

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

**FACOLTÀ DI INGEGNERIA**

**CORSO DI LAUREA SPECIALISTICA IN  
BIOINGEGNERIA  
(DM 509/99)**



**UN APPROCCIO BAYESIANO  
PER LA STIMA DELLA RISPOSTA EMODINAMICA  
DA DATI DI SPETTROSCOPIA FUNZIONALE NEL  
VICINO INFRAROSSO (FNIRS)**

**RELATORE: PROF. GIOVANNI SPARACINO  
CORRELATORE: ING. FABIO SCARPA**

**LAUREANDA: LUCIA GARBIN**

**ANNO ACCADEMICO: 2009-2010**



## ***Indice***

<b>Indice</b>	<b>1</b>
<b>Introduzione</b>	<b>3</b>
<b>Sommario</b>	<b>5</b>
<b>1. Spettroscopia funzionale nel vicino infrarosso nello studio delle neuroscienze cognitive</b>	<b>6</b>
1.1 Introduzione alle neuroscienze cognitive	6
1.1.1 Memoria visiva a breve termine (VSTM)	9
1.2 Descrizione generale della fNIRS	10
1.2.1 Nascita e sviluppo della fNIRS	11
1.2.2 Principi fisici di funzionamento della fNIRS	13
1.2.3 Strumentazione fNIRS	20
1.3 Applicazioni della fNIRS in letteratura	24
1.4 Confronto tra fNIRS e altre metodologie di neuroimaging	29
1.4.1 EEG e ERP	29
1.4.2 PET	32
1.4.3 fMRI	34
1.4.4 Vantaggi e svantaggi della fNIRS	36
1.5 Coregistrazioni fNIRS con altre tecniche di neuroimaging	40
1.6 Scopo della tesi	43
<b>2. Protocollo e Data Base</b>	<b>45</b>
2.1 Descrizione del paradigma	45
2.2 Descrizione della strumentazione utilizzata per l'acquisizione	48
2.3 Posizionamento delle sonde	49
2.4 Ipotesi neurofisiologiche sottostanti	53
<b>3. Approccio bayesiano per la stima della risposta emodinamica da segnale fNIRS</b>	<b>54</b>
3.1 Descrizione del segnale	54
3.2 Tecniche comunemente utilizzate per filtrare il segnale e loro limiti	61
3.3 Filtraggio bayesiano del segnale	65
3.3.1 Basi teoriche dell'approccio bayesiano alla stima della risposta emodinamica	66
3.3.2 Pre-elaborazione del segnale	70
3.3.3 Implementazione della stima Bayesiana	78
<b>4. Risultati</b>	<b>87</b>

4.1	Rapporto Segnale/Rumore	87
4.2	Risultati comportamentali	92
4.3	Analisi statistica ed interpretazione psicologica	97
<b>5.</b>	<b>Alcuni problemi metodologici aperti e possibili indicazioni per sviluppi futuri</b>	<b>110</b>
5.1	Ulteriore elaborazione del segnale	110
5.1.1	Filtro notch su più finestre temporali	110
5.1.2	Media pesata	114
5.1.3	Stima single trial	119
5.2	Acquisizione con canale di riferimento	120
5.3	Coregistrazione fNIRS-EEG	122
<b>6.</b>	<b>Conclusioni</b>	<b>124</b>
	<b>Bibliografia</b>	<b>128</b>

## ***Introduzione***

Le neuroscienze cognitive studiano i meccanismi di funzionamento del cervello umano durante le attività cognitive, analizzando i processi biologici che stanno alla base dell'interpretazione e della memorizzazione delle informazioni nonché del loro impiego. Negli ultimi trent'anni le conoscenze sul cervello umano sono progredite in modo straordinario grazie alla rapida ascesa delle tecniche di *neuroimaging*. La spettroscopia funzionale nel vicino infrarosso (fNIRS) è un'innovativa tecnica non invasiva di neuroimaging, che utilizza la regione del vicino infrarosso dello spettro elettromagnetico per misurare le variazioni di ossigenazione sanguigna, associate all'attività cerebrale, nel cervello.

Il lavoro esposto in questa tesi sviluppa, in questo ambito, un progetto innovativo sull'analisi dei segnali fNIRS, che nasce da una collaborazione interdisciplinare tra fisici, psicologi ed ingegneri. In particolare, il lavoro è stato svolto presso il Laboratorio Colab del Dipartimento di Psicologia dello Sviluppo e della Socializzazione dell'Università di Padova, in collaborazione con il Gruppo di Bioingegneria del Dipartimento di Ingegneria dell'Informazione.

In letteratura, per stimare la risposta emodinamica dal segnale fNIRS, non esiste un unico metodo. Il cosiddetto metodo dell'averaging convenzionale è fra le tecniche di stima più diffuse, ma presenta dei limiti non trascurabili. Poiché in esso non viene sfruttata alcuna conoscenza a priori sulle caratteristiche del segnale da stimare, per generare una stima sufficientemente accurata della risposta emodinamica con il metodo dell'averaging convenzionale sono richiesti tempi di acquisizione molto lunghi. Inoltre le assunzioni teoriche su cui esso si basa non sono quasi mai pienamente verificate nell'ambito dei segnali fNIRS.

Questo lavoro di tesi propone un nuovo approccio bayesiano non parametrico per la stima della risposta emodinamica finora mai utilizzato in dati di spettroscopia funzionale nel vicino infrarosso. Questo approccio si basa su assunzioni statistiche a priori del segnale oggetto di stima, senza definire su di esso alcun modello deterministico. L'algoritmo è stato sviluppato, in particolare, per filtrare dati fNIRS acquisiti all'interno di uno specifico paradigma sperimentale, ai fini di analizzare i

processi di attivazione neuronale implicati nella memoria visiva a breve termine (VSTM).

I risultati ottenuti hanno dimostrato come l'approccio bayesiano proposto in questa tesi sia in grado di ottenere stime molto accurate della risposta emodinamica, con un rapporto segnale-rumore notevolmente superiore a quello ottenibile con tecniche di averaging convenzionale a partire dallo stesso dataset.

Le stime ottenute hanno permesso di verificare l'implicazione, nei processi di attivazione neuronale che coinvolgono la VSTM, dell'intera regione corticale da cui è stato acquisito il segnale fNIRS, confermando i risultati ottenuti con alcune tecniche di neuroimaging più tradizionali, come la risonanza magnetica funzionale e l'elettroencefalografia. Inoltre, l'elevata risoluzione temporale del segnale fNIRS ha permesso di evidenziare, mediante un'analisi statistica delle risposte emodinamiche stimate, un effetto di lateralizzazione già evidenziato in letteratura in studi di attivazione neuronale condotti tramite acquisizioni elettroencefalografiche, ma finora mai rilevato a partire da misure di risposta emodinamica con la tradizionale tecnica di risonanza magnetica funzionale.

## **Sommario**

La tesi è suddivisa in sei capitoli. Il Capitolo 1 fornisce una breve introduzione alle neuroscienze cognitive e alla memoria visiva a breve termine seguita da un'ampia descrizione generale della spettroscopia funzionale nel vicino infrarosso. In particolare, oltre ai principi di funzionamento e alle metodologie di acquisizione del segnale fNIRS, vengono messe in luce le numerose potenzialità e possibili applicazioni di questa tecnica innovativa, eseguendo anche un confronto con le tradizionali tecniche di neuroimaging. Nel Capitolo 2 viene invece descritto il protocollo sperimentale utilizzato per l'acquisizione dei dati, definendo i principali risultati che con esso ci si aspetta di raggiungere. Il filtraggio del segnale, oggetto di questa tesi, è affrontato in modo dettagliato nel Capitolo 3: dopo aver analizzato le componenti di rumore che affliggono il segnale e le problematiche del metodo tipicamente usato per filtrare i segnali fNIRS (averaging convenzionale), viene proposto un nuovo metodo non parametrico basato su un approccio bayesiano alla stima. I risultati ottenuti sono esposti ed analizzati nel Capitolo 4, ponendo attenzione sia agli aspetti ingegneristici di analisi del segnale (rapporto segnale/disturbo), sia agli aspetti di analisi ed interpretazione psicologica dei dati (risultati comportamentali e analisi statistica). Alcune proposte per migliorare l'acquisizione e l'elaborazione del segnale fNIRS vengono esposte nel Capitolo 5, mentre il Capitolo 6 fornisce una lettura globale dei risultati che il nuovo approccio non parametrico di stima proposto in questa tesi ha permesso di raggiungere.

# **1. Spettroscopia funzionale nel vicino infrarosso nello studio delle neuroscienze cognitive**

## **1.1 Introduzione alle neuroscienze cognitive**

Il termine Neuroscienze Cognitive fu concepito a New York verso la fine degli anni '70 da George Miller e Michael Gazzaniga (rispettivamente un noto studioso di psicologia cognitiva e un affermato neurologo) mentre, assieme, stavano raggiungendo un importante convegno cui partecipavano scienziati di prestigiose università con lo scopo di capire come, a partire dal funzionamento del cervello, possa scaturire la mente. Le neuroscienze stavano scoprendo come era organizzata la corteccia cerebrale e come funzionasse in risposta a stimoli semplici; si era ormai consci che funzioni complesse come la percezione, la memoria, il ragionamento e il movimento sono il risultato di una miriade di processi sottostanti, ognuno dei quali è sostenuto da una distinta area cerebrale e si sentiva la necessità di verificare sperimentalmente i sofisticati modelli della mente che via via si proponevano [1]. La figura 1.1.a rappresenta la suddivisione dell'encefalo nelle principali aree cerebrali.



**Figura 1.1.a** – Principali aree cerebrali (lobi).

Le neuroscienze cognitive studiano dunque i meccanismi di funzionamento del cervello umano durante le attività cognitive, analizzando i processi biologici che stanno alla base dell'interpretazione e della memorizzazione delle informazioni



nonché del loro impiego. Per fare questo si cerca per esempio di correlare l'attività neuronale (ricavata da misure elettriche, da un'analisi del flusso sanguigno, della concentrazione dei metaboliti nel sangue, ecc.) con aspetti ben precisi del comportamento, sfruttando specifici paradigmi sperimentali e costruendo opportuni modelli.

Si tratta di un approccio fortemente interdisciplinare allo studio della mente in un campo in rapida evoluzione: si intrecciano competenze di numerose discipline, della psicologia e delle neuroscienze (quali ad esempio psicofisica, linguistica, psicologia cognitiva, neuropsicologia, neurofisiologia, neurobiologia, scienze sociali) con competenze tecniche e di bioingegneria (provenienti da conoscenze fisiche, elettroniche, informatiche) che permettono di sfruttare al meglio i recenti e continui sviluppi tecnologici, soprattutto nel campo delle neuroimmagini funzionali e dell'elettrofisiologia.

Negli ultimi trent'anni le conoscenze sul cervello umano sono progredite in modo straordinario grazie alla rapida ascesa delle tecniche di *brain imaging*, che forniscono informazioni sia morfologiche (TAC - tomografia assiale computerizzata, MRI - imaging a risonanza magnetica, DTI - imaging tramite tensori di diffusione) sia e soprattutto funzionali (EEG - elettroencefalografia, ERP - potenziali evento-relati, PET - tomografia ad emissione di positroni, fMRI - imaging a risonanza magnetica funzionale, fNIRS - spettroscopia funzionale nel vicino infrarosso), un ruolo importante è anche giocato dalla messa a punto di algoritmi sempre più efficaci per l'elaborazione e l'interpretazione dei dati così acquisiti. Inoltre, l'avvento di computer con potenza di calcolo sempre maggiore, tale da poter provare a riprodurre la mente umana, ha posto le basi per lo studio di un'altra disciplina che contribuisce alle neuroscienze cognitive oggi nota come *Intelligenza artificiale*.

Ad oggi le neuroscienze cognitive hanno a disposizione molti strumenti d'acquisizione che si avvicinano in modo diverso alle proprietà elettromagnetiche del corpo umano (EEG, MEG - megnetoencefalografia, DCS - stimolazione elettrica diretta, TMS - stimolazione magnetica transcranica) e ai parametri legati all'emodinamica cerebrale (PET, fMRI). A queste ultime, dagli anni '80, si sta affiancando la spettroscopia funzionale nel vicino infrarosso (fNIRS - functional near-infrared spectroscopy), un'innovativa tecnica non invasiva le cui caratteristiche e potenzialità saranno espone nella successiva sezione 1.2. La tabella 1.1.a presenta i

metodi di indagine maggiormente impiegati nel campo delle Neuroscienze Cognitive, evidenziandone le proprietà cerebrali coinvolte e l'invasività di misurazione.

	<b>Proprietà cerebrale coinvolta</b>	<b>Invasività</b>
<b>DCS</b>	Elettrica	No
<b>EEG/ERP</b>	Elettrica	No
<b>MEG</b>	Magnetica	No
<b>TMS</b>	Magnetica	No
<b>PET</b>	Emodinamica	Si
<b>fMRI</b>	Emodinamica	No
<b>fNIRS</b>	Emodinamica	No

**Tabella 1.1.a** – Metodi maggiormente utilizzati nelle Neuroscienze Cognitive

Il sistema nervoso umano è stato perciò trattato alla stregua di ogni altra fonte di segnale, allo scopo di estrarre le componenti non casuali dei segnali cerebrali inequivocabilmente collegate all'attività cognitiva.

Spesso tuttavia i neuroscienziati cognitivi sono stati spettatori passivi dei continui raffinamenti degli algoritmi proposti dai bioingegneri per un uso appropriato delle tecniche di neuroimaging e hanno importato, in modo a volte poco critico, tali tecniche (ad esempio per il filtraggio del segnale EEG, dei segnali ottici, dei segnali magnetici) nei loro laboratori al fine di investigare l'architettura cognitiva dei processi mentali implementati dal cervello. Una conseguenza negativa di una siffatta interazione tra neuroscienziati cognitivi e bioingegneri è stata il dare vita a due filoni scientifici fortemente indipendenti, il filone neuroscientifico degli studi sulle capacità del cervello umano e il filone degli studi bioingegneristici focalizzati sul filtraggio del segnale, sulla riduzione del rumore e sull'analisi dei dati. Solo raramente questi due ambiti si sono incontrati in uno scambio bidirezionale di informazioni dove fisici, bioingegneri, neuropsicologi e psicologi cognitivi di fatto collaborano per risolvere problemi che sono al confine tra la conoscenza tecnica e quella concettuale. Ecco perché la comunità scientifica internazionale sente sempre più necessaria una convergenza di metodi e approcci alle neuroscienze cognitive, per evitare che le

divisioni disciplinari, con quadri concettuali ed esplicativi spesso molto differenti l'una dall'altra e metodi di ricerca differenti, producano un mosaico di conoscenze in cui le tessere non si combinano bene fra loro [3].

Per concludere, è bene sapere che gli obiettivi perseguiti dalle neuroscienze cognitive trovano moltissimi campi di applicazione, non solo in clinica e in laboratorio, ma anche in studi di ambito sociale ed economico (legati soprattutto ad indagini sul comportamento umano).

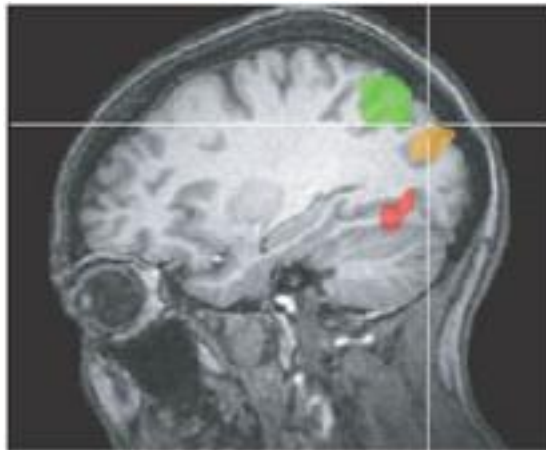
### **1.1.1 Memoria visiva a breve termine (VSTM)**

Anche lo studio dei processi fisiologici che stanno alla base della memoria, rientra fra i campi di indagine delle neuroscienze cognitive. Di particolare interesse per il lavoro qui esposto sono gli studi sulla memoria visiva a breve termine.

In ogni istante, il nostro sistema visivo percepisce un ambiente ricco ed altamente dettagliato da cui estraiamo importanti informazioni che utilizziamo per guidare il nostro comportamento. Possiamo tuttavia tenere a mente la scena visiva solo per una frazione di minuto, racchiudendola in poche informazioni memorizzate in un buffer temporaneo denominato *memoria visiva a breve termine (VSTM – visual short term memory)*. Anche se la VSTM è essenziale per l'esecuzione di una vasta gamma di funzioni percettive e cognitive, ed è supportata da una vasta rete di regioni cerebrali, la quantità di informazioni che può mantenere pronte alla lettura e alla manipolazione è estremamente limitata [4].

Negli ultimi anni si è sviluppato un crescente dibattito sui meccanismi di funzionamento e sulla capacità della VSTM e su quali siano i fattori (come la struttura più o meno complessa degli oggetti osservati, oltre che la loro numerosità) che la influenzano, stimolando molte ricerche scientifiche a riguardo, basate su dati acquisiti con fMRI ed EEG. Uno studio eseguito da Todd et al. nel 2004 [4], basandosi su immagini di fMRI, ha dimostrato come la quantità limitata delle informazioni della scena visiva che possono essere memorizzate nella VSTM sia strettamente correlata con l'attività neuronale nella corteccia parietale posteriore. Nel 2006, Xu et al. [5], sempre utilizzando acquisizioni di fMRI, hanno invece cercato di risolvere la questione dissociando gli effetti del carico informativo (numero di oggetti da memorizzare) sulla corteccia parietale da quelli sulla corteccia occipitale,

nelle zone evidenziate in figura 1.1.1.a. Grazie a questa dissociazione sono giunti ad affermare che la capacità della VSTM è determinata sia dal numero di oggetti (generalmente i soggetti riescono a memorizzare correttamente fino a quattro oggetti) che dalla complessità degli stessi. Infine anche uno studio molto recente di Luria et al. [6], pubblicato nel 2010, ha indagato gli effetti del carico e della lateralizzazione (differenza tra attività cerebrale nell'emisfero destro e sinistro, a seconda che gli oggetti da memorizzare siano presentati a destra o a sinistra) sulla memoria visiva a breve termine, conducendo però uno studio sugli ERPs. I risultati da loro raggiunti mostrano un'effettiva dipendenza fra la capacità della VSTM e la complessità e numerosità degli oggetti memorizzati, individuando l'effetto di lateralizzazione non riscontrato invece nell'attività emodinamica misurata con l'fMRI.



**Figura 1.1.1.a** – Zone della corteccia parietale (verde) e della corteccia occipitale (arancione e rossa) coinvolte nella VSTM (Xu et al. [5])

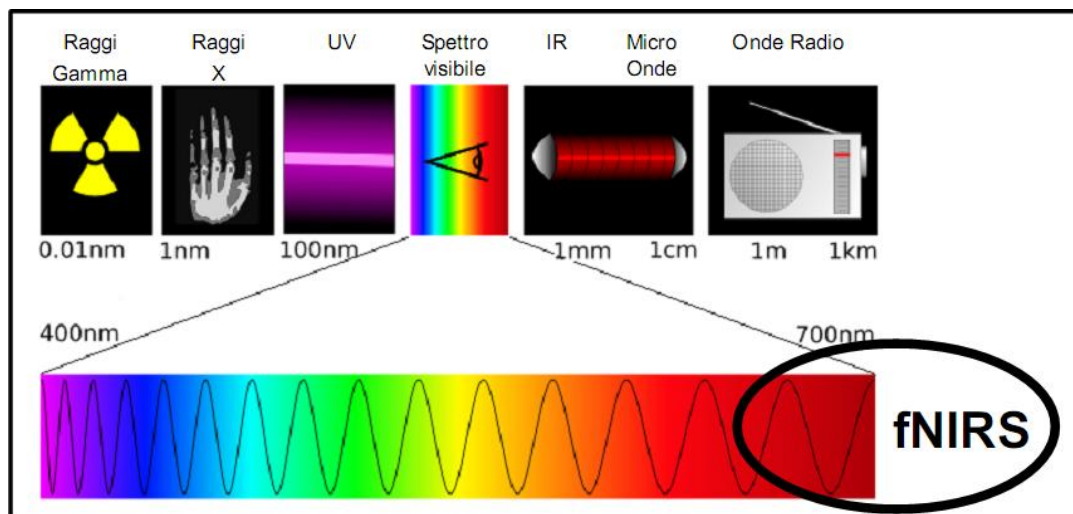
Gli esiti finora raggiunti si mostrano senza dubbio parziali e bisognosi di conferme: sono necessari ulteriori studi approfonditi per comprendere fino in fondo gli effetti del carico informativo e della lateralizzazione sulla VSTM.

## **1.2 Descrizione generale della fNIRS**

Alla fine degli anni '70, furono utilizzate per la prima volta le radiazioni ottiche nella regione spettrale del vicino infrarosso per misurare i parametri

dell'emodinamica cerebrale in modo non invasivo. La tecnica, allora usata da Jobsis, è oggi conosciuta come “spettroscopia nel vicino infrarosso”.

La NIRS (Near InfraRed Spectroscopy) è uno strumento che permette di monitorare le concentrazione di particolari sostanze cromofore presenti nei fluidi corporei (quali ossi-emoglobina, deossi-emoglobina, citocromo-ossidasi) sfruttando il loro diverso comportamento (più o meno assorbente) in presenza di radiazioni elettromagnetiche di specifiche lunghezza d'onda nella banda del vicino infrarosso (circa 650-1000 nm); è così possibile monitorare, in modo non invasivo, l'ossigenazione e altri parametri fisiologici in tessuti quali muscoli e cervello. Quando l'oggetto d'indagine è un aspetto funzionale, legato per esempio al flusso sanguigno in risposta all'attivazione neuronale, è più corretto parlare di fNIRS ovvero di NIRS funzionale. La figura 1.2.a mette in evidenza il range di lunghezze d'onda delle radiazioni elettromagnetiche sfruttate nella spettroscopia funzionale nel vicino infrarosso.



**Figura 1.2.a** – Range delle lunghezze d'onda sfruttate nella fNIRS [s5].

### 1.2.1 *Nascita e sviluppo della fNIRS*

Numerosi strumenti ottici che sfruttano la luce infrarossa sono impiegati in ambito biomedico, per analisi chimico-fisica delle molecole organiche nei laboratori, per misurare parametri clinici come la temperatura corporea (mediante i termometri ad infrarossi) o la saturazione di ossigeno nel sangue (tramite l'ossimetro) e, recentemente, anche per ottenere immagini ad alta risoluzione di sezioni della retina

in vivo grazie alla tomografia a coerenza ottica (OCT). L'utilizzo delle radiazioni nel vicino infrarosso per il monitoraggio funzionale di aree non direttamente accessibili (quali il tessuto muscolare o il cervello) tramite fNIRS ha invece una storia molto più recente e ricca di potenziali aspettative per il futuro.

Dopo il primo lavoro di Jöbsis nel 1977, intitolato “*Noninvasive, infrared monitoring of cerebral and myocardial oxygen sufficiency and circulatory parameter*” [7], altri gruppi di ricerca si dedicarono alla sperimentazione della fNIRS (per esempio B. Chance et al. 1988 [8], M. Cope & D.T. Delpy 1988 [9], P.W. Mc Cormick et al. 1991 [10]), esaminando inizialmente l'ossigenazione nei tessuti cerebrali ed in seguito il metabolismo ossidativo nei muscoli. In particolare, a partire dal 1993, grazie a continui miglioramenti tecnologici della strumentazione NIRS, è stata ampiamente osservata l'attivazione della corteccia cerebrale in adulti e neonati [13].

Nel 1992 furono condotti i primi esperimenti di risonanza magnetica funzionale (fMRI), una tecnologia che sfrutta un segnale dipendente dal livello di ossigenazione sanguigna (segnale BOLD – blood-oxygen-level dependent) e lo associa alle variazioni di flusso sanguigno e del metabolismo dell'ossigeno nel cervello. Le tecniche fMRI andarono perfezionandosi con gran rapidità permettendo validi confronti anche con i già consolidati risultati della tomografia ad emissione di positroni (PET, nata negli anni 70 e applicata a studi della cognizione umana già dagli anni '80). Le nuove mappe funzionali ottenute con l'fMRI, assieme a nuovi metodi di elaborazione, analisi ed interpretazione dei dati, che permettono di ottenere risultati affidabili e che possono quindi essere usati come riferimenti, hanno incoraggiato un numero sempre maggiore di gruppi di ricerca a perfezionare le tecnologie di spettroscopia funzionale nel vicino infrarosso e a studiarne nuove applicazioni, grazie appunto alla possibilità di confrontare e validare i risultati ottenuti. In particolare, dalla fine degli anni '90 ad oggi sono diverse le recensioni dettagliate apparse in letteratura che descrivono i principi, i limiti, e le applicazioni della fNIRS soprattutto in materia di monitoraggio di ossigenazione cerebrale nei neonati e negli adulti e che studiano la correlazione del segnale fNIRS con segnali fMRI o EEG mediante registrazioni separate o tecniche di co-registrazione (Strangman et al. 2002, Moosmann et al. 2003, Sassaroli et al. 2005, Koch et al. 2007, Takeuchi et al. 2008, Cooper et al. 2009, [15-21]).

I progressi degli ultimi anni sono stati possibili solo a seguito di approfondite indagini (come per esempio quelle pubblicate in Delpy et al. 1988, Delpy et al. 1989, Arridge et al. 1992, Duncan et al. 1995, Hielscher et al. 2002, [22-26]) dei meccanismi di interazione e di propagazione della luce attraverso mezzi come i tessuti biologici, i quali sono altamente diffondenti alle frequenze ottiche e non omogenei, individuando con precisione le lunghezze d'onda delle radiazioni capaci di attraversare il tessuto ma essere comunque assorbite dai cromofori di interesse (Wray et al. 1988 [27], Delpy et al. 1988 [22]). Essenziali sono stati anche i recenti sviluppi dell'optoelettronica nel settore delle sorgenti e dei sensori ottici che permettono di monitorare la propagazione dei raggi infrarossi attraverso ampi strati (centimetri) di tessuto [12].

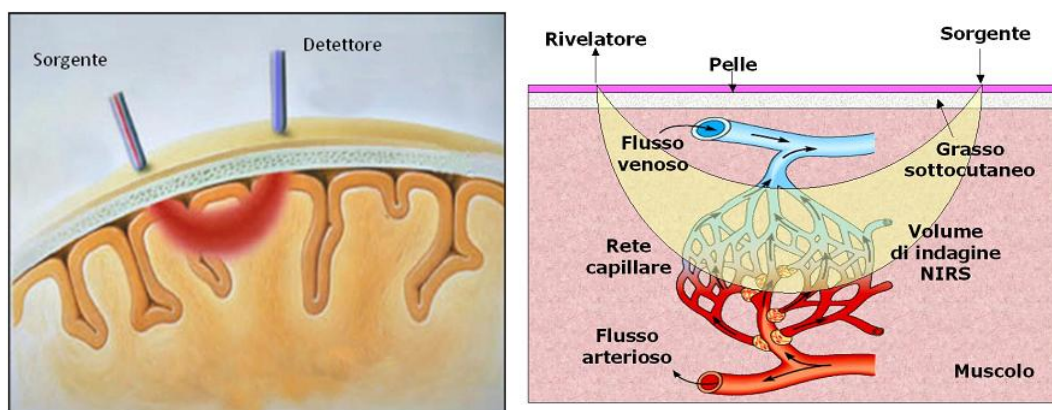
Trenta anni dopo la scoperta del NIRS, la spettroscopia e l'imaging funzionale nel vicino infrarosso sono oggi in una fase di transizione fra la ricerca di base e l'applicazione clinica. Di anno in anno si moltiplicano le pubblicazioni tecniche e scientifiche sulle applicazioni cliniche della fNIRS. Nei prossimi anni, questa tecnica potrebbe riuscire a misurare valori assoluti di concentrazione, e questo darebbe un consistente contributo per l'espansione delle applicazioni cliniche. La tecnica fNIRS ha inoltre mostrato enormi potenzialità come strumento di neuroimaging non invasivo, fornendo mappe funzionali e metaboliche della corteccia cerebrale attivata: vi sono grandi aspettative sia per lo sviluppo di sistemi che integrino la fNIRS con altre tecniche consolidate di imaging cerebrale, quali EEG, PET ed fMRI, sia per la coregistrazione con acquisizioni strutturali da strumenti di imaging convenzionali (TAC, MRI, ecografia) che permettano di far luce su svariate questioni fisiologiche e aumentare la conoscenza di molte malattie [13].

### **1.2.2 Principi fisici di funzionamento della fNIRS**

L'acquisizione del segnale NIRS avviene in modo non invasivo appoggiando sulla cute, o sul cuoio capelluto, una o più sorgenti luminose (diodi laser collegati a fibre ottiche) che proiettano la luce nei tessuti sottostanti e uno o più rilevatori (tubi fotomoltiplicatori collegati a fibre ottiche) atti a misurare l'intensità della luce dopo che ha attraversato i tessuti. Il numero ed il tipo di sorgenti/rilevatori, la loro distanza e disposizione spaziale dipendono dal tipo di protocollo e di strumentazione in uso,

oltre che dall'area che si vuole analizzare. Si vuole ora introdurre la teoria di funzionamento della spettroscopia funzionale ad onde continue (CW, in dettaglio nel paragrafo 1.2.3) che sta alla base di tutti i sistemi di acquisizione fNIRS, facendo riferimento ad una singola coppia sorgente-rilevatore appoggiata sul cuoio capelluto. Gli stessi procedimenti si potranno estendere agli altri tipi di acquisizioni NIRS volti ad analizzare altri parametri (legati per esempio al metabolismo muscolare o al metabolismo cellulare).

La propagazione nei tessuti della luce con lunghezza d'onda da 650 a 1000 nm è regolata dall'assorbimento dei fotoni da parte di alcuni cromofori ma soprattutto da una loro forte dispersione: essi non viaggiano lungo un percorso rettilineo, ma interagiscono con un confine e l'altro delle molte sottostrutture interne ai tessuti, a livello cellulare e sub-cellulare, modificando continuamente la traiettoria del loro percorso. Questo fenomeno di scattering della luce fa sì che la direzione di propagazione dei fotoni cambi continuamente, in modo casuale. I modelli fisici della propagazione della luce, sotto alcune ipotesi semplificative (fra le quali una discreta omogeneità del mezzo), permettono di determinare dei volumi cosiddetti "a banana" che individuano le regioni di tessuto con ugual probabilità di essere attraversate dai fotoni emessi dalla sorgente e misurati nella posizione del rilevatore. Le immagini in figura 1.2.2.a-b evidenziano schematicamente la propagazione della luce nel tessuto cerebrale (a) e nel tessuto muscolare (b).



**Figura 1.2.2.a-b** – Schema della propagazione della luce nel tessuto cerebrale (a) e nel tessuto muscolare (b).

Poiché è più probabile che i fotoni misurati del rilevatore siano passati attraverso le regioni centrali della "banana", la misura è più sensibile agli oggetti che si trovano



in quella zona. La maggior parte dei sistemi ottici NIRS sono sensibili ad una profondità di circa 25-30 mm, anche se questo valore dipende da molti fattori [28]. E' stato comunque dimostrato che una percentuale significativa del segnale misurato coinvolge le regioni corticali del cervello a patto che vi sia una sufficiente distanza (intorno ai 30 mm) fra sorgente e rivelatore [29].

La frazione della luce incidente che viene riflessa, rifratta, dispersa e assorbita dipende dalle proprietà ottiche del mezzo attraversato: la luce nel vicino infrarosso è poco assorbita dai tessuti biologici, alcuni cromofori presenti al loro interno mostrano particolari proprietà assorbenti a specifiche lunghezze d'onda, permettendo di relazionare le misure di attenuazione del segnale in uscita con il loro valore di concentrazione nel tessuto. I principali cromofori nei tessuti biologici sono l'acqua (in genere l'80% nel tessuto cerebrale), i lipidi, la melanina e l'emoglobina [30].

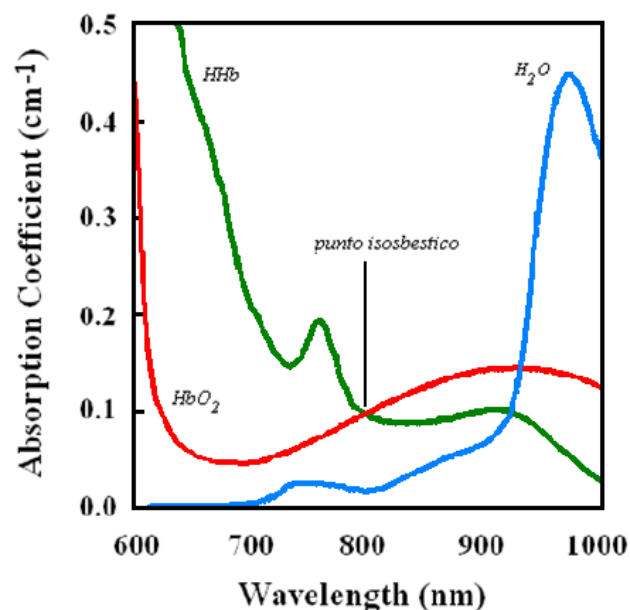


Figura 1.2.2.c – Assorbimento della luce infrarossa

Lo spettro di assorbimento dei lipidi e dell'acqua li rendono quasi trasparenti alla luce NIR, mentre la melanina, pur mostrando un coefficiente di estinzione abbastanza elevato, contribuisce solo con un'attenuazione costante del segnale. Il cromoforo clinicamente più interessante nella gamma di lunghezze d'onda 650-1000 nm è l'emoglobina, il cui coefficiente di estinzione, diverso a seconda che sia ossigenata ( $HbO_2$ ) o deossigenata ( $HHb$ ), permette di monitorare in modo affidabile numerosi aspetti funzionali (legati per esempio all'attivazione neuronale). In figura

1.2.2.c si può osservare che a circa  $\lambda=800$  nm (punto isosbastico), i coefficienti di estinzione specifici delle due forme di emoglobina sono uguali. Le radiazioni luminose con lunghezze d'onda inferiori o superiori a 650-1000 nm sarebbero invece in gran parte assorbite rispettivamente da HHb e dalle molecole d'acqua. Sono state più volte indagate anche le variazioni di concentrazione del cyt-ox (citocromo ossidasi), un cromoforo indicatore del metabolismo energetico intracellulare che permetterebbe di valutare lo stato funzionale del cervello; ma i contributi di assorbimento del cyt-ox sono di un ordine d'ampiezza (o più) inferiori a quelli dell'emoglobina e le relative misure richiedono pertanto di essere condotte in un ampio range spettrale [12]. Nello studio del metabolismo muscolare è possibile misurare anche la mioglobina, che rispetto all'emoglobina ha un'affinità per l'ossigeno sei volte superiore ed è indispensabile durante le attività aerobiche. La mioglobina è presente nei tessuti muscolari e non nel cervello.

Per il calcolo della variazione di concentrazione di HHb e HbO<sub>2</sub> il metodo più utilizzato è basato sulla legge modificata di Beer-Lambert. Questa legge, che deriva dalla soluzione delle equazioni di trasporto dei fotoni nei tessuti sotto particolari ipotesi semplificative, identifica un rapporto direttamente proporzionale fra l'assorbanza e la concentrazione di cromofori ad una specifica lunghezza d'onda:

$$A = -\log \frac{I}{I_0} \approx \varepsilon^\lambda \cdot c \cdot L \quad \text{con} \quad I = I_0 \cdot e^{-\varepsilon^\lambda \cdot c \cdot L} \quad (1.2.1)$$

dove i simboli indicano:

$A$	assorbanza della luce attraverso il mezzo (detta anche densità ottica)
$I$	intensità della luce misurata dal rivelatore
$I_0$	intensità della luce emessa dalla sorgente
$\varepsilon^\lambda$	coefficiente di estinzione (che dipende dalla lunghezza d'onda $\lambda$ )
$c$	concentrazione di cromoforo
$L$	lunghezza del cammino della luce

Nei tessuti biologici (che presentano scattering)  $L$  non corrisponde alla distanza sorgente-rivelatore ( $d$ ) ma dipende dal DPF (differential pathlength factor) che descrive l'incremento apportato alla lunghezza del cammino percorso dai fotoni in seguito alla loro dispersione. L'equazione 1.2.1 può quindi essere riscritta come:

$$A \approx \varepsilon^\lambda \cdot c \cdot d \cdot DPF^\lambda + G^\lambda \quad (1.2.2)$$

dove i simboli indicano

- $G^\lambda$  termine additivo incognito che dipende dalla geometria della misurazione e dalla lunghezza d'onda  $\lambda$
- $d$  distanza sorgente-rivelatore
- $DPF^\lambda$  differential pathlength factor, adimensionale, calcolato sperimentalmente o numericamente per diversi tipi di tessuto

Le legge MBLL (Modified Beer-Lambert Law) si basa su diverse ipotesi semplificative: si assume che il mezzo sia omogeneo, soggetto ad uno scattering elevato ma costante, con variazioni omogenee dei parametri di interesse in ogni volume sottoposto a misura. Se lo scattering è effettivamente elevato ma costante, i valori di  $G^\lambda$  e  $DPF^\lambda$  si possono considerare costanti e ricavare la variazione temporale di concentrazione del cromoforo mediante l'equazione:

$$\Delta A = A_t - A_{t_0} = \varepsilon^\lambda \cdot \Delta c \cdot d \cdot DPF^\lambda \quad (1.2.3)$$

dove i simboli indicano

- $A_t$  assorbanza ad un certo istante di tempo  $t$
- $A_{t_0}$  assorbanza ad un istante iniziale  $t_0$

Per ogni lunghezza d'onda la variazione di assorbanza può essere vista come la combinazione lineare dei contributi di entrambi i principali cromofori (HHb e HbO<sub>2</sub>), arrivando a scrivere:

$$\Delta A^\lambda = (\varepsilon_{HHb}^\lambda \cdot \Delta[HHb] + \varepsilon_{HbO_2}^\lambda \cdot \Delta[HbO_2]) \cdot d \cdot DPF^\lambda \quad (1.2.4)$$

dove i simboli indicano

- $\varepsilon_{HHb}^\lambda$  e  $\varepsilon_{HbO_2}^\lambda$  coefficienti di estinzione rispettivamente di deossiemoglobina e ossiemoglobina ad una specifica lunghezza d'onda  $\lambda$
- $\Delta[HHb]$  e  $\Delta[HbO_2]$  variazioni di concentrazione rispettivamente di deossiemoglobina e ossiemoglobina

La misura simultanea a due lunghezze d'onda ( $\lambda_1$  e  $\lambda_2$ ) permette di stimare le variazioni nelle concentrazioni di HHb e HbO<sub>2</sub>, essendo noti i valori di  $\varepsilon_{HHb}^\lambda$  e  $\varepsilon_{HbO_2}^\lambda$

$$\Delta[HHb] = \frac{\varepsilon_{HbO_2}^{\lambda_2} \frac{\Delta A^{\lambda_1}}{DPF^{\lambda_1}} - \varepsilon_{HHb}^{\lambda_1} \frac{\Delta A^{\lambda_2}}{DPF^{\lambda_2}}}{(\varepsilon_{HHb}^{\lambda_1} \varepsilon_{HbO_2}^{\lambda_2} - \varepsilon_{HHb}^{\lambda_2} \varepsilon_{HbO_2}^{\lambda_1}) \cdot d} \quad (1.2.5)$$

$$\Delta[HbO_2] = \frac{\varepsilon_{HHb}^{\lambda_1} \frac{\Delta A^{\lambda_2}}{DPF^{\lambda_2}} - \varepsilon_{HHb}^{\lambda_2} \frac{\Delta A^{\lambda_1}}{DPF^{\lambda_1}}}{(\varepsilon_{HHb}^{\lambda_1} \varepsilon_{HbO_2}^{\lambda_2} - \varepsilon_{HHb}^{\lambda_2} \varepsilon_{HbO_2}^{\lambda_1}) \cdot d} \quad (1.2.6)$$

Esiste anche una generalizzazione di queste formule, qui non esposta, per più di due lunghezze d'onda [11-12].

Dalle variazioni di concentrazione di deossiemoglobina e ossiemoglobina si possono ricavare dei valori relativi di ossigenazione (oxy) e di volume ematico (bv) [30]:

$$\text{oxy} = \Delta[HbO_2] - \Delta[HHb] \quad (1.2.7)$$

$$\text{bv} = \Delta[HbO_2] + \Delta[HHb] \quad (1.2.8)$$

Le assunzioni semplificative di mezzo omogeneo e variazioni omogenee nel volume attraversato dai fotoni sono talvolta inadeguate per alcune applicazioni, per esempio la MBLL si è rivelata poco affidabile e non in grado di fornire informazioni strutturali per la ricostruzione di immagini. Questo è dovuto alle grandi disomogeneità dei tessuti, che sono il principale ostacolo per una accurata descrizione teorica della propagazione della luce nei tessuti biologici. Non si può per esempio parlare di mezzo omogeneo quando vi è sovrapposizione fra strati di tessuti diversi (scalpo, ossa del cranio, tessuto cerebrale), ma anche semplicemente quando si è in presenza di una massa tumorale. Lo stesso si può dire per le acquisizioni NIRS rivolte ai tessuti muscolari: molti studi hanno mostrato per esempio che lo spessore del tessuto adiposo è in grado di confondere le misure NIRS, e che è essenziale tener conto di questo fattore [31]. Assumere  $DPF^{\lambda}$  e  $G^{\lambda}$  costanti non è attendibile nemmeno in caso di eventuali modifiche geometriche, come in presenza di artefatti da movimento interno al tessuto. Inoltre, la presenza del fluido cerebrospinale e del letto capillare che irrorano lo scalpo danno luogo ad un effetto “stratificato” del cammino della luce che non è tenuto in considerazione dalla MBLL.

Dall’assunzione di variazioni omogenee della concentrazioni di cromofori sorge invece il problema del cosiddetto "effetto di volume parziale": le variazioni di concentrazione sono sottostimate, perché il volume attivato (dove appunto

avvengono tali variazioni) è di solito più piccolo del volume di campionamento. Inoltre, il volume campionato dipende dalle proprietà ottiche dei tessuti che a loro volta dipendono dalla lunghezza d'onda: nelle misure simultanee a due o più lunghezze d'onda, poiché il modello MBLL ignora tale dipendenza (valore costante di  $DPF^\lambda$ ), si generano errori di crosstalk mescolando fra loro i contributi delle variazioni di concentrazione dei singoli cromofori [11]. Tutte queste problematiche si accentuano quando si utilizza una semplice strumentazione CW: approcci alternativi (in dettaglio nel paragrafo 1.2.3), che acquisiscono informazioni anche sul tempo di volo dei fotoni, permettono di localizzare meglio il segnale.

Per minimizzare gli effetti degli errori di crosstalk, Boas et al. in [32] hanno suggerito un modello più sofisticato e preciso per la propagazione dei fotoni nel cervello (che tiene conto in modo più dettagliato del cammino dei fotoni attraverso i diversi tessuti) [11]. Questo modello si basa sull'equazione di diffusione dei fotoni e utilizza, come condizioni al contorno, informazioni derivate dalle equazioni di trasporto delle radiazioni.

L'equazione di diffusione è la seguente:

$$-D \cdot \nabla^2 \Phi(\mathbf{r}, t) + \nu \cdot \mu_a \cdot \Phi(\mathbf{r}, t) + \frac{\delta \Phi(\mathbf{r}, t)}{\delta t} = \nu \cdot S(\mathbf{r}, t) \quad (1.2.9)$$

dove i simboli indicano

$\Phi(\mathbf{r}, t)$	flusso di fotoni (che è proporzionale all'intensità) nel punto $\mathbf{r}$ all'istante $t$
$S(\mathbf{r}, t)$	distribuzione di fotoni alla sorgente
$D = \frac{\nu}{3\mu_s}$	coefficiente di diffusione con $\mu_s'$ coefficiente ridotto di scattering
$\mu_a = \varepsilon^\lambda \cdot c$	coefficiente di assorbimento
$\nu$	velocità della luce nel mezzo

Si noti che, anche se non sempre esplicitato, tutti i fattori che compaiono nell'equazione 1.2.9 dipendono da  $\lambda$ .

Questo approccio modella accuratamente la propagazione della luce attraverso un mezzo con scattering elevato, ossia dove la probabilità che un fotone subisca scattering è assai superiore a quella che venga assorbito. Dalle soluzioni dell'equazione 1.2.9, assumendo che le variazioni di concentrazione siano piccole ma globali, si può arrivare a definire la variazione temporale di assorbanza come:

$$\Delta A = -\log \frac{\Phi_{Finale}}{\Phi_{Iniziale}} = \quad (1.2.10)$$

$$= \frac{1}{2} \left( \frac{3\mu'_s}{\mu_a^{Iniziale}} \right)^{\frac{1}{2}} \left[ 1 - \left( 1 + L(3\mu_s^{Iniziale} \mu_a^{Iniziale})^{\frac{1}{2}} \right)^{-1} \right] (\varepsilon_{HHb} \Delta[HHb] + \varepsilon_{HbO_2} \Delta[HbO_2]) d$$

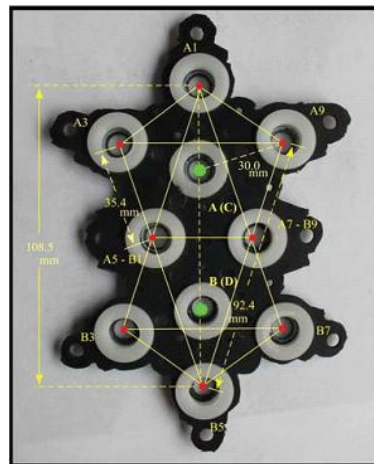
Confrontando questa equazione con la 1.2.4 si vede come la legge modificata di Beer-Lambert sia ragionevole solo per i tessuti con una buona uniformità spaziale quando le concentrazioni di cromofori non subiscono variazioni significative. Si nota infatti che il DPF dipende dal coefficiente ridotto di scattering, dalla concentrazione iniziale di cromofori, dal coefficiente di estinzione e dalla distanza sorgente-rilevatore. Questo secondo modello è quello che sta alla base della tomografia ottica diffusiva (DOT, Diffuse Optical Tomography), che sarà meglio introdotto nel prossimo paragrafo. Attualmente, nella maggior parte delle applicazioni NIRS, il valore di DPF viene determinato empiricamente, trascurando la sua dipendenza da  $\mu_a$  e da  $d$  [12]. Tale approssimazione è ritenuta valida anche per il fatto che sorgente e rilevatore sono fermi rispetto a tutti i tessuti dell'area analizzata.

