelerazione del ritmo cardiaco. Un fenomeno simile ma più rapido è riportato in figura 3.6.

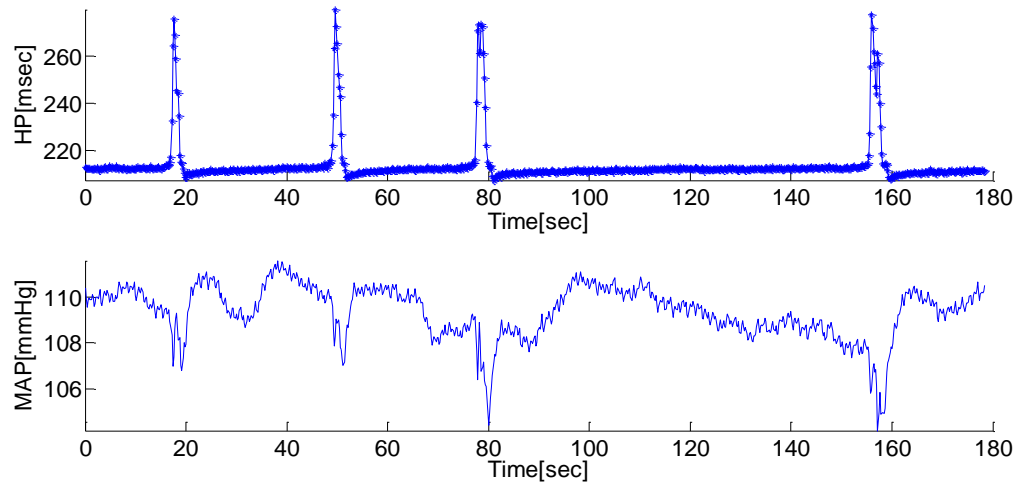


Figura 3.6 Nel riquadro in alto tratto della serie HP del ratto D3 (SFPD) nell'epoca di *pre-FD* che presenta episodi ripetuti di bradicardia. Nel riquadro in basso tratto corrispondente della serie MAP con episodi di *drop and recovery*.

3.1.2 Considerazioni generali sullo spettro di potenza

Gli spettri della pressione sistolica e della serie HP (figura 3.7 b e c) contengono due componenti principali: (i) un picco ad alta frequenza originato dall'attività respiratoria e (ii) delle componenti a bassa frequenza. Queste due componenti sono associate rispettivamente all'attività del sistema nervoso simpatico e del sistema nervoso parasimpatico (Japundizic et al., 1990; Cerutti, 1991).

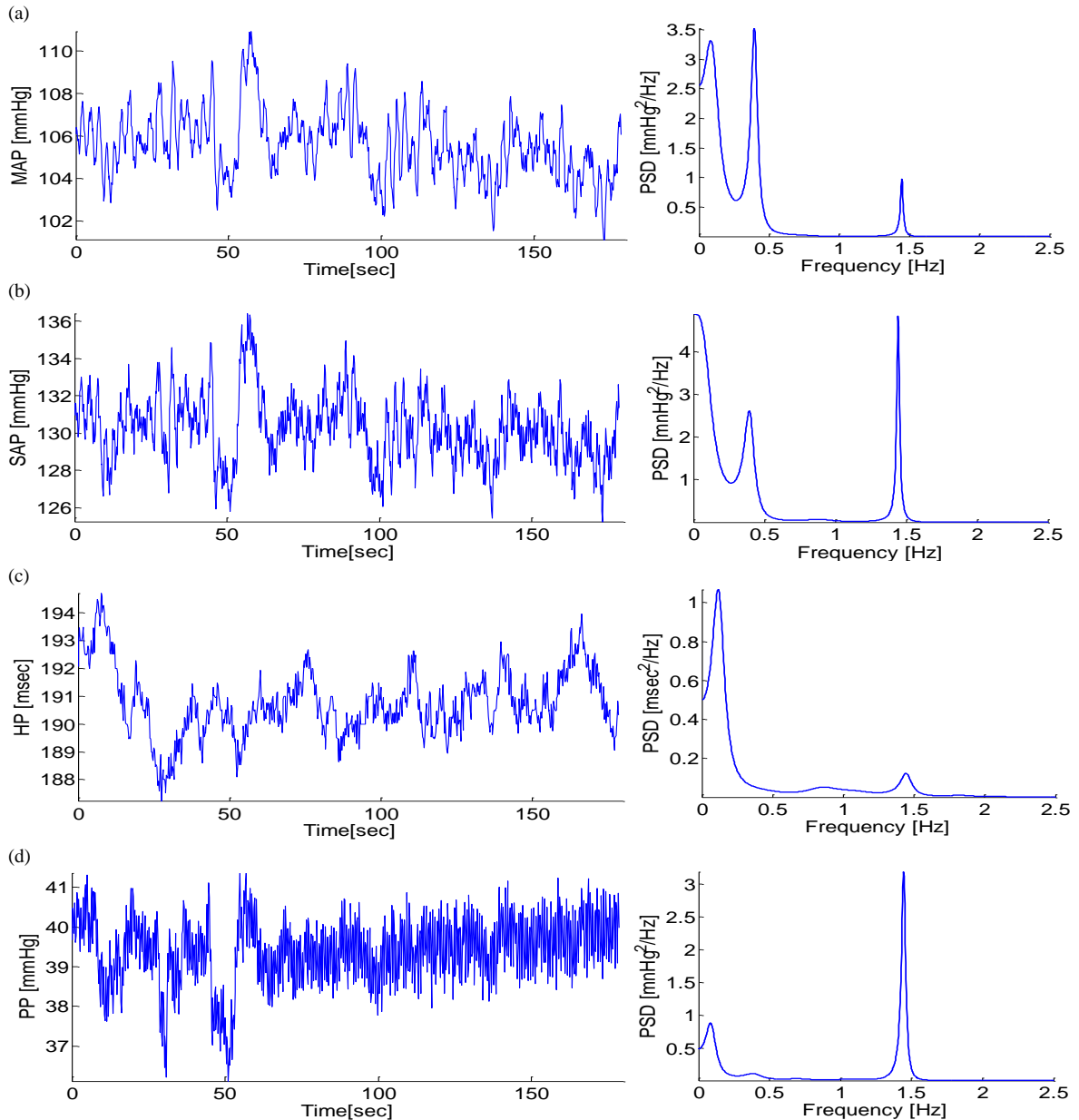


Figura 3.7 Serie battito-battito nel tempo e relativi spettri di potenza in un ratto non trattato con Xilazina nella fase di baseline: (a) Serie MAP; (b) serie SAP; (c) Serie HP; (d) serie PP.

Come si nota in figura 3.7, le serie SBP e PP contengono oscillazioni ad alta frequenza, che producono un picco ben visibile sui relativi spettri, e oscillazioni a bassa frequenza (0,25 -0,65 Hz); nella MAP le oscillazioni ad alta frequenza risultano meno

visibili e sullo spettro di potenza producono un picco meno pronunciato. La presenza di oscillazioni ad alta frequenza riflette le fluttuazioni del *cardiac output* dovute ai movimenti respiratori ed all'effetto dell'aritmia sinusale respiratoria sulla frequenza cardiaca. La serie HP mostra oscillazioni ad alta frequenza che, tuttavia, risultano meno regolari (Japundizic et al., 1990; Cerutti, 1991).

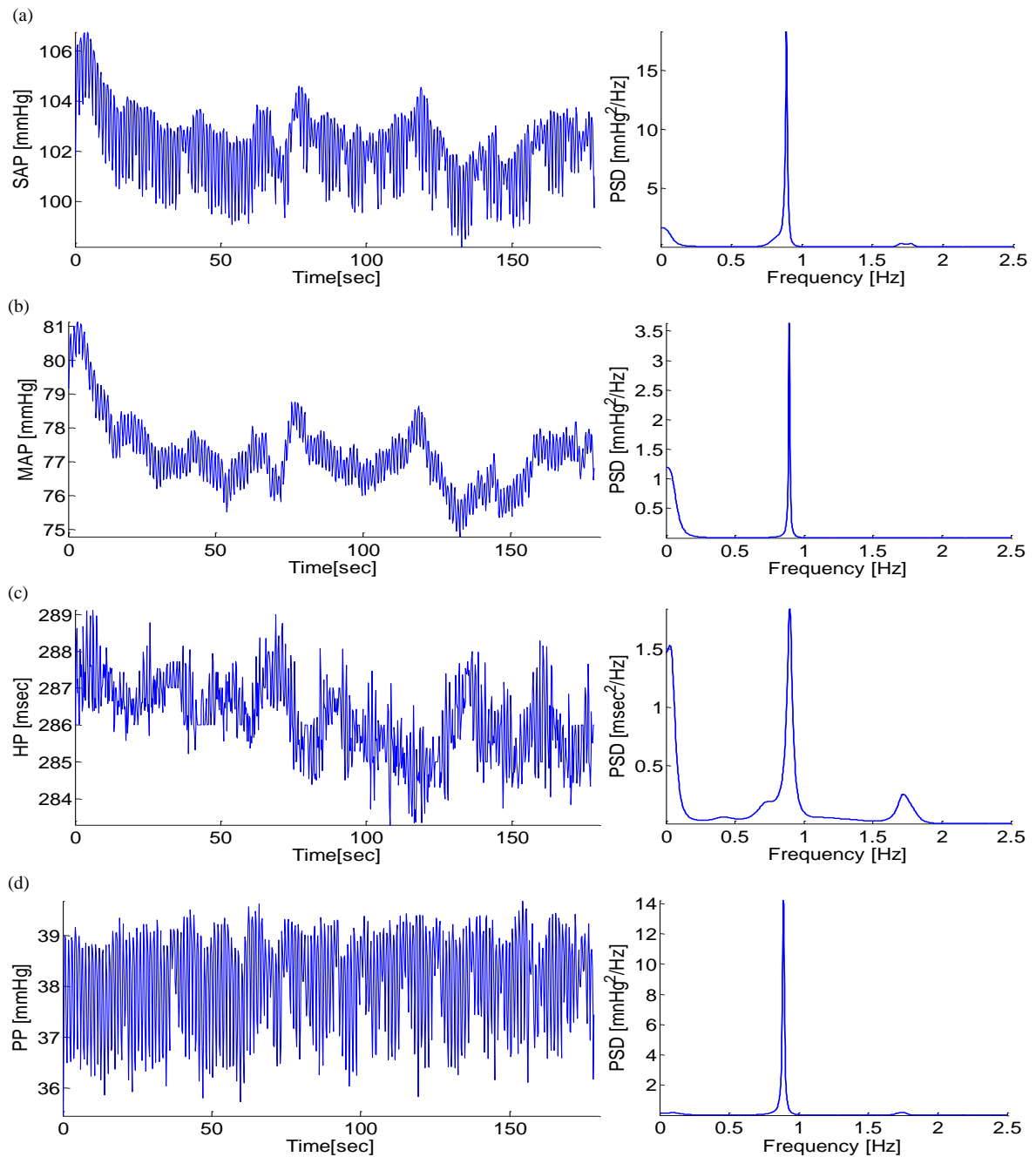


Figura 3.8 Serie battito-battito nel tempo e relativi spettri di potenza in un ratto trattato con Xilazina nella fase di baseline: (a) Serie MAP; (b) serie SAP; (c) Serie HP; (d) serie PP.

La figura 3.8 mostra le serie battito-battito MAP, SAP, HP e PP e i relativi spettri di potenza, nel segmento di baseline, per un ratto trattato con Xilazina. Si vede chiaramente che una sostanza agonista dei recettori α , come la Xilazina, contribuisce ad incrementare l'ampiezza delle oscillazioni ad alta frequenza, ossia il picco respiratorio ben visibile sullo spettro, riducendo la potenza a bassa frequenza; inoltre, la frequenza del picco respiratorio decresce.

L'analisi della morfologia degli spettri di potenza ottenuti dalle serie battito-battito ha permesso di individuare tre principali bande spettrali: (i) VLF comprese tra 0.003 Hz e 0.25 Hz; (ii) LF comprese tra 0.25 Hz e 0.75 Hz ; (iii) HF comprese tra 0.75 Hz e 2.5 Hz. Queste bande spettrali sono concordi con quelle definite in studi precedenti (Japundizic et al., 1990; Cerutti, 1991).

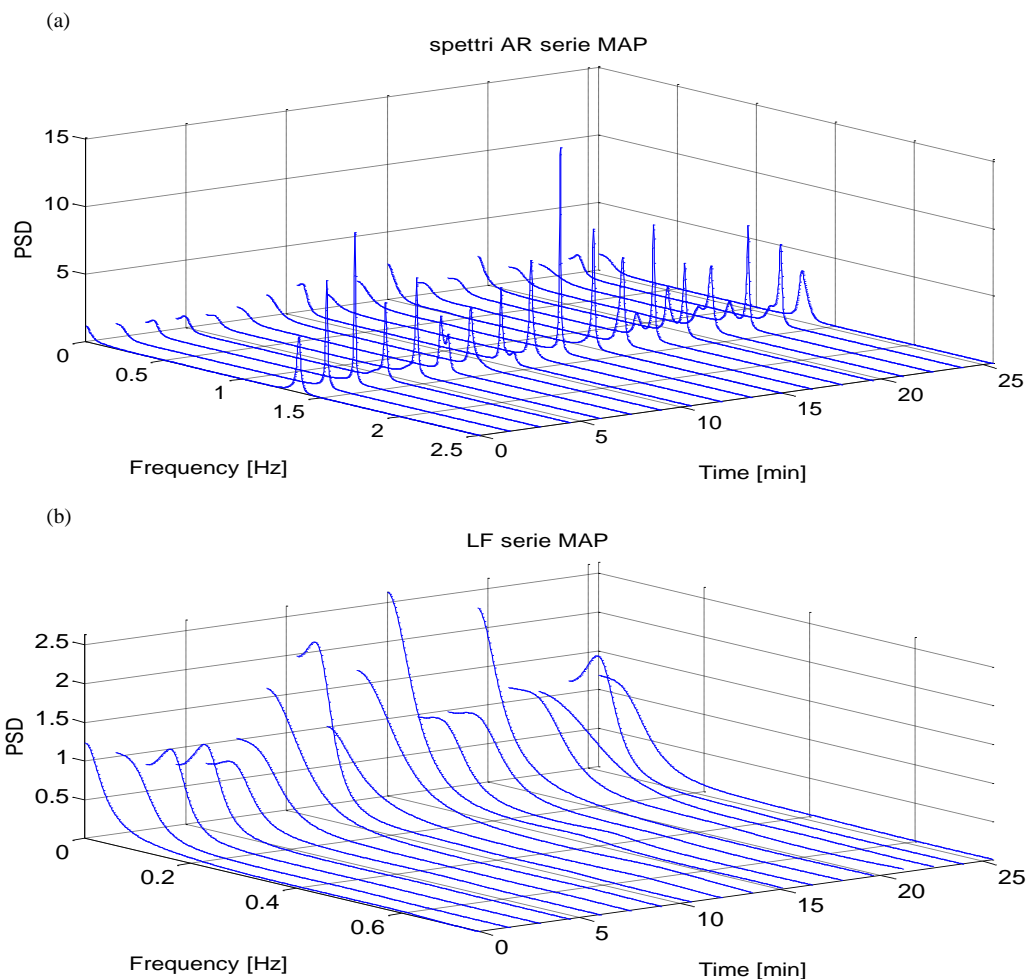


Figura 3.9 Spettri di potenza della serie MAP calcolati su finestre di tre minuti nella fase del protocollo successiva alla SAO per un ratto del gruppo *NoXyl*. In (a) spettro completo sino alla frequenza di Shannon, in (b) banda VLF ed LF (0-0.75Hz)

Nelle figura 3.9, 3.10 e 3.11 vengono mostrati gli spettri di potenza delle serie MAP, HP e PP calcolati su finestre temporali di tre minuti nella fase del protocollo successiva all'occlusione delle arterie per un ratto del gruppo *NoXyl*

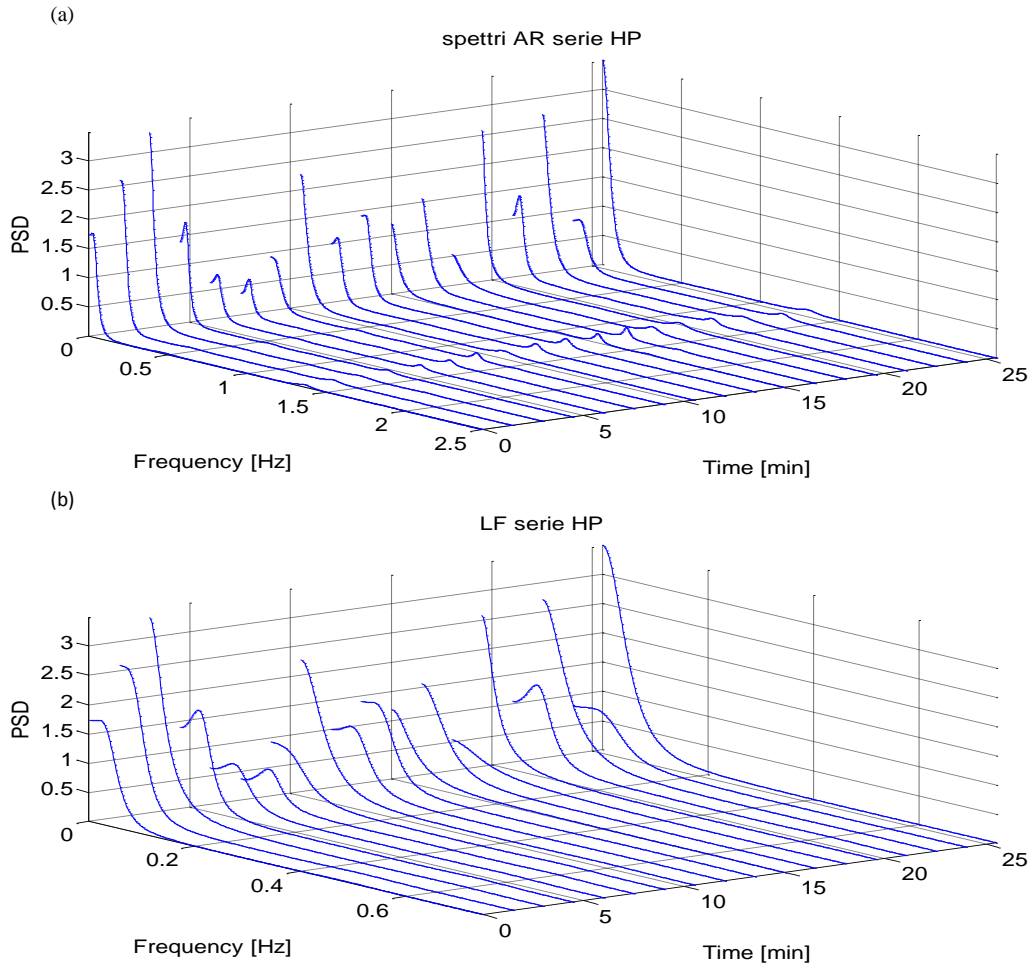


Figura 3.10 Spettri di potenza della serie HP calcolati su finestre di tre minuti nella fase del protocollo successiva alla SAO per un ratto del gruppo *NoXyl*. In (a) spettro completo sino alla frequenza di Shannon, in (b) banda VLF ed LF (0-0.75H)

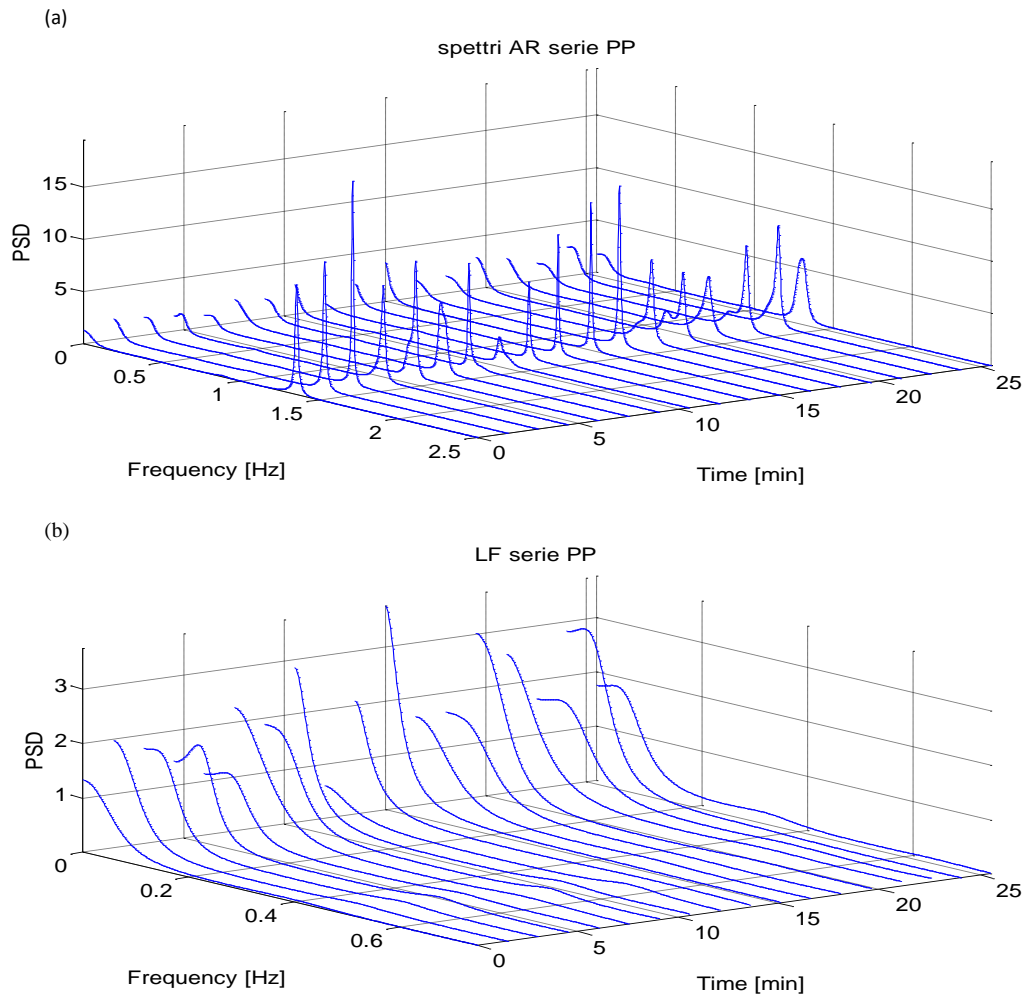


Figura 3.11 Spettri di potenza della serie PP calcolati su finestre di tre minuti nella fase del protocollo successiva alla SAO per un ratto del gruppo *NoXyl*. In (a) spettro completo sino alla frequenza di Shannon, in (b) banda VLF ed LF (0-0.75Hz)

Nelle figure seguenti vengono mostrati gli spettri di potenza delle serie MAP, HP e PP calcolati su finestre temporali di tre minuti nella fase del protocollo compresa tra il trentesimo minuto dopo la SAO e l'evento di FPD per un ratto del gruppo B che muore a causa di un SFPD.

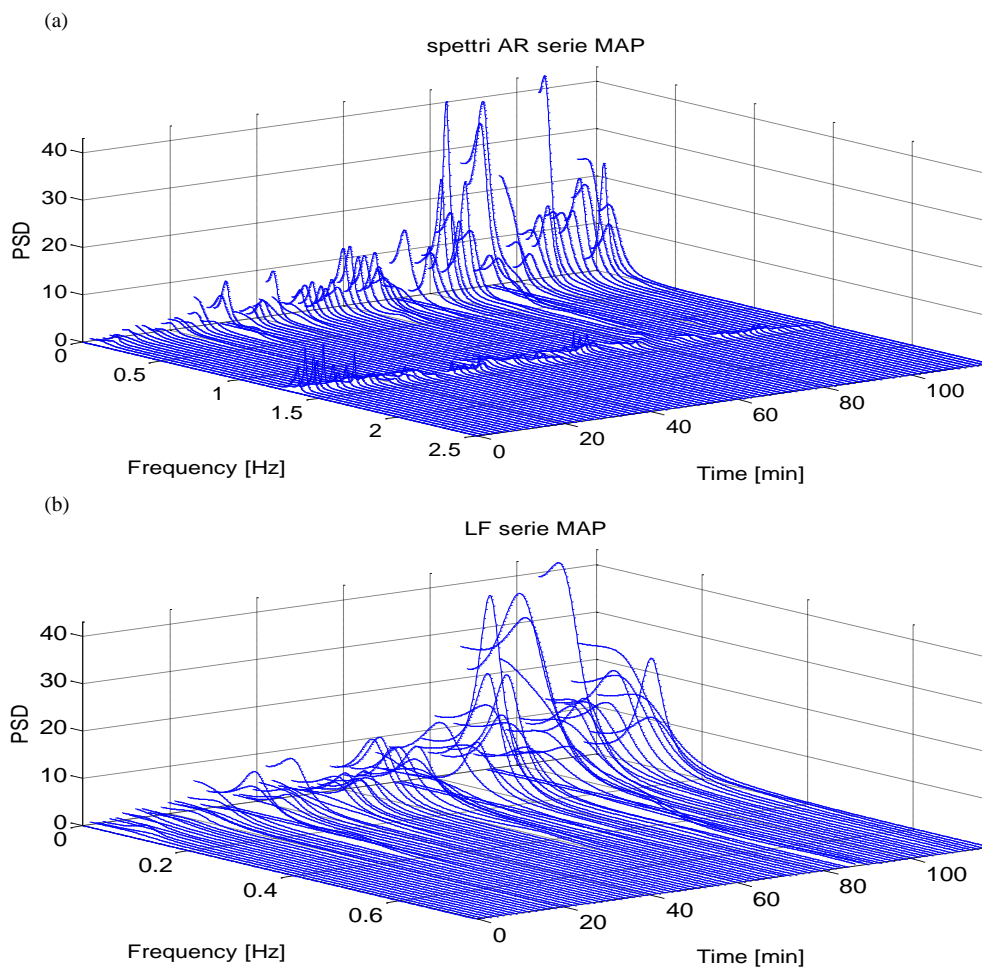


Figura 3.12 Spettri di potenza della serie MAP calcolati su finestre di tre minuti nella fase del protocollo compresa tra il trentesimo minuto dopo la SAO e il FPD per un ratto del gruppo B che presenta un FFPD. In (a) spettro completo sino alla frequenza di Shannon, in (b) banda VLF ed LF (0-0.75Hz)

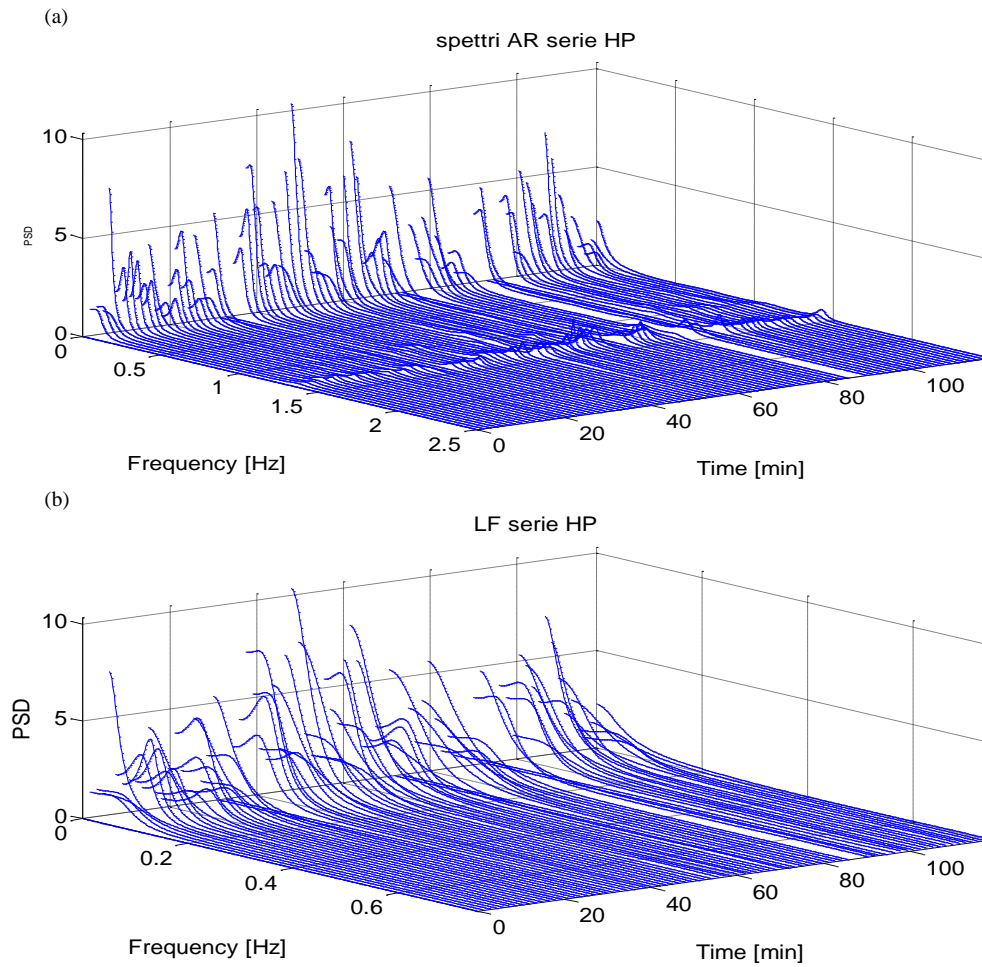


Figura 3.13 Spettri di potenza della serie HP calcolati su finestre di tre minuti nella fase del protocollo compresa tra il trentesimo minuto dopo la SAO e il FPD per un ratto del gruppo *B* che presenta un FFPD. In (a) spettro completo sino alla frequenza di Shannon, in (b) banda VLF ed LF (0-0.75Hz)

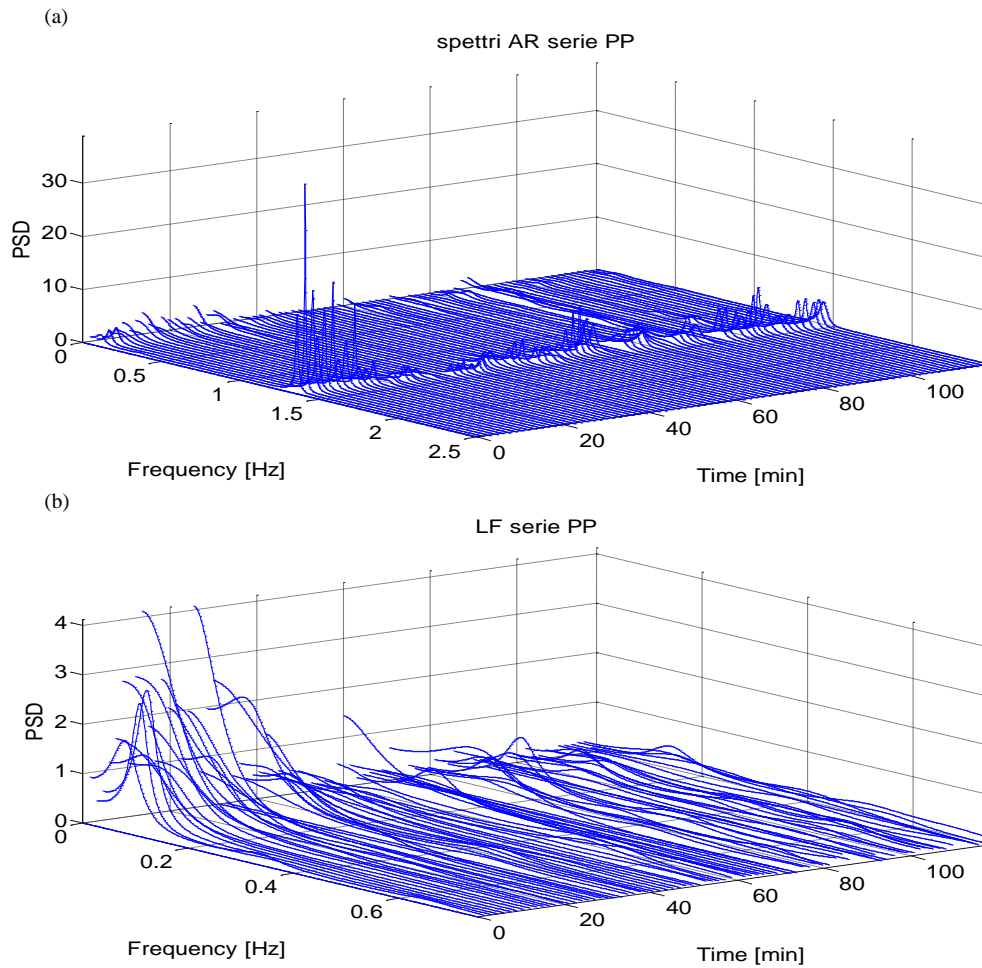


Figura 3.14 Spettri di potenza della serie PP calcolati su finestre di tre minuti nella fase del protocollo compresa tra il trentesimo minuto dopo la SAO e il FPD per un ratto del gruppo *B* che presenta un FFPD. In (a) spettro completo sino alla frequenza di Shannon, in (b) banda VLF ed LF (0-0.75Hz)

Nel seguito di questo capitolo verranno presentati i risultati del calcolo della potenza integrale nelle bande spettrali VLF, LF e HF che sono state definite in questo paragrafo.

3.2 Analisi della manovra di occlusione nel dominio del tempo

Come spiegato nel paragrafo 2.2.2, lo studio condotto in questo lavoro ha preso in considerazione due diverse epoche temporali: (i) la prima compresa tra il picco successivo all'occlusione delle arterie e il trentesimo minuto dopo tale evento e (ii) la seconda, di durata variabile, immediatamente successiva alla prima quindi compresa tra il trentesimo minuto dopo l'occlusione delle arterie e l'istante individuato come inizio del fatal pressure drop (FPD). Nei paragrafi seguenti verranno presentati i risultati relativi all'analisi della manovra di occlusione delle arterie splancniche. Questo evento, seguito da un aumento repentino della pressione media (figura 2.8) e da un aumento della frequenza cardiaca (figura 2.9), caratterizza la prima finestra di analisi ed è ben distinguibile su ogni segnale di pressione registrati. Verranno per primi presentati i risultati relativi all'analisi temporale e, nel paragrafo 3.3, quelli relativi all'analisi in frequenza delle serie MAP, HP e PP.

Tabella 3.4 Valori medi MAP (mmHg), HR (bpm) e PP (mmHg) per ciascun gruppo e per ciascuna epoca considerata (baseline e subito dopo la SAO).

	Baseline	Post-Clamp.
MAP^{&}		
Gruppo A	100 ± 7.08	135 ± 13.0 [§]
Gruppo B	98 ± 16.8	137 ± 7.20 [§]
Gruppo C	77 ± 4.30 ^b	135 ± 8.10 [§]
Gruppo D	79 ± 8.31 ^b	147 ± 9.72 [§]
HR^{*,#}		
Gruppo A	323 ± 14.6	335 ± 12.0
Gruppo B	340 ± 38.3	369 ± 57.6
Gruppo C	236 ± 17.8 ^{a,b}	219 ± 34.1 ^{a,b}
Gruppo D	245 ± 22.2 ^{a,b}	257 ± 32.5 ^b
PP^{&}		
Gruppo A	44.5 ± 4.73	52.1 ± 15.2
Gruppo B	45.2 ± 2.94	54.6 ± 7.05 [§]
Gruppo C	39.5 ± 3.98 ^b	55.5 ± 9.27 [§]
Gruppo D	45.2 ± 3.09	61.1 ± 6.63 [§]

*Confronti tra i diversi gruppi in ciascuna epoca: *1-way ANOVA p-value<0.01 nell'epoca di baseline, [&]1-way ANOVA p-value<0.05 nell'epoca di baseline, [#]1-way ANOVA p-value<0.01 nell'epoca Post Clamp., ^apost hoc comparisons p-value>0.05 vs gruppo A, ^bpost hoc comparisons p-value>0.05 vs gruppo B. Confronti tra le diverse epoche: [§]paired t-test p-value<0.05 vs. baseline.*

La tabella 3.4 riporta i valori della media e della deviazione standard della serie MAP, della serie HP e della serie PP durante la fase di baseline e nei minuti successivi all'innalzamento di pressione media provocato dalla SAO.

