

UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA



DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

La spettroscopia funzionale nel vicino infrarosso per lo studio della connettività neonatale durante l'ascolto delle parole

Relatore

Prof. Ferrante Augusto

Laureanda

Molo Giulia

Correlatrice

Flò Ana

ANNO ACCADEMICO 2023-2024

Data di laurea 25/09/2024

Sommario

Questa tesi esplora l'uso della spettroscopia funzionale nel vicino infrarosso (fNIRS) per l'analisi dell'attività cerebrale, con un focus particolare sulla connettività funzionale. La trattazione è articolata in due parti principali, ciascuna con un diverso approccio.

Nella prima parte, viene offerta una panoramica teorica e metodologica, che illustra i fondamenti fisici e strumentali della fNIRS. In particolare, viene approfondita la legge di Beer-Lambert modificata, fondamentale per comprendere l'assorbimento della luce nei tessuti cerebrali. Vengono inoltre descritte le varie tecniche utilizzate per l'acquisizione e l'analisi dei dati cerebrali, fornendo un quadro generale delle applicazioni della fNIRS nel campo delle neuroscienze.

La seconda parte si concentra sugli aspetti pratici, basati sull'esperienza di tirocinio. Viene descritto un esperimento specifico finalizzato a studiare la percezione del linguaggio nei neonati attraverso la fNIRS. Sono descritti i passaggi necessari per il preprocessing dei dati, fase cruciale per garantire l'affidabilità delle analisi successive. Si affrontano quindi le tecniche di analisi della connettività funzionale, mostrando come i dati preprocessati possano essere utilizzati per esplorare le interazioni tra diverse regioni cerebrali.

L'obiettivo principale di questa tesi è fornire una comprensione chiara e sistematica dei passaggi necessari per eseguire il preprocessing dei dati fNIRS e dimostrare come questi possano essere utilizzati in una prima analisi della connettività cerebrale. Questo lavoro rappresenta un primo passo verso una comprensione più ampia delle potenzialità della fNIRS, evidenziando l'importanza di integrare teoria e pratica per sfruttare appieno le sue applicazioni.

Indice

1	La spettroscopia funzionale nel vicino infrarosso	1
1.1	Basi e strumentazione della fNIRS	1
1.2	Componenti del segnale	3
1.3	Principi fisici: legge di Beer-Lambert modificata	6
1.4	Classificazione tecniche fNIRS	12
2	Applicazione fNIRS: la percezione del linguaggio nei neonati	15
2.1	Connettività funzionale	16
2.2	Descrizione esperimento	18
2.3	Data preprocessing	21
2.4	Analisi di connettività	24
3	Conclusioni e prospettive future	31
	Bibliografia	33

Elenco delle figure

1.1	Illustrazione del percorso (mostrato in rosso) seguito dai fotoni NIR dalla sorgente luminosa al rilevatore attraverso i diversi strati della testa.	2
1.2	Segnale dipendente dal livello di ossigenazione del sangue (BOLD).	3
1.3	Confronto tra un canale non funzionale e un canale funzionale (privo di artefatti)	4
1.4	Esempio di segnale contenente artefatti da movimento	5
1.5	Confronto tra le onde Mayer, la respirazione e la pulsazione cardiaca.	6
1.6	Rappresentazione del comportamento della luce quando incontra un mezzo materiale	7
1.7	Illustrazione delle tre diverse tecniche NIRI (Near-Infrared Imaging; si intendono i sistemi NIRS con capacità di imaging). (a) La tecnologia a onda continua emette luce a intensità costante e misura solo i cambiamenti nell'intensità della luce che passa attraverso il tessuto. (b) La tecnologia del dominio della frequenza modula l'intensità della luce emessa e quindi misura l'intensità della luce rilevata e lo sfasamento, che corrisponde al tempo di volo. (c) La tecnologia del dominio del tempo emette un impulso estremamente breve di luce nel tessuto e misura i tempi di arrivo dei fotoni che emergono dal tessuto.	12
2.1	Istogramma	17
2.2	Istogramma	17
2.3	Istogramma	17
2.4	Paradigma di familiarizzazione-interferenza-test. Ogni soggetto è stato testato in due sessioni separate da 9 minuti di silenzio: in una sessione i neonati hanno ascoltato la stessa parola durante la familiarizzazione e il test (condizione della stessa parola; A X A), mentre nell'altra sessione è stata presentata una parola nuova durante la fase di test (condizione della parola nuova; A X B). L'ordine delle condizioni e delle parole utilizzate nelle diverse fasi è stato controbilanciato tra i partecipanti.	20
2.5	Rappresenzazioni della distribuzione dei canali	21
2.6	Rappresentazione dei passaggi cruciali della fase del preprocessing	23

2.7	Matrici di correlazione considerando i dati non normalizzati.	24
2.8	Matrici di correlazione considerando i dati normalizzati con la trasformata di Fisher.	24
2.9	Box plot per visualizzare la distribuzione dei valori di connettività media calcolata per ogni soggetto all'interno di ciascuna condizione sperimentale. . .	26
2.10	Raffigurazione della strumentazione fNIRS dove i canali sono evidenziati con colori distintivi per rappresentare le diverse aree cerebrali monitorate. I canali in giallo identificano il Giro Frontale Inferiore, quelli in verde il Giro Temporale Superiore e quelli in rosa il Lobo Parietale	27

Capitolo 1

La spettroscopia funzionale nel vicino infrarosso

1.1 Basi e strumentazione della fNIRS

La functional Near-Infrared Spectroscopy (fNIRS) è una tecnica innovativa di neuroimaging che si basa sul principio dell'accoppiamento neuro-vascolare, utilizzando la luce a specifiche lunghezze d'onda nella regione del vicino infrarosso; consente di misurare in maniera non invasiva l'attività emodinamica del tessuto cerebrale e i relativi aspetti funzionali, rilevando le variazioni di concentrazione di ossiemoglobina e deossiemoglobina. I sistemi fNIRS permettono di condurre delle analisi in contesti interattivi della vita quotidiana, grazie alla compattezza della strumentazione, ai costi contenuti e alla trasportabilità. La registrazione fNIRS viene effettuata mediante un dispositivo indossabile (copricapo) posizionato sullo scalpo del paziente, che include coppie sorgente-rilevatore, senza imporre vincoli fisici al partecipante, consentendo così la libertà di eseguire movimenti o compiti motori. Diversamente delle altre tecniche di neuroimaging, la sicurezza d'uso e la tollerabilità ai movimenti hanno reso questa strumentazione applicabile a tutti i pazienti, compresi i neonati. Di conseguenza la fNIRS è utilizzata nelle indagini sullo sviluppo neuronale e sulle attività motorie. Attualmente, è impiegata come strumento di ricerca e monitoraggio dell'emodinamica corticale; tuttavia, ha mostrato il potenziale per essere anche una tecnica di supporto alla neuroriabilitazione, consentendo di monitorare continuamente i progressi motori e cognitivi dei pazienti.

La sorgente o emettitore del segnale, consiste in un diodo a emissione di luce (LED) o a un diodo laser (LD) posizionato sullo scalpo che emette un campo elettromagnetico nel vicino infrarosso. Un fotorilevatore con elevata sensibilità, posizionato a pochi centimetri dall'emettitore, rileva l'onda luminosa non assorbita dal mezzo. La luce nell'intervallo del vicino infrarosso (NIR) (650-1100 nm) può penetrare nei tessuti umani fino a una profondità di diversi centime-

tri, producendo effetti sia fisici che chimici. I fotoni incidenti attraversano il cuoio capelluto, il cranio e il cervello, seguendo un percorso approssimativamente a forma di banana la cui profondità è circa un terzo della distanza tra la sorgente di luce e il rivelatore [1]. La capacità della luce NIR di penetrare nei tessuti umani è dovuta principalmente alla dispersione (scattering), che è circa dieci volte più probabile rispetto all'assorbimento. Durante il suo passaggio attraverso i tessuti, la luce NIR viene assorbita dalle molecole di emoglobina ossigenata (HbO_2) e deossigenata (HHb), con contributi minori all'assorbimento dovuti all'acqua, ai grassi e a varie proteine (come i citocromi a e c). Inoltre, poiché il 70-80% del sangue nel cervello si trova nel compartimento venoso, le tecniche NIRS forniscono principalmente informazioni sul sangue venoso.

La profondità di penetrazione della luce NIR nella testa umana è principalmente determinata dalla distanza tra la sorgente luminosa e il rivelatore. Con valori tipici di assorbimento e dispersione per la testa umana e una distanza sorgente-rivelatore di circa 4 cm, si può monitorare una profondità della corteccia cerebrale di almeno 0,3 cm. Aumentare questa distanza può migliorare la profondità di penetrazione ottica, ma comporta una riduzione del rapporto segnale-rumore, limitando così i metodi ottici all'esplorazione della corteccia cerebrale esterna.

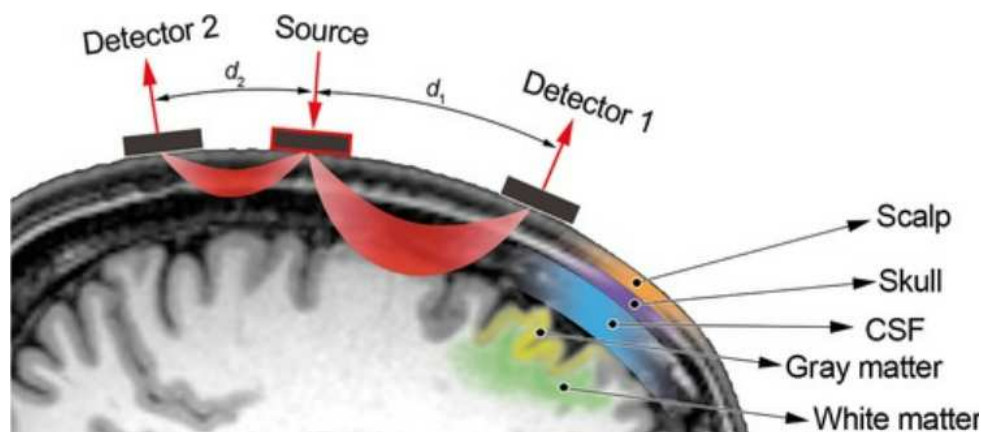


Figura 1.1: Illustrazione del percorso (mostrato in rosso) seguito dai fotoni NIR dalla sorgente luminosa al rivelatore attraverso i diversi strati della testa.

L'acquisizione del segnale attraverso la spettroscopia nel vicino infrarosso (NIRS) si basa sulla misurazione di come specifiche molecole assorbono la luce, chiamate cromofori. Nella regione del vicino infrarosso, l'assorbimento è principalmente legato all'ossiemoglobina (HbO_2) e alla deossiemoglobina (HHb). Per valutare l'attività cerebrale, si usano due lunghezze d'onda diverse: una più sensibile all'ossiemoglobina e l'altra alla deossiemoglobina, consentendo così di stimare la concentrazione di questi cromofori. Misurare le concentrazioni di deossiemoglobina e ossiemoglobina è fondamentale nello studio della funzione cognitiva, poiché esiste una correlazione significativa tra l'attività neuronale e la perfusione sanguigna cerebrale. Quando

le cellule nervose del cervello sono attivate, richiedono un aumento dell'apporto energetico. Questo incremento è sostenuto da un aumento del metabolismo, che comprende il consumo di glucosio e ossigeno. Questi nutrienti sono essenziali per la produzione di ATP attraverso due processi principali: la glicolisi e la fosforilazione ossidativa. In questo contesto, l'ossigeno funge da accettore finale di elettroni durante la sintesi di ATP; pertanto, durante l'attività cerebrale, si verifica un aumento della concentrazione di ossiemoglobina e una diminuzione della concentrazione di deossiemoglobina. Di conseguenza, questo strumento di neuroimaging è idoneo per la ricerca nelle neuroscienze cognitive, ovvero lo studio dei meccanismi neurali alla base delle funzioni cognitive del cervello umano. Questo include l'analisi dei processi neurobiologici che consentono al cervello di elaborare e rispondere a stimoli esterni e motivazioni interne, di decodificare il significato di tali stimoli e di generare risposte adeguate.