Alcuni gruppi di ricerca hanno infine lavorato utilizzando la luce diffusa per misurare direttamente l'attività neuronale (segnale a risposta veloce con latenza di circa 50 a 300 ms) piuttosto che indirettamente via emoglobina (segnale a risposta lenta con latenza di circa 10 s) [11]. E' stato dimostrato in vitro che l'attività neuronale è associata ad un aumento nello scattering della luce, indotto da una variazione dell'indice di rifrazione delle membrane neuronali/nervose. A partire da questa osservazione, i metodi ottici nel vicino infrarosso sono stati utilizzati con successo per determinare tali variazioni di scattering in esseri umani adulti. Questo rapido segnale ottico sembra mostrare lo stesso decorso temporale delle risposte fisiologiche misurate con EEG o tecniche elettrofisiologiche [12]. Ulteriori indagini sul segnale ottico veloce sono necessarie per verificare la sua attendibilità, su cui attualmente non tutti i ricercatori hanno opinioni concordi [72].

### 1.2.3 **Strumentazione fNIRS**

Il numero di sorgenti e di rilevatori, la loro disposizione spaziale e le caratteristiche del fascio luminoso emesso dalla sorgente sono scelte molto importanti, che dipendono dal tipo di informazioni che si vuole raggiungere.

Inizialmente si utilizzava solamente una coppia sorgente-detettore, ottenendo un segnale relativo ad un'unica ristretta regione di tessuto. In seguito, si cominciarono ad utilizzare più coppie sorgente-detettore distribuite sul tessuto di interesse (per esempio sullo scalpo): l'acquisizione simultanea di più segnali NIRS tramite un array di fibre ottiche ha permesso di sviluppare mappe superficiali dei tessuti sotto indagine (topografia ottica NIR), ma anche immagini trasversali o 3D del tessuto tramite la cosiddetta tomografia ottica diffusiva (DOT). I fotoni come si è visto si propagano in maniera diffusa portando poche informazioni spaziali del volume attraversato: i tradizionali algoritmi di retroproiezione sviluppati per la TAC hanno perciò scarsa applicabilità. Per costruire nuovi algoritmi di retroproiezione e generare mappe tridimensionali, i sistemi DOT utilizzando una matrice di rivelatori che misura con massima risoluzione la luce riemessa in superficie ed elaborano queste informazioni con modelli statistici basati sull'equazione di diffusione dei fotoni (formula 1.2.9) e con informazioni derivate dall'equazione di trasporto delle radiazioni. Si tratta di metodologie molto complesse ed in continuo sviluppo (com'è evidenziato in Hielscher et al. 2002 [26]), che richiedono conoscenze approfondite sull'interazione della luce con mezzi altamente diffusivi e non omogenei.



**Figura 1.2.3.a** – Esempio di una struttura usata per applicare più sorgenti (cerchi rossi) e rivelatori (cerchi verdi) [60]

Ciò che accade nell'accoppiamento fra la superficie degli strumenti ottici (sorgente e/o rivelatore) e la superficie del tessuto è difficile da misurare e molto sensibile alle variazioni temporali delle caratteristiche dei tessuti di superficie. Una tecnica di misurazione che permette di superare questo ostacolo è la spettroscopia

risolta nel dominio dello spazio (SRS), chiamata anche spettroscopia a più distanze (MD). La SRS, usata per esempio da S. Matcher et al. 1995 [33] e da S. Fantini et al. 1995 [34], si basa sulla misura di intensità della luce riemessa a varie distanze dalla sorgente. Assumendo che l'accoppiamento superficiale sia uguale per ogni coppia sorgente-rilevatore (indipendentemente dalla distanza), non si rendono più necessarie precise assunzioni sull'interazione di superficie: la misura dell'intensità luminosa viene eseguita in funzione della sola distanza sorgente-rilevatore, ottenendo dei parametri indipendenti dagli effetti di accoppiamento. Inoltre con questo approccio gli strati superficiali del tessuto (come per esempio lo scalpo e le ossa del cranio nelle applicazioni di attivazione cerebrale) hanno lo stesso effetto su tutti i fasci di luce e quindi la loro influenza si annulla (M. A. Franceschini et al. nel 1998 [35]).

Anche i tipi di sorgente luminosa si sono evoluti nel tempo ed hanno condotto ad avere oggi a disposizione tre tipologie principali di sistemi per la fNIRS: spettroscopia ad onda continua (CW), risolta nel dominio del tempo (TRS) e risolta nel dominio della frequenza (PMS).

La prima a svilupparsi fu la spettroscopia ad onda continua (CW) che misura solamente le variazioni di intensità della luce. Questo tipo di strumentazione ha il vantaggio di essere poco costosa e facilmente trasportabile (disponibile anche con strumentazione wireless), ma permette solo misure di variazione relativa di concentrazione dei cromofori rispetto al livello basale (fatta eccezione per i valori assoluti di saturazione di ossigeno nel sangue venoso riportati per esempio in Franceschini et al., 2001 [36]) poiché si basa su assunzioni semplificative circa la natura dei tessuti attraversati dalla luce e delle modifiche che avvengono all'interno del volume. Inoltre è molto sensibile agli artefatti da movimento.

Per poter quantificare meglio il valore di concentrazione dei cromofori, oltre alla misura di attenuazione della luce, serve anche il tempo di volo (TOF), che può essere per esempio rilevato tramite la spettroscopia risolta nel dominio del tempo o della frequenza.

La spettroscopia risolta nel dominio del tempo (TRS), studiata per la prima volta nel 1988 [8,22], si basa su sorgenti laser che emettono impulsi della durata di pochi picosecondi e detectors che rilevano l'evoluzione temporale dell'intensità della luce riemessa dopo aver attraversato il mezzo: le latenze dei picchi sono indicative della lunghezza del cammino medio dei fotoni, che a sua volta dipende dai coefficienti di



scattering. L'impulso generato viene dilatato a causa del processo di dispersione, e l'intensità si riduce a causa dell'assorbimento. Si può così costruire un istogramma (numero di fotoni rispetto ai tempi di arrivo) che contiene anche informazioni riguardo la profondità del percorso fotonico, perché i fotoni che arrivano più tardi hanno una maggiore probabilità di avere viaggiato più a fondo. In questo modo, a partire dall'istogramma, è possibile misurare i coefficienti sia di scattering che di assorbimento e da quest'ultimi si ricavano i valori di concentrazione dei cromofori. Questa tecnica può essere utilizzata anche per l'imaging tridimensionale e la tomografia, perché fra le altre raggiunge teoricamente la risoluzione spaziale migliore [12]. Lo svantaggio maggiore della tecnica TRS è invece il costo della sofisticata strumentazione, attualmente ingombrante e molto delicata (uso di fibre di vetro) e per questo ancora scarsamente diffusa in commercio. Inoltre i tempi di acquisizione per avere un sufficiente livello di SNR (rapporto segnale/rumore) sono lunghi.

La spettroscopia risolta nel dominio della frequenza (conosciuta anche come spettroscopia a modulazione di fase PMS o di intensità) è invece stata proposta la prima volta da Gratton et al. nel 1990 [38] e sfrutta sorgenti luminose che emettono un'onda continua modulata in ampiezza a frequenze radio. Di fatto si basa sugli stessi principi della TRS lavorando in frequenza: permette di misurare dalla luce che riemerge dal tessuto, oltre all'intensità media e all'ampiezza delle oscillazioni, anche la differenza di fase (contiene di fatto le informazioni sul tempo di volo). Rispetto a TRS i sistemi nel dominio della frequenza hanno il vantaggio di essere meno costosi (anche se comunque molto più costosi di CW), sono generalmente più veloci, hanno una maggior risoluzione temporale e presentano un migliore SNR (rapporto segnale/rumore). Tuttavia, essi possono fornire solo informazioni ad un numero finito di frequenze di modulazione, mentre, per ottenere le stesse informazioni della spettroscopia nel dominio temporale, la PMS richiederebbe la scansione attraverso tutte le frequenze (da 50 MHz a 1 GHz). La maggior parte degli strumenti in commercio sono strumenti PMS a singola frequenza di modulazione di ampiezza, di facile trasporto e con un buon livello SNR.

Negli anni '90 è stata sviluppata anche una metodologia di cosiddetto "imaging a banda larga" o "second differential spectroscopy" (per esempio in [38-40]), che anziché generare un fascio di luce ad una precisa lunghezza d'onda nel vicino

infrarosso, proietta nel tessuto un fascio di luce bianca e misura, nel sito di rilevamento, l'intero range di lunghezze d'onda tramite uno spettrometro. La disponibilità di uno spettro permette di identificare con maggior precisione il tipo di cromofori presenti nel tessuto e sotto certe ipotesi si può risalire anche ai valori assoluti di concentrazione; l'utilizzo delle derivate tuttavia riduce il rapporto segnale/disturbo mentre l'impiego di una "banda larga" richiede l'aumento in potenza della sorgente luminosa, con il conseguente riscaldamento dei tessuti.

Infine, negli ultimi anni, si sta sviluppando la "diffusing-wave spectroscopy" (DWS) o spettroscopia di correlazione diffusa (utilizzata per esempio in J. Li et al. 2005 [41], Y. Guoqiang et al. 2005 [42]). E' una tecnica che permette di analizzare il flusso sanguigno osservando l'autocorrelazione degli schemi di interferenza costruttiva/distruttiva della luce nei tessuti. Essendo appena nata, la strumentazione DWS è ancora molto costosa ma con ampie prospettive di sviluppo [13].

### **1.3 Applicazioni della fNIRS in letteratura**

La spettroscopia funzionale nel vicino infrarosso permette di misurare le variazioni di concentrazione di emoglobina ossigenata e deossigenata. Da queste misure si possono valutare un gran numero di parametri fisiologici quali flusso sanguigno, volume ematico, indice di ossigenazione, saturazione venosa di ossigeno, consumo di ossigeno, compliance e tempo di recupero muscolare. La Tomografia Ottica inoltre può fornire informazioni complementari a quelle ottenibili con altre tecniche (TAC, fMRI, PET) o addirittura non con queste ottenibili e visualizzare in modo selettivo specifiche strutture dell'organismo. Il campo applicativo è perciò enorme, non solo come strumento di imaging cerebrale, ma anche di indagine, diagnosi e monitoraggio in tempo reale in numerosi altri ambiti: imaging neonatale, studio dell'attività metabolica muscolare, diagnosi tumorale, monitoraggio sportivo, etc.

Fin dalla sua nascita i principali soggetti delle misurazioni della fNIRS sono due: il cervello ed i muscoli. Il campo di sperimentazione di maggiore interesse è lo studio dell'emodinamica cerebrale, soprattutto in relazione all'attivazione neuronale e alle funzioni cognitive. Anche se il rapporto tra l'attività neuronale e la risposta

vascolare non è ancora pienamente compreso, è ben noto che all'attività cerebrale è associata una variazione locale di flusso sanguigno e di ossigenazione: un aumento del flusso sanguigno, che a sua volta aumenta l'ossigenazione media locale, riflette un aumento dell'attività neuronale. I valori di perfusione cerebrale e di volume ematico, sono dunque fattori importanti nella stima dell'attività neurale.

Sono numerosissime le applicazioni della fNIRS che valutano quantitativamente funzioni cerebrali di adulti, bambini e neonati (anche prematuri) in stato sano o patologico, come negli esempi in figura 1.3.a. Generalmente si chiede al soggetto, bambino o adulto, di eseguire un semplice task motorio (sbucciare una mela, muovere le dita) o sensoriale (osservare un'immagine, ascoltare un suono) o un più complesso task cognitivo (che permetta di valutare aspetti come l'attenzione, la memoria, la pianificazione o il problem-solving) per analizzare i corrispondenti meccanismi di attivazione neuronale. La maggior parte degli studi neonatali si concentrano invece sulla stimolazione sensoriale, come stimoli visivi, uditivi e olfattivi, e sullo studio delle disfunzioni cerebrali. Il metodo fNIRS è particolarmente adatto per gli studi su neonati e bambini in quanto le apparecchiature sono sicure, non invasive, trasportabili e confortevoli: l'uso di questa modalità di neuroimaging apre nuove porte per lo studio dello sviluppo dell'encefalo e dei disturbi pediatrici che finora è stato limitato a causa della sensibilità ad artefatti da movimento, dall'invasività delle apparecchiature e dagli ambienti di acquisizione claustrofobici.



**Figura 1.3.a** – Esempi di applicazioni fNIRS in neonati e bambini [s1,s2].

Sono numerosi ed in continuo aumento gli studi fNIRS su soggetti con disfunzioni cerebrali, come ad esempio l'epilessia, la depressione, l'Alzheimer, il PTSD (post-traumatic-stress disorder), i disturbi dell'attenzione, i disturbi d'umore e gli attacchi di panico. Un compito di fluidità verbale è stato per esempio

somministrato da Hock et al. [43] a malati di Alzheimer e a soggetti normali, valutando le variazioni di concentrazione di emoglobina ossigenata sia da acquisizioni fNIRS, sia da acquisizioni simultanee PET. Durante il task, in entrambi i segnali acquisiti è stata rilevata una diminuzione della concentrazione di emoglobina ossigenata nei pazienti con Alzheimer mentre la stessa aumentava nei soggetti sani. Suto et al. [44] hanno invece condotto task di fluidità verbale e di "finger tapping" in pazienti con depressione, con schizofrenia e in soggetti normali: le risposte emodinamiche misurate hanno mostrato andamenti molto differenti nelle tre tipologie di soggetti, con valori di picco molto più elevati nei soggetti patologici [11].

L'analisi delle funzioni cognitive tramite la fNIRS ha anche portato a recenti applicazioni nella Brain-Computer-Interface, BCI (per esempio [45-46]), e in studi di correlazione fra risposta emodinamica e modelli cognitivi computazionali. Satoshi Kishi et al. [46] per esempio hanno sviluppato molto recentemente un'interfaccia uomo-robot, che ha l'ambizione di carpire ciò che l'uomo desidera misurando direttamente nel suo cervello le attività biologiche mediante spettroscopia funzionale NIR ed il segnale EEG.



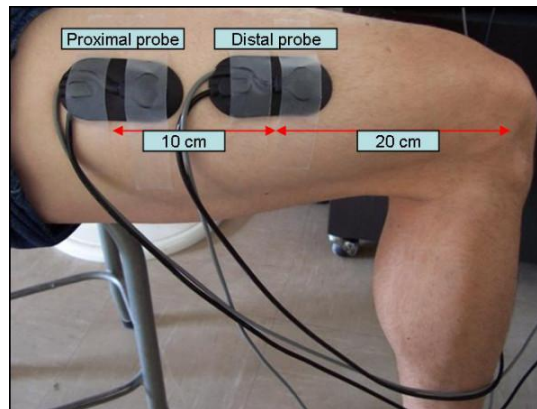
**Figura 1.3.b** – Esempi di un'applicazione BCI che sfrutta il segnale fNIRS [s3]

Nel cervello, oltre all'attivazione neuronale, sono stati affrontati molti altri aspetti tramite la spettroscopia funzionale nel vicino infrarosso, spaziando dalla medicina di emergenza alla fisiologia d'alta quota. Gli sviluppi 3D della tomografia ottica diffusiva (DOT) hanno per esempio permesso di individuare emorragie ed ematomi sub-cranici, perché le masse localizzate di sangue uscito dai vasi assorbono fortemente la luce NIR. Numerosi studi hanno inoltre dimostrato le potenzialità delle

tecniche di imaging fNIRS nel monitorare i parametri cerebrali in pazienti soggetti ad ictus, ove il flusso ematico cerebrale, il volume del sangue, e l'ossigenazione del cervello sono in costante evoluzione e una strumentazione di imaging real-time e trasportabile è altamente auspicabile [26].

La fNIRS è stata applicata anche in studi di fisiologia d'alta quota (Imray et al. per esempio hanno studiato la saturazione locale di ossigeno nel cervello in soggetti che salivano rapidamente a 4680 m [31]), ma costituisce un valido strumento di ricerca anche in campo di difesa e sicurezza: ci sono potenziali applicazioni sia nel valutare l'affaticamento degli operatori in ambienti di forte rischio e stress, sia in medicina d'emergenza (per esempio in campo di battaglia).

Oltre al cervello, il tessuto muscolare è un altro grande oggetto di indagine della spettroscopia funzionale nel vicino infrarosso. Molti ricercatori hanno monitorato il metabolismo cellulare nei muscoli tramite il citocromo ossidasi, ma l'accuratezza e la validità di questo tipo di misurazioni sono tutt'oggi al centro di un grosso dibattito. Lo studio del metabolismo muscolare è un ambito di forte interesse anche per la medicina dello sport (com'è spiegato in *The use of near infrared spectroscopy in sports medicine* [47]) e per questo la fNIRS è già stata impiegata per ottenere ed elaborare numerosi parametri medico-sportivi come il flusso sanguigno, il consumo locale di ossigeno (Sakai et al., 2005 [48]), la compliance del microcircolo (Binzoni et al., 2000 [49]), il tempo di recupero nonché la relazione fra la forza muscolare e l'ossigenazione (Yamaji, 2004 [50]) in diverse tipologie di test (carico costante, carico incrementale fino ad esaurimento e svariate condizioni di fatica muscolare). Il flusso sanguigno e l'ossigenazione locale dei muscoli sono stati studiati anche in pazienti con broncopatie croniche ostruttive (per esempio da Odagawa et al. 2009 [51]) o per indagare particolari patologie vascolari periferiche.



**Figura 1.3.c** - Esempio di misurazione fNIRS mirata al tessuto muscolare [s4]

Vi sono infine numerose altre applicazioni, già attive o in fase di sperimentazione, che coinvolgono i più svariati ambiti e metodologie di acquisizione: un considerevole sforzo è stato indirizzato verso lo sviluppo di un metodo ottico per la diagnosi precoce del tumore al seno, sfruttando le differenti proprietà ottiche del tessuto tumorale rispetto ad un tessuto sano. In particolare, la fNIRS sembra essere in grado di individuare quelle zone che presentano un aumentato metabolismo che si verifica nella fase di formazione dei tumori. Recenti studi fNIRS dimostrano come sia possibile individuare precocemente tumori che con tecniche convenzionali (ad esempio raggi X) non sarebbero altrettanto precocemente individuabili [73]. Con lo stesso principio numerosi studi fanno pensare che la DOT possa divenire a breve un nuovo strumento di imaging per il monitoraggio e la diagnosi precoce (attualmente inesistente) dell'artrite reumatoide, sfruttando le particolari proprietà ottiche del liquido sinoviale [26].

In pazienti con insufficienza cardiaca, le acquisizioni fNIRS hanno aiutato a determinare il livello critico di ossigeno del sangue con conseguente miglioramento dei trattamenti. Nel 2002 Weiss et al. [52] hanno cercato di misurare la saturazione di ossigeno nella vena epatica nei bambini sottoposti a cateterismo cardiaco tramite misure fNIRS transcutanee con una sonda posta sopra il fegato palpabile: i risultati tuttavia non sono stati soddisfacenti, poiché il segnale era dominato da variabili non epatiche.

Infine è attualmente di grande interesse lo sviluppo di metodi ottici per l'imaging molecolare: grazie alla scoperta di nuovi marcatori biochimici in grado di rilevare geni difettosi e processi molecolari che precedono lo sviluppo di una malattia: si potrebbe anticipare la comparsa dei sintomi effettivi. La ricerca in questa direzione è

stata supportata da notevoli risorse fornite dal National Institutes of Health (NIH) per malattie come il cancro, il diabete, le malattie cardiache e l'artrite [26].

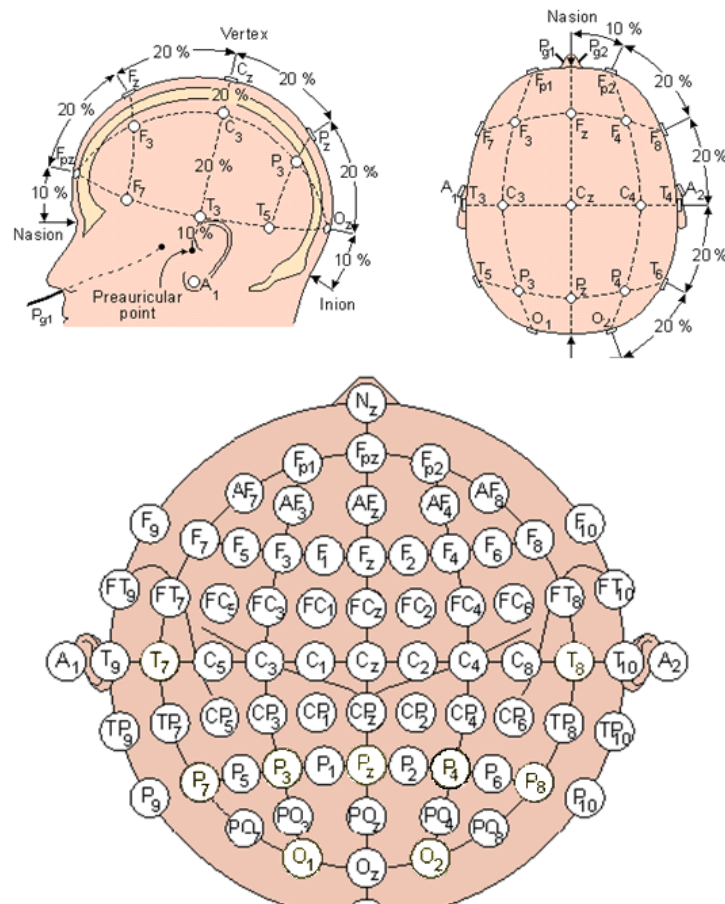
## **1.4 Confronto tra fNIRS e altre metodologie di neuroimaging**

Le immagini funzionali hanno lo scopo di fornire informazioni qualitative e quantitative utili a comprendere meglio la fisiologia e le funzioni delle cellule, dei tessuti e degli organi analizzati. Il Neuroimaging funzionale utilizza varie tecniche al fine di analizzare e studiare la relazione tra l'attività di determinate aree cerebrali e specifiche funzioni. In questo paragrafo si introducono brevemente le due principali tecniche di imaging funzionale (PET e fMRI) e la tecnica EEG per poi mettere in luce i vantaggi e gli svantaggi della spettroscopia funzionale nel vicino infrarosso, focalizzandosi sulle applicazioni di neuroimaging funzionale.

### **1.4.1 EEG e ERP**

L'elettroencefalografia (EEG) è una tecnica messa a punto già negli anni '20 per la registrazione non invasiva del segnale elettrico cerebrale. Gli elettrodi posti sullo scalpo misurano le variazioni del potenziale elettrico raccogliendo così informazioni sull'attività dello strato superficiale della corteccia cerebrale. L'attività spontanea del cervello si sovrappone a segnali specifici legati ad un eventuale compito (sensoriale, motorio o cognitivo) in cui il soggetto è coinvolto durante la registrazione. Dal confronto fra l'attività spontanea e la sua variazione durante l'attività indotta è possibile individuare, anche in tempo reale, le aree di maggiore attività elettrica. L'attuale possibilità di registrare più canali contemporaneamente permette di generare una mappa cerebrale (EEG topografico) della distribuzione spaziale di tale attività elettrica.

Per consentire l'esatta localizzazione e la replicabilità delle diverse misure EEG, è stato sviluppato un sistema universale di posizionamento degli elettrodi sul cuoio capelluto, conosciuto come *sistema internazionale 10/20*.



**Figura 1.4.1.a** - Posizione degli elettrodi secondo il sistema internazionale 10/20 [s10].

Questo sistema, illustrato in figura 1.4.1.a, descrive l'esatta posizione di ogni elettrodo, consentendo una buona copertura di tutta la superficie encefalica e garantendo che gli elettrodi siano posizionati sopra precise aree anatomiche: esso prevede di disegnare sulla superficie del cranio una rete di linee immaginarie a partire da specifici punti anatomici (come il punto preauricolare, il nasion e l'inion). Gli elettrodi vanno posizionati nei punti di intersezione di questa rete: la distanza tra un elettrodo e l'altro corrisponde sempre al 10% o al 20% della lunghezza totale della linea di appartenenza. Ad ogni posizione è associato un label, composto da una o più lettere e da un pedice. La lettera C indica gli elettrodi centrali, mentre le altre lettere prendono il nome dal lobo cerebrale sottostante: frontopolare (Fp), frontale (F), temporale (T), parietale (P) e occipitale (O). Il pedice invece è costituito da un numero o dalla lettera z. Il numero ha valori più bassi in posizione mediale ed è dispari per il lato sinistro (1, 3, 5, 7) e pari per il lato destro (2, 4, 6, 8). La lettera z



prende il posto dei numeri quando gli elettrodi si trovano sulla linea mediana interemisferica.

Esiste uno stretto rapporto fra il segnale EEG misurato e lo stato di attivazione neuronale. Quando la corteccia è impegnata nella elaborazione di informazioni (per esempio un compito di problem solving), molti neuroni si attivano (generando una differenza di potenziale) ma in modo non sincronizzato: il segnale elettrico misurato sullo scalpo, che risulta dalla somma di tutte le attivazioni, ha dunque una frequenza maggiore ma un'ampiezza minore. Quando invece la corteccia non è particolarmente implicata nei processi di pensiero (es. sonno profondo) i neuroni mandano un input più lento, fasico, da cui deriva un segnale con frequenza più lenta e ampiezza maggiore. Per questo motivo il ritmo del segnale EEG associato alla veglia attiva (onde beta, frequenza 14÷30 Hz, ampiezza 2÷20  $\mu$ V) ha per esempio valori di frequenza maggiore e di ampiezza minore rispetto al ritmo del segnale EEG associato al sonno profondo (onde delta, frequenza 0.5÷3.5 Hz, ampiezza 20÷100  $\mu$ V). Nell'interpretazione del segnale EEG è molto utile l'analisi dell'ampiezza e l'analisi correzionale (calcolo del grado di somiglianza tra due segnali inter/intra soggetto), ma l'ispezione visiva risulta ancora importante per identificare particolari ritmi (come la banda alfa o passaggio dal ritmo alfa ad altri ritmi).

Attualmente l'EEG viene utilizzato soprattutto come ausilio nelle diagnosi di determinate condizioni neurologiche, in particolare crisi epilettiche, e per scopi di ricerca, tra cui gli studi del sonno. Dal punto di vista cognitivo e funzionale, uno degli ambiti di impiego dell'EEG di maggior interesse è l'analisi dei potenziali evento-relati (ERP), ovvero di quei potenziali elettrici generati, a livello del sistema nervoso centrale (o periferico), in seguito ad una stimolazione sensoriale (acustica, visiva,...). Lo studio degli ERPs si è rivelato uno strumento importante, oltre che per i ricercatori, anche per i clinici, perché essi forniscono una registrazione temporale precisa della sottostante attività neuronale, permettendo per esempio di identificare a quale livello sia localizzato il deficit funzionale in pazienti neurologici o di descrivere il corso temporale dei processi cognitivi.

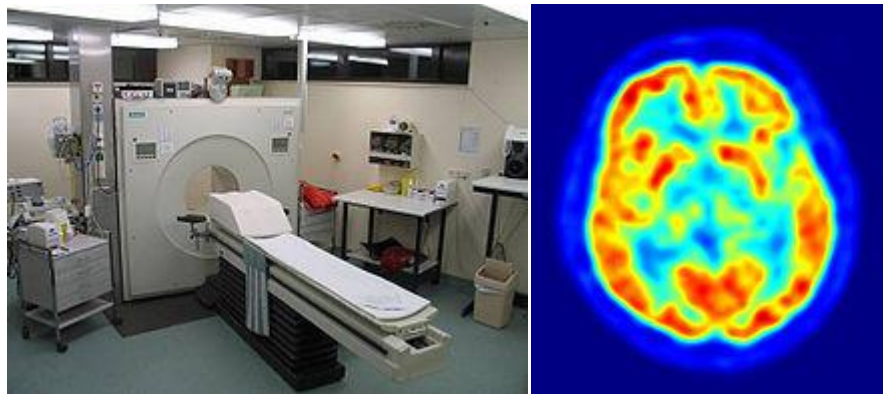
L'acquisizione indolore e non invasiva è fra i maggior vantaggi della registrazione EEG. Se la risoluzione temporale del segnale è fra le migliori ottenibili nel monitoraggio dell'attività cerebrale (~ms), la bassa risoluzione spaziale (~cm) dell'EEG è il suo limite maggiore: gli elettrodi rilevano infatti esclusivamente la

corrente che giunge alla superficie del cranio, e non è possibile risalire con precisione alle sorgenti di tale attività elettrica; esse possono solo essere stimate, ricorrendo a complessi algoritmi di ricostruzione. Per questo la localizzazione dell'attività neurale permessa dall'EEG può dare informazioni solo a livello dei lobi cerebrali attivati.

#### **1.4.2 PET**

La tomografia ad emissione di positroni ha cominciato a svilupparsi negli anni '70. Una tipica procedura di acquisizione inizia con l'iniezione (solitamente in vena) di un tracciante isotopo, legato chimicamente ad una molecola attiva a livello metabolico. Quando l'isotopo decade, emette un positrone che si annichila subito dopo con un elettrone producendo una coppia di fotoni gamma emessi in direzioni opposte fra loro. Il rilevamento contemporaneo di due fotoni (entro un intervallo di tempo detta finestra temporale di coincidenza, in genere da 4 a 10 ns) definisce una linea lungo la quale l'evento si è verificato, da centro a centro dei rivelatori coinvolti (numerosi rivelatori sono disposti ad anello attorno all'organo studiato). Mediante una tecnica di retroproiezione, ogni anello di rivelatori consente di generare l'immagine tomografica del piano corrispondente. Accostando più anelli si ottiene una rappresentazione 3D della distribuzione dell'isotopo radiattivo nell'organismo studiato. La distanza fra una scansione e la successiva è di circa 5 mm.

I traccianti utilizzati in PET hanno un'emivita (tempo occorrente perché la metà degli atomi di un campione puro dell'isotopo decadano) assai breve: questo riduce la quantità di radiazioni ricevuta dal paziente e permette comunque una buona riuscita dell'esame (la maggior parte dei processi metabolici avviene rapidamente), ma costringe la loro produzione in loco mediante ciclotrone. La disponibilità di traccianti fisiologici che mimano il comportamento metabolico di sostanze come il glucosio o l'ossigeno, e che si accumulano nei punti di maggior consumo, permette non solo una valutazione qualitativa dei parametri funzionali, ma anche una loro stima quantitativa. La figura 1.4.2.a mostra una tipica apparecchiatura per la PET ed un esempio di scansione cerebrale ottenuta con questa strumentazione.



**Figura 1.4.2.a** - Tipica apparecchiatura per la PET ed esempio di scansione cerebrale [s5]

La PET è usata soprattutto in cardiologia, in neurologia e in oncologia. In neurologia sono state realizzate metodiche di studio dell'epilessia, dei tumori al cervello, dell'ictus e della malattia di Alzheimer, di Parkinson e della sindrome Down. La PET è inoltre utilizzata per la localizzazione di foci epilettogeni (punti in cui originano gli attacchi epilettici) e per identificare il sito di eventuali interventi chirurgici. Le principali applicazioni della PET in oncologia riguardano la segnalazione e la stadiazione di tumori, consentendo di evitare il ricorso a biopsie.

La strumentazione attuale permette lo studio (con una singola scansione) di aree di 15 cm di lunghezza, si può quindi ottenere un'immagine per esempio della distribuzione di FDG (tracciante del glucosio) nell'intero corpo in circa 40 minuti. La risoluzione spaziale dell'attività metabolica è tipicamente limitata a volumi di circa 5-10 mm<sup>2</sup>: un tale volume può contenere migliaia di neuroni ed è quindi sufficiente per individuare aree corticali e subcorticali e anche per rilevare una variazione funzionale entro una certa area della corteccia cerebrale [1]. La PET fornisce immagini con una risoluzione spaziale inferiore a quella di CT (computed tomography) e MRI e scarsi riferimenti anatomici; per questo il suo utilizzo è sempre associato ad un attento confronto con CT o MRI.

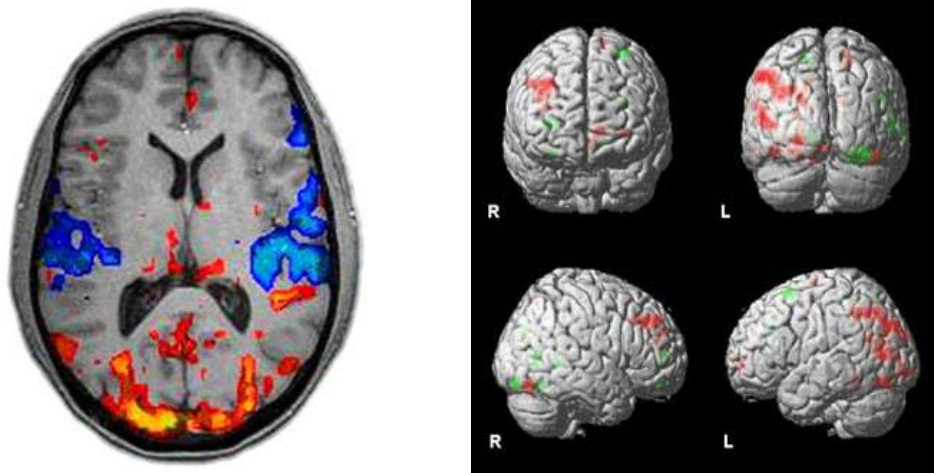
A causa del loro alto costo, dovuto all'esigenza di produrre in loco i traccianti, di sofisticata elettronica e di personale altamente specializzato, i tomografi PET sono stati per lungo tempo utilizzati in un numero limitato di laboratori avanzati di ricerca. Solo negli ultimi 10 anni la scoperta della loro potenzialità oncologica ha portato ad una loro più ampia diffusione negli ambienti ospedalieri [54].

### **1.4.3 fMRI**

Misure di parametri emodinamici locali si possono ottenere con diverse tecniche di acquisizione che sfruttano lo strumento di risonanza magnetica. In alcuni casi si usano traccianti esogeni: un esempio è la quantificazione di immagini DSC-MRI (dynamic susceptibility contrast magnetic resonance imaging) che utilizza le proprietà paramagnetiche del gadolinio per ottenere una stima del CBF (perfusion cerebrale), del CBV (volume ematico) e MTT (tempo medio di transito). La ASL (Arterial Spin Labeling) è invece un metodo alternativo che utilizza come tracciante endogeno le molecole di H<sub>2</sub>O presenti nel sangue: analogamente alla PET, anche l'ASL misura specificamente il parametro CBF (e questo la rende adatta a studi di imaging funzionale), ma non fornisce misure di CBV e di MTT.

La tecnica che ha però rivoluzionato lo studio della funzionalità cerebrale è la risonanza magnetica funzionale (anni '90) basata sulla misura del segnale BOLD (Blood Oxygenation Level Dependent): dalla sua nascita lo studio del cervello è stato esteso all'analisi funzionale di singole regioni che vengono evocate mediante semplici compiti che il soggetto deve eseguire durante l'esame. Tali compiti possono essere di natura sensoriale, motoria, verbale, cognitiva etc. a seconda della particolare funzione che si vuole indagare.

Le misure fMRI si basano sulle proprietà magnetiche di emoglobina ossigenata (diamagnetica) ed emoglobina deossigenata (paramagnetica). Il principio di funzionamento è lo stesso della risonanza magnetica tradizionale: onde radio causano l'oscillazione dei protoni degli atomi di idrogeno, quindi un sensore misura i campi locali di energia emessi quando i protoni ritornano all'orientamento del campo magnetico esterno. Nell'fMRI però si sfrutta il segnale BOLD che dipende dal bilancio tra consumo di ossigeno e apporto di ossigeno nella regione cerebrale sotto indagine. L'emoglobina deossigenata, essendo paramagnetica, genera campi magnetici locali che interrompono l'omogeneità del campo applicato esternamente con conseguente diminuzione di segnale in quel punto. Il momentaneo aumento del segnale fMRI indica invece un aumento della concentrazione relativa di ossiemoglobina e quindi un aumento dell'attività neuronale. La figura 1.4.3.a mostra alcuni esempi di immagini ottenute mediante acquisizioni fMRI.



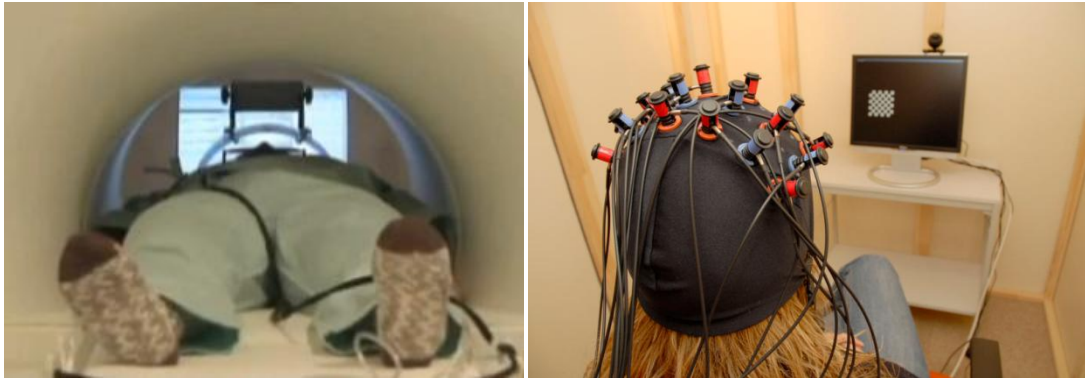
**Figura 1.4.3.a** - Esempio di immagini ottenute mediante fMRI [s6,s7]

Sono molte le applicazioni dell'fMRI, nel planning pre-chirurgico, nella comprensione dei meccanismi di riorganizzazione funzionale in soggetti con particolari lesioni encefaliche, ma l'fMRI è soprattutto risultata uno strumento unico per le neuroscienze nella comprensione dei meccanismi neurofunzionali.

La tecnica fMRI può essere considerata come lo standard di riferimento rispetto al quale tutte le altre tecniche di neuroimmagini devono confrontarsi. I vantaggi di questa tecnica sono diversi, primo fra tutti la registrazione non invasiva del segnale senza l'utilizzo di radiazioni ionizzanti. L'fMRI permette di localizzare, con una buona precisione spaziale, le regioni del cervello che vengono attivate durante processi cognitivi e l'introduzione di particolari sequenze di magnetizzazione consente di acquisire una immagine in meno di 100 ms, effettuando una scansione dell'intero cervello in 1÷2s. Ciò nonostante la risposta BOLD ha un andamento molto lento, che non consente di registrare le veloci dinamiche temporali che caratterizzano i processi cognitivi. Inoltre il rapporto segnale / disturbo è molto basso, il segnale è molto sensibile agli artefatti da movimento ed una singola scansione non è sufficiente a fornire le informazioni desiderate: è necessario ripetere più volte lo stimolo e mediare il segnale su più intervalli di alcune decine di secondi. Un esame fMRI generalmente ha una durata che va dai 15 minuti alle 2 ore a seconda dall'obiettivo dell'esame. Come la PET anche l'fMRI ha lo svantaggio di utilizzare una strumentazione molto costosa, ingombrante e che costringe il paziente a stare in un ambiente ristretto durante l'acquisizione. Infine, un forte limite della risonanza magnetica è l'impossibilità di sottoporre all'esame pazienti con qualsiasi tipo di oggetto ferromagnetico, compresi quelli interni (viti, placche, pacemaker).

#### **1.4.4 Vantaggi e svantaggi della fNIRS**

La tecnologia fNIRS offre senza dubbio numerosi vantaggi rispetto ad altre tecniche di neuroimaging attualmente esistenti: primo fra tutti la possibilità di eseguire le acquisizioni in condizioni naturali e in libertà di movimento. A differenza della PET e della fMRI (che richiedono al paziente di rimanere stesi, in modo poco confortevole, all'interno di una struttura stretta ed ingombrante, e in condizioni di assoluta immobilità visto che spostamenti di oltre 3 mm in acquisizioni fMRI annullano la validità dell'esame per eccesso di artefatti da movimento), il segnale fNIRS può essere acquisito indipendentemente dalla posizione del paziente, permettendo l'eseguibilità di task motori di vario livello. Le diverse condizioni di comfort del paziente, in acquisizioni fMRI e fNIRS, sono evidenziate in figura 1.4.4.a. In ambito clinico, il problema del movimento emerge con la maggior parte dei pazienti e soprattutto con i soggetti che non sono fisicamente o emotivamente preparati a questo genere di esami, come, ad esempio, persone affette da morbo di Alzheimer, schizofrenia o, semplicemente, bambini e neonati. In ambito di ricerca, la fNIRS è adatta allo studio dell'attività cognitiva, sia mentre si eseguono attività semplici (come sbucciare una mela comodamente seduti su una sedia), sia in condizioni più complesse, come quelle riportate negli studi di fisiologia d'alta quota (durante un'escursione). Questo tipo di sperimentazione coinvolge un altro aspetto importante: la facile trasportabilità della strumentazione, nonché il suo semplice funzionamento, che non richiede come per fMRI e PET personale altamente specializzato per l'acquisizione. La spettroscopia nel vicino infrarosso è l'unica metodica attualmente disponibile in grado di misurare e monitorare in modo non invasivo e continuativo direttamente nel letto del paziente l'ossigenazione e i parametri emodinamici cerebrali di adulti, bambini, neonati sia sani che patologici (malati di ictus o comunque non deambulanti, persone claustrofobiche) o con limitazioni fisiche che impediscono l'impiego di PET ed fMRI (peso, altezza, pacemaker o protesi metalliche). Tutti questi aspetti rendono la strumentazione fNIRS altamente versatile.



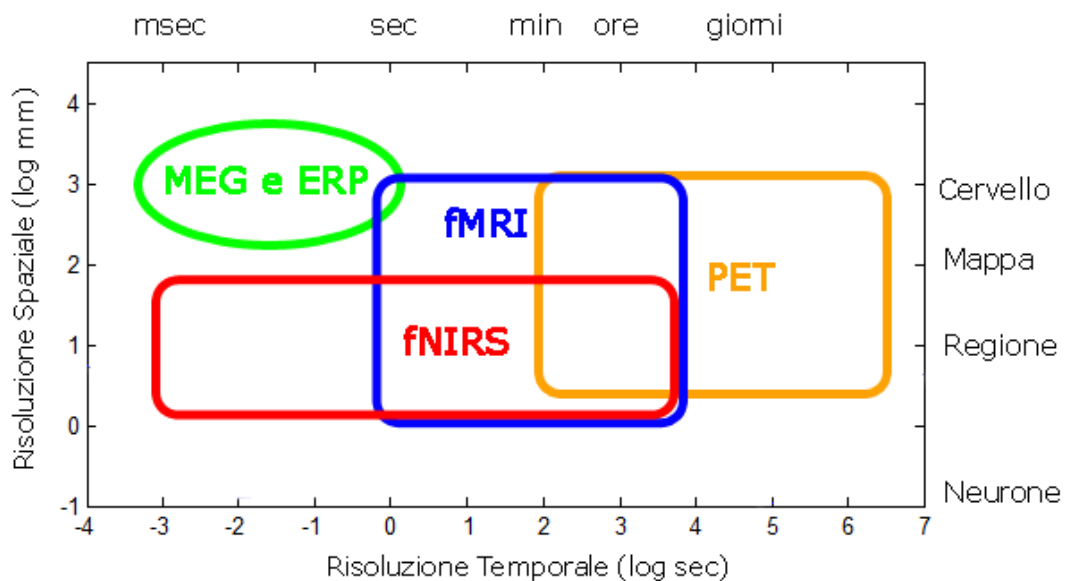
**Figura 1.4.4.a** - Diverse condizioni di confort del paziente in acquisizione fMRI e fNIRS [s8,s9].

L'applicabilità della fNIRS anche a neonati e bambini, il monitoraggio continuo dei parametri, la ripetibilità dell'esame, sono tutti aspetti resi possibili dall'acquisizione dei dati in modo assolutamente non invasivo ed in assenza di rischi biologici: non si usano traccianti esterni e radioattivi come nella PET, non vi sono dunque radiazioni ionizzanti né problemi di allergia o intolleranza al tracciante. L'applicazione delle fibre ottiche inoltre non richiede come nell'EEG di utilizzare della pasta abrasiva, può per esempio essere sufficiente un semplice meccanismo a molla che garantisca il contatto. Anche le spese di acquisto e gestione della fNIRS sono molto inferiori rispetto a quelle necessarie alla PET (che richiede anche la produzione in loco del tracciante) o all'fMRI.