3.2.1 Pressione media

Nella fase di baseline, I valori medi della MAP (figura 3.15), dei gruppi trattati con Xilazina (C e D) risultano significativamente inferiori rispetto a quelli dei gruppi non trattati; questo effetto è compatibile con l'azione simpatolitica del farmaco. Si registrano aumenti significativi della pressione media in seguito alla manovra di occlusione per tutti e quattro i gruppi. In seguito a tale manovra, i quattro gruppi raggiungono valori di pressione media che non risultano significativamente differenti tra loro, dunque il valore raggiunto della MAP sembra essere indipendente dal trattamento farmacologico a cui i ratti sono stati precedentemente sottoposti.

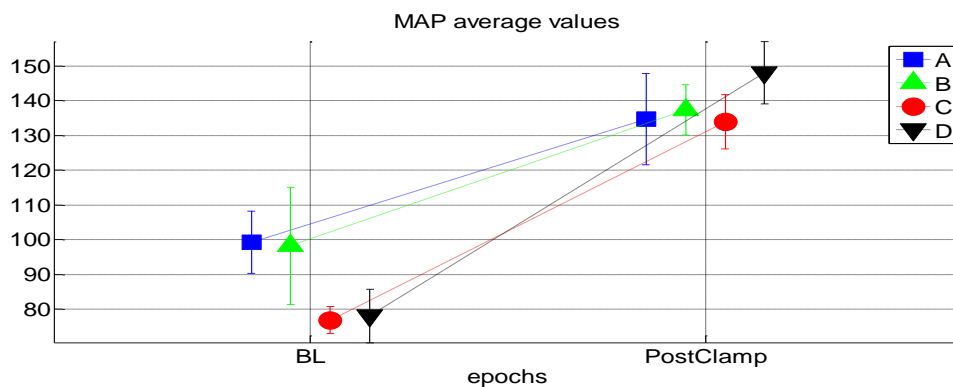


Figura 3.15 Valori medi della serie MAP (mmHg) in baseline e post clamp per ciascuno dei quattro gruppi di trattamento.

3.2.2 Frequenza cardiaca

Anche i valori della frequenza cardiaca (figura 3.16) risultano influenzati dal differente trattamento farmacologico a cui i quattro gruppi sono stati sottoposti.

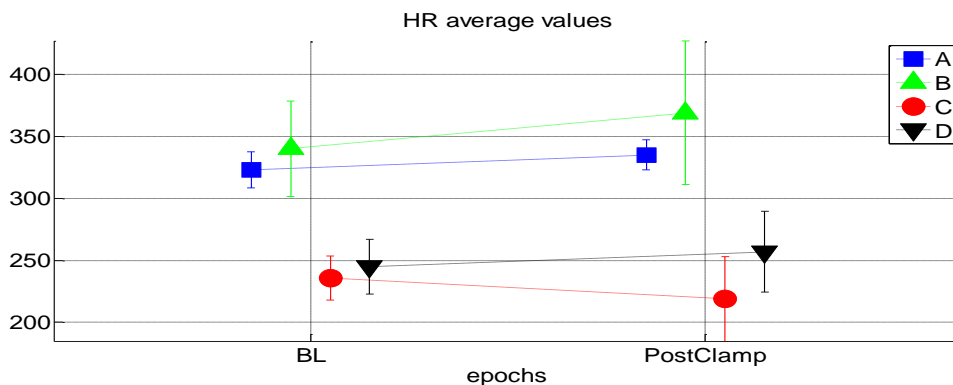


Figura 3.16 Valori medi della serie HR (bpm) in baseline e post clamp per ciascuno dei quattro gruppi di trattamento.

Sia nella fase di baseline che in quella successiva all'occlusione, i gruppi C e D, trattati con Xilazina, hanno valori di frequenza cardiaca significativamente inferiori rispetto agli altri due gruppi. Diversamente da quanto accade per la MAP, però, la manovra

di occlusione non sembra avere un effetto così marcato: i valori della frequenza cardiaca dopo l'occlusione non sono significativamente differenti da quelli nella fase di baseline.

3.2.3 Pressione pulsatoria

Gli effetti del trattamento farmacologico risultano meno evidenti sui valori medi della serie PP (figura 3.17), solamente il gruppo C risulta avere un valore medio di PP significativamente diverso da quello del gruppo B nella fase di baseline. La manovra di occlusione provoca un aumento significativo dei valori medi di PP per tutti i gruppi ad eccezione del gruppo A. In seguito all'occlusione i quattro gruppi non mostrano valori medi di PP significativamente diversi tra loro. Tale comportamento, come verrà spiegato meglio nel seguito, è compatibile con un incremento dello stroke volume in seguito alla SAO.

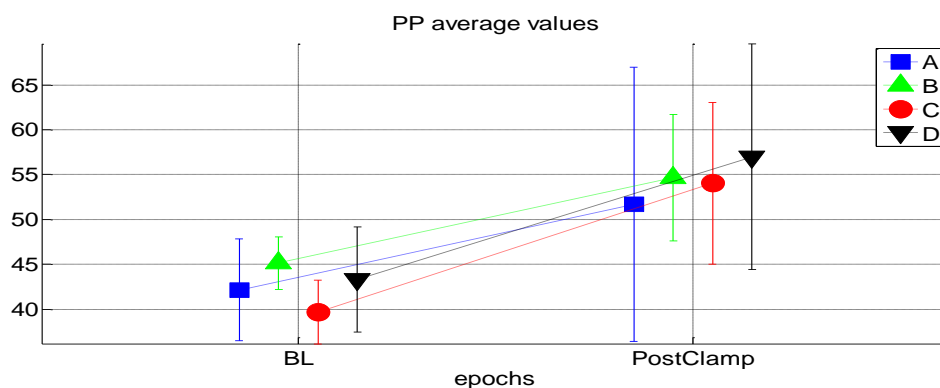


Figura 3.17 Valori medi della serie MAP (mmHg) in baseline e post clamp per ciascuno dei quattro gruppi di trattamento.

3.3 Analisi della manovra di occlusione nel dominio delle frequenze

Nei prossimi paragrafi verranno riportati i valori degli indici spettrali ottenuti dall'analisi in frequenza condotta sulle serie MAP, PP e HP nell'epoca temporale di baseline e in quella successiva alla SAO.

3.3.1 Pressione media

Nella tabella 3.5 sono riportati i valori della mediana, del 25° e del 75° percentile degli indici ottenuti dall'analisi spettrale della serie MAP (potenze allocate nelle bande VLF, LF e HF e della potenza totale)

Tabella 3.5 Valori della mediana e dei percentili (25°, 75°) della potenza nelle bande VLF, HF, LF, e P. totale calcolati sullo spettro di potenza della serie MAP (mmHg²) per ciascun gruppo e per ciascuna epoca considerata (baseline e nei 7,5min successivi alla SAO)

	Baseline	Post-Clamp.	Delta
VLF*[#]			
Gruppo A	167 (147, 197)	158 (119, 211)	6.16 (-9.50, 21.8)
Gruppo B	148 (129, 226)	198 (23.5, 250)	-52.4 (-113, 77.4)
Gruppo C	39.0 (29.1, 45.3) ^{a, b}	15.2 (7.40, 113)	-16.7 (-25.0, 72.0)
Gruppo D	13.5 (10.3, 27.0) ^{a, b}	12.5 (9.5, 16.3) ^{a, b}	-5.50 (-12.3, -1.64)
LF*			
Gruppo A	132 (69.7, 222)	20.2 (9.7, 24.6)	169 (-226, -112)
Gruppo B	70.8 (48.3, 140)	17.5 (3.48, 53.8)	-38.3 (-136, -8.60)
Gruppo C	1.51 (1.16, 1.80) ^{a, b}	2.75 (2.16, 5.73)	1.24 (0.259, 4.61)
Gruppo D	2.58 (1.93, 2.72) ^{a, b}	3.19 (1.23, 4.81)	0.612 (-0.525, 2.87)
HF			
Gruppo A	25.1 (18.2, 28.9)	17.0 (16.2, 67.7)	27.8 (-13.0, 68.7)
Gruppo B	15.7 (2.93, 25.59)	66.8 (54.2, 82.2)	40.4 (25.9, 76.8) [§]
Gruppo C	14.1 (11.1, 24.2)	31.8 (21.2, 41.9)	13.8 (4.03, 22.8) [§]
Gruppo D	22.8 (11.0, 36.1)	35.0 (14.0, 60.1)	13.2 (-0.535, 24.0)
P.totale*[#]			
Gruppo A	360 (252, 428)	205 (151, 306)	-133 (-246, -20.1)
Gruppo B	299 (238, 332)	304 (88.6, 420)	5.88 (-219, 113)
Gruppo C	61.9 (43.7, 69.4) ^{a, b}	62.69 (46.97, 150)	9.56 (-8.83, 83.0)
Gruppo D	44.6 (38.2, 49.8) ^{a, b}	69.7 (28.7, 97.9) ^b	24.7 (-4.74, 49.0)

*Confronti tra i diversi gruppi in ciascuna epoca: *1-way ANOVA p-value <0.01 nell'epoca di baseline, [#]1-way ANOVA p-value <0.05nell'epoca Post Clamp., ^apost hoc comparisons p-value<0.05 vs gruppo A, ^bpost hoc comparisons p-value<0.05 vs gruppo B. Confronti tra le diverse epoche: [§] paired t-test p-value <0.05.*

I risultati relativi alla potenza allocata nelle bande VLF e LF (figure 3.18 e 3.19) mostrano che nella fase di baseline i gruppi C e D, trattati con Xilazina, hanno valori di questi parametri significativamente inferiori rispetto a quelli dei gruppi A e B. Questo risultato è compatibile con quanto si è osservato nell'analisi delle temporale riportata nel paragrafo precedente e con l'effetto simpatolitico della Xilazina. I valori della potenza allocata nelle bande VLF ed LF nei minuti successivi alla manovra di occlusione rimangono più bassi per i gruppi C e D (sebbene l'unica differenza significativa riscontrata sia quella nel valore della potenza nella banda VLF del gruppo D rispetto a quella dei gruppi A e B). Per quanto riguarda il confronto tra le due epoche non sono state rilevate differenze significative tra la fase di baseline e i minuti successivi all'occlusione per i valori di questi due indici. Tuttavia, possiamo osservare che la maggior parte dei ratti appartenenti ai gruppi A e B sembra rispondere alla SAO riducendo la potenza allocata nella banda LF (figura 3.19, parte destra).

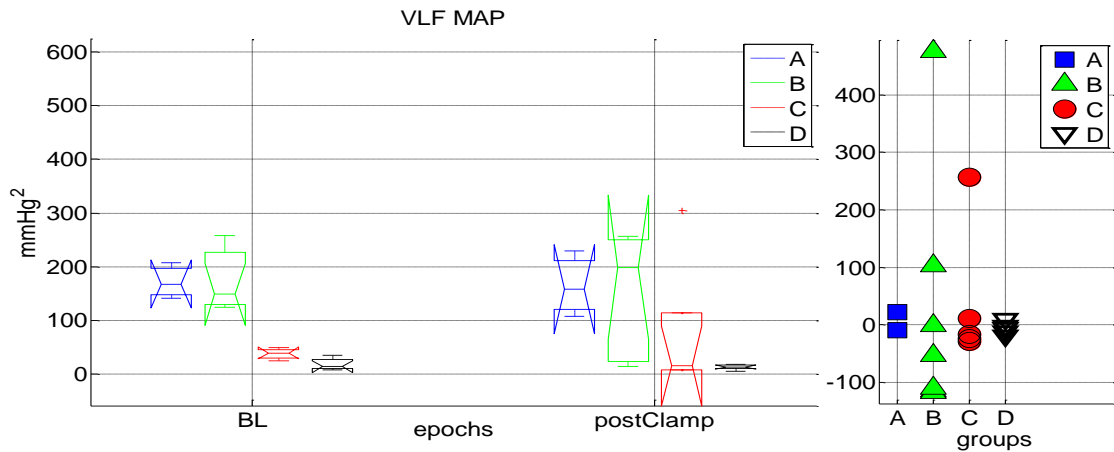


Figura 3.18 Boxplot della potenza nella banda VLF dello spettro della serie MAP (mmHg^2) nelle due epoche considerate per ciascuno dei quattro gruppi (sinistra) e differenza (Post Clamp. – BL) per ogni soggetto di ciascun gruppo (destra)

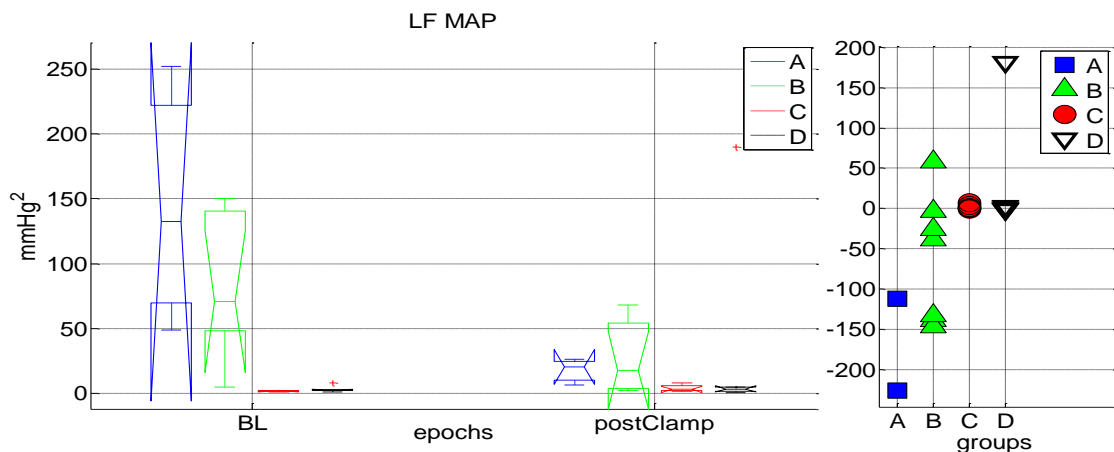


Figura 3.19 Boxplot della potenza nella banda LF dello spettro della serie MAP (mmHg^2) nelle due epoche considerate per ciascuno dei quattro gruppi (sinistra) e differenza (Post Clamp. – BL) per ogni soggetto di ciascun gruppo (destra)

I valori della potenza allocata nella banda spettrale HF (figura 3.20) non risultano significativamente differenti in nessuno dei quattro gruppi né nella fase di baseline né in quella successiva all'occlusione. Per quanto riguarda il confronto tra le due epoche, invece, si riscontra un aumento significativo di tale valore per i gruppi B e C. Anche gli altri due gruppi mostrano un aumento della potenza nella banda HF sebbene tale incremento non sia risultato significativo. Un comportamento simile, probabilmente, riflette la compensazione del sistema nervoso parasimpatico (che ricordiamo non avere un effetto diretto sui valori della pressione) in risposta ad un decremento del tono simpatico.

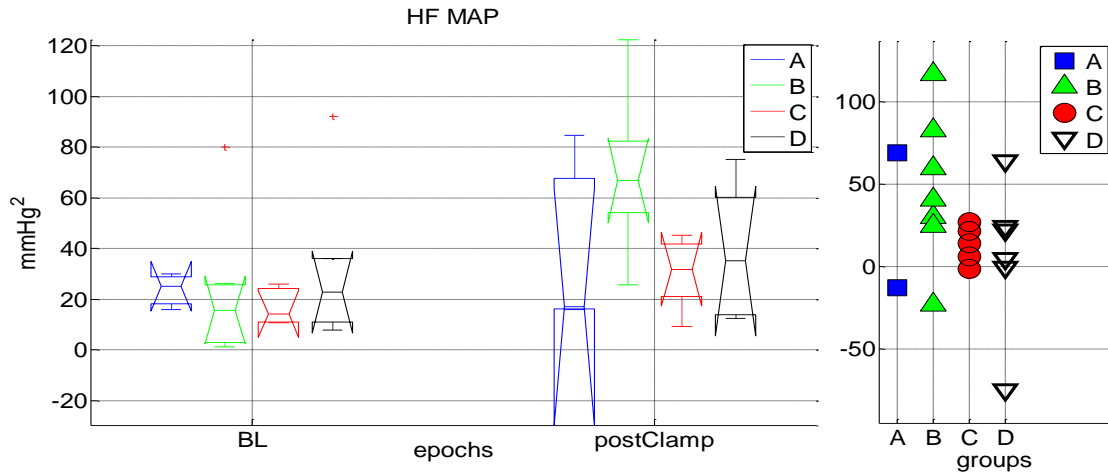


Figura 3.20 Boxplot della potenza nella banda HF dello spettro della serie MAP (mmHg^2) nelle due epoche considerate per ciascuno dei quattro gruppi (sinistra) e differenza (Post Clamp. – BL) per ogni soggetto di ciascun gruppo (destra)

I valori della potenza totale (figura 3.21) mostrano che, sia nella fase di baseline sia in quella successiva alla SAO, i gruppi Xyl hanno una potenza totale significativamente minore rispetto a quella degli altri due gruppi sperimentali che non hanno ricevuto il trattamento farmacologico con Xilazina. Dal confronto tra le due epoche non sono emerse variazioni significative della potenza totale.

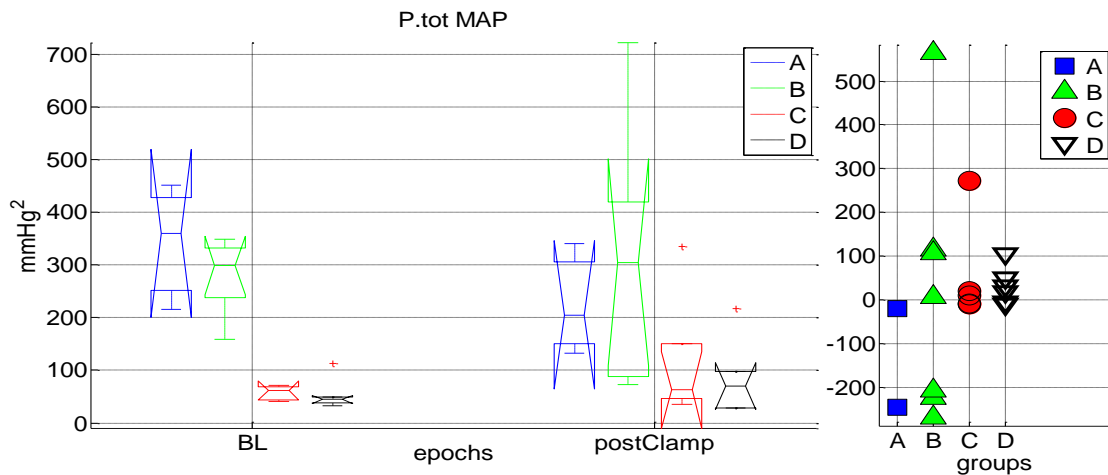


Figura 3.21 Boxplot della potenza totale dello spettro della serie MAP (mmHg^2) nelle due epoche considerate per ciascuno dei quattro gruppi (sinistra) e differenza (Post Clamp. – BL) per ogni soggetto di ciascun gruppo (destra)

Si riportano di seguito i valori della mediana e dei percentili degli indici spettrali LF%, e LF/HF ottenuti dall'analisi della serie MAP per ciascun gruppo nelle due epoche oggetto di questa analisi.

Tabella 3.6 Valori della mediana e dei percentili (25°, 75°) per il parametro LF% e per il rapporto LF/HF calcolati sullo spettro di potenza della serie MAP (mmHg²) per ciascun gruppo e per ciascuna epoca considerata (baseline e nei 7,5min successivi alla SAO)

	Baseline	Post clamp	Delta
LF% *			
Gruppo A	86.3 (70.2, 88.3)	24.2 (19.7, 47.4)	-50.9 (-68.0, -33.8)
Gruppo B	85.3 (63.3, 89.4)	16.6 (4.92, 32.9)	-58.1 (-76.6, -45.5) °
Gruppo C	6.47 (5.41, 11.0) ^{a, b}	9.95 (5.01, 17.1)	-0.971 (-3.98, 12.4)
Gruppo D	10.7 (6.68, 14.1) ^{a, b}	7.25 (3.90, 21.4)	-2.49 (-7.88, 7.31)
LF/HF *			
Gruppo A	8.33 (3.53, 8.34)	0.400 (0.281, 1.244)	-7.4 (-8.0, -6.8)
Gruppo B	6.14 (2.83, 11.8)	0.209 (0.053, 0.534)	-6.04 (-11.4, -1.74) §
Gruppo C	0.074 (0.060, 0.135) ^b	0.112 (0.053, 0.337)	-0.022(-0.051, 0.282)
Gruppo D	0.129 (0.073, 0.174) ^b	0.080 (0.040, 0.282)	-0.028 (-0.111, 0.109)

Confronti tra i diversi gruppi in ciascuna epoca: *1-way ANOVA p-value <0.01 nell'epoca di baseline, ^apost hoc comparisons p-value<0.05 vs gruppo A, ^bpost hoc comparisons p-value<0.05 vs gruppo B. Confronti tra le diverse epoche: ° t-test p-value <0.01, § paired t-test p-value <0.05.

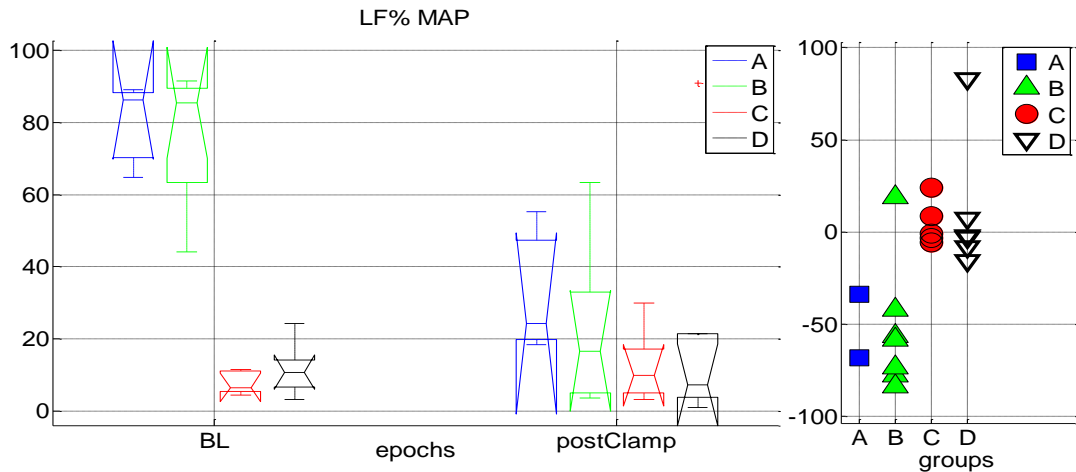


Figura 3.22 Boxplot LF% dello spettro della serie MAP nelle due epoche considerate per ciascuno dei quattro gruppi (sinistra) e differenza (Post Clamp. – BL) per ogni soggetto di ciascun gruppo (destra)

Compatibilmente con quanto appena osservato, i valori dell'indice LF% (figura 3.22) risultano significativamente differenti tra i quattro gruppi nella fase di baseline; in particolare, i gruppi Xyl sono caratterizzati da valori significativamente inferiori rispetto a quelli dei gruppi A e B. Per quanto riguarda il confronto tra le due epoche l'indice LF% mostra un decremento significativo per il solo gruppo B. Si osservi, però, che tale comportamento caratterizza anche il gruppo A ed è compatibile con un decremento del tono simpatico.

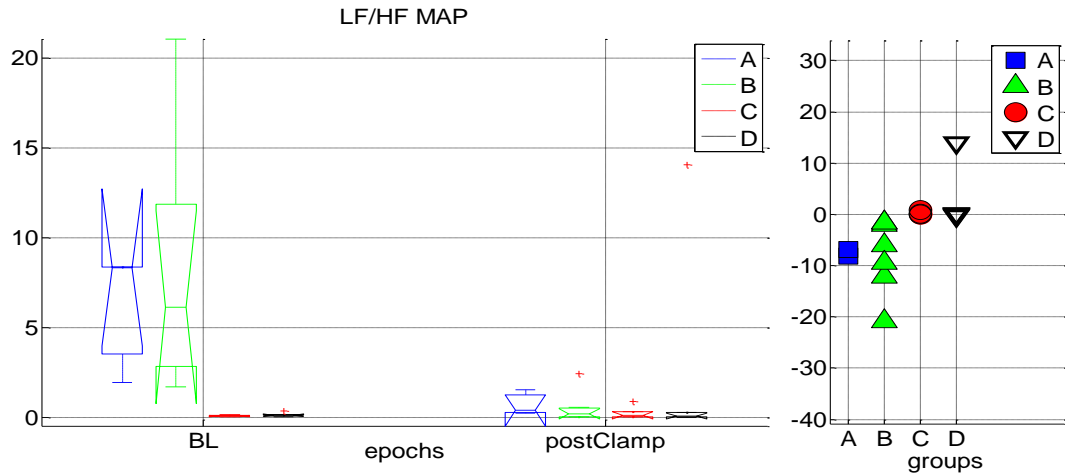


Figura 3.23 Boxplot del rapporto LF/HF dello spettro della serie MAP nelle due epoche considerate per ciascuno dei quattro gruppi (sinistra) e differenza (Post Clamp. – BL) per ogni soggetto di ciascun gruppo (destra)

3.3.2 Ciclo cardiaco

Di seguito vengono presentati i risultati relativi all’analisi spettrale condotta sulla serie HP nella fase di baseline e nella fase successiva alla SAO. Nella tabella 3.7 sono riportati i valori della mediana, del 25° e del 75° percentile delle potenze allocate nelle bande spettrali LF e HF e della potenza totale, calcolati sullo spettro AR per ciascuno dei quattro gruppi.

Tabella 3.7 Valori della mediana e dei percentili (25°, 75°) della potenza nelle bande VLF, LF, HF, e della P. totale calcolati sullo spettro di potenza della serie HP (msec²) per ciascun gruppo e per ciascuna epoca considerata (baseline e nei 7,5min successivi alla SAO)

	Baseline	Post-Clamp.	Delta
LF			
Gruppo A	9.24 (6.07, 16.2)	2.18 (1.84, 3.50)	-5.17 (-2.83, 7.51)
Gruppo B	4.79 (3.65, 13.8)	2.17 (0.917, 3.26)	-2.60 (-12.1, -1.38)
Gruppo C	14.1 (9.14, 28.7)	—	—
Gruppo D	7.71 (3.51, 9.61)	8.35 (3.10, 12.1)	0.038 (-2.77, 6.87)
HF *			
Gruppo A	16.9 (10.8, 22.8)	9.97 (7.29, 21.4)	-2.96 (-8.32, 2.38)
Gruppo B	9.38 (6.49, 11.7)	9.71 (9.03, 15.8)	5.92 (-1.66, 6.26)
Gruppo C	80.0 (50.4, 121) ^{a, b}	—	—
Gruppo D	47.0 (19.5, 72.5) ^b	19.69 (12.6, 27.9)	-34.6 (-49.9, -5.02)
P.totale			
Gruppo A	68.8 (51.0, 83.1)	42.5 (33.3, 90.8)	30.0 (14.7, 45.3)
Gruppo B	56.6 (29.5, 80.1)	31.4 (17.5, 60.9)	-7.03 (-52.3, 3.94)
Gruppo C	144 (75.3, 219)	—	—
Gruppo D	59.6 (37.1, 92.4)	34.4 (30.8, 58.0)	-30.7 (-61.6, 7.59)

Confronti tra i diversi gruppi in ciascuna epoca: *1-way ANOVA p-value <0.01 nell’epoca di baseline, ^apost hoc comparisons p-value<0.05 vs gruppo A, ^bpost hoc comparisons p-value<0.05 vs gruppo B. Confronti tra le diverse epoche: [§]t-test p-value <0.05.

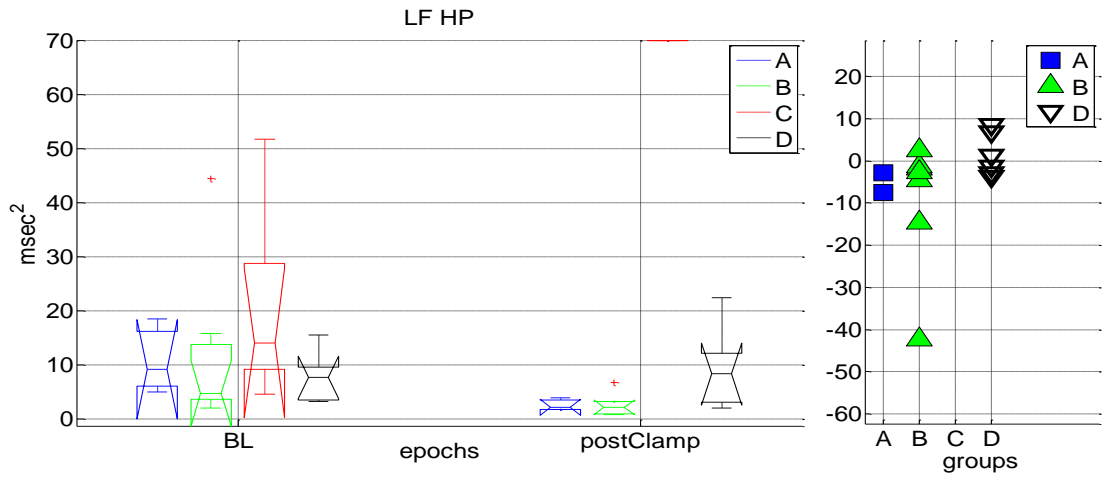


Figura 3.24 Boxplot della potenza nella banda LF dello spettro della serie MAP nelle due epoche considerate per ciascuno dei quattro gruppi (sinistra) e differenza (Post Clamp. – BL) per ogni soggetto di ciascun gruppo (destra)

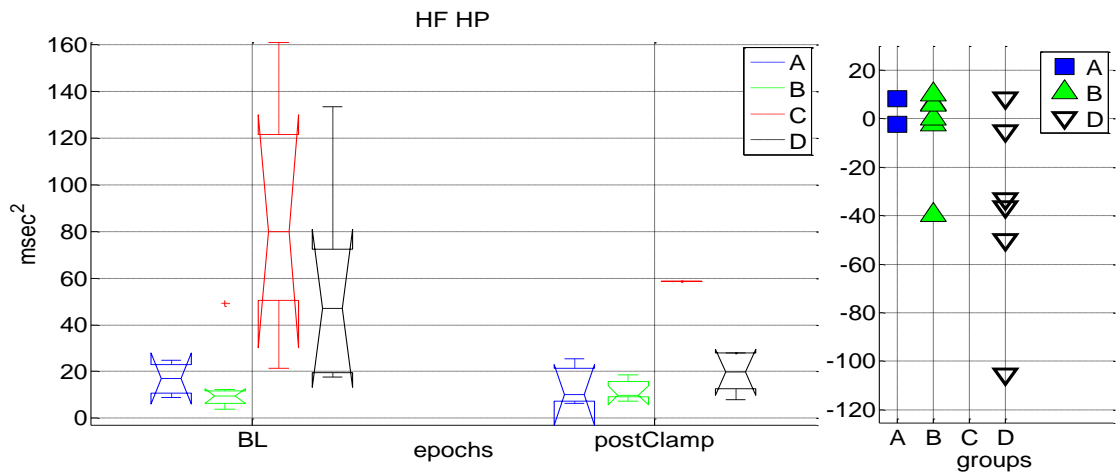


Figura 3.25 Boxplot della potenza nella banda HF dello spettro della serie MAP nelle due epoche considerate per ciascuno dei quattro gruppi (sinistra) e differenza (Post Clamp. – BL) per ogni soggetto di ciascun gruppo (destra)

Prima di presentare i risultati riportati nella tabella precedente bisogna fare una premessa. L'occlusione delle arterie splancniche ha un forte impatto sul sistema cardiovascolare, si è osservato che in seguito a tale manovra una frazione considerevole degli animali del gruppo C mostra alterazioni del ritmo cardiaco (paragrafo 3.1.1) e possibili alterazioni della frequenza respiratoria. Tali fenomeni, che modificano la morfologia dello spettro di potenza della serie HP, inficiano il risultato della stima spettrale. In particolare, si è riscontrata una tendenza del picco ad alta frequenza a scivolare verso il limite di banda fra le basse e le alte frequenze, che si può supporre sia legato al rallentamento della frequenza respiratoria, pertanto la stima delle potenze allocata nelle varie bande potrebbe risultare non corretta. Il confronto statistico dei valori ottenuti da tale analisi con quelli degli altri gruppi, in cui non sono state riscontrate tali alterazioni in

questa epoca temporale, non produrrebbe un risultato attendibile, pertanto si è scelto di non presentare i risultati dell'analisi spettrale condotta sul gruppo C nell'epoca di Post Clamp.

Contrariamente a quanto osservato per la serie MAP, i valori della potenza allocata nella banda LF (figura 3.24) dei quattro gruppi non risultano significativamente diversi tra loro nell'epoca di baseline. In quest'epoca, invece, i valori della potenza allocata nella banda HF (figura 3.25) dei Xyl, sono significativamente superiori a quelli dei gruppi A e B, questo risultato potrebbe indicare un aumento, o meglio un'azione di compensazione, del tono parasimpatico in risposta all'azione simpaticolitica del farmaco.

Nei minuti seguenti all'occlusione il gruppo D non mostra un valore della potenza nella banda HF significativamente differente da quelli dei gruppi NoXyl,

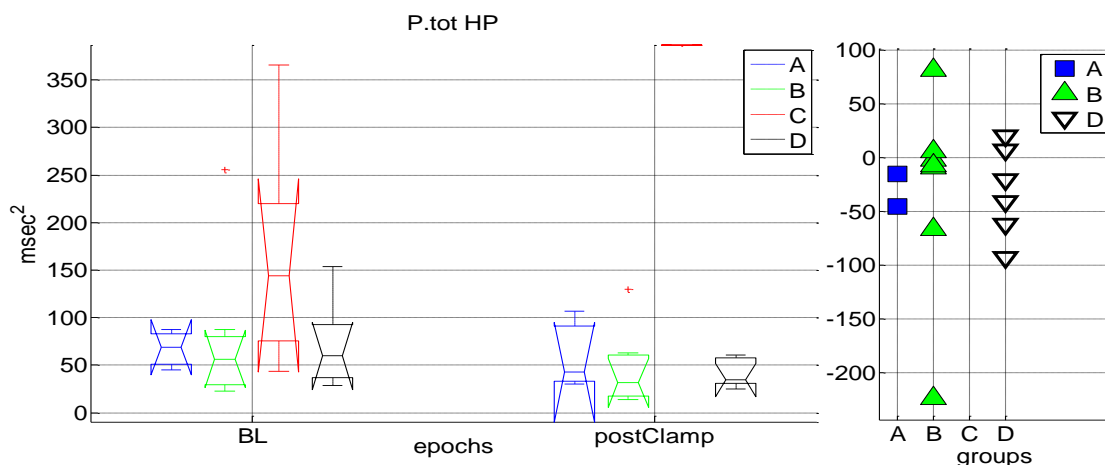


Figura 3.26 Boxplot della potenza totale dello spettro della serie MAP nelle due epoche considerate per ciascuno dei quattro gruppi (sinistra) e differenza (Post Clamp. – BL) per ogni soggetto di ciascun gruppo (destra)

Dal confronto tra le due epoche non emergono variazioni significative degli indici analizzati, si noti, però, il decremento della potenza nella banda LF che caratterizza i gruppi A e B e che potrebbe indicare una riduzione del tono simpatico in risposta al repentino aumento di pressione indotto dalla SAO.

