

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

FACOLTA' DI INGEGNERIA

LAUREA MAGISTRALE IN BIOINGEGNERIA



**SVILUPPO DI UN NUOVO ALGORITMO BASATO  
SUL GENERAL LINEAR MODEL PER LA STIMA  
DELLA RISPOSTA EMODINAMICA DA SEGNALI  
DI SPETTROSCOPIA FUNZIONALE NEL VICINO  
INFRAROSSO (fNIRS)**

**RELATORE:** PROF. GIOVANNI SPARACINO

**CORRELATORI:** ING. FABIO SCARPA

ING. SABRINA BRIGADOI

**LAUREANDA:** CHIARA FABRIS

Padova, 10 Ottobre 2011



*Ai miei genitori*



# Indice

Sommario.....	VII
1. La spettroscopia funzionale nel vicino infrarosso (fNIRS) e le sue applicazioni alle neuroscienze cognitive .....	9
1.1. Le neuroscienze cognitive .....	9
1.2. La fNIRS.....	12
1.2.1. Storia della fNIRS.....	12
1.2.2. Principi fisici alla base della fNIRS.....	15
1.2.3. Tipologie di strumentazione fNIRS.....	21
1.2.4. Applicazioni della fNIRS in letteratura .....	24
1.2.5. Vantaggi e svantaggi della fNIRS rispetto ad altre tecniche di neuroimaging	28
2. Stima della risposta emodinamica dal segnale fNIRS e problemi aperti .....	31
2.1. La risposta emodinamica .....	31
2.2. Oscillazioni fisiologiche e altre componenti di disturbo nel segnale fNIRS....	36
2.3. Metodi proposti in letteratura per la stima della risposta emodinamica.....	39
2.3.1. Filtraggio in frequenza.....	39
2.3.2. Sottrazione di una forma d'onda media adattata.....	40
2.3.3. Filtro adattivo per la rimozione della componente cardiaca.....	40
2.3.4. Principal component analysis (PCA).....	41
2.3.5. Sottrazione diretta di una forma d'onda non attivata.....	42
2.3.6. Adaptive filtering .....	43
2.3.7. La media coerente .....	45
2.4. Problemi aperti e scopo della tesi .....	48
3. Data Base.....	49
3.1. Dati reali .....	49
3.1.1. Il paradigma sperimentale.....	49
3.1.2. La strumentazione utilizzata per l'acquisizione.....	51
3.1.3. Posizionamento di sorgenti e rivelatori.....	52
3.1.4. Ipotesi neurofisiologiche sotto esame .....	54
3.2. Dati simulati.....	55

4. Un nuovo algoritmo basato sul General Linear Model per la stima della risposta emodinamica .....	57
4.1. Presentazione del metodo proposto .....	57
4.2. Step 1: filtraggio passa-banda.....	60
4.3. Step 2: identificazione del modello della risposta emodinamica.....	62
4.3.1. Formulazione del modello .....	62
4.3.2. Stima parametrica non lineare .....	65
4.4. Step 3: General Linear Model (GLM) .....	69
4.5. Criteri di valutazione dell'approccio utilizzato .....	72
5. Risultati .....	73
5.1. Dati simulati.....	73
5.2. Dati reali .....	80
6. Conclusioni e sviluppi futuri .....	87
6.1. Bilancio del lavoro svolto.....	87
6.2. Sviluppi futuri.....	90
Bibliografia .....	91
Sitografia.....	95
Ringraziamenti.....	97

## Sommario

La spettroscopia funzionale nel vicino infrarosso (fNIRS) è una recente tecnica di neuroimaging che permette di monitorare l'attività cerebrale in modo assolutamente non invasivo; detta tecnica si basa sulla misura dell'assorbimento della luce infrarossa attraverso la corteccia cerebrale, al fine di valutare le variazioni di concentrazione di emoglobina ossigenata ( $\Delta\text{HbO}$ ) e deossigenata ( $\Delta\text{HbR}$ ) associate alla specifica attività.

Il segnale acquisito con la fNIRS è costituito dalla risposta emodinamica (Hemodynamic Response Function - HRF), segnale di interesse nella nostra analisi, da oscillazioni legate ad attività fisiologiche quali il battito cardiaco e la respirazione, dalla cosiddetta onda di Mayer e da oscillazioni a bassissima frequenza (entrambe componenti legate alla variazione locale nella contrazione dei muscoli lisci della parete dei vasi sanguigni), e da altre fonti di disturbo assimilabili a rumore di misura casuale. Dette componenti si sommano alla risposta emodinamica, rendendo il segnale acquisito estremamente rumoroso. Una delle questioni di maggior interesse in ambito fNIRS riguarda la corretta stima dell'HRF evocata da un compito a cui il soggetto è sottoposto; il fatto che HRF e rumore sovrapposto presentino il medesimo contenuto in frequenza e che le componenti di rumore abbiano un'ampiezza estremamente più ampia rispetto all'HRF rende il problema di difficile soluzione e ancora ampiamente aperto.

Il presente lavoro propone, in merito, l'utilizzo del General Linear Model (GLM), modello statistico che descrive i dati sperimentali come combinazione lineare di funzioni più un termine relativo al rumore. Dette funzioni si ottengono come convoluzione tra il segnale che descrive lo specifico disegno sperimentale utilizzato e particolari forme d'onda note come Basis Functions (BFs). In particolare, in questa tesi è stato sviluppato un metodo, applicabile indipendentemente dalla natura dello stimolo presentato al soggetto, per stimare i parametri di queste BFs in modo efficace, permettendo al GLM di ottenere una buona stima dell'HRF a partire da segnali fNIRS pre-filtrati. I risultati ottenuti con tale approccio sono stati confrontati con quelli ottenuti applicando altri metodi proposti in letteratura. Sui dati simulati l'errore di stima della risposta emodinamica assume valore inferiore a quello ottenuto con entrambi i metodi utilizzati per il confronto, soprattutto in riferimento ai dati di emoglobina ossigenata. Nell'ambito dei dati reali è stato, invece, condotto uno studio preliminare su dati riguardanti un

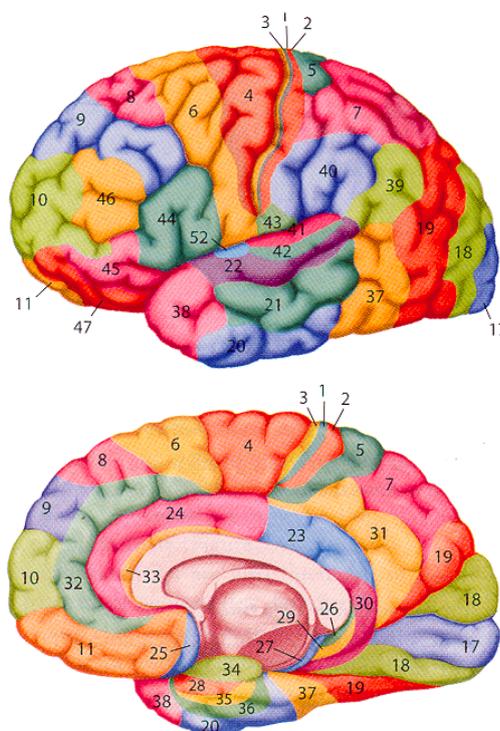
esperimento di “finger tapping”. Le ipotesi neurofisiologiche sotto esame, note da precedenti studi presenti in letteratura, trovano buona corrispondenza nei risultati preliminari ottenuti in questa tesi, supponendo il proseguimento dello studio con ulteriori analisi.

# 1. La spettroscopia funzionale nel vicino infrarosso (fNIRS) e le sue applicazioni alle neuroscienze cognitive

## 1.1. Le neuroscienze cognitive

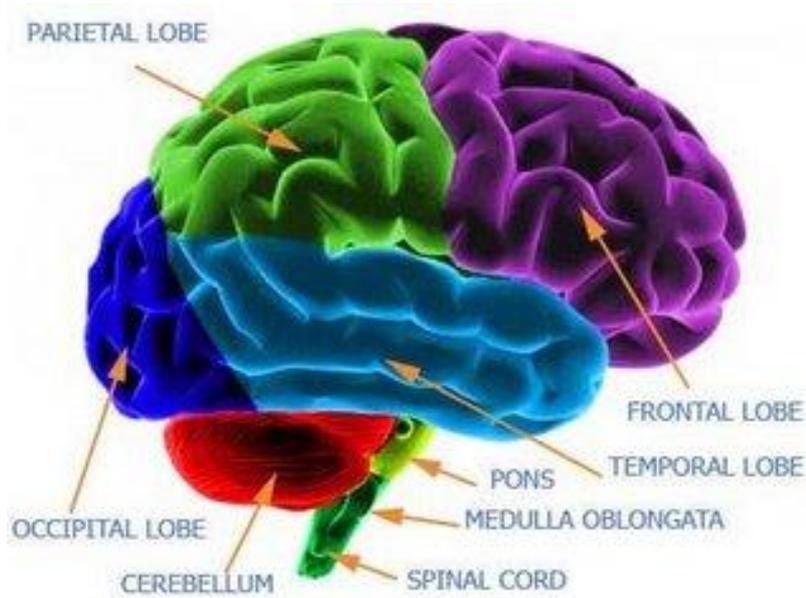
Le neuroscienze cognitive rappresentano un approccio interdisciplinare allo studio della mente [1], con particolare attenzione a specifici processi mentali, noti come processi cognitivi (percezione, attenzione, intelligenza, memoria, immaginazione, pensiero, linguaggio, coscienza), che permettono agli individui di raccogliere informazioni sull'ambiente, immagazzinarle, analizzarle, valutarle, trasformarle, per poi utilizzarle nel determinare il proprio agire nei confronti del mondo circostante.

E' ormai noto che specifiche funzioni cognitive corrispondono a determinate aree del cervello. In particolare all'inizio del '900, 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 [1s].

Dette aree sono state definite e numerate in base alla localizzazione anatomica ed alla citoarchitettura corticale, ossia l'organizzazione di cellule cerebrali (neuroni) e fibre nervose che si poteva osservare al microscopio ottico nella corteccia cerebrale. Inoltre, molte delle aree che Brodmann definì esclusivamente sulla base della loro organizzazione neuronale sono state fin da subito correlate a funzioni cerebrali specifiche, attribuendo alla classificazione di Brodmann un significato funzionale oltre che anatomico-strutturale. Classicamente, tuttavia, la corteccia cerebrale viene suddivisa in quattro lobi - il lobo frontale, il lobo parietale, il lobo temporale e quello occipitale (Fig. 1.1.b) - ognuno dei quali è predisposto a svolgere compiti diversi ed estremamente specifici.



**Figura 1.1.b** - Lobi cerebrali. Tratta da [2s].

Le neuroscienze cognitive studiano i meccanismi di funzionamento del cervello umano durante specifiche attività cognitive, analizzando i processi biologici che sono alla base della capacità del cervello di identificare ed elaborare il significato di stimoli esterni 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, di fondamentale importanza poter accedere ad una conoscenza estremamente dettagliata del cervello e la rapida evoluzione delle tecniche di brain imaging degli ultimi 30 anni è stata determinante al fine di condurre le neuroscienze cognitive a sempre più importanti scoperte.

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 relative al cervello, mentre quelle funzionali erano arrivate già con l'EEG, diversi decenni prima, e con l'analisi ERP (potenziali evento-relati); lo studio del cervello da un punto di vista funzionale è stato poi implementato dalla PET (tomografia ad emissione di positroni) negli anni '70, dalla fNIRS (spettroscopia funzionale nel vicino infrarosso) a partire dalla fine degli anni '80 e dall'fMRI (imaging a risonanza magnetica funzionale) negli anni '90.

Importante quanto le tecniche di brain imaging risulta essere lo sviluppo di nuovi metodi di elaborazione dei diversi segnali ed immagini acquisiti, come pure l'elaborazione di modelli per l'interpretazione di questi dati. E' 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 ed alla matematica (conoscenze matematiche, fisiche, informatiche, elettroniche, ecc.), sono necessarie per poter lavorare in quest'ambito. E' solo da una stretta collaborazione fra tutti questi settori che le neuroscienze cognitive potranno ottenere i giusti mezzi tecnici e conoscitivi per poter continuare a 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 modo non invasivo, ha una storia più recente. Il motivo di ciò è riconducibile a due ostacoli, il primo dei quali è la sensibilità di tale approccio. 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 parallelamente detectors sufficientemente sensibili, in grado 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 nm - 950 nm), poco assorbito dai tessuti biologici ma ben assorbito dall'ossiemoglobina, dalla deossiemoglobina e dal citocromo-ossidasi, particolari sostanze cromofore presenti nei fluidi corporei [3]. Dette sostanze modificano il loro comportamento in funzione della specifica lunghezza d'onda delle radiazioni elettromagnetiche incidenti, variando l'entità dell'assorbimento della radiazione stessa; tale aspetto assume notevole rilevanza e rende possibile ricavare importanti parametri fisiologici o monitorare l'ossigenazione in modo non invasivo, per esempio nel muscolo e nel cervello.

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 due 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, utilizzato soprattutto per analisi chimiche e in campo

astronomico. Negli ultimi decenni, tuttavia, 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, dell'incremento di ossigenazione locale 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, la DOT (Diffuse Optical Tomography) è diventata realtà, permettendo l'utilizzo della luce nel vicino infrarosso anche per ottenere immagini tomografiche [3].

In ambito biomedico, vengono utilizzati numerosi strumenti che sfruttano i raggi infrarossi: 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. L'utilizzo della luce infrarossa per monitorare aree non direttamente accessibili è, tuttavia, più complesso e la sua messa in pratica più recente. Durante gli anni '80 e i 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 e 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 di associare detto segnale alle variazioni locali di flusso sanguigno e di metabolismo dell'ossigeno. 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 funzionale nel vicino infrarosso. Molti studi sono anche stati eseguiti sulla correlazione del segnale fNIRS con i segnali fMRI o EEG, tramite co-registrazioni e 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 e questo dimostra l'abilità unica delle tecniche che sfruttano la luce nel vicino infrarosso di rilevare segnali emodinamici, metabolici e neuronali associati all'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 fare. Un altro vantaggio 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 ad esempio 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) ed un numero variabile di rivelatori (tubi fotomoltiplicatori) entrambi collegati a fibre ottiche, che vengono appoggiate 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 utilizzati [5]. Esistono tre tipologie di implementazione per la fNIRS: fNIRS nel dominio del tempo (Time Domain, TD), fNIRS nel dominio della frequenza (Frequency Domain, FD) e fNIRS ad onde continue (Continuous Wave, 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 sul cuoio capelluto.

La luce con lunghezza d'onda dai 650 ai 950 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, caratterizzati per esempio da una discreta omogeneità del mezzo, hanno portato alla definizione del cosiddetto modello "a banana" (Fig. 1.2.2.a), che assume per ciascuna regione la medesima probabilità di essere attraversata dai fotoni luminosi. La parte centrale della "banana" è quella con maggior probabilità di essere attraversata dai raggi luminosi.

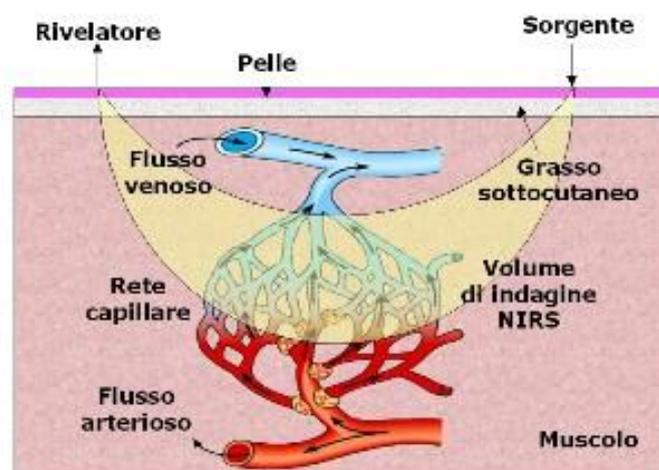
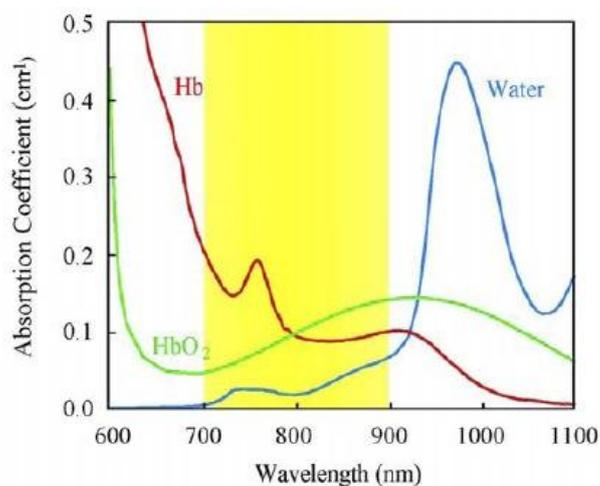


Figura 1.2.2.a - Modello "a banana" della propagazione della luce. Tratta da [3s].

La profondità raggiunta dai raggi emessi dai sistemi fNIRS è direttamente proporzionale alla distanza fra sorgente e rivelatore. 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 diminuisce il SNR (Signal-to-Noise Ratio); da ciò si deduce come, per ora, i metodi ottici siano utilizzabili solo al fine di 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 attraversato e dalla lunghezza d'onda della luce incidente. La luce nel vicino infrarosso è poco assorbita dai tessuti biologici ed è invece assorbita principalmente 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 indagato. 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) o deossigenata (HbR), ne attenua l'intensità in modo diverso. E' proprio l'emoglobina uno dei parametri fisiologici che permettono di monitorare in modo affidabile molti aspetti funzionali del cervello.



**Figura 1.2.2.b** - Spettri di assorbimento di HbO (verde), HbR (rosso) e H<sub>2</sub>O (blu).

Osservando lo spettro di assorbimento (Fig. 1.2.2.b), si può notare come a  $\lambda=800$  nm vi sia il punto isosbestico, in corrispondenza del quale i coefficienti di estinzione di ossiemoglobina e deossiemoglobina coincidono; per lunghezze d'onda superiori al range del vicino infrarosso, la luce infrarossa verrebbe assorbita quasi totalmente dall'acqua e per lunghezze d'onda inferiori, dalla deossiemoglobina. Un altro cromoforo interessante, che è stato oggetto di studio, è il citocromo-ossidasi, indicatore del metabolismo energetico intracellulare. Si è giunti, tuttavia, alla conclusione che con tale cromoforo sia 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 rispetto a quello dell'emoglobina [3].

La legge modificata di Beer-Lambert (MBLL, Modified Beer-Lambert Law) sfrutta l'assorbimento da parte di HbO e HbR 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 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
$\varepsilon^\lambda$	coefficiente di estinzione del cromoforo (funzione di $\lambda$ )
$c$	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:

- $G^\lambda$  termine che tiene in considerazione la geometria della misurazione
- $d$  distanza sorgente-rivelatore reale
- $DPF^\lambda$  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  $G^\lambda$  e  $DPF^\lambda$  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, nei tessuti biologici, i principali cromofori che contribuiscono all'assorbimento 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 superiore rispetto agli altri: la variazione di assorbanza, ad ogni lunghezza d'onda, viene considerata come la combinazione lineare dei soli contributi di HbR ed HbO, considerati indipendenti:

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

dove i simboli indicano:

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

$\Delta[HbR]$  e  $\Delta[HbO]$  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 HbR che di HbO eseguendo una misura simultanea a due diverse lunghezze d'onda  $\lambda_1$  e  $\lambda_2$ :

$$\Delta[HbR] = \frac{\varepsilon_{HbO}^{\lambda_2} \frac{\Delta A^{\lambda_1}}{DPF^{\lambda_1}} - \varepsilon_{HbO}^{\lambda_1} \frac{\Delta A^{\lambda_2}}{DPF^{\lambda_2}}}{\left( \varepsilon_{HbR}^{\lambda_1} \varepsilon_{HbO}^{\lambda_2} - \varepsilon_{HbR}^{\lambda_2} \varepsilon_{HbO}^{\lambda_1} \right) \cdot d} \quad (1.2.2.5)$$

$$\Delta[HbO] = \frac{\varepsilon_{HbR}^{\lambda_1} \frac{\Delta A^{\lambda_2}}{DPF^{\lambda_2}} - \varepsilon_{HbR}^{\lambda_2} \frac{\Delta A^{\lambda_1}}{DPF^{\lambda_1}}}{\left( \varepsilon_{HbR}^{\lambda_1} \varepsilon_{HbO}^{\lambda_2} - \varepsilon_{HbR}^{\lambda_2} \varepsilon_{HbO}^{\lambda_1} \right) \cdot d} \quad (1.2.2.6)$$

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):

$$oxy = \Delta[HbO] - \Delta[HbR] \quad (1.2.2.7)$$

$$bv = \Delta[HbO] + \Delta[HbR] \quad (1.2.2.8)$$

Le tre ipotesi semplificative alla base della MBLL non sono in realtà quasi mai verificate. Non si può, infatti, considerare il tessuto cerebrale o muscolare omogeneo; in merito 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 dei parametri nel volume interessato non è quasi mai verificata nel caso di muscolo o cervello; per questo la MBLL non è in grado di fornire informazioni affidabili per la ricostruzione di immagini. Inoltre, in presenza di eventuali modifiche geometriche, cioè, per esempio, nel caso di artefatti da movimento interno al tessuto, anche la terza ipotesi ( $G^\lambda$  e  $DPF^\lambda$  costanti) viene meno.

Un altro problema che sorge, ipotizzando che le variazioni dei parametri siano omogenee nel volume misurato, è che le variazioni di concentrazione dei cromofori risultano sottostimate. Si verifica, infatti, il cosiddetto “effetto di volume parziale”, in quanto il volume all’interno del quale si misura la variazione del cromoforo è in realtà più grande dell’effettivo 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  $DPF^\lambda$  costante, nelle misure con due lunghezze d’onda si generano errori di cross-talk; come conseguenza i contributi alle variazioni di concentrazione dei singoli cromofori si mescolano e non risultano ben distinti [8]. Le problematiche introdotte 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  $\lambda$ ):

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

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 $\mu_s$ coefficiente di scattering ridotto
$\mu_a = e^\lambda \cdot c$	coefficiente di assorbimento
$v$	velocità della luce nel mezzo.