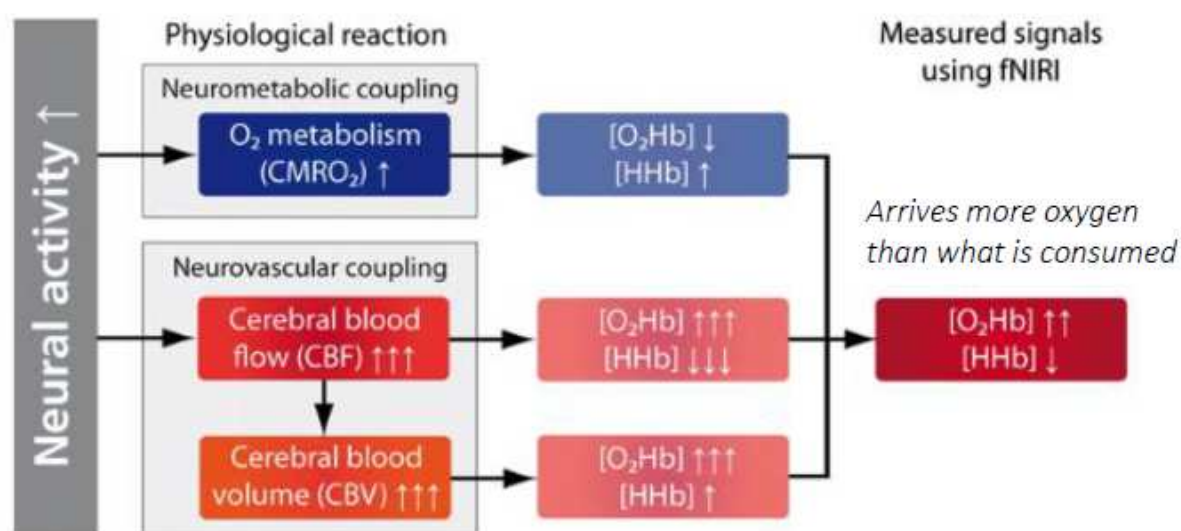


Figura 1.2: Segnale dipendente dal livello di ossigenazione del sangue (BOLD).

1.2 Componenti del segnale

Il segnale ottenuto con la tecnica fNIRS include sia informazioni utili legate all'attività cerebrale che interferenze dovute a fattori esterni o fisiologici non correlati all'attività cerebrale stessa. Per ottenere dati significativi sulle concentrazioni di cromofori, è fondamentale separare il segnale utile dalle varie fonti di disturbo.

In pratica, dobbiamo distinguere tra le variazioni del segnale causate da eventi specifici legati all'attività cerebrale e quelle dovute a fenomeni generali come cambiamenti nella circolazione sanguigna, altri processi fisiologici e rumore strumentale. Questo processo di separazione permette di isolare le informazioni rilevanti, migliorando la nostra comprensione dell'attività cere-

brale e assicurando che i dati ottenuti siano il più accurati e rappresentativi possibile. Il segnale neurale di interesse, che permette di valutare la concentrazione dei cromofori, è rappresentato dalle variazioni di intensità luminosa che riflettono l'attività cerebrale. Questi cambiamenti nella densità luminosa sono correlati all'attività neuronale e ai cambiamenti nel flusso sanguigno cerebrale. Durante la fase di preprocessamento dei dati le variazioni di intensità luminosa vengono convertite in misure dei cambiamenti di concentrazione dei cromofori, tramite l'applicazione della legge di Beer-Lambert modificata.

Tuttavia, affinché queste misure siano accurate, è fondamentale gestire e ridurre il rumore presente nei dati raccolti. Il rumore può essere classificato in diverse categorie:

1. Rumore dovuto alla strumentazione

Causa	Soluzione
Rumore elettrico	Ottimizzazione dell'intensità luminosa per ciascuna sorgente e lunghezza d'onda, e dell'amplificazione del guadagno del rilevatore
Variazioni temporali nel segnale	Ridurre rumore esterno
Saturazione del detector	Buon contatto degli optodi
Cross-talk	Migliorare le configurazioni e gli schemi di illuminazione

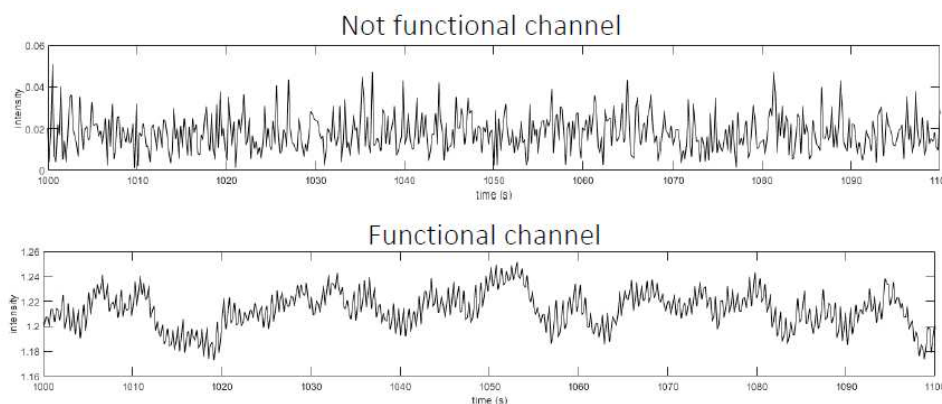


Figura 1.3: Confronto tra un canale non funzionale e un canale funzionale (privo di artefatti)

2. Artefatti da movimento

I movimenti della testa, dei denti e delle sopracciglia possono indurre variazioni significative nell'accoppiamento ottico tra l'optodo e la superficie cutanea. Tali movimenti possono introdurre artefatti nei dati raccolti, compromettendo l'integrità e l'accuratezza delle misurazioni neuroimaging. Generalmente, gli artefatti da movimento sono facilmente identificabili perché appaiono come picchi distinti nel segnale registrato. Questi picchi rappresentano variazioni rapide e improvvise, che si distinguono chiaramente dal segnale normale e ci aiutano a riconoscerli e correggerli durante l'analisi dei dati.

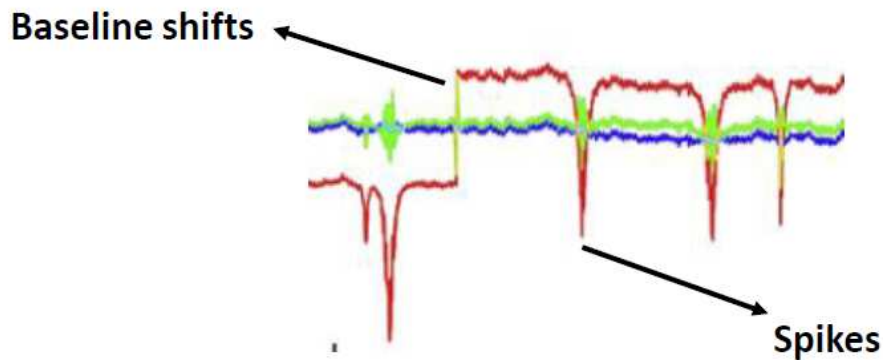


Figura 1.4: Esempio di segnale contenente artefatti da movimento

3. Rumore fisiologico

I processi fisiologici sistemici che non sono direttamente legati all'attività cerebrale possono introdurre artefatti nei dati di neuroimaging. Tra i principali responsabili di questi artefatti ci sono:

- Variazioni nella pressione parziale di CO₂: tali variazioni possono influenzare il diametro dei vasi sanguigni e alterare il flusso di sangue nel cervello.
- Pulsazioni cardiache (0,6-2,5 Hz): le pulsazioni del cuore causano cambiamenti nel volume del sangue all'interno dei vasi cerebrali, creando fluttuazioni nel segnale. Questi cambiamenti possono causare fluttuazioni nel segnale di neuroimaging, poiché le pulsazioni influenzano direttamente il flusso sanguigno e, di conseguenza, la concentrazione di cromofori nel sangue cerebrale. Le pulsazioni cardiache costituiscono la componente del segnale con la frequenza più elevata. La presenza di queste onde regolari, tipicamente intorno a 1 Hz (come mostrato in figura 1.3), è un indicatore fondamentale della qualità del segnale. Infatti, se non si riescono a vedere queste onde significa che non si sta registrando bene il segnale.
- Respirazione (0,2-0,6 Hz): le oscillazioni del volume toracico, dovute alla respirazione, possono influenzare sia il flusso sanguigno che la pressione intracranica, introducendo ulteriori artefatti nelle misurazioni. Inoltre, queste onde si trovano in una banda di frequenza simile a quella del segnale di interesse, rendendo più difficile la distinzione tra i segnali fisiologici e i segnali target.
- Onde di Mayer (0,1 Hz): queste oscillazioni lente della pressione sanguigna e del tono vascolare rappresentano un ulteriore fattore di confusione nei dati di neuroimaging, poiché possono produrre variazioni periodiche nel segnale che non sono direttamente correlate all'attività cerebrale.

Per minimizzare l'impatto di questi artefatti, è necessario implementare tecniche avanzate di pre-processamento e analisi dei dati. Questi metodi includono l'uso di filtri specifici per rimuovere frequenze non correlate all'attività cerebrale e algoritmi di separazione del segnale che possono distinguere tra le variazioni fisiologiche e quelle di interesse neurologico. Inoltre, è importante monitorare e, se possibile, controllare le condizioni fisiologiche dei partecipanti durante le sessioni di neuroimaging per ridurre l'influenza di questi fattori.

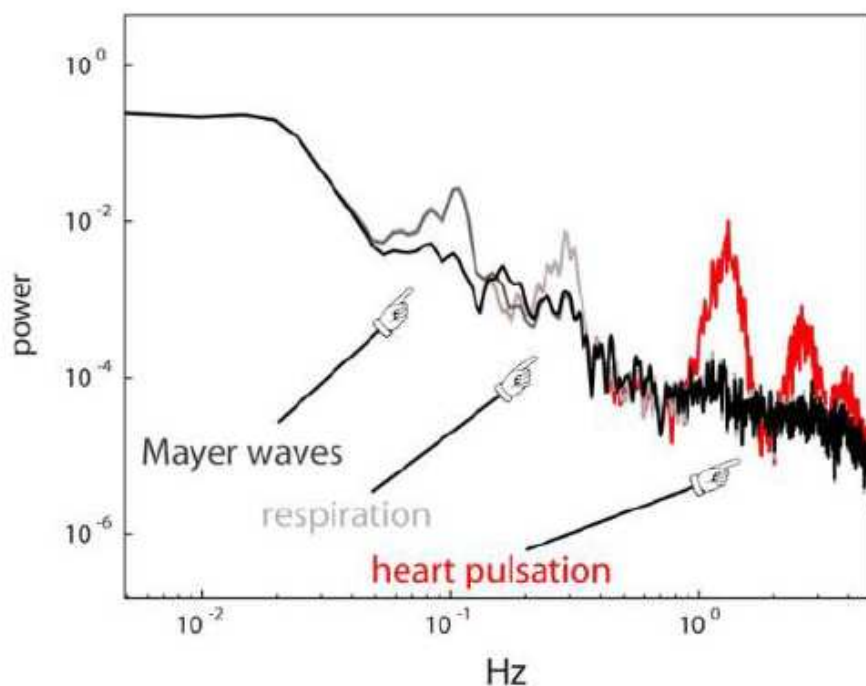


Figura 1.5: Confronto tra le onde Mayer, la respirazione e la pulsazione cardiaca.

1.3 Principi fisici: legge di Beer-Lambert modificata

Quando un'onda elettromagnetica incide su una superficie, possono verificarsi tre distinti fenomeni fisici:

1. Trasmissione: l'onda elettromagnetica attraversa il materiale senza alterazioni significative della sua direzione o intensità. Questo fenomeno è caratteristico di materiali trasparenti o semi-trasparenti che permettono il passaggio dell'onda.
2. Assorbimento: l'energia dell'onda elettromagnetica viene assorbita dal materiale, risultando in una conversione dell'energia dell'onda in energia interna delle molecole del materiale. Questo processo può portare ad un aumento della temperatura del materiale o ad altri cambiamenti fisici e chimici interni.

3. Scattering: l'onda elettromagnetica viene deviata in diverse direzioni a causa della presenza di particelle o irregolarità all'interno del mezzo, indicativo di un mezzo non omogeneo.

Nel caso della spettroscopia funzionale nel vicino infrarosso (fNIRS), il segnale luminoso emesso dalla sorgente deve attraversare un mezzo biologico non omogeneo. Durante il suo percorso, la luce interagisce con vari tessuti, come l'acqua, le ossa e la pelle, che influenzano la propagazione del segnale in modi differenti. Attraverso il fenomeno dello scattering, la luce viene deviata in diverse direzioni a causa delle disomogeneità del tessuto. I detector rilevano questa luce deviata, e quella che ha percorso distanze maggiori dalla sorgente è quella che ha penetrato più in profondità nel tessuto cerebrale. In questo contesto, non è ancora possibile determinare con precisione la quantità esatta di luce deviata. Pertanto, si adotta un'approssimazione che assume lo scattering come costante nel tempo.