Nella tabella seguente si riportano i valori della mediana e dei percentili dell'indice LF%, e del rapporto LF/HF per ciascun gruppo nelle due epoche considerate da questa analisi.

Tabella 3.8 Valori della mediana e dei percentili (25°, 75°) del parametro LF% e del rapporto LF/HF calcolati sullo spettro di potenza della serie HP (msec²) per ciascun gruppo e per ciascuna epoca considerata (baseline e nei 7,5min successivi alla SAO)

	Baseline	Post clamp	Delta
LF%*			
Gruppo A	33.9 (33.6, 40.4)	19.2 (9.65, 21.7)	-19.2 (-11.0, 27.5)
Gruppo B	38.8 (32.7, 46.7)	14.4 (8.12, 19.9)	-23.9 (-36.2, -11.6) ^o
Gruppo C	17.3 (12.4, 27.4) ^b	—	—
Gruppo D	11.4 (7.91, 15.4) ^b	23.9 (15.3, 43.9)	7.79 (-0.268, 18.6)
LF/HF*			
Gruppo A	0.570 (0.551, 0.702)	0.345 (0.139, 0.399)	-0.349 (-0.225, 0.473)
Gruppo B	0.752 (0.530, 0.905)	0.181 (0.090, 0.368)	-0.448 (-0.781, -0.18) [#]
Gruppo C	0.217 (0.148, 0.382) ^b	—	—
Gruppo D	0.130 (0.086, 0.185) ^b	0.327 (0.184, 0.798)	0.113 (0.004, 0.287)

Confronti tra i diversi gruppi in ciascuna epoca: *1-way ANOVA p-value <0.01 nell'epoca di baseline, ^apost hoc comparisons p-value<0.05 vs gruppo A, ^bpost hoc comparisons p-value<0.05 vs gruppo B. Confronti tra le diverse epoche: ^ot-test p-value <0.05

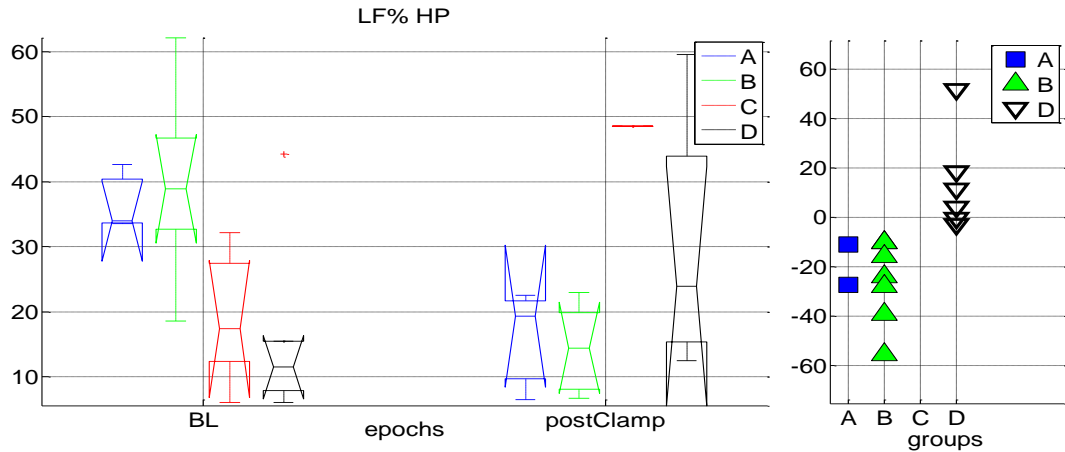


Figura 3.27 Boxplot del parametro LF% dello spettro della serie MAP nelle due epoche considerate per ciascuno dei quattro gruppi (sinistra) e differenza (Post Clamp. – BL) per ogni soggetto di ciascun gruppo (destra).

I valori dell'indice LF% mostrano una situazione simile a quella osservata per la serie MAP (figura.22): nella fase di baseline i gruppi Xyl sono caratterizzati da valori di tale indice inferiori a quelli dei gruppi NoXyl (ma significativamente inferiori solamente a quelli del gruppo B). Nei minuti successivi all'occlusione non si registra alcuna differenza significativa tra i tre gruppi per nessuno dei due parametri.

I confronti tra le due epoche hanno mostrato un decremento significativo del parametro LF% per il gruppo B, come osservato per gli stessi indici calcolati per serie MAP.

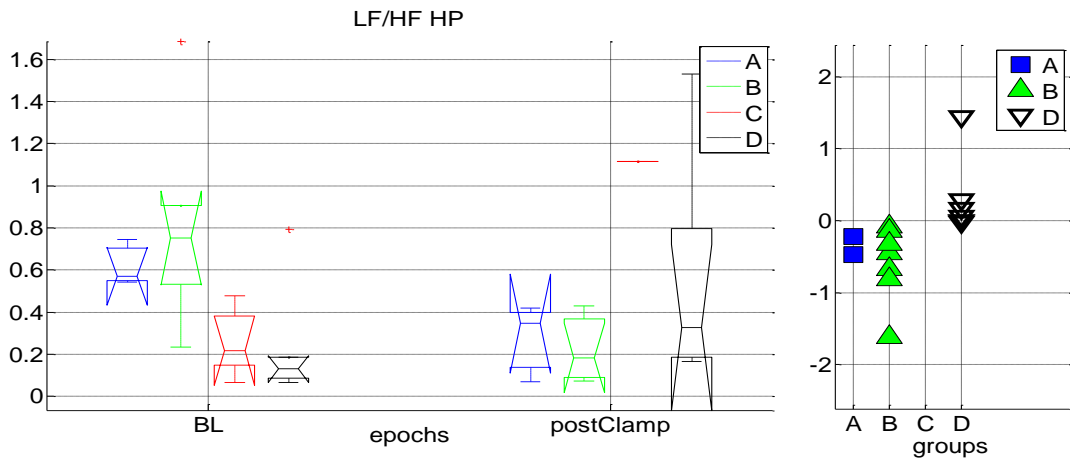


Figura 3.28 Boxplot del rapporto LF/HF dello spettro della serie MAP nelle due epoche considerate per ciascuno dei quattro gruppi (sinistra) e differenza (Post Clamp. – BL) per ogni soggetto di ciascun gruppo (destra).

3.3.3 Pressione Pulsatoria

Infine vengono presentati gli indici relativi all'analisi spettrale condotta sulla serie PP nella fase di baseline e nella fase successiva al occlusione delle arterie splancniche (SAO). Nella tabella 3.9 sono riportati i valori della mediana, del 25° e del 75° percentile degli indici ottenuti dall'analisi spettrale della serie PP, ovvero le potenze allocate nelle bande VLF, LF e HF e la potenza totale.

Come già osservato nell'analisi temporale della serie PP, quest'ultima sembra essere meno influenzata dagli effetti dai differenti tipi di trattamento farmacologico.

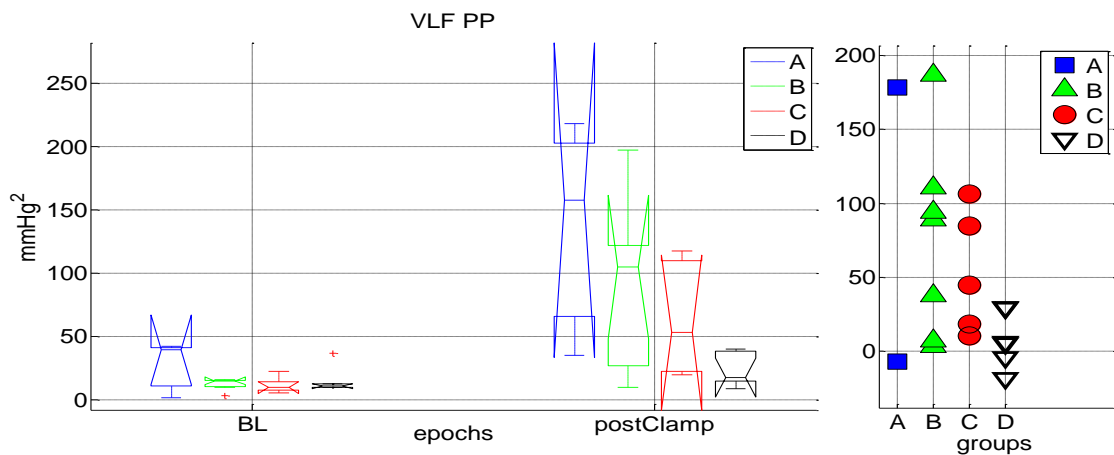


Figura 3.29 Boxplot della potenza nella banda VLF dello spettro della serie MAP nelle due epoche considerate per ciascuno dei quattro gruppi (sinistra) e differenza (Post Clamp. – BL) per ogni soggetto di ciascun gruppo (destra)

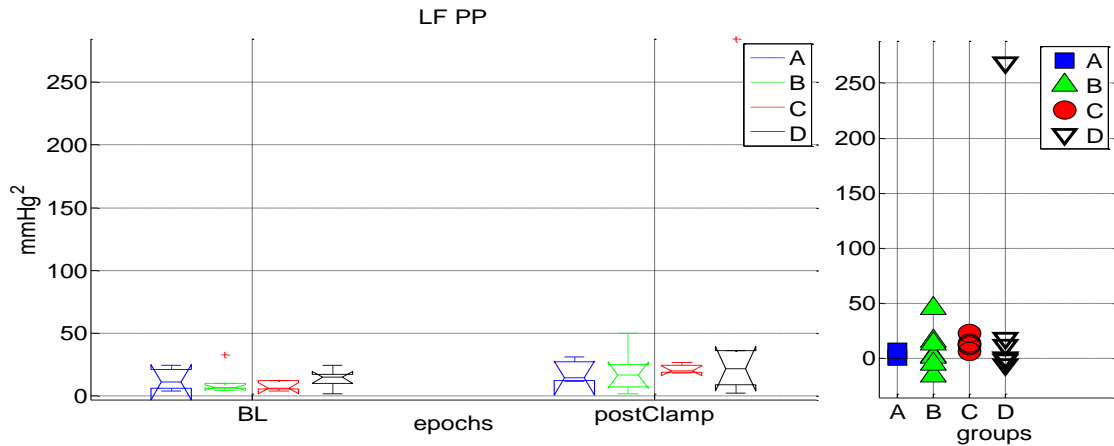


Figura 3.30 Boxplot della potenza nella banda LF dello spettro della serie MAP nelle due epoche considerate per ciascuno dei quattro gruppi (sinistra) e differenza (Post Clamp. – BL) per ogni soggetto di ciascun gruppo (destra)

Tabella 3.9 Valori della mediana e dei percentili (25°, 75°) della potenza nelle bande VLF, HF, LF, e della P. totale calcolati sullo spettro di potenza della serie PP (mmHg²) per ciascun gruppo e per ciascuna epoca considerata (baseline e nei 7,5min successivi alla SAO)

	Baseline	Post-Clamp.	Delta
VLF[#]			
Gruppo A	39.7 (11.3, 41.7)	158 (66.0, 203)	85.7 (-6.93, 178)
Gruppo B	15.2 (10.8, 15.7)	105 (26.8, 121)	88.8 (14.61, 106) [§]
Gruppo C	9.87 (7.76, 14.2)	53.3 (22.9, 110)	44.9 (16.2, 90.2) [§]
Gruppo D	11.0 (10.2, 13.0)	17.8 (15.2, 38.9) ^{a, b}	5.55 (-4.27, 29.0)
LF			
Gruppo A	10.9 (5.87, 21.2)	14.3 (12.2, 27.0)	3.63 (0.591, 6.67)
Gruppo B	6.85 (5.99, 9.86)	16.9 (7.42, 25.1)	2.14 (-3.33, 15.2)
Gruppo C	6.24 (5.67, 12.1)	19.9 (18.9, 24.4)	12.9 (10.1, 16.0) [§]
Gruppo D	14.9 (9.92, 17.3)	21.6 (8.77, 36.2)	6.30 (-1.15, 18.1)
HF*			
Gruppo A	72.3 (70.0, 128)	72.2 (57.8, 117)	-15.4 (-93.8, 62.8)
Gruppo B	40.2 (24.6, 61.8)	127 (66.0, 173)	87.0 (46.4, 134)
Gruppo C	134 (124, 158) ^b	183 (100, 207)	19.2 (-6.42, 53.8)
Gruppo D	143 (91.5, 234) ^b	79.1 (40.2, 158)	-68.2 (-75.3, -48.7) [§]
P.totale*			
Gruppo A	123 (89.7, 190)	249 (197, 293)	76.3 (56.6, 95.9)
Gruppo B	76.2 (48.3, 83.2)	236 (198, 313)	152 (144, 261) [§]
Gruppo C	161 (140, 177) ^b	247 (181, 283)	43.4 (37.6, 129) [§]
Gruppo D	182 (125, 247) ^b	178 (119, 203)	-25.4 (-45.1, 8.31)

Confronti tra i diversi gruppi in ciascuna epoca: *1-way ANOVA p-value <0.01 nell'epoca di baseline, [#]1-way ANOVA p-value <0.05 nell'epoca Post Clamp., ^apost hoc comparisons p-value <0.05 vs gruppo A, ^bpost hoc comparisons p-value <0.05 vs gruppo B. Confronti tra le diverse epoche: [§]paired t-test p-value <0.05.

Nella fase di baseline, la potenza allocata nelle bande VLF ed LF (figure 3.29 e 3.30) non differisce significativamente per nessuno dei quattro gruppi; la potenza nella allocata banda HF (figura 3.31), invece, risulta significativamente più elevata per i gruppi Xyl rispetto a quella del gruppo B in quest'epoca temporale. Questo risultato, alla luce di quanto visto nel paragrafo 3.1.2, può essere interpretato come un effetto dell'azione del respiro sulla serie PP. In particolare, sappiamo, che la pressione pulsatoria è direttamente proporzionale allo stroke volume. Infatti, secondo il modello Windkessel, la morfologia dell'onda pressoria è determinata dal rapporto tra due fattori, ovvero lo stroke volume e la compliance delle grandi arterie elastiche. Per la scala temporale oggetto di questa indagine, siamo legittimati a pensare che la compliance dei vasi rimanga costante. Da qui deriva un rapporto di proporzionalità diretta tra stroke volume e pressione pulsatoria. Il respiro esercita un azione meccanica diretta sullo stroke volume, dunque, tale azione ha un effetto anche sui valori della PP.

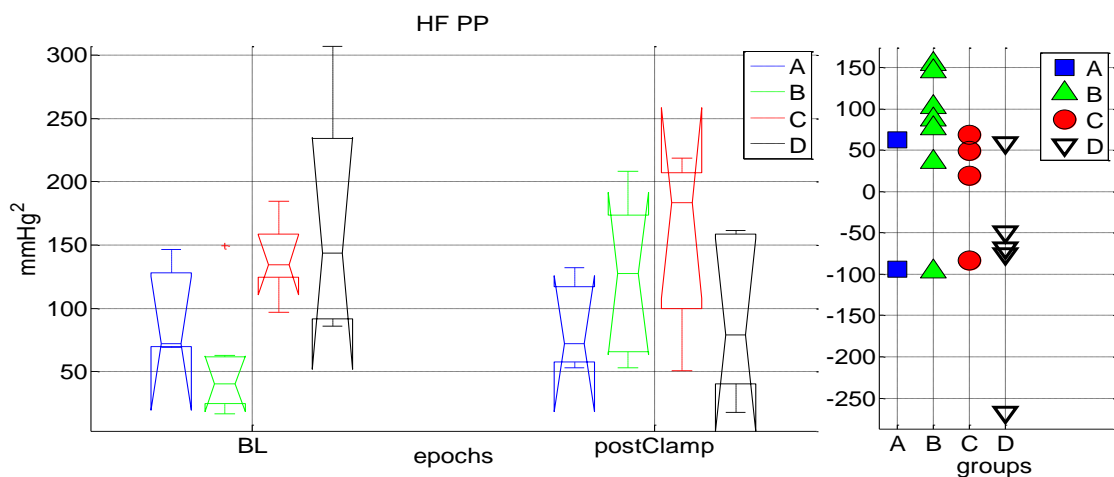


Figura 3.31 Boxplot della potenza nella banda LF dello spettro della serie MAP nelle due epoche considerate per ciascuno dei quattro gruppi (sinistra) e differenza (Post Clamp. – BL) per ogni soggetto di ciascun gruppo (destra)

Nei minuti successivi all'occlusione i gruppi Xyl mostrano valori di potenza allocata nella banda VLF inferiori a quelli dei gruppi A e B (sebbene l'unico ad avere un valore significativamente inferiore è solamente il gruppo D). I valori di potenza allocata nelle bande LF ed HF, invece, non differiscono in modo significativo tra i quattro gruppi in questa fase del protocollo. Neanche per quanto riguarda i valori di potenza totale (figura 3.32) si registrano differenze significative nell'epoca successiva alla SAO.

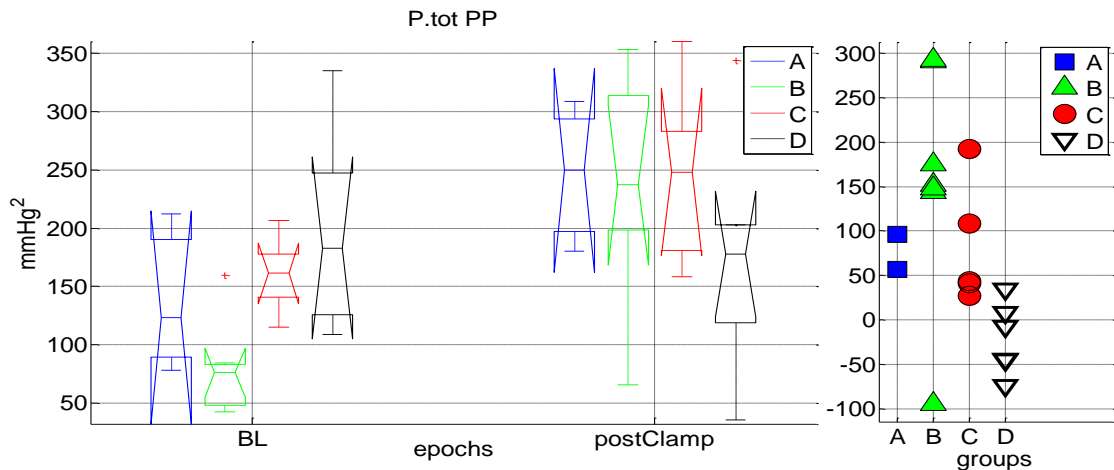


Figura 3.32 Boxplot della potenza totale dello spettro della serie MAP nelle due epoche considerate per ciascuno dei quattro gruppi (sinistra) e differenza (Post Clamp. – BL) per ogni soggetto di ciascun gruppo (destra)

Dai confronti tra le due epoche emerge un incremento della potenza nella banda VLF in tutti i gruppi ma tale incremento risulta significativo solamente per i gruppi B e C. I valori della potenza allocata nella banda LF sembrano, sostanzialmente, non risentire dell'effetto della SAO (solamente il gruppo C a far registrare un aumento significativo di tale parametro). Al contrario, anche se non sono state riscontrate differenze significative nel confronto tra le due epoche, i valori della potenza nella banda HF crescono in tutti i soggetti ad esclusione di quelli del gruppo D (che hanno ricevuto anche il Glicopirrolato, un vagolitico) che, invece, fanno registrare un decremento significativo di tale indice. Questo comportamento dei gruppi A, B e C, unito al fatto che la potenza totale tende a crescere in questi gruppi, fa presupporre che vi sia un'attivazione vagale, in seguito alla SAO. Tale attivazione vagale, come è stato detto, ha un effetto indiretto sulla PP attraverso lo stroke volume che, a sua volta, è influenzato meccanicamente dal respiro.

Per completezza si riportano i valori della mediana e dei percentili per ciascun gruppo nelle due epoche del parametro LF% e del rapporto LF/HF (tabella 3.10) calcolati per la serie PP.

Tabella 3.10 Valori della mediana e dei percentili (25°, 75°) per LF% e LF/HF calcolati sullo spettro di potenza della serie PP (mmHg²) per ciascun gruppo e per ciascuna epoca considerata (baseline e nei 7,5min successivi alla SAO)

	Baseline	Post clamp	Delta
LF%			
Gruppo A	13.4 (7.47, 14.0)	15.5 (9.76, 29.9)	7.40 (-5.62, 20.4)
Gruppo B	16.5 (8.99, 32.3)	13.5 (4.00, 20.4)	-4.77 (-5.26, -1.68)
Gruppo C	4.43 (3.70, 7.43)	10.6 (8.23, 18.1)	4.30 (3.43, 10.31)
Gruppo D	8.59 (5.02, 14.36)	26.9 (6.73, 45.2)	18.3 (0.76, 24.3)
LF/HF			
Gruppo A	0.158 (0.083, 0.165)	0.199 (0.114, 0.493)	0.176 (-0.072, 0.423)
Gruppo B	0.199 (0.099, 0.509)	0.161 (0.042, 0.266)	-0.055 (-0.097, -0.020)
Gruppo C	0.046 (0.039, 0.081)	0.126 (0.092, 0.244)	0.050 (0.043, 0.160)
Gruppo D	0.095 (0.053, 0.169)	0.402 (0.073, 0.859)	0.308 (0.008, 0.595)

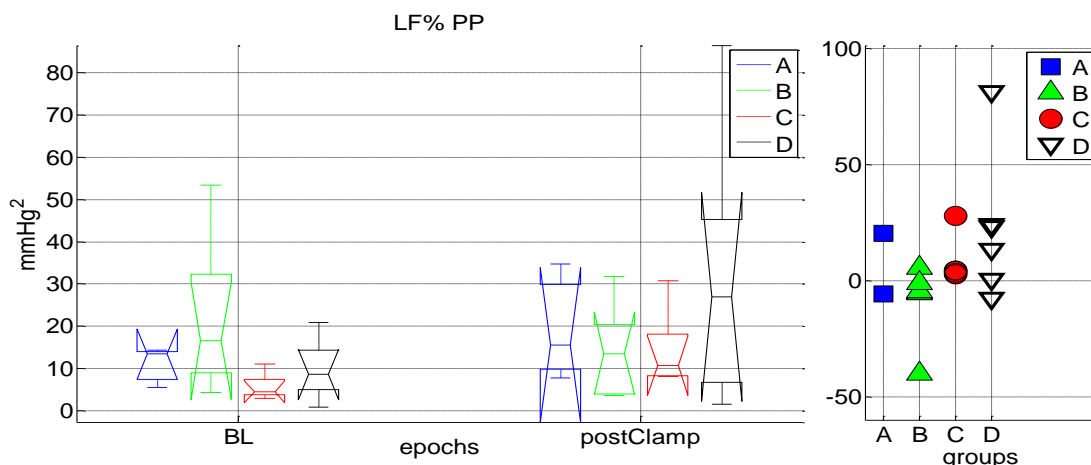


Figura 3.33 Boxplot del parametro LF% dello spettro della serie MAP nelle due epoche considerate per ciascuno dei quattro gruppi (sinistra) e differenza (Post Clamp. – BL) per ogni soggetto di ciascun gruppo (destra)

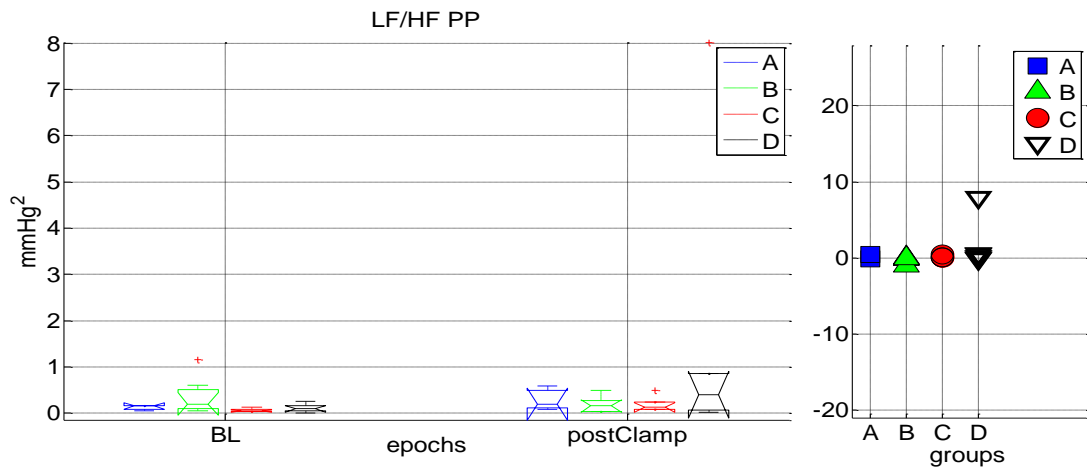


Figura 3.34 Boxplot della potenza totale dello spettro della serie MAP nelle due epoche considerate per ciascuno dei quattro gruppi (sinistra) e differenza (Post Clamp. – BL) per ogni soggetto di ciascun gruppo (destra)

I risultati ottenuti dal calcolo di questi parametri sono coerenti con quelli ottenuti delle serie MAP e HP (tabelle 3.6 e 3.8). I gruppi Xyl hanno valori di LF% inferiori rispetto agli altri due gruppi nella fase di baseline sebbene nel caso del PP, però, non si registri alcuna differenza significativa né nel confronto tra i quattro gruppi né in quello tra le due epoche.

3.4 Evoluzione verso il collasso: analisi nel dominio del tempo

In questo paragrafo vengono riportati I risultati di uno studio approfondito condotto sulla finestra temporale compresa tra il trentesimo minuto dopo la SAO e l'evento di fatal pressure drop, ovvero sul progressivo abbassamento della pressione media, dovuto al progredire dello stato di shock circolatorio ed all' ischemia intestinale, che porta l'animale alla morte. Tale studio ha preso in considerazione sia la suddivisione dei ratti basata sul tipo di trattamento farmacologico ricevuto (gruppi A, B, C e D) sia quella basata sul tipo di fatal pressure drop, quindi, distinguendo i ratti in due gruppi: (i) Fast fatal pressure drop (FFPD); (ii) Slow fatal pressure drop (SFPD).

Come è stato fatto in precedenza per l'analisi della manovra di occlusione, verranno prima presenti i risultati relativi all'analisi temporale e, nel paragrafo successivo, i risultati dell'analisi in frequenza per le serie MAP, HP e PP.

La tabella 3.11 riporta i valori medi nel tempo delle serie temporali MAP, HR e PP relativi alla suddivisione dei ratti nei quattro gruppi di trattamento farmacologico.

Tabella 3.11 Valori medi MAP (mmHg), HR (bpm) e PP (mmHg) per ciascun gruppo e per ciascuna epoca considerata (30minuti dopo SAO e prima dell'evento di Fatal Pressure Drop, FDP)

	30' Post Clamp.	Pre-FPD
MAP^{&}		
Gruppo A	127 ± 18.7	96.2 ± 24.3
Gruppo B	129 ± 8.36	99.5 ± 15.6 [§]
Gruppo C	104 ± 13.3 ^b	78.9 ± 10.6 [§]
Gruppo D	114 ± 14.3	83.4 ± 17.2 [§]
HR^{*,#}		
Gruppo A	324 ± 28.7	327 ± 25.9
Gruppo B	331 ± 46.1	289 ± 52.9
Gruppo C	211 ± 17.2 ^{a, b}	209 ± 28.9 ^a
Gruppo D	231 ± 29.3 ^{a, b}	245 ± 44.2
PP^{&, #}		
Gruppo A	46.2 ± 9.10	33.9 ± 7.10
Gruppo B	49.8 ± 6.46	41.9 ± 3.17
Gruppo C	39.4 ± 2.81 ^b	37.0 ± 1.98
Gruppo D	43.2 ± 2.62	32.9 ± 3.00 ^{b, §}

Confronti tra i diversi gruppi in ciascuna epoca: *1-way ANOVA p-value<0.01 nell'epoca 30'Post Clamp., [&]1-way ANOVA p-value<0.05 nell'epoca 30'Post Clamp., [#]1-way ANOVA p-value<0.05 nell'epoca Pre-FPD, ^bpost hoc comparisons p-value<0.05 vs gruppo B. Confronti tra le diverse epoche: [§]paired t-test p-value<0.05 vs. epoca iniziale(30' post clamp).

3.4.1 Pressione Media

Trenta minuti dopo la SAO i valori medi della MAP (figura 3.35) dei gruppi Xyl sono ancora inferiori a quelli dei NoXyl (sebbene l'unica differenza significativa sia quella tra il gruppo B e il gruppo C). Nei minuti precedenti all'evento di fatal pressure drop non si rileva più alcuna differenza significativa dei valori medi della MAP tra i quattro gruppi. Il confronto tra le due epoche ha evidenziato un decremento significativo dei valori medi della MAP per tutti i gruppi ad eccezione del gruppo A.

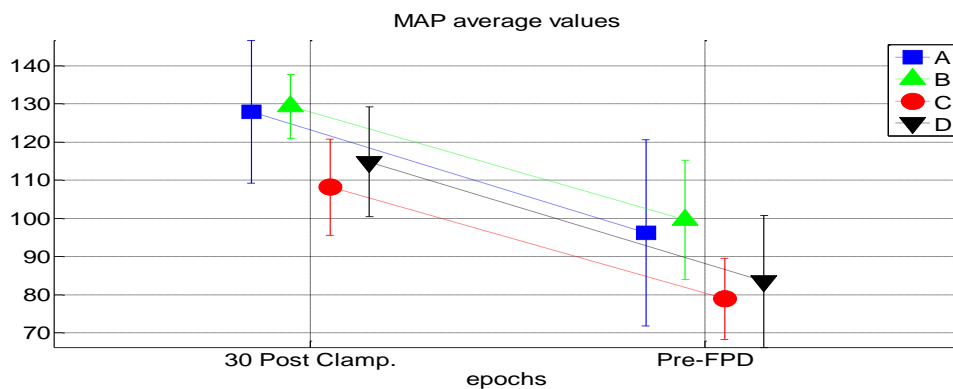


Figura 3.35 Andamento dei valori medi della serie MAP (mmHg) 30 minuti dopo l'occlusione e prima dell'evento di FPD per ciascun gruppo di trattamento.

3.4.2 Frequenza cardiaca

I valori medi di frequenza cardiaca (figura 3.36) dei gruppi Xyl, nei minuti iniziali della finestra di analisi considerata, risultano significativamente inferiori a quelli degli altri due gruppi. Nei minuti che precedono l'evento di FPD, invece, solamente il gruppo C risulta avere una frequenza cardiaca media significativamente inferiore a quella del gruppo A. Nel caso della serie HR non si registra nessuna differenza significativa tra le due epoche per nessuno dei gruppi sperimentali.

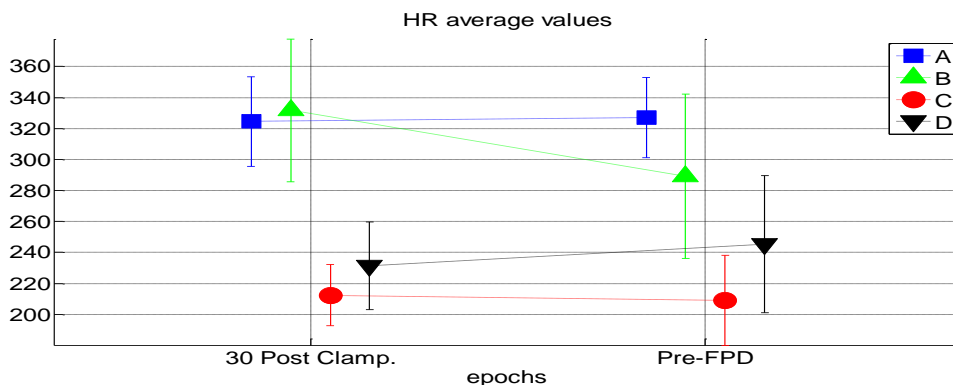


Figura 3.36 Andamento dei valori medi della serie HR (bpm) 30 minuti dopo l'occlusione e prima dell'evento di FPD per ciascun gruppo di trattamento.

3.4.3 Pressione pulsatoria

I valori del PP (figura 3.37), come detto in precedenza, sembrano risentire meno dell'effetto del trattamento farmacologico. Si osserva un decremento dei valori della PP per tutti i gruppi, anche se tale decremento risulta significativo solo per il gruppo D. Un simile comportamento è compatibile con la riduzione dell'stroke volume durante questa fase del protocollo. Tale riduzione dello stroke volume, come è stato detto nell'introduzione, caratterizza il progredire dello stato di shock circolatorio.

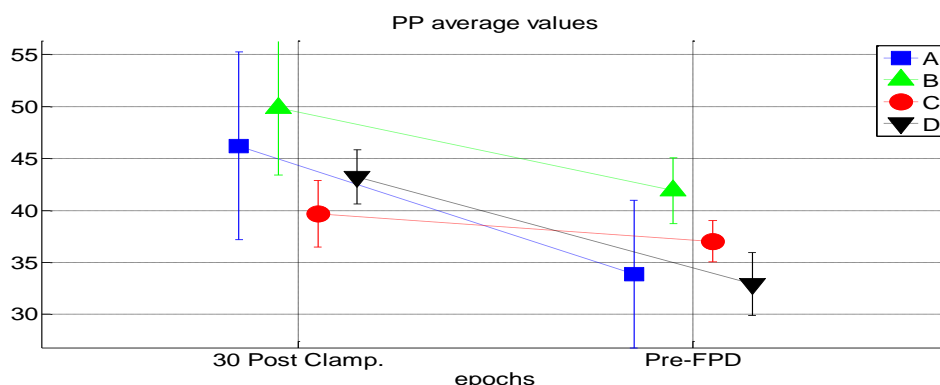


Figura 3.37 Andamento dei valori medi della serie PP (mmHg) 30 minuti dopo l'occlusione e prima dell'evento di FPD per ciascun gruppo di trattamento.

3.4.4 Confronto tra i gruppi FFPD e SFPD

La classificazione dei ratti secondo il tipo di FPD, dividendoli in SFPD e FFPD, non ha evidenziato differenze significative interessanti tra i due gruppi in nessuna delle due epoche analizzate, solamente il valore medio della serie PP nei minuti che precedono il FPD risulta essere significativamente diverso tra i due gruppi (tabella 3.12).

