

# POLITECNICO DI MILANO

Scuola di Ingegneria Industriale e dell'Informazione

Corso di Laurea Magistrale in  
Ingegneria Biomedica



Valutazione del livello di coscienza tramite la complessità dei potenziali evocati dalla TMS: visualizzazione ottimizzata dei segnali in tempo reale e verifica di riproducibilità con due diversi amplificatori EEG

Relatori: Prof. Giuseppe Baselli  
Prof. Marcello Massimini  
Dott. Silvia Casarotto

Tesi di Laurea di:

Gabriele RICCIO Matr. Nr. 818645

Anno Accademico 2014 – 2015

# Indice

Indice delle figure .....	4
Indice delle tabelle .....	7
Sommario .....	8
Abstract .....	11
1 INTRODUZIONE & METODI .....	14
1.1 La teoria dell'informazione integrata.....	15
1.2 Stimolazione Magnetica Transcranica (TMS) .....	18
1.2.1 TMS accoppiata a hd-EEG.....	19
1.2.2 Sistema di Stimolazione Cerebrale Navigato (NBS).....	21
1.2.3 Sistemi commerciali .....	24
NEXSTIM .....	24
BRAIN PRODUCTS .....	24
1.3 Come eseguire correttamente un esperimento di TMS/EEG .....	26
1.4 Riproducibilità della risposta corticale evocata dalla TMS.....	29
1.4.1 Divergence Index (DI) .....	29
1.5 Dipendenza dei potenziali TMS-evocati dalla stato di coscienza .....	32
1.5.1 Veglia e sonno NREM .....	33
1.5.2 Sonno REM.....	35
1.5.3 Anestesia .....	37
1.5.4 Pazienti con disturbo severo di coscienza .....	38
1.6 Perturbational Complexity Index (PCI) .....	39
1.6.1 PCI riflette la presenza congiunta di integrazione e differenziazione .....	40
1.6.2 PCI discrimina le condizioni di coscienza e non coscienza nei sani .....	42
1.6.3 PCI discrimina il livello di coscienza nei pazienti con lesioni cerebrali .....	44
1.7 Obiettivi.....	45
2 METODI E MODELLI COMPUTAZIONALI .....	47
2.1 Cleaning mediante ICA .....	47
2.2 Confronto tra i potenziali TMS-evocati .....	49
2.2.1 Baseline test.....	49
2.2.2 Permutazione.....	49
2.2.3 Calcolo dei limiti di significatività.....	51
2.2.4 Calcolo del Divergence Index (DI) .....	51
2.3 Valutazione della complessità e Perturbational Complexity Index (PCI).....	52
2.3.1 Source modeling.....	52
Il modello diretto .....	52

	Stima delle correnti primarie .....	53
	Analisi statistica delle attivazioni corticali .....	56
2.3.2	Complessità dei pattern di risposta.....	58
2.3.3	Algoritmo di Lempel-Ziv per matrici binarie.....	59
2.3.4	Perturbational Complexity Index secondo Lempel-Ziv ( $PCI_{LZ}$ ) .....	60
3	SOFTWARE E SISTEMA DI ACQUISIZIONE .....	62
3.1	Schemi funzionali di progetto .....	62
3.2	Strumenti SW e protocolli di comunicazione.....	63
3.2.1	Matlab Graphical User Interface (GUI) .....	63
3.2.2	Trasferimento dei dati .....	65
3.2.3	Client RDA.....	66
3.3	Struttura della GUI realizzata.....	68
3.4	Modalità di visualizzazione.....	70
3.4.1	Inizializzazione dell'interfaccia utente.....	70
3.4.2	Visualizzazione del dato grezzo (RAW display).....	72
3.4.3	Visualizzazione topografica della media dei trial acquisiti (AVG display) .....	73
3.4.4	Sovrapposizione dei canali EEG e distribuzione del potenziale sullo scalpo .....	75
3.5	Funzionalità disponibili.....	77
4	PROTOCOLLO SPERIMENTALE ED ELABORAZIONE DEL SEGNALE EEG .....	80
4.1	Setup sperimentale .....	80
4.2	Procedura di registrazione dei potenziali TMS-evocati .....	81
4.3	Preprocessing del segnale.....	81
4.3.1	Rimozione delle componenti artefatte tramite ICA.....	83
4.4	Confronto tra le sessioni Nexstim e BrainAmp.....	85
4.5	Calcolo della complessità tramite $PCI_{LZ}$ .....	86
5	RISULTATI .....	87
5.1	Display di visualizzazione e funzionalità della Matlab GUI.....	87
5.2	Potenziali evocati registrati e risultati di preprocessing.....	97
5.3	Valori di Divergence Index (DI) tra sessioni Nexstim e BrainAmp .....	103
5.4	Valori PCI su soggetti sani.....	106
6	DISCUSSIONE E CONCLUSIONI .....	110
7	BIBLIOGRAFIA.....	114

## Indice delle figure

Figura 1.1 Approssimazione empirica della misura teorica di complessità (tratta da Sarasso et al. 2014). .....	17
Figura 1.2 Due coil con forma differente (A e B) e corrispondenti campi elettrici risultanti dalla stimolazione (C e D), (Hallet 2007).....	19
Figura 1.3 Setup utilizzato durante un esperimento di TMS/EEG.....	20
Figura 1.4 Risonanza Magnetica e rendering 3D del soggetto.....	21
Figura 1.5 Distribuzione del campo elettrico indotto sulla corteccia cerebrale al variare dell'orientamento del coil. ....	22
Figura 1.6 Sistema di stimolazione cerebrale navigato della Nexstim.....	24
Figura 1.7 Amplificatore BrainAmp a 32 canali.....	24
Figura 1.8 Tracciato EEG ottenuto con Nexstim (a sinistra) e BrainAmp (a destra) in un intorno dell'istante temporale di stimolazione, con e senza rimozione dell'artefatto. ....	26
Figura 1.9 Effetto di impedenze elevate sui potenziali EEG registrati. ....	27
Figura 1.10 Artefatto muscolare indotto da TMS. ....	27
Figura 1.11 Attivazione di un muscolo temporale indotta dalla TMS e relativa distribuzione di potenziale sullo scalpo. ....	28
Figura 1.12 Distribuzione topografica dei potenziali evocati medi in average reference. ....	28
Figura 1.13 Risultati dei confronti a coppie tra i potenziali evocati di un soggetto rappresentativo, a livello dei sensori (A, B). ....	30
Figura 1.14 Valori DI di ciascuna coppia di sessioni confrontate (asse orizzontale), calcolati per l'intero periodo di post-stimolo (250 ms) e su diverse finestre temporali di interesse. ....	31
Figura 1.15 Cambiamenti nella risposta TMS-evocata durante transizioni dello stato di vigilanza. ....	33
Figura 1.16 Onda lenta del sonno in corteccia parietale. ....	34
Figura 1.17 Risposte corticali alla TMS in un ciclo sonno-veglia. ....	36
Figura 1.18 Risposta corticale alla TMS durante anestesia (midazolam).....	37
Figura 1.19 Risposte corticali TMS-evocate in pazienti con un severo disturbo di coscienza. ....	39
Figura 1.20 PCI misura simultaneamente integrazione e differenziazione (tratta da Casali et al., 2013). ....	41
Figura 1.21 PCI discrimina tra le condizioni di coscienza e di non coscienza nei soggetti sani (tratta da Casali et al., 2013). ....	43
Figura 1.22 PCI discrimina il livello di coscienza in pazienti cerebrolesi. ....	45
Figura 2.1 Valori singoli della matrice dei dati in scala semilogaritmica. ....	48
Figura 2.2 Procedura statistica non parametrica utilizzata per eseguire, a livello del singolo soggetto, confronti a coppie tra i potenziali evocati. ....	50

Figura 2.3 Analisi statistica non parametrica basata su procedura bootstrap utilizzata per determinare l'attività elettrica, correlata alla stimolazione magnetica, delle sorgenti corticali determinate con il source modeling. ....	57
Figura 2.4 Matrice binaria $SS(x,t)$ . ....	58
Figura 2.5 Schema dell' algoritmo utilizzato per calcolare la complessità secondo Lempel-Ziv di una matrice binaria. ....	59
Figura 3.1 Schema d' interazione tra i due elementi del processo, server e client. ....	62
Figura 3.2 Schema del setup hardware utilizzato per la realizzazione della GUI in Matlab. ....	62
Figura 3.3 Ambiente di progettazione GUIDE in Matlab. ....	64
Figura 3.4 Interfaccia utente all' avvio del programma. ....	69
Figura 3.5 Pannello di controllo e pannello Parameters a seguito dell' operazione di inizializzazione dell' interfaccia. ....	70
Figura 4.1 Setup sperimentale utilizzato per l' acquisizione dei potenziali TMS-evocati con i sistemi Nexstim e BrainAmp. ....	80
Figura 4.2 Modulo e fase della risposta in frequenza del filtro utilizzato per rimuovere la componente continua. ....	83
Figura 4.3 Andamento temporale delle componenti indipendenti. ....	84
Figura 4.4 Interfaccia utente realizzata per la visualizzazione e la rimozione delle componenti indipendenti artefatte. ....	85
Figura 5.1 Inizializzazione del avg axes. ....	87
Figura 5.2 Inizializzazione del raw axes. ....	87
Figura 5.3 Scorrimento dei dati EEG grezzi acquisiti con l' amplificatore BrainAmp DC. ....	88
Figura 5.4 Visualizzazione topografica delle risposte corticali medie evocate dalla TMS in average reference, registrate con una cuffia EEG da 64 canali. ....	89
Figura 5.5 Butterfly plot delle risposte corticali medie e topografia del potenziale sullo scalpo a 43.7 ms dopo la stimolazione dell' area pre-motoria dell' emisfero destro. ....	90
Figura 5.6 Risultato delle funzioni HOLD SCREEN e ZOOM TO SELECTION nel display dei dati grezzi. ....	91
Figura 5.7 Ingrandimento attorno all' istante temporale di stimolazione per apprezzare la rimozione dell' artefatto elettromagnetico. ....	92
Figura 5.8 Ingrandimento del canale FC2 nel display AVG e risultato del cursore utilizzato per ricavare i valori di tempo e potenziale di un campione desiderato. ....	92
Figura 5.9 Effetto della rimozione dei canali corrotti da artefatto dalla media dei potenziali corticali evocati. ....	93
Figura 5.10 Risultato dello slider d' amplificazione sul butterfly axes. ....	94
Figura 5.11 Ingrandimento di alcuni canali EEG, prima e dopo aver applicato un filtro di Butterworth con banda passante pari a [1 - 100] Hz sui dati grezzi. ....	95
Figura 5.12 Effetto del filtraggio [1 - 100] Hz sui potenziali corticali medi. ....	96

Figura 5.13 Rimozione dell'artefatto elettromagnetico di stimolazione per il canale 39, acquisito durante un esperimento di TMS/EEG con target in area premotoria. ....	97
Figura 5.14 Butterfly plot dei potenziali evocati in common reference, ottenuti a seguito di una stimolazione in area pre-motoria utilizzando l'amplificatore BrainAmp DC (57 canali).....	97
Figura 5.16 Componente di artefatto muscolare localizzato in zona temporale.....	98
Figura 5.15 Nona componente legata a segnale utile nel caso di stimolazione in area premotoria destra. ....	98
Figura 5.17 Componente legata ai movimenti saccadici del paziente durante l'esperimento di TMS/EEG.....	99
Figura 5.18 Componente che rappresenta l'artefatto di polarizzazione dovuto al gel degli elettrodi. ....	99
Figura 5.19 Butterfly plot e distribuzione istantanea sullo scalpo dei potenziali evocati. ....	100
Figura 5.20 Visualizzazione dei 60 potenziali evocati registrati con i due sistemi commerciali prima e dopo ICA. ....	102
Figura 5.21 Limiti di significatività calcolati per il canale 18 e corrispondenti potenziali evocati medi per le due sessioni Nexstim (traccia nera) e BrainAmp (traccia rossa) nel caso di stimolazione premotoria, prima e dopo ICA. ....	104
Figura 5.22 Ritmo $\alpha$ nella finestra temporale di pre-stimolo del canale 27 (traccia rossa, BrainAmp), rifiutato nel baseline test della procedura statistica utilizzata per confrontare le sessioni Nexstim e BrainAmp.....	105
Figura 5.23 Butterfly plot e distribuzione istantanea sulla corteccia delle correnti primarie stimate. ....	106
Figura 5.24 Matrice SS e percentuale di sorgenti significativamente attive nella finestra temporale $-400 \div 400$ ms nel caso di stimolazione in area premotoria e in area parietale per il soggetto 1. ....	107
Figura 5.25 Evoluzione temporale di PCI per il soggetto 1 nel caso di TMS in area premotoria (107 valori da 8 a 300 ms con una frequenza di campionamenti di 362 Hz). ....	109
Figura 6.1 Valori DI calcolati per l'intero periodo di post-stimolo (250 ms). ....	111
Figura 6.2 Valori PCI per soggetti sani in stato di veglia ( $+8 \div 300$ ms.).....	112

## **Indice delle tabelle**

Tabella 1 Confronto fra le caratteristiche dei sistemi EEG Nexstim e BrainAmp.....	25
Tabella 2 Valori Divergence Index (DI) nella finestra temporale 9 ÷ 250 ms.....	103
Tabella 3 Valori di Perturbational Complex Index (PCI) per le 6 sessioni effettuate sui 3 soggetti sani. .....	108

## Sommario

**Scopo.** Il presente lavoro di tesi si inserisce in una linea di ricerca volta alla comprensione e valutazione del sistema talamo-corticale che è centrale nella determinazione dello stato di coscienza. Il metodo d'indagine si basa sulla registrazione ad alta densità della risposta elettroencefalografica (EEG) alla Stimolazione Magnetica Transcranica (TMS) seguita da una analisi del grado di complessità globale, considerando tutti i canali EEG e tutta la finestra temporale di osservazione, attraverso il Perturbational Complexity Index (PCI). L'estensione allo studio di soggetti in coma è di particolare interesse clinico e ha richiesto di passare a strumentazione portatile al letto del paziente. Questa tesi ha affrontato il problema di una nuova implementazione del software di interfaccia e controllo della qualità del dato in fase di registrazione durante esperimenti di TMS/EEG. Ha inoltre validato preliminarmente la procedura su volontari sani, verificando l'equivalenza con la strumentazione precedente e la ripetibilità dei risultati.

**Background.** La TMS in combinazione con EEG ad alta densità costituisce un metodo innovativo e non invasivo per studiare le proprietà elettrofisiologiche del sistema talamo-corticale umano; essa prevede la possibilità di attivare in maniera diretta un'area corticale ben definita e di registrare con un'elevata risoluzione temporale la risposta elettrica generata a livello locale e nel resto della corteccia cerebrale. Inoltre, l'utilizzo integrato di un sistema di neuro-navigazione consente di controllare in modo anatomicamente preciso e riproducibile i parametri di stimolazione e la posizione degli elettrodi EEG sulle immagini di risonanza magnetica strutturale.