Sotto l’ipotesi che la probabilità di scattering all’interno del mezzo sia molto più elevata di quella di assorbimento [4], il modello proposto descrive in modo accurato la

migrazione della luce attraverso un mezzo con scattering elevato. Assumendo, inoltre, 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:

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

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 cambi in modo significativo. Dall'equazione (1.2.2.10) si ricava anche che il DPF dipende dal coefficiente ridotto di scattering, dalla concentrazione iniziale dei cromofori, dal coefficiente di assorbimento 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  $\mu_a$  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 fNIRS ad onde continue (Continuous Wave, CW), la fNIRS nel dominio del tempo (Time Domain, TD) e la fNIRS nel dominio della frequenza (Frequency Domain, FD).

La prima a svilupparsi fu la CW fNIRS; la sorgente luminosa emette luce in modo continuo 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 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, considerando più probabile che un fotone che arriva più tardi abbia attraversato il tessuto ad una maggiore profondità. Dall'istogramma si possono inoltre ricavare i valori dei coefficienti di scattering e di assorbimento: da questi è possibile ottenere 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 di ordine variabile tra le decine e le centinaia di megahertz. Informazioni sullo scattering e l'assorbimento dei fotoni luminosi vengono dedotte dallo slittamento di fase e dall'attenuazione in ampiezza subiti dal fascio di fotoni in uscita, rispetto 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 riescono a fornire valori quantitativi della variazione di concentrazione di emoglobina sia ossigenata che non, e riescono quindi a stimare in modo più accurato rispetto ai sistemi CW l'ossigenazione del tessuto cerebrale, in maniera

indipendente dall'ossigenazione della pelle e della scatola cranica [4]. Nonostante ciò, la tecnologia correntemente più utilizzata e diffusa negli studi sul cervello è la CW fNIRS; fra i motivi principali vi sono il basso costo e la facilità di trasporto, implementazione ed uso rispetto alle TD ed FD fNIRS, accanto ad una comunque notevole sensibilità alle caratteristiche emodinamiche cerebrali [3].

Un'altra tipologia di fNIRS che permette di determinare valori assoluti di concentrazione di emoglobina e di saturazione di 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 con il tessuto 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 il volume 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, e come conseguenza 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 della 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 650 ed i 950 nm, in corrispondenza del quale l'assorbimento da parte dei tessuti biologici è minimizzato. Dato che i fotoni devono penetrare per alcuni centimetri nella scatola cranica al fine di raggiungere la corteccia cerebrale, la sorgente luminosa deve possedere la potenza necessaria per arrivare a questa profondità; a tal scopo, 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 tra rivelatore e sorgente, per avere una sensibilità accettabile e raggiungere la corteccia cerebrale, è di 2.5 cm (meno nei neonati poiché possiedono una 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. Dai valori delle variazioni di concentrazione di ossi e deossi emoglobina è, infatti, 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 ed il tessuto muscolare. Tuttavia, le ricerche nel primo ambito hanno, per ora, ottenuto un maggior numero di successi. Il tessuto muscolare è, infatti, 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. Il monitoraggio continuo dell'ossigenazione ha, infatti, permesso di rilevare un decremento dell'ossiemoglobina e della saturazione di 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. Essi hanno, infatti, rilevato che la saturazione di ossigeno ricavata con la fNIRS non mostrava significativi cambiamenti nell'ossigenazione, rilevati invece dalla saturazione di ossigeno misurata a livello del 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 di 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 dette 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.



**Figura 1.2.4.a** - Applicazione della fNIRS. Tratta da [4s].

Le caratteristiche della fNIRS rendono tale tecnica spettroscopica molto promettente nel campo della neonatologia [3] [7] (Figg. 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, che costringono i pazienti a rimanere immobili al fine di non coprire il segnale con il rumore creato dal movimento. Se ne deduce che queste tecniche non possono essere utilizzate sui neonati, a meno che questi non vengano sedati. La strumentazione fNIRS è, inoltre, facilmente trasportabile e leggera, e non prevede l'impiego di ambienti claustrofobici, come lo scanner della MRI o della TAC, o di traccianti pericolosi, come nella PET. Non stupiscono, quindi, i numerosi studi che utilizzano la fNIRS sui neonati; ottenere dei parametri fisiologici 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 di 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 esse sono direttamente proporzionali: ad un aumento dell'attività neuronale, in risposta a stimoli specifici, segue un incremento del flusso sanguigno, con conseguente aumento dell'ossigenazione locale. Rilevando, quindi, variazioni locali del flusso sanguigno e dell'ossigenazione, si possono dedurre la presenza o l'assenza di un'attività cerebrale e la sua localizzazione. Gli stimoli utilizzati sono di tipo uditivo, olfattivo, visivo o motorio passivo [7].

Gli stessi stimoli e strumentazioni possono essere utilizzati anche su adulti e bambini, per valutare le loro funzioni cerebrali. Gli stimoli utilizzati 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 di ragionamento.



**Figure 1.2.4.b-c** - fNIRS in neonati e bambini. Tratte da [5s] e [6s].

Persone con gravi disabilità, come per esempio i malati di sclerosi multipla, hanno bisogno di assistenza costante al loro fianco. Poter comunicare e controllare strumenti esterni senza dover sempre dipendere da altre persone potrebbe essere molto utile per questi pazienti. La motivazione principale dello sviluppo della BCI (Brain Computer Interface) è proprio 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 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. I due studiosi hanno mostrato ai vari soggetti due figure di bevande per ogni trial ed hanno chiesto loro di valutare mentalmente quanto avrebbero desiderato bere le due bevande, decidendo 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%.



Figura 1.2.4.d - Applicazione della fNIRS nella BCI. Tratta da [7s].

### **1.2.5. Vantaggi e svantaggi della fNIRS rispetto ad altre tecniche di neuroimaging**

Nella pratica clinica esistono tecniche consolidate e già utilizzate per ottenere immagini neurologiche funzionali, che forniscono informazioni qualitative e quantitative sulla fisiologia e sulle funzioni delle cellule e dei tessuti cerebrali; si pensi, per esempio, ai già citati EEG, fMRI, PET e SPECT. L'esistenza di altre tecniche che permettono di caratterizzare l'attività neuronale in risposta a stimoli specifici rappresenta un mezzo molto importante per il confronto e la validazione dei risultati ottenuti con la fNIRS.

La fNIRS presenta, peraltro, notevoli vantaggi rispetto alle altre tecniche di neuroimaging citate, quali per esempio la libertà di movimento e la possibilità di eseguire l'esame in qualsiasi posizione il paziente si trovi, e non in un ambiente ristretto come con la fMRI e la PET. La strumentazione fNIRS è poi facilmente trasportabile, di semplice 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 spostare. Per soggetti impossibilitati ad essere esaminati con la fMRI o la PET, come i portatori di protesi metalliche, i neonati o gli schizofrenici, la spettroscopia nel vicino infrarosso rappresenta la soluzione ottima in quanto non crea alcun tipo di problema. Da evidenziare, fra i vantaggi della fNIRS, anche l'assoluta non invasività e pericolosità di questa tecnica, rispetto ai rischi biologici cui il paziente viene sottoposto per esempio nel caso di PET o SPECT (traccianti radioattivi); questo aspetto consente di ripetere l'esame ogniqualvolta si voglia, senza limitazioni dovute ai possibili danni subiti dal soggetto, e rende l'utilizzo di questa strumentazione particolarmente adatto a neonati e bambini.

La risoluzione temporale della fNIRS dipende dalla strumentazione utilizzata; tipicamente è di alcuni millisecondi 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. 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 rispetto alle altre tecniche.

Un altro vantaggio della fNIRS è che essa non interferisce con le altre strumentazioni, ad esempio con campi magnetici ed elettrici: è, quindi, possibile utilizzarla insieme a queste altre tecniche in applicazioni di coregistrazione, al fine, per

esempio, di integrare le informazioni di carattere funzionale fornite dalla fNIRS con informazioni strutturali e morfologiche ottenibili con altre tecniche; 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 differenti metodiche [3]. Data la diversità fra le strutture anatomiche e le localizzazioni dei diversi tessuti tra vari soggetti, si capisce immediatamente 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, come per esempio l'alta risoluzione temporale dell'EEG e l'elevata risoluzione spaziale della fMRI. La coregistrazione viene utilizzata anche per validare le varie metodiche; registrando simultaneamente con differenti tecniche lo stesso parametro, o parametri diversi ma correlati, è infatti 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; in merito è stata dimostrata una buona correlazione tra i dati fMRI e fNIRS in soggetti giovani ed anziani durante compiti motori [19].

## **2. Stima della risposta emodinamica dal segnale fNIRS e problemi aperti**

### **2.1. La risposta emodinamica**

La strumentazione fNIRS permette di misurare la variazione di assorbanza della luce attraverso il tessuto nel tempo, a partire dalle intensità delle radiazioni emesse dalle sorgenti e rilevate dai detettori: sulla base della MBLL (descritta nel paragrafo 1.2.2.) è quindi possibile ricavare le variazioni temporali di concentrazione di ossi- e deossi-emoglobina. Il segnale fNIRS così ottenuto risulta costituito da diverse componenti di cui la risposta emodinamica (Hemodynamic Response Function - HRF) è il “segnale utile”. Alla HRF si sovrappongono oscillazioni legate ad attività fisiologiche, artefatti da movimento e rumore di misura, che costituiscono, nella presente analisi, componenti di disturbo. L’obiettivo di molteplici studi in questo settore è di riuscire ad estrarre la risposta emodinamica dal segnale grezzo, attenuando le componenti di rumore sovrapposte.

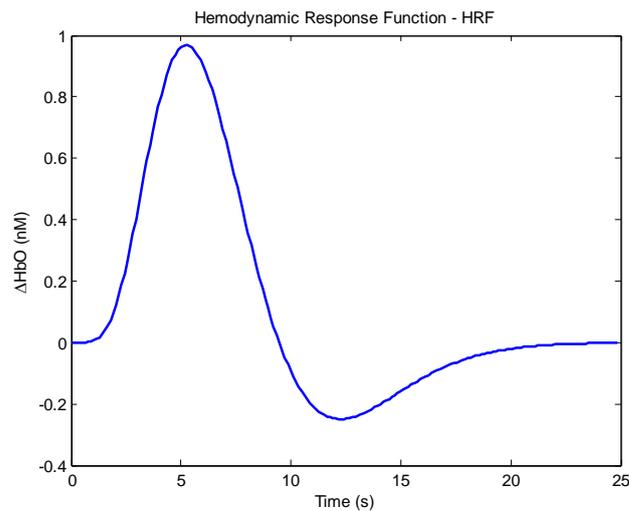
La presenza dell’HRF all’interno del segnale acquisito è diretta conseguenza di specifici processi fisiologici che si sviluppano nelle regioni attivate della corteccia; in seguito ad uno stimolo di qualsiasi tipo, infatti, si verifica un incremento del consumo di ossigeno da parte delle cellule neuronali attivate, che comporta un conseguente aumento di flusso sanguigno (Cerebral Blood Flow - CBF) e di volume ematico (Cerebral Blood Volume - CBV) in corrispondenza delle regioni cerebrali coinvolte nell’attività. Il consumo di ossigeno da parte dei neuroni attivati subisce un incremento in virtù del fatto che la fonte energetica dei processi cellulari è l’ATP, molecola sintetizzata nei mitocondri a partire da glucosio e, appunto, ossigeno; l’aumento del flusso nei capillari è dovuto a reclutamento o dilatazione dei capillari stessi e/o incremento della velocità del sangue. Il flusso sanguigno aumenta, tuttavia, in maniera sproporzionata rispetto al consumo di ossigeno: un aumento del flusso ematico a valori molto superiori a quanto necessario a fornire l’ossigeno richiesto per il metabolismo ha come effetto un incremento locale nella concentrazione di emoglobina ossigenata ed una relativa diminuzione nella concentrazione della de ossiemoglobina. Le variazioni di concentrazione di HbO e HbR sono quindi legate al bilancio tra l’apporto ed il consumo di ossigeno nella regione

attivata. Una volta terminata l'attività neuronale, il CBF decrementa molto più velocemente del CBV e ciò implica una concentrazione di deossiemoglobina temporaneamente superiore al valore basale ed una conseguente concentrazione di emoglobina ossigenata inferiore a detto valore. E' quindi immediato comprendere come l'emodinamica cerebrale rifletta l'attività neuronale.

In letteratura esistono diversi modelli matematici che descrivono la risposta emodinamica ed uno tra i più diffusi, noto come modello canonico (2.1.1), la rappresenta come combinazione di due funzioni gamma opportunamente dimensionate:

$$hrf(t) = \left(\frac{t}{d_1}\right)^{a_1} \cdot e^{-\left(\frac{t-d_1}{b_1}\right)} - c \cdot \left(\frac{t}{d_2}\right)^{a_2} \cdot e^{-\left(\frac{t-d_2}{b_2}\right)} \quad (2.1.1)$$

L'andamento del modello (2.1.1) per i valori dei parametri  $a_1=6$ ,  $a_2=12$ ,  $b_1=b_2=0.9$  sec,  $d_1=a_1 \cdot b_1$ ,  $d_2=a_2 \cdot b_2$ ,  $c=0.35$  è riportato di seguito (Fig. 2.1.a) e fornisce la variazione di concentrazione di emoglobina ossigenata ( $\Delta\text{HbO}$ ) nel tempo.

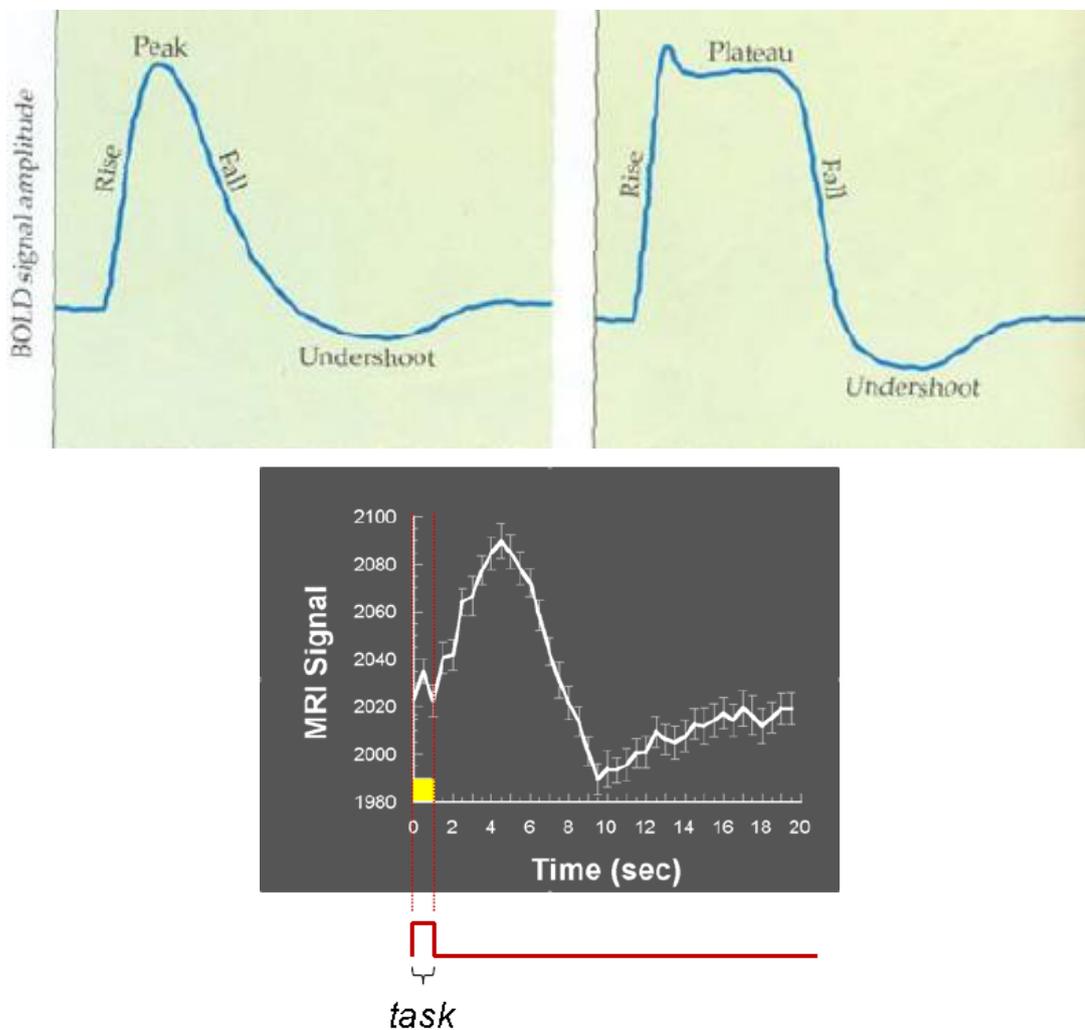


**Figura 2.1.a** - Modello canonico (2.1.1) della risposta emodinamica per HbO; valori dei parametri utilizzati:  $a_1=6$ ,  $a_2=12$ ,  $b_1=b_2=0.9$  sec,  $d_1=a_1 \cdot b_1$ ,  $d_2=a_2 \cdot b_2$ ,  $c=0.35$ .

In riferimento al modello di figura è immediato cogliere l'incremento di concentrazione di emoglobina ossigenata dovuto all'attivazione neuronale e l'undershoot finale che precede il ripristino del valore basale di concentrazione. Un andamento analogo, ma con segno opposto, si ottiene per HbR (Fig. 2.1.e).

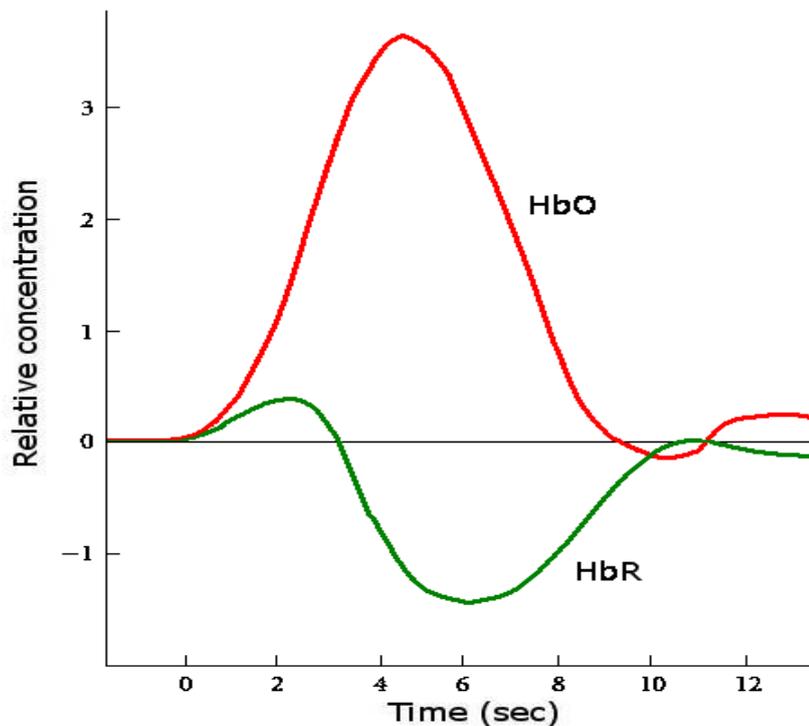
L'andamento della risposta emodinamica in termini di HbO è noto in letteratura in quanto questo segnale è già stato studiato con la risonanza magnetica funzionale. In

ambito fMRI, l'emoglobina deossigenata, per le sue proprietà paramagnetiche, viene utilizzata come mezzo di contrasto endogeno: è ormai dimostrato da innumerevoli studi che con campi magnetici superiori ad 1.5 T e immagini pesate T2\* è possibile misurare un segnale dipendente dal livello di emoglobina deossigenata presente nella regione cerebrale. In particolar modo, il segnale di risonanza magnetica (pesato in T2\*) aumenta proporzionalmente al decremento di concentrazione di deossi-emoglobina: l'attività neuronale, con la variazione di concentrazione di emoglobina, induce, quindi, un incremento del segnale acquisito, il cui andamento temporale è noto come segnale BOLD (Blood Oxygenation Level Dependent) e descrive la risposta emodinamica (Figg. 2.1.b-c-d). La forma dell'HRF può, peraltro, variare a seconda del tipo di stimolo che viene presentato al soggetto (Figg. 2.1.b-c).



**Figure 2.1.b-c-d** - Esempi di segnale BOLD in risposta task specifici. I pannelli (b) e (c) in alto fanno riferimento a stimoli di tipo diverso ed evidenziano come la forma della risposta emodinamica possa variare. Tratte da [41].

Con la fNIRS è possibile ottenere sia la variazione di concentrazione nel tempo di emoglobina ossigenata, sia quella di deossiemoglobina, e ci si aspetta che detti segnali abbiano l'andamento riportato di seguito (Fig. 2.1.e). Durante lo svolgimento di un compito, cioè, la concentrazione di emoglobina deossigenata diminuisce a fronte di un aumento di concentrazione di ossiemoglobina: nella fase di attivazione neuronale, il segnale relativo all'emoglobina ossigenata ( $\Delta\text{HbO}$  - curva rossa) cresce, mentre quello relativo all'emoglobina deossigenata ( $\Delta\text{HbR}$  - curva verde) decresce; una volta terminata l'attività neuronale (dopo circa cinque secondi dalla presentazione dello stimolo, nel caso in esame) la situazione si inverte,  $\Delta\text{HbO}$  decresce e  $\Delta\text{HbR}$  cresce, fino a che entrambi i segnali si annullano in corrispondenza del ripristino del valore basale di concentrazione di HbO e HbR.



