

**POLITECNICO DI MILANO**  
**FACOLTÀ DI INGEGNERIA DEI SISTEMI**  
**Corso di Laurea Specialistica in Ingegneria Biomedica**



**ANALISI DI SEGNALI NIRS MULTICANALE MEDIANTE  
MODELLI LINEARI GENERALIZZATI CON  
INTEGRAZIONE ELETTROENCEFALOGRAFICA ED  
ELETTROMIOGRAFICA IN SOGGETTI SANI E CON  
EPILESSIA DI UNVERRICHT-LUNDBORG**

Relatore: Prof. Sergio CERUTTI

Correlatori: Prof. Anna Maria BIANCHI

Ing. Erika MOLTENI

Tesi di Laurea di:

Stefano PERCIO

Matr. 750460

Anno Accademico 2011/2012



*“C'è una forza motrice più forte del vapore,  
dell'elettricità e dell'energia atomica:  
la volontà”*

ALBERT EINSTEIN (1879-1955)

<b>SOMMARIO</b>	<b>5</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>11</b>
<b>CAPITOLO 1: INTRODUZIONE</b>	<b>16</b>
<b>1.1 SEGNALE NIRS</b>	<b>17</b>
<b>1.2 ELETTRFISIOLOGIA CEREBRALE</b>	<b>21</b>
<b>1.3 PROGETTO nEUROPt</b>	<b>27</b>
<b>CAPITOLO 2: MATERIALI E METODO</b>	<b>29</b>
<b>2.1 HARDWARE</b>	<b>30</b>
2.1.1 ACQUISIZIONE SEGNALE NIRS	30
2.1.2 ACQUISIZIONE SEGNALE EEG ED EMG	39
<b>2.2 SOFTWARE</b>	<b>41</b>
2.2.1 ELABORAZIONE SEGNALE NIRS	41
2.2.2 ELABORAZIONE SEGNALE EEG ED EMG	45
<b>2.3 PROTOCOLLO SPERIMENTALE</b>	<b>51</b>
<b>2.4 RECLUTAMENTO SOGGETTI</b>	<b>53</b>
<b>CAPITOLO 3: RISULTATI</b>	<b>54</b>
<b>3.1 ANALISI TRADIZIONALE</b>	<b>55</b>
<b>3.2 ANALISI MULTIMODALE</b>	<b>62</b>
<b>3.3 ANALISI SOGGETTI CON PATOLOGIA</b>	<b>73</b>
<b>CAPITOLO 4: DISCUSSIONE</b>	<b>78</b>
<b>CAPITOLO 5: CONCLUSIONE</b>	<b>82</b>
<b>RINGRAZIAMENTI</b>	<b>85</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>87</b>



# Sommario

Il monitoraggio non invasivo dell'emodinamica e del metabolismo ossidativo è un importante metodo di indagine cerebrale. In particolare è possibile controllare l'attività metabolica attraverso variazioni di ossigenazione (quindi di emoglobina) in risposta a particolari stimoli (motori, visivi o cognitivi) e può quindi concorrere allo studio dei processi cognitivi, alla diagnosi delle malattie mentali, alla localizzazione di lesioni cerebrali.

Negli ultimi anni questo campo è in rapida evoluzione in quanto stimolato dalle possibilità di indagine offerte da altre tecniche di imaging quali risonanza magnetica funzionale, tomografia ad emissione di positroni, elettroencefalografia ed elettromiografia. In questo ambito, la spettroscopia della radiazione ottica nella regione del vicino infrarosso (600-1000 nm, NIRS) è un efficace mezzo diagnostico.

I tessuti biologici presentano infatti, in questo intervallo spettrale, una relativa trasparenza, fornendo quindi la possibilità di sondare in modo non invasivo anche regioni non direttamente accessibili. Inoltre, i principali costituenti dei tessuti (ossiemoglobina, deossiemoglobina, acqua e lipidi) presentano nella regione del vicino infrarosso caratteristiche spettrali distinte che possono essere usate per ricavare importanti informazioni sulla fisiopatologia del tessuto in esame. Tuttavia l'elevata torbidità dei tessuti biologici, dovuta all'enorme numero di strutture in grado di interagire con la luce (per esempio cellule, fibre, ecc.) rendono di difficile interpretazione i dati risultanti da questa metodica; infatti, per via dei fenomeni di deviazione ed assorbimento a cui i fotoni

vanno in contro, non sempre si ottiene un'immagine statisticamente significativa per lo scarso numero di eventi dettati.

In generale, le peculiarità della tecnologia NIRS sono quelle di rilevare ed analizzare immagini dell'attività cerebrale in tempo reale, utilizzando una sorgente luminosa a flusso continuo o pulsato facente parte di un sistema ottico posizionato sulla corteccia motoria, dove viene utilizzato per le misure di variazione emodinamica durante un compito sensitivo o cognitivo.

Negli ultimi anni, l'attività di ricerca è focalizzata allo sviluppo di una strumentazione NIRS compatta e multicanale, operante nel dominio del tempo o in frequenza, con sorgenti laser in grado di generare impulsi con durata di poche decine di picosecondi, sensori veloci e sensibili per rilevare i deboli segnali ottici propagatisi nei tessuti biologici. Si mira anche all'individuazione di un protocollo sperimentale comune per la taratura della strumentazione e per eseguire esperimenti con questa tecnologia innovativa; con questi obiettivi è nato un progetto finanziato dall'Unione Europea, nEUROPt, a scopo di ricerca sull'avanzamento tecnologico, lo sviluppo e la validazione clinica di metodologie avanzate di ottica non invasive, (in particolar modo NIRS nel dominio del tempo) in vivo per la diagnosi, il monitoraggio e la prognosi delle principali malattie neurologiche (ictus, epilessia, ischemia), sulla base di imaging con luce pulsata nel vicino infrarosso.

Nella sua configurazione più semplice la misura NIRS consiste nell'iniettare nel tessuto biologico un segnale luminoso di debole potenza (alcuni mW) e nel monitorare il segnale riemesso dal tessuto stesso. Per effetto dei fenomeni di assorbimento e di diffusione l'impulso all'uscita risulta ritardato, attenuato ed allargato temporalmente. L'analisi delle curve di riflettanza dei fotoni con un modello teorico fornisce informazioni sui coefficienti di diffusione ( $\mu_s'$ ) e di assorbimento ( $\mu_a$ ). Tipicamente sia l'iniezione, sia la raccolta del segnale NIRS vengono effettuate mediante fibre ottiche appoggiate sulla superficie del tessuto da esaminare, dando quindi una misura totalmente non invasiva e che non richiede l'immobilità del paziente, a differenza delle altre principali tecniche topografiche. Valutando l'assorbimento a due lunghezze d'onda è possibile risalire alla concentrazione di ossiemoglobina e deossiemoglobina, grazie alla legge di Lambert-Beer. In risposta ad uno stimolo motorio, le aree di elevata attivazione neuronale mostrano un aumento del consumo di ossigeno e conseguentemente un aumento del flusso sanguigno per garantire una maggior irrorazione di emoglobina ossigenata; come conseguenza, l'attivazione

neuronale può essere misurata dalla variazione locale di emoglobina nella vascolarizzazione cerebrale, come Shibuya et al., 2008, e molti altri lavori presenti in letteratura hanno dimostrato.

Uno dei problemi principali però, che rimane ancora irrisolto è l'integrazione dei dati NIRS con le altre metodiche di indagine diagnostica usate per rilevare parametri del cervello, per esempio EEG, MEG e fMRI. Nonostante ciò, capire il rapporto tra fenomeni elettrici e variazioni metaboliche risulta essere estremamente importante, tanto da indurre la sperimentazione di nuovi metodi che mirino ad integrare diversi aspetti della stessa informazione. In letteratura, Moosmann et al., 2003, hanno evidenziato una correlazione positiva in corteccia occipitale con un task di apertura e chiusura degli occhi tra il ritmo  $\alpha$  dell'EEG e cambiamenti di deossiemoglobina, tali da permettere di associare l'attività elettrica con quella metabolica; inoltre, Ye et al., 2009, hanno valutato una relazione tra il segnale NIRS e quello BOLD (Blood Oxygen Level Dependent) ottenuto con la fMRI; si evidenzia come, uno dei vantaggi principali del segnale NIRS, sia la capacità di misurare direttamente una vasta gamma di contrasti funzionali con altissima risoluzione temporale; dall'altra parte il segnale fMRI risulta avere più risoluzione spaziale rispetto a quello emodinamico.

Tutti questi studi portano a concludere che la misurazione simultanea di parametri diversi promette un miglioramento significativo nell'individuazione della zona cerebrale coinvolta nella stimolazione e nei processi di risposta. Mediante tale approccio multimodale infatti è possibile valutare diversi tipi di risposta, quella elettrica neuronale, quella autonoma e quella emodinamica, che, sebbene caratterizzate da diverse dinamiche temporali, sono rappresentative del medesimo fenomeno alla base del processo funzionale.

Per questi motivi lo scopo di questo lavoro di tesi è quello di determinare se un'apparecchiatura NIRS multicanale nel dominio del tempo sia in grado di individuare cambiamenti nelle aree motorie durante una stimolazione di handgrip e se tali informazioni si possano integrare con quelle fornite dall'EEG e dall'EMG rilevati contemporaneamente al segnale emodinamico; questa integrazione è stata valutata con il metodo Statistical Parametric Mapping (SPM), attraverso l'approccio statistico del Modello Lineare Generalizzato (GLM).

Pertanto il presente studio introduce principalmente elementi innovativi rispetto allo stato dell'arte precedentemente menzionato: l'indagine sugli effetti di modulazione del segnale



emodinamico prodotto da uno stimolo motorio di handgrip vengono combinati con i ritmi preponderanti dell'EEG e con l'EMG.

In questo lavoro 14 soggetti volontari sani e 9 soggetti patologici, affetti da epilessia mioclonica di Unverricht-Lundborg, sono stati sottoposti ad un compito di handgrip: uno per la mano destra, uno per la mano sinistra e uno per entrambe le mani; ciascuna di queste prove prevede un blocco di riposo iniziale (baseline) di 40 secondi, seguiti da dieci ripetizioni di 20 secondi di stimolo e 20 secondi di riposo; infine è stato previsto un ulteriore riposo finale di 50 secondi, per un totale di 490 secondi. Al fine del calcolo della correlazione si sono utilizzati l'EMG ed i ritmi di potenza EEG nella banda  $\alpha$  e  $\beta$  degli elettrodi C3 e C4 in base alla stimolazione di prova, scelti, poiché spazialmente prossimi ai probe NIRS e quindi più significativi nella valutazione dell'accoppiamento neurovascolare, come regressori del GLM.

In questo studio la variabile risposta che si vuole stimare è la variazione di concentrazione dei vari tipi di emoglobina (divisa in ossiemoglobina, HbO, deossiemoglobina, HbR e emoglobina totale, HbT) in base ad uno stimolo motorio di handgrip. I file contenenti i valori delle variazioni di concentrazione micromolare per ogni canale rilevato sono campionati a 1 Hz; inizialmente, per ciascun file ne è stato generato un altro contenente la variazione della concentrazione di emoglobina nel tempo ottenuta sottraendo il valore iniziale a tutti gli altri; successivamente sono stati generati tre file SPM rispettivamente per HbO, HbR e HbT per ogni singolo file di prova motoria; poi, attraverso l'interfaccia del toolbox è stato applicato un filtraggio per eliminare il rumore; infine, una volta ottenuto il file SPM si è scelta la desing matrix corrispondente alla specifica informazione ricercata e si sono stimati i parametri del GLM; l'inferenza è stata ottenuta attraverso un'immagine cerebrale che mette in evidenza le aree interessate dall'ossigenazione, con la possibilità di utilizzare o meno una restrizione sul p-value, quindi sull'area evidenziata.

L'EEG è stato elaborato attraverso un toolbox di MATLAB (EEGLAB) per mezzo dell'analisi delle componenti indipendenti (ICA). Successivamente è stato diviso nelle bande di interesse attraverso wavelet di Morlet per creare i regressori da inserire nel GLM, ricampionati a 1 Hz e normalizzati tra 0 e 1; infine, anche l'EMG è stato filtrato dal rumore, ricampionato e normalizzato per essere inserito anch'esso come regressore del GLM.

Le analisi tradizionali confermano quanto già evidenziato da studi precedenti; una controlateralizzazione dell'area attivata rispetto alla zona stimolata ed una maggior attivazione di HbO rispetto ad HbR, segno che i neuroni coinvolti ed anche quelli nelle immediate vicinanze richiamano globuli rossi con ossiemoglobina, quindi energia e nutrimento per poter svolgere i processi metabolici di risposta. Dagli esiti ottenuti con l'analisi multimodale si può immediatamente osservare che usando regressori EEG e EMG nel GLM si trovano correlazioni tra la risposta elettrica e quella metabolica; tuttavia in questo caso la significatività delle immagini si abbassa notevolmente e si osserva un'elevata variabilità interindividuale; ciò potrebbe essere dovuto ad un utilizzo di percorsi differenti tra i singoli soggetti. Si nota inoltre come il ritmo  $\alpha$  sia più visibile con HbR piuttosto che gli altri due, segno che probabilmente gli spikes prodotti da tale ritmo regolano le variazioni di deossiemoglobina.

Come si può notare dalle immagini la specificità di localizzazione e l'aumento di significatività sono invece i principali miglioramenti apportati con il regressore muscolare. Tuttavia, basandosi anche sui risultati ottenuti dagli altri soggetti, esso non modifica l'area principale di attivazione cerebrale, per tanto si può ritenere consistente il confronto con i regressori tradizionali; questo risultato apre nuovi orizzonti di ricerca; infatti, l'informazione della contrazione muscolare è molto importante nel caso in cui la patologia del soggetto in esame sia molto invalidante. In tutti quei casi in cui ad un comando di esecuzione del movimento dello stimolo non segue immediatamente la sua messa in atto è presente una latenza incognita tra la volontà del movimento e la sua messa in pratica, che il regressore tradizionale non è in grado di comprendere fornendo quindi immagini di attivazione falsate; inoltre, l'utilizzo dell'EMG è un ottimo sostituto nella ricerca della correlazione anche con l'attività. Va sottolineato però che questa tecnologia presenta anche dei limiti, principalmente intrinseci al principio fisico di funzionamento. Infatti, la conta dei fotoni in uscita è un fattore determinante per la significatività dell'immagine prodotta. Una soluzione plausibile a questo problema potrebbe essere quella di aumentare la potenza della sorgente laser. Un altro fattore che potrebbe portare una miglioria alle immagini è quello di aumentare il numero di optodi di detezione; in questo modo si otterrebbero delle immagini più specifiche in quanto aumenterebbe la localizzazione spaziale e la sua risoluzione; tuttavia, è bene fare un compromesso con il numero di optodi perché

aumentarli significherebbe anche aumentare il tempo di montaggio dei probe sullo scalpo del soggetto e aumentare il tempo di monitoraggio del segnale NIRS.

In conclusione questo lavoro si prospetta come punto di partenza per progressi futuri legati all'apparecchiatura, ai protocolli di taratura, di acquisizione del segnale, di generazione dello stimolo, ed infine al metodo di elaborazione utilizzato per la costruzione delle immagini di attivazione cerebrale.

# Abstract

The possibility to monitor non-invasively haemodynamics and oxidative metabolism in the brain is a challenging and important task. Particularly, it can lead to the monitoring of metabolic activity with oxygenation changes (such as haemoglobin) in response to some stimuli (motor, visual or cognitive), and thus it can help in the study of cognitive processes, diagnosis of mental diseases, localization of brain injuries.

In recent years, this field is evolving rapidly as stimulated by the possibilities of survey offered by other research techniques such as functional magnetic resonance, positron emission tomography, electroencephalography and electromyography. In this context, the spectroscopy of the optical radiation in the near infrared region (600-1000 nm, NIRS) is an effective diagnostic tool.

On one side in this spectral range biological tissues are rather transparent and penetration depth is relatively high, allowing for the noninvasive investigation of deep tissues. On the other side, main tissue constituents (water, lipid, oxygenated haemoglobin, and deoxygenated haemoglobin) exhibit distinct spectral features, which may be of help to discriminate them and to derive information on physiopathology of tissues. However, the high turbidity of biological tissues, due to the enormous number of structures able to interact with light (for example, cells, fibers, etc.) make it difficult to interpret the data resulting from this method; in fact, because of the phenomena diversion and absorption of photons that go against not always get an image statistically significant for the small number of events detected.

In general, the peculiarities of the signal NIRS are those to detect and analyze images of brain activity in real time, using a light source in pulsed or continuous flow forming part of an optical system positioned on the motor cortex, where it is used for measurements of haemodynamic changes during a sensory or cognitive task.

Recently, research has focused on the development of a compact and multi-channel NIRS instrumentation, operating in the time or in frequency domain with laser sources capable of generating pulses with duration of a few tens of picoseconds, sensors fast and sensitive for reveal weak optical propagated signals in biological tissues. It also aims at identifying a common experimental protocol for the calibration of instruments and to perform experiments with this innovative technology; these objectives was a project funded by the European Union, nEUROPt, the purpose of research progress in technology, development and clinical validation of advanced methods of optical non invasive (especially in the time domain NIRS) in vivo for diagnosis, monitoring and prognosis of major neurological diseases (stroke, epilepsy, ischemia), based on imaging with pulsed light in the near infrared.

In the simplest configuration, near infrared spectroscopy (NIRS) injects a weak (few mW) light signal in the tissue and measure the remitted signal which carries information on tissue constituents and structure. Due to absorption and scattering events the remitted pulse is delayed, broadened and attenuated. Analysis of reflectance curve with a theoretical model for photon migration in diffusive media yields estimate for the absorption ( $\mu_a$ ) and scattering ( $\mu_s'$ ) coefficients. Typically the measurements are made with a couple of optic fibers in contact with the surface of the tissue, resulting in a completely noninvasive measurement and that does not require the immobility of the patient, unlike the other major topographic techniques.

Evaluating the absorption at two wavelengths is possible to determine the concentration of oxyhaemoglobin and deoxyhaemoglobin, thanks to the law of Lambert-Beer. In response to a stimulus motor, the areas of high neuronal activation show an increase in oxygen consumption and thereby an increase in blood flow to ensure a greater spraying of oxygenated haemoglobin and as a result, the neuronal activation can be measured by the local variation of haemoglobin in the cerebral vasculature, such as Shibuya et al., (2008), and many other works in the literature have shown.

One major problem, however, that remains unresolved is the integration of NIRS data with other diagnostic methods of investigation used to detect parameters of the brain, such as EEG, MEG and fMRI. Nevertheless, understanding the relationship between electric phenomena and metabolic changes is extremely important so as to induce the development of new methods that aim to integrate different aspects of the same information. In literature, Moosmann et al., 2003, have shown a positive correlation in the occipital cortex with a task of opening and closing of the eye between the  $\alpha$  EEG's rhythm and changes in deoxyhaemoglobin, such as to enable the electrical activity associated with that metabolic; in addition, Ye et al., 2009, have evaluated a relationship between the NIRS and the BOLD (Blood Oxygen Level Dependent) signal obtained with fMRI; it is evident that one of the main advantages of the NIRS signal is the ability to directly measure a wide range of functional contrasts with high temporal resolution, on the other hand, the fMRI signal is more spatial resolution than the haemodynamic signal.

All these studies lead to the conclusion that the simultaneous measurement of different parameters promises a significant improvement in the identification of the brain area involved in the stimulation and response processes. With this approach it is possible to evaluate multimodal different types of responses, the neuronal electrical, the haemodynamic and autonomic, which, although characterized by different temporal dynamics, are representative of the same phenomenon at the basis of the functional process.

For these reasons, the purpose of this work is to determine if an apparatus NIRS multi-channel in the time domain is capable of detecting changes in motor areas during a stimulation of handgrip and if such information can be integrated with that provided by EEG and from EMG recorded simultaneously with the haemodynamic signal; this integration was assessed by the method statistical Parametric Mapping (SPM), using the statistical method of Generalized Linear Model (GLM).

Therefore, this study introduces innovative elements mainly from the state of the art mentioned above: the investigation of the effects of haemodynamic signal modulation produced by a stimulus of handgrip motor rhythms are combined with the preponderance of EEG and EMG.

In this study 14 healthy volunteers and 9 pathological subjects suffering from myoclonic epilepsy of Unverricht-Lundborg, underwent a handgrip task: one for the right hand, one

for the left hand and one for both hands, each of these tests provides a block of initial rest (baseline) of 40 seconds, followed by ten repetitions of 20 seconds of the stimulus and 20 seconds of rest, it was finally provided a final rest of 50 seconds, for a total of 490 seconds. At the end of the calculation of the correlation are used the EMG and the rhythms of EEG power in the band  $\alpha$  and  $\beta$ , chosen C3 and C4 of the electrodes according to the stimulation test, because spatially close to the probe NIRS and therefore more significant in the evaluation of neurovascular coupling, as regressors of the GLM.

In this study the variable response that is to be estimated is the variation of the concentration of the various types of haemoglobin (divided into oxyhaemoglobin, HbO, deoxyhaemoglobin, HbR and total haemoglobin, HbT) according to a stimulus motor of handgrip. The files containing the values of the changes in concentration micromolar for each detected channel are sampled at 1 Hz; initially, for each file another one was generated containing the variation of the concentration of haemoglobin in the time obtained by subtracting the initial value to all the others; three files were then generated for SPM respectively HbO, HbR, and HbT per file test motor, and then, through the interface of the toolbox has been applied a filter to eliminate noise and finally, once you get the files SPM has the choice desing matrix corresponding to the specific information searched for and are estimated parameters of the GLM; the inference has been obtained through an image brain that highlights the areas involved by oxygenation, with the possibility of using or not a restriction on the p-value, then the highlighted area.

The EEG was processed through a MATLAB toolbox (EEGLAB) by means of independent component analysis (ICA). It was subsequently divided into bands of interest through Morlet's wavelet to create the regressors to be included in the GLM, resampled at 1 Hz and normalized between 0 and 1 and finally, also the EMG was filtered from the noise, resampled and normalized to be inserted also as a regressor in the GLM.

The traditional analysis confirms what has already been highlighted by previous studies, a counter-lateralization of the activated compared to the stimulated area and a greater HbO activation than HbR that sign the neurons involved and even those close to call red blood cells with oxyhaemoglobin, thus energy and nutrients to carry out their metabolic response. From the results obtained with the multimodal analysis one can immediately observe that regressors using EEG and EMG in GLM are correlations between the electrical response and metabolic, but in this case the significance of the images is lowered considerably and it

is observed high interindividual variability , this may be due to use of different pathways among individual subjects. It is also noted as the  $\alpha$  rhythm is more visible with HbR rather than the other two, a sign that probably the spikes produced by this rhythm regulate the variations of deoxyhaemoglobin.

As you can see from the pictures of the specific localization and the increase of significance are the major improvements with the regressor muscle. However, based also on results obtained by others, it does not change the main area of brain activation, for so it can be considered consistent comparison with the traditional regressors, this result opens new horizons of research; in fact, the information of the contraction muscle is very important in the case where the pathology of the subject under examination is very debilitating. In all those cases in which an execution command of the movement of the stimulus does not immediately follow its implementation is an unknown latency between the will of the movement and its put into practice, that the traditional regressor is not able to understand thus providing images of activation distorted; addition, the use of EMG is an excellent substitute in the search for correlation with the activity. It should be emphasized, however, that this technology also has limitations, mainly intrinsic to the physical principle of operation. In fact, the counts of the photons at the outlet are a determining factor for the significance of the image produced. A plausible solution to this problem would be to increase the power of the laser source. Another factor that could lead to an improvement to the images is to increase the number of optodes detection; in this way would be obtained of the images more specific because it increases the spatial localization and its resolution; however, it is good to make a compromise with the number of optodes increase because the number also increase the installation time of the probe on the scalp of the subject and increase the time signal monitoring NIRS.

In conclusion this work promises to be a starting point for future progress related to the equipment, to the protocols of calibration, acquisition and signal processing and generation of the stimulus, and finally to the processing method used for the construction of images of cerebral activation.



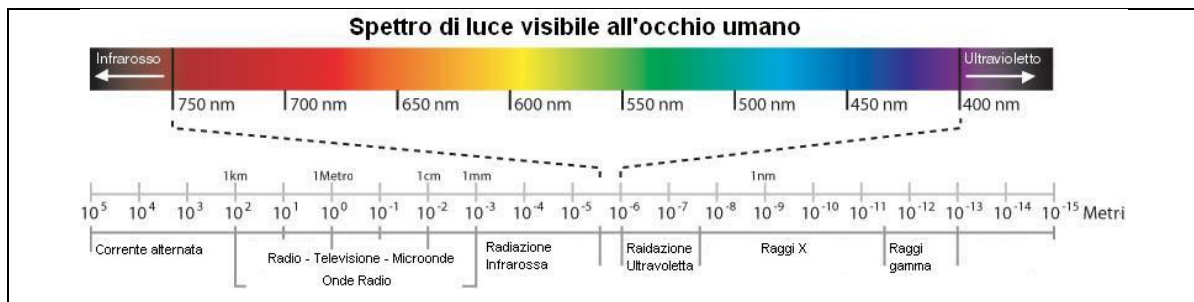
# Capitolo 1

## Introduzione

- segnale NIRS
- elettrofisiologia cerebrale
- progetto nEUROPt

### 1.1 - SEGNALE NIRS

Le tecnologie ottiche per applicazioni mediche e biologiche hanno conosciuto un intenso sviluppo nel corso degli ultimi tre decenni. In particolare la spettroscopia nel vicino infrarosso (NIRS, Near Infrared Spectroscopy) è stata recentemente indicata negli “Annals of the New York Academy of Sciences” (Annals of the New York Academy of Sciences , 2001) come una tecnologia tra le più promettenti della prossima decade, per ciò che concerne il monitoraggio finalizzato alla neuro-protezione, essendo in grado di misurare a livello regionale parametri come l’ossigenazione ed il flusso ematico tissutale cerebrale. L’origine di queste metodiche nasce nel 1800 quando il fisico William Herschel dimostrò l’esistenza di componenti di radiazione “non visibili” misurando la temperatura nelle varie bande colorate, ottenute da un prisma di vetro e scoprendo che essa continuava ad aumentare anche dopo che il termometro era stato posizionato al di fuori della banda estrema visibile del rosso. Fu il primo esperimento che mostrò come il calore poteva trasmettersi anche grazie ad una forma invisibile di luce che per tale motivo, venne chiamata in seguito infrarosso (infatti, comprende lunghezze d’onda inferiori alla banda del rosso, come mostrato in figura 1).



**Figura 1. Spettro di assorbimento dei fotoni; in particolare è evidenziato lo spettro visivo, mentre quello infrarosso ha un range di lunghezze d’onda compreso tra  $10^{-3}$  e  $10^{-5}$  m.**

Successivamente, si scoprì che queste radiazioni hanno maggiore capacità di penetrazione ed attraversamento della materia biologica rispetto alla radiazione visibile, e che queste loro capacità sono legate sia al contenuto energetico sia alle caratteristiche del materiale attraversato. Per avere a disposizione tecniche spettroscopiche, si è però dovuto aspettare il diciannovesimo secolo, con gli esperimenti e le intuizioni di Kirchoff e Bunsen, fondatori dell’analisi chimica spettroscopica, i quali scoprirono che alcune specie chimiche assorbono la luce in maniera proporzionale alle proprie concentrazioni (Rolfe, 2000).

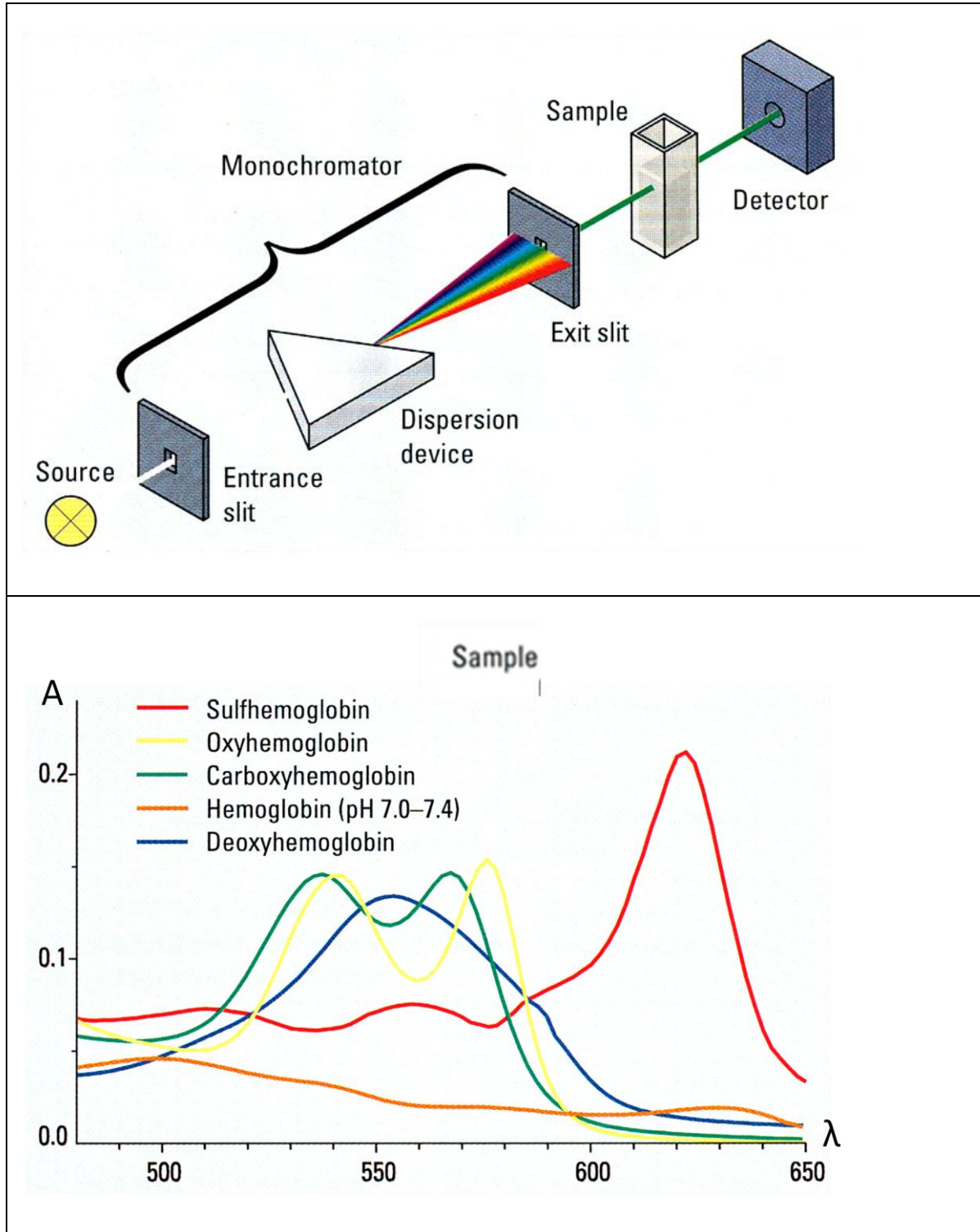


Figura 2. In alto lo schema di uno spettrometro, in basso gli spettri generati da campioni analizzati dallo spettrometro.