La TMS/EEG fornisce quindi una misura diretta e non invasiva di eccitabilità corticale e di connettività nell'uomo e può essere impiegata per monitorare nel tempo possibili alterazioni patologiche, cambiamenti di plasticità e modifiche nei circuiti corticali indotte dalla terapia. Avere una tecnica di valutazione dell'integrità del sistema talamocorticale che non richiede una collaborazione attiva da parte del soggetto né l'integrità delle vie sensoriali, è vantaggioso per studiare i pazienti con gravi lesioni cerebrali che non sono in grado di interagire con il mondo esterno.

A questo scopo, utilizzando la TMS/EEG, è stata recentemente proposta una misura del livello di coscienza (Perturbational Complexity Index – PCI, Casali et al., 2013) in pazienti non responsivi, che sono difficili da valutare clinicamente perché non comunicano efficacemente attraverso il comportamento, a causa di lesioni sensoriali, motorie e cognitive. Considerazioni teoriche suggeriscono che la coscienza dipende dall'abilità del cervello di generare pattern complessi di attività che sono, al tempo stesso, distribuiti tra aree corticali interagenti (integrati) e differenziati nello spazio e nel tempo (ricchi di informazione). Ad esempio, quando la coscienza svanisce durante il sonno profondo e l'anestesia, l'attività corticale evocata dalla TMS diventa locale e stereotipata. PCI sintetizza in un singolo numero la complessità della risposta EEG alla TMS e si è dimostrato efficace nel distinguere tra veglia e sonno o anestesia e nel descrivere pazienti che emergono dal coma e recuperano gradualmente un livello minimo di coscienza.

Poter valutare il livello di coscienza al letto del paziente comporta la necessità di avere un amplificatore EEG, portatile e compatibile con la TMS, e un sistema dedicato per la visualizzazione on-line dei potenziali evocati che consenta di valutare in tempo reale la qualità del dato acquisito.

Nel presente lavoro di tesi sono stati valutati due diversi amplificatori EEG disponibili nel laboratorio ITCF dell'Università degli Studi di Milano, eXimia di Nexstim e BrainAmp DC di Brain Products. Il primo è stato appositamente realizzato ed ottimizzato per registrare i potenziali evocati dalla TMS; tuttavia, è ingombrante, difficile da trasportare ed attualmente risulta fuori produzione. Il secondo ha dimensioni ridotte ed è portatile, si alimenta a batteria ed è adattabile per diverse applicazioni; tuttavia, presenta diversi limiti nella visualizzazione in tempo reale sia del dato EEG grezzo che dei potenziali evocati da stimolazione magnetica.

**Obiettivi specifici.** Il primo obiettivo del presente lavoro è stato quindi realizzare un'interfaccia grafica (GUI) in Matlab per ottimizzare la visualizzazione in tempo reale dei segnali TMS/EEG registrati con gli amplificatori BrainAmp, al fine di poter valutare la qualità dei potenziali cortico-corticali durante l'esperimento.

Il secondo obiettivo della tesi è stato confrontare i potenziali TMS-evocati acquisiti con il sistema BrainAmp con quelli ottenuti mediante il sistema Nexstim, per verificare che fossero comparabili. A questo scopo, è stato utilizzato il Divergence Index (DI), una misura data-driven della percentuale di campioni significativamente diversi tra una coppia di segnali (Casarotto et al., 2010). Utilizzando gli stessi parametri di stimolazione, sono state confrontate a coppie le dodici sessioni TMS/EEG acquisite con i due sistemi commerciali. I valori DI sono stati calcolati cumulando i campioni significativamente diversi in tutti i canali EEG e nel periodo 0-250 ms post-stimolo

Dopo aver implementato uno strumento software utile per eseguire esperimenti di TMS/EEG con il sistema BrainAmp e verificato che le risposte evocate acquisite fossero confrontabili con quelle ottenute con il sistema di riferimento Nexstim, il terzo ed ultimo obiettivo del presente lavoro è consistito nel calcolare e confrontare i valori PCI delle sessioni eseguite con i due sistemi EEG.

**Risultati.** L'interfaccia utente è stata implementata e validata su un gruppo di soggetti sani ed ha consentito di verificare on-line se la stimolazione fosse in grado di generare un'effettiva attivazione corticale priva di artefatti. Dal confronto dei potenziali TMS-evocati acquisiti con i due sistemi commerciali, risulta che le risposte corticali sono significativamente simili. I valori DI calcolati, infatti, rientrano nella variabilità biologica che contraddistingue due sessioni eseguite in successione (nello stesso giorno o a distanza di una settimana) con lo stesso amplificatore senza modificare i parametri di stimolazione (Casarotto et al., 2010). Infine, i valori PCI calcolati risultano pressoché uguali tra le sessioni acquisite con i due sistemi EEG: il valore medio è pari a  $0.54 \pm 0.01$  nella sessione Nexstim e uguale a  $0.53 \pm 0.03$  nella sessione BrainAmp, con una differenza massima di 0.05. Inoltre, essi rientrano all'interno della distribuzione di valori PCI ottenuta da Casali et al. (2013) e da Casarotto et al. (in preparazione) per soggetti sani in stato di veglia.

**Conclusion.** Il presente lavoro ha permesso di compiere alcuni passi importanti verso lo sviluppo di uno strumento che, al letto dei pazienti, possa fornire un'immediata valutazione della complessità dei potenziali evocati dalla TMS e quindi del livello di coscienza. Ha inoltre confermato, pur su di un piccolo campione di soggetti sani, la robustezza della valutazione PCI, rispetto a variazione dei parametri della TMS, premessa centrale per un indice volto a quantificare la comprimibilità della risposta corticale. Pertanto, alla luce del lavoro svolto e dei risultati raggiunti, risulta promettente l'estensione futura all'ambito di valutazione clinica e di follow-up dei soggetti in stati di coma.

## Abstract

**General purpose.** The present work is part of a research line aimed at understanding and evaluating the thalamocortical system that is central to the assessment of the state of consciousness. The method of investigation is based on high-density recording of the electroencephalographic response (EEG) to Transcranial Magnetic Stimulation (TMS) followed by an analysis of the degree of overall complexity, considering all EEG channels and throughout the observation window, using Perturbational Complexity Index (PCI). The extension to the study of coma subjects is of particular clinical interest and required portable instrumentation at the bedside. This thesis addressed the issue of a new implementation of the software for visualization and quality control of data during TMS/EEG experiments. It also validated the preliminary procedure in healthy volunteers, ensuring the equivalence with the previous instrumentation and the repeatability of results.

**Background.** TMS in combination with high-density EEG is an innovative and non-invasive technique to study the electrophysiological properties of the human thalamocortical system; it allows to activate a well defined cortical area directly and to record with high temporal resolution the electrical response generated over the entire cerebral cortex. Furthermore, the integrated use of a neuro-navigation system provides a reproducible and anatomically accurate control of the stimulation parameters and of the location of EEG electrodes on MRI images.

TMS/EEG therefore provides a direct and non-invasive measure of cortical excitability and connectivity in humans and may be employed to track over time pathological alterations, plastic changes and therapy-induced modifications in cortical circuits. The possibility of evaluating the integrity of the thalamocortical system, independently from the active cooperation of the subject and from the integrity of sensory-motor pathways, is crucial for studying patients with severe brain injury who are not able to interact with the external environment.

With this aim, TMS/EEG has been recently applied to develop a novel measure of the level of consciousness (Perturbational Complexity Index - PCI, Casali et al., 2013) applicable in non-responsive patients, whose clinical evaluation is challenging because they cannot effectively communicate through behavior due to sensory, motor and cognitive injuries. Theoretical considerations suggest that consciousness depends on the brain's ability to sustain complex activity patterns that are, at once, distributed among interacting cortical areas (integrated) and differentiated in space and time (information-rich). When consciousness fades away, e.g. during deep sleep or anesthesia, cortical activity evoked by TMS becomes local and stereotypical. PCI quantifies in a single number the complexity of EEG response to TMS and has been shown to effectively distinguish between wake and sleep or anesthesia and to describe patients who recover minimal signs of consciousness after coma.

Assessing the level of consciousness at the bedside of brain-injured patients requires an EEG amplifier that is portable and compatible with TMS, and also a dedicated system for properly displaying the evoked potentials and for evaluating data quality in real time.

In the present work two different EEG amplifiers have been evaluated, both available at the ITCF laboratory of University of Milan, eXimia of Nexstim and BrainAmp DC of Brain Products.

The first was specifically designed and optimized to record TMS-evoked potentials; however, it is bulky, difficult to transport and it is currently out of production. The second is small and portable, battery-powered and can be adapted for different applications; however, it has several limitations in the real-time display of both raw data EEG and TMS-evoked potentials.

**Specific objectives.** The first objective of this study was therefore to develop and implement a Matlab graphical user interface (GUI) to optimize the real-time visualization of TMS/EEG signals recorded with BrainAmp amplifiers, in order to provide a useful tool to assess the quality of cortico-cortical potential during the experiment.

The second aim of the thesis was to compare the TMS-evoked potentials acquired with the BrainAmp system with those obtained with the Nexstim system, to verify if they were comparable.

To this aim, we used the Divergence Index (DI), a data-driven measure of the percentage of samples that significantly differ between a pair of signals (Casarotto et al., 2010). Using the same stimulation parameters, twelve TMS/EEG sessions, acquired with the two commercial systems, were pairwise compared. DI values were computed cumulating significantly different samples in all EEG channels and in the post-stimulus period from 0 to 250 ms.

After implementing a useful software tool to run TMS/EEG experiments with BrainAmp system and verifying that the evoked responses were comparable with those obtained with the Nexstim reference system, the third and final objective of this work consisted in computing and comparing the PCI values of the TMS/EEG sessions acquired with the two EEG systems.

**Results.** The user interface has been implemented and tested on a group of healthy subjects and allowed to check online whether the stimulation was able to generate an effective and artifact-free cortical activation. From comparison of TMS-evoked potentials acquired with the two commercial systems, it appears that cortical responses are significantly similar. Specifically, DI values fell within the biological variability that distinguishes two subsequently recorded sessions (either on the same day or one-week far apart) with the same amplifier without changing the stimulation parameters (Casarotto et al., 2010). Finally, the calculated PCI values are almost equal between sessions recorded with the two EEG systems: the average value is equal to  $0.54 \pm 0.01$  in the Nexstim session and equal to  $0.53 \pm 0.03$  in the BrainAmp session, with a maximum difference of 0.05. Furthermore, they fell within the distribution of PCI values obtained by Casali et al. (2013) and by Casarotto et al. (In preparation) for healthy awake subjects.

**Conclusion.** This study allowed to make some important steps towards the development of a tool that, at the patients bedside, would provide an immediate assessment of the complexity of TMS-evoked potentials and, therefore, of the level of consciousness. It also confirmed, although on a small sample of healthy subjects, the robustness of PCI, with respect to variation of TMS parameters, central premise for an index face to quantify the compressibility of cortical response to TMS. Therefore, in light of the work done and the results achieved, the future extension in scope of clinical evaluation and follow-up of coma patients is promising.

# 1 INTRODUZIONE & METODI

Il presente lavoro di tesi si inserisce nella linea di ricerca del Laboratorio ITCF (Ospedale “L.Sacco”, Università di Milano), volta alla comprensione e valutazione del sistema talamo-corticale che è centrale nella determinazione dello stato di coscienza. Il metodo d’indagine è basato sulla registrazione ad alta densità della risposta elettroencefalografica (EEG) alla stimolazione magnetica Transcranica (TMS) seguita da un’analisi del grado di complessità globale, considerando tutti i canali EEG e tutta la finestra temporale di osservazione, attraverso il Perturbational Complexity Index (PCI). Ai fini di questo lavoro, è importante sottolineare alcune caratteristiche fondamentali del set-up sperimentale e delle procedure d’analisi applicate: 1) in fase di stimolazione/registrazione è necessario controllare in tempo reale l’efficacia dei parametri di stimolazione, stante l’ovvia variabilità morfologica soggettiva; 2) deve essere riscontrata una buona sensibilità dell’EEG evocato rispetto ai parametri di stimolazione (target TMS, intensità, angolo) e una buona ripetibilità nel tempo; a tale scopo viene ricavato un indice di differenza (Divergence Index, DI) fra diverse sessioni sperimentali, che deve risultare alto alle variazioni di parametri (sensibilità) e basso a pari parametri nel tempo (ripetibilità) 3) indipendentemente dai parametri di stimolazione, PCI deve garantire una valutazione efficace della complessità della risposta del sistema talamo-corticale ad una stimolazione diretta, che correli con lo stato di coscienza del soggetto. La verifica di questi requisiti si impone pertanto nel caso in cui la strumentazione venga modificata.

L’estensione allo studio di soggetti in coma, in collaborazione con l’Istituto Palazzolo, Milano, della Fondazione Don Gnocchi, è di particolare interesse clinico ma ha richiesto di passare a strumentazione portatile al letto del paziente. Questa tesi ha quindi affrontato il problema di una nuova implementazione del SW di interfaccia e controllo della qualità del dato in fase di registrazione. Ha inoltre validato preliminarmente la procedura su volontari sani, verificando l’equivalenza con la strumentazione precedente e la ripetibilità dei risultati.

Il sistema nervoso è la sede che sovrintende a quelle funzioni di ordine superiore che rendono unico ed irripetibile l’essere umano e che lo contraddistinguono dagli esseri di tutte le altre specie.

Esso è costituito da circa 100 miliardi di cellule nervose primarie, i **neuroni**, che, assieme alle cellule gliali, compongono il tessuto nervoso. I neuroni sono interconnessi tra di loro tramite un numero elevatissimo di connessioni e sono caratterizzati da una struttura altamente complessa evolutasi per favorire la ricezione, l’integrazione e la trasmissione degli impulsi nervosi.

I segnali elettrici, che il sistema nervoso impiega per ricevere, analizzare e trasmettere le informazioni, sono largamente stereotipati indipendentemente dalla loro origine, quindi l’informazione trasportata non dipende dalla morfologia del segnale, ma dal cammino che quel segnale percorre all’interno del cervello.