**Figura 2.1.e** - Andamento temporale della variazione di concentrazione di emoglobina ossigenata (rosso) e deossigenata (verde), in risposta ad uno stimolo specifico.

Dagli andamenti di figura è, peraltro, immediato constatare che inizialmente si manifesta un simultaneo incremento di ossi- e deossi-emoglobina; tale aspetto viene evidenziato anche da Jaszewski et al. in [20], facendo riferimento a soggetti sottoposti a stimoli di natura sia visiva che motoria: gli autori, infatti, sottolineano come il

decremento di concentrazione di deossiemoglobina risulti ritardato rispetto all'incremento nella concentrazione di emoglobina ossigenata.

La HRF ha frequenza che dipende dal paradigma sperimentale, e generalmente è compresa tra 0.05 ed 0.1 Hz.

## **2.2. Oscillazioni fisiologiche e altre componenti di disturbo nel segnale fNIRS**

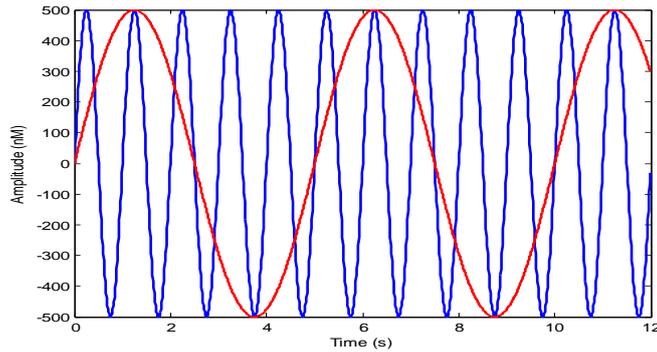
Nel segnale fNIRS, come detto, oltre alla risposta emodinamica compaiono diverse oscillazioni fisiologiche (dovute a processi che influiscono sulla concentrazione di emoglobina), che in tal sede costituiscono componenti di disturbo. Nel dettaglio si individuano quattro segnali che si sovrappongono alla HRF, caratterizzati da ampiezze e frequenze differenti, e relativi a battito cardiaco, frequenza respiratoria, onda vasomotrice (o di Mayer) e componenti a bassissima frequenza [24]. Oltre alle oscillazioni fisiologiche, nel segnale fNIRS compaiono anche componenti dovute a rumore di misura e artefatti da movimento. La descrizione che segue si riferisce ad esperimenti condotti su soggetti a riposo, cioè soggetti seduti o distesi a cui vengono somministrati test visivi, uditivi, cognitivi o a cui viene chiesto di eseguire semplici compiti motori (ad esempio muovere un dito o stringere la mano)

- **Componente dovuta al battito cardiaco**

Il battito cardiaco ha tipicamente una frequenza di 60-80 pulsazioni al minuto (circa 1 Hz) e la componente di disturbo presente nel segnale fNIRS associata ad esso è approssimativamente rappresentabile con una sinusoide, avente frequenza pari a quella cardiaca e ampiezza variabile nel range [0-500] nM (Fig. 2.2.a). Essendo una delle componenti con ampiezza maggiore ed avendo frequenza superiore alle altre, quella cardiaca è la componente più facilmente distinguibile, e può essere quindi eliminata più agevolmente rispetto alle altre oscillazioni fisiologiche, tramite un filtraggio passa-basso.

- **Componente dovuta alla respirazione**

La componente di disturbo dovuta alla frequenza respiratoria è, come quella relativa al battito cardiaco, assimilabile ad una sinusoide, con frequenza però inferiore, solitamente intorno a 0.2 Hz; l'ampiezza è invece simile a quella evidenziata dalla componente cardiaca (Fig. 2.2.a).



**Figura 2.2.a** - Sinusoidi che rappresentano le componenti cardiaca (blu) e respiratoria (rosso) sovrapposte alla HRF nel segnale fNIRS.

- **Onda di Mayer**

Un'altra oscillazione fisiologica presente nel segnale fNIRS è nota come onda di Mayer (o onda vasomotrice). Si tratta di una componente molto lenta, a frequenza tipicamente compresa fra 0.04 e 0.15 Hz [25], e quindi molto simile a quella evidenziata della risposta emodinamica. La componente di Mayer possiede, peraltro, un'ampiezza maggiore di quella della HRF attesa nella maggior parte degli esperimenti, e si rivela, dunque, essere una componente difficilmente eliminabile dal segnale senza intaccare la risposta emodinamica. Nel caso di paradigmi che prevedono stimoli visivi o cognitivi, l'onda di Mayer assume, infatti, valori compresi tra  $\pm 500$  nM, a fronte di un'ampiezza massima della risposta emodinamica di circa 200 nM. E' stato inoltre dimostrato che la componente di Mayer è molto attenuata quando il soggetto si trova in posizione sdraiata rispetto a quando è in piedi o seduto, situazioni nelle quali risulta invece predominante [3]. Per questo motivo si tratta di un'oscillazione che non compare negli studi di fMRI. L'esatta origine dell'onda di Mayer è sconosciuta [26], ma si ritiene che sia generata da oscillazioni del tono vascolare causate da cambiamenti locali nella contrazione dei muscoli lisci delle pareti dei vasi, modifiche non correlate con le frequenze respiratoria e cardiaca [7].

- **Oscillazioni a bassissima frequenza**

Le oscillazioni a bassissima frequenza (Very Low Frequency Oscillations - VLFO) sono componenti di disturbo aventi tipicamente spettri concentrati e frequenze inferiori a 0.1 Hz, arrivando anche a 0.004 Hz, e si presentano in genere come andamenti

sinusoidali o come trend crescenti o decrescenti; anche queste sono componenti legate alle oscillazioni del tono vascolare.

- **Artefatti da movimento**

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, che hanno l'effetto di modificare la concentrazione di emoglobina. 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.

- **Rumore di misura**

Oltre alle oscillazioni fisiologiche appena descritte e agli artefatti da movimento, il segnale fNIRS risulta corrotto anche da rumore di misura. Detto rumore che compare in ogni acquisizione ha un andamento casuale e indici statistici, come media e varianza, molto variabili, sia tra soggetti che tra canali di acquisizione; anche l'ampiezza di questa componente risulta molto variabile e, di norma, è notevolmente superiore a quella della HRF. Contrariamente a quanto accade per i metodi che sfruttano i campi magnetici ed elettrici [27], la fNIRS non è soggetta alle interferenze elettriche di rete, ma risulta evidentemente sensibile alla presenza di eventuali fonti di illuminazione presenti nell'ambiente circostante. Una precauzione da prendere per ridurre il rumore proveniente dall'ambiente è, infatti, 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.

## **2.3. Metodi proposti in letteratura per la stima della risposta emodinamica**

Verranno trattati di seguito i principali metodi utilizzati in letteratura per la stima della risposta emodinamica da segnali fNIRS, con una breve descrizione delle loro caratteristiche e dei rispettivi vantaggi e svantaggi.

### **2.3.1. Filtraggio in frequenza**

Il più semplice approccio al problema in esame, e per questo anche il più utilizzato, prevede l'applicazione di un filtro in frequenza di tipo passa-basso.

Jaszewski et al. [20] hanno utilizzato questo metodo nel loro studio sulle differenze tra la risposta emodinamica ottenuta a fronte di uno stimolo visivo e quella ottenuta, invece, in risposta ad un task motorio; la frequenza di taglio da essi utilizzata è di 1 Hz. I soggetti erano in posizione supina durante il compito motorio mentre erano seduti durante quello visivo. Gli autori hanno mediato tutti i trial acquisiti in ciascuna condizione per stimare la risposta emodinamica.

Anche Franceschini et al. in [28] hanno utilizzato un filtraggio di tipo passa-basso nella pre-elaborazione del segnale, in un esperimento in cui i dati erano acquisiti con la DOT. I soggetti si trovavano 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 passa-basso in questo studio è di 0.5 Hz, scelta che consente di eliminare la frequenza cardiaca. Il segnale, inoltre, è stato filtrato con un filtro passa-alto, con frequenza di cut-off di 0.02 Hz, per eliminare le lente oscillazioni presenti nel segnale.

Il filtraggio passa-basso è un metodo molto semplice e diretto per elaborare il segnale, che non richiede né un alto carico computazionale né una difficile implementazione. Esso risulta estremamente efficace nel rimuovere le pulsazioni cardiache, in quanto queste presentano un contenuto in frequenza sufficientemente diverso da quello del segnale utile; 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**

Si tratta di un metodo utilizzato da Gratton e Corballis in [29], 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.

I vantaggi di questo metodo sono un raddoppio del rapporto segnale-rumore e la rimozione del battito cardiaco dal segnale, ma, come per il semplice filtraggio in frequenza, le altre oscillazioni fisiologiche non vengono eliminate. Tale aspetto costituisce evidentemente un problema in quanto dette oscillazioni rappresentano la componente di disturbo che maggiormente distorce la risposta emodinamica, avendo un contenuto in frequenza molto simile a quello dell'HRF.

### **2.3.3. Filtro adattivo per la rimozione della componente cardiaca**

Un altro metodo per eliminare la componente cardiaca è quello utilizzato da Morren et al. in [30]. Gli autori hanno acquisito la frequenza cardiaca del soggetto, durante tutta la durata dell'esperimento, tramite un pulsossimetro applicato alla mano opposta a quella che si muoveva. Questo segnale è stato utilizzato come riferimento del rumore e fornito in ingresso ad un filtro adattivo, la cui uscita è stata poi sottratta dal segnale fNIRS acquisito, che contiene sia la HRF che la frequenza cardiaca; in tal modo il segnale rimanente dovrebbe contenere esclusivamente 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. La frequenza cardiaca acquisita con un pulsossimetro posizionato sulla mano, peraltro, non necessariamente coincide con quella rilevata dalla fNIRS a livello cerebrale. L'onda di pressione che parte dal cuore ad ogni battito, infatti, impiega un tempo diverso a raggiungere le diverse parti del corpo; il segnale acquisito in tal modo potrebbe, quindi, non essere quello ottimo per la riduzione della componente cardiaca presente nel segnale fNIRS.

#### **2.3.4. 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. La PCA applica, cioè, una trasformazione lineare ad un data set composto da  $N$  dati, che permette di ottenere  $M$  ( $M < N$ ) variabili; di dette variabili se ne considerano, poi, solamente  $P$ , basandosi sul fatto che nelle  $P$  variabili è contenuta buona parte dell'informazione disponibile. In questo modo, ad esempio, si riesce ad eliminare componenti non desiderate o, al contrario, evidenziare componenti di interesse presenti nei dati. La PCA può essere definita come la proiezione ortogonale dei dati su uno spazio lineare di dimensione inferiore (al numero di dati), in modo tale da massimizzare la varianza dei dati proiettati; equivalentemente, può essere definita come la proiezione lineare che minimizza una funzione costo rappresentata dalla media del quadrato della distanza tra i dati e le loro proiezioni. Si tratta di una tecnica largamente utilizzata per rimuovere le componenti dovute al rumore.

Zhang et al. la hanno utilizzata per esempio in [31], per l'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 neuronale 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 alcuna attivazione evento-relata; durante uno stimolo,

invece, il rumore fisiologico può risultare accoppiato alla frequenza di stimolazione, rendendo così difficile separare il sotto-spazio dell'attivazione indotta dallo stimolo da quello dell'interferenza fisiologica. Essi hanno anche ipotizzato 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 stata quindi 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.

### **2.3.5. Sottrazione diretta di una forma d'onda non attivata**

L'uso di questa tecnica è stato scientificamente validato nel 2007 da Saager e Berger in [32], 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 opportune pre-elaborazioni, la sua sottrazione dal segnale contenente la HRF, in modo da isolare quest'ultima.

Franceschini et al. in [28] hanno selezionato un punto non attivato (pixel), lontano dall'area cerebrale attivata dal paradigma sperimentale, e hanno assunto tale pixel come rappresentante del rumore fisiologico sistemico presente nell'acquisizione, considerato omogeneo in tutto il cranio. Gli autori hanno, quindi, 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 [32] hanno, invece, 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 detettore vicino alla sorgente, il segnale acquisito è relativo al solo strato superficiale del cranio e non raggiunge la corteccia, mentre il segnale acquisito dal rivelatore più lontano contiene sia il segnale cerebrale che quello proveniente dal cranio. Identificando il segnale acquisito con il detettore 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 al fine di scalare e aggiustare il segnale rappresentante il rumore, 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 [32] [33]. Il metodo appena presentato è estremamente promettente, ma le tecniche usate finora per aggiustare il segnale rilevato dal detettore più vicino non sono risultate ottime. Ad esempio, l'alta percentuale di segnale rimossa da Saager e Berger potrebbe essere dovuta al fatto che, eseguendo un fit ai minimi quadrati del segnale rumoroso su quello contenente la risposta emodinamica, venga introdotta nel segnale solo rumoroso anche una parte di HRF, successivamente sottratta da sè stessa con conseguente eliminazione di una 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. Anche il prossimo metodo descritto prevede l'utilizzo del canale di riferimento.

### **2.3.6. Adaptive filtering**

Questo metodo, ideato da Zhang et al. nel 2007 [24], risulta il più promettente fra quelli proposti, avendo ottenuto i migliori risultati. Si tratta di una tecnica che prevede l'utilizzo di rivelatori posti a diverse distanze dalla sorgente e di un filtro adattivo; il detettore più vicino, posto a 1.5 cm, è il canale di riferimento che acquisisce il segnale relativo al cranio ed al cuoio cappelluto. Quello più distante, posto a 4.5 cm, rileva il segnale relativo a cuoio cappelluto, cranio, materia bianca, fluido cerebrospinale e la risposta emodinamica. La misura ricavata dal rivelatore più vicino alla sorgente viene utilizzata come input del 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 ad 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 frequenze della HRF. Studi di simulazione confermano l'efficacia di questo metodo, dimostrando un significativo incremento del CNR dopo l'adaptive filtering e l'eliminazione di circa l'80% della variabilità del segnale. Tuttavia, in [24], gli autori hanno deciso di simulare solo la frequenza cardiaca e quella respiratoria come componenti del rumore da rimuovere, e non l'onda di Mayer. Resta quindi da valutare l'efficacia della tecnica in presenza di questa componente. Anche negli studi in vivo riportati all'interno della referenza [34], Zhang et al. hanno acquisito i dati in soggetti posti in posizione supina, posizione che diminuisce notevolmente la presenza della componente di Mayer nel segnale acquisito. Nonostante ciò, in uno studio dove un solo soggetto viene analizzato in posizione seduta [35], gli stessi autori dimostrano l'efficacia del metodo anche nella rimozione dell'onda di Mayer. Resta tuttavia da valutare la bontà del metodo in diverse situazioni e su più soggetti per la rimozione di questa componente fisiologica. Gli autori hanno, inoltre, 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 e di abitudine. Infatti, 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 comunque confermato l'efficacia dell'uso del canale di riferimento, in quanto è stato dimostrato che le variazioni ricavate dallo strato superficiale sono le maggiori componenti dell'interferenza globale. Tuttavia, 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, l'applicazione dell'adaptive filtering comporta addirittura una diminuzione del CNR. Per valutare questa correlazione gli autori calcolano il coefficiente di Pearson su dati acquisiti in una fase di riposo da entrambi i canali: questo, come il pre-training per il calcolo delle stime iniziali dei coefficienti del filtro, aumenta il tempo dell'esperimento, seppure gli autori sostengano 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, come già evidenziato, 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.

### 2.3.7. 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. 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 un singolo stimolo (e.g. visivo, motorio, uditivo). La HRF viene stimata mediando i trials corrispondenti a stimoli dello stesso tipo.

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; il rumore (considerato come somma di tutte le componenti del segnale esclusa la risposta emodinamica) viene assunto casuale, con media nulla e varianza  $\sigma^2$ , 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 come segue:

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

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; essa, infatti, fornisce in media proprio la risposta emodinamica voluta. Per valutare, poi, la precisione della stima, viene calcolata 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  $N \rightarrow \infty$ ,  $Var[e(t)] \rightarrow 0$ : 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 durata breve di 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 e 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; peraltro 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 e 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, e questi motivi la rendono la tecnica attualmente più utilizzata. Un esempio recente del suo utilizzo si trova nella referenza [38], che riporta un lavoro di Scarpa et al. del 2010.

## 2.4. Problemi aperti e scopo della tesi

Dalla presentazione, nei paragrafi precedenti, dei vari metodi proposti in letteratura e dei rispettivi vantaggi e svantaggi, se ne deduce come il problema della stima della HRF sia ancora aperto. Non si è riusciti, infatti, per ora, ad attenuare tutte le componenti del rumore in modo sufficientemente accurato, da permettere una stima adeguata della risposta emodinamica. La difficoltà maggiore consiste, come già detto, nel ridurre il rumore alle basse frequenze, in quanto questo presenta un contenuto in frequenza simile a quello della HRF.

Lo scopo della tesi, di conseguenza, è proprio quello di estrarre dal segnale fNIRS la risposta emodinamica di interesse. In particolare, si proporrà l'utilizzo del General Linear Model, modello statistico che descrive i dati come combinazione lineare di funzioni più un termine relativo al rumore, e che prevede in ingresso un modello della risposta emodinamica. Il GLM è un metodo ampiamente utilizzato nell'analisi di dati fMRI, ma non ancora applicato con successo al segnale fNIRS per la presenza dell'elevato rumore fisiologico e soprattutto per la mancanza di un modello dell'HRF in grado di adattarsi ai diversi tipi di esperimenti e stimoli, che ne vanno a modificare ampiezza, durata e forma. In questa tesi si svilupperà quindi un approccio basato sul GLM da applicare a segnali fNIRS, che sarà poi testato su dati simulati e, successivamente, su dati reali.

## **3. Data Base**

### **3.1. Dati reali**

#### **3.1.1. Il paradigma sperimentale**

Gli esperimenti sono stati realizzati presso il Cognition and Language Laboratory (CoLab) del Dipartimento di Psicologia dello Sviluppo e della Socializzazione dell'Università degli Studi di Padova, nella primavera del 2011, dal gruppo di ricerca del Professor Roberto Dell'Acqua. Gli esperimenti sono stati condotti su 10 soggetti (età medi 28, da 24 a 37), con il loro consenso informato; i soggetti erano di entrambi i sessi (5 maschi e 5 femmine), destrorsi e con una visione normale o corretta da lenti.

L'esperimento è stato svolto in una stanza insonorizzata e debolmente illuminata, all'interno della quale i soggetti sono stati fatti sedere comodamente; il personale del laboratorio ha provveduto al settaggio dell'apparecchiatura fNIRS ed al montaggio del caschetto, appoggiando le estremità delle fibre ottiche sulla testa del soggetto, al quale è stata illustrata tutta la procedura da svolgere. Di fronte alla seduta sulla quale si trovava il soggetto era stato predisposto un tavolo con un computer dotato di tastiera, sullo schermo del quale comparivano gli stimoli di natura visiva cui i soggetti sono stati sottoposti nel corso delle acquisizioni. Per l'intera durata dell'esperimento, il soggetto teneva l'indice della mano destra sul tasto "L" e l'indice della mano sinistra sul tasto "A". L'esperimento iniziava con un breve periodo di riposo, in cui sullo schermo nero era unicamente presente una scritta bianca che forniva le spiegazioni necessarie al soggetto per poter proseguire con l'esperimento effettivo, al soggetto sotto indagine venivano presentati in maniera randomizzata due differenti stimoli (condizioni), a ciascuno dei quali corrispondeva un compito diverso: comparsa sullo schermo di una freccia diretta verso destra (condizione 1) e comparsa di una freccia diretta verso sinistra (condizione 2); detti stimoli si alternavano a schermate nere in corrispondenza delle quali il soggetto non doveva eseguire alcun compito. Ciascuno stimolo era preceduto dalla comparsa di una croce di fissazione per due secondi, in modo da focalizzare l'attenzione del soggetto sull'imminente comparsa dello stimolo. Il soggetto, alla comparsa dello stimolo, doveva rispondere allo stesso rispettivamente premendo due volte il tasto "L" e premendo due

volte il tasto “A”. Si tratta, quindi, di uno stimolo visivo a cui è associato un task motorio, muovere un dito dal lato indicato dalla freccia (il tasto “L” si trova infatti sulla destra della tastiera ed il tasto “A” sulla sinistra), noto come “finger tapping”. I diversi stimoli comparivano in modo randomizzato al soggetto in modo tale che non subentrasse alcun fenomeno di abitudine. L’acquisizione, della durata totale di circa una trentina di minuti, prevedeva una fase di riposo dopo circa quindici minuti, durante la quale lo schermo del computer compariva, come nella fase iniziale, annerito con la scritta bianca di cui prima; durante questi due periodi di riposo, il soggetto poteva muoversi e distogliere l’attenzione dai compiti che stava eseguendo; la durata di detti periodi veniva decisa dallo specifico soggetto, che poteva porre termine alla pausa e proseguire con l’esperimento premendo la barra spaziatrice.

Secondo il protocollo sperimentale utilizzato, per ogni soggetto sono stati acquisiti 40 trials in risposta allo stimolo 1 e 40 in risposta allo stimolo 2, per un totale di 80 trials. Il segnale fNIRS è stato acquisito in modo sincronizzato con il trigger, che segna gli istanti temporali in corrispondenza dei quali vengono presentati gli stimoli al soggetto; ciò ha consentito di suddividere il segnale relativo all’intero esperimento nei singoli trials acquisiti. Si è deciso di considerare i primi 12 secondi dopo la comparsa dello stimolo come durata di ciascun trial, in quanto in 12 secondi la risposta emodinamica compare e si esaurisce quasi completamente.

La distanza temporale tra uno stimolo ed il successivo (Inter-Stimulus Interval, ISI) è stata fatta variare tra 12 e 15 secondi, e comporta quindi una frequenza della HRF compresa tra 0.067 e 0.083 Hz.

