

UNIVERSITÁ DEGLI STUDI DI PADOVA

FACOLTÁ DI INGEGNERIA

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN BIOINGEGNERIA



**UN NUOVO ALGORITMO PER LA RIMOZIONE DEGLI
ARTEFATTI FISIOLÓGICI DA SEGNALI DI
SPETTROSCOPIA FUNZIONALE NEL VICINO
INFRAROSSO (fNIRS)**

RELATORE: PROF. GIOVANNI SPARACINO

CORRELATORE: ING. FABIO SCARPA

LAUREANDA: SABRINA BRIGADOI

ANNO ACCADEMICO 2009/2010

Indice

Sommario.....	3
1 Spettroscopia funzionale nel vicino infrarosso e sue applicazioni nelle neuroscienze cognitive	5
1.1 Le neuroscienze cognitive	5
1.2 La fNIRS	8
1.2.1 Storia della fNIRS.....	8
1.2.2 Principi fisici alla base della fNIRS	11
1.2.3 Tipologie di strumentazione fNIRS	17
1.2.4 Applicazioni della fNIRS in letteratura.....	20
1.3 Vantaggi e svantaggi della fNIRS rispetto ad altre metodologie di neuroimaging	24
1.3.1 EEG e ERP.....	25
1.3.2 PET e SPECT.....	28
1.3.3 fMRI.....	30
1.3.4 Altri vantaggi e svantaggi della fNIRS	33
2 Caratteristiche del segnale fNIRS e problemi aperti	37
2.1 Risposta emodinamica e componenti di disturbo	37
2.2 L'onda di Mayer	40
2.3 Principali metodi proposti in letteratura per l'attenuazione delle componenti di rumore.....	44
2.3.1 Filtraggio in frequenza	44
2.3.2 Sottrazione di una forma d'onda media adattata.....	45
2.3.3 Filtro adattivo per rimuovere la componente cardiaca.....	45
2.3.4 Adaptive GLM (General linear model).....	46
2.3.5 Principal component analysis (PCA)	47
2.3.6 Sottrazione diretta di una forma d'onda non attivata	48
2.3.7 Adaptive filtering	49
2.3.8 La media coerente	51
2.4 Problemi aperti e scopo della tesi	52
3 Data Base.....	55
3.1 Dati reali	55
3.1.1 Il paradigma sperimentale.....	55
3.1.2 La strumentazione utilizzata durante l'acquisizione	56

3.1.3	Posizionamento delle sorgenti e dei rivelatori.....	57
3.1.4	Ipotesi neurofisiologiche sotto esame.....	59
3.2	Dati simulati.....	60
4	Nuovo metodo per la rimozione degli artefatti fisiologici.....	63
4.1	Presentazione del problema e descrizione generale del metodo di soluzione.....	63
4.2	La pre-elaborazione del segnale (passo 1).....	64
4.3	Passo 2: modellistica degli artefatti.....	66
4.4	Passo 3: identificazione del modello.....	68
4.4.1	Scelta dell'ordine.....	68
4.4.2	Formulazione del problema di stima parametrica.....	68
4.4.3	Risoluzione numerica.....	70
4.5	Passo 4: Calcolo della HRF.....	72
4.5.1	Stima per sottrazione.....	72
4.5.2	Raffinamento della stima mediante filtraggio passa-basso.....	72
4.6	Criteri di valutazione del metodo.....	73
5	Risultati.....	75
5.1	Dati simulati.....	75
5.2	Dati reali.....	79
5.2.1	Contrast-to-Noise Ratio (CNR).....	81
5.2.2	Analisi statistica ed interpretazione psicologica.....	83
6	Conclusioni e Sviluppi Futuri.....	93
6.1	Bilancio del lavoro svolto.....	93
6.2	Sviluppi futuri.....	96
	Ringraziamenti.....	99
	Bibliografia.....	101

Sommario

La spettroscopia funzionale nel vicino infrarosso (fNIRS) è una recente tecnica di neuroimaging che sfrutta la luce nel vicino infrarosso per misurare le variazioni di concentrazione di emoglobina ossigenata (HbO₂) e deossigenata (HHb) associate con l'attività cerebrale. Il segnale acquisito con la fNIRS contiene, oltre alla risposta emodinamica (HRF), anche componenti che costituiscono artefatti fisiologici (legati a battito cardiaco, frequenza respiratoria, oscillazioni alle bassissime frequenze ed onda di Mayer) ed altre fonti di disturbo assimilabili a rumore di misura casuale. La rimozione di questi artefatti (e soprattutto dell'onda di Mayer) è difficile, in quanto la loro frequenza si sovrappone a quella della HRF, e nella giovane letteratura fNIRS, il problema è ancora aperto. Il presente lavoro svolto è frutto di una collaborazione interdisciplinare tra il Gruppo di Bioingegneria del Dipartimento di Ingegneria dell'Informazione ed il Cognition and Language Laboratory (COLAB) del Dipartimento di Psicologia dello Sviluppo e della Socializzazione dell'Università di Padova, finalizzata a migliorare le metodologie per la comprensione dei meccanismi coinvolti nel cervello umano, integrando sinergicamente le rispettive competenze. In particolare, si propone un nuovo algoritmo che, per identificare l'artefatto da rimuovere, sfrutta il segnale acquisito da un canale di riferimento, che, da ipotesi, riflette le componenti di rumore presenti nel segnale fNIRS, ma non la risposta emodinamica. L'algoritmo si basa su un modello del rumore alle basse frequenze (<0.18 Hz), dato da una somma di sinusoidi con frequenza ed ampiezza che vengono identificate dai dati del canale di riferimento. I risultati ottenuti con l'algoritmo proposto sono confrontati con quelli ottenuti applicando altri metodi proposti in letteratura. Su dati simulati, in cui sia la risposta emodinamica che il rumore sono generati sinteticamente e quindi noti, il nuovo algoritmo, non solo presenta un errore di stima inferiore a quello degli altri metodi, ma riesce anche a stimare l'ampiezza del picco con migliore accuratezza. I risultati sui dati reali (misurati presso il Cognition and Language Laboratory, COLAB, del Dipartimento di Psicologia dello Sviluppo e della Socializzazione dell'Università di Padova) sono solo preliminari, ma mostrano un incremento del CNR (Contrast-to-Noise Ratio) nei confronti degli altri metodi. Questo risultato potrebbe in futuro permettere una miglior discriminazione delle zone attivate della corteccia cerebrale durante il compito svolto e portare quindi ad una corretta interpretazione dei meccanismi cognitivi coinvolti.

1 Spettroscopia funzionale nel vicino infrarosso e sue applicazioni nelle neuroscienze cognitive

1.1 Le neuroscienze cognitive

Può essere difficile rintracciare l'origine del termine "Neuroscienze Cognitive", ma la storia racconta che esso fu concepito verso la fine degli anni '70, sul sedile posteriore di un taxi, a New York. Un importante neurologo, Michael Gazzaniga, e un famoso psicologo cognitivo, George Miller, stavano andando ad una cena organizzata per gli scienziati delle "Rochefeller University" e "Cornell University", che avevano intenzione di unire le loro forze per studiare come, a partire dal cervello, possa scaturire la mente, un campo di studi bisognoso di un nome [1]. Già da parecchi anni si era capito che specifiche funzioni cognitive corrispondono a specifiche aree del cervello; già nel 1861, il neurologo francese Paul Broca incontrò un uomo in grado di capire ciò che gli veniva detto, ma non in grado di parlare. Successivamente, si scoprì che questa persona aveva un danno ad un'area del lobo frontale sinistro, nota ora come area di Broca. Una storia simile è all'origine del nome attribuito all'area di Wernicke. Wernicke era un neurologo tedesco che studiò un paziente simile a quello di Broca, solo che costui riusciva a parlare, facendo però discorsi senza senso: non riusciva a comprendere né il linguaggio scritto né il parlato. Tale paziente aveva una lesione nell'area di incontro fra il lobo parietale sinistro ed il lobo temporale. Questi casi furono alla base della nascita della Neuropsicologia, una disciplina nata con il compito di studiare la relazione fra fenomeni psicologici e lesioni o deficit del cervello. La scoperta di questi casi diede anche sempre maggior peso alla teoria della localizzazione, perché la lesione scoperta aveva comportato uno specifico cambiamento di comportamento in entrambi i pazienti. Fu così che nel 1909 Brodmann, dopo aver studiato i differenti tipi di cellule presenti nel cervello, concluse che il cervello umano è formato da 52 aree distinte, note proprio come aree di Brodmann (Fig. 1.1.a).

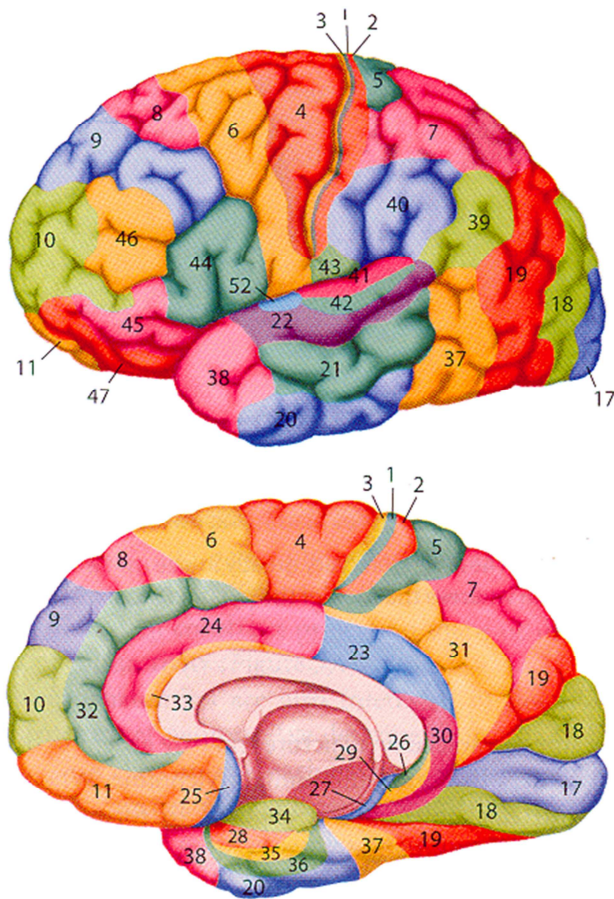


Figura 1.1.a – Aree di Brodmann, i numeri (da 1 a 52), identificano le diverse aree del cervello secondo la suddivisione dello studioso. Tratta da [47]

La corteccia cerebrale è classicamente suddivisa in quattro lobi: il lobo frontale, il lobo parietale, il lobo temporale e quello occipitale (Fig. 1.1.b). Ognuno di questi lobi è predisposto a svolgere compiti diversi. Le neuroscienze cognitive studiano i meccanismi di funzionamento del cervello umano durante le attività cognitive, analizzando i processi biologici che sono alla base della capacità del cervello di rispondere a stimoli esterni o motivazioni interne, di identificare il significato di questi stimoli e di rispondervi in modo adeguato. L'obiettivo è cercare di correlare l'attività neuronale, ricavata ad esempio da misure elettriche, metaboliche o da un'analisi del flusso sanguigno, con precisi aspetti del comportamento [2]. Per le neuroscienze cognitive è quindi importante poter avere una conoscenza sempre più dettagliata del cervello, in modo da poter rendere questa correlazione sempre più precisa. E' quindi grazie alla rapida evoluzione delle tecniche di brain imaging negli ultimi 30 anni che le neuroscienze cognitive hanno potuto fare i passi da gigante che le hanno portate alle odierne scoperte.

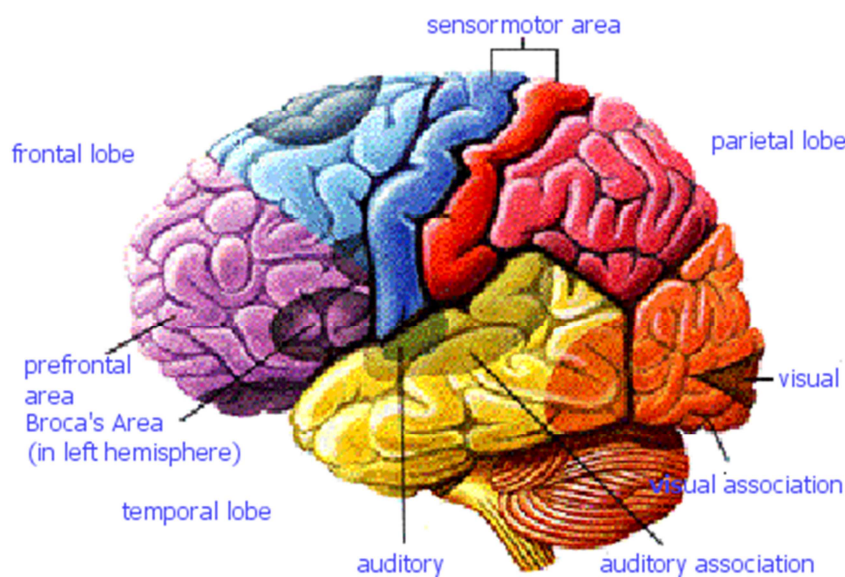


Figura 1.1.b – Lobi cerebrali, tratto da [48]

Negli anni '70 la TAC (tomografia assiale computerizzata) e negli anni '80 la MRI (imaging a risonanza magnetica) hanno iniziato a fornire le prime informazioni morfologiche, mentre quelle funzionali sono arrivate con l'EEG (elettroencefalografia, la prima fu nel 1929), l'ERP (potenziali evento-relati), la PET (tomografia ad emissione di positroni) negli anni '70, l'fMRI (imaging a risonanza magnetica funzionale) negli anni '90 e la fNIRS (spettroscopia funzionale nel vicino infrarosso) dalla fine degli anni '80.

Importante quanto le tecniche di brain imaging è anche lo sviluppo di nuovi metodi di elaborazione dei vari segnali ed immagini acquisiti, come pure l'elaborazione di modelli per l'interpretazione di questi dati. È così che le neuroscienze cognitive si rivelano essere un approccio multidisciplinare allo studio della mente: competenze appartenenti a diverse discipline, dalla psicologia e dalle neuroscienze (psicofisica, linguistica, psicologia cognitiva, neuropsicologia, ecc.) fino alla bioingegneria e alla matematica (conoscenze matematiche, fisiche, informatiche, elettroniche, ecc.) sono necessarie per poter lavorare in quest'ambito. È solo da una stretta collaborazione fra tutti questi settori che le neuroscienze cognitive potranno ottenere i giusti mezzi tecnici e mentali per poter progredire e fare nuove scoperte.

1.2 La fNIRS

1.2.1 Storia della fNIRS

Per decenni, metodi ottici sono stati utilizzati per misurare grandezze fisiologiche. Tuttavia, l'uso della luce ottica diffusa, in particolare con l'obiettivo di monitorare le grandezze fisiologiche in gioco in modo non invasivo, ha una storia più recente. Il motivo di ciò è riconducibile a due ostacoli; il primo è la sensibilità di tale tecnica. Era infatti necessario trovare un range di lunghezze d'onda che fosse poco assorbito dai tessuti biologici, ma che lo fosse dalle variabili fisiologiche d'interesse, e sviluppare al contempo detectors sufficientemente sensibili, in grado cioè di rilevare il segnale proveniente anche da grandi distanze (parecchi cm di tessuto). Si scoprì così che il range di lunghezze d'onda che possedeva questa caratteristica, era quello del vicino infrarosso (650-1000 nm), poiché esso è poco assorbito dai tessuti biologici; tuttavia tale intervallo è invece ben assorbito dall'ossi-emoglobina, dalla deossi-emoglobina e dal citocromo-ossidasi, particolari sostanze cromofore presenti nei fluidi corporei, che si rivelarono essere importanti parametri biologici [3]. Esse, infatti, in presenza di radiazioni elettromagnetiche di specifiche lunghezze d'onda, si comportano in modo diverso, risultando più o meno assorbenti e da questa diversità è possibile ricavare importanti parametri fisiologici o monitorare l'ossigenazione in modo non invasivo, nel muscolo e nel cervello per esempio. La luce nel vicino infrarosso era stata scoperta già da molti anni; fu infatti nel 1800 che Fredrick William Herschel la scoprì con un esperimento molto ingegnoso. Egli proiettò un fascio luminoso attraverso un prisma e studiò lo spettro della luce emessa, misurando il calore delle diverse aree colorate. Egli scoprì che la temperatura continuava a salire anche dopo aver oltrepassato il bordo rosso dello spettro, che si trova ad una delle estremità: il massimo effetto di calore che misurò si trovava nella zona oscura situata oltre la fine dello spettro del visibile [4]. Negli anni '50 la luce nel vicino infrarosso venne utilizzata per la prima volta in ambito industriale. All'inizio veniva usata solo come unità aggiuntiva su altri strumenti che adoperavano luce ad altre lunghezze d'onda, finché negli anni '80 fu realizzato il primo sistema funzionante da solo. Tuttavia, esso fu utilizzato per lo più per analisi chimiche e in campo astronomico. Fu solo negli ultimi decenni tuttavia che la luce nel vicino infrarosso iniziò ad essere utilizzata come strumento medico per il monitoraggio dei pazienti. Per quanto riguarda la sua applicazione nell'ambito delle neuroscienze, si narra

il seguente aneddoto: un neurochirurgo in attesa di una cavia animale da anestetizzare per uno dei primi esperimenti con la luce nel vicino infrarosso, decise di appoggiare i sensori sulla sua fronte; successivamente trattenne il respiro e fu stupito nell'osservare una diminuzione dell'ossigenazione del cervello dovuta all'ipossia che si era auto-creato. Questa fu una delle spinte che portarono a numerose ricerche in questo campo di studi [4]. Verso la fine degli anni '70, Jöbsis usò per la prima volta la luce in questo range di lunghezze d'onda per misurare parametri emodinamici del cervello non invasivamente. Egli utilizzò una tecnica che ora è conosciuta come "spettroscopia nel vicino infrarosso" (NIRS o Near Infra-Red Spectroscopy). In realtà è più corretto parlare di fNIRS, dato che l'aspetto sotto esame è di tipo funzionale, trattandosi per esempio di parametri legati al flusso sanguigno in risposta all'attivazione neuronale [5].

Il secondo ostacolo all'utilizzo della luce diffusa in campo medico derivava dalla mancata conoscenza di come essa si propagasse attraverso un tessuto altamente soggetto a scattering. Superato anche questo problema, grazie a numerosi studi sulla diffusione della luce in tessuti altamente diffondenti alle frequenze ottiche e non omogenei, anche la DOT (Diffuse Optical Tomography) è diventata realtà, permettendo quindi l'utilizzo della luce nel vicino infrarosso per ottenere anche immagini tomografiche [3].

Numerosi sono gli strumenti che sfruttano i raggi infrarossi utilizzati in ambito biomedico: dai termometri ad infrarossi, per misurare la temperatura corporea, all'ossimetro, usato per monitorare la saturazione dell'ossigeno nel sangue, agli strumenti utilizzati nei laboratori per analisi chimico-fisiche di molecole organiche. Tuttavia l'utilizzo della luce infrarossa per monitorare aree non direttamente accessibili è più complesso e la sua messa in pratica più recente. Durante gli anni '80 e primi anni '90, numerose ricerche vennero portate avanti, con lo scopo di misurare la saturazione dell'emoglobina ossigenata nel cervello, sia nei neonati che negli adulti, utilizzando la luce nel vicino infrarosso [3]. In seguito, venne preso in esame anche il metabolismo ossidativo nei muscoli. A partire dal 1993, si è riusciti a osservare l'attivazione della corteccia cerebrale sia in adulti che in neonati [6].

Al giorno d'oggi, la fNIRS utilizzata come strumento non invasivo per monitorare cambiamenti locali nell'ossigenazione e nell'emodinamica cerebrale, è studiata da scienziati di tutto il mondo. Grazie infatti allo sviluppo della fMRI dal 1992, è possibile avere dei dati molto accurati con cui confrontare i risultati ottenuti con la fNIRS. La fMRI è una tecnologia che permette di ottenere immagini del cervello basandosi sul segnale BOLD (Blood Oxygen Level-Dependent) e associarlo con le variazioni di flusso

sanguigno e del metabolismo dell'ossigeno nel cervello. Grazie anche al precedente sviluppo della PET sin dagli anni '70, si riuscì con queste tecnologie ad ottenere mappe funzionali del cervello molto accurate, da poter essere utilizzate come riferimento per la fNIRS, in modo da confrontare e validare i dati da essa ottenuti. Questa fu una delle spinte verso lo sviluppo e il sempre maggiore perfezionamento della spettroscopia nel vicino infrarosso. Molti studi sono anche stati eseguiti sulla correlazione del segnale fNIRS con i segnali fMRI o EEG sia tramite co-registrazioni che registrazioni separate.

Benché non siano passati tanti anni dalla scoperta della fNIRS, l'utilizzo della spettroscopia e dell'imaging funzionale sta già passando dall'ambito di ricerca a quello clinico. Ogni anno vengono pubblicati nuovi studi sulle applicazioni cliniche della fNIRS. Questo dimostra l'abilità unica delle tecniche che sfruttano la luce nel vicino infrarosso di rilevare segnali emodinamici, metabolici e neuronali associati con l'attività del cervello. Inoltre, la fNIRS sembra sia in grado, in un vicino futuro, di misurare valori assoluti di concentrazione, cosa che né l'fMRI, che può rilevare solo valori relativi, né la PET, che è in grado di misurare flusso e volume del sangue e metabolismo del glucosio, né l'EEG e la MEG, che possono rilevare solo segnali neuronali, sono in grado di misurare. Un altro punto a favore dello sviluppo dei metodi ottici è che tali tecniche sono in grado di misurare le grandezze fisiologiche di interesse anche in soggetti problematici per le altre tecniche di imaging del cervello, come fMRI e PET: con la fNIRS si può studiare lo sviluppo del cervello anche nei neonati [7] e nei bambini, la riorganizzazione funzionale durante un ictus ed è un esame che può essere facilmente eseguito anche su soggetti non deambulanti.

Alcuni gruppi di ricerca hanno anche provato ad utilizzare la luce nel vicino infrarosso per rilevare direttamente una risposta neuronale senza passare attraverso le variazioni di concentrazione dell'emoglobina. Si è infatti scoperto che l'attività cerebrale è associata ad un aumento dello scattering subito dai fotoni che attraversano il tessuto biologico, dovuto al cambiamento dell'indice di rifrazione delle membrane neuronali. Sembra che il segnale ottico a risposta veloce (con latenza da circa 50 a 300 ms) misurato con questa tecnica abbia lo stesso andamento temporale della risposta elettrofisiologica rilevata con l'EEG [3].

1.2.2 Principi fisici alla base della fNIRS

La strumentazione fNIRS comprende una o più sorgenti luminose (diodi laser) e dei rivelatori (tubi fotomoltiplicatori collegati a fibre ottiche) che vengono appoggiati in modo non invasivo sul cuoio capelluto o sulla cute. La luce generata dai laser penetra attraverso i tessuti, subisce fenomeni di dispersione e finisce su un rivelatore, che ne misura l'intensità. Il numero e il tipo di sorgenti e rivelatori, nonché il loro posizionamento, dipendono dalla strumentazione e dal paradigma sperimentale usati [5]. Ci sono tre tipologie di implementazione per la fNIRS: fNIRS nel dominio del tempo, fNIRS nel dominio della frequenza e fNIRS ad onde continue (CW). Dato che quest'ultima è alla base di tutti i sistemi di acquisizione fNIRS, la teoria che segue è riferita a questa tipologia di spettroscopia e fa riferimento ad una singola coppia sorgente-rivelatore appoggiata al cuoio capelluto.

La luce con lunghezza d'onda dai 650 ai 1000 nm una volta entrata nel tessuto non viaggia con direzione rettilinea, ma subisce un fenomeno di scattering casuale, in quanto interagisce con tutte le sottostrutture interne ai tessuti, sia a livello cellulare che sub-cellulare. Studi di propagazione della luce in modelli semplificati, per esempio con una discreta omogeneità del mezzo invece che disomogeneità, hanno portato alla definizione del cosiddetto modello "a banana" (Fig. 1.2.2.a), che descrive le regioni con uguale probabilità di essere attraversate dai fotoni luminosi. La parte centrale della "banana" è quella con maggior probabilità di essere attraversata dai raggi luminosi.

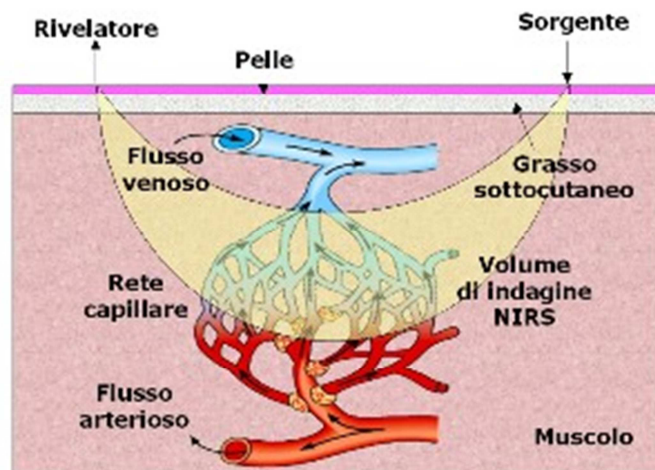


Fig. 1.2.2.a – Modello "a banana" della propagazione della luce, tratto da [49]

La profondità raggiunta dai raggi emessi dai sistemi fNIRS dipende dalla distanza fra sorgente e rivelatore (la profondità raggiunta è circa un terzo della distanza sorgente-rivelatore): maggiore è quest'ultima, maggiore è la profondità raggiunta. La maggior parte dei sistemi fNIRS raggiunge una profondità di 25-30 mm; una distanza sorgente-rivelatore di almeno 2 cm è necessaria per far sì che la luce raggiunga la corteccia cerebrale (ad una profondità di circa 2.5 cm) e che una percentuale significativa del segnale misurato sia proprio segnale cerebrale. All'aumentare della distanza sorgente-rivelatore aumenta la profondità raggiunta, ma in cambio diminuisce il SNR (Signal-to-Noise Ratio); da ciò si deduce come per ora i metodi ottici siano indicati solo per monitorare la parte superficiale della corteccia [4].

La luce all'interno del tessuto biologico può essere riflessa, rifratta, dispersa o assorbita e ciò dipende dalle caratteristiche del mezzo e dalla lunghezza d'onda della luce. La luce nel vicino infrarosso è poco assorbita dai tessuti biologici ed è invece assorbita a particolari lunghezze d'onda da alcuni cromofori, sostanze presenti nei tessuti biologici con la capacità di attenuare l'intensità del fascio luminoso: da tale attenuazione è possibile ricavare la loro concentrazione all'interno del tessuto. Nei tessuti biologici sono presenti quattro cromofori importanti: l'acqua e i lipidi, che tuttavia risultano essere praticamente trasparenti per la luce nel vicino infrarosso, la melanina, che risulta però portare un contributo di attenuazione costante e l'emoglobina, che, invece, in base alla lunghezza d'onda del fascio luminoso e al fatto che sia ossigenata (HbO_2) o deossigenata (HHb), lo attenua in modo diverso. E' proprio l'emoglobina uno dei parametri fisiologici che permettono di monitorare in modo affidabile molti aspetti funzionali del cervello.

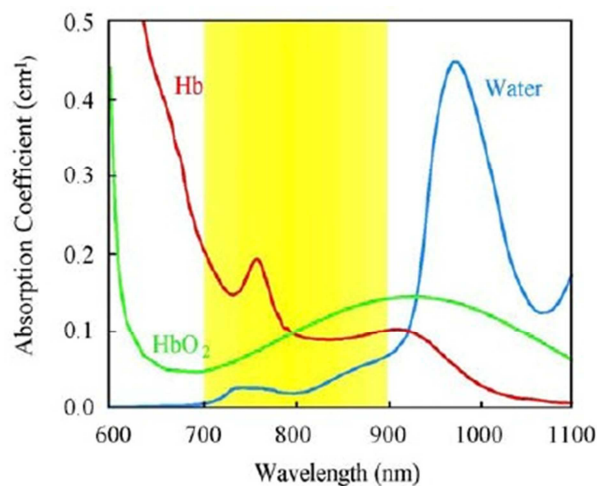


Fig. 1.2.2.b – Spettri di assorbimento di HbO_2 , HHb e H_2O

Osservando lo spettro di assorbimento (Fig. 1.2.2.b), si può notare come a $\lambda=800$ nm vi sia il punto isosbastico, il punto cioè dove i coefficienti di estinzione di ossiemoglobina e deossiemoglobina coincidono, mentre per lunghezze d'onda superiori al range del vicino infrarosso, la luce infrarossa verrebbe assorbita quasi totalmente dall'acqua e per quelle inferiori dalla deossiemoglobina. Un altro cromoforo interessante, che è stato oggetto di studio, è anche il citocromo-ossidasi, che è un indicatore del metabolismo energetico intracellulare. Tuttavia si è giunti alla conclusione che con tale cromoforo è necessario utilizzare un range di lunghezze d'onda maggiore, dato che il suo contributo all'assorbimento della luce nel vicino infrarosso è di almeno un ordine di ampiezza inferiore a quello dell'emoglobina [3].