Essi sono misurabili in maniera indiretta sul cuoio capelluto tramite l'**elettroencefalografia (EEG)**, una tecnica che consente di registrare con ottima risoluzione temporale (~ ms) l'attività elettrica cerebrale a riposo di qualsiasi soggetto. In particolare, le onde EEG rappresentano oscillazioni di differenze di potenziale fra punti diversi del volume extracellulare, generate dalle correnti ioniche associate ai potenziali post-sinaptici eccitatori o inibitori dei neuroni piramidali della corteccia cerebrale. Questi ultimi sono tutti orientati con il loro asse longitudinale in senso perpendicolare alla superficie del cervello. Gli estremi dei loro dendriti apicali sono situati nello strato più superficiale della corteccia, mentre i loro corpi cellulari risiedono molto più profondamente all'interno della stessa. Quando soggetto ad influenze sinaptiche, ogni neurone piramidale si comporta come un minuscolo dipolo, i cui poli negativo e positivo si trovano in corrispondenza, rispettivamente, del punto in cui la corrente sinaptica entra nel neurone e del punto in cui la corrente ne esce. La stratificazione dei neuroni piramidali e l'organizzazione parallela dei loro dendriti apicali fanno sì che gli effetti minuscoli dei singoli dipoli, ciascuno corrispondente ad un singolo neurone, possano sommarsi fra di loro senza annullarsi qualora siano almeno in parte sincronizzati, generando dipoli macroscopici e differenze di potenziale sufficientemente grandi da essere registrate a distanza.

Le onde EEG rappresentano quindi il risultato di medie temporali e spaziali degli effetti combinati di migliaia di micro-dipoli contigui, cioè di migliaia di neuroni piramidali appartenenti alla stessa regione corticale.

I parametri fondamentali dell'elettroencefalogramma sono la **frequenza** e l'**ampiezza** delle oscillazioni di potenziale (Baldissera, 2000).

L'importanza primaria dell'EEG per la fisiologia sta nel fatto che a diversi stati comportamentali o di vigilanza del sistema nervoso corrispondono tracciati EEG diversi.

## 1.1 La teoria dell'informazione integrata

Dall'inizio del secolo scorso fino ad oggi, le scienze e, in particolare, le neuroscienze hanno cercato di comprendere il significato intrinseco dei segnali elettrici neuronali e di rispondere a numerose domande circa la struttura del cervello e la sua organizzazione funzionale.

Uno degli ambiti più affascinanti delle neuroscienze è sicuramente quello rivolto allo studio della **coscienza**, ovvero tutto ciò di cui abbiamo esperienza e che scompare in larga parte quando ciascuno di noi cade addormentato in un sonno profondo senza sogni (Tononi e Massimini, 2008).

Sebbene non siano ancora svelati i correlati neurali della coscienza, è certo, però, che il sistema talamo-corticale svolga un ruolo necessario per la sua generazione (Tononi, 2004).

Di recente è stata formulata una teoria matematica, e dunque verificabile, della coscienza che prende il nome di **Teoria dell'Informazione Integrata** (Tononi, 2004). Secondo la **IIT**, la coscienza sarebbe basata sulla capacità del sistema talamo-corticale di integrare informazione. Tale capacità, e con essa il livello di coscienza, fluttuerebbe in dipendenza dello stato del sistema talamo-corticale, raggiungendo i livelli più bassi durante il sonno profondo e l'anestesia e i livelli più alti durante la veglia (Tononi e Massimini, 2008).

L'origine di questa definizione risiede nell'osservazione che l'esperienza cosciente è **differenziata**, ovvero ricchissima di informazione, ed **integrata**, nel senso che ogni stato di coscienza è esperito come una singola entità.

Secondo tale teoria, il sistema talamo-corticale sarebbe organizzato secondo due principi fondamentali: **specializzazione funzionale e integrazione funzionale** (Friston, 2002). Il primo dei due prevede che diverse aree o nuclei del sistema talamo-corticale svolgano compiti diversi mentre il secondo stabilisce che esse siano soltanto parzialmente segregate dal punto di vista funzionale e che, in realtà, interagiscano tra di loro tramite fasci di fibre, o assoni, a lungo raggio.

Il grado di *integrazione funzionale* tra popolazioni di neuroni specializzati è stato rilevato sino ad oggi considerando la **connettività funzionale**, ovvero il livello di correlazione temporale tra due eventi neurofisiologici generati dalle due popolazioni. Una elevata connettività funzionale, tuttavia, può derivare dalla presenza di un input comune alle due popolazioni e dunque, non corrispondere ad un livello elevato di *integrazione funzionale*. In realtà, la misura più affidabile di *integrazione funzionale* è la **connettività effettiva**, ovvero il grado di influenza che l'attività di una popolazione neuronale può avere sull'attività di un'altra popolazione neuronale (Friston, 2002).

La teoria propone anche una misura dell'informazione integrata, chiamata **phi** ( $\Phi$ , dove la barra verticale della lettera greca indica informazione e il cerchio l'integrazione). Per misurare  $\Phi$  occorre stimolare, in tutti i modi possibili, i vari elementi che costituiscono il sistema e osservare le risposte che vengono generate tramite le interazioni tra questi elementi. In questo modo,  $\Phi$  misura la quantità di stati che un sistema fisico è in grado di discriminare come un tutt'uno.

Se la specializzazione funzionale è persa, sostituendo una connettività eterogenea con una omogenea, oppure se l'integrazione funzionale è persa, riarrangiando le connessioni a formare piccoli moduli indipendenti, il valore di  $\Phi$  diminuisce considerevolmente (Tononi and Sporns, 2003).

L'EEG è sicuramente una delle tecniche d'elezione per valutare in maniera non invasiva lo stato del sistema talamo-corticale nell'uomo; dalla semplice osservazione dell'EEG spontaneo è possibile inferire, ad esempio, lo stato di vigilanza del soggetto ma non è facile poter dire se più circuiti siano coinvolti nella generazione di oscillazioni ad una determinata frequenza ed eventualmente in che modo si trovino ad interagire.

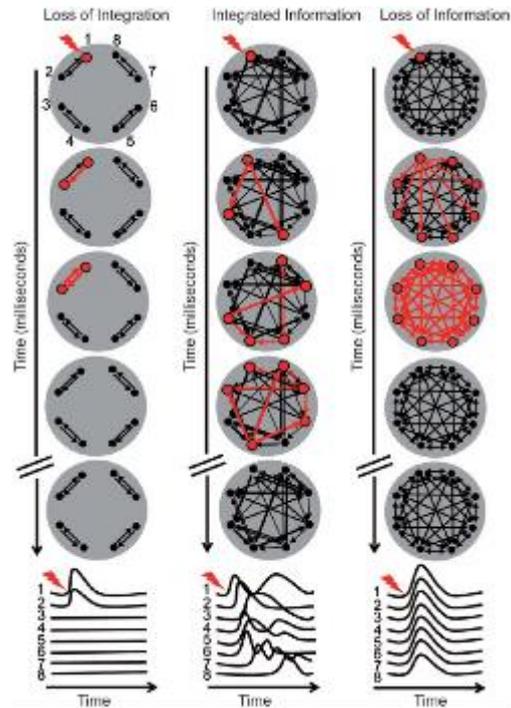


Figura 1.1 Approssimazione empirica della misura teorica di complessità (tratta da Sarasso et al. 2014).

A sinistra, perdita di integrazione: la perturbazione del primo elemento determina un'attivazione locale, di breve durata che coinvolge solo gli elementi connessi a quello perturbato.

Al centro, informazione integrata: solo in questo caso, la perturbazione del primo elemento determina una risposta diffusa ma complessa, di lunga durata che coinvolge diversi elementi in diversi intervalli temporali.

A destra, perdita di informazione/differenziazione: la perturbazione del primo elemento determina un'attivazione diffusa che coinvolge tutti gli elementi contemporaneamente per poi svanire.

## 1.2 Stimolazione Magnetica Transcranica (TMS)

Alla luce della IIT, l'abilità di integrare informazione può essere dimostrata con certezza solo da un punto di vista **causale**. Per fare ciò, è necessario utilizzare **un approccio di tipo perturbazionale** ed esaminare in che misura i diversi elementi che compongono il sistema sono in grado di interagire causalmente come un tutt'uno (integrazione) per produrre risposte che sono complesse e differenziate (informazione) (Massimini et al., 2009). Tra l'altro, questa indagine dovrebbe essere condotta stimolando direttamente la corteccia cerebrale per evitare possibili filtri o blocchi sottocorticali.

Infine, poiché le interazioni causali tra neuroni talamocorticali si sviluppano su una scala di frazioni di secondo, proprio come la coscienza fenomenica, è molto importante registrare gli effetti neurali della perturbazione con l'appropriata risoluzione temporale.

In sostanza, un metodo ottimale dovrebbe prevedere la possibilità di **attivare in maniera selettiva un sottoinsieme di neuroni corticali** ben definito e misurare, con buona risoluzione spazio-temporale, gli effetti prodotti da questa perturbazione locale nel resto del sistema talamocorticale.

Oggi, tale metodo è disponibile ed è basato sull'impiego combinato di **Stimolazione Magnetica Transcranica (TMS)**, per perturbare direttamente un'area corticale, ed **elettroencefalografo ad alta densità (hd-EEG)**, per registrare le risposte EEG immediatamente seguenti la stimolazione magnetica (Ilmoniemi et al., 1997).

La stimolazione cerebrale attraverso TMS viene effettuata dall'esterno, non è necessario avere la partecipazione attiva del soggetto sottoposto alla stimolazione, si può ripetere facilmente, gli effetti procurati dalla tecnica sulla corteccia cerebrale sono reversibili ed, infine, è indolore. Per questi motivi è considerata **non invasiva**.

In particolare, la TMS si fonda sul principio dell'induzione elettromagnetica scoperto da Faraday nel 1831: un campo magnetico **B** rapidamente variabile nel tempo induce un flusso di corrente all'interno di un circuito elettrico che vi si trova immerso.

L'intensità della forza elettromotrice indotta nel circuito è proporzionale alla velocità di variazione del flusso di **B** attraverso l'area del circuito nell'unità di tempo.

Nel caso della TMS, il campo magnetico viene prodotto da un circuito elettrico primario attraversato da una corrente che varia rapidamente nel tempo (equazioni di Maxwell). In pratica, una bobina di rame immersa in un guscio di materiale isolante viene alimentata da un impulso di corrente dell'ordine delle migliaia di A per una durata di un centinaio di  $\mu$ s; ciò genera un impulso di campo magnetico compreso tra 1-3 T, che attraversa la corteccia cerebrale.

Tale campo magnetico, a sua volta, è in grado di generare all'interno della corteccia un campo elettrico indotto, e quindi un flusso di corrente che può attivare in maniera diretta le strutture nervose che si trovano nelle immediate vicinanze.

La forma di questa spirale è un elemento critico. A seconda di come viene progettata, il campo magnetico generato avrà caratteristiche diverse, e, di conseguenza, la distribuzione delle correnti indotte a livello corticale sarà differente. Al variare della forma varia anche il sito di stimolazione. Le forme più utilizzate sono quelle a *single loop*, che genera campi con elevata potenza ma bassa precisione, e quelle *figure-eight* (alias *eight-shaped*, a forma di 8), che garantiscono invece maggiore focalizzazione.

Nella figura 1.2 vengono rappresentati i campi elettrici indotti generati dalle due tipologie di *coil*.

Negli anni è stato possibile dimostrare che la corrente indotta all'interno del neurone è strettamente legata al campo elettrico presente nel *path* neuronale circostante, ovvero nel circuito di cellule che lo circonda. Quindi, in sostanza, senza il background di input sinaptici, è quasi impossibile che la stimolazione magnetica riesca a portare al raggiungimento della soglia di sparo del neurone.

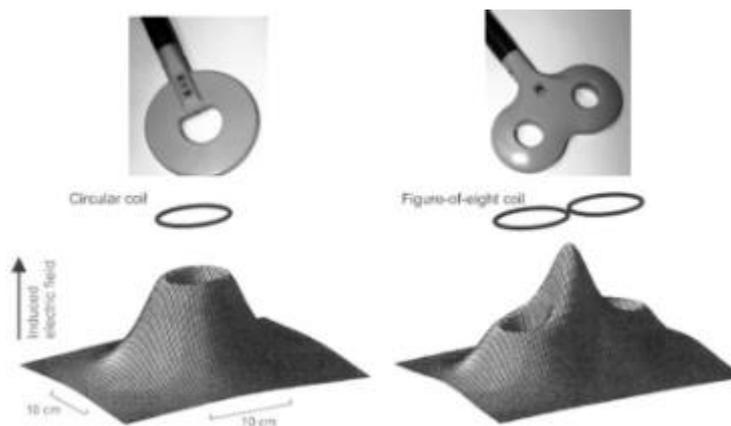


Figura 1.2 Due coil con forma differente (A e B) e corrispondenti campi elettrici risultanti dalla stimolazione (C e D), (Hallet 2007).

Invece, se esiste un background sinaptico, la stimolazione magnetica genera una rapida sequenza di impulsi, dovuta all'afflusso di ioni Ca e seguita da un lungo periodo silente, causato dall'apertura di canali per gli ioni K calcio-dipendenti (Kamitani, et al., 2001).

Pertanto, questo tipo di stimolazione è in grado di modulare l'attività cerebrale in una specifica area corticale-subcorticale; inoltre, cosa più importante per i nostri scopi, la risposta evocata è a sua volta modulata dallo stato di eccitabilità corticale.

### 1.2.1 TMS accoppiata a hd-EEG

La TMS/hd-EEG rende possibile **la misura diretta delle interazioni causali** all'interno della corteccia cerebrale e, pertanto, potrebbe rappresentare uno strumento appropriato per approssimare **la misura teorica di informazione integrata** nel cervello di un essere umano. Se la coscienza ha a che fare con la capacità del cervello di integrare informazione, si dovrebbe dimostrare che le attivazioni evocate dalla TMS sono diffuse (integrazione) e complesse (informazione) in un cervello cosciente. A maggior ragione, si dovrebbe dimostrare che queste attivazioni divengono locali, rivelando *una perdita di integrazione*, e/o semplici, rivelando *una perdita di informazione*, quando lo stato di coscienza tende a scemare durante il sonno senza sogni (non REM, NREM) e l'anestesia.

Poi, dovremmo osservare un recupero dell'**estensione** e della **complessità** della risposta alla TMS durante i sogni, ovvero quando il cervello umano, seppur disconnesso dall'ambiente esterno, può potenzialmente sviluppare un'esperienza conscia.

In particolare, Massimini et al. (2009) mostrano come l'approccio perturbativo della TMS/hd-EEG sia efficace per apprezzare, a livello generale, in che misura le diverse regioni del sistema talamo-corticale possono interagire a livello globale (integrazione) per produrre risposte specifiche (informazione); quindi, anziché chiedere ai soggetti di eseguire volontariamente un atto motorio o un processo cognitivo, viene richiesto (con la TMS) al loro sistema talamo-corticale di entrare in diversi stati neurali per valutare (con hd-EEG) in che misura questi stati sono integrati e specifici.