Per quanto riguarda l'assorbimento della luce, esso dipende da vari fattori: l'assorbimento specifico di ciascun cromoforo a determinate lunghezze d'onda, la concentrazione dei cromofori nel mezzo e la distanza percorsa dalla luce attraverso il mezzo stesso. Ogni cromoforo possiede un coefficiente di assorbimento che varia con la lunghezza d'onda della luce, e la quantità di luce assorbita aumenta con la concentrazione dei cromofori e con la distanza attraversata dalla luce.

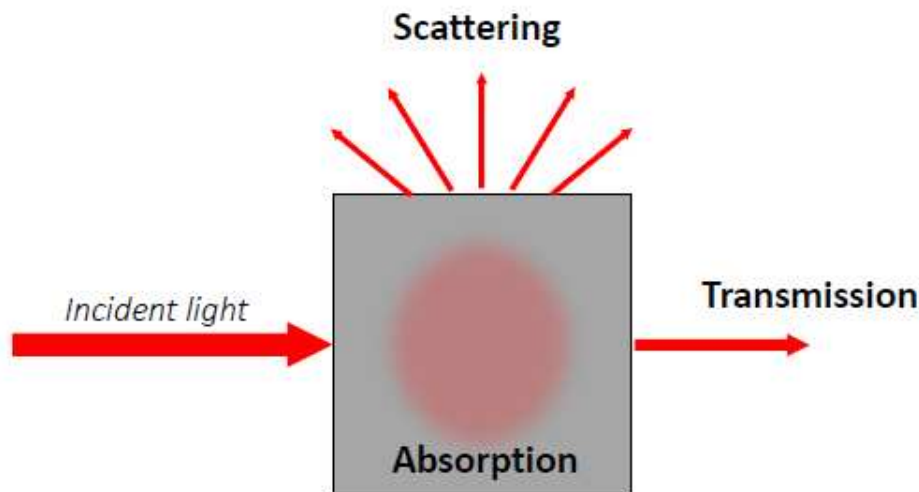


Figura 1.6: Rappresentazione del comportamento della luce quando incontra un mezzo materiale

Il principio di Beer-Lambert consente di calcolare l'assorbimento della luce in relazione alla concentrazione dei cromofori nel tessuto. Esso stabilisce una relazione direttamente proporzionale tra l'assorbanza (anche chiamata densità ottica) e la concentrazione dei cromofori a una

specifica lunghezza d'onda. In altre parole, questo principio permette di determinare come varia l'intensità della luce assorbita in funzione della quantità di cromofori presenti nel tessuto e della lunghezza del cammino ottico attraverso il quale la luce passa. La formula che esprime questa relazione è:

$$A(\lambda) = -\ln\left(\frac{I}{I_0}\right) = \alpha(\lambda)cl \quad (1.1)$$

dove:

- $A(\lambda)$ è l'assorbimento (detto anche densità ottica OD);
- I_0 è l'intensità della luce incidente;
- I è l'intensità della luce trasmessa;
- $\alpha(\lambda)$ coefficiente di assorbimento del cromoforo;
- c è la concentrazione del soluto;
- l è il percorso ottico della luce attraverso il campione.

Possiamo riscrivere questa formula utilizzando il logaritmo in base 10, ricordando la relazione di cambio di base per i logaritmi:

$$\log_{10}\left(\frac{I}{I_0}\right) = \frac{\ln\left(\frac{I}{I_0}\right)}{\ln 10}$$

Quindi posso scrivere:

$$A(\lambda) = -\log_{10}\left(\frac{I}{I_0}\right) = \frac{\alpha(\lambda)}{\ln 10}cl = \varepsilon(\lambda)cl \quad (1.2)$$

Dove $\varepsilon(\lambda) = \frac{\alpha(\lambda)}{\ln 10}$ rappresenta il coefficiente di estinzione molare e differisce da $\alpha(\lambda)$ per un fattore di scala. In questo caso, stiamo analizzando l'assorbanza attribuibile a un singolo cromoforo. Tuttavia, è fondamentale considerare che il tessuto biologico è costituito da una varietà di molecole assorbenti, tra cui lipidi, mioglobina, acqua, ossiemoglobina e deossiemoglobina. Di conseguenza, l'assorbanza totale del tessuto biologico è la risultante della somma dei contributi di ciascuno di questi cromofori, ognuno caratterizzato da specifici coefficienti di assorbimento a diverse lunghezze d'onda:

$$A(\lambda) = -\log_{10}\left(\frac{I}{I_0}\right) = [\varepsilon_1(\lambda)c_1 + \varepsilon_2(\lambda)c_2 + \dots + \varepsilon_n(\lambda)c_n]l = \sum_{i=1}^n \varepsilon_i(\lambda) \cdot c_i \cdot l \quad (1.3)$$

Poiché la legge di Beer-Lambert è valida solo in mezzi omogenei, non può essere applicata direttamente ai tessuti biologici. Per questo motivo, è stata sviluppata la legge di Beer-Lambert modificata (MBLL) dal ricercatore britannico Delpy e colleghi (Delpy et al., 1988), al fine di tenere conto dello scattering della luce nei tessuti biologici. Pertanto, la MBLL (Modified Beer-Lambert Law) costituisce un raffinamento della legge di Beer-Lambert, finalizzato a migliorarne l'accuratezza in presenza di scattering [2]. Questo modello introduce il parametro G , il quale corregge la diminuzione dell'intensità fotonica dovuta ai processi di scattering e tiene conto della conseguente variazione della lunghezza del cammino ottico dei fotoni. Di conseguenza, l'equazione originale (1.3) viene riformulata come segue, per integrare queste considerazioni e garantire una descrizione più precisa del comportamento della luce in mezzi non omogenei [3].

$$A(\lambda) = -\log_{10} \left(\frac{I(\lambda)}{I_0(\lambda)} \right) = \sum_i \varepsilon_i(\lambda) \cdot c_i \cdot DPF(\lambda) \cdot l + G(\lambda) \quad (1.4)$$

Dove i simboli hanno il significato seguente:

- A : assorbanza;
- I : intensità della luce trasmessa;
- I_0 : intensità della luce incidente;
- c : concentrazione del cromoforo;
- ε : coefficiente di estinzione molare;
- DPF : fattore di lunghezza del percorso differenziale;
- l : distanza sorgente-rilevatore;
- G : perdita di intensità della luce dovuta a scattering (adimensionale).

Inoltre, è fondamentale evidenziare che, a causa dello scattering, i fotoni percorrono una distanza media significativamente superiore rispetto alla distanza geometrica (l). Questa distanza media è definita come lunghezza del percorso differenziale (Differential Pathlength, DP). Il rapporto tra la distanza geometrica d e la lunghezza del percorso differenziale DP è descritto da un parametro noto come fattore di lunghezza del percorso differenziale (DPF, Differential Pathlength Factor). L'equazione (1.4) può essere riscritta considerando anche la dipendenza dal tempo, ovvero:

$$A(t, \lambda) = -\log_{10} \left(\frac{I(t, \lambda)}{I_0(\lambda)} \right) = \sum_i \varepsilon_i(\lambda) \cdot c_i(t) \cdot DPF(\lambda) \cdot l + G(\lambda) \quad (1.5)$$

Il termine G è un parametro adimensionale legato alla geometria del tessuto e al suo coefficiente di scattering. Questa complessità rende impossibile, usando la MBLL, calcolare direttamente l'assorbanza o la concentrazione del cromoforo in modo assoluto. Per risolvere questo problema, si assume che la variazione dello scattering sia molto più piccola rispetto a quella dell'assorbimento, permettendo così di considerare G come costante nel tempo.

Grazie a questa semplificazione, calcolando la variazione dell'assorbanza tra due momenti temporali t_0 e t_1 ($\Delta A_{\Delta t, \lambda} = A_{t_1, \lambda} - A_{t_0, \lambda}$), il termine G si annulla, poiché si considera invariante in quell'intervallo. Inoltre, se si assume che l'intensità della luce emessa I_0 sia costante, e che la distanza d e il fattore DPF non cambino durante la misurazione, si semplifica ulteriormente la situazione, permettendo di ottenere i risultati desiderati.

$$\begin{aligned} \Delta A(\Delta t, \lambda) &= A(t_1, \lambda) - A(t_0, \lambda) = -\log_{10} \left(\frac{I(t_1, \lambda)}{I_0(\lambda)} \right) + \log_{10} \left(\frac{I(t_0, \lambda)}{I_0(\lambda)} \right) \\ &= -\log_{10} \left(\frac{I(t_1, \lambda)}{I(t_0, \lambda)} \right) = \\ &= \sum_i \varepsilon_i(\lambda) \cdot c_i(t_1) \cdot DPF(\lambda) \cdot d + G(\lambda) - \sum_i \varepsilon_i(\lambda) \cdot c_i(t_0) \cdot DPF(\lambda) \cdot d + G(\lambda) \end{aligned}$$

Da cui

$$\Delta A(\Delta t, \lambda) = -\log_{10} \left(\frac{I(t_1, \lambda)}{I(t_0, \lambda)} \right) = \sum_i \varepsilon_i(\lambda) \cdot \Delta c_i \cdot DPF(\lambda) \cdot l \quad (1.6)$$

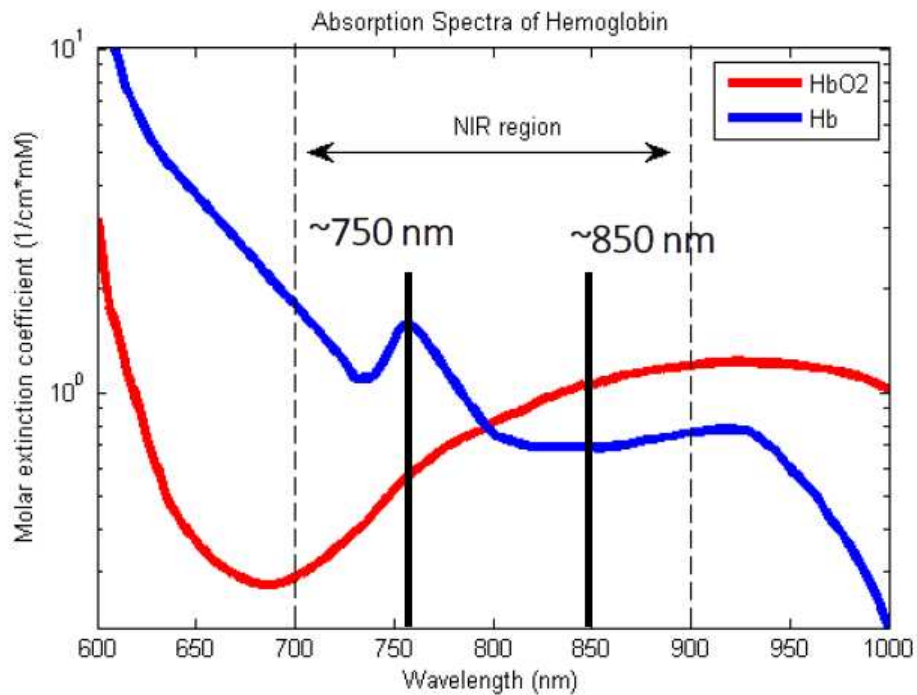
La MBLL (Modified Beer-Lambert Law) è valida solo quando le concentrazioni di ossiemoglobina e deossiemoglobina cambiano in modo uniforme nei tessuti omogenei. Quindi, non si applica in modo ottimale alle misurazioni nella testa. Anche se l'eterogeneità dei tessuti è considerata costante e inclusa nel termine G , la MBLL tende a sottostimare le variazioni di concentrazione di HbO_2 e HHb , poiché queste variazioni avvengono solo nel tessuto cerebrale e non in altri tessuti come pelle e ossa. Sebbene l'errore possa essere corretto con tecniche adeguate, di solito non si fa perché l'obiettivo principale della ricerca cerebrale è rilevare la presenza e la localizzazione delle attivazioni, piuttosto che ottenere misurazioni precise. Per determinare i cambiamenti nelle concentrazioni di HbO_2 e HHb , si utilizzano due lunghezze d'onda specifiche e si risolve un sistema di due equazioni differenziali:

$$\begin{aligned} \Delta A(\Delta t, \lambda_1) &= \varepsilon_{\text{HHb}, \lambda_1} \cdot DPF(\lambda_1) \cdot l \cdot \Delta[\text{HHb}] + \varepsilon_{\text{O}_2\text{Hb}, \lambda_1} \cdot DPF(\lambda_1) \cdot l \cdot \Delta[\text{O}_2\text{Hb}] \\ \Delta A(\Delta t, \lambda_2) &= \varepsilon_{\text{HHb}, \lambda_2} \cdot DPF(\lambda_2) \cdot l \cdot \Delta[\text{HHb}] + \varepsilon_{\text{O}_2\text{Hb}, \lambda_2} \cdot DPF(\lambda_2) \cdot l \cdot \Delta[\text{O}_2\text{Hb}] \end{aligned}$$

$$\begin{bmatrix} \Delta[\text{HHb}] \\ \Delta[\text{O}_2\text{Hb}] \end{bmatrix} = (l)^{-1} \begin{bmatrix} \varepsilon_{\text{HHb},\lambda_1} & \varepsilon_{\text{O}_2\text{Hb},\lambda_1} \\ \varepsilon_{\text{HHb},\lambda_2} & \varepsilon_{\text{O}_2\text{Hb},\lambda_2} \end{bmatrix}^{-1} \begin{bmatrix} \Delta A(\Delta t, \lambda_1)/DPF(\lambda_1) \\ \Delta A(\Delta t, \lambda_2)/DPF(\lambda_2) \end{bmatrix} \quad (1.7)$$

Il valore del coefficiente di estinzione molare (ε) e il fattore di lunghezza del percorso differenziale (DPF) sono stati tabulati e resi disponibili per le misurazioni fNIRS. Il DPF è stato calcolato e classificato in base all'età, al genere e al tipo di tessuto analizzato. Inoltre, l'invio del segnale a due diverse lunghezze d'onda serve per avere il quadro completo sulle concentrazioni di ossiemoglobina e deossiemoglobina, generalmente i valori che si scelgono sono:

- 750 nm: più sensibile a HHb;
- 850 nm: più sensibile a O₂Hb.