Lo scopo dell’esperimento era valutare la differenza tra l’attivazione indotta dallo stimolo 1 e quella conseguente allo stimolo 2. L’ipotesi di partenza, già nota da altri studi sul “finger tapping”, è che la risposta emodinamica indotta dal movimento di una mano sia maggiore nell’emisfero opposto al lato in cui si esegue il movimento della mano stessa (effetto di lateralizzazione), come evidenziato da Holper et al. in [36]. Altra ipotesi nota dalla letteratura e sottolineata da Lutz et al. in [37] è che l’attivazione indotta dal movimento della mano destra (condizione 1), che è la mano dominante essendo i soggetti esaminati tutti destrorsi, risulti inferiore rispetto a quella conseguente al movimento della mano sinistra (condizione 2), che richiede un impegno maggiore. L’ampiezza attesa della risposta emodinamica per lo stimolo 1 è, cioè, inferiore rispetto a quella attesa per lo stimolo 2. Si è scelto questo tipo di esperimento proprio in quanto nota la risposta emodinamica, in modo da poter validare il nuovo metodo di filtraggio del segnale.

A differenza degli altri lavori proposti in letteratura, che richiedono compiti di “finger tapping” della durata di almeno 15 secondi, i nostri soggetti erano istruiti a premere un determinato tasto solamente due volte. In questo modo la risposta emodinamica evocata è caratterizzata da un’ampiezza ridotta, ed è quindi più difficile da stimare correttamente, ma risulta paragonabile all’HRF evocata da task cognitivi, non motori: l’obiettivo è, infatti, sviluppare un metodo di filtraggio del segnale in grado di stimare correttamente la risposta emodinamica indipendentemente dal tipo di task (motorio, cognitivo, visivo, etc.).

### **3.1.2. La strumentazione utilizzata per l’acquisizione**

L’unità ottica di registrazione utilizzata è uno spettrometro multi-canale operante nel dominio della frequenza (ISS Imagent<sup>TM</sup>, Champaign, Illinois), dotato di diodi laser modulati a 110 MHz, la metà dei quali emettono luce a 690 nm e gli altri 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  $\mu\text{m}$ , sono state utilizzate per convogliare la luce sulla testa del soggetto sotto analisi.

La luce emessa dalle sorgenti, dopo aver attraversato la testa del soggetto, viene rilevata dai detectors; viene, cioè, fatta convogliare, anch’essa tramite fibre ottiche (con un diametro di 3 mm), a 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 viene utilizzato per far sì che solo due sorgenti alla volta, una per ogni emisfero, emettano luce in modo sincrono; in tal modo risulta 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 risulta pari a  $T_{\text{tot}}=64$  ms; a questo corrisponde una frequenza di campionamento  $F_c=15.625$  Hz. Poiché per stabilizzare il segnale ottico è stata eseguita anche una media dual-period, il periodo finale di campionamento risulta essere di 128 ms, a cui corrisponde una frequenza di campionamento  $F_c=7.8125$  Hz.

Il segnale ottico, rilevato dai detettori ed amplificato dai tubi fotomoltiplicatori, viene convertito in corrente alternata (AC), corrente continua (DC) e segnale di fase, per

ogni coppia sorgente-rivelatore e per ognuna delle due lunghezze d'onda [21]. Dai valori ottenuti è poi possibile calcolare 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 facendo ricorso alle seguenti equazioni [22]:

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

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

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 [23].

### 3.1.3. Posizionamento di sorgenti e rivelatori

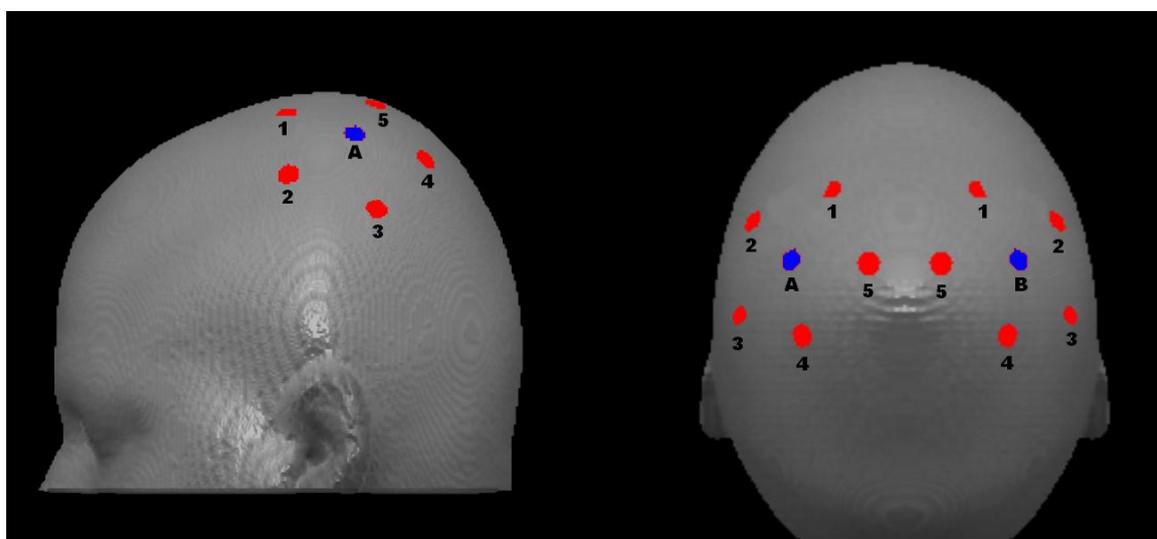
Sorgenti e rivelatori vanno posizionati con molta attenzione sulla testa di ogni soggetto: per far sì che le misurazioni siano confrontabili, si è scelto di usare il sistema internazionale 10-20 secondo il quale posizionare le varie sonde. Inoltre, poiché la morfologia del cervello varia da soggetto a soggetto, i volumi cerebrali vengono normalizzati 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): il primo MNI template era basato su 305 soggetti normali (239 maschi, 66 femmine, età 23.4 +/- 4.1); 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 estremamente basso.

Nell'esperimento sono state utilizzate 10 sorgenti (5 per emisfero), in ognuna delle quali convergevano 2 fibre ottiche provenienti dai diodi laser, e 2 rivelatori (1 per emisfero); le 2 fibre ottiche presenti in ciascuna sorgente sono relative alle due diverse lunghezze d'onda utilizzate, che permettono di monitorare le concentrazioni sia di HbO che di HbR. Ogni rivelatore risultava circondato da 5 sorgenti per HbO e altrettante (poste nelle medesime posizioni) per HbR, posizionate ad una distanza massima di 3 cm. Questi canali rilevano il segnale proveniente dalla corteccia, in quanto detta distanza sorgente-

rivelatore permette al fascio di luce di raggiungere una profondità compatibile con quella della corteccia. Le sorgenti sono numerate da 1 a 5 in ogni emisfero (sia per HbO che per HbR) (Fig. 3.1.3.a).

Per posizionare le sonde in questo esperimento è stato utilizzato un caschetto che permettesse di massimizzare il numero di siti di misurazione di HbO e HbR. 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 tenue. 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 maiuscole (A per l'emisfero sinistro e B per quello destro), mentre le sorgenti con dei numeri, da 1 a 5 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 [21]. Il canale di acquisizione formato da ogni coppia sorgente-rivelatore arriva ad una profondità di circa 2 cm; il punto di massima profondità si trova in corrispondenza del punto medio della distanza fra sorgente e detettore. L'area analizzata corrisponde alla corteccia motoria e premotoria (lobo parietale), cioè la zona cerebrale coinvolta in compiti di "finger tapping" (Fig. 3.1.3.a).



**Figura 3.1.3.a** - Posizionamento di sorgenti e rivelatori

### **3.1.4. Ipotesi neurofisiologiche sotto esame**

Come descritto nel paragrafo 3.1.1., l'esperimento cui sono stati sottoposti i soggetti esaminati viene definito di "finger tapping", in quanto prevede che a stimoli diversi si risponda con movimenti delle dita che nel caso specifico consistono nella pressione di tasti diversi della tastiera del computer, utilizzando l'indice della mano destra o della mano sinistra a seconda del tipo di stimolo presentato. Dalla letteratura, come evidenziato da Holper et al. in [36], è noto che la risposta emodinamica indotta dal movimento di una mano è maggiore nell'emisfero opposto al lato in cui si esegue il movimento della mano stessa (effetto di lateralizzazione). Muovendo le dita della mano destra (condizione 1) ci si aspetta, quindi, una risposta emodinamica nell'emisfero sinistro (controlaterale) maggiore rispetto a quella ottenuta nell'emisfero destro (ipsilaterale); ci si attende, invece, la situazione opposta se il movimento è effettuato dalle dita della mano sinistra (condizione 2). Lo stimolo di tipo 1, che comporta la pressione del tasto "L" con l'indice della mano destra, ci si aspetta, quindi, che induca attivazione maggiore nell'emisfero cerebrale sinistro, mentre lo stimolo di tipo 2, che comporta la pressione del tasto "A" con l'indice della mano sinistra, dovrebbe indurre attivazione maggiore nell'emisfero destro; in entrambi i casi ci si aspetta l'attivazione di tutti i canali della zona motoria e premotoria (situate nel lobo parietale). Inoltre, essendo i soggetti esaminati tutti destrorsi, l'ipotesi di partenza, che ci si aspetta venga confermata dai risultati sperimentali, è che l'attivazione cerebrale in corrispondenza del movimento della mano sinistra risulti maggiore di quella registrata in risposta al movimento della mano destra [37]; tale ipotesi si basa evidentemente sul fatto che soggetti destrorsi dovrebbero trovare più impegnativo il movimento della mano sinistra rispetto a quello della mano destra, mano dominante.

## 3.2. Dati simulati

I dati simulati sono stati creati in modo che fossero simili ai dati realmente acquisiti. Per simulare il segnale acquisito da ogni canale, oltre alla risposta emodinamica attesa nel paradigma sperimentale in esame, sono state introdotte altre componenti, quali il rumore di misura e gli artefatti fisiologici. Lo scopo di usare i dati simulati è che, in questi ultimi, l'andamento temporale della HRF è noto, e ciò consente di confrontare la risposta emodinamica stimata con l'algoritmo proposto con quella realmente presente nei dati. In tal modo è possibile valutare in modo oggettivo le prestazioni dell'algoritmo e la sua accuratezza nel ricostruire la risposta emodinamica, calcolare l'errore da esso commesso e valutare la sua robustezza.

I campioni di ciascun canale simulato in termini di emoglobina ossigenata sono stati generati come:

$$y(t) = HRF_{true}(t) + v(t) = HRF_{true}(t) + y_{PH}(t) + \eta(t) \quad (3.2.1)$$

dove:

$y(t)$	canale simulato di ossiemoglobina
$HRF_{true}(t)$	risposta emodinamica nota
$y_{PH}(t)$	componenti fisiologiche del rumore
$\eta(t)$	rumore di misura.

Le componenti fisiologiche del rumore  $y_{PH}(t)$  sono state modellate come una combinazione lineare di sinusoidi, a tre diverse specifiche frequenze:

$$y_{PH}(t) = \sum_{i=\{1,2,3\}} [a_i \cdot \sin(2\pi f_i t + \theta_i)] \quad (3.2.2)$$

La prima sinusoide corrisponde al battito cardiaco, ha una frequenza  $f_1$  che può variare uniformemente nel range 0.85-1.35 Hz e un'ampiezza  $a_1$  di 400 nM. La seconda sinusoide rappresenta la frequenza respiratoria, ha una frequenza  $f_2$  variabile uniformemente all'interno dell'intervallo 0.15-0.35 Hz e ampiezza  $a_2$  di 400 nM. La terza sinusoide, con frequenza  $f_3$  che varia uniformemente fra 0.05 Hz e 0.1 Hz e ampiezza  $a_3$  di 800 nM, corrisponde all'onda di Mayer. Per aumentare la variabilità, ognuna di queste sinusoidi presenta una fase  $\theta$  (variabile uniformemente fra 0 e  $2\pi$ ) differente in ogni trial.

Il rumore di misura  $\eta(t)$  è stato modellato come un rumore bianco, normale, e con deviazione standard regolata in modo che approssimasse la deviazione standard ottenuta nei trials contenenti dati reali.

La risposta emodinamica  $HRF_{true}(t)$ , invece, è stata modellata come una combinazione lineare di due funzioni gamma-varianti, con un totale di 6 parametri:

$$HRF_{true}(t) = \alpha \cdot [\Gamma(t, \tau_1, \varphi_1) - \beta \cdot \Gamma(t, \tau_2, \varphi_2)] \quad (3.2.3)$$

dove:

- $\alpha$             parametro che regola l'ampiezza
- $\tau_1$  e  $\tau_2$     parametri che regolano la forma della HRF
- $\varphi_1$  e  $\varphi_2$     parametri che regolano la scala
- $\beta$             parametro che determina il rapporto della risposta all'undershoot.

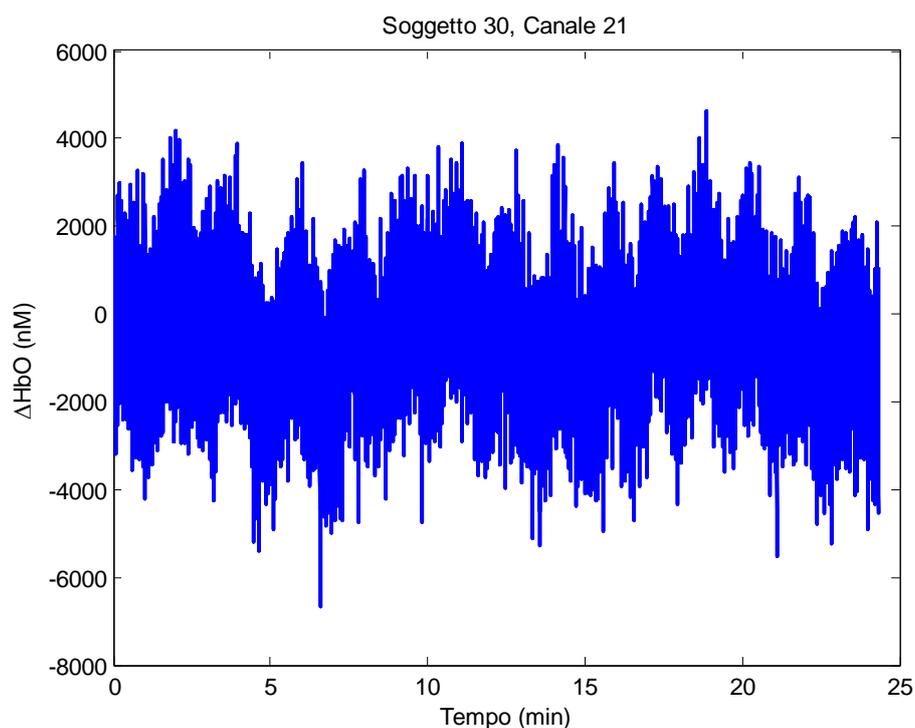
I 6 parametri liberi sono stati scelti in modo da ottenere una risposta emodinamica simile a quella attesa dopo l'esecuzione di un paradigma sperimentale come quello in esame. In particolar modo, dovendo modellare l'HRF ottenuta in risposta a due differenti stimoli visivi, sono state generate due diverse risposte emodinamiche, assegnando valori adeguati ai sei parametri. La prima forma d'onda presenta ampiezza di circa 360 nM e latenza di picco di circa 5 secondi ( $\alpha=1099$ ,  $\tau_1=\tau_2=1$ ,  $\varphi_1=-1$ ,  $\varphi_2=3$ ,  $\beta=0.5$ ); la seconda HRF generata è caratterizzata, invece, da un'ampiezza di picco di circa 420 nM e da una latenza di circa 5.5 secondi ( $\alpha=1282$ ,  $\tau_1=\tau_2=1$ ,  $\varphi_1=-0.5$ ,  $\varphi_2=3.5$ ,  $\beta=0.5$ ). Si noti come l'ampiezza della risposta emodinamica sia inferiore rispetto a quella delle componenti fisiologiche del rumore.

I canali di emoglobina deossigenata sono stati generati nello stesso modo, sommando i termini relativi a segnale utile e a componenti di rumore.

## 4. Un nuovo algoritmo basato sul General Linear Model per la stima della risposta emodinamica

### 4.1. Presentazione del metodo proposto

La figura di seguito riportata (Fig. 4.1.a) mostra un esempio di segnale relativo alla variazione di concentrazione di emoglobina ossigenata, acquisito per tutta la durata dell'esperimento cui viene sottoposto il soggetto. Come si verifica, il segnale grezzo non fornisce alcun tipo di informazione circa l'attivazione cerebrale evento-relata, in quanto il segnale utile è completamente coperto dal rumore sovrapposto.

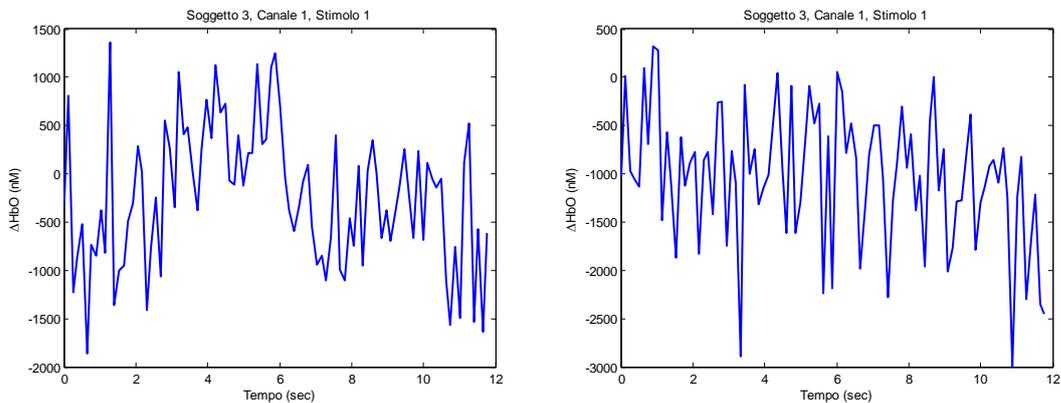


**Figura 4.1.a** - Esempio di segnale di HbO acquisito dal canale B3 per tutta la durata dell'esperimento.

Anche a livello single-trial (Fig. 4.1.b) è immediato verificare come l'HRF non sia visibile ad occhio nudo. Di seguito sono visualizzati due trials relativi al medesimo soggetto e al medesimo canale di acquisizione, ottenuti in risposta a stimoli identici (Fig. 4.1.b); come è immediato notare, i due profili, benché dovrebbero presentare andamento simile, appaiono estremamente diversi per la presenza del rumore sovrapposto e nessuna

risposta emodinamica risulta visibile. Si evidenzia, quindi, nuovamente la necessità di un'elaborazione del segnale al fine di ottenere una stima dell'HRF.

L'obiettivo del metodo che di seguito verrà presentato, come di svariati lavori presenti in letteratura, è, quindi, quello di estrarre dai dati la corretta risposta emodinamica.



**Figura 4.1.b** - Trials relativi al soggetto 3, canale di acquisizione A1, in risposta allo stimolo di tipo 1.

L'algoritmo proposto per la stima della risposta emodinamica (Fig. 4.1.c) si basa sull'utilizzo del General Linear Model (GLM) e risulta costituito da tre step fondamentali, che vengono di seguito introdotti ed approfonditi nei paragrafi seguenti:

- **Step 1:** pre-filtraggio del segnale grezzo relativo a ciascun canale di acquisizione tramite un filtro di tipo passa-banda;
- **Step 2:** identificazione di un adeguato modello della HRF su segnali ottenuti in seguito ad un'operazione di averaging di tutti i trials relativi alla medesima condizione di stimolo (sono stati mediati i trials provenienti da tutti i canali di acquisizione); la procedura è stata svolta sia per HbO che per HbR;
- **Step 3:** applicazione del General Linear Model (GLM) ai dati pre-filtrati, utilizzando il modello precedentemente identificato e la sua derivata temporale nell'implementazione; l'analisi GLM ha consentito di giungere alla stima finale della risposta emodinamica, in ciascuna condizione di stimolo, sia per HbO che per HbR in corrispondenza di tutti i canali di acquisizione.