La legge modificata di Beer-Lambert (MBLL Modified Beer-Lambert Law) sfrutta l'assorbimento da parte di HbO₂ e HHb della luce infrarossa e permette di calcolarne le variazioni di concentrazione. Tale legge deriva dalla soluzione delle equazioni di trasporto dei fotoni nei tessuti sotto alcune e precise ipotesi semplificative: il mezzo viene assunto omogeneo e soggetto ad uno scattering elevato ma costante, ed omogenee nel volume misurato sono anche assunte le variazioni dei parametri di interesse. L'equazione della MBLL è:

$$A = -\log \frac{I}{I_0} \approx \varepsilon^\lambda \cdot c \cdot L \quad \text{con} \quad I = I_0 \cdot e^{-\varepsilon^\lambda \cdot c \cdot L} \quad (1.2.2.1)$$

dove i simboli indicano:

- A densità ottica (assorbanza della luce attraverso il mezzo)
- I intensità della luce rilevata dal rivelatore
- I_0 intensità della luce emessa dalla sorgente
- ε^λ coefficiente di estinzione del cromoforo (dipende da λ)
- c concentrazione del cromoforo
- L distanza fra il punto in cui la luce entra nel tessuto e quello in cui la luce rilevata vi esce

Dalla MBLL si deduce l'esistenza di un rapporto direttamente proporzionale fra la concentrazione del cromoforo e l'assorbanza ad una specifica lunghezza d'onda. L'equazione tiene in considerazione il fatto che i fotoni subiscono molti fenomeni di scattering quando entrano nel tessuto biologico: infatti L non corrisponde a d , distanza reale fra sorgente e rivelatore, e tiene in considerazione l'incremento del cammino dei

fotoni dovuto allo scattering tramite il DPF (Differential Pathlength Factor).
L'equazione 1.2.2.1 può quindi essere riscritta nella forma:

$$A \approx \varepsilon^\lambda \cdot c \cdot d \cdot DPF^\lambda + G^\lambda \quad (1.2.2.2)$$

dove i simboli indicano:

- G^λ termine che tiene in considerazione la geometria della misurazione
- d distanza sorgente-rivelatore reale
- DPF^λ termine adimensionale che viene calcolato sperimentalmente o numericamente per diversi tipi di tessuto

Se l'ipotesi semplificativa di assumere uno scattering elevato ma costante risulta effettivamente verificata, i parametri G^λ e DPF^λ possono essere considerati costanti; si riesce così a ricavare la variazione temporale di concentrazione del cromoforo sotto esame:

$$\Delta A = A_t - A_{t_0} = \varepsilon^\lambda \cdot \Delta c \cdot d \cdot DPF^\lambda \quad (1.2.2.3)$$

dove i simboli indicano

- A_t assorbanza ad un certo istante temporale t
- A_{t_0} assorbanza all'istante iniziale t_0

Dato che i principali cromofori che contribuiscono all'assorbimento nei tessuti biologici sono l'acqua, i lipidi, il citocromo-ossidasi e l'emoglobina, bisognerebbe tenere in considerazione il contributo di tutti all'attenuazione del fascio luminoso. Tuttavia, il contributo dell'emoglobina è di solito di almeno un ordine di grandezza maggiore, per cui la variazione di assorbanza, ad ogni lunghezza d'onda, viene considerata come la combinazione lineare dei soli contributi di HHb e HbO₂, considerati indipendenti:

$$\Delta A^\lambda = (\varepsilon_{HHb}^\lambda \cdot \Delta[HHb] + \varepsilon_{HbO_2}^\lambda \cdot \Delta[HbO_2]) \cdot d \cdot DPF^\lambda \quad (1.2.2.4)$$

dove i simboli indicano:

- $\varepsilon_{HHb}^\lambda$ e $\varepsilon_{HbO_2}^\lambda$ coefficienti di estinzione di deossiemoglobina e ossiemoglobina ad una particolare lunghezza d'onda

$\Delta[HHb]$ e $\Delta[HbO_2]$ variazioni di concentrazione di deossiemoglobina e ossiemoglobina

Essendo noti i coefficienti di estinzione dei due cromofori alle specifiche lunghezze d'onda, è possibile ricavare i valori della variazione temporale di concentrazione sia di HHb che di HbO₂ eseguendo una misura simultanea a due diverse lunghezze d'onda λ_1 e λ_2 :

$$\Delta[HHb] = \frac{\varepsilon_{HbO_2}^{\lambda_2} \frac{\Delta A^{\lambda_1}}{DPF^{\lambda_1}} - \varepsilon_{HbO_2}^{\lambda_1} \frac{\Delta A^{\lambda_2}}{DPF^{\lambda_2}}}{(\varepsilon_{HHb}^{\lambda_1} \varepsilon_{HbO_2}^{\lambda_2} - \varepsilon_{HHb}^{\lambda_2} \varepsilon_{HbO_2}^{\lambda_1}) \cdot d} \quad (1.2.2.5)$$

$$\Delta[HbO_2] = \frac{\varepsilon_{HHb}^{\lambda_1} \frac{\Delta A^{\lambda_2}}{DPF^{\lambda_2}} - \varepsilon_{HHb}^{\lambda_2} \frac{\Delta A^{\lambda_1}}{DPF^{\lambda_1}}}{(\varepsilon_{HHb}^{\lambda_1} \varepsilon_{HbO_2}^{\lambda_2} - \varepsilon_{HHb}^{\lambda_2} \varepsilon_{HbO_2}^{\lambda_1}) \cdot d} \quad (1.2.2.6)$$

La generalizzazione di questa formula per più di due lunghezze d'onda si può trovare nella referenza [8].

Le misure di variazione di concentrazione sono importanti, in quanto permettono di ricavare significativi parametri fisiologici, come le misure relative di volume ematico (bv) e di ossigenazione (oxy):

$$oxy = \Delta[HbO_2] - \Delta[HHb] \quad (1.2.2.7)$$

$$bv = \Delta[HbO_2] + \Delta[HHb] \quad (1.2.2.8)$$

Le tre ipotesi semplificative alla base della MBLL non sono in realtà quasi mai verificate in alcune applicazioni. Infatti non si può considerare il tessuto cerebrale o muscolare omogeneo; è stato dimostrato che nel muscolo, il tessuto adiposo, in base al suo spessore, può confondere le misure fNIRS e questo non viene tenuto in considerazione nella MBLL [9]. Per quanto riguarda il tessuto cerebrale, esso è composto da molti strati diversi, che vanno dalla pelle e dall'osso esterni, fino al fluido cerebrospinale, ai vasi sanguigni ed alla corteccia interni, tutti mezzi con proprietà e comportamenti diversi in presenza di radiazioni luminose: l'ipotesi di omogeneità non sussiste. Anche l'ipotesi di variazioni omogenee nel volume interessato dei parametri non è quasi mai verificata in tali situazioni. Per questo la MBLL non è in grado di fornire informazioni affidabili per la ricostruzione di immagini. Anche la terza ipotesi

(G^λ e DPF^λ costanti) viene meno nel caso di artefatti da movimento interno al tessuto, per esempio, cioè in presenza di eventuali modifiche geometriche.

Un altro problema che sorge ipotizzando che le variazioni dei parametri siano omogenee nel volume misurato, è che le variazioni di concentrazione dei cromofori sono sotto stimate. Si verifica infatti “l’effetto di volume parziale”, in quanto il volume all’interno del quale si misura la variazione del cromoforo è in realtà più grande dell’attuale volume in cui essa avviene. A ciò si aggiunge un altro problema: poiché tale volume campionato dipende dalle proprietà ottiche del mezzo, che a loro volta dipendono dalla lunghezza d’onda del fotone, e tale dipendenza non viene presa in considerazione nella MBLL poiché si assume DPF^λ costante, nelle misure con due lunghezze d’onda si generano errori di cross-talk, per cui i contributi alle variazioni di concentrazione dei singoli cromofori si mescolano e non risultano ben distinti [8]. Queste problematiche sono tutte presenti in modo molto accentuato nella strumentazione fNIRS CW; con le altre tipologie di fNIRS, invece, si riescono ad ottenere misurazioni più affidabili, soprattutto nella localizzazione del segnale.

Tenendo conto in maniera più dettagliata del cammino dei fotoni attraverso i vari tessuti biologici, Boas et al. in [10] hanno proposto un modello più sofisticato per la propagazione del fascio luminoso all’interno del cervello, con l’obiettivo di ridurre in tal modo gli errori di cross-talk. Tale modello si basa sull’equazione di diffusione dei fotoni e utilizza le equazioni di trasporto delle radiazioni per ottenere le informazioni di contorno necessarie. L’equazione di diffusione dei fotoni è la seguente (tutti i fattori dipendono da λ):

$$-D \cdot \nabla^2 \Phi(\mathbf{r}, t) + v\mu_a \Phi(\mathbf{r}, t) + \frac{\delta \Phi(\mathbf{r}, t)}{\delta t} = v \cdot S(\mathbf{r}, t) \quad (1.2.2.9)$$

dove i simboli si riferiscono a:

$\Phi(\mathbf{r}, t)$	flusso di fotoni al punto \mathbf{r} ed al tempo t , proporzionale all’intensità
$S(\mathbf{r}, t)$	distribuzione della sorgente di fotoni
$D = \frac{v}{3\mu_s}$	coefficiente di diffusione dei fotoni, con μ_s ’ coefficiente di scattering ridotto
$\mu_a = \epsilon^\lambda \cdot c$	coefficiente di assorbimento
v	velocità della luce nel mezzo

Assumendo l'ipotesi che la probabilità di scattering all'interno del mezzo è molto più alta di quella di assorbimento [4], questo modello descrive in modo accurato la migrazione della luce attraverso un mezzo con scattering elevato. Assumendo che le variazioni di concentrazione siano piccole ma globali, è possibile risolvere l'equazione di diffusione dei fotoni (1.2.2.9) e ottenere la variazione di assorbanza:

$$\begin{aligned} \Delta A &= -\log \frac{\Phi_{finale}}{\Phi_{iniziale}} = & (1.2.2.10) \\ &= \frac{1}{2} \left(\frac{3\mu'_s}{\mu_a^{iniziale}} \right)^{\frac{1}{2}} \left[1 - \left(1 + L(3\mu_s'^{iniziale} \mu_a^{iniziale})^{\frac{1}{2}} \right)^{-1} \right] (\varepsilon_{HHb} \Delta[HHb] \\ &+ \varepsilon_{HbO_2} \Delta[HbO_2]) d \end{aligned}$$

Se si confronta questa equazione con la MBLL (1.2.2.4), si può notare come quest'ultima sia adeguata per tessuti con proprietà ottiche uniformi nello spazio, quando la concentrazione dei cromofori non cambia in modo significativo. Dall'equazione 1.2.2.10 si ricava anche che il DPF dipende al coefficiente ridotto di scattering, dalla concentrazione iniziale di cromofori, dal coefficiente di estinzione e dalla distanza sorgente-rivelatore. In pratica, nella maggior parte delle applicazioni fNIRS, il DPF viene determinato empiricamente e viene trascurata la sua dipendenza da μ_a e d ; tale approssimazione è considerata valida anche perché sorgente e rivelatore risultano fermi rispetto ai tessuti della zona analizzata [3].

1.2.3 Tipologie di strumentazione fNIRS

Esistono diversi metodi di implementazione della fNIRS e fra questi i tre principali sono la spettroscopia ad onda continua (CW), quella risolta nel dominio del tempo (TD) e quella risolta nel dominio della frequenza (FD).

La prima a svilupparsi fu la CW fNIRS; la sorgente luminosa emette luce continuamente e ad ampiezza costante. Il sistema è in grado di misurare solo l'attenuazione in ampiezza subita dal raggio luminoso una volta uscito dal tessuto attraversato. La tecnologia CW può essere costruita con componenti facilmente reperibili sul mercato e ad un costo relativamente basso. Tuttavia, misurando solo variazioni relative di concentrazione dei cromofori rispetto al livello basale, non

permette di quantificare l'assorbimento basale e lo scattering subito dal fotone luminoso indipendentemente [3]. Per questo si svilupparono i sistemi TD e FD.

La spettroscopia risolta nel dominio del tempo prevede l'utilizzo di impulsi luminosi di durata molto breve (picosecondi) e la conseguente rilevazione della distribuzione temporale dei fotoni una volta emersi dal tessuto attraversato. Dalla forma della distribuzione temporale dei raggi luminosi in uscita è infatti possibile risalire alla misurazione dello scattering e dell'assorbimento subito dal fascio luminoso. Le latenze dei picchi, infatti, sono collegate al cammino medio seguito dai fotoni, che a sua volta dipende dai coefficienti di scattering. Dalla distribuzione temporale dei fotoni in arrivo si può costruire un istogramma, dal quale si possono anche ricavare informazioni riguardanti la profondità raggiunta dai fotoni sotto esame, in quanto è più probabile che un fotone che arriva più tardi abbia attraversato il tessuto ad una maggiore profondità. Dall'istogramma si possono anche ricavare i valori dei coefficienti di scattering e assorbimento: da questi si possono ricavare le variazioni di concentrazione dei cromofori. I sistemi TD hanno risoluzione spaziale maggiore rispetto ai sistemi FD e CW. Tuttavia, essi necessitano di tempi di acquisizione molto lunghi per ottenere un SNR accettabile, usano strumenti con un ingombro notevole ed un costo molto elevato (laser ultra veloci) e hanno bisogno di una stabilizzazione meccanica della strumentazione [3].

La spettroscopia risolta nel dominio della frequenza prevede invece l'utilizzo di una sorgente luminosa sempre attiva, come nella spettroscopia CW; tuttavia, l'ampiezza viene modulata con frequenze radio dell'ordine dalle decine alle centinaia di megahertz. Informazioni sullo scattering e l'assorbimento dei fotoni luminosi vengono dedotte dallo slittamento di fase e dall'attenuazione in ampiezza subito dal fotone in uscita in confronto a quello incidente. I sistemi FD hanno una risoluzione temporale superiore a quelli TD e un costo inferiore; tuttavia il loro costo è superiore a quello dei sistemi CW. Inoltre essi presentano un migliore SNR e consentono tempi di acquisizione più veloci. Rispetto ai sistemi TD, permettono di ottenere informazioni solo a determinate frequenze di modulazione; per avere le stesse informazioni fornite dai sistemi TD bisognerebbe analizzare il tessuto a tutte le frequenze. La maggior parte degli strumenti in commercio di questa tipologia sono di facile trasporto, con un buon SNR e sono a singola frequenza di modulazione di ampiezza [3].

I sistemi TD e FD permettono di determinare valori assoluti di concentrazione di HHb, HbO₂, dell'emoglobina totale (data dalla somma di HHb e HbO₂) e di saturazione

dell'ossigeno, cosa che il metodo CW non permette di ottenere. I vantaggi principali di queste due tipologie di fNIRS rispetto alla CW sono due: riescono a fornire valori quantitativi delle concentrazioni di emoglobina sia ossigenata che non, e non variazioni di concentrazione, e riescono a stimare in modo più accurato l'ossigenazione del tessuto cerebrale, in maniera indipendente dall'ossigenazione della pelle e della scatola cranica [4]. Tuttavia, la tecnologia correntemente più utilizzata e diffusa negli studi sul cervello è la CW fNIRS. Fra i motivi principali, vi sono il suo basso costo e la facilità di trasporto, implementazione ed uso rispetto alla TD e FD fNIRS, riuscendo comunque a mostrare una sensibilità notevole alle caratteristiche emodinamiche cerebrali [3].

Un'altra tipologia di fNIRS che permette di determinare valori assoluti di concentrazione di Hb e di saturazione dell'ossigeno è la spettroscopia risolta nel dominio dello spazio. Essa permette anche di superare il problema dell'accoppiamento fra sorgente o rivelatore e tessuto, accoppiamento che risulta essere molto sensibile alle variazioni temporali delle caratteristiche dei tessuti superficiali. Questa tecnica utilizza due o più rivelatori posizionati a diverse distanze dalla sorgente. Ipotizzando che l'accoppiamento superficiale sia uguale per ogni coppia sorgente-rivelatore, ne risulta che le misure di intensità luminosa emessa non dipendono da tale accoppiamento, essendo esso uguale in ogni posto, ma solo dalla distanza dalla sorgente. Un altro vantaggio di questa tecnica è il fatto che anche gli strati superficiali, come il cranio e lo scalpo, hanno la stessa influenza su tutti i fasci luminosi, per cui il loro contributo si annulla. La spettroscopia risolta nel dominio dello spazio permette di monitorare il rapporto tra le concentrazioni assolute di emoglobina ossigenata e di emoglobina totale. Questa misura non è altro che la media pesata dell'ossigenazione del sangue arterioso, venoso e capillare [4].

La posizione, il numero e la tipologia di sorgenti e detettori utilizzati dipendono da ciò che si vuole misurare. I primi esperimenti furono realizzati con un'unica coppia sorgente-rivelatore e ciò che si riusciva a misurare era una ristretta fascia di tessuto compresa fra i due. Poi si ampliò la quantità di coppie disposte sullo scalpo ed in questo modo aumentò la quantità di tessuto analizzato. Con l'introduzione dell'array di fibre ottiche, si è potuto arrivare ad acquisire mappe superficiali dei tessuti, grazie ad acquisizioni simultanee di più segnali fNIRS, ma anche immagini trasversali o 3D del tessuto tramite la DOT (tomografia ottica diffusiva). Il compito di ottenere immagini 3D del tessuto non è così semplice con la luce nel vicino infrarosso come nella TAC: gli algoritmi di retroproiezione usati in quest'ultima infatti non possono essere utilizzati, in

quanto la luce, nell'attraversare il tessuto, subisce un fenomeno di scattering molto importante e casuale, per cui non porta con sé informazioni spaziali sul volume attraversato [5]. La soluzione trovata comporta l'uso di una matrice di rivelatori che misura con grande risoluzione i fotoni riemersi ed elabora quest'informazione facendo uso dell'equazione di diffusione dei fotoni e delle equazioni di trasporto delle radiazioni, creando dei modelli statistici per l'interpretazione dei dati che tengono conto della disomogeneità e diffusività del mezzo [11].

La strumentazione fNIRS prevede l'utilizzo di una o più sorgenti luminose, che emettono fotoni a due o più diverse lunghezze d'onda, nel range fra i 600 e i 950 nm, in cui l'assorbimento da parte dei tessuti biologici è minimizzato. Dato che i fotoni devono penetrare per alcuni cm nella scatola cranica per raggiungere la corteccia cerebrale, la sorgente luminosa deve possedere la potenza necessaria per arrivare a questa profondità, per cui la maggior parte delle volte la sorgente è costituita da diodi laser. La luce emessa dalla sorgente è diretta verso una singola porzione di tessuto e viene rilevata una volta uscita da uno o più detettori posti in diverse posizioni. La minima distanza fra rivelatore e sorgente per avere una sensibilità accettabile e raggiungere la corteccia cerebrale, deve essere di almeno 2.5 cm (meno nei neonati poiché possiedono un scatola cranica meno spessa di quella degli adulti). Per ottenere un rapporto segnale-rumore accettabile, i rivelatori usati devono possedere un'alta sensibilità; quelli comunemente utilizzati sono i tubi fotomoltiplicatori, i fotodiodi e le camere CCD [3].

1.2.4 Applicazioni della fNIRS in letteratura

Numerosi sono gli ambiti in cui la fNIRS è stata studiata negli ultimi anni. Infatti, dai valori della variazione di concentrazione di ossi e deossi emoglobina, è possibile ricavare una moltitudine di parametri di interesse fisiologico, nonché mappe tessutali e immagini tridimensionali dei tessuti, che a volte non possono essere ottenuti con le altre tecniche di imaging e monitoraggio. Gli studi con la fNIRS si sono concentrati su due tessuti particolari: il tessuto cerebrale e quello muscolare. Tuttavia, le ricerche nel primo ambito hanno, per ora, ottenuto un maggior numero di successi. Il tessuto muscolare, infatti, è di più difficile indagine. Il cromoforo di interesse per valutare il metabolismo cellulare nel muscolo è il citocromo-ossidasi che, come si è già accennato, necessita di un più ampio range di lunghezze d'onda in quanto dà un contributo all'assorbimento di

un ordine di grandezza inferiore rispetto all'emoglobina. I risultati ottenuti per ora sono quindi poco accurati e c'è molto dibattito sulla loro validità.

Sul tessuto cerebrale (fig. 1.2.4.a), invece, la fNIRS è stata applicata per diversi scopi, che vanno dalla semplice ricerca all'applicazione clinica. In ambito neurochirurgico la fNIRS può rivelarsi molto utile. Uno studio di Calderon-Arnulphi et al. [12] ha dimostrato come la fNIRS possa essere un promettente strumento per la rilevazione di eventi ischemici nel cervello durante interventi di chirurgia neurovascolare. Infatti, il monitoraggio continuo dell'ossigenazione ha permesso di rilevare un decremento dell'ossiemoglobina e della saturazione dell'ossigeno ed un corrispettivo incremento della deossiemoglobina. Dunham et al. [13], invece, hanno correlato l'ossimetria cerebrale ricavata con la fNIRS con la perfusione cerebrale in pazienti con traumi cranici molto gravi. L'obiettivo in questa tipologia di pazienti è quello di ridurre il rischio di un danno secondario, che solitamente si manifesta alcuni giorni dopo il trauma principale sotto forma di ipossia o ipotensione e può portare all'ischemia cerebrale. Monitorando la perfusione cerebrale è possibile rilevare i pazienti a rischio ed intervenire tempestivamente. Tuttavia, in un altro studio, Lewis et al. [14] sono arrivati alla conclusione che monitorare l'ossigenazione cerebrale tramite fNIRS non dà risultati rilevanti in pazienti con danni interni alla scatola cranica e non esposti. Infatti, essi hanno rilevato che la saturazione dell'ossigeno ricavata con la fNIRS non mostrava significativi cambiamenti nell'ossigenazione, rilevati invece dalla saturazione dell'ossigeno nel bulbo venoso della giugulare. Altri studiosi, tuttavia, affermano che non si possa confrontare un valore ricavato con un metodo locale come la fNIRS con uno calcolato con un metodo globale, come appunto dalla giugulare.

La fNIRS è stata anche utilizzata come strumento per valutare la capacità di autoregolazione nel cervello da parte dei singoli soggetti: una normale circolazione sanguigna cerebrale infatti, ha la capacità di mantenere un flusso sanguigno costante nonostante la variazione della pressione di perfusione cerebrale. Msira et al. [15] hanno misurato la saturazione dell'ossigeno tramite la fNIRS in pazienti sofferenti di aterosclerosi nelle arterie carotidee e vertebrali ed in pazienti sani: quando il paziente passava da una posizione supina ad una eretta, il valore di saturazione dell'ossigeno decrementava in maniera consistente. Queste misurazioni possono essere molto importanti per diagnosticare queste malattie.

Un altro ambito in cui la fNIRS sembra essere molto promettente è nella diagnosi di emorragie intracraniche. E' stato infatti dimostrato che la fNIRS riesce a predire

ematomi subdurali ed epidurali addirittura prima di ogni altra tecnica; prima, ad esempio, di un aumento della pressione intracranica, o di un cambiamento nell' EEG o nell'immagine ricavata dalla TAC. Infatti, le masse di sangue uscito dai vasi assorbono fortemente la luce NIR per cui sono facilmente rintracciabili. Nonostante ciò, la fNIRS non è purtroppo ancora in grado di rilevare in modo affidabile ematomi che compaiono dopo operazioni neurochirurgiche o craniotomia [4].

Soller et al. [16] hanno messo le basi per la prosecuzione delle ricerche su un'altra interessante applicazione della fNIRS: la misura non invasiva del pH. Il loro studio ha infatti dimostrato l'esistenza di parti dello spettro dipendenti sia dalla saturazione dell'ossigeno che dal pH.



Fig. 1.2.4.a – Applicazione della fNIRS tratto da [50]

La fNIRS è una tecnica spettroscopica che ha delle caratteristiche che la rendono molto promettente nel campo della neonatologia [3] [7] (Fig. 1.2.4.b-c). Essa infatti è molto meno sensibile agli artefatti da movimento rispetto alle altre tecniche diagnostiche, come l'EEG o la fMRI, dove i pazienti sono costretti a rimanere immobili, altrimenti il segnale viene completamente coperto dal rumore creato dal movimento. Se ne deduce che queste tecniche non possono essere utilizzate sui neonati, a meno che questi non vengano sedati. Inoltre, la strumentazione fNIRS è facilmente trasportabile e leggera, e non prevede l'impiego di ambienti claustrofobici come lo scanner della MRI o della TAC o traccianti pericolosi come nella PET. Non stupiscono quindi i numerosi studi che utilizzano la fNIRS sui neonati; ottenere dei parametri utilizzabili in modo non invasivo, permette di studiare come il cervello si evolve e diagnosticare danni o problemi cerebrali sin dalla nascita, in modo da poter intervenire tempestivamente,

nonché valutare quantitativamente le funzioni cerebrali. Infatti, anche se il rapporto fra l'attività neuronale e quella vascolare nel cervello non è ancora totalmente compreso, gli esperimenti hanno mostrato che essi sono direttamente proporzionali: ad un aumento del flusso sanguigno, con conseguente aumento dell'ossigenazione locale, segue un aumento dell'attività neuronale. Rilevando quindi variazioni locali del flusso sanguigno e dell'ossigenazione, si possono dedurre la presenza o assenza di un'attività cerebrale e la sua localizzazione. Gli stimoli utilizzati sono di tipo uditivo, olfattivo, visivo o motorio passivo [7]. Ovviamente gli stessi stimoli e strumentazioni possono essere anche utilizzati su adulti e bambini, per valutare le loro funzioni cerebrali. Gli stimoli qui possono essere semplici come quelli dei neonati, come ad esempio ascoltare un suono e osservare un'immagine, o più complessi, come un task motorio attivo o un task cognitivo, da cui si possono dedurre importanti informazioni su, ad esempio, l'attenzione, la memoria, la capacità di pianificazione e ragionamento (Fig. 1.2.4.a).



Fig. 1.2.4.b-c – fNIRS in neonati e bambini tratte a [51] e [52]

Persone con gravi disabilità, come per esempio i malati di sclerosi multipla, hanno bisogno sempre di avere assistenza al loro fianco. Poter comunicare e controllare strumenti esterni senza dover sempre dipendere dagli altri potrebbe essere molto utile per questi pazienti. La motivazione principale allo sviluppo della BCI (Brain Computer Interface) è propria quella di permettere alle persone di comunicare ed accedere alla tecnologia solo tramite i loro processi mentali, senza dover utilizzare il sistema muscolare, che non funziona a causa della loro malattia. La fNIRS si presta come ottima strumentazione per tale scopo (Fig. 1.2.4.d). Il meccanismo utilizzato finora prevede la possibilità da parte dell'utente di dare due risposte, affermativa o negativa, in base al compito mentale da esso eseguito [17]. Per esempio, Naito et al. [18] hanno stabilito di usare attività mentali complesse, come un calcolo mentale o l'immaginazione di qualche

canzone, per la risposta affermativa, e attività rilassanti, come la conta delle pecore o il pensiero di un paesaggio, per la risposta negativa. Un interessante studio del 2008 di Luu e Chau [17] ha mostrato che tramite la fNIRS è possibile decodificare direttamente i segnali nervosi corrispondenti a specifiche decisioni. Essi hanno mostrato ai vari soggetti due figure di bevande per ogni trial e chiesto ad essi di valutare mentalmente quanto avrebbero desiderato bere le due bevande e decidere quale delle due avrebbero preferito. Il risultato dello studio afferma che è possibile capire la preferenza soggettiva delle varie persone tramite la fNIRS con un'accuratezza media dell'80%.



Fig. 1.2.4.d – Applicazione della fNIRS nella BCI tratto da [53]

1.3 Vantaggi e svantaggi della fNIRS rispetto ad altre metodologie di neuroimaging

Esistono tecniche consolidate e già utilizzate nella pratica clinica per ottenere immagini neurologiche funzionali che possano fornire informazioni qualitative e quantitative sulla fisiologia e sulle funzioni delle cellule e dei tessuti. Lo scopo è quello di relazionare l'attività neurologica da esse rilevata con delle specifiche funzioni eseguite. Interessante è quindi avere una panoramica delle tecniche più importanti in uso e, mostrando i loro vantaggi e svantaggi, capire perchè lo sviluppo della fNIRS è promettente e oggetto di numerosi studi e ricerche.

1.3.1 EEG e ERP

L'EEG è una tecnica che utilizza degli elettrodi posti sullo scalpo per misurare le variazioni di potenziale elettrico provenienti dallo strato superficiale della corteccia cerebrale. All'attività elettrica spontanea si sovrappongono specifici segnali legati a qualche compito sensoriale, motorio o cognitivo. Confrontando l'attività di base con le variazioni indotte dai vari compiti eseguiti è possibile ricavare le aree cerebrali di maggior attivazione durante questi compiti anche in tempo reale. Registrando contemporaneamente da più canali è possibile ricavare una mappa cerebrale, chiamata EEG topografico, rappresentante la distribuzione spaziale dell'attività elettrica.

L'EEG fu la prima tecnica con cui si riuscì a rilevare l'attività cerebrale. Hans Berger inaugurò il periodo clinico della metodica il 6 luglio 1924, quando registrò il primo elettroencefalogramma umano in uno dei suoi pazienti dell'ospedale di Jena, che un anno prima era stato sottoposto ad un intervento di trapanazione cranica. Fu proprio Berger l'autore della classificazione delle onde dell'EEG. Egli aveva notato che c'erano dei ritmi prevalenti e regolari all'interno del segnale, che comunque non si presentava periodico. Berger confrontò il segnale con diverse sinusoidi ed osservò, ad esempio, che, quando il soggetto giaceva su un lettino rilassato e con gli occhi chiusi, il tracciato era caratterizzato dalla successione regolare di onde a 10 cicli/sec, che lui chiamò onde alfa (frequenza 8-12 Hz, ampiezza 50÷60 μ V), le quali risultavano tra l'altro più ampie a livello occipitale. Infatti, l'input inviato dai neuroni quando la corteccia non è coinvolta in attività di pensiero, è lento e fasico; da qui il segnale con frequenza minore ed ampiezza maggiore. Tuttavia, non appena il soggetto veniva stimolato in qualche modo, le onde divenivano meno ampie e più frequenti; Berger chiamò queste ultime onde beta (frequenza 14÷30 Hz, ampiezza 2÷20 μ V). Infatti, quando la corteccia è impegnata nell'elaborazione di informazioni, molti neuroni vengono attivati, tuttavia in modo non sincronizzato; per questo motivo il segnale registrato ha frequenza maggiore ma ampiezza minore dei singoli segnali che lo compongono. Questa classificazione delle onde è tuttora usata ed è molto importante soprattutto nella diagnosi di epilessia, nella quale vi è la comparsa di alterazioni in queste onde. Nel 1938 alle onde alfa e beta si aggiunsero le onde delta (presenti nel sonno profondo, frequenza 0.5÷3.5 Hz, ampiezza 20÷100 μ V), in seguito agli studi dell'americano W.C. Walter, che le rilevò durante un intervento chirurgico nei tessuti immediatamente circostanti un tumore cerebrale. Egli scoprì pure le onde theta (presenti nei bambini dagli 1 ai 6 anni, oppure

nell'adulto se in stato di ipnosi o meditazione, frequenza 5÷7 Hz) [19] [20]. Grazie all'EEG un neurochirurgo, Penfield, riuscì a rappresentare l'"homunculus", stimolando elettricamente determinate aree corticali: esso riporta la corrispondenza fra punto stimolato della corteccia e muscolo conseguentemente attivato. Esistono sia l'homunculus sensorius che quello motorius, che evidenziano come i neuroni nella nostra testa non siano posizionati a caso, ma abbiano un ordine ben preciso (Fig. 1.3.1.a). Inoltre, la proiezione delle parti del nostro corpo in queste aree del cervello non è uguale per tutte: alcune aree sono proiettate su zone più grandi, altre su zone più piccole. Il segnale che si misura da ogni elettrodo posto sullo scalpo, non rispecchia ciò che accade nel punto preciso dove è posizionato, perché in mezzo vi è anche il cranio che fa da conduttore, ma rispecchia ciò che accade in una determinata e più ampia area sottostante. La scoperta della localizzazione funzionale dei neuroni è stata quindi molto importante, in quanto ciò permette di capire dove sono localizzate le eventuali lesioni nel cervello [21].