Alcuni dei *vantaggi specifici* che la combinazione della TMS con l'hd-EEG possono offrire per approssimare una misura teorica di coscienza al letto del paziente sono:

1. Le risposte TMS-evocate sono intrinsecamente *causali*, separando la *connettività effettiva* dalla *connettività funzionale*;
2. Non genera effetti periferici, bypassando i percorsi sensoriali e le strutture sottocorticali per sondare direttamente il sistema talamo-corticale;
3. I potenziali evocati possono essere registrati con una risoluzione adeguata a catturare le effettive interazioni sinaptiche tra neuroni (ms);
4. Non richiede al soggetto di essere coinvolti in un compito, valutando quindi la capacità oggettiva dei suoi circuiti talamo-corticali indipendentemente dal comportamento e dalla volontà;
5. Può essere resa portatile al fine di superare gli ostacoli logistici ed economici.

In fig. 1.3 sono mostrati i tre elementi fondamentali che compongono il set-up TMS/hd-EEG:

1. Una cuffia per registrazioni hd-EEG collegata ad un amplificatore compatibile con TMS;
2. Una bobina stimolante focale a forma di otto, tenuta in posizione da un braccio meccanico;
3. Il display del sistema di Stimolazione Cerebrale Navigato (NBS).

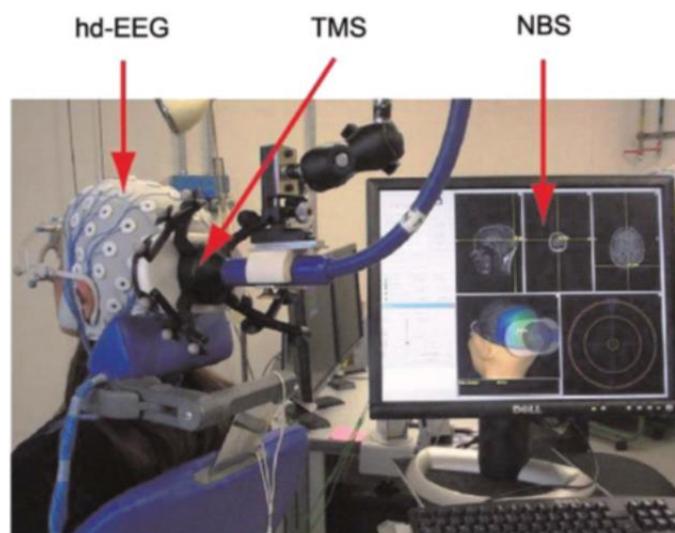


Figura 1.3 Setup utilizzato durante un esperimento di TMS/EEG.

### 1.2.2 Sistema di Stimolazione Cerebrale Navigato (NBS)

Elemento di fondamentale importanza ai fini dell'applicazione della TMS risulta essere il sistema di navigazione. Tale sistema si basa su di una tecnologia del tutto simile a quella utilizzata per la navigazione intracranica nel corso di interventi di neurochirurgia mini-invasiva, nota come *image-guided frameless stereotaxic system* (Wagner, Valero-Cabre e Pascual-Leone, 2007).

Fondamentalmente questo strumento permette di tracciare la posizione nello spazio 3D del cranio del soggetto e del coil di stimolazione al fine di conoscere sempre la loro posizione relativa; quest'ultima viene utilizzata dallo stesso software per calcolare la distribuzione e l'intensità del campo elettrico intracranico indotto dalla stimolazione.

Entrando un po' più nel dettaglio, il sistema è costituito da:

- Un sistema ottico con due telecamere a infra-rosso;
- Un coil di stimolazione, munito di numerosi marker catarifrangenti necessari per il suo tracking.
- Un paio di occhiali o una fascia, entrambi dotati di marker, fissati solidalmente alla testa del soggetto.
- Un puntatore (bacchetta a forma di Y, dotata anch'essa di 3 marker, che rilevati forniscono le coordinate 3D della punta dal lato opposto della Y).
- Un software d'elaborazione di una immagine a risonanza magnetica (MRI) anatomica del soggetto e dei dati provenienti dalla telecamera.
- Un display per la visualizzazione degli output prodotti dall'apposito software.

La fotocamera viene posta davanti alla testa del soggetto in modo tale che gli occhiali o la fascia siano sempre visibili dalla fotocamera durante l'esperimento; ciò è necessario affinché la loro posizione possa essere acquisita e quindi utilizzata dal software come *riferimento* della posizione nello spazio della testa del soggetto, in ogni istante di tempo.

L'input principale del sistema è la MRI del soggetto; essa è utilizzata dal software per realizzare **un rendering 3D della testa** del soggetto, come mostrato in figura 1.4.

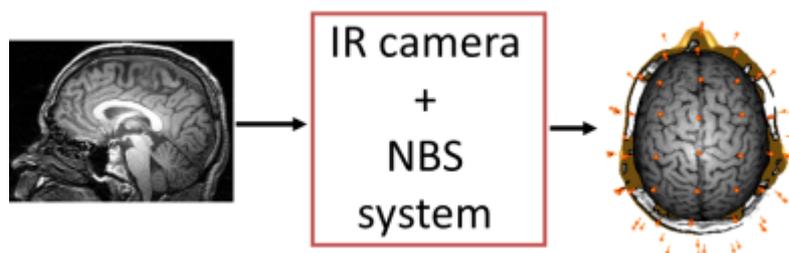


Figura 1.4 Risonanza Magnetica e rendering 3D del soggetto.

Prima di poter cominciare un esperimento di TMS/EEG, è necessario attuare un'apposita **procedura di calibrazione**; durante questa fase, il software dà la possibilità di scegliere, tramite cursore di puntamento, tre punti di reperi (landmarks) sulla risonanza del soggetto, generalmente identificati con i due tragi e il nasion; successivamente, il puntatore appoggiato allo scalpo del paziente viene utilizzato per individuare con il sistema ottico gli stessi tre punti di reperi.

Il software usa poi questi tre punti nei due spazi per realizzare *una procedura di registrazione* che permette di calcolare la matrice di rototraslazione necessaria per passare dal sistema di riferimento del laboratorio a quello MRI.

Terminata la fase di calibrazione, sempre utilizzando il puntatore, vengono acquisiti dalla fotocamera altri nove punti, utilizzati per fittare una sfera (simil scalpo) su cui viene stimato il campo elettrico indotto dal coil di stimolazione. Il campo elettrico indotto è stimato utilizzando un modello sferico adattato alla posizione del capo ma generico quanto a parametri elettrici.

A questo punto, è possibile iniziare l'esperimento di TMS/EEG: una volta aver selezionato sulla risonanza del soggetto il punto della corteccia che si vuole stimolare, viene mostrato a display il rendering 3D della corteccia cerebrale del soggetto e la distribuzione del campo elettrico indotto, rappresentato da un vettore la cui posizione e orientamento variano in tempo reale in funzione della posizione e dell'orientamento del coil manipolato dall'operatore.

Il software inoltre, calcola e mostra a display in tempo reale l'intensità massima del campo elettrico e la profondità del punto in cui il campo assume questo valore, calcolata come distanza tra il target selezionato sulla risonanza e piano tangenziale alla sfera precedentemente fittata.

In questo modo, è possibile orientare il coil e quindi il campo indotto perpendicolarmente alla convessità del giro corticale prescelto e regolare l'intensità del campo al di sopra la soglia necessaria per ottenere una risposta EEG significativa (80-160 V/m).

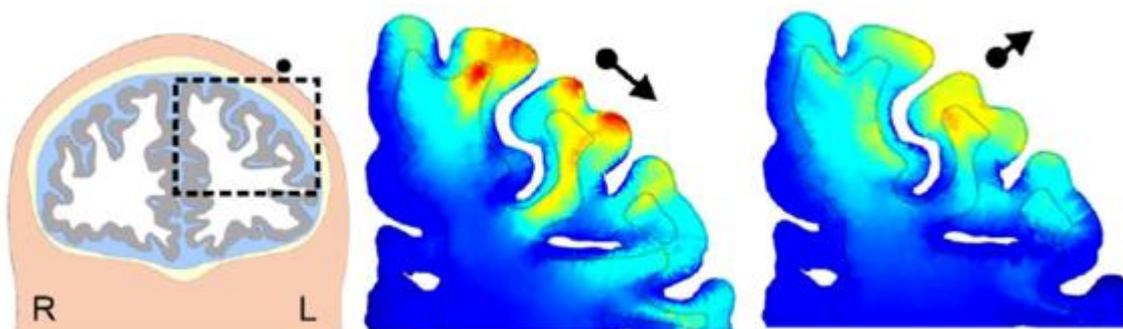


Figura 1.5 Distribuzione del campo elettrico indotto sulla corteccia cerebrale al variare dell'orientamento del coil.

La gestione delle coordinate di stimolazione da parte del software garantisce **la riproducibilità intra- ed inter-sessione di posizione e orientamento** dello stimolatore: ogni deviazione dal target prescelto superiore ai 3 mm viene segnalata in real-time.

Riassumendo, i vantaggi derivanti dall'utilizzo di un sistema di neuro-stimolazione navigata sono:

1. La possibilità di scegliere, in real time, il **punto esatto di stimolazione** sulla MRI del soggetto mostrata a display.
2. La **ripetibilità** della stimolazione, grazie al salvataggio delle coordinate del target di stimolazione;
3. La possibilità di generare un campo elettrico indotto che sia **perpendicolare alla convessità** del giro corticale prescelto.

Come dimostrato da precedenti lavori (Casali et al., 2010; Casarotto et al., 2010), questo dispositivo assicura **un'elevata riproducibilità test-retest in misurazioni longitudinali** di TMS/EEG.

### 1.2.3 Sistemi commerciali

Nel presente lavoro di tesi sono stati impiegati due sistemi commerciali per eseguire esperimenti di TMS/EEG: **Nexstim** e **Brain Products**.

#### NEXSTIM

Nexstim è una società finlandese di strumentazione medica che si pone come obiettivo il miglioramento del processo riabilitativo in pazienti colpiti da ictus, attraverso l'uso di stimolazione cerebrale non invasiva. Per quanto riguarda la tecnologia per la diagnostica del cervello umano, Nexstim produce un dispositivo di stimolazione cerebrale navigato (sistema NBS), come quello descritto al paragrafo 1.2.2, insieme ad un amplificatore per hd-EEG a 60 canali, che verrà descritto nel seguito di questo paragrafo.



Figura 1.6 Sistema di stimolazione cerebrale navigato della Nexstim.

#### BRAIN PRODUCTS

Brain Products è una società tedesca che realizza una vasta gamma di applicazioni scientifiche nel contesto dell'elettroencefalografia.

Tutti i prodotti attualmente in vendita sono stati sviluppati e progettati in stretta collaborazione con varie università e istituti di ricerca.

Essa attualmente è attiva sia nel settore dello sviluppo di hardware che di software; in particolare, la serie degli amplificatori comprende nove tipi diversi, per coprire una vasta gamma di applicazioni nel campo della ricerca neurofisiologica.

Nel presente lavoro di tesi è stato utilizzato un **amplificatore BrainAmp DC**, una soluzione *compatta, portatile e combinabile* con altre unità all'interno della stessa famiglia di prodotti per acquisire simultaneamente numerosi tipi di dati neurofisiologici quali ECG, EMG, EOG, GSR (Galvanic Skin Response), l'accelerazione, il flusso di sangue e altri ancora.

Il BrainAmp DC è un amplificatore con unità a **32 canali**, espandibile fino a 8 unità per un massimo di 256 canali, permette registrazioni in DC con diverse opzioni di filtraggio hardware, si collega a qualsiasi computer, può essere alimentato da batterie e utilizzato per registrazioni EEG/ERP standard, ma anche per altri tipi di acquisizioni, come, ad esempio, registrazioni simultanee EEG/TMS, acquisizioni EEG/MEG, Brain Computer Interface e Neurofeedback.



Figura 1.7 Amplificatore BrainAmp a 32 canali.

La configurazione dell'amplificatore è completamente controllabile tramite il software di registrazione, che permette non solo di commutare la modalità di registrazione in AC ma anche di selezionare diverse larghezze di banda hardware.

La sua grande flessibilità consente inoltre, l'utilizzo di elettrodi sia passivi che attivi e, tramite l'ingresso trigger TTL a 16bit, la rilevazione di un gran numero di marcatori da utilizzare in combinazione con stimolatori visivi, acustici, magnetici e di altro tipo.

Brain Products fornisce, insieme agli amplificatori, un software di acquisizione, il *BrainVision Recorder*, e un software di analisi, il *BrainVision Analyzer*; quest'ultimo, sebbene valido, non è stato usato in questo lavoro e l'elaborazione del segnale EEG è stata eseguita off-line esternamente al software fornito.

Nella fase di raccolta dei dati sperimentali, ho utilizzato il sistema Nexstim NBS e, separatamente, i due amplificatori EEG, Nexstim e BrainAmp.

In tabella 1, è possibile osservare le caratteristiche principali dei due sistemi EEG utilizzati. Nel caso del sistema BrainAmp, da evidenziare è la mancanza di una rimozione on-line, dal tracciato EEG, dell'artefatto indotto dal forte impulso elettromagnetico generato dallo stimolatore.

In fig 1.8, sono mostrati i tracciati EEG con e senza rimozione dell'artefatto suddetto, rispettivamente nel caso del sistema Nexstim e BrainAmp. La rimozione dell'artefatto elettromagnetico verrà trattato ulteriormente nella sezione materiali e metodi.

	<b>NEXSTIM EEG</b>	<b>BRAINAMP EEG</b>
Frequenza di campionamento (Hz)	1450	5000
High-pass (Hz)	0.1	0 in DC mode 0.016 in AC mode
Low-pass (Hz)	500	250, 1000
Range operativo (mV)	5	$\pm 3.28$ , $\pm 16.384$ , $\pm 327.68$
Risoluzione ( $\mu$ V)	0.1	0.5/0.1
Conversione A/D (bit)	16	16
Alimentazione	Rete	Batteria ricaricabile
Dimensioni (cm)	98 x 72 x 68	20 x 16 x 19
Portabilità	Scarsa	Massima
Rimozione artefatto da stimolazione	Si (Circuito di sample&hold)	No (Ampio range dinamico)
Cuffia EEG	Fissa	Flessibile
Tipologia di elettrodi	Pin-shaped	C-shaped
Numero di elettrodi/canali EEG	60	62

Tabella 1 Confronto fra le caratteristiche dei sistemi EEG Nexstim e BrainAmp.