Nella raccolta dei dati sperimentali, le lunghezze d'onda dei segnali inviati sono uniformi e standardizzate per tutti i soggetti, garantendo così la coerenza e la comparabilità dei risultati. Tuttavia, l'intensità della luce può variare a seconda delle caratteristiche individuali dei soggetti. Ad esempio, in ambito neonatale, la presenza di capelli abbondanti o spessi può ostacolare la penetrazione del segnale nel tessuto cerebrale. Per affrontare questo problema, è necessario aumentare l'intensità della luce, in modo che il segnale possa attraversare efficacemente il cuoio capelluto e i capelli e raggiungere il tessuto cerebrale sottostante. Tuttavia, l'intensità del segnale è generalmente minore nei neonati rispetto agli adulti, poiché il cranio è più sottile e la quantità di capelli è generalmente inferiore.

Regolare l'intensità della luce in base alle caratteristiche specifiche del soggetto è cruciale per ottenere dati di alta qualità. Questo aggiustamento consente di ottenere misurazioni più precise e affidabili, assicurando che i risultati riflettano accuratamente le condizioni del tessuto cerebrale e mantenendo così l'integrità scientifica dell'esperimento.

[4]

1.4 Classificazione tecniche fNIRS

In base al metodo di misurazione e al tipo di strumentazione utilizzati, le tecniche fNIRS possono essere suddivise in tre categorie principali: a onda continua (Continuous Wave, CW-fNIRS), risolte nel dominio della frequenza (Frequency Domain, FD-fNIRS), e risolte nel dominio del tempo (Time Domain, TD-fNIRS).

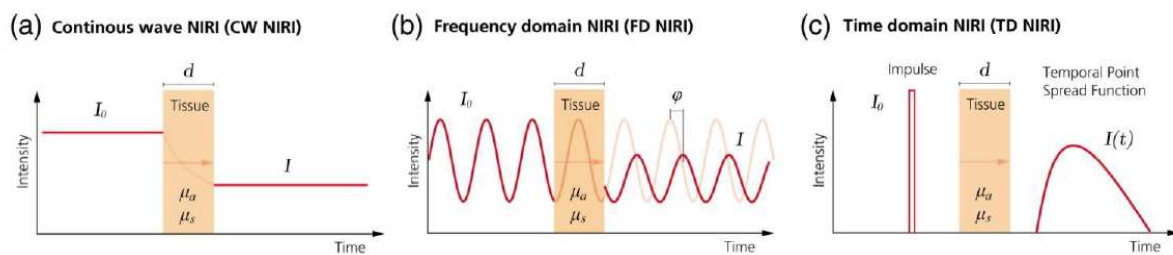


Figura 1.7: Illustrazione delle tre diverse tecniche NIRS (Near-Infrared Imaging; si intendono i sistemi NIRS con capacità di imaging). (a) La tecnologia a onda continua emette luce a intensità costante e misura solo i cambiamenti nell'intensità della luce che passa attraverso il tessuto. (b) La tecnologia del dominio della frequenza modula l'intensità della luce emessa e quindi misura l'intensità della luce rilevata e lo sfasamento, che corrisponde al tempo di volo. (c) La tecnologia del dominio del tempo emette un impulso estremamente breve di luce nel tessuto e misura i tempi di arrivo dei fotoni che emergono dal tessuto.

In figura 1.7 i simboli hanno il significato seguente:

- I_0 segnale luminoso incidente,
- I segnale luminoso trasmesso,
- d spessore del mezzo,
- μ_a coefficiente di assorbimento,
- μ_s coefficiente di scattering,
- φ ritardo di fase,

- $I(t)$ funzione di diffusione temporale del segnale luminoso trasmesso.

Nella tecnica Continuous Wave fNIRS (CW-fNIRS), la luce viene emessa in modo continuo a una intensità specifica, e viene misurata la sua attenuazione dopo che ha attraversato il tessuto. Questa tecnica è la più comunemente utilizzata per applicazioni cliniche e di ricerca, in quanto è relativamente semplice e meno costosa rispetto agli altri due approcci. Tuttavia, presenta alcune limitazioni, in particolare nella stima assoluta della concentrazione dei cromofori, poiché non fornisce informazioni dirette sulla fase o sul tempo di propagazione della luce attraverso i tessuti.

La tecnica Frequency Domain fNIRS (FD-fNIRS), invece, utilizza una luce modulata a una determinata frequenza, e le proprietà ottiche del tessuto vengono determinate misurando sia l'ampiezza che la fase della luce modulata. Questo metodo consente di modulare in ampiezza una sorgente laser continua tramite sinusoidi per valori di frequenza dell'ordine delle radiofrequenze inferiori a 200MHz. Le informazioni sulle proprietà del tessuto sono più precise rispetto alla tecnica CW, permettendo di misurare separatamente l'assorbimento e lo scattering del tessuto. Inoltre, la misurazione della fase fornisce dati sul tempo di volo della luce (ossia il tempo che un impulso di luce impiega per attraversare il tessuto), aumentando così la precisione complessiva delle misurazioni rispetto alla CW-fNIRS. Questa strumentazione permette di effettuare studi avanzati di imaging cerebrale, purtroppo però richiede una strumentazione più complessa e costosa rispetto alla CW-fNIRS.

Infine, la tecnica Time Domain fNIRS (TD-fNIRS) rappresenta il metodo più sofisticato tra quelli descritti. In questo approccio, brevi impulsi di luce vengono inviati nel tessuto, e viene analizzata la distribuzione temporale della luce emergente. Questo metodo offre una visione dettagliata della propagazione della luce attraverso il tessuto, permettendo di distinguere con precisione tra assorbimento e scattering, e fornendo una risoluzione temporale molto elevata. Per questi motivi, è particolarmente vantaggiosa per studi che richiedono misurazioni assolute delle proprietà ottiche del tessuto. La TD-fNIRS è in grado di acquisire una grande quantità di informazioni, determinando le proprietà ottiche dei tessuti attraverso l'emissione di numerosi impulsi con frequenze differenti e fornendo una valutazione precisa dei coefficienti di scattering e assorbimento. Tuttavia, questa tecnica è anche molto complessa e costosa, richiedendo competenze avanzate per l'analisi dei dati. [2]

Scegliere la tecnica fNIRS giusta è fondamentale e dipende da ciò che si vuole ottenere dallo studio, dalle risorse disponibili e dal livello di dettaglio necessario. Conoscere bene le caratteristiche e le limitazioni di ogni metodo aiuta i ricercatori a fare la scelta migliore per raccogliere dati precisi e significativi. Una scelta ben informata non solo ottimizza la qualità dei dati raccolti, ma può anche portare a importanti scoperte sulle proprietà ottiche dei tessuti. Questo è essenziale per avanzare nella comprensione delle condizioni cliniche e per migliorare le applicazioni scientifiche della fNIRS. In definitiva, prendere la decisione giusta sulla tecnica

da utilizzare può fare una grande differenza nella ricerca e nella pratica clinica, contribuendo a innovare e migliorare le diagnosi e i trattamenti.

Capitolo 2

Applicazione fNIRS: la percezione del linguaggio nei neonati

Lo studio dei processi cognitivi del cervello è un campo in continua evoluzione, alimentato dai costanti miglioramenti nelle tecniche di neuroimaging e dal contributo di numerosi ricercatori. Un'iniziativa di ricerca in questo ambito è il progetto IN-MIND, in cui ho avuto l'opportunità di svolgere un tirocinio durante il corrente anno accademico. Questo progetto, finanziato dal Consiglio Europeo della Ricerca (ERC), è guidato da un team di ricerca del Dipartimento di Psicologia dello Sviluppo e della Socializzazione dell'Università di Padova. L'obiettivo principale è quello di approfondire la comprensione dei meccanismi di plasticità cerebrale legati allo sviluppo della memoria e all'acquisizione del linguaggio fin dai primi giorni di vita.

Per raggiungere questo obiettivo, uno degli studi condotti dal progetto IN-MIND utilizza la tecnologia fNIRS, che consente di monitorare in modo non invasivo l'attività cerebrale dei neonati. Questa tecnologia è particolarmente utile per esaminare i processi neurali alla base dell'apprendimento del linguaggio, offrendo un'analisi dettagliata delle dinamiche cerebrali. Negli ultimi dieci anni, la ricerca fNIRS sui neonati ha registrato significativi progressi, tra cui miglioramenti nella progettazione degli strumenti, nello sviluppo delle sonde, nell'ottimizzazione dei protocolli e nell'analisi e interpretazione dei dati. Questi progressi hanno fornito una base solida affinché la fNIRS continui a essere uno strumento essenziale per il futuro della ricerca neuroscientifica sullo sviluppo.

Durante il mio tirocinio, ho avuto l'opportunità di lavorare con i dati fNIRS raccolti in un esperimento progettato per investigare la formazione di memorie verbali nei neonati. In particolare ho avuto modo di apprendere come si articolano le fasi del preprocessing dei dati, che includono la gestione e la pulizia dei dati grezzi per rimuovere artefatti e rumore, e la normalizzazione dei dati per garantire che siano comparabili e coerenti. Successivamente, mi sono dedicata all'impostazione di un'analisi di connettività, che mira a mappare le interazioni tra di-

verse aree cerebrali coinvolte nella formazione delle memorie verbali. Ho acquisito competenze nell'interpretazione dei risultati delle analisi di connettività funzionale, il che ha contribuito a una comprensione preliminare delle basi neurali del linguaggio nei primi stadi di sviluppo.

2.1 Connettività funzionale

La connettività funzionale è un concetto chiave nelle neuroscienze cognitive, che si riferisce alla co-attivazione sincronizzata di diverse regioni cerebrali durante l'esecuzione di compiti specifici o in stati di riposo. Questo termine descrive le relazioni funzionali e temporali tra le diverse aree del cervello, evidenziando come queste regioni comunichino e cooperino per supportare processi cognitivi e comportamentali complessi. A differenza della connettività strutturale, che riguarda le connessioni anatomiche fisiche tra neuroni o aree cerebrali, la connettività funzionale si concentra sulle dinamiche delle interazioni funzionali che emergono dalle attività neuronali sincronizzate.[5]

Per comprendere come queste aree del cervello si attivano durante l'esecuzione dell'esperimento, dopo aver completato la fase di preprocessing dei dati, si procede al calcolo delle matrici di correlazione per ciascun soggetto. Le matrici di correlazione sono utilizzate per esaminare le relazioni tra le variabili di interesse, che nel caso dell'analisi dei dati fNIRS (Functional Near-Infrared Spectroscopy) in esame sono le concentrazioni di ossiemoglobina misurate in diverse regioni del cervello durante l'esperimento.

Ogni matrice di correlazione fornisce una rappresentazione numerica della forza e della direzione delle relazioni lineari tra queste variabili. Ogni elemento della matrice rappresenta la correlazione tra una coppia di variabili: un valore positivo indica una correlazione diretta, mentre un valore negativo suggerisce una correlazione inversa. L'ampiezza del valore di correlazione riflette la forza di questa relazione, con valori prossimi a +1 o -1 che indicano una forte correlazione, mentre valori vicini a 0 suggeriscono una debole o assente correlazione. Nel nostro caso, le matrici di correlazione sono ottenute calcolando la "Pearson correlation" tra tutte le coppie di canali fNIRS in blocchi di 180 secondi durante le diverse fasi dello studio. I segmenti contaminati da artefatti di movimento vengono preventivamente rimossi, e i blocchi con meno di 100 secondi liberi da artefatti non sono considerati. Questo permette di identificare come le variazioni nelle concentrazioni di ossiemoglobina siano interrelate tra le diverse regioni cerebrali durante l'esperimento. I risultati delle matrici di correlazione vengono successivamente visualizzati graficamente, consentendo una valutazione visiva immediata delle relazioni tra le regioni cerebrali monitorate e facilitando l'identificazione di pattern e connessioni significative.