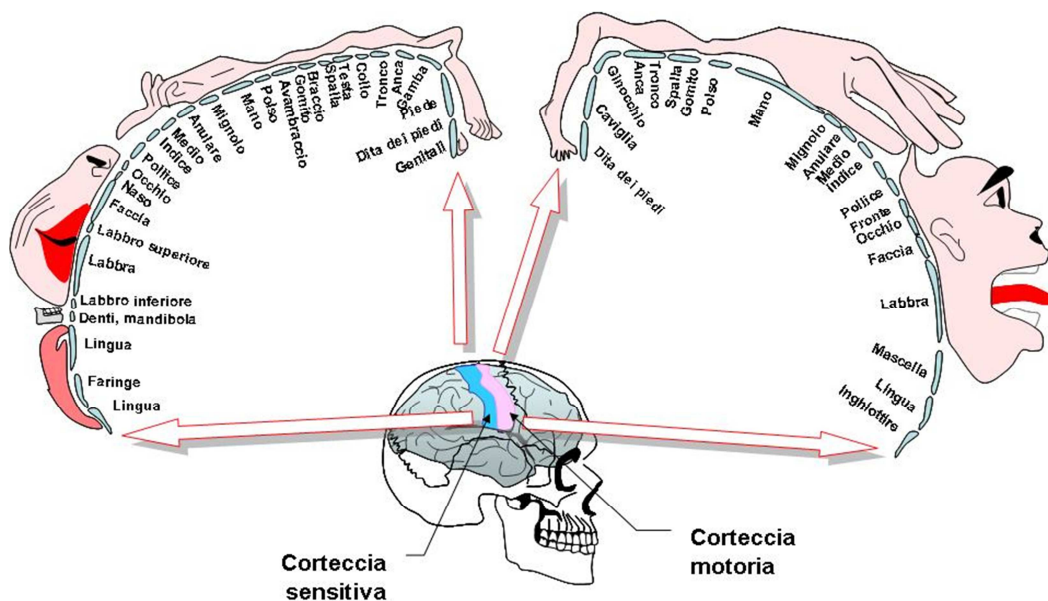


Fig 1.3.1.a – Homunculi motorius e sensorius, tratto da [54]

Dato che il segnale ricevuto dagli elettrodi posti sullo scalpo, non solo varia nel tempo, ma anche nello spazio, si dedusse che bisognava stabilire uno standard, in modo che la misura dell'elettroencefalogramma si riferisse alle stesse aree del cervello per tutti e che quindi si adattasse anche a pazienti con teste molto diverse fra loro. Così, per consentire il paragone di misure successive nello stesso soggetto, o il paragone di

misure in soggetti diversi, alla fine degli anni '40 è stato sviluppato un sistema internazionale, conosciuto come sistema internazionale 10-20. Gli elettrodi vengono posti sui punti di intersezione di immaginarie linee tracciate sul cranio partendo da specifici punti anatomici. La distanza fra elettrodi consecutivi è sempre pari al 10% o al 20% della lunghezza totale. Questo sistema garantisce una buona copertura di tutta la superficie encefalica e garantisce che gli elettrodi siano posizionati sempre sopra le stesse aree. La misura acquisita è una differenza di potenziale fra due elettrodi e di solito si prende un elettrodo di riferimento e si riferiscono ad esso tutte le misure: molto spesso si prende come riferimento l'elettrodo sull'orecchio oppure la media di tutti gli elettrodi. Ogni elettrodo viene identificato da un'etichetta comprendente una lettera (C per gli elettrodi centrali, Fp per i frontopolari, F frontali, T temporali, P parietali e O occipitali) ed un pedice, che può essere un numero o la lettera z. Il numero discrimina il lato sinistro (numeri dispari) da quello destro (numeri pari) ed ha valori più bassi in posizione mediale. La lettera z invece fa parte del label degli elettrodi situati sulla linea mediana interemisferica (Fig. 1.3.1.b).

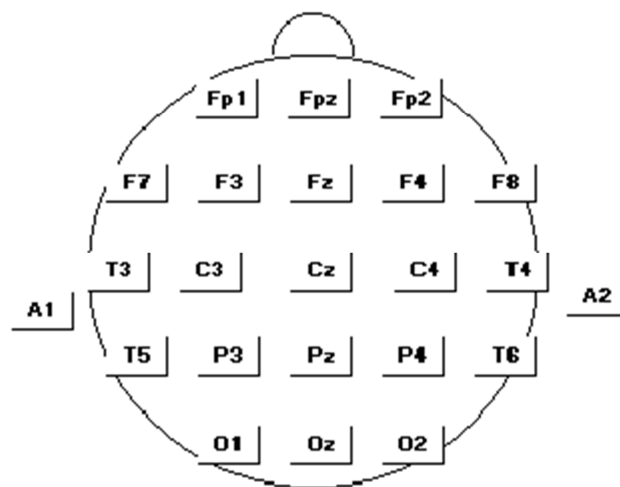


Fig. 1.3.1.b – Il sistema internazionale 10-20 tratto da [55]

L'elettroencefalografia è stata oggi giorno superata in molte applicazioni, tuttavia rimane fondamentale nella diagnosi di epilessia, nello studio delle fasi del sonno, nell'individuare e quantificare deficit dell'attività dell'encefalo, nello studio sugli effetti di farmaci, droghe e sulla meditazione ed infine nel monitoraggio durante l'anestesia: la più grande abilità degli anestesisti è riuscire a far rimanere il paziente in una fase a

cavallo fra la veglia ed il sonno, e ciò è possibile grazie all'EEG che essi osservano e dal quale deducono la dose di anestetico da utilizzare.

Un'applicazione molto importante dell'EEG, utile sia a localizzare i deficit funzionali in pazienti neurologici che a descrivere il decorso temporale dei processi cognitivi, è l'analisi dei potenziali evento-relati (ERP). Il soggetto viene stimolato con segnali di tipo sensoriale (come ad esempio stimoli acustici, visivi, ecc.) e il potenziale elettrico generato in seguito a tale stimolazione, a livello del sistema nervoso centrale o periferico, viene registrato. Essi forniscono una descrizione temporale accurata della sottostante attività cerebrale.

L'EEG, come la fNIRS, permette un'acquisizione indolore e non invasiva del segnale cerebrale. Ha un'ottima risoluzione temporale, dell'ordine del ms, confrontabile con quella della fNIRS, tuttavia la sua risoluzione spaziale è peggiore, dell'ordine del cm, e questo è lo svantaggio principale dell'esame elettroencefalografico. Gli elettrodi, infatti, registrano la corrente che arriva da tutta la zona sottostante e non da un singolo punto, per cui non è possibile risalire all'esatta localizzazione della sorgente di tale corrente. Con l'EEG è possibile quindi avere informazioni solo a livello dei lobi cerebrali attivati. L'acquisizione elettroencefalografica risente degli artefatti da movimento, per cui il soggetto deve stare fermo il più possibile (molto complicato soprattutto nei bambini), cosa invece a cui la fNIRS risulta più immune. Inoltre nella fNIRS l'applicazione delle fibre ottiche non richiede come nell'EEG l'uso della pasta abrasiva; un semplice meccanismo a molla che garantisca il contatto può essere sufficiente. Infatti, il problema dell'accoppiamento fra la sorgente e il rivelatore e il cuoio capelluto è un problema meno vincolante nella spettroscopia nel vicino infrarosso, perché come spiegato precedentemente, si ha lo stesso contributo su tutte le coppie sorgente-rivelatore [7].

1.3.2 PET e SPECT

La PET (tomografia ad emissione di positroni) è una tecnica di imaging che iniziò a svilupparsi negli anni '70. La procedura di analisi prevede che degli isotopi instabili vengano incorporati chimicamente in molecole attive a livello metabolico (come per esempio l'acqua o il glucosio o precursori di specifici neurotrasmettitori) e che questo tracciante venga poi iniettato nel flusso sanguigno. L'ossigeno e il glucosio marcati

tendono ad accumularsi nelle aree metabolicamente più attive e vengono inglobati in vari organi e regioni in modo selettivo. Quando l'isotopo instabile decade, viene emesso un positrone, che si annichila con un elettrone, producendo così una coppia di fotoni gamma che vengono emessi in direzioni opposte (180 gradi di differenza) [2]. L'apparecchiatura che rileva questa coppia di fotoni si chiama gamma camera ed è situata attorno alla testa del paziente. Un evento viene rilevato solo se i due fotoni colpiscono la gamma camera in posizioni distanti 180 gradi l'una dall'altra entro un intervallo compreso in una finestra temporale di coincidenza che va dai 4 ai 10 ns. Se ciò avviene, vuol dire che l'evento è accaduto lungo la linea che unisce i due rivelatori. Questi sono disposti solitamente ad anello intorno all'organo di interesse, per cui, grazie ad una tecnica di retroproiezione e a misure da tutti questi detettori, è possibile ricostruire una rappresentazione tridimensionale della distribuzione dell'isotopo radioattivo nella zona studiata [22]. E' quindi possibile ottenere non solo una valutazione qualitativa dei parametri funzionali ma anche una loro stima quantitativa.

La SPECT (Single-Photon Emission Computerized Tomography) è simile alla PET. Anch'essa richiede l'iniezione di un tracciante radioattivo (come per esempio lo ^{133}Xe), o la sua inalazione, ma, al contrario della PET, è direttamente questo tracciante che produce dei fotoni gamma che vengono rilevati dalla gamma camera che si muove velocemente attorno alla testa del soggetto [2] [22].

La PET è utilizzata molto in cardiologia, neurologia ed oncologia. Una scintigrafia miocardica è in grado di valutare la perfusione del miocardio e la grandezza di un'eventuale infarto miocardico [22]. In oncologia, la PET è molto utile nella segnalazione della presenza di tumori e del loro stadio, evitando così la biopsia. In neurologia, è stata utilizzata nello studio dell'epilessia, dei tumori del cervello (i tumori sono zone metabolicamente più attive, quindi la concentrazione di glucosio e ossigeno marcati sarà maggiore in quelle regioni), dell'ictus e di malattie come il Parkinson, l'Alzheimer e la sindrome di Dawn.

I traccianti utilizzati hanno un'emivita (definita come il tempo necessario affinché la metà degli atomi di un campione puro dell'isotopo decadano) molto breve. Questa caratteristica ha uno svantaggio ma anche un vantaggio. Un'emivita breve richiede che il tracciante sia prodotto in loco, cioè che sia presente un ciclotrone nel luogo dove si svolge l'esame. Tuttavia, poiché il tracciante decade in un tempo molto breve, le radiazioni subite dal paziente sono ridotte. Inoltre, la maggior parte dei processi metabolici sotto indagine ha una durata breve, per cui la riuscita dell'esame è assicurata.

L'uso dei traccianti può comunque essere pericoloso: possono sorgere problemi di allergia o intolleranza al tracciante e, nonostante le radiazioni a cui il paziente è sottoposto siano limitate grazie alla breve emivita, sono comunque presenti, al contrario della fNIRS che invece non impiega nessun tipo di radiazioni ionizzanti.

Anche la PET e la SPECT sono molto sensibili agli artefatti da movimento, al contrario della fNIRS. Inoltre, il paziente è obbligato a giacere supino su un lettino, mentre durante l'acquisizione fNIRS il soggetto sotto esame può avere libertà di movimento o essere seduto su una sedia. Un altro svantaggio della strumentazione PET e SPECT è uno dei principali motivi che l'hanno resa presente solo in poche strutture sanitarie, è il suo alto costo, derivato anche dall'obbligo di produzione locale del tracciante, nonché dalla necessità di avere sempre personale specializzato per l'acquisizione. Al contrario, la strumentazione fNIRS è molto semplice da trasportare ed utilizzare e presenta un costo molto più contenuto. Anche le informazioni che si possono ricavare con le due tecniche sono differenti. Infatti, mentre con la PET o la SPECT ciò che si può misurare sono il flusso sanguigno, il volume ematico ed il consumo di glucosio, con la fNIRS si possono ottenere informazioni sia sulla concentrazione assoluta di ossiemoglobina che di deossiemoglobina separatamente. La risoluzione spaziale della fNIRS è leggermente migliore di quella della PET, così come la sua risoluzione temporale. La PET, inoltre, fornisce scarsi riferimenti anatomici; per questo motivo è spesso utilizzata insieme con la TAC o la MRI [7].

1.3.3 fMRI

La risonanza magnetica funzionale (fMRI) offre per ora il miglior approccio validato a livello clinico per la visualizzazione delle funzioni cerebrali basandosi sul metabolismo locale. L'fMRI si basa sul fatto che l'emoglobina nel sangue possiede la capacità di distorcere leggermente le proprietà di risonanza magnetica possedute dai nuclei di idrogeno situati nelle sue vicinanze; il grado di distorsione dipende e cambia in base al fatto che l'emoglobina sia ossigenata o no [2]. Il principio di funzionamento è identico a quello della risonanza magnetica tradizionale (in fig. 1.3.3.a un esempio della strumentazione utilizzata). Quando il corpo umano viene posto all'interno di un forte campo magnetico, tutti i protoni che si trovano all'interno del corpo (il 60% del corpo umano è composto da acqua) orientano il loro asse di rotazione in modo che risulti il più

possibile parallelo al campo magnetico. La rotazione da essi descritta produce un'orbita a forma di cono. Quando un breve impulso a radio frequenza, con la stessa frequenza posseduta dai protoni in rotazione, viene applicato esternamente, i protoni ne assorbono l'energia. Subito dopo, essi rilasciano l'energia ad una certa velocità, che dipende da quanto strettamente erano legati ai componenti chimici del tessuto. La misura che si effettua è quella dei tempi di rilassamento T1 e T2 e ciò viene fatto per ogni voxel (un volume parziale del corpo) cosicché un'immagine può essere ricostruita unendo i vari pixel che rappresentano i vari voxel [22].



Fig. 1.3.3.a – Uno scanner MRI tratto da [56]

Quando un'area cerebrale viene attivata da uno specifico compito (di natura sensoriale, motoria, visiva, cognitiva ecc.), essa necessita di un maggiore apporto di ossigeno; la microcircolazione sanguigna cerebrale risponde con un aumento del flusso sanguigno ricco di ossigeno nella zona attiva. Questi cambiamenti nella concentrazione di ossigeno e flusso sanguigno comportano dei cambiamenti chiamati BOLD (Blood Oxygenation Level-Dependent) nel segnale di risonanza magnetica. La fMRI sfrutta quindi il segnale BOLD che dipende dal bilancio fra consumo e apporto di ossigeno nella zona cerebrale attiva [2]. L'emoglobina ossigenata, infatti, essendo diamagnetica, provoca un aumento del segnale fMRI rilevato, che quindi simboleggia un aumento dell'attività cerebrale. L'emoglobina deossigenata invece, essendo paramagnetica, provoca dei campi magnetici locali che interrompono l'omogeneità del campo magnetico esterno, con una conseguente diminuzione del segnale registrato (in fig.

1.3.3.b un esempio di immagine ottenuta con la fMRI: le aree colorate sono quelle di attivazione).

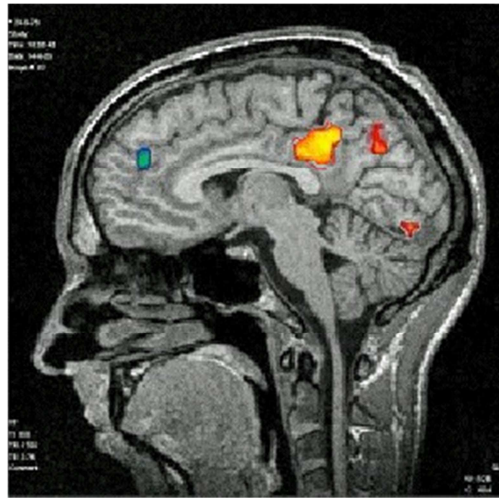


Fig. 1.3.3.b – Un esempio di immagine acquisita con la fMRI tratto da [57]

L’fMRI è emersa come la tecnologia di scelta per sondare sia la struttura che le funzioni del cervello umano, soprattutto per comprenderne i suoi meccanismi neurofunzionali. Essa viene anche utilizzata nel planning pre-chirurgico. L’fMRI è per ora la tecnica più affidabile, per cui viene considerata uno standard di riferimento con cui tutti gli altri metodi di neuroimaging devono confrontarsi. Infatti, essa condivide il vantaggio della fNIRS di non utilizzare radiazioni ionizzanti, ma segnali intrinseci al cervello. Grazie a ciò, molte e ripetute scansioni possono essere effettuate sullo stesso individuo, cosa invece non praticabile con la PET. Tuttavia, in questo modo aumenta il tempo richiesto per il singolo esame. Grazie all’uso di particolari sequenze di magnetizzazione, l’intero cervello può essere scandito in 1-2 secondi, garantendo alla fMRI una risoluzione temporale superiore a quella degli altri metodi di imaging funzionale ma inferiore a quella della fNIRS. La risoluzione spaziale della fMRI (2-3 mm), risulta essere al contrario superiore di quella della fNIRS (1-2 cm) [2]. Uno svantaggio dell’uso del segnale BOLD come parametro principale è che esso è un segnale con andamento molto lento, che quindi non riesce a seguire le rapide dinamiche temporali che caratterizzano i processi cognitivi. Fra tutte le tecniche di imaging, la fMRI è quella maggiormente sensibile agli artefatti da movimento (spostamenti di soli 3 mm annullano l’esame in quanto il segnale utile è sovrastato completamente dal rumore). Per cui il paziente, al contrario della fNIRS, deve rimanere costantemente fermo, per di più in un ambiente claustrofobico come può essere lo scanner della fMRI,

per un periodo di tempo piuttosto lungo, potendo durare l'esame dai 15 minuti alle 2 ore. Si può capire da ciò come tale tecnica sia difficilmente utilizzabile sui bambini e su soggetti con patologie come la schizofrenia o il morbo di Parkinson che hanno difficoltà nel controllare il proprio corpo e nel comprendere l'utilità dell'esame. Altri svantaggi della fMRI sono il basso rapporto segnale-rumore e la necessità di eseguire più scansioni per poter ottenere le informazioni desiderate. Come la PET ed al contrario della fNIRS, anche la strumentazione fMRI è molto costosa ed ingombrante e richiede che il paziente sia steso in posizione supina sul lettino. Un ulteriore svantaggio è l'impossibilità di utilizzare questa strumentazione su certe categorie di pazienti, come i portatori di pacemaker o protesi metalliche, o coloro che necessitano di respirazione assistita con bombole di ossigeno metalliche. Infatti, ogni oggetto ferromagnetico verrebbe attratto dal campo magnetico con gravi rischi per il paziente [22]. Da un punto di vista dei parametri funzionali, la grande differenza fra fMRI e fNIRS, che spiega il motivo del crescente interesse verso quest'ultima, è che mentre la prima fornisce valori relativi delle variazioni emodinamiche tramite il segnale BOLD, la seconda è potenzialmente in grado di fornire i loro valori assoluti e soprattutto separare il contributo di emoglobina ossigenata e deossigenata, cosa che il segnale BOLD non riesce a fare [7].

1.3.4 Altri vantaggi e svantaggi della fNIRS

Come è emerso nel confronto con la PET, l'EEG e la fMRI, grande è la versatilità della fNIRS e numerosi sono i vantaggi che il suo uso apporta. Primo fra tutti la libertà di movimento e la possibilità di eseguire l'esame in qualsiasi posizione il paziente sia e non in un ambiente ristretto come con la fMRI e la PET. La strumentazione fNIRS inoltre è facilmente trasportabile, di facile utilizzo (non richiede personale altamente specializzato) e meno costosa rispetto alle altre ed è l'unica tecnica che permette di monitorare e rilevare parametri emodinamici cerebrali al letto del paziente, senza doverlo far muovere. In tal modo molti soggetti impossibilitati ad essere esaminati con la fMRI o la PET, come i portatori di protesi metalliche o i neonati o gli schizofrenici, possono essere invece analizzati con essa. Da evidenziare fra i vantaggi anche l'assoluta non invasività e pericolosità di questa metodica, rispetto ai rischi biologici esistenti

nelle altre tecnologie (traccianti radioattivi), cosa che consente maggiormente l'utilizzo di questa strumentazione con i neonati e i bambini.

Come già notato, non solo la fNIRS fornisce informazioni in tempo reale e continue sui parametri emodinamici cerebrali, ma ha la potenzialità di ricavare i valori assoluti delle concentrazioni di HHb e HbO₂ in maniera distinta, cosa che nessun'altra tecnica di imaging è finora stata in grado di fornire.

La risoluzione temporale della fNIRS dipende dalla strumentazione utilizzata; solitamente è di alcuni ms ed è migliore di quella della fMRI. La risoluzione spaziale va considerata sia nel piano parallelo alla superficie del cervello, considerando cioè la distanza sorgente-rivelatore, sia nel piano perpendicolare, ossia calcolando la profondità. Entrambe le tipologie di risoluzione spaziale dipendono dalla posizione reciproca di sorgente e rivelatore e dal tipo di strumentazione. Come precedentemente rilevato, la risoluzione orizzontale della fNIRS (1-2 cm) è lievemente migliore di quella della PET, ma peggiore di quella della fMRI. Situazione analoga si riscontra per la risoluzione verticale, che per la fNIRS è all'incirca di 1 cm. Al contrario di fMRI e PET, che permettono di ottenere informazioni su tutte le sezioni del cranio con uguale risoluzione, la fNIRS permette per ora di ottenere solo informazioni riguardanti ristrette zone della corteccia cerebrale.

Purtroppo la fNIRS possiede anche altri svantaggi. Il rapporto segnale-rumore è soggettivo; esso infatti varia in base allo spessore del cranio (all'aumentare dello spessore aumenta anche l'effetto di assorbimento e scattering) ed al colore dei capelli (i capelli neri assorbono maggiormente la luce infrarossa rispetto a quelli biondi). Tuttavia, essa è meno sensibile agli artefatti da movimento in confronto alle altre metodiche.

Un altro vantaggio della fNIRS è che essa non interferisce con le altre strumentazioni, ad esempio campi magnetici ed elettrici, per cui può essere utilizzata insieme a queste altre metodiche in tecniche di coregistrazione, per ottenere, ad esempio, informazioni strutturali e morfologiche che la fNIRS da sola non può fornire, essendo essa unicamente una tecnica funzionale. Molto spesso infatti, le nuove tecniche di imaging proposte risultano complementari più che sostitutive alle precedenti. Ecco l'importanza della coregistrazione, che permette di sfruttare simultaneamente le diverse informazioni ricavabili con diverse metodiche [3]. Data la diversità fra le strutture anatomiche e le localizzazioni dei diversi tessuti tra vari soggetti, si capisce come sia importante sovrapporre per esempio i risultati morfologici ed anatomici ottenuti con la

MRI a quelli funzionali ottenuti con la fNIRS, in modo da avere la certezza su quali tessuti e posizioni sia stata eseguita la misura. Inoltre, usando più tecniche, si possono sfruttare le caratteristiche positive di ognuna, per esempio l'alta risoluzione temporale dell'EEG con l'elevata risoluzione spaziale della fMRI. La coregistrazione è anche utilizzata per validare le varie metodiche. Registrando simultaneamente con differenti tecnologie lo stesso parametro, o parametri diversi ma correlati, è possibile verificare la correttezza delle nuove metodiche e la loro affidabilità. La fNIRS è stata validata usando per esempio l'EEG o la fMRI come tecniche di confronto e riferimento. E' stata dimostrata, per esempio, una buona correlazione fra i dati fMRI e fNIRS in soggetti giovani ed anziani durante compiti motori [23].

2 Caratteristiche del segnale fNIRS e problemi aperti

2.1 Risposta emodinamica e componenti di disturbo

Il segnale acquisito durante l'esperimento è stato trasformato in variazioni temporali della concentrazione di ossi e deossiemoglobina con la MBLL descritta nel paragrafo 1.2.2. Dal segnale grezzo così ottenuto non si riesce ad osservare nessuna risposta emodinamica, perché il rumore che si sovrappone è troppo grande (vedi fig. 2.1.a). Per questo è necessaria una pre-elaborazione del segnale, prima di poter interpretare la risposta emodinamica e trarre delle conclusioni.

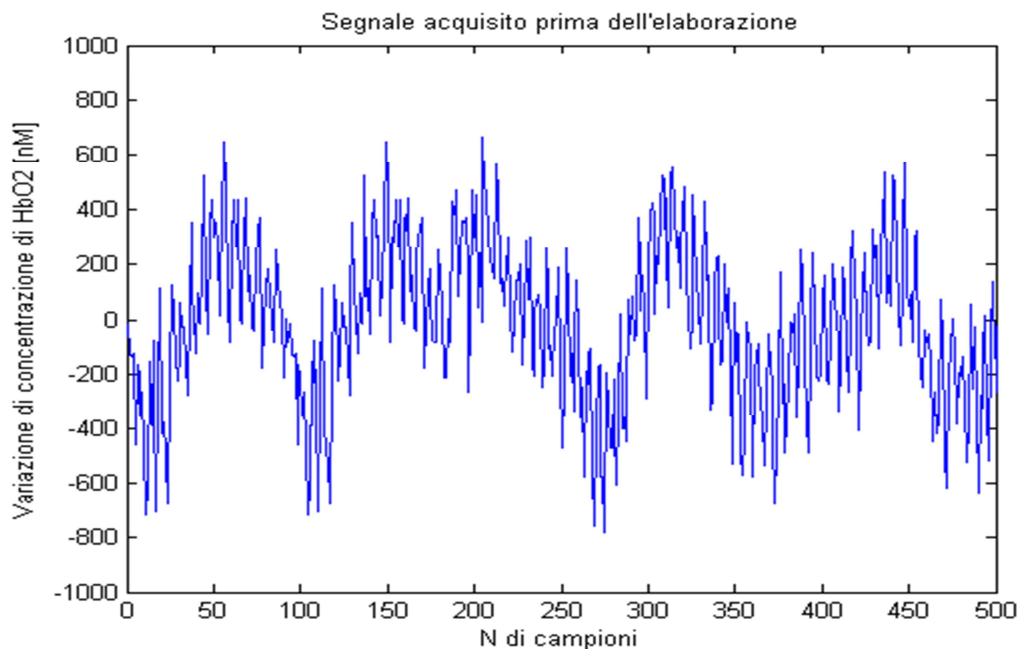


Fig. 2.1.a – Segnale acquisito grezzo, prima di qualsiasi elaborazione

Il segnale ottenuto dallo strumento fNIRS è composto dalla risposta emodinamica, da oscillazioni fisiologiche, da artefatti da movimento e da rumore di misura, tutte componenti con ampiezze e frequenze molto diverse.

La risposta emodinamica è stata studiata con la risonanza magnetica funzionale, per cui ha un andamento conosciuto, simile a quello in figura 2.1.b. Nell'ambito fMRI, per risposta emodinamica (di seguito denominata anche HRF, Hemodynamic Response Function) si intende la variazione temporale del segnale BOLD dovuta ad una variazione dell'attività cerebrale conseguente a qualche stimolo. Sono stati creati alcuni modelli matematici che descrivono la HRF ed uno dei più diffusi è quello che la

rappresenta come una combinazione di due funzioni gamma opportunamente dimensionate (modello canonico, vedi fig. 2.1.b).

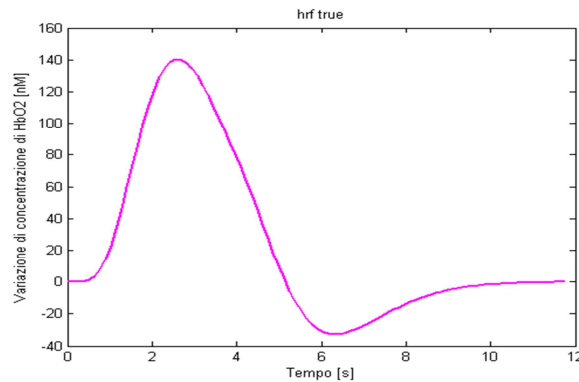


Fig. 2.1.b – Risposta emodinamica attesa, modello canonico

Con la fNIRS sono ottenibili sia la variazione di concentrazione nel tempo dell'emoglobina ossigenata, che di quella deossigenata, per cui sono due i segnali di risposta emodinamica che si ottengono. Ci si aspetta che essi abbiano l'andamento mostrato in figura 2.1.c: durante lo svolgimento di un compito, il segnale che rappresenta l'emoglobina ossigenata aumenterà, poiché maggiore è l'apporto di ossigeno nella zona attiva, mentre l'andamento dell'emoglobina deossigenata risulterà opposto, con un suo decremento nello stesso lasso temporale. Generalmente, l'andamento della risposta emodinamica è sempre simile a quello in figura 2.1.c; tuttavia, in base al tipo di stimolo utilizzato e alla zona analizzata, parametri come il valore di picco, la latenza di picco e la FWHM (larghezza a metà del massimo) possono variare. La HRF ha una frequenza che dipende dal paradigma sperimentale; nel nostro caso è compresa fra 0.062 e 0.089 Hz.