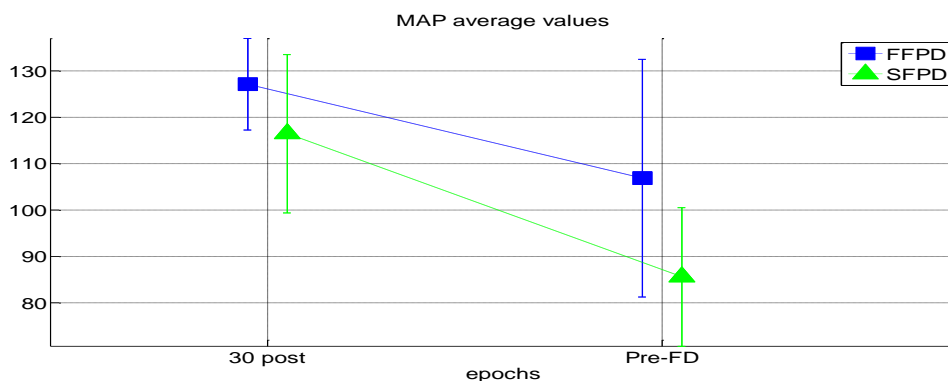


Figura 3.38 Andamento dei valori medi della serie MAP (mmHg) 30 minuti dopo l'occlusione e prima dell'evento di FPD per ciascun gruppo di trattamento.

Dal confronto tra le due epoche emerge, invece, una diminuzione significativa del valor medio della MAP (figura 3.38) nei minuti che precedono il FPD per entrambi i gruppi.

Tabella 3.12 Valori medi MAP (mmHg), HR (bpm) e PP (mmHg) per ciascun gruppo e per ciascuna epoca considerata (30minuti dopo SAO e prima dell'evento di Fatal Pressure Drop, FDP)

	30' Post Clamp.	Pre-FPD	Delta
MAP			
FFPD	127 ± 9.91	107 ± 25.5	-26 ± 12 [§]
SFPD	116 ± 17.1	85.6 ± 14.8	-29 ± 9 ^{&}
HR			
FFPD	292 ± 61.3	263 ± 62.7	-23 ± 20 [§]
SFPD	267 ± 64.0	272 ± 55.6	18 ± 26 [§]
PP *			
FFPD	46 ± 8.38	43 ± 4.89	-4 ± 9
SFPD	44 ± 6.08	34 ± 4.24	-11 ± 6 ^{&}

Confronti tra i diversi gruppi in ciascuna epoca : *unpaired t-test p-value <0.01, FFPD vs. SFPD nell'epoca Pre-FD.

Confronti tra le diverse epoche: [§]paired t-test p-value <0.05 epoca finale vs. epoca iniziale, [&]paired t-test p-value <0.01 epoca finale vs. epoca iniziale.

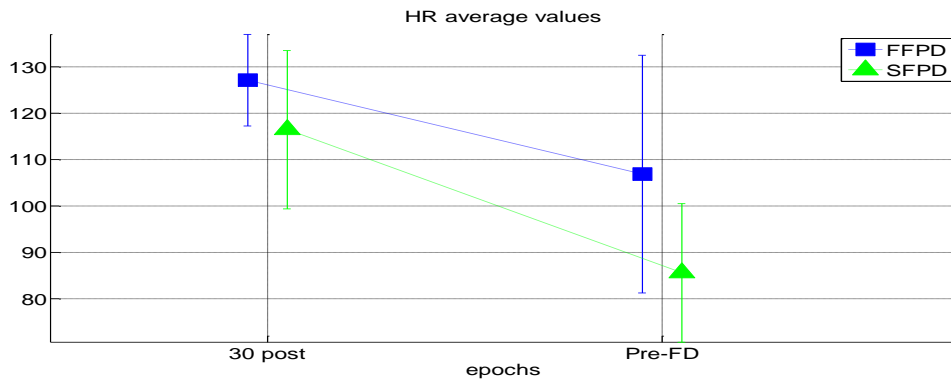


Figura 3.39 andamento dei valori medi della serie HR (bpm) 30 minuti dopo l'occlusione e prima dell'evento di FPD per ciascun gruppo di trattamento.

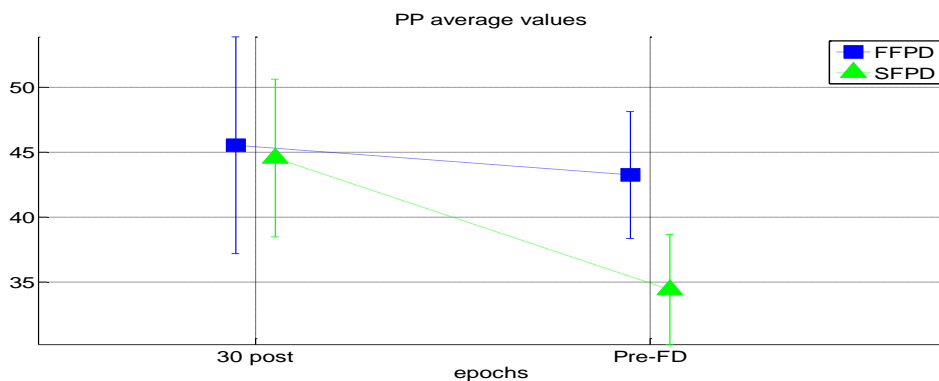


Figura 3.40 andamento dei valori medi della serie PP (mmHg) 30 minuti dopo l'occlusione e prima dell'evento di FPD per ciascun gruppo di trattamento.

Sia il gruppo SFPD che il gruppo FFPD presentano variazioni della frequenza cardiaca (figura 3.39) significative tra le due epoche. In particolare, i ratti che presentano FFPD diminuiscono la loro frequenza cardiaca, quelli che presentano SFPD, invece, la aumentano. Per quanto riguarda i valori medi di pressione pulsatoria (figura 3.40), i ratti che presentano FFPD mantengono questo parametro pressoché inalterato sino all'evento di *pressure drop*, i ratti con SFPD mostrano, invece, un decremento significativo del valore medio di PP.

3.5 Evoluzione verso il collasso: Analisi nel dominio delle frequenze

Sono riportati, nell'ordine, tabelle ed immagini relative dall'analisi spettrale della serie MAP, HP e PP; le finestre temporali su cui sono stati calcolati gli spettri di potenza sono le stesse su cui è stata condotta l'analisi temporale presentata nel paragrafo precedente. Per ciascuna serie vengono prima riportati i risultati relativi alla suddivisione dei ratti secondo i quattro gruppi di trattamento farmacologico (A, B, C e D) ed, a seguire, quelli relativi alla suddivisione secondo il tipo di FPD. I risultati sono espressi nella forma mediana (25°percentile, 75° percentile).

3.5.1 Pressione Media

Nella tabella 3.13 sono riportati i valori della mediana e dei percentili delle potenze allocate nelle bande spettrali VLF, LF e HF e la potenza totale per lo spettro AR della serie battito-battito della pressione media per ciascun gruppo di trattamento farmacologico.

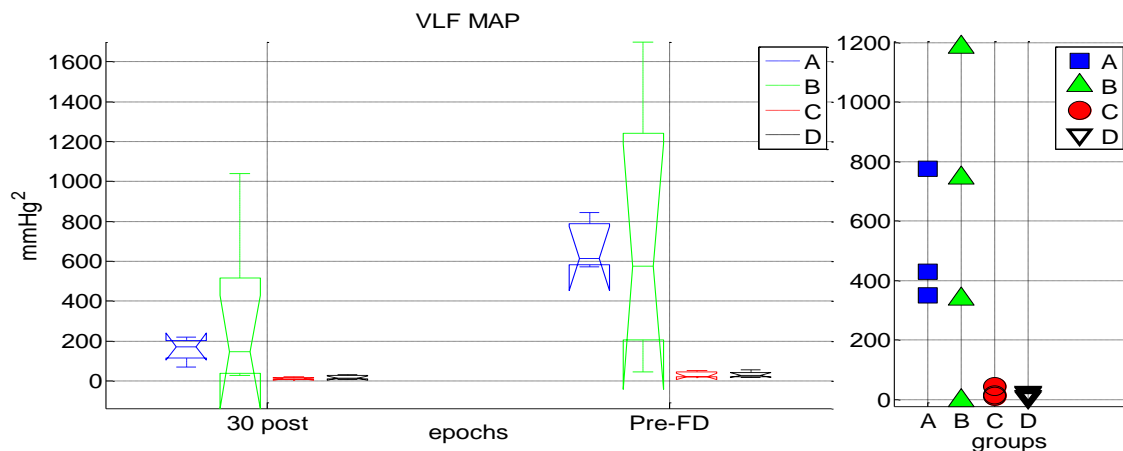


Figura 3.41 Boxplot della potenza nella banda VLF dello spettro della serie MAP nelle due epoche considerate per ciascuno dei quattro gruppi (sinistra) e differenza (Pre-FD. - 30' post) per ogni soggetto di ciascun gruppo (destra)

Tabella 3.13 Valori della mediana e dei percentili (25°, 75°) della potenza nelle bande VLF, LF e HF e della p. totale calcolati sullo spettro di potenza della serie MAP (mmHg²) per ciascun gruppo e per ciascuna epoca considerata (30minuti dopo SAO e prima dell'evento di Fatal Pressure Drop, FDP)

	30' Post Clamp.	Pre-FPD	Delta
VLF *[#]			
Gruppo A	172 (115, 202)	613 (582, 787)	430 (370, 689) [§]
Gruppo B	145 (39.2, 516)	575 (205, 1242)	542 (168, 965)
Gruppo C	9.85 (8.99, 18.2) ^{a, b}	23.1 (21.1, 45.7) ^{a, b}	15.2 (12.1, 36.3)
Gruppo D	14.8 (10.5, 29.4) ^{a, b}	29.0 (21.9, 42.4) ^{a, b}	21.7 (10.8, 23.6) [§]
LF*			
Gruppo A	14.5 (5.52, 23.2)	252 (71.0, 306)	247 (65, 287)
Gruppo B	20.7 (4.11, 78.8)	58.8 (18.0, 212)	54.6 (14.1, 191)
Gruppo C	1.51 (0.434, 2.79) ^{a, b}	1.91 (0.895, 23.4)	1.64 (0.460, 21.7)
Gruppo D	2.01 (1.42, 2.25) ^{a, b}	3.22 (2.75, 4.80)	1.80 (0.055, 3.17)
HF^{&}			
Gruppo A	21.0 (16.0, 137)	35.1 (10.9, 62.0)	21.6 (-10.1, 44.9)
Gruppo B	55.7 (52.5, 94.3)	26.1 (18.2, 59.8)	-28.9 (-56.1, 5.07)
Gruppo C	24.0 (18.9, 31.9) ^b	5.98 (3.21, 18.8)	-4.58 (-31.2, -1.76)
Gruppo D	21.1 (12.8, 31.2) ^b	8.23 (6.08, 11.1)	-23.0 (-29.7, -4.88)
P.totale *[#]			
Gruppo A	240 (156, 349)	940 (720, 1130)	677 (490, 994) [§]
Gruppo B	380 (104, 962)	668 (257, 1528)	553 (160, 1148)
Gruppo C	45.0 (29.5, 52.3) ^{a, b}	47.5 (33.3, 78.7) ^{a, b}	14.9 (9.92, 29.4)
Gruppo D	41.9 (39.4, 48.3) ^{a, b}	41.3 (38.4, 53.3) ^{a, b}	2.40 (-7.54, 10.3)

Confronti tra i diversi gruppi in ciascuna epoca: *1-way ANOVA p-value <0.01 nell'epoca di baseline, [&]1-way ANOVA p-value <0.06 nell'epoca di baseline, [#]1-way ANOVA p-value <0.05 nell'epoca Post Clamp., ^apost hoc comparisons p-value<0.05 vs gruppo A, ^bpost hoc comparisons p-value<0.05 vs gruppo B. Confronti tra le diverse epoche: [§] paired t-test p-value <0.05.

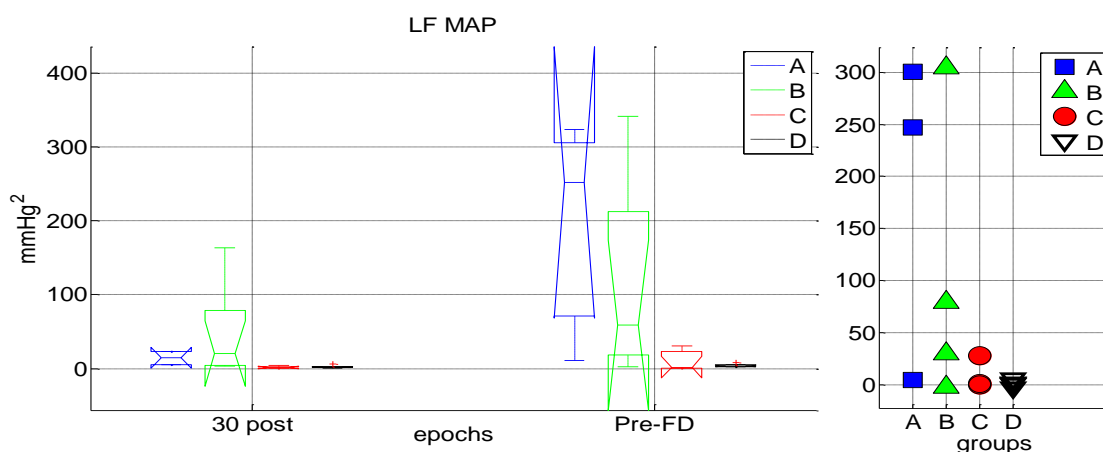


Figura 3.42 Boxplot della potenza nella banda LF dello spettro della serie MAP nelle due epoche considerate per ciascuno dei quattro gruppi (sinistra) e differenza (Pre-FD. – 30' post) per ogni soggetto di ciascun gruppo (destra)

All'inizio della finestra di analisi considerata si osserva una situazione simile a quella che precede la SAO: i gruppi Xyl hanno valori di potenza allocata nelle bande VLF

e LF (figure 3.41 e 3.42) e valori di potenza totale (figura 3.44) significativamente inferiori a quelli dei due gruppi che non hanno ricevuto la Xilazina. Il valore della potenza allocata nella banda HF (figura 3.43) dei gruppi Xyl in questa fase del protocollo è significativamente inferiore rispetto a quella del gruppo B.

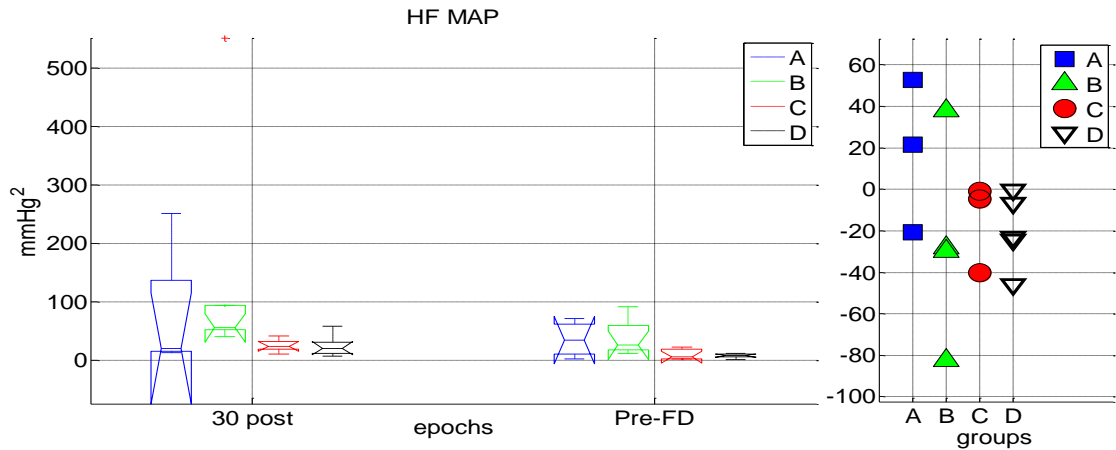


Figura 3.43 Boxplot della potenza nella banda HF dello spettro della serie MAP nelle due epoche considerate per ciascuno dei quattro gruppi (sinistra) e differenza (Pre-FD. – 30' post) per ogni soggetto di ciascun gruppo (destra)

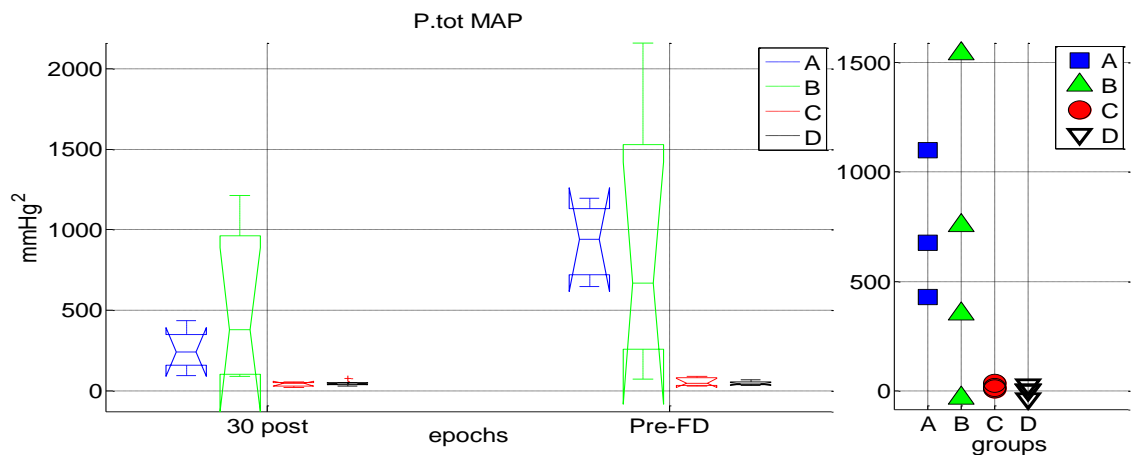


Figura 3.44 Boxplot della potenza totale dello spettro della serie MAP nelle due epoche considerate per ciascuno dei quattro gruppi (sinistra) e differenza (Pre-FD. – 30' post) per ogni soggetto di ciascun gruppo (destra)

Questi risultati concordano con quanto osservato nell'analisi temporale della serie MAP. Infatti, come si è osservato, trenta minuti dopo la SAO i gruppi Xyl sono caratterizzati ancora da valori di pressione media inferiori a quella agli altri due gruppi.

Anche nei minuti che precedono il FPD i gruppi Xyl continuano ad avere valori di potenza allocata nella banda VLF e valori di potenza totale significativamente inferiori a quelli degli altri due gruppi (figure 3.43 e 3.44). Al contrario nessuna differenza

significativa tra i quattro gruppi è stata rilevata per i valori della potenze integrali nella banda LF e HF in questa fase del protocollo

I confronti tra le due epoche evidenziano un incremento significativo dei valori di potenza nella banda VLF per i gruppi A e D, si osserva un incremento della potenza in VLF anche per gli altri due gruppi sebbene questo non sia risultato significativo. Nessuna differenza significativa tra le due epoche è stata, invece, rilevata per quanto riguarda i valori della potenza nelle bande LF e HF. Sembrerebbe, tuttavia, che in tutti i gruppi (Ma in particolare nei gruppi NoXyl) la maggior parte dei ratti risponda al collasso della pressione aumentando i valori di potenza allocata nella banda LF compatibilmente con l'effetto di stimolazione simpatica indotto da uno stato ischemico prolungato nel tempo, a tal proposito si guardino le differenze tra le due epoche per ciascun soggetto (figura 3.42 a destra). Questo comportamento risulta più evidente nei ratti dei gruppi A e B. Un risultato simile risultato, probabilmente, riflette il grado di attivazione simpatica differente tra i gruppi NoXyl, che aumentano il tono simpatico in risposta al progredire dello stato ischemico, e i gruppi Xyl in cui tale risposta simpatica è depressa dall'azione simpatolitica del farmaco.

Si riportano di seguito i valori della mediana e dei percentili dell'indice LF%, e del rapporto LF/HF per ciascun gruppo nelle due epoche.(tabella 3.14 e figure 3.45 e 3.46). Nessuna significatività degna di nota è emersa dall'analisi di tali parametri che tuttavia contribuiscono alla comprensione del quadro generale e sembrano confermare quanto appena detto circa l'effetto di un'ischemia prolungata.

Tabella 3.14 Valori della mediana e dei percentili (25°, 75°) del parametro LF% e del rapporto LF/HF calcolati sullo spettro di potenza della serie MAP (mmHg²) per ciascun gruppo e per ciascuna epoca considerata (30minuti dopo SAO e prima dell'evento di Fatal Pressure Drop, FDP)

	30' Post Clamp.	Pre-FPD	Delta
LF%			
Gruppo A	17.6 (12.7, 37.0)	68.9 (42.2, 83.2)	32.3 (20.3, 46.0)
Gruppo B	14.6 (6.34, 35.0)	59.4 (26.1, 75.0)	38.6 (19.6, 55.3)
Gruppo C	4.90 (2.33, 7.90)	23.5 (7.65, 69.7)	21.0 (5.46, 65.4)
Gruppo D	7.73 (6.33, 14.16)	22.6 (20.7, 39.2)	16.3 (12.1, 30.3)
LF/HF			
Gruppo A	0.254 (0.173, 1.01)	3.83 (3.34, 8.05)	3.57 (3.09, 6.66)
Gruppo B	0.184 (0.069, 0.693)	2.49 (0.657, 5.62)	2.11 (0.586, 5.25)
Gruppo C	0.052 (0.024, 0.093)	0.314 (0.098, 10.1)	0.294 (0.076, 10.1)
Gruppo D	0.085 (0.068, 0.178)	0.338 (0.281, 2.40)	0.235 (0.216, 2.27)

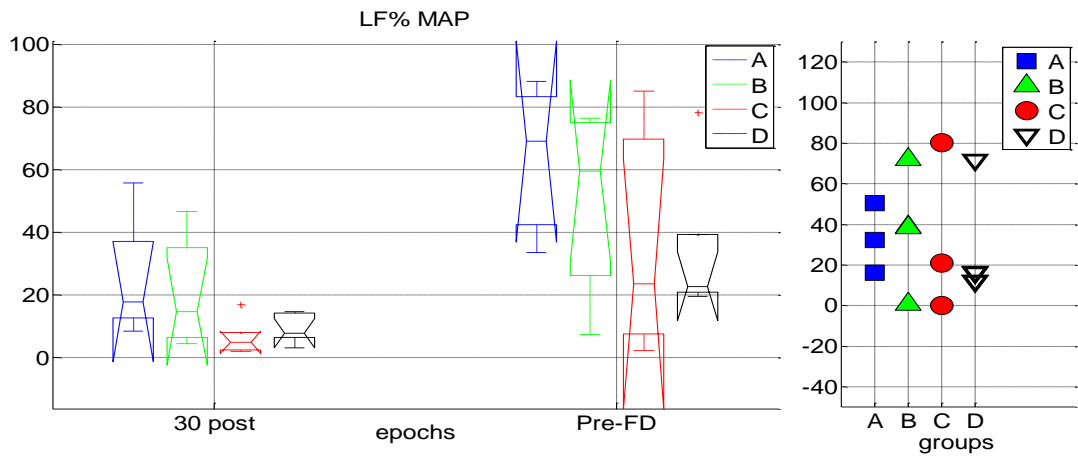


Figura 3.45 Boxplot del parametro LF% dello spettro della serie MAP nelle due epoche considerate per ciascuno dei quattro gruppi (sinistra) e differenza (Pre-FD. - 30' post) per ogni soggetto di ciascun gruppo (destra)

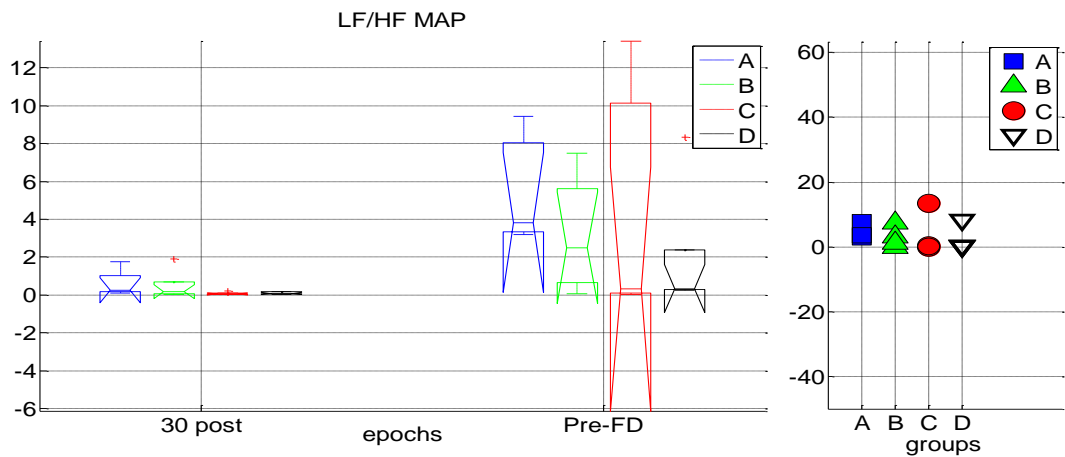


Figura 3.46 Boxplot del rapporto LF/HF dello spettro della serie MAP nelle due epoche considerate per ciascuno dei quattro gruppi (sinistra) e differenza (Pre-FD. - 30' post) per ogni soggetto di ciascun gruppo (destra)

Nella tabella seguente sono riportati i risultati delle stesse analisi condotte sulla serie MAP considerando la suddivisione dei ratti nei due macro-gruppi FFPD e SFPD, in base al tipo di FPD osservato.

Tabella 3.15 Valori della mediana e dei percentili (25°, 75°) della potenza nelle bande VLF, LF e HF e della p. totale calcolati sullo spettro di potenza della serie MAP (mmHg²) per ciascun gruppo e per ciascuna epoca considerata (30minuti dopo SAO e prima dell'evento di Fatal Pressure Drop, FDP)

	30' Post Clamp.	Pre-FPD	Delta
VLF			
FFPD	46.8 (23.4, 227)	210 (48.7, 469)	191 (20.3, 344)
SFPD	24.9 (11.7, 115)	38.3 (22.8, 741)	23.0 (13.0, 666) [§]
LF			
FFPD	4.11 (3.28, 58.4)	32.3 (16.3, 179)	29.1 (13.3, 165)
SFPD	3.29 (1.46, 5.95)	3.70 (2.72, 65.5)	2.17 (0.904, 61.0) [§]
HF			
FFPD	52.6 (35.2, 180)	26.1 (13.4, 31.4)	-28.9 (-35.0, -3.18)
SFPD	24.6 (17.7, 47.4)	10.4 (6.43, 20.6)	-6.46 (-23.9, -0.311)
P.totale			
FFPD	104 (81.2, 437)	265 (80.7, 691)	193 (1.16, 514)
SFPD	49.9 (39.5, 178)	48.7 (40.4, 831)	14.9 (2.91, 673) [§]

Confronti tra le diverse epoche: [§] paired t-test p-value <0.01, epoca finale vs. epoca iniziale.

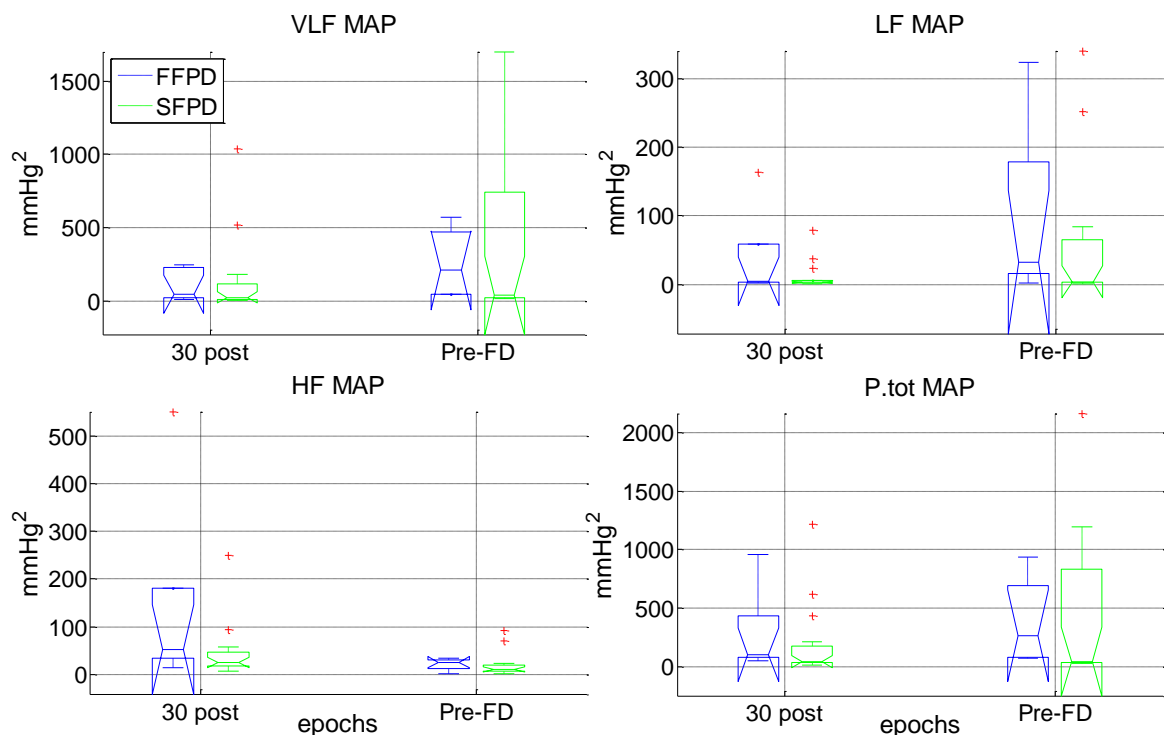


Figura 3.47 Boxplot della potenza nelle bande VLF, LF e HF e della potenza totale dello spettro della serie MAP nelle due epoche considerate per ciascuno dei due gruppi.

Come già osservato nell'analisi temporale, questa suddivisione dei ratti risulta meno efficace nell'evidenziare differenze significative tra i due gruppi FFPD e SFPD nelle due epoche temporali oggetto di questa analisi. Probabilmente, l'effetto del trattamento farmacologico con Xilazina che, come è stato evidenziato dai risultati precedentemente

presentati, permane a lungo termine genera una variabilità intragruppo che influenza i risultati dell'analisi statistica.

I valori delle potenze allocate nelle bande VLF, LF ed HF e il valore della potenza totale (figura 3.47) non differiscono in modo significativo tra i due gruppi in nessuna delle due epoche.

Il confronto tra le due epoche, invece, ha permesso di evidenziare differenze significative nei valori del gruppo SFPD. Da tale confronto emerge che gli animali con SFPD hanno un incremento significativo della potenza nelle bande VLF e LF e della potenza totale. Si noti che, sebbene i test statistici non abbiano restituito alcuna significatività, i ratti con FFPD presentano lo stesso comportamento. Come sottolineato più volte, un incremento della potenza alle basse frequenze e della potenza totale, accompagnato da un decremento della potenza alle alte frequenze è compatibile con l'attivazione simpatica in risposta al progredire dello stato ischemico.

Anche in questo caso è stato calcolato il parametro e il rapporto LF/HF, la tabella 3.16 riporta il valore della media e dei percentili di questi due parametri.

Tabella 3.16 Valori della mediana e dei percentili (25°, 75°) del parametro LF% e del rapporto LF/HF calcolati sullo spettro di potenza della serie MAP (mmHg²) per ciascun gruppo e per ciascuna epoca considerata (30minuti dopo SAO e prima dell'evento di Fatal Pressure Drop, FDP)

	30' Post Clamp.	Pre-FPD	Delta
LF%			
FFPD	6.62 (5.99, 30.9)	65.1 (26.1, 86.6)	35.3 (16.5, 59.3)
SFPD	8.73 (4.62, 16.9)	26.2 (21.5, 72.6)	16.5 (13.1, 47.6) §
LF/HF*			
FFPD	0.072 (0.065, 0.664)	5.34 (0.657, 11.4)	4.42 (0.586, 10.5)
SFPD	0.097 (0.050, 0.233)	0.414 (0.297, 3.81)	0.294 (0.228, 3.45)§

Confronti tra i diversi gruppi in ciascuna epoca: *unpaired t-test FFPD vs. SFPD p-value <0.05 nell'epoca Pre-FPD.

Confronti tra le diverse epoche: §paired t-test p-value <0.01, epoca finale vs. epoca iniziale

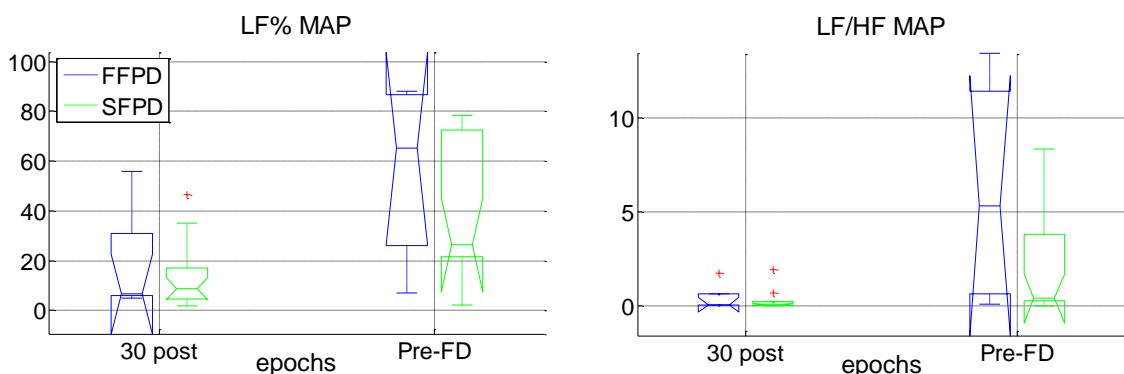


Figura 3.48 Boxplot del parametro LF% e del rapporto LF/HF dello spettro della serie MAP nelle due epoche considerate per ciascuno dei due gruppi.

Il valore del rapporto LF/HF (figura 3.48, parte destra) risulta significativamente differente tra i due gruppi nei minuti precedenti l'evento di fatal drop. Dal confronto fra i due gruppi non emergono, tuttavia, altre differenze significative in nessuna delle due epoche. Anche in questo caso il confronto tra le due epoche ha invece permesso di evidenziare differenze significative per il gruppo SFPD. In particolare, si osserva un incremento del parametro LF% e del rapporto LF/HF. Anche questo risultato concorda con l'ipotesi di un incremento di attività simpatica indotta da un ischemia prolungata. Si noti che anche il gruppo FFPD mostra lo stesso comportamento ma, probabilmente a causa del basso numero di soggetti considerati nelle analisi statistiche (N=5), non si riscontra alcuna significatività statistica nei risultati ottenuti.

3.5.2 Ciclo cardiaco

Nel seguito vengono presentati i risultati dell'analisi spettrale condotta sulla serie HP nella finestra compresa tra il trentesimo minuto e il FPD. Anche in questo caso la tabella 3.17 riporta i valori della mediana e dei percentili (25°, 75°) delle potenze calcolate nelle bande VLF, LF ed HF e della potenza totale per ciascuno dei quattro gruppi nelle due epoche temporali oggetto di questa analisi.

Trenta minuti dopo la SAO nei ratti del gruppo C non si riscontrano alterazioni del ritmo cardiaco e della frequenza respiratoria paragonabili a quelle individuate nella fase immediatamente successiva alla SAO. Mentre tali alterazioni avevano giustificato l'esclusione dell'intero gruppo dai confronti statistici, in questa fase non ci sono motivazioni obiettive per farlo, pertanto il gruppo C è ora incluso nelle analisi statistiche. Tuttavia, si tenga presente che sono stati esclusi dall'analisi quegli animali in cui tali alterazioni erano ancora presenti e sensibili. Si noti infine che il gruppo C presenta comunque un valore di potenza totale (figura 3.51) significativamente superiore rispetto a quello degli altri gruppi.