Una crescente letteratura sta dimostrando la capacità unica della spettroscopia funzionale nel vicino infrarosso di rilevare segnali metabolici, emodinamici e neuronali associati all'attività cerebrale. Inoltre questa tecnica porta con sé la potenziale capacità di fornire valori assoluti (grazie a sempre più sofisticate strumentazioni e sempre più precisi modelli del tessuto biologico attraversato dai fotoni) di concentrazione di ossiemoglobina e deossiemoglobina e di altri parametri metabolici ed emodinamici. Nessun'altra tecnica di imaging è stata finora in grado di fornirli, poiché la fMRI può misurare valori relativi delle variazioni emodinamiche, l'EEG misura solo segnali elettrici, mentre la PET può misurare il flusso sanguigno, il volume ematico ed il consumo di glucosio [12]. Inoltre, rispetto all'fMRI che tramite il segnale BOLD analizza il bilancio fra ossigenazione e deossigenazione di emoglobina, la fNIRS è in grado di ottenere informazioni separate su  $\Delta\text{HHb}$  e  $\Delta\text{HbO}_2$ ; stimare con precisione le concentrazioni assolute di questi cromofori potrebbe contribuire a chiarire l'andamento temporale delle variazioni

microvascolari che stanno alla base del segnale BOLD [55]. In ogni caso, come si vedrà nel paragrafo successivo, i dati fNIRS finora acquisiti hanno mostrato ampia correlazione e confrontabilità con i risultati di altre metodologie quali fMRI ed EEG.

I sistemi per il monitoraggio funzionale non invasivo dell'attività cerebrale devono poter seguire i cambiamenti rapidi dell'emodinamica e del metabolismo ossidativo. La risoluzione temporale della fNIRS è migliore rispetto alla fMRI: alcuni ms per la fNIRS rispetto a 1-2 secondi per la fMRI [18]. Nello specifico la risoluzione temporale della fNIRS dipende molto dalla tipologia di strumentazione utilizzata: generalmente quella che permette una miglior risoluzione temporale è TRS (frequenza di campionamento di alcuni Hz). Sistemi monocanale possono avere frequenze maggiori, ma sono soggetti a molti artefatti e hanno scarse capacità di imaging.



**Figura 1.4.4.b** – Risoluzione spaziale e temporale di alcune tecniche di neuroimaging

Per quanto riguarda la risoluzione spaziale bisogna considerare due aspetti: la distanza tra sorgente e rilevatore (parallelamente alla superficie del cervello) e la profondità raggiungibile dalle acquisizioni. Per la fNIRS, entrambi gli aspetti sono fortemente dipendenti dalla disposizione di sorgenti e rivelatori sul cuoio capelluto e dal tipo di strumentazione. La risoluzione spaziale della fNIRS (1-2 cm) è leggermente migliore di quella della PET, ma inferiore o comunque meno precisa di quella della fMRI (da 3 a 6 mm). La profondità di penetrazione del segnale fNIRS è



invece di circa 25-30 mm dallo scalpo [28], ma dipende da molti fattori. Questo purtroppo è uno dei principali svantaggi della fNIRS rispetto a PET e fMRI che sono in grado di ottenere con ugual risoluzione, informazioni su tutta la sezione del cranio; la tomografia ottica diffusiva e i sistemi di topografia invece sono ancora in fase iniziale di sviluppo e forniscono informazioni solo su aree della corteccia cerebrale. La figura 1.4.4.b fornisce una rappresentazione schematica della risoluzione spaziale e temporale nelle principali tecniche di neuroimaging funzionale.

In seguito è riportata una classificazione qualitativa delle caratteristiche delle principali tecniche di neuroimaging, sia funzionali che di tipo morfologico che comprende anche DTI (diffusion tensor imaging), MEG (magnetoencephalography), MRI non funzionale, MRS (magnetic resonance spectroscopy) e SPECT(single photon emission computed tomography).

Characteristics	Less	→			More
Ability to measure both cortical and deep structures	NIRS		MEG ERP, EEG	SPECT	PET, MRS, fMRI, phMRI, DTI
Temporal resolution	MRI DTI MRS	phMRI	PET SPECT	fMRI NIRS	EEG, ERP MEG
Spatial resolution	ERP EEG	MEG	SPECT	PET	NIRS, fMRI, DTI MRI, phMRI
Invasiveness of method		ERP EEG NIRS MEG	fMRI MRI DTI MRS	phMRI	PET SPECT
Expense of method		EEG ERP NIRS	fMRI DTI MRI MRS	phMRI	PET SPECT MEG
Ease of use with developmental populations	PET SPECT	phMRI	fMRI	MRI DTI MRS	EEG, ERP NIRS

**Figura 1.4.4.c** - Confronto riassuntivo fra le diverse tecniche di neuroimaging. Tabella estratta da [3].

Oltre al campo di indagine ristretto alla corteccia cerebrale, la fNIRS presenta altre limitazioni, come un rapporto segnale/disturbo che dipende dal soggetto. Il rapporto segnale-rumore varia ad esempio in base allo spessore del cranio (uno spessore maggiore aumenta l'effetto di assorbimento e scattering) o al colore dei capelli (i capelli neri assorbono più luce rispetto ai capelli biondi). Il rapporto segnale-rumore delle registrazioni fNIRS è invece influenzato da movimenti del paziente in una quantità nettamente minore rispetto a tutte le altre tecniche di neuroimaging.

Poiché la fNIRS non è in grado di fornire informazioni di tipo strutturale, risultano molto utili acquisizioni contemporanee e coregistrazioni del segnale fNIRS con altre tecniche di neuroimaging, soprattutto di tipo morfologico. Nella strumentazione fNIRS solo fibre ottiche e materiali plastici entrano in contatto con il soggetto. Tali materiali interagiscono minimamente con campi magnetici o segnali elettrici, e questo rende possibile la coregistrazione di fNIRS con altre tecniche con minime interferenze reciproche.

Si sente infine l'esigenza di eseguire numerosi studi clinici per comprendere a fondo il significato di un nuovo parametro come la saturazione di ossigeno dei tessuti, per stabilire i suoi valori normali, e per la determinazione dei limiti che richiedono interventi terapeutici o correttivi (come la somministrazione di ossigeno). Una forte collaborazione interdisciplinare tra medici e scienziati potrebbe facilitare il corretto uso della fNIRS. La spettroscopia funzionale nel vicino infrarosso è infatti ancora in via di sviluppo rispetto alle altre tecniche più tradizionali, ma i vantaggi sopra esposti ed i risultati finora acquisiti motivano e promettono numerosi sviluppi futuri, primo fra tutti una misura dei valori assoluti di concentrazione, dando un consistente contributo per l'espansione delle applicazioni cliniche. Infine, progressi tecnologici e computazionali fanno sperare in una ricostruzione delle immagini con maggiore risoluzione spaziale e sensibilità [13].

### **1.5 Coregistrazioni fNIRS con altre tecniche di neuroimaging**

I grandi progressi nella comprensione del funzionamento del cervello umano sono stati resi possibili dallo sviluppo delle diverse tecniche di imaging funzionale, soprattutto dalla tomografia ad emissione di positroni e dalla risonanza magnetica funzionale. Anche la spettroscopia funzionale nel vicino infrarosso si sta affiancando a queste tecniche.

Molto spesso in medicina le tecniche di introduzione più recente sono complementari e non alternative o completamente sostitutive di quelle presenti. I differenti metodi sono basati su differenti proprietà dei tessuti biologici e quindi forniscono misure di differenti grandezze fisiche e biologiche delle strutture. Ogni

singola tecnica fornisce informazioni parziali, l'integrazione delle informazioni ottenute con diverse metodiche costituisce perciò un arricchimento della rappresentazione complessiva [54]. Inoltre, nonostante le conoscenze morfologiche abbiano raggiunto livelli molto elevati, le strutture anatomiche rimangono comunque particolarmente complesse, e molto variabili fra i singoli individui. Per questo motivo non è possibile separare nettamente l'imaging morfologico da quello funzionale. Anche grazie all'aiuto del computer e dell'elaborazione digitale, risulta molto utile la coregistrazione di immagini e segnali acquisiti con strumentazioni diverse, per sovrapporre immagini funzionali ad immagini morfologiche, per integrare due o più differenti modalità in modo da combinare le migliori caratteristiche di ciascuna (ad esempio l'ottima risoluzione temporale di EEG con l'elevata risoluzione spaziale di MRI o CT), ma anche per confrontare fra loro valori relativi ad aree ed istanti temporali coincidenti ma ottenuti con diversi approcci funzionali per valutarne legami e somiglianze, nonché allo scopo di ottenere una cross-validation dei metodi.

La fNIRS è una tecnica nuova, ancora in via di sviluppo che per affermarsi ha bisogno di essere validata non solo con riscontri nelle conoscenze mediche già acquisite dei fenomeni che va ad indagare, ma anche con un confronto diretto con i risultati di altre tipologie di imaging funzionale già consolidate. Per esempio studi recenti di coregistrazione fMRI-fNIRS hanno permesso di dimostrare che i cambiamenti di ossigenazione misurati con tecnica fNIRS corrispondono alle variazioni dell'intensità del segnale misurato con tecnica fMRI [56]. Rostrup et al. [74], invece, hanno confrontato le variazioni di concentrazione di ossiemoglobina e deossiemoglobina rilevate da acquisizioni di fNIRS sul cervello, con le corrispondenti variazioni di CBF (Cerebral Blood Flow) e CBV (Cerebral Blood Volume) misurate simultaneamente attraverso la PET. Il loro studio ha dimostrato una buona correlazione fra i segnali acquisiti con le due diverse tecnologie, pur concludendo che la fNIRS deve essere usata ancora con molta cautela nelle valutazioni quantitative di flusso e di volume ematico.

Negli ultimi anni sono state sempre più numerose le pubblicazioni su registrazioni simultanee e confronti fMRI-fNIRS ed EEG-fNIRS. Tutte queste metodiche sono caratterizzate da differenti risoluzioni spaziali e temporali: per poterli integrare bisogna prima rendere confrontabili i passi di campionamento

(temporale e spaziale) dei segnali acquisiti. Sassaroli et al. hanno pubblicato uno studio di coregistrazione fNIRS-fMRI proprio con lo scopo di indagare le correlazioni spaziali e temporali tra il segnale BOLD e i segnali fNIRS, mettendo in luce i vantaggi e gli svantaggi delle singole tecniche.

Segnali relativamente semplici da coregistrare sono quelli ottenuti con fNIRS ed EEG, ma richiedono un preciso posizionamento intrecciato degli elettrodi EEG con le sorgenti e i rivelatori NIRS. Nel 2009 R. J. Cooper et al. [20] hanno proposto un preciso schema di disposizione delle sonde facile da applicare per l'acquisizione simultanea di EEG e fNIRS che permette una coregistrazione ottimale delle due forme di dati e che massimizza il numero di sensori applicabili in una determinata zona. Hanno poi convalidato il progetto effettuando uno studio di semplice attivazione funzionale della corteccia motoria, ottenendo buoni risultati.

Nel 2007, in uno studio di acquisizione simultanea di elettroencefalogramma e spettroscopia funzionale nel vicino infrarosso, S.P. Koch et al. [19] hanno invece investigato un particolare indice soggettivo legato alla frequenza delle onde alfa a riposo (IAF), trovando una buona correlazione della risposta neuronale con la risposta emodinamica alla stessa stimolazione visiva. I risultati di questo studio hanno in parte potuto spiegare la grande variabilità interindividuale osservata in recenti studi di correlazione EEG-fMRI.

La coregistrazione fMRI e fNIRS richiede particolari accortezze vista l'elevata intensità del campo magnetico generato dalla strumentazione fMRI e per ridurre gli artefatti incrociati nelle due metodologie. Sassaroli et al. per esempio per studi di correlazione di questi due segnali hanno sviluppato uno speciale fMRI-compatibile ideato per migliorare l'accoppiamento tra le fibre e il cuoio capelluto. Questa accortezza ha permesso loro di ottenere risultati tali da confermare il ruolo della fNIRS come strumento affidabile per lo studio funzionale del cervello.

In generale i dati fNIRS e fMRI hanno finora mostrato buona correlazione durante protocolli motori in soggetti giovani e anziani [57]. Molti ricercatori, fra i quali anche Gary Strangman et al. [15], hanno osservato una corrispondenza spaziale approssimativa con le mappe generate con fMRI, mentre le corrispondenti variazioni di intensità dei segnali ottenuti con le due modalità sono state solo parzialmente individuate. Inoltre, nonostante ci si aspettasse una maggior correlazione tra segnale BOLD e deossiemoglobina (vista l'origine del segnale BOLD), è stata invece trovata

una correlazione maggiore tra segnale BOLD e variazione di concentrazione di emoglobina ossigenata.

Matthias Moosmann et al. [16] nel 2003 invece hanno eseguito una correlazione multipla utilizzando dati fMRI, EEG, e fNIRS per indagare se i cambiamenti del ritmo alfa dell'EEG acquisiti sull'area posteriore sono correlati con variazioni locali di ossigenazione del sangue cerebrale. Un'analisi di cross-correlazione fra le fluttuazioni lente e spontanee dei ritmi EEG nella corteccia occipitale e il segnale di risonanza magnetica ha rivelato una relazione inversa tra l'attività alfa e il livello di ossigeno nel sangue. La coregistrazione fNIRS-EEG ha invece dimostrato un cross-correlazione positiva nella corteccia occipitale tra l'attività alfa e le variazioni di concentrazione di emoglobina deossigenata, che hanno raggiunto il valore massimo dopo circa 8 s.

Acquisizioni simultanee di informazioni sull'emodinamica e sull'attività cerebrale tramite coregistrazione EEG-fNIRS hanno trovato spazio anche nella BCI, con la recente progettazione di un robot che ha l'ambizione di "quantificare e capire il nostro pensiero" e agire di conseguenza [45-46].

Tutti questi tipi di esperimenti sono solo alcuni esempi delle innumerevoli applicazioni delle modalità di coregistrazione della spettroscopia funzionale nel vicino infrarosso con le altre tecniche di neuroimaging, ma ne mostrano tutte le potenzialità di indagine. Future coregistrazioni con parametri sistemici, quali frequenza cardiaca, pressione sanguigna e frequenza respiratoria, associate allo sviluppo di nuovi algoritmi di elaborazione dei dati rivestiranno un'importanza cruciale per l'analisi e l'interpretazione dei dati fNIRS.

## **1.6 Scopo della tesi**

Numerosi gruppi di ricerca hanno recentemente cercato di caratterizzare i substrati neuronali implicati nell'utilizzo della memoria visiva a breve termine, studiando mediante acquisizioni di EEG ed fMRI gli effetti del carico informativo e della lateralizzazione sulla VSTM. I risultati finora raggiunti sono tuttavia parziali e gli indici fisiologici specifici ancora in via di definizione, soprattutto per quanto riguarda l'effetto di lateralizzazione.

Il lavoro presentato in questa tesi si inserisce in un progetto finalizzato a proporre un nuovo approccio allo studio degli effetti di carico e lateralizzazione sulla memoria visiva a breve termine usando la fNIRS, strumento mai utilizzato prima in questo ambito. Lo scopo è di mostrare, con questa nuova tecnologia, il rapporto diretto tra l'attività neuronale e le capacità di codifica e di mantenimento degli oggetti in memoria visiva, sfruttando anche l'utilizzo di algoritmi avanzati per l'elaborazione e l'analisi del segnale acquisito, come quelli messi a punto in questa tesi.

In particolare il lavoro si è concentrato sullo sviluppo di un nuovo metodo non parametrico, basato su un approccio bayesiano per la stima della risposta emodinamica mai utilizzato prima nel filtraggio di dati acquisiti con la fNIRS. Come verrà descritto in seguito, tale metodo è stato sviluppato tenendo in considerazione tutte le componenti (fisiologiche e di rumore) del segnale, con lo scopo di migliorare il rapporto segnale-rumore. L'obiettivo è ottenere delle accurate risposte emodinamiche, relative ad un paradigma sperimentale appositamente sviluppato, su cui poi valutare gli effetti del carico e della lateralizzazione sulla VSTM.

Nel prossimo capitolo verrà descritto il paradigma sperimentale e la strumentazione utilizzata per l'acquisizione dei dati fNIRS, evidenziando le ipotesi neurofisiologiche sottostanti. Successivamente saranno discussi l'algoritmo e l'implementazione (Capitolo 3).

## **2. Protocollo e Data Base**

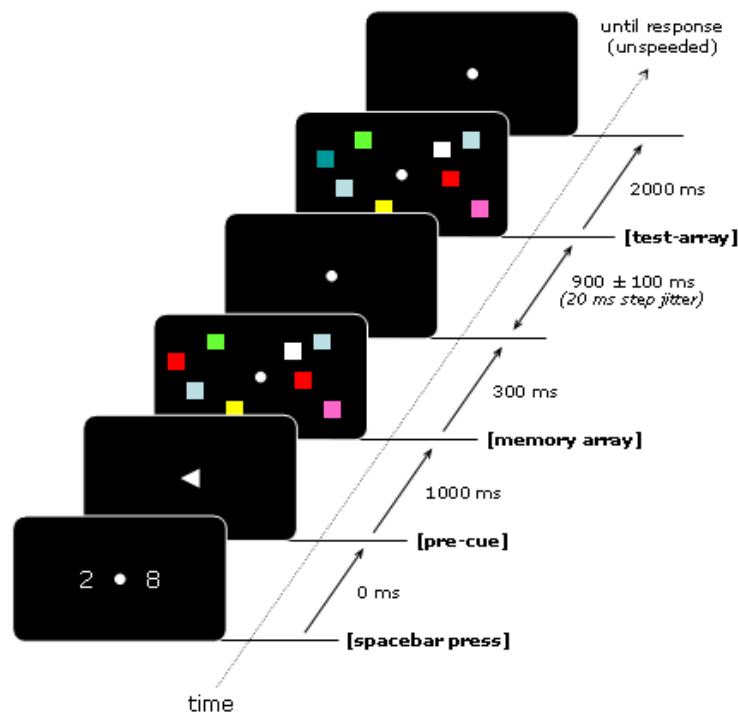
### **2.1 Descrizione del paradigma**

L'esperimento è stato condotto su 14 volontari, studenti dell'Università di Padova, con il loro preventivo consenso informato. Due partecipanti sono stati successivamente scartati dall'analisi a causa di un numero troppo elevato di risposte errate (accuratezza inferiore al 50%), e un altro a causa di un troppo debole rapporto segnale/rumore. I partecipanti inclusi nell'analisi dei dati sono stati perciò 11, 6 femmine e 5 maschi, con età media di  $23.36 \pm 2.73$  (deviazione standard) anni. La totalità dei partecipanti non riportava malattie neurologiche o psichiatriche, né era in terapia al momento dell'acquisizione. Tutti i soggetti non erano mancini e possedevano una visione normale o corretta da lenti, con una normale interpretazione dei colori.

Il paradigma sperimentale prevedeva la registrazione del segnale fNIRS proveniente dall'area parieto-occipitale (dettagli in 2.3) della corteccia cerebrale allo scopo di analizzare la risposta emodinamica di quelle aree durante uno specifico compito visivo appositamente pensato per lo studio della VSTM. I soggetti sono stati fatti sedere in una stanza insonorizzata e debolmente illuminata, su di una sedia confortevole, con lo schermo di presentazione posizionato a circa 57 cm di distanza dal viso e collocato su un tavolo posto di fronte a loro. Il personale del laboratorio, dopo aver fatto accomodare il partecipante, ha fornito informazioni sul funzionamento dell'apparecchiatura e sulle azioni di montaggio del caschetto per l'acquisizione del segnale, in modo da mettere la persona a proprio agio e consentirgli di dare il proprio consenso informato. Inoltre, dopo aver dato istruzioni sul compito da svolgere, si è concesso al partecipante di prender confidenza con il compito stesso tramite una serie di prove preventive. Sia la fase di pratica che quella sperimentale iniziavano premendo la barra spaziatrice di una tastiera per computer posta anch'essa sul tavolo di fronte al soggetto.

Gli stimoli visivi venivano presentati su di un monitor a sfondo nero. Tutti gli stimoli sono stati presentati all'interno di due regioni rettangolari  $4^\circ \times 7.3^\circ$ , centrate a  $3^\circ$  a destra e a sinistra di un punto di fissazione bianco al centro dello schermo.

L'esperimento era diviso in blocchi, come illustrato in figura 2.1.a. Ogni blocco iniziava con la comparsa del punto centrale di fissazione assieme a due numeri che i partecipanti erano istruiti a ripetere subvocalmente durante tutta la durata del blocco stesso. Questo espediente ha lo scopo di ridurre al minimo la possibilità da parte dei soggetti di ricodificare fonologicamente gli stimoli, e di dipendere da altre forme di memoria (es. verbale) per svolgere il compito visivo. I blocchi erano a loro volta divisi in prove (o trials), la prima delle quali iniziava dopo la pressione della barra spaziatrice, che provocava anche la scomparsa dei due numeri. Una illustrazione schematica di una prova (o trial) del protocollo a cui i partecipanti sono stati sottoposti è riportata in Figura 2.1.a.



**Figura 2.1.a** – Esempio schematico di un trial del protocollo a cui erano sottoposti i partecipanti.

All'inizio della prova il punto di fissazione veniva sostituito da una freccia (pre-cue) presentata in posizione centrale per 1000 ms, che indicava la porzione sinistra o destra dello schermo. Al soggetto era formalmente richiesto di spostare l'attenzione sul lato del monitor indicato dalla freccia, mantenendo però lo sguardo al centro dello schermo. Sul monitor veniva dunque presentato per 300 ms il *memory array*, costituito da un numero variabile di quadrati colorati da memorizzare. Il *memory array* era seguito da un intervallo di ritenzione (*retention interval*) di  $900 \pm 100$  ms



(variato di 20 ms in 20 ms) con il solo punto di fissazione presente sul display. Infine veniva presentato, per una durata di 2000 ms il *test array*, composto da quadrati colorati posti nelle medesime posizioni spaziali dei quadrati del *memory-array*.

Ogni *memory array* consisteva di 2 oppure 4 quadrati colorati  $0.65^\circ \times 0.65^\circ$  in ogni emi-campo. La posizione dei quadrati era randomizzata in ogni prova, con la costrizione che la distanza tra i quadrati all'interno di ciascun emi-campo fosse almeno  $2^\circ$  (centro - centro). Il colore di ogni quadrato era selezionato all'interno di un gruppo di otto colori altamente discriminabili (rosso, verde, blu, giallo, bianco, azzurro ciano, viola e arancione) e di uguale luminosità, che non potevano apparire più di 2 volte all'interno di una schermata. Il colore di uno dei quadrati del *test array* era differente dal corrispondente item del *memory array* nel 50% delle prove, mentre i colori delle due schermate erano identici nel restante 50%. Il compito richiedeva di indicare se il colore di uno dei quadrati inclusi nella porzione del *memory-array* indicata dalla freccia fosse cambiato o meno nel *test-array*, premendo rispettivamente il tasto "1" o il tasto "2" del tastierino numerico. In figura 2.1.a per esempio, il quadrato all'estrema sinistra, di colore rosso nel *memory-array*, è sostituito da un quadrato di colore blu nel *test-array*.

In tutto i partecipanti dovevano svolgere un blocco di pratica contenente 16 trials e 6 blocchi sperimentali, ciascuno composto da 24 trials, per un totale di 144 prove. L'intervallo di tempo fra l'inizio di una prova e l'inizio della successiva non era costante, ma variava fra i 15 e i 20 secondi (con passo costante su scala logaritmica, privilegiando quindi le prove di durata superiore ai 15 sec). Nell'analisi dei dati si è tenuto conto della correttezza o meno della risposta del soggetto ad ogni prova. Il tempo di reazione non è invece stato considerato, ma se dopo due secondi il soggetto non aveva ancora premuto uno dei due tasti la risposta veniva considerata errata.

Inoltre, per controllare che il soggetto avesse effettivamente tenuto lo sguardo al centro dello schermo durante la comparsa del *memory array*, assieme al segnale fNIRS è stato registrato anche il segnale EOG (elettrooculogramma). La presenza di movimenti oculari (EOG eccedente  $\pm 30 \mu\text{V}$ ) durante i 300 ms di comparsa del *memory array*, indica che in quella prova il soggetto non ha mantenuto lo sguardo al centro dello schermo. La corrispondente risposta emodinamica, se presente, può essere quindi dovuta a processi diversi da quelli coinvolti nella VSTM. Per questo motivo tali prove sono state scartate dalle analisi.

Infine, per evitare che altre zone dell'encefalo venissero attivate interferendo con la risposta emodinamica delle zone di interesse, è stato chiesto ai partecipanti di mantenere gli indici delle due mani rispettivamente sui tasti "1" e "2" con i gomiti appoggiati sul tavolo e di limitare il più possibile i loro movimenti (ad es. non tamburellare con le dita, non battere il piede o non masticare una gomma) per tutta la durata di ogni blocco (circa 7 minuti). I movimenti erano invece consentiti durante gli intervalli tra i vari blocchi.

## **2.2 Descrizione della strumentazione utilizzata per l'acquisizione**

L'unità ottica di registrazione è costituita da uno spettrometro multi-canale operante nel dominio della frequenza (ISS Imagent™, Champaign, Illinois) dotato di 32 diodi laser (16 di questi emettono luce a 690 nm, e 16 a 830 nm) modulati a 110.0 MHz. La luce emessa da ogni diodo è stata convogliata verso la testa del partecipante attraverso fibre ottiche di vetro "multimode" (fibre della serie OFS Furukawa LOWOH, di apertura numerica 0.37) con una lunghezza di 250 cm e un diametro del core di 400  $\mu\text{m}$ .

La luce diffusa attraverso il tessuto cerebrale è poi stata catturata da un fascio di fibre ottiche (3 mm di diametro) e condotta a 4 tubi fotomoltiplicatori (PMTs; R928 Hamamatsu Photonics). I PMTs sono stati modulati a 110.005 Mhz, generando una frequenza combinata di cross-correlazione a 5 KHz.



**Figura 2.2.a** – Strumentazione utilizzata per l'acquisizione dei dati, con 32 connettori per le fibre ottiche delle sergenti e 4 per le fibre ottiche dei rilevatori.

Per separare la luce in funzione della posizione della sorgente è stato utilizzato un multiplexer che permetteva a sole due sorgenti per volta (una per emisfero) di emettere luce in modo sincrono ( $T = 4\text{ms}$ ) ; poiché i canali multiplexati erano 8, il periodo di campionamento necessario a compiere un ciclo completo attraverso tutti i canali per entrambe le lunghezze d'onda è stato di  $T_{\text{tot}} = 16 \cdot T = 64 \text{ ms}$ , con una corrispondente frequenza di campionamento pari ad  $f = 15.625 \text{ Hz}$ . Per stabilizzare il segnale ottico è stata infine condotta una media dual-period, portando ad un periodo finale di campionamento pari a  $128 \text{ ms}$  ( $f = 7.8125 \text{ Hz}$ ).

Analogamente a quanto fatto in Cutini et al., 2008 [60], dopo la rilevazione e l'amplificazione del segnale ottico tramite PMTs, per ogni coppia sorgente-detettore e per ciascuna delle due lunghezze d'onda (690 nm e 830 nm), il segnale è stato convertito in corrente alternata (AC), corrente continua (DC) e segnale di fase. Da questi valori sono state poi calcolate le stime delle variazioni del coefficiente di assorbimento  $\Delta\mu_a$  con il metodo descritto nel paragrafo 1.2.2 (esposto in dettaglio in [9]). Tali stime, essendo sensibili alle differenze di età [62,63], sono state corrette utilizzando le equazioni descritte da Duncan in [61].

$$DPF_{\text{HbO}_2} = 5.13 + 0.07(0.81 \cdot \text{age}) \quad (2.2.1)$$

$$DPF_{\text{HHb}} = 4.67 + 0.062(0.877 \cdot \text{age}) \quad (2.2.2)$$

Infine, dai valori di  $\Delta\mu_a$  relativi alle due lunghezze d'onda sono state calcolate le variazioni temporali nelle concentrazioni di ossiemoglobina ( $\Delta\text{HbO}_2$ ) e di de ossiemoglobina ( $\Delta\text{HHb}$ ) come indicato in [64].

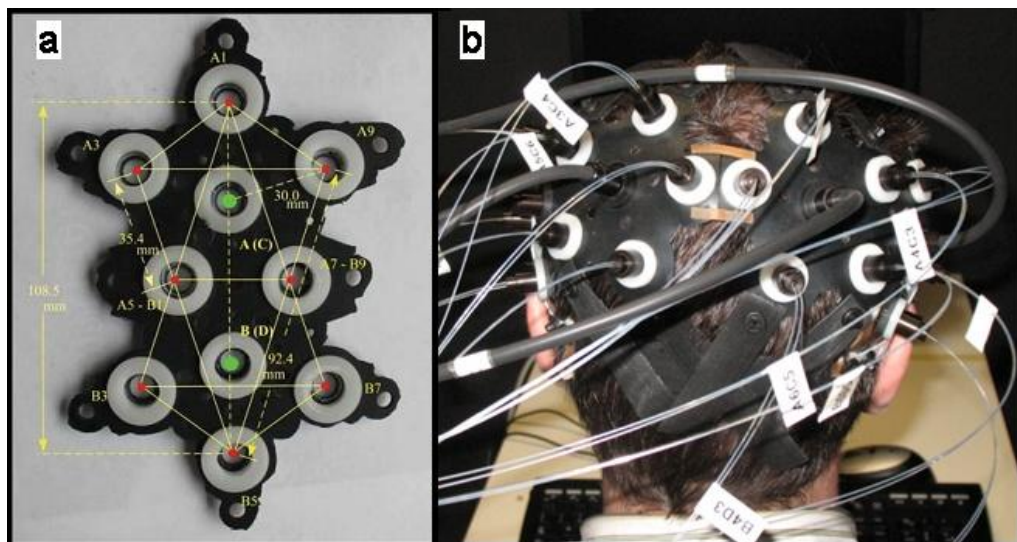
L'EOG (ElettroOculoGramma) relativo ai movimenti oculari orizzontali è stato registrato con derivazione bipolare tramite 3 elettrodi: 2 posizionati ai lati di entrambi gli occhi, vicino alle tempie del partecipante, 1 posizionato in corrispondenza del mastoide destro e utilizzato come riferimento.

### **2.3 Posizionamento delle sonde**

L'acquisizione del segnale fNIRS richiede molta attenzione nel posizionamento delle sonde (sorgenti e rilevatori): ogni fibra ottica deve essere fissata direttamente

sul cuoio capelluto, in modo da non sovrapporsi con i capelli che altrimenti interferirebbero con l'acquisizione del segnale e diminuirebbero il rapporto segnale/rumore. La posizione spaziale delle sonde deve essere determinata in modo ben preciso sullo scalpo, generalmente in accordo con i sistemi internazionali di misurazione dei segnali cerebrali (per esempio il sistema 10/20). Inoltre, poiché il cervello umano ha una morfologia molto variabile, per rendere confrontabili le misure emodinamiche acquisite dai diversi soggetti, è necessario normalizzare i volumi cerebrali ad uno spazio comune detto spazio stereotassico o atlante. Il modello standard negli studi di neuroimaging è quello creato dal Montreal Neurological Institute (MNI template). L'attuale versione del MNI template si chiama ICBM152.

Nell'esperimento qui trattato, per posizionare le sonde, è stato adottato un dispositivo (caschetto) volto a massimizzare il numero di siti di misurazione di HHb e HbO<sub>2</sub>, con un'unica distanza sorgente-rivelatore ( $d = 30.0$  mm) al fine di ottenere una profondità di penetrazione ottica (20 mm circa) tale da raggiungere il tessuto corticale (Sassaroli et al., 2005, [18]).



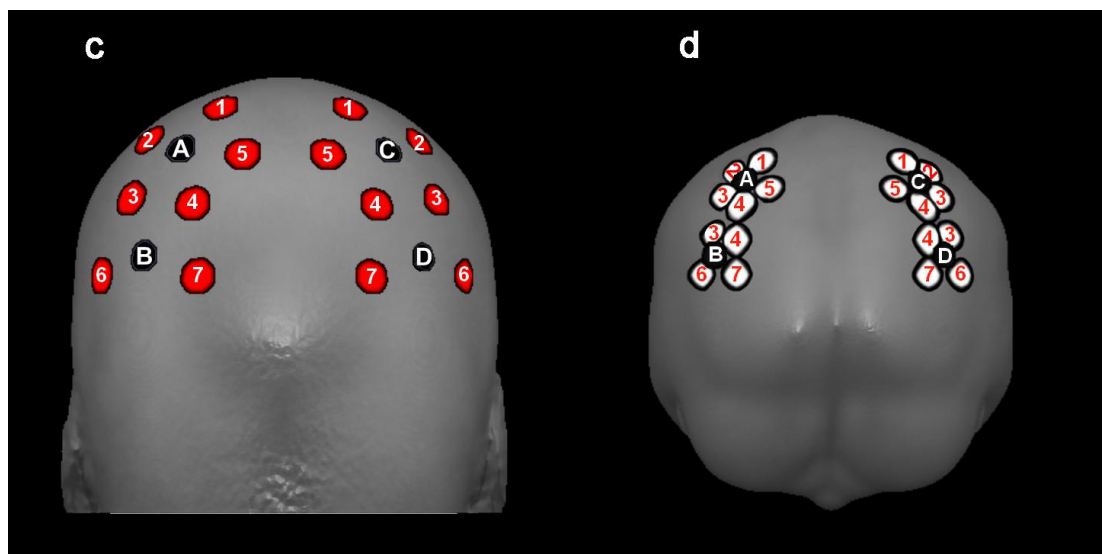
**Figura 2.3.a-b** – Struttura utilizzata per fissare sorgenti e detettori (a) ed esempio di applicazione su un soggetto (b).

Per mantenere in posizione sorgenti e rivelatori è stata utilizzata, per ogni emisfero, una struttura (rappresentata in figura 2.3.a) composta da una lamina in gomma nera (superficie esterna) e da una soffice spugna in neoprene (superficie interna, rivolta verso lo scalpo) con lo scopo di minimizzare le interferenze con la

luce ambientale. Questa struttura presenta due fori centrali (indicati in verde) dove sono stati fissati due rivelatori, e otto fori più esterni (indicati in rosso) su ognuno dei quali sono state collegate due fibre ottiche (corrispondenti alle sorgenti, una per ogni lunghezza d'onda). Data la dislocazione di sorgenti e rivelatori, i canali a disposizione (coppie sorgente-rivelatore) erano in totale 40, 20 per la HbO<sub>2</sub> e 20 per HHb (si noti che le due sorgenti centrali si accoppiano con entrambi i rivelatori). In questo esperimento tuttavia, sul foro più in basso (indicato con B5) non è stata applicata alcuna sorgente: i dati acquisiti sono perciò relativi a 36 canali.

Come mostrato in figura 2.3.b, alcune strisce di velcro hanno permesso di fissare le due strutture adattandole al capo dei soggetti, ponendo attenzione a garantire, per ogni optodo, il miglior contatto con il cuoio capelluto.

Le sorgenti sono state numerate da 1 a 7 (in entrambi gli emisferi) mentre i rivelatori sono stati etichettati con le lettere A - B (emisfero sinistro) e C - D (emisfero destro) (Fig. 2.3.c).



**Figura 2.3.c-d** – Posizione di sorgenti (1,2,3,4,5,6,7) e detettori (A,B,C,D) sullo scalpo (c) e posizione dei corrispondenti canali sul tessuto cerebrale del soggetto (d).

Per posizionare correttamente le sonde sullo scalpo è stato utilizzato un metodo di correlazione probabilistica fra il cranio e il tessuto cerebrale (esposto in dettaglio in Cutini et al. [60]) che esegue una correlazione precisa tra i punti di riferimento 10/20 e le coordinate MNI basandosi su di un modello fisico della superficie della testa relativa al modello ICBM152. Grazie a questo modello è stato possibile posizionare con precisione le sonde in corrispondenza delle regioni parieto-occipitali

principalmente coinvolte nella VSTM. Ad ogni coppia sorgente-rivelatore (figura 2.3.c) corrispondeva un canale di acquisizione sul tessuto cerebrale (rappresentato in figura 2.3.d) a 2 cm di profondità in corrispondenza del punto medio di ogni segmento sorgente-rivelatore (per esempio il canale A3 è relativo alla proiezione sulla corteccia cerebrale del punto medio tra il rivelatore A e la sorgente 3 dell'emisfero sinistro). Le immagini in figura 2.3.c e 2.3.d sono state generate estraendo le superfici dell'encefalo e dello scalpo dal modello ICBM152 e sovrapponendo i punti stereotattici a quelli del cervello di riferimento mediante il software MRIcron. In particolare canali A1-C1 e A2-C2 risultavano posizionati sul solco intra-parietale superiore (sIPS), A3-C3 sul giro angolare (ANG), A4-C4 sul solco intra-parietale (IPS), A5-C5 sulla parte posteriore del lobo parietale superiore (pSPL), B3-D3 sul giro angolare (in posizione inferiore rispetto a A3-C3), B4-D4 all'incrocio tra IPS e il solco intra-occipitale (IOS), B6-D6 si trovavano in prossimità della corteccia occipitale laterale (LOC) e B7-D7 erano situati sulla corteccia occipitale superiore (SOC). La tabella 2.3.a illustra le posizioni dei canali rispetto alle coordinate MNI e alle regioni della corteccia cerebrale del soggetto.

Canale	Coordinate MNI			Regione	
A1/C1	± 28	-62	70	L/R sIPS	solco intra-parietale superiore
A2/C2	± 39	-59	64	L/R sIPS	solco intra-parietale superiore
A3/C3	± 43	-67	54	L/R ANG	giro angolare
A4/C4	± 37	-75	52	L/R IPS	solco intra-parietale
A5/C5	± 25	-76	58	L/R pSPL	parte posteriore del lobo parietale superiore
B3/D3	± 51	-74	23	L/R ANG	giro angolare
B4/D4	± 38	-81	38	L/R IPS-IOS	intersezione dei solchi intraparietale e intraoccipitale
B6/D6	± 46	-81	17	L/R LOC	corteccia occipitale laterale
B7/D7	± 38	-86	24	L/R SOC	corteccia occipitale superiore

**Tabella 2.3.a** – Posizione dei canali rispetto alle coordinate MNI e alle regioni della corteccia cerebrale del soggetto.

## **2.4 Ipotesi neurofisiologiche sottoesame**

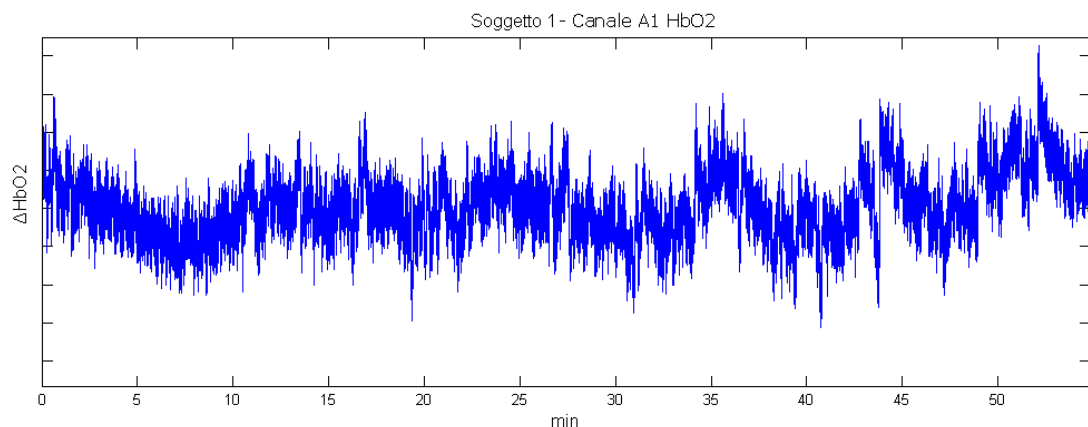
Una volta eseguito il filtraggio del segnale, oggetto di questa tesi, si andranno a considerare gli andamenti temporali delle concentrazioni medie di emoglobina ossigenata, deossigenata e totale in corrispondenza del diverso tipo di stimolazione della memoria visiva (2 o 4 quadrati, presentati a sinistra o a destra del punto centrale di fissazione). Rispetto al segnale fMRI, l'elevata risoluzione temporale fNIRS permette di valutare con grande precisione il profilo temporale della risposta emodinamica, ed in particolare la latenza del suo picco massimo.

Innanzitutto, analogamente a quanto dimostrato con il segnale fMRI ed EEG [4,6], ci si aspetta che anche i dati acquisiti con il segnale fNIRS dimostrino il coinvolgimento della regione parieto-occipitale nella memoria visiva a breve termine, rilevando attivazione in tutti i canali. Inoltre, mediante un'analisi comportamentale (accuratezza delle risposte nelle diverse condizioni, cioè numero di prove a cui il soggetto ha risposto correttamente rispetto al numero totale di prove) e un'analisi statistica delle aree di attivazione nelle diverse condizioni, si analizzeranno l'effetto di carico e l'effetto di lateralizzazione. Per effetto di carico si intende l'influenza del numero di oggetti da memorizzare: ci si aspetta una minore accuratezza delle risposte nelle prove con 4 quadrati rispetto a quelle con 2 ed una risposta emodinamica maggiore nelle prove con più quadrati. Per effetto di lateralizzazione si intende un diverso funzionamento dei due emisferi, in risposta a stimoli presentati a sinistra o a destra rispetto al punto centrale di fissazione. In particolare ci si aspetta di trovare una risposta emodinamica maggiore nelle aree cerebrali che si trovano sull'emisfero opposto al lato di visualizzazione dei quadrati sul display rispetto alle risposte emodinamiche delle aree che si trovano sullo stesso lato. Si andranno quindi ad analizzare separatamente l'attivazione nei canali dell'emisfero corrispondente (ipsi-laterale) o contrario (contra-laterale) al lato di visualizzazione dei quadrati colorati da memorizzare nel display per cercare eventuali segni di lateralizzazione.

### **3. Approccio bayesiano per la stima della risposta emodinamica da segnale fNIRS**

#### **3.1 Descrizione del segnale**

Le variazioni temporali delle concentrazioni di ossiemoglobina e di deossiemoglobina (espresse in nanomoli - nM) sono state stimate come descritto nel paragrafo 2.2, a partire dai segnali acquisiti per tutta la durata dell'esperimento. Ogni soggetto ha sostenuto 6 blocchi sperimentali, ciascuno composto da 24 trials, per un totale di 144 prove. L'intervallo di tempo fra l'inizio di una prova (istante di trigger) e l'inizio della successiva aveva una durata variabile fra i 15 e i 20 secondi (tempo di ISI), con passo costante su scala logaritmica (la maggioranza delle prove ha quindi una durata ben maggiore di 15 secondi). In media, l'intero segnale fNIRS acquisito, tenendo conto dell'intervallo fra i vari blocchi, ha dunque una durata totale di circa 50 minuti. La Figura 3.1.a illustra un esempio di segnale, relativo a  $\Delta\text{HbO}_2$ , acquisito nel canale A1 $_{\Delta\text{HbO}_2}$  del soggetto 1 durante l'intera prova sperimentale.

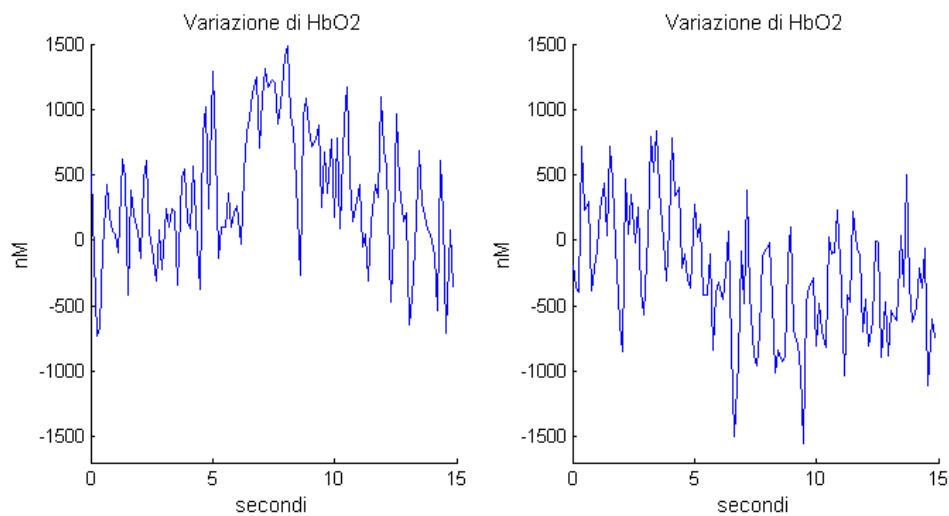


**Figura 3.1.a.** - Esempio di segnale relativo a  $\Delta\text{HbO}_2$ , acquisito in un canale durante l'intera prova sperimentale.

Il segnale fNIRS è stato acquisito in modo sincronizzato con il segnale di trigger (che indica l'inizio di ogni prova): questo permette di definire porzioni di segnale (trials), della durata di 15 secondi, a partire dagli istanti di trigger, ove valutare la risposta emodinamica relativa ad ogni singola prova, e di escludere quelle in cui i



soggetti non hanno risposto correttamente al compito cognitivo. Inoltre, come già detto, la registrazione simultanea del segnale EOG permette di eliminare anche i trials relativi alle prove in cui il soggetto non ha mantenuto lo sguardo al centro dello schermo. Due esempi di trials validi acquisiti durante l'esperimento sono mostrati nelle figure 3.1.b e 3.1.c. Nei due segnali ci si aspetterebbe di trovare un andamento molto simile: essi sono relativi a  $\Delta\text{HbO}_2$ , provenienti dallo stesso canale ( $A1_{\Delta\text{HbO}_2}$ ) e acquisiti mentre al soggetto era chiesto, in entrambi i casi, di memorizzare due quadrati sul lato sinistro del display. E' invece evidente che nel segnale acquisito sono presenti molte componenti non intrinsecamente legate al task cognitivo proposto al soggetto, tali da rendere impossibile riconoscere a occhio nudo la presenza di una risposta emodinamica. Per avere accesso al contenuto informativo del segnale fNIRS, è dunque indispensabile elaborare e filtrare il segnale con lo scopo di ridurre il più possibile i contributi delle componenti indesiderate.