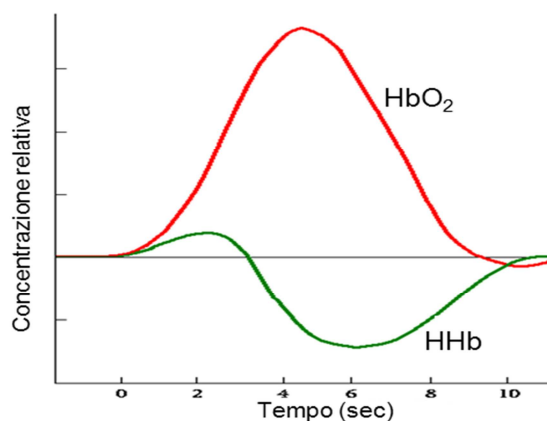


Fig. 2.1.c – Risposta emodinamica attesa per HbO₂ e HHb

In seguito ad uno stimolo di qualsiasi tipo, i neuroni attivati consumano l'ossigeno trasportato dall'emoglobina; da ciò deriva un aumento del flusso di sangue (CBF-Cerebral Blood Flow) verso la zona attiva, e quindi un conseguente aumento del volume di sangue (CBV-Cerebral Blood Volume). L'aumento del flusso sanguigno è così elevato rispetto al reale consumo di ossigeno ed immediato, che inizialmente nella zona attiva si verifica un aumento della concentrazione di ossiemoglobina e una conseguente diminuzione di deossiemoglobina. Le variazioni di HHb e HbO₂ infatti sono dipendenti dal bilancio fra l'apporto di ossigeno ed il suo consumo nella zona analizzata. Una volta terminata l'attività dei neuroni richiedenti l'apporto di ossigeno, il flusso sanguigno cerebrale diminuisce molto più rapidamente del volume ematico, causando un undershooting nel segnale, che successivamente ritorna ai valori basali di concentrazione.

Le oscillazioni fisiologiche presenti nel segnale misurato, che nel nostro caso si sommano alla HRF e sono quindi da considerarsi come rumore, sono solitamente dovute a quattro distinte componenti: il battito cardiaco, la frequenza respiratoria, l'onda di Mayer e delle oscillazione a bassissime frequenze [28]. La frequenza della pulsazione cardiaca è solitamente di 60 battiti al minuto (circa 1 Hz), ed il battito cardiaco è rappresentabile con una senoide con frequenza pari a quella cardiaca e ampiezza che oscilla fra ± 500 nM. Il suo andamento sinusoidale pseudo-costante la rende una componente facilmente osservabile ad occhio nudo, considerando anche la diversità in frequenza con la HRF. Anche la componente respiratoria è assimilabile ad una senoide, con frequenza però inferiore a quella cardiaca (solitamente intorno a circa 0.2 Hz), ma dipendente dal paradigma sperimentale e dal soggetto, ed ampiezza simile a quella cardiaca. La componente di Mayer è molto lenta, avendo una frequenza solitamente compresa fra 0.04 e 0.15 Hz [29], molto simile a quella della risposta emodinamica, e possiede un'ampiezza maggiore di quella della HRF attesa nel nostro esperimento, per cui si tratta di una componente difficilmente eliminabile dal segnale senza intaccare la risposta emodinamica. Le oscillazioni a bassissima frequenza (VLFO, Very Low Frequency Oscillations), hanno solitamente frequenza inferiore a 0.1 Hz, arrivando anche a frequenza di 0.004 Hz, e compaiono solitamente come dei trend particolari, che possono essere costanti, crescenti o decrescenti.

Il rumore di misura che compare in ogni acquisizione ha un andamento casuale e indici statistici, come varianza e media, molto variabili, sia fra soggetti che fra canali di acquisizione. Il rumore proveniente dall'ambiente è facilmente riducibile nella fNIRS;

infatti, essa non è soggetta alle interferenze elettriche di rete, che invece compaiono nei metodi che sfruttano i campi magnetici ed elettrici [30]. L'unica precauzione da prendere per ridurre il rumore proveniente dall'ambiente è quella di svolgere le acquisizioni in una stanza non eccessivamente luminosa, in modo che la luce esterna non interferisca con quella nel vicino infrarosso sui rivelatori.

Infine, gli artefatti da movimento che possono comparire sono solitamente dovuti allo spostamento relativo di sorgente o rivelatore rispetto al cuoio capelluto oppure a movimenti del soggetto come uno sbadiglio. Talvolta questi artefatti sono ben distinguibili, avendo valori di concentrazione improponibili o comparendo come improvvisi abbassamenti o diminuzioni del segnale; molto spesso, invece, hanno un andamento difficilmente distinguibile e complicano la corretta stima della HRF.

2.2 L'onda di Mayer

La componente di Mayer o onda vasomotrice, come precedentemente detto, è una delle componenti del rumore fisiologico che si somma alla risposta emodinamica acquisita dalla fNIRS. Essa possiede una frequenza compresa tra 0.04 e 0.15 Hz, ed è quindi simile a quella della HRF. Inoltre, nel caso di paradigmi che, come quello qui utilizzato, prevedono stimoli visivi, la componente di Mayer presenta un'ampiezza (range di circa ± 500 nM) molto superiore a quella della HRF. Per questo motivo l'onda di Mayer si è rivelata una componente molto ostica da eliminare e un'interessante tematica di studio, perché, senza la sua eliminazione, difficilmente si possono ottenere dalla fNIRS segnali correttamente interpretabili. La componente di Mayer è una nuova sfida per gli studiosi, in quanto essa non compariva negli studi fMRI. E' infatti dimostrato che essa è molto attenuata quando il soggetto si trova in posizione sdraiata, rispetto a quando è in piedi o seduto, situazioni nelle quali essa è invece predominante [3] (vedi fig. 2.2.a). Negli studi fMRI, quindi, dove il soggetto è in posizione supina, tale componente risulta avere un'ampiezza molto ridotta.

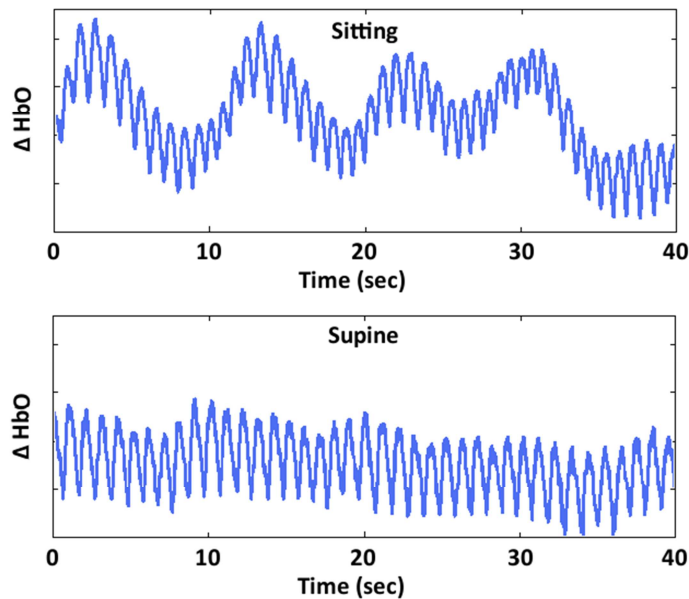


Fig. 2.2.a – Esempi di acquisizioni di segnale fNIRS relative a variazioni di concentrazione di HbO_2 , in soggetti posti in posizione seduta e supina: si nota la presenza predominante della componente di Mayer nel soggetto posto in posizione seduta. Tratto da [3]

L'esatta origine dell'onda vasomotrice è sconosciuta [31], ma si crede che essa sia legata ad oscillazioni dovute alla pressione sistemica del sangue. L'ipotesi più accreditata è che quest'onda sia generata da oscillazioni del tono vascolare causate da cambiamenti locali nella contrazione dei muscoli lisci delle pareti vascolari, modifiche non correlate con la frequenza respiratoria o cardiaca [7].

Fu Ludwig Traube, un medico tedesco co-fondatore della patologia sperimentale in Germania, che per primo notò questo fenomeno nel 1865. Nel 1869 Karl Ewald Konstantin Hering, un fisiologo tedesco, confermò la presenza di queste oscillazione. Simili oscillazioni furono successivamente osservate anche da Siegmund Mayer, un fisiologo e istologo tedesco, nel 1876. Questa componente fisiologica osservata fu conseguentemente chiamata "onda di Traube-Hering-Mayer" ed è ora conosciuta semplicemente come onda di Mayer, ricordando solo l'ultimo dei tre scienziati che per primi la osservarono.

L'onda di Mayer presenta tre caratteristiche: è spontanea, cioè è presente anche in assenza di stimoli, è molto lenta, per cui è differenziabile dalla frequenza cardiaca e respiratoria, che sono più veloci, ed è modulabile, cioè può venire modificata in condizioni patologiche o sotto l'effetto di alcuni farmaci [31]. La componente di Mayer è stata studiata da molti ricercatori, sia nel modello animale sia nell'uomo. Si è scoperto che solitamente tale componente viene amplificata durante gli stati di attivazione del

sistema nervoso simpatico. Infatti, registrando simultaneamente la pressione arteriosa (AP) e l'attività nervosa simpatica (SNA) in animali e uomini in stato di veglia, si è rilevata la presenza di oscillazioni spontanee in entrambi i segnali, con frequenze inferiori a quella respiratoria. Un'analisi di coerenza ha mostrato che queste oscillazioni in alcune bande di frequenza risultano molto correlate nei due segnali: è stato quindi proposto di definire come onda di Mayer quelle oscillazioni della pressione arteriosa, con frequenza inferiore a quella respiratoria, che mostravano il più alto grado di coerenza con le oscillazione trovate nella SNA. Negli esseri umani, la banda di frequenza che soddisfaceva tale richiesta era quella intorno a 0.1 Hz. La componente di Mayer è anche chiamata onda vasomotrice; infatti, sembra che essa sia creata da un'oscillazione del tono vasomotore simpatico. E' stato dimostrato sperimentalmente che utilizzando bloccanti alfa-adrenergici, che causano un rilassamento della muscolatura liscia, anche l'onda di Mayer viene attenuata, arrivando a volte addirittura a scomparire [32].

La frequenza e la portata cardiaca vengono regolati da un centro nervoso, il centro cardiovascolare (CV), situato nella medulla allungata. Questo centro controlla anche altri sistemi di feedback negativo, che agiscono tramite ormoni o nervi, e che aiutano a regolare la pressione ed il flusso sanguigno locali. Alcuni neuroni del centro CV regolano la frequenza cardiaca, altri il diametro dei vasi sanguigni, altri la contrattilità dei ventricoli. La loro azione può essere sia inibitoria (ad esempio con la vasodilatazione) che stimolante (per esempio con la contrazione dei muscoli delle pareti vascolari). Un'altra funzione del centro cardiovascolare è quella di spedire continuamente impulsi ai muscoli lisci che si trovano nelle pareti dei vasi sanguigni, attraverso dei nervi chiamati vasomotori. Alcuni neuroni facenti parte del sistema simpatico vengono stimolati da questi impulsi e li propagano fino ad arrivare a stimolare la muscolatura liscia delle arteriole nelle viscere e nelle aree periferiche. Il risultato è la presenza di un tono vasomotore, cioè un costante e moderato stato di vasocostrizione, che stabilisce il livello basale della resistenza vascolare sistemica [33]. Sembra che siano proprio oscillazioni in questo tono vasomotore l'origine dell'onda di Mayer.

Una particolarità dell'onda di Mayer è che, all'interno di una data specie, essa risulta quasi costante; negli esseri umani è stato dimostrato che essa non dipende nè dall'età, nè dal sesso [32].

Se la frequenza dell'onda di Mayer risulta costante all'interno di una data specie, la stessa conclusione non può essere tratta per la sua ampiezza. Essa infatti varia notevolmente nel tempo addirittura nello stesso individuo. Negli esseri umani sembra che esista una relazione positiva fra l'ampiezza della componente di Mayer, la forza della corrispondente oscillazione del sistema nervoso simpatico ed il livello medio della SNA. Tuttavia, altri esperimenti hanno rilevato che questa dipendenza ha una riproducibilità limitata addirittura all'interno dello stesso soggetto se si considera un periodo di tempo molto lungo ed è assente se si considerano gruppi di individui [32].

La funzione dell'onda vasomotrice non è ancora del tutto chiara. Lo stimolo sentito dai barocettori viene convertito in veloci oscillazioni della SNA, le quali contribuiscono a stabilire il livello del tono vasocostrittore simpatico delle pareti dei vasi sanguigni, contribuendo così al mantenimento della pressione arteriosa. E' stato proposto che l'onda di Mayer potrebbe dare il via alla liberazione di monossido di azoto dall'endotelio attraverso cambiamenti ciclici nella tensione della parete vascolare, con una conseguente diminuzione dell'ampiezza dell'onda [32].

Il principale problema che l'onda di Mayer apporta nell'utilizzo della fNIRS per lo studio del cervello è proprio la sua sovrapposizione in frequenza con la risposta emodinamica. E' chiaro come un semplice filtro passabanda non possa essere utilizzato per eliminare questo rumore fisiologico, perché esso modificherebbe anche la HRF, modificando e togliendo parte del segnale utile. In letteratura questo problema è stato affrontato in vari modi, che saranno descritti nel prossimo paragrafo. Per ora nessuno di questi è riuscito a dare risultati davvero soddisfacenti, soprattutto a livello di single trial, per cui molto lavoro è ancora richiesto per risolvere tale problema. Alcuni metodi hanno ottenuto risultati molto promettenti, ma talvolta si è reso necessario qualche espediente (come per esempio acquisire il segnale con il soggetto in posizione supina) per ottenere dei risultati accurati. Dopo una revisione dei principali metodi utilizzati, verrà descritto il metodo da noi proposto.

2.3 Principali metodi proposti in letteratura per l'attenuazione delle componenti di rumore

I principali metodi utilizzati in letteratura per la diminuzione delle componenti fisiologiche, fra cui quella di Mayer, verranno trattati di seguito, con una breve descrizione delle loro caratteristiche e dei rispettivi vantaggi e svantaggi.

2.3.1 Filtraggio in frequenza

Il più semplice filtraggio, e per questo anche il più utilizzato, prevede l'applicazione di un semplice filtro in frequenza, di tipo passabasso, al segnale acquisito. Jaszewski et al. [34] hanno utilizzato questo metodo nel loro studio sulle differenze nella HRF in esperimenti coinvolgenti uno stimolo visivo ed uno motorio. La frequenza di taglio da essi utilizzata è di 1 Hz. I soggetti erano in posizione supina durante il task motorio mentre erano seduti durante quello visivo. Gli autori hanno mediato tutti i trial acquisiti nelle due condizioni (1440) per stimare la risposta emodinamica.

Anche Franceschini et al. in [35], hanno utilizzato un filtraggio passabasso nella pre-elaborazione del segnale. In questo esperimento i dati erano acquisiti con la DOT. I soggetti erano in posizione supina e i periodi di stimolazione e riposo avevano durata prefissata e costante (20 secondi). La frequenza di taglio utilizzata per il filtraggio passabasso è di 0.5 Hz, in modo da eliminare la frequenza cardiaca. Il segnale inoltre è stato anche filtrato con un filtro passa-alto, con frequenza di cut-off di 0.02 Hz, per eliminare le derive lente presenti.

Il filtraggio passabasso è un metodo molto semplice e diretto per elaborare il segnale, che non richiede né un alto carico computazionale né una difficile implementazione. Esso è molto efficace nel rimuovere le pulsazioni cardiache dal segnale; tuttavia, le altre componenti fisiologiche del rumore (frequenza respiratoria, onda di Mayer e oscillazioni alle basse frequenze) permangono e non possono essere eliminate, in quanto i loro spettri di frequenza si sovrappongono a quello della risposta emodinamica.

2.3.2 Sottrazione di una forma d'onda media adattata

Questo metodo fu utilizzato da Gratton e Corballis in [36], per esempio, con lo scopo di attenuare la componente cardiaca dal segnale registrato con la fNIRS senza alterare la risposta emodinamica. Gli autori tennero in considerazione il fatto che l'ampiezza del battito, nonché l'intervallo fra battiti successivi, possono variare nel tempo. Il metodo consisteva nel segmentare il segnale registrato in intervalli in cui comparisse un singolo battito alla volta, poi allungare tale intervallo interpolando linearmente i dati aggiunti e infine mediare i singoli intervalli. Per tenere in considerazione la diversità fra il segnale medio ed ogni singolo battito, gli autori ricompressero la forma d'onda media in modo che avesse la stessa lunghezza dell'intervallo sotto analisi, praticarono una regressione del segnale medio contro il segnale contenuto nell'intervallo del singolo battito e poi sottrassero il segnale così ottenuto da quello contenuto nell'intervallo del singolo battito. Il risultato è la rimozione del battito cardiaco dal segnale registrato dalla fNIRS. Il vantaggio di questo metodo è un raddoppio del rapporto segnale-rumore e sicuramente la rimozione del battito cardiaco dal segnale registrato; tuttavia, tutte le altre frequenze fisiologiche non vengono eliminate e queste sono quelle che influenzano maggiormente il segnale, in quanto l'HRF possiede una frequenza molto simile a queste ultime più che a quella cardiaca.

2.3.3 Filtro adattivo per rimuovere la componente cardiaca

Un altro metodo per eliminare la componente cardiaca è quello utilizzato da Morren et al. in [37]. Tramite un pulsossimetro legato alla mano opposta a quella che si muoveva durante l'esperimento, gli autori hanno acquisito la frequenza cardiaca del soggetto durante tutta la durata dell'esperimento. Questo segnale è stato utilizzato come riferimento del rumore e dato in ingresso ad un filtro adattivo; l'uscita del filtro viene poi sottratta dal segnale fNIRS acquisito, che contiene sia la HRF che la frequenza cardiaca. In tal modo il segnale rimanente dovrebbe contenere solo la risposta emodinamica. Lo svantaggio principale di questo metodo è lo stesso del metodo precedente, ovvero viene ridotta solo la frequenza cardiaca, ma non le altre componenti fisiologiche del rumore. Inoltre, la frequenza cardiaca acquisita con un pulsossimetro posizionato sulla mano, non necessariamente coincide con quella rilevata dalla fNIRS

nel cervello. Infatti l'onda di pressione che parte dal cuore ad ogni battito, impiega un tempo diverso a raggiungere le varie parti del corpo. Per cui il segnale acquisito in tal modo potrebbe non essere quello ottimo per la riduzione della componente cardiaca dal segnale fNIRS.

2.3.4 Adaptive GLM (General linear model)

Il GLM canonico è stato spesso utilizzato nell'analisi della fMRI e anche alcuni studi su dati fNIRS lo hanno adottato. Abdelnour et al. in [38] hanno proposto una versione tempo variante (adaptive appunto) del canonico GLM con lo scopo di stimare la HRF da dati fNIRS in tempo reale in ogni trial. Il loro metodo sfrutta il filtro di Kalman per il calcolo dei coefficienti del modello. L'ipotesi alla base del GLM è che le variazioni emodinamiche sono linearmente additive: il segnale che si acquisisce è la somma di tutte le componenti prima descritte e del rumore di misura. Il modello richiede di definire una forma a priori per la HRF e quella canonica solitamente utilizzata è una combinazione lineare di funzioni gamma-varianti modificate. Il segnale acquisito con la fNIRS è molto rumoroso, per cui al modello descritto precedentemente vengono aggiunte linearmente anche delle sinusoidi, alle specifiche frequenze del rumore fisiologico (per esempio 0.1 Hz per l'onda di Mayer, 0.25 Hz per quella respiratoria e 1 Hz per quella cardiaca). La fase e l'ampiezza di queste sinusoidi è adattabile, cosicché si può adattare al rumore presente nel trial. Il vettore di stato del modello con le componenti da stimare è tempo variante e viene stimato tramite il filtro di Kalman esteso. Il filtro di Kalman, che ha come input il segnale acquisito con la fNIRS, stima lo stato di un processo rumoroso aggiornandolo ricorsivamente: la stima della HRF ad ogni istante temporale è la combinazione pesata della storia precedente e dei nuovi dati correnti. Il vantaggio dell'adaptive GLM è che permette di stimare la variabilità dinamica dell'attività cerebrale su single-trial. Inoltre, non mantiene la forma canonica della HRF stabilita all'inizio fissa, ma la utilizza solo come un prior da cui ci si può successivamente scostare. Anche il rumore aggiunto al modello è adattabile in base alle circostanze e non fisso. Tuttavia, numerosi sono anche gli svantaggi, primo fra tutti la necessità di stabilire un prior sia per la HRF che per il rumore atteso. Il filtro inoltre va allenato prima dell'inizio dell'esperimento, in modo che possa partire con delle buone stime iniziali. Questo aumenta notevolmente i tempi richiesti per

l'esperimento. In aggiunta, il filtro richiede una stima iniziale della variabilità fra le varie prove della risposta emodinamica, e questa informazione non sempre è disponibile. Oltre a ciò, la forma a priori utilizzata per la HRF deriva da studi fMRI e non è ancora chiaro se tale forma rispecchi sia la deossiemoglobina che l'ossiemoglobina; sembra anzi che, mentre la prima abbia una forma molto simile, la seconda sia molto differente.

2.3.5 Principal component analysis (PCA)

Scopo primario di questa tecnica è la semplificazione dei dati, riducendo il numero più o meno elevato di variabili che li descrivono in un numero limitato di variabili latenti. Queste ultime permettono una separazione di tutte le componenti del segnale che presentano caratteristiche diverse tra loro. Zhang et al. lo hanno utilizzato per esempio in [39] per analisi di dati acquisiti tramite la DOT. La caratteristica che gli autori volevano sfruttare, notata nei dati acquisiti, era la diversità nel comportamento spaziale del segnale locale desiderato rispetto al rumore fisiologico di fondo. L'ipotesi matematica alla base di questa tecnica è l'ortogonalità fra il sotto-spazio dell'interferenza fisiologica e quello dell'attivazione cerebrale dovuta allo stimolo. Gli autori hanno calcolato il sotto-spazio del rumore da dati basali acquisiti prima dello stimolo, ipotizzando che in questi dati l'interferenza fosse predominante (non essendoci alcun stimolo), e che invece durante uno stimolo il rumore fisiologico possa risultare accoppiato con la frequenza di stimolazione, rendendo così difficile separare il sotto-spazio dell'attivazione indotta dallo stimolo da quello dell'interferenza fisiologica. Essi hanno ipotizzato anche che il rumore di fondo fosse uguale sia nei dati acquisiti senza stimolo che in quelli con lo stimolo. L'interferenza stimata dai dati acquisiti nel periodo di pre-stimolo tramite la tecnica PCA è poi usata per attenuare il rumore nei dati con la HRF. Il principale svantaggio di questa tecnica è quello di basarsi su un'ipotesi che per ora non ha trovato nessuna base fisiologica: l'attivazione cerebrale infatti non è necessariamente ortogonale alle componenti spaziali calcolate dal rumore fisiologico durante l'acquisizione nel periodo di pre-stimolo.

2.3.6 Sottrazione diretta di una forma d'onda non attivata

L'uso di questa tecnica è stato scientificamente validato nel 2007 da Saager and Berger in [40], che hanno dimostrato come l'emodinamica del cervello e del cranio possa essere descritta con un modello a due strati sostanzialmente omogenei. In generale, questa tecnica prevede l'acquisizione di un segnale non contenente la risposta emodinamica e, dopo averlo aggiustato con varie tecniche, la sua sottrazione dal segnale contenente la HRF, in modo da isolare quest'ultima.

Franceschini et al. in [35] hanno utilizzato un punto non attivato (pixel), lontano dall'area cerebrale attivata dal paradigma sperimentale e assunto tale pixel come rappresentante del rumore fisiologico sistemico presente nell'acquisizione, considerato omogeneo in tutto il cranio. Essi hanno sottratto le variazioni di concentrazione di emoglobina di quel pixel a quelle misurate in tutti gli altri pixel ed isolato così in questi ultimi la risposta emodinamica.

Saager e Berger [40], invece, hanno acquisito dati con la fNIRS ponendo i rivelatori a due distanze diverse dalla sorgente, sfruttando il fatto che la profondità raggiunta dal fascio di raggi nel vicino infrarosso dipende dalla distanza fra sorgente e rivelatore. In tal modo, posizionando un dettore vicino alla sorgente, il segnale acquisito è relativo al solo strato superficiale del cranio e non raggiunge la corteccia, mentre il segnale acquisito da quello più lontano contiene sia il segnale cerebrale che quello proveniente dal cranio. Identificando il segnale acquisito con il rivelatore più vicino come rappresentante del rumore fisiologico, considerato omogeneo in tutto il cranio, si può, tramite una sottrazione pesata, eliminare l'interferenza dal segnale acquisito dal rivelatore più lontano. Gli autori hanno utilizzato un fit ai minimi quadrati come tecnica per scalare il segnale rappresentante il rumore e aggiustarlo in modo da poterlo sottrarre al segnale contenente la HRF. E' stata stimata una rimozione del 60% del segnale acquisito dal rivelatore più lontano. Come gli stessi autori confermano, questa percentuale è più alta rispetto a quella riportata in letteratura finora [40] [41]. Questo metodo è molto promettente, tuttavia le tecniche usate finora per aggiustare il segnale rilevato dal dettore più vicino non sono risultate ottime. Ad esempio, l'alta percentuale di segnale rimossa da Saager and Berger potrebbe essere dovuta al fatto che, facendo un fit ai minimi quadrati del segnale rumoroso su quello contenente anche la risposta emodinamica, c'è il rischio di introdurre nel segnale solo rumoroso anche una parte di risposta emodinamica e successivamente sottrarla da se stessa, eliminando così

parte del segnale utile. L'utilizzo del canale di riferimento (il canale vicino alla sorgente) sembra comunque essere molto promettente; i risultati ottenuti con il suo utilizzo, finora, sono migliori di quelli in cui il segnale è acquisito da un unico canale contenente la risposta emodinamica. Il prossimo metodo descritto, nonché quello da noi implementato, prevedono l'utilizzo del canale di riferimento.

2.3.7 Adaptive filtering

Questo metodo, ideato da Zhang et al. nel 2007 [28], risulta il più promettente fra quelli proposti, avendo ottenuto i migliori risultati. Questa tecnica prevede l'utilizzo di rivelatori posti a diversa distanza dalla sorgente (quello più vicino, posto a 1.5 cm, è il canale di riferimento che acquisisce il segnale relativo al cranio ed al cuoio cappelluto, mentre quello più distante, posto a 4.5 cm rileva il segnale relativo a cuoio cappelluto, cranio, materia bianca, fluido cerebrospinale e risposta emodinamica) e di un filtro adattivo. L'obiettivo è usare la misura ricavata dal rivelatore più vicino alla sorgente come riferimento da dare come input al filtro adattivo, che la trasforma in una stima del rumore fisiologico presente nel segnale acquisito dal rivelatore più distante, dal quale questa stima viene poi sottratta, ottenendo così l'HRF. Gli autori non fanno altro che assumere una mappa lineare tra l'emodinamica esistente nello strato superficiale del cranio (acquisita con il canale di riferimento) e l'interferenza globale presente nella misura acquisita con il detettore più lontano. Il filtro adattivo riesce a ottimizzare questa mappa lineare punto a punto. Il filtro usato dagli autori è un filtro FIR e i coefficienti vengono aggiornati con l'algoritmo ai minimi quadrati di Widrow-Hoff. Il filtro adattivo necessita di un pre-training per poter acquisire una buona stima iniziale dei coefficienti. Per valutare la bontà del metodo gli autori utilizzano il CNR (Contrast to Noise Ratio), definito come la radice quadrata del rapporto fra la potenza del segnale e quella del rumore. La potenza del segnale viene calcolata integrando la PSD (Power Spectral Density) nella banda di frequenze attorno alla frequenza della risposta emodinamica, mentre per ottenere la potenza del rumore, l'integrale è calcolato su tutto lo spettro esclusa la banda di frequenza della HRF. Studi di simulazione confermano l'efficacia di questo metodo, dimostrando un significativo incremento del CNR dopo l'adaptive filtering ed eliminando circa l'80% della variabilità del segnale. Tuttavia, in questi studi di simulazione, gli autori hanno deciso di simulare solo la frequenza

cardiaca e quella respiratoria come componenti del rumore da eliminare, e non l'onda di Mayer [28]; è quindi da valutare l'efficacia di questa tecnica in presenza di questa componente. Anche negli studi in vivo gli autori hanno acquisito i dati in soggetti posti in posizione supina, posizione che diminuisce notevolmente la componente di Mayer nel segnale acquisito [42]. Nonostante ciò, in uno studio dove un solo soggetto viene analizzato in posizione seduta, gli stessi autori dimostrano l'efficacia del metodo anche nella rimozione dell'onda vasomotrice [43]. È tuttavia da valutare la bontà del metodo in diverse situazioni e su più soggetti per la rimozione di questa componente fisiologica. Inoltre, gli autori hanno sempre eseguito gli esperimenti con un periodo costante di stimolazione, seguito da un periodo di riposo di 15 secondi, stratagemma che permette un ottimale utilizzo del filtro adattivo, ma che quasi mai è possibile utilizzare nei reali esperimenti psicologici per motivi di affaticamento dei soggetti ed abitudine (le aree cerebrali che si attivano durante compiti che si ripetono identici per molto tempo modificano il loro tipo di attivazione, rendendo complicata l'interpretazione dei segnali acquisiti).

Questi studi hanno dimostrato anche che le variazioni ricavate dallo strato superficiale sono le maggiori componenti dell'interferenza globale, garantendo quindi l'efficacia dell'uso del canale di riferimento. Inoltre, gli autori affermano che questa tecnica che usa il canale di riferimento dà risultati positivi (un miglioramento del CNR) solo se c'è correlazione fra l'interferenza globale presente nel segnale contenente anche la risposta emodinamica ed il segnale acquisito dal canale di riferimento. Se tale correlazione è bassa, il CNR addirittura diminuisce se viene applicato l'adaptive filtering. Per calcolare questa correlazione gli autori calcolano il coefficiente di Pearson su dati acquisiti in una fase di riposo su entrambi i canali: questo, come il pre-training per il calcolo delle stime iniziali dei coefficienti del filtro, aumenta il tempo dell'esperimento. Tuttavia, gli autori sostengono che questo metodo sia applicabile anche in real-time. Negli esperimenti su soggetti reali, gli autori riportano un miglioramento medio del CNR del 60%. Il metodo appare quindi molto promettente e i risultati molto buoni; tuttavia, esso è efficace solo nelle situazioni in cui c'è una correlazione superiore al 60% fra il segnale acquisito nel canale di riferimento e quello acquisito nel canale normale. Inoltre, non è ancora dimostrata efficacemente la sua validità in presenza della componente di Mayer.

2.3.8 La media coerente

Qualsiasi tecnica venga applicata per la pre-elaborazione del segnale, comunque, per ottenere una risposta emodinamica interpretabile viene eseguita, alla fine, una media coerente o averaging convenzionale, tecnica comunemente utilizzata anche negli studi fMRI. Il segnale registrato viene diviso in piccole porzioni, chiamati trials o sweeps, della durata di una decina di secondi ciascuna. Ogni trial corrisponde al segnale registrato dopo la presentazione al soggetto di uno stimolo (e.g visivo, motorio, uditivo). La HRF viene stimata mediando i trials corrispondenti a stimoli identici.