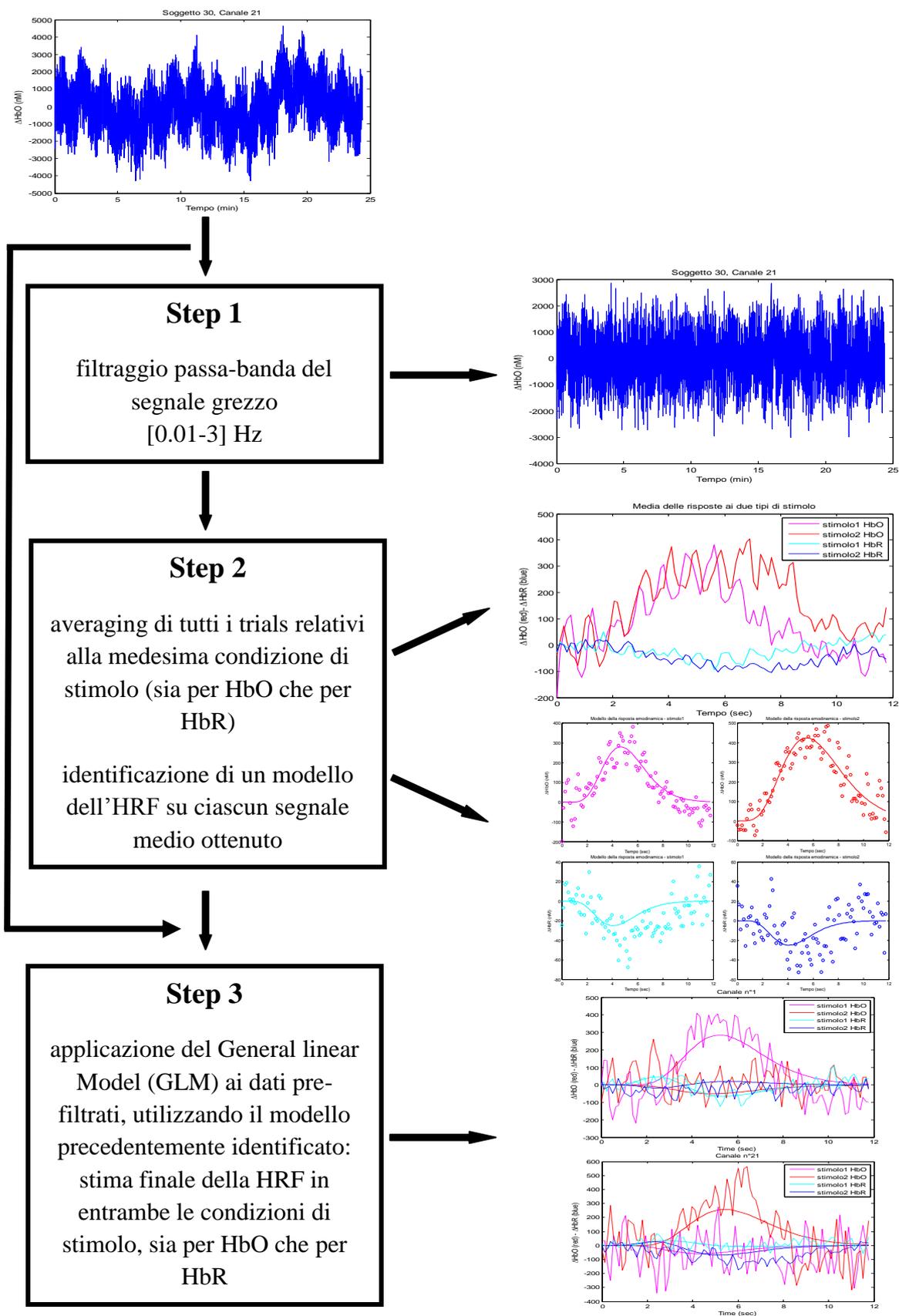
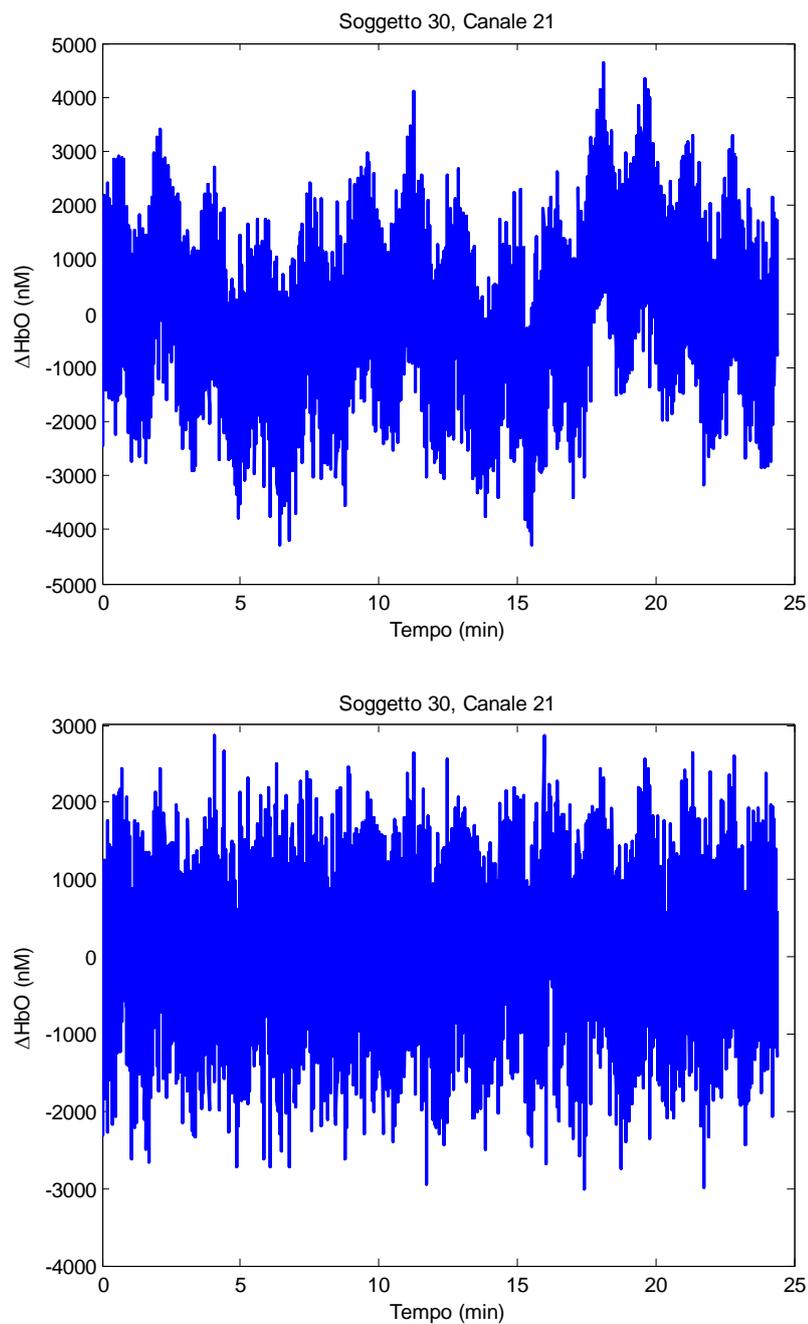


Figura 4.1.c - Schema a blocchi dell'algorithmo basato sul GLM per la stima dell'HRF.

## 4.2. Step 1: filtraggio passa-banda

Prima dell'identificazione del modello dell'HRF e dell'implementazione del GLM, il segnale grezzo è stato filtrato con un filtro di tipo passa-banda. Di seguito (Fig. 4.2.a) sono riportati gli andamenti del segnale grezzo e del segnale filtrato, per il medesimo canale del medesimo soggetto.



**Figura 4.2.a** - Segnale grezzo (pannello superiore) e filtrato con filtro passa-banda (pannello inferiore), soggetto 30, canale di acquisizione B1.

Il filtro in frequenza utilizzato consiste in un filtro di Butterworth del quarto ordine, avente frequenze di taglio inferiore e superiore rispettivamente pari a 0.01 e 3 Hz. Il filtraggio è stato eseguito al fine di eliminare le componenti ad alta e a bassissima frequenza, operando una scelta di frequenze di taglio tale da garantire la completa integrità del segnale di interesse. La banda utilizzata risulta, infatti, sufficientemente ampia, per non incorrere nel rischio di eliminare qualche componente dell'HRF.

## 4.3. Step 2: identificazione del modello della risposta emodinamica

La risposta emodinamica è stata modellata con un'unica funzione gamma, definendo un modello per HbO (4.3.1.1) ed un modello per HbR (4.3.1.2). Entrambi i modelli sono stati identificati per le due condizioni di stimolo tramite un approccio non lineare alla stima parametrica; i segnali su cui sono stati identificati i modelli della HRF sono stati ottenuti mediando tra loro tutti i trials relativi allo stesso tipo di stimolo (provenienti da tutti i canali di acquisizione del soggetto sotto esame) (Fig. 4.3.1.a).

### 4.3.1. Formulazione del modello

In letteratura, la risposta emodinamica viene tipicamente modellata tramite la combinazione di due funzioni gamma opportunamente dimensionate (2.1.1). Qui, per semplicità, l'HRF è stata descritta tramite un'unica funzione gamma, definendo i modelli (4.3.1.1) per HbO e (4.3.1.2) per HbR.

Facendo riferimento alla risposta emodinamica in termini di emoglobina ossigenata, il modello (4.3.1.1) permette di cogliere e modellare il picco della funzione, trascurando l'undershoot finale che non fornisce informazione rilevante circa l'intensità dell'attivazione cerebrale evento-relata [39]:

$$h_{HbO}(t) = \left(\frac{t}{d}\right)^a \cdot e^{-\left(\frac{t-d}{b}\right)} \quad (4.3.1.1)$$

Nel modello (4.3.1.1) compaiono tre parametri incogniti ( $a$ ,  $b$  e  $d$ ), stimati per ciascuna condizione di stimolo tramite minimi quadrati non lineari pesati.

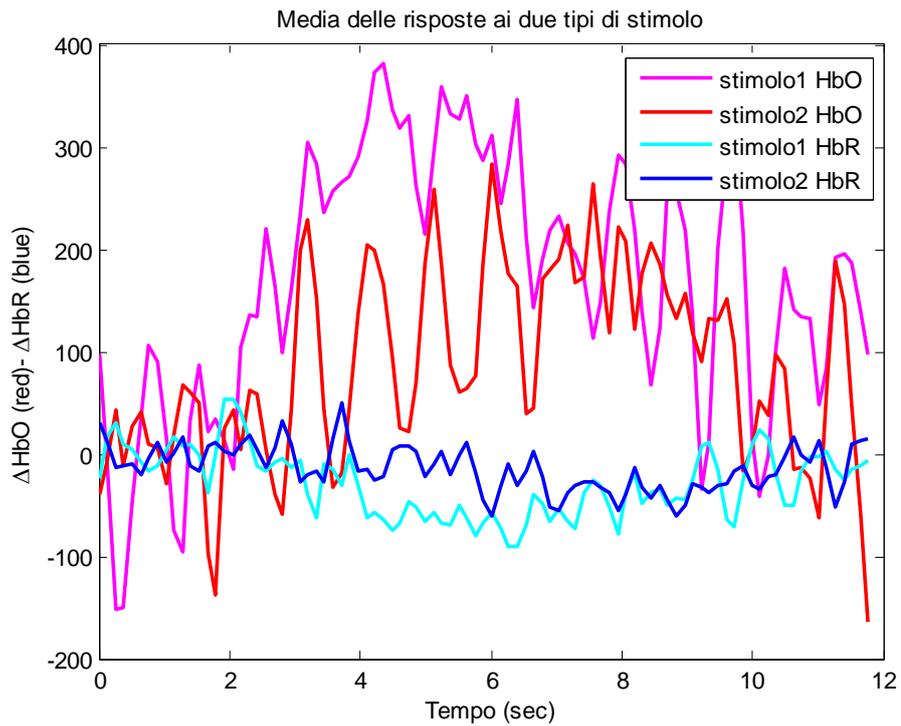
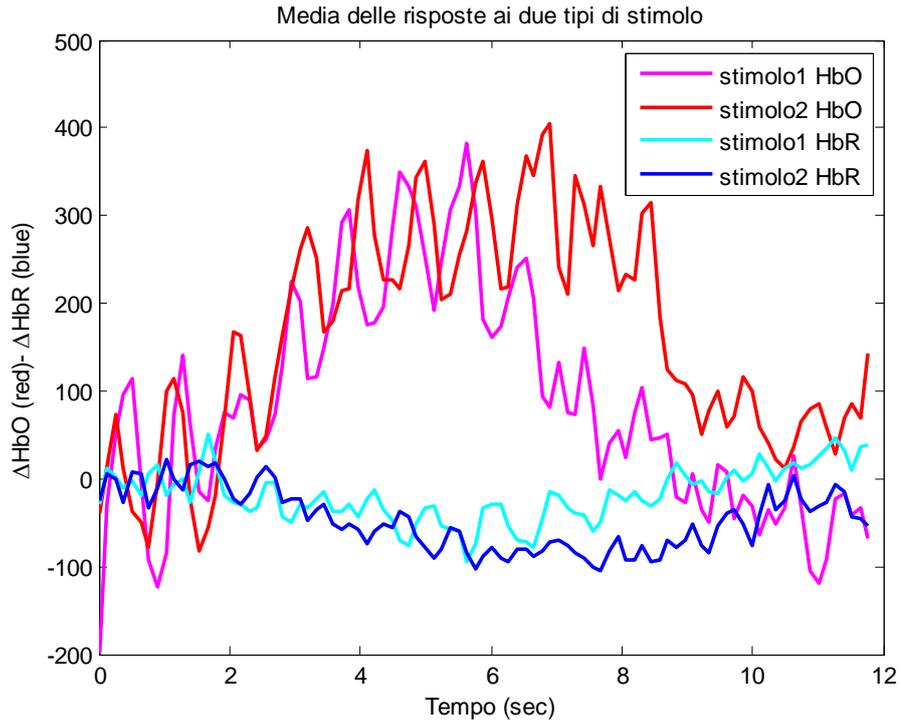
Il modello (4.3.1.2) utilizzato per descrivere la risposta emodinamica in termini di deossiemoglobina ha la stessa forma del (4.3.1.1) ma risulta pre-moltiplicato per il parametro ( $-c$ ):

$$h_{HbR}(t) = -c \cdot \left(\frac{t}{d}\right)^a \cdot e^{-\left(\frac{t-d}{b}\right)} \quad (4.3.1.2)$$

In questo secondo caso i parametri incogniti sono quattro ( $a$ ,  $b$ ,  $d$  e  $c$ ) e si utilizza ancora uno stimatore ai minimi quadrati non lineari pesati al fine di determinarne i valori nelle due condizioni di stimolo.

Ciascun modello è stato identificato su due segnali della durata di 12 secondi, ottenuti mediando tutti i trials (provenienti da tutti i canali) relativi al medesimo tipo di stimolo; la procedura è stata effettuata sia per emoglobina ossigenata, identificando il modello (4.3.1.1), che per emoglobina deossigenata, identificando il modello (4.3.1.2). I quattro segnali ottenuti in seguito all'operazione di averaging sono riportati di seguito (Fig. 4.3.1.a), per due diversi soggetti.

Questo approccio permette di ottenere una stima della risposta emodinamica avente ampiezza ridotta rispetto a quella reale, poiché in molti canali che vengono inclusi nella media la HRF non è presente, ma ha il vantaggio di riuscire a ridurre notevolmente il rumore fisiologico e di misura, per via dell'elevato numero di trials mediati (40 trials per ciascuno dei canali acquisiti, sia per HbO che per HbR).



**Figura 4.3.1.a** - Media di tutti i trials relativi alla medesima condizione di stimolo, sia per HbO che per HbR; soggetto 4 pannello superiore, soggetto 30 pannello inferiore.

### 4.3.2. Stima parametrica non lineare

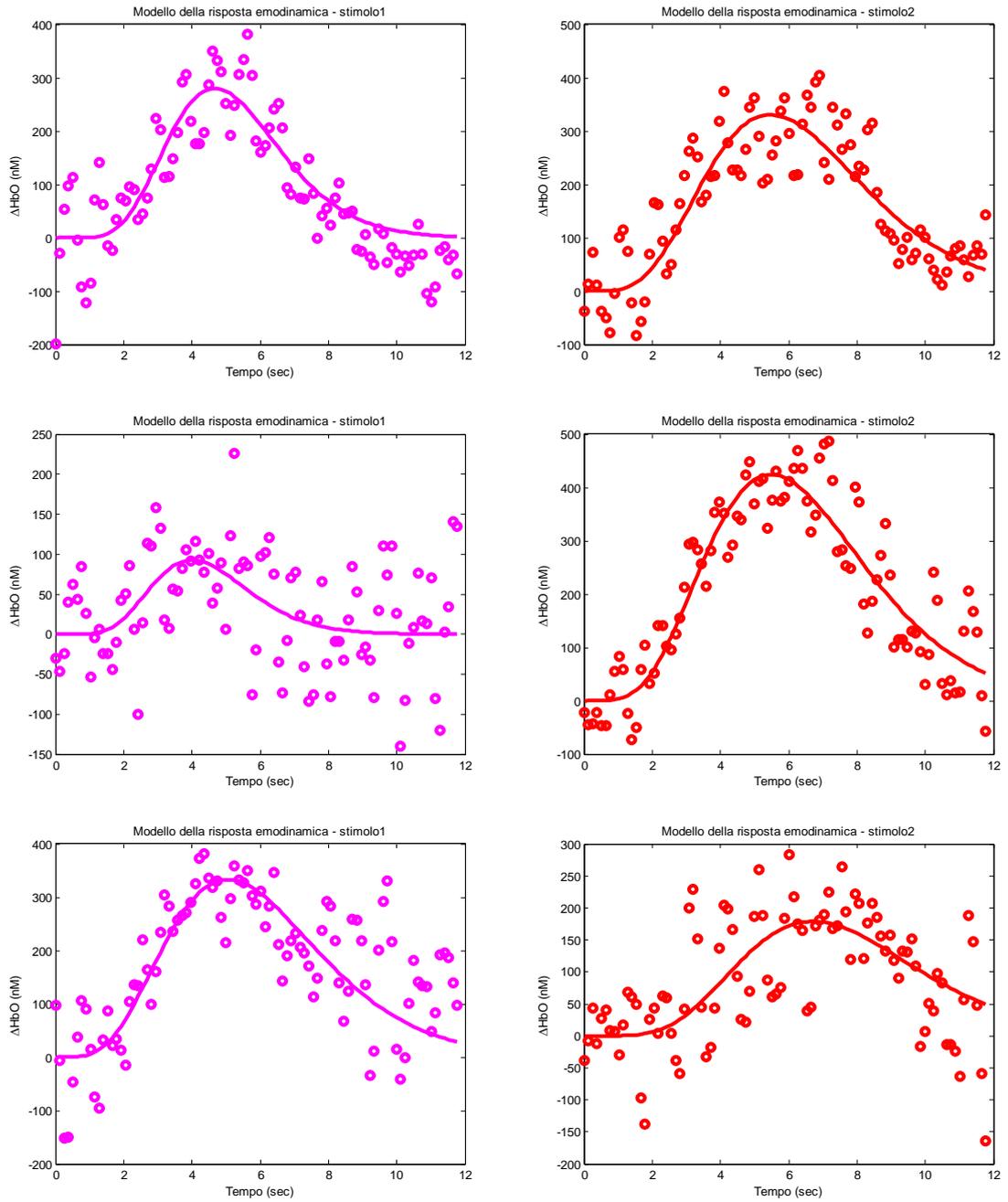
I modelli (4.3.1.1) e (4.3.1.2) utilizzati per descrivere la risposta emodinamica sono evidentemente non lineari nei parametri incogniti: si manifesta, dunque, la necessità di utilizzare uno stimatore non lineare al fine di identificare i modelli in entrambe le condizioni di stimolo. Qui è stato deciso di utilizzare la stima ai minimi quadrati non lineari pesati, implementata dalla function LSQNONLIN fornita da Matlab. Il passaggio più critico e delicato della procedura di stima parametrica è stato definire i valori iniziali dei parametri da fornire in ingresso alla function: la scelta di detti valori è stata fatta sulla base delle conoscenze sulla forma canonica della HRF, note dalla letteratura e dai precedenti studi svolti sul segnale tramite tecniche di fMRI. I valori iniziali utilizzati (Tab. 4.3.2.a) variano in funzione del fatto che si faccia riferimento ad emoglobina ossigenata o a deossiemoglobina; per quest'ultima, inoltre, i parametri da stimare sono quattro ( $a$ ,  $b$ ,  $d$  e  $c$ ), mentre per l'emoglobina ossigenata sono tre ( $a$ ,  $b$  e  $d$ ). Per ciascun parametro sono stati forniti dei range di variabilità (un limite inferiore ed un limite superiore), al fine di garantire un'ammissibilità fisiologica dei valori stimati (Tab. 4.3.2.a).

<b>Emoglobina ossigenata (HbO)</b>		
parametro	valore iniziale	inf_bound-sup_bund
$a$	7	1-8
$b$	0.6 sec	0.3-1 sec
$d$	4.2 sec	0.3-8 sec

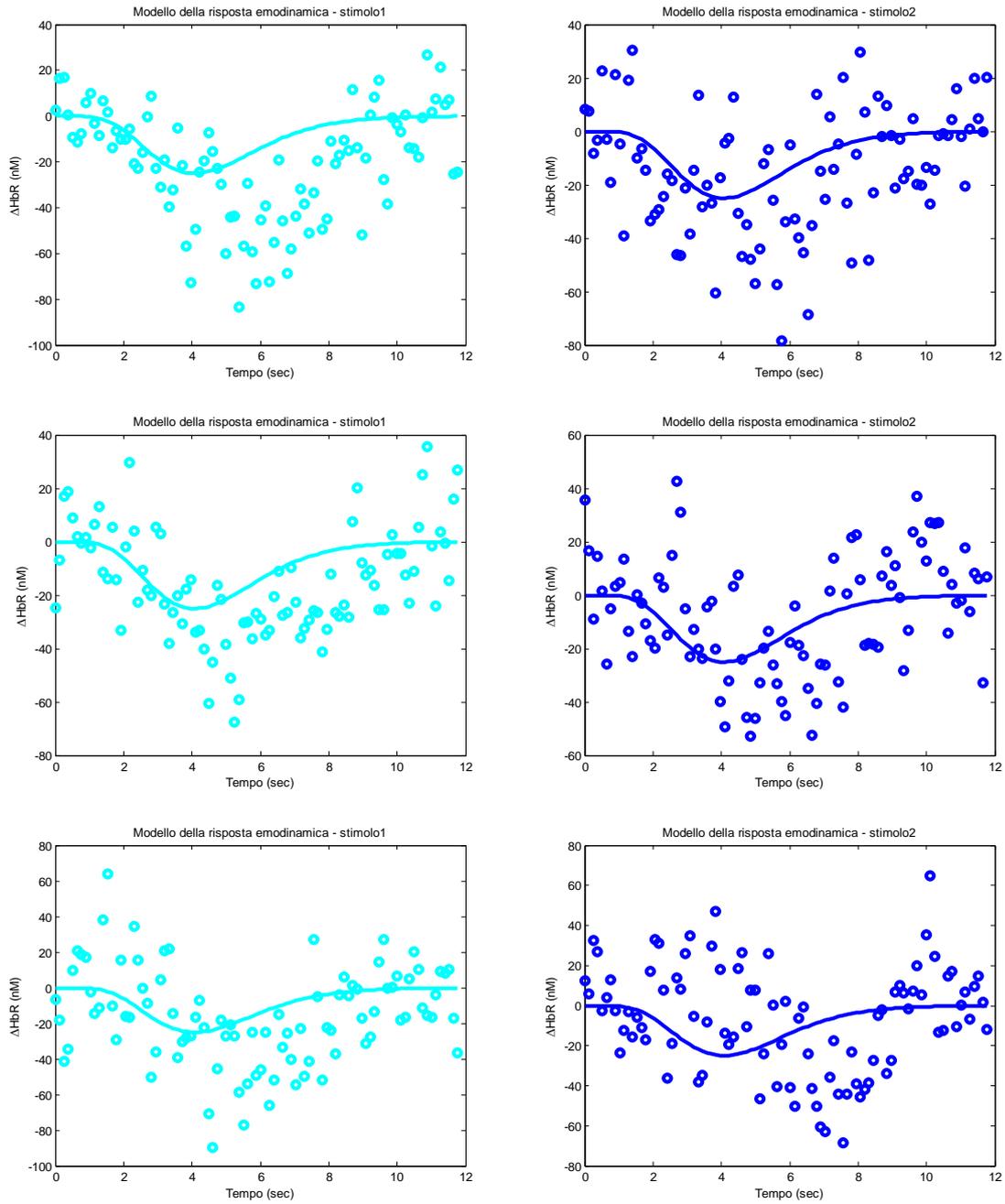
<b>Emoglobina deossigenata (HbR)</b>		
parametro	valore iniziale	inf_bound-sup_bund
$a$	7.5	6.8-8
$b$	0.75 sec	0.6-0.9 sec
$d$	5.625 sec	4.08-7.2 sec
$c$	-35	(-55)-(-25)

**Tabella 4.3.2.a** - Valori iniziali e bounds dei parametri forniti in ingresso alla function di Matlab LSQNONLIN, che implementa la stima ai minimi quadrati non lineari.