Considerando un singolo soggetto, utilizzando MATLAB, è possibile rappresentare un istogramma per analizzare la distribuzione dei coefficienti di correlazione relativi a quel soggetto

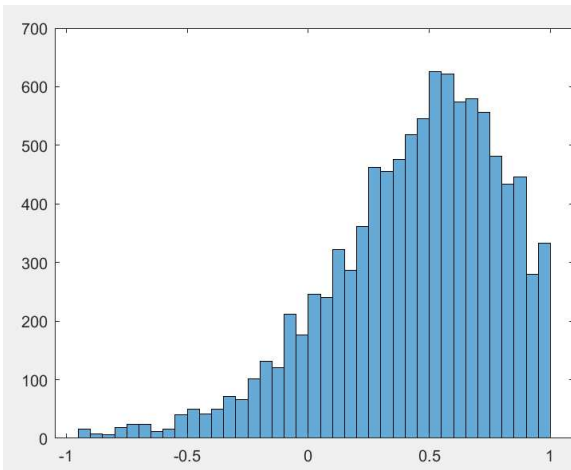


Figura 2.1: Istogramma

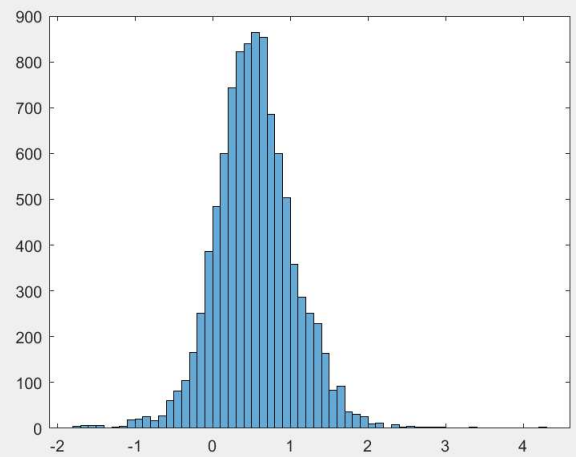


Figura 2.2: Istogramma

(figura 2.1). Successivamente, per normalizzare i dati, si applica la trasformazione di Fisher ai coefficienti di correlazione (figura 2.2). Questa trasformazione consente di ottenere una distribuzione più simile a quella gaussiana, facilitando così l'analisi statistica. La stessa procedura viene estesa a tutti i soggetti del campione. Questo approccio consente di ottenere un'analisi complessiva della distribuzione dei coefficienti di correlazione attraverso l'intero gruppo di soggetti, creando istogrammi aggregati per tutti i soggetti per osservare l'andamento generale dei dati (figura 2.3).

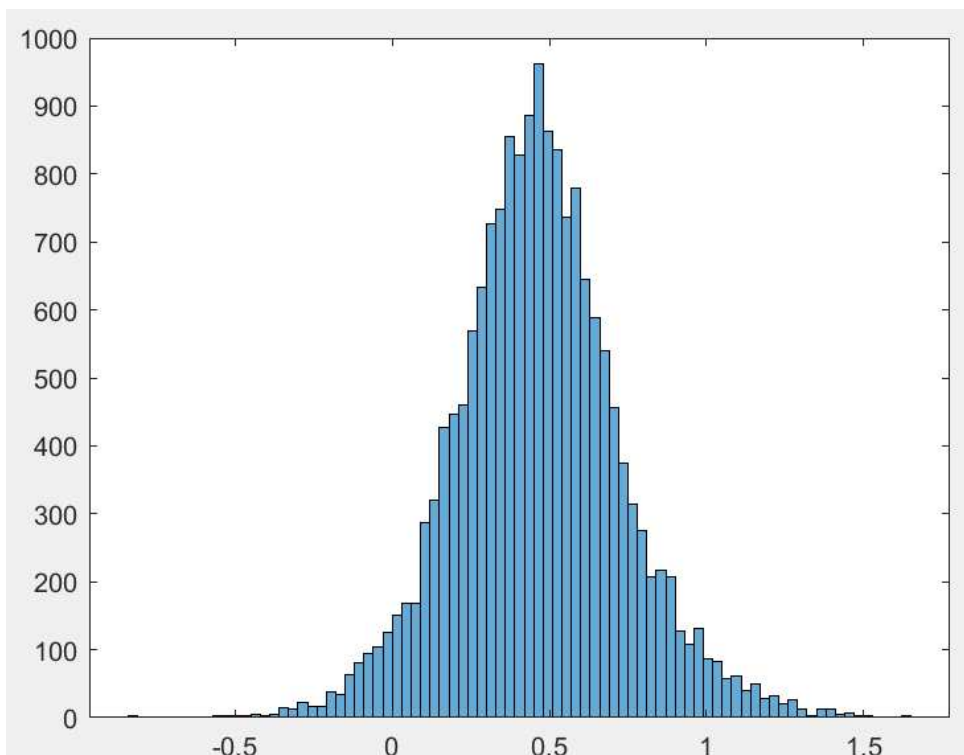


Figura 2.3: Istogramma

In sintesi, questo metodo consente di esplorare la complessità della connettività funzionale cerebrale, offrendo importanti indicazioni su come le diverse regioni del cervello lavorino insieme per supportare funzioni cognitive e comportamentali. L'analisi delle matrici di correlazione, basate sui dati dell'esperimento, aiuta a identificare le relazioni tra le aree cerebrali e a comprendere come queste interazioni siano fondamentali per la cognizione umana.

2.2 Descrizione esperimento

La percezione e la cognizione nei neonati sono state tradizionalmente esplorate attraverso i paradigmi di abituação, che si riferiscono al processo mediante il quale un individuo diventa progressivamente meno sensibile a uno stimolo che viene ripetutamente presentato. Questi paradigmi assumono che, in contesti di laboratorio, la memoria dei bambini si sviluppi in modo ottimale attraverso numerose ripetizioni dello stesso stimolo, senza interferenze esterne. Tuttavia, una questione cruciale e ancora irrisolta è come i neonati affrontino stimoli presentati in condizioni simili a quelle dell'apprendimento quotidiano, cioè quando sono presenti stimoli interferenti. In altre parole, è importante comprendere come i neonati gestiscano e memorizzino le informazioni quando sono esposti a stimoli concorrenti o multipli, anziché solo a stimoli isolati, come avviene nei paradigmi sperimentali tradizionali. L'esperimento presentato in questa tesi si propone di rispondere a queste domande, esplorando i meccanismi di formazione della memoria verbale nei primi giorni di vita. Prima di entrare nei dettagli di questo esperimento, è utile richiamare uno studio precedente condotto da Silvia Benavides-Varela, che ha fornito una base per la ricerca qui presentata. In tale studio, è stata utilizzata la spettroscopia nel vicino infrarosso funzionale (fNIRS) per esaminare 40 neonati sani, valutando la loro capacità di codificare parole presentate simultaneamente ad altri stimoli verbali.

I risultati hanno evidenziato una risposta emodinamica nella regione frontale sinistra durante la fase di codifica, simile al fenomeno dell'abituação, accompagnata da una progressiva riduzione delle connessioni funzionali tra questa regione e le aree temporali sinistra, destra e parietale destra. Inoltre, durante la fase di riconoscimento, è emersa una firma neurale distintiva nella regione frontale destra, che si è estesa successivamente alle regioni parietali destre. Quando i neonati hanno ascoltato una parola familiare nel test, sono state osservate connessioni originanti dalle aree temporali destre verso queste regioni.

Questi risultati suggeriscono che esiste una specializzazione neurale fin dalla nascita, caratterizzata da una lateralizzazione delle funzioni mnemoniche: durante la codifica, c'è un'interazione tra le regioni temporali e frontali sinistre, mentre durante il riconoscimento dei suoni linguistici, si osserva un'interazione tra le regioni temporo-parietali e frontali destre. I risultati dimostrano che i neonati sono in grado di mantenere il ricordo di specifici suoni verbali,

nonostante l'interferenza di altri stimoli durante la codifica. Ciò implica che i paradigmi di abitudine che includono una varietà di stimoli possono essere altrettanto efficaci nello studio della memoria precoce quanto la ripetizione di un singolo stimolo. Infine, lo studio ha confermato che i neonati sono capaci di riconoscere parole fin dalla nascita, come evidenziato dalla riduzione dell'attività cerebrale in risposta a parole già sentite e dall'aumento di attività quando venivano presentate parole nuove.

L'esperimento condotto dal progetto IN-MIND, che verrà descritto successivamente, si propone di approfondire i meccanismi alla base della formazione della memoria verbale nei neonati in presenza di interferenze esterne, sia attraverso la ripetizione dello stesso stimolo, sia variandolo dopo l'interferenza.

Partecipanti

Sono stati testati 29 neonati (età media: 22,8 giorni) che hanno fornito dati utili per ciascun blocco sperimentale in un esperimento di familiarizzazione-interferenza-test della durata di 27 minuti (Benavides et al., 2011, 2012, 2017)[6]. I criteri di inclusione comprendevano un'età gestazionale tra 38 e 42 settimane, punteggi di Apgar pari a 8 al primo e quinto minuto, assenza di cefaloematoma, udito normale e diametro della testa tra 33,5 e 36,0 cm. I neonati sono stati reclutati presso il Reparto Neonatale della Divisione di Ostetricia dell'Università di Padova tra maggio e settembre 2023. Tutti i genitori hanno fornito il consenso informato per la partecipazione all'esperimento, che è stato approvato dal Comitato Etico di dell'università di Padova.

Stimoli

Cinque pseudoparole (struttura CVCV: consonante-vocale-consonante-vocale) sono state utilizzate nello studio (parole target e test: /mita/, /pelu/, /voli/; parole di interferenza: /noke/, /dafo/). Una speaker femminile e uno speaker maschile hanno registrato ogni parola in isolamento (le speaker femminili hanno pronunciato le parole target e test, mentre gli speaker maschili hanno prodotto le parole di interferenza). Tutte le pseudoparole avevano l'accento sulla prima sillaba e sono state modificate per avere un'intensità media (70 dB) e una durata (700 ms).

Procedura

L'esperimento è stato condotto in una stanza debolmente illuminata. I neonati sono stati testati mentre giacevano nelle loro culle o tra le braccia delle loro madri, in uno stato di riposo tranquillo o dormendo. Le pseudoparole sono state presentate tramite due altoparlanti con volume fisso.

Il paradigma era una versione modificata del precedente protocollo sperimentale (Benavides-Varela et al., 2011). L'unico cambiamento era che i periodi di familiarizzazione e ritenzione erano di 3 minuti ciascuno rispetto a 6 e 2 minuti rispettivamente (Benavides-Varela et al., 2011). Le pseudoparole sono state presentate in un design a blocchi con ogni fase (familiarizzazione,

interferenza, test) della durata di 3 minuti (5 blocchi di 6 parole ciascuno, ISI 0,5-1,5 s, intervallo tra i blocchi 25-35 s). Durante la familiarizzazione, un speaker pronunciava una parola e durante il periodo di ritenzione, un altro speaker produceva un'altra parola. I due speaker erano una voce femminile e una maschile, differendo drasticamente nelle caratteristiche acustiche. Un protocollo base intra-soggetto è stato implementato con due sessioni separate da 9 minuti di silenzio: una condizione in cui i neonati ascoltavano la stessa parola durante la familiarizzazione e il test (condizione stessa parola; A X A) e un'altra con una parola nuova presentata durante la fase di test (condizione parola nuova; A X B). L'ordine delle condizioni e le parole utilizzate nelle diverse fasi erano bilanciati tra i partecipanti.