Le ipotesi alla base di questo metodo sono che la HRF sia un segnale deterministico, con andamento identico in tutti i trials e che si esaurisca prima dell'inizio del trial successivo, mentre che il rumore (considerato come somma di tutte le componenti del segnale esclusa la risposta emodinamica) sia un segnale casuale, con media nulla e varianza σ^2 , stazionario durante tutto l'esperimento e non correlato con la HRF. Dagli N trials acquisiti $y_i(t)$, la media $y_m(t)$ può quindi essere scritta:

$$y_m(t) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N y_i(t) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (u_i(t) + v_i(t)) = u(t) + \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N v_i(t) \quad (2.3.8.1)$$

dove i simboli indicano:

$u_i(t)$ risposta emodinamica nel trial i -esimo

$v_i(t)$ rumore nel trial i -esimo

$u(t)$ risposta emodinamica deterministica, supposta uguale in tutti i trials

Si può quindi considerare $y_m(t)$ come una stima della risposta emodinamica $u(t)$; grazie infatti alle proprietà statistiche assunte come ipotesi, il suo valore atteso coincide proprio con $u(t)$:

$$E[y_m(t)] = E[u(t)] + \frac{1}{N} E[\sum_{i=1}^N v_i(t)] = u(t) \quad (2.3.8.2)$$

La media coerente è quindi uno stimatore non polarizzato; infatti essa fornisce in media proprio la risposta emodinamica voluta.

Per valutare la precisione della stima, si calcola la varianza dell'errore di stima:

$$e(t) = y_m(t) - u(t) \quad (2.3.8.3)$$

$$Var[e(t)] = E \left[\left(\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N v_i(t) \right)^2 \right] = \frac{1}{N^2} E[\sum_{i=1}^N v_i^2(t)] = \frac{\sigma^2}{N} \quad (2.3.8.4)$$

Per $N \rightarrow \infty$ $\text{Var}[e(t)] \rightarrow 0$: la precisione di stima è direttamente proporzionale al numero di trials acquisiti. Stessa relazione sussiste fra N e SNR (Signal-to-Noise Ratio):

$$SNR^{(N)} = \frac{E_{segn.utile}^{(N)}}{E_{rumore}^{(N)}} = \frac{E_{segn.utile}^{(1)}}{\frac{E_{rumore}^{(1)}}{N}} = N \cdot SNR^{(1)} \quad (2.3.8.5)$$

La media coerente è una tecnica molto utilizzata in casi in cui è possibile acquisire un elevato numero di trials (più di 100), come per esempio, in studi che si basano sui potenziali evocati, i quali hanno una breve durata (alcune centinaia di microsecondi). Purtroppo, in studi riguardanti la risposta emodinamica non è possibile acquisire un numero elevato di trials e quindi avere una stima accurata del segnale utile. Questo, infatti, ha una dinamica molto più lenta dei potenziali evocati ed inoltre per rispettare l'ipotesi che la HRF debba essere esaurita nel trial successivo, è richiesta una durata dei trials di almeno una decina di secondi. Il lasso temporale in cui l'esperimento avviene, non può essere comunque allungato eccessivamente, in quanto entrano in gioco fenomeni come l'abituazione o la stanchezza che possono modificare i risultati altrimenti ottenibili. Da qui, la difficoltà di ottenere una stima accurata della risposta emodinamica, dato il numero limitato di trials a disposizione. Inoltre, le ipotesi alla base dell'averaging convenzionale, non sono quasi mai verificate nella realtà. Non è corretto considerare la risposta emodinamica un segnale deterministico, in quanto sue variazioni sono possibili anche se il soggetto è sottoposto sempre allo stesso stimolo. Non è corretto nemmeno considerare il rumore come un processo stazionario e a media nulla per tutta la durata dell'acquisizione, a causa delle oscillazioni fisiologiche precedentemente descritte ed a causa di possibili variazioni della posizione di sorgenti e detettori (e quindi del loro accoppiamento ottico). Tuttavia, la media coerente è una tecnica semplice, facile da implementare e con un carico computazionale molto basso: questi motivi la rendono la tecnica attualmente più utilizzata.

2.4 Problemi aperti e scopo della tesi

Dalla presentazione, nei paragrafi precedenti, dei vari metodi usati in letteratura e dei rispettivi vantaggi e svantaggi, se ne deduce come il problema della stima della HRF sia ancora aperto. In particolare, non si è riusciti, per ora, ad attenuare la componente di Mayer sufficientemente in modo da riuscire a stimare accuratamente la

risposta emodinamica. La difficoltà maggiore, quindi, è ridurre il rumore alle basse frequenze, che si sovrappone alla frequenza della risposta emodinamica.

Lo scopo della tesi, di conseguenza, è proprio quello di cercare di ridurre tale tipologia di rumore, per migliorare la qualità del segnale fNIRS. In particolare, si propone un nuovo algoritmo che, per identificare l'artefatto da rimuovere, sfrutta il segnale acquisito da un canale di riferimento, che per ipotesi riflette le componenti di rumore presenti nel segnale fNIRS acquisito da un normale canale, ma non la risposta emodinamica. Il nuovo algoritmo sarà testato su dei dati simulati e successivamente si valuteranno le sue prestazioni su dei dati reali acquisiti come descritto nel capitolo 3.

Questa tesi si pone all'interno di un più ampio progetto coinvolgente la fNIRS. Già precedentemente un nuovo algoritmo per la stima della HRF media, che usava un approccio bayesiano invece che la solita media convenzionale, è stato proposto da Garbin in [5]. Idealmente, si vorrebbe riuscire, in un vicino futuro, a porre le due tecniche in cascata, riducendo la componente di Mayer con il nuovo algoritmo proposto in questa tesi (l'approccio bayesiano infatti fallisce in questo compito), per poi applicare l'approccio bayesiano per ottenere una stima della HRF con un numero di trials inferiore a quello richiesto dalla media convenzionale.

3 Data Base

3.1 Dati reali

3.1.1 Il paradigma sperimentale

Gli esperimenti sono stati realizzati presso il Cognition and Language Laboratory del Dipartimento di Psicologia della Sviluppo e della Socializzazione dell'Università di Padova nella primavera 2010, dal gruppo di ricerca del Professore Dell'Acqua. Gli esperimenti sono stati condotti su 7 studenti dell'Università degli Studi di Padova, con il loro consenso informato. Tutti i soggetti erano maschi, destrorsi e con una visione normale o corretta da lenti.

L'esperimento è stato effettuato usando la realtà virtuale; i soggetti durante l'acquisizione indossavano degli occhiali che creavano il mondo virtuale ed erano seduti su una sedia. Gli occhiali sono stati montati su un casco da ciclista, del quale è stata mantenuta solo la montatura esterna, per consentire così di appoggiare la cuffia della strumentazione fNIRS sulla zona del cranio desiderata. La parte della corteccia sotto esame è la zona parieto-occipitale, che è la responsabile dell'elaborazione dell'informazione acquisita nello spazio.

Lo scopo dell'esperimento era valutare la presenza o assenza di una differenza nel segnale cerebrale fra la situazione in cui il soggetto biseca una linea presente nello spazio peripersonale (che corrisponde allo spazio raggiungibile dagli arti di una persona) e quella in cui la linea si trova nello spazio extrapersonale (corrispondente allo spazio non raggiungibile con gli arti). Esistono infatti delle lesioni cerebrali che possono alterare la capacità del soggetto di bisecare la linea solo in uno dei due spazi, mantenendo inalterata la capacità nell'altro. È stato dimostrato che la realtà virtuale può essere una buona sostituzione dello spazio reale in questo tipo di esperimenti, consentendo anche una maggiore precisione nella misurazione dell'esatta distanza fra il reale punto di biscazione e quello indicato dal soggetto [24]. Nella pratica clinica, è molto importante poter rilevare la presenza o meno di una di queste patologie tramite esperimenti di questo tipo, per poter capire la loro gravità, monitorarne l'evoluzione e pianificare un'adeguata riabilitazione e cura.

I soggetti dell'esperimento sono stati fatti sedere comodamente in una stanza insonorizzata e debolmente illuminata. Il personale del laboratorio ha provveduto al montaggio del caschetto e dell'apparecchiatura fNIRS sulla testa del soggetto, al quale è stata illustrata tutta la procedura. Dopo aver spiegato chiaramente al soggetto il compito

da svolgere durante l'esperimento, alcune prove sono state eseguite dal medesimo, per prendere confidenza con l'apparecchiatura usata. La realtà virtuale vista dal soggetto corrispondeva ad una stanza, con un tavolo, sopra il quale compariva un pannello bianco, sul quale veniva visualizzata la linea su cui il soggetto doveva lavorare. Il soggetto aveva in mano un controller della WiiTM. (Nintendo® of America Inc. Redmond, Washington), assunto come puntale.

Gli stimoli che venivano dati al soggetto erano quattro (1, 2, 3 e 4) e ad ognuno corrispondeva un compito diverso. In presenza degli stimoli 1 e 3, la linea compariva ad una distanza di 60 cm dal soggetto, ovvero all'interno del suo spazio peripersonale. In risposta allo stimolo 1, il soggetto doveva toccare l'estremità della linea presentata, mentre in presenza dello stimolo 3 doveva bisecarla. Durante gli stimoli 2 e 4 la linea compariva ad una distanza di 120 cm dal soggetto, cioè nel suo spazio extrapersonale. In presenza dello stimolo 2, il soggetto doveva toccare l'estremità della linea presentata, mentre in presenza dello stimolo 4 bisecarla. Le condizioni 1 e 2 sono state assunte come condizioni base; l'ipotesi di partenza è che dovrebbe esserci maggior attivazione cerebrale nelle condizioni 3 e 4 rispetto alle 1 e 2, in quanto il compito richiesto è più difficile. I vari stimoli comparivano in modo randomizzato al soggetto, in modo che non subentrasse alcun fenomeno di abituazione; il numero totale di stimoli è stato 36 per le condizioni 3 e 4 e 18 per quelle 1 e 2, per una durata totale dell'esperimento, per ciascun soggetto, di una trentina di minuti. La durata temporale dell'intervallo fra uno stimolo ed il successivo è stata fatta variare in modo casuale in un range compreso fra 12 e 15 secondi, con passo logaritmico.

3.1.2 La strumentazione utilizzata durante l'acquisizione

Uno spettrometro multi-canale operante nel dominio della frequenza (ISS ImagentTM, Champaign, Illinois) è l'unità ottica di registrazione utilizzata: esso è dotato di 32 diodi laser, modulati a 110 MHz. 16 di questi diodi emettono luce a 690 nm, mentre gli altri 16 a 830 nm. Fibre ottiche di vetro "multimode" (OFS Furukawa LOWOH, con apertura numerica 0.37) lunghe 250 cm e con diametro del core di 400 µm, sono state utilizzate per convogliare la luce sulla testa del soggetto sotto analisi.

Anche la luce rilevata dai detectors è stata convogliata tramite delle fibre ottiche, con un diametro di 3 mm, a 4 tubi fotomoltiplicatori (PMTs, R928 Hamamatsu

Photonics), modulati a 110.005 MHz. Si è in tal modo generata una frequenza di correlazione di 5 KHz.

Un multiplexer (di 8 canali) è stato utilizzato per far sì che solo due sorgenti alla volta, una per ogni emisfero, emettessero luce in modo sincrono ($T=4$ ms). In tal modo, è possibile separare la luce in funzione della posizione della sorgente. Il periodo di campionamento necessario a compiere un ciclo completo attraverso tutti i canali per entrambe le lunghezze d'onda è quindi di $T_{tot}=(8*2)*T=64$ ms. A questo corrisponde una frequenza di campionamento di $F_c=15.625$ Hz. Poiché per stabilizzare il segnale ottico è stata anche eseguita una media dual-period, il periodo finale di campionamento risulta essere di 128 ms, a cui corrisponde una frequenza di campionamento di $F_c=7.8125$ Hz.

Il segnale ottico rilevato ed amplificato dai tubi fotomoltiplicatori, è stato convertito in corrente alternata (AC), corrente continua (DC) e segnale di fase; ciò è stato eseguito per ogni coppia sorgente-rivelatore e per ognuna delle due lunghezze d'onda [25]. Dai valori ottenuti sono state poi calcolate le stime delle variazioni del coefficiente di assorbimento $\Delta\mu_a$ (con il metodo esposto nel paragrafo 1.2.2). Queste stime, poiché sensibili alle differenze d'età, sono state successivamente corrette usando le seguenti equazioni [26]:

$$DPF_{HbO_2} = 5.13 + 0.07(0.81 \cdot age) \quad (3.1.2.1)$$

$$DPF_{HHb} = 4.67 + 0.062(0.877 \cdot age) \quad (3.1.2.2)$$

Le variazioni temporali di ossiemoglobina e deossiemoglobina sono infine state calcolate dai valori ottenuti di $\Delta\mu_a$ relativi alle due lunghezze d'onda, come indicato in [27].

3.1.3 Posizionamento delle sorgenti e dei rivelatori

Sorgenti e rivelatori vanno posizionati con molta attenzione sulla testa di ogni soggetto. Per far sì che le misurazioni siano confrontabili, si sceglie un sistema internazionale secondo il quale posizionare le varie sonde. Inoltre, poiché la morfologia del cervello varia da soggetto a soggetto, si normalizzano i volumi cerebrali ad uno spazio comune, lo spazio stereotassico o atlante. Il modello standard utilizzato negli studi di neuroimaging è quello del Montreal Neurological Institute (MNI template): la

versione più recente si chiama ICBM152. Un'altra attenzione che va necessariamente presa per ridurre l'interferenza che il segnale altrimenti subirebbe è il posizionamento delle sonde direttamente sul cuoio capelluto e non sui capelli; il rapporto segnale-rumore sarebbe altrimenti molto basso.

Nell'esperimento le sorgenti sono state poste a due diverse distanze dai rivelatori. Sono state utilizzate 32 sorgenti (16 per emisfero, 16 per HHb e 16 per HbO₂; in ognuna delle 32 sorgenti sono state posizionate due fibre ottiche, una per ogni lunghezza d'onda usata), e 4 rivelatori (2 per emisfero); ogni rivelatore era circondato da 5 sorgenti per la HbO₂, e altrettante (poste nelle medesime posizioni) per HHb, poste ad una distanza massima di 3 cm. Poiché la massima distanza presa in considerazione per la rilevazione della luce nel canale è proprio di 3 cm, 40 canali sono stati così acquisiti (le sorgenti 3 e 4 sono in comune ai rivelatori A-B e C-D). Delle 32 sorgenti, 4 (per ogni emisfero, una per HbO₂ ed una per HHb) sono stati poste ad una distanza di 1.5 cm dal rivelatore: queste due sorgenti creano il cosiddetto canale di riferimento, che misura il segnale proveniente dal solo cuoio capelluto e cranio, ma non dalla corteccia cerebrale. Le altre 28 sorgenti, poste invece ad una distanza di 3 cm, rilevano il segnale proveniente anche dalla corteccia, perché questa distanza fra sorgente e rivelatore permette al fascio di luce di raggiungere una profondità compatibile con quella della corteccia. Le sorgenti sono numerate da 1 a 8 in ogni emisfero (sia per HbO₂ che per HHb). I canali di riferimento sono indicati con il numero 8 (vedi fig. 3.1.3.a).

Per posizionare queste sonde in questo esperimento è stato utilizzato un caschetto con lo scopo di massimizzare il numero di siti di misurazione di HHb e HbO₂. Per ogni emisfero è stata utilizzata una struttura formata da una lamina in gomma nera come superficie esterna e da una soffice spugna in neoprene come superficie interna, con lo scopo di fissare sorgenti e rivelatori e minimizzare le interferenze con la luce ambientale. Per ridurre ulteriormente queste ultime, la luce della stanza durante l'esperimento è stata mantenuta molto diffusa. Delle strisce di velcro hanno permesso di fissare queste strutture alle teste dei soggetti, adattandole alle diverse dimensioni.

I rivelatori sono stati identificati con delle lettere (A e B per l'emisfero sinistro e C e D per quello destro), mentre le sorgenti con dei numeri, da 1 a 8 in entrambi gli emisferi. Un metodo di correlazione probabilistica fra il cranio e il tessuto cerebrale che si basa sul modello fisico della superficie del cranio ICBM152, e che sfrutta la correlazione fra i punti del sistema 10-20 e le coordinate MNI, è stato utilizzato per posizionare correttamente le sonde, in modo che i canali da esse formati acquisissero il

segnale dalle zone di corteccia sotto indagine [25]. Il canale di acquisizione formato da ogni coppia sorgente rivelatore è posizionato a circa 2 cm di profondità (per tutti i canali esclusi i due canali di riferimento) e si trova in corrispondenza del punto medio della distanza fra sorgente e detettore. In tal modo, i canali A1-C1 e A2-C2 risultano posizionati sul solco intra-parietale superiore (sIPS), A3-C3 sul giro angolare (ANG), A4-C4 sul solco intra-parietale (IPS), A5-C5 sulla parte posteriore del lobo parietale superiore (pSPL), B3-D3 sul giro angolare, inferiormente rispetto ad A3-C3, B4-D4 all'incrocio fra IPS ed il solco intra-occipitale (IOS), B6-D6 vicino alla corteccia occipitale laterale (LOC) e infine B7-D7 sulla corteccia occipitale superiore (SOC) (vedi fig. 3.1.3.a).

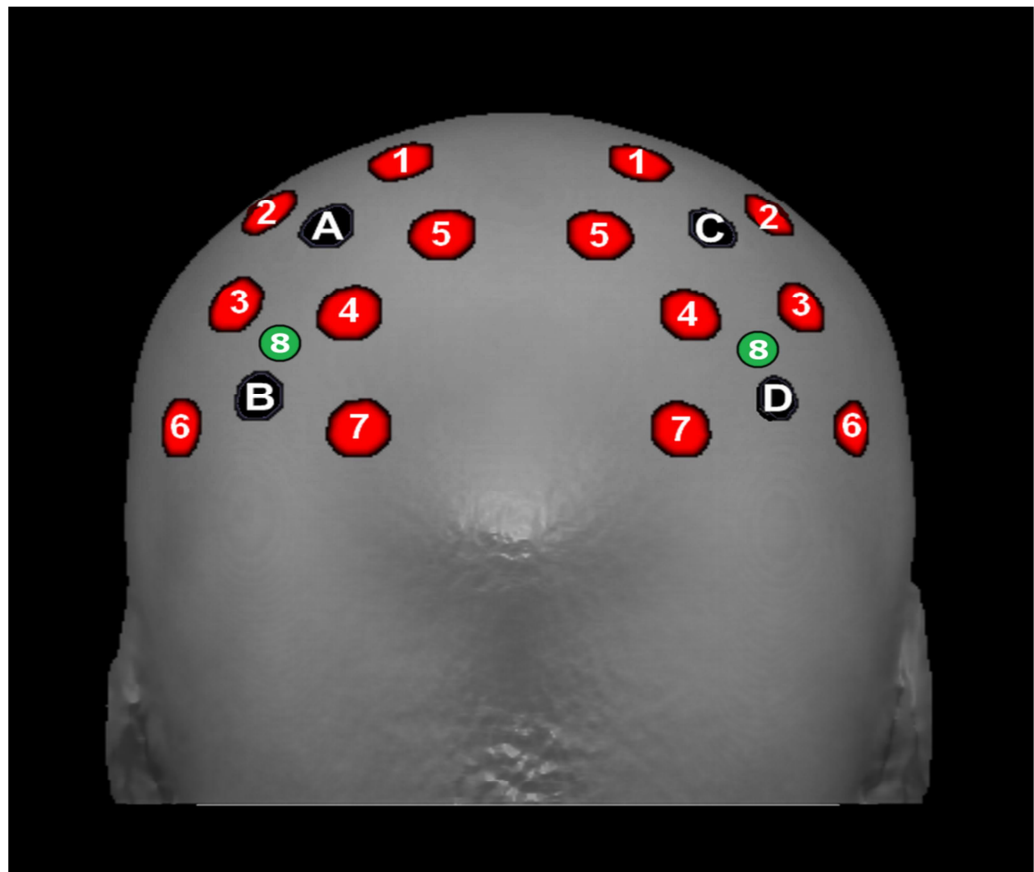


Fig. 3.1.3.a – Posizionamento di sorgenti e rivelatori

3.1.4 Ipotesi neurofisiologiche sotto esame

Una volta ottenute le variazioni di concentrazione di ossiemoglobina, si valuteranno i loro profili temporali, nonché il valore del picco e la sua latenza in ognuna

delle diverse condizioni. Ci si aspetta un'attivazione in tutti i canali della zona parieto-occipitale. Inoltre, si analizzeranno le differenze fra le varie condizioni. Le ipotesi di partenza sono di trovare una maggior attivazione nelle condizioni 3 e 4 rispetto alle 1 e 2, in quanto il compito da eseguire nelle prime due dovrebbe risultare più difficile per il soggetto. Inoltre, ci si aspetta di trovare una differenza fra le condizioni 3 e 4, nonché fra le condizioni 1 e 2, in quanto benché il compito da eseguire sia lo stesso, esso prende in esame due spazi differenti relativi al soggetto, per cui diversa dovrebbe risultare l'attivazione cerebrale.

3.2 Dati simulati

I dati simulati sono stati creati in modo che fossero simili ai dati realmente acquisiti: per cui, per simulare il segnale acquisito da un canale normale, oltre alla risposta emodinamica attesa nel paradigma in esame, sono state introdotte altre componenti, cioè il rumore di misura e gli artefatti fisiologici, mentre per simulare il segnale del canale di riferimento, si è eseguita la stessa procedura, ma senza l'introduzione della HRF. Lo scopo di usare i dati simulati è che, in questi ultimi, la HRF da stimare è nota, per cui si può confrontare la risposta emodinamica stimata con il nuovo algoritmo con quella realmente presente nei dati sui quali l'algoritmo viene applicato. In tal modo si può testare l'abilità dell'algoritmo nel ricostruire la risposta emodinamica, calcolare l'errore da esso commesso e valutare la sua robustezza.

Le componenti fisiologiche del rumore sono state modellate come una combinazione lineare di sinusoidi, a tre diverse specifiche frequenze: la prima sinusoidale corrisponde al battito cardiaco, ha una frequenza che può variare nel range 0.85-1.35 Hz e un'ampiezza di ± 200 nM, la seconda sinusoidale rappresenta la frequenza respiratoria, con un range di frequenze possibili all'interno dell'intervallo 0.15-0.35 Hz e ampiezza di ± 200 nM, mentre la terza sinusoidale, con frequenza che varia fra 0.05 Hz e 0.1 Hz e ampiezza di ± 400 nM, corrisponde all'onda di Mayer. Per aumentare la variabilità, ognuna di queste sinusoidi aveva una fase θ (variabile fra 0 e 2π) differente in ogni trial. Il rumore di misura η è stato modellato come un rumore bianco, normale, e con deviazione standard regolabile in modo che approssimasse la deviazione standard ottenuta nei trial contenenti dati reali. Il rumore totale è la somma di tutte queste componenti:

$$v(t) = \sum_{i=\{1,2,3\}} [a_i \cdot \sin(2\pi f_i t + \theta_i)] + \eta(t) \quad (3.2.1)$$

La risposta emodinamica invece, è stata modellata come una combinazione lineare di due funzioni gamma-varianti, per un totale di 6 parametri variabili:

$$hrf_{true}(t) = \alpha \cdot [\Gamma(t, \tau_1, \varphi_1) - \beta \cdot \Gamma(t, \tau_2, \varphi_2)] \quad (3.2.2)$$

dove:

HRF_{true} risposta emodinamica nota

α parametro che regola l'ampiezza

τ_i parametro che regola la forma della HRF

φ_i parametro che regola la scala

β parametro che determina il rapporto della risposta all'undershoot

I parametri sono stati scelti in modo da ottenere un'HRF simile a quella attesa dopo l'esecuzione di un paradigma sperimentale come quello in esame, ovvero con un'ampiezza di picco di circa 140 nM e latenza di picco di circa 2.5 secondi.

4 Nuovo metodo per la rimozione degli artefatti fisiologici

4.1 Presentazione del problema e descrizione generale del metodo di soluzione

Come descritto nel paragrafo 1.2.2, dal segnale acquisito sono state stimate le variazioni temporali delle concentrazioni di ossi-emoglobina, espresse in nM. D'ora in avanti si considereranno solo le variazioni di concentrazioni di HbO₂, in quanto le variazioni di concentrazione di HHb risultano affette da un eccessivo rumore di misura e l'interpretazione delle eventuali HRF stimate risulta molto più complicata. In questa tesi il nuovo algoritmo è quindi stato testato solo sui dati di HbO₂. Ogni soggetto ha acquisito 18 trials nelle condizioni 1 e 2, e 36 in quelle 3 e 4, per un totale di 108 trials (circa 30 minuti). Un esempio di segnale acquisito, per esempio dal canale C4, è osservabile in figura 4.1.a.

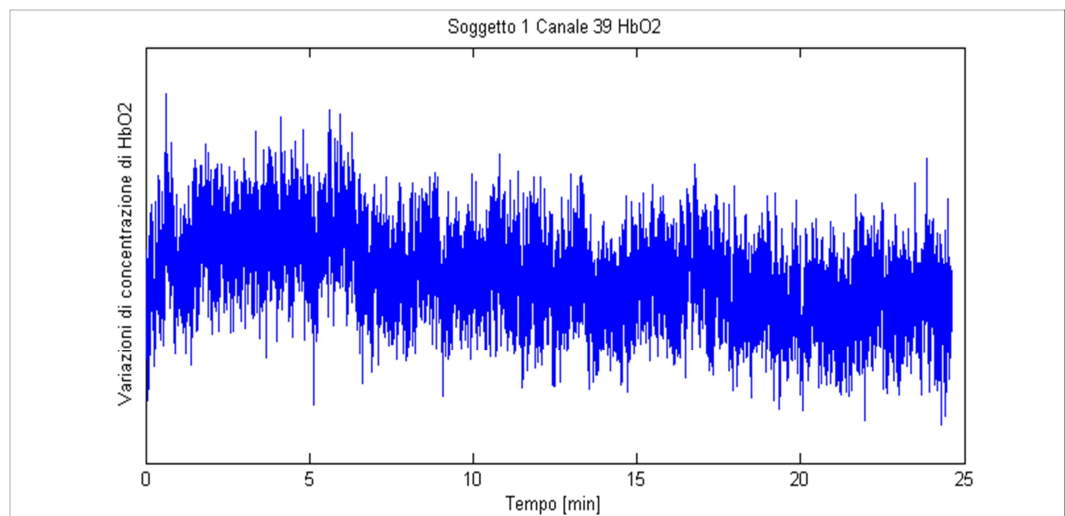


Fig. 4.1.a - Esempio di segnale di HbO₂ acquisito da un canale per tutta la durata dell'esperimento

Il segnale fNIRS è stato acquisito in modo sincronizzato con il trigger (che segna gli istanti temporali in cui vengono presentati gli stimoli al soggetto); in tal modo è possibile dividere il segnale nei vari trials acquisiti. Si è deciso di considerare i primi 12 secondi dopo ciascun stimolo come durata di ogni trial: 12 secondi, infatti, sono il tempo necessario alla risposta emodinamica per comparire ed esaurirsi. In figura 4.1.b sono visualizzati due trials relativi allo stesso canale ed allo stesso soggetto durante l'esecuzione dello stesso compito. Come si può notare, benché essi dovrebbero essere simili, non lo sono affatto e nessuna risposta emodinamica è osservabile ad occhio

nudo. Si capisce quindi come, per poter stimare la HRF, sia fondamentale un'elaborazione del segnale.

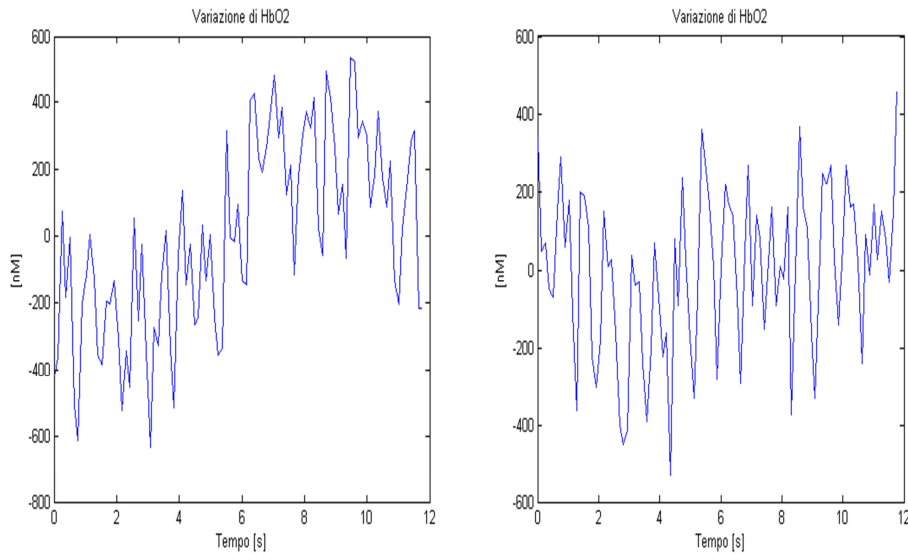


Fig 4.1.b: Due esempi di trials relativi al canale D6

L'algoritmo sviluppato in questa tesi si articola in 4 passi. Nel passo 1, descritto nel paragrafo 4.2, dopo aver suddiviso il segnale acquisito in trials e raggruppato questi ultimi in base al tipo di stimolo, vengono applicati degli algoritmi e dei test statistici al segnale fNIRS, in modo da eliminare gli artefatti da movimento. Al secondo passo, (paragrafo 4.3), il modello del rumore, basato su dati del canale di riferimento, viene creato per ogni trial. Il terzo passo, descritto nel paragrafo 4.4, prevede l'identificazione di tale modello: nel paragrafo 4.4.1 viene descritta la scelta dell'ordine ottimo mentre nel 4.4.2 e 4.4.3 viene formulato e risolto numericamente il problema di stima dei parametri del modello. Al quarto passo (paragrafo 4.5), avviene il calcolo della HRF (paragrafo 4.5.1) ed il raffinamento di questa stima (4.5.2).

Il nuovo algoritmo verrà, nel capitolo 5, testato su dati simulati e confrontato con altri metodi. Sono stati simulati 10 soggetti, in modo analogo a quanto fatto in [45], ognuno contenente 70 trials.