Nella procedura di stima parametrica sono stati, inoltre, inseriti dei pesi in base ai quali l'aderenza ai dati sperimentali è stata perseguita in maniera differente: in particolare modo, ai 15 campioni iniziali e finali (corrispondenti ai primi e agli ultimi 2 secondi del segnale) sono stati assegnati dei pesi estremamente bassi, al fine di evitare di fittare il rumore che affliggeva i campioni stessi in tratti in cui la HRF non era presente con ampiezza significativa. Di seguito viene riportata la risposta emodinamica stimata come appena descritto, sia per i dati di emoglobina ossigenata (Fig. 4.3.2.a) che per quelli di deossiemoglobina (Fig. 4.3.2.b), per entrambe le condizioni di stimolo. Le risposte emodinamiche stimate rappresentano un compromesso tra significatività fisiologica e bontà dei residui.



**Figura 4.3.2.a** - Risposta emodinamica stimata per HbO a partire dal modello (4.3.1.1) per ciascuna condizione di stimolo; soggetto 4 (pannelli superiori), soggetto 21 (pannelli centrali), soggetto 30 (pannelli inferiori).



**Figura 4.3.2.b** - Risposta emodinamica stimata per HbR a partire dal modello (4.3.1.2) per ciascuna condizione di stimolo; soggetto 6 (pannelli superiori), soggetto 12 (pannelli centrali), soggetto 17 (pannelli inferiori).

## 4.4. Step 3: General Linear Model (GLM)

In seguito all'identificazione dei modelli della risposta emodinamica (4.3.1.1) per HbO e (4.3.1.2) per HbR, in entrambe le condizioni di stimolo, le HRF stimate sono state utilizzate nell'implementazione del GLM. Il General Linear Model è un modello statistico che descrive i dati sperimentali come combinazione lineare di funzioni più un termine relativo al rumore (4.4.1); dette funzioni hanno forma nota ed ampiezza incognita da stimare:

$$Y = X \cdot \beta + \varepsilon \quad (4.4.1)$$

dove:

$Y$	dati acquisiti (Nx $n$ )
$X$	design matrix (Nx $M$ )
$\beta$	parametri da stimare ( $M$ x $n$ )
$\varepsilon$	rumore di misura (Nx $n$ ).

Le colonne della matrice  $Y$  sono costituite dai segnali (relativi ad HbO o ad HbR) acquisiti dagli  $n$  canali del soggetto considerato per tutta la durata dell'esperimento, e pre-filtrati come descritto nel paragrafo 4.2.

La matrice  $X$  contiene il modello che descrive la risposta emodinamica: le sue colonne sono ottenute come convoluzione del modello della HRF (4.3.1.1) o (4.3.1.2), adeguatamente identificato per ogni stimolo, e della sua derivata temporale con il segnale che descrive lo specifico disegno sperimentale utilizzato. In particolar modo, per ciascuno stimolo si definiscono due Basis Functions (BFs): la prima BF è il modello della HRF identificato per lo stimolo considerato (si fa riferimento al modello (4.3.1.1) per HbO e (4.3.1.2) per HbR) e la seconda BF è la derivata temporale di detto modello. Le due BFs vengono fatte convolvere con il segnale che descrive il disegno sperimentale relativo allo stimolo cui fanno riferimento le BFs stesse; detto segnale è rappresentato da un treno di impulsi, centrati in corrispondenza degli istanti di presentazione dello stimolo al soggetto. Nel caso in esame, essendo due gli stimoli utilizzati, si definisce una matrice  $X$  di dimensione Nx4, le cui colonne sono costruite come segue:

Emoglobina ossigenata (HbO)

1° colonna:  $h_{HbO}(t) * u_1(t)$

2° colonna:  $\frac{dh_{HbO}(t)}{dt} * u_1(t)$

3° colonna:  $h_{HbO}(t) * u_2(t)$

4° colonna:  $\frac{dh_{HbO}(t)}{dt} * u_2(t)$

Emoglobina deossigenata (HbR)

1° colonna:  $h_{HbR}(t) * u_1(t)$

2° colonna:  $\frac{dh_{HbR}(t)}{dt} * u_1(t)$

3° colonna:  $h_{HbR}(t) * u_2(t)$

4° colonna:  $\frac{dh_{HbR}(t)}{dt} * u_2(t)$

dove  $u_1(t)$  e  $u_2(t)$  sono i segnali che descrivono i disegni sperimentali relativi allo stimolo 1 ed allo stimolo 2 rispettivamente.

La matrice  $\beta$  è costituita, invece, dalle ampiezze incognite delle M funzioni contenute nelle colonne della matrice X, per ciascuno degli n canali di acquisizione considerati. L'analisi GLM determina per ciascun canale i valori delle ampiezze delle funzioni che, sommate, meglio descrivono i dati sperimentali; dette ampiezze vengono stimate tramite minimi quadrati lineari:

$$\beta_{est} = (X^T \cdot X)^{-1} \cdot X^T \cdot Y \quad (4.4.2)$$

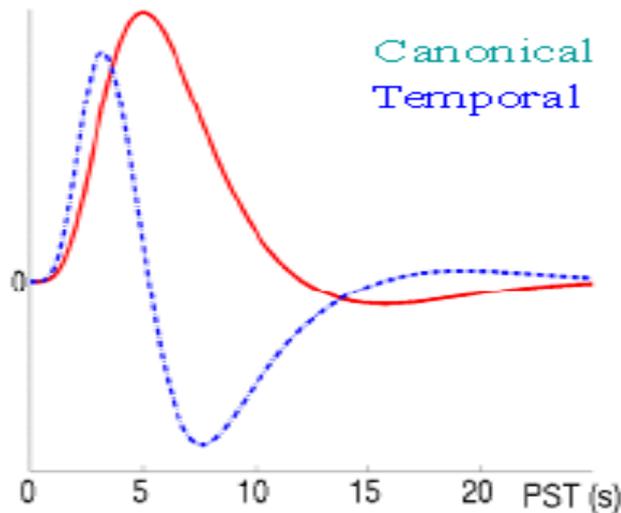
La stima della risposta emodinamica si ottiene poi come combinazione lineare delle BFs (modello della HRF (4.3.1.1) o (4.3.1.2) adeguatamente identificato, e sua derivata temporale) tramite le ampiezze  $\beta_{est}$  stimate dall'analisi GLM. Per il caso in esame, facendo riferimento al canale *i-esimo* le stime dell'HRF nelle due condizioni, per HbO, sono date da:

$$hrf_{est}^{(c1,HbO)}(t) = \beta_{est}(1, i) \cdot h_{HbO}(t) + \beta_{est}(2, i) \cdot \frac{dh_{HbO}(t)}{dt} \quad (4.4.3)$$

$$hrf_{est}^{(c2,HbO)}(t) = \beta_{est}(3, i) \cdot h_{HbO}(t) + \beta_{est}(4, i) \cdot \frac{dh_{HbO}(t)}{dt} \quad (4.4.4)$$

Le medesime stime si ottengono per HbR, sostituendo nelle (4.4.3) e (4.4.4) il modello (4.3.1.2) che descrive  $h_{HbR}(t)$  al modello (4.3.1.1) che descrive  $h_{HbO}(t)$ .

Nel presente algoritmo è stato deciso di utilizzare due BFs per ciascuna condizione di stimolo, il modello della HRF, (4.3.1.1) per HbO e (4.3.1.2) per HbR, adeguatamente identificato e la sua derivata temporale. In questo modo vengono stimate correttamente ampiezza e latenza di ciascuna HRF, e la derivata temporale permette inoltre di cogliere l'undershoot finale precedentemente non considerato; di seguito (Fig. 4.4.a) vengono riportati il modello canonico dell'HRF e la sua derivata temporale.



**Figura 4.4.a** - Modello canonico della HRF (rosso) e sua derivata temporale (blu). Sono le Basis Functions utilizzate nell'implementazione del General Linear Model; si noti come la forma della derivata temporale permetta di cogliere l'undershoot finale.

Il metodo presentato in questo lavoro prevede di stimare ad hoc le BFs da utilizzare nell'implementazione del GLM, al fine di perseguire la massima aderenza agli specifici dati sperimentali ma seguendo un approccio adattabile e quindi generalizzabile a qualunque esperimento. La necessità di stimare ad hoc le BFs si è palesata in seguito all'utilizzo di un particolare programma, noto come NIRS-SPM, che implementa proprio il GLM su dati fNIRS. Detto programma, che richiede in ingresso il segnale grezzo suddiviso per canale di acquisizione, permette all'utente di scegliere se utilizzare una, due o tre BFs nell'implementazione del GLM: in particolare, la prima BF corrisponde al modello della HRF, la seconda alla sua derivata temporale e la terza alla derivata rispetto alla dispersione. Il limite dell'approccio utilizzato dal NIRS-SPM consiste, però, nell'utilizzo di BFs standard, definite, cioè, indipendentemente dallo specifico data-set fornito, e proprio questo aspetto compromette notevolmente la bontà dei risultati ottenuti con l'utilizzo di detto programma; da qui la decisione di stimare ad hoc le BFs per ciascuna condizione di stimolo.

## 4.5. Criteri di valutazione dell'approccio utilizzato

Per confrontare i risultati dell'algoritmo appena presentato e valutarne l'efficacia, sono stati applicati ai dati simulati, nei quali quindi la reale risposta emodinamica era nota, altri metodi usati in letteratura. Sono stati scelti due metodi per il confronto, descritti di seguito ed indicati con Metodo 1 e Metodo 2.

Il primo metodo di confronto utilizzato (Metodo 1) consiste in un filtro Butterworth del quarto ordine, avente frequenze di taglio inferiore e superiore rispettivamente pari a 0.01 e 0.3 Hz, che permette, cioè, di selezionare la sola banda di frequenze corrispondente a quella della HRF. Dopo aver applicato tale filtro in frequenza, la stima della HRF è ottenuta mediando tutti i trials (della durata di 12 secondi) registrati dopo la presentazione al soggetto degli stimoli corrispondenti alla medesima condizione.

La stima della HRF tramite il Metodo 2 è stata ottenuta applicando innanzitutto al segnale un filtro passa-banda (Butterworth del quarto ordine, con frequenze di taglio inferiore e superiore rispettivamente pari a 0.01 e 3 Hz) in modo da eliminare le frequenze che sicuramente appartengono al rumore. Successivamente, sono stati mediati tutti i trials (della durata di 12 secondi) registrati dopo la presentazione al soggetto degli stimoli corrispondenti alla medesima condizione. Alla stima così ottenuta per ogni canale di acquisizione viene applicato un filtro Savitzky-Golay del terzo ordine, con una finestra temporale di 3 secondi, al fine di ridurre l'elevata quantità di rumore ancora presente nella HRF.

## 5. Risultati

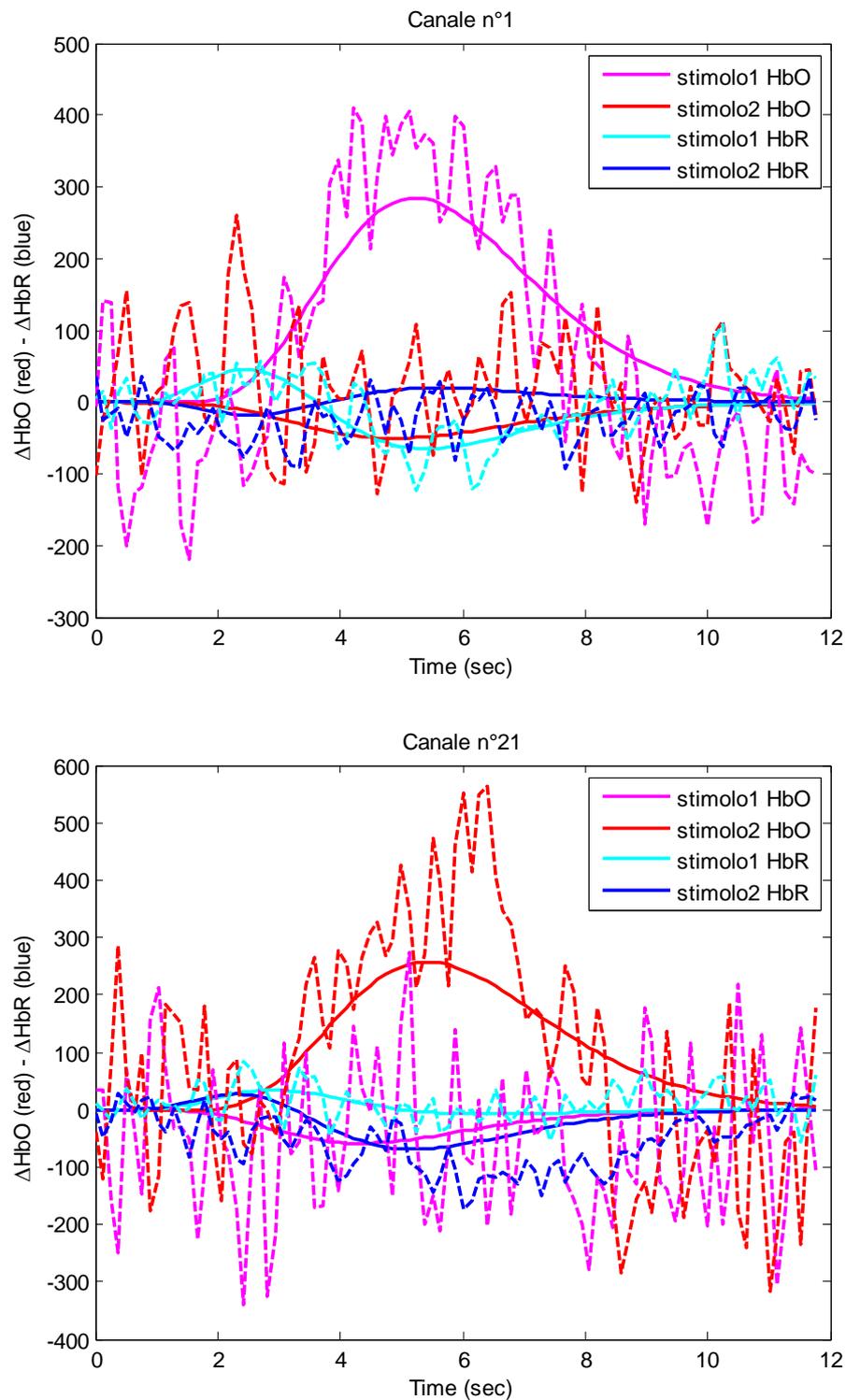
### 5.1. Dati simulati

Il metodo proposto, il Metodo 1 ed il Metodo 2 sono stati testati su 30 soggetti simulati, generati come descritto nel paragrafo 3.2., in accordo con il protocollo di acquisizione dei dati reali (80 trials, 40 per lo stimolo 1 e 40 per lo stimolo 2).

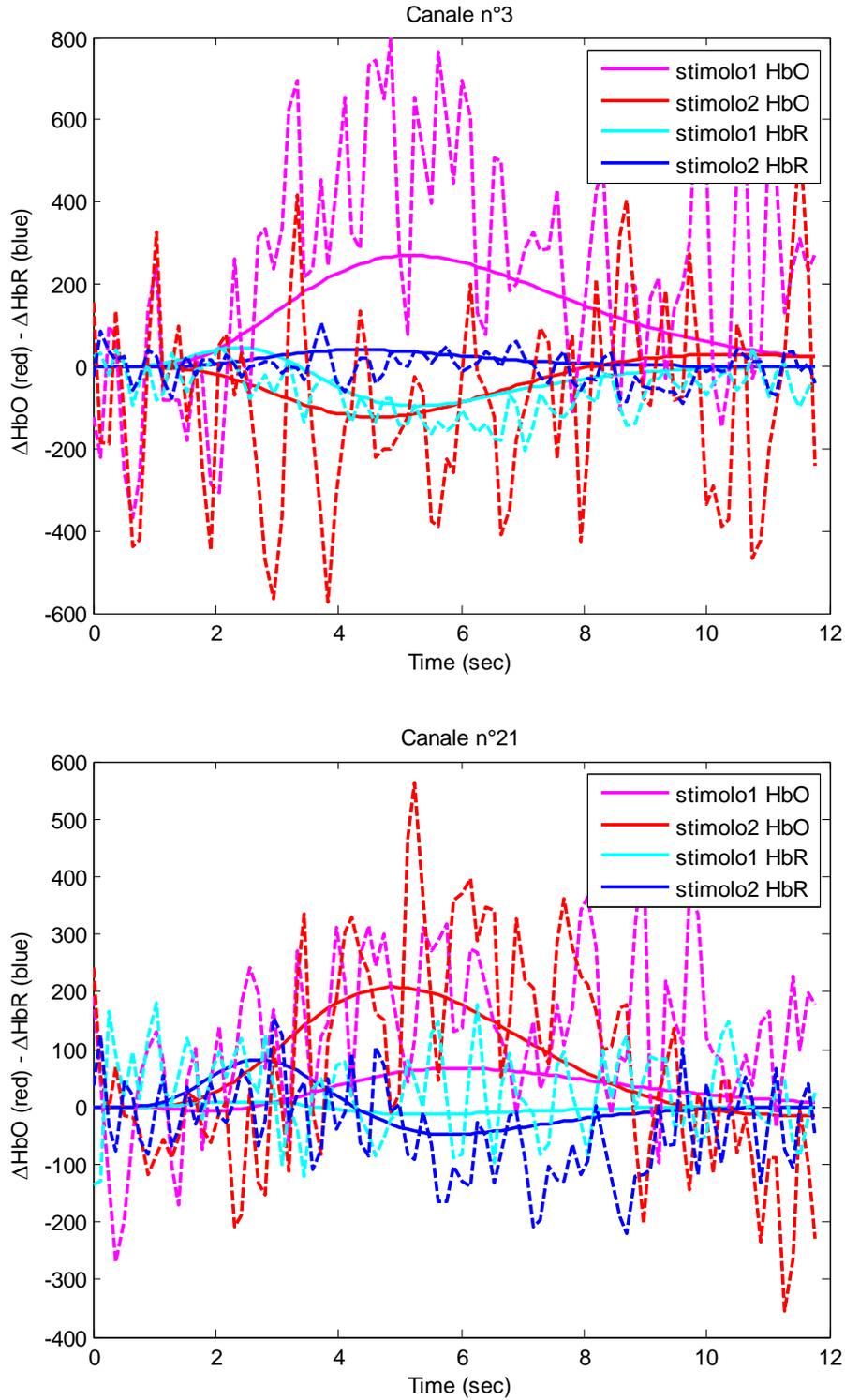
I risultati ottenuti con il metodo proposto sui dati simulati sono riportati di seguito (Figg. 5.1.a-b): in ciascun pannello vi sono le stime dell'HRF per entrambe le condizioni di stimolo, sia per HbO che per HbR; si riportano i risultati relativi a due canali di acquisizione differenti, uno appartenente all'emisfero destro ed uno appartenente all'emisfero sinistro, per due diversi soggetti. I pannelli superiori di entrambe le immagini sono relativi a canali dell'emisfero sinistro: in questo caso ci si aspetta attivazione cerebrale esclusivamente in risposta allo stimolo 1, che prevede il movimento del dito della mano destra, e le immagini riportate, come si può vedere, confermano quanto appena affermato. In entrambi i pannelli superiori è, infatti, immediato cogliere il picco della curva rosa, che rappresenta la stima della risposta emodinamica in termini di HbO per la prima condizione di stimolo, e l'assenza di un picco significativo per la curva rossa, che fornisce, invece, la stima dell'HRF in termini di HbO per lo stimolo di tipo 2. Il medesimo tipo di approccio può essere utilizzato anche per l'analisi delle curve riportate nei pannelli inferiori delle due immagini, che rappresentano canali appartenenti all'emisfero destro: in questo caso ci si attende attivazione unicamente in risposta allo stimolo di tipo 2 e, di nuovo, le rappresentazioni grafiche riportate confermano le ipotesi fatte. Si hanno, infatti, picchi significativi delle curve rosse e assenza di picchi per le curve rosa. Gli andamenti ottenuti per le stime della risposta emodinamica in termini di HbO in entrambe le condizioni di stimolo risultano, dunque, coerenti con le ipotesi neurofisiologiche formulate precedentemente.