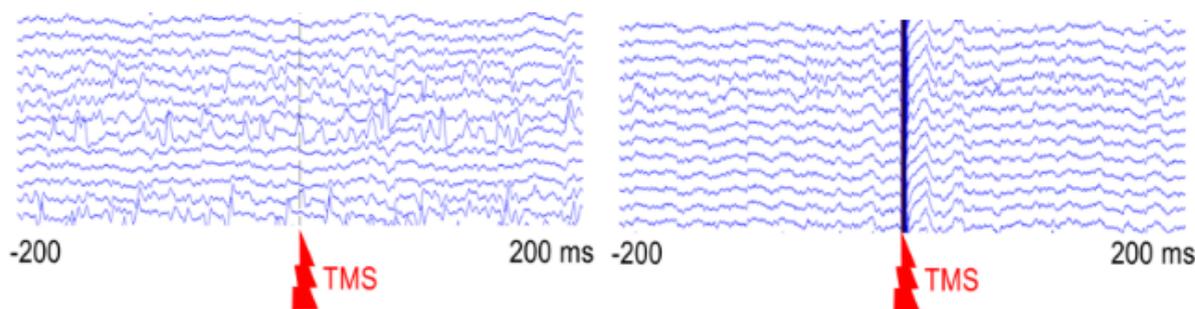


Figura 1.8 Tracciato EEG ottenuto con Nexstim (a sinistra) e BrainAmp (a destra) in un intorno dell'istante temporale di stimolazione, con e senza rimozione dell'artefatto.

L'assenza dell'artefatto nel Nexstim è dovuta ad un circuito di sample and hold che "disconnette" l'amplificatore per i pochi millisecondi di durata dell'artefatto.

### 1.3 Come eseguire correttamente un esperimento di TMS/EEG

In questo paragrafo si vogliono brevemente delineare le *linee guida* per eseguire un buon esperimento di TMS/EEG e, soprattutto, per valutare on-line la qualità del dato acquisito (Ilmoniemi e Kicic, 2010, Rogasch e Fitzgerald, 2012).

Queste considerazioni si riveleranno essere maggiormente utili nella comprensione delle motivazioni che stanno dietro agli obiettivi di questo lavoro, descritti nel paragrafo 1.7.

Nelle diverse fasi in cui un esperimento di TMS/EEG si articola, occorre:

1. Minimizzare le **impedenze** degli elettrodi della cuffia EEG, correttamente posizionata sulla testa del soggetto (interfaccia elettrodi-cuoio capelluto).
2. Impostare i **parametri di stimolazione**, basandosi su informazioni a priori.
3. Valutare la presenza di **artefatti muscolari**, dovuti ad un'attivazione diretta o indiretta dei nervi presenti nello scalpo, o di componenti evocate, non direttamente indotte dalla stimolazione corticale, all'interno di una risposta evocata da singolo trial. Se nessun artefatto è presente nel trial considerato, si può procedere con la stimolazione del target prescelto e l'acquisizione di nuovi trial.
4. Dopo un numero sufficiente di trial, valutare l'effettiva attivazione dei circuiti neuronali stimolati, osservando la risposta evocata media in **average reference** e verificando che il signal-to-noise ratio (SNR) dei potenziali corticali sia sufficientemente elevato.

Generalmente, le impedenze vengono ritenute accettabili per una buona acquisizione dei potenziali evocati quando assumono valori al di sotto dei 5 K $\Omega$ .

Elevate impedenze all'interfaccia elettrodo-scalpo possono determinare l'insorgenza di *rumore distribuito* sul canale interessato o la *polarizzazione* dell'interfaccia di contatto e, di conseguenza, artefatti con andamento a decadimento esponenziale, come mostrato in figura 1.9.

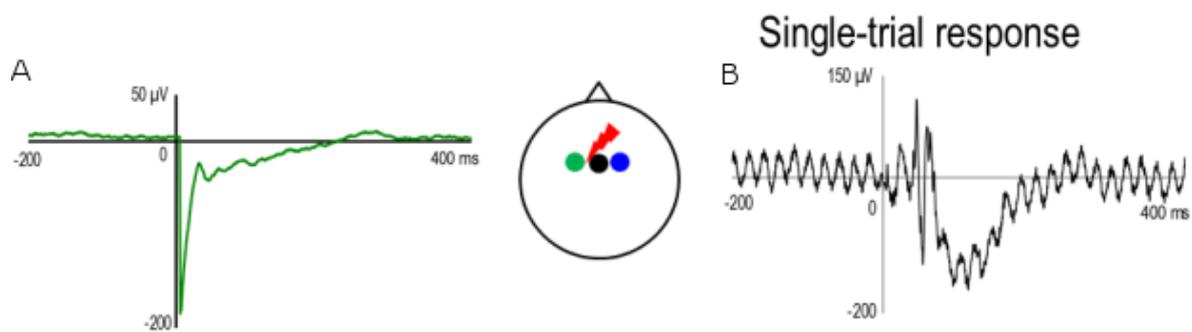


Figura 1.9 Effetto di impedenze elevate sui potenziali EEG registrati.

(A) Artefatto dovuto alla polarizzazione della pasta conduttiva. (B) Rumore di rete a 50 Hz sul canale.

Per quanto riguarda il setting dei parametri di stimolazione, è necessario stabilire:

- **Il target corticale.**
- **L'orientamento dello stimolatore**, in modo tale che esso sia tangenziale allo scalpo e che il campo indotto sia ortogonale alla circonvoluzione cerebrale scelta.
- **L'intensità di stimolazione**, valutando la distanza scalpo-corteccia e che la stima di campo elettrico massimo si avvicini ad un valore di 120 V/m.

A questo punto, anche solo un singolo trial sarà sufficiente a suggerirci se i parametri di stimolazione scelti sono ottimali per l'esecuzione dell'esperimento di TMS/EEG.

La figura 1.10, ad esempio, mostra un'attivazione muscolare diffusa, indotta dall'impulso magnetico dello stimolatore.

In figura 1.11 viene mostrata invece, l'attivazione di un muscolo temporale indotta dalla TMS e la distribuzione di potenziale corrispondente sullo scalpo, in corrispondenza di due istanti temporali.

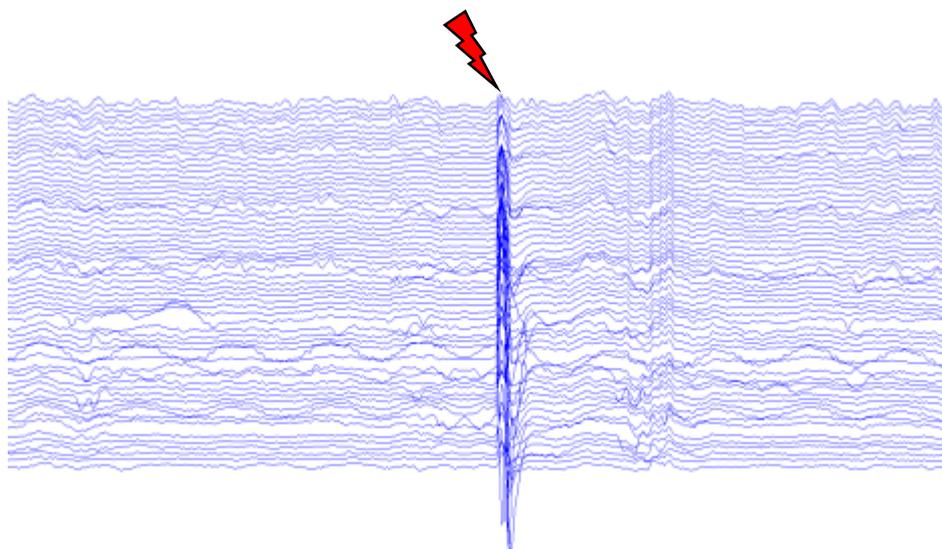


Figura 1.10 Artefatto muscolare indotto da TMS.

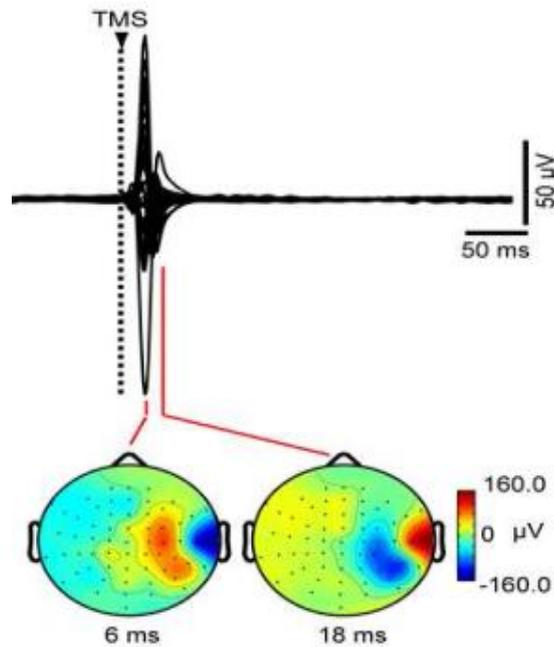


Figura 1.11 Attivazione di un muscolo temporale indotta dalla TMS e relativa distribuzione di potenziale sullo scalpo.

Supposto di aver determinato una configurazione ottimale dei parametri di stimolazione, bisognerà acquisire una decina di trial per stabilire se si è stati in grado di suscitare un effettivo potenziale evocato da TMS. I due casi possibili, di assenza e di presenza di risposta, sono raffigurati in figura 1.12.

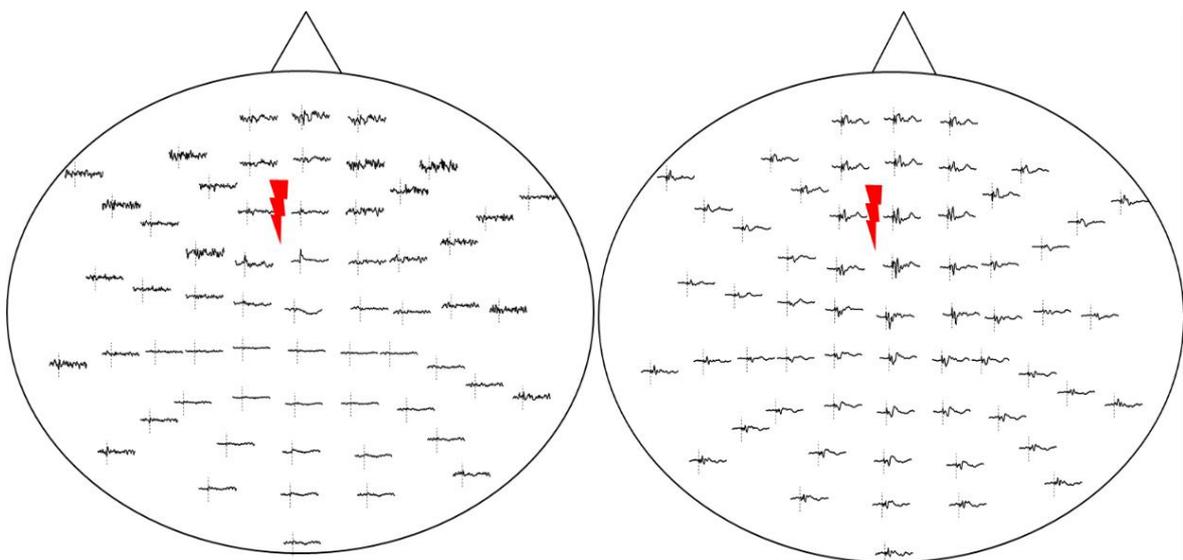


Figura 1.12 Distribuzione topografica dei potenziali evocati medi in average reference.

La media è calcolata eliminando da ogni canale EEG la media di tutti i canali EEG. A sinistra, assenza di risposta. A destra, la stimolazione genera una risposta evocata più ampia nei canali intorno al sito di stimolazione.

## 1.4 Riproducibilità della risposta corticale evocata dalla TMS

Se ottenuta correttamente, la TMS/EEG rappresenta quindi una misura *diretta* e non *invasiva* di **eccitabilità corticale** e **connettività** del cervello umano e può essere impiegata per tenere traccia nel tempo di alterazioni patologiche, variazioni di plasticità e modifiche, indotte dalla terapia, nei circuiti corticali.

Un primo passo per valutare concretamente la potenzialità della TMS/hd-EEG come strumento diagnostico e di monitoraggio, prevede la definizione della **sensitività** e della **ripetibilità** di questa tecnica. In altre parole, prima di impiegare la TMS/hd-EEG al letto del paziente, è necessario valutare in che misura i potenziali evocati da TMS riflettono le particolari proprietà elettrofisiologiche dei circuiti corticali stimolati, piuttosto che una reazione stereotipica del cervello o una variabilità incontrollabile. I potenziali evocati da TMS, infatti, avrebbero limitata applicazione diagnostica e di monitoraggio se non manifestassero alcun cambiamento quando diversi sottoinsiemi neuronali vengono stimolati, o al contrario, se variassero in modo casuale quando i parametri di stimolazione vengono mantenuti costanti.

Idealmente, i potenziali evocati, registrati in diverse sessioni in un cervello sano, dovrebbero cambiare sempre in modo significativo se i parametri di stimolazione variano (100% di sensitività) e non mostrare mai significative variazioni quando i parametri sono mantenuti costanti (100% di ripetibilità).

### 1.4.1 Divergence Index (DI)

Per questo motivo, Casarotto et al. (2010) hanno utilizzato **variazioni controllate dei parametri** di stimolazione (sito, intensità, e l'angolo di stimolazione) e **misurazioni longitudinali ripetute** (stesso giorno e a una settimana di distanza) per valutare la sensibilità e ripetibilità dei potenziali evocati.

Nel complesso, hanno registrato 100 sessioni di TMS/ hd-EEG in 10 volontari sani e, sistematicamente, hanno effettuato 92 confronti a coppie, a livello del singolo soggetto, tra i potenziali TMS-evocati ottenuti utilizzando diversi parametri di stimolazione, cioè sito, intensità e angolo di stimolazione (*confronto con cambiamento - C*), o mantenendo gli stessi parametri costanti nel tempo (*confronto senza cambiamento - NC*). Per ogni confronto, è stata applicata una statistica non parametrica allo scopo di calcolare un indice di diversità, indicato con il nome di **Divergence Index (DI)**. Esso rappresenta, infatti, la percentuale di campioni spazio-temporali che differiscono significativamente tra le due sessioni di registrazione dei potenziali TMS-evocati.

A questo punto, considerando ogni valore di DI come soglia variabile, è stata effettuata un'**analisi ROC**, calcolando il tasso di veri positivi (la frazione di confronti C con DI maggiore della soglia.) e il tasso di veri negativi (la frazione di confronti NC con un DI minore della soglia).

L'analisi ROC ha mostrato che l'accuratezza complessiva della TMS/hd-EEG nel rivelare i cambiamenti dei parametri di stimolazione è del **96,7%**, con il 95% di sensitività e il 100% di specificità (cioè ripetibilità), in corrispondenza di una **soglia di DI pari a 1.67%**.

I risultati di un soggetto rappresentativo sono riportati in figura 1.13.

Qui, una particolare sessione di TMS/hd-EEG (stimolazione di BA19 a intensità I% e angolo 0° nel giorno 1) è presa come riferimento (in blu) e confrontata con altre quattro sessioni (in rosso), in cui i parametri di stimolazione variano solamente uno alla volta. In particolare, il sito (BA19 vs. BA6), l'intensità (I% vs. I% + 10%), l'angolo (0° vs. 45°) e il giorno (giorno 1 vs giorno 8) di stimolazione vengono fatti variare, portando a tre confronti di tipo C e un confronto di tipo NC.