4.2 La pre-elaborazione del segnale (passo 1)

Il segnale, per ogni canale (sia normale che di riferimento), è stato diviso in trials della durata di 12 secondi l'uno, e i vari trials relativi a ciascuna della 4 condizioni (1, 2, 3 e 4) sono stati raggruppati in 4 gruppi diversi, analizzati separatamente. Nella fase di

pre-elaborazione e filtraggio sono stati considerati facenti parte del segnale anche i campioni corrispondenti ad 1 secondo prima dello stimolo ed 1 secondo dopo la fine dei 12 secondi; per questo motivo il segnale in queste fasi di elaborazione ha una durata di 14 secondi. Per permettere un calcolo dello spettro del canale di riferimento (necessario per valutare i picchi dominanti alle basse frequenze) più accurato, è necessario avere un numero maggiore di campioni da analizzare per ogni trial, per cui, per il solo calcolo dello spettro, si è ampliato il segnale di ogni trial aggiungendogli anche i campioni relativi agli 11 secondi precedenti l'inizio del trial e agli 11 secondi successivi alla fine del medesimo. È stato inoltre effettuato uno zero padding di 4 secondi, per aumentare ulteriormente il numero di campioni su cui calcolare lo spettro. Per calcolare il modello del rumore dal canale di riferimento (vedi più avanti), invece, si è deciso di prendere come dati per la sua stima anche i 6 secondi precedenti la comparsa dello stimolo e i 6 secondi successivi al termine del trial, per poter avere un modello del rumore più accurato anche alle estremità del trial. La stima della risposta emodinamica e dei risultati è stata invece effettuata sui soli 12 secondi del trial, intervallo in cui si vuole valutare effettivamente la HRF.

Dato che la fNIRS fornisce solo informazioni sulle variazioni di concentrazione dell'ossiemoglobina, e non i suoi valori assoluti, il valor medio calcolato sui 12 secondi del trial è stato sottratto al trial medesimo, per portare così le misurazioni a dei livelli basali.

Prima di procedere a qualsiasi filtraggio ed analisi è necessario eliminare tutti i trials che contengono eventuali artefatti, che influenzerebbero negativamente la stima della risposta emodinamica. Innanzitutto vengono eliminati tutti i trials che presentano valori non plausibili da un punto di vista fisiologico. La somma di tutte le possibili componenti del segnale acquisito (sia la reale risposta cerebrale che il rumore e le componenti fisiologiche di disturbo), può avere una massima variazione di concentrazione di 8000 nM. Valori superiori non sono plausibili da un punto di vista fisiologico, ma dovuti ad artefatti, per cui tutti i trials che li presentano vengono eliminati. Vengono poi applicati due metodi di rimozione degli artefatti, che prendono in considerazione il fatto che nello stesso soggetto, nello stesso canale e nella stessa condizione, la risposta emodinamica presente nei vari trials dovrebbe avere un andamento simile ed il rumore sovrapposto non variare molto nella breve durata del trial. La presenza di outlier indicherebbe quindi la presenza di artefatti. Per cui, questi due metodi vengono applicati dopo aver diviso i vari trials per canale e nelle quattro

diverse condizioni. Per ogni canale di ogni soggetto, i trials relativi ad ogni condizione vengono allineati temporalmente rispetto alla comparsa dello stimolo, memorizzata nel trigger. Il primo criterio prevede il confronto fra i vari trials del valore massimo, minimo e medio di variazione di concentrazione: se tali valori sono compresi fra ± 2.5 volte la deviazione standard, allora non vengono rilevati artefatti; se invece anche solo uno dei tre valori è esterno a tale intervallo, il trial in questione mostra un'eccessiva variabilità, dovuta probabilmente ad un artefatto, per cui viene eliminato. I dati sottoposti a questo criterio di eliminazione degli artefatti, sono ora idonei per essere sottoposti al test di Grubbs, il secondo criterio di rimozione degli artefatti. Il test di Grubbs è un test statistico che è in grado di riconoscere ed eliminare in modo iterativo i trials i cui valori risultano anomali rispetto a quelli degli altri trials dello stesso gruppo. Il test viene applicato ad ogni istante di campionamento dei trials: i valori relativi a quell'istante temporale di ogni trial vengono confrontati e se qualcuno di essi assume un valore anomalo rispetto agli altri, allora il trial corrispondente viene eliminato. Il numero totale di trials eliminati è mediamente di 8 trials nelle condizione 1 e 2 e di 9 trials nelle condizioni 3 e 4, ma questi valori sono molto variabili, in base al soggetto ed al canale e dipendono da diversi fattori che influenzano l'acquisizione dei dati, come per esempio il corretto posizionamento degli elettrodi o i movimenti del soggetto.

I dati sono ora pronti per essere elaborati e filtrati, al fine di ottenere la stima della HRF.

4.3 Passo 2: modellistica degli artefatti

L'idea alla base di questo metodo è quella di sfruttare il canale di riferimento, che dovrebbe contenere solo rumore e componenti fisiologiche comuni a cranio e corteccia cerebrale (esclusa quindi la risposta emodinamica, presente solo in quest'ultima), per creare un modello single-trial dell'andamento temporale delle componenti fisiologiche più lente, con frequenze cioè che si sovrappongono a quella della risposta emodinamica, e quindi non eliminabili con un semplice filtraggio passabanda. Tale modello rappresenta quindi una stima delle componenti fisiologiche che si vogliono eliminare dal segnale acquisito dai 38 canali: sottraendo tale modello a questo segnale, quello che dovrebbero rimanere sono la sola risposta emodinamica e le componenti di rumore alle alte frequenze.

L'analisi di rimozione degli artefatti viene eseguita sia sui due canali di riferimento che sui singoli canali di acquisizione. Solo uno dei due canali di riferimento viene scelto per ogni canale di ogni soggetto: la scelta ricade sul canale meno rumoroso fra i due. Il criterio usato per questa decisione consiste nel calcolare la media delle deviazioni standard di ogni trial dei due canali di riferimento e scegliere di utilizzare il canale di riferimento che tra i due presenta la minor deviazione standard e quindi la minore variabilità. Una volta scelto il canale di riferimento, i trials che durante la pre-elaborazione vengono definiti contenenti artefatti nel canale di riferimento vengono eliminati anche nel canale di acquisizione e viceversa.

Il nuovo modello assume che la componente di Mayer e le oscillazioni alle bassissime frequenze, che sono di natura quasi periodica, possano essere rappresentate ciascuna da delle sinusoidi del tipo [30]:

$$m(t)=a\sin(\omega t+\varphi) \quad (4.3.1)$$

dove:

- α ampiezza della sinusoide
- ω frequenza della sinusoide
- φ fase a $t=0$

Poiché la risposta emodinamica ed il rumore (sia fisiologico che non) risultano essere additivi, i dati acquisiti da ogni canale possono quindi essere modellati come una somma di armoniche, di varia ampiezza e frequenza, più un termine costante, che contiene i possibili drift costanti che il segnale subisce. L'equazione che descrive i dati acquisiti è del tipo:

$$y_k(A,B,C,\omega)=A\cos(\omega t_k)+B\sin(\omega t_k)+C \quad (4.3.2)$$

dove:

- $A=a\sin(\varphi)$ e $B=acos(\varphi)$ costanti da stimare
- ω frequenza angolare dell'armonica
- C segnale residuo
- $y_0\dots y_N$ dati acquisiti agli istanti $t_0\dots t_N$

4.4 Passo 3: identificazione del modello

4.4.1 Scelta dell'ordine

Da un'ispezione visiva degli spettri del canale di riferimento di ciascun soggetto e trial, risulta che alle basse frequenze (inferiori ai 0.18 Hz), mediamente compaiono da 1 a 3 picchi (vedi Fig. 4.4.1.a).

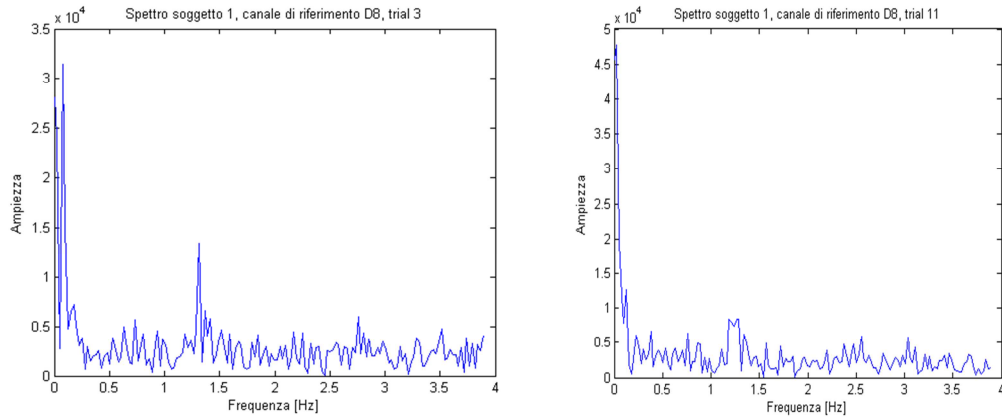


Fig 4.4.1.a- Esempi di spettri del canale di riferimento nello stesso soggetto e condizione ma trials diversi: nello spettro a sinistra si nota la presenza di tre picchi, mentre in quello a destra di due.

Presumibilmente, uno di questi corrisponde alla frequenza dell'onda di Mayer, un altro alla frequenza delle oscillazioni a bassissima frequenza e il terzo potrebbe essere dovuto o alla frequenza respiratoria (a volte bassa in alcuni soggetti) o a possibili disturbi fisiologici dovuti al paradigma di acquisizione che prevede il movimento del braccio del soggetto. Tuttavia, tutte queste componenti fisiologiche, che sono comuni sia al canale di riferimento che al canale normale, sono definibili come rumore per il nostro scopo, e quindi vanno eliminate dal segnale acquisito da un normale canale, cosicché rimanga solo la HRF. Per ogni trial vengono quindi rilevati dallo spettro del canale di riferimento i picchi compresi fra 0 e 0.18 Hz, che vengono utilizzati come stima iniziale della frequenza delle varie armoniche.

4.4.2 Formulazione del problema di stima parametrica

In base al numero di picchi rilevato, il modello del rumore da noi utilizzato per descrivere i dati del canale di riferimento ($y_0(t) \dots y_N(t)$), corrisponde ad una delle seguenti equazioni:

$$y_k(t) = A\cos(\omega_1 t_k) + B\sin(\omega_1 t_k) + C \quad (4.4.2.1)$$

$$y_k(t) = A\cos(\omega_1 t_k) + B\sin(\omega_1 t_k) + C\cos(\omega_2 t_k) + D\sin(\omega_2 t_k) + E \quad (4.4.2.2)$$

$$y_k(t) = A\cos(\omega_1 t_k) + B\sin(\omega_1 t_k) + C\cos(\omega_2 t_k) + D\sin(\omega_2 t_k) + E\cos(\omega_3 t_k) + F\sin(\omega_3 t_k) + G \quad (4.4.2.3)$$

dove la 4.4.2.1 viene usata nel caso fosse presente un solo picco, la 4.4.2.2 nel caso ce ne fossero 2 e la 4.4.2.3 in presenza di 3 picchi.

Queste equazioni possono essere riscritte in forma matriciale:

$$y = Dx \quad \text{con} \quad (4.4.2.4)$$

$$x = (A, B, C)^T \quad D = \begin{bmatrix} \cos(\omega t_1) & \sin(\omega t_1) & 1 \\ \cos(\omega t_2) & \sin(\omega t_2) & 1 \\ \vdots & \vdots & \vdots \\ \cos(\omega t_N) & \sin(\omega t_N) & 1 \end{bmatrix}$$

nel caso dell'equazione 4.4.2.1,

$$x = (A, B, C, D, E)^T \quad D = \begin{bmatrix} \cos(\omega_1 t_1) & \sin(\omega_1 t_1) & \cos(\omega_2 t_1) & \sin(\omega_2 t_1) & 1 \\ \cos(\omega_1 t_2) & \sin(\omega_1 t_2) & \cos(\omega_2 t_2) & \sin(\omega_2 t_2) & 1 \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ \cos(\omega_1 t_N) & \sin(\omega_1 t_N) & \cos(\omega_2 t_N) & \sin(\omega_2 t_N) & 1 \end{bmatrix}$$

nel caso dell'equazione 4.4.2.2 e

$$x = (A, B, C, D, E, F, G)^T \quad D = \begin{bmatrix} \cos(\omega_1 t_1) & \sin(\omega_1 t_1) & \cos(\omega_2 t_1) & \sin(\omega_2 t_1) & \cos(\omega_3 t_1) & \sin(\omega_3 t_1) & 1 \\ \cos(\omega_1 t_2) & \sin(\omega_1 t_2) & \cos(\omega_2 t_2) & \sin(\omega_2 t_2) & \cos(\omega_3 t_2) & \sin(\omega_3 t_2) & 1 \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ \cos(\omega_1 t_N) & \sin(\omega_1 t_N) & \cos(\omega_2 t_N) & \sin(\omega_2 t_N) & \cos(\omega_3 t_N) & \sin(\omega_3 t_N) & 1 \end{bmatrix}$$

nel caso dell'equazione 4.4.2.3.

I dati acquisiti dal canale di riferimento vengono poi utilizzati per identificare il modello del rumore. I parametri del modello vengono stimati utilizzando un fit ai

minimi quadrati: i parametri cercati sono quelli che minimizzano la somma delle differenze al quadrato (RSS, Residual Sum of Square):

$$RSS = \sum_{n=1}^N (y_n - y_n[x])^2 \quad (4.4.2.5)$$

dove:

y_n dati del canale di riferimento
 $y_n[x]$ modello del rumore definito in 4.4.2.1-2-3

Usando le equazioni 4.4.2.4 e in base al caso una fra le equazioni 4.4.2.1-2-3 in forma matriciale, la RSS può essere riscritta nella forma:

$$RSS = (y - Dx)^T (y - Dx) \quad (4.4.2.6)$$

4.4.3 Risoluzione numerica

Dato che l'equazione del rumore da identificare è lineare in tutti i parametri escluso ω , si può utilizzare l'algoritmo dei minimi quadrati per stimare i parametri lineari, e usare un altro metodo per stimare la velocità angolare. Infatti, il valore assunto come stima iniziale ($\omega=2\pi f$, con f picco dello spettro), non necessariamente corrisponde alla reale velocità angolare, essendo lo spettro calcolato da un numero limitato di campioni. Per cui, per trovare una migliore stima di ω , il criterio utilizzato è quello della ricerca monodimensionale del massimo della funzione $g(\omega)$, definita come [44]:

$$g(\omega) = y^T D(D^T D)^{-1} D^T y \quad (4.4.3.1)$$

$$\hat{\omega} = \arg \max_{\omega} g(\omega) \quad (4.4.3.2)$$

$$D = \begin{bmatrix} \cos(\omega t_1) & \sin(\omega t_1) & 1 \\ \cos(\omega t_2) & \sin(\omega t_2) & 1 \\ \cdot & \cdot & \cdot \\ \cdot & \cdot & \cdot \\ \cos(\omega t_N) & \sin(\omega t_N) & 1 \end{bmatrix} \quad (4.4.3.3)$$

L'algoritmo per trovare il massimo di $g(\omega)$ prevede una ricerca monodimensionale della velocità angolare migliore all'interno di una griglia di valori di ω :

- a) Si costruisce una griglia di valori ω_i con $i=1:M$, con velocità angolare centrale

pari a quella calcolata dalla frequenza del picco trovato nello spettro e limiti inferiore e superiore pari a tale frequenza \pm una volta la frequenza di campionamento.

- b) Si crea un ciclo for, da 1 a M, e per ogni ω si crea la matrice D (4.4.3.3) e conseguentemente la funzione $g(\omega_i)=g_i$ (4.4.3.1).
- c) La velocità angolare stimata è l' ω dal quale è stata calcolata la funzione g_i che presenta il valore più alto:

$$\hat{\omega} = \omega_k \quad \text{dove} \quad g_k = \max[g_i | i = 1 \dots M] \quad (4.4.3.4)$$

Questo procedimento viene effettuato sia per trovare ω_1 , sia per trovare ω_2 , che ω_3 , in base al numero di picchi trovati nello spettro. Nel caso in cui, nel modello a 3 o 2 frequenze, le ω stimate coincidessero (per esempio ω_1 con ω_2 o ω_2 con ω_3) allora si è scelto di semplificare il modello, cioè usare invece che il modello a 3 frequenze quello a 2 o invece che quello a 2 quello a 1 frequenza.

Successivamente, per stimare i valori degli altri parametri contenuti in x (le ampiezze delle armoniche), si utilizza un fit ai minimi quadrati:

$$\hat{x} = (D^T D)^{-1} D^T y \quad (4.4.3.5)$$

dove la matrice D utilizzata è quella di una delle equazioni 4.4.2.1-2-3 scritte in forma matriciale, scelta in base al numero di picchi trovati in quel trial.

Per valutare l'effettivo beneficio dell'introdurre più frequenze nel modello del rumore (per esempio modellarlo con 3 invece che con 2), a scapito del fatto che in tal modo il fit potrebbe diventare più sensibile al rumore e computazionalmente più pesante, e per bilanciare esigenze contrastanti di fit e precisione, si è scelto di confrontare per ogni trial i modelli del rumore calcolati con 3 e 2 frequenze (nel caso della presenza di 3 picchi) e con 2 e 1 frequenza (nel caso della presenza di 2 picchi) con il criterio di Akaike:

$$AIC = WRSS + 2M \quad \text{con} \quad (4.4.3.6)$$

$$WRSS = (y - Dx)^T \Sigma_v^{-1} (y - Dx) \quad \text{con} \quad (4.4.3.7)$$

$$\Sigma_v = \text{diag}(\sigma^2) \quad (4.4.3.8)$$

dove:

M numero dei parametri da stimare

- Σ_v matrice NxN di covarianza dell'errore di misura v ($y=Dx+v$)
- σ^2 deviazione standard calcolata per ogni trial in un intervallo di 4 secondi e considerata costante all'interno del trial

Il criterio di Akaike prevede la scelta del modello che ottiene l'AIC più basso.

4.5 Passo 4: Calcolo della HRF

4.5.1 Stima per sottrazione

Una volta scelto il modello più parsimonioso, stimati i parametri incogniti e calcolato il modello del rumore che al meglio descrive i dati del canale di riferimento per ogni trial, per calcolare la HRF, si sottrae, per ogni trial, ai dati acquisiti dal canale normale tale modello del rumore:

$$z = y_{ch} - D\hat{x} \quad (4.5.1.1)$$

dove:

- y_{ch} dati acquisiti da un normale canale
- D una tra le matrici 4.4.2.1-2-3 in base alla situazione

Il vettore z contiene oltre che la risposta emodinamica presente nel trial anche altre componenti alle alte frequenze, non eliminate dal modello del rumore che modella solo quelle alle basse frequenze. Per esempio in z è ancora contenuta la componente cardiaca, solitamente presente con una frequenza intorno ad 1, 1.5 Hz, e quindi non presente nel modello del rumore.

4.5.2 Raffinamento della stima mediante filtraggio passa-basso

Per attenuare anche queste componenti, è stato applicato al segnale z uno smoothing, con un filtraggio di Savitzky-Golay (parametri scelti: ordine del polinomio 3 e frame size 25), che utilizza una regressione locale, e funziona molto bene su questo tipo di dati, in quanto preserva il più possibile i picchi, cosa molto importante nel nostro caso per non rischiare di attenuare anche la risposta emodinamica.

L'algoritmo appena descritto è stato implementato in Matlab© (versione R2010a, The Mathworks, Natick, Massachusetts, USA) ed eseguito su un personal computer.

4.6 Criteri di valutazione del metodo

Per confrontare i risultati del nuovo algoritmo e valutare la sua efficacia, altri metodi usati in letteratura sono stati applicati, oltre al nuovo metodo, a dei dati simulati, nei quali quindi la reale risposta emodinamica era nota. Tre metodi sono stati scelti per il confronto. Primo fra tutti la media convenzionale, calcolata sui dati non filtrati di un normale canale. Il secondo metodo per il confronto è l'applicazione di un tradizionale filtro passa-basso sempre sui dati acquisiti da un canale normale. Il filtro passa-basso utilizzato è lo stesso usato da Zhang et al. in [42] come confronto con il loro metodo: si tratta di un filtro Butterworth del sesto ordine, con frequenza di taglio pari a 1.25 Hz. Questi primi due metodi non prevedono lo sfruttamento del canale di riferimento, per cui dal loro confronto sarà possibile ricavare i benefici del suo utilizzo. Il terzo ed ultimo metodo usato come confronto prevede invece l'uso del canale di riferimento e dal suo confronto si potranno dedurre gli eventuali benefici del nuovo algoritmo spiegato nel paragrafo precedente, che è più complesso del semplice metodo di seguito proposto. Esso infatti prevede un semplice filtraggio passa-basso sia del canale di riferimento che del canale normale, e successivamente la diretta sottrazione fra i due. Il filtro utilizzato è un filtro Butterworth del quarto ordine, con frequenza di taglio di 0.3 Hz.

5 Risultati

5.1 Dati simulati

Per valutare quantitativamente il miglioramento con cui il nuovo algoritmo stima la HRF rispetto agli altri metodi, è stato definito l'errore di stima [46]:

$$E = 100 \times \frac{\|u_{true} - \bar{u}\|^2}{\|u_{true}\|^2} \quad (5.1.1)$$

dove:

- \bar{u} stima della risposta emodinamica media
- u_{true} risposta emodinamica nota (3.2.2)

Il valore di E è una sorta di errore di stima percentuale. Esso è stato calcolato per tutti i 10 soggetti simulati, sia per le HRF stimate con il nuovo algoritmo sia per quelle ottenute con gli altri metodi, cioè la media coerente (block average), il filtraggio passabasso sul solo canale di acquisizione (traditional low pass) e la sottrazione fra canale di acquisizione e canale di riferimento dopo l'applicazione su entrambi di un filtraggio passabasso (low pass subtraction).

I valori medi di E per i vari metodi, calcolati su tutta la durata del trial (12 secondi) sono rappresentati in tabella 5.1.a, insieme alle rispettive deviazioni standard. Come si può notare, i due metodi che sfruttano il canale di riferimento riportano valori molto più bassi di errore di stima rispetto ai due metodi che si avvalgono del solo canale normale di acquisizione (traditional low pass e block average). Nel confronto fra il nuovo algoritmo e la sottrazione fra i due canali dopo l'applicazione del filtro passabasso, quest'ultimo metodo presenta un errore di stima inferiore rispetto al nuovo algoritmo; tuttavia, la sua deviazione standard è leggermente superiore.

E su 12 secondi				
	Nuovo algoritmo	Low pass subtraction	Traditional low pass	Block average
Media	15,3852	13,3505	86,9535	123,9567
SD	9,1090	11,5338	68,6657	86,2324

Tabella 5.1.a – Errore calcolato sull'intero trial

Poiché dai grafici si può notare che la differenza maggiore fra il nuovo algoritmo ed il low pass subtraction nella stima della risposta emodinamica è negli ultimi secondi del trial, cioè nella stima della coda, in cui il nuovo algoritmo presenta stime meno precise (vedi fig. 5.1.a), e, dato che i parametri di interesse sono in realtà il picco della HRF e la latenza di quest'ultimo, si è deciso di calcolare E anche in un intervallo più ristretto del trial. Si è quindi identificato l'intervallo temporale in cui compare nel trial la curva positiva della HRF e si è di conseguenza calcolato E in tale intervallo (0.5-5.5 secondi).

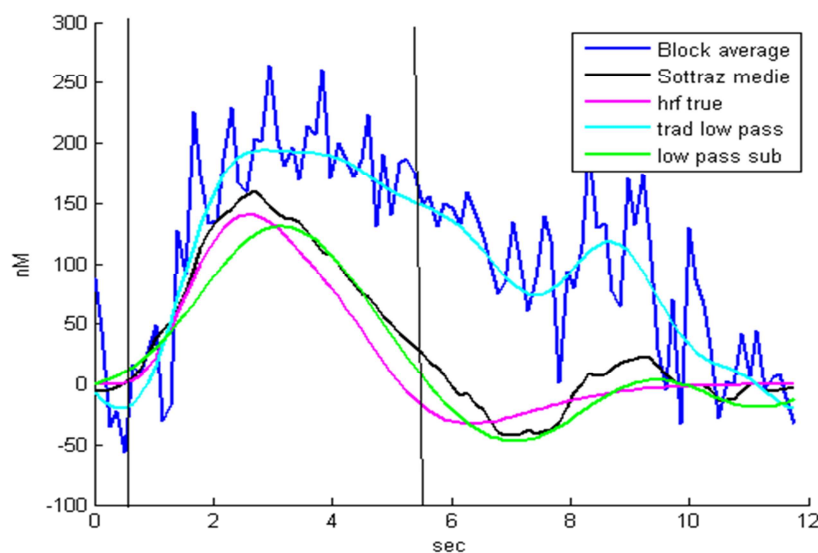


Fig 5.1.a – Risposta emodinamica stimata con i vari metodi vs HRF nota (magenta). Le linee verticali indicano l'intervallo in cui viene calcolato E.

I valori di E calcolati nell'intervallo 0.5-5.5 secondi sono riportati in tabella 5.1.b. Come si può notare, anche in questo caso l'uso del canale di riferimento migliora sostanzialmente la stima della HRF. Il nuovo algoritmo presenta l'errore di stima più

basso, e anche una deviazione standard inferiore rispetto a quella ottenuta negli altri metodi. Sembra quindi nel complesso che il nuovo algoritmo abbia una buona probabilità di stimare correttamente la risposta emodinamica anche sui dati reali.

E calcolato tra 0.5 e 5.5 secondi				
	Nuovo algoritmo	Low pass subtraction	Traditional low pass	Block average
Media	6,8335	8,7009	32,7283	46,0001
SD	3,3680	7,6092	36,8874	42,4804

Tab. 5.1.b – Errore calcolato tra 0.5 e 5.5 secondi

I parametri di interesse, come prima accennato, per un'interpretazione delle risposte emodinamiche, sono il valore e la latenza del picco della risposta emodinamica. Questi valori sono stati calcolati sia con il nuovo algoritmo sia con gli altri tre metodi e sono stati poi confrontati con il valore noto della HRF simulata. I risultati (per ogni metodo media e deviazione standard) sono rappresentati nelle tabelle 5.1.c-d e figure 5.1.b-c. Per quanto riguarda il valore del picco, il nuovo algoritmo riesce a stimarlo con maggiore precisione rispetto agli altri metodi, benché la differenza con il low pass subtraction sia minima. La latenza invece, viene stimata abbastanza correttamente da tutti i metodi: il traditional low pass presenta il valore più vicino a quello vero. La massima differenza fra la latenza stimata e quella vera è presente nel metodo block average ed è di solo 0.5 secondi. Il nuovo algoritmo commette un errore di 0.3 secondi in media nella stima della latenza.

Valori del picco [nM]					
	HRF true	Nuovo algoritmo	Low pass subtraction	Traditional low pass	Block average
Media	140,2831	140,3634	138,5185	158,8673	204,5495
SD		21,1392	20,8499	41,2932	34,4552

Tab. 5.1.c – Valori del picco calcolati con i vari metodi e HRF vera

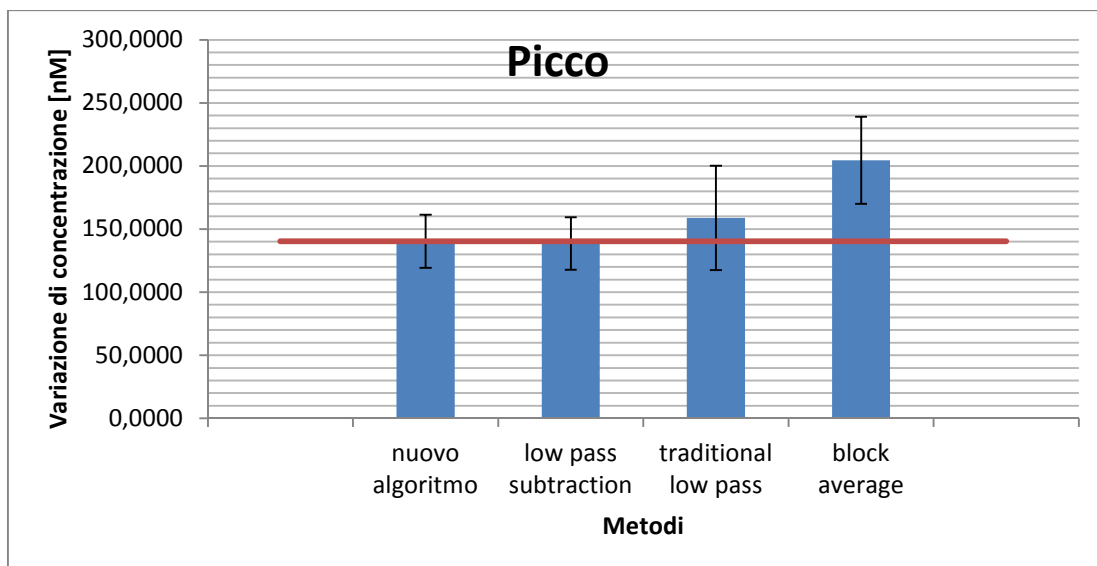


Fig. 5.1.b – Istogramma rappresentante il valore medio di picco ottenuto dai vari metodi e confronto con quello vero rappresentato dalla linea rossa

Valore della latenza del picco [s]					
	HRF true	Nuovo algoritmo	Low pass subtraction	Traditional low pass	Block average
Media	2,56	2,8672	2,9056	2,8288	3,0592
SD		0,1728	0,1602	0,1951	0,4112

Tab. 5.1.d – Valori della latenza del picco calcolati con i vari metodi e valore vero

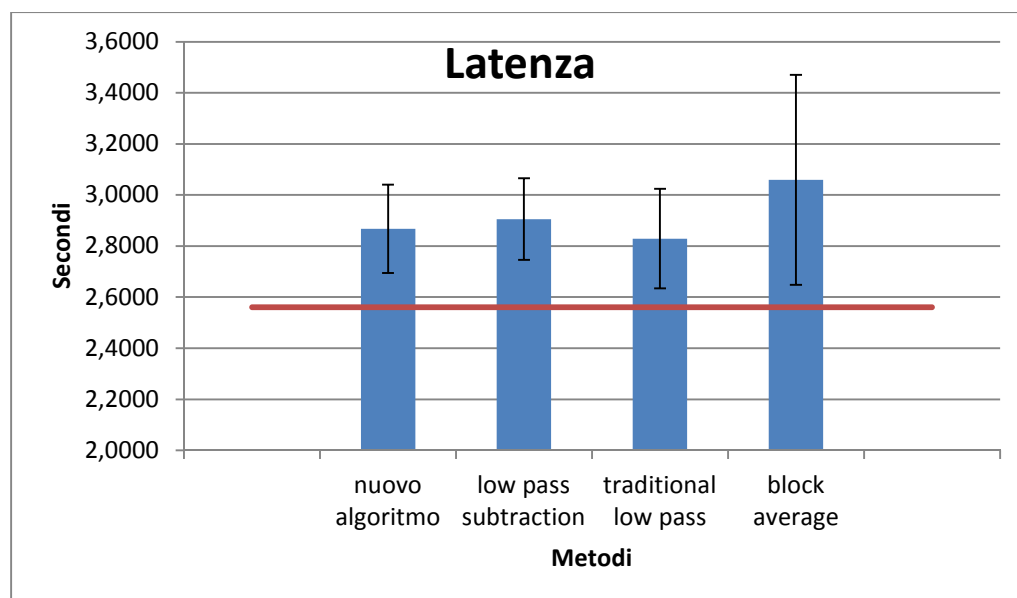


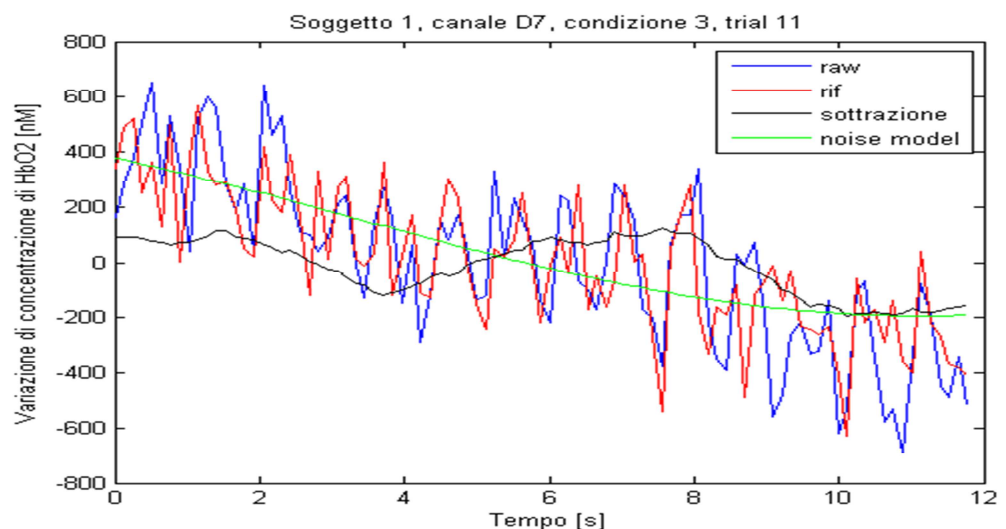
Fig. 5.1.c – Istogramma rappresentante i valori medi di latenza del picco ottenuti con i diversi metodi e confronto con il valore vero (linea rossa)

Dall'analisi sui dati simulati si può dedurre come l'utilizzo del canale di riferimento dia un netto miglioramento nella stima della risposta emodinamica. Utilizzare il canale di riferimento per ridurre il rumore presente nel segnale acquisito da un normale canale è quindi una strada promettente da intraprendere.