Anche in termini di HbR si ottengono risultati conformi alle ipotesi fatte; la curva ciano, relativa alla deossiemoglobina per lo stimolo di tipo 1, presenta infatti un picco negativo nei grafici riportati nei pannelli superiori (attivazione nell'emisfero sinistro in seguito alla prima condizione di stimolo) e la curva blu, relativa anch'essa ad HbR ma per

lo stimolo 2, evidenzia detto picco nei grafici dei pannelli inferiori (attivazione nell'emisfero destro in seguito alla seconda condizione di stimolo), come atteso.

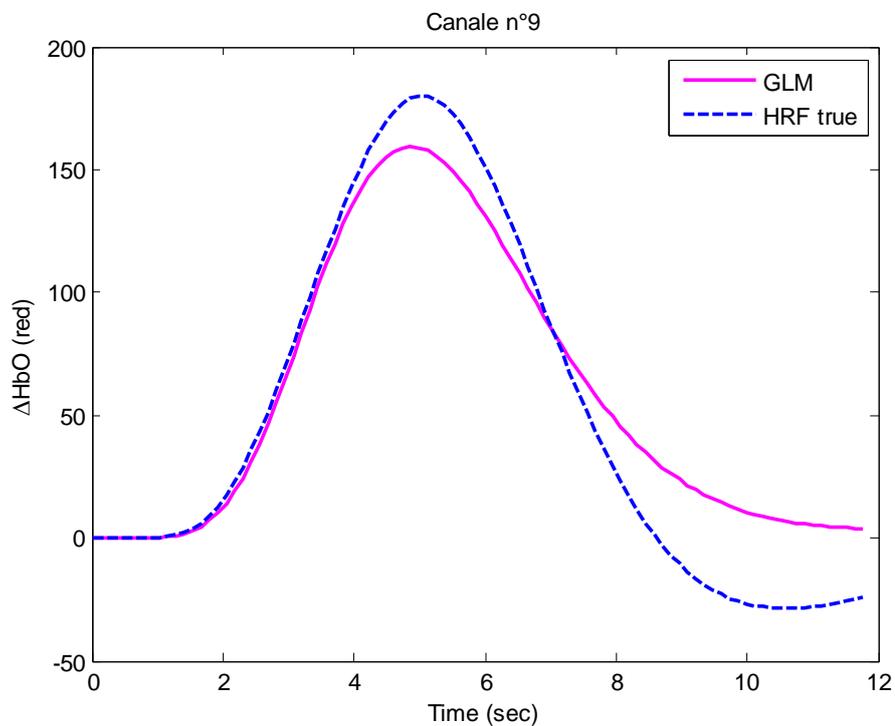


**Figura 5.1.a** - Stima finale della risposta emodinamica ottenuta con l'algorithm basato sul GLM, per entrambe le condizioni di stimolo, sia per HbO che per HbR; soggetto 5, canali A1 e B1.

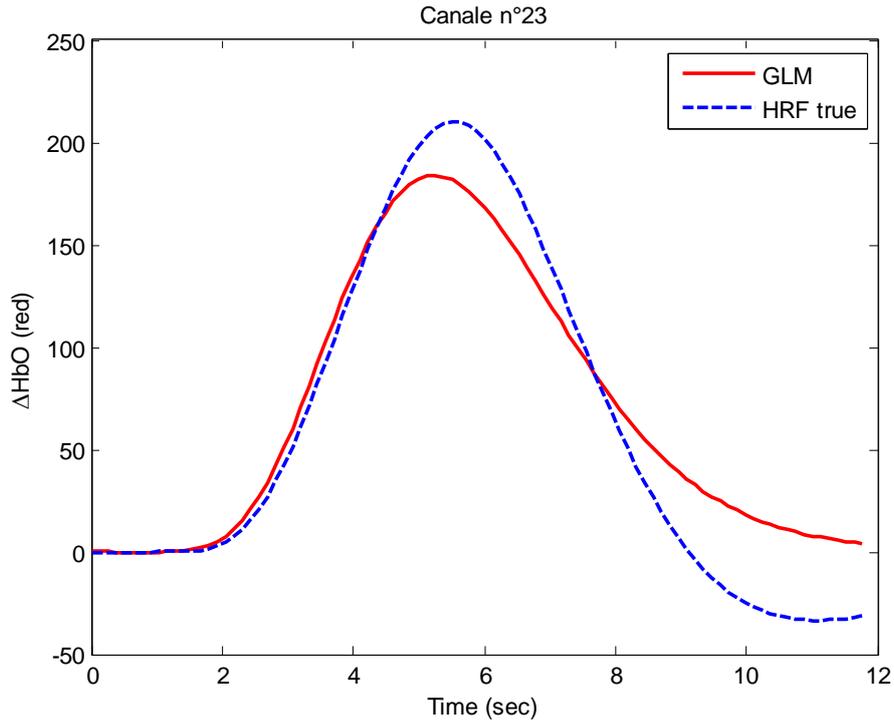


**Figura 5.1.b** - Stima finale della risposta emodinamica ottenuta con l'algoritmo basato sul GLM, per entrambe le condizioni di stimolo, sia per HbO che per HbR; soggetto 30, canali A2 e B1.

I risultati ottenuti sui dati simulati sono quindi coerenti con le ipotesi neurofisiologiche formulate. Si confrontino, inoltre, il profilo noto dell'HRF con quello stimato tramite il nuovo metodo, in riferimento ad HbO (Figg. 5.1.c-d): la prima immagine (Fig. 5.1.c) è relativa ad un canale dell'emisfero sinistro e viene dunque riportata l'HRF stimata per la prima condizione di stimolo; la seconda immagine (Fig. 5.1.d) è invece relativa ad un canale dell'emisfero destro e riporta l'HRF relativa alla seconda condizione di stimolo. Osservando gli andamenti del segnale vero e del segnale stimato in entrambi gli emisferi si può affermare che l'approccio basato sul GLM porta ad una stima molto buona dell'HRF.



**Fig. 5.1.c** - HRF vera (blu) e HRF stimata tramite il metodo basato sul GLM (magenta), per HbO nella prima condizione di stimolo; soggetto 5, canale A5.



**Fig. 5.1.d** - HRF vera (blu) e HRF stimata tramite il metodo basato sul GLM (rosso), per HbO nella seconda condizione di stimolo; soggetto 5, canale B2.

Al fine di fornire una misura oggettiva della bontà delle stime ottenute, è stato inoltre definito l'errore di stima [40]:

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

dove:

$\bar{u}$  stima della risposta emodinamica media

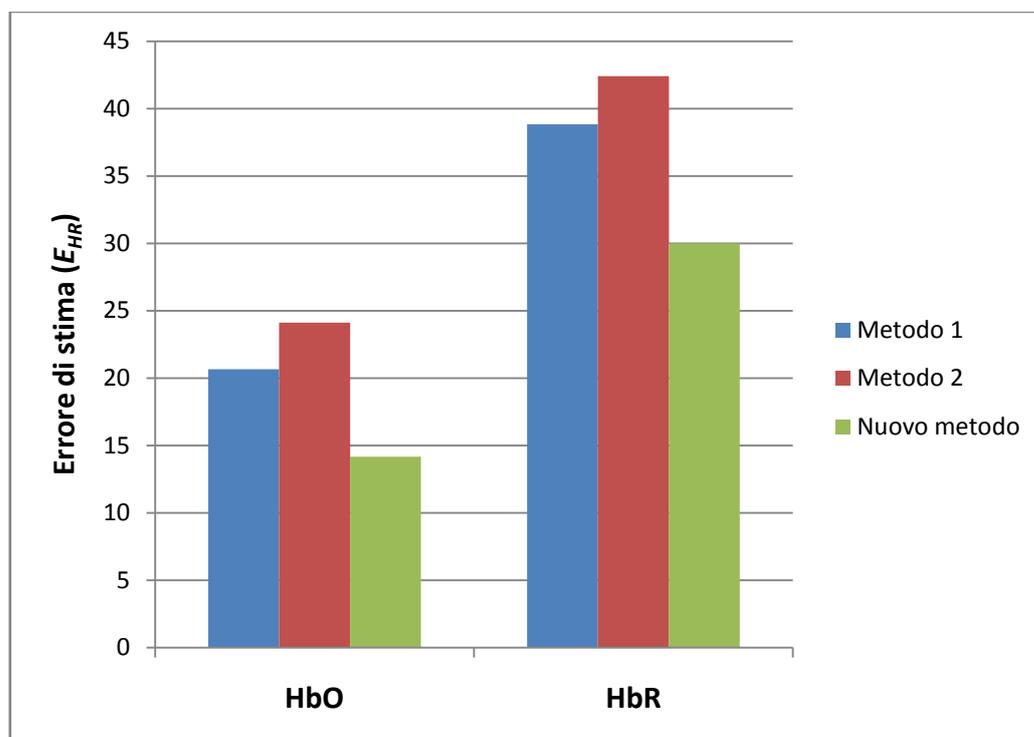
$u_{true}$  risposta emodinamica nota (3.2.3)

Il valore di  $E_{HR}$  fornisce una sorta di errore di stima percentuale ed è stato calcolato sia per l'algoritmo proposto nel presente lavoro, sia per i due metodi di confronto (Metodo 1 e Metodo 2). Detto errore è stato valutato per tutti e 30 i soggetti simulati (sia per emoglobina ossigenata che per deossiemoglobina), in corrispondenza di entrambe le condizioni di stimolo, indicate con "c1" e "c2". Di seguito (Tab. 5.1.a e Grafico 5.1.a) sono riportati i valori medi di  $E_{HR}$  ottenuti per i tre metodi, in riferimento all'intera durata del trial, e le rispettive deviazioni standard.

In tabella 5.1.a sono riportati anche gli errori percentuali di stima dell'ampiezza ( $E_A$ ) e della latenza ( $E_L$ ) del picco dell'HRF, parametri caratteristici che permettono di valutare la bontà della stima ottenuta.

	Metodo 1				Metodo 2				Nuovo metodo			
	HbO		HbR		HbO		HbR		HbO		HbR	
	c1	c2	c1	c2	c1	c2	c1	c2	c1	c2	c1	c2
$E_{HR}$												
<b>Mean</b>	21.2	20.1	40.7	28.9	24.4	23.8	50.3	34.6	12.9	15.5	23.6	36.5
<b>(Sd)</b>	(15.2)	(20.4)	(38.9)	(34.6)	(18.5)	(23.4)	(45.9)	(41.6)	(6.93)	(9.99)	(13.5)	(10.9)
$E_A(\%)$												
<b>Mean</b>	20.1	19.0	26.9	24.4	22.8	21.9	29.9	26.5	22.6	26.5	21.9	33.2
<b>(Sd)</b>	(14.5)	(16.2)	(19.3)	(19.0)	(15.9)	(17.6)	(21.4)	(20.9)	(15.0)	(17.6)	(12.8)	(14.9)
$E_L(\%)$												
<b>Mean</b>	5.29	5.81	5.39	2.61	6.33	6.92	6.53	4.08	5.80	4.97	11.8	15.4
<b>(Sd)</b>	(4.78)	(4.71)	(4.46)	(2.72)	(5.37)	(5.11)	(5.29)	(5.20)	(4.80)	(4.17)	(3.41)	(2.87)

**Tabella 5.1.a** - Media e standard deviation dell'errore di stima  $E_{HR}$ , dell'errore percentuale di stima dell'ampiezza del picco  $E_A$  e dell'errore percentuale di stima della latenza del picco  $E_L$ , valutati per tre diversi metodi di stima della risposta emodinamica da dati fNIRS (Metodo 1, Metodo 2 e Nuovo metodo); vengono riportati i valori relativi ad entrambe le condizioni di stimolo (c1 e c2), sia per HbO che per HbR.



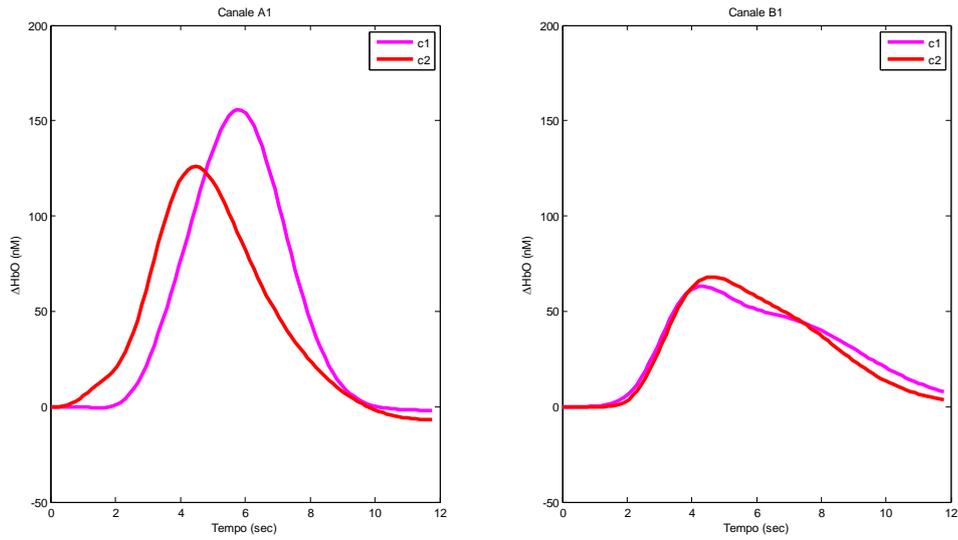
**Grafico 5.1.a** - Istogramma dei valori medi dell'errore di stima  $E_{HR}$  ottenuti con i tre metodi utilizzati.

Come si può notare dai valori riportati in tabella 5.1.a e dalla rappresentazione grafica, l'errore di stima della HRF assume valori notevolmente inferiori con il GLM rispetto alle altre tecniche testate, relativamente sia ai valori medi sia alle deviazioni standard. In particolare, è stato condotto un t-test e l'errore di stima relativo al metodo basato sul GLM è risultato significativamente inferiore ( $p < 0.01$ ) rispetto agli errori di stima che caratterizzano i due metodi utilizzati per il confronto. Si noti, peraltro, che tutti i metodi utilizzati presentano errori di stima estremamente più elevati in corrispondenza dei dati di emoglobina deossigenata, essendo questi ultimi tipicamente più rumorosi; appare, quindi, più affidabile, per una corretta interpretazione fisiologica dei risultati, la stima in termini di HbO. Il minor errore di stima si ottiene, come detto, proprio con il GLM, per HbO, nella prima condizione di stimolo ( $12.91 \pm 6.931$ ), e fornisce un decremento percentuale del 39.19% rispetto al Metodo 1 e del 47.11% rispetto al Metodo 2. Inoltre, nel caso del GLM, per entrambe le condizioni di stimolo e sia per ossi- che per deossi-emoglobina, la standard deviation dell'errore di stima assume valori enormemente più bassi di quelli ottenuti con l'utilizzo degli altri metodi: questo aspetto assume notevole rilevanza in quanto rispecchia una minor variabilità delle stime ottenibili, ovvero una maggior precisione dei risultati. In media, per l'emoglobina ossigenata, la standard deviation risulta inferiore del 52.72% rispetto al filtraggio passa-banda e del 59.85% rispetto alla media convenzionale; per la deossi-emoglobina, le percentuali sono, invece, rispettivamente pari a 66.91% e 72.21%.

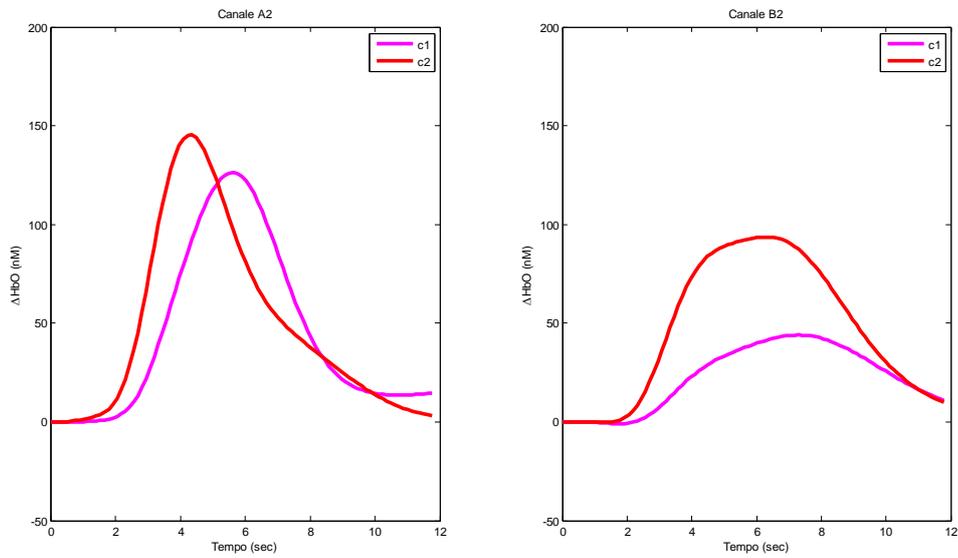
Facendo riferimento agli errori percentuali di stima dell'ampiezza e della latenza del picco dell'HRF, le differenze evidenziate tra i tre metodi utilizzati per la stima non risultano significative sulla base del t-test condotto.

## 5.2. Dati reali

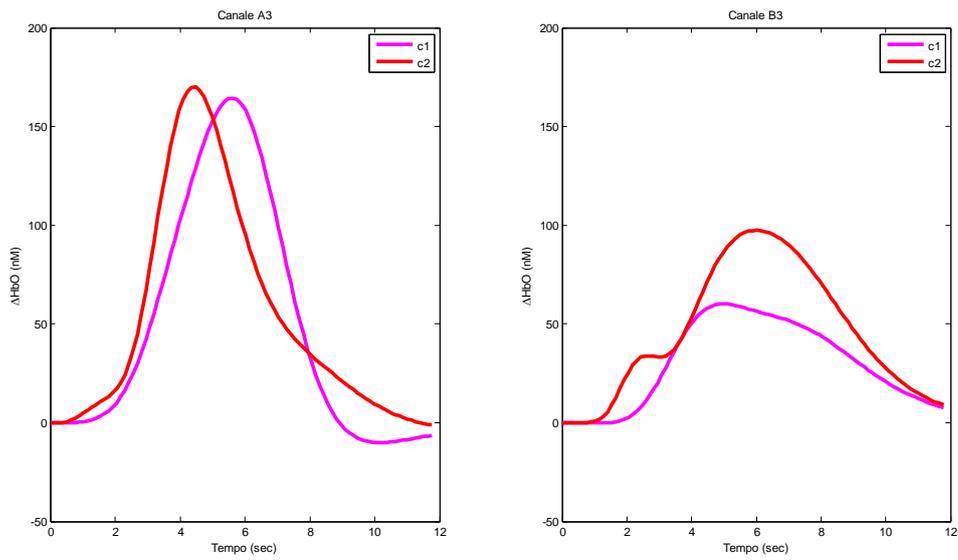
L'algoritmo sviluppato nel presente lavoro è stato testato anche su dati reali, acquisiti come descritto nel Capitolo 3. Quelli riportati in questa tesi sono risultati preliminari, che saranno integrati da successive ed esaustive analisi. Vengono riportati, di seguito, i grafici che rappresentano le risposte emodinamiche stimate con il metodo basato sul GLM da tutti i canali acquisiti, sia in termini di HbO (Figg. 5.2.a-b-c-d-e) che in termini di HbR (Fig. 5.2.f), facendo riferimento ad entrambe le condizioni di stimolo. In corrispondenza di ciascun pannello è riportato il canale di acquisizione ad esso corrispondente; come descritto nel paragrafo 3.1.3., i canali A1-A2-A3-A4-A5 appartengono all'emisfero sinistro, e ci si aspetta, dunque, che evidenzino un'elevata attivazione in corrispondenza della condizione 1 (freccia a destra, e quindi movimento della mano destra). I canali B1-B2-B3-B4-B5 appartengono, invece, all'emisfero destro, ed è quindi attesa in essi un'attivazione maggiore per la condizione 2, corrispondente al movimento della mano sinistra. L'HRF relativa allo stimolo 1 è rappresentata in magenta per HbO e in ciano per HbR; quella relativa allo stimolo 2 è rappresentata in rosso per HbO e in blu per HbR. Le curve riportate sono state ottenute mediando le HRF stimate per i 10 soggetti acquisiti (vedi paragrafo 3.1.1.) e rappresentano ciascuna coppia di canali simmetrici (A1-B1, A2-B2, A3-B3, A4-B4, A5-B5), canali cioè relativi alla medesima posizione ma nei due emisferi opposti.



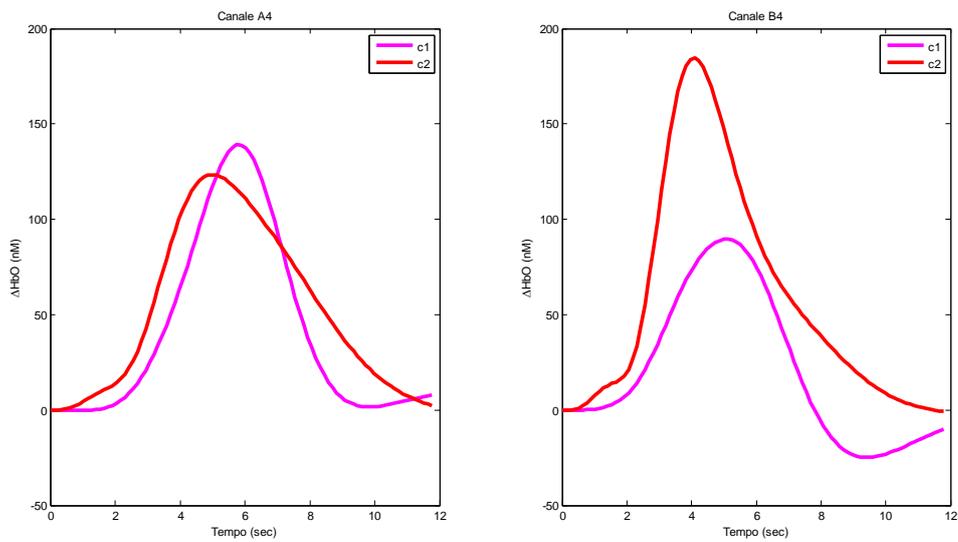
**Figura 5.2.a** - Stima della risposta emodinamica per HbO ottenuta con il GLM da dati reali, in entrambe le condizioni di stimolo; canali di acquisizione A1-B1.