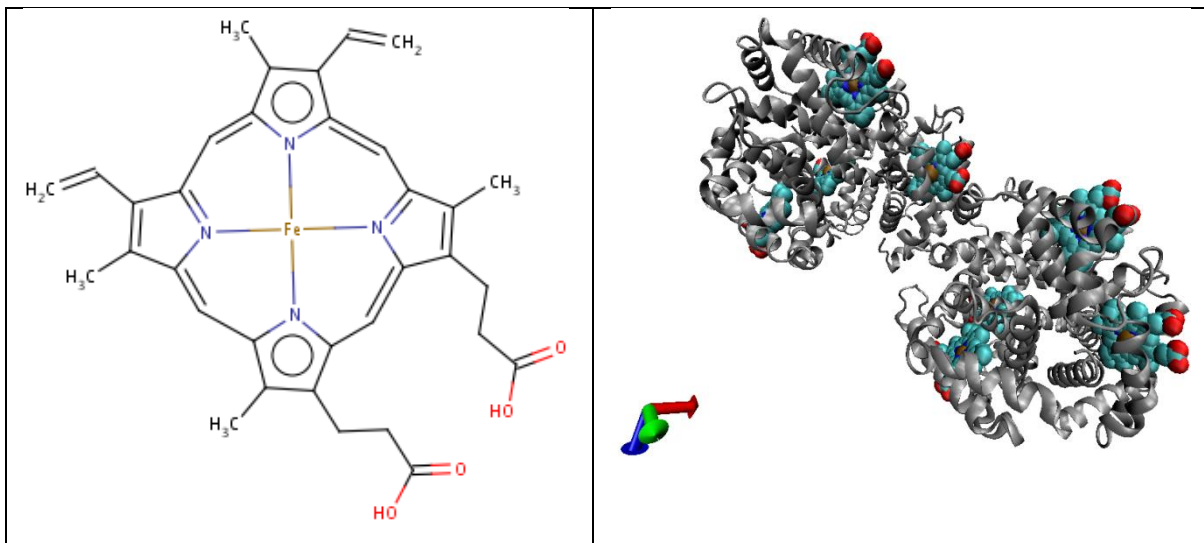
Si scoprì grazie a questa nuova tecnica, che il fotone NIR irraggiante il tessuto biologico non lo attraversa secondo un percorso rettilineo (tra sorgente e detettore), come nel caso del fotone X, bensì esegue un percorso maggiore, assimilabile ad una spezzata (detta

“banana shape”), più o meno complessa a seconda del numero di eventi di scattering a cui va incontro, che si conclude con l’assorbimento totale del fotone da parte del tessuto o con la sua fuoriuscita dal tessuto (fotoni trasmessi o fotoni riflessi, a seconda della direzione di uscita). Sebbene un numero di esperimenti NIR fossero stati fatti nei primi anni del 1900, fu solo dalla metà del secolo (1960) che la spettroscopia NIR venne usata praticamente (figura 2). Infine, una svolta nell’ambito delle tecniche ottiche è stata data da Jöbsis, il quale, nel 1977, mise a punto il primo strumento in grado di sfruttare la luce nell’intervallo del vicino infrarosso (approssimativamente tra 700 e 900-1000 nm) per effettuare un monitoraggio funzionale non invasivo dei tessuti del corpo umano ed in particolare di quello cerebrale (Jöbsis, 1977). La tecnica sviluppata da Jöbsis è diventata nota col nome di spettroscopia nel vicino infrarosso (NIRS) e negli ultimi anni si è assistito al suo sviluppo e diffusione in ambito clinico, grazie all’enorme potenziale. Infatti, la NIRS è una tecnica diagnostica non invasiva, totalmente innocua per il paziente, ed in tempo reale, in grado di misurare l’emodinamica tissutale utilizzando strumentazioni portatili, relativamente a basso costo; la possibilità di riutilizzare il campione e l’assenza di reagenti completa il quadro dei vantaggi. Al contrario, si presentano di notevole complessità la scelta del giusto algoritmo da utilizzare per l’interpretazione dei dati e l’accurata procedura di calibrazione della sofisticata attrezzatura, in quanto non sono ancora stati delineati protocolli comuni (Perrey, 2008); è inoltre svantaggiosa la dipendenza dai metodi chimici tradizionali non applicabili ad una completa analisi di tutti i costituenti quali, per esempio, gli elementi minerali.

Le radiazioni del vicino infrarosso forniscono quanti di energia che causano cambiamenti nello stato energetico delle vibrazioni molecolari (legami OH, CH, NH e SH). Un campione irradiato assorbe l’energia selettivamente in funzione della specifica frequenza di vibrazioni delle molecole presenti, creando così lo spettro di assorbimento. In generale, tutti i legami organici hanno bande di assorbimento nella regione del NIR, mentre i minerali possono essere rilevati esclusivamente in complessi organici e nei chelati, oppure per i loro effetti sui legami dell’idrogeno.

Per la sua particolare struttura, l’emoglobina (figura 3) è il principale componente ematico che assorbe i fotoni nella regione NIR; inoltre, l’emoglobina ossigenata (HbO) e deossigenata (HbR) hanno spettri di assorbimento diversi in tale banda, il che, permette di

ricavare separatamente le concentrazioni delle due specie di emoglobina nel tessuto e quindi il livello di saturazione dell'ossigeno nel sangue.



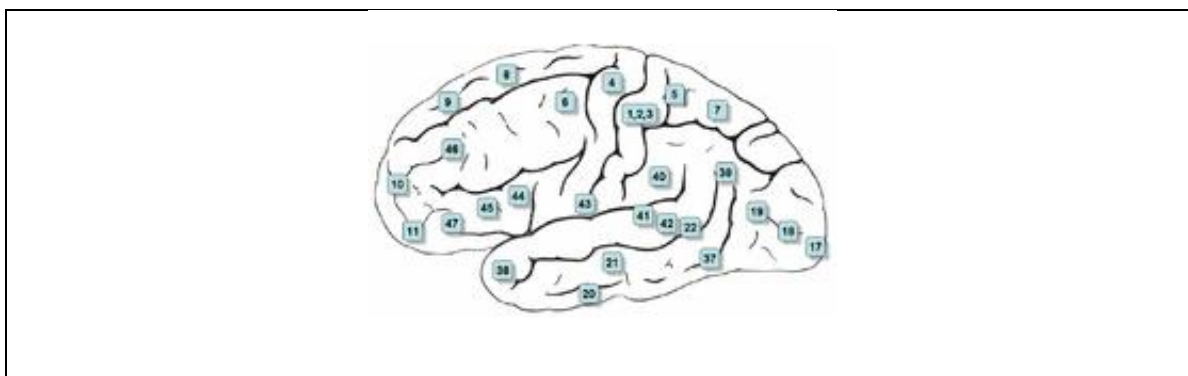
**Figura 3. A sinistra la rappresentazione della formula chimica dell'emoglobina (Hb), mentre a destra una rappresentazione tridimensionale della molecola dove sono evidenziati in grigio i domini principali mentre con visualizzazione VMD i gruppi -eme.**

Inoltre, utilizzando diverse lunghezze d'onda, essa ha le potenzialità di interrogare altri cromofori oltre all'emoglobina. La NIRS, dunque, possiede un'ottima sensibilità temporale, dell'ordine dei secondi, ed una discreta sensibilità spaziale, dell'ordine dei centimetri; tuttavia, il suo limite principale è dato dalla profondità di penetrazione della luce, che non le consente di analizzare le regioni interne del cervello. Va però osservato che la strumentazione NIRS può essere applicata su qualunque soggetto incluso il neonato, perché robusta agli artefatti di movimento; infatti, non richiedendo l'immobilità della testa del paziente, viene adoperata soprattutto per lo studio di soggetti con gravi patologie e difficoltà nel controllo dei movimenti, compresi i bambini.

Ci sono molti lavori in letteratura riguardanti lo studio dei cambiamenti emodinamici (dati dalla variazione di concentrazione di emoglobina) causati dall'attivazione di aree cerebrali, dovuta a funzioni motorie o cognitive; per tutti questi motivi, l'evoluzione tecnologica e l'orizzonte della ricerca sono mirati ad un'acquisizione standardizzata più specifica e dettagliata del segnale, grazie a sistemi a più canali di misura per aumentare la ROI (Region Of Interest) e la profondità di penetrazione (attualmente di circa 3.5 cm), con componenti sempre più piccoli ed affidabili e l'hardware principale non più grande di un normale laptop.

## 1.2 – ELETTROFISIOLOGIA

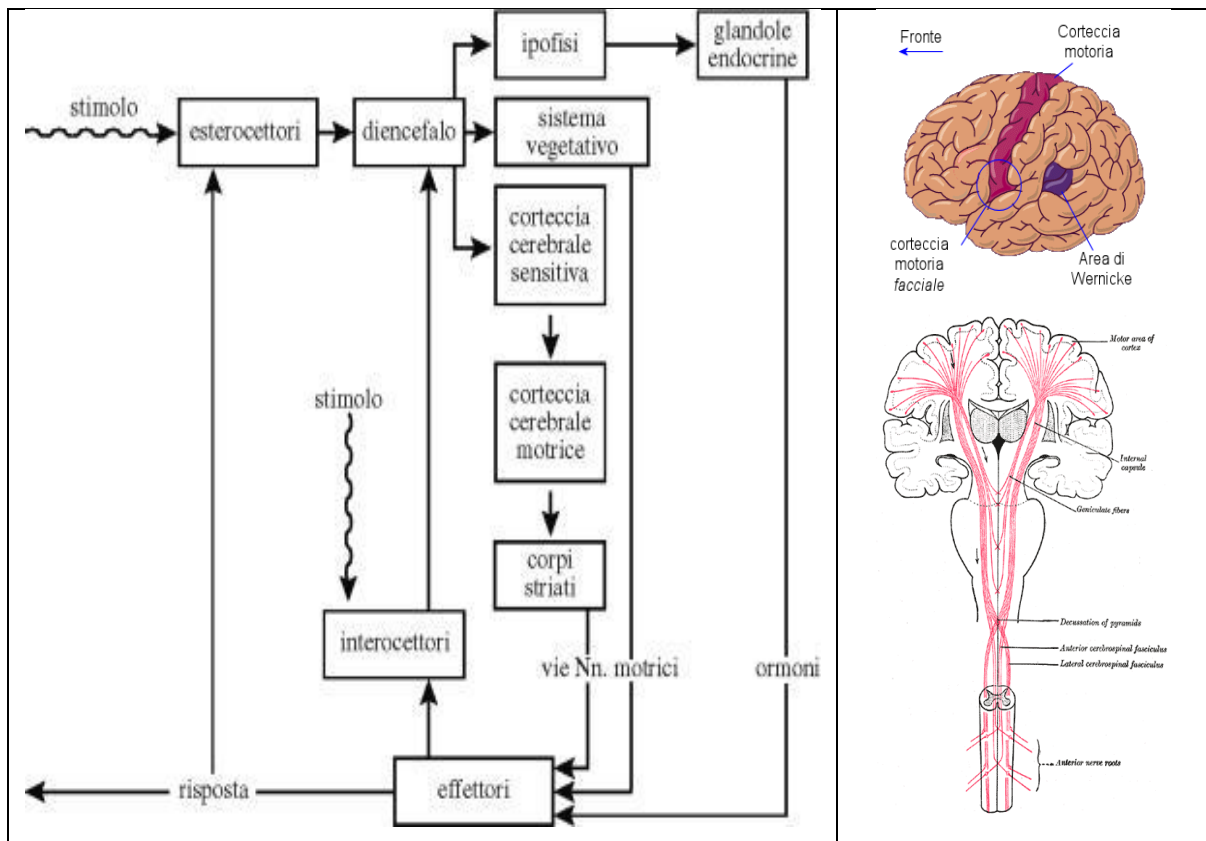
Il cervello è un organo costituito da due emisferi, destro e sinistro, separati da una scissura e caratterizzati da solchi e circonvoluzioni; la corteccia cerebrale è suddivisa in lobi: frontale, separato dal resto dalla scissura di Rolando sede principalmente delle attività cognitive (pensiero, memoria, ecc.), parietale, separato dalla scissura parietoccipitale e sede principalmente delle attività motorie e tattili, temporale separato dal resto dalla scissura di Sylvius e sede principalmente delle funzioni uditive, e occipitale sede principalmente delle sensazioni visive. Secondo la classificazione di Brodmann sulla superficie della corteccia telencefalica è possibile individuare 52 aree (chiamate per questo aree di Brodmann, figura 4) con diverse caratteristiche citoarchitettoniche e funzionali; esistono dunque un'area motoria e un'area sensitiva per ciascun emisfero, di dimensioni proporzionali al numero di recettori presenti nelle zone periferiche corrispondenti, che controllano il lato opposto del corpo.



**Figura 4. È visualizzato l'encefalo diviso nelle 52 aree di Brodmann; l'area 4 identifica la corteccia motoria primaria.**

Un'azione volontaria nasce da opportuni segnali della corteccia cerebrale determinanti il movimento desiderato. Questi segnali sono elaborati e trasmessi da alcuni nuclei del sistema nervoso fino ad arrivare nelle sue interfacce in uscita costituite da opportuni attuatori (placche motrici): il comando, infatti, parte dalle cellule motorie piramidali situate nella corteccia cerebrale, percorre sotto forma di impulso elettrico le fibre efferenti corrispondenti che, ad un certo punto del tronco encefalico (nel bulbo, detto anche midollo allungato perché costituisce il primo prolungamento del midollo spinale all'interno del cranio), si incrociano per passare nel midollo spinale del lato opposto del corpo; raggiunto quindi il neurone corrispondente che si trova all'incirca all'altezza del muscolo che si deve

contrarre, si propaga dal midollo ai nervi spinali, i quali si assottigliano e ramificano sempre di più fino a diventare un'unica fibra nervosa che si collega ad una fibra muscolare mediante una giunzione detta sinapsi neuro-muscolare; qui la trasmissione dell'impulso che avviene per fenomeni chimici (liberazione di neurotrasmettitori nello spazio intermedio tra le fibre della sinapsi) determina la contrazione muscolare (figura 5). Poi, all'interno del muscolo, dei tendini e delle articolazioni vi sono dei recettori collegati con delle fibre nervose, mediante i quali viene registrata la posizione dei nostri segmenti corporei nello spazio e sempre sotto forma di impulsi viene trasmessa al cervello seguendo esattamente il percorso inverso a quello della via motoria (fibre afferenti). Questo percorso è responsabile della percezione ed è denominato via sensitiva.



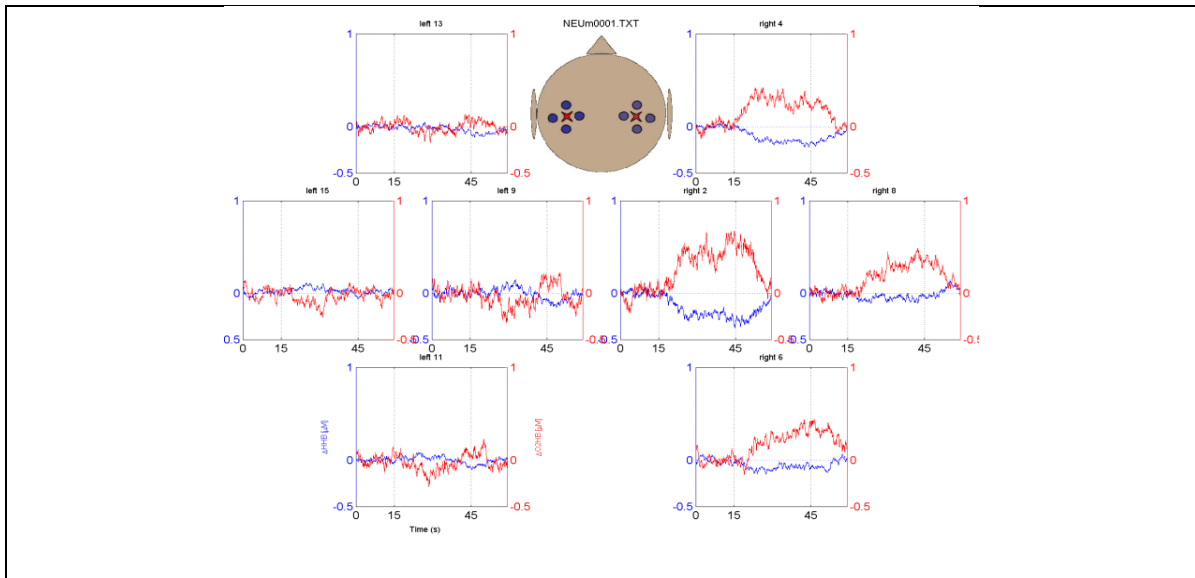
**Figura 5. A sinistra uno schema a blocchi della risposta cerebrale ad uno stimolo esterno. A destra in alto l'area motoria mentre in basso sono mostrate le vie efferenti.**

Insieme agli eventi elettrici e chimici che hanno luogo a livello cellulare, l'attività cerebrale induce fenomeni a livello vascolare, noti come risposta emodinamica cerebrale.

La risposta di ossigenazione attesa in un'area corticale attivata a seguito di uno stimolo consiste in un piccolo aumento iniziale di emoglobina deossigenata (HbR) ed in una corrispondente diminuzione di ossiemoglobina (HbO); tali fenomeni sono dovuti al fatto



che, in risposta alla richiesta di ossigeno, quest'ultimo viene separato dall'emoglobina ed estratto dai globuli rossi contestualmente presenti nell'area. Si ha, in seguito, una vasodilatazione capillare e, di conseguenza, un aumento compensatorio del flusso ematico regionale (figura 6).



**Figura 6. Andamento nel tempo del segnale NIRS registrato su vari elettrodi. In rosso il segnale dell'ossiemoglobina, in blu quello della deossiemoglobina.**

L'aumento del flusso sanguigno locale e la distribuzione di ossigeno eccedono il tasso di consumo locale di ossigeno anche in condizioni fisiologiche (il sangue diretto al cervello è il 20% di quello totale corporeo, cioè circa 1 litro, consumando però solo il 10% di glucosio e tenendo il resto per eventuali emergenze; Villringer e Chance, 1997). Questo disaccoppiamento emodinamico, tra disponibilità di ossigeno e tasso di consumo dello stesso, è un ben noto meccanismo di precauzione che porta ad un aumento locale dell'ossigenazione del sangue e, dunque, ad un aumento di HbO con conseguente diminuzione di HbR (Fox e Raichle, 1986).

Risulta evidente, che misurando i parametri vitali del cervello durante l'esecuzione di un compito, sia esso motorio o cognitivo, è possibile studiare il controllo, l'attivazione ed il coordinamento di tale organo sulle aree attivate per capirne i meccanismi, e di come una variazione dell'emodinamica possa fungere da predittore di una locale attività elettrica associata.

Con l'espressione mappatura cerebrale si intende, nella letteratura neuroscientifica, la possibilità di visualizzare le aree corticali attivate a fronte di un determinato compito e le loro interconnessioni, utilizzando tecniche non invasive (Shibasaki, 2008). Le tecniche non



invasive attualmente in uso sono suddivise in due gruppi in base al principio fisico cui fanno riferimento: tecniche elettrofisiologiche ed emodinamiche. Il primo gruppo comprende l'elettroencefalografia (EEG) e la magnetoencefalografia (MEG), il secondo, invece, la tomografia ad emissione di positroni (PET), la tomografia computerizzata ad emissione di singolo fotone (SPECT), la risonanza magnetica funzionale (fMRI) e la spettroscopia nel vicino infrarosso (NIRS). Lo stato dell'arte attuale mostra una relazione effettiva tra i fenomeni elettrici e vascolari in risposta ad uno stimolo, come detto in precedenza.

Roy e Sherrington, nel loro celebre articolo pubblicato nel 1890, basandosi su una serie di studi effettuati su svariati animali, suggerirono che alcuni composti chimici del metabolismo cerebrale, lambendo le pareti delle arteriole erano in grado di indurre delle variazioni nel calibro di tali vasi: in questo modo le strutture cerebrali avrebbero un meccanismo intrinseco di autoregolazione con cui variare localmente l'apporto di sangue in risposta a variazioni locali di funzionalità (Roy e Sherrington, 1890).

Successivamente, Logothetis et al., (2001), hanno studiato la risposta della corteccia visiva della scimmia ad una stimolazione visiva tramite scacchiera (pattern reversal), misurando simultaneamente dei segnali fMRI di elevata risoluzione spazio-temporale e delle registrazioni intracorticali dell'attività di spike di unità singole o multiple e dei potenziali di campo locale. Gli autori hanno riscontrato che i potenziali di campo locale sono maggiormente correlati alle risposte del segnale BOLD (Blood Oxygenation Level Dependent), di quanto non lo siano le risposte multi-unità, supportando l'ipotesi per cui il contrasto evidenziato dal segnale BOLD rifletta l'elaborazione sinaptica di una certa area corticale, piuttosto che la sua attività di spike.

Zonta et al., (2003), hanno dimostrato, a partire da sezioni cerebrali di ratto, che la dilatazione delle arteriole, che risponde al trigger dell'attività neuronale, è dipendente da oscillazioni nella concentrazione dello ione  $Ca^{2+}$  negli astrociti (cellule gliali legate ai vasi sanguigni), mediate da glutammato; pertanto è stato enfatizzato il ruolo degli astrociti nella mediazione dell'accoppiamento tra l'attività sinaptica e la vasodilatazione locale attraverso la presenza di recettori del glutammato, ma il ruolo di tali mediatori è ancora tutto da capire.

Nello stesso anno, Moosmann et al., 2003, hanno evidenziato una correlazione positiva in corteccia occipitale con un task di apertura e chiusura degli occhi tra il ritmo alpha

dell'EEG e cambiamenti di deossiemoglobina, tale da permettere di associare l'attività elettrica con quella metabolica.

Più di recente, Shibuya et al., (2008), hanno scoperto, durante un compito di handgrip della durata di tre minuti con intensità crescente, che l'attivazione corticale registrata con il segnale EEG è seguita da un aumento di ossigenazione registrata con il segnale NIRS; per cui ogni elaborazione di un processo motorio implica un'attività elettrica concentrata del sistema nervoso ed un flusso di ossigenazione crescente nelle aree interessate. Tuttavia Holper et al., (2009), hanno evidenziato che non è ancora noto se il segnale NIRS possa anche rilevare i cambiamenti in risposta alla crescente complessità del compito.

Infine, Abdelnour et al., (2009), ha proposto un metodo di analisi dell'attività cerebrale in tempo reale, utilizzando un filtro di Kalman adattivo ed un modello spaziale basato sul modello lineare generale (GLM) canonico.

Nonostante ciò, l'integrazione reale dei segnali NIRS ed EEG è ancora tutta da investigare. Tra i pochissimi lavori effettuati su tale argomento spicca quello di Nasi et al., (2010), che hanno valutato l'interazione di risposte emodinamiche visive evento evocate (HRDS) misurate con la NIRS e l'attività neuronale nei soggetti analizzata con potenziali evocati visivi (VEPs); i risultati mostrano una parziale relazione lineare per i primi secondi di stimolazione.

Le tecniche tradizionali di imaging funzionale di medicina nucleare, ovvero PET e SPECT, pur permettendo la misura diretta dell'ossigenazione, implicano una limitata ripetibilità delle misure in tempi brevi sullo stesso individuo, una limitata risoluzione temporale ed un'elevata invasività dovuta all'utilizzo di traccianti radioattivi. La fMRI permette, invece, di rilevare le variazioni di concentrazione della deossiemoglobina, per gli effetti che questa induce sul campo magnetico applicato, attraverso la valutazione del segnale BOLD e di valutare il flusso sanguigno (Ye et al., 2008); nonostante ciò, la misura di emoglobina è relativa e non fornisce alcuna valutazione sulla HbO, pertanto la stima dell'ossigenazione richiede delle ipotesi a priori tra le variazioni del flusso e del volume totale di sangue per poter essere calcolata.

In tale panorama si inserisce la tecnica NIRS: con una distanza interfibra appropriata, i fotoni possono penetrare all'interno del cranio ed arrivare alla superficie dell'encefalo, rilevando quindi variazioni di assorbimento determinate da HbR e HbO ed i parametri ad esse correlate quali ossigenazione e volume totale di sangue. Inoltre, operando con diversi

punti sorgente e detezione, è possibile costruire una topografia della zona di interesse con una discreta risoluzione spaziale (questa modalità di misura è indicata come DOT, Diffuse Optical Topography).

Ognuna delle tecniche precedentemente descritte ha i propri vantaggi e svantaggi; in particolare, i metodi elettrofisiologici hanno una risoluzione spaziale limitata e una buona risoluzione temporale, al contrario di quelli emodinamici che, inoltre, rilevano l'attività neuronale sulla base di un'analisi di una funzione di accoppiamento con un meccanismo vascolare complesso e solo parzialmente compreso.

Proprio in virtù delle diverse caratteristiche possedute dalle tecniche attualmente utilizzate per l'analisi dell'attività cerebrale, è ragionevole ritenere che l'utilizzo combinato di due o più di esse possa fornire delle informazioni complementari, quindi un valore aggiunto, in termini di contributo informativo, rispetto all'utilizzo di una sola di esse. Ciò è vero soprattutto qualora si decida di combinare l'uso di tecniche appartenenti alle due diverse categorie che sfruttano dei diversi principi di funzionamento, cogliendo diversi ma complementari aspetti dell'attività cerebrale, contribuendo alla conoscenza dei fenomeni alla base del sopra menzionato accoppiamento neurovascolare. Per questo motivo, oggi più che mai, in ambito neuroscientifico, va affermandosi il paradigma dell'approccio multimodale secondo il quale le diverse tecniche possono essere usate simultaneamente oppure in sessioni di test ripetute, compatibilmente con la loro facilità di utilizzo e disponibilità.

In questo lavoro di tesi si è utilizzato un approccio multimodale, effettuando delle rilevazioni simultanee di EEG, EMG e NIRS, durante una stimolazione motoria di handgrip per individuare cambiamenti fisiologici nelle aree motorie attivate. Pertanto, si introducono principalmente elementi innovativi rispetto allo stato dell'arte precedentemente menzionato: l'indagine sugli effetti di modulazione del segnale emodinamico prodotto da uno stimolo motorio di handgrip vengono combinati con i ritmi preponderanti dell'EEG ( $\alpha$  e  $\beta$ ), per mettere in luce se una particolare frequenza di spike è causa della regolazione emodinamica locale. Infatti, mediante tale approccio multimodale è possibile valutare diversi tipi di risposta, quella elettrica neuronale, quella autonoma e quella emodinamica, che, sebbene caratterizzate da diverse dinamiche temporali, sono rappresentative del medesimo fenomeno alla base del processo funzionale.

**1.3 - PROGETTO nEUROPt ("Non-invasive imaging of brain function and disease by pulsed near infrared light")**

Questo elaborato si inserisce in un contesto più ampio riguardante un progetto finanziato dall'unione europea a scopo di ricerca sull'avanzamento tecnologico, lo sviluppo e la validazione clinica di metodologie avanzate di ottica non invasive in vivo per la diagnosi, il monitoraggio e la prognosi delle principali malattie neurologiche (ictus, epilessia, ischemia), sulla base di imaging con luce pulsata nel vicino infrarosso (figura 7).

Il progetto ha riunito diciassette partecipanti provenienti da Regno Unito, Germania, Polonia e Italia; ciascuna nazione si serve di organizzazioni operanti nell'ambito tecnologico, clinico ed industriale.



**Figura 7. Progetto nEUROPt.**

I punti chiave di questo progetto europeo sono:

- la ricerca di nuove strategie nel dominio del tempo di imaging ottico nel cervello
- lo sviluppo e sperimentazione di nuovi dispositivi fotonici con relative modellizzazioni
- la creazione di una strumentazione clinica condivisa tra i partner, risultante dall'ottimizzazione delle singole tecnologie presenti nei laboratori
- la stesura e realizzazione di un protocollo condiviso su phantom e in vivo per testare la validità della macchina con prove motorie di handgrip e visive di reverse check board

- la validazione clinica in neurologia così suddivisa:
  - Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta: studi su soggetti con epilessia fotosensibile e di Unverricht-Lundborg
  - Charité Universitätsmedizin: studi su soggetti con stroke ischemico (ipossia) ed emorragico
  - La Facoltà di Medicina dell'Università di Varsavia (Dipartimento di Anestesiologia e Rianimazione, Unità di Cura Intensiva: studi su soggetti con trauma cranico in fase acuta
  - University College London (Istituto della salute delle donne, Dipartimento di Pediatria): studi su neonati prematuri

mentre l'ultimo laboratorio utilizza una macchina che effettua misure in trasmittanza (Monstir 2) fornendo un'immagine tomografica, gli altri tre utilizzano misure in riflettanza fornendo quindi un'immagine NIRS topografica.

Per l'Italia le unità coinvolte sono il Politecnico di Milano (Dipartimento di Fisica e di Bioingegneria), che si occupa della progettazione e costruzione dell'apparecchiatura e dell'elaborazione del segnale, l'Università di Firenze che si occupa della costruzione di un modello per l'estrazione dei parametri di ossi/deossiemoglobina su phantom, ottenuti da nanoconi di carbonio che creano le proprietà ottiche per testare la metodica, Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta, che si occupa della validazione clinica ed uno spin-off industriale (Micro Photon Devices S.r.l.).

# Capitolo 2

## Materiali e metodi

- hardware
- software
- protocollo sperimentale
- soggetti

## 2.1 – HARDWARE

### 2.1.1 – ACQUISIZIONE SEGNALE NIRS

Per le acquisizioni effettuate in questo studio è stato utilizzato un sistema Time Resolved NIRS (NIRS-TR), ovvero risolto nel tempo, progettato e costruito dal Dipartimento di Fisica del Politecnico di Milano; tale apparecchiatura è basata su impulsi laser a semiconduttore (AlGaAs, Arsenio di Gallio e Alluminio), su un iniettore ottico che amplifica le sorgenti e su catene indipendenti di detezione per ogni sorgente, basate sulla correlazione temporale del conteggio di un singolo fotone, per un totale di trentadue detettori; ogni coppia sorgente-detettore è chiamata canale. Questo sistema è solo una parte di un apparato più complesso in cui lo strumento NIRS sincronizza e controlla tutti i set-up sperimentali: un personal computer (PC) per la sincronizzazione della stimolazione inviata e un altro per un'acquisizione on-line ed un'analisi del biosegnale. Infatti, ogni detettore registra la luce in arrivo da un sottogruppo di sorgenti vicine e per identificarle vengono illuminate sequenzialmente, in questo modo, il campionamento può raggiungere un range di diversi Hz, tipicamente tra 1 e 10, consentendo così la cattura della risposta emodinamica nel tempo (figura 8).

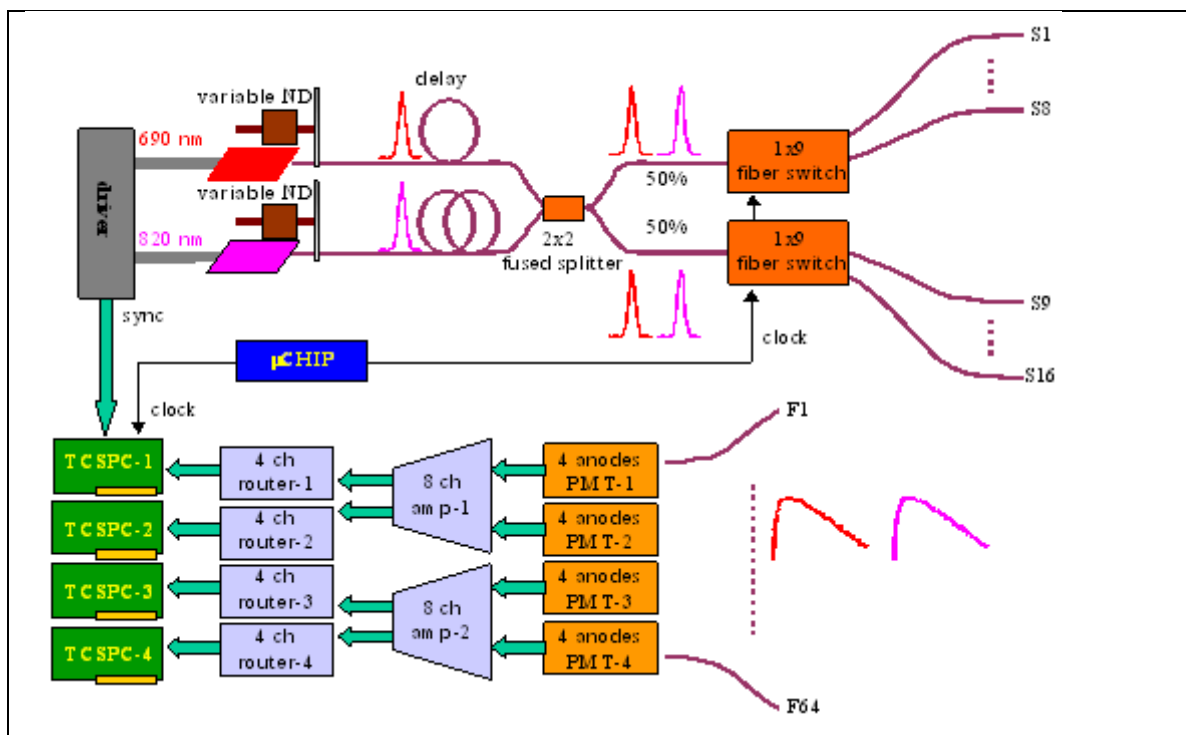


Figura 8. Schema della strumentazione NIRS-TR.