Il nuovo algoritmo proposto si comporta molto bene sui dati simulati, stimando un andamento temporale medio della risposta emodinamica molto vicino a quello della vera HRF e commettendo un errore minimo nella stima del suo valore di picco e della latenza. La prestazione del nuovo algoritmo rispetto al low pass subtraction è leggermente migliore; si è deciso di mantenere come metodo prioritario il nuovo algoritmo perché esso modella le diverse componenti del rumore trial per trial, in base ai dati acquisiti, mentre applicando un filtro passabasso, si rischia di eliminare anche parte del segnale utile e di modificare erroneamente il segnale da sottrarre.

5.2 Dati reali

Dopo aver testato l'efficacia dell'algoritmo sui dati simulati ed averlo confrontato con gli altri metodi proposti, esso è stato applicato ai dati reali. Purtroppo, sia con i dati simulati che con i dati reali, a livello single-trial la risposta emodinamica non è osservabile né prima né dopo l'applicazione dell'algoritmo. Infatti, come si può vedere in figura 5.2.a, il rumore sovrapposto casuale, presente in ogni misura, non è stato eliminato.



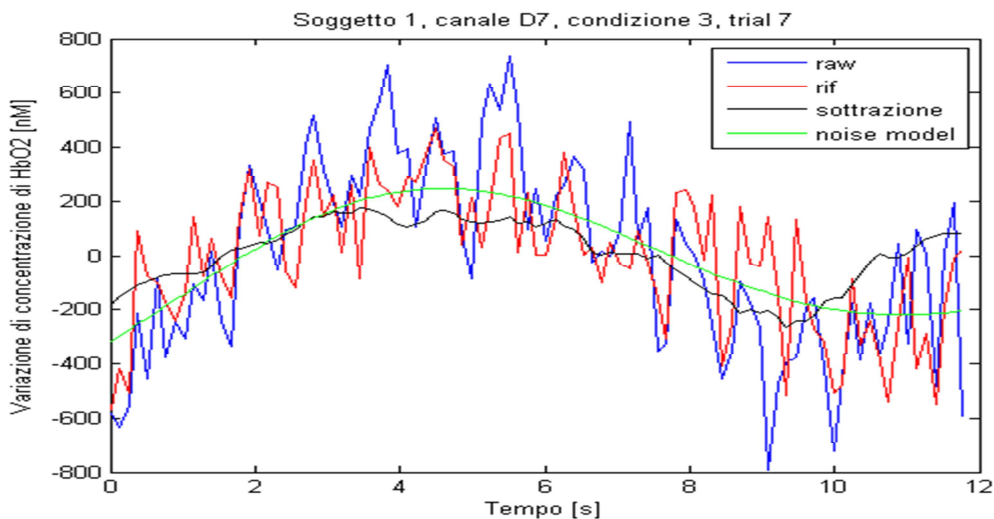


Fig 5.2.a - Esempi di trials dello stesso soggetto e canale: in blu il canale grezzo, in rosso il canale di riferimento grezzo, in verde il modello del rumore e in nero il segnale stimato dall' algoritmo.

Questo risultato non è sorprendente, in quanto il rumore casuale sempre presente quando si effettua una misurazione, non viene eliminato dal modello del rumore, che rappresenta solo determinate componenti fisiologiche da rimuovere, né dallo smoothing di Savitzky-Golay, che, appunto, provoca solo uno smoothing del segnale, riducendo soprattutto la frequenza cardiaca. Inoltre, può essere che alcune componenti fisiologiche del rumore, con frequenza maggiore di 0.18 Hz siano ancora presenti nel segnale. Anche le componenti fisiologiche alle basse frequenze potrebbero non essere state totalmente eliminate dal nuovo metodo, a causa sia del rumore presente nel canale di riferimento sia del fatto che viene usato un unico canale di riferimento per l'intera area analizzata: nei canali normali situati in posizioni lontane da quelle di riferimento le componenti fisiologiche potrebbero avere valori diversi rispetto ai canali vicini a quello di riferimento. Per questi motivi si è deciso di mediare fra di loro i trials relativi ad una stessa condizione. Infatti, dato che il rumore sovrapposto alla risposta emodinamica non è ad essa correlato temporalmente, e l'intervallo di tempo fra uno stimolo ed il successivo varia in modo casuale durante l'esperimento, la probabilità che le componenti fisiologiche rimaste siano in fase nei diversi trials è molto bassa. Inoltre, è un'ipotesi plausibile che il rumore di misura sia un segnale casuale, a media nulla, e non correlato con la HRF. La risposta emodinamica, invece, può essere assunta identica in tutti i trial di una stessa condizione. Per cui, mediando tra di loro tutti i trials relativi ad una stessa condizione, il rumore fisiologico e casuale si annullano, lasciando inalterata la risposta emodinamica.

Per ogni canale e soggetto sono stati considerati separatamente i trials relativi ai quattro diversi eventi; in questo modo è stato possibile valutare l'andamento temporale medio dell'emoglobina ossigenata per ognuna delle quattro condizioni. Poiché soprattutto nelle condizioni 1 e 2, ma anche nelle 3 e 4, il numero di trials mediati è piccolo (una decina nelle prime due e una trentina nelle seconde), è difficile ottenere una stima accurata della risposta emodinamica, come spiegato nel paragrafo 2.3.8. Dato che non sono state rilevate differenze significative fra la condizione 1 e 2 e tra la 3 e la 4, si è deciso di valutare la risposta emodinamica totale nelle condizioni 1 e 2, mediando tutti i trials relativi alle due condizioni e analogamente per le condizioni 3 e 4.

La stima della HRF è stata corretta per il valore di baseline: dall'intera curva della risposta emodinamica media stimata è stato sottratto il suo valor medio calcolato nell'intervallo compreso fra 5 campioni prima dello stimolo e 5 campioni successivi allo stimolo (circa 600 ms prima e 600 ms dopo lo stimolo).

5.2.1 Contrast-to-Noise Ratio (CNR)

Il CNR (Contrast-to-Noise Ratio) è un indice che viene utilizzato al posto del più comune SNR (Signal-to-Noise Ratio) in quanto, su dati reali, è difficile separare esattamente il rumore dal segnale utile. Tale indice è già stato usato su dati misurati con la fNIRS da Zhang et al. in [43]. Il CNR viene usato per verificare un effettivo miglioramento del nuovo algoritmo rispetto agli altri metodi utilizzati; esso infatti rappresenta il rapporto tra la potenza del segnale utile e quella del rumore, a partire da un'analisi della densità spettrale di potenza: un suo incremento comporta una migliore stima della HRF. È preferibile utilizzare un metodo che definisca il CNR nel dominio della frequenza piuttosto che nel tempo, in quanto gli stimoli dati al soggetto sono di natura periodica: in tal modo si riesce a separare più accuratamente il segnale utile dal rumore. La densità spettrale di potenza, $PSD(\omega)$, del segnale $y(t)$ viene stimata con il metodo del periodogramma a partire dagli N campioni di $y(t)$:

$$PSD(\omega) = \frac{1}{N} \cdot |Y(\omega)|^2 \quad (5.2.1.1)$$

dove:

$Y(\omega)$ Trasformata discreta di Fourier di $y(t)$

Il CNR è definito come:

$$CNR = \sqrt{\frac{P_{utile}}{P_{rumore}}} \quad (5.2.1.2)$$

dove:

P_{utile} potenza del segnale utile, dato dall'integrale della PSD(ω) all'interno della banda utile

P_{rumore} potenza del rumore, dato dall'integrale della PSD(ω) su tutte le frequenze al di fuori della banda del segnale utile

La banda utile nell'esperimento in esame è quella compresa tra 0.06167 e 0.08933 (banda fondamentale) e 0.12833 e 0.17267 (seconda armonica).

Il valore del CNR è stato calcolato su ogni risposta emodinamica stimata, per ogni soggetto, canale e condizione. I valori medi del CNR ottenuti con il nuovo algoritmo e con gli altri metodi di confronto sono riportati in tabella 5.2.1.a.

CNR			
Nuovo algoritmo	Low pass subtraction	Traditional low pass	Block average
0,8881	0,8788	0,6947	0,5911

Tab. 5.2.1.a – Valori medi di CNR calcolati sull'HRF stimata; a confronto i valori ottenuti applicando il nuovo algoritmo e quelli ottenuti con i tre metodi usati per il confronto

Il nuovo algoritmo presenta il valore di CNR più alto. Confrontato con la media coerente, il nuovo algoritmo porta un aumento del 50% del CNR medio, mentre rispetto al traditional low pass del 28%. Minima è invece la differenza con il low pass subtraction, risultando comunque leggermente migliore.

5.2.2 Analisi statistica ed interpretazione psicologica

Anche sui dati reali, come su quelli simulati, si è proceduto al calcolo del valore del picco della risposta emodinamica. Per individuare le aree cerebrali che si sono attivate durante i compiti proposti al soggetto, si è scelto di utilizzare il t-test come strumento per l'analisi statistica. I valori di picco sono stati calcolati per ogni canale, in ogni soggetto, per ognuna della quattro condizioni, sulla risposta emodinamica media stimata. Un esempio di HRF media stimata nel soggetto 2 nel canale A4 in ognuna delle 4 condizioni è rappresentata nelle fig. 5.2.2.a-b-c-d.

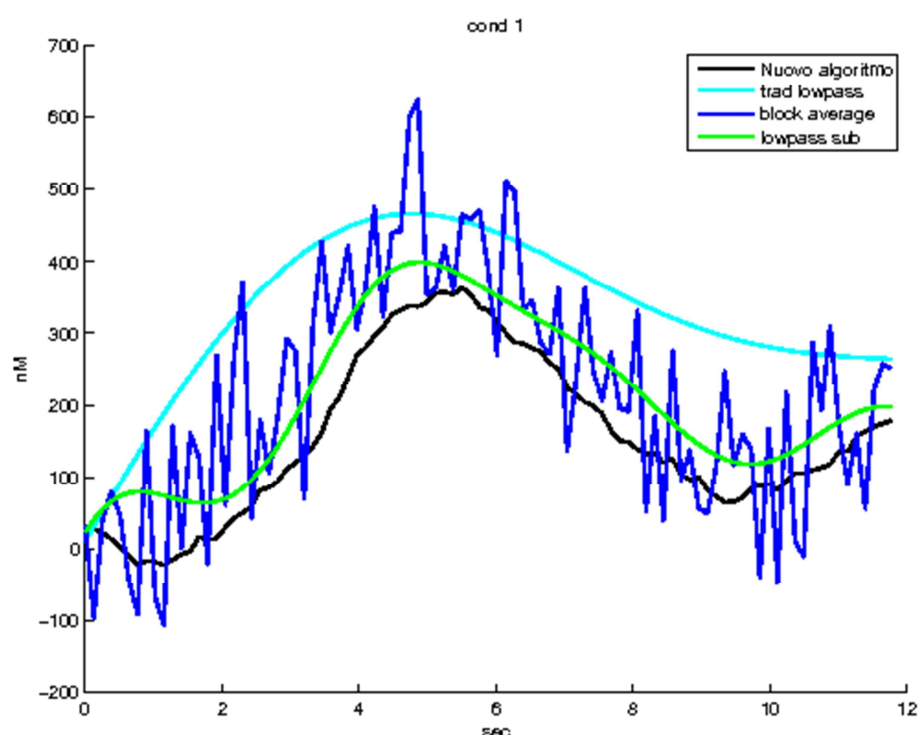


Fig. 5.2.2.a – Risposta emodinamica media del soggetto 2 nel canale A4, nella condizione 1. In nero la HRF stimata con il nuovo algoritmo, in verde con il low pass subtraction, in ciano con il traditional low pass e in blu con la media coerente.

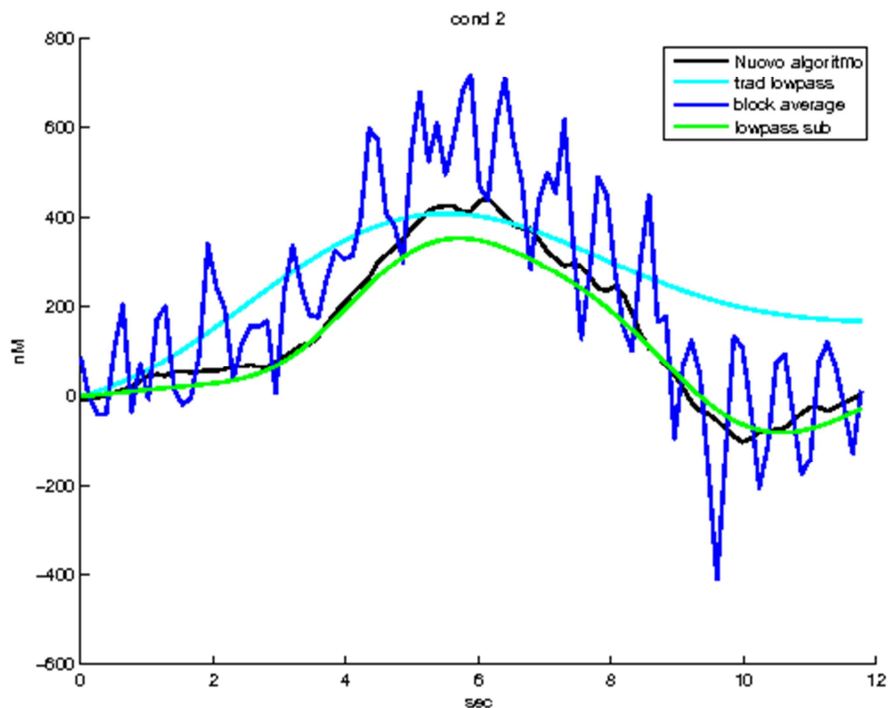


Fig. 5.2.2.b – Risposta emodinamica media del soggetto 2 nel canale A4, nella condizione 2. In nero la HRF stimata con il nuovo algoritmo, in verde con il low pass subtraction, in ciano con il traditional low pass e in blu con la media coerente.

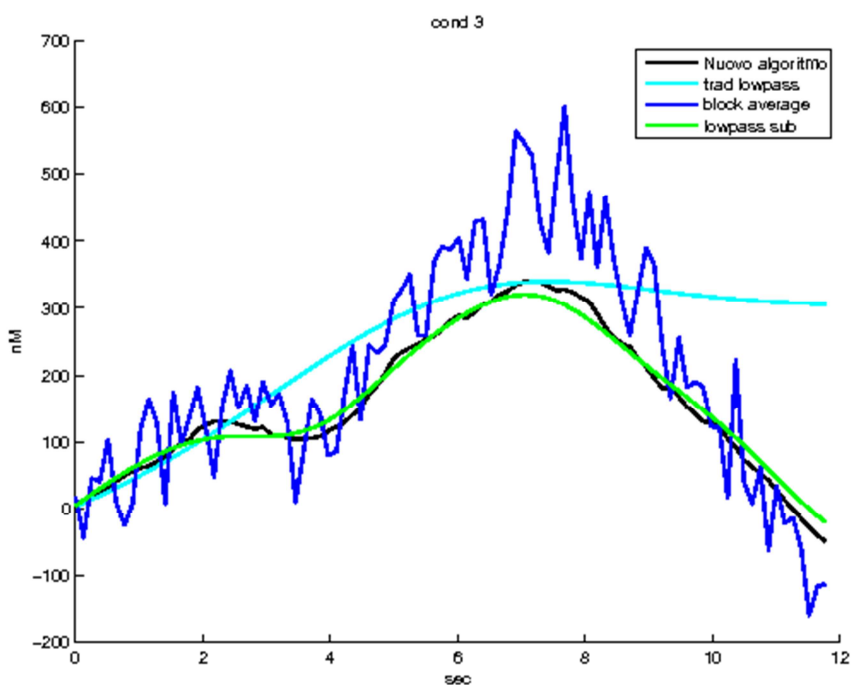


Fig. 5.2.2.c – Risposta emodinamica media del soggetto 2 nel canale A4, nella condizione 3. In nero la HRF stimata con il nuovo algoritmo, in verde con il low pass subtraction, in ciano con il traditional low pass e in blu con la media coerente.

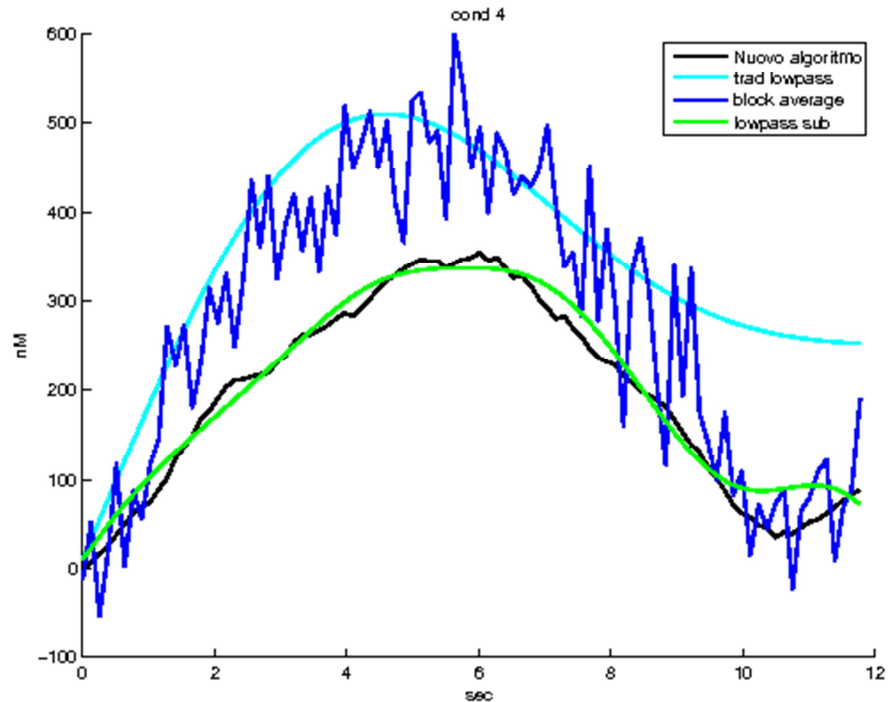


Fig. 5.2.2.d – Risposta emodinamica media del soggetto 2 nel canale A4, nella condizione 4. In nero la HRF stimata con il nuovo algoritmo, in verde con il low pass subtraction, in ciano con il traditional low pass e in blu con la media coerente.

Per individuare le aree di attivazione viene usato il t-test sui valori massimi delle risposte emodinamiche stimate. Il t-test viene applicato, separatamente per ogni canale e condizione, ai massimi valori di ampiezza delle HRF di ogni soggetto, confrontandoli con i valori di baseline (zero). I p-values ottenuti sono contenuti nella tabella 5.2.2.a: la soglia di significatività imposta è 0.05. I risultati del t-test rivelano un'attivazione in quasi tutti i canali in tutte e quattro le condizioni (p-values inferiori alla soglia di significatività): c'è un'ampia attivazione bilaterale di tutta la corteccia parieto-occipitale. L'unica zona che non risulta attiva da questa prima analisi preliminare è la ANG dell'emisfero destro (canale C3): risulta attiva solo durante il compito 4, ma con un p-value quasi al limite della significatività. Nella condizione 1 il p-value minore corrisponde alla zona LOC destra (canale D6) mentre nella condizione 2 alla zona ANG destra (canale D3); le zone IPS e pSPL dell'emisfero sinistro (canali A4 e A5) sono quelle con p-values minori nella condizione 3, mentre lo è la zona sIPS sempre dell'emisfero sinistro (canale A1) nella condizione 4.

Canali	Regioni	P-values vs baseline			
		Cond 1	Cond 2	Cond 3	Cond 4
A1	L sIPS	0,0047	0,0179	0,0092	0,0003
C1	R sIPS	0,0283	0,0351	0,0091	0,0497
A2	L sIPS	0,0156	0,0028	0,0043	0,0026
C2	R sIPS	0,0143	0,0372	0,0082	0,0022
A3	L ANG	0,0045	0,0410	0,0231	0,0080
C3	R ANG	0,0985	0,0928	0,0586	0,0487
A4	L IPS	0,0028	0,0025	0,0012	0,0040
C4	R IPS	0,0038	0,0031	0,0017	0,0011
A5	L pSPL	0,0076	0,0049	0,0012	0,0095
C5	R pSPL	0,0241	0,0233	0,0123	0,0041
B3	L ANG	0,0058	0,0720	0,0085	0,0275
D3	R ANG	0,0194	0,0024	0,0041	0,0052
B4	L IPS-IOS	0,0276	0,0083	0,0210	0,0097
D4	R IPS-IOS	0,0008	0,0028	0,0227	0,0115
B6	L LOC	0,0557	0,0118	0,0121	0,0124
D6	R LOC	0,0001	0,0061	0,0138	0,0026
B7	L SOC	0,0024	0,0255	0,0068	0,0043
D7	R SOC	0,0014	0,0055	0,0020	0,0011

Tab. 5.2.2.a – P-values ottenuti applicando un t-test ai valori di picco delle curve HRF medie stimate nelle 4 condizioni verso i valori di baseline, per ogni canale. Nella seconda colonna sono indicate le regioni della corteccia cerebrale a cui corrispondono i canali indicati nella prima colonna.

L'applicazione del t-test separatamente a ciascuna condizione nei confronti del valore di baseline ha permesso di evidenziare l'attivazione della zona parieto-occipitale durante il task motorio-cognitivo richiesto al soggetto in questo esperimento. Per valutare l'esistenza o meno di una differenza nell'attivazione cerebrale fra lo stesso compito ma eseguito nello spazio peripersonale o in quello extrapersonale, un ulteriore t-test viene eseguito confrontando i valori del picco della condizione 1 con quelli della condizione 2 e quelli della condizione 3 con quelli della 4. I p-values ottenuti sono contenuti nella tabella 5.2.2.b.

Canali	Regioni	P-values	
		1 vs 2	3 vs 4
A1	L sIPS	0,3339	0,2885
C1	R sIPS	0,1604	0,3138
A2	L sIPS	0,1261	0,1963
C2	R sIPS	0,4704	0,1680
A3	L ANG	0,1701	0,1533
C3	R ANG	0,1555	0,0784
A4	L IPS	0,0341	0,1334
C4	R IPS	0,1842	0,0147
A5	L pSPL	0,3022	0,1202
C5	R pSPL	0,3350	0,2758
B3	L ANG	0,1695	0,3350
D3	R ANG	0,2977	0,1228
B4	L IPS-IOS	0,4266	0,1186
D4	R IPS-IOS	0,2129	0,3260
B6	L LOC	0,0455	0,0267
D6	R LOC	0,2889	0,2039
B7	L SOC	0,4571	0,4545
D7	R SOC	0,2256	0,2275

Tab. 5.2.2.b – P-values ottenuti applicando un t-test ai valori di picco delle HRF medie stimate nella condizione 1, per ogni canale, verso i corrispondenti valori nella condizione 2 (terza colonna) e nella condizione 3 verso i corrispondenti valori nella condizione 4 (quarta colonna). I canali indagati e le rispettive zone della corteccia cerebrale sono indicati nelle prime due colonne.

Da quest'analisi risulta che solo una piccola parte della corteccia presenta delle differenze significative nell'attivazione tra la condizione 1 e la 2 e tra la condizione 3 e la 4. Solo la zona LOC dell'emisfero sinistro presenta una differenza significativa nell'attivazione sia tra quando il soggetto esegue il compito 1 ed il 2 che quando il soggetto esegue il 3 ed il 4. Forse questa potrebbe essere la zona che differenzia nella corteccia cerebrale l'interpretazione dell'informazione proveniente dallo spazio peripersonale da quella proveniente da quello extrapersonale. Un'altra zona risulta mostrare differenze significative nell'attivazione ma diverso è l'emisfero a cui la zona

appartiene nei due diversi confronti: la zona IPS dell'emisfero sinistro mostra una differenza significativa nell'attivazione fra la condizione 1 e la 2, mentre la zona IPS dell'emisfero destro mostra una differenza significativa nell'attivazione cerebrale fra le condizioni 3 e 4.

Al fine di aumentare il numero di trials da mediare ed ottenere così una stima più accurata (maggiore è il numero di trials, maggiormente la stima converge al valor vero), è stata calcolata la HRF media per le condizioni 1 e 2 considerate insieme ed analogamente per gli eventi 3 e 4. Due curve di risposta emodinamica stimate in tale modo sono raffigurate in figura 5.2.2.e-f.

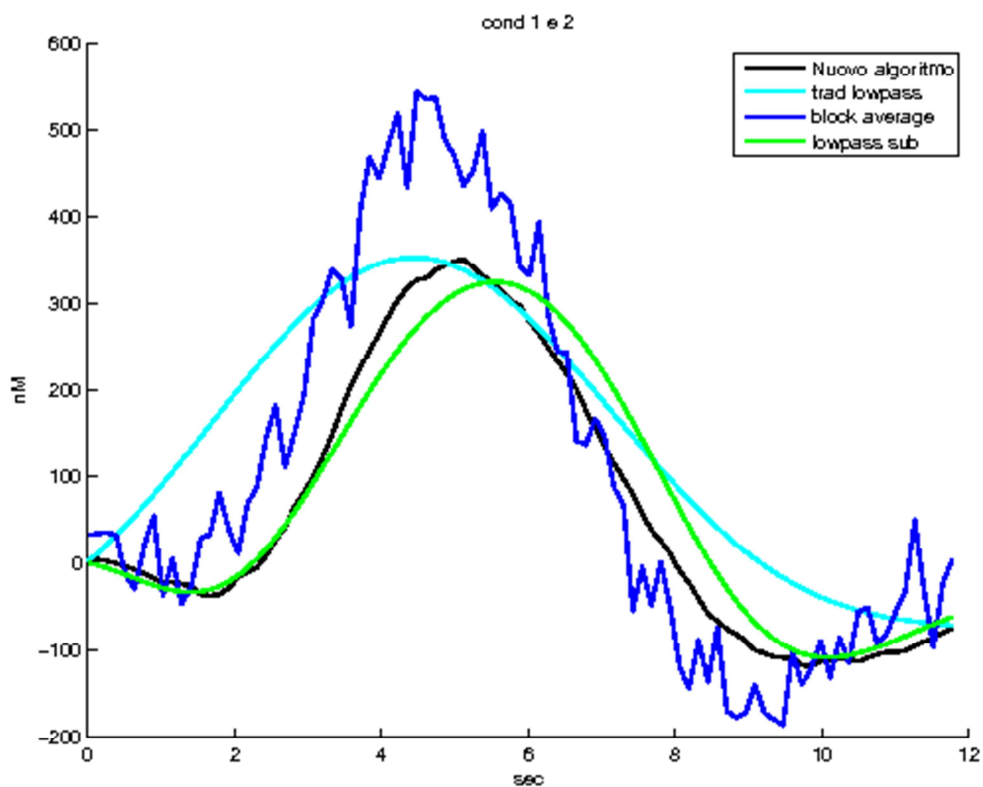


Fig. 5.2.2.e - Risposta emodinamica media del soggetto 5 nel canale A4, nella condizione 1 e 2. In nero la HRF stimata con il nuovo algoritmo, in verde con il low pass subtraction, in ciano con il traditional low pass e in blu con la media coerente.