Mentre i potenziali corticali TMS-evocati tendono a sovrapporsi nel confronto NC, essi sono chiaramente caratterizzati da pattern spazio-temporali differenti in tutti i confronti C, il che suggerisce che *le caratteristiche spazio-temporali della risposta della corteccia cerebrale a una perturbazione diretta dipendono marcatamente da ognuno dei tre parametri di stimolazione considerato.*

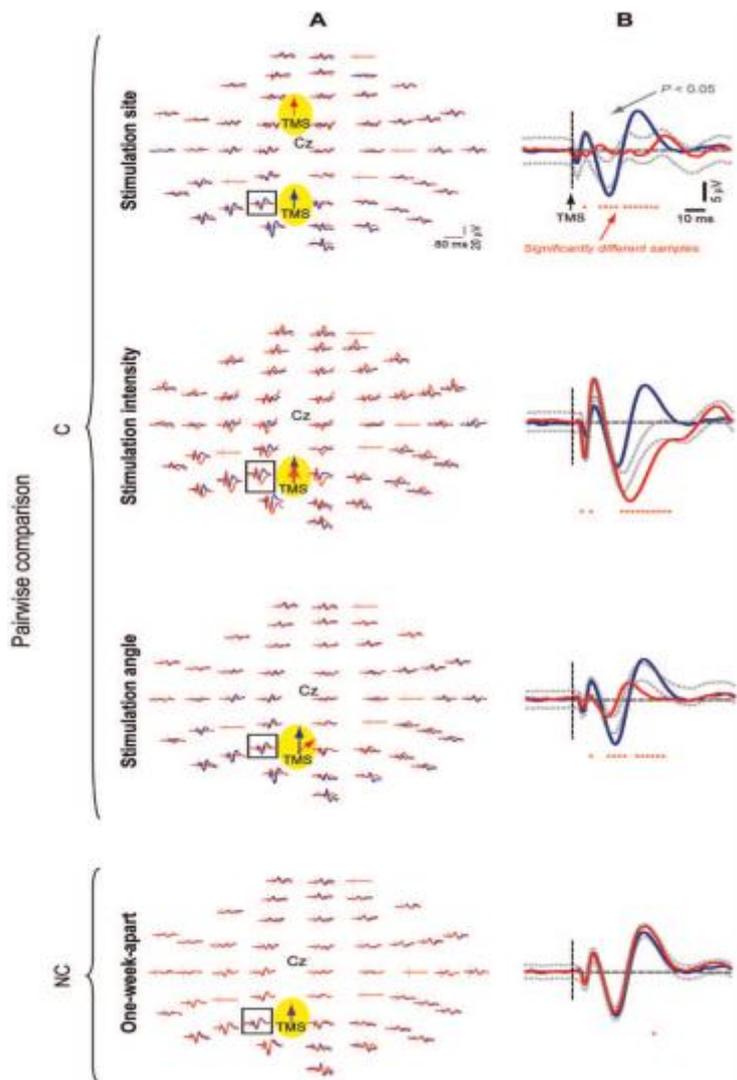


Figura 1.13 Risultati dei confronti a coppie tra i potenziali evocati di un soggetto rappresentativo, a livello dei sensori (A, B).

Le risposte del cervello alla stimolazione della BA19 con I% d'intensità e 0° d'angolazione durante il giorno 1 (tracce blu) sono confrontate con quelle registrate durante quattro diverse sessioni (tracce rosse), durante le quali i parametri di stimolazione variano uno alla volta. Per ciascun confronto, la sovrapposizione delle coppie di potenziali TMS-evocati in tutti i sensori viene visualizzata in (A), mentre una vista ingrandita del canale P1 è mostrato in (B), insieme ai confini di significatività (tracce grigie tratteggiate) e ai campioni significativamente diversi (stelle rosse).

La figura 1.14 A riassume invece i risultati ottenuti da tutti i soggetti: ogni punto colorato rappresenta il DI calcolato per uno specifico confronto a coppie. In particolare, i DI nel caso dei confronti di tipo C per variazioni del sito di stimolazione, intensità e angolo, sono rappresentati da punti color ciano, nero e verde, rispettivamente; i DI nel caso dei confronti di tipo NC sono invece raffigurati in giallo per le sessioni in giornata e in rosso per le sessioni a distanza di una settimana.

Risulta evidente che i confronti C portano a valori maggiori di DI rispetto al confronto NC e che la la rotazione dello stimolatore nella stessa area produce minori variazioni dei potenziali evocati (DI più piccolo) rispetto ai cambiamenti di sito e intensità di stimolazione. Infatti, 4 dei 20 confronti a coppie tra sessioni di registrazione con diverse angolazioni determinano un DI minore di 1.67%, la soglia ottimale che massimizza sensibilità e specificità (ripetibilità) dei potenziali evocati nell'analisi ROC.

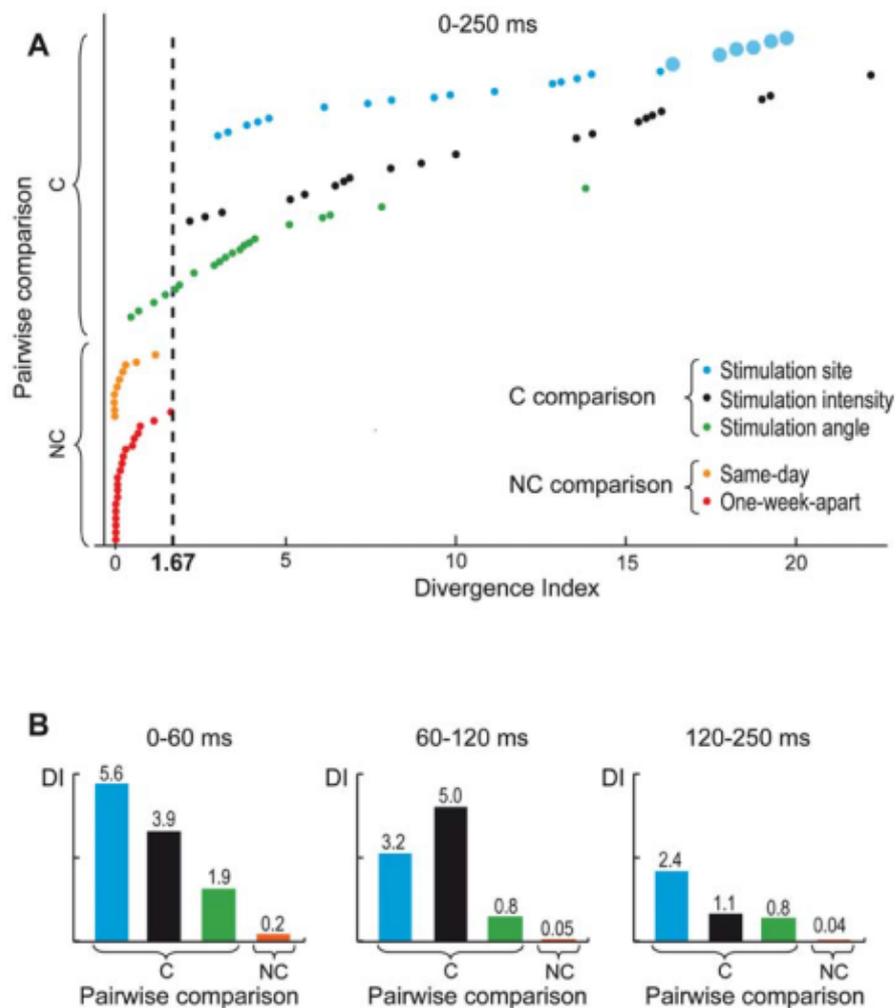


Figura 1.14 Valori DI di ciascuna coppia di sessioni confrontate (asse orizzontale), calcolati per l'intero periodo di post-stimolo (250 ms) e su diverse finestre temporali di interesse.

In (A) sono mostrati i valori DI in caso di: cambiamento (C) del sito di stimolazione (ciano), dell'intensità (nero) e dell'angolo (verde), e non cambiamento dei parametri (NC) con ripetizione dell'esperimento in giornata (giallo) e a distanza di una settimana (rosso). I valori di DI calcolati su diverse finestre temporali di interesse (0-60 ms, 60-120 ms, 120-250 ms) sono riportati in (B) con la stessa codifica a colori, fatta eccezione per i confronti NC che vengono uniti e rappresentati in arancione.

Una spiegazione plausibile potrebbe essere che, mentre l'orientamento principale degli assoni in corteccia motoria è riproducibile tra soggetti, l'orientamento principale delle fibre in altre aree del cervello, come quelle stimulate in questo studio (BA6, BA7 e BA19) è piuttosto variabile. Pertanto, è probabile che i valori di DI minori di 1.67%, nei 4 confronti a coppie tra diversi angoli di stimolazione, siano dovuti ad una variazione (praticamente trascurabile) di direzione della corrente indotta rispetto a quella degli assoni corticali.

Infine, per capire se le differenze osservate tra i potenziali evocati si conservano per tutto il periodo post-stimolo, piuttosto che limitarsi ad una latenza specifica, lo studio esamina inoltre, i valori di DI in tre diversi intervalli successivi di post-stimolo, vale a dire 0-60 ms, 60-120 ms e 120-250 ms (Fig. 1.14 B).

Per ogni tipo di confronto a coppie, il DI medio calcolato alle brevi latenze (0-60 ms) è stato significativamente più elevato ( $P < 0.05$ ) rispetto a quello calcolato per lunghe latenze (120-250 ms), anche se le differenze relative tra i tipi di confronto si sono conservate in tutti gli intervalli di tempo ( $P < 0.01$ ).

In conclusione, lo studio di Casarotto et al. (2010) mostra che *differenti perturbazioni corticali producono un grado di differenziazione di risposta evocata che è costantemente superiore rispetto alla variabilità casuale di test-retest.*

## **1.5 Dipendenza dei potenziali TMS-evocati dalla stato di coscienza**

Nel campo delle neuroscienze, esiste una letteratura ricchissima di lavori che palesano la dipendenza dei potenziali evocati dalla TMS dalla stato di coscienza dei soggetti stimolati.

In questo paragrafo si vogliono quindi sintetizzare i relativi risultati principali; la maggior parte dei lavori citati sono stati svolti, nel corso dell'ultimo decennio, da membri e collaboratori del laboratorio ITCF dell'ospedale Sacco di Milano, gruppo di ricerca in cui sono stato inserito per il mio lavoro di tesi.

Essi hanno registrato le risposte cerebrali evocate dalla TMS (TEP) in soggetti sani il cui livello di coscienza è stato sperimentalmente manipolato, sia in condizioni fisiologiche (Massimini et al., 2005; Massimini et al., 2007; Massimini et al., 2010) che farmacologiche (Ferrarelli et al., 2010), e hanno confrontato le risposte ottenute con quelle registrate durante la veglia degli stessi soggetti.

Hanno poi esteso queste prime osservazioni allo studio delle condizioni patologiche in cui la coscienza può essere compromessa, ovvero in pazienti con lesioni cerebrali ed un ampio spettro di diagnosi cliniche che vanno dallo stato vegetativo/stato di veglia non responsiva (VS)/(UWS) allo stato di minima coscienza (MCS) fino alla sindrome locked-in (LIS) (Rosanova et al., 2012).

### 1.5.1 Veglia e sonno NREM

La stimolazione diretta di un'area corticale applicata in un soggetto sveglio e cosciente risulta tipicamente in un pattern di risposta neuronale diffuso e complesso (Massimini et al., 2005; Rosanova et al., 2009). Come mostrato nella Fig. 1.14, durante *lo stato di veglia*, la TMS innesca un pattern di attività, rappresentata da una sequenza di onde di bassa ampiezza ed ad alta frequenza (10-30 Hz), dove aree corticali diverse e lontane tra loro si attivano in tempi diversi (fino a 300 millisecondi).

Questo schema di attivazione è precisamente quello che ci si attenderebbe da un sistema composto da moduli differenziati che sono tuttavia in grado di interagire efficacemente tra loro; in sostanza, la perturbazione iniziale attiva **un sistema complesso** (*differenziato e integrato*) che produce una risposta complessa.

La risposta alla perturbazione cambia quando lo stesso cervello entra nel sonno NREM e perde coscienza. In questa condizione, osserviamo una forte risposta dell'area direttamente stimolata (a testimonianza del fatto che il cervello dormiente rimane attivo e re-attivo) che, tuttavia, non si propaga alle altre zone della corteccia, rimanendo locale (Fig. 1.15).

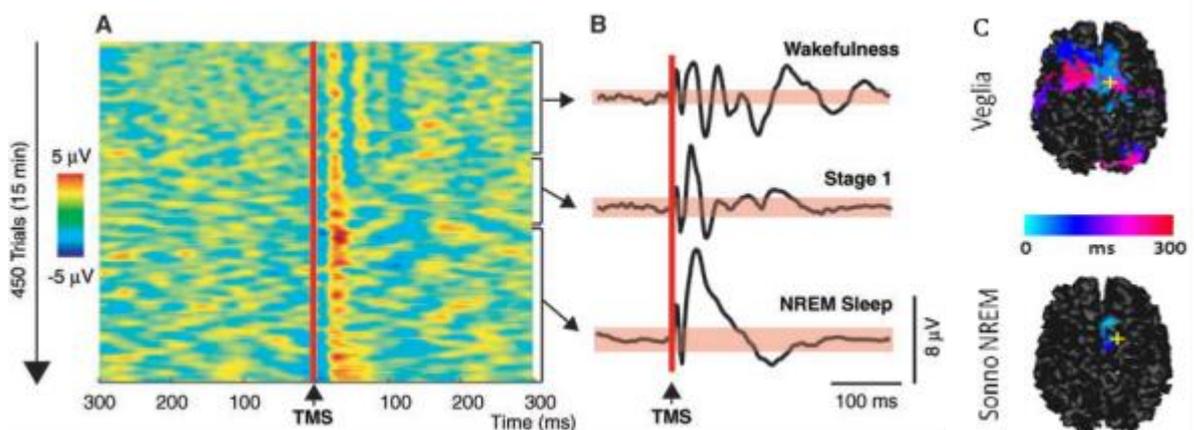


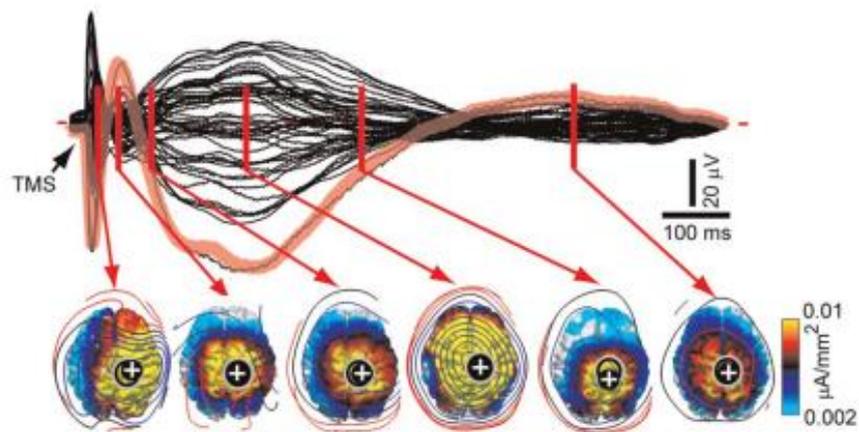
Figura 1.15 Cambiamenti nella risposta TMS-evocata durante transizioni dello stato di vigilanza.