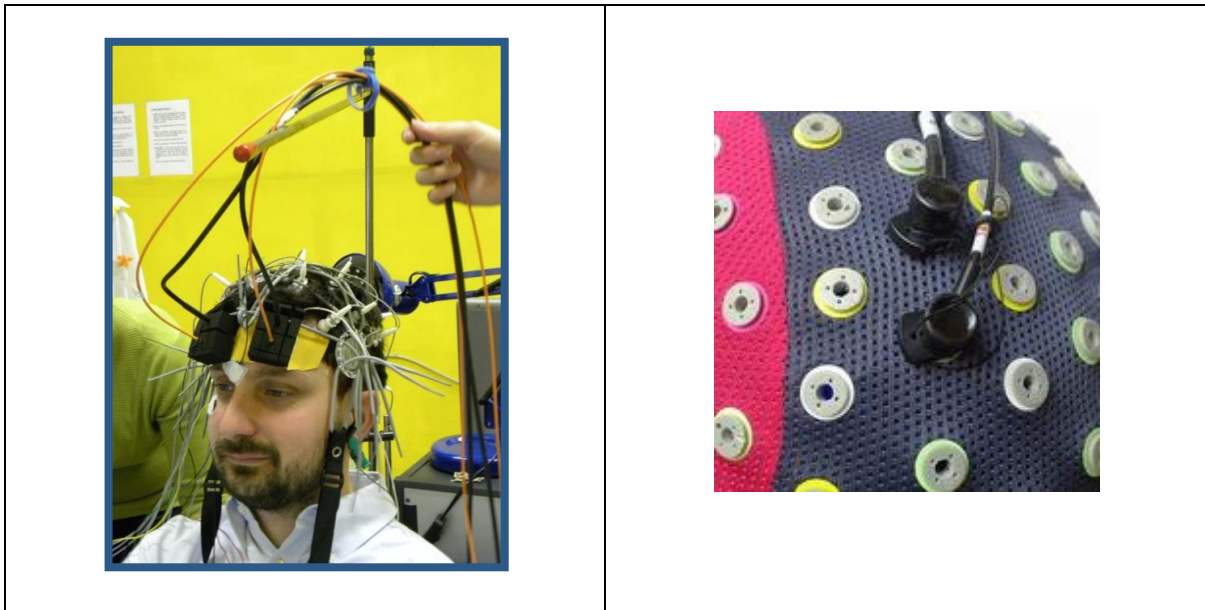
La sorgente luminosa è costituita da due laser a diodi pulsati, operanti alle frequenze di 690 nm e 820 nm, con 80 MHz di frequenza di ripetizione e 1 mW di potenza media (prodotti da PDL, Picoquant GmbH, Germany). Le testine dei laser sono state connesse a fibre ottiche con un indice di grado multimodale (50-125  $\mu\text{m}$ , tipo J54-082, prodotte da Edmund OptiK GmbH; Germany) da un attacco artigianale che causa un'attenuazione di densità variabile nel range di 0-80 dB ed un accoppiatore standard FC di fibre ottiche di diversa lunghezza. L'attenuazione è necessaria per equalizzare il segnale delle due lunghezze d'onda durante la misurazione e per evitare danni ai detettori durante l'acquisizione della risposta del sistema. Prima di penetrare il tessuto gli impulsi attraversano uno switch ottico 2x2 (splitter di fibre ottiche, prodotto da VISNIR5050, OZ Optics, Canada) che consente di inviare l'impulso di luce laser alle diverse lunghezze d'onda indipendentemente nei due canali. Lo switch viene invertito ogni 500 ms, pertanto è possibile inviare le due lunghezze d'onda nei due diversi emisferi ogni secondo (campionamento segnale NIRS a 1 Hz). In ciascun canale, un interruttore 1x16 di fibre ottiche (F-SM19, PiezoJena GmbH, Germany) crea sedici sorgenti indipendenti o punti di iniezione, quindi trentadue sorgenti disponibili totali. L'acquisizione dei fotoni dopo l'attraversamento del mezzo diffusivo avviene tramite quattro catene di detezione in parallelo TCSPC (Time Correlating Single Photon Counting) generando una curva di riflettenza del tessuto. L'uso del parallelo e le linee di acquisizione permettono una gestione indipendente dei detettori. Per catturare la luce uscente dal tessuto biologico si sono utilizzate fibre ottiche, accorpate in un unico fascio lungo 1,5 m (Loptek GmbH, Germany).

Il sistema è controllato da un personal computer (Pentium IV 3.5 GHz, 2 Gb RAM), che gestisce i comandi di acquisizione e consente il salvataggio e la memoria dei dati, attraverso specifiche funzioni personalizzate in linguaggio C per il controllo degli strumenti. L'unità di micro-controllore (dsPIC30F6014, Microchip Technology Inc., AZ) è usata per il controllo dell'hardware della strumentazione e per generare dei segnali di trigger per la sincronizzazione dell'acquisizione dei dati dai detettori e per la sequenza di attivazione delle sorgenti.

Il sistema è poi fornito di due probe realizzati per posizionare le fibre ottiche su un cuscinetto di materiale flessibile (neoprene) che preserva la loro posizione per tutto il tempo dell'acquisizione, così da ottimizzare l'iniezione della luce; i sensori sono anch'essi inseriti nel cuscinetto per favorire l'accoppiamento ottico. Le fibre, posizionate sopra lo



scalpo, sono state accuratamente progettate per poter registrare su qualsiasi paziente, in modo tale da rispettare specifici requisiti di ogni protocollo di acquisizione. Negli esperimenti effettuati l'obiettivo era quello di monitorare sia la corteccia occipitale che l'area motoria, perciò la geometria della sonda è stata modificata adeguatamente (figura 9). In ogni caso, due sonde sono state usate per i due emisferi cerebrali. Come regola generale, le fibre di iniezione sono state circondate da quattro o più detettori ad una distanza di 2,5 cm.



**Figura 9. A sinistra i NIRS probe durante una registrazione combinata dei segnali NIRS-EEG; a destra un ingrandimento delle sonde.**

Ogni sostanza è in grado di assorbire radiazioni elettromagnetiche; pertanto sfruttando lo spettro di assorbimento dei fotoni si è in grado di determinarne la concentrazione. Si può estendere questa proprietà anche alle soluzioni (insieme di due o più sostanze) grazie alla legge di Lambert-Beer (figura 10): una relazione empirica che correla la variazione di intensità della radiazione irraggiante una soluzione (e quindi l'intensità di radiazione/luce assorbita da essa) alle sue caratteristiche, quali la natura chimica del soluto, la sua concentrazione molare e lo spessore del mezzo attraversato (cammino ottico), basandosi sul fatto che strati infinitesimi di campione irraggiato assorbano la stessa quantità (infinitesimale) di radiazione.

$$dI = -\mu_a I dl$$

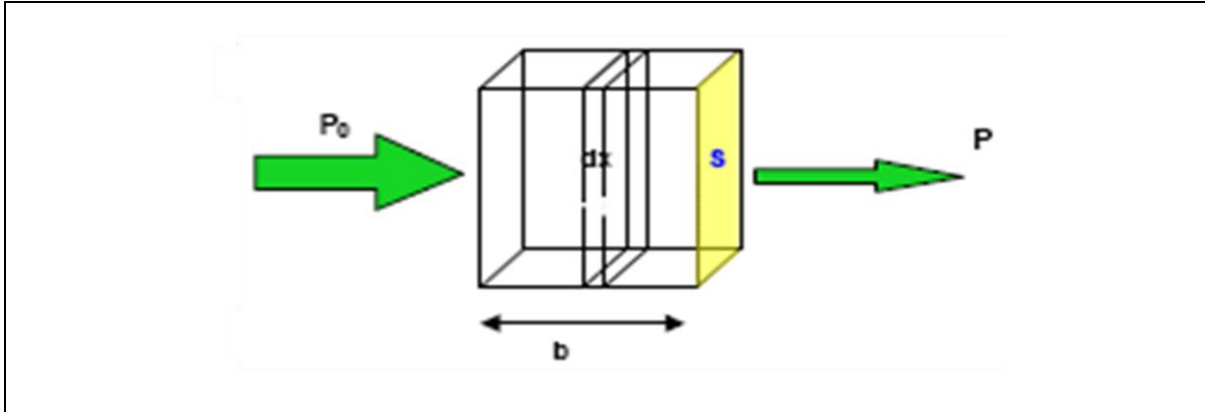


Figura 10. Rappresentazione grafica della legge di Lambert-Beer;  $P$  e  $P_0$  sono le intensità di luce uscente ed entrante rispettivamente dal campione,  $s$  la superficie ortogonale alla direzione di propagazione dei fotoni e  $b$  lunghezza del campione da attraversare.

Integrando quindi tale equazione si ottiene:

$$\int_{I_0}^{I_1} \frac{dI}{I} = \mu_a \int_0^l dl$$

e dunque svolgendo l'integrale:

$$\ln \frac{I_1}{I_0} = \mu_a l \Rightarrow I_1 = I_0 e^{-\mu_a l}$$

con  $\mu_a$  coefficiente di assorbimento, costante tipica del mezzo.

Introducendo il concetto di assorbanza ( $A$ ), o densità ottica, si misura la radiazione assorbita dalla soluzione in funzione della sua concentrazione molare; perciò:

$$A = c\epsilon l = \ln \frac{I_0}{I_1}$$

dove  $\epsilon$  rappresenta il coefficiente di estinzione molare e  $c$  la concentrazione del soluto; dalla formula precedente si ricava il valore del coefficiente di assorbimento come:

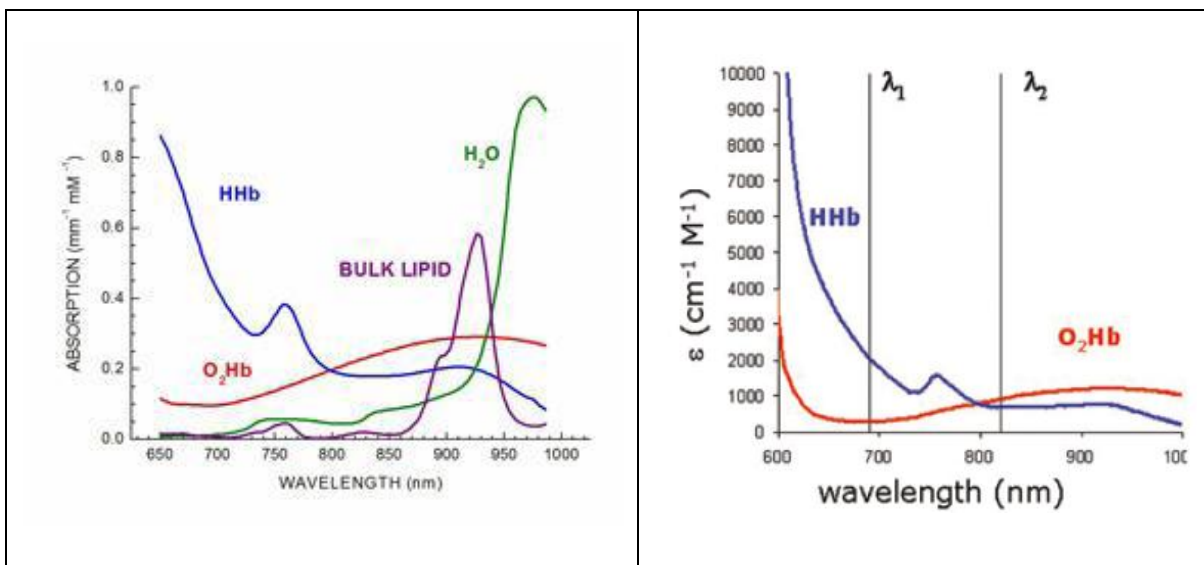
$$\mu_a = c\epsilon$$

Se il soluto è composto da  $n$  cromofori, come nel sangue, allora per distinguere ciascun contributo si può applicare la legge di sovrapposizione degli effetti, considerando il coefficiente di assorbimento come grandezza additiva e, valutandolo a  $n$  lunghezze d'onda, si risolve il sistema lineare di  $n$  equazioni in  $n$  incognite:

$$\mu_a(\lambda) = c_1\varepsilon_1(\lambda) + c_2\varepsilon_2(\lambda) + \dots + c_n\varepsilon_n(\lambda)$$

$$\mu_a(\lambda) = c\varepsilon(\lambda)$$

Nei tessuti biologici, si riscontra che nell'intervallo di lunghezze d'onda del vicino infrarosso utilizzate per la diagnostica (600nm-900nm) l'assorbimento totale è dovuto al contributo di due soli cromofori: ossiemoglobina (HbO) e deossiemoglobina (HbR), in quanto il contributo di assorbimento di radiazione da parte di lipidi ed acqua può essere trascurato (figura 11).



**Figura 11.** A sinistra sono rappresentati gli spettri di assorbimento nel vicino infrarosso delle principali sostanze biologiche, mentre a destra sono rappresentati gli spettri di assorbimento dell'emoglobina ossigenata e deossigenata, evidenziando le lunghezze d'onda usate per calcolarne le rispettive concentrazioni (Bari e Calcagnile, 2007).

Per distinguere dunque le concentrazioni dei due cromofori occorre misurare il coefficiente di assorbimento a due lunghezze d'onda differenti (che risultano essere 690 nm per HbR e 820 per HbO.)

Le concentrazioni misurate saranno quindi pari a:

$$c_{HbO} = \frac{\mu_a(\lambda_1)\varepsilon_{HbO}(\lambda_2) - \mu_a(\lambda_2)\varepsilon_{HbO}(\lambda_1)}{\varepsilon_{HbO}(\lambda_1)\varepsilon_{HbR}(\lambda_2) - \varepsilon_{HbO}(\lambda_2)\varepsilon_{HbR}(\lambda_1)}$$

$$c_{HbR} = \frac{\mu_a(\lambda_2)\varepsilon_{HbR}(\lambda_1) - \mu_a(\lambda_1)\varepsilon_{HbR}(\lambda_2)}{\varepsilon_{HbO}(\lambda_1)\varepsilon_{HbR}(\lambda_2) - \varepsilon_{HbO}(\lambda_2)\varepsilon_{HbR}(\lambda_1)}$$

da cui è possibile anche ricavare la concentrazione totale di emoglobina (HbT):

$$c_{HbT} = c_{HbO} + c_{HbR}$$

Le formule finora considerate non tengono però conto anche del fenomeno della diffusione che attenua anch'esso la luce all'interno dei tessuti biologici, come già riscontrato da Jöbsis (Jöbsis, 1977); conseguenza di questo fatto è un aumento di probabilità di assorbimento della radiazione durante il suo percorso con una riduzione nel conteggio di uscita (figura 12).

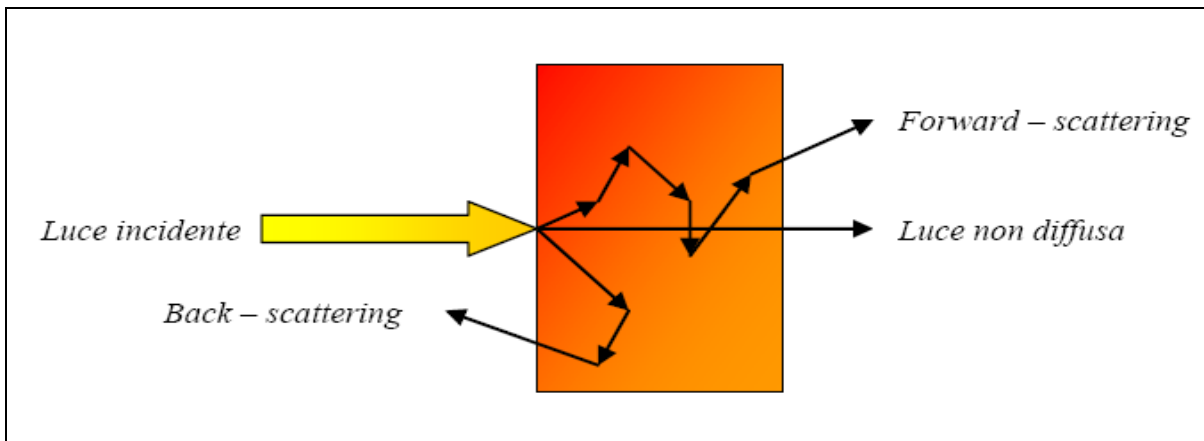


Figura 12. Comportamento del fotone all'interfaccia con tessuti biologici.

Per questo motivo è opportuno introdurre dei fattori di correzione:

- un coefficiente di correzione della diffusione ( $\mu_s$ , scattering, nella pratica sostituito con il coefficiente di diffusione ridotto  $\mu'_s$  che tiene conto della diffusione anisotropa nei tessuti)
- un coefficiente per la correzione della distanza sorgente-rivelatore dovuta sempre agli effetti di scattering (DPF)
- un coefficiente che tenga conto della perdita di intensità del segnale, ovvero di fotoni ( $G(\lambda)$ )

ottenendo quindi la legge di Lambert-Beer modificata:

$$I_1 = I_0 e^{-(\mu_a + \mu'_s)l * DPF + G}$$

dove  $DPF$  è tabulato e  $G$  è ritenuto costante poiché le variazioni di ossigenazione del flusso sanguigno sono principalmente dovute a fenomeni di assorbimento piuttosto che di scattering (Perrey, 2008).

Per la valutazione della risposta cerebrovascolare sono disponibili principalmente tre tipologie di strumentazione NIRS (figura 13):

1. NIRS-CW (Continuos Wave): usa una sorgente ad onda continua di luce; con questa tecnica purtroppo non è possibile stimare il disaccoppiamento dell'attenuazione tra assorbimento e scattering, consentendo di valutare solamente le variazioni relative di concentrazioni di HbO e HbR ma non i loro valori assoluti.
2. NIRS-FD (Frequency Domain): usa un fascio di luce modulata in ampiezza ottenendo in uscita uno sfasamento correlato al tempo di permanenza del mezzo; in questo caso è quindi possibile stimare DPF,  $\mu_a$  e  $\mu_s$ .
3. NIRS-TR (Time Resolved): usa impulsi di luce della durata di ps, al fine di misurare la distribuzione temporale dei fotoni in uscita detta TPSF (Temporal Point Spread Function); essa è vista come la risposta all'impulso del tessuto convoluta con quella del sistema di misura. La forma ed il ritardo temporale rispetto al riferimento riflettono le proprietà ottiche del tessuto analizzato. Anche in questo caso è possibile ricavare  $\mu_a$  e  $\mu_s$  effettuando misure a più lunghezze d'onda ed interpolando i dati della TSPF con un modello teorico della migrazione di fotoni nei tessuti.

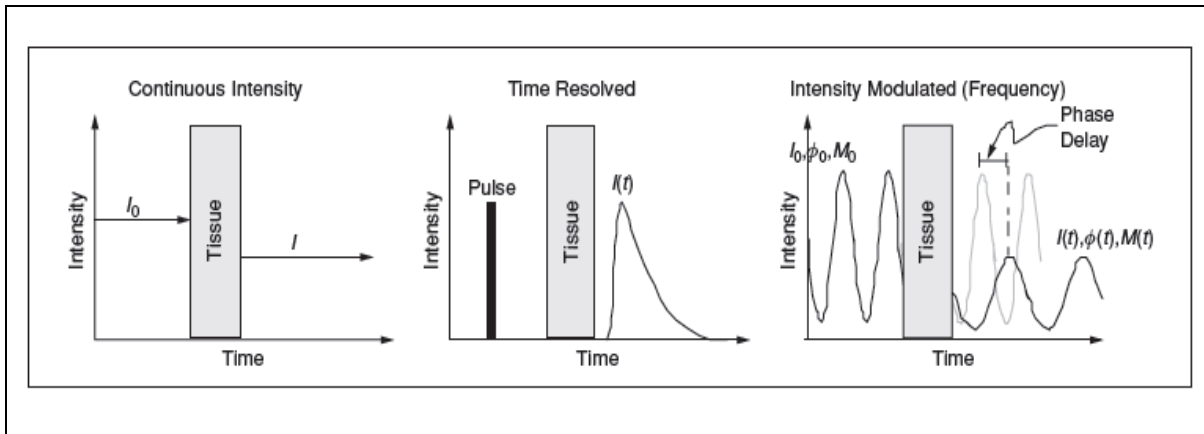
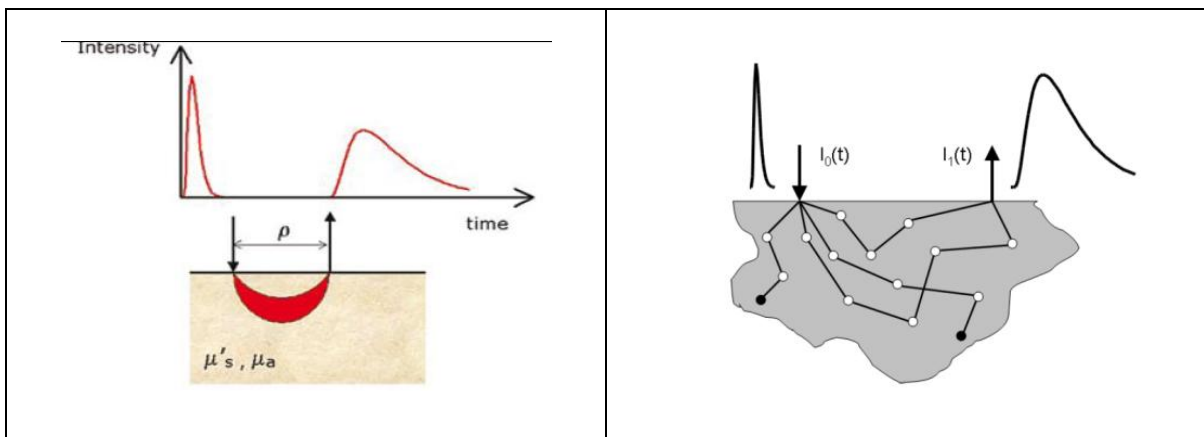


Figura13. Tecniche di acquisizione segnale NIRS (Nishimura et al., 2007).

In generale mentre la tecnica in continua viene utilizzata per il monitoraggio clinico, grazie anche alla sua relativa semplicità di fabbricazione e d'impiego, e grazie anche al basso costo, le tecniche risolte nel tempo o in frequenza consentono la discriminazione dei coefficienti di assorbimento e di diffusione ed un aumento di profondità di penetrazione e di risoluzione temporale, a discapito di un maggior costo.

Le tecniche NIRS infine prevedono la possibilità di fare misure in trasmittanza o misure in riflettenza. Le prime fanno uso di una fibra di raccolta dei fotoni collocata in posizione opposta rispetto alla fibra sorgente misurando il contributo del forward scattering, le seconde invece, si servono di una fibra di raccolta collocata dalla stessa parte della fibra di lancio misurando il contributo del back scattering (figura 14).

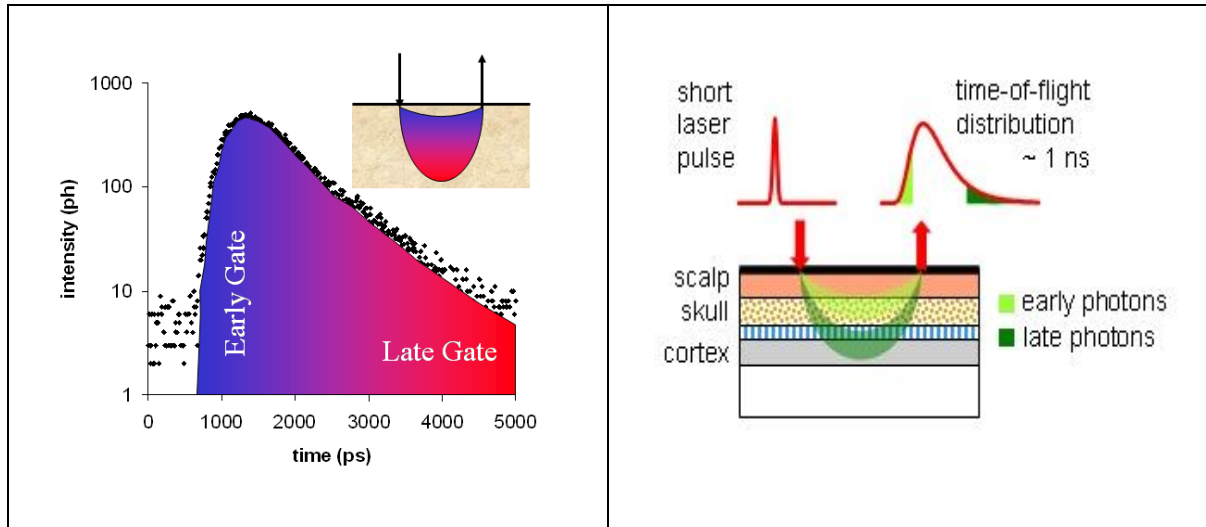
Nel nostro studio con l'apparecchiatura NIRS-TR sono state eseguite delle misure di riflettenza risolta nel tempo per ogni lunghezza d'onda  $\lambda$  ( $R(t;\lambda)$ ) per ottenere la stima dei parametri  $\mu_a$  e  $\mu'_s$ .



**Figura14. Entrambe le figure mostrano il percorso del fotone nel tessuto biologico ed il grafico di invio e ricezione dell'intensità di tale fotone per acquisire la misurazione NIRS-TR.**

L'algoritmo utilizzato prevede il calcolo della curva teorica tramite convoluzione della risposta del sistema (IRF, Instrument Response Function, con una FWHM di circa 500 ps; una descrizione dettagliata del sistema è riportata in Contini et al., (2006), con la curva di riflettenza teorica per la geometria di interesse, l'interpolazione delle curve sperimentali di baseline (riposo) con la curva teorica minimizzando lo scarto quadratico medio tra le due (attraverso il metodo dei minimi quadrati) per ricavare  $\mu_a$  e  $\mu'_s$  di baseline ed infine la valutazione della variazione dei due parametri con il metodo Time-Gated. Esso si basa sul fatto che le informazioni di profondità nel dominio del tempo sono codificate nel tempo di volo dei fotoni (Selb et al., 2005; Del Bianco et al., 2002): infatti, inizialmente i fotoni attraversano gli strati superficiali della testa, mentre successivamente, se non assorbiti, hanno un'alta probabilità di visitare anche gli strati profondi; per cui in base al tempo di detezione, i fotoni con tempi maggiori (Late Photons) portano informazioni sia di superficie che di profondità, mentre quelli rilevati in tempi più brevi (Early Photons) hanno

probabilità molto bassa di aver raggiunto anche gli strati più profondi, pertanto portano informazione solo degli strati superficiali (figura 15).



**Figura15. Entrambe le figure mostrano la risposta all'impulso dell'apparecchiatura NIRS-TR: gli early photons hanno attraversato gli strati più superficiali, mentre i late photons molto probabilmente sono giunti nella corteccia cerebrale.**

Questa osservazione fa sì che per l'estrazione dei valori di concentrazione di emoglobina in profondità e in superficie si utilizzi questo modello: a bassi gate temporali sono rilevati gli early photons, mentre per gate maggiori sono rilevati i late photons; sottraendo dal valore dei late (informazione superficiale e profonda) il valore degli early (informazione superficiale) si isola il contributo degli strati più profondi (Nomura et al., 1997).

In particolare, è possibile stimare il valore di  $\Delta\mu_a(\lambda)$  come:

$$\Delta\mu_a(\lambda, t) = -\frac{1}{vt} \ln\left(\frac{R(t, \lambda)}{R_0(t, \lambda)}\right)$$

dove  $v$  è la velocità della luce nel mezzo,  $t$  è il tempo di arrivo dei fotoni, e  $R(t, \lambda)$  è la curva di riflettanza nel dominio del tempo (TTR, Time Resolved Reflectance) ottenuta durante le registrazioni (figura 16).

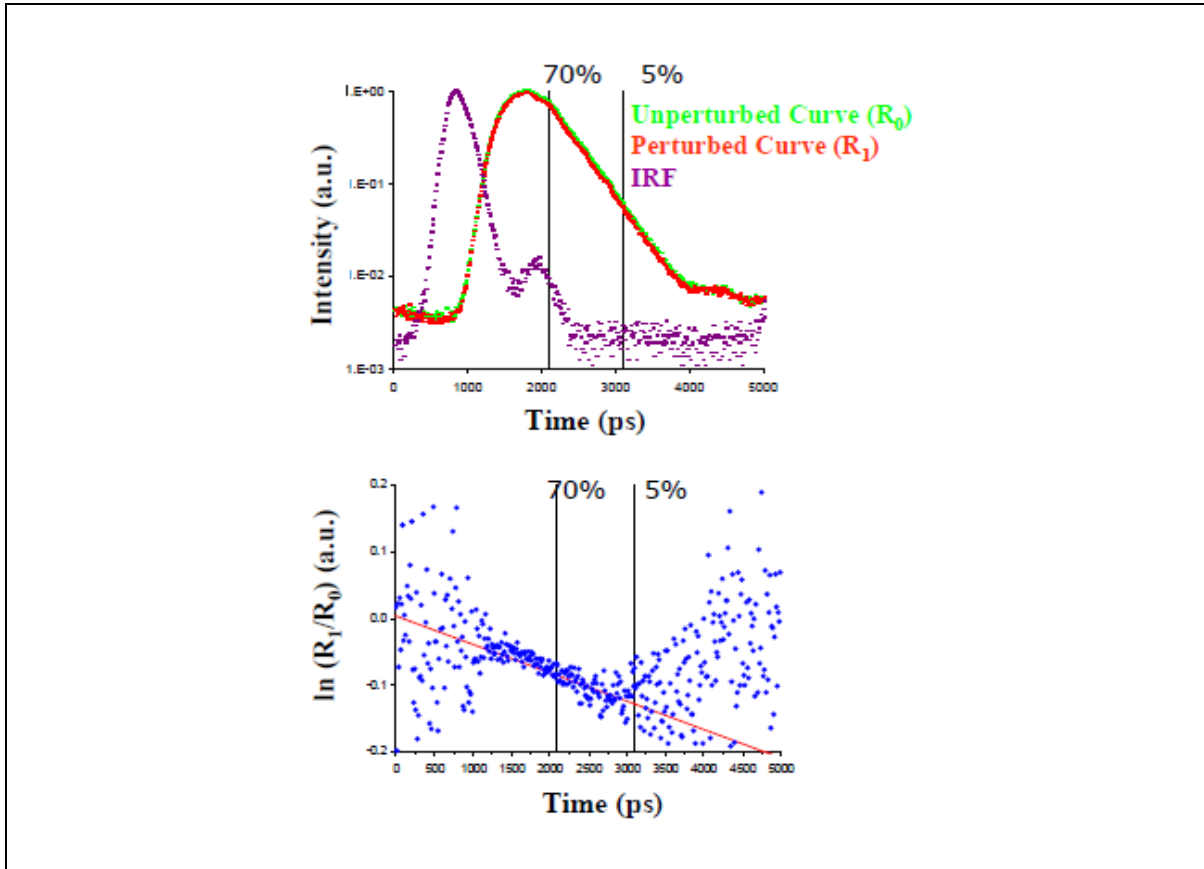


Figura 16. In alto un esempio di curva di riflettenza ottenuta dalla Lambert-Beer modificata. In verde ed in rosso, rispettivamente, TRR non perturbata e perturbata. In basso è mostrato il regressore lineare per la stima della variazione del coefficiente di assorbimento.

Conseguentemente il coefficiente di assorbimento finale è dato da:

$$\mu_a(\lambda, t) = \mu_{a0}(\lambda) + \Delta\mu_a(\lambda, t)$$

Per potenziare i contributi degli strati più profondi e per rimuovere il più possibile i disturbi causati dagli strati di superficie è stato applicato un metodo di correzione basato sull'uso di una finestra temporale di ritardo ( $t = 1750-2500$  ps) (Contini et al., 2006). Infine il sistema è anche interfacciato con un software specifico (Presentation, Neurobehavioral Systems Inc, Albany, CA) per l'invio degli stimoli con alta risoluzione temporale e per la sincronizzazione del restante hardware tramite il micro-controllore.