Tabella 3.17 Valori della mediana e dei percentili (25°, 75°) della potenza nelle bande VLF, LF e HF e della p. totale calcolati sullo spettro di potenza della serie HP (msec²) per ciascun gruppo e per ciascuna epoca considerata (30minuti dopo SAO e prima dell'evento di Fatal Pressure Drop, FDP)

	30' Post Clamp.	Pre-FPD	Delta
LF *			
Gruppo A	1.97 (1.78, 4.12)	10.4 (9.7, 11.3)	8.49 (7.58, 9.41)
Gruppo B	2.92 (2.29, 3.57)	12.9 (11.3, 15.1)	9.32 (8.58, 12.8) §
Gruppo C	16.8 (12.6, 42.2) ^{a, b}	12.2 (7.4, 69.6)	-3.19 (-3.87, 52.8)
Gruppo D	7.62 (3.84, 10.5) ^a	8.67 (4.1, 41.8)	-3.84 (-8.04, 33.0)
HF &			
Gruppo A	15.0 (8.54, 29.1)	15.2 (13.8, 16.6)	6.67 (4.42, 9.10)
Gruppo B	13.6 (8.48, 19.8)	36.7 (29.6, 99.4)	17.8 (17.1, 88.6)
Gruppo C	50.4 (34.4, 122) ^{a, b}	87.2 (34.3, 200)	-5.81 (-79.2, 136)
Gruppo D	23.3 (19.3, 41.2)	34.6 (27.8, 40.8)	6.09 (-13.3, 10.4)
P.totale*			
Gruppo A	45.1 (34.3, 77.7)	72.8 (45.9, 99.6)	38.5 (4.54, 72.4)
Gruppo B	57.8 (46.6, 82.1)	96.5 (84.5, 138)	31.6 (6.70, 109)
Gruppo C	193 (34.4, 298) ^{a, b, d}	138 (84.3, 331)	4.99(-109.1, 222)
Gruppo D	42.7 (24.8, 54.4)	61.3 (38.2, 113)	8.23 (-23.8, 57.5)

Confronti tra i diversi gruppi in ciascuna epoca: *1-way ANOVA p-value <0.01 nell'epoca di baseline, &1-way ANOVA p-value <0.05 nell'epoca di baseline, ^apost hoc comparisons p-value<0.05 vs gruppo A, ^bpost hoc comparisons p-value<0.05 vs gruppo B. Confronti tra le diverse epoche: § paired t-test p-value <0.05.

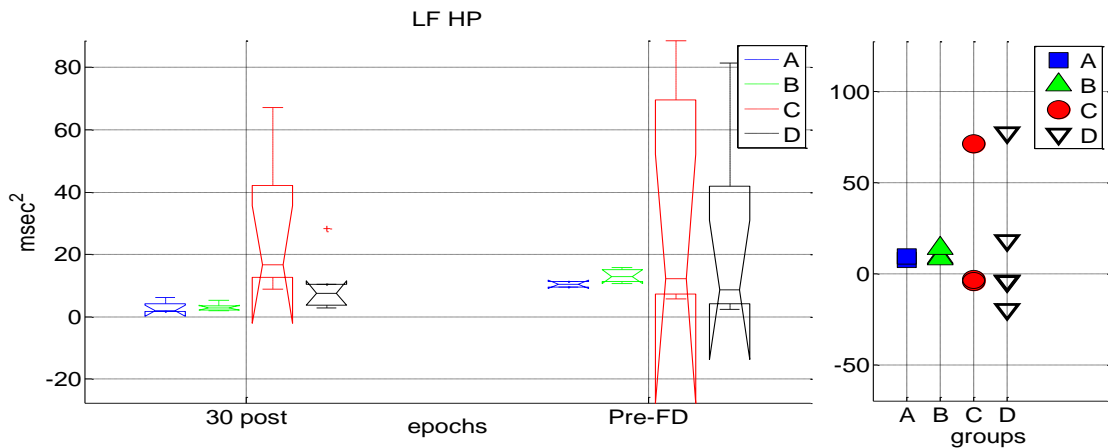


Figura 3.49 Boxplot della potenza nella banda LF dello spettro della serie HP nelle due epoche considerate per ciascuno dei quattro gruppi (sinistra) e differenza (Pre-FD. – 30'post) per ogni soggetto di ciascun gruppo (destra)

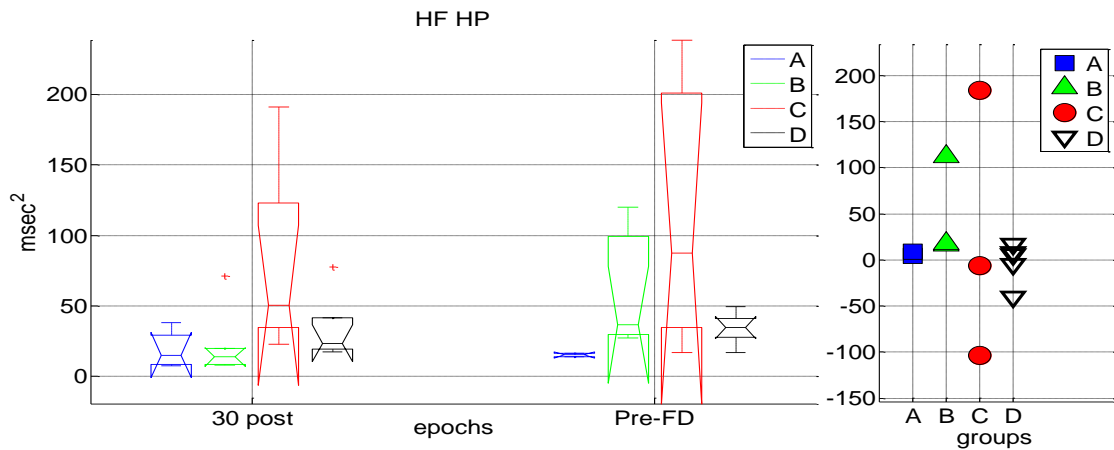


Figura 3.50 Boxplot della potenza nella banda HF dello spettro della serie HP nelle due epoche considerate per ciascuno dei quattro gruppi (sinistra) e differenza (Pre-FD. - 30' post) per ogni soggetto di ciascun gruppo (destra)

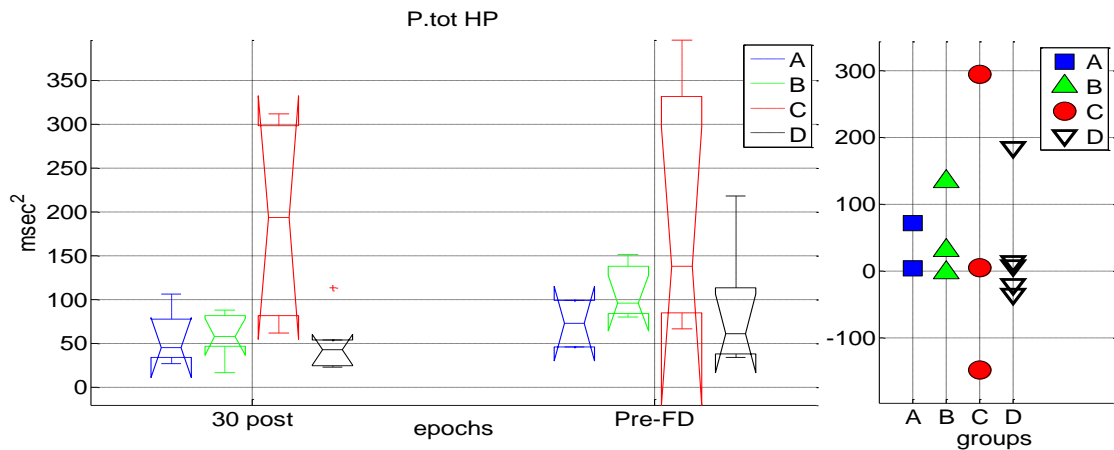


Figura 3.51 Boxplot della potenza totale dello spettro della serie HP nelle due epoche considerate per ciascuno dei quattro gruppi (sinistra) e differenza (Pre-FD. - 30' post) per ogni soggetto di ciascun gruppo (destra)

Trenta minuti dopo la SAO ritroviamo una situazione analoga a quella dell'epoca di Baseline; in particolare, i gruppi Xyl sono caratterizzati da una potenza maggiore allocata nella banda spettrale HF (questa differenza risulta significativa solamente per il gruppo C). Nei minuti che precedono il FPD non si riscontrano differenze significative tra i quattro gruppi per nessuno degli indici considerati. Il confronto tra le due epoche rivela un aumento della potenza in tutte le bande spettrali che non permette di avanzare delle ipotesi circa l'attività del SNA.

Per completezza si riportano i valori della mediana e dei percentili dell'indice LF%, e del rapporto LF/HF per ciascun gruppo nelle due epoche (tabella 3.18) ottenuti dall'analisi spettrale della serie HP.

Anche per la serie HP nessuna significatività degna di nota è emersa dall'analisi di tali parametri, possiamo limitarci ad osservare un comportamento che risulta coerente con quanto precedentemente detto per la serie MAP, ovvero un attivazione simpatica in risposta ad uno stato ischemico prolungato nel tempo nei gruppi NoXyl.

Tabella 3.18 Valori della mediana e dei percentili (25°, 75°) del parametro LF% e del rapporto LF/HF calcolati sullo spettro di potenza della serie HP (msec²) per ciascun gruppo e per ciascuna epoca considerata (30minuti dopo SAO e prima dell'evento di Fatal Pressure Drop, FDP)

	30' Post Clamp.	Pre-FPD	Delta
LF%			
Gruppo A	17.1 (10.4, 19.0)	31.5 (30.6, 37.2)	18.1 (14.7, 21.5) [§]
Gruppo B	15.5 (10.4, 18.5)	27.0 (19.2, 58.1)	9.96 (- 2.06, 12.2)
Gruppo C	24.4 (15.6, 39.2)	21.5 (14.4, 25.5)	4.24 (3.58, 12.1)
Gruppo D	15.8 (13.1, 26.5)	33.1 (8.11, 49.7)	-9.13 (-20.7, 35.9)
LF/HF			
Gruppo A	0.236 (0.128, 0.282)	0.663 (0.581, 0.677)	0.436 (0.423, 0.450) [§]
Gruppo B	0.209 (0.129, 0.256)	0.425 (0.268, 4.51)	0.145 (-0.041, 0.237)
Gruppo C	0.357 (0.201, 0.922)	0.344 (0.191, 0.901)	0.055 (0.054, 0.413)
Gruppo D	0.200 (0.152, 0.363)	0.507 (0.089, 1.20)	-0.121 (-0.421, 1.033)

Confronti tra le diverse epoche: [§] paired t-test p-value <0.05

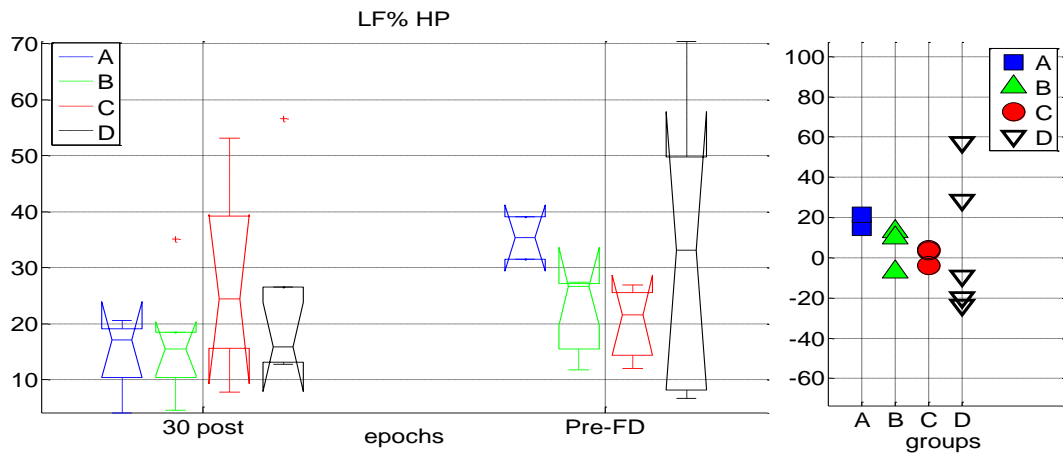


Figura 3.52 Boxplot del parametro LF% dello spettro della serie HP nelle due epoche considerate per ciascuno dei quattro gruppi (sinistra) e differenza (Pre-FD. – 30' post) per ogni soggetto di ciascun gruppo (destra)

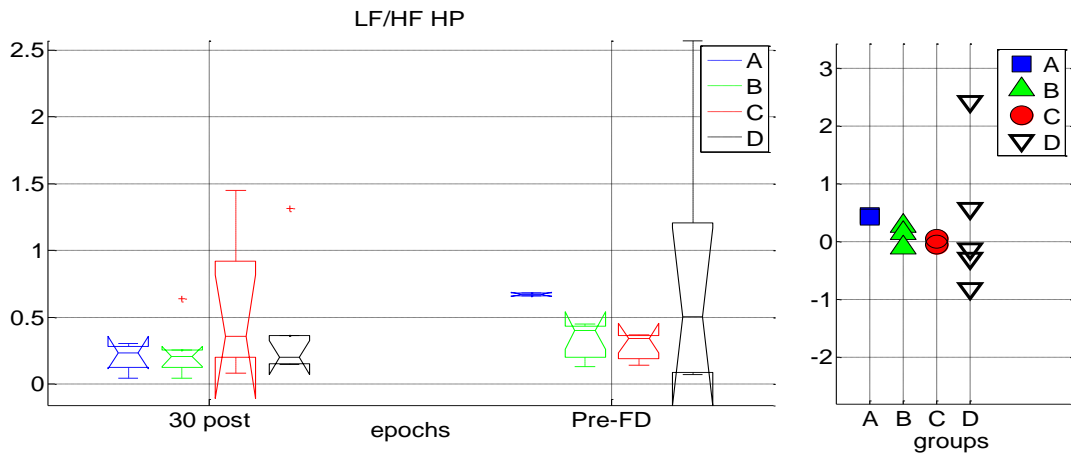


Figura 3.53 Boxplot del rapporto LF/HF dello spettro della serie HP nelle due epoche considerate per ciascuno dei quattro gruppi (sinistra) e differenza (Pre-FD. – 30’post) per ogni soggetto di ciascun gruppo (destra)

Vengono riportati nel seguito i risultati dell’analisi spettrale condotta sulla serie Heart period condotta nel periodo precedente all’evento di FPD, considerando la suddivisione in SFPD e FFPD. Nella seguente tabelle sono riportati i valori della mediana e dei percentili (25°, 75°) della potenza allocata nelle bande VLF, LF e HF e della potenza totale per ciascuno dei due gruppi nelle due epoche oggetto dell’analisi.

Tabella 3.19 Valori della mediana e dei percentili (25°, 75°) della potenza nelle bande VLF, LF e HF e della p. totale calcolati sullo spettro di potenza della serie HP (msec²) per ciascun gruppo e per ciascuna epoca considerata (30minuti dopo SAO e prima dell’evento di Fatal Pressure Drop, FDP)

	30’ Post Clamp.	Pre-FPD	Delta
VLF*			
FFPD	35.3 (14.5, 49.7)	69.6 (39.5, 182)	54.5 (-7.14, 143)
SFPD	23.8 (3.87, 40.3)	17.3 (9.20, 64.4)	3.78 (-7.99, 31.5)
LF			
FFPD	3.58 (3.07, 15.3)	12.8 (10.4, 93.0)	9.32 (8.01, 58.3)
SFPD	6.28 (2.36, 13.4)	12.2 (9.20, 68.2)	9.41 (-4.01, 58.1)
HF			
FFPD	19.8 (9.33, 74.3)	36.6 (19.5, 91.6)	16.8 (7.41, 24.4)
SFPD	22.0 (17.6, 43.8)	37.9 (28.3, 112)	9.10 (-1.86, 88.6)
P. totale			
FFPD	82.2 (44.8, 110)	99.6 (85.3, 369)	72.4 (16.9, 230)
SFPD	53.8 (36.9, 104)	96.5 (49.8, 201)	14.6 (-14.1, 173)

Confronti tra i diversi gruppi in ciascuna epoca: *unpaired t-test FFPD vs. SFPD p-value <0.05 nell’epoca Pre-FPD

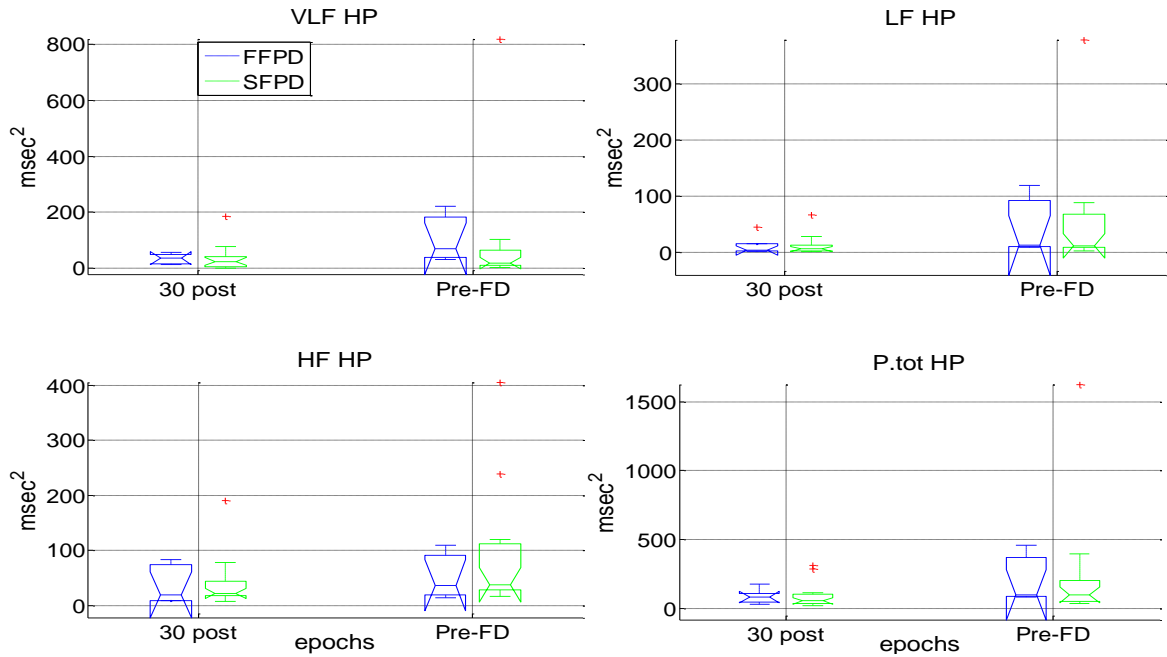


Figura 3.54 Boxplot della potenza nelle bande VLF,LF e HF e della potenza totale dello spettro della serie HP nelle due epoche considerate per ciascuno dei due gruppi

Dal confronto tra i due gruppi in ciascuna epoca emerge solamente una differenza significativa nel valore della potenza nella banda VLF nella finestra che precede l'evento di FPD. Nessuna differenza significativa è emersa dal confronto tra le due epoche.

Per completezza si riportano i valori della mediana e dei percentili (25°, 75°) del parametro LF% e del rapporto LF/HF (tabella 3.20) calcolati per lo spettro di potenza della serie battito-battito HP.

Tabella 3.20 Valori della mediana e dei percentili (25°, 75°) del parametro LF% e del rapporto LF/HF calcolati sullo spettro di potenza della serie HP (msec²) per ciascun gruppo e per ciascuna epoca considerata (30minuti dopo SAO e prima dell'evento di Fatal Pressure Drop, FDP)

	30' Post Clamp.	Pre-FPD	Delta
LF%			
FFPD	16.8 (11.9, 34.7)	31.5 (28.4, 44.9)	14.7 (13.4, 14.7)
SFPD	17.6 (12.9, 24.4)	26.9 (11.8, 37.6)	4.24 (-8.54, 18.7)
LF/HF *			
FFPD	0.213 (0.147, 0.569)	0.663 (0.502, 0.973)	0.450 (0.313, 0.512)
SFPD	0.246 (0.149, 0.340)	0.402 (0.135, 0.650)	0.055 (0.116, 0.380)

Confronti tra i diversi gruppi in ciascuna epoca : *unpaired t-test FFPD vs. SFPD p-value <0.05 nell'epoca Pre-FPD.

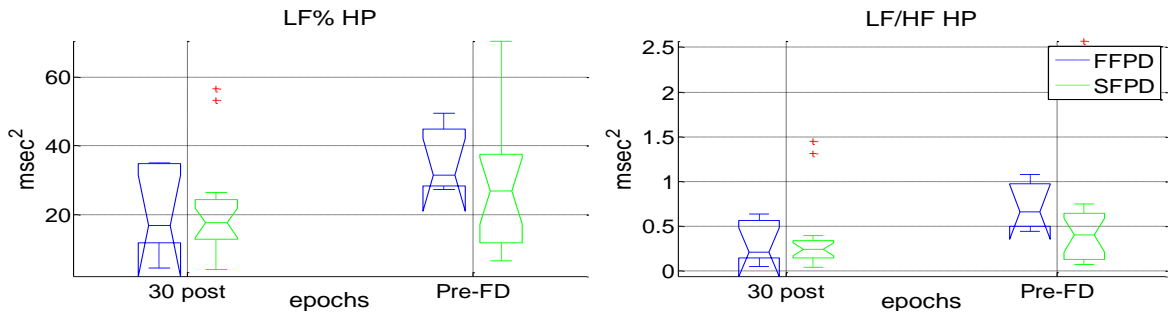


Figura 3.55 Boxplot del parametro LF% e del rapporto LF/HF dello spettro della serie HP nelle due epoche considerate per ciascuno dei due gruppi

Anche nel caso della serie HP, come osservato per la MAP (tabella 3.14), il valore del rapporto LF/HF risulta significativamente differente tra i due gruppi nei minuti precedenti al FPD. Da questi risultati emerge un incremento dell'attività simpatica, sebbene sia meno evidente e non si evidenzino differenze significative di questi tre parametri tra le due epoche analizzate.

3.5.3 Pressione pulsatoria

Infine vengono presentati i risultati dell'analisi spettrale condotta sulla serie PP. Anche in questo caso vengono riportati i valori della mediana e dei percentili (25° e 75°) degli indici spettrali VLF, LF ed HF e della potenza totale per ciascuno dei quattro gruppi (tabella 3.21).

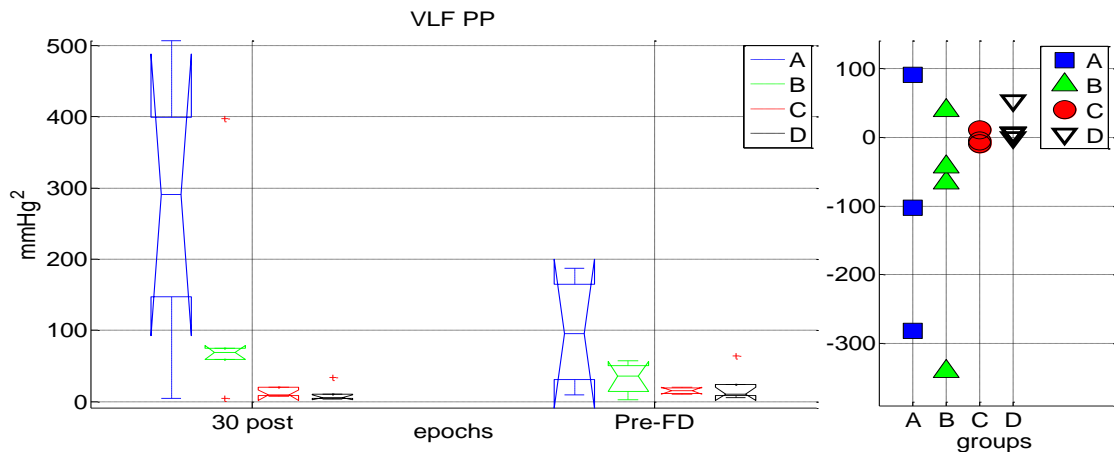


Figura 3.56 Boxplot della potenza nella banda VLF dello spettro della serie PP nelle due epoche considerate per ciascuno dei quattro gruppi (sinistra) e differenza (Pre-FD. - 30' post) per ogni soggetto di ciascun gruppo (destra)

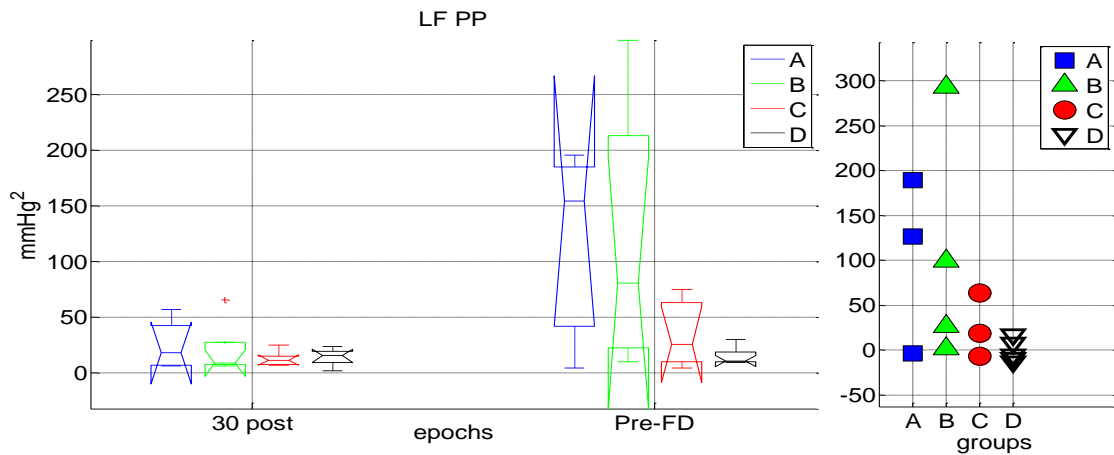


Figura 3.57 Boxplot della potenza nella banda LF dello spettro della serie PP nelle due epoche considerate per ciascuno dei quattro gruppi (sinistra) e differenza (Pre-FD. – 30' post) per ogni soggetto di ciascun gruppo (destra)

Tabella 3.21 Valori della mediana e dei percentili (25°, 75°) della potenza allocata nelle bande VLF, LF e HF e della p. totale calcolati sullo spettro di potenza della serie PP (mmHg²) per ciascun gruppo e per ciascuna epoca considerata (30minuti dopo SAO e prima dell'evento di Fatal Pressure Drop, FDP)

	30' Post Clamp.	Pre-FPD	Delta
VLF*			
Gruppo A	290 (147, 399)	95.8 (31.2, 164)	-102 (-236, 42.7)
Gruppo B	68.9 (58.8, 74.8)	35.5 (14.7, 50.5)	-54.1 (-203, -1.51)
Gruppo C	9.36 (8.50, 19.8)	15.2 (11.6, 19.1)	-4.99 (-8.24, 7.45)
Gruppo D	5.92 (4.15, 10.6) ^{a, b}	10.7 (8.55, 24.3)	5.74 (4.06, 18.2)
LF			
Gruppo A	17.7 (6.91, 42.3)	154 (41.8, 185)	126 (29.0, 173)
Gruppo B	8.49 (7.58, 27.4)	80.7 (22.2, 212)	62.7 (14.1, 196)
Gruppo C	11.2 (7.58, 14.7)	25.3 (9.67, 62.7)	18.5 (-0.578, 52.6)
Gruppo D	15.2 (9.40, 19.4)	10.4 (9.91, 18.4)	-4.86 (-10.0, 10.5)
HF			
Gruppo A	63.7 (45.3, 246)	112 (51.6, 291)	80.2 (-7.82, 239)
Gruppo B	133 (69.0, 232)	139 (95.1, 205)	-6.66 (-113, 140)
Gruppo C	67.6 (54.7, 90.2)	57.5 (29.3, 158)	6.43 (-25.4, 55.7)
Gruppo D	40.7 (22.0, 95.2)	20.2 (16.1, 46.5)	-10.4 (-56.5, -7.27)
P.totale*			
Gruppo A	366 (212, 693)	456 (148, 597)	100 (-223, 456)
Gruppo B	287 (155, 477)	326 (132, 468)	-81.3 (-154, 180)
Gruppo C	97.6 (77.4, 113)	116 (99.2, 188)	39.8 (21.6, 55.1)
Gruppo D	63.7 (49.4, 121) ^{a, b}	65.8 (40.4, 84.2)	-12.9 (-27.1, -4.35)

Confronti tra i diversi gruppi in ciascuna epoca: *1-way ANOVA p-value <0.05 nell'epoca 30' Post Clamp., ^apost hoc comparisons p-value<0.05 vs gruppo A, ^bpost hoc comparisons p-value<0.05 vs gruppo B.

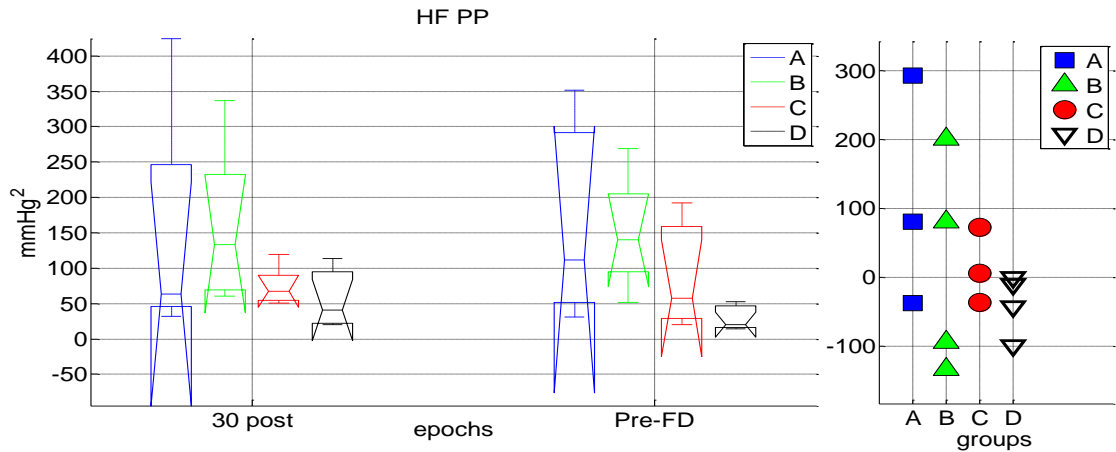


Figura 3.58 Boxplot della potenza nella banda HF dello spettro della serie PP nelle due epoche considerate per ciascuno dei quattro gruppi (sinistra) e differenza (Pre-FD. - 30' post) per ogni soggetto di ciascun gruppo (destra)

Per quanto riguarda la distribuzione della potenza nelle bande spettrali VLF, LF e HF, l'unica differenza significativa risulta essere quella del valore della potenza allocata nella banda VLF (figura 3.56) per il gruppo D rispetto a quella dei gruppi A e B, nell'epoca temporale all'inizio del periodo considerato.

Nei minuti immediatamente precedenti al fatal drop i risultati ottenuti suggeriscono che i gruppi NoXyl sono caratterizzati, in tutte le bande spettrali, da valori di potenza più elevati rispetto a quelli dei gruppi Xyl, anche se non è stata riscontrata alcuna significatività. Nessuna differenza significativa è emersa da confronto tra le due epoche

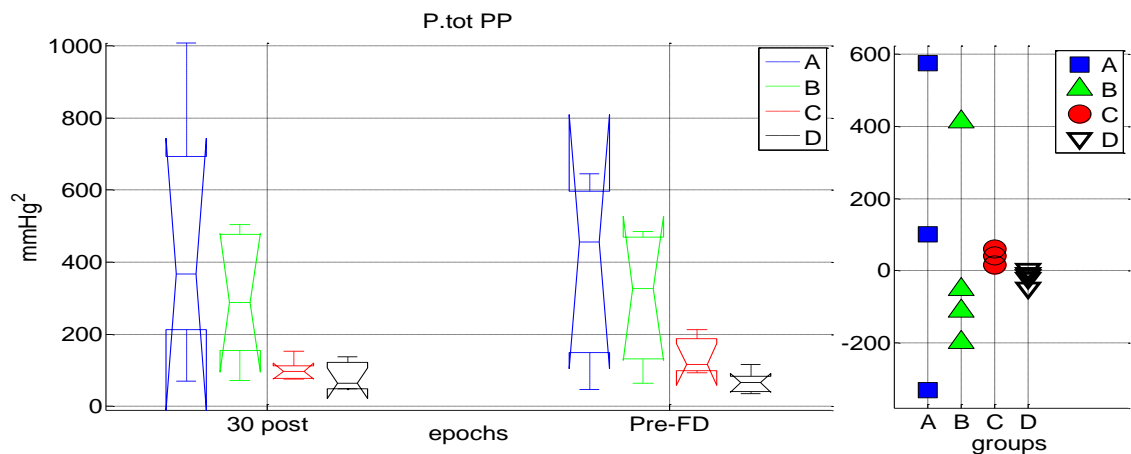


Figura 3.59 Boxplot della potenza totale dello spettro della serie PP nelle due epoche considerate per ciascuno dei quattro gruppi (sinistra) e differenza (Pre-FD. - 30' post) per ogni soggetto di ciascun gruppo (destra)

Per completezza si riportano i valori della mediana e dei percentili per ciascun gruppo nelle due epoche del parametro LF% e del rapporto LF/HF (tabella 3.22) calcolati

per la serie PP. Anche in questo caso non è emersa alcuna differenza significativa né dal confronto tra i quattro gruppi sperimentali né dal confronto tra le due epoche. Per questi parametri valgono le stesse considerazioni avanzate per quelli estratti dalla serie MAP e HP riportate in precedenza.

Tabella 3.22 Valori della mediana e dei percentili (25°, 75°) del parametro LF% e del rapporto LF/HF calcolati sullo spettro di potenza della serie PP (mmHg²) per ciascun gruppo e per ciascuna epoca considerata (30minuti dopo SAO e prima dell'evento di Fatal Pressure Drop, FDP)

	30' Post Clamp.	Pre-FPD	Delta
LF%			
Gruppo A	10.1 (9.14, 26.4)	32.7 (16.9, 47.8)	11.1 (4.76, 20.4)
Gruppo B	8.90 (3.90, 16.1)	26.1 (18.2, 49.8)	14.4 (9.54, 37.4)
Gruppo C	11.7 (8.80, 19.1)	30.5 (9.32, 66.6)	18.8 (-0.141, 51.2)
Gruppo D	23.0 (10.7, 40.1)	33.7 (20.7, 40.0)	4.54 (-9.27, 22.9)
LF/HF			
Gruppo A	0.124 (0.108, 0.509)	0.522 (0.233, 1.06)	0.363 (0.108, 0.406)
Gruppo B	0.101 (0.041, 0.194)	0.365 (0.227, 1.31)	0.187 (0.115, 1.13)
Gruppo C	0.134 (0.098, 0.243)	0.441 (0.128, 2.94)	0.307 (0.022, 2.75)
Gruppo D	0.316 (0.129, 0.675)	0.520 (0.264, 0.933)	0.071 (-0.269, 0.651)

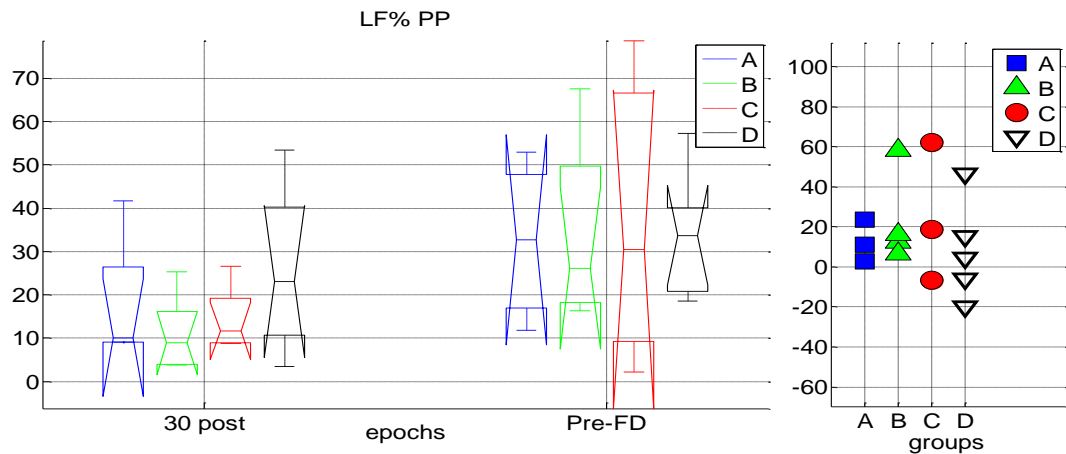


Figura 3.60 Boxplot del parametro LF% dello spettro della serie PP nelle due epoche considerate per ciascuno dei quattro gruppi (sinistra) e differenza (Pre-FD. – 30' post) per ogni soggetto di ciascun gruppo (destra)

Seguono i risultati dell'analisi spettrale della serie PP considerando la divisione dei ratti nei due macro gruppi FFPD e SFPD. Nelle tabella seguente viene riportato il valore della mediana e dei percentili (25°, 75°) di ciascun indice spettrale calcolato in questa analisi.