(A) Singoli trial registrati da un canale posto sotto lo stimolatore mentre il soggetto transita dalla veglia, attraverso la fase 1, al sonno non-REM. I Dati EEG, filtrati 4-100 Hz sono color-coded secondo il valore di potenziale. (B) Risposte medie TMS-evocate, filtrate da 1 a 100 Hz, ottenute durante i tre stati di vigilanza. Le bande rosa orizzontali indicano il livello di significatività (3 volte la standard deviation dalla tensione media di pre-stimolo). (C) La croce gialla indica la zona di stimolazione sulla corteccia; le aree colorate indicano le aree corticali che si attivano a seguito della stimolazione (il colore dipende dalla latenza di attivazione in millisecondi, come indicato dalla barra).

Il sistema talamo-corticale, incosciente, è diventato un sistema modulare a bassa integrazione. La risposta evocata dalla TMS durante il sonno NREM, infatti, cambia marcatamente: l'onda iniziale raddoppia in ampiezza e ha una durata nettamente maggiore. Inoltre, dopo l'onda iniziale, non vengono rilevate ulteriori attività, ad eccezione di una piccola onda negativa tra gli 80 e i 140 ms, scompaiono le componenti in alta frequenza e l'attività evocata cessa già dopo 150 ms.

Stimolando aree diverse, si ottiene sempre la stessa **risposta semplice e stereotipata** nel caso di sonno NREM, mentre, durante la veglia, è possibile osservare risposte elettriche molto differenziate (Rosanova et al., 2009).

È interessante notare che la scomparsa di un pattern complesso spazio-temporale di attivazione corticale non è semplicemente dovuta alla riduzione di responsività dei neuroni corticali iperpolarizzati. Infatti, quando la TMS viene erogata ad intensità progressivamente maggiori, l'attivazione iniziale è seguita da un'ampia onda negativa che si propaga in vaste regioni della corteccia. In particolare, quando la TMS è applicata sulla corteccia parietale, quest'onda assume valori di periodo ed ampiezza tipici di un'onda lenta del sonno (Massimini et al., 2007), come osservabile in fig. 1.16.



*Figura 1.16 Onda lenta del sonno in corteccia parietale.*

In questa regione, la TMS innesca una grande deflessione negativa associata a correnti di lunga durata che si diffondono a macchia d'olio nella corteccia circostante, partendo da un massimo locale fisso. In questo caso particolare, la reazione del cervello di TMS diventa globale, ma rimane stereotipata e non specifica.

Complessivamente, questi risultati hanno mostrato che, durante il sonno NREM, il sistema talamo-corticale, pur essendo attivo e reattivo, perde la sua capacità di produrre pattern complessi di attività (Casarotto et al., 2010; Rosanova et al., 2009) che siano, al contempo, distribuiti all'interno di un sistema di aree corticali interagenti (integrati) e differenziati nello spazio e nel tempo (ricchi di informazione); ma si rompe in una serie di moduli indipendenti (perdita di integrazione) o produce una risposta di tipo esplosivo (perdita di differenziazione/informazione).

### **1.5.2 Sonno REM**

Uno dei paradossi più eclatanti che il sonno può offrire è rappresentato dal sogno sogno caratterizzato da movimenti involontari dei bulbi oculari (Rapid Eye Movements, REM). Davanti a noi, abbiamo una persona che si trova ad occhi chiusi, come durante il sonno NREM, disconnesso dall'ambiente esterno, quasi completamente paralizzato e non responsivo. Eppure, questa persona sta consciamente vivendo un'esperienza che assomiglia all'attività di veglia, e, al risveglio, è in grado di riferire verbalmente il suo contenuto. Che cosa accade quando la coscienza riemerge nella forma di un sogno nel cervello di un soggetto che giace immobile con gli occhi chiusi?

Per investigare il dialogo interno del sistema talamocorticale anche in assenza di qualsiasi indizio comportamentale, sono state registrate le risposte evocate dalla TMS, durante il sonno REM in soggetti sani che avessero vissuto esperienze coscienti in forma di sogni lunghi e vivaci (Massimini et al., 2010). Come illustrato nella Figura 1.17C, durante il sonno REM, il sistema talamo-corticale, insieme alla coscienza, recupera la capacità di produrre risposte integrate e differenziate (Massimini et al., 2010). In accordo con le previsioni teoriche, il recupero dell'esperienza cosciente durante REM si associa ad un pattern di attivazione corticale diffuso e differenziato simile a quello osservato durante la veglia.

Nella stessa figura, è possibile apprezzare la sovrapposizione dei potenziali evocati ottenuti dai 60 canali EEG e l'andamento temporale della relativa densità di corrente corticale, nei tre distinti casi di veglia, sonno NREM e sonno REM.

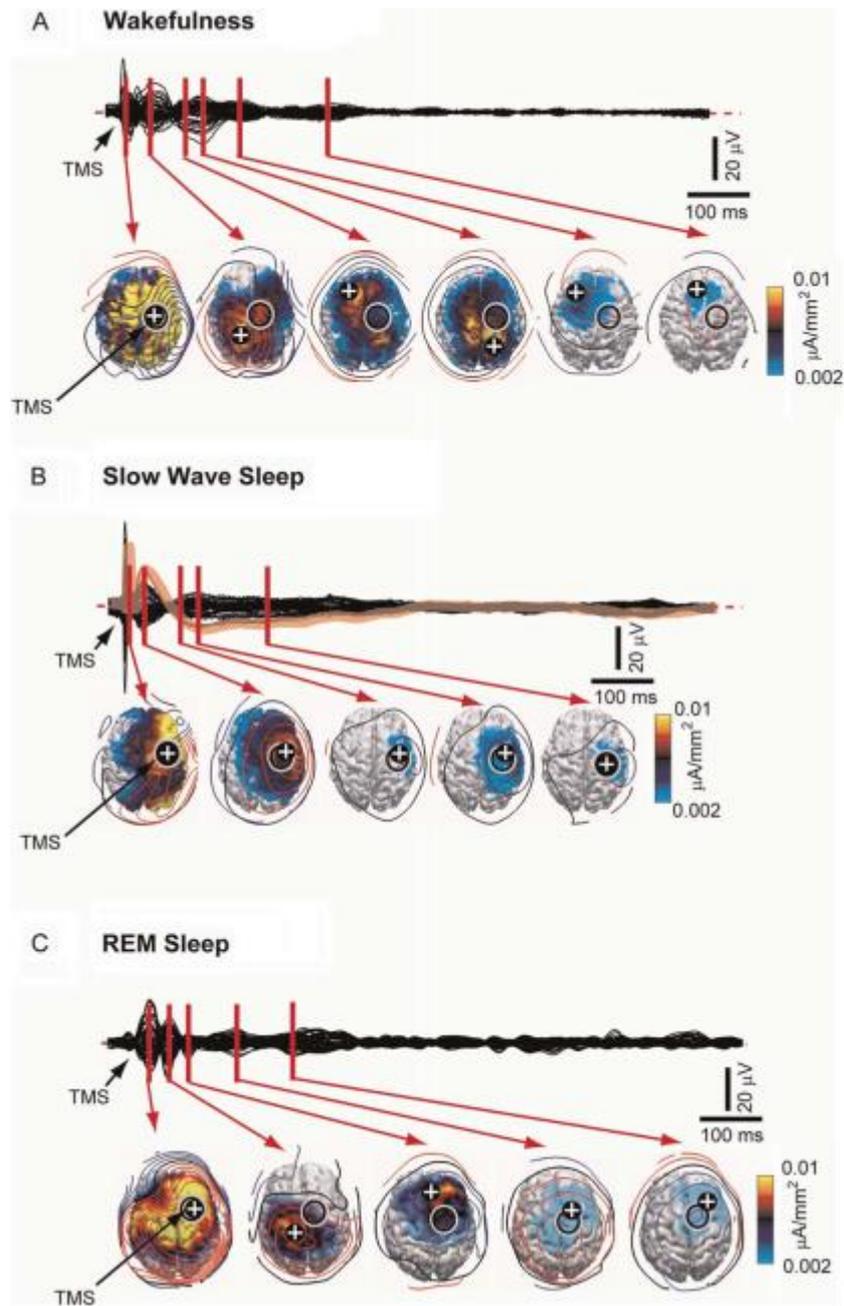


Figura 1.17 Risposte corticali alla TMS in un ciclo sonno-veglia.

I potenziali evocati e la stima delle correnti indotte sono ottenute da un soggetto in cui è stata stimolata la corteccia premotoria (freccia nera). (A) Durante la veglia, la stimolazione evoca risposte hd-EEG prima nei pressi del sito di stimolazione (cerchio, la croce è il luogo di massima corrente indotta) e poi, in sequenza, in altri luoghi corticali. (B) Durante il sonno a onde lente, la risposta stimolo-evocata resta locale, indicando una perdita di integrazione corticale. Allo stesso tempo, la risposta registrata dall'elettrodo posto sotto lo stimolatore (traccia rossa spessa) diventa un'onda positiva seguito da un rebound negativo. (C) Durante il sonno REM, la connettività effettiva tra diverse aree corticali distanti torna ad esistere, indicando una ripresa significativa di integrazione corticale.

### 1.5.3 Anestesia

Le misure effettuate durante veglia, sonno NREM e REM, sembrano confermare la predizione teorica; tuttavia, se la teoria è corretta, la capacità del cervello di integrare informazione dovrebbe ridursi non solo quando la coscienza cambia in condizioni fisiologiche ma dovrebbe ridursi ogniqualvolta la coscienza viene ridotta; come, per esempio, durante anestesia generale. Recenti esperimenti (Ferrarelli et al., 2010) hanno dimostrato che la connettività corticale effettiva, durante la perdita di coscienza indotta da un agente farmacologico (midazolam, somministrato a concentrazioni anestetiche in soggetti sani), si riduce significativamente, in maniera analoga a quanto osservato in sonno profondo NREM. Anche in questo caso, infatti, la TMS evoca una risposta positiva-negativa, inizialmente ampia, ma locale (figura 1.18) e, proprio come nel sonno NREM, questa risposta stereotipata si trasforma in una vera e propria onda lenta quando la corteccia cerebrale è stimolata a maggiore intensità (Massimini et al., 2012).

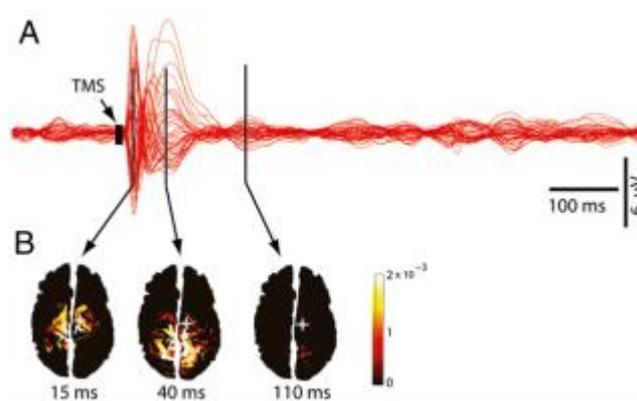


Figura 1.18 Risposta corticale alla TMS durante anestesia (midazolam).

(A) Media dei potenziali TMS-evocati registrati con 60 canali, sovrapposti in un butterfly-plot, durante anestesia. (B) Distribuzione delle correnti corticali, calcolate in corrispondenza di tre istanti temporali durante anestesia; la TMS dà luogo a risposte di elevata ampiezza e breve durata che rimangono locali e svaniscono entro 150 ms. Le frecce nere rappresentano gli istanti temporali in corrispondenza dei quali si registrano dei massimi locali di attivazione.

### 1.5.4 Pazienti con disturbo severo di coscienza

E' stato infine studiato se un pattern stereotipato di risposte corticali (simile al sonno NREM e all'anestesia con midazolam) fosse presente anche quando la coscienza è persa a seguito di lesioni cerebrali (Rosanova et al., 2012).

Per ridurre al minimo la possibilità di una diagnosi errata imputabile a fluttuazioni della risposta comportamentale, è stata effettuata una valutazione clinica mediante la scala CRS-R almeno 4 volte a settimana, a giorni alterni.

In tutti *i pazienti vegetativi*, la risposta EEG alla TMS è rappresentata da un'onda locale stereotipata positiva-negativa simile a quella ottenuta durante il sonno NREM e l'anestesia (fig. 1.19 A).

La stessa stimolazione, eseguita su pazienti con lesioni cerebrali ma capaci di eseguire risposte comportamentali intenzionali, anche minime come l'inseguimento visivo, (e quindi diagnosticati come *MCS*), è caratterizzata da un recupero del pattern complesso spazio-temporale di attivazione corticale, molto simile a quello ottenuto durante la veglia e il sonno REM (fig. 1.19 B).

Quindi, mentre il cervello dei pazienti in stato vegetativo risponde come il cervello di un soggetto NREM o anestetizzato, le risposte registrate nei pazienti in stato di minima coscienza possiedono **un livello di complessità** che è molto simile a quello ottenibile in soggetti svegli o che sognano; simili a queste attivazioni, ma ancora più integrate e differenziate, sono invece le risposte registrate nei pazienti locked-in, i quali sono completamente paralizzati, ma pienamente coscienti (figura 1.19C).

A proposito di livello di complessità, nel paragrafo successivo sarà introdotto un indice appositamente pensato per quantificare il grado di integrazione e differenziazione delle risposte corticali evocate da TMS.

Una serie di misure recentemente condotte su un numero significativo di pazienti cerebrolesi ha confermato che la TMS/hd-EEG è in grado di distinguere i pazienti in stato di coscienza minima da quelli in stato vegetativo (Rosanova et al., 2012).

Questo lavoro ha anche mostrato che un recupero del dialogo intracorticale può essere chiaramente osservabile prima ancora che sia manifesta la capacità del paziente di comunicare con l'esterno: misure ripetute nel tempo in un soggetto in evoluzione dal coma hanno mostrato, infatti, una netta ripresa dell'estensione e della complessità della risposta corticale alla TMS quando il paziente clinicamente sembrava ancora vegetativo; solo una settimana dopo, il paziente è stato in grado di comunicare che era cosciente.