### 2.1.2 – ACQUISIZIONE SEGNALE EEG ED EMG

Contemporaneamente alla registrazione del segnale NIRS i soggetti sono stati sottoposti ad elettroencefalogramma (EEG). Tutte le registrazioni sono state effettuate con un



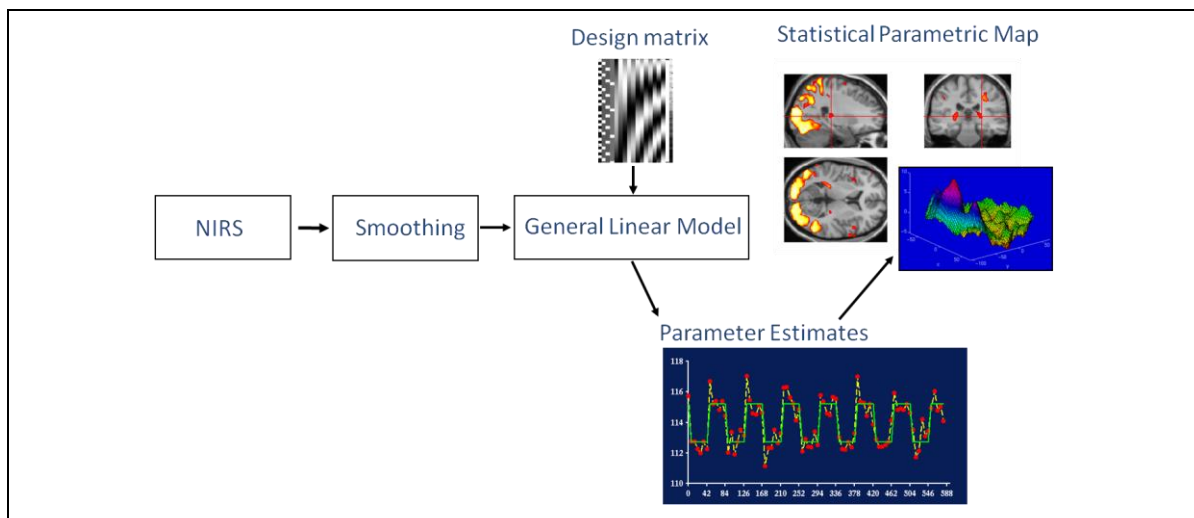


## 2.2 – SOFTWARE

### 2.2.1 – ACQUISIZIONE SEGNALE NIRS

Il software utilizzato per l'elaborazione del segnale emodinamico cerebrale è SPM (Statistical Parametric Mapping, toolbox di MATLAB, versione 5.0). A prescindere dalla tecnologia di acquisizione utilizzata per l'analisi, tale software prevede la costruzione di una mappa dell'area sottoposta ad indagine che viene rappresentata sotto forma di voxel (esso rappresenta l'attività di una determinata coordinata nello spazio tridimensionale); l'esatta dimensione di un voxel varia in base alla tecnologia di imaging diagnostico utilizzata e per ciascuno di essi viene misurato l'effetto del parametro di interesse (regressore), attraverso un test statistico su una o più ipotesi (contrasto) per fare inferenza (p-value), calcolata con il modello lineare generalizzato (approccio univariato).

Tuttavia, in generale, prima di eseguire qualsiasi inferenza statistica è necessario pre-processare il segnale (figura 19). Inoltre, per effettuare una validazione statistica nei protocolli di studio di neuroimaging funzionale occorrono diversi soggetti (accomunati dalla stessa malattia o dal fatto di essere certificati come "soggetti di controllo" normali), che avranno sempre qualche lieve differenza nella forma e organizzazione del cervello: avranno tutti la stessa anatomia complessiva, ma vi saranno alcune differenze minori nella dimensione dell'encefalo, variazioni individuali nella topografia delle circonvoluzioni e dei solchi della corteccia cerebrale, e differenze morfologiche in strutture profonde come il corpo calloso.



**Figura 1910.** Schema a blocchi del funzionamento di NIRS-SPM.

In generale si è interessati a valutare la dinamica dell'attività cerebrale sia da un punto di vista elettrico che metabolico, correlata o meno con processi psicologici specifici. Tipicamente un approccio sperimentale riguarda la questione di quali aree del cervello sono significativamente attivate quando una persona esegue un determinato compito piuttosto che un altro; tuttavia, anche se si ipotizzasse di riuscire a progettare un compito che viene ripetuto uguale a se stesso, si riscontrerebbero comunque cambiamenti nell'attivazione a causa di fattori paralleli coordinati anch'essi dal cervello ma non strettamente correlati al compito sperimentale; inoltre, il segnale contiene una certa quantità di rumore introdotto dalle caratteristiche intrinseche del processo di imaging. Per aggiustare questi effetti sistematici e per evidenziare solo le aree connesse al compito SPM impiega quindi il metodo statistico del modello lineare generale (GLM).

Questa statistica di tipo parametrico è un'estensione dei modelli lineari, il cui scopo è quello di studiare la relazione che intercorre tra le variabili caratterizzanti un fenomeno. In particolare, si assume che una variabile risposta,  $Y$ , sia legata linearmente ad una o più variabili esplicative,  $X_1, \dots, X_k$ , con  $\beta_1, \dots, \beta_k$  coefficienti incogniti, rappresentanti i pesi delle rispettive variabili esplicative. Il valore osservato della variabile risposta è dunque:

$$Y = f(x_1, \dots, x_k) + \epsilon = \sum_{j=1}^k \beta_j x_j + \epsilon$$

in cui la sommatoria che rappresenta la combinazione lineare viene detta componente sistematica, mentre la parte restante è detta componente accidentale o di errore di natura casuale ( $\epsilon \sim N(0, \sigma^2)$ ). In presenza di  $n$  osservazioni della variabile risposta si può scrivere il sistema in forma compatta:

$$Y = X\beta + \epsilon$$

$$\begin{bmatrix} Y_1 \\ \vdots \\ Y_N \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} x_{11} & \dots & x_{1K} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ x_{N1} & \dots & x_{NK} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \beta_1 \\ \vdots \\ \beta_K \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} \epsilon_1 \\ \vdots \\ \epsilon_N \end{bmatrix}$$

dove  $X$  è detta matrice di regressione (design matrix, che rappresenta il modello dell'esperimento) e  $\beta$  sono i parametri di regressione.

L'estensione generalizzata del modello lineare consente di applicare questo metodo anche quando la relazione tra le variabili esplicative e la variabile risposta non sia di tipo lineare,

quando la distribuzione delle variabili risposta non sia normale ed inoltre è robusto rispetto ad imprecisioni sul coefficiente DPF, sulle attenuazioni dovute a scattering e sullo scarso contatto elettrodo scalpo.

I coefficienti che rappresentano il contributo della variabile esplicativa corrispondente vengono stimati con il metodo dei minimi quadrati:

$$\hat{\beta} = (X^T X)^{-1} X^T Y$$

da cui:

$$\hat{Y} = X \hat{\beta}$$

posso quindi stimare l'errore e la sua varianza come:

$$\varepsilon = Y - \hat{Y}$$

$$\sigma^2 = \varepsilon^T \varepsilon / d_f$$

con  $d_f$  gradi di libertà ( $d_f = N - \text{rank}(X)$ ).

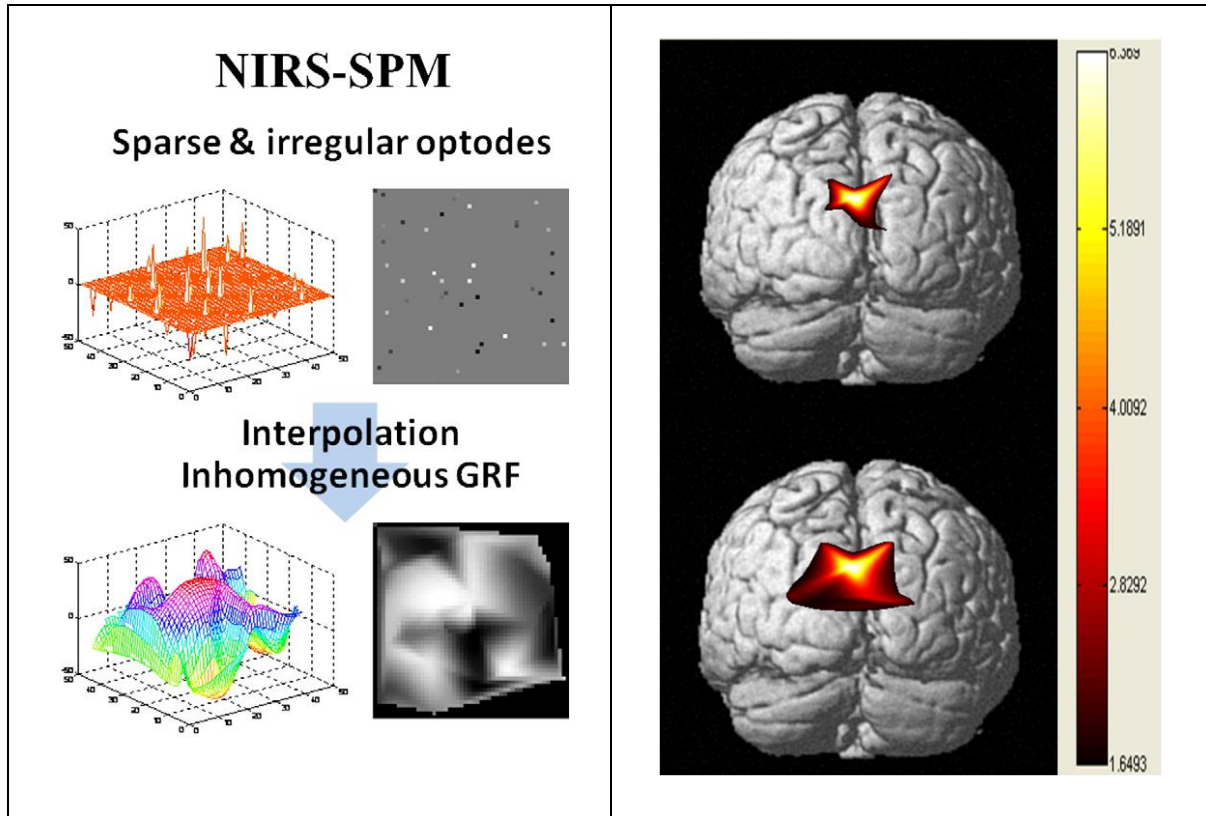
Uno specifico contrasto,  $c$ , è una combinazione lineare dei parametri stimati che permette di evidenziare specifici regressori, ottenendo quindi uno specifico segnale risposta, sul quale è possibile fare inferenza sotto l'ipotesi nulla ( $H_0$ ) che il segnale risposta sia distribuito come una gaussiana a media nulla:

$$H_0 = \hat{Y} \sim \mathcal{N}(0, \sigma^2)$$

$$\hat{Y} = c^T \hat{\beta}$$

Usando una statistica-t si calcola da tabulatura il p-value tale per cui l'ipotesi nulla viene abbandonata. Poiché è un'analisi da test multiplo occorre introdurre delle correzioni sul p-value per diminuire il numero di falsi positivi trovati; le correzioni più usate presuppongono però che i test siano indipendenti (p.e. Bonferroni), invece, ciò non accade per SPM che si basa anche sui voxel vicini; è possibile dunque utilizzare la teoria di campo gaussiano casuale che considera la mappatura come rappresentazione di un reticolo in un campo casuale continuo; dal segnale proveniente dagli optodi (detettori) sparsi nel campo esegue un'interpolazione (smooth) basandosi sulle derivate parziali, assumendo che essi

siano multivariati normali e che lo smooth introdotto sia più grande della dimensione di un voxel ( $FWHM > 3\sigma$  voxel); questo tool tuttavia usa una variante della teoria detta Sun's tube formula (figura 20, Henson).



**Figura 20.** A sinistra è mostrata l'interpolazione secondo la teoria di campo gaussiano casuale, mentre a destra sono mostrate immagini di inferenza statistica con la Tube formula (in alto) e senza (in basso).

È importante osservare che, se i regressori sono linearmente dipendenti, la stima dei coefficienti non può essere fatta perché la design matrix risulterebbe singolare, ottenendo una stima non univoca; se invece, hanno alta correlazione la stima è fattibile ma può risultare inefficiente (molto variabile); occorre allora ortogonalizzare i regressori o meglio sceglierli non correlati (quindi con grande variabilità tra essi), in modo da rendere la stima il più efficiente possibile; ciò nonostante, spesso nella pratica clinica e di ricerca risulta inevitabile sceglierli relazionati tra loro, facendo dunque un compromesso tra informazione ricercata e variazione su tale informazione.

In questo studio la variabile risposta che si vuole stimare è la variazione di concentrazione di emoglobina (divisa in HbO, HbR e HbT) in base ad uno stimolo motorio di handgrip; i dati sono stati forniti dal Dipartimento di Fisica del Politecnico di Milano.

Per ogni soggetto analizzato sono stati resi disponibili tre file .mat (uno per ciascuna prova di handgrip e precisamente mano destra, mano sinistra e mano destra e sinistra) contenenti i valori delle variazioni di concentrazione micromolare per ogni canale rilevato (trenta canali in tutto), campionati nel tempo ad 1 Hz per un totale di 490 campioni, quindi la durata complessiva della prova è di 490 secondi, registrata in contemporanea con l'EEG.

Inizialmente, per ciascun file ne è stato generato un altro contenente non i valori assoluti delle concentrazioni ma la variazione di tali valori nel tempo ottenuta sottraendo il valore iniziale a tutti gli altri; successivamente sono stati generati tre file SPM rispettivamente per l'ossiemoglobina, la deossiemoglobina e l'emoglobina totale per ogni singolo file di prova motoria (per un totale di nove file per ogni soggetto); attraverso l'interfaccia del toolbox è stato applicato un filtraggio per eliminare il rumore con la metodica wavelet-MDL lasciando il numero di trials di default (4) e con un filtro passa-basso di tipo hrf; una volta ottenuto il file SPM si è scelta la desing matrix corrispondente alla specifica informazione ricercata e si sono stimati i parametri del GLM con il comando Estimate del toolbox; infine l'inferenza è stata ottenuta con il comando Result NIRS attraverso un'immagine cerebrale che mette in evidenza le aree interessate dall'ossigenazione, disponibile da più angolazioni e con la possibilità di utilizzare o meno la restrizione sul p-value, quindi sull'area evidenziata.

### 2.2.2 – ELABORAZIONE SEGNALI EEG ED EMG

Il software per l'elaborazione del segnale elettrico cerebrale è EEGLAB (toolbox di MATLAB, versione 6.03b). Per mezzo dell'analisi delle componenti indipendenti (ICA) si vuole separare un segnale multivariante nelle sue sotto componenti additive, assumendo che esista una mutua indipendenza statistica delle sorgenti non gaussiane del segnale (al più solo una può esserlo). Tale metodo, in virtù delle sue ipotesi, risulta applicabile al segnale EEG, infatti, l'idea che il segnale EEG possa originare da processi cerebrali temporalmente indipendenti, o quasi, è consistente con l'osservazione del fatto che la corteccia cerebrale è organizzata in differenti regioni caratterizzate da funzioni specifiche. Entrando nel dettaglio, si osserva che la connettività delle cellule piramidali è limitata da connessioni intra-colonnari che hanno luogo principalmente tra cellule inibitorie. Tali connessioni inibitorie fanno sì che la densità delle connessioni corticali di lungo raggio sia

molto inferiore rispetto a quelle di corto raggio. Pertanto, un'ipotesi di lavoro neurobiologicamente plausibile per l'EEG è che attività sincrone localizzate sulla scala dei centimetri di corteccia siano temporalmente indipendenti tra loro e agiscano come delle sorgenti indipendenti di attività EEG (Onton et al., 2006).

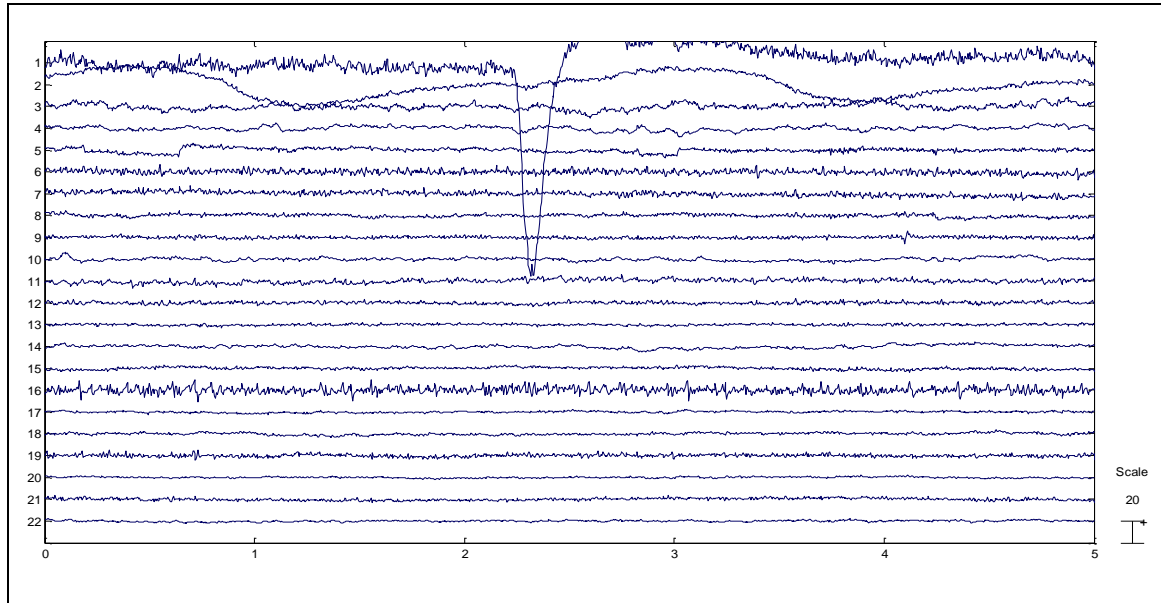
Il segnale EEG può quindi essere modellizzato come una combinazione lineare di attività generate da sorgenti multiple, cerebrali e non, con andamento indipendente dal punto di vista temporale.

L'analisi effettua una separazione 'cieca' dei dati, organizzati in una matrice ( $X$ ), facendo in modo che le sorgenti ( $U$ ) siano massimamente indipendenti attraverso l'attribuzione di una matrice pesi ( $W$ ):

$$U = WX + \epsilon$$

con  $\epsilon$  rumore casuale; l'ottenimento di sorgenti massimamente indipendenti è garantito da un'iterazione dell'algorithmo che minimizza una funzione di costo rappresentata solitamente dalla mutua informazione (basata sull'entropia, ovvero la dispersione dei dati nello spazio); l'algorithmo suppone che la posizione delle sorgenti sia stazionaria per tutta la durata del segnale, cioè assume che  $W$  sia fissa, mentre  $U$  vari conseguentemente al variare di  $X$ .

Questo metodo è sicuramente vantaggioso nella rimozione del rumore introdotto dagli artefatti oculari, separando quindi la componente EOG dal resto per poterla in un secondo momento eliminare; tuttavia, individua  $n$  sorgenti per  $n$  canali, mentre il numero di sorgenti reali potrebbe essere maggiore, con la conseguente unione di più contributi in un'unica componente, o minore, dove una sorgente verrebbe separata in più componenti (figura 21).



**Figura 21. Grafico delle componenti di un EEG di un soggetto. Si vedono chiaramente quelle più rumorose: 1 (blink), 2 (derive lente) 5 (artefatti pupillari) e 16 (rumore).**

Una volta che le componenti di rumore sono state rimosse (anche qui è stato scelto un compromesso tra perdita del rumore e perdita di informazione) il segnale è stato filtrato con un filtro FIR passa banda (0.5-48 Hz) dal prompt dei comandi (figura 22).



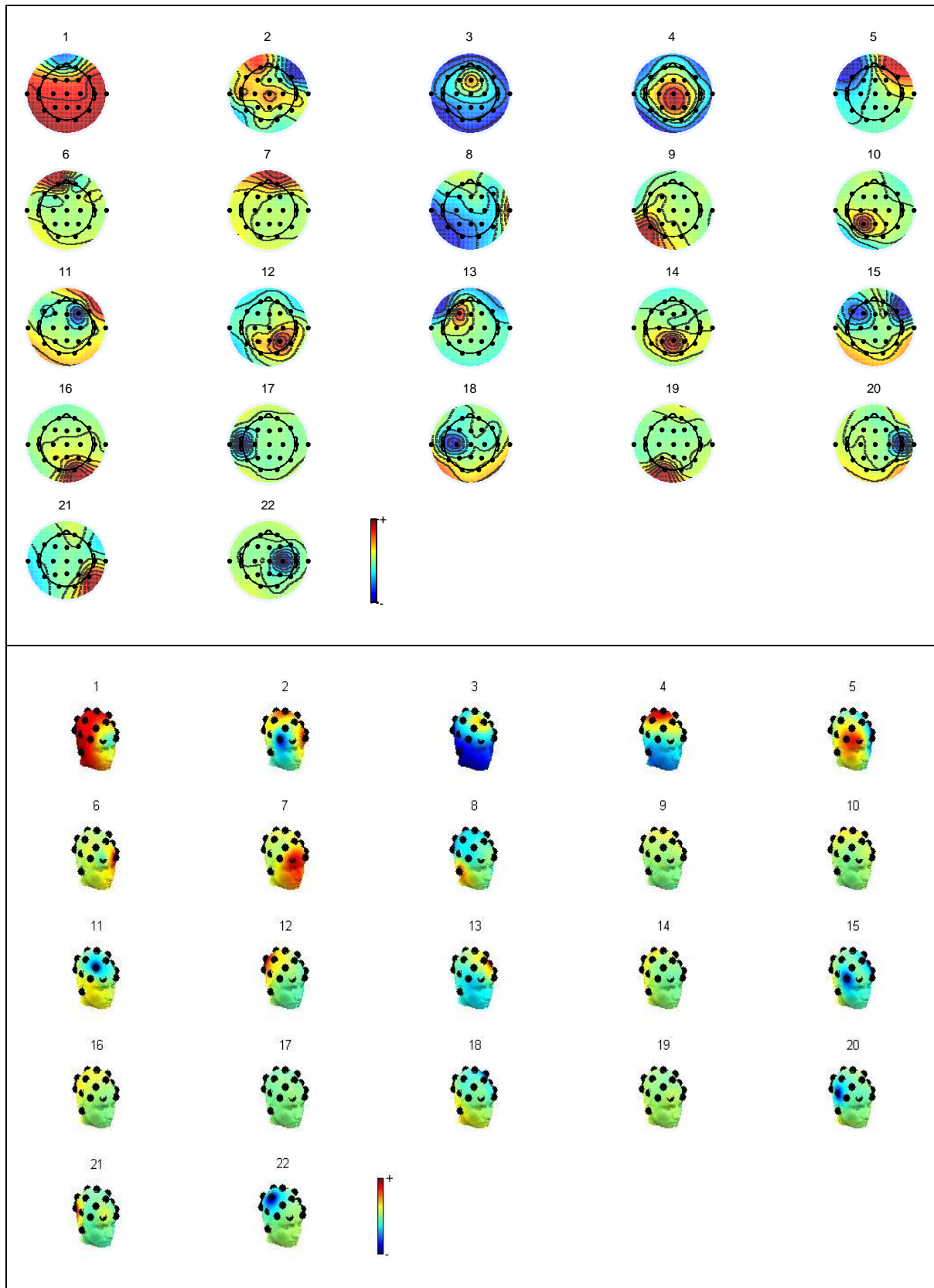
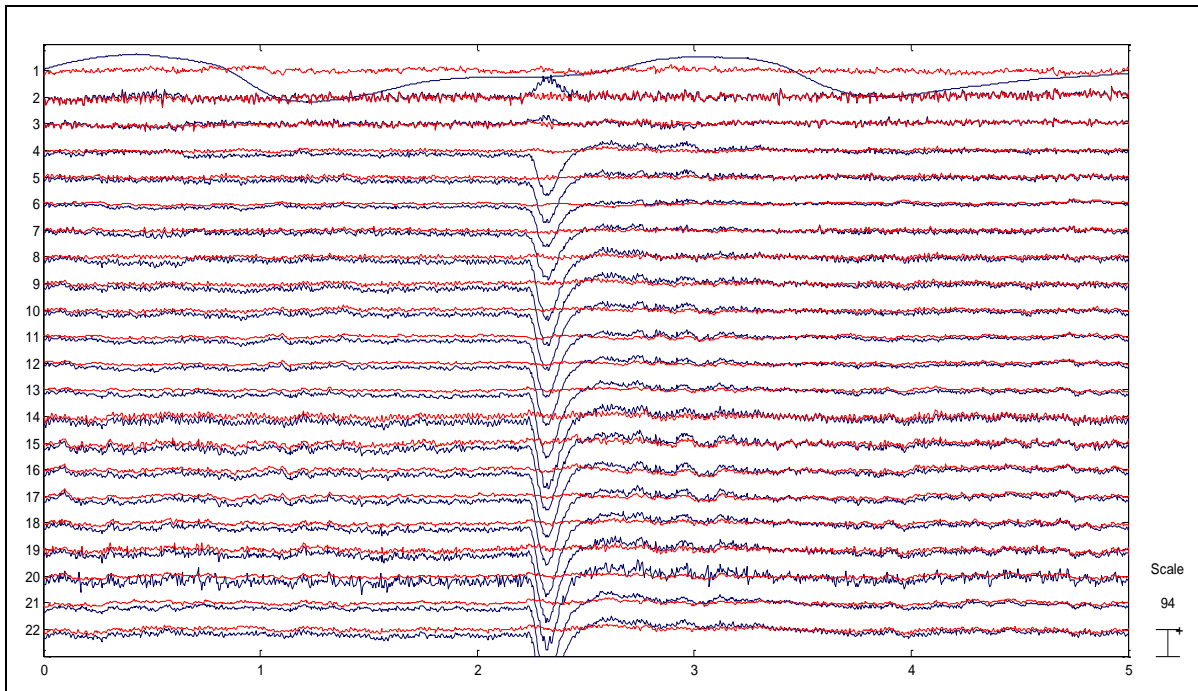


Figura 22. Le figure mostrano le componenti indipendenti trovate con la tecnica ICA per uno dei soggetti analizzati in 2D (in alto) ed in 3D (in basso).

Il segnale pulito (figura 23) può essere ora ulteriormente processato.

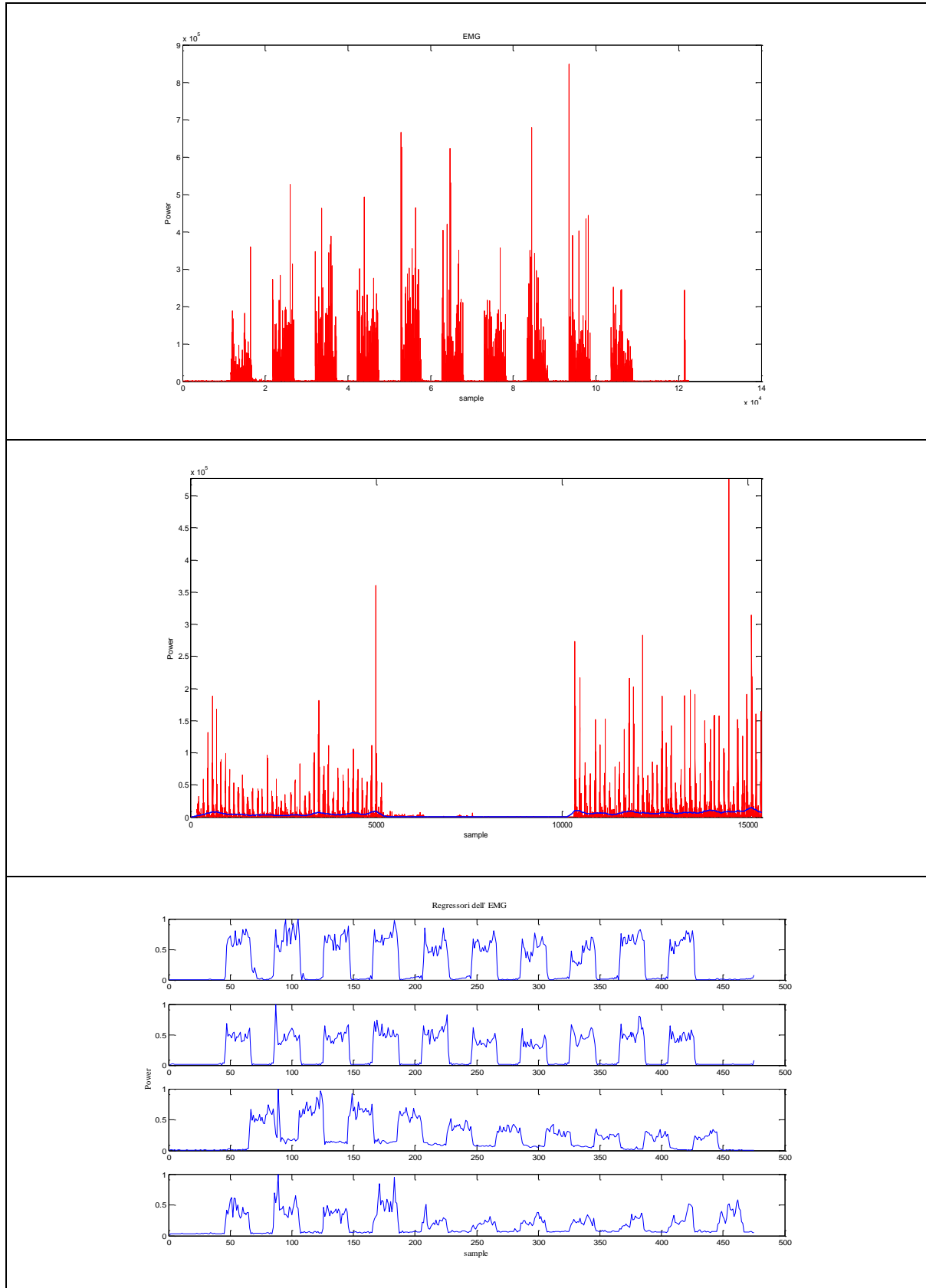


**Figura 23. Confronto tra il segnale originario (blu) e quello con le componenti tolte (rosso) visualizzando soltanto i canali EEG ed EOG.**

Successivamente con una funzione di MATLAB, l'EEG è stato diviso nelle bande di interesse attraverso wavelet di Morlet per creare i regressori da inserire nel GLM, ricampionati a 1 Hz e normalizzati tra 0 e 1:

- Delta  $\delta$  [0.5-3.5 Hz]
- Teta  $\theta$  [3.5-7 Hz]
- Alpha  $\alpha$  [7-13 Hz]
- Beta  $\beta$  [13-22 Hz]
- Gamma  $\gamma$  [22-48 Hz]

Infine, sempre con una funzione di MATLAB è stato separato dall'EEG l'elettromiogramma (EMG), ugualmente filtrato con un filtro a media mobile, ricampionato a 1 Hz e normalizzato tra 0 e 1 per essere anch'esso inserito come regressore (figura 24).



**Figura 24.** In alto un'immagine dell'EMG di un soggetto. Al centro un tratto di EMG (rosso) sovrapposto al tratto EMG filtrato (blu). In basso i regressori ottenuti per le tre prove, rispettivamente avambraccio destro prova 1, avambraccio sinistro prova 2 e avambraccio destro e sinistro prova 3.

### **2.3 - PROTOCOLLO SPERIMENTALE**

Il protocollo sperimentale in questo lavoro di tesi consiste nel registrare contemporaneamente l'attività elettrica e metabolica del cervello durante uno stimolo esterno. La prova di stimolo consiste in un handgrip motorio suddiviso in tre parti:

1. handgrip destro
2. handgrip sinistro
3. handgrip destro e sinistro

Ciascuna di queste prove prevede un blocco di riposo iniziale (baseline) di 40 secondi, seguiti da dieci ripetizioni di 20 secondi di stimolo e 20 secondi di riposo, infine è stato previsto un ulteriore riposo finale di 50 secondi, per un totale di 490 secondi.

L'obiettivo dell'acquisizione simultanea dei segnali EEG, EMG e NIRS è quello di rendere attuabile la valutazione della correlazione tra i suddetti segnali e tra i segnali e l'andamento temporale del compito.

Al fine del calcolo della correlazione si sono utilizzati l'EMG ed i ritmi di potenza EEG nella banda  $\alpha$  e  $\beta$  degli elettrodi C3 e C4 in base alla stimolazione di prova, scelti, poiché spazialmente prossimi ai probe NIRS e quindi più significativi nella valutazione dell'accoppiamento neurovascolare, come regressori del GLM. Si è quindi preferito valutare il loro contributo separatamente piuttosto che considerare un valor medio  $(C3+C4/2)$  il quale avrebbe potuto far perdere contributi informativi importanti.

Questi segnali sono direttamente correlabili poiché entrambi campionati a 1 Hz; per tanto le prove di correlazione prevedono le seguenti desing matrix:

- Tradizionale (task a blocchi)
- Tradizionale + EEG (ritmi  $\alpha$  e  $\beta$ )
- Ritmi EEG
- EMG
- EMG + EEG (ritmi  $\alpha$  e  $\beta$ )

Per le varie desing matrix sono stati fatti diversi contrasti descritti nella tabella 1:

Desing Matrix	Contrasto
Tradizionale	Task vs Rest [0 1 -1 0] Task dx vs Task sx [0 1 -1 0] Task sx vs Task dx [0 -1 1 0] Task dx e Task sx vs Baseline [-1 0.5 0.5 0]
Ritmi EEG	Alpha [0 0 1 0 0] Beta [0 0 0 1 0]
EMG	EMG vs Rest [0 1 -1 0] EMG dx vs EMG sx [0 1 -1 0] EMG sx vs EMG dx [0 -1 1 0] EMG dx e EMG sx vs Baseline [-1 0.5 0.5 0]
Tradizionale + EEG (ritmi $\alpha$ e $\beta$ )	Combinazione dei due
EMG + EEG (ritmi $\alpha$ e $\beta$ )	Combinazione dei due

Tabella 1. Tabella dei contrasti per ogni desing matrix.