Nel caso della serie PP non si evidenzia nessuna differenza significativa nei valori delle potenze VLF , LF e HF né tra i due gruppi né tra le due epoche oggetto dell'analisi.

Tabella 3.23 Valori della mediana e dei percentili (25°, 75°) della potenza nelle bande VLF, LF e HF e della p. totale calcolati sullo spettro di potenza della serie PP (mmHg²) per ciascun gruppo e per ciascuna epoca considerata (30minuti dopo SAO e prima dell'evento di Fatal Pressure Drop, FDP)

	30' Post Clamp.	Pre-FPD	Delta
VLF			
FFPD	68.3 (7.80, 128)	32.3 (11.5, 115)	-27.0 (-84.2, 25.5)
SFPD	15.1 (5.92, 64.0)	11.1 (9.88, 49.3)	-0.369 (-34.2, 6.40)
LF			
FFPD	11.2 (7.19, 37.1)	114 (42.4, 226)	95.3 (32.9, 209)
SFPD	10.3 (7.83, 21.4)	14.6 (9.24, 33.6)	8.272 (-6.42, 24.3)
HF			
FFPD	60.5 (49.9, 222)	81.9 (35.7, 126)	22.1 (-84.6, 80.3)
SFPD	68.8 (52.9, 104)	52.9 (23.1, 178)	-9.67 (-41.0, 55.7)
P. totale			
FFPD	262 (74.9, 386)	286 (89.9, 470)	70.1 (-79.3, 256)
SFPD	110 (68.0, 233)	93.5 (50.7, 209)	-12.9 (-50.6, 12.9)

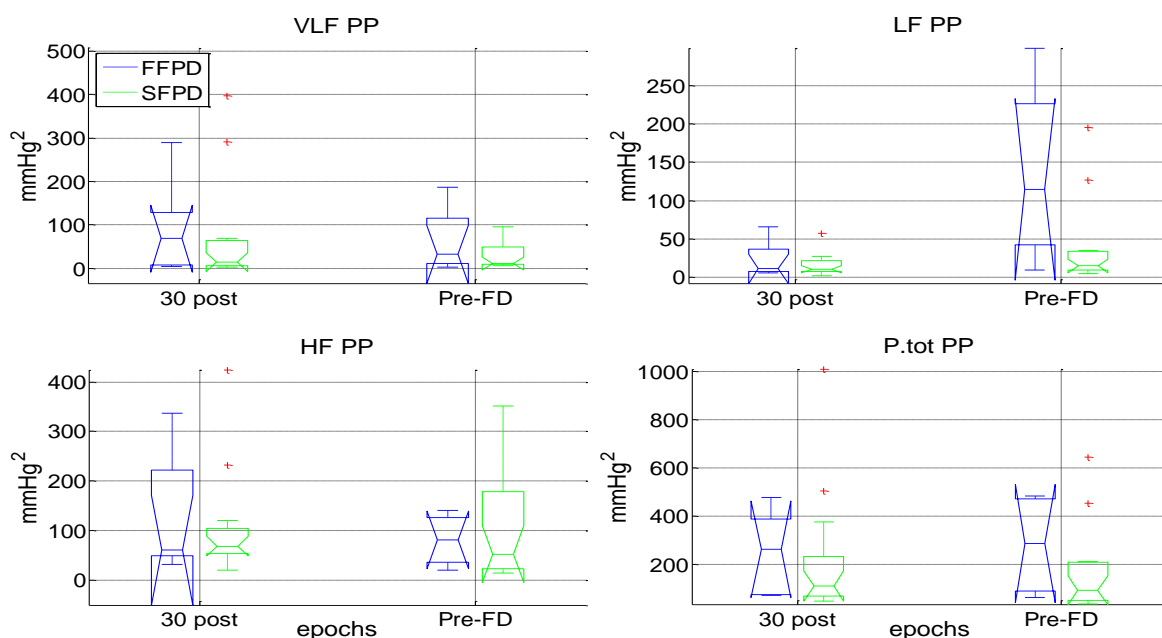


Figura 3.61 Boxplot della potenza nelle bande VLF, LF e HF e della potenza totale dello spettro della serie PP nelle due epoche considerate per ciascuno dei due gruppi.

Per completezza si riportano i risultati ottenuti dal calcolo del parametro LF% e del rapporto LF/HF (tabella 3.24) ricavati dall'analisi spettrale condotta sulla serie PP considerando la suddivisione dei ratti in FFPD e SFPD. Anche per tali parametri non si registrano differenze significative tra i due gruppi in nessuna delle due epoche analizzate. Dai confronti tra le due epoche non è emersa alcuna differenza significativa. Tuttavia, anche in questo caso, restano valide le considerazioni fatte in precedenza per quanto riguarda l'andamento generale di questi parametri nelle serie MAP e HP: sembra esserci un attivazione simpatica in risposta ad un'ischemia prolungata.

Tabella 3.24 Valori della mediana e dei percentili (25°, 75°) del parametro LF% e del rapporto LF/HF calcolati sullo spettro di potenza della serie PP (mmHg²) per ciascun gruppo e per ciascuna epoca considerata (30minuti dopo SAO e prima dell'evento di Fatal Pressure Drop, FDP)

	30' Post Clamp.	Pre-FPD	Delta
LF%			
FFPD	16.1 (7.82, 22.9)	60.1 (34.5, 73.1)	35.3 (11.7, 60.2)
SFPD	10.9 (8.83, 25.9)	30.5 (19.0, 33.4)	6.68 (-3.69, 18.2)
LF/HF			
FFPD	0.194 (0.086, 0.373)	1.69 (0.723, 2.96)	1.206 (0.260, 2.81)
SFPD	0.132 (0.100, 0.384)	0.441 (0.237, 0.521)	0.072(-0.049, 0.285)

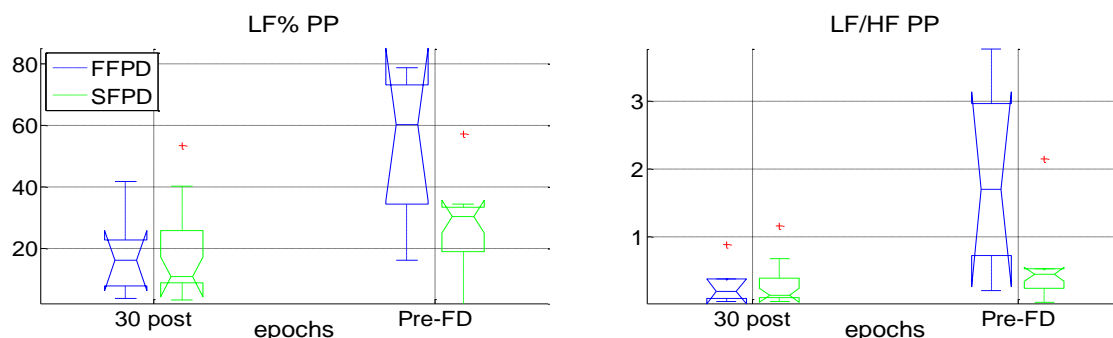


Figura 3.62 Boxplot del parametro LF% e del rapporto LF/HF dello spettro della serie PP nelle due epoche considerate per ciascuno dei due gruppi.

Aggiungiamo che l'interpretazione dei risultati ottenuti dall'analisi spettrale della serie PP risulta difficoltosa senza avere a disposizione una misura diretta dello stroke volume. Come detto in precedenza quest'ultimo ha un rapporto di proporzionalità diretta con la PP ed in questa fase avanzata dell'ischemia subisce un decremento a causa di vari fattori alcuni dei quali non sono direttamente legati al controllo nervoso.

3.5.4 Linear mixed effect model (LME)

Come spiegato nel paragrafo 2.4.2, per comprendere meglio l'evoluzione e il comportamento dei parametri LF%, HF% e del rapporto LF/HF a partire dal trentesimo minuto dopo l'occlusione delle arterie è stato utilizzato un *linear mixed effect model* che tiene conto sia degli effetti fissi, uguali per ciascun ratto di ciascun gruppo, sia degli effetti stocastici che invece variano per ogni animale.

Sono stati considerati i valori dei suddetti parametri ottenuti da spezzoni temporali delle serie MAP, HP e PP della durata di tre minuti ed è stata considerata la suddivisione dei ratti nei due gruppi, FFPD e SFPD. Come si può notare dalle figure 3.63 e 3.64, riportate di seguito, i ratti appartenenti al gruppo FFPD hanno un numero di valori inferiore per ciascun parametro poiché la durata totale della finestra di analisi è più corta.

Di seguito vengono riportati risultati dell'applicazione del LME ai parametri LF%, HF% e al rapporto LF/HF calcolati per lo spettro della serie MAP, HP e PP; Nella tabella

3.25 sono riportati i valori delle pendenze delle rette che stimano i *fixed effect* nell'andamento di ciascuno dei parametri considerati.

Tabella 3.25 pendenze delle rette che stimano i fixed effect dei due gruppi ottenute dall'applicazione del LME alle serie MAP, HP ePP per ciascuno dei parametri analizzati.

	FFPD	SFPD
MAP		
LF%	0.990	0.595
HF%	-1.01	-0.790
LF/HF	0.121	0.055
HP		
LF%	0.635	0.181
HF%	-0.637	-0.141
LF/HF	0.046	0.007
PP		
LF%	0.883	0.235
HF%	-0.811	-0.240
LF/HF	0.033	0.009

Come si osserva dalle pendenze riportate in tabella 3.25 entrambi i gruppi mostrano lo stesso comportamento per i tre parametri in tutte le serie analizzate: le LF% tendono ad aumentare mentre le HF% a diminuire di conseguenza il rapporto LF/HF tende a crescere. Questo risultato concorda con quanto è emerso dalle analisi che sono state presentate in questo capitolo. Quello che emerge chiaramente da questa analisi è che il gruppo FFPD è caratterizzato da dinamiche più veloci. Questo risultato farebbe pensare ad un meccanismo di saturazione della risposta simpatica coinvolto nel fenomeno del FFPD.

Di seguito vengono riportate delle figure esemplificative delle analisi svolte:

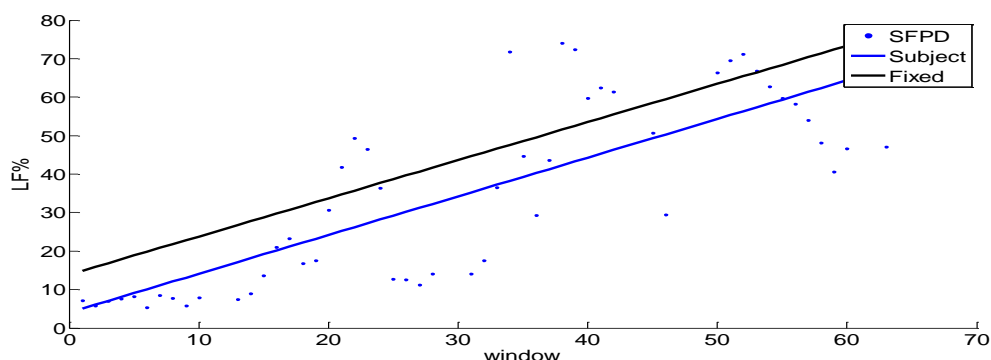


Figura 3.63 Analisi del trend del parametro LF% mediante LME Model. In nero la stima dell'effetto fisso dovuto all'appartenenza del ratto al gruppo SFPD. In blu la variabilità soggettiva dovuta al singolo ratto.

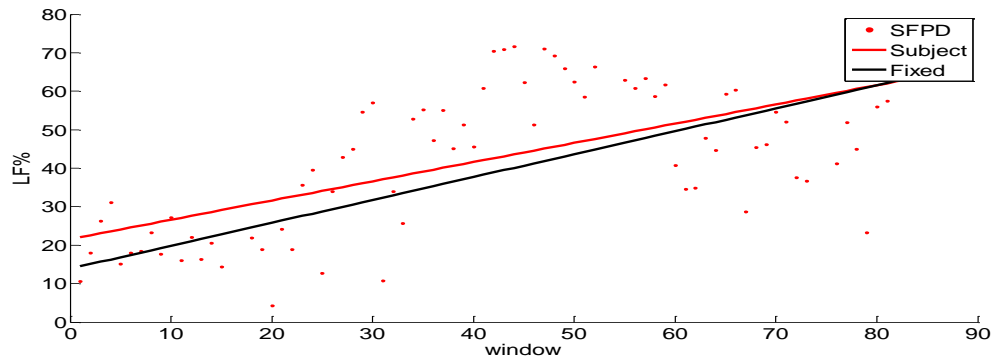


Figura 3.64 Analisi del trend del parametro LF% mediante LME Model. In nero la stima dell'effetto fisso dovuto all'appartenenza del ratto al gruppo SFPD. In blu la variabilità soggettiva dovuta al singolo ratto.

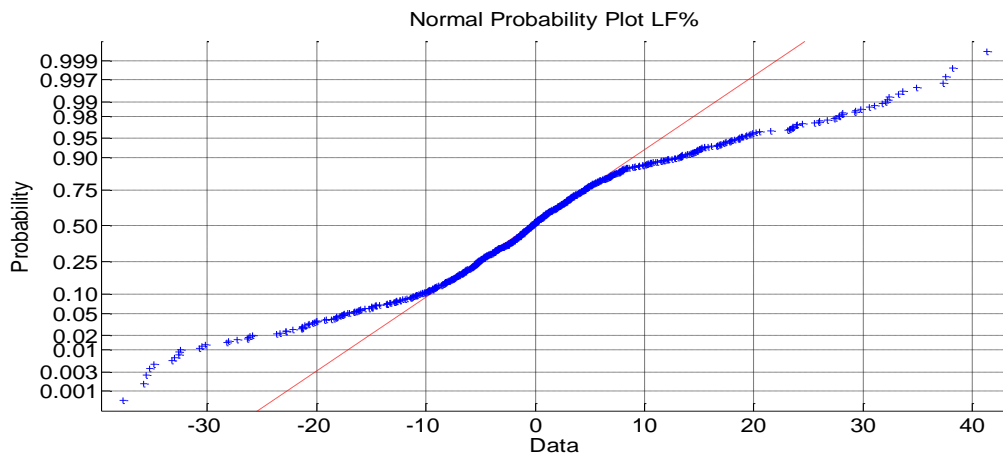


Figura 3.65 Normal Probability Plot dei residui per il parametro LF% della serie MAP. In rosso la retta che unisce il primo e terzo quartile dei dati e rappresenta una distribuzione normale teorica. In blu sono riportati i valori dei residui, ovvero le differenze tra il reale valore della sensibilità ed il valore stimato dal modello lineare. L'allontanamento dei dati dalla retta esprime un allontanamento dalla distribuzione normale.

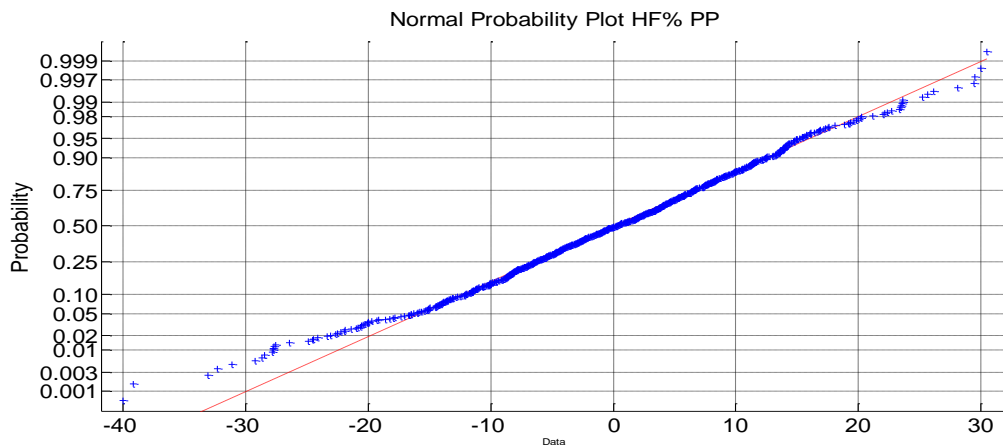


Figura 3.66 Normal Probability Plot dei residui per il parametro HF% della serie PP. In rosso la retta che unisce il primo e terzo quartile dei dati e rappresenta una distribuzione normale teorica. In blu sono riportati i valori dei residui, ovvero le differenze tra il reale valore della sensibilità ed il valore stimato dal modello lineare. L'allontanamento dei dati dalla retta esprime un allontanamento dalla distribuzione normale

3.6 Approximate Entropy

Per il calcolo dell'Approximate Entropy e della Sample Entropy è stata considerata solamente l'epoca temporale precedente all'evento di fatal pressure drop. Per l'analisi di questa fase, il cui inizio è stato assunto a partire dal momento sperimentale, definito in precedenza, è stata considerata sia la suddivisione degli animali nei quattro gruppi secondo il tipo di trattamento farmacologico ricevuto, sia la suddivisione nei due gruppi fast Fatal pressure drop (FFPD) e Slow fatal pressure drop (SFPD) secondo la durata di tale fase.

Nel seguito vengono riportati i risultati relativi al calcolo dell'ApEn e della SampEn per le serie MAP e HP.

3.6.1 Pressione media

Nelle tabelle 3.26 e 3.27 sono riportati i valori della media e della deviazione standard dell'ApEn (m, r) per ciascuno dei quattro gruppi e per ciascun valore del parametro r considerato in questa analisi.

Tabella 3.26 Valori medi e deviazioni standard dell'ApEn calcolati dalla serie MAP (mmHg) per ciascun gruppo e ciascuna epoca considerata (baseline, 30 minuti dopo SAO e nei minuti che precedono l'evento di fatal pressure drop) e per diversi valori del parametro r .

	baseline	30' post Clamp.	Pre-FD
ApEn(2, 0.1)			
Gruppo A	1.056 ± 0.318	1.223 ± 0.113	1.050 ± 0.153
Gruppo B	0.967 ± 0.277	1.113 ± 0.066	1.173 ± 0.102
Gruppo C	1.087 ± 0.087	1.081 ± 0.074	0.989 ± 0.355
Gruppo D	0.982 ± 0.127	1.115 ± 0.140	1.223 ± 0.131
ApEn (2,0.2)			
Gruppo A	0.845 ± 0.413	1.140 ± 0.077 [§]	0.780 ± 0.251
Gruppo B	0.898 ± 0.460	1.008 ± 0.278	0.949 ± 0.189
Gruppo C	0.950 ± 0.166	0.924 ± 0.125	0.903 ± 0.443
Gruppo D	0.949 ± 0.193	0.999 ± 0.200	1.058 ± 0.195

Confronti tra le diverse epoche: [§] paired t-test p-value vs. Pre-FD < 0.05.

L'unica differenza significativa che emerge dall'analisi condotta sull'Approximate Entropy della serie MAP è il decremento dell'indice ApEn nei minuti che precedono il FPD rispetto al valore 30' post per il solo gruppo A (per $r = 0.2SD$ e $0.6SD$). Anche gli altri gruppi mostrano tale decremento, sebbene questo sia meno marcato e non risulti significativo.

Tabella 3.27 Valori medi e deviazioni standard dell'ApEn calcolati dalla serie MAP (mmHg) per ciascun gruppo e ciascuna epoca considerata (baseline, 30 minuti dopo SAO e nei minuti che precedono l'evento di fatal pressure drop) e per diversi valori del parametro r.

	Baseline	30' post Clamp.	Pre-FD
ApEn (2,0.6)			
Gruppo A	0.289 ± 0.189	0.524 ± 0.157 [§]	0.278 ± 0.153
Gruppo B	0.398 ± 0.290	0.471 ± 0.292	0.374 ± 0.137
Gruppo C	0.425 ± 0.145	0.431 ± 0.096	0.406 ± 0.248
Gruppo D	0.467 ± 0.203	0.450 ± 0.162	0.408 ± 0.127
ApEn (2,0.9)			
Gruppo A	0.160 ± 0.110	0.320 ± 0.161	0.164 ± 0.093
Gruppo B	0.237 ± 0.176	0.307 ± 0.221	0.224 ± 0.097
Gruppo C	0.256 ± 0.104	0.273 ± 0.084	0.262 ± 0.171
Gruppo D	0.316 ± 0.152	0.283 ± 0.136	0.236 ± 0.084
ApEn (2,1.2)			
Gruppo A	0.099 ± 0.068	0.213 ± 0.128	0.111 ± 0.061
Gruppo B	0.151 ± 0.112	0.211 ± 0.162	0.143 ± 0.067
Gruppo C	0.158 ± 0.070	0.166 ± 0.052	0.176 ± 0.121
Gruppo D	0.234 ± 0.125	0.208 ± 0.113	0.152 ± 0.050

Confronti tra le diverse epoche: [§] paired t-test p-value vs. Pre-FD < 0.05.

Nella tabella 3.28 sono riportati i valori della media e della deviazione standard dell'indice ApEn calcolati per la serie MAP, nelle tre epoche analizzate, considerando la suddivisione dei ratti nei due gruppi FFPD e SFPD.

Tabella 3.28 Valori medi e deviazioni standard dell'ApEn calcolati dalla serie MAP(mmHg) per i gruppi FFPD e SFPD, in ciascuna epoca considerata (baseline, 30 minuti dopo SAO e nei minuti che precedono l'evento di fatal pressure drop) e per diversi valori del parametro r.

	Baseline	30' post Clamp.	Pre-FD
ApEn(2, 0.1)			
FFPD	1.058 ± 0.201 ^P	1.131 ± 0.118	1.176 ± 0.023
SFPD	1.002 ± 0.209	1.122 ± 0.106	1.103 ± 0.249
ApEn(2, 0.2)			
FFPD	0.999 ± 0.318	1.134 ± 0.221	1.038 ± 0.125
SFPD	0.890 ± 0.309	0.964 ± 0.178	0.909 ± 0.313
ApEn(2, 0.6)^{&}			
FFPD	0.468 ± 0.218	0.600 ± 0.210	0.461 ± 0.110
SFPD	0.386 ± 0.214	0.418 ± 0.161	0.348 ± 0.175
ApEn(2, 0.9)^{&}			
FFPD	0.291 ± 0.147	0.398 ± 0.170	0.295 ± 0.096
SFPD	0.239 ± 0.145	0.259 ± 0.131	0.204 ± 0.111
ApEn(2, 1.2)^{&}			
FFPD	0.186 ± 0.102	0.274 ± 0.127	0.196 ± 0.076
SFPD	0.163 ± 0.110	0.174 ± 0.103	0.132 ± 0.075

Confronti tra i diversi gruppi in ciascuna epoca : [&] 1-way ANOVA p-value <0.5 nell'epoca 30' post. Confronti tra le diverse epoche: ^P paired t-test p-value <0.05 vs. 30' post.

Dal calcolo dell'indice ApEn per la serie MAP nei gruppi FFPD e SFPD emerge un risultato interessante. Il valore di tale indice risulta significativamente superiore per il gruppo FFPD nell'epoca temporale 30' Post Clamp per valori del parametro r superiori a 0,6 SD. Un risultato simile lascia sperare che l'Approximate Entropy sia in grado di distinguere i due gruppi. e che, definendo opportune soglie, sia possibile, già trenta minuti dopo la SAO (quindi con decine di minuti di anticipo rispetto al FPD), stimare la probabilità che si verifichi un FFPD. Non si registrano differenze significative tra le varie epoche degne di nota.

3.6.2 Ciclo cardiaco

Nelle tabelle 3.29 e 3.30 sono riportati i valori della media e della deviazione standard dell'indice ApEn della serie HP nelle epoche considerate in questa analisi (baseline, finestra temporale localizzata 30 minuti dopo la SAO e minuti che precedono il FPD), per ciascuno dei quattro gruppi e per ciascun valore del parametro r considerato in questa analisi.

Tabella 3.29 Valori medi e deviazioni standard dell'ApEn calcolati dalla serie HP(msec) per ciascun gruppo e ciascuna epoca considerata (baseline, 30 minuti dopo SAO e nei minuti che precedono l'evento di fatal pressure drop) e per diversi valori del parametro $r < 0,6$.

	Baseline	30' post Clamp.	Pre-FD
ApEn(2, 0.1)*			
Gruppo A	1.031 ± 0.294	1.155 ± 0.146	1.157 ± 0.101
Gruppo B	1.151 ± 0.154	1.012 ± 0.440	0.954 ± 0.420
Gruppo C	1.113 ± 0.075	0.985 ± 0.480	0.979 ± 0.410
Gruppo D	0.883 ± 0.115 ^b	0.918 ± 0.105	0.866 ± 0.361
ApEn(2, 0.2)			
Gruppo A	1.103 ± 0.075	1.296 ± 0.159	1.287 ± 0.306
Gruppo B	1.133 ± 0.219	1.097 ± 0.481	1.091 ± 0.561
Gruppo C	1.331 ± 0.293	1.169 ± 0.570	1.221 ± 0.550
Gruppo D	1.156 ± 0.282	1.124 ± 0.245	1.084 ± 0.613

Confronti tra i diversi gruppi in ciascuna epoca : *1-way ANOVA p-value <0.01 nell'epoca di baseline, ^bpost hoc comparisons p-value<0.05 vs gruppo B.

Nel caso della serie HP si evidenziano differenze significative tra i quattro gruppi nel valore dell'indice ApEn calcolato per $r = 0.1SD$ (tabella 3.29) e per $r = 0,6SD, 0,9SD$ e $1.2SD$ (tabella 3.30) nell'epoca di baseline. Per bassi valori di soglia il gruppo D è caratterizzato da un valore di entropia inferiore agli altri tre gruppi, ma significativamente inferiore solo al gruppo B. Per valori di r superiori a 0.6 i gruppi C e D, trattati con Xilazina, mostrano un valore più alto di entropia rispetto ai gruppi A e B, che non hanno ricevuto il trattamento farmacologico.

Tabella 3.30 Valori medi e deviazioni standard dell'ApEn calcolati dalla serie HP(msec) per ciascun gruppo e ciascuna epoca considerata (baseline, 30 minuti dopo SAO e nei minuti che precedono l'evento di *fatal pressure drop*) e per diversi valori del parametro $r \geq 0,6$.

	Baseline	30' post Clamp.	Pre-FD
ApEn(2, 0.6)*			
Gruppo A	0.435 ± 0.072	0.672 ± 0.294	0.681 ± 0.256
Gruppo B	0.429 ± 0.150	0.516 ± 0.240	0.622 ± 0.362
Gruppo C	0.731 ± 0.292	0.615 ± 0.311	0.695 ± 0.337
Gruppo D	0.789 ± 0.228 ^b	0.802 ± 0.185	0.688 ± 0.411
ApEn(2, 0.9)*			
Gruppo A	0.241 ± 0.045	0.411 ± 0.209	0.437 ± 0.184
Gruppo B	0.233 ± 0.089	0.307 ± 0.160	0.432 ± 0.238
Gruppo C	0.481 ± 0.204 ^b	0.392 ± 0.206	0.448 ± 0.218
Gruppo D	0.545 ± 0.146 ^{a, b}	0.566 ± 0.115	0.466 ± 0.261
ApEn(2, 1.2)*, #			
Gruppo A	0.141 ± 0.031	0.271 ± 0.147	0.290 ± 0.123
Gruppo B	0.145 ± 0.052	0.200 ± 0.114	0.312 ± 0.169
Gruppo C	0.329 ± 0.139 ^{a, b}	0.261 ± 0.141	0.303 ± 0.149
Gruppo D	0.388 ± 0.082 ^{a, b}	0.401 ± 0.055 ^b	0.319 ± 0.172

Confronti tra i diversi gruppi in ciascuna epoca : *1-way ANOVA p-value <0.01 nell'epoca di baseline, #1-way ANOVA p-value <0.05 nell'epoca di 30'Post, ^apost hoc comparisons p-value<0.05 vs gruppo A, ^bpost hoc comparisons p-value<0.05 vs gruppo B.

Nel confronto tra le epoche temporali analizzate, non sono state riscortate variazioni significative dell'ApEn in nessuno dei quattro gruppi.

Per interpretare questi risultati bisogna prima di tutto dire che il processo in analisi non gode della proprietà di *consistency*, ovvero la proprietà generale per cui dati due segnali S e T, se $ApEn(m_1, r_1)(S) > ApEn(m_1, r_1)(T)$ allora necessariamente $ApEn(m_2, r_2)(S) > ApEn(m_2, r_2)(T)$ (Pincus, 1994 ,Richman and Moorman, 2000). Come è stato spiegato nel capitolo relativo ai Materiali ed ai Metodi, il parametro r è di fatto un filtro che definisce una soglia per l'ampiezza delle oscillazioni, abbassando la soglia si riduce l'ampiezza ammissibile delle oscillazioni. Per $r = 0,1SD$ possiamo supporre che il valore minore di entropia riscontrato per il gruppo D nell'epoca di baseline, che indica una maggiore una maggiore regolarità, dipenda dal ridotto controllo del SNA sulla variabilità cardiaca a causa del trattamento farmacologico a cui sono stati sottoposti i ratti del gruppo D, ovvero Xilazina (un simpatolitico) e Glicopirrolato (un vagolitico).

Il valore di ApEn significativamente maggiore rispetto a quello degli altri due gruppi, riscontrato nei gruppi Xyl per valori di r superiori a 0,6SD, può essere spiegato, invece, dalla maggiore irregolarità dovuta al prevalere delle alte frequenza che caratterizzano i ratti trattati con Xilazina e che per tali valori di soglia possiamo supporre influenzino maggiormente il computo dell'ApEn. Come si è detto le alte frequenze sono

legate all'attività respiratoria e possiamo ipotizzare che questo risultato sia in qualche modo dovuto all'azione del respiro sulla variabilità cardiaca.

Nella tabella 3.31 sono riportati i risultati (media \pm Dev. Std.) del calcolo dell'indice ApEn della serie HP per i due gruppi FFPD e SFPD nell'epoca di baseline, trenta minuti dopo la SAO e nei minuti precedenti l'evento di FPD. In questo caso non si osserva nessuna differenza significativa tra i due gruppi in nessuna delle epoche oggetto di questa analisi.

Tabella 3.31 Valori medi e deviazioni standard dell'ApEn calcolati dalla serie HP(msec) per i gruppi FFPD e SFPD , in ciascuna epoca considerata (baseline, 30 minuti dopo SAO e nei minuti che precedono l'evento di *fatal pressure drop*) e per diversi valori del parametro r .

	Baseline	30' post Clamp.	Pre-FD
ApEn(2, 0.1)			
FFPD	1.031 \pm 0.094 [#]	1.045 \pm 0.082 [#]	1.138 \pm 0.102
SFPD	1.001 \pm 0.173	0.880 \pm 0.349	0.897 \pm 0.392
ApEn(2, 0.2)			
FFPD	1.079 \pm 0.330	1.264 \pm 0.135	1.152 \pm 0.241
SFPD	1.064 \pm 0.276	0.994 \pm 0.405	0.992 \pm 0.518
ApEn(2, 0.6)			
FFPD	0.468 \pm 0.315	0.705 \pm 0.153	0.560 \pm 0.197
SFPD	0.555 \pm 0.312	0.561 \pm 0.307	0.545 \pm 0.344
ApEn(2, 0.9)			
FFPD	0.291 \pm 0.215	0.441 \pm 0.123	0.377 \pm 0.114
SFPD	0.346 \pm 0.217	0.367 \pm 0.221	0.344 \pm 0.221
ApEn(2, 1.2)			
FFPD	0.188 \pm 0.145	0.287 \pm 0.093	0.267 \pm 0.081
SFPD	0.239 \pm 0.154	0.250 \pm 0.158	0.230 \pm 0.148

Confronti tra le diverse epoche: [#] paired t-test p-value <0.05 vs. pre-FD.

Possiamo limitarci ad osservare che il gruppo FFPD è caratterizzato da valori dell'indice ApEn più elevati nella finestra di analisi localizzata trenta minuti dopo la SAO.

3.7 Sample Entropy

Nelle tabelle seguenti sono riportati i risultati del calcolo della Sample Entropy. Come spiegato nel paragrafo 2.5, la differenza principale tra ApEn e SampEn è che quest'ultima non conta i *self-matching*. I risultati ottenuti confermano quelli ottenuti dal calcolo dell'Approximate Entropy riportati nelle tabelle del paragrafo precedente.

3.7.1 Pressione media

Nelle tabelle (3.32 e 3.33) sono riportati i valori della media e della dev. standard dell'indice SampEn calcolato per le serie MAP di ognuno dei quattro gruppi di trattamento farmacologico in ciascuna epoca considerata in questa analisi.

Tabella 3.32 Valori medi e deviazioni standard dell'SampEn calcolati dalla serie MAP(mmHg) per ciascun gruppo e ciascuna epoca considerata (baseline, 30 minuti dopo SAO e nei minuti che precedono l'evento di *fatal pressure drop*) e per diversi valori del parametro $r < 0,6$.

	Baseline	30' post Clamp.	Pre-FD
SampEn(2, 0.1)			
Gruppo A	1.428 ± 0.554	1.777 ± 0.181 [§]	1.208 ± 0.356
Gruppo B	1.458 ± 0.723	1.552 ± 0.412	1.483 ± 0.255
Gruppo C	1.376 ± 0.243	1.360 ± 0.139	1.385 ± 0.662
Gruppo D	1.502 ± 0.459	1.555 ± 0.326	1.692 ± 0.351
SampEn (2, 0.2)			
Gruppo A	0.883 ± 0.445	1.211 ± 0.121 [§]	0.708 ± 0.303
Gruppo B	0.957 ± 0.557	1.063 ± 0.386	0.928 ± 0.220
Gruppo C	0.969 ± 0.184	0.949 ± 0.141	0.929 ± 0.497
Gruppo D	1.032 ± 0.300	1.050 ± 0.259	1.103 ± 0.238

Confronti tra le diverse epoche: [§] paired t-test p-value vs. Pre-FD < 0.05.

Tabella 3.33 Valori medi e deviazioni standard dell'SampEn calcolati dalla serie MAP(mmHg) per ciascun gruppo e ciascuna epoca considerata (baseline, 30 minuti dopo SAO e nei minuti che precedono l'evento di *fatal pressure drop*) e per diversi valori del parametro $r \geq 0,6$.