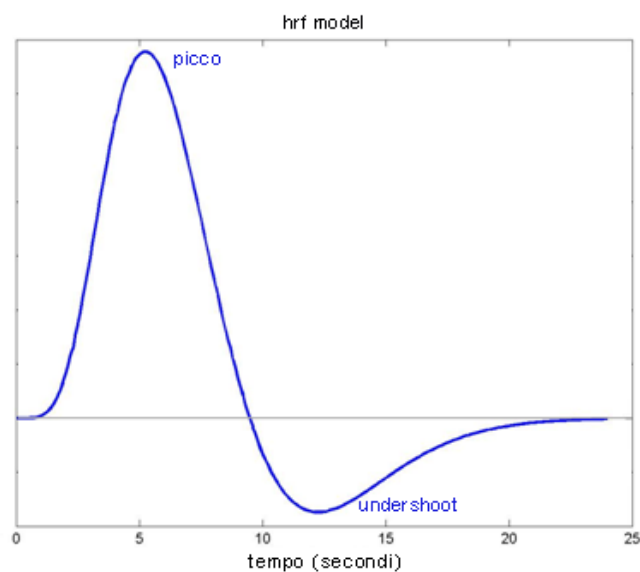


**Figura 3.1.b e 3.1.c** - Due esempi di trials validi, acquisiti dallo stesso canale  $A1_{\Delta\text{HbO}_2}$ .

Le componenti fisiologiche e di rumore che si sommano alla risposta emodinamica nel segnale fNIRS hanno ampiezze e frequenze molto diverse. Per ottenere un buon filtraggio del segnale, è importante avere delle conoscenze sufficientemente approfondite sull'andamento temporale sia del segnale utile (risposta emodinamica evento-relata), sia del rumore e delle altre componenti non di interesse presenti nel segnale acquisito.

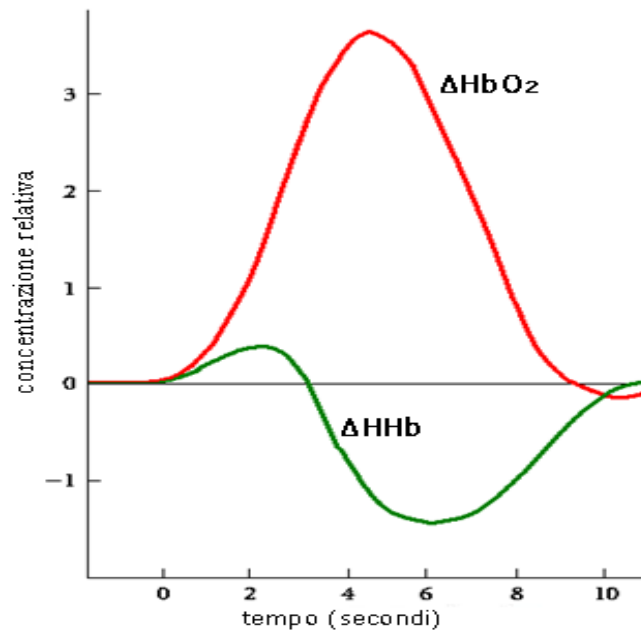
L'emodinamica cerebrale è stata ampiamente studiata negli ultimi decenni grazie alla risonanza magnetica funzionale; in questo ambito con il termine risposta

emodinamica si indica la variazione del segnale BOLD in seguito ad una variazione dell'attività neuronale: di fatto la risposta emodinamica è una misura indiretta dell'aumento del flusso cerebrale locale. Sono stati generati dei modelli matematici che descrivono l'andamento della risposta emodinamica (hrf, haemodynamic response function) per facilitare l'analisi del segnale BOLD. Uno dei modelli matematici più diffusi (conosciuto anche come modello canonico) è quello mostrato in figura 3.1.d, che si ottiene dalla combinazione di due funzioni gamma opportunamente dimensionate.



**Figura 3.1.d** - Tipico modello della risposta emodinamica utilizzato in fMRI.

Il segnale fNIRS permette di analizzare la risposta emodinamica legata sia all'emoglobina ossigenata che all'emoglobina deossigenata mediante le stime di  $\Delta\text{HbO}_2$  e  $\Delta\text{HHb}$ . In particolare, nelle aree di attivazione della VSTM, ci si aspetta di misurare un andamento temporale di  $\Delta\text{HbO}_2$  simile a quello rappresentato in rosso in figura 3.1.e: di fatto esso riprende l'andamento della risposta emodinamica registrata in fMRI. Per il segnale relativo a  $\Delta\text{HHb}$  invece, ci si aspetta di trovare un andamento simile a quello rappresentato in verde (sempre in figura 3.1.e), che mostra una variazione di concentrazione minore (in valore assoluto) ed un andamento temporale opposto a quello di  $\Delta\text{HbO}_2$ .



**Figura 3.1.e** – Modelli teorici delle risposte emodinamiche relative a  $\Delta\text{HbO}_2$  (in rosso) e a  $\Delta\text{HHb}$  (in verde).

La forma della risposta emodinamica riflette l'attività neuronale: caratteristiche come valore del picco, latenza del picco (intervallo di tempo tra lo stimolo e il valore di picco) e larghezza a metà del massimo (FWHM) cambiano in base al tipo di stimolo e di attivazione neuronale evocata, ma il profilo globale sia del segnale BOLD che del segnale fNIRS relativo a  $\Delta\text{HbO}_2$  riprende sempre l'andamento della curva hrf rappresentata in figura 3.1.d. Nelle argomentazioni che seguono saranno utilizzati indistintamente i termini hrf e risposta emodinamica.

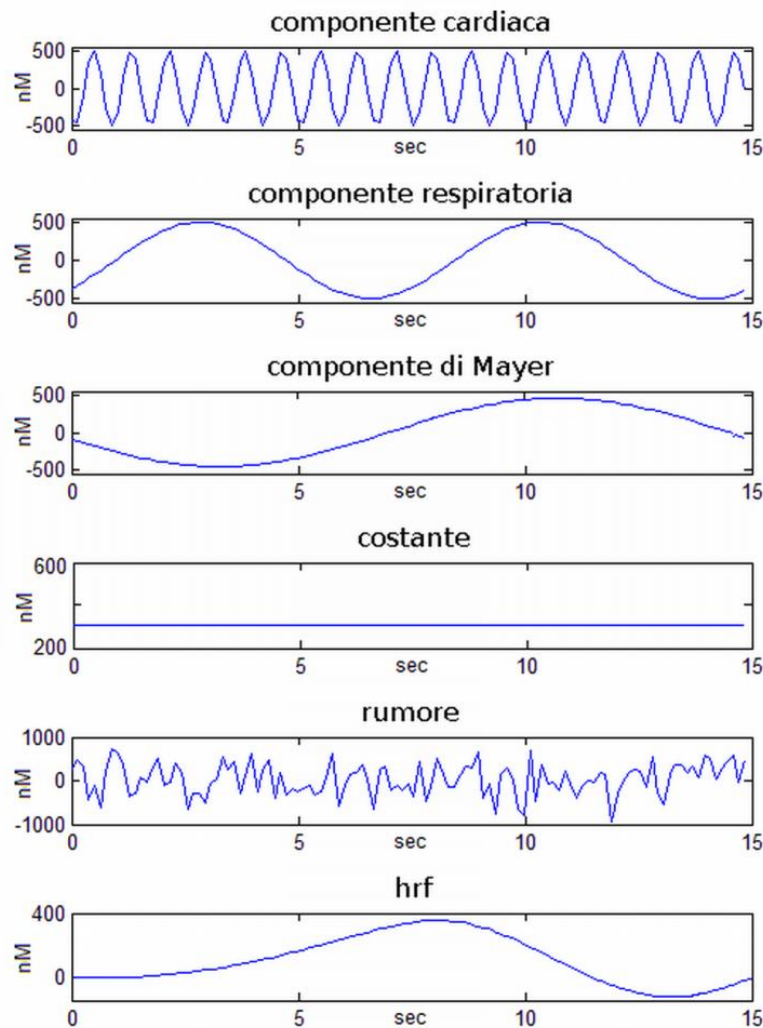
Le variazioni nelle concentrazioni di HHb e  $\text{HbO}_2$  dipendono dal bilancio tra consumo di ossigeno e apporto di ossigeno in quella specifica regione cerebrale: quando i neuroni si attivano, consumano l'ossigeno trasportato dall'emoglobina e stimolano un aumento locale di flusso sanguigno (CBF) e di volume ematico (CBV). Il CBF aumenta in modo sproporzionato rispetto al consumo di ossigeno, perciò nelle aree più attive si verifica un aumento nella concentrazione di ossiemoglobina e una relativa diminuzione nella concentrazione di deossiemoglobina. Nonostante la durata dell'attività neuronale sia inferiore al secondo, la risposta emodinamica impiega generalmente 4-5 secondi per raggiungere il suo valore massimo. Successivamente il CBF decresce molto più rapidamente del CBV, causando un piccolo undershoot nei valori del segnale acquisito fino a quando i livelli di CBF e CBV non ritornano ai valori basali. Alcuni modelli di risposta emodinamica considerano anche un lieve

undershoot iniziale, dovuto all'immediato consumo di ossigeno nella fase iniziale di attivazione.

Un modello approssimativo del segnale utile hrf, che ci si aspetta di trovare per  $\Delta\text{HbO}_2$  in ogni trial del dataset sperimentale del lavoro esposto in questa tesi, è rappresentato in figura 3.1.f, assieme alle principali componenti di rumore che si presume affliggano il segnale utile. Il paradigma sperimentale proposto ai soggetti stimola un'attività neuronale molto complessa. La VSTM coinvolge infatti molti processi, come la codifica delle informazioni, il loro mantenimento ed il loro recupero dalla memoria, che si svolgono dalla comparsa del memory array fino alla risposta data dal soggetto dopo la comparsa del test array. Tutte queste attività generano una risposta emodinamica complessiva con una latenza di picco attesa tra 6 e 9 secondi, come è già stato d'altra parte rilevato anche tramite il segnale BOLD in [4,5]. Il valore del picco, nel modello in figura, è stata fissata a circa 300 nM, ma si tratta di una ipotesi approssimativa poiché la VSTM non è mai stata indagata prima d'ora tramite acquisizioni di spettroscopia funzionale nel vicino infrarosso. Inoltre il valore del picco dipende dal compito richiesto al soggetto (nelle condizioni con 4 quadrati da memorizzare è attesa una risposta emodinamica con un valore di picco maggiore rispetto a quelle con 2 quadrati), dalla zona esaminata (nei canali corrispondenti a IPS è attesa una risposta emodinamica con valori di picco maggiori rispetto alle altre aree, ed in alcune aree potrebbe non esserci risposta emodinamica legata al compito) e può variare da soggetto a soggetto.

Nelle misure relative a  $\Delta\text{HHb}$  ci si aspetta invece un andamento del segnale utile simile a quello mostrato in verde in figura 3.1.e, con un variazione di concentrazione massima molto inferiore (in valore assoluto) a quella del picco in  $\Delta\text{HbO}_2$  (~-100 nM) ma anch'esso con una latenza del picco (negativo) tra 6 e 9 secondi.

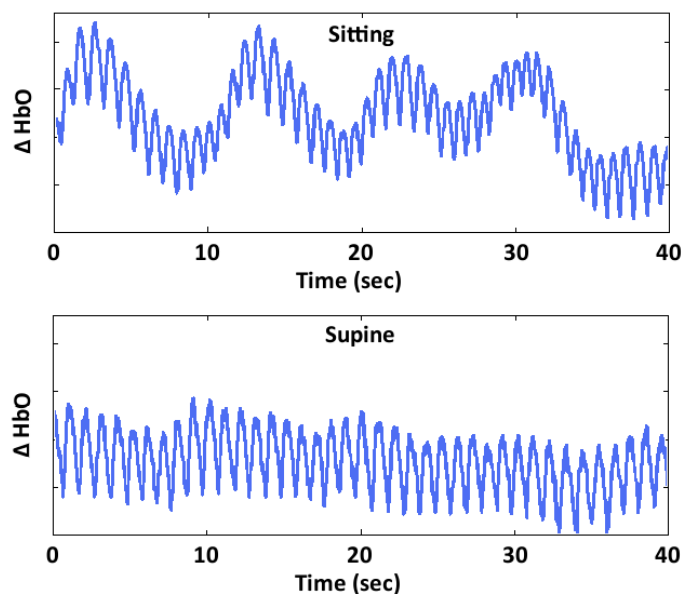
La frequenza della hrf è legata all'ISI dell'esperimento, ed in questo caso la banda principale è tra 0.05 e 0.067 Hz.



**Figura 3.1.f** – Presunte componenti del segnale (nM vs secondi)

Esistono tre principali componenti fisiologiche che si sommano alla risposta emodinamica e ne rendono complicata la stima dal segnale fNIRS: il battito cardiaco, l'attività respiratoria e la componente di Mayer, illustrate in figura 3.1.f. La componente cardiaca riprende le pulsazioni del battito cardiaco (in media poco più di 60 battiti al minuto). Si tratta di una componente approssimabile con un segnale sinusoidale, con un valore di frequenza quasi costante lungo tutto il trial, di circa 1 Hz e con un valore di concentrazione che oscilla fra  $\pm 500$  nM circa. L'andamento sinusoidale pseudo-costante, sia in valori di concentrazione che in frequenza, rende questa componente spesso visibile anche ad occhio nudo. Anche l'attività respiratoria genera un segnale con un andamento sinusoidale che raggiunge valori di concentrazione simili alla componente cardiaca, ma si tratta di una componente più lenta, con una frequenza di circa 0.15 Hz.

La componente fisiologica che maggiormente interferisce con il segnale utile nelle acquisizioni fNIRS è invece la cosiddetta componente di Mayer. Si tratta di un segnale con una frequenza (tra 0.05 e 0.1 Hz) molto simile a quelle della risposta emodinamica che ci si aspetta di ottenere con l'esperimento proposto, e con valori di concentrazione leggermente superiori ( $\sim \pm 500$  nM): si tratta dunque di una componente molto difficile da eliminare senza perdere informazioni anche sulla risposta emodinamica. Per eliminare questa componente un filtraggio passabanda non sarebbe certo applicabile. Se il battito cardiaco e l'attività respiratoria disturbano anche le acquisizioni di risonanza magnetica funzionale, la componente di Mayer è una componente di rumore sconosciuta agli studi di fMRI; essa non è presente o è comunque molto attenuata quando il soggetto si trova in posizione supina. Quando il soggetto è invece seduto o in piedi, la componente di Mayer è sempre ben evidente, anche in condizioni di riposo e con gli occhi chiusi. La figura 3.1.g mostra due esempi di misure fNIRS relative a  $\Delta\text{HbO}_2$ , acquisite in un soggetto in condizioni di riposo ad occhi chiusi, rispettivamente in posizione seduta e supina. In entrambi è ben evidente la componente cardiaca del segnale fNIRS. La componente di Mayer, invece, è presente solamente quando il soggetto si trovava in posizione seduta. La sua origine non è ancora del tutto chiara, ma è legata, a livello sistemico, a particolari oscillazioni nei valori della pressione sanguigna [12].

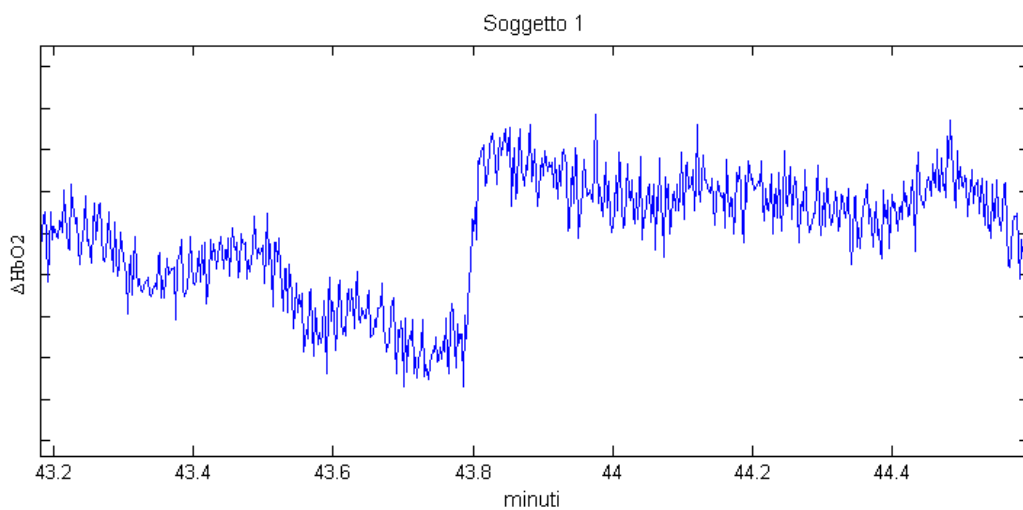


**Figura 3.1.g** – Due esempi di misure fNIRS relative a  $\Delta\text{HbO}_2$ , acquisite in un soggetto in condizioni di riposo ad occhi chiusi, rispettivamente in posizione seduta e supina [12].

Tali componenti si sommano a particolari trend (costanti, crescenti o decrescenti) dovuti a componenti fisiologiche a bassa frequenza ( $<0.1$  Hz), come si può vedere anche in figura 3.1.a. Nel seguito della tesi si considereranno le componenti fisiologiche come componenti di rumore, in quanto si sommano alla risposta emodinamica e ne rendono maggiormente complicata la stima.

Vi è infine una componente legata al rumore di misura, con andamento casuale e indici statistici (media e varianza) molto variabili da un canale di acquisizione all'altro e tra un soggetto e l'altro.

Nel segnale misurato possono essere presenti anche alcuni artefatti, generalmente dovuti a movimenti del soggetto (come il corrugare la fronte o fare uno sbadiglio) oppure a piccoli spostamenti di un rivelatore o di una sorgente luminosa durante la fase di acquisizione. Un esempio di artefatto (dovuto probabilmente allo spostamento di una sorgente) è rappresentato in figura 3.1.h.



**Figura 3.1.h** - Esempio di artefatto presente nel segnale rappresentato per intero in figura 3.1.a.

### **3.2** *Tecniche comunemente utilizzate per filtrare il segnale e loro limiti*

Nel paragrafo precedente sono state messe in luce tutte le principali componenti di rumore che si sovrappongono al segnale utile nelle acquisizioni fNIRS, da cui si evince che per stimare l'andamento temporale della risposta emodinamica è

necessaria una complessa elaborazione del segnale. Il rapporto segnale/rumore è evidentemente molto basso, non è possibile ottenere una stima corretta della risposta emodinamica da ogni singolo trial. Per ovviare a questo problema, la tecnica più utilizzata nell'elaborazione del segnale fNIRS è quella comunemente applicata anche negli studi di attivazione neuronale con il segnale BOLD e negli studi dei potenziali evocati o evento-relati (ERP) a partire da registrazioni di EEG: l'averaging convenzionale o media coerente. Questa tecnica prevede di calcolare il segnale medio a partire da un insieme di segnali, detti sweeps o trials, registrati durante lo stesso task cognitivo (ripetuto più volte) o dopo la generazione di molti stimoli identici.

L'averaging convenzionale basa il suo funzionamento sulle ipotesi che il rumore, inteso come somma di tutte le componenti del segnale diverse dalla risposta emodinamica, sia un segnale casuale, a media nulla e varianza  $\sigma^2$ , non correlato ad hrf e stazionario durante tutta la durata dell'esperimento. Inoltre si assume che la risposta emodinamica sia un segnale deterministico, con un andamento identico in tutti i trials e che si esaurisce completamente prima dell'inizio della prova successiva.

Sotto queste ipotesi, la media  $y_m(t)$  degli  $N$  trials  $y_i(t)$  acquisiti può essere scritta come:

$$y_m(t) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N y_i(t) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (u_i(t) + v_i(t)) = u(t) + \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N v_i(t) \quad (3.2.1)$$

dove i simboli indicano

- $u_i(t)$     risposta emodinamica contenuta nel trial  $i$ -esimo
- $v_i(t)$     rumore sovrapposto a  $u_i(t)$
- $u(t)$      risposta emodinamica deterministica, uguale in tutti i trials

$y_m(t)$  può quindi essere vista come una stima della risposta emodinamica  $u(t)$ , e gode di alcune proprietà statistiche. In particolare, grazie alle ipotesi sopra citate, per il valore atteso di  $y_m(t)$  si ha:

$$E[y_m(t)] = E[u(t)] + \frac{1}{N} E[\sum_{i=1}^N v_i(t)] = u(t) \quad (3.2.2)$$



L'averaging convenzionale si mostra così essere uno stimatore non polarizzato, che fornisce in media la risposta emodinamica cercata  $u(t)$ .

Definito l'errore di stima  $e(t) = y_m(t) - u(t)$ , si considera la sua varianza come indice di precisione di stima:

$$\text{Var}[e(t)] = E \left[ \left( \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N v_i(t) \right)^2 \right] = \frac{1}{N^2} E[\sum_{i=1}^N v_i^2(t)] = \frac{\sigma^2}{N} \quad (3.2.3)$$

La precisione di stima perciò aumenta all'aumentare del numero di trials mediati. In particolare, per  $N \rightarrow \infty$  si ha che  $\text{Var}[e(t)] \rightarrow 0$ . Anche il rapporto segnale/rumore migliora all'aumentare di  $N$ , poiché vale:

$$\text{SNR}^{(N)} = \frac{E_{segn. \text{ utile}}^{(N)}}{E_{rumore}^{(N)}} = \frac{E_{segn. \text{ utile}}^{(1)}}{\frac{E_{rumore}^{(1)}}{N}} = N \cdot \text{SNR}^{(1)} \quad (3.2.4)$$

Il numero di trials che si possono acquisire ( $N$ ) dipende dal tipo di segnale che si sta analizzando. Nel caso dei potenziali evocati, per esempio, ogni trial può avere una durata molto breve (in alcuni casi anche inferiore al secondo). Negli studi di risposta emodinamica, invece, ogni trial deve durare almeno una decina di secondi per poter contenere l'intera hrf. In particolare, nello studio presentato in questa tesi, ove il picco di hrf è atteso tra 6 e 9 secondi dopo il segnale di trigger, ogni trial deve avere una durata di almeno 15 secondi per permettere alla risposta emodinamica di esaurirsi completamente prima dell'inizio del trial successivo. Essendo la durata totale dell'esperimento vincolata da fattori come l'abituazione (processo inibitorio che sopprime progressivamente la risposta dell'organismo al ripresentarsi dello stimolo) o la stanchezza (che determina una riduzione dell'accuratezza delle risposte), il valore di  $N$  risulta fortemente limitato. In questo esperimento sono stati acquisiti 144 trials, distribuiti fra 4 possibili eventi (due o quattro quadrati, visualizzati a destra o a sinistra). Considerando anche l'eliminazione dei trials non validi, per ogni evento si hanno a disposizione in media 25 trials. L'averaging convenzionale, con un simile valore di  $N$ , fornisce una precisione di stima decisamente inferiore a quella raggiungibile con la stessa tecnica applicata, per esempio, alla stima dei potenziali evocati, dove generalmente si hanno a disposizione un centinaio di trials ( $N \sim 100$ ).

La necessità di acquisire molti trials per poter ottenere una stima sufficientemente affidabile rappresenta un forte limite dell'averaging convenzionale, sia per le attuali applicazioni sia per tutte le potenziali applicazioni real-time della spettroscopia funzionale nel vicino infrarosso (per esempio test cognitivi con stimoli e compiti che variano da prova a prova in base alla risposta emodinamica stimata nelle prove precedenti).

L'averaging convenzionale è una tecnica semplice concettualmente e facile da implementare, ma si può dimostrare che le ipotesi su cui si basa costituiscono in realtà un forte limite alla sua applicabilità, perché non sono quasi mai pienamente verificate. In particolare, nelle acquisizioni fNIRS, il rumore non può essere considerato stazionario e a media nulla per tutta la durata della acquisizione (~50 minuti), soprattutto a causa dei trend (crescenti o decrescenti) presenti nel segnale. Anche le ipotesi sulla risposta emodinamica non sono del tutto reali: l'hrf non può essere considerato un segnale deterministico, identico in ogni trial, nemmeno quando corrisponde allo stesso tipo di attivazione cognitiva. Tutte le informazioni relative ad eventuali variazioni di latenza e valore dei picchi vengono perse nell'averaging convenzionale, ottenendo solamente una risposta emodinamica "media", ove la latenza di picco ottenuta dalla media non è necessariamente pari alla media delle latenze.

Le problematiche legate ai limiti del numero di trials disponibili nelle acquisizioni fNIRS e alle assunzioni teoriche su cui si basa l'averaging convenzionale, mettono in luce la necessità di utilizzare un metodo alternativo che riesca a raggiungere una stima "media" più affidabile e precisa nonostante il numero limitato di trials a disposizione e, se possibile, che permetta di valutare anche la risposta "single-trial".

In letteratura sono recentemente state proposte alcune tecniche alternative di filtraggio del segnale, con lo scopo di migliorare i risultati del semplice averaging convenzionale. Tuttavia, attualmente tali tecniche variano a seconda del tipo di apparecchiatura e del paradigma sperimentale utilizzati, oltre che dell'area da analizzare e della risposta emodinamica attesa. Sono stati per esempio proposti l'applicazione di un filtro passabasso in [66], la sottrazione di un segnale che rappresenti una sorta di "forma d'onda media" del rumore cardiaco in [68], l'utilizzo di tecniche di PCA (Principal Components Analysis) ([69]) o di ICA (Independent

Component Analysis) associata ad un filtraggio adattativo che utilizza la forma d'onda registrata da un ossimetro come segnale di riferimento ([70]). Questi approcci hanno tutti migliorato l'SNR del segnale acquisito mediante fNIRS, ma spesso hanno permesso di eliminare solo alcune tipologie di rumore, correndo il rischio di perdere parte delle informazioni relative alla risposta emodinamica presenti nel segnale acquisito. Il principale svantaggio del filtraggio passabasso, per esempio, è la possibilità di eliminare assieme al rumore anche parte della risposta emodinamica, poiché le bande di frequenza cui appartengono gli spettri delle varie componenti non sono ben distinte. I metodi basati sulla sottrazione di “forma d'onda media” di un determinato tipo di rumore sono metodi di filtraggio parziale, che non tengono conto delle altre componenti di rumore presenti nel segnale e della non stazionarietà della componente che si vuole eliminare. Le tecniche di filtraggio adattativo o che sfruttano un approccio GLM (General Linear Model, una delle tecniche maggiormente utilizzate nell'analisi del segnale BOLD), richiedono assunzioni deterministiche sulla forma d'onda del rumore presente nel segnale o della risposta emodinamica che si vuole misurare.

Questa tesi propone una nuova tecnica di filtraggio del segnale fNIRS, basata sull'approccio bayesiano al problema di stima, la cui implementazione è illustrata in modo dettagliato nei prossimi paragrafi. Tale metodo è completamente non parametrico e non fa alcuna assunzione deterministica sul segnale da stimare.

### **3.3 *Filtraggio bayesiano del segnale***

Dopo una fase di pre-elaborazione del segnale, è stata implementata sul segnale acquisito una nuova tecnica di filtraggio ottimo, mai applicata prima nello studio della risposta emodinamica da acquisizioni di fNIRS, basata sull'approccio bayesiano al problema della stima. Questa tecnica è analoga a quella introdotta da Sparacino et al. [71] in uno studio di potenziali evocati uditivi e prevede un procedimento a due passi: smoothing bayesiano di ogni singolo trial, seguito da un calcolo della media.

Il prossimo sottoparagrafo introdurrà le basi teoriche su cui si basa l'approccio bayesiano alla stima della risposta emodinamica, mentre i sottoparagrafi successivi

affronteranno in modo più dettagliato l'elaborazione apportata al segnale acquisito, descrivendo gli algoritmi utilizzati per la stima della risposta emodinamica. In particolare, il paragrafo 3.3.2 descriverà l'elaborazione del segnale avvenuta prima di applicare il filtro bayesiano, mentre il paragrafo 3.3.3 affronta l'implementazione della stima bayesiana introdotta a livello teorico nel prossimo sottoparagrafo. Tutti gli algoritmi descritti in questa tesi sono stati implementati in MATLAB<sup>®</sup>, versione 7.7.0.471 (R2008b), ed eseguiti su un personal computer.

### **3.3.1 Basi teoriche dell'approccio bayesiano alla stima della risposta emodinamica**

Lo smoothing bayesiano permette di effettuare, per ciascuno degli  $N$  trial disponibili, una stima ottima del segnale utile  $u_i(t)$  (con  $i=1, \dots, N$ ), sfruttando conoscenze statistiche di secondo ordine note a priori (e quindi indipendenti dai dati) sia sul segnale utile  $u_i(t)$  che sul rumore.

Per ogni singolo trial, è stato adottato un modello delle misure lineare con rumore additivo, espresso come:

$$y = u + v \quad (3.3.1)$$

con  $y$ ,  $u$  e  $v$  vettori  $n$ -dimensionali che contengono rispettivamente i campioni del segnale misurato  $y(t)$ , della risposta emodinamica  $u(t)$  e del rumore  $v(t)$ .  $u(t)$  e  $v(t)$  sono interpretati come grandezze aleatorie, assunte scorrelate ed entrambe con valore atteso nullo.

Affrontando la stima del vettore  $u(t)$ , noto  $y(t)$ , come un problema di stima lineare a minima varianza d'errore, si può dimostrare che la stima ottima si ottiene risolvendo il problema di ottimizzazione:

$$\hat{u} = \arg \min_u (y - u)^T \Sigma_v^{-1} (y - u) + u^T \Sigma_u^{-1} u \quad (3.3.2)$$

dove i simboli indicano

$\Sigma_u$  matrice di covarianza di  $u$

$\Sigma_v$  matrice di covarianza di  $v$

La soluzione in forma chiusa della (3.3.2) è data da:

$$\hat{u} = (\Sigma_v^{-1} + \Sigma_u^{-1})^{-1} \Sigma_v^{-1} y \quad (3.3.3)$$

Un passo molto importante è la definizione delle matrici di covarianza  $\Sigma_v$  e  $\Sigma_u$  relative ai due segnali. Il rumore presente nel segnale acquisito è costituito dalla somma di molte componenti e, come già anticipato, non può essere considerato stazionario per tutta la durata della prova (~50 minuti). Tuttavia, considerando di volta in volta gli intervalli temporali (15 secondi) relativi ai singoli trials, si possono utilizzare dei modelli stazionari autoregressivi in grado di descrivere la natura del rumore  $v(t)$  rumore. In particolare il rumore è stato modellato come l'uscita di un filtro auto regressivo (AR) di ordine  $p$ , alimentato da rumore bianco a media nulla e varianza  $\sigma^2$ , la cui matrice di covarianza risulta:

$$\Sigma_v = \sigma^2 (A^T A)^{-1} \quad (3.3.4)$$

dove i simboli indicano

$A$  matrice di Toeplitz triangolare inferiore, di rango pari al numero  $n$  di elementi del vettore  $v$ , con la prima colonna costituita dal vettore  $[1 \ a_1 \ a_2 \ \dots \ a_p \ \dots \ 0 \ 0 \ \dots \ 0]^T$

I parametri della matrice  $A$  e il valore dello scalare  $\sigma^2$  vengono stimati per ogni trial, a partire dal segnale  $y(t)$  acquisito in un intervallo a cavallo del segnale di trigger, detto di pre-stimolo, della durata di 4 secondi e avente inizio 1.5 secondi prima del segnale di trigger. Infatti, poiché l'attivazione neuronale impiega alcuni secondi prima di generare la curva hrf, si può assumere che il segnale acquisito nell'intervallo di pre-stimolo sia costituito solamente da rumore, senza alcun contributo da parte della risposta emodinamica. Le informazioni statistiche di tipo quantitativo sul rumore presente nell'intervallo di pre-stimolo così ottenute vengono poi assunte costanti per l'intera durata del trial.

Per quanto riguarda la risposta emodinamica, invece, non avendo a disposizione alcuna informazione di tipo quantitativo, si possono sfruttare solamente alcune informazioni di tipo qualitativo sulla "regolarità" del segnale  $u(t)$  che viene considerato come la realizzazione di un processo aleatorio. In particolare, per

descrivere  $u(t)$ , è stato utilizzato un modello di rumore bianco plurintegrato, avente matrice di covarianza:

$$\Sigma_u = \lambda^2 (F^T F)^{-1} \quad (3.3.5)$$

con

$$F = \Delta^m, \quad \Delta = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 & \dots & 0 \\ -1 & 1 & 0 & \dots & 0 \\ 0 & -1 & 1 & \dots & 0 \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ 0 & 0 & 0 & \dots & 1 \end{bmatrix}$$

dove i simboli indicano

- $\Delta$  matrice delle differenze prime
- $m$  indice che riflette il grado di continuità del segnale
- $F$  matrice delle differenze  $m$ -esime (di Toeplitz triangolare inferiore)
- $\lambda$  parametro incognito, calcolato a posteriori

Aver definito le matrici di covarianza  $\Sigma_v$  e  $\Sigma_u$  permette di riscrivere la (3.3.2) come:

$$\hat{u} = \arg \min_u (y - u)^T A^T A (y - u) + \gamma u^T F^T F u \quad (3.3.6)$$

la cui soluzione in forma chiusa risulta:

$$\hat{u} = (A^T A + \gamma F^T F)^{-1} A^T A y \quad (3.3.7)$$

con

$$\gamma = \frac{\sigma^2}{\lambda^2} \text{ parametro di regolarizzazione}$$

Il compromesso fra le informazioni note a priori (segnale regolare) e quelle ottenute a posteriori (aderenza ai dati) che l'approccio bayesiano alla stima di  $u(t)$  permette di realizzare è ben evidenziato dal calcolo di  $\hat{u}$  in (3.3.6). Il peso relativo, assegnato alle due controparti, è gestito dal valore di gamma: maggiore è il valore di  $\gamma$ , maggiore è la regolarizzazione introdotta in  $\hat{u}$ , a scapito dell'aderenza ai dati.

La scelta del valore da assegnare a  $\gamma$  è un aspetto di fondamentale importanza: una scelta inopportuna può generare casi di oversmoothing ( $\hat{u}$  troppo regolare) o undersmoothing ( $\hat{u}$  troppo aderente ai dati). In letteratura sono stati proposti diversi criteri di regolarizzazione per la scelta di  $\gamma$ . In questa tesi è stato applicato il criterio

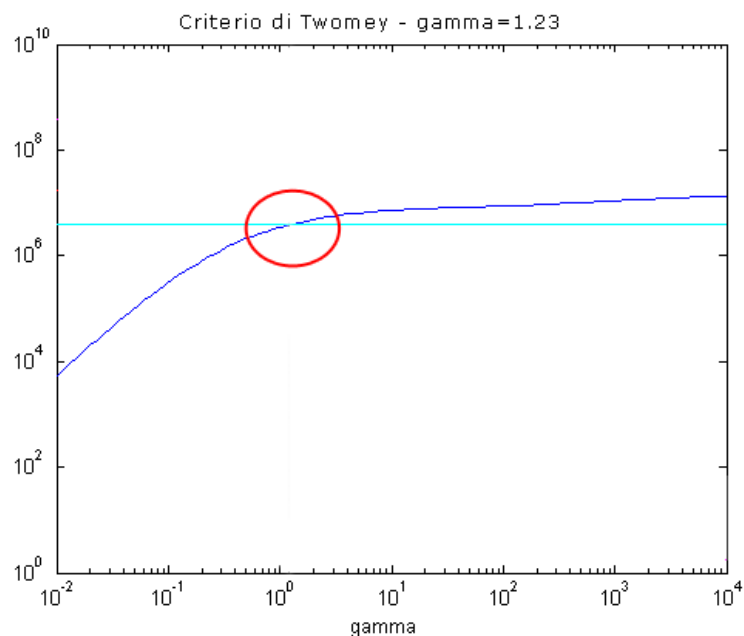
di Twomey, o di Discrepanza, che prevede di scegliere un valore di  $\gamma$  tale da soddisfare l'equazione:

$$WRSS(\gamma) = n\sigma^2 \quad (3.3.8)$$

dove  $n$  è il numero di campioni che compongono ogni trial filtrato e  $WRSS(\gamma)$  è la somma pesata dei residui  $r(\gamma) = (y - \hat{u})$  al quadrato. Si tratta di una variabile aleatoria definita come:

$$WRSS(\gamma) = r(\gamma)^T A^T A r(\gamma) \quad (3.3.9)$$

La (3.3.8) può essere spiegata a partire dal significato del vettore dei residui  $r(\gamma)$ : esso può essere visto come una stima dell'errore di misura  $v = (y - u)$ . Il  $\gamma$  migliore, secondo il criterio di Twomey, è quello che rende la somma dei residui al quadrato pari all'aspettazione della somma degli errori di misura al quadrato, che si dimostra essere uguale a  $E[v^T v] = n\sigma^2$ . Figura 3.3.1.a mostra un esempio di implementazione grafica del criterio di Twomey, dove in blu è rappresentato l'andamento di  $WRSS(\gamma)$ , e in azzurro il valore  $n\sigma^2$  per uno specifico trial mentre il punto di convergenza è cerchiato in rosso.



**Figura 3.3.1.a** – Implementazione grafica del criterio di Twomey per la scelta del valore di  $\gamma$  nel filtraggio di un trial.

E' importante sottolineare che l'equazione (3.3.8) non ammette sempre soluzione: se l'energia del segnale misurato  $y(t)$  risulta essere minore dell'energia del rumore di misura  $v(t)$ , il primo termine della (3.3.8) non raggiungerà mai il valore  $n\sigma^2$ . Se invece l'energia di  $y(t)$  supera quella di  $v(t)$ , si dimostra che la soluzione esiste sempre ed è unica.

Nonostante la regolarità del segnale stimato dipenda dal valore del parametro di regolarizzazione  $\gamma$ , esso dipende a sua volta da molti fattori (come per esempio dalla dimensione  $n$  del vettore  $\hat{u}$  stimato). Un indice più oggettivo del grado di regolarizzazione introdotto nella stima del segnale utile è fornito dal numero di gradi di libertà  $q(\gamma)$  associati a  $\gamma$ , che si calcola come:

$$q(\gamma) = \text{trace}(A(A^T A + \gamma F^T F)^{-1} A^T) \quad (3.3.10)$$

In particolare il valore dei gradi di libertà normalizzato per il numero di campioni,  $q(\gamma)/n$ , (che assume valori compresi fra 0 e 1), consente di confrontare la quantità di regolarizzazione introdotta anche in contesti diversi.

Maggiori dettagli sull'approccio bayesiano alla stima sono presenti in Sparacino et al. [71] e in [59].

### 3.3.2 *Pre-elaborazione del segnale*

Dal segnale fNIRS acquisito in ognuno dei 36 canali (18 relativi a  $\Delta\text{HHb}$  e 18 relativi a  $\Delta\text{HbO}_2$ ), vengono estratte porzioni di segnale (trials) della durata di 15 secondi a partire dal segnale di trigger, in corrispondenza delle quali è possibile stimare la risposta emodinamica eventualmente presente in quel canale. Per poter ottenere un buon filtraggio, sia nella fase di pre-elaborazione che di filtraggio del segnale, sono stati considerati anche alcuni campioni acquisiti prima e dopo ogni trial. Per questo motivo, la durata effettiva dei trials nella fase di pre-elaborazione e filtraggio è di 19 secondi, tempo che include i campioni corrispondenti a 1,5 secondi antecedenti il trigger e 2,5 secondi oltre i 15 secondi successivi al trigger. La stima dell'hrf e le analisi dei risultati saranno invece eseguite solo nei 15 secondi dopo il trigger, in cui si vuole valutare la risposta emodinamica.



I trials ottenuti dal segnale relativo ad ogni canale sono stati suddivisi nei quattro tipi di eventi che hanno caratterizzato il paradigma sperimentale: 2 o 4 quadrati visualizzati a sinistra (evento 1/evento 2) oppure 2 o 4 quadrati visualizzati a destra (evento 3/evento 4) rispetto al punto centrale di fissazione.

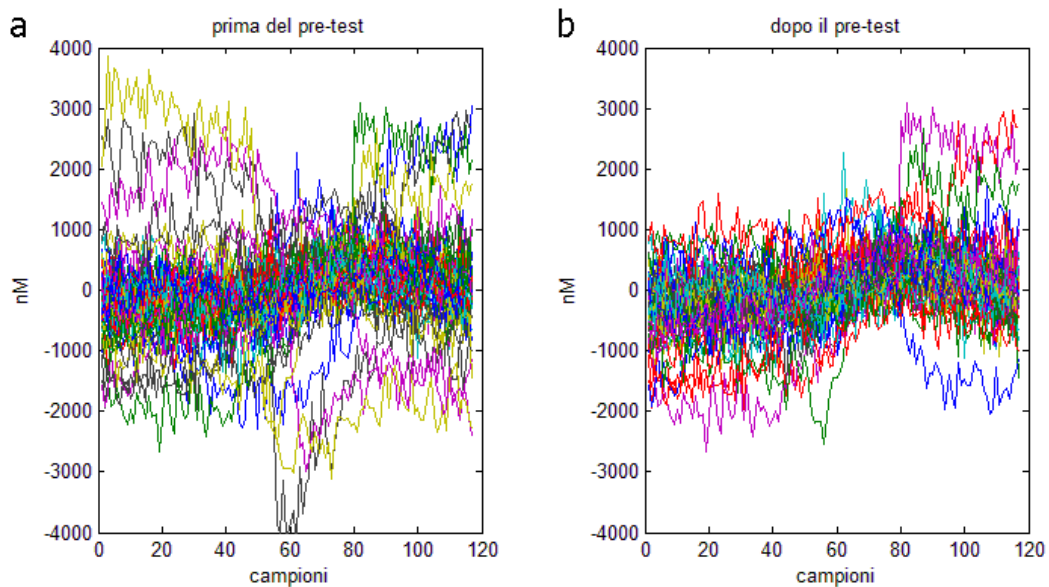
Poiché la fNIRS non fornisce valori assoluti delle concentrazioni di  $\Delta\text{HbO}_2$  e  $\Delta\text{Hbb}$  ma solo informazioni sulle loro variazioni, ad ogni trial viene sottratto il suo valore medio.

Prima di procedere al filtraggio del segnale, è necessario rimuovere i trials che contengono al loro interno eventuali artefatti (come quello mostrato in figura 3.1.h) che rendono impossibile risalire alle informazioni sulle relative curve di risposta emodinamica. Se non venissero eliminati andrebbero a influenzare fortemente le stime delle hrf. L'eliminazione degli artefatti viene eseguita per gradi successivi. Innanzitutto, indipendentemente dal canale o dall'evento cui si riferiscono, vengono eliminati tutti i trials che assumono valori di  $\Delta\text{HbO}_2$  e  $\Delta\text{HHb}$  non plausibili da un punto di vista fisiologico (per un soggetto seduto e fermo il più possibile), cioè il cui range di valori assunti dalla variazione di concentrazione è superiore a 8000 nM (sommando tutte le componenti descritte nei paragrafi precedenti si ottiene un valore ben inferiore a questa soglia, che può essere quindi giustificato solo dalla presenza di artefatti).

A questa prima valutazione globale, fa seguito una valutazione raggruppando i trials a seconda del canale e dell'evento cui si riferiscono: nel segnale acquisito in ciascun canale infatti, in corrispondenza ad ognuno dei 4 possibili eventi, si può assumere che la risposta emodinamica presenti un andamento molto simile in tutti i trials e che il rumore ad essa sovrapposto non subisca eccessive variazioni nella durata di un trial. La presenza di outlier all'interno dei vari gruppi di trials è certamente dovuta ad artefatti.