#### **2.4 - RECLUTAMENTO SOGGETTI**

I soggetti che hanno partecipato a questo esperimento sono stati 14 soggetti sani volontari (età media 25 anni) e 9 soggetti patologici (età media 30 anni).

Tutti i soggetti sono stati informati sulla natura dell'esperimento e sulle modalità di acquisizione dei segnali e di funzionamento di EEG e NIRS prima di rilasciare il loro consenso informato scritto. Nessun soggetto ha ricevuto alcuna ricompensa per la sua partecipazione allo studio.

I soggetti patologici sono affetti da una sindrome di epilessia mioclonica di Unverricht-Lundborg. Questo disturbo è una rara malattia genetica appartenente al gruppo delle epilessie miocloniche progressive, caratterizzate dalla comparsa di crisi epilettiche che vanno progressivamente peggiorando. I sintomi principali compaiono tra i 6 e i 13 anni e sono due: le crisi convulsive e il mioclono (brevi e involontarie contrazioni di un muscolo o di un gruppo di muscoli), che è spesso stimolato dal movimento, da luci lampeggianti, da certi suoni e dallo stress. A questi sintomi possono aggiungersi, nel tempo, difficoltà di linguaggio, incapacità di coordinazione dei movimenti, tremori e declino intellettuale. La progressione della malattia è in genere lenta e l'aspettativa di vita è compresa tra i 50 e i 70 anni. La diagnosi si basa sull'osservazione clinica, su test di laboratorio, su indagini strumentali (risonanza magnetica, tomografia computerizzata) e neurofisiologiche e sul risultato della biopsia cutanea. L'analisi genetica, con ricerca di mutazioni nel gene EPM1, conferma la diagnosi (Genton, 2010).

I soggetti qui di seguito saranno identificati con numeri naturali progressivi.

# Capitolo 3

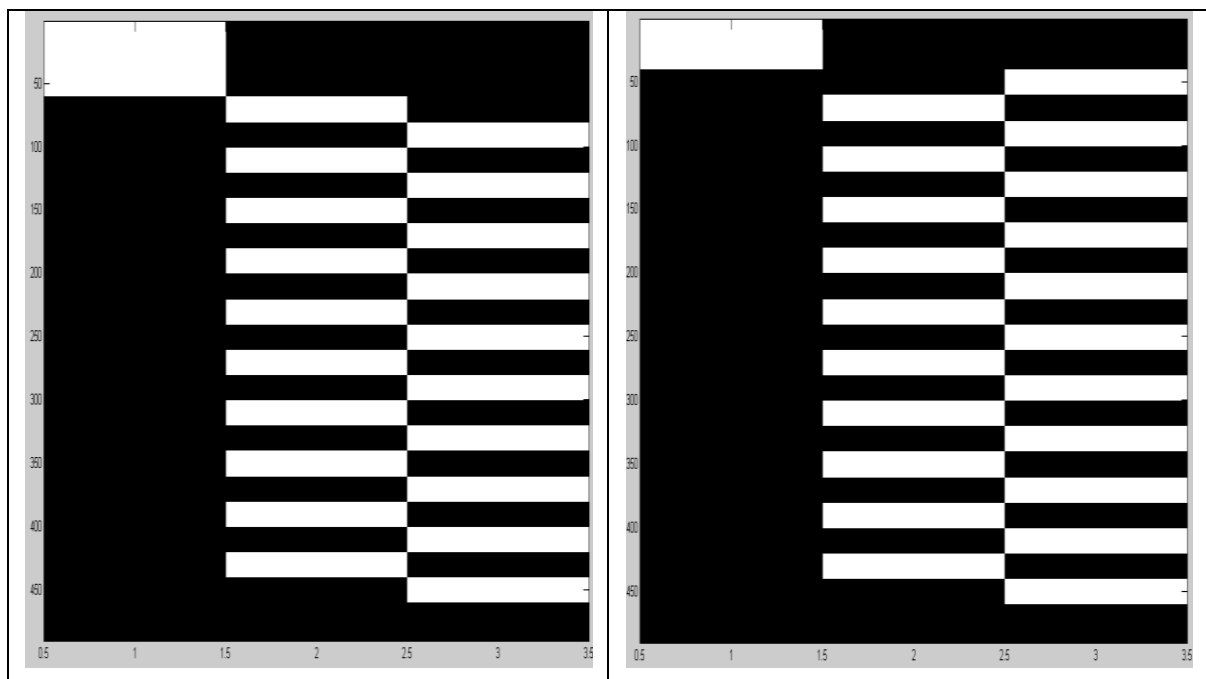
## Risultati

- analisi tradizionale
- analisi multimodale
- analisi soggetti con patologia

### 3.1 - ANALISI TRADIZIONALE

Grazie al toolbox di MATLAB, NIRS-SPM, l'inferenza statistica sulle analisi effettuate sui soggetti viene visualizzata sul cervello come area attivata. In questo modo è raffigurato il risultato dell'apporto metabolico. Dei 14 soggetti sani volontari, i soggetti 2, 4 e 13 sono stati scartati in quanto la conta dei fotoni era troppo bassa perché potessero essere analizzati, mentre i soggetti 7, 8 e 10 sono stati scartati perché i segnali grezzi ottenuti erano troppo rumorosi.

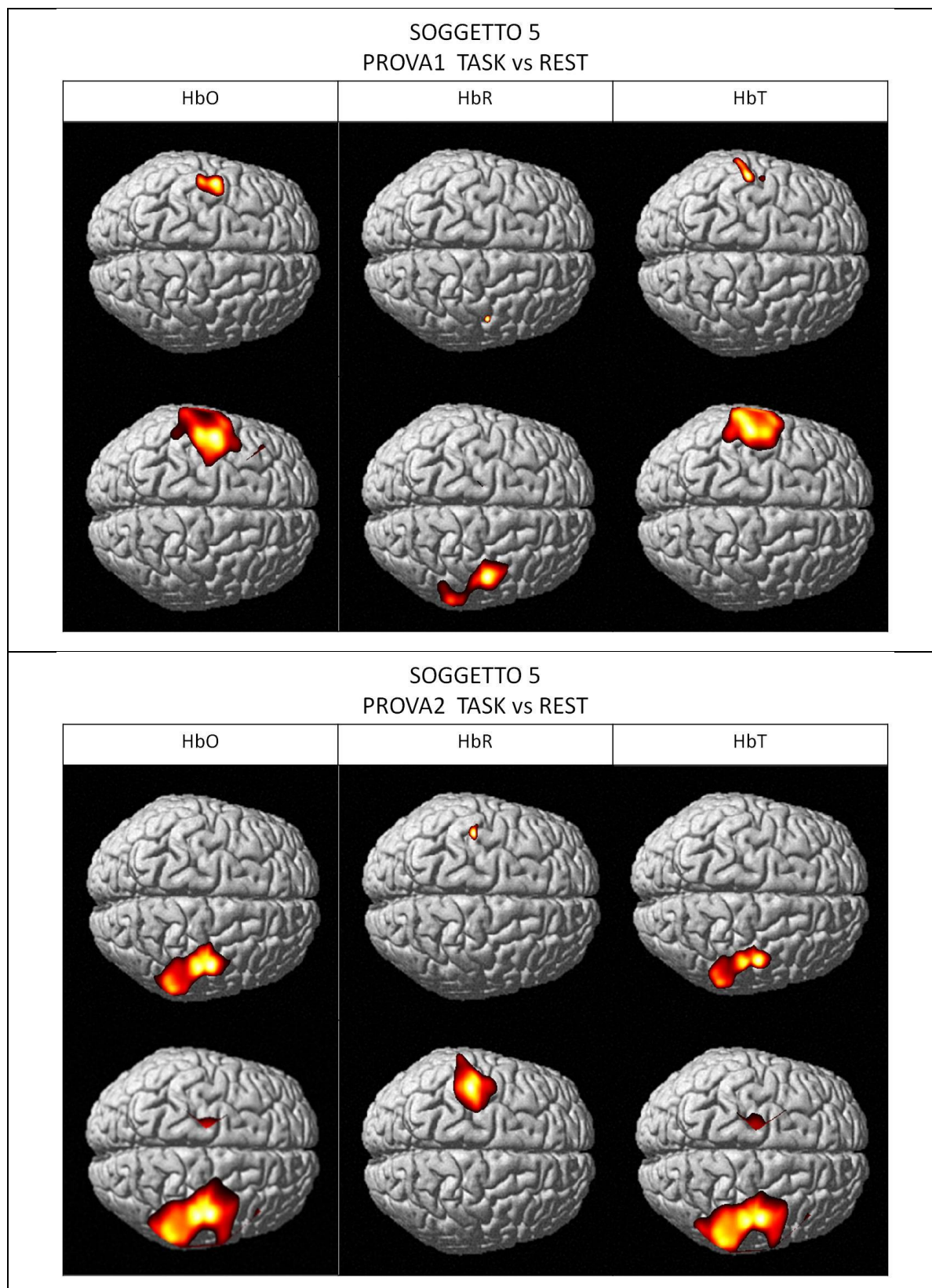
Nel capitolo precedente si è messo in evidenza che le variazioni di concentrazione dei cromofori analizzati (HbO, HbR e HbT) sono state valutate sia in valore assoluto sia in valore relativo, considerando cioè i cambiamenti della variazione di concentrazione nel tempo rispetto al valore iniziale. La desing matrix progettata per questo tipo di valutazione è la seguente (figura 25):



**Figura 25.** A sinistra la desing matrix per la prova 1 e 2 mentre a destra quella per la prova 3. La prima colonna di entrambe le matrici contiene il regressore della baseline, la seconda quella del task mentre la terza quella del rest nel primo caso e del task con l'altra mano nel secondo caso.

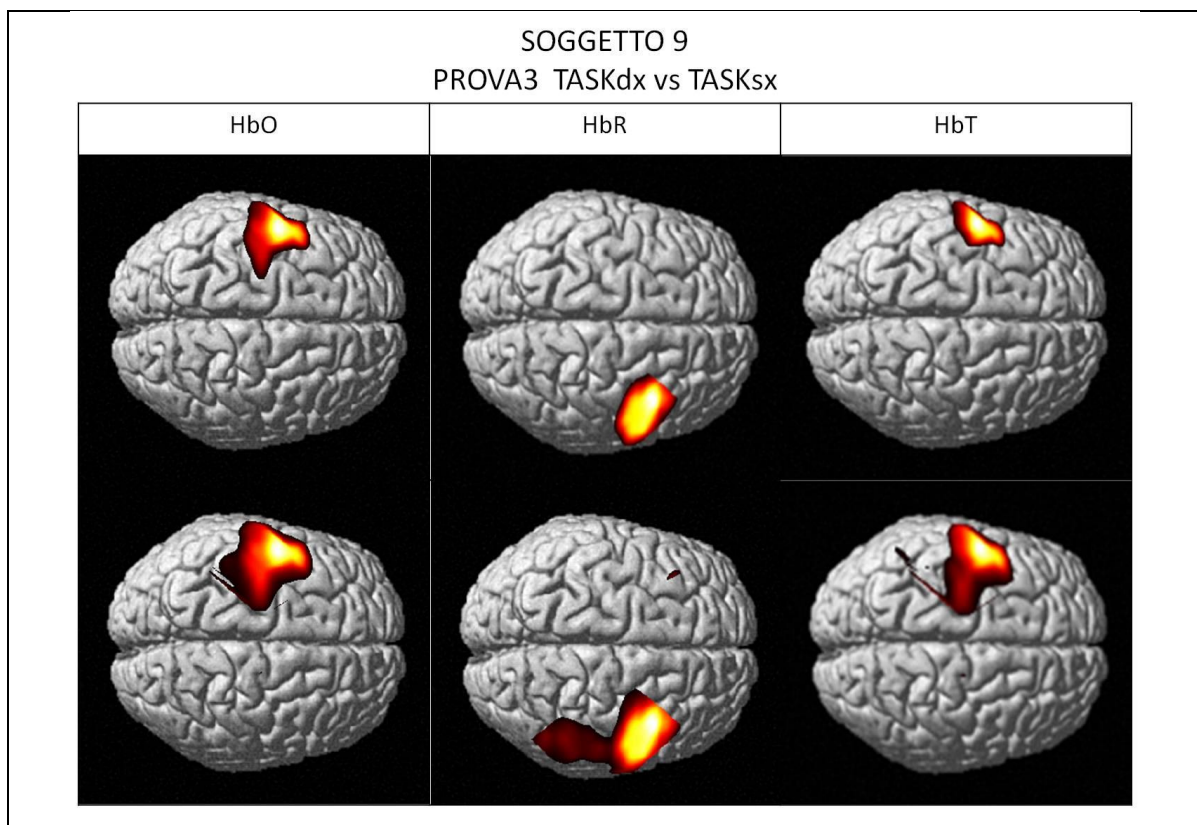
Le immagini che seguono mostrano le aree di attivazione su una visione dorsale dell'encefalo considerando sia il valore di p-value modificato dalla Tube formula (prima riga), che il valore senza alcuna restrizione (seconda riga); per entrambe le inferenze la soglia di p-value considerata è stata di  $\alpha < 0.05$ .

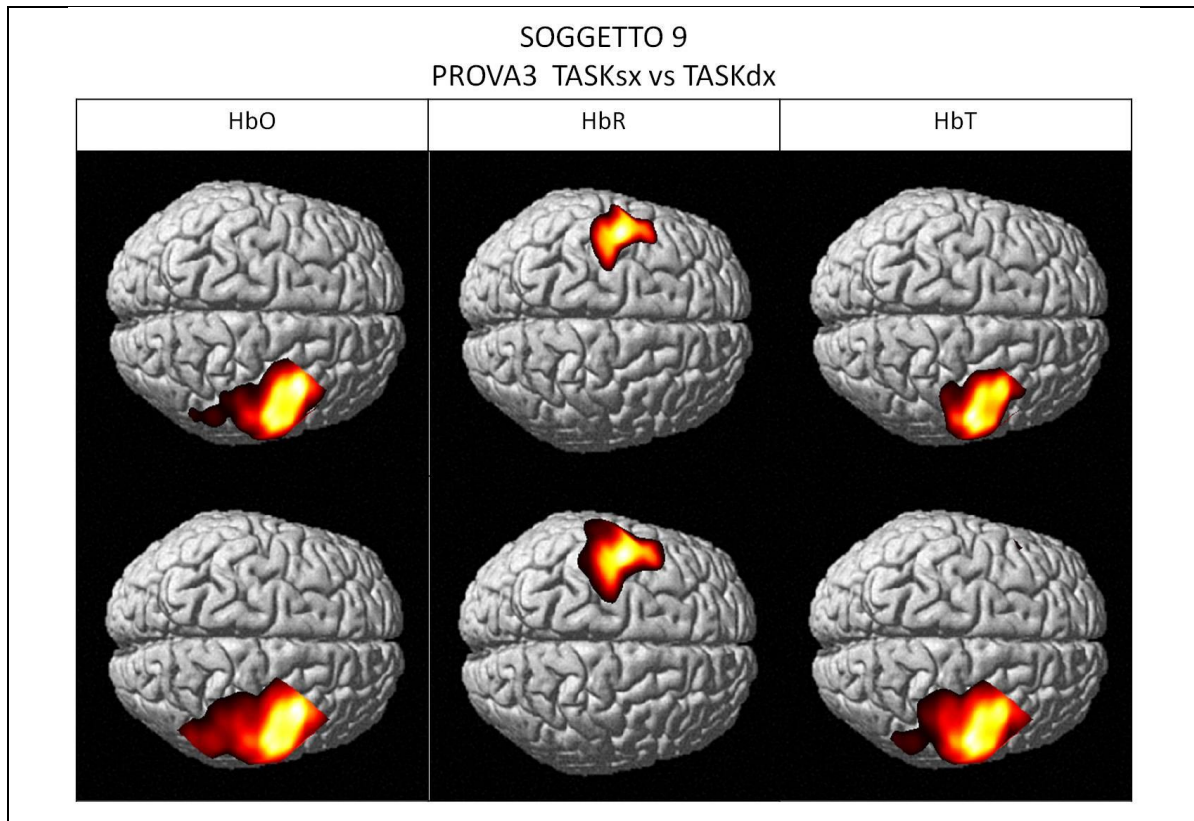




**Figura 26.** Le figure rappresentano le aree di attivazione divise in base al tipo di emoglobina considerata. La significatività maggiore è rappresentata dalle aree in giallo, mentre in rosso quella minore.

Dai risultati ottenuti dall'analisi dei valori assoluti delle prove di handgrip riguardanti l'utilizzo di una sola mano (prova1 la destra, prova2 la sinistra) si nota immediatamente un'attivazione controlaterale come atteso (figura 26). Inoltre, è evidente come la formula di restrizione del p-value sia molto più conservativa, circoscrivendo fortemente le aree attivate. Si può osservare poi, che le aree attivate della deossiemoglobina sono meno estese rispetto alle altre; ciò è dovuto probabilmente dal fatto che i neuroni coinvolti ed anche quelli nelle immediate vicinanze richiamano globuli rossi con ossiemoglobina, quindi energia e nutrimento per poter svolgere i processi metabolici di risposta. Come conseguenza, emerge anche il fatto che l'emoglobina totale ha un'attivazione molto più simile all'ossiemoglobina rispetto alla deossiemoglobina.



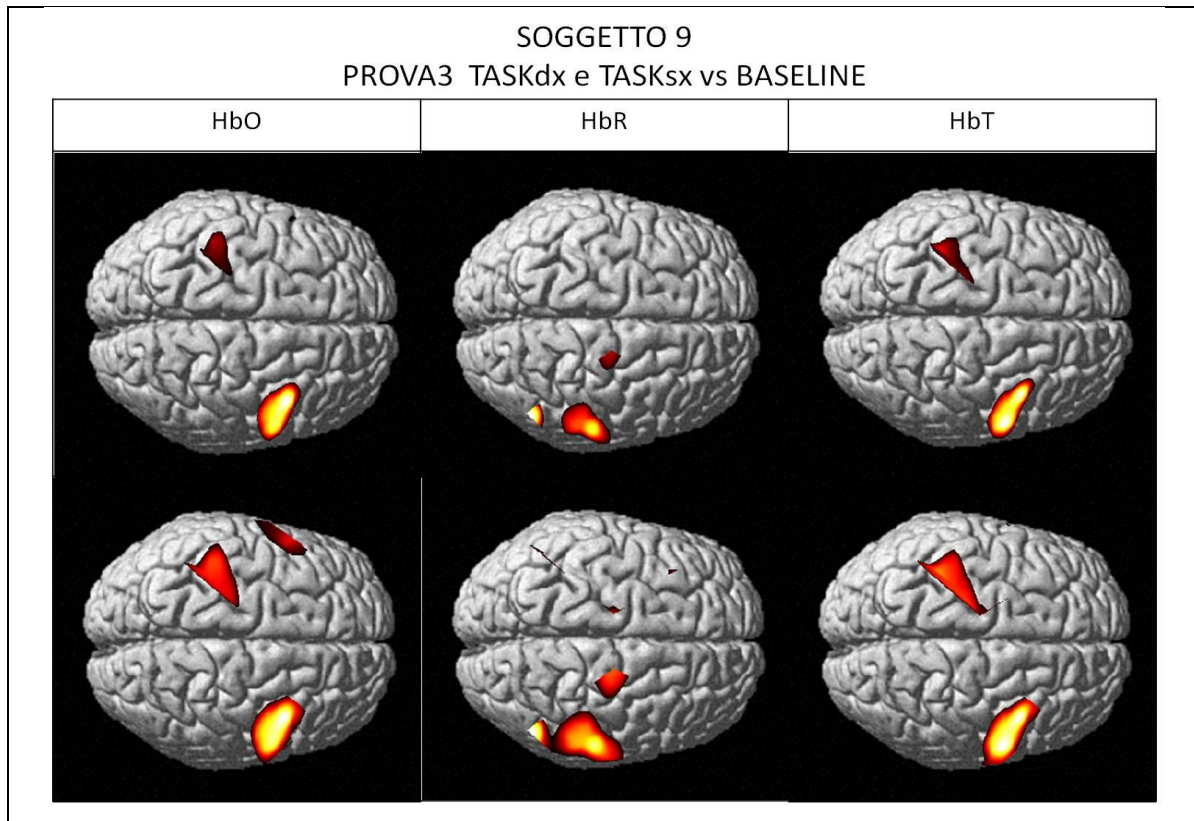


**Figura 27. Immagini relative alla terza prova dove si mettono in evidenza le aree di un task di una mano rispetto all'altra.**

Le immagini della terza prova (figura 27) confermano quanto detto in precedenza: infatti, si nota che, evidenziando con il vettore contrasto l'area attivata dallo stimolo motorio svolto dalla mano destra rispetto alla mano sinistra, essa è situata nell'emisfero sinistro (quindi controlaterale), viceversa, risaltando il task sinistro rispetto quello destro, l'area attivata è nell'emisfero destro. Infine è opportuno mostrare che le aree attivate nella terza prova sono più estese rispetto le altre due; questo particolare era fortemente aspettato, in quanto all'aumentare della complessità dello stimolo aumenta conseguentemente lo "sforzo" cerebrale e quindi l'ossigenazione che ne segue.

È stato poi effettuato un terzo contrasto nella terza prova che valuta il task complessivo rispetto alla situazione normale di riposo (baseline), visibile in figura 28:

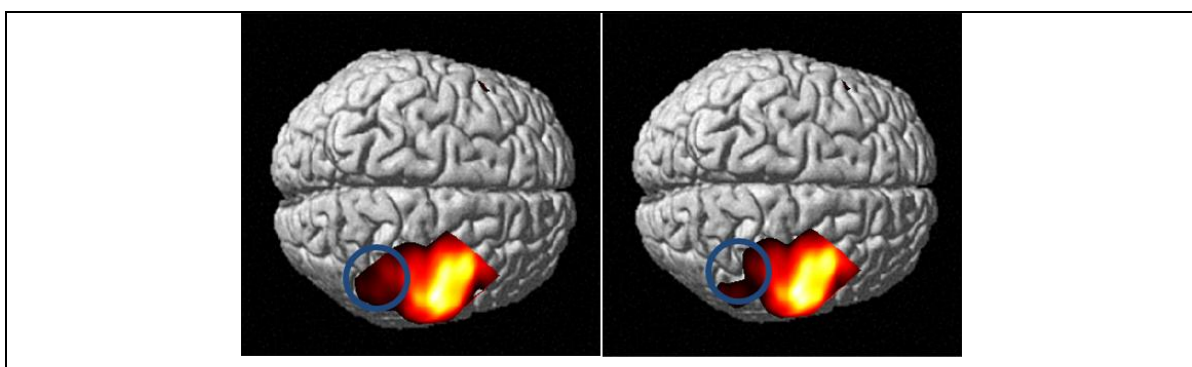




**Figura 28.** Immagine relativa al contrasto task vs baseline.

Contrariamente alle aspettative, l'area attivata è lateralizzata prevalentemente nell'emisfero destro ed è meno estesa rispetto a tutte le altre attivazioni. Essendo tutti i soggetti analizzati destrimani, era prevista una maggior attivazione dell'emisfero sinistro in questo tipo di contrasto; quanto osservato potrebbe essere dovuto alla correlazione tra i regressori che, come detto in precedenza producono risultati con grande variabilità.

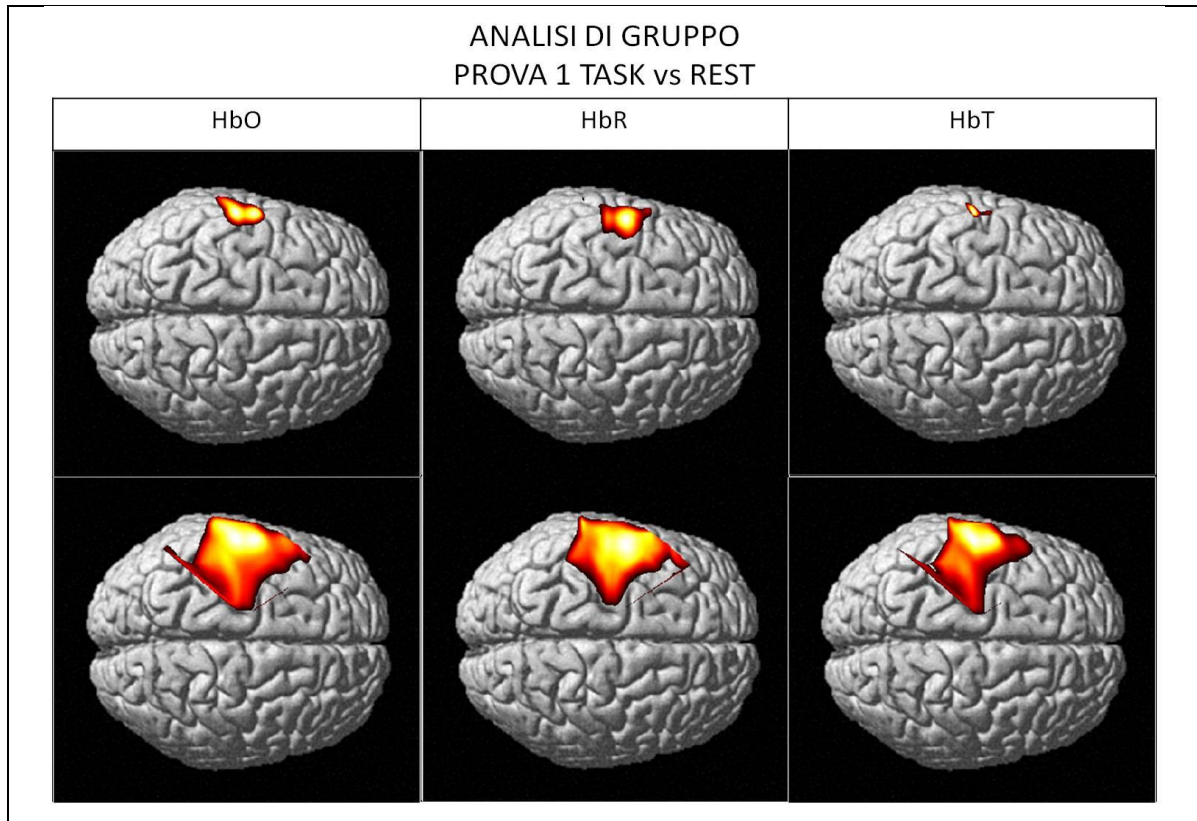
Analizzando invece i risultati ottenuti con i valori relativi sono chiaramente visibili le medesime aree attivate dei valori assoluti salvo piccole minime differenze per altro non significative (figura 29).

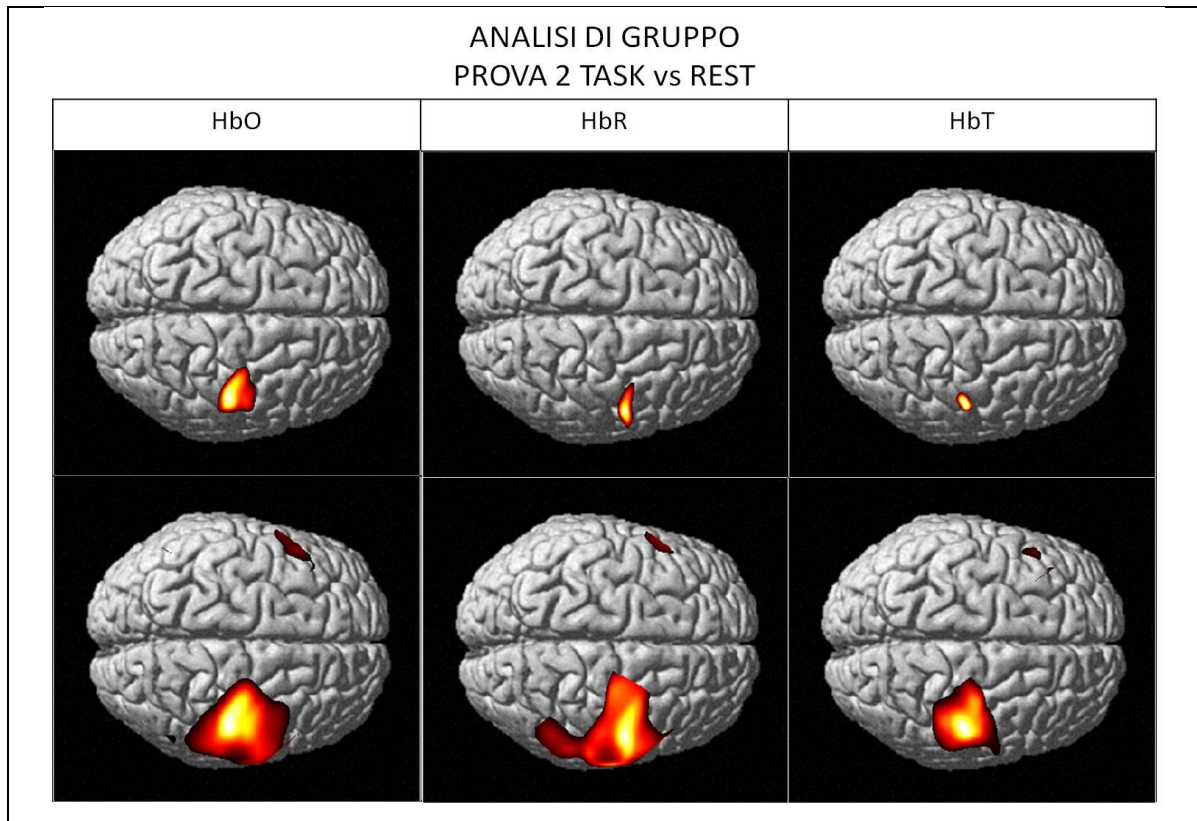


**Figura 29.** A sinistra l'immagine prodotta dai valori relativi, mentre a destra l'immagine prodotta dai valori assoluti.

Poiché non ci sono né miglioramenti significativi, né disparità tra i risultati, si è ritenuto opportuno considerare esclusivamente i risultati prodotti dalle analisi con dati assoluti e non relativi per l'approccio multimodale.

Considerando e confrontando le analisi effettuate su tutti i soggetti sani volontari sono state eseguite le analisi di gruppo che evidenziano aree di attivazione comuni a tutti i soggetti; i risultati sono visibili nella seguente figura 30:



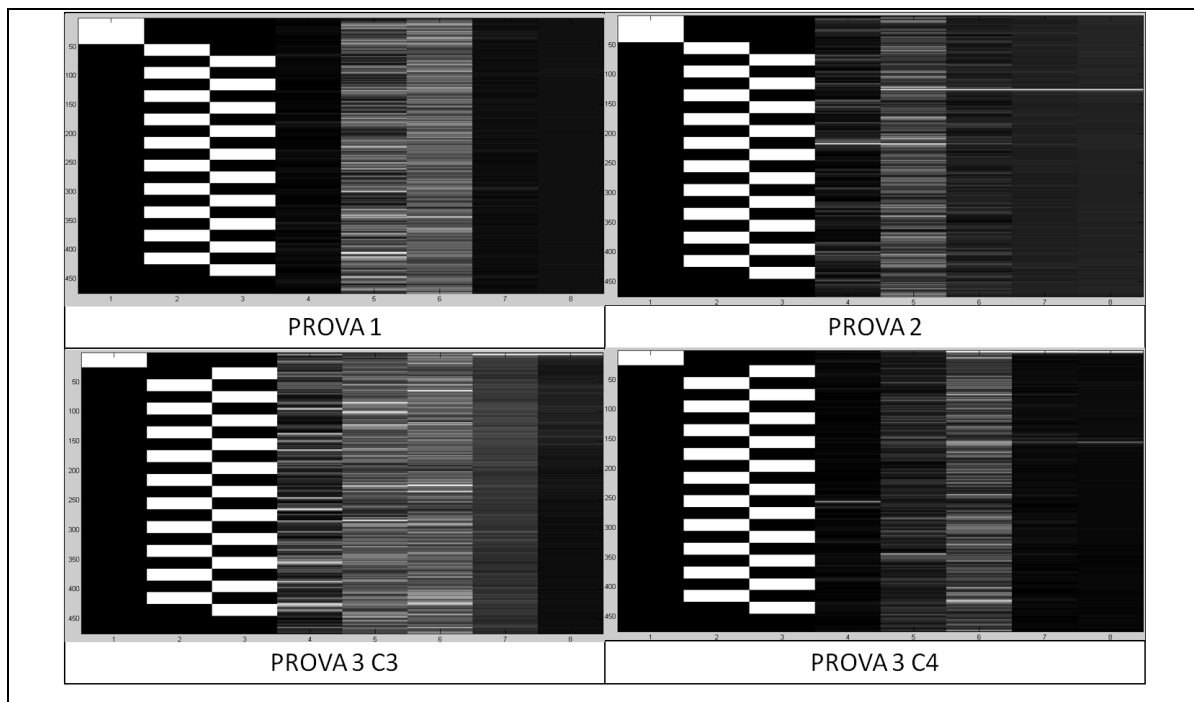


**Figura 30.** Immagini ottenute dall'analisi di gruppo degli 8 soggetti sani volontari.

Come nelle immagini precedenti si vede un'area di attivazione nella corteccia motoria più circoscritta con la correzione della Tube formula; inoltre rimane ben evidente l'attivazione controlaterale fisiologica aspettata.