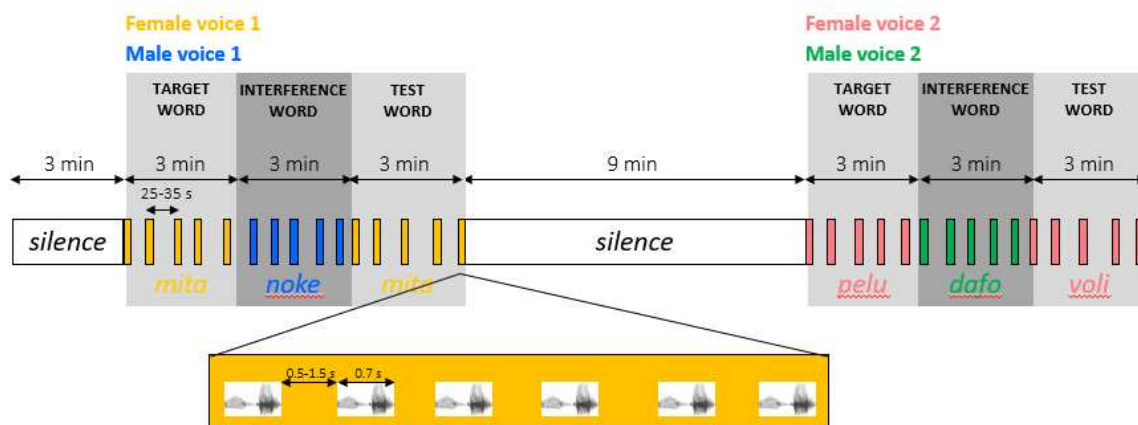


Figura 2.4: Paradigma di familiarizzazione-interferenza-test. Ogni soggetto è stato testato in due sessioni separate da 9 minuti di silenzio: in una sessione i neonati hanno ascoltato la stessa parola durante la familiarizzazione e il test (condizione della stessa parola; A X A), mentre nell'altra sessione è stata presentata una parola nuova durante la fase di test (condizione della parola nuova; A X B). L'ordine delle condizioni e delle parole utilizzate nelle diverse fasi è stato controbilanciato tra i partecipanti.

Acquisizione dei Dati

Le risposte emodinamiche sono state misurate registrando l'attività corticale neurale su regioni frontali (giro frontale inferiore), temporali (giro temporale superiore) e parietali (lobo parietale) utilizzando un sistema fNIRS a 42 canali (NIRx NIRSPort, lunghezze d'onda = 760 e 850 nm) con 16 sorgenti e 15 rilevatori. Le posizioni degli optodi sono state selezionate utilizzando il toolbox fOLD (Zimeo Morais et al., 2018). La distanza tra le sorgenti e i rilevatori era di circa 2 cm, la frequenza di campionamento 7,6 Hz.

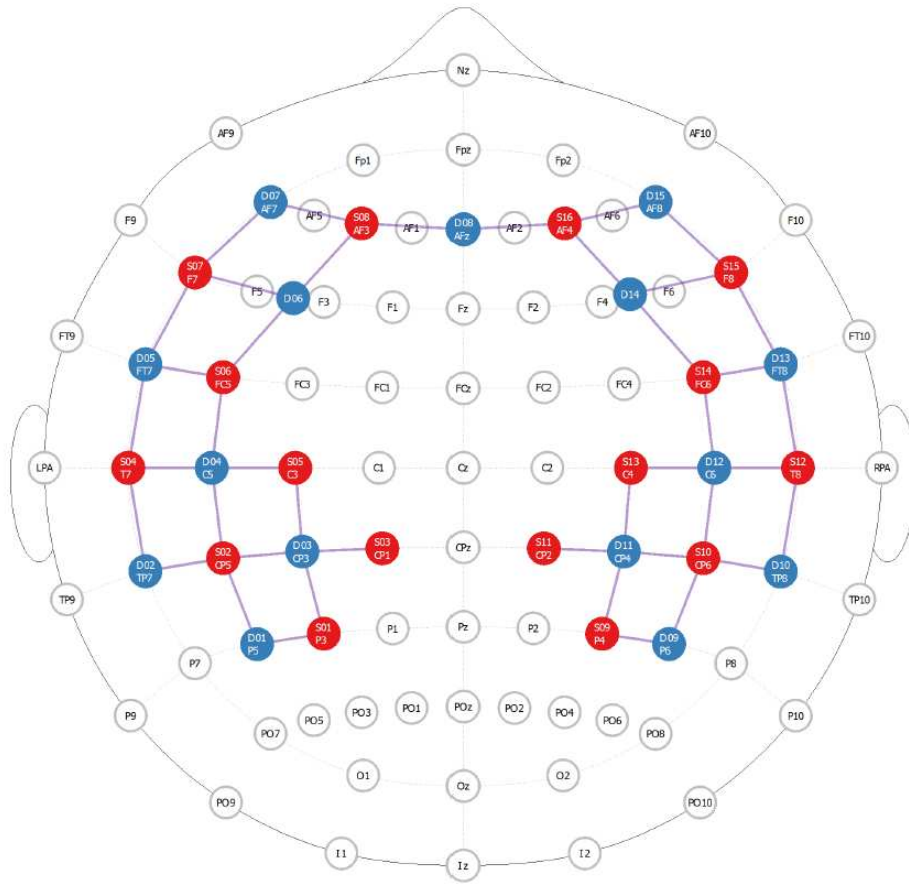


Figura 2.5: Rappresentazioni della distribuzione dei canali

2.3 Data preprocessing

I passaggi per convertire il valore misurato (intensità) nella misura effettiva (concentrazione dei cromofori) sono stabiliti dal preprocessing, una fase cruciale per preparare i dati acquisiti per l'analisi. Questa fase è stata realizzata all'interno dell'ambiente di calcolo MATLAB, utilizzando una combinazione di funzioni personalizzate e strumenti avanzati del pacchetto Homer3 fNIRS (Huppert, Diamond, Franceschini, & Boas, 2009). Il pacchetto Homer3 è un software open-source progettato specificamente per l'analisi dei dati fNIRS, fornendo strumenti e algoritmi per elaborare e interpretare le misurazioni.

I principali passaggi del preprocessing includono:

1. **Pruning dei canali:** questo passaggio comporta l'eliminazione dei canali non rilevanti o superflui dai dati acquisiti. Il pruning è stato effettuato in base al rapporto segnale-rumore (SNR) del segnale e allo scalp coupling index (SCI). Il signal-to-noise ratio (SNR) è una misura della qualità del segnale che quantifica la proporzione di segnale utile rispetto al

rumore di fondo. Canali con un SNR basso indicano che il segnale utile è sopraffatto dal rumore, rendendo il canale poco affidabile per l'analisi. Lo scalp coupling index (SCI), invece, valuta la presenza del battito cardiaco nel segnale a entrambe le lunghezze d'onda. Un buon accoppiamento suggerisce che il canale è sensibile ai veri cambiamenti nella concentrazione dei cromofori di interesse, mentre un cattivo accoppiamento indica che il canale potrebbe essere dominato da artefatti o rumore strumentale. Pertanto, l'operazione di pruning elimina i canali con SNR basso o SCI insufficiente, riducendo il volume complessivo dei dati e migliorando la qualità dell'analisi. Questo processo consente di concentrarsi esclusivamente sui canali che forniscono informazioni rilevanti, aumentando così l'accuratezza e l'affidabilità dei risultati.

2. **Passaggio da intensità a densità ottica:** nelle misurazioni spettroscopiche, l'intensità misurata viene convertita in densità ottica (OD) utilizzando la formula:

$$OD = -\log_{10} \left(\frac{I}{I_0} \right) \quad (2.1)$$

dove I rappresenta l'intensità misurata e I_0 è l'intensità della luce incidente. La densità ottica fornisce una misura più adeguata dell'assorbimento del campione rispetto ai valori di intensità grezzi.

3. **Rimozione degli artefatti:** questo passaggio consiste nell'identificazione e nella correzione o eliminazione di errori e anomalie presenti nei dati, che possono derivare da rumore strumentale o interferenze ambientali. I periodi contenenti artefatti sono stati identificati come quelli in cui si osservavano cambiamenti anomali nella densità ottica (OD), con valori superiori a un limite stabilito in base alla distribuzione dei valori. Inoltre, un periodo del processo sperimentale è stato scartato se più del 30% dei canali conteneva artefatti. La rimozione del rumore è cruciale per assicurare la qualità e l'affidabilità dei dati.
4. **Passaggio da densità ottica a concentrazione:** una volta ottenuta la densità ottica, è possibile convertire questa misura nella concentrazione dei cromofori utilizzando la legge di Beer-Lambert. Questa legge stabilisce una relazione quantitativa tra la densità ottica e la concentrazione del campione.
5. **Filtraggio passabanda:** l'applicazione di filtri passabanda è fondamentale per eliminare il rumore e migliorare la qualità del segnale. Un filtro passabanda consente il passaggio solo delle frequenze comprese in un intervallo specifico, attenuando le frequenze più alte e più basse che potrebbero contenere rumore indesiderato. Nel caso dell'esperimento in esame, è stato utilizzato un filtro con un intervallo di $[0.01, 0.1]$ Hz per l'analisi della

connettività funzionale, permettendo di focalizzarsi sulle frequenze di interesse che riflettono l'attività cerebrale rilevante, riducendo l'influenza di componenti rumorose o non correlate.

6. **Segmentazione dei dati:** questo processo comporta la suddivisione dei dati in segmenti significativi o intervalli di interesse, facilitando così l'analisi e l'interpretazione dei risultati. In questo esperimento, la segmentazione è stata eseguita suddividendo i dati in blocchi da 180 secondi, ciascuno corrispondente a specifiche fasi sperimentali: resting iniziale, habituation (stimolo target), interference, e test (con lo stesso stimolo o diverso). Questa suddivisione permette di identificare e analizzare in dettaglio le caratteristiche del campione in relazione agli eventi e alle condizioni sperimentali. Per garantire la qualità delle analisi, sono stati scartati i blocchi che contenevano meno di 100 secondi senza artefatti, assicurando che solo segmenti con una quantità sufficiente di dati validi fossero inclusi nell'analisi.

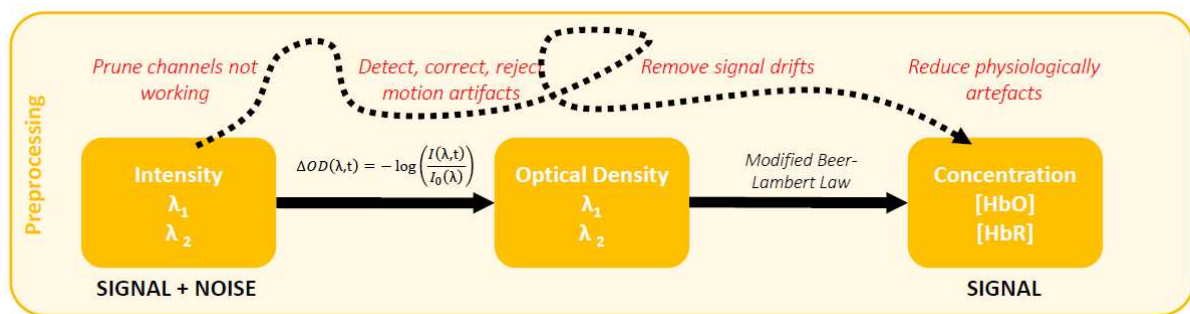


Figura 2.6: Rappresentazione dei passaggi cruciali della fase del preprocessing

In conclusione, il preprocessing rappresenta una fase cruciale nell'analisi dei dati di neuroimaging. Attraverso le procedure descritte, i dati grezzi vengono trasformati per garantirne la pulizia, la consistenza e la qualità necessarie per un'analisi affidabile. Questi passaggi aiutano a ridurre le potenziali fonti di errore e a migliorare la precisione delle misurazioni.

Grazie a questi interventi, i dati sono pronti per essere utilizzati nell'analisi di connettività, permettendo di esplorare con maggiore accuratezza le relazioni funzionali e strutturali tra le diverse regioni cerebrali. Il preprocessing non solo ottimizza la qualità dei dati, ma assicura anche che le analisi successive si basino su informazioni affidabili e prive di distorsioni dovute a fattori esterni o tecnici. Pertanto, una corretta esecuzione delle fasi di preprocessing è fondamentale per ottenere risultati validi e significativi nello studio della connettività cerebrale.

2.4 Analisi di connettività

Nell'ambito dell'esperimento in esame, la connettività cerebrale viene analizzata utilizzando matrici di correlazione. Queste matrici sono strumenti matematici che quantificano, per ogni paio di canali, il grado di interdipendenza funzionale tra i diversi segnali cerebrali registrati. Esse forniscono una rappresentazione dettagliata delle relazioni sincrone tra le regioni cerebrali, permettendo di mappare le dinamiche della comunicazione neurale. Questa analisi contribuisce a una comprensione più approfondita delle dinamiche sottostanti l'attività cerebrale, offrendo elementi cruciali per interpretare i meccanismi alla base delle funzioni cognitive e comportamentali osservate. Nel nostro esperimento, le matrici di correlazione sono state calcolate per ciascun blocco sperimentale dopo il preprocessing dei dati. Per semplificare l'analisi, i due blocchi relativi alla condizione "target" e i due blocchi relativi alla condizione "interference" sono stati aggregati. Poiché l'esperimento include due sessioni, ciascuna con entrambe queste condizioni, l'aggregazione ha permesso di unire i dati in un'unica matrice per ciascuna condizione (figura 2.4). Di conseguenza, invece di analizzare separatamente due blocchi di "target" e due blocchi di "interference", i dati sono stati combinati per ottenere una singola matrice "target" e una singola matrice "interference".