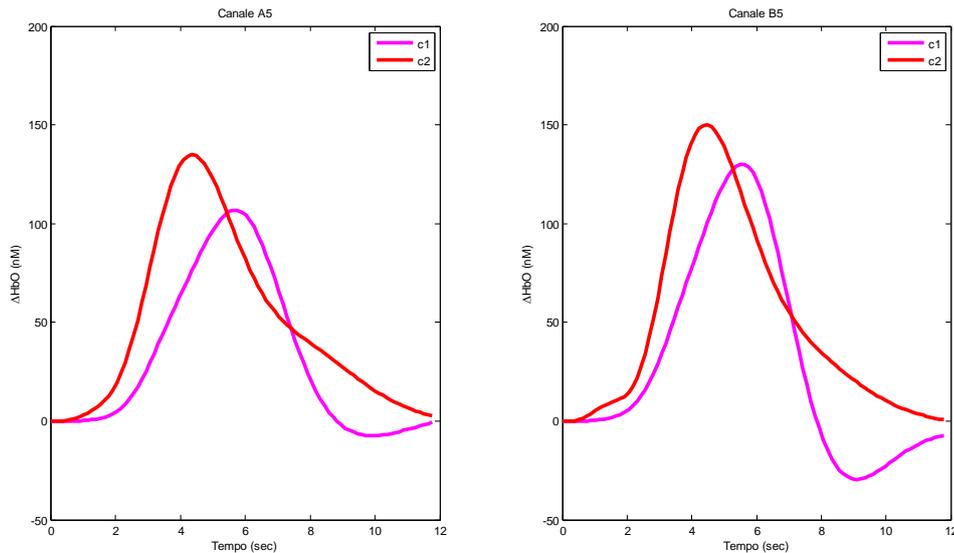
**Figura 5.2.b** - Stima della risposta emodinamica per HbO ottenuta con il GLM da dati reali, in entrambe le condizioni di stimolo; canali di acquisizione A2-B2.



**Figura 5.2.c** - Stima della risposta emodinamica per HbO ottenuta con il GLM da dati reali, in entrambe le condizioni di stimolo; canali di acquisizione A3-B3.



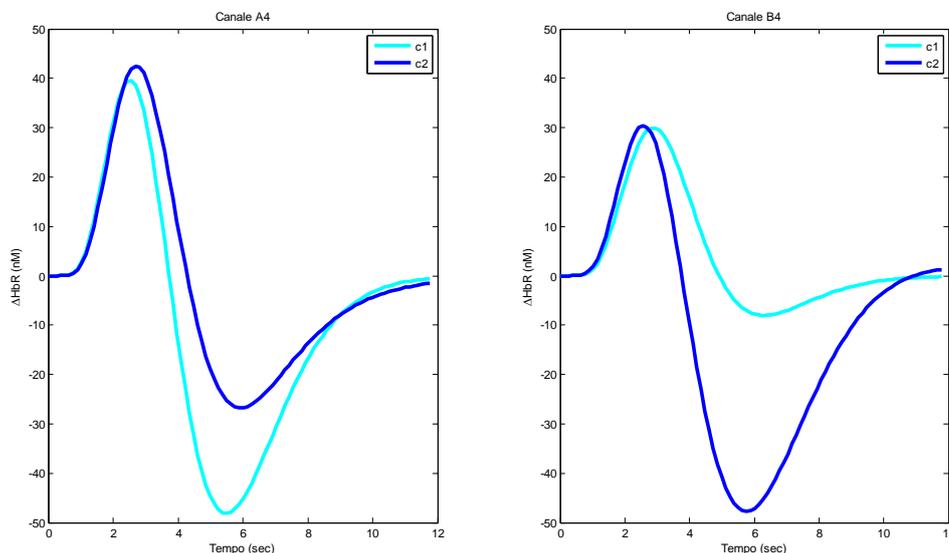
**Figura 5.2.d** - Stima della risposta emodinamica per HbO ottenuta con il GLM da dati reali, in entrambe le condizioni di stimolo; canali di acquisizione A4-B4.



**Figura 5.2.e** - Stima della risposta emodinamica per HbO ottenuta con il GLM da dati reali, in entrambe le condizioni di stimolo; canali di acquisizione A5-B5.

L'analisi dei risultati ottenuti, di seguito esposta, è stata per ora condotta considerando la sola ampiezza del picco. Facendo riferimento a tutti i canali di acquisizione, si osserva innanzitutto che l'attivazione evocata da entrambe le condizioni di stimolo non si manifesta solamente nell'emisfero controlaterale allo stimolo stesso (come nella situazione ideale ottenuta dai dati simulati), ma anche nell'emisfero ipsilaterale. Ci si attende, tuttavia, che l'attivazione nell'emisfero controlaterale risulti maggiore di quella rilevata nell'emisfero ipsilaterale (effetto di lateralizzazione) [36], e detta ipotesi viene confermata dai risultati ottenuti. Come si può facilmente osservare dai grafici riportati (Figg. 5.2.a-b-c-d-e), infatti, l'effetto di lateralizzazione trova riscontro per i canali A1-B1, A2-B2, A3-B3, A4-B4 in riferimento alla prima condizione di stimolo (l'HRF evocata nell'emisfero sinistro ha ampiezza maggiore di quella evocata nell'emisfero destro) e per i canali A4-B4, A5-B5 se si considera lo stimolo 2 (l'HRF evocata nell'emisfero destro ha ampiezza maggiore di quella evocata nell'emisfero sinistro). La significatività delle differenze di ampiezza evidenziate tra i due emisferi è stata valutata facendo ricorso ad un t-test; esclusivamente per la seconda condizione di stimolo e in riferimento alla coppia di canali A4-B4, si trova una differenza significativa ( $p < 0.05$ ) tra l'attivazione nell'emisfero controlaterale (destro) e l'attivazione nell'emisfero ipsilaterale (sinistro). Ci si attende, inoltre, che il movimento della mano sinistra evochi una risposta emodinamica maggiore di quella conseguente al movimento

della mano destra, in quanto i soggetti che sono stati sottoposti all'esperienza sono tutti destrorsi, e dunque per loro il movimento della mano sinistra risulta più complesso rispetto al movimento della mano destra [37]. Anche questa seconda ipotesi trova riscontro nei risultati ottenuti dai dati reali; nei canali A4-B4 e A5-B5, infatti, l'HRF evocata dallo stimolo 2 nell'emisfero destro risulta maggiore di quella evocata dallo stimolo 1 nell'emisfero sinistro. Tuttavia, l'unica differenza significativa ( $p < 0.05$ ) tra le ampiezze delle risposte emodinamiche stimate si trova, ancora, in corrispondenza della coppia di canali A4-B4. Questi risultati vengono confermati anche dall'analisi svolta in termini di deossiemoglobina; di seguito (Fig. 5.2.f) se ne riporta un esempio, relativo alla coppia simmetrica di canali di acquisizione A4-B4.



**Figura 5.2.f** - Stima della risposta emodinamica per HbR ottenuta con il GLM da dati reali, in entrambe le condizioni di stimolo; canali di acquisizione A4-B4.

Le stime dell'HRF ottenute per l'emoglobina deossigenata evidenziano l'effetto di lateralizzazione. La risposta emodinamica evocata dalla prima condizione di stimolo in tutti i canali dell'emisfero sinistro (controlaterale allo stimolo) è, infatti, maggiore (trattandosi di HbR si intende l'ampiezza negativa del picco) rispetto a quella evocata nei canali dell'emisfero destro (ipsilaterale allo stimolo). La condizione 2 induce, parallelamente, una risposta emodinamica in tutti i canali appartenenti all'emisfero destro, per il quale la condizione 2 risulta controlaterale, maggiore rispetto a quella evocata nell'emisfero sinistro. Anche per HbR si trova una differenza significativa tra le due

condizioni ( $p < 0,05$ ) solo per i canali A4-B4 e relativamente alla prima condizione di stimolo (Fig. 5.2.f); detti canali corrispondono, quindi, alle aree maggiormente coinvolte nel compito di “finger tapping”.

Si noti, peraltro, osservando i due grafici relativi all'emoglobina deossigenata (Fig. 5.2.f), come in entrambe le condizioni di stimolo si abbia un picco iniziale delle curve; questo aspetto, evidenziato anche da Jaszewski et al. in [20], facendo riferimento a soggetti sottoposti a stimoli di natura sia visiva che motoria, evidenzia che il decremento di concentrazione di deossiemoglobina risulta ritardato rispetto all'incremento nella concentrazione di emoglobina ossigenata; tipicamente, infatti, nei primi secondi dopo la presentazione dello stimolo al soggetto, si ha un simultaneo incremento di concentrazione di HbO ed HbR, in seguito al quale, come avviene anche in questo caso, la concentrazione di HbR diminuisce.

Si sottolinea nuovamente che quelli presentati sono risultati preliminari: sono, infatti, necessarie più approfondite analisi sui dati reali, ad esempio eseguite valutando altri parametri oltre all'ampiezza del picco. Tuttavia, questi risultati preliminari costituiscono una buona base di partenza per sviluppi futuri del metodo proposto, in ambito fNIRS.



## 6. Conclusioni

### 6.1. Bilancio del lavoro svolto

La spettroscopia funzionale nel vicino infrarosso (fNIRS) è una recente tecnica di neuroimaging che permette di monitorare l'ossigenazione cerebrale in modo completamente non invasivo. Detta tecnica prevede l'utilizzo della luce nel vicino infrarosso (avente lunghezza d'onda compresa tra 650 e 950 nm) e sfrutta il diverso comportamento di emoglobina ossigenata (HbO), deossiemoglobina (HbR) e tessuti biologici nei confronti di quest'ultima. In particolar modo, la luce nel vicino infrarosso risulta poco assorbita dai tessuti biologici, ma ben assorbita da HbO ed HbR, in funzione della specifica lunghezza d'onda, e questa caratteristica viene utilizzata dalla fNIRS al fine di determinare la concentrazione relativa di HbO ed HbR in diverse aree cerebrali, durante lo svolgimento di compiti specifici. In risposta ad uno stimolo di qualsiasi genere, infatti, le cellule neuronali coinvolte nell'elaborazione si attivano ed incrementano il proprio consumo di ossigeno (al fine di aumentare la produzione di ATP, fonte energetica dei processi cellulari); parallelamente si verifica un incremento del flusso sanguigno (CBF) a livello delle regioni coinvolte nell'attivazione, tramite reclutamento o dilatazione dei capillari e/o aumento della velocità del sangue. Il flusso aumenta, però, in modo sproporzionato rispetto al consumo di ossigeno: un incremento del CBF a valori molto superiori rispetto a quanto necessario a fornire l'ossigeno richiesto per il metabolismo neuronale comporta un aumento locale nella concentrazione di emoglobina ossigenata, ed una relativa diminuzione nella concentrazione di deossiemoglobina. La possibilità di misurare la variazione di concentrazione di HbO ed HbR durante lo svolgimento di un task specifico permette, quindi, di determinare le zone cerebrali sede dell'attivazione neuronale.

Il segnale fNIRS risulta costituito da diverse componenti; l'HRF è la variazione di concentrazione di ossiemoglobina (o emoglobina deossigenata) nel tempo, e rappresenta in questa sede il segnale di interesse. All'HRF si sovrappongono oscillazioni legate ad attività fisiologiche (battito cardiaco, respirazione), onda di Mayer, oscillazioni a bassissime frequenze, artefatti da movimento e rumore di misura, che costituiscono

componenti di disturbo. L'obiettivo di molteplici studi in questo settore è di riuscire ad estrarre la risposta emodinamica dal segnale grezzo.

Il metodo proposto in questo lavoro per la stima della risposta emodinamica da segnali fNIRS si basa sull'utilizzo del General Linear Model (GLM), modello statistico che descrive i dati sperimentali come combinazione lineare di funzioni più un termine relativo al rumore. Dette funzioni hanno forma nota, ottenuta dalla convoluzione tra il segnale che descrive lo specifico disegno sperimentale utilizzato e le BFs, ed ampiezza incognita; l'analisi GLM determina i valori delle ampiezze delle funzioni che meglio descrivono i dati, utilizzando lo stimatore ai minimi quadrati lineari. Nel presente lavoro è stato deciso di stimare anche le BFs da utilizzare nell'implementazione del GLM, sviluppando un metodo applicabile indipendentemente dalla specifica natura del compito utilizzato (motorio, visivo, cognitivo, etc.). In particolar modo, sono stati mediati tra loro tutti i trials (della durata di 12 secondi) acquisiti in seguito alla presentazione del medesimo tipo di stimolo al soggetto e sui segnali ottenuti (due nel caso in esame, in quanto il disegno sperimentale prevedeva l'alternarsi di due diverse condizioni di stimolo) è stato identificato un modello della risposta emodinamica, che la descrive tramite una funzione gamma, e ne sono stati stimati i parametri caratteristici. Il fatto di utilizzare un modello ad un'unica funzione gamma per descrivere la forma canonica della HRF consente di cogliere il picco della forma d'onda, ma non il caratteristico undershoot finale. Il modello della HRF adeguatamente identificato per entrambe le condizioni di stimolo è stato utilizzato come BF nell'implementazione del GLM; la seconda BF utilizzata è la derivata temporale del modello della HRF, che permette di cogliere l'undershoot finale, precedentemente non considerato. La medesima procedura è stata svolta sia per HbO che per HbR. In seguito all'applicazione del GLM sono stati nuovamente mediati tra loro tutti i trials relativi alla medesima condizione di stimolo, e sono state ottenute così le stime finali della risposta emodinamica (sia per HbO che per HbR).

L'algoritmo descritto è stato testato sia su dati simulati, nei quali la reale risposta emodinamica è nota, sia su dati reali. I dati reali sono stati acquisiti durante lo svolgimento di esperimenti di "finger tapping", nei quali i soggetti erano tenuti a premere il tasto "L" della tastiera del computer utilizzando l'indice della mano destra, nel caso in cui sullo schermo del computer comparisse una freccia diretta verso destra, e il tasto "A" con l'indice della mano sinistra, nel caso in cui sullo schermo comparisse una freccia diretta verso sinistra. Le ipotesi neurofisiologiche sotto esame, note dalla letteratura e da

precedenti studi su esperimenti di “finger tapping”, prevedono che il movimento di una mano evochi una risposta emodinamica di ampiezza maggiore nell’emisfero opposto al lato in cui avviene il movimento della mano stessa (controlaterale) rispetto a quella evocata nell’emisfero ipsilaterale al movimento (effetto di lateralizzazione). Inoltre, essendo i soggetti sottoposti agli esperimenti tutti destrorsi, ci si attende che l’attivazione indotta dal movimento della mano sinistra risulti maggiore rispetto a quella indotta dal movimento della mano destra, mano dominante. Per i soggetti destrorsi si ipotizza, infatti, che il movimento delle dita della mano sinistra risulti più impegnativo del movimento della mano destra. Dette ipotesi hanno trovato conferma sia nei risultati ottenuti nel caso ideale dei dati simulati, per i quali l’attivazione indotta dal movimento di una mano era addirittura assente nell’emisfero ipsilaterale al movimento stesso, sia nei risultati ottenuti dai dati reali. Nel caso dei dati simulati, inoltre, l’algoritmo basato sul GLM è stato posto a confronto con altre due tecniche utilizzate per la stima dell’HRF, indicati con Metodo 1 e Metodo 2. Per tutti e tre i metodi è stato, quindi, calcolato un errore di stima della risposta emodinamica, in entrambe le condizioni di stimolo, sia per HbO che per HbR: in tutti e quattro i casi (stimolo1, stimolo2, HbO, HbR) il metodo basato sul GLM ha evidenziato errore di stima minimo (sia in termini di media che di standard deviation); i risultati ottenuti con i dati simulati risultano, quindi, estremamente soddisfacenti. Per quanto riguarda i dati reali, i risultati ottenuti sono preliminari, ma costituiscono una buona base di partenza per sviluppi futuri del metodo proposto, in ambito fNIRS.

## 6.2. Sviluppi futuri

Gli sviluppi futuri del metodo proposto in questo lavoro di tesi riguardano accurate e specifiche analisi da condurre sui dati reali, che permettano di considerare nella formulazione dei risultati altri parametri caratteristici della risposta emodinamica, oltre all'ampiezza del picco. L'analisi condotta in questa sede ha, infatti, utilizzato solamente l'ampiezza del picco come parametro sul quale basare il confronto tra le risposte emodinamiche stimate nei diversi canali di acquisizione; ci si prospetta, invece, la possibilità di utilizzare anche parametri come la latenza del picco e l'ampiezza a metà del massimo (Full-Width-at-Half-Maximum, FWHM), da affiancare all'ampiezza che risulta evidentemente significativa.

Si provvederà, peraltro, a confrontare il metodo basato sul GLM con altre tecniche di stima della risposta emodinamica, oltre ai due metodi presentati in questo lavoro di tesi. In particolar modo ci si propone di confrontare le prestazioni dell'algoritmo basato sul GLM con quelle di metodi di stima della HRF che utilizzano il canale di riferimento. Si tratta di particolari metodi che si propongono di ottenere una stima del rumore sovrapposto alla risposta emodinamica (oscillazioni fisiologiche e rumore di misura) da sottrarre al segnale fNIRS, al fine di isolare il segnale di interesse. A detta stima è possibile pervenire utilizzando il segnale acquisito dal cosiddetto canale di riferimento: si tratta di un segnale relativo esclusivamente al cranio (non alla corteccia cerebrale), e dunque contenente solo rumore e componenti fisiologiche, sul quale è possibile identificare un adeguato modello del rumore stesso, da sottrarre al segnale fNIRS, isolando, quindi, la risposta emodinamica. I metodi basati sull'utilizzo del canale di riferimento hanno condotto a risultati estremamente soddisfacenti sia in riferimento ai dati simulati che ai dati reali, e costituiscono, dunque, un termine di paragone estremamente interessante per il metodo basato sul GLM, che ha dimostrato risultati molto buoni sui dati simulati e risultati preliminari soddisfacenti sui dati reali.

## 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 Vivo Optical Imaging of Brain Function*.: CRC Press, 2002, ch. 8, pp. 192-221.
- [4] Calderon-Arnulphi M, Alaraj 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 CE, "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 IY, Yazici B, "Near Infrared Imaging and Spectroscopy for Brain Activity Monitoring", *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 DA, Gaudette T, Strangman G, Cheng X, Marota JJ, Mandeville JB, "The accuracy of near infrared spectroscopy and imaging during focal changes in cerebral hemodynamic", *NeuroImage*, vol. 13, pp. 76-90, 2001.
- [11] Hielscher AH, Bluestone AY, Abdoulaev GS, Klose AD, 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 CM, Sosnowski C, Porter JM, 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 SB, Myburgh JA, Thornton EL, 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 MS, 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 BR, Micheels RH, 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] Mehagnoul-Schipper DJ, 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.
- [20] 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.
- [21] 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.
- [22] 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.

- [23] 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.
- [24] 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.
- [25] 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.
- [26] 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.
- [27] Coyle S, Ward T, Markham C, "Physiological Noise in Near-infrared Spectroscopy: Implications for Optical Brain Computer Interfacing", San Francisco, CA, USA, 2004.
- [28] 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.
- [29] 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.
- [30] 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.
- [31] 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.
- [32] 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.
- [33] 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.
- [34] 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.

- [35] 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.
- [36] Holper L, Biallas M, Wolf M, "Task complexity relates to activation of cortical motor areas during uni- and bimanual performance: A functional NIRS study", *NeuroImage*, vol. 46, pp. 1105-1113, 2009.
- [37] Lutz K, Koeneke S, Wustenberg T, Jancke L, "Asymmetry of cortical activation during maximum and convenient tapping speed", *Neuroscience Letters*, vol. 373, pp. 61-66, 2005.
- [38] 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)", *Optics Express*, vol. 18, no. 25, pp. 26550-25568, 2010.
- [39] 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.
- [40] 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.
- [41] Kwong KK, Belliveau JW, Chesler DA, "Dynamic magnetic resonance imaging of human brain activity during primary sensory stimulation", *PNAS*, vol. 89, pp. 5675-5679, 1992.

## Sitografia

- [1s] <http://www.mrc-cbu.cam.ac.uk/people/jessica.grahn/neuroanatomy.html>
- [2s] <http://www.riabilitazionepsichiatrica.com>
- [3s] <http://www.nimoworld.com/ita/biomedicale/teoria.asp>
- [4s] [http://www.yss\\_lab.mech.keio.ac.jp/research/bio/index.html](http://www.yss_lab.mech.keio.ac.jp/research/bio/index.html)
- [5s] <http://www.nimoworld.com/ita/biomedicale/teoria.asp>
- [6s] <http://ardbeg.c.u-tokyo.ac.jp/pc/method.html>
- [7s] <http://www.gizmowatch.com/entry/13-ways-to-use-brain-power-to-command-your-geekdom>



## **Ringraziamenti**

Un sentito ringraziamento al Professor Sparacino per la disponibilità e l'attenzione con cui mi ha seguita in questo stimolante percorso di tesi e per la passione che mi ha trasmesso nei confronti dello studio e della ricerca. Un ringraziamento speciale all'Ing. Fabio Scarpa per avermi aiutata, supportata e corretta in questi mesi di lavoro e a tutto il gruppo di ricerca del Dipartimento di Psicologia dello Sviluppo e della Socializzazione.

Ai miei genitori il ringraziamento più grande e sincero, per avermi dato la possibilità di intraprendere questo percorso di studi e per credere sempre e fermamente in me.