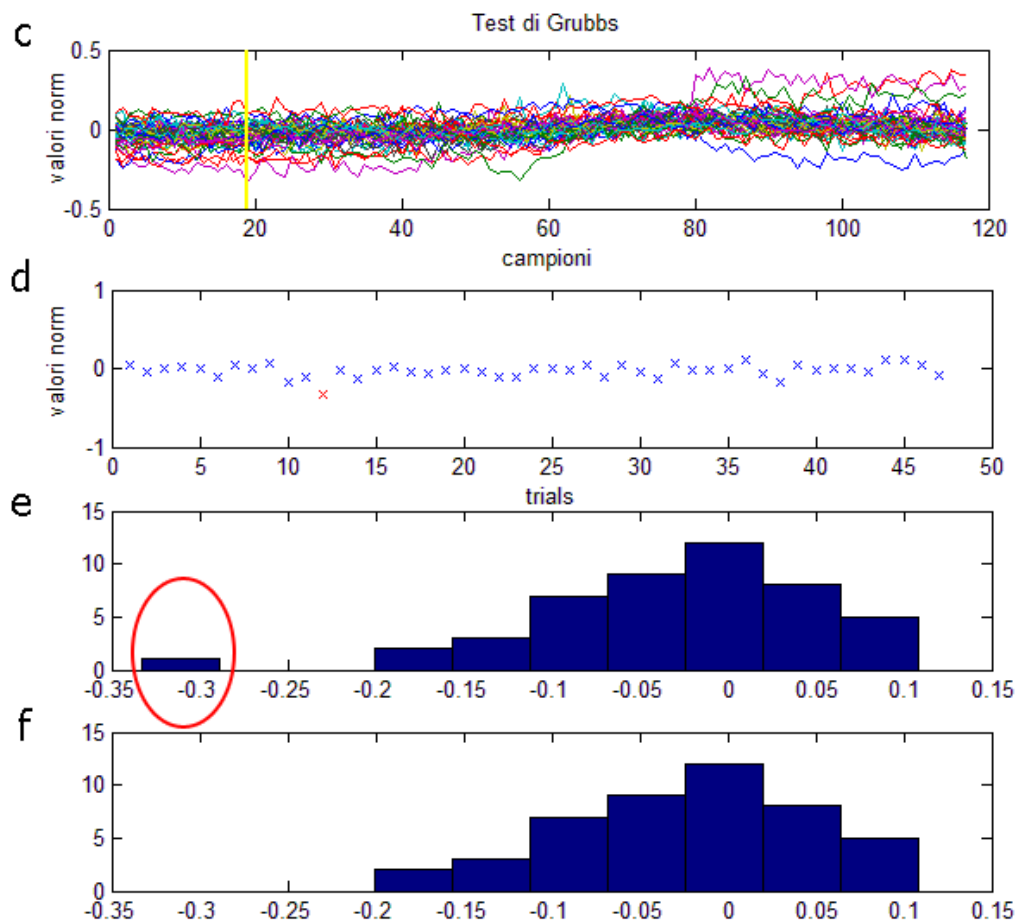
Per individuare ed eliminare gli outlier vengono utilizzati in successione due criteri, che considerano separatamente i trials di ogni canale e di ogni evento, allineandoli temporalmente rispetto al trigger. Il primo criterio valuta 3 parametri: il valore medio, il valore massimo ed il valore minimo di variazione di concentrazione di ogni trials. I trials che, rispetto agli altri dello stesso gruppo, mostrano una variabilità eccessiva (superiore od inferiore a 2,5 volte la deviazione standard) in uno di questi 3 parametri vengono eliminati. La Figura 3.3.2.b mostra un esempio dei

risultati ottenuti in questa fase, visualizzando i trials (relativi al soggetto 5, canale  $A1_{\Delta HbO_2}$ , evento 2) considerati validi prima e dopo la rimozione degli artefatti. Questa prima fase, eseguita con soglie molto conservative in modo da individuare ed eliminare i trials in cui sicuramente sono presenti artefatti, ha reso i dati idonei all'applicazione del test di Grubbs.



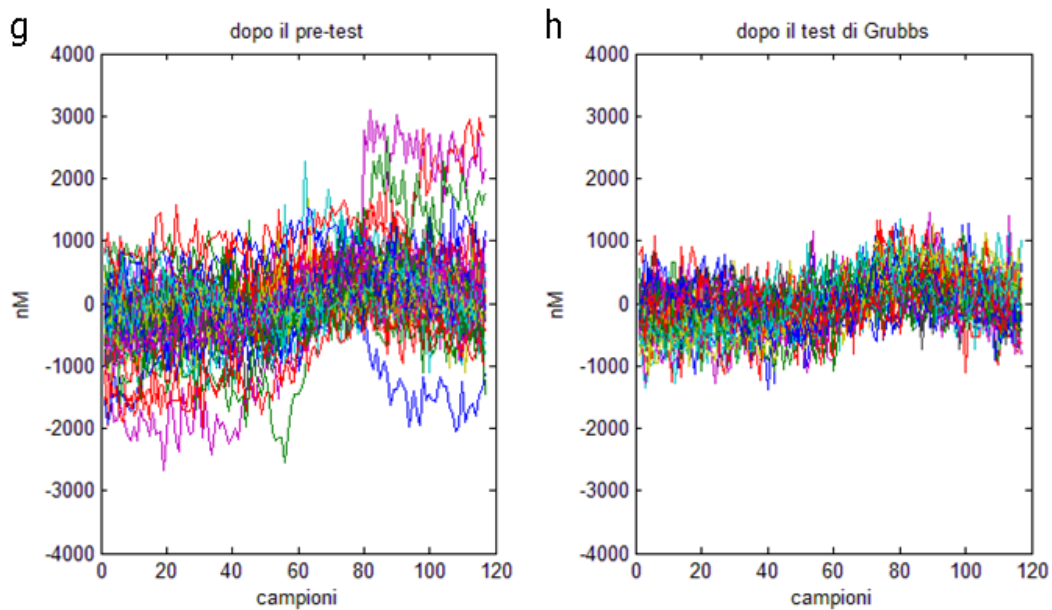
**Figura 3.3.2.a-b** - Trials validi prima (a) e dopo (b) l'eliminazione degli outliers riconosciuti dal primo criterio applicato per eliminare gli artefatti, nel segnale acquisito dal soggetto 5, canale  $A1_{\Delta HbO_2}$ , e relativi all'evento 2.

Il secondo criterio prevede appunto l'applicazione del test di Grubbs. Si tratta di un test statistico, in grado di riconoscere ed eliminare in modo iterativo dati con valori anomali rispetto ad altri in uno stesso insieme di partenza. Il test di Grubbs viene applicato sui campioni di ogni trial relativi allo stesso istante di campionamento, spazzolando l'intero tempo di acquisizione dei trials. Un esempio di applicazione (relativo agli stessi trials precedentemente rappresentati in figura 3.3.b), è mostrato nelle immagini di figura 3.3.2.c-f. La linea gialla verticale in (c), sovrapposta ai trials in esame, si trova in corrispondenza dell'istante di campionamento cui si riferiscono i dati ai quali è appena stato applicato il test. Tali dati, con valori normalizzati, sono rappresentati in (d): la crocetta rossa indica il valore outlier riconosciuto dal test di Grubbs; l'intero trial di appartenenza sarà eliminato. (e) ed (f) mostrano invece gli istogrammi dei valori rispettivamente prima e dopo essere stati sottoposti al test.



**Figura 3.3.2.c-f** - Esempio di un'iterazione del test di Grubbs lungo l'asse di campionamento, applicato ai trials illustrati in figura 3.3.2.b. La linea gialla verticale in (c), sovrapposta ai trials in esame, si trova in corrispondenza dell'istante di campionamento cui si riferiscono i dati ai quali è appena stato applicato il test. Tali dati sono rappresentati in (d): la crocetta rossa indica il valore outlier riconosciuto dal test di Grubbs, mentre (e) ed (f) mostrano gli istogrammi dei valori rispettivamente prima e dopo essere stati sottoposti al test.

La Figura 3.3.2.h mostra il risultato finale della rimozione degli artefatti (applicata sempre allo stesso set di dati cui si riferiscono anche le immagini precedenti), dopo aver applicato il test di Grubbs lungo tutto l'asse temporale dei trials. Il numero di trials eliminati dalla procedura di rimozione degli artefatti è mediamente 6, ma è un valore molto variabile, che dipende da svariati fattori che influenzano l'acquisizione dei dati (corretto posizionamento degli elettrodi, movimenti del soggetto, ecc.).

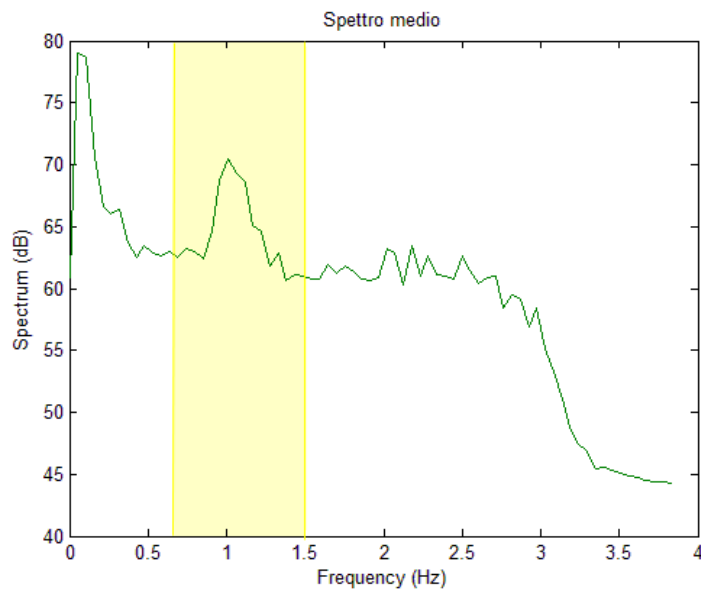


**Figura 3.3.2.g e 3.3.2.h** - trials validi prima (g) e dopo (h) l'eliminazione degli outliers ad opera del test di Grubbs. (soggetto 5, canale  $A1_{\Delta HbO_2}$ , evento 2).

Dopo la rimozione degli artefatti, vengono applicate due operazioni di filtraggio in frequenza. In primo luogo viene applicato un filtro passabasso per eliminare indistintamente tutte le componenti di rumore ad alta frequenza. E' stata scelta una frequenza di taglio pari a 3 Hz, molto elevata rispetto alla frequenza della risposta emodinamica attesa ( $0.05 \div 0.067$  Hz, banda principale), per non correre in alcun modo il rischio di eliminare, assieme al rumore, anche componenti di segnale utile.

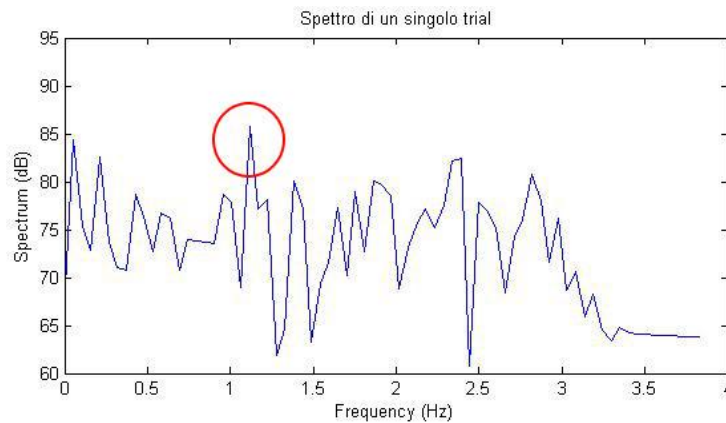
In secondo luogo viene applicato un filtraggio più selettivo, con lo scopo di ridurre solamente la componente cardiaca del rumore. Come anticipato all'inizio di questo capitolo, il rumore cardiaco è un segnale con un andamento sinusoidale spesso visibile anche ad occhio nudo nei singoli trials. La frequenza della sinusoide, pressoché costante per tutta la durata di ogni trial, riprende la frequenza del battito cardiaco, il cui valore (in soggetti come quelli che hanno partecipato all'esperimento: giovani, a riposo e non affetti da patologie cardiache) è di circa 65 battiti al minuto. La componente cardiaca del rumore presente nel segnale ha perciò una frequenza media di poco più di 1 Hz, ma che a seconda del soggetto e di altre circostanze può assumere valori fra 0.7 e 1.5 Hz. La Figura 3.3.2.i mostra un esempio di spettro medio, in un canale relativo a  $\Delta HbO_2$ , ottenuto mediando gli spettri dei singoli trials calcolati tramite la trasformata discreta di Fourier (DFT). Si può notare la presenza di un picco elevato a frequenze  $0 \div 0.2$  Hz (frequenze che accorpano sia lo spettro della risposta emodinamica, sia quello delle componenti di Mayer e respiratoria) e di un

picco meno elevato, ma comunque ben evidente, nella banda  $0.7\div 1.5$  Hz, ovvero proprio in corrispondenza delle frequenze del rumore cardiaco. Questo esempio non è un caso particolare: tutti gli spettri medi, indipendentemente dal canale e dall'evento cui si riferiscono, mostrano due picchi rispettivamente nelle bande  $0\div 0.2$  Hz e  $0.7\div 1.5$  Hz, anche se in quelli dove non c'è attivazione il primo picco risultava molto più basso.



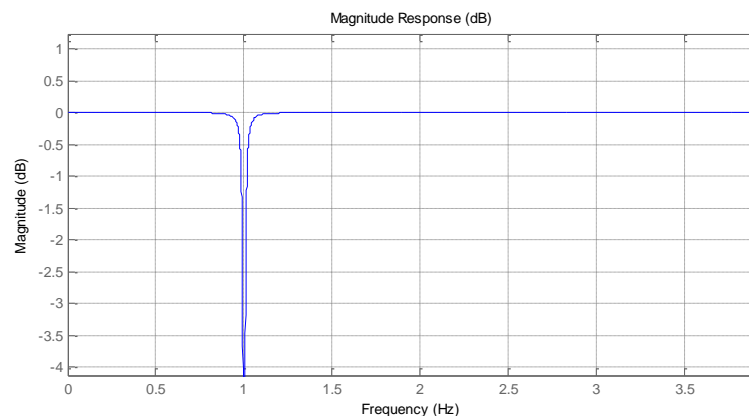
**Figura 3.3.2.i** – Esempio di spettro medio dei trials prima del filtraggio notch. In giallo è evidenziata la banda  $0.7\div 1.5$  Hz relativa alle frequenze della componente cardiaca del rumore (soggetto 5, canale  $B3_{\Delta HbO_2}$ , evento 1).

Anche lo spettro di ogni singolo trial è generalmente in grado di evidenziare la presenza della componente cardiaca del rumore, nonostante si tratti di uno spettro approssimativo calcolato tramite DFT e il numero di campioni a disposizione in un trial sia relativamente basso ( $\sim 150$ , relativi a 19 secondi, in cui possono comparire solo pochi battiti cardiaci). Un esempio dello spettro di un singolo trial è mostrato in figura 3.3.2.1, dove in rosso è evidenziato il picco massimo nella banda  $0.7\div 1.5$  Hz.



**Figura 3.3.2.1** – Esempio dello spettro di un singolo trial (canale B3 $_{\Delta\text{HbO}_2}$ ) prima del filtraggio notch dove è messo in evidenza un picco relativo alla componente cardiaca.

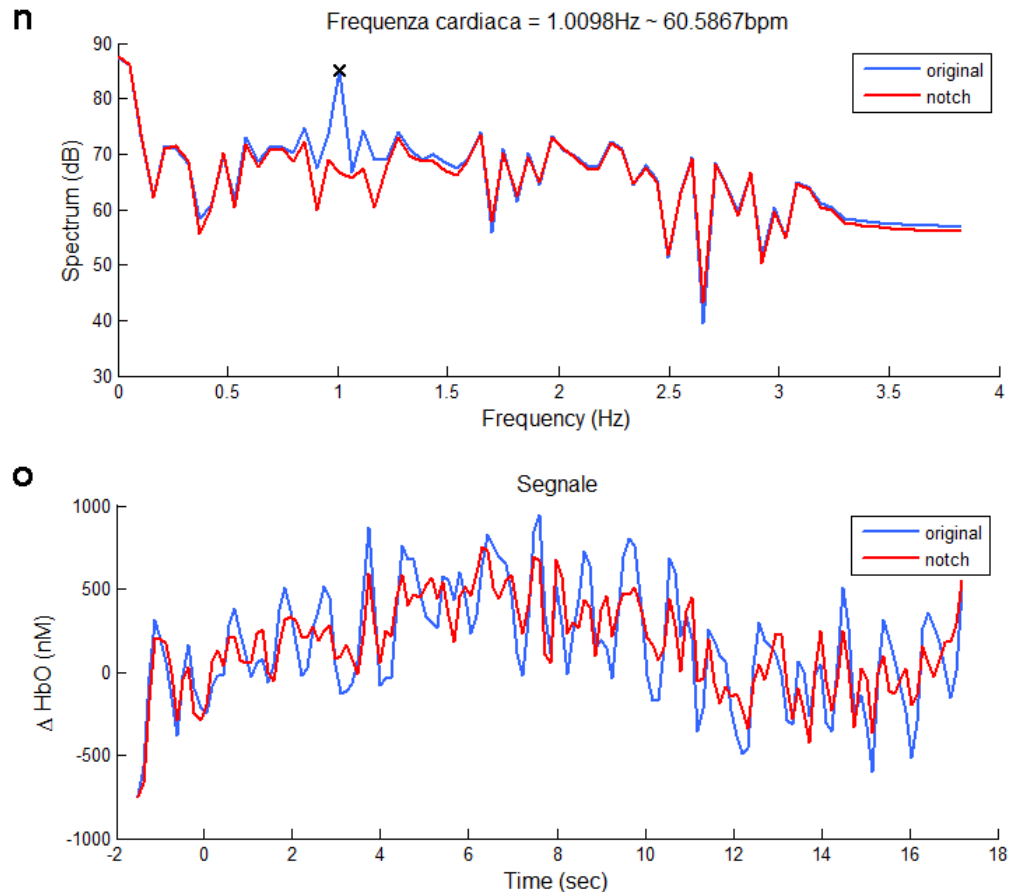
La componente cardiaca costituisce perciò una porzione importante del rumore e la sua frequenza, disgiunta dalla banda in cui è attesa la risposta emodinamica, la rendono relativamente facile da filtrare. Per eliminarla in modo molto selettivo viene applicato un filtro notch, la cui curva di risposta in frequenza è simile a quella mostrata in figura 3.3.2.m.



**Figura 3.3.2.m** – Esempio della risposta in frequenza di un filtro notch ( $f_0=1$  Hz).

La frequenza cardiaca può essere considerata costante solo per intervalli di tempo relativamente brevi e non per tutta la durata dell'esperimento (~50 minuti), ecco perché la frequenza notch non è fissata ad un valore costante, ma viene calcolata nello spettro di ogni singolo trial come latenza del picco massimo nella banda 0.7÷1.5 Hz. Adattare la frequenza notch al singolo trial permette di utilizzare un filtro piuttosto selettivo, riducendo al massimo il rischio di eliminare assieme alla componente cardiaca anche componenti del segnale utile. La Figura 3.3.2.o mostra l'andamento di un trial prima (blu) e dopo (rosso) essere stato filtrato con il filtro

notch, mentre la figura 3.3.2.n mette a confronto lo spettro dello stesso segnale prima e dopo il filtraggio. Il simbolo “x” indica il picco massimo nella banda 0.7÷1.5 Hz, ovvero la frequenza notch del filtro applicato.



**Figura 3.3.2.n-o** – Spettri di un trial prima (azzurro) e dopo (rosso) l’applicazione di un filtro notch (n) e relativi andamenti temporali (o), (cogetto 1, canale C4 $_{\Delta$ HbO<sub>2</sub>, evento 1).

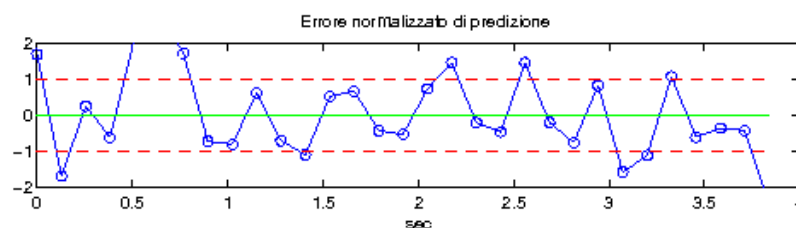
Dopo tutte queste operazioni di pre-elaborazione del segnale, viene fatto un controllo sulla rumorosità dei canali: per ogni trial è stato calcolato il valore di deviazione standard e mediato con i valori degli altri trial appartenenti allo stesso canale. I canali che hanno una deviazione standard media superiore a 800 nM (valore non giustificabile fisiologicamente) vengono scartati dalle analisi successive. Questo controllo si rende necessario perché non sempre nella fase di montaggio si riesce a posizionare correttamente tutte le sorgenti, e può succedere che il segnale che viene registrato in un canale sia relativo solo al rumore di misura, con valori misurati molto elevati ma dovuti solo all’alto guadagno imposto al tubo fotomoltiplicatore. Da tali canali non sarebbe comunque possibile ricavare la risposta emodinamica. Tale

controllo elimina generalmente un canale per soggetto, ma si è verificato un caso in cui per un soggetto sono stati eliminati più del 50% dei canali: come anticipato nel paragrafo 2.1, si è deciso di non analizzare i dati acquisiti dal quel soggetto.

### 3.3.3 Implementazione della stima bayesiana

L'approccio bayesiano alla stima della risposta emodinamica prevede di descrivere l'andamento della risposta emodinamica con il modello statistico a priori descritto dalla formula 3.3.5. L'ordine  $m$  della matrice alle differenze  $F$  è posto pari a 1, ovvero si è scelto di basare il modello di  $u(t)$  sulla continuità della sua derivata prima.

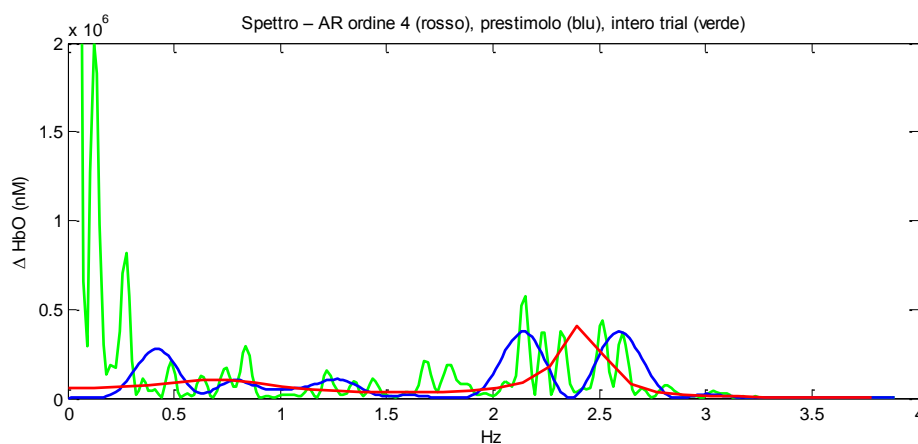
Il rumore  $v(t)$ , invece, è modellato come l'uscita di un filtro auto regressivo (AR) di ordine  $p$ , alimentato da un rumore bianco a media nulla e varianza  $\sigma^2$ . I parametri della matrice di covarianza  $\Sigma_v$  (esplicitata nella formula 3.3.4) sono stimati a partire dal segnale di prestimolo, implementando le equazioni di Yule-Walker. L'intervallo di prestimolo, come spiegato nel paragrafo 3.3.1, ha una durata di 4 secondi: un intervallo di durata superiore includerebbe probabilmente anche componenti di segnale utile. I  $p+1$  parametri del modello ( $p$  coefficienti della matrice  $A$  a cui si aggiunge la stima della varianza  $\sigma^2$  del rumore in ingresso al filtro) sono perciò stimati a partire da solo 30 campioni circa. I criteri proposti in letteratura (come FPE - Final Prediction Error o AIC - Akaike Information Criterion) per la scelta dell'ordine ottimo del modello, non sono utilizzabili su un numero così limitato di campioni: per spiegare bene i dati indicano ordini troppo elevati, quasi uguali al numero di campioni a disposizione. Per questo motivo si è scelto di fissare empiricamente l'ordine del modello pari a 4.



**Figura 3.3.3.a** – Esempio dell'andamento dell'errore normalizzato di predizione del modello AR identificato su dati di prestimolo, utilizzato per una verifica visiva della bontà del modello.



Il numero limitato di campioni di prestimolo impedisce anche l'impiego di test canonici (come il test di Anderson) per valutare la bontà del modello, perché si tratta generalmente di test statistici che richiedono un numero sufficientemente elevato di campioni. E' stata dunque possibile solo un'analisi qualitativa della bontà del modello, mediante due approcci: verifica visiva della bianchezza dell'errore di predizione (in grafici come quello rappresentato in figura 3.3.3.a) e analisi visiva degli spettri in grafici come quello di figura 3.3.3.b). In questa figura lo spettro relativo al modello AR identificato sui dati di prestimolo (rosso) è sovrapposto agli spettri del segnale di prestimolo (blu) e dell'intero trial (verde). Il numero molto limitato di campioni a disposizione costringe a valutare versioni molto approssimative degli spettri dei segnali, ottenuti dal segnale di prestimolo e dall'intero trial tramite zero-padding da DFT. Dal grafico è comunque possibile osservare come (in questo esempio) le componenti spettrali del modello AR (ordine 4) approssimino relativamente bene il profilo spettrale del rumore presente sia nel prestimolo (blu) che nell'intero trial (verde, in cui bisogna tener presente che il picco maggiore identifica soprattutto le componenti di segnale utile ed è quindi corretto che non siano identificate nel modello AR).



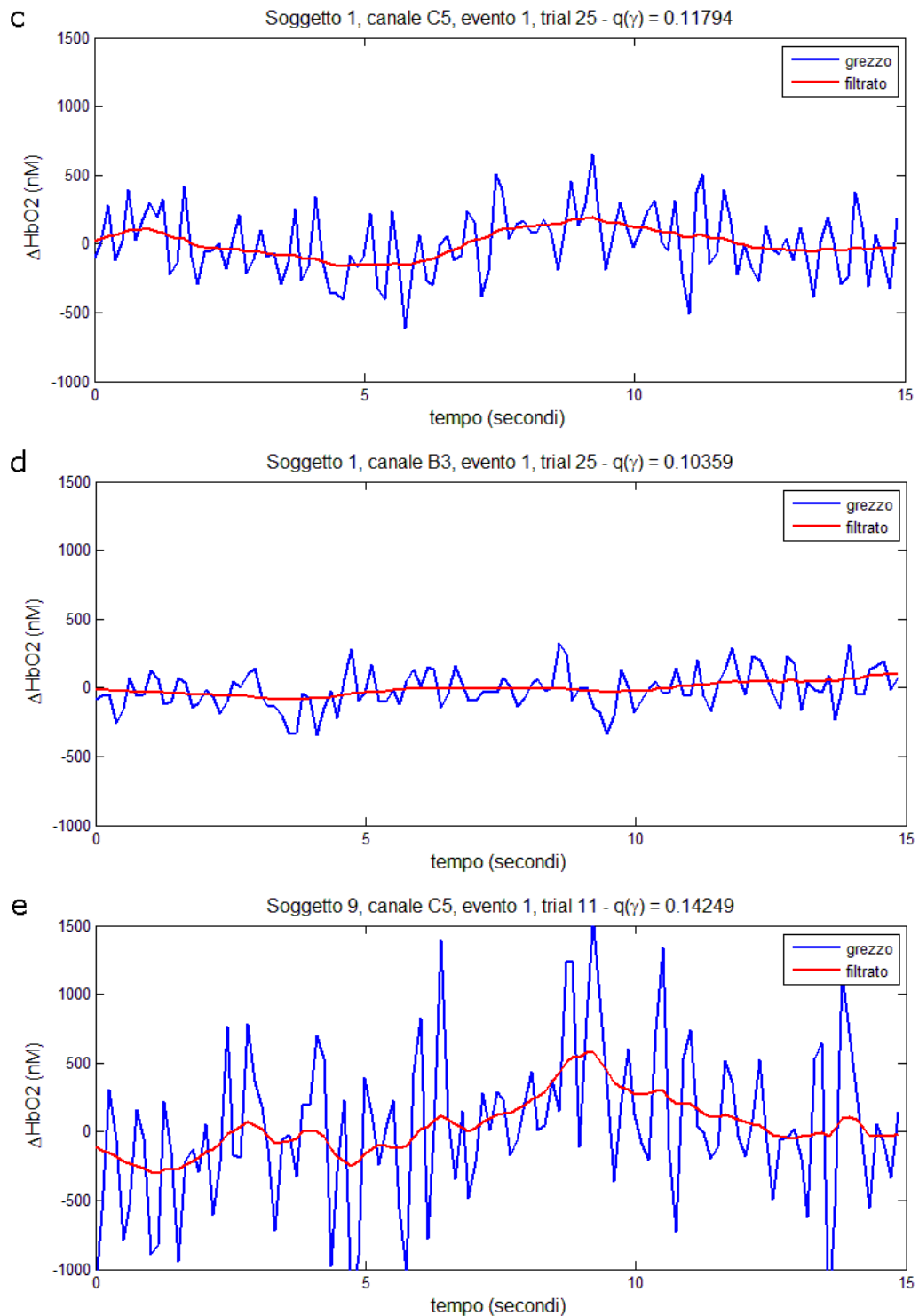
**Figura 3.3.3.b** – Esempio di spettro relativo al modello AR di ordine 4 stimato (rosso) e spettri ottenuti tramite zero-padding da DFT del segnale di prestimolo (blu) e dell'intero trial considerato (verde).

La formula (3.3.8) per il calcolo di  $\hat{u}$ , richiede l'inversione di una matrice  $n \times n$  (con  $n$  numero di campioni per ogni trial), con un costo computazionale  $O(n^3)$ , molto elevato. Inoltre tale inversione deve essere reiterata per ogni trial per un numero di

volte che permetta all'algoritmo di calcolare il valore di  $\gamma$  ottimo giungendo a convergenza. Per questo motivo, sono stati implementati degli algoritmi di SVD (Singular Value Decomposition) in grado di ridurre drasticamente i tempi di calcolo (complessità  $O(n)$  per ogni iterazione) garantendo allo stesso tempo un'elevata precisione di calcolo (maggiori informazioni a riguardo si possono trovare in [59]).

Il criterio di Twomey, utilizzato per la scelta del valore ottimo di gamma, viene implementato risolvendo l'equazione (3.3.8) con una tecnica di bisezione e facendo variare gamma nell'intervallo di valori  $10^{-2} \div 10^4$ . E' possibile ottenere un valore di gamma in quasi tutti i trial filtrati (in media più dell'85% del totale dei trial): i trials ove il criterio di Twomey non giunge a convergenza vengono scartati perché molto probabilmente la stima dei parametri della matrice  $\Sigma_v$  ( ed in particolare di  $\sigma^2$ ) relativa a quei trials non è avvenuta in modo sufficientemente affidabile. Inoltre è necessario porre un limite inferiore ed un limite superiore al valore normalizzato dei gradi di libertà ( $q(\gamma)/n$ ), per individuare i casi di oversmoothing (gamma<0.04) e undersmoothing (gamma>0.4) e rielaborare il loro valore di gamma. In particolare, viene calcolato il valore medio di gamma a partire dai trials giunti a convergenza senza implicare over/undersmoothing, e si impone questo valore di gamma per rifiltrare i trials che mostrano un numero inadeguato di gradi di libertà.

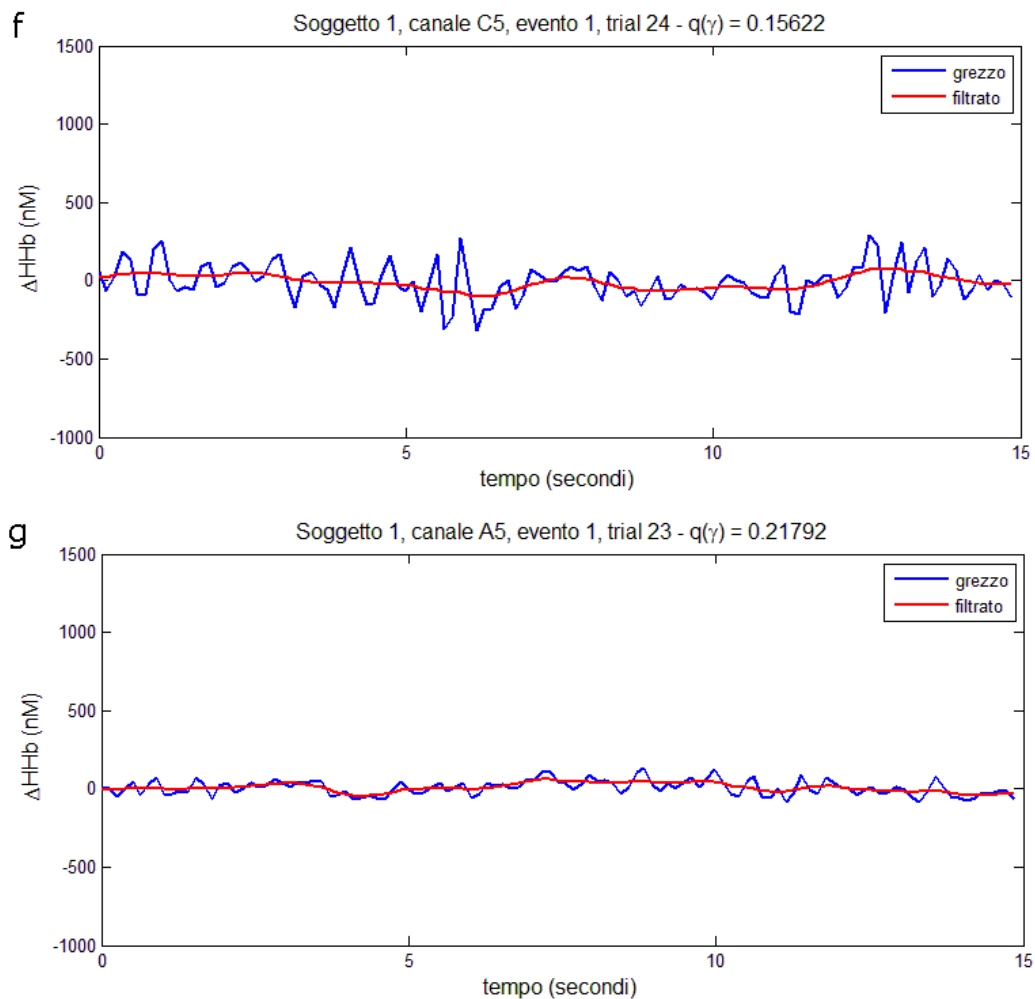
Le figure 3.3.3.c-h mostrano alcuni esempi dei risultati ottenuti su singoli trials (rosso) grazie all'approccio bayesiano appena descritto, sovrapposti all'andamento temporale degli stessi trials non filtrati (blu). I trials filtrati rappresentati in (c-e), pur essendo tutti relativi a misure di  $\Delta\text{HbO}_2$ , seguono andamenti molto diversi fra loro. In particolare il canale  $C5_{\Delta\text{HbO}_2}$  del soggetto 11, a cui appartiene il trials rappresentato in figura 3.3.3.e, è un canale molto rumoroso e questo si riflette anche sull'andamento e sul SNR del singolo trial rappresentato anche dopo essere stato filtrato.



**Figura 3.3.3.c-e** – Esempi di trials relativi a misure di  $\Delta\text{HbO}_2$  filtrati con approccio bayesiano alla stima (rosso) e sovrapposti all'andamento temporale degli stessi trials non filtrati (blu).

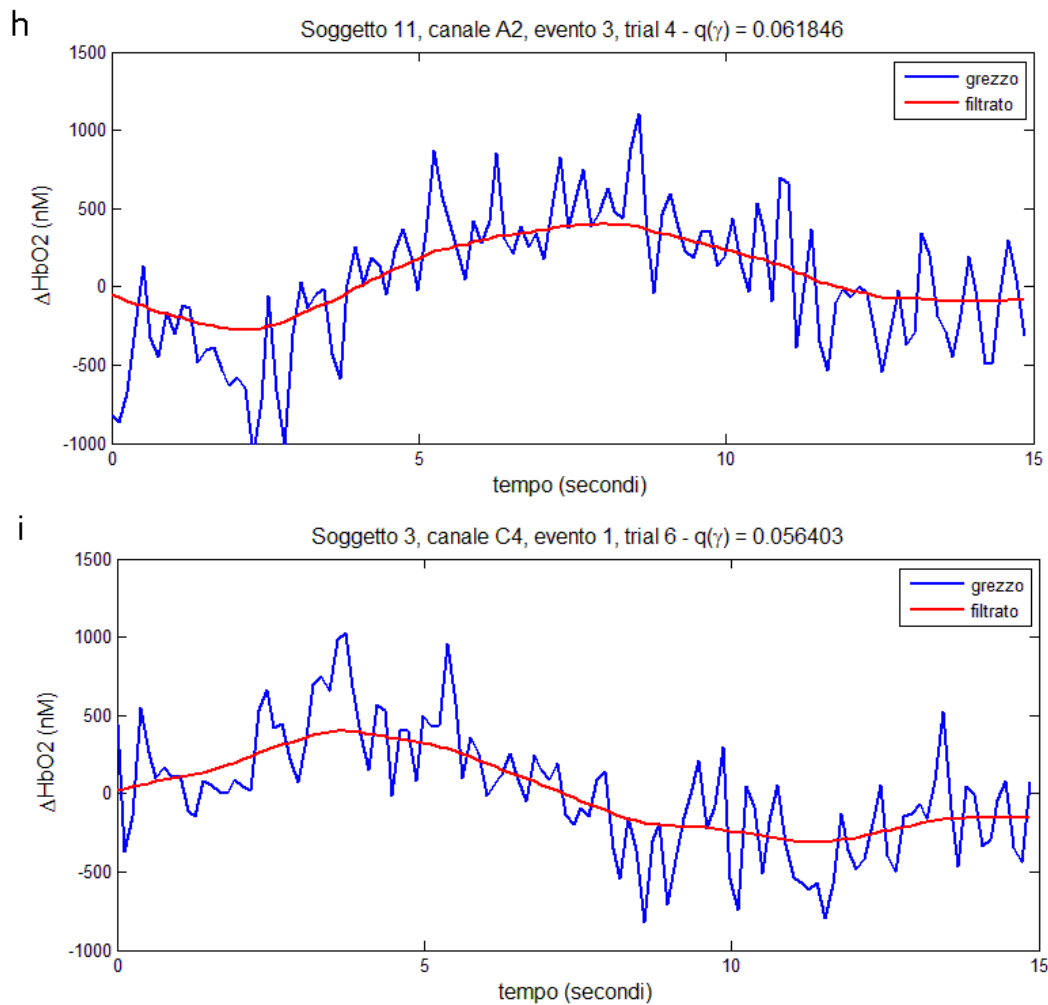
Le immagini in figura 3.3.3.f-g mostrano invece due risultati relativi a misure di  $\Delta\text{HHb}$ : in entrambi gli esempi (e in generale nella maggior parte delle misure di  $\Delta\text{HHb}$ ) il segnale filtrato segue un andamento quasi piatto, anche la componente di

Mayer non sembra presente. Evidentemente, come sarà confermato anche nell'analisi dei risultati finali, il segnale relativo a  $\Delta\text{HHb}$ , oltre a mostrare una curva della risposta emodinamica con valori inferiori in modulo, è in genere molto più debole e rumoroso rispetto a quello relativo a  $\Delta\text{HbO}_2$ .



**Figura 3.3.3.f-g** – Esempi di trials relativi a misure di  $\Delta\text{HHb}$  filtrati con approccio bayesiano alla stima (rosso) e sovrapposti all'andamento temporale degli stessi trials non filtrati.

In generale è difficile se non impossibile distinguere la presenza di un'eventuale risposta emodinamica nei singoli trials filtrati, nemmeno per le misure di  $\Delta\text{HbO}_2$  (che dovrebbero mostrare una curva hrf di intensità maggiore). Le immagini in figura 3.3.3.h-i, mettono infatti in evidenza la presenza della componente di Mayer anche dopo il filtraggio del segnale. Nella maggior parte dei singoli trials acquisiti (relativi a  $\Delta\text{HbO}_2$ ), andamenti approssimabili con delle sinusoidi di periodo  $\sim 15$  secondi e con valori  $\sim \pm 500$  nM dominano l'intero segnale anche dopo essere stato filtrato, impedendo di riconoscere, quando presente, la presenza di segnale utile.



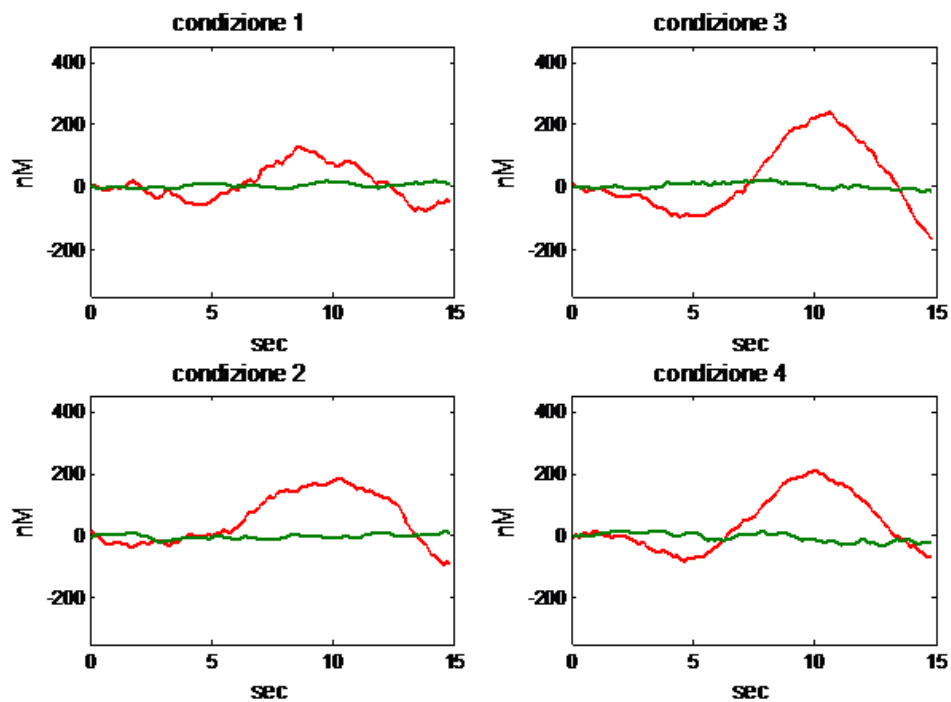
**Figura 3.3.3.h-i** – Esempi di trials relativi a misure di  $\Delta\text{HbO}_2$  filtrati con approccio bayesiano alla stima (rosso) e sovrapposti all'andamento temporale degli stessi trials non filtrati (blu). In entrambi la componente di Mayer risulta molto evidente.

Il fatto che la componente di Mayer non venga eliminata dal filtraggio dei singoli trial non deve stupire. L'approccio bayesiano basa di fatto i suoi risultati sui due modelli statistici a priori che descrivono il rumore ed il segnale utile. Come già precisato, i parametri del modello del rumore vengono stimati a partire da un segnale di prestimolo, corrispondente a soli 4 secondi. Stimare i parametri in un intervallo di tempo così breve non permette al modello di spiegare correttamente le componenti fisiologiche più lente, come la componente respiratoria e soprattutto la componente di Mayer, poiché queste componenti hanno andamenti approssimabili con delle sinusoidali di periodo maggiore di 4 secondi (circa 6 secondi per la componente respiratoria e 15 secondi per la componente di Mayer). Inoltre il modello statistico del segnale utile non fa alcuna ipotesi deterministica sulla forma della risposta emodinamica, imponendo solamente condizioni di continuità al segnale da stimare.

Di fatto il modello del segnale utile ingloba in se, oltre alla curva attesa di hrf, anche tutte le componenti lente del rumore, fra le quali soprattutto la componente di Mayer. La stima bayesiana dunque è in grado di filtrare la maggior parte del rumore ad alta frequenza senza rischiare di eliminare anche componenti utili del segnale, ma fatica ad eliminare le componenti di rumore a bassa frequenza. Per questo motivo, come già anticipato, l'approccio bayesiano proposto in questa tesi per la stima della risposta emodinamica prevede anche di mediare fra loro i valori dei trials filtrati che corrispondono ad una stessa tipologia di stimolazione della memoria visiva. Poiché il rumore (fisiologico ma anche di altra origine) sovrapposto alla risposta emodinamica non è ad essa temporalmente correlato e l'intervallo di tempo che intercorreva fra l'inizio di una prova e l'inizio della successiva nel corso dell'esperimento variava in modo casuale, la probabilità che le componenti fisiologiche siano in fase nei diversi trials mediati è molto ridotta. E' ragionevole assumere che il rumore, inteso come somma di tutte le componenti del segnale diverse dalla risposta emodinamica ma ancora presenti nei trials filtrati, sia un segnale casuale, non correlato ad hrf e a media nulla. La risposta emodinamica invece, poiché vengono mediati fra loro solamente i trials relativi allo stesso tipo di stimolo, può essere assunta identica in ogni trial mediato. Mediando i vari trials si annullano quindi le componenti fisiologiche lasciando inalterata la hrf.

Per valutare singolarmente gli andamenti temporali medi di  $\Delta\text{HbO}_2$ ,  $\Delta\text{HHb}$  e delle variazioni nella concentrazione di emoglobina totale ( $\Delta\text{HbT} = \Delta\text{HbO}_2 + \Delta\text{HHb}$ ) in risposta ai diversi tipi di stimoli della memoria visiva, per ogni canale sono stati considerati in modo separato i 4 possibili eventi, mediando fra loro solamente i trials filtrati relativi ad uno stesso canale e ad uno stesso evento. In questo modo, per ogni canale, sono state ottenute le stime degli andamenti temporali di  $\Delta\text{HHb}$  e  $\Delta\text{HbO}_2$  in corrispondenza dei 4 possibili eventi (un esempio è mostrato in figura 3.3.3.j).

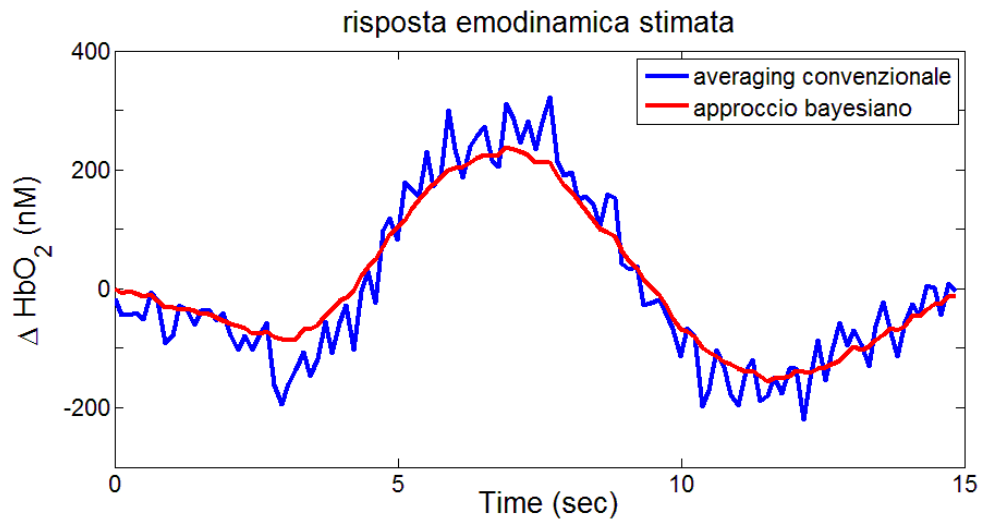
Come si può notare in figura 3.3.3.j, le stime della curva hrf media sono corrette per il valore di baseline. La correzione avviene sottraendo dall'intera curva di risposta emodinamica media stimata (per ogni evento di ogni canale), il suo valor medio nell'intervallo di tempo di 0-500 ms a partire dal segnale di trigger.