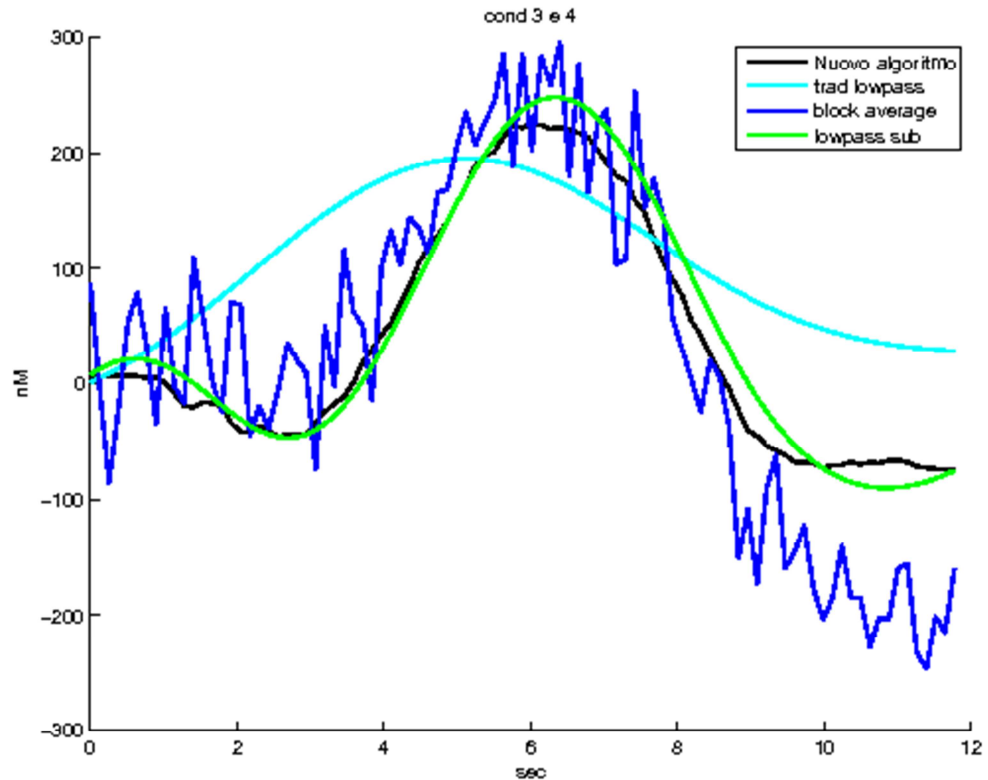


Fig. 5.2.2.f - Risposta emodinamica media del soggetto 5 nel canale A4, nella condizione 3 e 4. In nero la HRF stimata con il nuovo algoritmo, in verde con il low pass subtraction, in ciano con il traditional low pass e in blu con la media coerente.

Un t-test per valutare l'attivazione delle aree della corteccia cerebrale è stato effettuato anche sui risultati ottenuti con questo tipo di media. Nel t-test sono state prese in considerazione solo le risposte emodinamiche medie che rispettavano certi parametri, ovvero presentavano un valore massimo di picco di 900 nM, un minimo di 0 nM, ed erano state ottenute mediando un numero minimo di 20 trials.

Prima è stato effettuato un t-test confrontando i valori di picco ottenuti dalle risposte emodinamiche medie stimate con i valori di baseline (zero) (vedi tabella 4.2.2.c): tutte le aree della corteccia parieto-occipitale sotto indagine sono risultate attive. In secondo luogo, è stato effettuato un t-test per valutare eventuali differenze nell'elaborazione cerebrale tra i compiti 1 e 2 e quelli 3 e 4 e cioè differenze nell'elaborazione di un compito più complesso come il bisecare una linea rispetto ad uno più semplice come il toccare un'estremità. I p-values ottenuti sono riportati in tabella 5.2.2.d. La zona ANG sia dell'emisfero destro che del sinistro (canali C3,D3 e A3) presenta una differenza significativa nei valori assunti dal picco della HRF nell'eseguire i due diversi compiti. Questa potrebbe essere la zona della corteccia

cerebrale che viene maggiormente attivata durante l'elaborazione di un compito complesso. Anche la zona LOC presenta delle differenze significative, ma solo nell'emisfero sinistro.

Canali	Regioni	P-values	
		1+2 vs 0	3+4 vs 0
A1	L sIPS	0,0129	0,0035
C1	R sIPS	0,0022	0,0233
A2	L sIPS	0,0023	0,0038
C2	R sIPS	0,0194	0,0124
A3	L ANG	0,0033	0,0008
C3	R ANG	0,0134	0,0266
A4	L IPS	0,0099	0,0024
C4	R IPS	0,0059	0,0058
A5	L pSPL	0,0072	0,0026
C5	R pSPL	0,0222	0,0183
B3	L ANG	0,0384	0,0080
D3	R ANG	0,0031	0,0019
B4	L IPS-IOS	0,0274	0,0006
D4	R IPS-IOS	0,0016	0,0174
B6	L LOC	0,0290	0,0053
D6	R LOC	0,0017	0,0106
B7	L SOC	0,0201	0,0014
D7	R SOC	0,0036	0,0028

Tab. 5.2.2.c – P-values ottenuti applicando un t-test ai valori di picco delle HRF medie stimate nella condizione 1 e 2, per ogni canale, verso i valori di baseline (terza colonna) e nella condizione 3 e 4 verso i valori di baseline (quarta colonna). I canali indagati e le rispettive zone della corteccia cerebrale sono indicati nelle prime due colonne.

Canali	Regioni	P-values
		1+2 vs 3+4
A1	L sIPS	0,2049
C1	R sIPS	0,1149
A2	L sIPS	0,0907
C2	R sIPS	0,2557
A3	L ANG	0,0484
C3	R ANG	0,0454
A4	L IPS	0,0604
C4	R IPS	0,1135
A5	L pSPL	0,0556
C5	R pSPL	0,4800
B3	L ANG	0,0743
D3	R ANG	0,0216
B4	L IPS-IOS	0,0618
D4	R IPS-IOS	0,1232
B6	L LOC	0,0356
D6	R LOC	0,0519
B7	L SOC	0,2359
D7	R SOC	0,0905

Tab. 5.2.2.d – P-values ottenuti applicando un t-test ai valori di picco delle HRF medie stimate nella condizione 1 e 2, per ogni canale, verso i corrispondenti valori nella condizione 3 e 4. I canali indagati e le rispettive zone della corteccia cerebrale sono indicati nelle prime due colonne. In rosso le zone che presentano differenze significative.

Riassumendo, la risposta emodinamica stimata nelle varie condizioni con il nuovo algoritmo da dati fNIRS ha permesso di trarre delle conclusioni preliminari sulle zone della corteccia cerebrale attivate durante i diversi compiti proposti al soggetto. Risultati preliminari sono stati ottenuti anche per quanto riguarda la differenza tra le zone attivate durante un compito complesso e quelle attivate durante uno più semplice, nonché la differenza di attivazione cerebrale fra il compito eseguito nello spazio peripersonale e in quello extrapersonale. Ulteriori analisi sono necessarie per poter trarre delle conclusioni definitive.

6 Conclusioni e Sviluppi Futuri

6.1 Bilancio del lavoro svolto

La spettroscopia funzionale nel vicino infrarosso (fNIRS) è un'innovativa tecnica di neuroimaging che sfrutta il diverso comportamento dell'emoglobina ossigenata e deossigenata e dei tessuti nei confronti della luce nel vicino infrarosso, per calcolare le concentrazioni relative di HbO₂ e HHb. In risposta ad uno stimolo, i neuroni si attivano e richiedono un maggior apporto di ossigeno; tale aumento di emoglobina ossigenata e corrispettiva diminuzione di quella deossigenata nella zona attivata viene rilevata dal segnale fNIRS e rappresenta quella che viene chiamata risposta emodinamica. Dalle variazioni di concentrazione di HbO₂ e HHb, è possibile ricavare alcuni parametri emodinamici molto utili nello studio delle neuroscienze cognitive, come per esempio l'ossigenazione del cervello ed il flusso ematico. Poter ottenere un sempre maggiore numero di informazioni dallo stesso segnale nonché stimare i vari parametri con sempre maggior precisione, sono i motivi dei numerosi studi apparsi negli ultimi decenni sulla fNIRS e sulle altre tecniche di neuroimaging. Un miglioramento nell'elaborazione dei segnali acquisiti, per consentire una stima più accurata della risposta emodinamica, potrebbe aiutare gli studiosi di neuroscienze a meglio interpretare il segnale acquisito ed in base alla sua esatta localizzazione nella corteccia cerebrale, correlare quest'ultima con il compito eseguito durante l'acquisizione.

Ancora oggi, non sempre si riesce ad ottenere una stima accurata della risposta emodinamica, a causa principalmente delle componenti fisiologiche che vengono acquisite insieme ad essa e compaiono nel segnale fNIRS: la componente cardiaca, quella respiratoria, l'onda di Mayer e le oscillazioni alle bassissime frequenze. La più problematica e difficile da rimuovere, è la componente di Mayer, poiché essa possiede una frequenza simile a quella della risposta emodinamica attesa, per cui non è eliminabile con un semplice filtraggio in frequenza.

L'algoritmo proposto in questa tesi ha lo scopo di cercare di rimuovere questi artefatti fisiologici, soprattutto l'onda di Mayer. Esso sfrutta i dati acquisiti da un canale di riferimento, che non contiene la risposta emodinamica, ma solo le oscillazioni fisiologiche da eliminare e il rumore di misura. Il canale di riferimento viene ottenuto ponendo sorgente e rivelatore più vicini (1.5 cm) rispetto che nel normale canale di acquisizione (3 cm): il fascio di luce del canale di riferimento non raggiunge la corteccia cerebrale, per cui contiene solo il segnale che attraversa cuoio cappelluto e scalpo. La

novità dell'algoritmo proposto è proprio quella di usare questo canale di riferimento per calcolare un modello del rumore alle basse frequenze, da sottrarre poi al segnale acquisito da un normale canale.

Per validare l'algoritmo proposto e valutarne i benefici rispetto a metodi tradizionali usati generalmente in letteratura che non sfruttano il canale di riferimento (media convenzionale e filtraggio passabasso), si sono creati dei dati simulati sia per il canale di riferimento che per un normale canale di acquisizione. L'errore di stima è stato calcolato ed utilizzato come parametro quantitativo per il confronto. Il nuovo algoritmo presenta un errore di stima nettamente inferiore a quello degli altri due metodi. In aggiunta, il nuovo algoritmo presenta dei vantaggi rispetto agli altri due metodi nella stima del valore di picco, mentre per quanto riguarda la latenza tutti i metodi la sovrastimano leggermente: il valore di ampiezza del picco e la sua latenza sono i parametri comunemente usati per valutare la HRF ed è quindi essenziale una loro stima accurata. Il nuovo algoritmo ha permesso quindi di dimostrare ulteriormente l'efficacia dell'uso di un canale di riferimento per l'elaborazione del segnale fNIRS acquisito e per stimare la risposta emodinamica. L'ipotesi che il segnale in esso contenuto ben correla con il rumore fisiologico da eliminare contenuto nel segnale acquisito da un normale canale sembra essere confermata. Questo è essenziale, in quanto acquisire il segnale dal canale di riferimento richiede di utilizzare una o più coppie sorgente-detettore, che non possono essere quindi usate per registrare la risposta emodinamica, ed ha, come effetto, una riduzione dell'area cerebrale analizzabile, cosa di non poco conto se si dispone di un numero molto limitato di canali (come nella maggior parte delle strumentazioni fNIRS). Se non fosse possibile ottenere un miglioramento dall'uso del canale di riferimento, il suo utilizzo sarebbe quindi dannoso.

Il nuovo algoritmo è stato anche confrontato con un altro metodo che sfrutta il canale di riferimento e prevede la sottrazione diretta tra il segnale acquisito dal canale normale e quello rilevato da quello di riferimento, previa applicazione di un filtraggio passabasso su entrambi. L'errore di stima sull'intera durata del trial premia quest'ultimo metodo, anche se la differenza tra i due è minima. Invece, calcolando l'errore su un intervallo più limitato, all'interno del quale è contenuta la parte positiva della risposta emodinamica ed i parametri di interesse, l'errore di stima commesso dal nuovo algoritmo è inferiore, e soprattutto lo è la sua deviazione standard. La non grande differenza tra i due metodi è probabilmente dovuta al fatto che il nuovo algoritmo deve essere ancora migliorato nella parte riguardante l'eliminazione delle alte frequenze

fisiologiche. Il filtraggio passabasso, invece, elimina tutta la parte del segnale superiore alla frequenza di taglio, ma presumibilmente elimina anche parte del segnale utile. Infatti, la frequenza di taglio imposta, presume l'esatta conoscenza della frequenza della risposta emodinamica, cosa non sempre nota. Ulteriori sviluppi sono necessari per migliorare le prestazioni dell'algoritmo soprattutto nell'eliminazione degli artefatti fisiologici ad alte frequenze.

L'algoritmo è stato testato anche su dati reali, dati gli incoraggianti risultati emersi dalla simulazione. I dati reali sono stati ottenuti dalla registrazione del segnale fNIRS proveniente dall'area parieto-occipitale di 7 soggetti. L'esperimento è stato condotto nella realtà virtuale; i soggetti dovevano svolgere due compiti, bisecare o toccare l'estremità di una linea ad essi presentata, linea che poteva essere situata a 60 cm dal soggetto (nel suo spazio peripersonale) o a 120 cm da esso (nel suo spazio extrapersonale). Test statistici (t-test) applicati ai valori di picco ricavati dalle curve medie di ciascun soggetto confermano l'attivazione di tutta l'area parieto-occipitale durante l'esecuzione del task in esame. Tuttavia, dato che il numero di trials mediati è molto basso e la stima quindi ottenuta potrebbe non essere accurata, sono state raggruppate le condizioni così da averne solo due (bisecare o toccare l'estremità della linea). Questo ha permesso di ricavare le curve medie sfruttando un numero maggiore di trials (circa il doppio): anche in questo caso è stata trovata attivazione nell'intera regione parieto-occipitale, ed una differenza significativa (seppur piccola in termini di p-value) fra le due condizioni in alcuni siti. Tuttavia, per poter dare un'interpretazione dei meccanismi cognitivi sottostanti il compito eseguito dai soggetti, sono necessarie ulteriori indagini ed un miglioramento della stima della HRF, soprattutto in alcuni soggetti, il cui segnale sembra contenere più artefatti degli altri.

Per valutare l'effettivo miglioramento portato dal nuovo algoritmo sui dati reali, è stato calcolato il CNR (Contrast-to-Noise Ratio), che si basa su un'analisi della densità spettrale di potenza del segnale, sui dati elaborati con gli stessi algoritmi visti per i dati simulati. Il nuovo algoritmo presenta il valore di CNR più alto, ottenendo quindi una stima più accurata della HRF rispetto a quella ottenuta con gli altri metodi. In particolare, il valore di CNR ottenuto con il nuovo metodo è di poco superiore a quello ottenuto con l'altro metodo che sfrutta il canale di riferimento, mentre è molto maggiore di quello ottenuto con i metodi che non sfruttano il canale di riferimento, cosa che rende l'utilizzo di quest'ultimo molto promettente.

Il nuovo algoritmo sembra quindi in grado di ricostruire la HRF molto bene dai dati simulati, e riesce ad ottenere dei risultati preliminari soddisfacenti sui dati reali. Un ulteriore miglioramento dell'algoritmo è richiesto per riuscire a stimare la HRF in tutti i soggetti e situazioni, e per arrivare ad una stima single-trial.

6.2 Sviluppi futuri

L'algoritmo ideato in questo studio sembra portare un miglioramento nell'elaborazione dei dati di alcuni soggetti; tuttavia, su altri, le stime della risposta emodinamica che si ottengono restano difficilmente interpretabili. Ulteriori studi sono necessari per capire il motivo di tale differenza, che potrebbe non essere dovuta solo ad un diverso SNR legato al soggetto stesso (la fNIRS presenta infatti lo svantaggio di avere un SNR dipendente, per esempio, dal colore dei capelli o dallo spessore del cranio) e sfruttarlo al fine di trovare un modo per ottenere buone stime della HRF da tutti i soggetti.

Importante sarebbe riuscire anche a trovare un parametro che discrimini il caso in cui l'algoritmo è efficacemente applicabile ai dati ed il caso in cui, invece, la sua applicazione risulterebbe inutile se non addirittura nociva (per il rischio di introdurre rumore anziché rimuoverlo e per la perdita di almeno un canale normale che viene utilizzato invece come riferimento) o equivalente all'uso di un metodo tradizionale più semplice. Distinguere questi casi sarebbe importante per rendere massima l'efficacia dell'algoritmo. Per esempio, Zhang et al. in [43], hanno utilizzato il "rest period correlation coefficient" come indice per valutare quando l'applicazione del loro algoritmo sia vantaggiosa e quando no. Essi hanno calcolato il coefficiente di correlazione fra i dati del canale normale e quelli di quello di riferimento in 15 secondi precedenti ciascuno stimolo, in cui al soggetto era imposto di non muoversi e stare a riposo. Se tale indice era superiore a 0.6, allora l'applicazione del loro algoritmo portava benefici significativi nell'elaborazione dei dati. Infatti, solo se il canale di riferimento e quello normale sono correlati, allora ha senso usare il canale di riferimento per eliminare il rumore presente in quello normale, altrimenti si rischia di introdurre nel canale normale altro rumore, presente nel canale di riferimento ma non in quello normale. Nell'esperimento trattato in questa tesi, non è possibile utilizzare tale tipo di indice, in quanto, per limitare la durata complessiva dell'esperimento, non sono stati inseriti momenti di riposo tra uno stimolo ed il successivo. Durante l'esperimento il

soggetto aveva a disposizione alcune piccole pause, durante le quali gli era però consentito di muoversi. Ulteriori studi sono quindi necessari per trovare un appropriato indice che possa discriminare dai dati quando sia conveniente utilizzare il nuovo algoritmo proposto da quando non lo sia.

Utilizzando il nuovo algoritmo si arriva attualmente a valutare solo la risposta emodinamica media nei vari soggetti e nelle varie condizioni; la risposta emodinamica sul single-trial non è visibile né interpretabile, a causa della presenza del rumore di misura e di parte delle componenti fisiologiche. Questo comporta che le informazioni relative ai valori di picco e di latenza di ogni trial vengono perse nel calcolo della media, e il valore del picco della media di solito non coincide con la media dei valori di picco dei singoli trial. Interessante sarebbe quindi riuscire ad ottenere un miglioramento dell'algoritmo in questione, al fine di ottenere un stima single-trial della risposta emodinamica, e poter quindi valutare le sue variazioni durante l'esperimento.

Ringraziamenti

Vorrei ringraziare il Professor Sparacino, per aver avuto fiducia in me ed avermi affidato questo interessante tema di ricerca, nonché per i consigli e l'aiuto che mi ha sempre dato. Un ringraziamento particolare all'ing. Fabio Scarpa, per avermi sempre consigliato, sostenuto e corretto in questi mesi di lavoro. Un ringraziamento anche al Dipartimento di Psicologia dello Sviluppo e della Socializzazione dell'Università di Padova, per i consigli ed i feedback dati.

Infine un ringraziamento a tutta la mia famiglia ed i miei amici, per avermi sempre sostenuto ed accompagnato in questi anni di università.

Bibliografia

- [1] Cognitive Neuroscience Society. <http://cogneurosociety.org/>.
- [2] Purves D., Augustine G., Fitzpatrick D., Hall W., LaMantia A., McNamara J., White L., *Neuroscience*. Sunderland, MA, USA: Sinauer Associates, Inc., 2008.
- [3] Boas D., Franceschini M., Dunn A., Strangman G., "Noninvasive Imaging of Cerebral Activation with Diffuse Optical Tomography," in *In Vivo Optical Imaging of Brain Function*.: CRC Press, 2002, ch. 8, pp. 192-221.
- [4] Calderon-Arnulphi M., Alaray A., Slavin K.V., "Near infrared technology in neuroscience: past, present and future," *Neurological Research*, vol. 31, pp. 605-614, 2009.
- [5] Garbin L., Tesi di Laurea: Un Approccio Bayesiano per la Stima della Risposta Emodinamica da Dati di Spettroscopia Funzionale nel vicino Infrarosso (fNIRS), 2010.
- [6] Wolf M., Ferrari M., Quaresima V., "Progress of near-infrared spectroscopy and topography for brain and muscle clinical applications," *J Biomed Opt*, vol. 12, 2007.
- [7] Lloyd-Fox S., Blasi A., Elwell C.E., "Illuminating the developing brain: The past, present and future of functional near infrared spectroscopy," *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, vol. 34, pp. 269-284, 2010.
- [8] Son I.Y., Yazici B., "Near Infrared Imaging and Spectroscopy for Brain Activity Monitoring," in *Advances in Sensing with Security Applications*.: NATO, 2006.
- [9] Ferrari M., Mottola L., Quaresima V., "Principles, techniques, and limitations of near infrared spectroscopy," *Canadian Journal of Applied Physiology*, vol. 29, pp. 463-487, 2004.
- [10] Boas D.A., Gaudette T., Strangman G., Cheng X., Marota J.J., Mandeville J.B., "The accuracy of near infrared spectroscopy and imaging during focal changes in cerebral hemodynamic," *NeuroImage*, vol. 13, pp. 76-90, 2001.
- [11] Hielscher A.H., Bluestone A.Y., Abdoulaev G.S., Klose A.D., Lasker J., Stewart M., Netz U., Beuthanc J., "Near-infrared diffuse optical tomography," *Disease Markers*, vol. 18, pp. 313-337, 2002.
- [12] Calderon-Arnulphi M., Alaraj A., Amin-Hanjani S., et al., "Detection of cerebral ischemia in neurovascular surgery using quantitative frequency-domain near-infrared spectroscopy," *Neurosurg.*, vol. 106, pp. 283-290, 2007.

- [13] Dunham C.M., Sosnowski C., Porter J.M., et al., "Correlation of noninvasive cerebral oximetry with cerebral perfusion in the severe head injured patient: a pilot study," *J. Trauma*, vol. 52, pp. 40-46, 2002.
- [14] Lewis S.B., Myburgh J.A., Thornton E.L., et al., "Cerebral oxygenation monitoring by near-infrared spectroscopy is not clinically useful in patients with severe closed-head injury: a comparison with jugular venous bulb oximetry," *Crit. Care Med.*, vol. 24, pp. 1334-1338, 1996.
- [15] Misra M., Dujovny M., Alp M.S., et al., "Changes in cerebral oxygen saturation with change in posture: a preliminary report," *Stroke Cerebrovasc. Disc.*, vol. 6, pp. 337-340, 1997.
- [16] Soller B.R., Micheels R.H., Coen J., et al., "Feasibility of non-invasive measurement of tissue pH using near infra-red reflectance spectroscopy," *J Clin Monit*, vol. 12, pp. 387-395, 1996.
- [17] Luu S., Chau T., "Decoding subjective preference from single-trial near-infrared spectroscopy signals," *Journal of Neural Engineering*, vol. 6, 2009.
- [18] Naito M., Michioka Y., Ozawa K., Ito Y., Kiguchi M., Kanazawa T., "A communication means for totally locked-in als patients based on changes in cerebral blood volume measured with near-infrared light," *Trans Inform System*, vol. 90, 2007.
- [19] Biondi E., Cobelli C., *Storia della bioingegneria*. Bologna, Italia: Patron, 2001.
- [20] Sterpellone L., *I grandi della medicina.*: Donzelli, 2004.
- [21] Dealy J., Verdeaux G., Gaches J., *Elettroencefalografia clinica.*: Masson Italia editori, 1982.
- [22] Jacobson B., Murray A., *Medical Devices.*: Churchill Livingstone Elsevier, 2007.
- [23] Mehagnoul-Schipper D. J., Van Der Kallen, Colier, Van der Sluijjs, Van Erning, Thijssen, Oeseburg, Hoefnagels, Jansen, "Simultaneous measurements of cerebral oxygenation changes during brain activation by near-infrared spectroscopy and functional magnetic resonance imaging in healthy young and elderly subjects," *Hum Brain Mapp*, vol. 16, pp. 14-23, 2002.
- [24] Gamberini L, Seraglia B, Priftis K, "Processing of peripersonal and extrapersonal space using tools: Evidence from visual line bisection in real and virtual environments," *Neuropsychologia*, vol. 46, pp. 1298-1304, 2008.
- [25] Cutini S, Scatturin P, Menon E, Bisiacchi PS, Gamberini L, Zorzi M, Dell'Acqua R, "Selective activation of the superior frontal gyrus in task-switching: An event-related fNIRS study," *NeuroImage*, vol. 42, pp. 945-955, 2008.

- [26] Duncan A, Meek J, Clemence C, Elwell C, Fallon P, Tyszczuk L, Cope M, Delpy D, "Measurement of cranial optical path length as a function of age using phase resolved near infrared spectroscopy," *Pediatr. Res.*, vol. 39, pp. 889-894, 1996.
- [27] Franceschini MA, Toronov V, Filiaci ME, Gratton E, Fantini S, "On-line optical imaging of the human brain with 160-ms temporal resolution," *Opt. Express*, vol. 6, pp. 49-57, 2000.
- [28] Zhang Q, Brown EN, Strangman G, "Adaptive filtering for global interference cancellation and real-time recovery of evoked brain activity: a Monte Carlo simulation study," *J Biomed Opt*, vol. 12(4), 2007.
- [29] Finucane C, Boye G, Wei Fan C, Hade d, Byrne L, Kenny RA, "Mayer wave activity in vasodepressor carotid sinus hypersensitivity," *Europace*, vol. 23, pp. 247-253, 2010.
- [30] Coyle S, Ward T, Markham C, "Physiological Noise in Near-infrared Spectroscopy: Implications for Optical Brain Computer Interfacing," , San Francisco, CA, USA, 2004.
- [31] Obrig H, Neufang M, Wenzel R, Kohl M, Steinbrink J, Einhaeupl K, Villringer A, "Spontaneous Low Frequency Oscillations of Cerebral Hemodynamics and Metabolism in Human Adults," *NeuroImage*, vol. 12, pp. 623-639, 2000.
- [32] Julien C, "The enigma of Mayer waves: Facts and models," *Cardiovascular Research*, vol. 70, pp. 12-21, 2006.
- [33] Tortora GJ, Derrickson BH, *Principles of anatomy and physiology.*: John Wiley & Sons, 2009.
- [34] Jaszewski G, Strangman G, Wagner J, Kwong KK, Poldrack RA, Boas DA, "Differences in the hemodynamic response to event-related motor and visual paradigms as measured by near-infrared spectroscopy," *NeuroImage*, vol. 20, pp. 479-488, 2003.
- [35] Franceschini MA, Fantini S, Thompson JH, Culver JP, Boas DA, "Hemodynamic evoked response of the sensorimotor cortex measured noninvasively with near-infrared optical imaging," *Psychophysiology*, vol. 40, pp. 548-560, 2003.
- [36] Gratton G, Corballis PM, "Removing the heart from the brain: Compensation for the pulse artifact in the photon migration signal," *Psychophysiology*, vol. 32, pp. 292-299, 1995.
- [37] Morren G, Wolf M, Lemmerling P, Wolf U, Choi JH, Gratton E, De Lathauwer L, Van Huffel S, "Detection of fast neuronal signals in the motor cortex from functional near infrared spectroscopy measurements using independent component analysis," *Med Biol Eng Comput*, vol. 42, pp. 92-99, 2004.
- [38] Abdelnour AF, Huppert T, "Real-time imaging of human brain function by near-infrared spectroscopy using an adaptive general linear model," *NeuroImage*, vol. 46, pp. 133-143, 2009.

- [39] Zhang Y, Brooks DH, Franceschini MA, Boas DA, "Eigenvector-based spatial filtering for reduction of physiological interference in diffuse optical imaging," *J Biomed Opt*, vol. 10(1), 2005.
- [40] Saager R, Berger A, "Measurements of layer-like hemodynamic trends in scalp and cortex: implications for physiological baseline suppression in functional near-infrared spectroscopy," *J Biomed Opt*, vol. 13, 2008.
- [41] Telleri NL, Saager RB, Berger AJ, Scalp signal subtraction improves the signal-to-noise of NIRS activations, 2009, The Institute of Optics, University of Rochester.
- [42] Zhang Q, Brown EN, Strangman GE, "Adaptive filtering to reduce global interference in evoked brain activity detection: a human subject case study," *J Biomed Opt*, vol. 12(6), 2007.
- [43] Zhang Q, Strangman GE, Ganis G, "Adaptive filtering to reduce global interference in non-invasive NIRS measures of brain activation: How well and when does it work?," *NeuroImage*, vol. 45, pp. 788-794, 2009.
- [44] Haendel P., "Evaluation of a standardized sine wave fit algorithm".
- [45] Scarpa F, Cutini S, Scatturin P, Dell'Acqua R, Sparacino G, Bayesian filtering of human brain hemodynamic activity elicited by visual short-term maintenance recorded through functional near-infrared spectroscopy (fNIRS), 2010, submitted article.
- [46] Sparacino G, Milani S, Arslan E, Cobelli C, "A Bayesian approach to estimate evoked potentials," *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, vol. 68, pp. 233-248, 2002.

Siti consultati per le immagini

- [47] MRC Cognition and Brain Sciences Unit. <http://www.mrc-cbu.cam.ac.uk/people/jessica.grahn/neuroanatomy.html>.
- [48] <http://magdalenanordh.wordpress.com/2010/06/>
- [49] <http://www.nimoworld.com/ita/biomedicale/teoria.asp>
- [50] http://www.yss_lab.mech.keio.ac.jp/research/bio/index.html
- [51] <http://www.nimoworld.com/ita/biomedicale/teoria.asp>
- [52] <http://ardbeg.c.u-tokyo.ac.jp/pc/method.html>

- [53] <http://www.gizmowatch.com/entry/13-ways-to-use-brain-power-to-command-your-geekdom>
- [54] <http://www.dangerousfitness.it/?p=1701>
- [55] <http://www.ebme.co.uk/arts/eegintro/index.htm>
- [56] <http://www.ebme.co.uk/arts/mri/fmri.htm>
- [57] <http://www.dsc.tudelft.nl/Research/Current/projects-by-person-13-kedarekdne-1140456268-cf51.html>