### 3.2 - ANALISI MULTIMODALE

Integrando alle informazioni metaboliche quelle elettriche si mira a determinare un rapporto di causalità tra i due fenomeni. Dopo aver progettato una specifica funzione di MATLAB per estrarre i valori di potenza dalle bande dell'EEG con la tecnica delle wavelet, si sono normalizzati i dati e ricampionandoli per poter essere paragonati a quelli NIRS; infine sono stati inseriti nella matrice di regressione del GLM (dopo essere stati normalizzati) e attraverso i contrasti si sono analizzate immagini riguardanti i ritmi  $\alpha$  e  $\beta$  sia integrati con i regressori tradizionali del task (figura 31) sia da soli. In queste elaborazioni le immagini relative alla terza prova sono state suddivise in base al segnale registrato dagli elettrodi C3 e C4 posti sulla stessa area ma nei due emisferi diversi.



**Figura 31.** L'immagine rappresenta le desing matrix dell'analisi multimodale dove oltre ai regressori tradizionali citati in precedenza si sono aggiunti quelli relativi ai ritmi EEG e precisamente  $\delta$ ,  $\theta$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ .

Poiché si tratta di risultati multimodali le immagini che seguiranno avranno 'parti mancanti' dovute alla non significatività del risultato segnalata dal toolbox stesso.



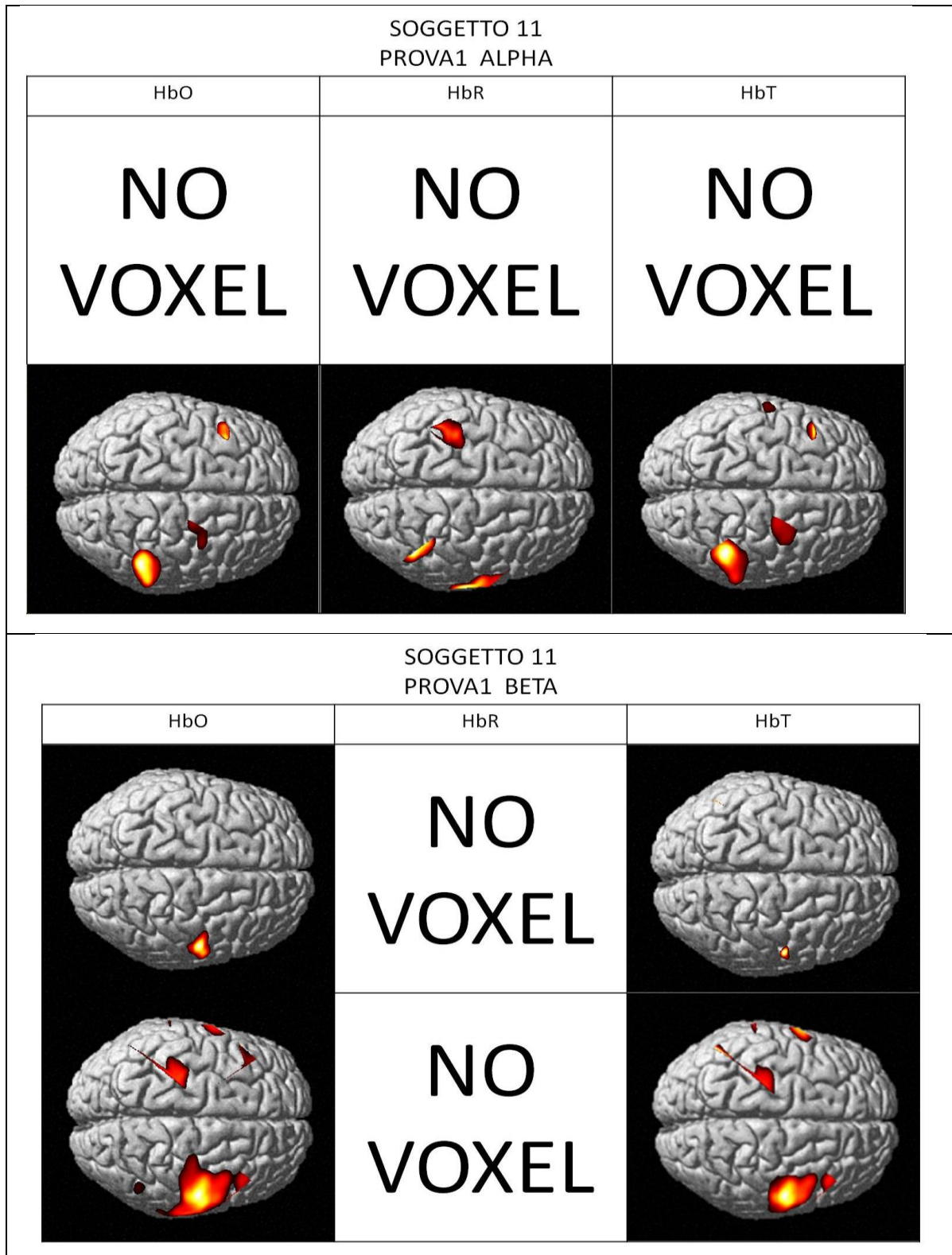
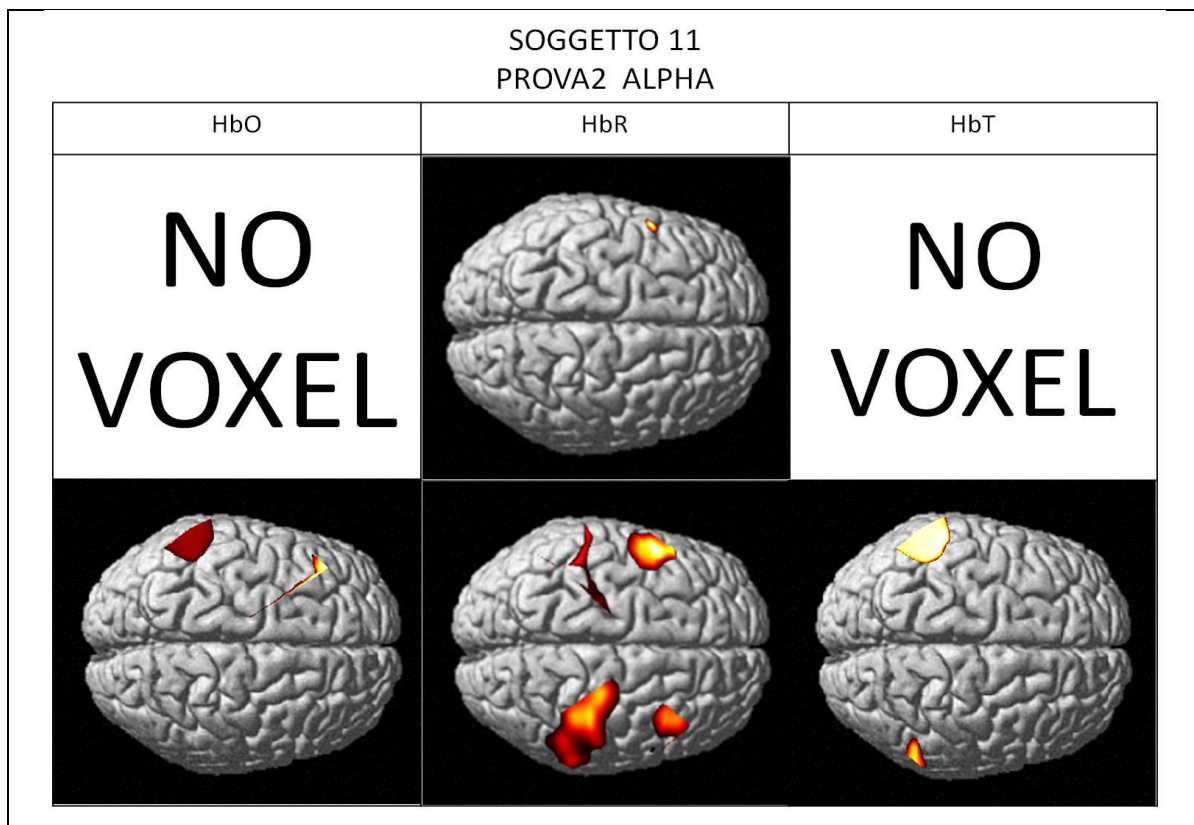


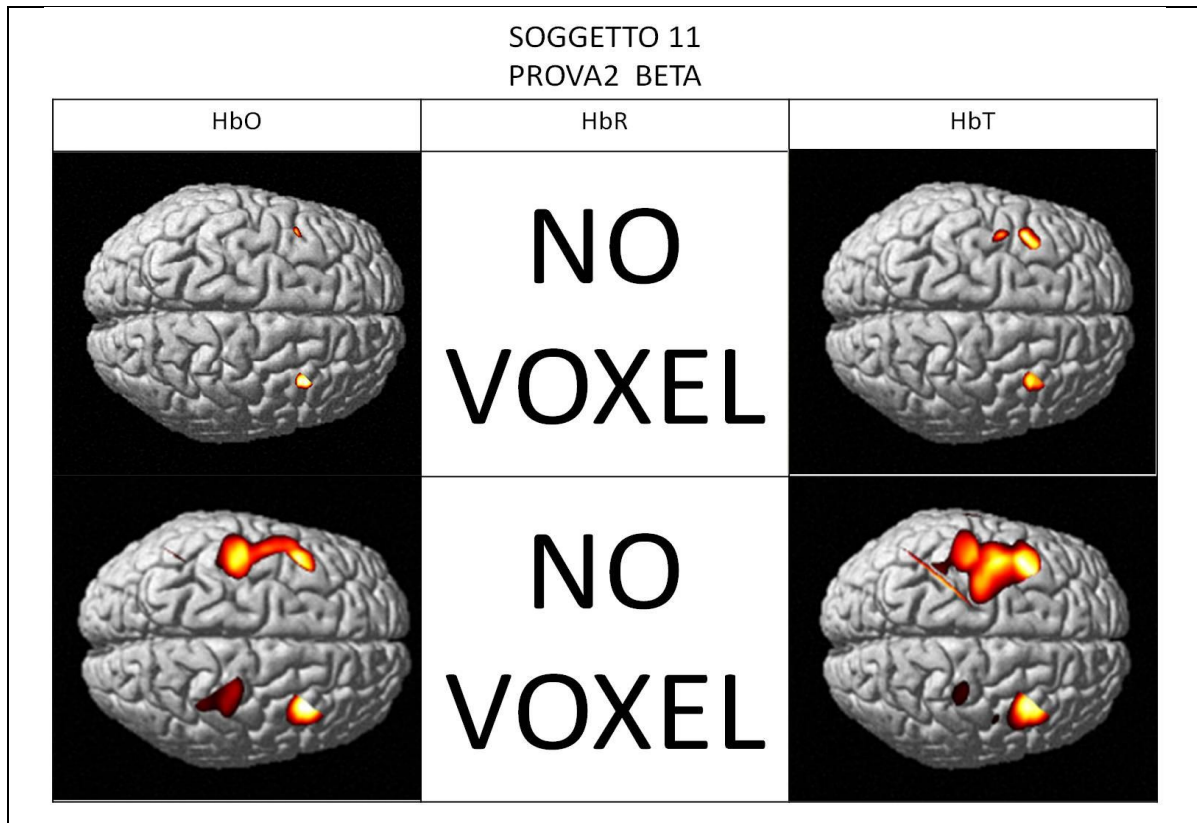
Figura 32. Immagini relative all'approccio multimodale; molte risultano essere non significative perché l'informazione ricercata è più specifica.



Nella prima prova le correlazioni mostrate (figura 32) risultano rispettare la controlateralità del task; si osserva anche in queste immagini una similarità tra HbO e HbT rispetto che HbR.

Nella seconda prova invece è poco visibile la lateralità mostrata in precedenza (figura 33); ciò potrebbe essere dovuto ad una variabilità tra i singoli soggetti che utilizzano percorsi differenti e specifici. Si nota inoltre come il ritmo  $\alpha$  sia più visibile con HbR piuttosto che gli altri due, come mostrano anche i risultati degli altri soggetti; segno che probabilmente gli spikes prodotti da tale ritmo sono legati al regolamento delle variazioni di deossiemoglobina.

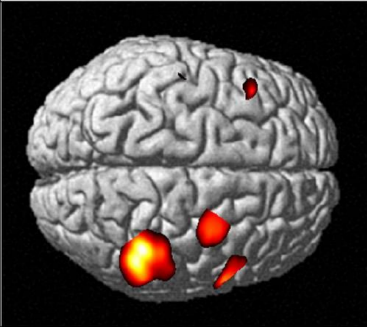




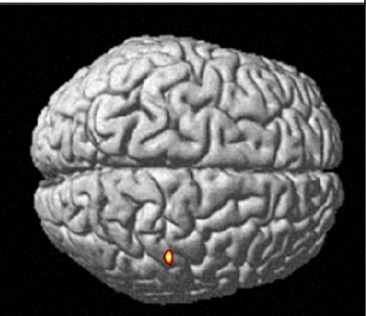
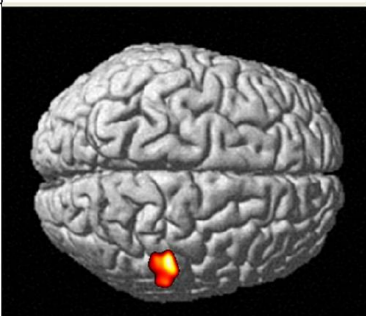
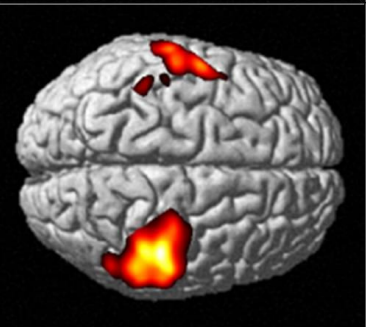
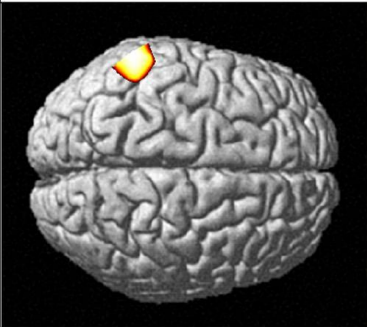
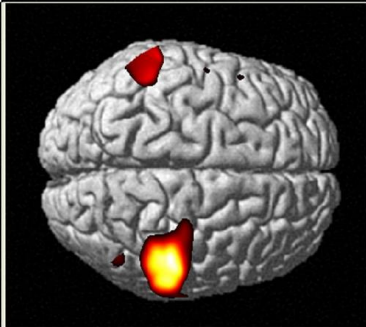
**Figura 33. Immagini relative alla seconda prova di un soggetto analizzato.**

Per quanto riguarda la terza prova verranno mostrate di seguito le immagini relative ai due elettrodi nei due contrasti utilizzati (figura 34).

SOGGETTO 9  
PROVA3\_C3 ALPHA

HbO	HbR	HbT
NO VOXEL	NO VOXEL	NO VOXEL
NO VOXEL		NO VOXEL

SOGGETTO 9  
PROVA3\_C3 BETA

HbO	HbR	HbT
	NO VOXEL	
		

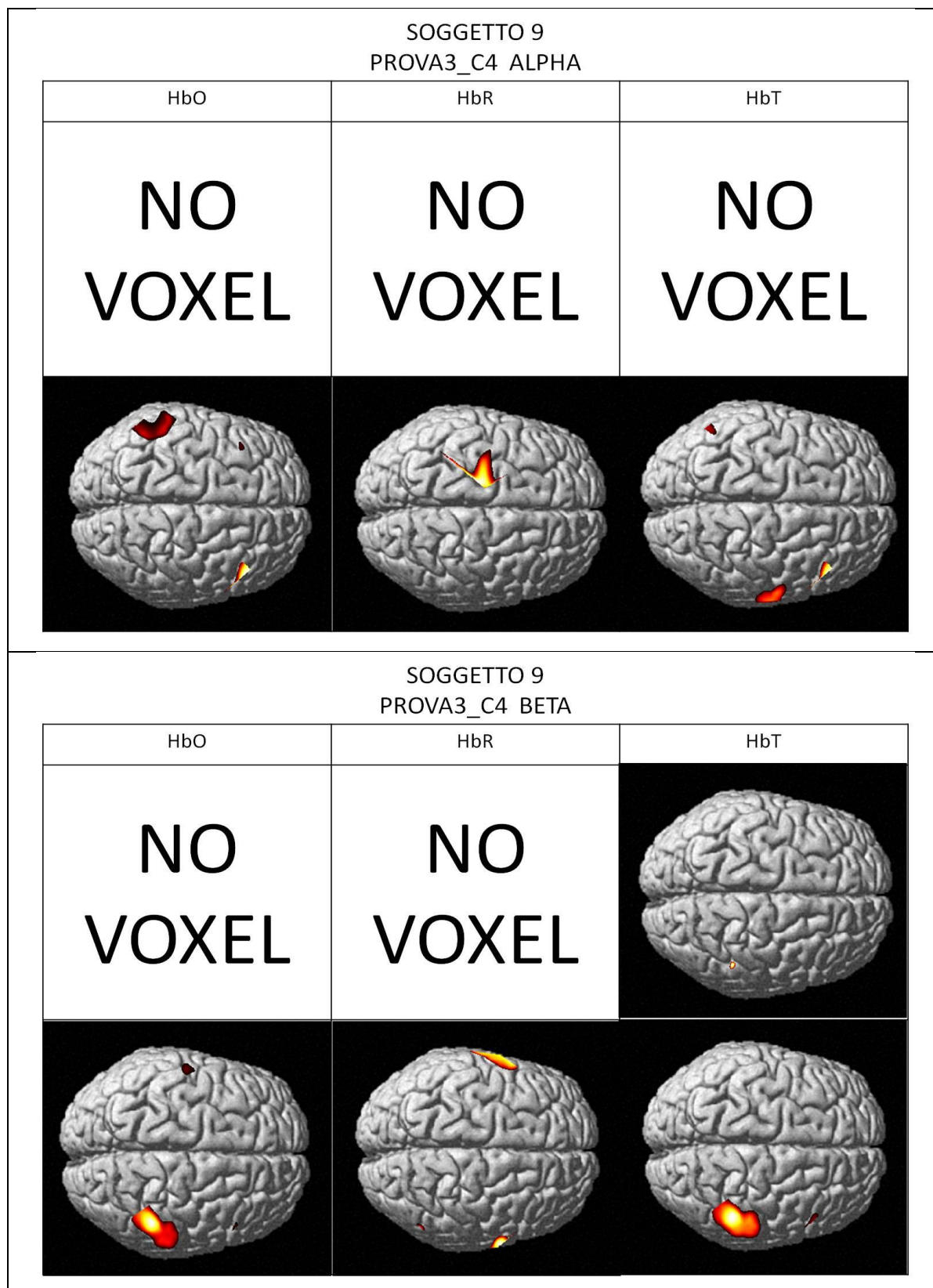
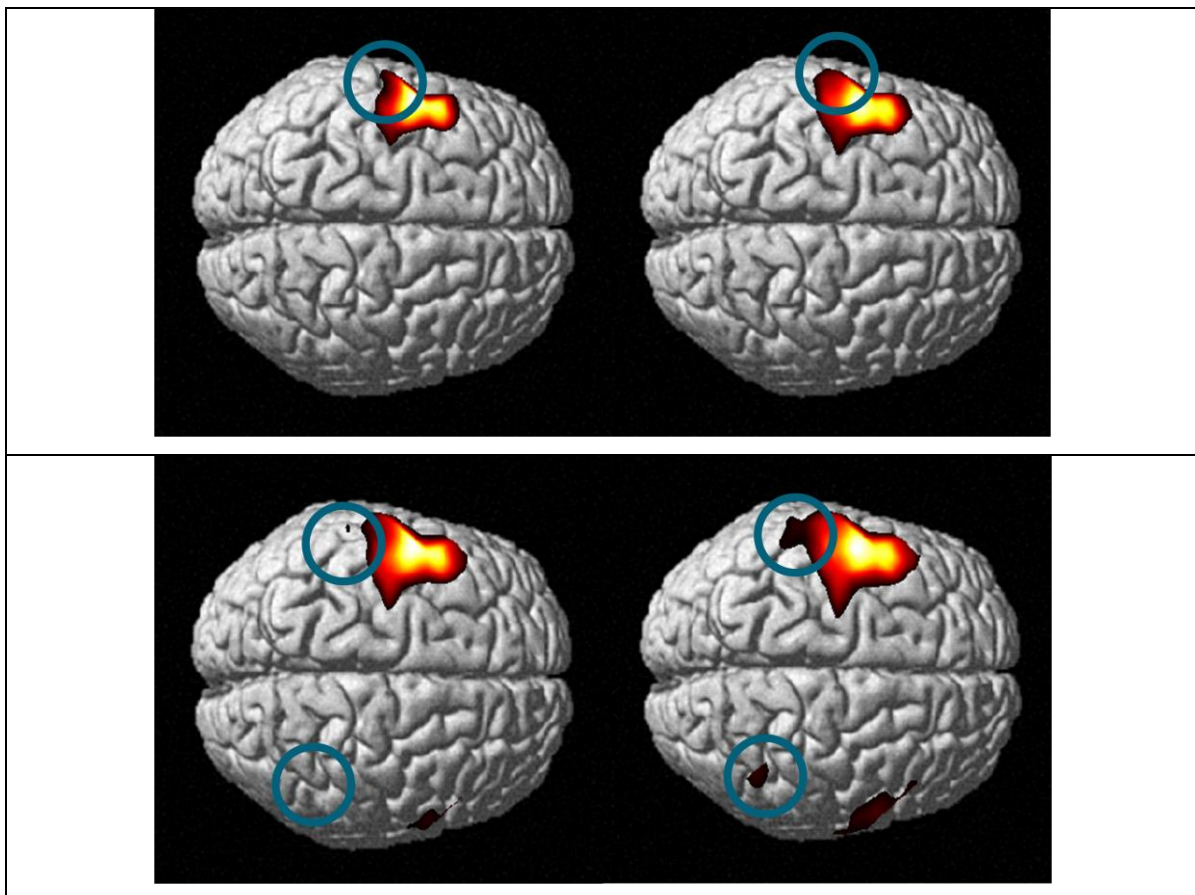


Figura 34. Immagini relative alla terza prova divise in base all'elettrodo di registrazione del segnale EEG.



In primo luogo, anche nella terza prova si osserva l'impossibilità di asserire la controlateralità cerebrale rispetto alla stimolazione eseguita; inoltre si osserva una variabilità di detezione degli elettrodi C3 e C4; infatti, in questo soggetto mentre il contrasto Alpha evidenzia una diversa zona di attivazione tra i due elettrodi ciò non risulta nel contrasto Beta, dove le aree attivate sono invece paragonabili. In generale, si osserva che, a differenza del contrasto Task, l'aumento della complessità dello stimolo non causa necessariamente un aumento della zona di attivazione cerebrale relativa ai due ritmi.

Sono stati eseguiti anche i contrasti dell'analisi tradizionale senza mostrare significativi cambiamenti di attivazione rispetto ad essa (figura 35); infine tali contrasti mostrano gli stessi risultati su entrambi gli elettrodi, risultato previsto in quanto il block desing non è legato all'attività ricavata dallo specifico elettrodo.



**Figura 35.** In questa figura sono mostrate le immagini relative all'ossiemoglobina di soggetto che ha eseguito la prima prova; in alto il risultato della desing matrix integrata con i regressori EEG mentre in basso il risultato con il solo utilizzo dei regressori tradizionali.

Sono state anche eseguite le stesse analisi usando una matrice regressori con i soli ritmi EEG (figura 36).

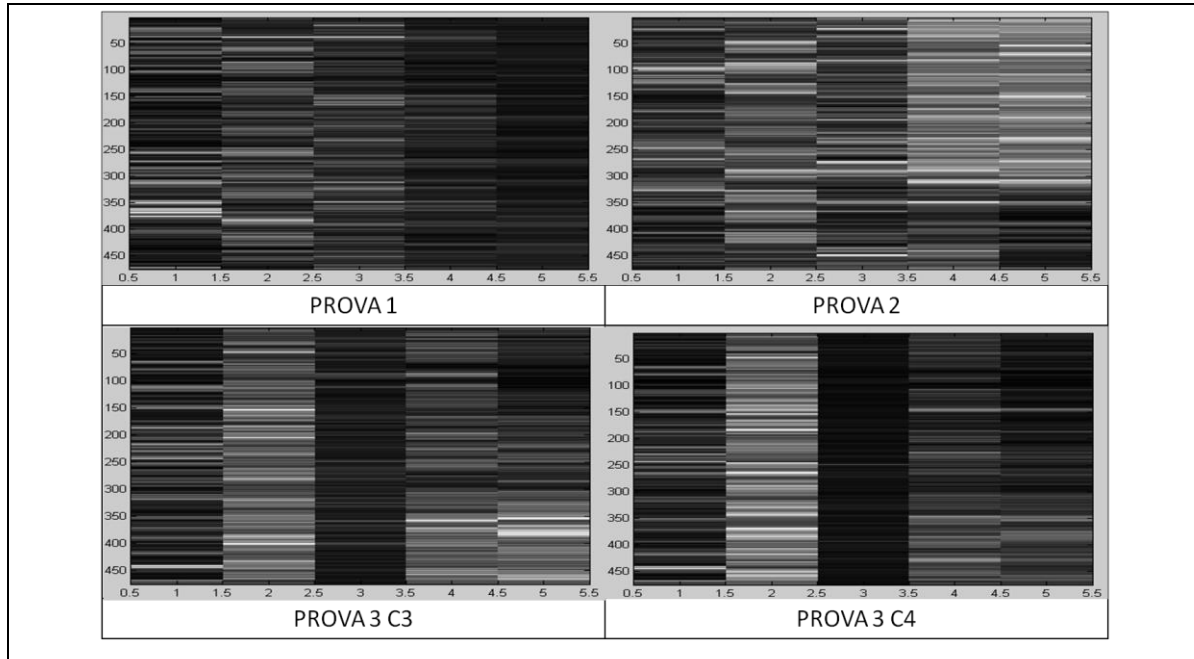


Figura 36. Regressori dei soli ritmi EEG.

Anche in questo caso non si sono riscontrate significative differenze tra le immagini ottenute rispetto alla desing matrix contenente tutti i regressori, se non un lieve aumento delle aree nel caso in cui sono stati usati solo i regressori EEG (figura 37).

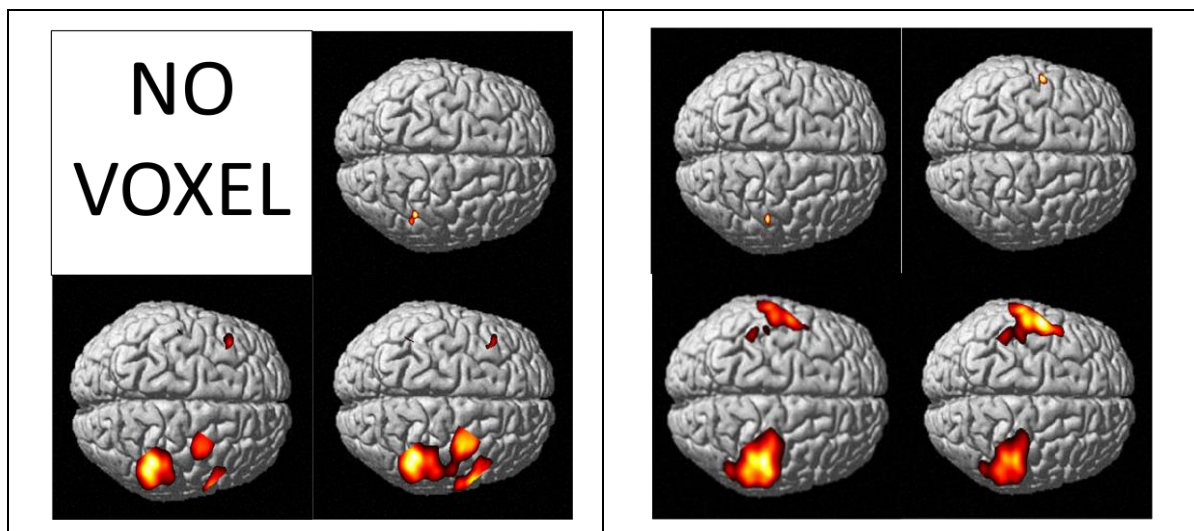
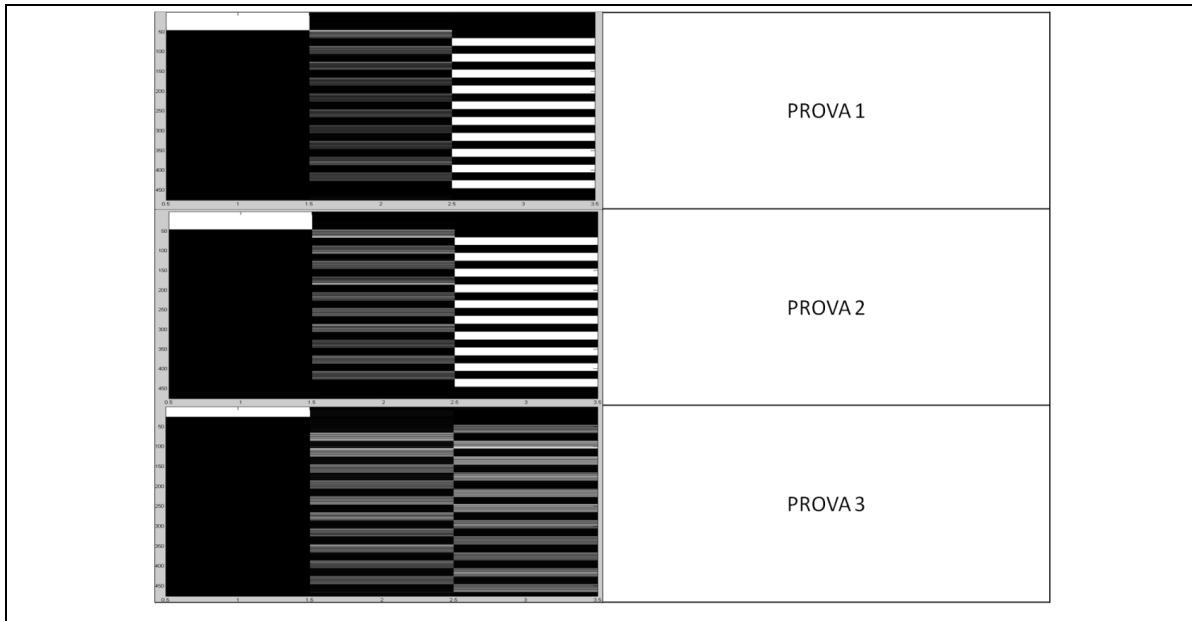


Figura 37. Le immagini si riferiscono alla prova 3 elettrodo C3 con (in alto) e senza (in basso) Tube formula. Nell'immagine di sinistra sono risultanti il contrasto Alpha in HbR, mentre a destra risultanti il contrasto Beta in HbO. A sinistra di ciascuna delle due immagini i risultati sono stati prodotti dalla desing matrix integrata, a destra solo con i regressori dei ritmi EEG.