**Figura 3.3.3.j** – Soggetto 1, canale  $C5_{\Delta HbO_2}$  e  $C5_{\Delta HHb}$ : stime della risposta emodinamica nel canale C5 intese come andamenti medi delle variazioni di  $\Delta HbO_2$  (rosso) e di  $\Delta HHb$  (verde) nelle quattro condizioni.

L'approccio bayesiano per la stima della curva hrf, prevede di mediare fra loro solo i trials che non sono stati eliminati nei diversi passaggi di elaborazione (risposta errata del soggetto, movimenti oculari, presenza di artefatti) e filtraggio (non convergenza del criterio di Twomey) del segnale acquisito. In questo modo il numero di trials che possono essere mediati fra loro in corrispondenza dei singoli eventi è in genere compreso fra 10 e 25 trials. Questo valore varia molto non solo da un canale all'altro, ma anche da soggetto a soggetto. Avere a disposizione un numero così limitato di trials non permette di stimare in modo sufficientemente accurato la risposta emodinamica in corrispondenza di ogni singolo evento. Le componenti di rumore (in particolare la componente di Mayer) ancora presenti nei trials filtrati, anziché venire eliminate omogeneamente dall'operazione di media, contribuiscono erroneamente alla stima della curva hrf. Per questo motivo, mantenere separati i quattro tipi di eventi nel calcolo delle medie non permetterebbe né di valutare correttamente le curve hrf, né di confrontare coerentemente fra loro i risultati ottenuti in soggetti e canali diversi. Come sarà esposto in dettaglio nel prossimo capitolo, per stimare le risposte emodinamiche per valutare l'effetto di carico e l'effetto di lateralizzazione e possibile unire i vari eventi, in modo diverso a seconda che si stia

analizzando l'effetto del carico o la lateralizzazione. Le risposte emodinamiche sono quindi stimate da un numero sufficientemente elevato di trials (~40), tale da garantire una corretta eliminazione delle componenti di rumore ancora presenti nei singoli trials filtrati. La figura 3.3.3.k mostra un esempio di risposta emodinamica stimata sia utilizzando l'averaging convenzionale (linea blu) sia utilizzando l'approccio bayesiano proposto.



**Figura 3.3.3.k** – Soggetto 9, canale A2/C2<sub>ΔHbO<sub>2</sub></sub>: stima della risposta emodinamica ottenuta con l'averaging convenzionale (blu) e l'approccio bayesiano proposto (rosso).



## 4. Risultati

### 4.1 Rapporto Segnale/Rumore

Per valutare i risultati dell'approccio bayesiano proposto, è necessario calcolare il rapporto fra il segnale utile ed il rumore (SNR) presenti nel segnale prima e dopo il filtraggio. In dati reali, come quelli su cui viene fatta l'analisi in questa tesi, non si conosce con esattezza il segnale utile e non è possibile separarlo totalmente dal rumore. Pertanto, è preferibile calcolare il contrast-to-noise ratio (CNR). Il CNR, già utilizzato in letteratura per valutare il livello di SNR in segnali fNIRS (per esempio da Zhang et. al [69]), è un indice che mette in relazione la potenza del segnale utile con quella del rumore, a partire da un'analisi della densità spettrale di potenza (PSD). Data la natura periodica della nostra stimolazione visiva, questo metodo che definisce l'SNR nel dominio della frequenza è preferibile a quelli basati sul dominio del tempo, perché consente una separazione più accurata tra segnale utile e rumore. Dati gli  $n$  campioni del segnale  $y(t)$ , viene stimata la densità spettrale di potenza  $PSD(\omega)$  di  $y(t)$  con il metodo del periodogramma:

$$PSD(\omega) = \frac{1}{n} |Y(\omega)|^2 \quad (4.1.1)$$

dove

$Y(\omega)$  è la trasformata discreta di Fourier, ottenuta dai campioni di  $y(t)$ .

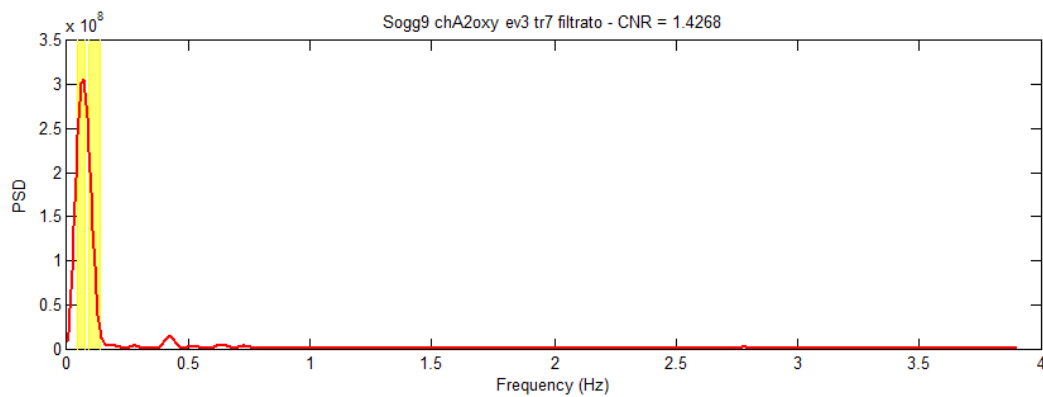
Il valore di CNR si calcola come:

$$CNR = \frac{P_{utile}}{P_{rumore}} \quad (4.1.2)$$

con

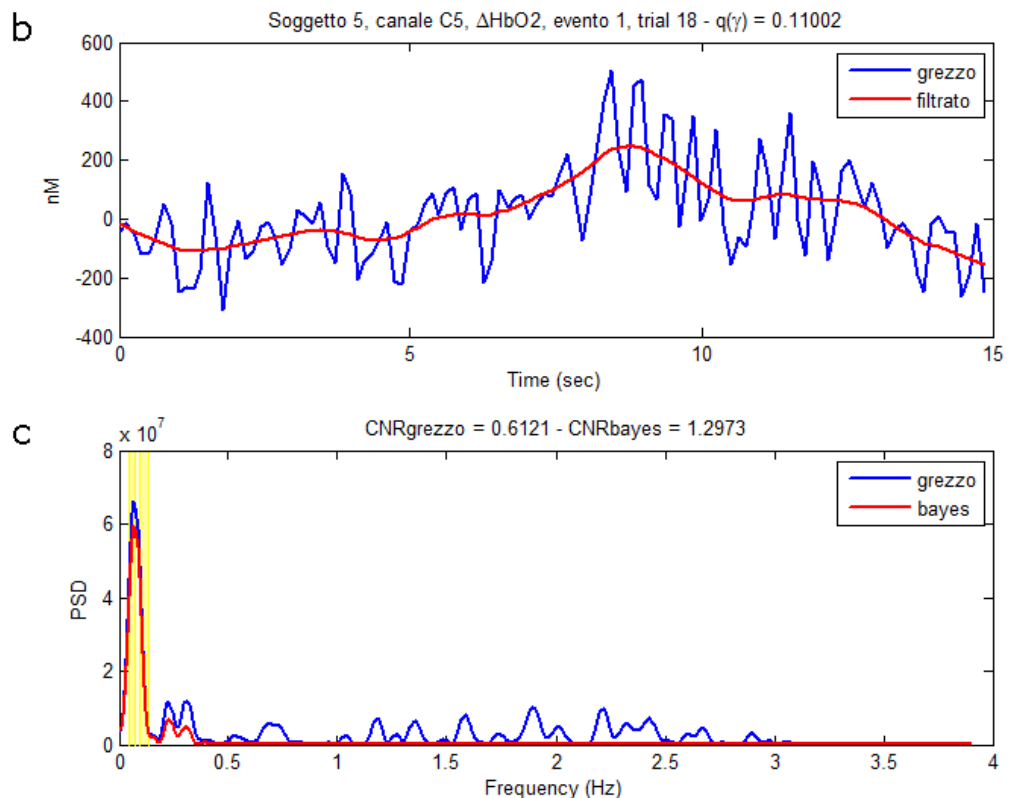
$P_{utile}$  potenza del segnale utile, calcolata integrando (con scala lineare) i valori di  $PSD(\omega)$  nella "banda utile"

$P_{rumore}$  potenza del rumore, calcolata integrando (con scala lineare) i valori di  $PSD(\omega)$  su tutte le frequenze al di fuori della "banda utile"



**Figura 4.1.a** – Esempio dei valori di densità spettrale di potenza stimati da un trial filtrato. In giallo è evidenziata la banda utile.

La banda utile prevista da questo paradigma sperimentale è data dall'unione di 0.050-0.067 Hz (banda fondamentale) e di 0.100-0.133 Hz (seconda armonica). La figura 4.1.a mostra i valori della densità spettrale di potenza, relativi ad un trial filtrato con approccio bayesiano, evidenziando in giallo la banda utile.



**Figura 4.1.b-c** - confronto fra il risultato del filtraggio bayesiano (rosso) in un trial relativo all'evento 1 acquisito dal soggetto 5 nel canale  $C5_{\Delta HbO_2}$ , e i valori dello stesso trial prima di applicare il filtro (blu), sia dal punto di vista delle variazioni temporali di  $HbO_2$  (b), sia dal punto di vista della densità spettrale di potenza (c). In giallo è evidenziata la banda utile cui si riferiscono i valori di CNR.

I grafici in figura 4.1.b-c, invece, confrontano il risultato dell'approccio bayesiano (rosso) applicato ad un trial (soggetto 5, canale C5 $\Delta$ HbO<sub>2</sub>, evento 1, trial 10) con i valori dello stesso trial prima di applicare il filtro (blu), sia dal punto di vista delle variazioni temporali di HbO<sub>2</sub> (b), sia dal punto di vista della densità spettrale di potenza (c). La regolarizzazione del trial avvenuta ad opera del filtraggio bayesiano con un valore normalizzato di gradi di libertà  $q(\gamma) = 0.11002$ , ha migliorato molto il rapporto segnale disturbo. In particolare i valori (arrotondati) di CNR sono passati da 0.61 (nel trial grezzo) a 1.30 (nel trial filtrato).

La tabella 4.1.a mette a confronto i valori medi di CNR relativi ai singoli trials dell'intero dataset, prima (dati grezzi) e dopo essere stati filtrati con l'approccio bayesiano (proposto in questa tesi), separati per le variazioni di concentrazione di emoglobina ossigenata ( $\Delta$ HbO<sub>2</sub>) e di emoglobina deossigenata ( $\Delta$ HHb). La tabella 4.1.b, invece, mette a confronto i valori medi di CNR calcolati dopo aver mediato fra loro più trials, e quindi riporta il CNR delle hrf stimate con l'averaging convenzionale ed il CNR delle hrf stimate invece con l'approccio bayesiano proposto.

CNR su singolo trial		
	$\Delta$ HbO <sub>2</sub>	$\Delta$ HHb
Dati grezzi	0,61	0,42
Approccio bayesiano	2,41	1,73

**Tabella 4.1.a** – Valori medi di CNR calcolati su singoli trials, relativi a misure di emoglobina ossigenata e deossigenata, prima di essere filtrati (Dati grezzi) e dopo essere stati filtrati con l'approccio bayesiano (Bayes).

CNR sulle hrf stimate		
	$\Delta$ HbO <sub>2</sub>	$\Delta$ HHb
Averaging convenzionale	1,39	0,97
Approccio bayesiano	3,35	2,24

**Tabella 4.1.b** – Valori medi di CNR calcolati sulle hrf stimate, relativi a misure di emoglobina ossigenata e deossigenata. Sono messi a confronto i valori di CNR che si ottengono applicando l'averaging convenzionale o il filtraggio bayesiano.

Per quanto riguarda le misure di  $\Delta\text{HbO}_2$ , la regolarizzazione introdotta dal filtraggio bayesiano nei singoli trials aumenta notevolmente il rapporto segnale/rumore. I valori di CNR presenti in tabella 4.1.a, infatti, mostrano un aumento del 295% dopo il filtraggio, passando da  $\text{CNR}_{\text{Dati grezzi}} = 0.61$  a  $\text{CNR}_{\text{Bayes}} = 2.41$ . Aver migliorato l'SNR nei singoli trials, permette di raggiungere buoni risultati nella stima finale della risposta emodinamica (ovvero dopo aver mediato fra loro i trials filtrati), soprattutto rispetto all'averaging convenzionale che invece media direttamente i dati grezzi. I valori in tabella 4.1.b in corrispondenza delle misure di  $\Delta\text{HbO}_2$  mostrano infatti un aumento del 141% del CNR medio, passando da un valore di  $\text{CNR}_{\text{Averaging Convenzionale}} = 1.39$  a  $\text{CNR}_{\text{Bayes}} = 3.35$ .

Per quanto riguarda invece le misure di  $\Delta\text{HHb}$ , i singoli trials grezzi mostrano in tabella 4.1.a un valore medio di CNR pari a 0.42, denotando un rapporto segnale/rumore decisamente inferiore a quello delle misure di  $\Delta\text{HbO}_2$ .

In generale si può affermare che le misure di  $\Delta\text{HHb}$  forniscono segnali molto più deboli rispetto alle misure di  $\Delta\text{HbO}_2$ , con valori di CNR molto più bassi. Questo aspetto si può collegare anche ai valori attesi della curva hfr dell'emoglobina deossigenata che, rispetto a quelli attesi per l'emoglobina ossigenata, sono inferiori in modulo. Applicare il filtro di Bayes ai singoli trials permette di ridurre notevolmente la potenza del segnale al di fuori della banda utile, facendo aumentare i valori medi di CNR di più del 300% ( $\text{CNR}_{\text{dati grezzi}} = 0.42$ ,  $\text{CNR}_{\text{Bayes}} = 1.73$ ), ma si tratta di un rapporto segnale/rumore ancora molto basso rispetto a quello dei singoli trials filtrati relativi a  $\Delta\text{HbO}_2$  ( $\text{CNR}_{\text{Bayes}} = 2.41$ ). Analogamente, anche per le misure di  $\Delta\text{HHb}$ , l'approccio bayesiano migliora enormemente i risultati dell'averaging convenzionale (tabella 4.1.b), generando un aumento medio del 131% nei valori di CNR ( $\text{CNR}_{\text{AC}} = 0.97$ ,  $\text{CNR}_{\text{Bayes}} = 2.24$ ), senza però raggiungere i corrispondenti valori di CNR per le misure di  $\Delta\text{HbO}_2$  (3.35).

Oltre che con l'averaging convenzionale, l'approccio bayesiano è stato confrontato con un tradizionale filtro passabasso, il quale è stato applicato ai singoli trials prima di effettuare la media. Come frequenza di taglio si è scelto il valore di 0.3 Hz, ovvero di poco superiore al massimo valore di frequenza atteso per la risposta emodinamica, in modo da ridurre al minimo la possibilità di togliere insieme al rumore anche parte del segnale utile. La tabella 4.1.c contiene i valori di CNR ottenuti in media nei singoli trials e nelle risposte emodinamiche stimate. Come

prevedibile, i valori di CNR sono superiori in tutti i casi ( $\Delta\text{HbO}_2$  e  $\Delta\text{HHb}$ , singolo trial e hrf stimate) ai corrispondenti valori di CNR calcolati a partire dai dati grezzi. Rispetto all'approccio bayesiano, invece, i valori medi di CNR calcolati sui singoli trials dopo essere stati filtrati con il filtro passabasso sono leggermente inferiori per  $\Delta\text{HbO}_2$  ( $\text{CNR}_{\text{Bayes}} = 2.41$ ,  $\text{CNR}_{\text{PassaBasso}} = 2.28$ ) e quasi identici per  $\Delta\text{HHb}$  ( $\text{CNR}_{\text{Bayes}} = 1.73$ ,  $\text{CNR}_{\text{PassaBasso}} = 1.72$ ). Questi risultati suggeriscono che le componenti di rumore con frequenza superiore a 0.3 Hz sono completamente eliminate dal filtro passabasso e quasi completamente dal filtro bayesiano. Nelle frequenze del segnale utile, invece, solamente il filtraggio bayesiano è in grado di eliminare ulteriori componenti di rumore, salvaguardando tuttavia, per le ipotesi statistiche sulle quali si basa, le componenti della risposta emodinamica. I valori di CNR relativi alle risposte emodinamiche stimate con il filtro passabasso, invece, superano in media i relativi valori calcolati sulle curve hrf stimate con l'approccio bayesiano. Si tratta di una leggera differenza per le misure relative a  $\Delta\text{HbO}_2$  ( $\text{CNR}_{\text{Bayes}} = 3.35$ ,  $\text{CNR}_{\text{PassaBasso}} = 3.45$ ) e di una differenza un po' più marcata per le misure relative a  $\Delta\text{HHb}$  ( $\text{CNR}_{\text{Bayes}} = 2.24$ ,  $\text{CNR}_{\text{PassaBasso}} = 2.67$ ).

CNR con filtraggio passabasso		
	$\Delta\text{HbO}_2$	$\Delta\text{HHb}$
Singolo trial	2,28	1,72
hrf stimate	3,45	2,67

**Tabella 4.1.c** – Valori medi di CNR calcolati sui singoli trials e loro sulle risposte emodinamiche stimate, mantenendo separati i canali relativi a misure di emoglobina ossigenata e deossigenata.

L'approccio bayesiano presenta quindi valori di CNR simili e a volte inferiori rispetto al filtro passabasso, ma ha il vantaggio di non fare alcuna ipotesi deterministica sulle frequenze delle componenti della risposta emodinamica. Applicando invece il filtro passabasso con una frequenza di taglio di poco superiore alla frequenza della risposta emodinamica attesa, si corre il rischio di eliminare, quando presente, parte del segnale utile (come sarà confermato nei prossimi paragrafi). Aumentando la frequenza di taglio si riduce ovviamente la perdita di segnale utile ma peggiora il CNR, rendendo non conveniente l'applicazione del filtraggio in frequenza. Questo problema relativo all'applicabilità dei filtri di tipo

passabasso, con bassa frequenza di taglio, ai segnali di fNIRS è già stato messo in luce anche in altri studi [67].

## **4.2 Risultati comportamentali**

L'approccio bayesiano esposto nel paragrafo 3.3.3, permette di stimare le variazioni medie delle concentrazioni di emoglobina ossigenata e deossigenata in corrispondenza dei 36 canali d'acquisizione, negli 11 soggetti che hanno partecipato con esito positivo all'esperimento condotto per raccogliere i dati elaborati in questa tesi. Prima di effettuare un'analisi statistica sulle stime delle risposte emodinamiche che permetta di individuare le aree di attivazione cerebrale e di dare quindi un'interpretazione psicologica ai risultati, è opportuno compiere un'analisi comportamentale, valutando cioè le risposte date dai soggetti durante l'esperimento (al soggetto era chiesto di indicare se il colore di uno dei quadrati del *memory-array* fosse cambiato o meno nel *test-array*, risposta che poteva quindi essere corretta o errata). Nella stima delle risposte emodinamiche si è tenuto conto della correttezza o meno della risposta del soggetto ad ogni prova, scartando quei trials ove il soggetto non aveva risposto in modo corretto: l'accuratezza delle risposte è data dal rapporto tra il numero di prove a cui il soggetto ha risposto correttamente rispetto al numero totale di prove. Le condizioni che hanno caratterizzato il paradigma sperimentale (o eventi) sono quattro: 2 o 4 quadrati visualizzati a sinistra (condizione 1/condizione 2) oppure 2 o 4 quadrati visualizzati a destra (condizione 3/condizione 4) rispetto al punto centrale di fissazione. La tabella 4.2.a contiene i valori di accuratezza delle risposte date nelle singole condizioni, in corrispondenza dei singoli soggetti. Per valutare i risultati comportamentali dell'esperimento, è necessario valutare l'effetto di carico e l'effetto di lateralizzazione combinando in modo opportuno i valori di accuratezza delle risposte relative alle singole condizioni.

	2 quadrati a sinistra	4 quadrati a sinistra	2 quadrati a destra	4 quadrati a destra
soggetto01	0,936	0,729	0,979	0,708
soggetto02	0,900	0,700	0,933	0,800
soggetto03	0,972	0,833	0,971	0,722
soggetto04	0,944	0,694	0,917	0,722
soggetto05	0,944	0,833	0,972	0,972
soggetto06	0,972	0,806	0,861	0,694
soggetto07	1,000	0,906	0,971	0,824
soggetto08	0,972	0,806	0,944	0,806
soggetto09	0,972	0,833	0,944	0,889
soggetto10	0,944	0,806	0,917	0,889
soggetto11	0,972	0,778	0,917	0,639
MEDIA	0,957	0,793	0,939	0,788
STD	0,027	0,064	0,035	0,101

**Tabella 4.2.a** – Valori di accuratezza delle risposte degli 11 soggetti nelle 4 diverse condizioni che hanno caratterizzato il paradigma sperimentale (2 quadrati a sinistra, 4 a sinistra, 2 a destra e 4 a destra) con rispettivi valor medi e deviazioni standard.

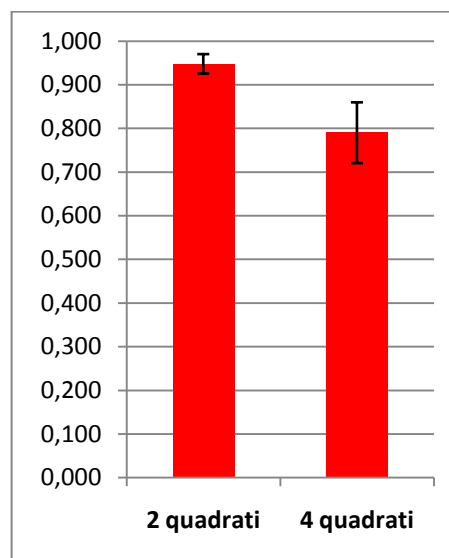
	2 quadrati	4 quadrati
soggetto01	0,958	0,719
soggetto02	0,917	0,750
soggetto03	0,972	0,778
soggetto04	0,931	0,708
soggetto05	0,958	0,903
soggetto06	0,917	0,750
soggetto07	0,985	0,864
soggetto08	0,958	0,806
soggetto09	0,958	0,861
soggetto10	0,931	0,847
soggetto11	0,944	0,708
MEDIA	0,948	0,790
STD	0,022	0,070

**Tabella 4.2.b** – Studio dell'effetto di carico: valori di accuratezza delle risposte degli 11 soggetti alla presentazione di 2 o 4 quadrati durante la prova sperimentale, con rispettivi valori medi e deviazione standard.

Da un punto di vista comportamentale l'effetto di carico è l'influenza del numero di oggetti da memorizzare sull'accuratezza delle risposte fornite: nella tabella 4.2.a sono messi a confronto i valori di accuratezza delle risposte alla presentazione di 2 o di 4 quadrati, in corrispondenza dei singoli soggetti e

indipendentemente dal lato di visualizzazione, calcolati unendo le condizioni 1 e 3 (2 quadrati) e le condizioni 2 e 4 (4 quadrati).

Come ci si poteva aspettare, ogni soggetto mostra un'accuratezza maggiore nelle risposte in corrispondenza alle prove con soli 2 quadrati visualizzati, più facili da memorizzare rispetto a 4 quadrati. Le risposte errate alla visualizzazione di 4 quadrati hanno un'occorrenza maggiore circa del 15% rispetto a quelle relative a soli due quadrati. I valori di accuratezza media nelle prove con 2 o 4 quadrati sono rappresentati in figura 4.2.a assieme alle rispettive deviazioni standard.



**Figura 4.2.a** – Studio dell'effetto di carico: valori di accuratezza media, con relative deviazioni standard, delle risposte dei soggetti rispetto alla visualizzazione rispettivamente di 2 o 4 quadrati durante la prova sperimentale.

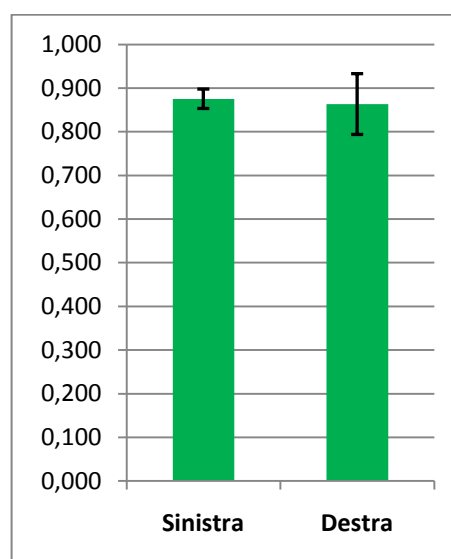
In generale per effetto di lateralizzazione si intende invece un diverso funzionamento dei due emisferi, in risposta a stimoli presentati a sinistra o a destra rispetto al punto centrale di fissazione, indipendentemente dal numero di quadrati visualizzati. Da un punto di vista comportamentale la lateralizzazione, quando presente, si riflette in una diversa accuratezza delle risposte nelle prove che richiedono di fissare l'attenzione sul lato sinistro o destro del display.



	Sinistra	Destra
soggetto01	0,832	0,844
soggetto02	0,800	0,867
soggetto03	0,903	0,845
soggetto04	0,819	0,819
soggetto05	0,889	0,972
soggetto06	0,889	0,778
soggetto07	0,955	0,897
soggetto08	0,889	0,875
soggetto09	0,903	0,917
soggetto10	0,875	0,903
soggetto11	0,875	0,778
MEDIA	0,875	0,863
STD	0,044	0,059

**Tabella 4.2.c** – Studio dell’effetto di lateralizzazione: valori di accuratezza delle risposte degli 11 soggetti alla presentazione dei quadrati a sinistra o a destra del punto di fissazione, con rispettivi valori medi e deviazione standard.

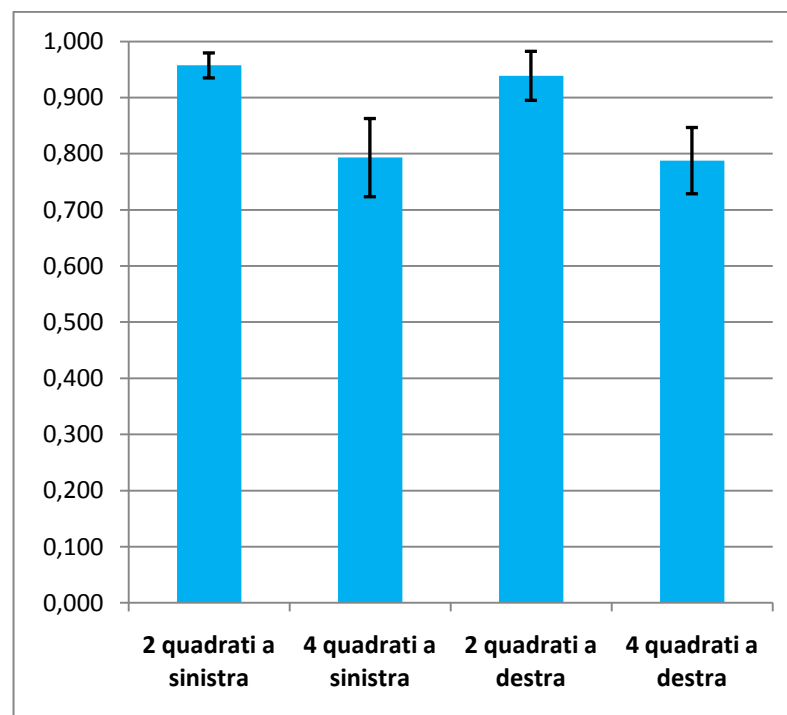
La tabella 4.2.c mette a confronto tali valori in corrispondenza dei singoli soggetti, unendo la condizione 1 alla condizione 2 (sinistra) e la condizione 3 alla condizione 4 (destra). Mentre l’effetto di carico è evidente anche nei singoli soggetti mostrando sempre un’accuratezza maggiore delle risposte relative alla memorizzazione di 2 quadrati, lo stesso non si può dire per l’effetto di lateralizzazione



**Figura 4.2.b** – Studio dell’effetto di lateralizzazione: valori di accuratezza media, con relative deviazioni standard, nelle prove che richiedevano al soggetto di memorizzare i quadrati visualizzati a sinistra o a destra del punto centrale di fissazione.

I valori in tabella 4.2.c, infatti, mostrano valori di accuratezza molto simili in entrambi i casi analizzati. I valori di accuratezza media delle risposte nelle due condizioni (sinistra e destra), rappresentati in figura 4.2.b, hanno una differenza di circa l'1%, non evidenziando alcun effetto di lateralizzazione.

In conclusione, l'analisi dei risultati comportamentali sugli 11 soggetti che hanno partecipato all'esperimento per l'acquisizione dei dati fNIRS ha evidenziato la presenza di un effetto di carico della memoria visiva a breve termine ma non ha mostrato alcuna differenza di lateralizzazione. L'accuratezza delle risposte fornite non dipende dal lato (sinistro o destro) del display ove si sposta l'attenzione del soggetto, ma soltanto dal numero più o meno elevato di quadrati visualizzati. Queste conclusioni, che confermano i risultati comportamentali attesi, sono evidenti anche in figura 4.2.c che mostra l'accuratezza media delle risposte nelle quattro condizioni prese singolarmente (riprendendo i valori della tabella 4.2.a).



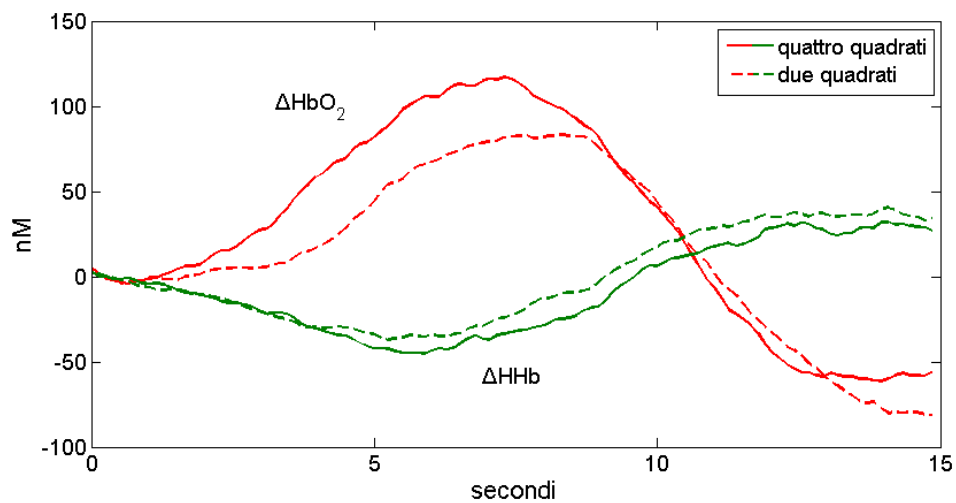
**Figura 4.2.c** –Valori di accuratezza media e relative deviazioni standard (relativi ai valori riportati in tabella 4.2.a) nelle quattro diverse condizioni che hanno caratterizzato il paradigma sperimentale.

### **4.3 *Analisi statistica ed interpretazione psicologica***

In questo paragrafo viene effettuata un'analisi statistica dei risultati ottenuti con l'elaborazione del segnale esposta nel capitolo 3, individuando le aree cerebrali che si sono attivate durante l'acquisizione dei dati fNIRS in relazione al paradigma sperimentale proposto. In particolare gli effetti di carico e di lateralizzazione legati alla VSTM non sono più affrontati da un punto di vista comportamentale ma a partire dai risultati delle risposte emodinamiche stimate. Oltre ai valori di  $\Delta\text{HbO}_2$  e di  $\Delta\text{HHb}$ , è stata valutata anche la variazione temporale della concentrazione totale di emoglobina, definita come stima del volume ematico cerebrale ( $\Delta\text{HbT} = \Delta\text{HbO}_2 + \Delta\text{HHb}$ ; Culver et al.). Per individuare le aree cerebrali da cui provengono le misure di risposte emodinamiche che riflettono in un modo sufficientemente significativo la presenza di attivazione si è scelto di utilizzare il t-test. I risultati ottenuti sono poi stati corretti per confronto multiplo con il metodo di false discovery rate (FDR) di Benjamini e Hochberg [17]. Il valore di FDR è stato fissato a  $q = 0.10$ , in modo che per ogni t-test eseguito non siano mediamente accettati più del 10% di falsi positivi.

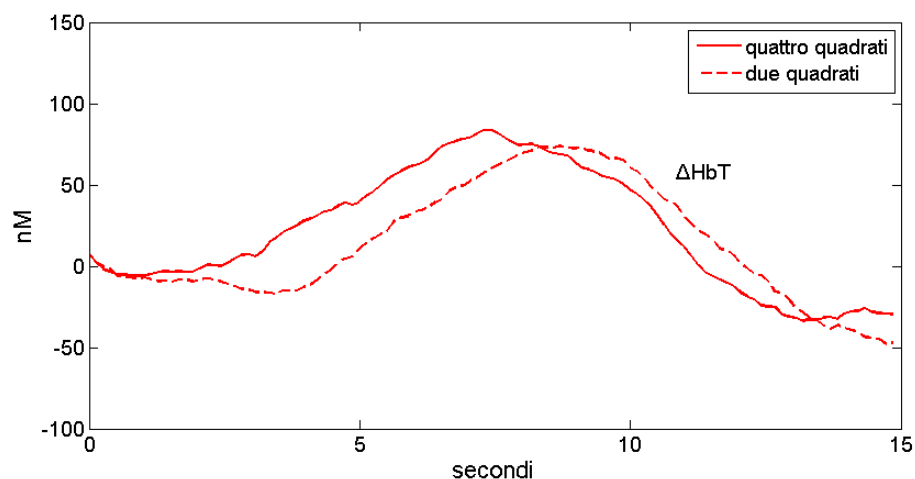
Il lato di visualizzazione dei quadrati da memorizzare non influisce sullo studio dell'effetto di carico, e non è dunque necessario mantenere separati i 4 eventi che hanno caratterizzato il paradigma sperimentale: l'unione dei trials relativi agli eventi 1-3 e 2-4 permette così di effettuare una stima molto più accurata delle risposte emodinamiche corrispondenti alla memorizzazione di rispettivamente 2 e 4 quadrati. Le condizioni considerate per l'analisi dell'effetto di carico sono perciò solamente due, in corrispondenza della presentazione di 2 quadrati oppure della presentazione di 4 quadrati.

Per effettuare l'analisi statistica sull'intero dataset, le risposte emodinamiche stimate nelle due condizioni, nei diversi canali degli 11 soggetti, vengono combinate come segue. Le due curve hrf stimate nelle condizioni con 2 e 4 quadrati dal segnale acquisito in ciascun canale dell'emisfero sinistro vengono mediate con le curve stimate dal segnale acquisito nelle medesime condizioni nel corrispondente canale simmetrico dell'emisfero destro. Per esempio, la curva hrf stimata in corrispondenza della visualizzazione di 2 quadrati nel canale  $B4_{\Delta\text{HbO}_2}$  del soggetto 1 viene mediata con la curva hrf stimata nel canale  $D4_{\Delta\text{HbO}_2}$  dello stesso soggetto, sempre in corrispondenza della visualizzazione di 2 quadrati.



**Figura 4.3.a** – Valori delle curve hrf medie ottenute mediando fra loro le hrf che si ottengono nei canali B4-D4 $_{\Delta HbO_2}$  (rosso) e B4-D4 $_{\Delta HHb}$  (verde) degli 11 soggetti, sia per la condizione con 2 quadrati che per la condizione con 4 quadrati.

Nella figura 4.3.a sono rappresentate le hrf medie ottenute mediando fra loro le hrf che si ottengono nei canali B4-D4 $_{\Delta HbO_2}$  (rosso) e B4-D4 $_{\Delta HHb}$  (verde) degli 11 soggetti, sia per la condizione con 2 quadrati (linea tratteggiata) che per la condizione con 4 quadrati (linea continua). La figura 4.3.b, invece, mostra gli andamenti delle hrf medie relative a  $\Delta HbT$  nei canali B4-D4, ottenute sommando i rispettivi andamenti di  $\Delta HbO_2$  e  $\Delta HHb$  rappresentati nella figura precedente.



**Figura 4.3.b** – Valori delle curve hrf relative alla variazione media di concentrazione di emoglobina totale negli 11 soggetti in corrispondenza dei canali B4-D4, ottenute sommando fra loro le rispettive curve hrf rappresentate in figura 4.3.a, relative ai canali B4-D4 $_{\Delta HbO_2}$  e B4-D4 $_{\Delta HHb}$ , sia per la condizione con 2 quadrati che per la condizione con 4 quadrati.

Le variazioni temporali medie di concentrazione di emoglobina ossigenata, deossigenata e totale, rappresentate nelle due figure, mostrano degli andamenti molto simili a quelli attesi in presenza di attivazione neuronale (descritti nel paragrafo 3.1). I valori dei picchi massimi raggiunti in entrambe le condizioni sono leggermente inferiori a quelli attesi (in modulo) ma, come ci si aspettava, hanno una latenza compresa fra i 6 e i 9 secondi dopo l'istante iniziale della prova.

L'effetto di carico si dovrebbe manifestare attraverso una risposta emodinamica con valori maggiori in modulo nelle prove relative alla visualizzazione di 4 quadrati, riflettendo una maggiore attivazione neuronale perché questa condizione richiede alla VSTM di elaborare un maggior numero di informazioni rispetto alle prove con soli 2 quadrati. Per individuare le aree di attivazione e la differenza tra le due condizioni viene utilizzato il t-test, valutando i valori massimi (per  $\Delta\text{HbO}_2$  e  $\Delta\text{HbT}$ , valori minimi per  $\Delta\text{HHb}$ ) delle risposte emodinamiche stimate. L'elevata risoluzione temporale del segnale fNIRS (rispetto per esempio agli studi di fMRI) rende possibile valutare con grande precisione il profilo di risposta emodinamica media stimata e la tempistica esatta del suo valore massimo. Per questo motivo il valore indicativo della risposta emodinamica media stimata per ogni coppia di canali simmetrici nei singoli soggetti, da utilizzare nel t-test, viene calcolato come valore di intensità media della curva in corrispondenza di un intervallo di 2 secondi, centrato rispetto alla latenza del picco massimo.

Per analizzare l'effetto di carico viene innanzitutto applicato un t-test a ciascuna condizione, che confronta i valori calcolati nelle condizioni con 2 quadrati e con 4 quadrati con i valori di baseline (zero): i p-values così ottenuti sono contenuti rispettivamente nella tabelle 4.3.a e 4.3.b.

I risultati dei due test hanno rivelato la presenza di attivazione (p-values inferiori alla soglia di significatività  $q=0.10$ ) in tutti i canali relativi a  $\Delta\text{HbO}_2$ , con valori minimi di p-value, per la condizione con 2 quadrati, in corrispondenza delle zone pSPL (A5/C5, p-value = 0.0028) e IPS/IOS (B4/D4, p-value = 0.0031). Per la condizione con 4 quadrati invece i valori minimi di p-value corrispondono alle zone IPS/IOS (B4/D4, p-value = 0.0036) e sIPS (A1/C1, p-value = 0.063). Anche i p-value relativi a  $\Delta\text{HbT}$  evidenziano la presenza di attivazione in tutti i canali, mentre quelli relativi a  $\Delta\text{HHb}$  sembrano rilevare attivazione solamente in corrispondenza dell'intersezione fra il solco intraparietale ed il solco intraoccipitale (B4/D4, p-value

= 0,0211 per 2 quadrati e p-value = 0.0139 per quattro quadrati), per entrambe le condizioni. Probabilmente questo è dovuto al basso livello di SNR del segnale relativo a  $\Delta\text{HHb}$  discusso nel paragrafo 4.1.

Canali	Regioni	2 quadrati vs. baseline		
		$\Delta\text{HbO}_2$	$\Delta\text{HHb}$	$\Delta\text{HbT}$
A1/C1	L/R sIPS	0,0093	0,2922	0,0117
A2/C2	L/R sIPS	0,0197	0,5948	0,0242
A3/C3	L/R ANG	0,0263	0,5317	0,0170
A4/C4	L/R IPS	0,0050	0,7209	0,0088
A5/C5	L/R pSPL	0,0028	0,3044	0,0033
B3/D3	L/R ANG	0,0302	0,7538	0,0657
B4/D4	L/R IPS-IOS	0,0031	0,0211	0,0224
B6/D6	L/R LOC	0,0277	0,1991	0,0393
B7/D7	L/R SOC	0,0183	0,5326	0,0230
p-value medio		0,0158	0,4389	0,0239

**Tabella 4.3.a** – p-values ottenuti applicando un t-test ai valori indicativi delle curve hrf stimate nella condizione con 2 quadrati, relative a ciascuna coppia di canali simmetrici nei due emisferi (prima colonna), verso i valori di baseline. Nella seconda colonna sono riportate le regioni del tessuto corticale che corrispondono ai canali indicizzati nella prima colonna.

Canali	Regioni	4 quadrati vs. baseline		
		$\Delta\text{HbO}_2$	$\Delta\text{HHb}$	$\Delta\text{HbT}$
A1/C1	L/R sIPS	0,0063	0,9026	0,0157
A2/C2	L/R sIPS	0,0192	0,9904	0,0343
A3/C3	L/R ANG	0,0545	0,8048	0,0555
A4/C4	L/R IPS	0,0141	0,1264	0,0244
A5/C5	L/R pSPL	0,0107	0,7807	0,0146
B3/D3	L/R ANG	0,0140	0,2766	0,0580
B4/D4	L/R IPS-IOS	0,0036	0,0139	0,0141
B6/D6	L/R LOC	0,0706	0,2308	0,1049
B7/D7	L/R SOC	0,0350	0,5523	0,0325
p-value medio		0,0253	0,5198	0,0393

**Tabella 4.3.b** – p-values ottenuti applicando un t-test ai valori indicativi delle curve hrf stimate nella condizione con 4 quadrati, relative a ciascuna coppia di canali simmetrici nei due emisferi (prima colonna), verso i valori di baseline. Nella seconda colonna sono riportate le regioni del tessuto corticale che corrispondono ai canali indicizzati nella prima colonna.

Applicare separatamente un t-test a ciascuna condizione rispetto al valore di baseline ha permesso di evidenziare l'attivazione di tutta l'area da cui è stato acquisito il segnale fNIRS, definendo in particolar modo la regione di intersezione fra il solco intraparietale ed il solco intraoccipitale come una delle aree della corteccia cerebrale maggiormente coinvolte nei processi della memoria visiva a breve termine. Per valutare invece la differenza tra le due condizioni, viene eseguito un ulteriore t-test confrontando i valori della condizione con 2 quadrati e con 4 quadrati : i relativi valori di p-value sono riportati nella tabella 4.3.c.

Canali	Regioni	2 quadrati vs. 4 quadrati		
		$\Delta\text{HbO}_2$	$\Delta\text{HHb}$	$\Delta\text{HbT}$
A1/C1	L/R sIPS	0,6773	0,0082	0,5020
A2/C2	L/R sIPS	0,6957	0,2130	0,4805
A3/C3	L/R ANG	0,8446	0,4445	0,8248
A4/C4	L/R IPS	0,1604	0,6185	0,1596
A5/C5	L/R pSPL	0,6226	0,3604	0,5687
B3/D3	L/R ANG	0,7075	0,9863	0,8993
B4/D4	L/R IPS-IOS	0,1290	0,9466	0,2213
B6/D6	L/R LOC	0,4546	0,9278	0,8468
B7/D7	L/R SOC	0,8101	0,4649	0,7522
p-value medio		0,5669	0,5522	0,5839

**Tabella 4.3.c** – p-values ottenuti applicando un t-test ai valori indicativi delle curve hrf stimate nella condizione con 2 quadrati, relative a ciascuna coppia di canali simmetrici nei due emisferi (prima colonna), verso i corrispondenti valori nella condizione con 4 quadrati. Nella seconda colonna sono riportate le regioni del tessuto corticale che corrispondono ai canali indicizzati nella prima colonna.

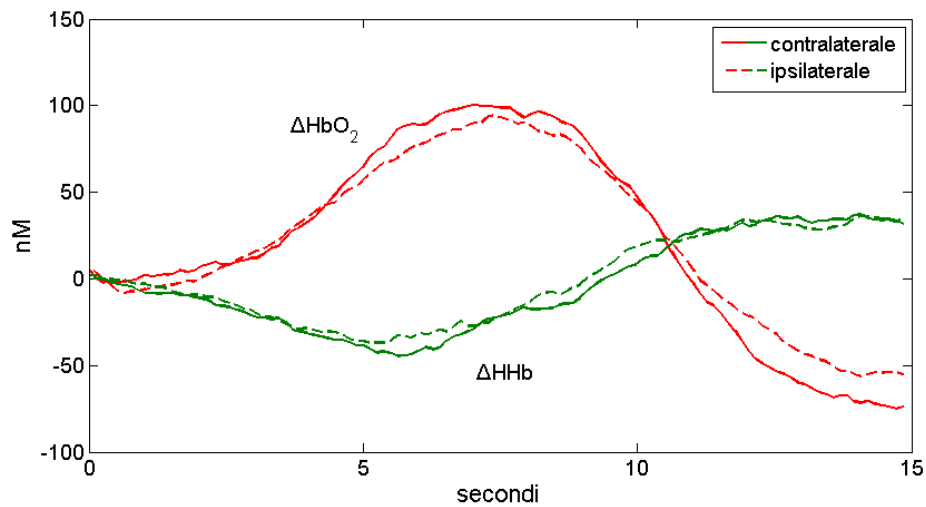
Nemmeno questo confronto diretto, tuttavia, riesce ad evidenziare sostanziali differenze di attivazione in risposta alla visualizzazione di 2 o 4 quadrati da memorizzare. E' presente infatti un unico p-value < 0.10 in corrispondenza dei canali A1/C1 per il segnale  $\Delta\text{HHb}$ , ma vista la mancata corrispondenza di un basso p-value nei relativi segnali  $\Delta\text{HbO}_2$  e  $\Delta\text{HbT}$  e dato il basso CNR del segnale  $\Delta\text{HHb}$ , si tratta con molta probabilità di un valore non effettivamente legato alla presenza di attivazione neuronale.