	Baseline	30' post Clamp.	Pre-FD
SampEn (2, 0.6)			
Gruppo A	0.266 ± 0.163	0.512 ± 0.150 ^P	0.202 ± 0.108
Gruppo B	0.373 ± 0.282	0.456 ± 0.306	0.324 ± 0.139
Gruppo C	0.419 ± 0.142	0.428 ± 0.105	0.402 ± 0.256
Gruppo D	0.445 ± 0.188	0.441 ± 0.165	0.387 ± 0.130
SampEn (2, 0.9)			
Gruppo A	0.146 ± 0.096	0.311 ± 0.157	0.118 ± 0.059
Gruppo B	0.216 ± 0.166	0.297 ± 0.230	0.188 ± 0.095
Gruppo C	0.245 ± 0.099	0.264 ± 0.084	0.257 ± 0.174
Gruppo D	0.306 ± 0.144	0.280 ± 0.135	0.220 ± 0.084
SampEn(2, 1.2)			
Gruppo A	0.090 ± 0.060	0.207 ± 0.125	0.081 ± 0.037
Gruppo B	0.135 ± 0.103	0.203 ± 0.166	0.118 ± 0.064
Gruppo C	0.147 ± 0.065	0.155 ± 0.053	0.170 ± 0.120
Gruppo D	0.227 ± 0.121	0.205 ± 0.111	0.141 ± 0.060

Confronti tra le diverse epoche: ^P paired t-test p-value vs. Pre-FD < 0.05.

Come per i rispettivi valori dell'indice ApEn, non si registra nessuna differenza significativa tra i due gruppi in nessuna delle epoche considerate.

Il calcolo dell'indice SampEn per la MAP dei gruppi FFPD e SFPD (tabella 3.34) conferma i risultati ottenuti dall'indice ApEn. In particolare, si registra una differenza significativa tra i gruppi FFPD e SFPD del valore di tale indice nell'epoca temporale localizzata trenta minuti dopo la SAO. In questo caso tale differenza risulta significativa per tutti i valori di r .

Tabella 3.34 valori medi e deviazioni standard dell'SampEn calcolati dalla serie MAP(mmHg) per i gruppi FFPD e SFPD, in ciascuna epoca considerata (baseline, 30 minuti dopo SAO e nei minuti che precedono l'evento di *fatal pressure drop*) e per diversi valori del parametro r .

	Baseline	30' post Clamp.	Pre-FD
SampEn(2, 0.1)^{&}			
FFPD	1.589 ± 0.513	1.759 ± 0.366	1.600 ± 0.159
SFPD	1.398 ± 0.496	1.470 ± 0.269	1.432 ± 0.482
SampEn(2, 0.2)^{&}			
FFPD	1.059 ± 0.400	1.247 ± 0.289	1.055 ± 0.145
SFPD	0.940 ± 0.372	0.992 ± 0.229	0.906 ± 0.371
SampEn(2, 0.6)^{&}			
FFPD	0.441 ± 0.218	0.599 ± 0.218	0.436 ± 0.119
SFPD	0.370 ± 0.203	0.405 ± 0.165	0.310 ± 0.181
SampEn(2, 0.9)^{&}			
FFPD	0.268 ± 0.142	0.396 ± 0.176	0.275 ± 0.100
SFPD	0.227 ± 0.139	0.250 ± 0.131	0.179 ± 0.113
SampEn(2, 1.2)			
FFPD	0.168 ± 0.095	0.269 ± 0.129	0.180 ± 0.075
SFPD	0.154 ± 0.107	0.167 ± 0.103	0.116 ± 0.076

Confronti tra i diversi gruppi in ciascuna epoca : [&] 1-way ANOVA p-value <0.5 nell'epoca 30' post

Valgono le considerazioni avanzate in merito All'indice ApEn calcolato per la serie MAP dei due macro-gruppi FFPD e SFPD sulla possibilità di riconoscere i due gruppi in base al valore di questi indici entropici..

3.7.2 Ciclo cardiaco

Nelle tabelle (3.35 e 3.36) sono riportati i valori della media e della dev. standard dell'indice SampEn calcolato per le serie HP di ognuno dei quattro gruppi di trattamento farmacologico in ciascuna epoca considerata in questa analisi.

Tabella 3.35 Valori medi e deviazioni standard dell'SampEn calcolati dalla serie HP (msec) per ciascun gruppo e ciascuna epoca considerata (baseline, 30 minuti dopo SAO e nei minuti che precedono l'evento di *fatal pressure drop*) e per diversi valori del parametro $r < 0,6$.

	Baseline	30' post Clamp.	Pre-FD
SampEn(2, 0.1)			
Gruppo A	1.331 ± 0.258	1.260 ± 0.263	1.394 ± 0.263
Gruppo B	1.343 ± 0.318	1.251 ± 0.615	1.504 ± 0.715
Gruppo C	1.716 ± 0.504	1.330 ± 0.736	1.657 ± 0.852
Gruppo D	1.250 ± 0.242	1.084 ± 0.196	1.035 ± 0.473
SampEn (2, 0.2)			
Gruppo A	0.968 ± 0.336	1.229 ± 0.210	0.904 ± 0.237
Gruppo B	0.944 ± 0.311	1.048 ± 0.481	1.115 ± 0.590
Gruppo C	1.436 ± 0.443	1.202 ± 0.604	1.314 ± 0.661
Gruppo D	1.168 ± 0.221	1.022 ± 0.230	0.958 ± 0.540

I risultati ottenuti dal calcolo dell'indice SampEn della serie HP nei quattro gruppi di trattamento farmacologico (A, B, C e D) sono assolutamente sovrapponibili a quelli ottenuti dal calcolo dell'indice ApEn. I valori dell'indice SampEn risultano significativamente differenti tra i quattro gruppi per valori di $r \geq 0,6SD$ (tabella 3.36).

Tabella 3.36 Valori medi e deviazioni standard dell'SampEn calcolati dalla serie HP (msec) per ciascun gruppo e ciascuna epoca considerata (baseline, 30 minuti dopo SAO e nei minuti che precedono l'evento di *fatal pressure drop*) e per diversi valori del parametro $r \geq 0,6$.

	Baseline	30' post Clamp.	Pre-FD
SampEn (2, 0.6)*			
Gruppo A	0.279 ± 0.111	0.599 ± 0.339	0.267 ± 0.087
Gruppo B	0.253 ± 0.118	0.441 ± 0.233	0.492 ± 0.297
Gruppo C	0.681 ± 0.316 ^{a,b}	0.535 ± 0.284	0.582 ± 0.334
Gruppo D	0.734 ± 0.168 ^{a,b}	0.672 ± 0.233	0.567 ± 0.350
SampEn (2, 0.9)*			
Gruppo A	0.152 ± 0.068	0.376 ± 0.223	0.145 ± 0.037
Gruppo B	0.135 ± 0.059	0.265 ± 0.166	0.322 ± 0.193
Gruppo C	0.427 ± 0.213 ^{a,b}	0.324 ± 0.177	0.361 ± 0.216
Gruppo D	0.475 ± 0.119 ^{a,b}	0.468 ± 0.173	0.365 ± 0.207
SampEn(2, 1.2)*			
Gruppo A	0.090 ± 0.032	0.236 ± 0.153	0.095 ± 0.014
Gruppo B	0.083 ± 0.034	0.172 ± 0.119	0.220 ± 0.134
Gruppo C	0.289 ± 0.143 ^{a,b}	0.207 ± 0.118	0.241 ± 0.145
Gruppo D	0.330 ± 0.075 ^{a,b}	0.333 ± 0.124	0.246 ± 0.133

Confronti tra i diversi gruppi in ciascuna epoca: *1-way ANOVA p-value <0.01 nell'epoca di baseline, ^apost hoc comparisons p-value <0.05 vs gruppo A, ^bpost hoc comparisons p-value <0.05 vs gruppo B.

Il calcolo della SampEn per la serie HP (tabella 3.37) considerando la suddivisione dei ratti nei due macrogruppi FFPD e SFPD non ha prodotto risultati significativi.

Tabella 3.37 valori medi e deviazioni standard dell'SampEn calcolati dalla serie HP (msec) per i gruppi FFPD e SFPD, in ciascuna epoca considerata (baseline, 30 minuti dopo SAO e nei minuti che precedono l'evento di *fatal pressure drop*) e per diversi valori del parametro r .

	Baseline	30' post Clamp.	Pre-FD
SampEn(2, 0.1)			
FFPD	1.464 ± 0.566	1.513 ± 0.396 [#]	1.665 ± 0.312
SFPD	1.388 ± 0.307	1.127 ± 0.495	1.294 ± 0.726
SampEn(2, 0.2)			
FFPD	1.143 ± 0.463	1.338 ± 0.214	1.212 ± 0.278
SFPD	1.134 ± 0.346	1.032 ± 0.434	1.041 ± 0.614
SampEn(2, 0.6)			
FFPD	0.423 ± 0.285	0.647 ± 0.149	0.498 ± 0.163
SFPD	0.532 ± 0.300	0.528 ± 0.289	0.499 ± 0.340
SampEn(2, 0.9)			
FFPD	0.259 ± 0.189	0.400 ± 0.119	0.323 ± 0.091
SFPD	0.327 ± 0.208	0.343 ± 0.206	0.312 ± 0.218
SampEn(2, 1.2)			
FFPD	0.164 ± 0.127	0.259 ± 0.086	0.221 ± 0.064
SFPD	0.222 ± 0.145	0.232 ± 0.149	0.209 ± 0.146

Confronti tra le diverse epoche: [#] paired t-test p-value <0.05 vs. pre-FD

3.8 Corrected Conditional Entropy

La conditional entropy (CE) è stata calcolata secondo l'algoritmo che utilizza la correzione proposta da Porta et al. (1998), descritto nel paragrafo 2.6 del capitolo relativo ai Materiali e ai Metodi. Il calcolo è stato effettuato su finestre temporali di tre minuti (circa 890 punti) nella fase del protocollo compresa tra il trentesimo minuto dopo la SAO e precedente al FPD, ovvero le stesse finestre temporali utilizzate per il calcolo dell'ApEn e della SampEn e per le analisi nel dominio del tempo e in quello della frequenza. Anche in questo caso è stata considerata sia la divisione dei ratti basata sui differenti tipi di trattamento farmacologico sia quella basata sul tipo di FPD.

A differenza dell'ApEn, la CCE non impone di decidere a priori la dimensione m di embedding. L'algoritmo calcola la Conditional Entropy per diversi valori di m e sceglie la dimensione di embedding corrispondente al valore di CE minimo. Nel nostro caso la CE è stata calcolata per m compreso tra 1 e 10. Si è osservato che la dimensione di embedding a cui corrisponde il valore minimo della CE è compresa tra 2 e 9 per la serie MAP e tra 3 e 6 per la serie HP.

3.8.1 Pressione media

La tabella 3.38 riporta per ciascun gruppo e ciascuna epoca la dimensione m media a cui corrisponde il minimo della CE calcolato dalla serie MAP. La tabella 3.39 riporta il valore medio della CCE calcolato per ciascun gruppo ed in ciascuna epoca considerata per la serie MAP.

Tabella 3.38 valori medi e deviazioni standard della dimensione di embedding m a cui corrisponde il minimo della CE calcolata dalla serie MAP (mmHg) per ciascun gruppo e ciascuna epoca considerata (baseline, 30 minuti dopo SAO e nei minuti che precedono l'evento di fatal pressure drop).

	baseline	30'post Clamp.	Pre-FD
Gruppo A	4.0 ± 1.41	5.5 ± 0.58	5.0 ± 0.82
Gruppo B	4.3 ± 1.38	5.4 ± 1.72	4.4 ± 1.27
Gruppo C	5.7 ± 0.82	6.8 ± 0.98	5.2 ± 1.60
Gruppo D	5.3 ± 0.49	5.4 ± 0.98	5.4 ± 0.98

Tabella 3.39 valori medi e deviazioni standard della CCE calcolati dalla serie MAP (mmHg) per ciascun gruppo e ciascuna epoca considerata (baseline, 30 minuti dopo SAO e nei minuti che precedono l'evento di fatal pressure drop).

	baseline	30'post Clamp.	Pre-FD
Gruppo A	0.412 ± 0.159	0.413 ± 0.063	0.407 ± 0.112
Gruppo B	0.431 ± 0.162	0.392 ± 0.117	0.451 ± 0.091
Gruppo C	0.353 ± 0.073	0.339 ± 0.042	0.391 ± 0.129
Gruppo D	0.399 ± 0.135	0.402 ± 0.142	0.430 ± 0.066

La tabella 3.40 riporta i valori medi e quelli della deviazione standard della CE calcolata per la serie MAP dei gruppi FFPD e SFPD in ciascuna epoca considerata.

Tabella 3.40 valori medi e deviazioni standard della CCE calcolati dalla serie MAP (mmHg) per i gruppi FFPD e SFPD in ciascuna epoca considerata (baseline, 30 minuti dopo SAO e nei minuti che precedono l'evento di fatal pressure drop).

	baseline	30'post Calmp.	Pre-FD
FFPD	0.462 ± 0.125	0.437 ± 0.094	0.474 ± 0.079
SFPD	0.378 ± 0.128	0.368 ± 0.102	0.405 ± 0.096

L'analisi statistica condotta sui valori dell'indice CE per la serie MAP, diversamente da quanto osservato per l'indice ApEn, non ha prodotto nessun risultato significativo per quanto riguarda le differenze tra i due gruppi. Si noti, comunque, che il gruppo FFPD è caratterizzato da valori di entropia più elevati, coerentemente con il

risultato del calcolo dell' ApEn. Probabilmente, scegliendo opportunamente il valore di ξ , anche la CE sarebbe in grado di distinguere i due gruppi.

3.8.2 Ciclo cardiaco

Nelle tabelle seguenti sono riportati i risultati ottenuti dal calcolo della CCE per la serie battito-battito HR. La tabella 3.41 riporta la dimensione di embedding m media per ciascun gruppo in ciascuna epoca considerata. La tabella 3.41 riporta il valore medio della CE calcolato per ciascun gruppo ed in ciascuna epoca considerata secondo l'algoritmo corretto (CCE).

Tabella 3.41 valori medi e deviazioni standard della dimensione di embedding m a cui corrisponde il minimo della CE calcolata dalla serie HP (msec) per ciascun gruppo e ciascuna epoca considerata (baseline, 30 minuti dopo SAO e nei minuti che precedono l'evento di fatal pressure drop).

	baseline	30'post Clamp.	Pre-FD
Gruppo A	3.8 ± 0.50	5.0 ± 1.41	4.8 ± 0.50
Gruppo B	4.4 ± 0.98	4.1 ± 1.07	4.4 ± 1.13
Gruppo C	5.8 ± 1.72	4.2 ± 0.41	4.5 ± 0.84
Gruppo D	5.0 ± 0.58	5.1 ± 1.21	4.9 ± 0.38

Tabella 3.42 valori medi e deviazioni standard dea CCE calcolati dalla serie HP (msec) per ciascun gruppo e ciascuna epoca considerata (baseline, 30 minuti dopo SAO e nei minuti che precedono l'evento di fatal pressure drop).

	Baseline*	30'post Clamp.	Pre-FD
Gruppo A	0.437 ± 0.043	0.493 ± 0.114	0.425 ± 0.025
Gruppo B	0.391 ± 0.081	0.440 ± 0.063	0.504 ± 0.121
Gruppo C	0.623 ± 0.153 ^{a, b}	0.548 ± 0.191	0.578 ± 0.234
Gruppo D	0.597 ± 0.138 ^{a, b}	0.564 ± 0.183	0.507 ± 0.237

Confronti tra i diversi gruppi in ciascuna epoca : *1-way ANOVA p-value <0.01 nell'epoca di baseline , ^apost hoc comparisons p-value<0.05 vs gruppo A, ^bpost hoc comparisons p-value<0.05 vs gruppo B.

un risultato interessante che emerge dal calcolo della CE per le serie HP: i ratti trattati con Xilazina, come osservato anche per l'indice ApEn, nella fase di baseline hanno un valore di entropia significativamente maggiore rispetto a quelli non trattati. Tale differenza, probabilmente a causa degli effetti della manovra di occlusione e del progredire della condizione di shock circolatorio, diventa meno visibile nelle epoche successive. Si noti, inoltre, che la dimensione media di embedding dei ratti dei gruppi *Xyl* è maggiore di quella dei gruppi *NoXyl* nell'epoca di baseline.

Anche questo risultato è spiegato dal fatto che le serie HP dei ratti trattati con Xilazina sono caratterizzate da un'irregolarità maggiore dovuta al prevalere delle alte. Possiamo supporre che per il valore di ξ , scelto (ricordiamo che ξ , come il parametro r per l'ApEn, costituisce un filtro che definisce l'ampiezza delle oscillazioni ammissibili) tali frequenze influenzino maggiormente il computo della CE.

La tabella 3.36 riporta i valori medi e quelli della deviazione standard della CE calcolata per la serie HP nei gruppi FFPD e SFPD in ciascuna epoca considerata.

Tabella 3.43 valori medi e deviazioni standard della CCE calcolati dalla serie HP (mmHg) per i gruppi FFPD e SFPD in ciascuna epoca considerata (baseline, 30 minuti dopo SAO e nei minuti che precedono l'evento di fatal pressure drop).

	baseline	30' post Clamp.	Pre-FD
FFPD	0.512 ± 0.194	0.593 ± 0.110	0.562 ± 0.121
SFPD	0.518 ± 0.141	0.485 ± 0.153	0.493 ± 0.197

Dal confronto dei valori della CE tra i due gruppi, FFPD e SFPD e tra le diverse epoche, non emerge alcuna differenza significativa.

Capitolo 4

Discussione e conclusioni

4.1 Analisi della manovra di occlusione nel dominio del tempo

L'effetto immediato della SAO consiste in un repentino innalzamento dei valori della pressione media (figura 2.8) e dei valori di frequenza cardiaca (figura 2.9). In seguito a tale evento, mentre i valori della pressione media rimangono significativamente più elevati, i valori della frequenza cardiaca tornano ad un livello paragonabile a quello precedente all'occlusione delle arterie. Nel seguito, discutiamo nel dettaglio i più importanti risultati nel dominio del tempo e della frequenza, secondo i vari approcci adottati per lo studio dell'esperimento.

4.1.1. Pressione media

Prima della SAO i ratti che non hanno ricevuto il trattamento farmacologico con Xilazina mostrano valori di pressione media maggiori dei ratti che hanno ricevuto tale trattamento farmacologico. In particolare, la pressione media è compresa tra 82 e 107 mmHg per i gruppi NoXyl e tra 71 e 87 mmHg per i gruppi Xyl. I valori trovati risultano coerenti con i dati riportati in letteratura (Davis e Morris, 1993; Olfert et al. 1993 e Julien

et al., 1995). L'abbassamento di pressione arteriosa che si riscontra nei topi trattati con Xilazina è compatibile con gli effetti della somministrazione di sostanze antagoniste dei recettori adrenergici di tipo α_2 sull'apparato cardiocircolatorio (Klide et al., 1975; Hsu et al., 1985).

Come è stato detto, la SAO induce un innalzamento dei valori della pressione media in tutti e quattro i gruppi di trattamento farmacologico. Il valore massimo ed il valore di pressione media raggiunto dopo l'esaurimento degli effetti transitori indotti dalla manovra stessa sembrano non dipendere dal differente tipo di trattamento farmacologico a cui i quattro gruppi sperimentali sono stati sottoposti (122-144 mmHg per i gruppi NoXyl vs. 127-157 mmHg per i gruppi Xyl, non significativo). Possiamo spiegare questo allineamento dei valori della pressione media tramite la seguente ipotesi. L'innalzamento che si registra subito dopo la manovra di occlusione delle arterie splanchniche, che blocca la circolazione arteriosa addominale, non dipende dall'attivazione simpatica ma è dovuto principalmente a due cause: (i) l'effetto emodinamico della redistribuzione del flusso sanguigno da circuiti a bassa resistenza, come la circolazione arteriosa addominale, a circuiti ad alta resistenza e (ii) l'aumento del volume di sangue circolante causato dallo svuotamento passivo dei vasi capacitivi della regione splanchnica ad opera del ritorno venoso (Huang, e Longhurst, 1994). Quest'ultimo fenomeno provoca un incremento del precarico del cuore e dunque, per effetto del meccanismo di Frank-Starling, incrementa anche la gittata cardiaca e di conseguenza, la pressione arteriosa. Ciò spiegherebbe anche l'aumento della frequenza cardiaca che si osserva immediatamente dopo la SAO.

Inoltre, negli animali dei gruppi Xyl il mantenimento di valori di pressione media simili a quelli dei gruppi non trattati, anche dopo che gli effetti transitori dovuti alla manovra sono esauriti, è dovuto al fatto che esiste ancora una risposta simpatica residua. Infatti, il dosaggio di Xilazina che viene utilizzato in questo studio (4 mg/kg) non è sufficiente per indurre un blocco simpatico totale: l'effetto simpaticolitico del Rompun, nome commerciale di un farmaco della Bayer corrispondente al principio attivo della Xilazina, si stima che sia completo nel ratto per dosaggi compresi fra 10 e 15 mg/kg. Pertanto, in presenza di uno stimolo simpatico, dovuto all'insorgere di uno stato ischemico, e di un blocco simpatico non completo, dovuto al ridotto dosaggio di Xilazina, è presumibile che vi sia una responsività residua del sistema simpatico e che questa prevalga rispetto all'effetto inibitore del farmaco.

4.1.2 Frequenza cardiaca

Prima della SAO i ratti che hanno ricevuto il trattamento farmacologico con Xilazina mostrano una discreta bradicardia. La frequenza cardiaca è compresa tra 302 e 380 bpm per i gruppi NoXyl e tra 217 e 267 bpm per i gruppi Xyl. Anche in questo caso i valori trovati risultano compatibili con i dati riportati in letteratura (Davis e Morris, 1993; Olfert et al. 1993 e Julien et al., 1995).

Come anticipato, la SAO induce un brusco decremento della durata del ciclo cardiaco, determinando un aumento transitorio della frequenza cardiaca in tutti e quattro i gruppi. A differenza di quanto avviene per la pressione media però, esauriti gli effetti transitori della manovra di occlusione delle arterie splanchniche, la frequenza cardiaca in tutti e quattro i gruppi ritorna ad un valore che non risulta significativamente differente da quello precedente alla SAO. Inoltre i valori di frequenza cardiaca dei gruppi Xyl, esaurito il transitorio suddetto, risultano ancora significativamente inferiori a quelli dei gruppi non trattati con Xilazina (figura 3.16). Questo risultato sembra confermare l'ipotesi esposta precedentemente circa le cause del repentino aumento di pressione media e inoltre suggerisce che il trattamento farmacologico con Xilazina ha un effetto più evidente sulla frequenza cardiaca rispetto a quello sulla pressione arteriosa.

Volendo analizzare nel dettaglio l'effetto dei diversi trattamenti farmacologici, possiamo dire che:

(i) la somministrazione di Glicopirrolato nel gruppo D ha mostrato effetti sui valori della frequenza cardiaca (e in maniera ridotta anche sui valori della pressione media). Sono stati registrati, dopo il transitorio successivo all'occlusione arteriosa, valori di frequenza cardiaca (224-308 bpm) maggiori rispetto a quelli dei ratti del gruppo C, cioè gli animali trattati con Xilazina ma non trattati con vagolitico (185-275 bpm)

(ii) come anticipato nel secondo capitolo, non vi sono in letteratura prove definitive a sostegno di un'azione vagotonica del glucosio sull'apparato cardiocircolatorio; per i ratti non trattati con Xilazina ed a cui è stato somministrato glucosio, (gruppo A) non si sono registrati, né in questa fase del protocollo né in quelle seguenti, valori di pressione media, frequenza cardiaca e pressione pulsatoria dissimili da quelli del gruppo B a cui non era stato somministrato glucosio

4.1.3 Pressione pulsatoria

La pressione pulsatoria presenta un comportamento analogo in tutti e quattro i gruppi indipendentemente dal diverso tipo di trattamento farmacologico ricevuto. I valori

della PP dei gruppi Xyl risultano simili sia prima che dopo la manovra di occlusione a quelli dei gruppi non trattati con Xilazina. Si registra un aumento del valore medio della PP per tutti e quattro i gruppi in seguito alla SAO (figura 3.17). Secondo il modello WindKessel della circolazione, la pressione pulsatoria dipende principalmente dal rapporto tra due fattori: (i) lo stroke volume e (ii) la compliance delle grandi arterie elastiche (aorta, carotidi, succlavia e arterie polmonari in primis). Possiamo supporre che, per le scale temporali oggetto di questa analisi, il secondo fattore sia costante. Dunque, esiste una proporzionalità diretta tra PP e stroke volume per cui un aumento della PP è imputabile ad un aumento della gittata cardiaca. Quest'ultimo, come è stato detto precedentemente, in questa fase del protocollo, è dovuto principalmente ad un aumento del ritorno venoso al cuore che attiva il meccanismo di Frank-Starling.

4.2. Analisi della manovra di occlusione nel dominio delle frequenze

Prima di discutere i risultati dell'analisi in frequenza condotta nei minuti successivi alla SAO bisogna ricordare che il fronte di salita della pressione media non è stato analizzato in quanto, a causa degli effetti transitori e degli artefatti dovuti alla della manovra di occlusione stessa, vengono meno i presupposti di linearità e stazionarietà che sono necessari per applicare i metodi di analisi in frequenza utilizzati in questo lavoro di tesi. Inoltre, come ipotizzabile, la SAO ha un impatto molto forte sul sistema cardiovascolare e, con il progredire dello stato di shock circolatorio e dell'ischemia intestinale, sono stati osservati, in taluni casi, alterazioni del ritmo cardiaco e fenomeni di instabilità emodinamica come i drop and recovery. Pertanto i risultati dell'analisi in frequenza in quest'epoca del protocollo, e delle successive, sono caratterizzati da una grande variabilità intra e intersoggettiva.

Nella maggior parte dei casi, salvo alcune eccezioni che sono state dette nel capitolo precedente, i valori delle potenze allocate nelle bande VLF, LF e HF ottenuti dall'analisi in frequenza delle serie MAP, HP e PP sono risultati coerenti con quelli riportati in letteratura (Japundzic, 1990; Cerutti C, 1991; Julien, 1995).

4.2.1 Pressione media

Dai risultati ottenuti dall'analisi in frequenza della serie MAP nella finestra di baseline, precedente alla SAO, è emerso che i gruppi NoXyl mostrano valori di potenza allocata nelle bande LF e VLF significativamente più alti di quelli dei gruppi Xyl ($p < 0.01$). Tutti e quattro i gruppi, invece, mostrano valori di potenza nella banda HF che non

risultano differenti tra loro. Inoltre, i valori della potenza totale sono significativamente più bassi per i ratti che hanno ricevuto il trattamento farmacologico con Xilazina. Questo quadro è totalmente compatibile con l'effetto di depressione dell'attività simpatica indotta dalla Xilazina nei gruppi C e D. Dall'analisi del parametro LF%, e del rapporto LF/HF emerge ancora più chiaramente quanto appena affermato: il tono simpatico nei gruppi Xyl risulta fortemente depresso (tabella 3.6 e figura 3.22).

Compatibilmente con l'ipotesi avanzata nel paragrafo precedente circa le cause dell'aumento di pressione che segue la SAO, dall'analisi in frequenza della serie MAP nei minuti successivi alla SAO non si osserva un aumento della potenza allocata nella banda LF, che ricordiamo essere associata all'attività del sistema simpatico. Al contrario, sembrerebbe, che la maggior parte dei ratti dei gruppi A e B risponda alla manovra con un decremento della potenza in questa banda. Parallelamente, si registra un aumento significativo della potenza allocata nella banda HF per i gruppi B e C ($p < 0.05$), (ricordiamo che il primo non ha ricevuto né Xilazina né glucosio intraddominale mentre il secondo è stato sottoposto ad entrambi i trattamenti); anche gli altri due gruppi seguono lo stesso andamento, sebbene i loro incrementi non risultino significativi. Come è stato detto nel capitolo introduttivo, qualsiasi azione vagale non ha un effetto diretto sulla pressione è possibile, dunque, che l'aumento della potenza integrale nella banda HF, in questo caso, possa riflettere un decremento del tono simpatico e la compensazione da parte del vago.

In questo caso gli andamenti del parametro percettuale LF% e del rapporto LF/HF, che risultano più omogenei all'interno dei singoli gruppi, contribuiscono a spiegare meglio la situazione. Si osserva chiaramente un decremento della potenza percentuale nella banda LF rispetto all'epoca di baseline. Tale andamento è particolarmente visibile nei gruppi NoXyl, ma risulta significativo ($p < 0.01$) solamente per il gruppo B. Il decremento del parametro LF% nei gruppi Xyl risulta meno evidente, tale comportamento potrebbe essere giustificato dal fatto che il tono simpatico, già depresso dall'azione della Xilazina, non può subire un'ulteriore riduzione (figura 3.22).

4.2.2 Ciclo cardiaco

Dall'analisi della serie HP nell'epoca di baseline emerge una situazione meno chiara di quella osservata per gli indici spettrali ricavati dalla serie MAP: i valori di potenza allocati nelle bande VLF e LF non differiscono significativamente tra i quattro gruppi; invece, si osserva che i gruppi Xyl hanno valori di potenza nella banda HF significativamente superiori a quelli dei gruppi non trattati ($p < 0.01$). I valori della potenza

totale risultano simili per i quattro gruppi di trattamento farmacologico. Questo risultato potrebbe essere spiegato dal fatto che l'innervazione parasimpatica raggiunge il cuore ma non i vasi, pertanto, uno scompenso della bilancia simpato-vagale, dovuta ad una depressione del tono simpatico indotta dalla Xilazina, si traduce, nel caso della serie HPn dei ratti Xyl, in un incremento delle frequenze associate all'attività del sistema nervoso parasimpatico ed al respiro. Al contrario, tale incremento non si verifica per lo spettro di potenza della pressione media sulla quale predomina, invece, il controllo simpatico e lo sbilanciamento simpatovagale si traduce in una depressione delle basse frequenze associate, appunto, al sistema simpatico. Il parametro LF%, e il rapporto LF/HF calcolati per la serie HP (tabella 3.8) evidenziano chiaramente ed in modo significativo lo scompenso della bilancia simpatovagale nei gruppi di ratti che hanno ricevuto la Xilazina.

Come è stato detto nel capitolo relativo ai Materiali e Metodi introducendo l'analisi in frequenza condotta sulla serie HP nell'epoca successiva alla SAO, una frazione considerevole dei ratti appratenti al gruppo C ha mostrato, in seguito alla manovra di occlusione, marcate alterazioni del ritmo cardiaco e possibili alterazioni della frequenza respiratoria. Simili alterazioni modificano la morfologia dello spettro inficiando il risultato della stima spettrale. In particolare, si è riscontrata una tendenza del picco ad alta frequenza a scivolare verso il limite di banda fra le basse e le alte frequenze, che si può supporre sia legato al rallentamento della frequenza respiratoria, pertanto la stima delle potenze allocate nelle varie bande potrebbe risultare non corretta e si è scelto di escludere il gruppo C dai confronti statistici condotti per quest'epoca temporale.

Nonostante questa limitazione, dall'analisi in frequenza del periodo cardiaco emergono alcuni risultati interessanti. I gruppi NoXyl fanno registrare un decremento della potenza allocata nella banda LF in seguito alla SAO che, tuttavia è molto ridotto e non risulta significativo; per il gruppo D non si registra, invece, alcuna variazione. Questo risultato concorda con quanto emerso dall'analisi temporale della frequenza cardiaca: esauriti gli effetti transitori della manovra di occlusione, la frequenza cardiaca in tutti e quattro i gruppi ritorna ad un valore che non risulta significativamente differente da quello precedente alla SAO.

Quanto alle alterazioni del ritmo e della frequenza cardiaca riscontrate nel gruppo C possiamo fare alcune considerazioni:

(i) Negli animali del gruppo D, che oltre alla Xilazina hanno ricevuto il Glicopirrolato, non si osservano, in questa fase del protocollo, alterazioni del ritmo cardiaco simili a quelle che individuate nel gruppo C.

(ii) Il gruppo C è l'unico dei quattro gruppi in cui, esauriti gli effetti transitori dovuti alla SAO, la frequenza cardiaca mostra un decremento.

(iii) Sebbene tale decremento non sia risultato significativo, le considerazioni (i) e (ii) ci portano ad ipotizzare che le alterazioni del ritmo cardiaco e le possibili alterazioni della frequenza respiratoria riscontrate nel gruppo C in questa fase del protocollo siano associate a degli scompensi della bilancia simpato-vagale, in particolare ad un attivazione del sistema parasimpatico non compensata dall'attività del sistema simpatico depressa dal trattamento farmacologico con Xilazina.

4.2.3 Pressione pulsatoria

Dall'analisi statistica condotta sulle potenze allocate nelle bande VLF, LF e HF dello spettro della pressione pulsatoria e da quella dei parametri LF% e LF/HF (figure 3.33 e 3.34) ricavati nella fase di baseline emerge un quadro simile a quello descritto per il periodo cardiaco. In particolare, il valore della potenza allocata nelle alte frequenze risulta significativamente maggiore nei gruppi Xyl rispetto ai gruppi non trattati con Xilazina. In questo caso, i valori osservati nei gruppi Xyl gruppi non possono essere spiegati come un effetto diretto dell'attività parasimpatica sulla PP; tali valori potrebbero essere associati, invece, agli effetti meccanici dovuti all'attività respiratoria che, come è stato visto nel paragrafo 3.1.2, influenzano maggiormente gli indici spettrali della pressione pulsatoria ed, invece, sono meno evidenti su quelli della pressione media (Japundzic, 1990).

In particolare, i movimenti dovuti alla respirazione hanno un effetto diretto sullo stroke volume, che, come abbiamo detto, insieme alla compliance delle grandi arterie elastiche, determina la PP. Nel caso degli indici spettrali della PP, un aumento delle alte frequenze riflette l'influenza meccanica diretta del respiro sulla pressione e l'effetto dell'aritmia sinusale respiratoria, mediato dal sistema vagale, sulla frequenza cardiaca, la quale si riflette a sua volta sulla pressione.

Dal confronto tra le due epoche, emerge che i valori della potenza allocata nella banda LF sembrano, sostanzialmente, non risentire dell'effetto della SAO (solamente il gruppo C a far registrare un aumento significativo di tale parametro). Al contrario, anche se non sono state riscontrate differenze significative nel confronto tra le due epoche, i valori della potenza nella banda HF crescono in tutti i soggetti eccezion fatta per quelli del gruppo D (trattati anche con il Glicopirrolato, un vagolitico) che, invece, fanno registrare un decremento significativo di tale indice. In base alle considerazioni espresse in precedenza, possiamo dire che questo quadro riflette l'azione del respiro sulla circolazione

mediata dal sistema vagale, la quale tenta di contrastare l'aumento pressorio imposto dalla SAO. Sarebbe utile disporre di una misurazione diretta dell'attività respiratoria per confermare o smentire quanto appena affermato.

4.3 Evoluzione verso il collasso: analisi nel dominio del tempo

Tutti gli animali mostrano un comportamento analogo, dopo un repentino aumento di pressione che segue la SAO, di cui si è discusso nei paragrafi precedenti, i valori di pressione media decrescono progressivamente sinché o (i) si verifica un FFPD (figura 2.1) oppure (ii) la pressione continua ad abbassarsi sino a raggiungere un livello critico, evolvendo in entrambi i casi verso una condizione che produce la morte dell'animale (SFPD, figura 2.2). Come spiegato nel capitolo relativo ai Materiali e Metodi, per studiare l'evoluzione verso il collasso è stata considerata una finestra temporale compresa tra il trentesimo minuto dopo la SAO e la nota che individua il FPD.