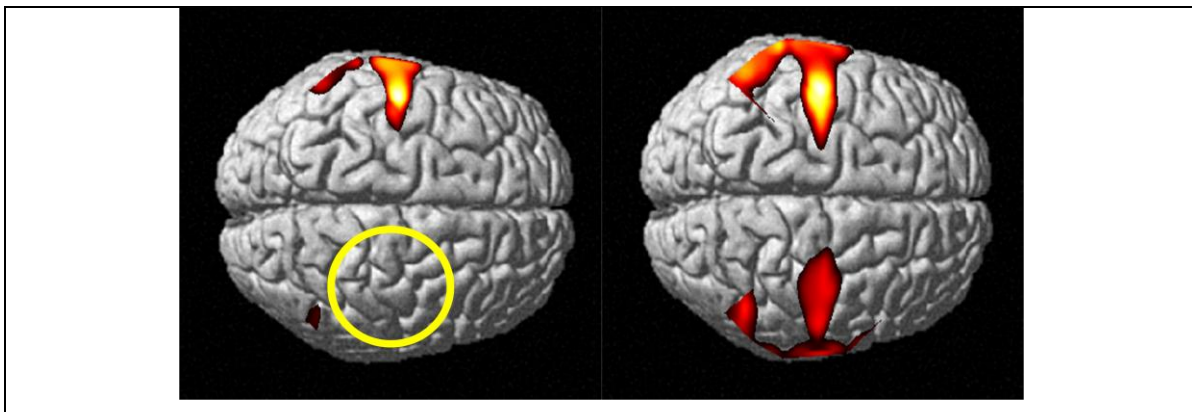
Sempre utilizzando una funzione di MATLAB è stato eseguito un filtraggio a media mobile sull'EMG per eliminare il rumore di fondo; è stato normalizzato e ricampionato per essere utilizzato come regressore nel GLM (figura 38). Questo regressore viene usato in

sostituzione del regressore Task, in quanto è la misura elettrica dell'avvenuta contrazione muscolare, quindi sicuramente più preciso ed accurato.



**Figura 38.** desing matrix relative all'EMG. La prima colonna modella la baseline, la seconda l'elettromiogramma e la terza i periodi di riposo, tranne nella terza prova dove le ultime due colonne sono date dall'EMG dei due avambracci.

Inizialmente si sono eseguiti i contrasti tradizionali per confrontarlo con i risultati dell'analisi tradizionale.

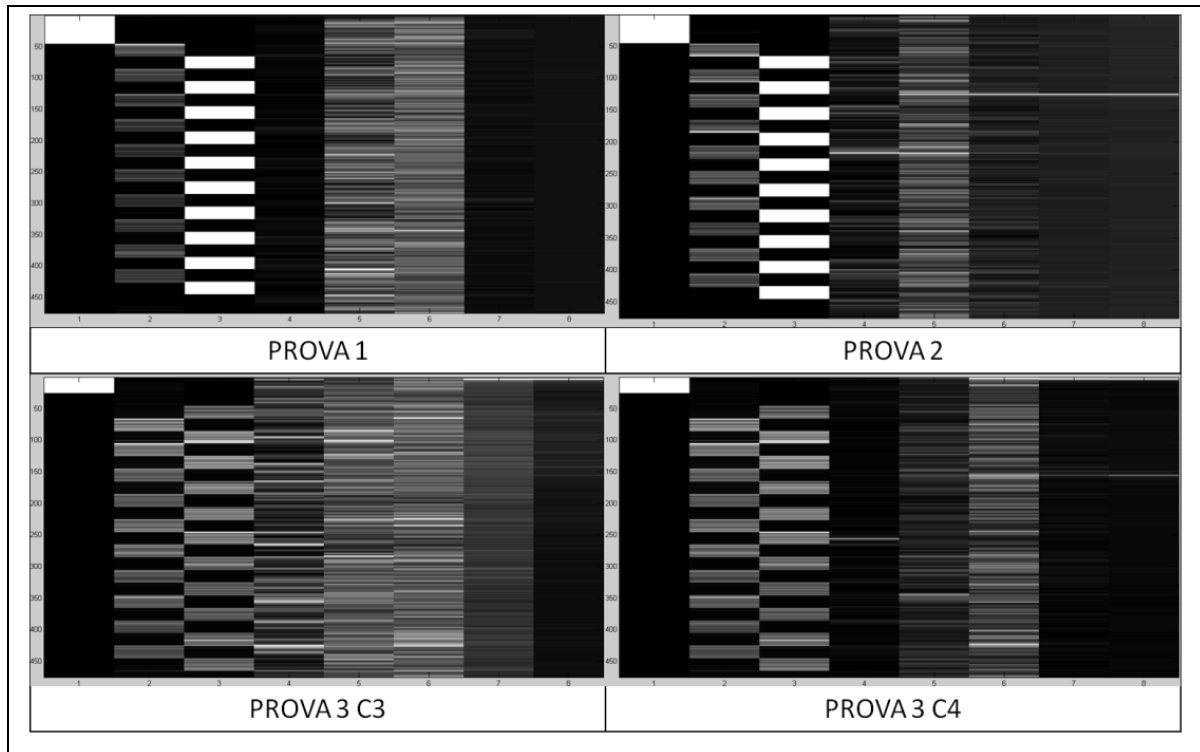


**Figura 39.** Le immagini si riferiscono alla prova 1 in HbO dove è evidenziato come l'utilizzo del regressore EMG (a sinistra) sia più restrittivo del classico block desing (a destra).

Come si può notare dalle immagini (figura 39) la specificità di localizzazione e l'aumento di significatività sono i principali miglioramenti apportati con il regressore muscolare. Tuttavia, basandosi anche sui risultati ottenuti dagli altri soggetti, esso non modifica l'area principale di attivazione cerebrale, per tanto si può ritenere consistente il confronto Task,

in quanto molto spesso la registrazione dell'EMG contiene artefatti molto rumorosi che non si riesce ad eliminare nemmeno con il filtraggio a media mobile.

Successivamente sono state eseguite analisi di integrazione con i regressori EEG (figura 40).



**Figura 40.** In figura le matrici dell'analisi multimodale NIRS-EEG-EMG.

I risultati non mostrano differenze con l'analisi tradizionale integrata con i ritmi EEG se non piccole variazioni di intensità di attivazione (figura 41).



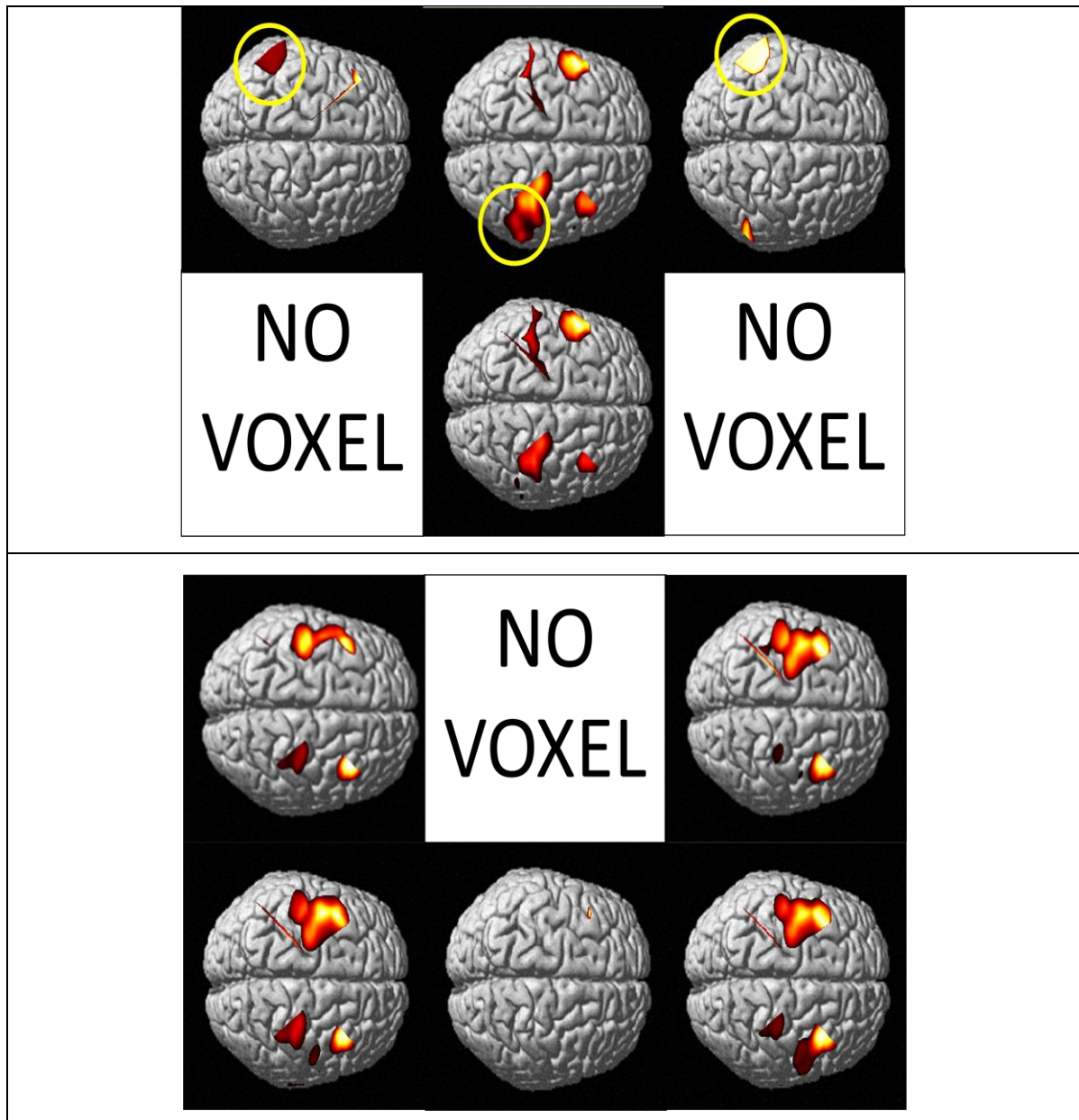


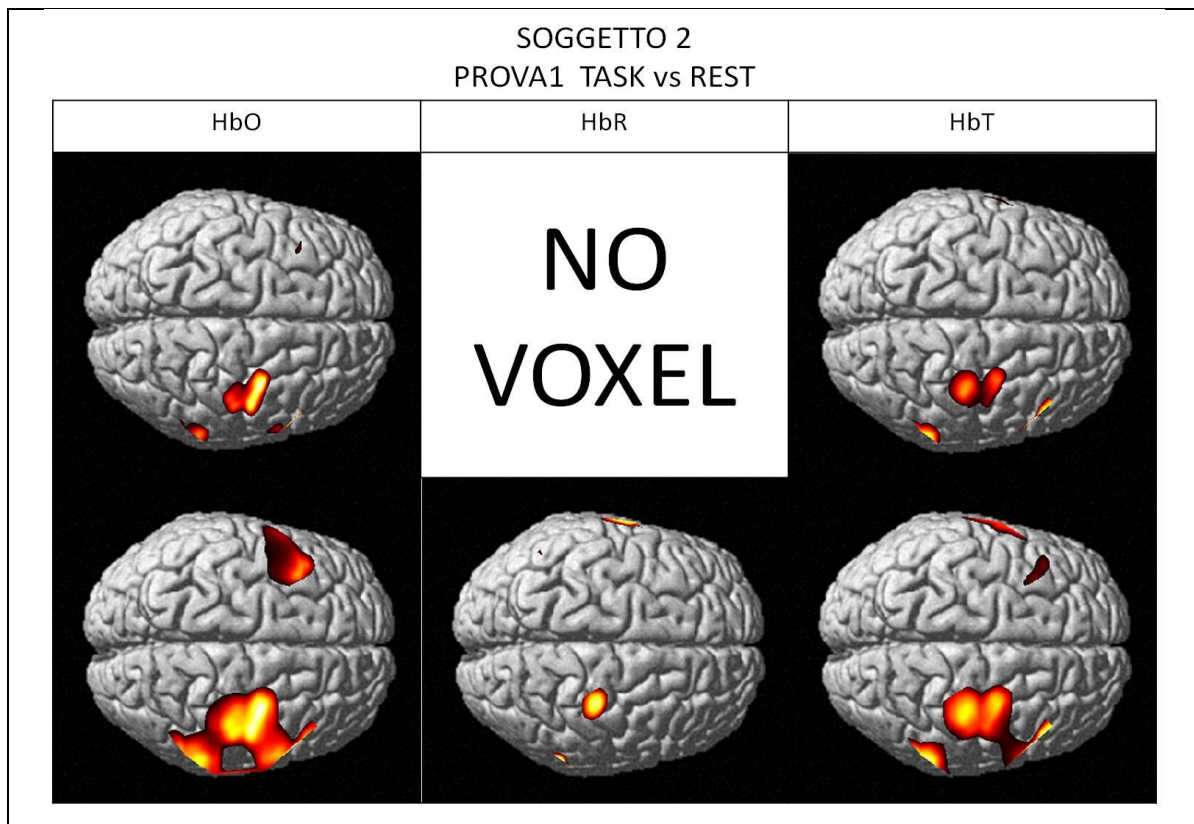
Figura 41. Le immagini relative allo stesso soggetto mostrano in alto il contrasto Alpha ed in basso il contrasto Beta della seconda prova per tutti i tre tipi di emoglobina. In ciascuna immagine la riga in alto si riferisce all'integrazione EEG con il block desing tradizionale mentre sotto l'integrazione EEG è stata fatta con i regressori EMG.

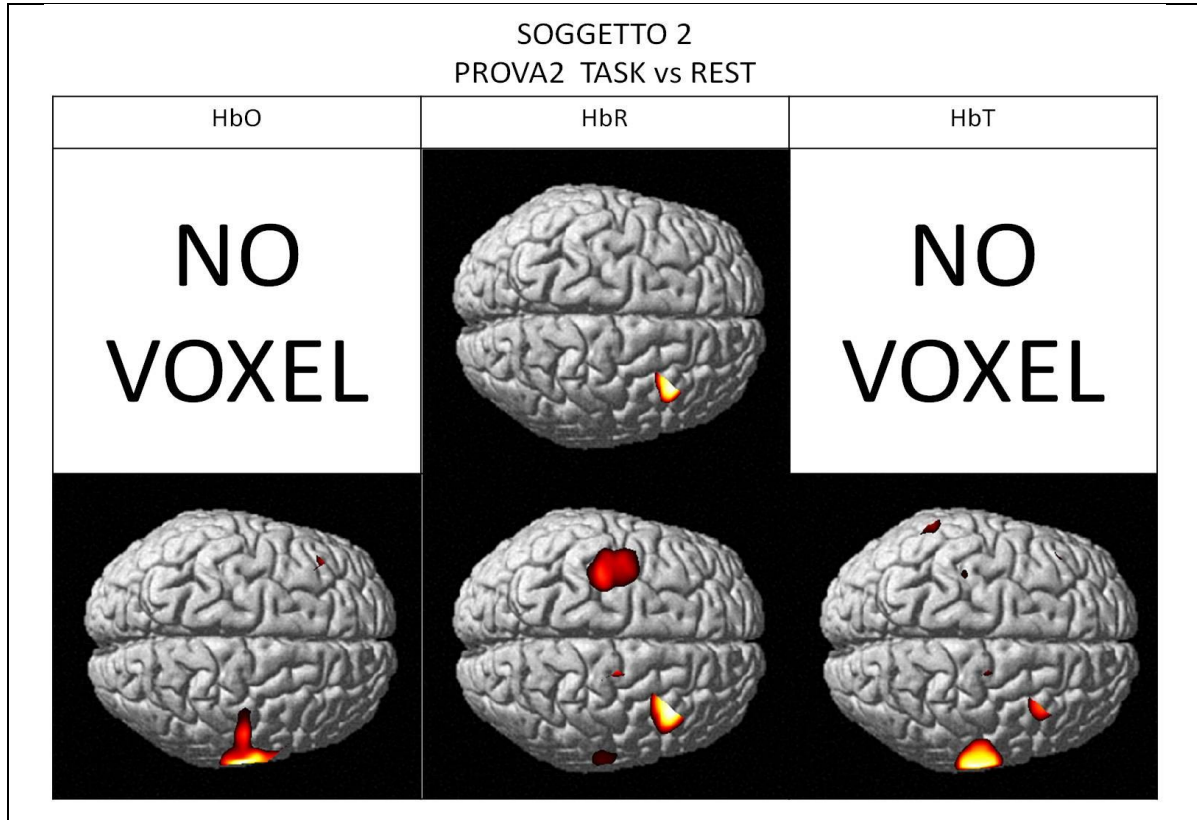
Infatti, per questo soggetto è ben visibile come con il regressore muscolare aumenti la significatività statistica dell'area rispetto al tradizionale; inoltre alcuni artefatti considerati come voxel falsi positivi vengono anche eliminati (cerchiati in figura in HbO e HbT).

### 3.3 - ANALISI SOGGETTI CON PATOLOGIA

Dei 10 soggetti patologici analizzati, il 9 è stato scartato perché la conta fotonica era troppo bassa per poter essere analizzata, mentre i soggetti 5 e 8 sono stati scartati perché i segnali grezzi ottenuti erano troppo rumorosi.

In generale le analisi mostrano risultati molto variabili tra loro per intensità, ed un'estensione di area di attivazione minore in confronto con i soggetti sani volontari; infatti, per l'analisi tradizionale si nota un'attivazione a volte ipsi a volte controlaterale.





**Figura 42. Immagini dei risultati di un soggetto patologico per le prime due prove.**

Come si può osservare in figura 42, nella prima prova l'attivazione risulta ipsilaterale contrariamente a quanto accade nei soggetti sani volontari mentre nella seconda prova l'attivazione cerebrale è localizzata nell'emisfero aspettato.

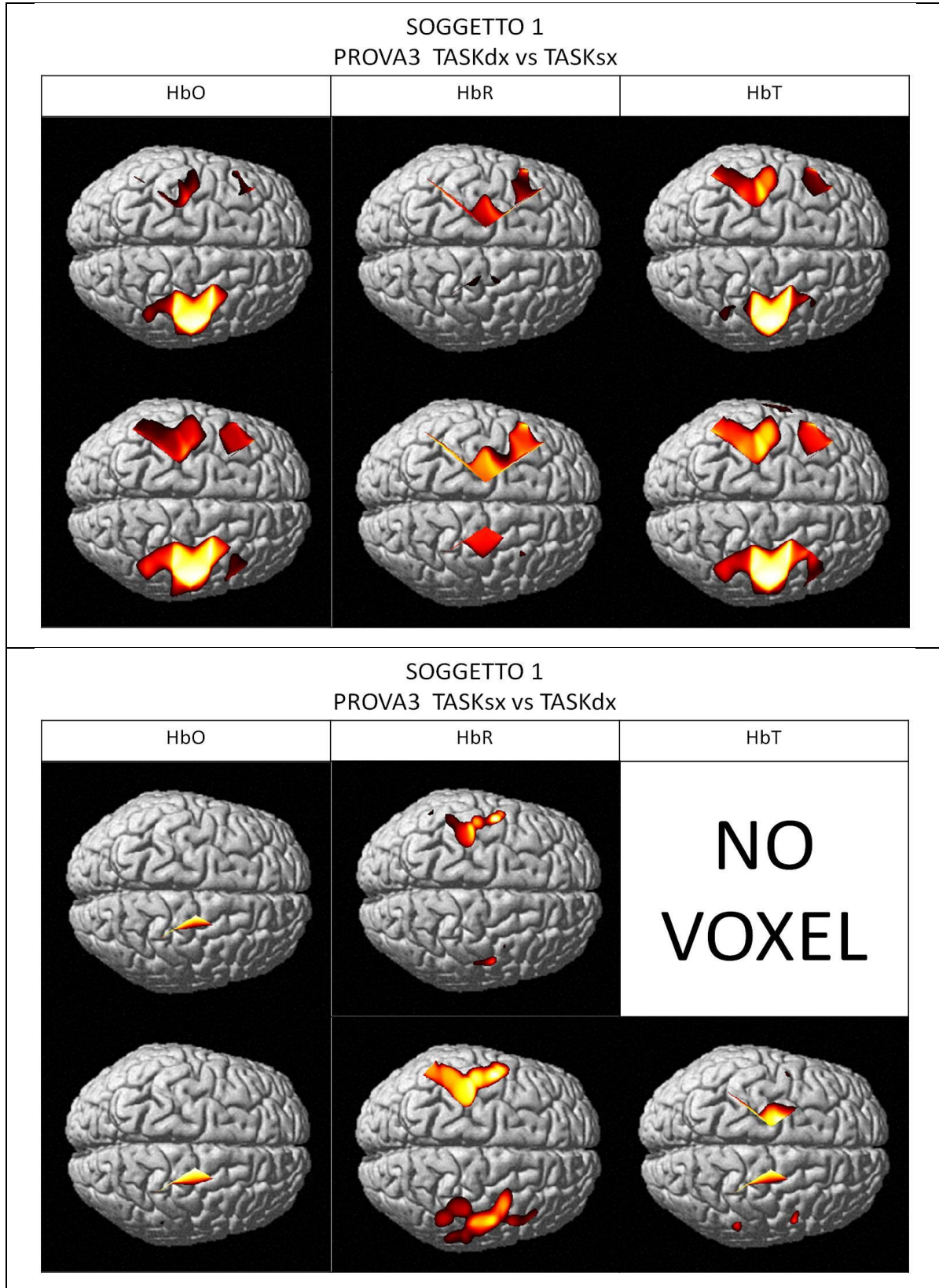


Figura 43. Immagini relative alla terza prova di un soggetto patologico.



Anche nella terza prova le localizzazioni delle attivazioni sembrano non seguono lo schema fisiologico cerebrale (figure 43 e 44).

Per le analisi multimodali le attivazioni risultano molto variabili tra loro e rispetto anche ai soggetti sani volontari.

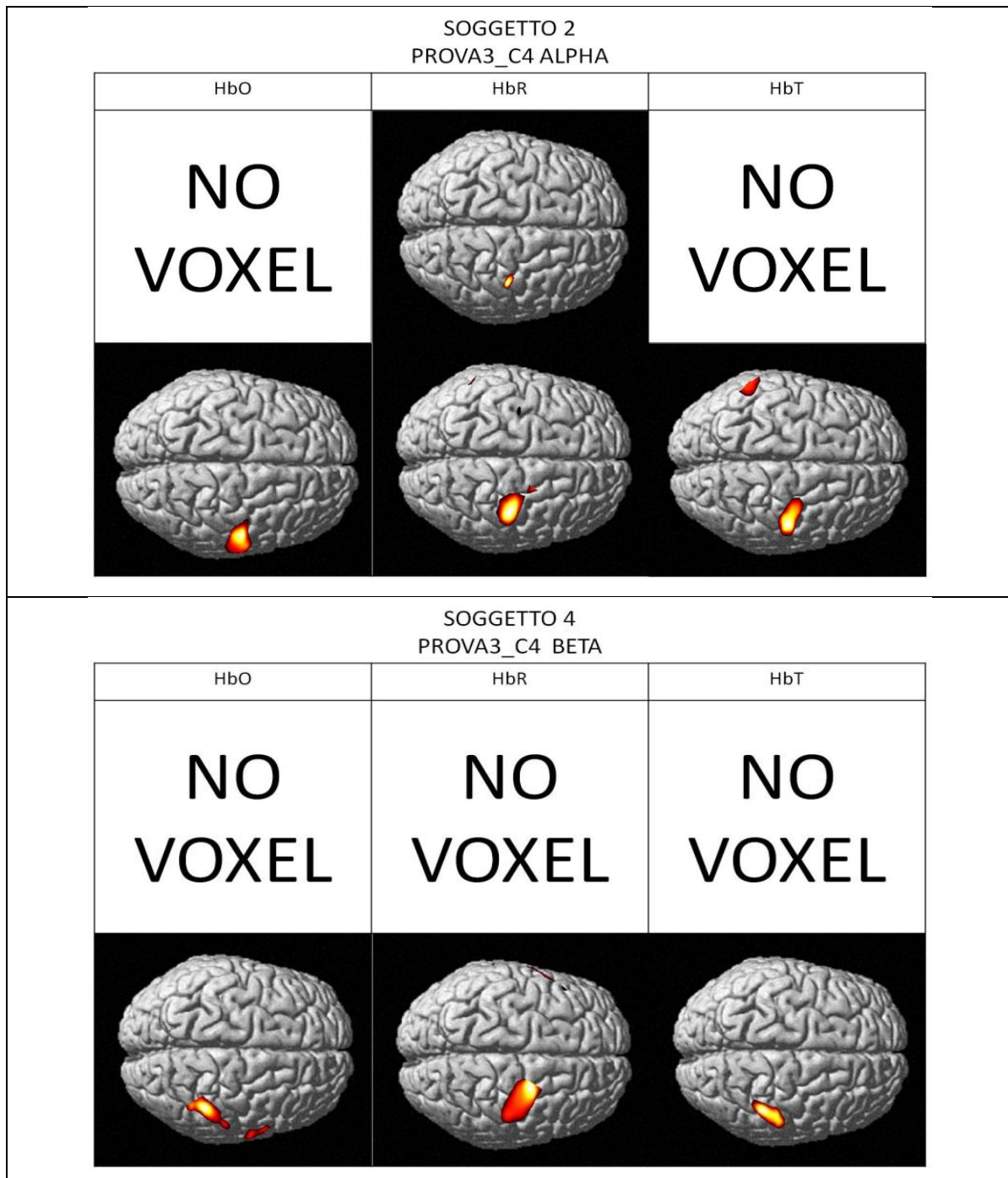
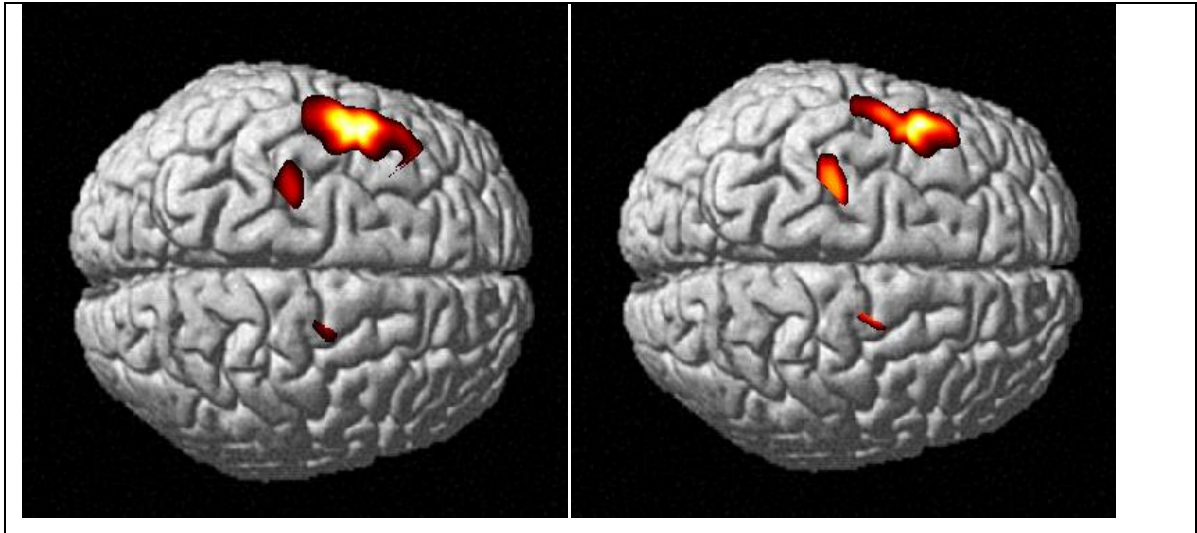


Figura 44. Immagini multimodali di un soggetto patologico.

Per l'analisi con l'EMG le immagini risultano, come per gli altri soggetti, più specifiche; anche in questo caso si può affermare che l'elettromiogramma migliora la qualità delle immagini evidenziando aree di attivazione più intense (significative) ed in generale più focalizzate (figura 45).



**Figura 45. Immagini prodotte dall'integrazione con EMG; a sinistra l'EMG mentre a destra il regressore tradizionale.**

# Capitolo 4

## Discussione

Dagli esiti ottenuti e dalle immagini mostrate in precedenza si può immediatamente osservare che, usando i regressori EEG e EMG nel GLM si trovano correlazioni tra la risposta elettrica e quella metabolica. Questo approccio metodologico è quindi valido e dunque merita studi ed approfondimenti futuri.

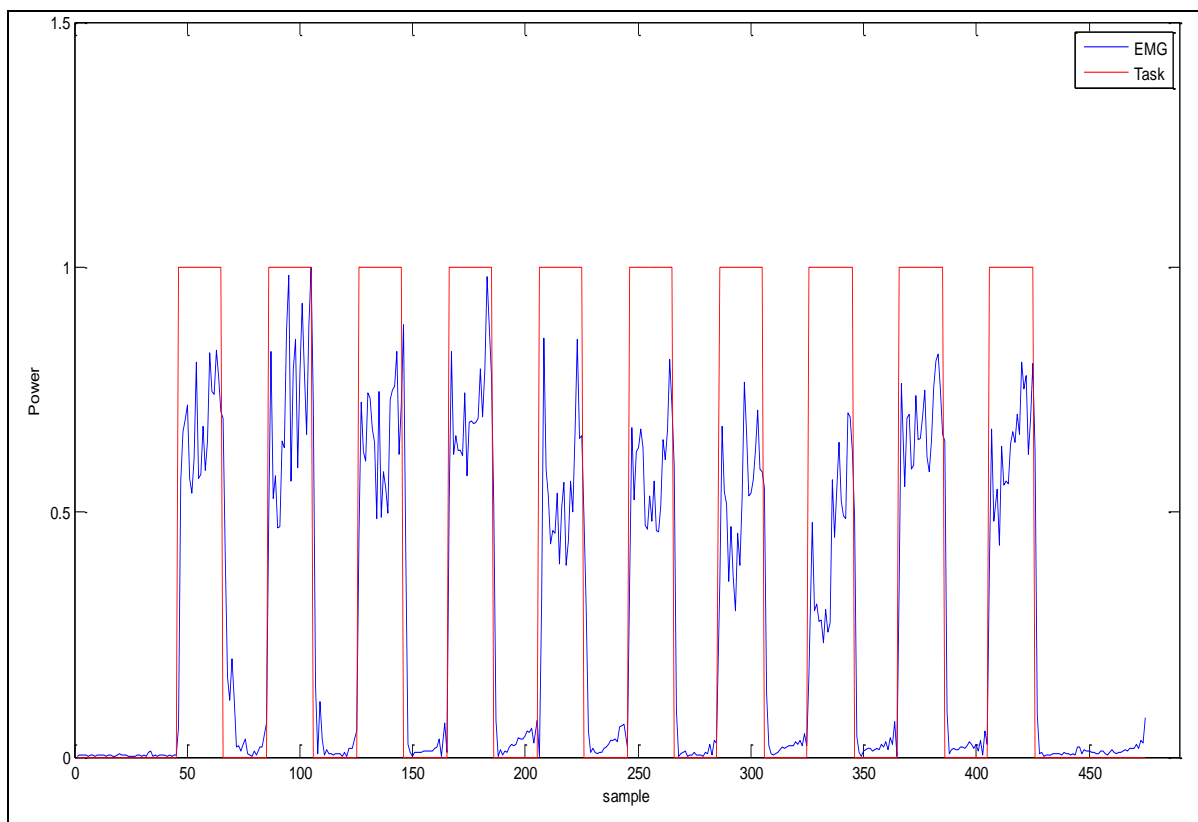
In questo lavoro di tesi, si sono scelti due metodi di elaborazione dei dati grezzi: il metodo dei valori assoluti di concentrazione di emoglobina ed il metodo di analisi delle variazioni, rispetto ad un valore iniziale di riposo, delle concentrazioni di emoglobina. Dai risultati ottenuti con il primo metodo si è notato che la statistica di attivazione delle aree cerebrali in seguito alla stimolazione è più robusta probabilmente in virtù del carattere quantitativo della misura. Il secondo metodo, ha evidenziato aree di attivazione leggermente ridotte e con valori inferiori (alcune immagini non hanno voxel significativi rispetto a quelle con valori assoluti); inoltre, in generale, non si evidenzia in queste immagini un'attivazione maggiore per HbO rispetto all'attivazione HbR, conseguenza del fatto che con questo metodo si valuta la dinamica del segnale, quindi il suo andamento nel tempo rispetto al valore iniziale di attivazione, perciò l'estensione dell'area è indipendente dalla conta fotonica ma dipende dalla variazione dei fotoni che sono transitati nell'area per tutto il tempo della stimolazione. Si è deciso, visto che in generale le immagini con i due approcci non mostravano grosse differenze, di utilizzare sempre il metodo dei valori assoluti.