Questo approccio ha portato alla creazione di due serie di cinque matrici di connettività: la prima serie comprende le matrici ottenute dai dati preprocessati, mentre la seconda serie include le matrici normalizzate tramite la trasformata di Fisher. La normalizzazione mediante la trasformata di Fisher consente di ottenere una distribuzione dei dati più vicina a quella normale, facilitando un'analisi statistica più accurata e migliorando la comprensione delle interazioni cerebrali durante l'esperimento.

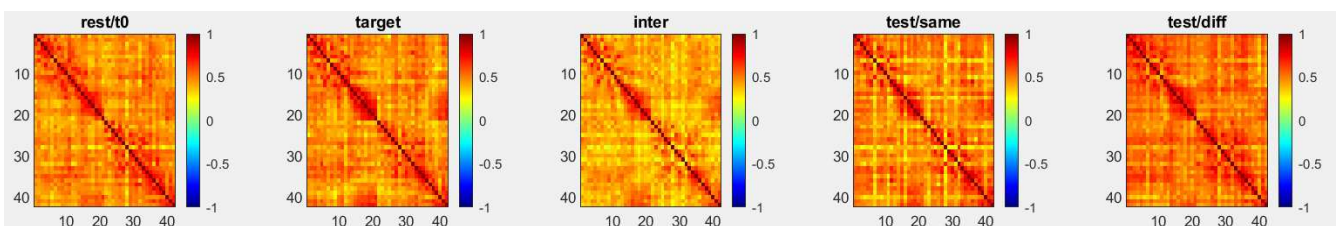


Figura 2.7: Matrici di correlazione considerando i dati non normalizzati.

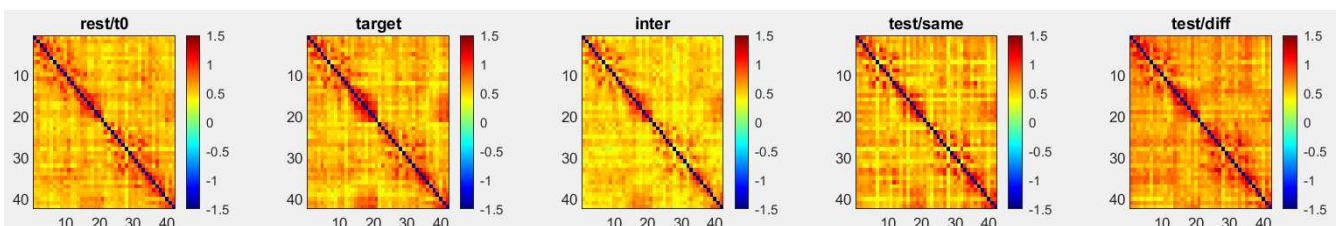


Figura 2.8: Matrici di correlazione considerando i dati normalizzati con la trasformata di Fisher.

Le matrici di correlazione risultanti rappresentano le relazioni tra tutti i canali del dispositivo di acquisizione fNIRS. Ogni matrice è una griglia quadrata in cui le righe e le colonne corrispondono ai canali misurati. Ad esempio, nella posizione (1,2) della matrice è indicata la correlazione tra il primo e il secondo canale. La matrice di correlazione è simmetrica rispetto alla diagonale principale, il che significa che l'elemento nella posizione (i,j) è identico all'elemento nella posizione (j,i). Pertanto, per analizzare le correlazioni tra i canali, è sufficiente esaminare solo una delle due metà della matrice, ovvero la parte superiore o quella inferiore, poiché forniscono informazioni equivalenti. Inoltre, le celle fuori dalla diagonale principale mostrano le correlazioni incrociate tra i diversi canali, mentre gli elementi sulla diagonale principale riflettono la correlazione di ogni canale con se stesso, risultando sempre pari a 1. È stato utilizzato MATLAB per condurre l'analisi di connettività, focalizzandosi su tre tipologie: all'interno della regione destra, all'interno della regione sinistra e tra le due regioni. Per ogni soggetto è stata calcolata la connettività media per ciascuno dei cinque blocchi sperimentali. Nei segmenti contenenti artefatti, la connettività media non è stata calcolata; questo approccio ha garantito che i risultati riflettano con precisione la connettività cerebrale, escludendo interferenze dovute a rumore o artefatti. I risultati sono stati successivamente rappresentati con un plotbox, ovvero è un tipo di grafico che riassume la distribuzione di un insieme di dati attraverso cinque principali statistiche: gli outliers, il primo quartile (Q1), la mediana (Q2), il terzo quartile (Q3) e il valore massimo. La mediana è il valore centrale che divide un insieme di dati ordinati in due metà uguali; è il 50° percentile. I quartili sono valori che dividono i dati in quattro parti uguali: il primo quartile (Q1) rappresenta il 25° percentile, ovvero il punto sotto il quale si trova il 25% dei dati, mentre il terzo quartile (Q3) rappresenta il 75° percentile, sotto il quale si trova il 75% dei dati. Gli outliers sono i dati che si trovano molto lontani dai valori centrali. Nel grafico, sono mostrati come punti separati al di fuori delle linee orizzontali chiamate whiskers, che si estendono fino a 1.5 volte l'IQR sopra e sotto la scatola. Nel box plot, la scatola rappresenta l'intervallo interquartile (IQR), ovvero la dispersione centrale dei dati, con i lati inferiore e superiore corrispondenti rispettivamente a Q1 e Q3. Al suo interno, una linea indica la mediana. Il box plot è particolarmente utile per visualizzare la distribuzione dei dati, identificare la simmetria o asimmetria della distribuzione, individuare outlier e confrontare la distribuzione di più gruppi di dati in modo efficace e intuitivo.

Nel nostro caso questo grafico rappresenta la connettività cerebrale misurata nelle regioni destra-destra, sinistra-sinistra e tra destra e sinistra (right-right, left-left, left-right) durante cinque condizioni sperimentali: *rest*, *target*, *inter*, *test/same* e *test/diff*, evidenziando la distribuzione dei valori di connettività media calcolata per ogni soggetto all'interno di ciascuna condizione sperimentale.

Da questo grafico possiamo osservare che le aree cerebrali più vicine, come quelle all'in-

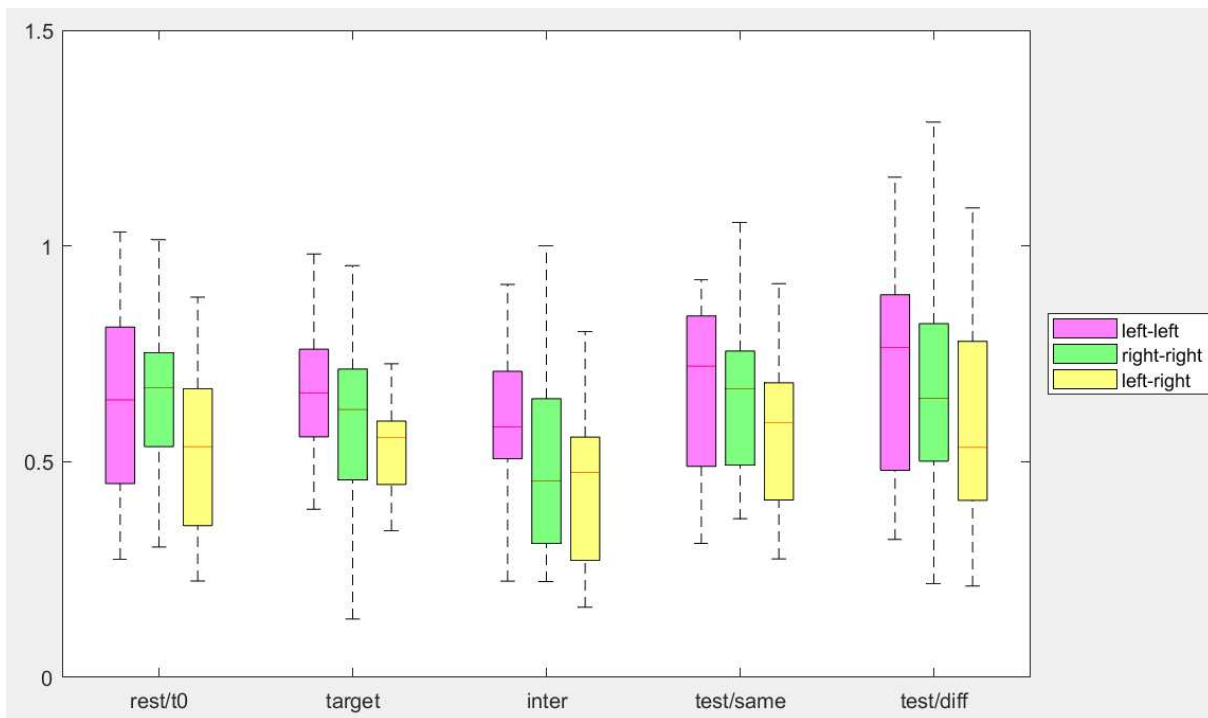


Figura 2.9: Box plot per visualizzare la distribuzione dei valori di connettività media calcolata per ogni soggetto all'interno di ciascuna condizione sperimentale.

terno della stessa regione (destra-destra o sinistra-sinistra), mostrano una correlazione maggiore rispetto a quando viene considerata la connettività tra la regione destra e sinistra (destra-sinistra). Questo risultato è coerente con l'idea che le connessioni neurali siano generalmente più forti e più sincronizzate all'interno di una stessa regione cerebrale rispetto a quelle tra regioni distinte. Tale osservazione riflette la natura organizzativa del cervello, in cui le aree geograficamente più vicine tendono a lavorare più strettamente insieme rispetto a quelle più distanti.

Questa analisi delle regioni del cervello rappresenta solo un primo passo nella comprensione della connettività cerebrale. Un passaggio successivo, comunemente svolto, consiste nel raggruppare i canali in base alle specifiche aree cerebrali in cui si trovano, per analizzare regioni più dettagliate, piuttosto che limitarsi alla distinzione tra emisfero destro e sinistro. Le aree cerebrali esplorate tramite fNIRS includono:

- **Inferior Frontal Gyrus (IFG):** La Circonvoluzione Frontale Inferiore è coinvolto nella produzione e nell'elaborazione del linguaggio, ospitando l'Area di Broca, fondamentale per la sintassi e la produzione del linguaggio. Inoltre, è cruciale per il controllo dell'inibizione cognitiva e la cognizione sociale, influenzando la regolazione comportamentale e l'interazione sociale.
- **Superior Temporal Gyrus (STG):** La Circonvoluzione Temporale Superiore è essenziale per l'elaborazione uditiva e la comprensione del linguaggio, ospitando l'Area di

Wernicke, che facilita la comprensione del linguaggio parlato e scritto. Inoltre, è implicato nella cognizione sociale e nell'integrazione multisensoriale, combinando informazioni uditive e visive.

- **Parietal Lobe (PL):** Il Lobo Parietale gestisce l'elaborazione somatosensoriale, inclusa la percezione tattile e spaziale. La corteccia somatosensoriale primaria elabora le informazioni sensoriali, mentre la corteccia parietale posteriore è coinvolta nella percezione spaziale e nella coordinazione motoria fine. Integra anche informazioni sensoriali diverse per una percezione coerente dell'ambiente.