4.3.1 Pressione media

I valori di pressione media dei quattro gruppi, sia all'inizio che alla fine della finestra temporale considerata, mostrano che le differenze osservate nella fase precedente alla SAO risultano ridotte, sebbene i gruppi Xyl denotino ancora valori inferiori rispetto a quelli dei gruppi non trattati con Xilazina (109-137 mmHg nei gruppi NoXyl vs. 91-128 mmHg nei gruppi Xyl trenta minuti dopo la SAO, $p < 0.05$; 72-115 mmHg gruppi NoXyl vs. 66-101 mmHg gruppi Xyl nei minuti che precedono il FPD, non significativo). Quanto osservato conferma l'ipotesi che il dosaggio di Xilazina utilizzato non induce un blocco completo dell'attività simpatica ed indica che il suo effetto sulla pressione media diventa meno marcato con il trascorrere dei minuti. Si osserva inoltre che tutti i gruppi, indipendentemente dal trattamento farmacologico, subiscono un progressivo e significativo ($p < 0.05$) decremento della pressione media sino ad un livello critico che segna l'evento di FPD (figura 3.35). Questo andamento è compatibile con il progredire dello stato di shock circolatorio e dell'ischemia intestinale, come descritto nel capitolo introduttivo di questo lavoro di tesi.

4.3.2 Ciclo cardiaco

Per quanto riguarda i valori medi della frequenza cardiaca nella suddetta finestra di analisi, si osserva che i gruppi trattati con Xilazina sono caratterizzati da una marcata bradicardia sia all'inizio che alla fine di tale finestra (181-290 bpm). La frequenza

cardiaca per i gruppi NoXyl risulta significativamente più elevata (239-377 mmHg); la maggior parte dei ratti appartenenti ai gruppi A e B hanno valori di frequenza che rientrano negli intervalli di normalità (tabella 2.2), ma sono stati individuati alcuni ratti che sviluppano una marcata tachicardia nella fase che precede il FPD. Per quanto riguarda le aritmie cardiache, che si presentano in questa fase del protocollo, si ricordino anche gli episodi di bradicardia, associati ai drop and recovery della MAP riscontrati in diversi animali, indipendentemente dal trattamento farmacologico, che sono stati presentati nel paragrafo 3.1.1 del capitolo dei risultati. Diversamente da quanto avviene per la MAP, i valori medi della frequenza cardiaca non subiscono un decremento significativo in nessuno dei quattro gruppi (figura 3.36). Da questi risultati possiamo concludere che gli effetti della Xilazina sulla frequenza cardiaca, nonostante il basso dosaggio, sono più marcati e permangono più a lungo nel tempo.

Nei minuti che precedono il Fatal pressure drop, inoltre, il gruppo D fa registrare valori di HR che, al contrario di quelli del gruppo C, non risultano significativamente differenti da quelli dei gruppi A e B (*post hoc comparison* n.s.). Questo risultato concorda con quanto riportato in letteratura circa l'effetto vagolitico del Glicopirrolato (Sneyd e Berry, 1991). Inoltre, tale risultato è interessante perché, considerato che il gruppo D è l'unico dei quattro gruppi in cui non si verifica nessun FFPD, supporterebbe l'ipotesi di Penn et al. (2011) di un meccanismo vagale come responsabile del FFPD e, se questa ipotesi fosse confermata, la somministrazione di un vagolitico risulterebbe efficace nel prevenirlo.

4.3.1 Pressione pulsatoria

Compatibilmente con quello che dovrebbe essere l'effetto di un'ischemia protratta, si assiste ad un decremento dei valori della PP in tutti i gruppi (figura 3.37). Infatti sulla base delle considerazioni espresse nel paragrafo 4.1.3, possiamo presumere che tale decremento rifletta quello dello stroke volume. Come è stato detto nel capitolo introduttivo, una diminuzione dello stroke volume caratterizza lo shock circolatorio ed è dovuto a molteplici fattori non solamente di tipo nervoso.

4.4 Evoluzione verso il collasso: analisi nel dominio delle frequenze

4.4.1 Pressione media

Per la serie MAP si osserva che, trenta minuti dopo la SAO, i gruppi Xyl sono ancora caratterizzati da una potenza spettrale allocata nelle bande VLF e LF significativamente inferiore ($p < 0.01$) rispetto a quella dei gruppi NoXyl. Analogamente, ciò si verifica anche nei minuti che precedono il FPD: i gruppi Xyl continuano ad avere valori significativamente più bassi della potenza nelle bande VLF e LF ($p < 0.05$) rispetto agli altri due gruppi, tale risultato si deve all'azione simpatolitica della Xilazina.

Dal confronto tra le due epoche emerge che la maggior parte degli animali dei gruppi NoXyl risponde all'ischemia in atto con un incremento marcato della potenza nella banda spettrale LF, accompagnato da un incremento della potenza totale. Sebbene tali incrementi non risultino significativi, un comportamento simile è compatibile con l'attivazione simpatica volta a contrastare il collasso della pressione media. Nei gruppi Xyl, invece, non si osserva tale comportamento ed i valori della potenza nella banda LF e della potenza totale rimangono pressoché invariati nei minuti che precedono il FPD (figura 3.42 e 3.44).

Anche in questo caso l'analisi dei parametri percentuali e del rapporto LF/HF (tabella 3.14) risulta utile per chiarire quanto appena detto: emerge chiaramente un incremento della potenza nella banda LF, il quale risulta maggiore per i gruppi A e B che non per i gruppi C e D.

Quanto osservato risulta compatibile con gli effetti simpatolitici della Xilazina e con il progredire dell'ischemia intestinale. In particolare, come si evince dall'andamento della potenza nella banda LF, negli animali dei gruppi Xyl la risposta simpatica all'abbassamento di pressione risulta depressa, il che li porta a raggiungere valori di pressione media inferiori.

4.4.2 Ciclo cardiaco

La discussione dei risultati dell'analisi spettrale condotta sulla serie HP richiede una premessa. Come si è detto, una frazione considerevole dei ratti del gruppo C mostra delle alterazioni del ritmo cardiaco, possibilmente legate ad irregolarità del ritmo respiratorio. Durante l'evoluzione verso il collasso non si osservano nei ratti del gruppo C alterazioni tali da giustificare l'esclusione dell'intero gruppo sperimentale dai confronti statistici. Si noti tuttavia che i valori del gruppo C per i parametri analizzati sono, in generale, maggiori di quelli degli altri tre gruppi (tabella 3.17).

I gruppi A e B mostrano chiaramente un incremento della potenza allocata nella banda LF dello spettro di potenza della serie HP (significativo solamente per il gruppo B), il quale, come è stato detto, è compatibile con un'attivazione del sistema simpatico in risposta all'abbassamento pressorio. Il gruppo D, trattato con Xilazina, non mostra un comportamento simile (figura 3.49).

Anche in questo caso l'andamento dei parametri percentuali e del rapporto LF/HF (tabella 3.18 e figura 3.45) mostra chiaramente un incremento di potenza nelle banda LF per i gruppi *NoXyl* compatibile con un incremento dell'attività simpatica.

4.4.3 Pressione pulsatoria

L'analisi statistica sui valori della potenza allocata nelle bande VLF, LF e HF dello spettro di potenza della serie PP non ha prodotto risultati significativi.

Ci limitiamo ad osservare che, anche in questo caso, si assiste ad un incremento dei valori della potenza integrale nella banda LF nei gruppi *NoXyl* che potrebbe indicare un incremento del tono simpatico. Tuttavia, come abbiamo detto, la PP è direttamente proporzionale allo stroke volume ed, in assenza una misura diretta del valore di quest'ultimo, risulta difficile interpretare il risultato ottenuto dall'analisi spettrale della PP in questa fase del protocollo. Infatti, a causa dell'ischemia intestinale in fase avanzata, lo stroke volume potrebbe essere influenzato da molteplici fattori di natura non nervosa.

4.5 Confronto tra FFPD e SFPD

L'analisi temporale e quella in frequenza delle serie battito-battito MAP, HR e PP nella finestra compresa tra il trentesimo minuto dopo la SAO e il FPD è stata condotta considerando anche la suddivisione dei ratti nei due macro gruppi FFPD e SFPD. Lo studio del differente comportamento dei ratti appartenenti al gruppo FFPD rispetto a quelli appartenenti al gruppo SFPD, è stato condotto al fine di chiarire i meccanismi coinvolti nella morte improvvisa dovuta a collasso. L'accorpamento di animali con diverso trattamento farmacologico genera due macro gruppi molto eterogenei caratterizzati da una grande variabilità interna che condiziona il risultato dell'analisi statistica. Peraltro, l'evoluzione verso un collasso improvviso è, a dispetto delle differenze all'interno dei due gruppi (FFPD vs. SFPD) dovute alle diverse combinazioni di trattamenti farmacologici, ciò che realmente ha più importanza da un punto di vista di endpoint dell'esperimento e della sua eventuale valenza come modello clinico di morte improvvisa per ischemia intestinale

4.5.1 Analisi temporale.

Dal confronto degli tra i due gruppi (FFPD e SFPD) in ciascuna epoca, è emerso che non esistono differenze significative tra i valori della pressione media (figura 3.38) e della frequenza cardiaca (figura 3.39) né all'inizio della finestra di analisi considerata né nei minuti che precedono il FPD. Si noti, tuttavia, che il gruppo SFPD raggiunge un valore di pressione media inferiore (85.6 ± 14 mmHg) rispetto al gruppo FFPD (107 ± 25 mmHg). Il valore della PP del Gruppo FFPD risulta invece significativamente più elevato di quello del gruppo SFPD nei minuti che precedono il FPD. Tuttavia, come è stato detto, interpretare quest'ultimo risultato senza il supporto di una misura diretta dello stroke volume risulta difficile.

Un risultato interessante emerge dall'analisi dell'heart rate: i ratti appartenenti al gruppo SFPD reagiscono al decremento di pressione aumentando la frequenza cardiaca ($\Delta_{\text{pre-FD-30' post SAO}} = +18 \pm 27$ bpm, $p < 0.05$). Questo risultato è coerente con quanto riportato in letteratura (Huang e Longhurst, 1994) circa l'intesa stimolazione simpatica causata dallo stato di shock circolatorio e dall'ischemia intestinale, in virtù del quale tale stimolazione simpatica indurrebbe un aumento della frequenza cardiaca nel tentativo di riportare la pressione arteriosa ad un livello fisiologico. Al contrario, i ratti appartenenti al gruppo FFPD fanno registrare un abbassamento di frequenza cardiaca nei minuti che precedono l'evento di fatal pressure drop ($\Delta_{\text{pre-FD-30' post SAO}} = -23 \pm 20$ bpm, $p < 0.05$). Questo risultato è coerente le ipotesi formulate da Penn et al. (2011) presentate nel capitolo introduttivo: l'improvvisa caduta di pressione, che caratterizza il FFPD sarebbe associata ad una scompenso della bilancia simpatovagale che causerebbe, come osservato, un rallentamento del ritmo cardiaco.

Per completare le considerazioni proposte da Penn (2011) sul ruolo del sistema vagale nel FFPD occorre considerare anche 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 dovuto al progredire dello stato di shock circolatorio e dell'ischemia intestinale, dipende, come spiegato nel capitolo introduttivo, dalla capacità del sistema simpatico di rispondere a tale condizione. In letteratura, vari lavori hanno ipotizzato l'esistenza di meccanismi di saturazione del sistema simpatico, che lo renderebbero impossibilitato ad attivarsi al di sopra di una certa soglia (Convertino e Cooke, 2002; Cooke e Convertino, 2002). Dunque, possiamo supporre, come è stato detto, che, vi sia una depressione, progressiva o transitoria, dell'attività simpatica e che, in tali frangenti, il sistema parasimpatico tenda a compensare

l'assenza del tono simpatico diventando largamente predominante e assumendo il controllo delle dinamiche dell'intero sistema cardiovascolare.

4.5.2 Analisi in frequenza

L'analisi in frequenza condotta sulla serie MAP, considerando questa suddivisione dei ratti, non ha prodotto risultati significativi per quanto riguarda il confronto dei due gruppi in ciascuna delle epoche considerate. Come era già emerso dall'analisi basta sui gruppi di trattamento farmacologico, nei minuti che precedono il FPD si osserva un incremento della potenza nella banda LF e della potenza totale accompagnato da un decremento della potenza nella banda HF (tabella 3.15 e figura 3.47) sia nel gruppo dei FFPD che nel gruppo degli SFPD (nonostante questo comportamento sia più evidente per il gruppo FFPD, i test statistici hanno restituito significatività solamente per il gruppo SFPD).

L'analisi delle serie HP ha mostrato esiti analoghi, sebbene non emergano differenze significative dal confronto tra i valori degli indici calcolati trenta minuti dopo la SAO e quelli calcolati nei minuti che precedono il FPD. Questo andamento dei valori di potenza nelle bande spettrali è compatibile con l'effetto di una stimolazione simpatica indotta dall'ischemia intestinale.

L'analisi dei parametri percentuali e del rapporto LF/HF, sia per la serie MAP (figura 3.48) che per la serie HP (figura 3.55), conferma quanto appena detto. Inoltre, il valore del rapporto LF/HF del gruppo FFPD risulta significativamente più elevato rispetto a quello del gruppo SFPD, sia per la serie MAP che per la serie HP (rispettivamente $p < 0.01$ e $p < 0.05$). Quest'ultimo risultato porta alla seguente considerazione: il tasso di crescita della potenza allocata nella banda LF dello spettro della MAP e del HP, nel periodo compreso tra il trentesimo minuto dopo la SAO e il FPD, sembra essere più elevato nel gruppo FFPD, come, per altro, confermano i risultati del LME (tabella 3.25).

In virtù di questi commenti, si può ipotizzare che, all'origine dei fenomeni di crollo improvviso della pressione arteriosa, vi sia l'intervento di un meccanismo di saturazione del tono simpatico (Convertino e Cooke, 2002; Cooke e Convertino, 2002) per cui, oltre una certa soglia di attivazione (o trascorso un certo periodo di tempo al di sopra di tale soglia), l'attività simpatica viene depressa. Tale ipotesi integra quella formulata da Penn e Schmid-Schonbein (2011), chiarendo il ruolo del sistema nervoso simpatico e sottolineando come alla base dei fenomeni oggetto di indagine di questo lavoro vi sia, in

generale, una risposta autonoma fallimentare. In sostanza, i risultati presentati indicano che l'ipotesi di un meccanismo vagale proposta da Penn e Schmid-Schonbein è valida ma, più che una improvvisa attivazione parasimpatica, sembra avvenire una compensazione del sistema vagale, chiamato a gestire in solitudine il controllo autonomo della circolazione, nel momento in cui il contributo del sistema simpatico venga a mancare, secondo i meccanismi di iperattivazione e saturazione che sono stati richiamati per spiegare i risultati ottenuti.

4.6 Approximate Entropy e Sample Entropy

Il calcolo dell'Approximate Entropy e della Sample Entropy ha prodotto risultati significativi solamente per la serie battito-battito del periodo cardiaco. In particolare il valore dell'ApEn e della SampEn calcolati per $r = 0,6SD$, $0,9SD$ e $1,2SD$ dei gruppi C e D, trattati con Xilazina, nell'epoca di baseline risulta più alto rispetto a quello dei gruppi A e B, che non hanno ricevuto tale trattamento farmacologico. Come esposto precedentemente, gli indici ApEn e SampEn forniscono una misura della regolarità di una serie numerica. Il risultato ottenuto indica, dunque, che le serie battito-battito del periodo cardiaco nei ratti trattati con Xilazina sono caratterizzate da una maggiore irregolarità nell'epoca di baseline.

Il fatto che la differenza tra i gruppi *Xyl* e *NoXyl* sia significativa solamente per valori del parametro r maggiori di $0,6SD$ dipende dal livello del rumore presente sulla serie HP. Come riportato nel paragrafo 2.6, il parametro r è un filtro che definisce l'ampiezza ammissibile del rumore presente sulla serie analizzata, di fatto il confronto dei valori della serie all'interno dell'intervallo definito da r equivale ad una quantizzazione del segnale. Nonostante Pincus (1994) raccomandi valori di r compresi nell'intervallo $0,1SD$ e $0,25SD$ limitatamente a serie RR in soggetti umani, studi successivi hanno mostrato che tale intervallo risulta spesso troppo ridotto (Gonçalves, 2013). Valori di r inferiori a $0,6SD$ possono essere associati ad oscillazioni della serie HP significative dal punto di vista fisiologico, oppure a rumore di varia natura che, effettivamente, si sovrappone alle oscillazioni legate all'effetto del trattamento farmacologico mascherandolo. Gli indici entropici non sempre mostrano la proprietà di *consistency*, ovvero la proprietà generale per cui dati due segnali S e T, se $ApEn(m_1, r_1)(S) > ApEn(m_1, r_1)(T)$ allora necessariamente $ApEn(m_2, r_2)(S) > ApEn(m_2, r_2)(T)$ (Richman and Moorman, 2000)

Tuttavia, possiamo elaborare un'ipotesi per interpretare il risultato trovato. Il parametro m determina la finestra temporale in cui si confrontano i valori dei segnali, se m

è basso si osservano pattern di breve durata. Il parametro r pone, come abbiamo detto, una soglia sull'ampiezza ammissibile delle oscillazioni. Dall'analisi spettrale risulta che l'effetto della Xilazina sulla serie HP è quello di deprimere le basse frequenze ed incrementare la potenza alle alte frequenze, in particolare la potenza si concentra nel picco associabile all'attività respiratoria. Se a prevalere sono dunque le alte frequenze il segnale appare più irregolare e di conseguenza i valori di entropia saranno più elevati. Ponendo la soglia r ad un valore inferiore all'ampiezza delle oscillazioni ad alta frequenza dovute al respiro queste vengono filtrate e non si evidenzia alcuna differenza tra i quattro gruppi. Dunque possiamo supporre che il valore di entropia maggiore, mostrato dai gruppi *Xyl* rispetto a i gruppi *NoXyl*, sia dipendente in qualche misura dall'azione esterna del respiro esercitata sulla variabilità cardiaca, ed in particolare al maggior accoppiamento tra il respiro e la variabilità cardiaca, sia di natura meccanica che attraverso la mediazione del nervo vago.

4.7 Corrected Conditional Entropy

I risultati ottenuti da calcolo della Conditional Entropy confermano quelli ottenuti dal calcolo della ApEn e della SampEn. I gruppi *Xyl*, nell'epoca di baseline, sono caratterizzati da una regolarità significativamente inferiore a quella dei gruppi A e B che, invece, non hanno ricevuto il trattamento farmacologico con Xilazina. In questo caso il livello di rumore ammissibile è stabilito dal numero di bins ζ utilizzati per la quantizzazione del segnale. Valgono, dunque, le stesse considerazioni e le stesse ipotesi esposte nel paragrafo precedente in merito ai risultati ottenuti dal calcolo dell'ApEn.

4.8 Conclusioni

4.8.1 Effetti del trattamento farmacologico

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). Nei ratti trattati con Xilazina la pressione arteriosa e la frequenza cardiaca sono risultati inferiori, coerentemente con quanto noto dalla letteratura riguardo gli effetti di sostanze agoniste dei recettori α_2 -adrenergici sull'apparato cardiocircolatorio (Hsu et al., 1985; Klide et al., 1975; Sanforde Colby, 1980). (Tabella 3.4). I valori della densità spettrale di potenza e la distribuzione dei picchi spettrali ottenuti dall'analisi in frequenza delle serie MAP, HP e

PP sono paragonabili a quelli riportanti in studi precedenti (Japundzic, 1990; Cerutti C, 1991; Julien, 1995). La somministrazione di Xilazina ha inoltre prodotto un significativo decremento della potenza in banda LF nello spettro di potenza della serie MAP in tutte le epoche analizzate (tabelle 3.5 e 3.13) ed un incremento della potenza allocata nella banda HF (concentrata in particolare in un picco spettrale associabile all'attività respiratoria) negli spettri di potenza delle serie HP e PP durante l'epoca di baseline (tabelle 3.17 e 3.21).

Nel complesso la Xilazina deprime il tono simpatico causando una compensazione da parte del sistema nervoso parasimpatico. Tale effetto di compensazione è visibile in soprattutto negli indici spettrali estratti dalla serie HP che mostrano un incremento della potenza alle alte frequenze nei gruppi Xyl.(figura 3.24)

4.8.2 Effetti dell'occlusione delle arterie splancniche (SAO)

Il repentino aumento di pressione che si registra in seguito alla SAO non è di origine simpatica. Tale innalzamento di pressione dunque è legato ad effetti emodinamici legati al blocco della circolazione arteriosa addominale. In particolare l'effetto emodinamico della redistribuzione del flusso sanguigno da circuiti a bassa resistenza come la circolazione atriale addominale, a circuiti ad alta resistenza, aumenta la pressione arteriosa per effetto di un incremento del postcarico cardiaco. Parimenti, si verifica un aumento del volume di sangue circolante causato dallo svuotamento passivo dei vasi capacitivi della regione splancnica ad opera del ritorno venoso che aumenta il postcarico del cuore e, attraverso il meccanismo di Frank-Starling, incrementa la gittata cardiaca e dunque la pressione arteriosa (Huang,e Longhurst, 1994). Diversi risultati di questo lavoro di tesi supportano l'ipotesi che innalzamento pressorio che segue la SAO non sia indotto da una risposta nervosa ma, bensì, dai fenomeni emodinamici appena descritti:

(i) Il valore massimo ed il valore di pressione media raggiunto dopo l'esaurimento degli effetti transitori indotti dalla manovra stessa sembrano non dipendere dal differente tipo di trattamento farmacologico a cui i quattro gruppi sperimentali sono stati sottoposti, infatti, se l'incremento di pressione media fosse di natura nervosa avremmo osservato incrementi minori per i gruppi Xyl. (tabella 3.4 e figura 3.15)

(ii) La SAO provoca un brusco innalzamento della frequenza cardiaca che tuttavia viene recuperato in breve tempo ed il suo valore, esauriti gli effetti del transitorio suddetto, non risultano significativamente differenti da quelli precedenti alla SAO (tabella 3.4 e figura 3.15)

(iii) L'analisi spettrale condotta sulla serie MAP e HP non rivela un comportamento degli indici spettrali, nella loro evoluzione dai valori basali a quelli dell'immediato periodo successivo all'occlusione, compatibile con una aumentata attivazione simpatica (tabella 3.6 e tabella 3.8), ma piuttosto con una riduzione del tono simpatico stesso, in risposta all'aumento di pressione imposto dalla manovra di *clamping*.

4.8.3 Attivazione simpatica indotta dall'ischemia

Dopo il repentino aumento di pressione che segue la SAO, si è osservato come, con il progredire dello stato di alterazione emodinamica imposto dal perdurare dell'ischemia intestinale, i valori di pressione media decrescano progressivamente (tabella 3.11 e figura 3.31). Si è ipotizzato che il tono simpatico incrementi progressivamente per tentare di contrastare il collasso della pressione arteriosa. A sostegno di tale ipotesi, l'analisi spettrale condotta sulla serie MAP, ha mostrato un aumento della potenza allocata nella banda spettrale LF (0.25-0.75 Hz) e della potenza totale, accompagnata da un decremento della potenza alle alte frequenze nei minuti che precedono il FPD, il che suggerirebbe una riduzione dell'ampiezza delle oscillazioni emodinamiche legate all'attività respiratoria. Tale comportamento è meno evidente nei ratti trattati con Xilazina in cui tale risposta simpatica risulta depresso dall'azione del farmaco (tabella 3.14 e figure 3.42).

4.8.4 Meccanismi alla base del Fatal pressure drop

Quanto all'obiettivo principale di questo lavoro di tesi, ovvero fare luce sul ruolo del sistema nervoso autonomo nell'evento di FPD e in eventi affini come i drop and recovery di pressione arteriosa, possiamo concludere i risultati ottenuti sono sostanzialmente coerenti con l'ipotesi avanzata da Penn e Schmid-Schonbein (2011) circa il ruolo del sistema parasimpatico nel FFPD. In particolare, l'analisi temporale condotta considerando la suddivisione dei ratti nei due macrogruppi FFPD e SFPD ha mostrato una diminuzione di frequenza cardiaca nei ratti del macro-gruppo FFPD all'approssimarsi del Fatal Pressure Drop (tabella 3.12). L'ipotesi di un meccanismo vagale alla base del FFPD è inoltre supportata dal comportamento dei ratti trattati con Glicopirrolato, un parasimpatolitico, nessuno dei quali ha presentato FFPD. Ad integrazione dell'ipotesi principale di Penn e Schmid-Schonbein circa tale meccanismo vagale, possiamo formulare un'ulteriore ipotesi utile ad interpretare il comportamento del SNA ed il suo ruolo nel FFPD, oltre che nel SFPD. In particolare, abbiamo ipotizzato che intervenga un meccanismo di saturazione del tono simpatico (Convertino e Cooke, 2002; Cooke e

Convertino, 2002) per mezzo del quale, questo ultimo, viene depresso o, addirittura, disattivato.

A sostegno di questa interpretazione abbiamo ottenuto i seguenti risultati:

(a) L'analisi in frequenza della serie MAP ha mostrato che i ratti del gruppo FFPD sono caratterizzati, nei minuti che precedono il FPD, da un valore maggiore della potenza allocata nella banda LF e da un rapporto LF/HF significativamente più elevato rispetto a quelli del gruppo SFPD (tabella 3.15 e 3.16)

(b) Il gruppo FFPD mostra un incremento maggiore di tali parametri rispetto a quello del gruppo SFPD

(c) Il LME, applicato al parametro percentuale LF% e al rapporto LF/HF delle serie MAP, HP e PP, ha mostrato che il gruppo FFPD è caratterizzato da un tasso di crescita di questi indici superiore rispetto al gruppo SFPD (tabella 3.25)

(d) 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.

I risultati (a), (b) e (c) ci portano dunque a pensare che i ratti che mostrano FFPD attivano in maniera maggiore e più rapida il SNA simpatico in risposta al decremento di pressione di cui si è detto precedentemente e che caratterizza questa fase del protocollo. Tale attivazione, come ampiamente argomentato, non è sostenibile per un periodo prolungato oppure supera un livello di soglia per cui viene depressa o addirittura interrotta. In questi frangenti, il tono vagale, anche non necessariamente incrementato, oppure addirittura al di sotto dei livelli normali a causa degli effetti dell'ischemia, può causare un repentino rallentamento del ritmo cardiaco. Questa decelerazione del battito impone, di conseguenza, un decremento della pressione arteriosa che, in assenza di tono simpatico, non può essere compensato da una risposta baroriflessa fisiologica. Si potrebbe pertanto pensare che si instauri una sorta di "circolo vizioso" estremamente rapido e quindi letale, per cui il predominio del controllo parasimpatico, che deve compensare l'improvviso crollo del tono simpatico, produce un calo sostenuto della frequenza cardiaca che ha come effetto collaterale una riduzione della pressione, così netta da portare alla scomparsa del polso e dunque al collasso.

Una riduzione del tono vagale, tramite la somministrazione di Glicopirrolato, risulta efficace nel prevenire crolli di pressione fatali. Infatti, anche nel gruppo D, si sono riscontrati crolli di pressione che comunque vengono recuperati (drop and recovery).

4.8.5 Utilità dei parametri non lineari

Infine, in questo lavoro di tesi, si è visto come il calcolo di parametri non lineari come l'Approximate Entropy, la Sample Entropy, e la Corrected Conditional Entropy possano aggiungere delle informazioni utili alla comprensione delle dinamiche che caratterizzano le serie di variabilità. In particolare il calcolo dell'ApEn e della CE hanno fornito informazioni circa l'influenza di *drive* esterni sul sistema analizzato. In particolare, si è osservato che le serie di variabilità cardiaca dei ratti trattati con Xilazina risultano più irregolari perché caratterizzate da oscillazioni ad alta frequenza più ampie. Si è ipotizzato che tali oscillazioni derivino dall'attività respiratoria la quale, in seguito al trattamento farmacologico, influenza maggiormente la variabilità cardiaca dei ratti Xyl. Dai risultati ottenuti (tabella 3.26 e 3.34) ed in base alle ipotesi formulate abbiamo concluso che il trattamento farmacologico con Xilazina amplifica l'azione di quello che abbiamo individuato essere un possibile drive esterno, ovvero il respiro, sulla variabilità cardiaca.

4.9 Limitazioni

La limitazione principale di questo lavoro di tesi è la dimensione del dataset: il numero di animali disponibili per ogni gruppo, a volte, si è rivelato essere troppo basso per poter disporre di un'elevata potenza statistica. Ad esempio un numero più alto di animali avrebbe permesso di confrontare FFPD e SFPD all'interno di ciascun gruppo di trattamento farmacologico. Lo studio pubblicato da Penn et al. (2011), che riportava una serie di dati ottenuti dall'esperimento considerato in questa tesi, includeva un numero di animali molto superiore per ciascuno dei quattro gruppi di ratti studiati. Tuttavia, come si è stato spiegato nel capitolo Materiali e Metodi, 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.

Una seconda limitazione riguarda il design sperimentale ed in particolare la scelta del trattamento farmacologico per ciascun gruppo. Sarebbe stato utile disporre (oltre ai gruppi A, B, C e D) di altri gruppi sperimentali in cui gli effetti di più trattamenti farmacologici non fossero sovrapposti, ad esempio un gruppo trattato solamente con Xilazina e salina nel lume intestinale e di un gruppo trattato con Glicopirrolato e salina nel lume intestinale.

Infine, la presenza di ulteriori misure sperimentali avrebbe permesso analisi più complete ed approfondite: (i) l'elettrocardiogramma avrebbe permesso una stima diretta e più accurata degli intervalli RR e avrebbe permesso di individuare eventuali anomalie del

ritmo cardiaco e le loro cause; (ii) una misura diretta del flusso aortico avrebbe permesso di ottenere informazioni sulla regolazione battito-battito dello *stroke volume* così da integrare i risultati ottenuti dall'analisi del periodo cardiaco.

4.10 Sviluppi futuri

I risultati ottenuti in questo lavoro di tesi e i risultati dei lavori precedenti di Gambarotta (2013) e Cruanes (2013) sono coerenti con le ipotesi di lavoro delineate nel capitolo introduttivo. Con questo lavoro di tesi si conclude, dunque, un'analisi approfondita di questo database, nella quale sono stati utilizzati diversi metodi di indagine per studiare le serie battito-battito estratte dal segnale pressorio e la serie HP, sia nel dominio del tempo che nel dominio della frequenza. Inoltre sono stati stimati indirettamente il *cardiac output* e lo *stroke volume*. L'utilizzo di metodi di indagine più avanzati, come ad esempio un'analisi approfondita nel dominio tempo-frequenza attraverso le *wavelet* applicate alle serie di variabilità cardiaca e pressoria, con tutta probabilità non aggiungerebbe informazioni fondamentali ai risultati già ottenuti.

I risultati ottenuti dai vari approcci menzionati sono comunque rilevanti e servono a stimolare ulteriore ricerca nel campo, giustificando in prospettiva nuovi esperimenti, integrati da nuove misure o proponendo altri trattamenti farmacologici.

Bibliografia

Acharya U. R., Joseph K.P., Kannathal N., Min Lim C., Suri J.S (2006). Heart rate variability: a review. *Med Bio Eng Comput*, 44:1031–1051

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.

Boardman A., Schlindwein F.S., Rocha A.P., Leite A. (2002). A study on the optimum order of autoregressive models for heart rate variability. *Physiological Measurement*, 23: 325–336.

Chemla D., Hébert J., Coirault C., Zamani K., Suard I., Colin P., Lecaprienter Y. (1998). Total arterial compliance estimated by stroke volume-to-aortic pulse pressure ratio in humans. *American Journal of Physiology*. 274: H500–H505

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.

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.

Cerutti C., Gustin M.P, Molino P., Paultre C.Z (2001). Beat-to-beat stroke volume estimation from aortic pressure waveform in conscious rats: comparison of models. *American Journal of Physiology -Heart Circulation Physiology* 281: H1148–H1155.

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

Eckmann, J.P., Ruelle, D. (1985). Ergodic theory of chaos and strange attractors. *Rev. Mod. Phys.* 57(3), 617-656.

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.

Fu L.W., Longhurst J.C. (1998). Role of 5-HT₃ receptors in activation of abdominal sympathetic C fibre afferents during ischemia in cats. *Journal of Physiology*, 509(3): 729-740.

Goldberger A.L., Rigney D. R., Mietus J., Antman E. M., Greenwald S. (1988). Nonlinear dynamics in sudden cardiac death syndrome: Heart rate oscillations and bifurcations. *Experientia* 44 (11): 983-987.

Gonçalves H., Tiago Henriques-Coelho T., Ana Paula Rochac A.P., Lourenço A.P., Leite-Moreira A., Bernardes J. (2013). Comparison of different methods of heart rate entropy analysis during acute anoxia superimposed on a chronic rat model of pulmonary hypertension. *Medical Engineering & Physics* 35(5): 559–568.

Grassberger P., Procaccia I. (1983). Estimation of the Kolmogorov entropy from a chaotic signal. *Physical Review A* 28 (4): 2591–2593.

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.

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

Japundzic N., Grichois M., Zitoun P., Laude D., Elghozi J. (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.

Kaplan D.T., Furman M., Pincus S.M., Ryan S. M., Lipsitz L.A., Goldberger A.L. (1991). Aging and the complexity of cardiovascular dynamics. *Biophysical Journal*, 59: 945-949.

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.

Kolmogorov A.N. (1965). A new metric invariant of transient dynamical systems and automorphisms in lebesgue spaces. *Dokl. Akad. Neuk*, 119:861-864.

Lindstrom M.J., Bates D.M. (1990). Nonlinear Mixed Effects Models for Repeated Measures Data. *Biometrics*, 46: 673-687.

Olfert E.D., Cross B.M., McWilliam A.A. (1993). Guide to the care and use of experimental animals. Canadian Council on Animal Care.

Papoulis A. (1984). Probability, random variables and stochastic processes. McGraw-Hill, New York

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.

Pincus S.M. (1991). Approximated entropy as a measure of system complexity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:2297–2311

Pincus S. M., Cummins T. R., Haddad G. G (1993). Heart rate control in normal and aborted-SIDS infants. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 264: R638-R64.

Pincus S.M., Goldberger A.L. (1994). Physiological time-series analysis: what does regularity quantify? *American Journal of Physiology*, 266: 1643-1656.

Pincus S.M., Gladstone I.M., Ehrenkranz R.A. (1991). A regularity statistic for medical data analysis. *Journal of Clinical Monitoring*, 7(4): 335-345

Pincus S.M., Keefe D.L. (1992). Quantification of hormone pulsatility via an approximate entropy algorithm. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*,. 262: E741-E754

Porta A., Baselli G., Liberati D., Montano N., Cogliati C., Gneccchi-Ruscione T., A. Malliani, S. Cerutti (1998). Measuring regularity by means of a corrected conditional entropy in sympathetic outflow. *Biological Cybernetics*, 78: 71:78

Richman J.S., Moorman J.R. (2000). Physiological time-series analysis using approximate entropy and sample entropy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 278: H2039–H2049

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.

Task force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology(1996). Heart Rate Variability: Standards of measurements, physiological interpretation and clinical use. *Circulation*, 96: 1043-1065.

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.