Per quanto riguarda le analisi multimodali, la desing matrix dei regressori EEG è stata creata inserendo tutti i ritmi cerebrali e non solo quelli contrastati in quanto, da precedenti lavori svolti, i risultati forniti con tutti i ritmi sono più significativi rispetto al considerare solo quelli di interesse (Logotetis et al., 2001). Le aree di attivazione ottenute sono molto meno estese e significative rispetto a quelle dell'analisi tradizionale, questo perché innanzitutto la relazione cercata non è ancora del tutto compresa; esistono in letteratura dei lavori a riguardo (Moosmann et al., 2003 e Nasi et al., 2010). È bene notare comunque che risulta esserci un'elevata interindividualità in ciascuna prova in termini di forma e di estensione della zona di attivazione (Koch et al., 2008): infatti, in ogni individuo il cervello utilizza specifici percorsi per trasmettere e propagare l'informazione; per questo motivo le analisi di gruppo con i regressori EEG risultano poco appropriate, in quanto non possono tenere conto dell'individualità dell'attivazione.

Considerando il regressore EMG si può notare che i risultati sono paragonabili a quelli prodotti dal regressore tradizionale del Task. Tuttavia, l'informazione della contrazione



muscolare è molto importante nel caso in cui la patologia del soggetto in esame sia molto invalidante. Infatti, in tutti quei casi in cui ad un comando di esecuzione del movimento dello stimolo non segue immediatamente la sua messa in atto, è presente una latenza incognita, tra la volontà del movimento e la sua messa in pratica, che il regressore tradizionale non è in grado di comprendere fornendo quindi immagini di attivazione falsate. In patologie non esplorate in questo elaborato, quali paralisi infantile cerebrale, non è possibile sincronizzare lo stimolo con la sua risposta; per questo motivo l'utilizzo dell'attività muscolare è un ottimo sostituto nella ricerca della correlazione con l'attività cerebrale (non solo elettrica ma anche emodinamica; Carr, 1996).



**Figura 46. In rosso il block desing tradizionale, mentre in blu il regressore EMG.**

In questo lavoro di tesi la patologia dei soggetti analizzata non era così invalidante da impedire la pronta esecuzione del compito motorio, per cui anche come si vede dalla figura 46, l'EMG ha lo stesso andamento del blocco di stimolazione.

Va sottolineato però che la tecnologia NIRS presenta anche dei limiti, principalmente intrinseci al principio fisico di funzionamento. Infatti, la conta dei fotoni in uscita è un fattore determinante per la significatività dell'immagine prodotta. La NIRS dunque, come per altre tecniche diagnostiche di indagine che utilizzano lo stesso principio (SPECT, PET, etc.), fornisce immagini a bassa efficienza se è basso il numero di eventi che portano alla costruzione dell'immagine stessa, quindi se i fotoni che arrivano ai detettori sono inferiori di  $10^6$  (Contini et al., 2006). Una prima causa di attenuazione dei fotoni, è il tipo di capelli del soggetto, in quanto un colore scuro assorbe maggiormente la luce rispetto ad un colore più chiaro o, meglio ancora, sarebbe avere un soggetto calvo. Questo problema si presenta per indagini diagnostiche e di ricerca mentre per un monitoraggio post-chirurgico, essendo tutti i soggetti rasati, l'assorbimento è molto meno marcato. Una soluzione plausibile a questo problema potrebbe essere quella di aumentare la potenza della sorgente laser.

Un altro fattore che potrebbe portare una miglioria alle immagini è quello di aumentare il numero di optodi di detezione; in questo modo si otterrebbero delle immagini più specifiche in quanto aumenterebbe la localizzazione spaziale e la sua risoluzione, fornendo aree sempre più focali di attivazione cerebrale in seguito ad una variazione emodinamica; tuttavia, è bene fare un compromesso con il numero di optodi perché aumentarli significa anche aumentare il tempo di montaggio dei probe sullo scalpo del soggetto ed aumentare il tempo di monitoraggio del segnale NIRS. Se il soggetto è sano, una tempistica più prolungata non dovrebbe riscontrare problemi (se non la perdita della pazienza del soggetto stesso) ma nel caso di soggetti patologici sarebbe quasi impensabile da praticare per complicazioni ulteriori.

# Capitolo 5

## Conclusione

Lo studio descritto in questo lavoro di tesi si configura come un tentativo di comprensione dei meccanismi di risposta neurovascolare ed autonoma, a fronte di un compito motorio di handgrip, tramite un approccio multimodale, sia su soggetti sani volontari che su soggetti patologici per poter esaltare possibili differenze di aree di attivazione cerebrale.

Lo studio è caratterizzato da un'elevata innovatività, dovuta all'acquisizione simultanea dei tre segnali EEG, EMG e NIRS. Esistono infatti, pochissimi studi in letteratura scientifica volti alla comprensione del fenomeno di accoppiamento neurovascolare in ambito motorio e un numero ancora più ridotto che valuta, contemporaneamente, anche la risposta autonoma. Un ulteriore fattore di originalità è rappresentato dall'utilizzo di strumentazione NIRS-TR, tecnologia di recente introduzione nello studio dei sistemi fisiologici in generale, operante nel dominio del tempo che utilizza sorgenti laser in grado di generare impulsi con durata di poche decine di picosecondi, sensori veloci e sensibili per rivelare i deboli segnali ottici propagatisi nei tessuti biologici. In questo modo è possibile la discriminazione tra i coefficienti di assorbimento e di diffusione e l'aumento della profondità di penetrazione e della risoluzione spaziale rispetto alle tecniche ottiche in continua.

Il lavoro svolto in questa tesi è un contributo ad un progetto europeo riguardante la ricerca e gli sviluppi sul segnale NIRS; in questo elaborato sono stati sottoposti dei soggetti sani volontari e patologici a delle registrazioni di NIRS ed EEG contemporaneamente durante uno stimolo motorio; il segnale ottenuto è stato elaborato con dei toolbox e specifiche funzioni MATLAB fino ad ottenere delle immagini riguardanti l'attivazione di aree corticali; i risultati prodotti sono stati analizzati con il GLM utilizzando tre tipi di regressori diversi: tradizionali (block desing), ritmi  $\alpha$  e  $\beta$  dell'EEG ed EMG per ottenere inferenze diverse. In questo modo oltre alle informazioni metaboliche conseguenti uno stimolo, già presenti in letteratura, si sono integrate le informazioni elettriche. Sebbene tali informazioni siano poco significative ed interindividuali, risulta chiaro che questo approccio metodologico fornisce dei dati significati. Questo risultato ottenuto deve fungere da spunto per ulteriori ricerche ed approfondimenti. Considerare la contrazione muscolare invece del block desing tradizionale, con il quale per altro ha rilevato alta correlazione, implica non solo una maggior focalizzazione dell'area ma soprattutto una diretta conseguenza dell'attività cerebrale; infatti, in tutti quei soggetti gravemente patologici in cui risulta impossibile sincronizzare la risposta emodinamica con l'attività neuronale per

via della patologia stessa, la correlazione mostrata con l'EMG risulta essere l'unica alternativa possibile e praticabile.

Inoltre per le sue caratteristiche di rilevazione, robuste ai movimenti corporei, tale metodica consente l'acquisizione del segnale anche in presenza di pazienti con crisi epilettiche o sintomi simili che sono soggetti a movimenti improvvisi ed involontari, o di soggetti neonatali.

Con questo spirito di indagine, si potrebbero affiancare alle analisi effettuate altre integrazioni con segnali di valutazione dei parametri respiratori e di variabilità cardiaca, come ad esempio la bilancia simpato-vagale. Rilevando, infatti, un più alto numero di parametri su soggetti sani, questi costituirebbero uno screening di controllo maggiore rispetto ad una popolazione patologica. Ciò avrebbe come fine quello di stabilire in base al deficit individuato patologie neurodegenerative o lesionali.

In conclusione questo lavoro si prospetta come punto di partenza per progressi futuri legati all'apparecchiatura, ai protocolli di taratura, di acquisizione ed elaborazione del segnale e di generazione dello stimolo, ed infine al metodo di elaborazione utilizzato per la costruzione delle immagini di attivazione cerebrale.

# Ringraziamenti

*Innanzitutto vorrei ringraziare il Professor Sergio Cerutti che ha accettato di sviluppare con me questa tesi; vorrei poi ringraziare la Professoressa Anna Maria Bianchi e l'Ingegnere Biomedico Erika Molteni che mi hanno seguito, consigliato e supportato in questo importante lavoro, sempre disponibili, ritagliando uno spazio tra mille impegni, nell'aiutarmi nella ricerca del materiale necessario allo sviluppo dell'elaborato, nel concedermi chiarimenti utili e nel fornirmi preziosi consigli.*

*Un ringraziamento particolare va a tutte quelle persone che in questi due anni mi sono state particolarmente vicine: ai miei compagni di corso ed in particolare ad Andrea, Daniele, Guglielmo, Michele e Paolo perché sono riusciti a distrarmi nelle pause con il "fascino" della briscola chiamata; ai miei amici della Hope con i quali ho condiviso canzoni, emozioni e due settimane di puro divertimento; ai miei compagni di squadra di pallavolo vecchi e nuovi, con i quali ho passato tanti sabato sera, dopo la partita, a mangiare al Tiratardi, facendo a gara per mangiare l'ultima fetta di calabra, o da Mimmo cercando di scegliere la pizza più farcita possibile e poi bere limoncello a più non posso per digerirla; ai miei amici di vecchia data, Lisa, Diego, Gabry, Miky e Max che mi hanno fatto ridere con le loro peripezie quotidiane, legate a paesi sovrappopolati, a case da sistemare, a tavole rotonde e a dinosauri da ufficio; a Pigna, Andrea, Carmine e agli altri amici "bella vita" del venerdì sera, al Due, a parlare di piercing e tatuaggi, con i quali ho anche condiviso una splendida vacanza a Giulianova dove le specialità gastronomiche principali erano "il barattolo" e "lo scampo cocchia nera"; a Cecilia, Giulio e tutto il resto*

*della banda con cui ho condiviso abbondanti grigliate bevendo Nocciolino sotto la pioggia battente; alla mitica squadra dei Rusty Nail, con la quale ho vinto tanti tornei estivi di beach volley conquistando come premi panini con la salamella e patatine fritte; a Paolo, compagno di risate e amico fedele, che con la sua genuina spensieratezza riesce sempre a farmi ridere, anche nei momenti più difficili; a Sara, che nel suo percorso per diventare dottoressa, mi ha letteralmente travolto con una quantità enorme di immagini utilissime; ad Eleonora, la mia ballerina “latina” e compagna di nuoto con la quale ho passato bellissimi momenti sia in piscina che in pista da ballo tra “pica boom” e “susì chiu”.*

*Infine, un grazie sincero e sentito va a tutta quanta la mia famiglia, in particolar modo a mia mamma “Totella” che mi ha sostenuto, incoraggiato e sopportato in questa mia importante esperienza di vita, facendomi crescere al meglio per diventare la persona che sono.*

*Grazie!*

# Bibliografia

- Abdelnour, A. F., & Huppert, T. (2009). Real-time imaging of human brain function by near-infrared spectroscopy using an adaptive general linear model. *NeuroImage*, *46*(1), 133-143. doi:10.1016/j.neuroimage.2009.01.033
- Addison P. S. (2002). The illustrated wavelet transform handbook: Introductory theory and applications in science, engineering, medicine and finance.
- Aihara, T., Takeda, Y., Takeda, K., Yasuda, W., Sato, T., Otaka, Y., . . . Osu, R. (2012). Cortical current source estimation from electroencephalography in combination with near-infrared spectroscopy as a hierarchical prior. *NeuroImage*, *59*(4), 4006-4021. doi:10.1016/j.neuroimage.2011.09.087
- Ancora, G., Maranella, E., Grandi, S., Sbravati, F., Coccolini, E., Savini, S., & Faldella, G. (2011). Early predictors of short term neurodevelopmental outcome in asphyxiated cooled infants. A combined brain amplitude integrated electroencephalography and near infrared spectroscopy study. *Brain & Development*, doi:10.1016/j.braindev.2011.09.008
- Andrews, R. J. (2001). Monitoring for neuroprotection. new technologies for the new millennium. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *939*, 101-113.
- Bari, V., Calcagnile, P. (2007). *STUDIO DELLE RISPOSTE DEL SISTEMA NERVOSO CENTRALE ED AUTONOMO DURANTE UN COMPITO DI ATTEZIONE DIVISA MEDIANTE INTEGRAZIONE DEI SEGNALI EEG, ECG, NIRS*. Laurea Specialistica in Ingegneria Biomedica, Politecnico di Milano.
- Breitwieser, C., Daly, I., Neuper, C., & Muller-Putz, G. R. (2012). Proposing a standardized protocol for raw biosignal transmission. *IEEE Transactions on Bio-Medical Engineering*, *59*(3), 852-859. doi:10.1109/TBME.2011.2174637
- Butti, M., Pastori, A., Merzagora, A., Bianchi, A., Bardoni, A., Branca, V., . . . Reni, G. (2006). Combining near infrared spectroscopy and functional MRI during continuous performance test in healthy subjects. *Conference Proceedings : ...Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. Conference*, *1*, 1944-1947. doi:10.1109/IEMBS.2006.259273
- Canafoglia, L., Ciano, C., Visani, E., Anversa, P., Panzica, F., Viri, M., . . . Franceschetti, S. (2010). Short and long interval cortical inhibition in patients with unverricht-lundborg and lafora body disease. *Epilepsy Research*, *89*(2-3), 232-237. doi:10.1016/j.eplesyres.2010.01.006
- Carr LJ. (1996). Development and reorganization of descending motor pathways in children with hemiplegic cerebral palsy. *Acta Paediatr Suppl*, *416*, 53-7. PubMed PMID: 8997449.
- Cecchinato, A., De Marchi, M., Penasa, M., Casellas, J., Schiavon, S., & Bittante, G. (2012). Genetic analysis of beef fatty acid composition predicted by near-infrared spectroscopy. *Journal of Animal Science*, *90*(2), 429-438. doi:10.2527/jas.2011-4150
- Contini, D., Torricelli, A., Pifferi, A., Spinelli, L., Paglia, F., Cubeddu, R. (2006). Multi-channel time-resolved system for functional near-infrared spectroscopy. *Optics Express*, *14*(12), 5418-5432.



- Cui, X., Bray, S., & Reiss, A. L. (2010). Functional near infrared spectroscopy (NIRS) signal improvement based on negative correlation between oxygenated and deoxygenated hemoglobin dynamics. *NeuroImage*, *49*(4), 3039-3046. doi:10.1016/j.neuroimage.2009.11.050
- Del Bianco, S., Martelli, F., & Zaccanti, G. (2002). Penetration depth of light re-emitted by a diffusive medium: Theoretical and experimental investigation. *Physics in Medicine and Biology*, *47*(23), 4131-4144.
- Fazli, S., Mehnert, J., Steinbrink, J., Curio, G., Villringer, A., Müller, K. R., & Blankertz, B. (2012). Enhanced performance by a hybrid NIRS-EEG brain computer interface. *NeuroImage*, *59*(1), 519-529. doi:10.1016/j.neuroimage.2011.07.084
- Fekete, T., Rubin, D., Carlson, J. M., & Mujica-Parodi, L. R. (2011). The NIRS analysis package: Noise reduction and statistical inference. *PloS One*, *6*(9), e24322. doi:10.1371/journal.pone.0024322
- Ferlazzo, E., Magaudda, A., Striano, P., Vi-Hong, N., Serra, S., & Genton, P. (2007). Long-term evolution of EEG in unverricht-lundborg disease. *Epilepsy Research*, *73*(3), 219-227. doi:10.1016/j.eplepsyres.2006.10.006
- Fox, P. T., & Raichle, M. E. (1986). Focal physiological uncoupling of cerebral blood flow and oxidative metabolism during somatosensory stimulation in human subjects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *83*(4), 1140-1144.
- Gagnon, L., Cooper, R. J., Yucel, M. A., Perdue, K. L., Greve, D. N., & Boas, D. A. (2012). Short separation channel location impacts the performance of short channel regression in NIRS. *NeuroImage*, *59*(3), 2518-2528. doi:10.1016/j.neuroimage.2011.08.095
- Genton, P. (2010). Unverricht-lundborg disease (EPM1). *Epilepsia*, *51 Suppl 1*, 37-39. doi:10.1111/j.1528-1167.2009.02441.x
- Giovagnoli, A. R., Canafoglia, L., Reati, F., Raviglione, F., & Franceschetti, S. (2009). The neuropsychological pattern of unverricht-lundborg disease. *Epilepsy Research*, *84*(2-3), 217-223. doi:10.1016/j.eplepsyres.2009.02.004
- Gucuyener, K., Beken, S., Ergenekon, E., Soysal, S., Hirfanoglu, I., Turan, O., . . . Atalay, Y. (2012). Use of amplitude-integrated electroencephalography (aEEG) and near infrared spectroscopy findings in neonates with asphyxia during selective head cooling. *Brain & Development*, *34*(4), 280-286. doi:10.1016/j.braindev.2011.06.005
- Henson, R., (s.d.). [www.mrc-cbu.cam.ac.uk/.../rikSPM-GLM.ppt](http://www.mrc-cbu.cam.ac.uk/.../rikSPM-GLM.ppt). Tratto da [www.mrc-cbu.cam.ac.uk/.../rikSPM-GLM.ppt](http://www.mrc-cbu.cam.ac.uk/.../rikSPM-GLM.ppt)
- Hirth, C., Obrig, H., Valdueza, J., Dirnagl, U., & Villringer, A. (1997). Simultaneous assessment of cerebral oxygenation and hemodynamics during a motor task. A combined near infrared and transcranial doppler sonography study. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *411*, 461-469.
- Hirth, C., Obrig, H., Villringer, K., Thiel, A., Bernarding, J., Muhlnickel, W., . . . Villringer, A. (1996). Non-invasive functional mapping of the human motor cortex using near-infrared spectroscopy. *Neuroreport*, *7*(12), 1977-1981.
- Holper, L., Biallas, M., & Wolf, M. (2009). Task complexity relates to activation of cortical motor areas during uni- and bimanual performance: A functional NIRS study. *NeuroImage*, *46*(4), 1105-1113. doi:10.1016/j.neuroimage.2009.03.027

- Hoshi, Y., Huang, J., Kohri, S., Iguchi, Y., Naya, M., Okamoto, T., & Ono, S. (2011). Recognition of human emotions from cerebral blood flow changes in the frontal region: A study with event-related near-infrared spectroscopy. *Journal of Neuroimaging : Official Journal of the American Society of Neuroimaging*, 21(2), e94-101. doi:10.1111/j.1552-6569.2009.00454.x; 10.1111/j.1552-6569.2009.00454.x
- Huppert, T. J., Diamond, S. G., Franceschini, M. A., & Boas, D. A. (2009). HomER: A review of time-series analysis methods for near-infrared spectroscopy of the brain. *Applied Optics*, 48(10), D280-98.
- Ikegami, T., & Taga, G. (2008). Decrease in cortical activation during learning of a multi-joint discrete motor task. *Experimental Brain Research. Experimentelle Hirnforschung. Experimentation Cerebrale*, 191(2), 221-236. doi:10.1007/s00221-008-1518-2
- Jang, K. E., Tak, S., Jung, J., Jang, J., Jeong, Y., & Ye, J. C. (2009). Wavelet minimum description length detrending for near-infrared spectroscopy. *Journal of Biomedical Optics*, 14(3), 034004. doi:10.1117/1.3127204
- Jobsis, F. F. (1977). Noninvasive, infrared monitoring of cerebral and myocardial oxygen sufficiency and circulatory parameters. *Science (New York, N.Y.)*, 198(4323), 1264-1267.
- Kamoussi, B., Liu, Z., & He, B. (2005). Classification of motor imagery tasks for brain-computer interface applications by means of two equivalent dipoles analysis. *IEEE Transactions on Neural Systems and Rehabilitation Engineering : A Publication of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*, 13(2), 166-171. doi:10.1109/TNSRE.2005.847386
- Kleinschmidt, A., Obrig, H., Requardt, M., Merboldt, K. D., Dirnagl, U., Villringer, A., & Frahm, J. (1996). Simultaneous recording of cerebral blood oxygenation changes during human brain activation by magnetic resonance imaging and near-infrared spectroscopy. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism : Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 16(5), 817-826. doi:10.1097/00004647-199609000-00006
- Koch SP, Koendgen S, Bourayou R, Steinbrink J, Obrig H. (2008). Individual alpha-frequency correlates with amplitude of visual evoked potential and hemodynamic response. *Neuroimage*. 2008 Jun;41(2):233-42. Epub 2008 Feb 25. PubMed PMID: 18395469.
- Koenraadt, K. L., Munneke, M. A., Duysens, J., & Keijsers, N. L. (2011). TMS: A navigator for NIRS of the primary motor cortex? *Journal of Neuroscience Methods*, 201(1), 142-148. doi:10.1016/j.jneumeth.2011.07.024
- Koskenkorva, P., Hypponen, J., Aikia, M., Mervaala, E., Kiviranta, T., Eriksson, K., . . . Kalviainen, R. (2011). Severer phenotype in unverricht-lundborg disease (EPM1) patients compound heterozygous for the dodecamer repeat expansion and the c.202C>T mutation in the CSTB gene. *Neuro-Degenerative Diseases*, 8(6), 515-522. doi:10.1159/000323470
- Koskenkorva, P., Niskanen, E., Hypponen, J., Kononen, M., Mervaala, E., Soininen, H., . . . Vanninen, R. (2012). Sensorimotor, visual, and auditory cortical atrophy in unverricht-lundborg disease mapped with cortical thickness analysis. *AJNR. American Journal of Neuroradiology*. doi:10.3174/ajnr.A2882
- Lareau, E., Lesage, F., Pouliot, P., Nguyen, D., Le Lan, J., & Sawan, M. (2011). Multichannel wearable system dedicated for simultaneous electroencephalography-near-infrared spectroscopy real-time data acquisitions. *Journal of Biomedical Optics*, 16(9), 096014. doi:10.1117/1.3625575
- Logothetis, N. K., Pauls, J., Augath, M., Trinath, T., & Oeltermann, A. (2001). Neurophysiological investigation of the basis of the fMRI signal. *Nature*, 412(6843), 150-157. doi:10.1038/35084005

- Mehagnoul-Schipper, D. J., van der Kallen, B. F., Colier, W. N., van der Sluijs, M. C., van Erning, L. J., Thijssen, H. O., . . . Jansen, R. W. (2002). Simultaneous measurements of cerebral oxygenation changes during brain activation by near-infrared spectroscopy and functional magnetic resonance imaging in healthy young and elderly subjects. *Human Brain Mapping, 16*(1), 14-23.
- Mento, G., & Bisiacchi, P. S. (2012). Neurocognitive development in preterm infants: Insights from different approaches. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews, 36*(1), 536-555.  
doi:10.1016/j.neubiorev.2011.08.008
- Minati, L., Visani, E., Dowell, N. G., Medford, N., & Critchley, H. D. (2011). Variability comparison of simultaneous brain near-infrared spectroscopy and functional magnetic resonance imaging during visual stimulation. *Journal of Medical Engineering & Technology, 35*(6-7), 370-376.  
doi:10.3109/03091902.2011.595533
- Moosmann, M., Ritter, P., Krastel, I., Brink, A., Thees, S., Blankenburg, F., . . . Villringer, A. (2003). Correlates of alpha rhythm in functional magnetic resonance imaging and near infrared spectroscopy. *NeuroImage, 20*(1), 145-158.
- Nasi, T., Kotilahti, K., Noponen, T., Nissila, I., Lipiainen, L., & Merilainen, P. (2010). Correlation of visual-evoked hemodynamic responses and potentials in human brain. *Experimental Brain Research. Experimentelle Hirnforschung. Experimentation Cerebrale, 202*(3), 561-570.  
doi:10.1007/s00221-010-2159-9
- Nishimura, E., Stautzenberger, J. P., Robinson, W., Downs, T. H., & Downs, J. H., 3rd. (2007). A new approach to functional near-infrared technology. *IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine : The Quarterly Magazine of the Engineering in Medicine & Biology Society, 26*(4), 25-29.
- Nomura, Y., Hazeki, O., & Tamura, M. (1997). Relationship between time-resolved and non-time-resolved beer-lambert law in turbid media. *Physics in Medicine and Biology, 42*(6), 1009-1022.
- Obrig, H., Hirth, C., Junge-Hulsing, J. G., Doge, C., Wenzel, R., Wolf, T., . . . Villringer, A. (1997). Length of resting period between stimulation cycles modulates hemodynamic response to a motor stimulus. *Advances in Experimental Medicine and Biology, 411*, 471-480.
- Onton, J., Westerfield, M., Townsend, J., & Makeig, S. (2006). Imaging human EEG dynamics using independent component analysis. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews, 30*(6), 808-822.  
doi:10.1016/j.neubiorev.2006.06.007
- Perrey, S. (2008). Non-invasive NIR spectroscopy of human brain function during exercise. *Methods (San Diego, Calif.), 45*(4), 289-299. doi:10.1016/j.jymeth.2008.04.005
- Pfurtscheller, G., Bauernfeind, G., Neuper, C., & Lopes da Silva, F. H. (2012). Does conscious intention to perform a motor act depend on slow prefrontal (de)oxyhemoglobin oscillations in the resting brain? *Neuroscience Letters, 508*(2), 89-94. doi:10.1016/j.neulet.2011.12.025
- Roche-Labarbe, N., Zaaimi, B., Mahmoudzadeh, M., Osharina, V., Wallois, A., Nehlig, A., . . . Wallois, F. (2010). NIRS-measured oxy- and deoxyhemoglobin changes associated with EEG spike-and-wave discharges in a genetic model of absence epilepsy: The GAERS. *Epilepsia, 51*(8), 1374-1384.  
doi:10.1111/j.1528-1167.2010.02574.x; 10.1111/j.1528-1167.2010.02574.x
- Rolfe, P. (2000). In vivo near-infrared spectroscopy. *Annual Review of Biomedical Engineering, 2*, 715-754.  
doi:10.1146/annurev.bioeng.2.1.715
- Roy, C. S., Sherrington C. S. (1890). *On the regulation of the blood-supply of the brain, J. Physiol, 11*, 85-108.

- Salvaderi C., . (2003). *ESPERIENZE NELLA MISURA DELL'AFFINITA'DELL'EMOGLOBINA PER L'OSSIGENO SU SANGUE INTERO*. Laurea in Scienze Biologiche, Università degli Studi di Milano.
- Selb, J., Stott, J. J., Franceschini, M. A., Sorensen, A. G., & Boas, D. A. (2005). Improved sensitivity to cerebral hemodynamics during brain activation with a time-gated optical system: Analytical model and experimental validation. *Journal of Biomedical Optics*, *10*(1), 11013. doi:10.1117/1.1852553
- Shibasaki, H. (2008). Human brain mapping: Hemodynamic response and electrophysiology. *Clinical Neurophysiology : Official Journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology*, *119*(4), 731-743. doi:10.1016/j.clinph.2007.10.026
- Shibuya, K., Sadamoto, T., Sato, K., Moriyama, M., & Iwadate, M. (2008). Quantification of delayed oxygenation in ipsilateral primary motor cortex compared with contralateral side during a unimanual dominant-hand motor task using near-infrared spectroscopy. *Brain Research*, *1210*, 142-147. doi:10.1016/j.brainres.2008.03.009
- Tak, S., Yoon, S. J., Jang, J., Yoo, K., Jeong, Y., & Ye, J. C. (2011). Quantitative analysis of hemodynamic and metabolic changes in subcortical vascular dementia using simultaneous near-infrared spectroscopy and fMRI measurements. *NeuroImage*, *55*(1), 176-184. doi:10.1016/j.neuroimage.2010.11.046
- Takeuchi, M., Hori, E., Takamoto, K., Tran, A. H., Satoru, K., Ishikawa, A., . . . Nishijo, H. (2009). Brain cortical mapping by simultaneous recording of functional near infrared spectroscopy and electroencephalograms from the whole brain during right median nerve stimulation. *Brain Topography*, *22*(3), 197-214. doi:10.1007/s10548-009-0109-2
- Tegelberg, S., Kopra, O., Joensuu, T., Cooper, J. D., & Lehesjoki, A. E. (2012). Early microglial activation precedes neuronal loss in the brain of the *cstb*<sup>-/-</sup> mouse model of progressive myoclonus epilepsy, EPM1. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, *71*(1), 40-53. doi:10.1097/NEN.0b013e31823e68e1
- Tong, Y., Bergethon, P. R., & Frederick, B. D. (2011). An improved method for mapping cerebrovascular reserve using concurrent fMRI and near-infrared spectroscopy with regressor interpolation at progressive time delays (RIPTiDe). *NeuroImage*, *56*(4), 2047-2057. doi:10.1016/j.neuroimage.2011.03.071
- Tong, Y., & Frederick, B. D. (2010). Time lag dependent multimodal processing of concurrent fMRI and near-infrared spectroscopy (NIRS) data suggests a global circulatory origin for low-frequency oscillation signals in human brain. *NeuroImage*, *53*(2), 553-564. doi:10.1016/j.neuroimage.2010.06.049
- Tong, Y., Lindsey, K. P., & deB Frederick, B. (2011). Partitioning of physiological noise signals in the brain with concurrent near-infrared spectroscopy and fMRI. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism : Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, *31*(12), 2352-2362. doi:10.1038/jcbfm.2011.100; 10.1038/jcbfm.2011.100
- Toronov, V., Webb, A., Choi, J. H., Wolf, M., Michalos, A., Gratton, E., & Hueber, D. (2001). Investigation of human brain hemodynamics by simultaneous near-infrared spectroscopy and functional magnetic resonance imaging. *Medical Physics*, *28*(4), 521-527.
- V.V.A.A. (2001). *Annals of the New York Academy of Science*, *939*, 101-113.
- Villringer, A., & Chance, B. (1997). Non-invasive optical spectroscopy and imaging of human brain function. *Trends in Neurosciences*, *20*(10), 435-442.

- Villringer, K., Minoshima, S., Hock, C., Obrig, H., Ziegler, S., Dirnagl, U., . . . Villringer, A. (1997). Assessment of local brain activation. A simultaneous PET and near-infrared spectroscopy study. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 413, 149-153.
- Visani, E., Minati, L., Canafoglia, L., Gilioli, I., Granvillano, A., Varotto, G., . . . Panzica, F. (2011). Abnormal ERD/ERS but unaffected BOLD response in patients with unverricht-lundborg disease during index extension: A simultaneous EEG-fMRI study. *Brain Topography*, 24(1), 65-77. doi:10.1007/s10548-010-0167-5
- Visani, E., Minati, L., Canafoglia, L., Gilioli, I., Salvatoni, L., Varotto, G., . . . Panzica, F. (2010). Simultaneous EEG-fMRI in patients with unverricht-lundborg disease: Event-related desynchronization/synchronization and hemodynamic response analysis. *Computational Intelligence and Neuroscience*, , 164278. doi:10.1155/2010/164278
- Wallois, F., Mahmoudzadeh, M., Patil, A., & Grebe, R. (2011). Usefulness of simultaneous EEG-NIRS recording in language studies. *Brain and Language*, doi:10.1016/j.bandl.2011.03.010
- Watanabe, E., Yamashita, Y., Maki, A., Ito, Y., & Koizumi, H. (1996). Non-invasive functional mapping with multi-channel near infra-red spectroscopic topography in humans. *Neuroscience Letters*, 205(1), 41-44.
- Wriessnegger, S. C., Kurzman, J., & Neuper, C. (2008). Spatio-temporal differences in brain oxygenation between movement execution and imagery: A multichannel near-infrared spectroscopy study. *International Journal of Psychophysiology : Official Journal of the International Organization of Psychophysiology*, 67(1), 54-63. doi:10.1016/j.ijpsycho.2007.10.004
- Ye, J. C., Tak, S., Jang, K. E., Jung, J., Jang, J. (2008). NIRS-SPM: statistical parametric mapping for near-infrared spectroscopy. *Neuroimage*, 2009 Jan 15;44(2):428-47. Epub 2008 Sep 12.
- Zhang, D., Hou, X., Liu, Y., Zhou, C., Luo, Y., & Ding, H. (2012). The utility of amplitude-integrated EEG and NIRS measurements as indices of hypoxic ischaemia in the newborn pig. *Clinical Neurophysiology : Official Journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology*, doi:10.1016/j.clinph.2011.10.051.
- Zonta, M., Angulo, M. C., Gobbo, S., Rosengarten, B., Hossmann, K-A. Pozzan, T. et al. (2003). Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. *Nat Neurosci* 6,43-50.