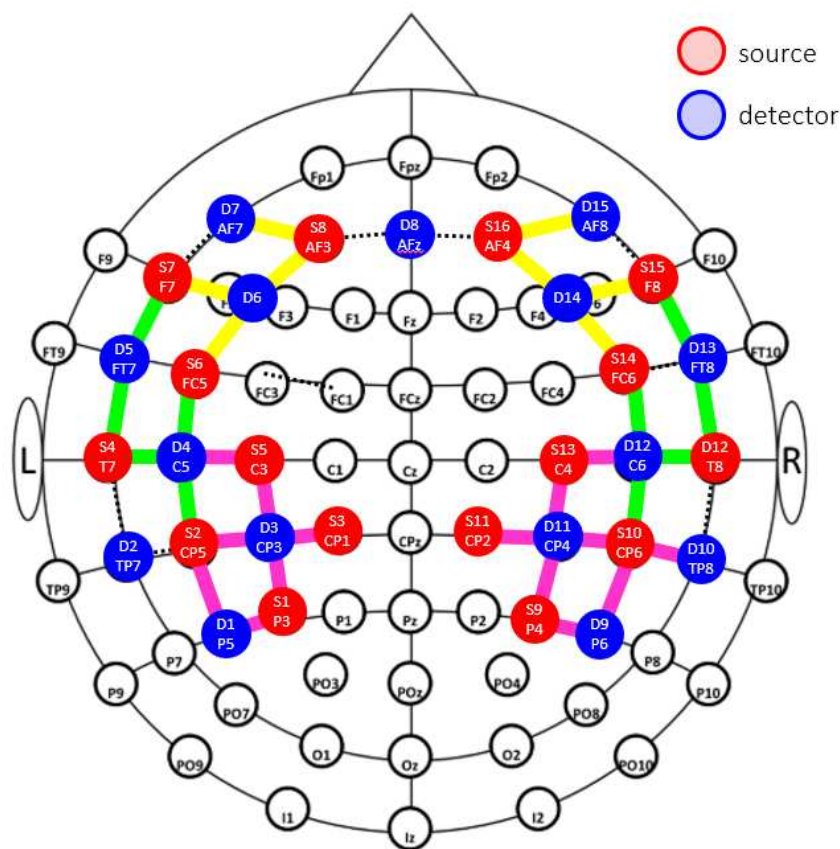


Figura 2.10: Raffigurazione della strumentazione fNIRS dove i canali sono evidenziati con colori distintivi per rappresentare le diverse aree cerebrali monitorate. I canali in giallo identificano il Giro Frontale Inferiore, quelli in verde il Giro Temporale Superiore e quelli in rosa il Lobo Parietale

Successivamente sono state svolte delle statistiche descrittive utilizzando i t-test, uno strumento statistico fondamentale per confrontare le medie di due gruppi di dati e determinare se esiste una differenza significativa tra di esse. Il t-test verifica l'ipotesi nulla (H_0), che presuppone l'assenza di differenze reali tra le medie dei gruppi, contro l'ipotesi alternativa (H_1), che

invece postula la presenza di una differenza significativa. Il test fornisce un p-value, che rappresenta la probabilità di osservare una differenza tra le medie almeno grande quanto quella riscontrata, assumendo che l'ipotesi nulla sia vera. Se questo p-value è inferiore a una soglia prestabilita (tipicamente 0,05), l'ipotesi nulla viene rigettata, suggerendo che la differenza osservata è statisticamente significativa e non dovuta al caso. In sintesi, l'uso dei t-test consente di valutare in modo rigoroso e quantitativo se le differenze tra gruppi di dati sono attribuibili a variabili significative o semplicemente a variazioni casuali. Successivamente sono riportati i risultati dei t-test effettuati:

- **Left-left vs Right-right:**

Resting	0.9517
Target	0.4618
Interference	0.0180
Test-same	0.5334
Test-different	0.3456

- **Rest vs Target:**

left-left	0.4804
right-right	0.6939
left-right	0.2967

- **Rest vs Test-same:**

left-left	0.8348
right-right	0.5937
left-right	0.2408

- **Rest vs Test-different:**

left-left	0.1664
right-right	0.0869
left-right	0.8237

- **Rest vs Interference:**

left-left	0.9954
right-right	0.1516
left-right	0.0835

- **Test-same vs Test-diff:**

left-left	0.1876
right-right	0.4390
left-right	0.5792

- **Test-same vs Target:**

left-left	0.2892
right-right	0.3688
left-right	0.7297

- **Test-same vs Interference:**

left-left	0.1332
right-right	0.0162
left-right	0.0078

Questi risultati raffigurano alcuni dei confronti possibili per analizzare la connettività. Nella prima tabella sono state confrontate le correlazioni tra emisfero destro, dove ogni riga rappresenta una condizione sperimentale: rest, target, interference, test-same e test-different. Si può notare che l'unico confronto che si differenzia in modo significativo è il blocco dell'interferenza, rappresentato nella terza riga, dove il p-value è minore di 0,05. Questo risultato è coerente con l'ipotesi che il blocco dell'interferenza tenda a indurre una maggiore variazione nell'attività cerebrale, probabilmente a causa del cambiamento di voce, rispetto alle altre condizioni che possono essere più prevedibili.

Nelle tabelle successive, invece, sono stati confrontati diversi blocchi sperimentali per ciascuna delle tre analisi di connettività svolte: left-left, right-right e left-right. Ogni tabella mostra i risultati dei t-test per uno specifico confronto tra blocchi sperimentali, evidenziando le differenze di connettività all'interno dello stesso emisfero (left-left e right-right) o tra emisferi diversi (left-right) sotto le varie condizioni sperimentali. Questo approccio permette di valutare in modo dettagliato come le diverse condizioni influenzino la connettività cerebrale sia a livello intraemisferico che interemisferico. L'interpretazione di questi dati non si limita quindi a un semplice confronto numerico, ma invita a una riflessione più profonda sul ruolo che i diversi tipi di stimoli e condizioni sperimentali giocano nella modulazione della connettività cerebrale. Ad esempio, la condizione rest fornisce un'importante linea di base per valutare come il cervello si organizza in assenza di compiti specifici, mentre la condizione target potrebbe riflettere una connettività associata a un obiettivo focalizzato e chiaramente definito.

Il confronto tra le condizioni test-same e test-diff fornisce ulteriori spunti di riflessione. Queste condizioni sono progettate per esplorare come il cervello reagisce a stimoli simili ma non identici, e la differenziazione nei p-value potrebbe indicare come la mente gestisce la familiarità rispetto alla novità o alla variazione. Infine, il confronto con la condizione interference diventa cruciale per comprendere come il cervello risponde quando viene sottoposto a stimoli che intenzionalmente cercano di distrarre o interrompere l'elaborazione delle informazioni.

La complessità e la ricchezza di questi dati evidenziano l'importanza di un'analisi rigorosa della connettività cerebrale. I t-test utilizzati non solo confermano l'esistenza di differenze significative tra le condizioni, ma aiutano anche a svelare le dinamiche cognitive sottostanti che governano queste differenze. Inoltre, questo tipo di analisi fornisce una finestra cruciale su come il cervello organizza le sue risorse in risposta a una varietà di compiti, contribuendo così a una comprensione più profonda dei meccanismi neurali alla base della cognizione umana. Sebbene i risultati ottenuti dai t-test siano rilevanti e forniscano un primo sguardo su come varia la connettività cerebrale in diverse condizioni, essi rappresentano solo un passo iniziale nell'analisi. La connettività cerebrale è un fenomeno complicato che non può essere completamente compreso attraverso il solo confronto delle medie tra gruppi. La complessità delle interazioni neurali, influenzata da molteplici fattori come il contesto, la variabilità individuale e le dinamiche temporali, richiede un approccio analitico più articolato.

Per ottenere una comprensione più profonda, è necessario integrare i risultati dei t-test con analisi statistiche avanzate e modelli più sofisticati, come quelli utilizzati per studiare la connettività funzionale e strutturale attraverso tecniche di neuroimaging. Strumenti come le analisi di rete e i modelli multivariati possono fornire una visione più completa delle interazioni tra le regioni cerebrali. Inoltre, applicare le stesse analisi considerando diverse aree anatomiche e funzionali, come quelle precedentemente descritte, potrebbe contribuire a ottenere risultati ancora più accurati e dettagliati. In sintesi, sebbene i t-test costituiscano un punto di partenza importante, rappresentano solo una parte della complessa indagine necessaria per una comprensione approfondita dei meccanismi della connettività cerebrale.

Capitolo 3

Conclusioni e prospettive future

Questa tesi ha fornito un'analisi della spettroscopia funzionale nel vicino infrarosso (fNIRS), esplorando i suoi principi teorici, la strumentazione e le tecniche di analisi dei dati. Nel Capitolo 1, sono stati trattati i fondamenti della fNIRS, con particolare attenzione alla strumentazione e alle componenti del segnale. È stata illustrata come la fNIRS utilizza la luce infrarossa per monitorare l'attività cerebrale, spiegando il processo di acquisizione e analisi del segnale. In particolare, la legge di Beer-Lambert modificata è stata presentata per chiarire i principi fisici alla base della tecnologia. Inoltre, sono state classificate le tecniche fNIRS disponibili, offrendo un quadro completo delle metodologie per l'analisi dei dati cerebrali. Il Capitolo 2 ha descritto un'applicazione dove questi principi all'analisi della percezione del linguaggio nei neonati, focalizzandosi sulla connettività funzionale. È stato descritto un esperimento specifico, evidenziando le metodologie di preprocessing dei dati e le tecniche di analisi della connettività. Questi approfondimenti hanno dimostrato come i dati fNIRS possano essere preprocessati e analizzati per ottenere informazioni significative sulla connettività cerebrale, mettendo in luce la complessità e le sfide dell'interpretazione dei dati.

L'obiettivo principale di questo lavoro è stato acquisire una comprensione delle procedure fondamentali per l'elaborazione dei dati fNIRS e per effettuare una prima analisi della connettività cerebrale. Attraverso l'esplorazione delle tecniche di preprocessing e delle analisi preliminari, la tesi ha fornito una base per ulteriori ricerche in questo campo.

In sintesi, sebbene questa tesi rappresenti un punto di partenza, evidenzia la necessità di approfondire ulteriormente le conoscenze nella fNIRS e nell'analisi della connettività cerebrale. I t-test e le analisi preliminari forniscono una visione iniziale utile, ma è evidente che una comprensione completa dei meccanismi cerebrali richiede l'impiego di tecniche avanzate e modelli più sofisticati. Le future ricerche dovranno integrare metodologie avanzate e considerare diverse aree anatomiche e funzionali per ottenere risultati più precisi e dettagliati.

Inoltre, la fNIRS si è dimostrata particolarmente utile in ambito clinico, soprattutto per il

monitoraggio della saturazione cerebrale di ossigeno nei neonati. Studi recenti hanno mostrato che la fNIRS può essere impiegata per analizzare lo sviluppo motorio e cognitivo nei neonati pretermine, fornendo strumenti per uno screening precoce e l'identificazione di periodi critici per interventi mirati. Questo approccio potrebbe ridurre significativamente il rischio di disturbi motori e cognitivi associati alla nascita pretermine, migliorando gli esiti a lungo termine per questi neonati vulnerabili.

Nonostante i progressi tecnologici e l'introduzione di strumenti di seconda generazione che hanno migliorato l'affidabilità delle misurazioni, l'uso della fNIRS come strumento esclusivo per il monitoraggio dell'ossigenazione cerebrale è ancora oggetto di discussione. Le limitazioni attuali, come le variazioni nello spessore del cuoio capelluto, la concentrazione di melanina e la presenza di ematomi o aria sotto il cranio, possono influenzare l'accuratezza delle misurazioni e complicare l'interpretazione dei dati. [7]

In sintesi, mentre la fNIRS rappresenta un notevole progresso nella comprensione della fisiologia cerebrale e offre applicazioni cliniche promettenti, il suo ruolo futuro nelle neuroscienze cliniche dipenderà dalla capacità di superare le attuali sfide tecniche. La validazione clinica e la ricerca continua sono essenziali per garantire che la fNIRS possa essere integrata efficacemente nella pratica clinica e sfruttare appieno il suo potenziale diagnostico e terapeutico. Solo attraverso studi approfonditi e ulteriori miglioramenti tecnologici sarà possibile consolidare il valore della fNIRS come strumento indispensabile per il monitoraggio e la ricerca neuroscientifica.

Bibliografia

- [1] J. G. Jessica Gemignani, «Comparing different pre-processing routines for infant fNIRS data,» *Developmental Cognitive Neuroscience*, 2021.
- [2] A. J. M. R. Z. J. M. P. U. W. M. W. Felix Scholkmann Stefan Kleiser, «A review on continuous wave functional near-infrared spectroscopy and imaging instrumentation and methodology,» *NeuroImage*, 2014.
- [3] M. d. C. B. Adelina Pellicer, «Near-infrared spectroscopy: A methodology-focused review,» *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*, 2011.
- [4] C. E. S. Lloyd-Fox A. Blasi, «Illuminating the developing brain: The past, present and future of functional near infrared spectroscopy,» *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 2010.
- [5] K. J. Friston, «Functional and Effective Connectivity: A Review,» *Brain Connectivity*, 2011.
- [6] D. M. G. F. M. L. C. Silvia Benavides-Varelaa Roma Siugzdaitec e J. Mehlerh, «Brain regions and functional interactions supporting early word recognition in the face of input variability,» *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2017.
- [7] M. Calderon-Arnulphi, A. Alaraj e K. V. Slavin, «Near Infrared Technology in Neuroscience: Past, Present and Future,» *Neurological Research*, 2013.