L'analisi statistica dei dati non è dunque riuscita a rilevare alcun effetto di carico, per nessuna delle regioni esaminate. Questo risultato è di fatto coerente con i

risultati dell'analisi comportamentale: la maggiore difficoltà nel memorizzare 4 quadrati confermata dalla minore accuratezza delle risposte comporta un maggior numero di prove considerate valide ma in cui probabilmente non c'è stata memorizzazione, e quindi nemmeno la relativa risposta emodinamica. Per mantenere semplice il paradigma e limitare i movimenti, ai soggetti era infatti chiesto di fornire comunque una risposta al test (colori dei quadrati del *memory-array* uguali o doversi ai colori dei quadrati del *test-array*), anche se non sicuri della correttezza della risposta. Inoltre, le curve della risposta emodinamica stimate in corrispondenza della visualizzazione di 4 quadrati, sono state stimate a partire da un numero inferiore di trials (accuratezza delle risposte molto inferiore rispetto a quella relativa alla visualizzazione di 2 quadrati). Per questi motivi, nonostante per la condizione con 4 quadrati ci si aspettasse una curva hrf con valori superiori (in modulo) rispetto a 2 quadrati, non compaiono sostanziali differenze tra le risposte emodinamiche nelle due diverse condizioni.

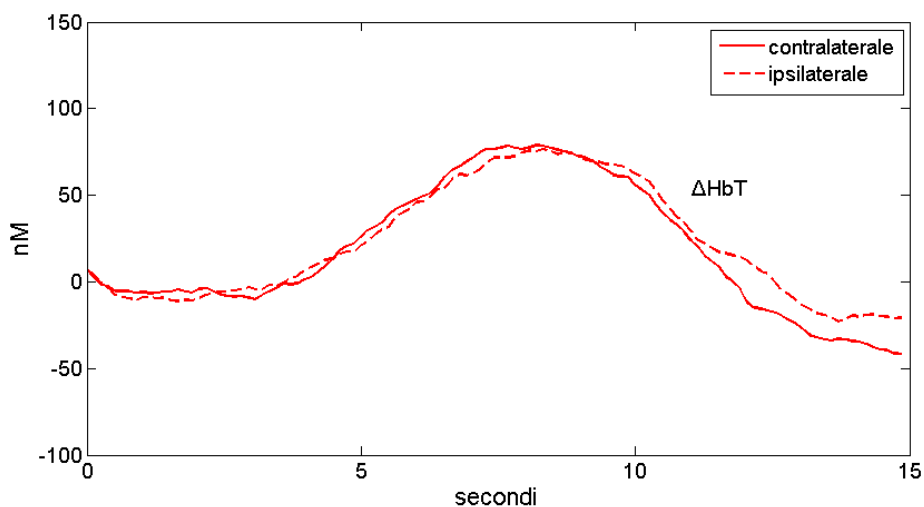
Analogamente a quanto fatto per studiare l'effetto di carico, anche per studiare l'effetto di lateralizzazione è possibile ottenere delle stime più accurate delle curve di risposta emodinamica unendo fra loro, in modo opportuno, i trials relativi a diverse delle 4 condizioni iniziali del paradigma sperimentale. In particolare, nella lateralizzazione, il numero di quadrati visualizzati non ha alcuna importanza, mentre gioca un ruolo fondamentale il lato di visualizzazione rispetto al lato dell'emisfero cerebrale da cui è stato acquisito il segnale. Si possono quindi definire due nuove condizioni: ipsi-laterale se le curve hrf stimate si riferiscono a misurazioni avvenute nell'emisfero corrispondente al lato di visualizzazione dei quadrati oppure contra-laterale nel caso contrario. Nella figura 4.3.c sono rappresentate le hrf medie ottenute mediando fra loro le hrf che si ottengono nei canali B4-D4 $\Delta$ HbO<sub>2</sub> (rosso) e B4-D4 $\Delta$ Hb (verde) degli 11 soggetti, sia per la condizione ipsilaterale (linea tratteggiata) che per la condizione contralaterale (linea continua).





**Figura 4.3.c** – Valori delle curve hrf medie ottenute mediando fra loro le hrf che si ottengono nei canali B4-D4 $_{\Delta HbO_2}$  (rosso) e B4-D4 $_{\Delta HHb}$  (verde) degli 11 soggetti, sia per la condizione ipsilaterale che per la condizione contralaterale.

La figura 4.3.d, invece, mostra gli andamenti delle hrf medie relative a  $\Delta HbT$  nei canali B4-D4, ottenute sommando i rispettivi andamenti di  $\Delta HbO_2$  e  $\Delta HHb$  rappresentati nella figura precedente. Per entrambe le figure si possono ripetere le stesse considerazioni effettuate per le rispettive figure 4.3.a e 4.3.b nello studio dell'effetto di carico e anche in questo caso per stabilire correttamente le differenze di attivazione nelle diverse condizioni è necessario applicare dei test statistici. Anche in questo caso, vengono valutati i valori massimi (per  $\Delta HbO_2$  e  $\Delta HbT$ , valori minimi per  $\Delta HHb$ ) delle risposte emodinamiche stimate nelle due condizioni.



**Figura 4.3.d** – Valori delle curve hrf relative alla variazione media di concentrazione di emoglobina totale negli 11 soggetti in corrispondenza dei canali B4-D4, ottenute sommando fra loro le rispettive curve hrf medie rappresentate in figura 4.3.c, relative ai canali B4-D4 $_{\Delta HbO_2}$  e B4-D4 $_{\Delta HHb}$ , sia per la condizione ipsilaterale che per la condizione contralaterale.

Viene dunque eseguito prima un t-test per ciascuna condizione rispetto al valore di baseline, e in seguito un t-test per confrontarle direttamente fra loro. I p-values relativi a questi tre t-test sono contenuti rispettivamente nella tabelle 4.3.d, 4.3.e e 4.3.f. I risultati nei singoli confronti delle due condizioni con i valori di baseline sono molto simili a quelli ottenuti nello studio dell'effetto di carico, poiché dimostrano che l'intera regione parieto-occipitale analizzata è coinvolta nella memoria visiva a breve termine. Per entrambe le condizioni, infatti, i p-values relativi a  $\Delta\text{HbO}_2$  e  $\Delta\text{HbT}$  rivelano la presenza di attivazione in tutti i canali ed in particolar modo nella regione IPS e IPS/IOS (rispettivamente A4/C4 e B4/D4). L'analisi di  $\Delta\text{HHb}$  invece, a causa del basso rapporto segnale/rumore, mostra attività neuronale solamente nella IPS/IOS (in entrambe le condizioni) e sulla IPS (solo contralaterale).

Canali	Regioni	Ipsilaterale vs. Baseline		
		$\Delta\text{HbO}_2$	$\Delta\text{HHb}$	$\Delta\text{HbT}$
A1/C1	L/R sIPS	0,0141	0,4106	0,0286
A2/C2	L/R sIPS	0,0192	0,5849	0,0264
A3/C3	L/R ANG	0,0239	0,6710	0,0087
A4/C4	L/R IPS	0,0075	0,9317	0,0155
A5/C5	L/R pSPL	0,0101	0,9688	0,0113
B3/D3	L/R ANG	0,0268	0,7445	0,0552
B4/D4	L/R IPS-IOS	0,0021	0,0225	0,0149
B6/D6	L/R LOC	0,0501	0,5505	0,0620
B7/D7	L/R SOC	0,0245	0,5649	0,0356
p-value medio		0,0198	0,6055	0,0287

**Tabella 4.3.d** – p-values ottenuti applicando un t-test ai valori indicativi delle curve hrf stimate nella condizione ipsilaterale, relative a ciascuna coppia di canali simmetrici nei due emisferi (prima colonna), verso i valori di baseline. Nella seconda colonna sono riportate le regioni del tessuto corticale che corrispondono ai canali indicizzati nella prima colonna.

Canali	Regioni	Contralaterale vs. Baseline		
		$\Delta\text{HbO}_2$	$\Delta\text{HHb}$	$\Delta\text{HbT}$
A1/C1	L/R sIPS	0,0073	0,6846	0,0061
A2/C2	L/R sIPS	0,0134	0,9645	0,0190
A3/C3	L/R ANG	0,0512	0,9392	0,0569
A4/C4	L/R IPS	0,0044	0,0243	0,0112
A5/C5	L/R pSPL	0,0058	0,1871	0,0090
B3/D3	L/R ANG	0,0144	0,3138	0,0715
B4/D4	L/R IPS-IOS	0,0038	0,0531	0,0174
B6/D6	L/R LOC	0,0461	0,1111	0,0704
B7/D7	L/R SOC	0,0128	0,6264	0,0109
p-value medio		0,0177	0,4338	0,0303

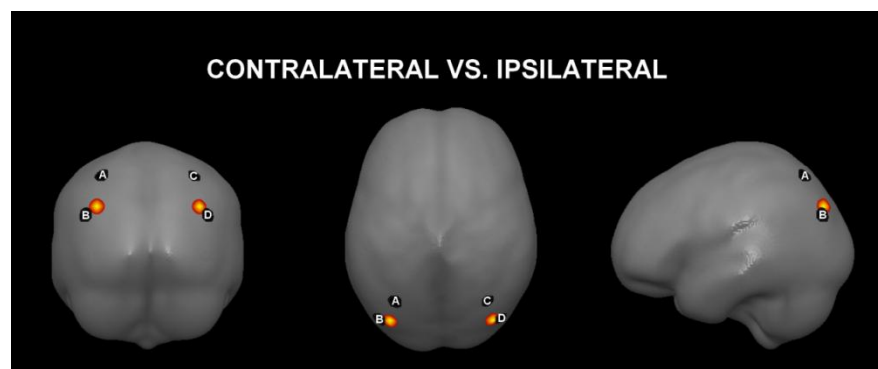
**Tabella 4.3.e** – p-values ottenuti applicando un t-test ai valori indicativi delle curve hrf stimate nella condizione contralaterale, relative a ciascuna coppia di canali simmetrici nei due emisferi (prima colonna), verso i valori di baseline. Nella seconda colonna sono riportate le regioni del tessuto corticale che corrispondono ai canali indicizzati nella prima colonna.

Per confrontare le differenze di attivazione nelle due condizioni, è però necessario osservare i risultati riportati del terzo t-test effettuato, riportati in tabella 4.3.f. In questa analisi l'unica regione che mostra un significativo effetto di lateralizzazione è la IPS/IOS (B4-D4), con p-value rispettivamente di 0.0115 e 0.0366 in corrispondenza di  $\Delta\text{HbO}_2$  e di  $\Delta\text{HbT}$ . Tutti gli altri canali riportano p-values > 0.10, ad eccezione solamente della regione ANG (definita dai canali B3/D3) che riporta un p-value = 0.0735 minore di 0.10 ma comunque di molto superiore a quello calcolato per la regione IPS/IOS e solo in corrispondenza di  $\Delta\text{HbO}_2$  mentre per  $\Delta\text{HbT}$  p-value = 0.3666. Anche in questo caso i p-value relativi a  $\Delta\text{HHb}$  sono tutti superiori alla soglia stabilita, ed anche in questo caso la motivazione è sempre il relativamente basso valore del picco (negativo) ed il basso rapporto segnale/rumore. Si può dunque affermare che il paradigma sperimentale proposto in questa tesi e analizzato tramite l'acquisizione del segnale fNIRS è stato in grado di evidenziare un effetto di lateralizzazione, che si è manifestato con una risposta emodinamica di intensità maggiore selettivamente in corrispondenza dell'area IPS/IOS.

Canali	Regioni	Ipsilaterale vs. Contralaterale		
		$\Delta\text{HbO}_2$	$\Delta\text{HHb}$	$\Delta\text{HbT}$
A1/C1	L/R sIPS	0,3202	0,3132	0,2674
A2/C2	L/R sIPS	0,5994	0,0300	0,3998
A3/C3	L/R ANG	0,8315	0,7050	0,9404
A4/C4	L/R IPS	0,2369	0,9935	0,4428
A5/C5	L/R pSPL	0,3178	0,8161	0,6156
B3/D3	L/R ANG	0,0735	0,7777	0,3666
B4/D4	L/R IPS-IOS	0,0115	0,9964	0,0366
B6/D6	L/R LOC	0,1911	0,6602	0,2885
B7/D7	L/R SOC	0,1671	0,8717	0,4347
p-value medio		0,3055	0,6849	0,4214

**Tabella 4.3.f** – p-values ottenuti applicando un t-test ai valori indicativi delle curve hrf stimate nella condizione ipsilaterale, relative a ciascuna coppia di canali simmetrici nei due emisferi (prima colonna), verso i valori della corrispondente condizione contralaterale. Nella seconda colonna sono riportate le regioni del tessuto corticale che corrispondono ai canali indicizzati nella prima colonna.

A partire dai risultati dei t-test sui singoli canali sono state generate delle mappe di attivazione (voxel di  $1 \text{ mm}^3$ ) sovrapponibili al modello MNI del tessuto cerebrale secondo precise coordinate generate con il toolbox Nifti (Neuroimaging Informatics Technology Initiative, [www.nifti.nih.gov](http://www.nifti.nih.gov)). Alle mappe è poi stato applicato un filtro di sfocatura gaussiano ( $SD = 10 \text{ mm}$ ) per approssimare visivamente le aree coperte da ogni canale. Una sintesi delle mappe generate a partire dalla tabella 4.3.f per  $\Delta\text{HbO}_2$  è graficamente riprodotta in figura 4.3.e. Le sovrapposizioni delle mappe al cervello di riferimento sono effettuate utilizzando il software MRicron.



**Figura 4.3.e** – Riproduzione grafica delle mappe generate a partire dalla tabella 4.3.f per i valori di p-values relativi a misure di  $\Delta\text{HbO}_2$  ottenuti dal t-test controlaterale vs ipsilaterale.

Nel paragrafo 4.1 le stime delle curve hfr ottenute con l'approccio bayesiano (oggetto di questa tesi) sono state confrontate con quelle ottenute con un approccio più tradizionale che media i singoli trials dopo aver loro applicato un filtro passabasso con frequenza di taglio di 0.3 Hz. Le tabelle 4.3.g-i mostrano i p-value ottenuti con una analisi statistica analoga a quella appena svolta, ma applicata alle curve hrf stimate utilizzando lo stesso filtro passabasso utilizzato nel paragrafo 4.1. Si può subito notare che i valori di p-value in corrispondenza di  $\Delta\text{HbO}_2$  e  $\Delta\text{HbT}$  nelle prime due tabelle sono sempre superiori a quelli ottenuti applicando un approccio bayesiano: mentre i risultati statistici relativi al segnale  $\Delta\text{HbO}_2$  e  $\Delta\text{HbT}$  ottenuti con l'approccio bayesiano avevano chiaramente evidenziato la presenza di attivazione in tutti i canali e per tutte le condizioni, applicare un filtro passabasso non permette in alcuni canali di rilevare la presenza di attivazione (come per esempio in B6/D6). Applicare un filtraggio passabasso genera dunque una generale perdita di significatività nella valutazione statistica dei risultati ottenuti (evidenziata anche dai valori medi dei p-value). Questa perdita di significatività si riflette anche nei valori di p-value riportati nella tabella 4.3.i (ipsilaterale vs. contralaterale) ed in particolare su quelli relativi ai canali B4/D4. Anche l'approccio con filtro passabasso è infatti in grado di individuare un effetto di lateralizzazione solamente sulla regione IPS/IOS, ma con p-value molto superiori a quelli calcolati con l'approccio bayesiano ( $p_{\text{value}_{\Delta\text{HbO}_2}} = 0.0443$  e  $p_{\text{value}_{\Delta\text{HbT}}} = 0.0886$  con filtro passabasso,  $p_{\text{value}_{\Delta\text{HbO}_2}} = 0.0115$  e  $p_{\text{value}_{\Delta\text{HbT}}} = 0.0366$  con approccio bayesiano). La perdita di significatività del filtro passabasso conferma il rischio di eliminare con tale filtraggio non solo il rumore ma anche parte del segnale utile. Il metodo proposto, basato sull'approccio bayesiano, sembra invece riuscire a ridurre il rumore mantenendo inalterato il segnale utile.

Canali	Regioni	Ipsilaterale vs. Baseline		
		$\Delta\text{HbO}_2$	$\Delta\text{HHb}$	$\Delta\text{HbT}$
A1/C1	L/R sIPS	0,0077	0,5707	0,0111
A2/C2	L/R sIPS	0,0136	0,4633	0,0199
A3/C3	L/R ANG	0,0709	0,4580	0,0543
A4/C4	L/R IPS	0,0475	0,9324	0,0614
A5/C5	L/R pSPL	0,0139	0,5193	0,0179
B3/D3	L/R ANG	0,0760	0,7176	0,1231
B4/D4	L/R IPS-IOS	0,0098	0,0471	0,0485
B6/D6	L/R LOC	0,1053	0,4950	0,1562
B7/D7	L/R SOC	0,0345	0,4381	0,0524
p-value medio		0,0421	0,5157	0,0605

**Tabella 4.3.g** – p-values ottenuti applicando un t-test ai valori indicativi delle curve hrf stimate attraverso l'applicazione di un filtro passa basso nella condizione ipsilaterale, relative a ciascuna coppia di canali simmetrici nei due emisferi (prima colonna), verso i valori di baseline. Nella seconda colonna sono riportate le regioni del tessuto corticale che corrispondono ai canali indicizzati nella prima colonna.

Canali	Regioni	Contralaterale vs. Baseline		
		$\Delta\text{HbO}_2$	$\Delta\text{HHb}$	$\Delta\text{HbT}$
A1/C1	L/R sIPS	0,0746	0,9920	0,0656
A2/C2	L/R sIPS	0,0283	0,7564	0,0355
A3/C3	L/R ANG	0,0338	0,8706	0,0511
A4/C4	L/R IPS	0,0324	0,0938	0,0608
A5/C5	L/R pSPL	0,0150	0,1536	0,0242
B3/D3	L/R ANG	0,0264	0,4847	0,0728
B4/D4	L/R IPS-IOS	0,0238	0,0887	0,0250
B6/D6	L/R LOC	0,0983	0,1117	0,1525
B7/D7	L/R SOC	0,0101	0,4291	0,4423
p-value medio		0,0381	0,4423	0,1033

**Tabella 4.3.h** – p-values ottenuti applicando un t-test ai valori indicativi delle curve hrf stimate attraverso l'applicazione di un filtro passa basso nella condizione contralaterale, relative a ciascuna coppia di canali simmetrici nei due emisferi (prima colonna), verso i valori di baseline. Nella seconda colonna sono riportate le regioni del tessuto corticale che corrispondono ai canali indicizzati nella prima colonna.

Canali	Regioni	Ipsilaterale vs. Contralaterale		
		$\Delta\text{HbO}_2$	$\Delta\text{HHb}$	$\Delta\text{HbT}$
A1/C1	L/R sIPS	0,9094	0,3503	0,9092
A2/C2	L/R sIPS	0,4661	0,0134	0,1584
A3/C3	L/R ANG	0,4834	0,7214	0,6331
A4/C4	L/R IPS	0,2509	0,9967	0,5035
A5/C5	L/R pSPL	0,1970	0,9002	0,5565
B3/D3	L/R ANG	0,1641	0,7950	0,2941
B4/D4	L/R IPS-IOS	0,0443	0,9713	0,0886
B6/D6	L/R LOC	0,1831	0,9587	0,5899
B7/D7	L/R SOC	0,1782	0,6074	0,2334
p-value medio		0,3196	0,7016	0,4407

**Tabella 4.3.i** – p-values ottenuti applicando un t-test ai valori indicativi delle curve hrf stimate attraverso l'applicazione di un filtro passa basso e nella condizione ipsilaterale, relative a ciascuna coppia di canali simmetrici nei due emisferi (prima colonna), verso i valori della corrispondente condizione contralaterale. Nella seconda colonna sono riportate le regioni del tessuto corticale che corrispondono ai canali indicizzati nella prima colonna.

L'effetto di lateralizzazione rilevato dall'elaborazione del segnale fNIRS effettuata in questa tesi con un approccio bayesiano è un risultato molto importante nello studio dei processi implicati dalla VSTM, poiché conferma risultati finora trovati solamente con misurazioni di potenziali evento-relati (ERPs) e mai riscontrati analizzando gli andamenti delle risposte emodinamiche stimate attraverso la risonanza magnetica funzionale. Una plausibile spiegazione risiede nel fatto che il segnale BOLD non misura separatamente l'emoglobina ossigenata e l'emoglobina deossigenata, e la sola combinazione delle due sembra quindi non essere sufficiente ad individuare correttamente le aree di attivazione. Il segnale fNIRS invece, potendo misurare separatamente le due componenti di emoglobina, permette di rilevare l'andamento della curva hrf in modo più accurato, cogliendo anche l'effetto di lateralizzazione in corrispondenza della regione IPS/IOS.

## ***5. Alcuni problemi metodologici aperti e possibili indicazioni per sviluppi futuri***

### ***5.1 Ulteriore elaborazione del segnale***

Un aspetto molto importante che influisce sulla qualità delle stime delle risposte emodinamiche è il numero di trials che possono essere mediati fra loro in una stessa condizione. Sono molti i trials acquisiti che non possono venir considerati nella stima della hrf, per la presenza di artefatti o per casi di non convergenza del criterio di Twomey. Limitare il numero di trials scartati potrebbe permettere sia una riduzione della durata dell'esperimento (attualmente ~50 minuti) sia una maggior precisione di stima. Per rimuovere gli artefatti presenti nel segnale acquisito, senza dover per forza scartare dall'elaborazione i trials che li contengono, si potrebbero sviluppare degli algoritmi basati sull'Independent Component Analysis (ICA), come ad es. in [53]. Per stimare con più precisione i parametri del modello statistico del rumore su cui si basa il filtro bayesiano e limitare così i casi di non convergenza del criterio di Twomey, sarebbe invece opportuno riuscire a ridurre maggiormente le componenti fisiologiche del rumore, intervenendo non solo nella fase di acquisizione del segnale (come si vedrà in 5.2) ma anche nella fase di pre-elaborazione del segnale (ottimizzando per esempio le prestazioni del filtro notch).

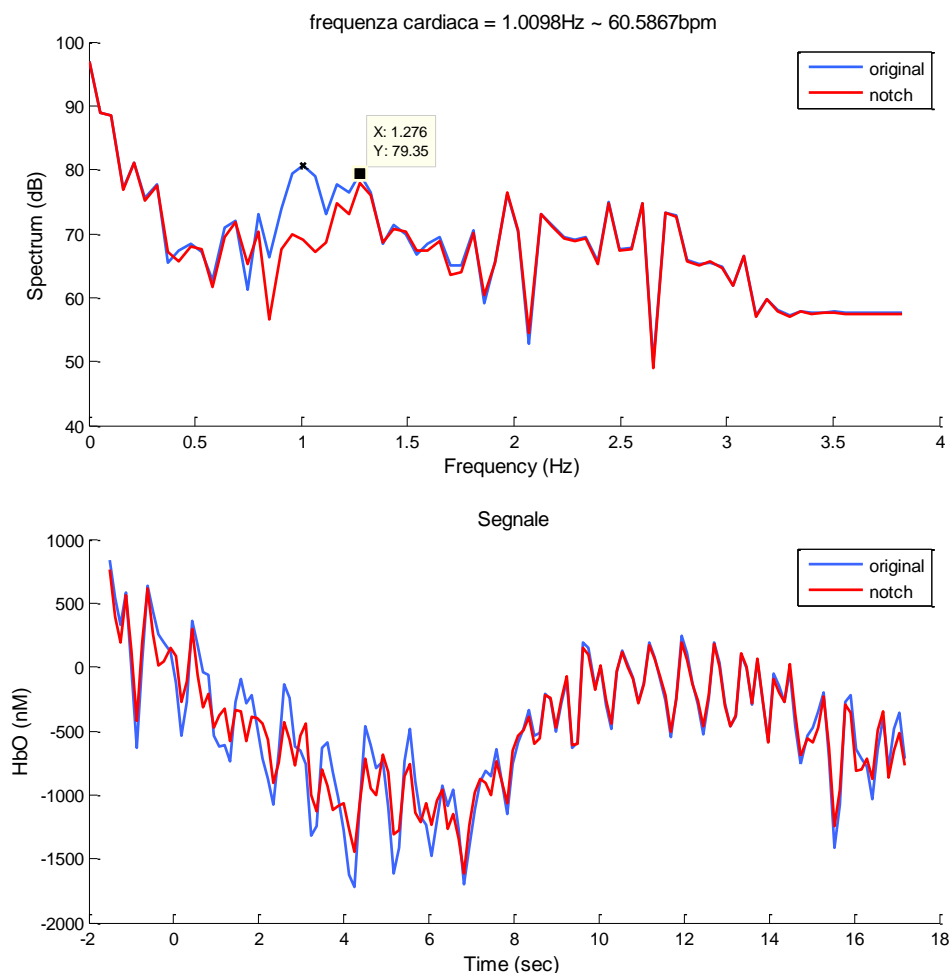
Inoltre, l'approccio bayesiano alla stima della risposta emodinamica potrebbe essere potenziato, applicando per esempio una media pesata che privilegi i trials il cui segnale utile è stato stimato con maggior precisione. I paragrafi che seguono approfondiranno alcune di queste problematiche, proponendo metodi alternativi ed ulteriori elaborazioni del segnale per migliorare le prestazioni dell'approccio bayesiano proposto in questa tesi per la stima della risposta emodinamica.

#### ***5.1.1 Filtro notch su più finestre temporali***

Nella fase di elaborazione del segnale acquisito, per ridurre in modo selettivo la componente cardiaca del rumore in ogni singolo trial, è stato applicato un filtro notch



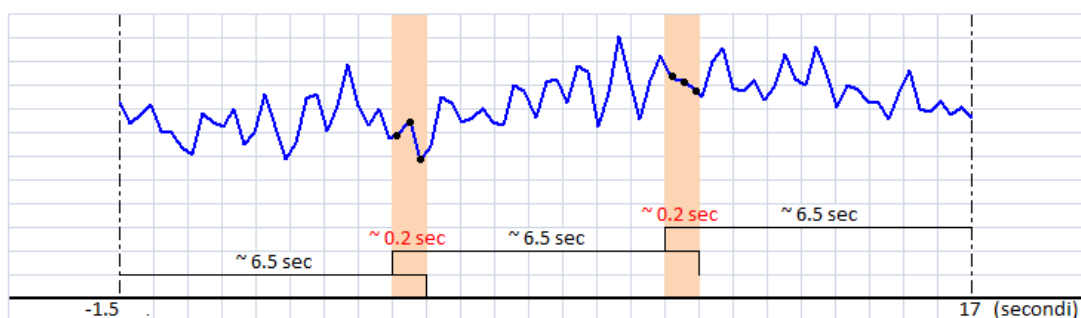
con una specifica frequenza di taglio, calcolata a partire dallo spettro dell'intero trial nella banda 0.7÷1.5 Hz (dettagli in 3.3.3). Questo metodo ha permesso di ottenere risultati soddisfacenti nella maggior parte dei trials filtrati, ma esistono alcune eccezioni come quella illustrata in figura 5.1.1.a-b (spettri e andamenti di un trial relativo all'evento 1 e acquisito dal soggetto 1 nel canale  $C4_{\Delta HbO_2}$ , prima (blu) e dopo (rosso) essere stato filtrato con il filtro notch). Come si è detto, la componente cardiaca del rumore è un segnale con un andamento sinusoidale la cui frequenza riprende quella del battito cardiaco e il battito cardiaco può essere assunto regolare solo per intervalli di tempo relativamente brevi. Applicare un filtro notch con un'unica frequenza di taglio per l'intera durata del trial presuppone che la frequenza cardiaca permanga costante per più di 15 secondi, ma questa ipotesi non è valida in corrispondenza di tutti i trials registrati.



**Figura 5.1.1.a-b** – Spettri di un trial relativo all'evento 1 acquisito dal soggetto 1 nel canale  $C4_{\Delta HbO_2}$  prima (azzurro) e dopo (rosso) l'applicazione di un filtro notch (a) e relativi andamenti temporali (b).

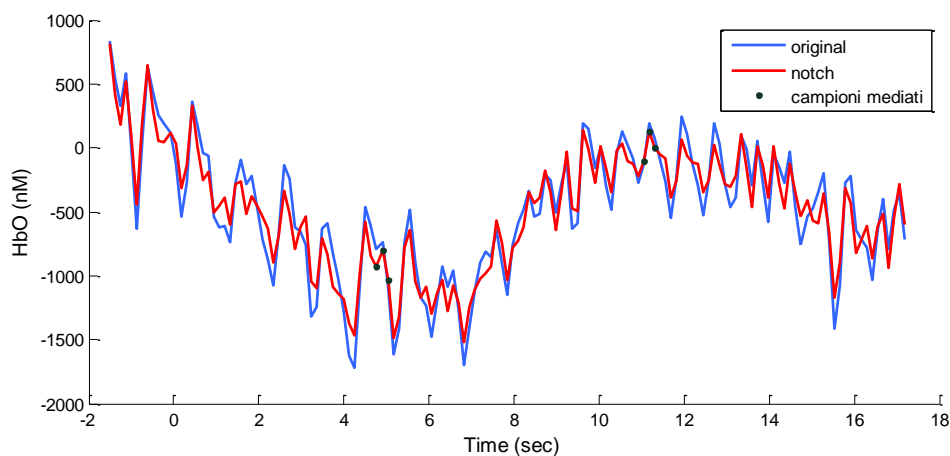
Durante l'acquisizione del trial preso in considerazione dalla figura 5.1.1.a-b, per esempio, la componente cardiaca del rumore, visibile in (b) anche ad occhio nudo, ha aumentato la propria frequenza. Lo spettro del segnale prima di essere filtrato presenta due picchi di ampiezza quasi identica nella banda di probabile frequenza cardiaca  $0.7 \div 1.5$  Hz (corrispondenti a 1.0098 Hz e 1.2760 Hz), ma il filtraggio notch proposto in questa tesi prevede di eliminare solo il picco massimo, riducendo in questo caso solo il rumore cardiaco con frequenze minore. Dopo il filtraggio, mentre nel tratto iniziale del trial le ampiezze della componente cardiaca risultano visibilmente ridotte, il resto del segnale rimane praticamente inalterato.

Un'idea per migliorare le prestazioni del filtro notch quando la frequenza della componente cardiaca del rumore non permane costante lungo tutto il trial, può essere quella di ridurre l'intervallo temporale su cui valutare lo spettro del segnale. La durata di un trial (da -1.5 a +17 secondi rispetto al segnale di trigger) può per esempio essere suddivisa in sottofinestre temporali della durata di pochi secondi, leggermente sovrapposte. La stessa procedura utilizzata per filtrare l'intero trial con un unico filtro notch, viene applicata separatamente ai singoli tratti di segnale, valutando di volta in volta sullo spettro di ognuno di essi il valore della frequenza notch da utilizzare. La figura 5.1.1.c mostra una rappresentazione schematica di una possibile suddivisione del trial: il trial viene diviso in 3 parti leggermente sovrapposte, ciascuna della durata di 6.5 secondi, che spezzano il trial in segnali di circa 50 campioni ciascuno. In questo esempio, le finestre si sovrappongono con tre campioni che vengono poi mediati nella ricostruzione dell'intero trial dopo le modifiche apportate dal filtraggio.



**Figura 5.1.1.c** – Schema di suddivisione di un trial per applicare un filtro notch su più finestre temporali di circa 6.5 secondi ciascuna.

Per mostrare un esempio dei risultati di questo approccio, il trial che non mostrava una rimozione soddisfacente della componente cardiaca dopo essere stato filtrato con un unico filtro notch (figura 5.1.1.b), viene filtrato anche su queste tre sottofinestre temporali ottenendo il segnale rappresentato in rosso nella figura 5.1.1.d. Nonostante la frequenza cardiaca aumenti nel corso dell'acquisizione dell'intero trial, considerare sottofinestre di durata inferiore ha permesso in questo esempio di eliminare il rumore cardiaco in modo più mirato ed omogeneo rispetto al metodo utilizzato in questa tesi.



**Figura 5.1.1.d** - Andamento temporale del trial rappresentato in blu in figura 5.1.1.b prima (azzurro) e dopo (rosso) l'applicazione di più filtraggi notch su tre sottofinestre temporali.

Da un'analisi visiva dei risultati ottenuti in figura, mediare i campioni in comune a due finestre consecutive (rappresentati in nero) per ricomporre l'andamento del trial dopo averlo segmentato e filtrato, non sembra apportare eccessive discontinuità al segnale. Tuttavia si tratta di un aspetto che merita un'analisi più approfondita per non rischiare di distorcere le componenti del segnale utile.

Ridurre l'ampiezza della componente cardiaca del rumore presente nel segnale, permette di stimare in modo più accurato i parametri del modello statistico del rumore su cui si basa la stima bayesiana, riducendo i casi di oversmoothing, undersmoothing e non convergenza nella scelta di gamma con il criterio di Twomey. La tabella 5.1.1.a visualizza, ad esempio, il numero medio di trials per i quali il criterio di Twomey converge senza dare oversmoothing o undersmoothing nei canali relativi a  $\Delta\text{HbO}_2$  del soggetto 1 in corrispondenza dei 4 possibili eventi che caratterizzano il paradigma sperimentale, senza applicare il filtro notch oppure

applicando il filtro notch su una o più sottofinestre (fino a cinque). Il numero medio di trials che viene filtrato correttamente nel soggetto 1 aumenta applicando il filtro notch, ed in particolare aumenta all'aumentare del numero di finestre temporali in cui è suddiviso il trial per essere filtrato, raggiungendo i risultati migliori con 3 finestre. Anche applicare il filtro notch su 4 o 5 sottofinestre del trial aumenta il numero di trials che convergono senza dare over/undersmoothing rispetto al caso in cui non si applica alcun filtro notch, ma mediamente i valori tendono a diminuire rispetto a quelli ottenuti con tre finestre, probabilmente perché il numero di campioni nelle sottofinestre è troppo basso per ottenere un'approssimazione corretta dei segnali.

	Evento 1	Evento 2	Evento 3	Evento 4
No notch	20,22	16,00	23,50	14,33
Notch su 1 finestra	20,78	16,72	23,78	14,44
Notch su 2 finestre	20,67	17,17	24,00	15,06
Notch su 3 finestre	21,28	17,56	24,39	15,44
Notch su 4 finestre	21,06	17,44	24,83	15,39
Notch su 5 finestre	21,00	16,94	24,72	15,44

**Tabella 5.1.1.a** – Numero medio di trials per i quali il criterio di Twomey converge senza dare oversmoothing o undersmoothing nei canali relativi a  $\Delta\text{HbO}_2$  del soggetto 1 in corrispondenza dei 4 possibili eventi che caratterizzano il paradigma sperimentale, senza applicare il filtro notch oppure applicando il filtro notch su una o più finestre.

### 5.1.2 *Media pesata*

Nell'approccio bayesiano per la stima della risposta emodinamica da dati fNIRS proposto in questa tesi, tutti i trials filtrati assumono lo stesso peso nel calcolo finale della hrf media. Con un approccio più raffinato si potrebbe pensare di associare invece un peso diverso ai singoli trials sfruttando le informazioni statistiche che derivano dalla teoria di stima bayesiana sulla precisione di stima del segnale utile nei singoli trials. Con questo metodo, utilizzato anche da Sparacino et al. [71] in uno studio di potenziali evocati uditivi, l'andamento della risposta emodinamica  $\bar{u}$  può essere calcolata come media pesata degli N trials filtrati  $\hat{u}_i$ , secondo la formula:

$$\bar{u} = \frac{1}{\sum_{i=1}^N p_i} \sum_{i=1}^N p_i \hat{u}_i \quad (5.1.2.1)$$

dove

$p_i$  peso dell'i-esimo trial filtrato.

In [71] i pesi  $p_i$  assumono valori inversamente proporzionali al valore atteso della norma quadratica dell'errore di stima. Dalla teoria della stima bayesiana, una misura della varianza dell'errore di stima della risposta emodinamica nell' $i$ -esimo trial (definito come  $e_i(t) = u_i(t) - \hat{u}_i(t)$ ), può essere calcolata come:

$$\text{cov}(e_i) = \sigma_i^2 (A_i^T A_i + \gamma_i F^T F)^{-1} \quad \text{con } i = 1, \dots, N \quad (5.1.2.1)$$

dove i simboli indicano

$\sigma_i^2$  varianza del rumore in ingresso al filtro AR nel modello del rumore stimata in corrispondenza dell' $i$ -esimo trial filtrato.

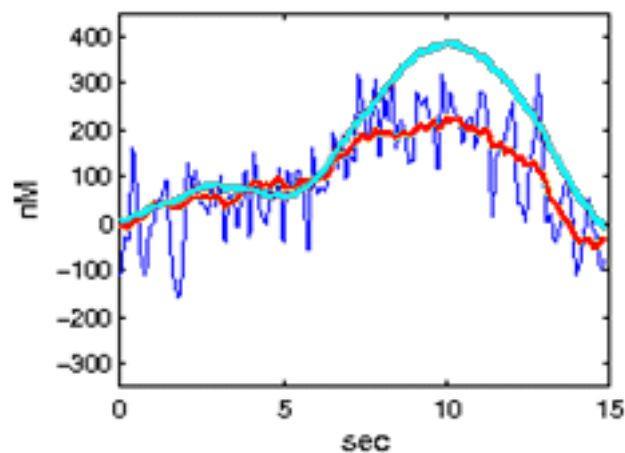
$A_i$  matrice dei parametri del filtro AR nel modello del rumore, stimata in corrispondenza dell' $i$ -esimo trial filtrato.

$\gamma_i$  valore di gamma utilizzato per regolarizzare l' $i$ -esimo trial.

$F$  matrice alle differenze di ordine 1 utilizzata nel modello a priori del segnale utile.

Da cui, utilizzando un approccio analogo a quello utilizzato in [71], i pesi risultano pari a:

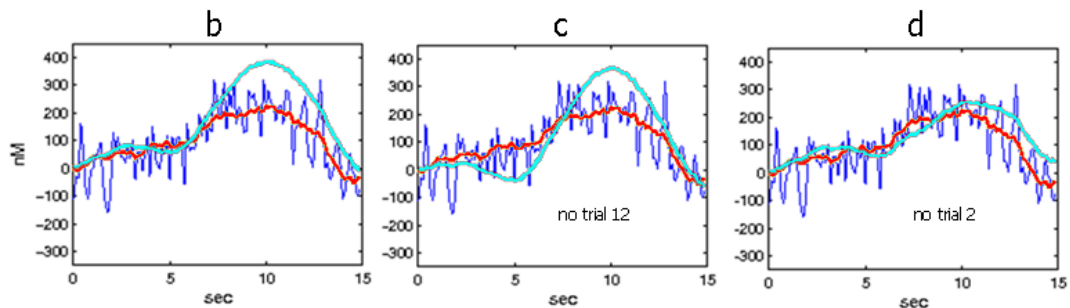
$$p_i = \frac{1}{E[||e_i||^2]} = \frac{1}{\text{trace}[\text{cov}(e_i)]} \quad \text{con } i = 1, \dots, N \quad (5.1.2.1)$$



**Figura 5.1.2.a** – Confronto fra i risultati ottenuti, con averaging convenzionale (blu), con media non pesata (rosso) e con media pesata (azzurro) dei trials filtrati, a partire dai trials acquisiti dal soggetto 1 nel canale  $C5_{\Delta HbO_2}$  in corrispondenza del singolo evento 2.

La figura 5.1.2.a confronta i risultati ottenuti, a partire dai trials acquisiti dal soggetto 1 nel canale  $C5_{\Delta HbO_2}$  in corrispondenza dell' evento 2, con averaging convenzionale (blu), con media non pesata (rosso) e con media pesata (azzurro) dei trials filtrati, con i pesi calcolati con la formula (5.1.2.1). Trattandosi di un unico evento, si tenga presente che nessuno dei tre profili rappresentati può essere considerato una stima reale di risposta emodinamica, in quanto, come è già stato ampiamente discusso nel paragrafo 3.3.3, il numero di trials mediati non è sufficientemente elevato.

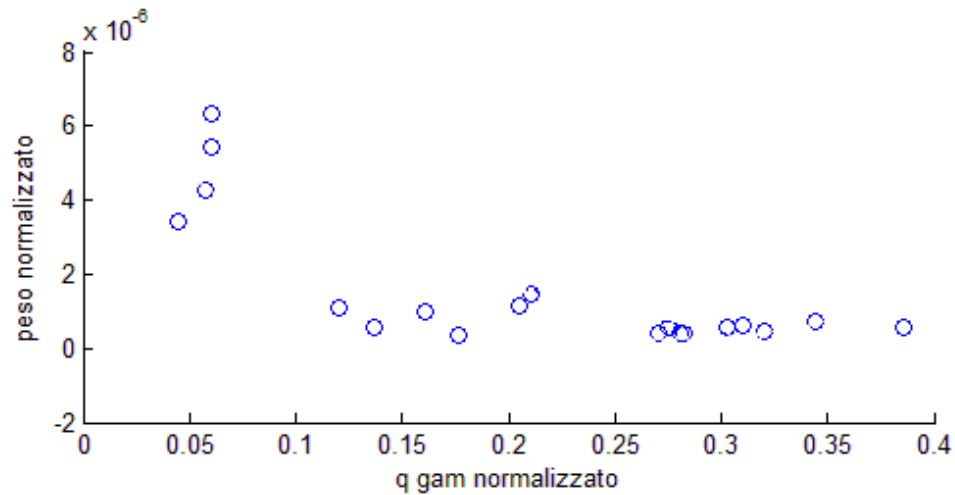
I risultati ottenuti con i tre approcci sono molto diversi fra loro: l'averaging, poiché media fra loro trials non filtrati, genera un segnale con SNR ancora molto elevato. Entrambi i profili medi ottenuti a partire dai trials filtrati, invece, permettono di ottenere risultati molto più regolari e con SNR inferiore, ma l'ampiezza di picco massimo del profilo ottenuto con la media pesata si discosta molto da quella relativa alla media non pesata. La figura 5.1.2.b-d evidenzia come nell'esempio analizzato in figura 5.1.2.a alcuni trials abbiano un peso eccessivo, tanto da modificare pesantemente il profilo ottenuto dal calcolo della media pesata quando non vengono considerati. In particolare l'immagine 5.1.2.b riprende l'esempio analizzato in figura 5.1.2.a, mentre in (c) e (d) nel calcolo della media pesata sottratti non sono stati considerati rispettivamente il trial 12 e trial 2.



**Figura 5.1.2.b-d** – Confronto fra media pesata (azzurro) non pesata (rosso) e averaging convenzionale (blu) (b), lo stesso riportato in figura 5.1.3.a, e immagini analoghe dove nel calcolo della media pesata, non sono stati considerati il trial 12 (c) oppure il trial 2 (d).

Un'analisi della distribuzione dei pesi fra i diversi trials mette infatti in evidenza un'eccessiva disomogeneità di valori: alcuni trials assumono chiaramente un peso troppo elevato rispetto agli altri (in alcuni casi anche oltre 5 volte superiore rispetto al peso medio). Il grafico in figura 5.1.2.e mette in evidenza che i trials che vengono pesati maggiormente nell'esempio considerato sono quelli in cui è stata introdotta

una regolarizzazione superiore alla media (ovvero con valori più bassi di gradi di libertà  $q(\gamma)$ ).

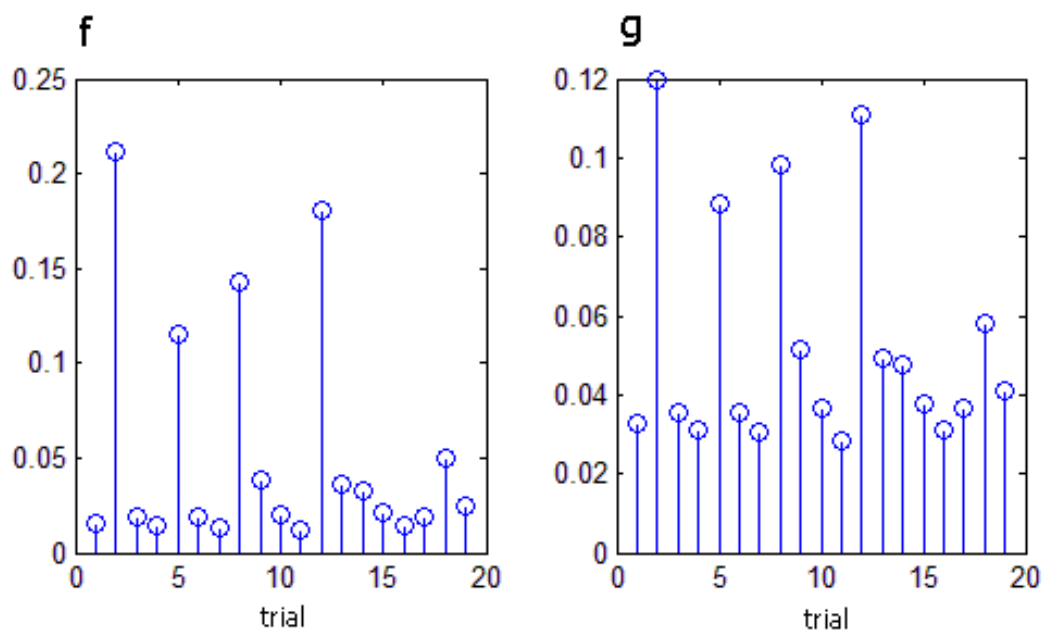


**Figura 5.1.2.e** – Valori di peso normalizzato (blu) vs gradi di libertà ( $q(\gamma)$ ) normalizzati associati ai singoli trials nel calcolo della media pesata rappresentata in rosso in figura 5.1.2.b, a partire dai trials acquisiti dal soggetto 1 nel canale  $C5_{\Delta HbO_2}$  in corrispondenza dell'evento 2. In verde un'interpolazione polinomiale di secondo ordine che evidenzia la distribuzione media dei valori in blu.

Il motivo principale per cui in questo dataset la media pesata non può essere considerata un metodo affidabile per la stima della hrf media è la presenza della componente di Mayer anche nei trials filtrati. Come è stato osservato nel paragrafo 3.3.3, il modello del segnale utile ingloba in se, oltre alla curva attesa di hrf, anche tutte le componenti lente del rumore, fra le quali soprattutto la componente di Mayer. L'errore di stima, inteso come  $e_i(t) = u_i(t) - \hat{u}_i(t)$ , non misura perciò l'effettivo errore di stima rispetto all'andamento della sola risposta emodinamica presente nel trial, ma l'errore di stima rispetto alla somma di tutte le componenti di segnale inglobate nel modello del segnale utile. In questo modo, calcolare il valore dei pesi sfruttando la misura della varianza dell'errore di stima calcolata nella formula 5.1.2.1 significa associare un maggior peso a quei trials dove, per esempio, è stata stimata con maggior precisione anche la componente di Mayer. Il risultato che si ottiene è che la componente di Mayer non può più essere eliminata nel calcolo della media ed influisce pesantemente nella stima della risposta emodinamica.

Per ottenere una minor variabilità nella distribuzione dei pesi fra i diversi trials pur basandosi sulle informazioni statistiche della precisione di stima, si possono calcolare i pesi come valori inversamente proporzionali al valore atteso della norma

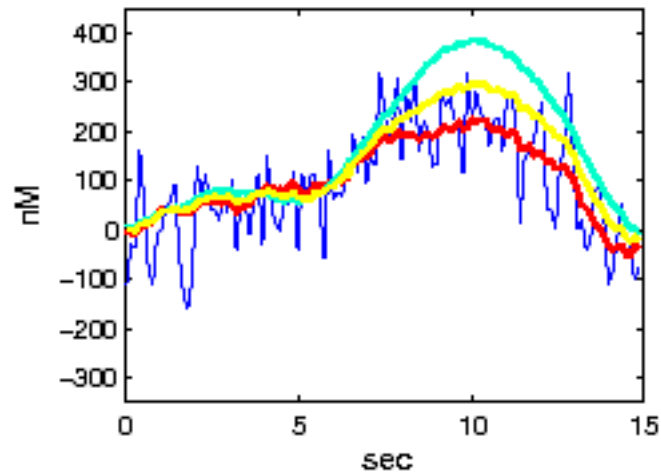
non quadratica dell'errore di stima. Di fatto, anziché una misura della varianza dell'errore di stima, si utilizza un'analoga misura della sua deviazione standard. La figura 5.1.2.f-g mostra un confronto fra le distribuzioni dei pesi normalizzati nei diversi trials, acquisiti dal soggetto 1 nel canale  $C5_{\Delta HbO_2}$  in corrispondenza del singolo evento 2, che si ottengono utilizzando una misura della varianza dell'errore di stima (f) o della sua deviazione standard (g). La distribuzione in (g), pur mostrando ancora alcuni valori molto più elevati rispetto alla media, è molto più omogenea di quella in (f).



**Figura 5.1.2.f-g** – Confronto fra le diverse distribuzioni dei pesi normalizzati nei diversi trials, acquisiti dal soggetto 1 nel canale  $C5_{\Delta HbO_2}$  in corrispondenza del singolo evento 2, che si ottengono utilizzando una misura della varianza dell'errore di stima (f) o della sua deviazione standard (g).

La figura 5.1.2.h mostra invece un confronto fra gli andamenti medi rappresentati in 5.1.2.a e quello ottenuto calcolando i valori dei pesi basandosi sulla deviazione standard dell'errore di stima (giallo). Di fatto, comunque, per poter utilizzare una media pesata dei trials filtrati che rappresenti una stima affidabile della risposta emodinamica bisogna prima riuscire a ridurre fortemente la presenza della componente di Mayer dal segnale. Il paragrafo 5.2 espone una possibile soluzione a questo problema apportando una modifica al sistema di acquisizione dei dati.





**Figura 5.1.2.h** – Confronto fra i risultati ottenuti, con averaging convenzionale (blu), con media non pesata (rosso), media pesata basandosi sulla varianza (azzurro) oppure sulla deviazione standard (giallo) dell’errore di stima dei trials filtrati, a partire dai trials acquisiti dal soggetto 1 nel canale  $C5_{\Delta HbO_2}$  in corrispondenza del singolo evento 2.

### 5.1.3 *Stima single trial*

Una delle critiche apportate alla tecnica dell’averaging convenzionale nel paragrafo 3.2 è che nell’operazione di media tutte le informazioni relative ad eventuali variazioni di latenza e valore dei picchi delle risposte emodinamiche presenti nei singoli trials vengono perse, ottenendo solamente una risposta emodinamica “media”, ove la latenza di picco ottenuta dalla media non è necessariamente pari alla media delle latenze. Di fatto anche l’approccio bayesiano per la stima della risposta emodinamica a partire da dati di spettroscopia funzionale nel vicino infrarosso, così come è stato proposto in questa tesi, permette di stimare con elevata precisione solamente l’andamento della risposta emodinamica media in corrispondenza delle diverse condizioni di stimolo della VSTM previste dal paradigma sperimentale (visualizzazione di 2 o di 4 quadrati oppure visualizzazione dei quadrati in condizione ipsilaterale o contralaterale), ma non fornisce alcuna informazione specifica sulla latenza o sulla ampiezza del picco massimo della risposta emodinamica in corrispondenza dei singoli trials.

Esiste tuttavia un ulteriore approccio bayesiano che potrebbe essere applicato per ottenere una stima sufficientemente accurata delle risposte emodinamiche presenti nei singoli trials, a partire dalle stime delle hrf medie ottenute in questa tesi. Si tratta di una tecnica *single-trial* simile a quella proposta da Sparacino et al. [71] in

uno studio dei potenziali evocati uditivi e implementata in una tesi di laurea su potenziali evocati cognitivi [59]. L'idea di base è che ogni risposta emodinamica può essere considerata un elemento di una "popolazione" omogenea. Le risposte emodinamiche appartenenti alla stessa popolazione hanno come componente comune una media e la differenza tra la singola risposta emodinamica e la media può essere vista come uno shift individuale. Una tecnica single-trial potrebbe dunque prevedere di definire come profilo medio di riferimento (noto a priori) quello stimato in questa tesi e di determinare la risposta emodinamica presente nei singoli trials sommando al segnale di riferimento una stima della sua deviazione. Poiché ci si aspetta che ogni singola risposta emodinamica assuma dei valori "vicini" a quelli della hrf media di riferimento, la differenza fra questi due segnali può essere stimata di trial in trial attraverso uno stimatore a minima varianza d'errore.

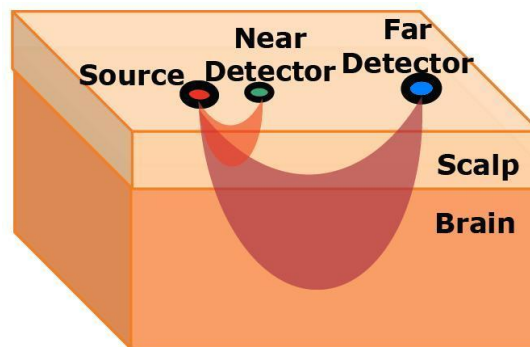
Il motivo per cui in questa tesi non è stato applicato questo approccio è la presenza nei singoli trial, anche se filtrati, della componente di Mayer. Prima di poter applicare con successo questo approccio è necessario sviluppare metodi per eliminare tale componente.

## **5.2 *Acquisizione con canale di riferimento***

Nel lavoro esposto in questa tesi è stato spesso messo in evidenza come la componente di Mayer, fra tutte le componenti fisiologiche del rumore che affliggono il segnale fNIRS, sia quella più difficile da eliminare senza ridurre anche componenti del segnale utile. Per risolvere questo problema Zhang et al. [67] hanno recentemente illustrato l'utilizzo di un canale di riferimento da cui ottenere un modello globale del rumore dovuto alla maggior parte delle componenti fisiologiche, compresa anche la componente di Mayer.

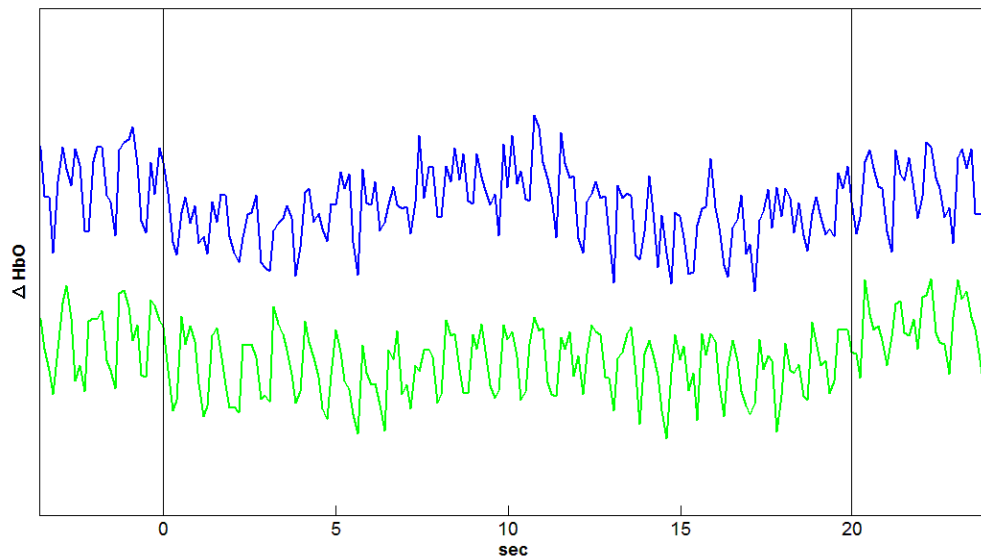
L'idea, illustrata in figura 5.2.a, è di porre il rivelatore del canale di riferimento ad una distanza tale da non permettere al fascio di luce emesso dalla sorgente di penetrare in profondità ed attraversare aree di possibile attivazione cerebrale prima di essere misurato dal rivelatore. E' stato infatti dimostrato che le componenti fisiologiche del rumore che si sommano al segnale utile nelle misure di un rivelatore

più lontano dalla sorgente, sono straordinariamente simili alle uniche componenti di segnale presenti nel segnale misurato contemporaneamente nel canale di riferimento (più vicino alla sorgente). Si può quindi pensare di utilizzare il segnale misurato sul canale di riferimento per generare un modello delle componenti fisiologiche di rumore che si sommano alla risposta emodinamica, e sfruttare questo modello per filtrare i segnali acquisiti invece dai canali di interesse.



**Figura 5.2.a** – Schema del principio su cui si basa l'utilizzo di un canale di riferimento (ovvero l'applicazione di un rilevatore sufficientemente vicino alla sorgente) [s11].

La figura 5.2.b, mostra i segnali acquisiti (relativi a  $\Delta\text{HbO}_2$ ) da un canale con distanza tra sorgente e rilevatore di 3 cm (blu), ed il segnale registrato da un canale con sorgente e rilevatore posti a 1,5 cm (verde), che funge quindi da canale di riferimento. Nei due segnali cambia il rumore di misura, mentre le componenti fisiologiche sono le stesse. La differenza principale tra i due segnali è quindi la risposta emodinamica, presente nel canale che raggiunge la corteccia cerebrale (distanza sorgente-rilevatore pari a 3 cm) e non nel canale di riferimento che invece limita l'area analizzata allo scalp. Si può notare infatti che i due segnali hanno andamenti molto simili, ma il primo segnale mostra un picco più accentuato intorno ai 9 secondi, dovuto alla risposta emodinamica. Questi due segnali sono stati acquisiti mentre il soggetto era impegnato nel test cognitivo proposto in questa tesi. Presso il Laboratorio fNIRS del Dipartimento di Psicologia dello Sviluppo e della Socializzazione dell'Università di Padova, si prevedono di sviluppare, nei prossimi mesi, ulteriori indagini sul canale di riferimento.



**Figura 5.2.b** – Segnale registrato da un canale con sorgente e rilevatore posti a 3 cm di distanza (linea blu) e da un canale con sorgente e rilevatore posti a 1,5 cm di distanza (linea verde).

### 5.3 Coregistrazione fNIRS-EEG

L'attività neuronale delle aree coinvolte nei processi della memoria visiva a breve termine è stata misurata e analizzata attraverso l'acquisizione del segnale EEG (per esempio in [6]). In particolare è stata rilevata la presenza di una correlazione positiva tra il carico di memoria visiva e l'ampiezza della sustained posterior contralateral negativity (SPCN), una componente del potenziale evento-relato (ERP): all'aumentare del carico in memoria (associato ad un incremento del numero di oggetti da memorizzare), l'ampiezza della SPCN aumenta (raggiungendo un asintoto con 3-4 oggetti). Lo studio della risposta emodinamica durante la stimolazione della VSTM è finora stato eseguito solo con tecniche di fMRI, per esempio in [4,5], e mai da dati di spettroscopia funzionale nel vicino infrarosso. L'elaborazione del segnale fNIRS esposto in questa tesi ha dimostrato le potenzialità di questa nuova tecnica nel campo delle neuroscienze, ottenendo importanti informazioni sulla memoria visiva a breve termine non ottenibili con indagini fMRI. In particolare questa tecnica ha permesso di verificare quali siano le aree cerebrali della regione parieto-occipitale maggiormente coinvolte nei processi della VSTM e di studiare gli effetti di carico e di lateralizzazione ad essa correlata da un punto di vista emodinamico.

Una delle aspettative maggiori per il prossimo futuro, è riuscire a verificare l'esistenza di una correlazione tra l'SPCN e il segnale emodinamico misurato nelle regioni posteriori del lobo parietale. Il miglior metodo di confronto è dato da una registrazione sincrona dei due segnali biologici (ERPs stimati dal segnale EEG e risposte emodinamiche misurate con acquisizioni fNIRS) in risposta ad un paradigma sperimentale analogo a quello utilizzato per acquisire i dati elaborati in questa tesi. Un simile approccio permetterebbe di monitorare simultaneamente l'ampiezza della componente di negatività posteriore controlaterale sostenuta (SPCN) dell'ERP e le corrispondenti variazioni di ossigenazione, portando ad una migliore comprensione dei processi coinvolti nella VSTM. L'obiettivo è individuare legami quantitativi tra le risposte ERP e hrf, sfruttando i vantaggi di entrambe le tecniche di acquisizione (alta risoluzione temporale dell'EEG e buona risoluzione spaziale della fNIRS) e la bassa interferenza reciproca.

E' importante precisare che la registrazione simultanea dei segnali EEG ed fNIRS, per lo studio della memoria visiva a breve termine, non è mai stata documentata in letteratura.

## 6. Conclusioni

La spettroscopia funzionale nel vicino infrarosso è uno strumento innovativo, che permette di misurare le variazioni di concentrazione di emoglobina ossigenata ( $\Delta\text{HbO}_2$ ) e deossigenata ( $\Delta\text{HHb}$ ) presenti nel sangue. L'acquisizione del segnale fNIRS avviene in modo assolutamente non invasivo, appoggiando sulla cute, o sul cuoio capelluto, una o più coppie sorgente-rivelatore e sfruttando il comportamento più o meno assorbente dell'emoglobina ossigenata e deossigenata, in presenza di radiazioni elettromagnetiche di specifiche lunghezze d'onda nella banda del vicino infrarosso (circa 650-1000 nm). Le misure di  $\Delta\text{HbO}_2$  e di  $\Delta\text{HHb}$  permettono di monitorare importanti parametri fisiologici locali, come l'ossigenazione ed il flusso sanguigno, in tessuti relativamente superficiali come la corteccia cerebrale.

La fNIRS è un ottimo strumento di indagine nel campo delle neuroscienze cognitive, poiché permette di analizzare i processi biologici che stanno alla base dell'interpretazione e della memorizzazione delle informazioni. In questo ambito, la variazione di concentrazione di emoglobina ossigenata e deossigenata, prendono il nome di *risposta emodinamica*.

In questa tesi è stato sviluppato un nuovo metodo non parametrico basato su un approccio bayesiano alla stima, per filtrare dati acquisiti con la spettroscopia funzionale nel vicino infrarosso (fNIRS). I dati sono stati acquisiti in specifiche aree cerebrali; l'obiettivo era di ottenere una corretta stima della risposta emodinamica ad esse relativa.

In particolare, per dimostrare la superiorità di questo approccio per la stima della risposta emodinamica rispetto ad altri metodi generalmente utilizzati (come l'averaging convenzionale e approcci basati su un filtraggio passabasso), l'algoritmo è stato testato su uno specifico dataset acquisito da 11 soggetti. Tali dati sono stati ottenuti dalla registrazione del segnale fNIRS proveniente dall'area parieto-occipitale della corteccia cerebrale in corrispondenza di 36 canali d'acquisizione durante uno specifico compito che prevedeva 4 diversi tipi di stimolazione visiva reiterati nel tempo. L'esperimento è stato appositamente pensato per lo studio della memoria visiva a breve termine (VSTM), ed in particolare per lo studio degli effetti di carico e di lateralizzazione. Gli stimoli, infatti, si differenziavano fra loro per il numero di

quadrati visualizzati (due oppure quattro) e per la loro posizione (destra oppure sinistra)

L'approccio bayesiano alla stima della risposta emodinamica è stato effettuato in due fasi consecutive di elaborazione del segnale. Nella prima fase sono stati elaborati e filtrati singolarmente brevi tratti di segnale (trials), acquisiti in corrispondenza delle diverse aree cerebrali esaminate durante ogni singolo compito visivo. Nella seconda fase invece è stata stimata la risposta emodinamica calcolando gli andamenti temporali medi dei trials in corrispondenza del diverso tipo di stimolazione della memoria visiva e dell'aspetto indagato (effetto di carico o di lateralizzazione).

I risultati dell'approccio bayesiano proposto per il filtraggio del segnale sono stati valutati in termini di rapporto segnale-rumore, calcolando il valore di CNR (contrast-to-noise ratio) a partire da un'analisi della densità spettrale di potenza (PSD) del segnale, prima e dopo il filtraggio. L'analisi del rapporto segnale-rumore ha innanzitutto messo in evidenza la debolezza del segnale relativo a misure di  $\Delta\text{HHb}$  rispetto a quello relativo a misure di  $\Delta\text{HbO}_2$ , spostando l'attenzione dell'analisi dei risultati (sia dal punto di vista della qualità del filtraggio che della loro interpretazione psicologica) sulle misure di  $\Delta\text{HbO}_2$  e di  $\Delta\text{HbT}$ . Applicare il filtro di Bayes ha migliorato notevolmente il rapporto segnale-disturbo nei singoli trials, ottenendo mediamente un aumento dei valori di CNR del 300% circa. Aver migliorato l'SNR nei singoli trials ha permesso di raggiungere buoni risultati anche nella stima finale della risposta emodinamica, soprattutto rispetto a quelli ottenuti applicando allo stesso dataset l'averaging convenzionale: i valori di CNR con l'approccio bayesiano aumentano mediamente del 141% rispetto a quelli ottenuti con l'averaging convenzionale. L'approccio bayesiano è stato confrontato anche con un tradizionale filtro passabasso (con una frequenza di taglio di poco superiore alla frequenza della risposta emodinamica attesa), applicato ai singoli trials prima di effettuarne la media. Questo secondo approccio è stato in grado di fornire valori di CNR medi molto simili a quelli ottenuti con l'approccio bayesiano proposto in questa tesi, sia nel singolo trial sia rispetto alle stime della risposta emodinamica. Tuttavia l'approccio bayesiano, rispetto al filtro passabasso, ha il vantaggio di non fare alcuna ipotesi deterministica sulle frequenze delle componenti della risposta emodinamica, mentre applicando un filtro passabasso con una frequenza di taglio di

poco superiore alla frequenza della risposta emodinamica attesa si corre il rischio di eliminare, quando presente, parte del segnale utile.

E' stata poi eseguita un'analisi dei risultati comportamentali, ovvero una valutazione dell'accuratezza delle risposte date dagli 11 soggetti durante l'esperimento nelle diverse condizioni di stimolo per l'acquisizione dei dati fNIRS. Questa analisi ha evidenziato la presenza di un effetto di carico della memoria visiva a breve termine (le risposte errate alla visualizzazione di 4 quadrati hanno avuto un'occorrenza maggiore circa del 15% rispetto a quelle relative a soli 2 quadrati) ma non ha mostrato alcuna differenza di lateralizzazione. Confermando i risultati comportamentali attesi, l'accuratezza delle risposte fornite non dipendeva dunque dal lato (sinistro o destro) del display ove si spostava l'attenzione del soggetto, ma soltanto dal numero più o meno elevato di quadrati visualizzati.

Infine le stime delle risposte emodinamiche, ottenute con l'approccio bayesiano proposto in questa tesi sono state analizzate statisticamente mediante l'applicazione di t-test. Innanzitutto, come previsto dai risultati ottenuti in studi di fMRI e di EEG, i dati acquisiti con il segnale fNIRS hanno confermato il coinvolgimento della regione parieto-occipitale nei processi della memoria visiva a breve termine, rilevando attivazione in tutti i canali. Anche se ci si aspettava una risposta emodinamica maggiore in corrispondenza della visualizzazione di 4 quadrati rispetto a 2, l'analisi statistica dei dati non è riuscita a rilevare alcun effetto di carico, per nessuna delle regioni esaminate. Questo risultato è strettamente legato ai risultati comportamentali che evidenziavano una minore accuratezza delle risposte dei soggetti in corrispondenza della visualizzazione di 4 quadrati, riducendo il numero di trials che hanno potuto registrare un'effettiva risposta emodinamica in questa condizione. Il paradigma sperimentale proposto in questa tesi è invece stato in grado di evidenziare un effetto di lateralizzazione, che si è manifestato con una risposta emodinamica di intensità maggiore per la condizione contralaterale in corrispondenza dell'area IPS/IOS. In particolare questo risultato è stato possibile soprattutto grazie all'utilizzo dell'approccio bayesiano per la stima delle risposte emodinamiche: un confronto con i risultati del filtro passabasso ha infatti mostrato una minore significatività dei risultati statistici ottenuti con quest'ultimo metodo.

L'approccio bayesiano per la stima della risposta emodinamica da dati fNIRS, mai utilizzato prima per filtrare questo tipo di segnale, ha perciò permesso di ottenere



buoni risultati nello studio dei processi che coinvolgono la VSTM, mai ottenuti prima d'ora con studi fMRI ma confermati da studi EEG. Esistono tuttavia alcuni accorgimenti che possono essere adottati per migliorare l'efficienza dell'algoritmo e produrre risultati migliori in termini di SNR e di precisione delle stime, oltre che per ridurre la durata dell'esperimento (attualmente ~50 minuti). Inoltre sarebbe importante riuscire a correlare fra loro i risultati relativi alle risposte emodinamiche ottenuti in questa tesi, che per la prima volta ha indagando le proprietà della VSTM da acquisizioni di spettroscopia funzionale nel vicino infrarosso, con i rispettivi risultati di attivazione neuronale che si otterrebbero da un'acquisizione simultanea del segnale EEG durante lo stesso paradigma sperimentale. Un simile approccio porterebbe ad una migliore comprensione dei processi coinvolti nella VSTM.

Per concludere, il lavoro esposto in questa tesi è frutto di un progetto molto innovativo di collaborazione interdisciplinare tra il Dipartimento di Ingegneria dell'Informazione e il Dipartimento di Psicologia dello Sviluppo e della Socializzazione dell'Università di Padova che ha permesso di compiere un passo importante per la comprensione dei meccanismi di funzionamento del cervello umano. Sono stati utilizzati metodi di processing del segnale mai applicati prima d'ora a dati di spettroscopia funzionale che hanno permesso di giungere ad importanti risultati, sia dal punto di vista psicologico (sono state individuate le aree cerebrali coinvolte nei processi della VSTM) sia dal punto di vista ingegneristico (è stato notevolmente migliorato il rapporto segnale/rumore).

## **Bibliografia**

- [1] M. S. Gazzaniga, R. B. Ivry, G. R. Mangun  
*Neuroscienze Cognitive*  
Ed. Zanichelli, 2005
- [2] A cura di L. Meccacci  
*Manuale di psicologia generale*  
Giunti Editore (collana Le basi della psicologia), 2001, pp 12-52
- [3] B.J. Casey, Michelle de Haan  
*Introduction: new methods in developmental science*  
Developmental Science 5:3 (2002), pp 265–267
- [4] J. Jay Todd, Renè Marois  
*Capacity limit of visual short-term memory in human posterior parietal cortex*  
Nature 428, 751-754 (15 April 2004)
- [5] Yaoda Xu, Marvin M. Chun  
*Dissociable neural mechanisms supporting visual short-term memory for objects*  
Nature 440, 91-95 (2 March 2006)
- [6] R. Luria, P. Sessa, A. Gotler, P. Jolicœur, R. Dell'Acqua  
*Visual Short-term Memory Capacity for Simple and Complex Objects*  
Journal of Cognitive Neuroscience March 2010, Vol. 22, No. 3, pp 496-512: 496-512.
- [7] F. F. Jobsis  
*Noninvasive, infrared monitoring of cerebral and myocardial oxygen sufficiency and circulatory parameters.*  
Science, 198:1264–1267, 1977
- [8] B. Chance, J. S. Leigh, H. Miyake, D. S. Smith, S. Nioka, R. Greenfield, M. Finander, K. Kaufman, W. Lery, M. Yong, P. Cohn, H. Yoshioka, and R. Boretsky  
*Comparison of time-resolved and unresolved measurements of deoxyhemoglobin in brain*  
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85, 4971, 1988
- [9] M. Cope, D.T. Delpy  
*System for long-term measurement of cerebral blood flow and tissue oxygenation on newborn infants by infrared transillumination*  
Med. Biol. Eng. Comput., 26, 289, 1988
- [10] P.W. Mc Cormick et al.  
*Non invasive cerebral optical spectroscopy for monitoring cerebral oxygen delivery and hemodynamics*  
Clin. Care Med., 19, 89, 1991
- [11] I. Y. Son, B. Yazici  
*Near Infrared Imaging and Spectroscopy for Brain Activity Monitoring*  
Advances in Sensing with Security Applications, pp: 341-372, NATO (2006)

- [12] A. David, M.A. Franceschini, K. Dunn, G. Strangman  
*In vivo optical imaging of brain function*  
Edited by Ron D. Frostig, Chapter 8, 2002
- [13] M. Wolf, M. Ferrari, V. Quaresima  
*Progress of near-infrared spectroscopy and topography for brain and muscle clinical applications*  
J. Biomed. Opt., Vol. 12, 062104 (2007)
- [14] E. Okada  
*Forward Modelling of Light Propagation in a Brain*  
Review of Laser Engineering Vol. 30; No. 11; pp 630-635 (2002)
- [15] G. Strangman, J. P. Culver, J. H. Thompson, D. A. Boas  
*A quantitative comparison of simultaneous BOLD fMRI and NIRS recordings during functional brain activation*  
Neuroimage 17:719-731 (2002)
- [16] M. Moosmann, P. Ritter, I. Krastel, A. Brink, S. Thees, F. Blankenburg, B. Taskin, H. Obrig, A. Villringer  
*Correlates of alpha rhythm in functional magnetic resonance imaging and near infrared spectroscopy*  
Neuroimage. 2003 Sep, 20(1):145-58
- [17] Y. Benjamini, Y. Hochberg  
*Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing*  
J. R. Statist. SocSer. B. 57, 289–300, (1995)
- [18] A. Sassaroli, Y. Tong, B. Frederick, P. Renshaw, B. Ehrenberg, S. Fantini  
*Studying brain function with concurrent near-infrared spectroscopy (NIRS) and functional magnetic resonance imaging (fMRI)*  
Optical Tomography and Spectroscopy of Tissue VI. Edited by Chance, Britton; Alfano, Robert R.; Tromberg, Bruce J.; Tamura, Mamoru; Sevick-Muraca, Eva M. Proceedings of the SPIE, Volume 5693, pp. 161-165 (2005).
- [19] S. P. Koch, S. Koendgen, R. Bourayou, J. Steinbrink, H. Obrig  
*Individual alpha-frequency correlates with amplitude of visual evoked potential and hemodynamic response*  
Berlin NeuroImaging Center/Department of Neurology (2008)
- [20] R. J. Cooper, N. L. Everdell, L. C. Enfield, A. P. Gibson, A. Worley, J. C. Hebden  
*Design and evaluation of a probe for simultaneous EEG and near-infrared imaging of cortical activation*  
Physics in Medicine and Biology, Vol. 54, N. 7 (2009)
- [21] M. Takeuchi et al.  
*Brain cortical mapping by simultaneous recording of functional near infrared spectroscopy and electroencephalograms from the whole brain during right median nerve stimulation*  
Brain topography (2009), vol. 22, n°3, pp. 197-214
- [22] M D. T. Delpy, M. Cope, P. van der Zee, S. Arridge, S. Wray, J. Wyatt  
*Estimation of optical pathlength through tissue from direct time of flight measurement*  
Phys. Med. Biol. 33\_12\_, 1433–1442 (1988)

- [23] D. T. Delpy, S. R. Arridge, M. Cope, D. Edwards, E. O. Reynolds, C. E. Richardson, S. Wray, J. Wyatt, P. van der Zee  
*Quantitation of pathlength in optical spectroscopy*  
Adv. Exp. Med. Biol. 248, 41–46 (1989)
- [24] S. R. Arridge, M. Cope, and D. T. Delpy  
*The theoretical basis for the determination of optical pathlengths in tissue: temporal and frequency analysis*  
Phys. Med. Biol. 37(7), 1531–1560 (1992)
- [25] A. Duncan, J. H. Meek, M. Clemence, C. E. Elwell, L. Tyszczuk, M. Cope, D.T. Delpy  
*Optical pathlength measurements on adult head, calf and forearm and the head of the newborn infant using phase resolved optical spectroscopy*  
Phys. Med. Biol. 40(2), 295–304 (1995)
- [26] A.H. Hielscher, A.Y. Bluestone, G.S. Abdoulaev, A.D. Klose, J. Lasker, M. Stewart, U. Netz, J. Beuthanc  
*Near-infrared diffuse optical tomography*  
Disease Markers 18 (2002) 313–337
- [27] S. Wray, M. Cope, D. T. Delpy, J. S. Wyatt, E. O. Reynolds  
*Characterization of the near infrared absorption spectra of cytochrome aa3 and haemoglobin for the non-invasive monitoring of cerebral oxygenation*  
Biochim. Biophys. Acta 933(1), 184–192 (1988)
- [28] Y. Fukui, Y. Ajichi, E. Okada  
*Monte Carlo prediction of near-infrared light propagation in realistic adult and neonatal head models*  
Appl Opt 42:2881–2887( 2003)
- [29] Y. Minagawa-Kawai, K. Mori, J. C. Hebden, E. Dupoux  
*Optical imaging of infants' neurocognitive development: recent advances and perspectives*  
Developmental Neurobiology pp. 712-728 (2008)
- [30] A. Devaraj  
*Signal processing for functional near-infrared neuroimaging*  
Thesis Submitted to the Faculty Of Drexel University (2005)
- [31] M. Ferrari, L. Mottola, V. Quaresima  
*Principles, techniques, and limitations of near infrared spectroscopy*  
Canadian Journal of Applied Physiology. 2004; 29: 463-487
- [32] D. A. Boas, T. Gaudette, G. Strangman, X. Cheng, J. J. Marota, J. B. Mandeville  
*The accuracy of near infrared spectroscopy and imaging during focal changes in cerebral hemodynamic.*  
NeuroImage, 13:76–90, 2001
- [33] S. Matcher, P. Kirkpatrick, K. Nahid, M. Cope, D. T. Delpy  
*Absolute quantification methods in tissue near infrared spectroscopy*  
Proc. SPIE 2389, 486–495 (1995)
- [34] S. Fantini, M. A. Franceschini, J. S. Maier, S. A. Walker, B. Barbieri, E. Gratton  
*Frequency-domain multichannel optical detector for noninvasive tissue spectroscopy and oximetry*  
Opt. Eng. 34, 32–42 (1995)

- [35] S M. A. Franceschini, S. Fantini, L. A. Paunescu, J. S. Maier, and E. Gratton  
*Influence of a superficial layer in the quantitative spectroscopic study of strongly scattering media*  
Appl. Opt. 37\_31\_, 7447–7458 (1998)
- [36] M. A. Franceschini, A. Zourabian, J. B. Moore, A. Arora, S. Fantini D. A. Boas  
*Local measurement of venous saturation in tissue with non-invasive, near-infrared respiratory-oximetry*  
Proc. SPIE 4250, 164–170 (2001)
- [37] E. Gratton, W. W. Mantulin, M. J. vandeVen, J. B. Fishkin, M. B. Maris, B. Chance  
*The possibility of a near-infrared optical imaging system using frequency-domain methods*  
In Proceedings of 3rd International Conference on Peace through Mind/Brain Science, pages 183–189, 1990
- [38] C. E. Cooper, C. E. Elwell, J. H. Meek, S. J. Matcher, J. S. Wyatt, M. Cope, D. T. Delpy  
*The noninvasive measurement of absolute cerebral deoxyhemoglobin concentration and mean optical path length in the neonatal brain by second derivative near infrared spectroscopy*  
Pediatr. Res. 39\_1\_, 32–38 (1996)
- [39] F. Bevilacqua, A. J. Berger, A. E. Cerussi, D. Jakubowski, B. J. Tromberg  
*Broadband absorption spectroscopy in turbid media by combined frequency-domain and steady-state methods*  
Appl. Opt. 39\_34\_, 6498–6507 (2000)
- [40] T. H. Pham, F. Bevilacqua, T. Spott, J. S. Dam, B. J. Tromberg, S. Andersson-Engels  
*Quantifying the absorption and reduced scattering coefficients of tissue-like turbid media over a broad spectral range with noncontact Fourier-transform hyperspectral imaging*  
Appl. Opt. 39\_34\_, 6487–6497 (2000)
- [41] J. Li, G. Dietsche, D. Iftime, S. E. Skipetrov, G. Maret, T. Elbert, B. Rockstroh, T. Gisler  
*Noninvasive detection of functional brain activity with near-infrared diffusing-wave spectroscopy*  
J. Biomed.Opt. 10\_4\_, 44002 (2005)
- [42] Y. Guoqiang, T. Durduran, G. Lech, Z. Chao, B. Chance, E. R. Mohler, and A. G. Yodh  
*Time-dependent blood flow and oxygenation in human skeletal muscles measured with noninvasive nearinfrared diffuse optical spectroscopies*  
J. Biomed. Opt. 10\_2\_, 24027 (2005)
- [43] C. Hock, K. Villringer, F. Muller-Spahn, R. Wenzel, H. Heekeren, S. Schuh Hofer, M. Hofmann, S. Minoshima, M. Schwaiger, U. Dirnagl, and A. Villringer  
*Decrease in parietal cerebral hemoglobin oxygenation during performance of a verbal fluency task in patients with alzheimer's disease monitored by means of near-infrared spectroscopy (nirs) – correlation with simultaneous rcbf-pet measurements*  
Brain Research, 755:293–303, 1997
- [44] T. Suto, M. Fukuda, M. Ito, T. Uehara, and M. Mikuni  
*Multichannel near-infrared spectroscopy in depression and schizophrenia: Cognitive brain activation study*  
Biological Psychiatry, 55:501–511, 2004.
- [45] S. Coyle, T. Ward, C. Markham, G. McDarby  
*On the suitability of near-infrared (nir) systems for next-generation brain-computer interfaces*  
Physiological Measurement, 25:815–822, 2004
- [46] S. Kishi, Z. Luo, A. Nagano, M. Okumura, Y. Nagano, Y. Yamanaka

*On NIRS-based BRI for a human-interactive robot RI-MAN*  
 Joint 4th International Conference on Soft Computing and Intelligent Systems and 9th  
 International Symposium on advanced Intelligent Systems

- [47] V. Quaresima, R. Lepanto, M. Ferrari  
*The use of near infrared spectroscopy in sports medicine.*  
 J Sports Med Phys Fitness. 2003 Mar;43(1):1-13.
- [48] Y. Sakai, Y. Matsuyama, N. Ishiguro  
*Intramuscular oxygenation of exercising trunk muscle in elderly persons*  
 J. of Japanese Society of Lumbar Spine Disorders, Vol. 11 (2005) , No. 1 pp.148-156
- [49] T. Binzoni, V. Quaresima, M. Ferrari, E. Hiltbrand, P. Cerretelli  
*Human calf microvascular compliance measured by near-infrared spectroscopy*  
 J. Appl. Physiol. 88\_2\_, 369–372 (2000)
- [50] S. Yamaji, S. Demura, Y. Nagasawa, M. Nakada  
*Relationships between decreasing force and muscle oxygenation kinetics during sustained static gripping*  
 J. of physiological anthropology and applied human science 23(2) pp.41-47 (2004)
- [51] J. Odagawa, K. Sekikawa, K. Kawaguchi, M. Takahashi, N. Morita, T. Inamizu  
*Influence of home-based pulmonary rehabilitation on muscle oxygenation in elderly patients with chronic obstructive pulmonary disease*  
 J. Phys. Ther. Sci. 21: 301:305, 2009
- [52] M. Weiss, G. Schulz, M. Fasnacht, C. Balmer, J. E. Fischer, A. C. Gerber, H. Bucher, O. Baenziger  
*Transcutaneously measured near-infrared spectroscopic liver tissue oxygenation does not correlate with hepatic venous oxygenation in children*  
 Canadian Journal of Anesthesia, Vol. 49, N. 8, pp 824-829, 2002
- [53] Makeig S., Bell A.J., TP Jung T.P., Sejnowski T.J.  
*Independent Component Analysis of Electroencephalographic Data.*  
 Advances in neural information processing systems vol. 8, pp. 145-151, (1996)
- [54] G. Valli, G. Coppini  
*Bioimmagini*  
 Patron Editore, 2005
- [55] A. Villringer, J. Planck, C. Hock, L. Schleinkofer, and U. Dirnagl,  
*Near infrared spectroscopy (NIRS): a new tool to study hemodynamic changes during activation of brain function in human adults*  
 Neurosci Lett , 154:101-104 (1993)
- [56] V. Toronov, A. Webb, J. H. Choi, M. Wolf, A. Michalos, E. Gratton, D. Hueber  
*Investigation of human brain hemodynamics by simultaneous near-infrared spectroscopy and functional magnetic resonance imaging*  
 Med. Phys. 28(4), 521–527, (2001)
- [57] Mehagnoul-Schipper D. J., Van Der Kallen, Colier, Van Der Sluijs, 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 16:14-23 (2002)

- [58] A. Torricelli, D. Contini, A. Pifferi, L. Spinelli, R. Cubeddu  
*Functional brain imaging by multi-wavelength time-resolved near infrared spectroscopy*  
Opto-Electronics review, Vol. 16, pp 131-135 (2008)
- [59] E. Veronese  
*Stima singola sweep di potenziali evocati cognitivi durante compito Simon*  
Tesi di Laurea, Dipartimento di Ingegneria dell'Informazione (DEI), Università di Padova,  
A.A. 2007/2008
- [60] S. Cutini, P. Scatturin, E. Menon, P. S. Bisiacchi, L. Gamberini, M. Zorzi, R. Dell'Acqua  
*Selective activation of the superior frontal gyrus in task-switching: an event-related fNIRS study*  
NeuroImage 42 (2008) 945–955
- [61] A. Duncan, J. Meek, M. Clemence, C. Elwell, P. Fallon, L. Tyszczyk, M. Cope, D. Delpy  
*Measurement of cranial optical path length as a function of age using phase resolved near infrared spectroscopy*  
Pediatr. Res. 39, 889–894. (1996)
- [62] M.L. Schroeter, S. Zysset, F. Kruggel, D.Y. von Cramon  
*Age-dependency of the hemodynamic response as measured by functional near-infrared spectroscopy.*  
NeuroImage 19, 555–564, (2003)
- [63] M.L. Schroeter, M.M. Bucheler, K. Muller, K. Uludag, H. Obrig, G. Lohmann, M. Tittgemeyer, A. Villringer, D.Y. Cramon  
*Towards a standard analysis for functional near-infrared imaging*  
NeuroImage 21, 283–290, (2004)
- [64] M.A. Franceschini, V. Toronov, M.E. Filiaci, E. Gratton, S. Fantini  
*On-line optical imaging of the human brain with 160-ms temporal resolution*  
Opt. Express 6, 49–57, (2000)
- [65] M. Okamoto, H. Dan, K. Sakamoto, K. Takeo, K. Shimizu, S. Kohno, I. Oda, S. Isobe, T. Suzuki, K. Kohyama, I. Dan  
*Three-dimensional probabilistic anatomical cranio-cerebral correlation via the international 10–20 system oriented for transcranial functional brain mapping.*  
NeuroImage 21, 99–111, (2004)
- [66] M.A. Franceschini, S. Fantini, J.H. Thompson, J.P. Culver, D.A. Boas  
*Hemodynamic evoked response of the sensorimotor cortex measured noninvasively with near-infrared optical imaging*  
Psychophysiology 40, 548–560, (2003)
- [67] Q. Zhang, G.E. Strangman, G. Ganis  
*Adaptive filtering to reduce global interference in non-invasive NIRS measures of brain activation: How well and when does it work?*  
NeuroImage 45 (2009) 788–794
- [68] G. Gratton, P.M. Corballis  
*Removing the heart from the brain: compensation for the pulse artifact in the photon migration signal*  
Psychophysiology 32, 292–299, (1995)

- [69] Q. Zhang, D.H. Brooks, M.A. Franceschini, D.A. Boas  
*Eigenvector-based spatial filtering for reduction of physiological interference in diffuse optical imaging*  
J. Biomed. Opt. 10, (2005)
- [70] G. Morren, U. Wolf, P. Lemmerling, M. Wolf, J.H. Choi, E. Gratton, L. De Lathauwer, S. Van Huffel  
*Detection of fast neuronal signals in the motor cortex from functional near infrared spectroscopy measurements using independent component analysis*  
Med. Biol. Eng. Comput. 42, 92–99, (2004)
- [71] G. Sparacino, S. Milani, E. Arslan, C. Cobelli  
*A Bayesian approach to estimate evoked potentials*  
Computer Methods and Programs in Biomed., 68: 233-248, 2002
- [72] H. Radhakrishnan, W. Vanduffel, H.Ping Deng, L. Ekstrom, D.A. Boas, M.A. Franceschini,  
*Fast optical signal not detected in awake behaving monkeys*  
NeuroImage 45 (2009) 410–419
- [73] Adam Gibson and Hamid Dehghani  
*Diffuse optical imaging*  
Phil. Trans. R. Soc. A 2009 367, 3055-3072
- [74] E. Rostrup, I. Law, M. Blinkenberg, H. B. W. Larsson, A. P. Born, S. Holm, O. B. Paulson,  
*Regional Differences in the CBF and BOLD Responses to Hypercapnia: A Combined PET and fMRI Study*  
NeuroImage, Volume 11, Issue 2, Pages 87-97

**Siti consultati:**

- [s1] [www.bec.ethz.ch](http://www.bec.ethz.ch)
- [s2] [www.utoronto.ca](http://www.utoronto.ca)
- [s3] [www.sltechgroup.com](http://www.sltechgroup.com)
- [s4] [www.dynamic-med.com](http://www.dynamic-med.com)
- [s5] [www.wikipedia.it](http://www.wikipedia.it)
- [s6] [www.fmrigoandscience.org](http://www.fmrigoandscience.org)
- [s7] [www.study.itee.uq.edu.au](http://www.study.itee.uq.edu.au)
- [s8] <http://singularityhub.com>
- [s9] [www.uni-graz.at](http://www.uni-graz.at)
- [s10] [www.bci2000.org](http://www.bci2000.org)
- [s11] [www.rochester.edu](http://www.rochester.edu)



Voglio ringraziare tutta la mia famiglia, ed in particolare Mamma e Papà per essermi stata vicina ed avermi accompagnata in questo cammino, sostenendomi soprattutto nei momenti di difficoltà.

Ringrazio il professore Giovanni Sparacino per la fiducia che ha dimostrato d'avere in me, affidandomi un lavoro di tesi molto affascinante e mai affrontato prima nel nostro Dipartimento.

Ringrazio l'ing. Fabio Scarpa per avermi aiutata, consigliata e sostenuta in questi mesi intensi di lavoro.

E infine ringrazio tutti gli amici e le persone a me care, che mi sono stati vicini in tutte le attività e le passioni che hanno fatto parte della mia vita in questi anni di studio.

Lucia