Le misure empiriche condotte al letto del paziente confermano ancora una volta le predizioni teoriche e promettono lo sviluppo di un nuovo approccio diagnostico e prognostico al problema della coscienza nei pazienti portatori di gravi lesioni cerebrali.

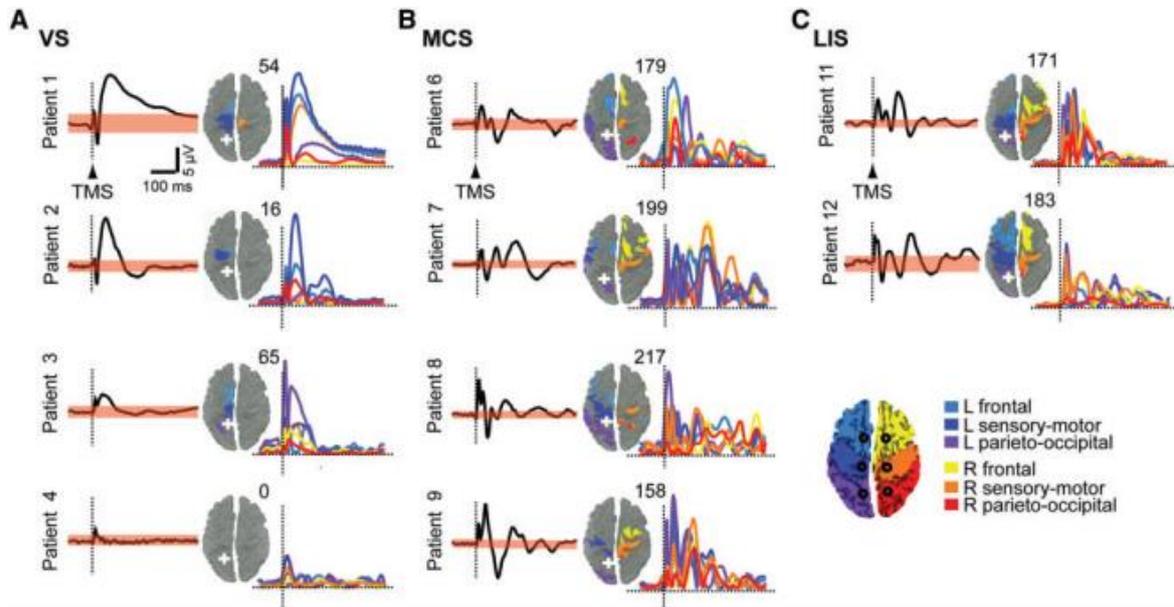


Figura 1.19 Risposte corticali TMS-evocate in pazienti con un severo disturbo di coscienza.

Un gruppo di quattro soggetti in stato vegetativo, quattro in stato di coscienza minima (MCS, B) e due pazienti con sindrome locked-in (LIS, C) hanno una sessione di TMS/EEG dopo 7 giorni di ripetute valutazioni mediante CRS-R. Per ciascun paziente, sono mostrati i potenziali evocati medi in corrispondenza di un elettrodo sotto lo stimolatore (traccia nera) e la rispettiva soglia di significatività. Le sorgenti interessate da correnti corticali massime (10 sorgenti più attive) durante il periodo post-stimolo significativo di global mean field power (GMFP) sono rappresentate sulla superficie corticale e codificate con diversi colori in base alla loro posizione in sei macro aree anatomiche, indicate in leggenda; il numero di sorgenti rilevate è indicato in alto a destra in ogni mappa. La serie temporali (tracce colorate) rappresentano le correnti corticali TMS-evocate in corrispondenza di un array di sei sorgenti (cerchi neri nella mappa corticale della leggenda) che distano 2 cm dalla linea mediana, una per ogni macro-area. Le croci bianche indicano i siti di stimolazione.

## 1.6 Perturbational Complexity Index (PCI)

L'identificazione di un marker oggettivo della capacità del cervello di generare coscienza, che non dipenda dalla capacità del soggetto di comprendere, comunicare o muoversi, è uno degli obiettivi principali per far fronte alla necessità clinica ed etica di valutare correttamente, in modo sensibile e affidabile, il livello di coscienza nei pazienti portatori di gravi lesioni cerebrali.

Il **Perturbational Complexity Index (PCI)** rappresenta una misura empirica della complessità cerebrale (Casali et al., 2013; Sarasso et al., 2014) che stima *la quantità di informazione contenuta nella risposta integrata del sistema talamocorticale ad una perturbazione diretta*.

L'indice di complessità, che varia tra **0** e **1**, ha un basso valore ogniqualvolta si verifici una ridotta interazione tra aree corticali (*perdita di integrazione*), in questo caso, la matrice di sorgenti attive indotte dalla TMS risulta spazialmente limitata; bassi valori di PCI si ottengono anche quando molte aree interagiscono e reagiscono alla perturbazione in modo stereotipato (*perdita di differenziazione*): la matrice risultante, in questo caso, è grande ma ridondante e quindi efficacemente comprimibile.

Alti valori di PCI si hanno solo quando la perturbazione iniziale viene trasmessa a numerose aree integrate tra di loro che reagiscono in modo differenziato, generando un complesso pattern spazio-temporale di attivazione che non può essere facilmente compresso.

PCI è stato quindi validato su un largo dataset di sessioni TMS-EEG registrate sia su soggetti sani (in veglia, sogno, sonno NREM e differenti livelli di sedazione indotti da vari anestetici tra cui propofol, midazolam, xenon) che su soggetti con lesioni cerebrali (Casali et al., 2013). Recentemente (Casarotto et al., in preparazione), tale indice è stato ulteriormente validato su una popolazione di soggetti e pazienti di controllo molto più ampia (150 soggetti) ed applicato su una popolazione di pazienti con disturbo di coscienza comprendente 73 pazienti, di cui 33 MCS e 40 VS). Tale lavoro incrementa il numero di pazienti e di sessioni, e include anche la condizione di anestesia con ketamina (Sarasso et al., in press) ove non si realizza una perdita di coscienza ma una condizione simile allo stato onirico

Per i dettagli e le fasi di calcolo di PCI si rimanda al paragrafo 2.3.

### **1.6.1 PCI riflette la presenza congiunta di integrazione e differenziazione**

Un esempio di applicazione della TMS con calcolo di PCI in un soggetto sano è mostrato in Fig.1.19. I pattern spaziotemporali di attivazione corticale evocata dalla TMS sono ottenuti calcolando le **matrici delle significant sources, SS (x, t)**, che descrivono dove (x) e quando (t) la TMS evoca una significativa attività corticale (Casali et al., 2010). In questo caso, esse sono state calcolate durante una sessione eseguita in veglia (intensità di stimolo 90 V / m) e due sessioni ottenuti con diverse intensità di stimolazione (90 e 160 V / m) in sonno NREM (fig. 1.20 B e C).

In veglia, la TMS ha innescato una catena di risposte significative in un complesso di aree corticali che si attivano a latenza diversa generando quindi un pattern spazio-temporale complessivo di attivazione corticale che risulta sia diffuso che differenziato.

La TMS erogata con gli stessi parametri di stimolazione, durante il sonno NREM, genera una risposta locale di breve durata (fig. 1.20 B), mentre aumentando l'intensità di stimolo si ottiene una tipica onda lenta (Massimini et al., 2007) ed una risposta corticale globale (fig. 1.20 C, in questo caso molte aree corticali sono costantemente attive per poche centinaia di millisecondi). La compressione di queste matrici permette di ottenere alti valori di PCI in veglia, quando le risposte corticali sono sia integrate che differenziate, e bassi valori di PCI in sonno NREM indipendentemente dall'ampiezza e dall'estensione della risposta alla TMS.

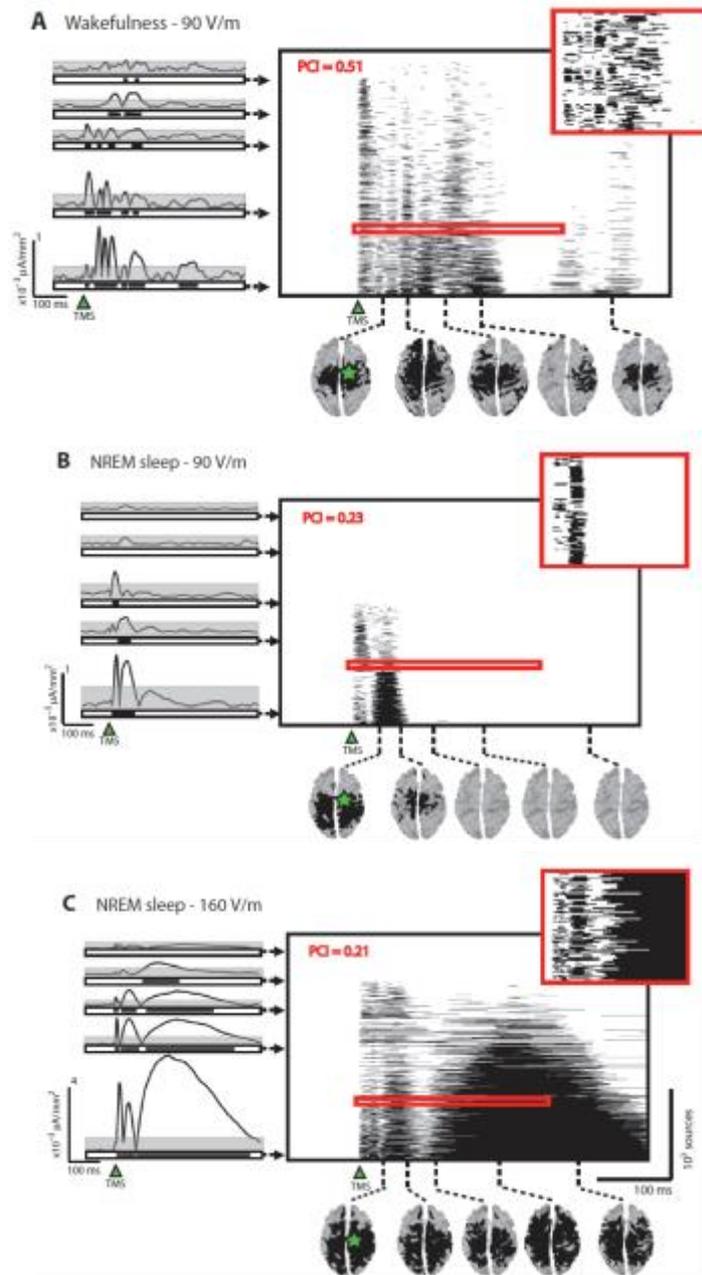


Figura 1.20 PCI misura simultaneamente integrazione e differenziazione (tratta da Casali et al., 2013).

Le matrici spazio-temporali delle sorgenti significative per un soggetto rappresentativo in veglia (A), sonno NREM a bassa intensità di stimolo (B), sonno NREM ad alta intensità di stimolo (C). In ogni matrice, le sorgenti sono ordinate dall'alto in basso in base all'entità totale di attivazione significativa durante il periodo post-stimolo. I riquadri rossi mostrano una porzione espansa della matrice SS per mostrare in dettaglio la sua struttura spazio-temporale. Le serie temporali, alla sinistra di ogni matrice, mostrano le correnti evocate dalla TMS per alcune sorgenti rappresentative. L'area grigia indica la soglia statistica (statistica di bootstrap) applicata ad ogni sorgente di attività, mentre i punti neri illustrati sotto ogni serie temporale rappresentano i punti nel dominio del tempo in cui la TMS ha generato attivazioni significative (questi stessi punti temporali vanno a costituire le corrispondenti righe della matrice SS). Le mappe corticali topografiche sotto ciascuna matrice SS mostrano l'estensione spaziale delle attivazioni corticali significative negli istanti di tempo selezionati. La stella verde indica il sito di stimolazione della TMS.

## 1.6.2 PCI discrimina le condizioni di coscienza e non coscienza nei sani

Successivamente sono stati verificati gli effetti di intensità e sito di stimolazione sul PCI in soggetti sani (Casali et al., 2013).

Nei soggetti in stato di veglia, l'indice varia entro un intervallo relativamente ristretto (tra 0.44 e 0.67; media  $\pm$  SD,  $0.55 \pm 0.05$ ; numero di misurazioni (n) = 110] rispetto a

- diversi siti di stimolazione [giro occipitale superiore (BA19), giro frontale superiore (BA08), giro parietale superiore (BA07), porzione rostrale della corteccia premotoria (BA06), e corteccia sensorimotoria vicino alla midline (BA04)],
- diverse intensità di stimolazione soprasoglia (campo indotto sulla superficie corticale: da 80 a 160 V / m),
- soggetti diversi [numero di soggetti n = 32].

Se i siti di stimolazione e le intensità di stimolazione vengono inseriti come fattori fissi in un modello misto lineare (LMM) (vedi Materiali e Metodi), si ricava che tali variabili non hanno effetto statisticamente significativo sui valori di PCI.

Inoltre, i valori PCI non dipendono

- dall'emisfero destro o sinistro stimolato con la TMS,
- dall'apertura o chiusura degli occhi del soggetto durante la procedura sperimentale.

Nello stesso gruppo di soggetti, l'indice di complessità è stato calcolato durante sonno profondo NREM e durante anestesia con vari farmaci (n = 24).

In queste condizioni di "non coscienza", PCI si riduce a valori compresi tra 0.12 e 0.31 [media  $\pm$  SD,  $0.23 \pm 0.04$ ; N = 42] con conseguente netta distinzione netta rispetto ai valori delle condizioni di "coscienza vigile" (fig. 1.21 A).

Considerando tutte le condizioni e confrontando gli effetti principali, si trova che i valori di PCI in veglia sono significativamente più alti (fig. 1.21 B) di quelli ottenuti

- in sonno profondo NREM (range, 0.18-0.28; media  $\pm$  SD,  $0.24 \pm 0.02$ ;  $P=10^{-19}$ ),
- dopo la somministrazione di midazolam (range 0.23-0.31; media $\pm$ SD, $0.28 \pm 0.03$ ;  $P=10^{-19}$ ),
- durante l'anestesia generale con propofol (range 0.13-0.30; media $\pm$ SD, $0.23 \pm 0.04$ ;  $P=10^{-13}$ )
- con xenon (range 0.12-0.31; media  $\pm$  SD,  $0.23 \pm 0.06$ ;  $P=10^{-22}$ ).

Nessuna differenza significativa si rileva tra i valori PCI delle diverse condizioni di "non coscienza" (fig. 1.21 B).

Inoltre, risulta riproducibile anche la durata di PCI (fig. 1.21 C): durante la veglia, PCI cresce ancora in modo significativo dopo i 100 ms, mentre in tutte le condizioni di non coscienza, esso raggiunge il plateau alla stessa latenza. La massima divergenza tra la crescita di PCI nelle condizioni di “coscienza” rispetto a quelle di “non coscienza” si realizza tra i 50 e 150 ms dopo la TMS.

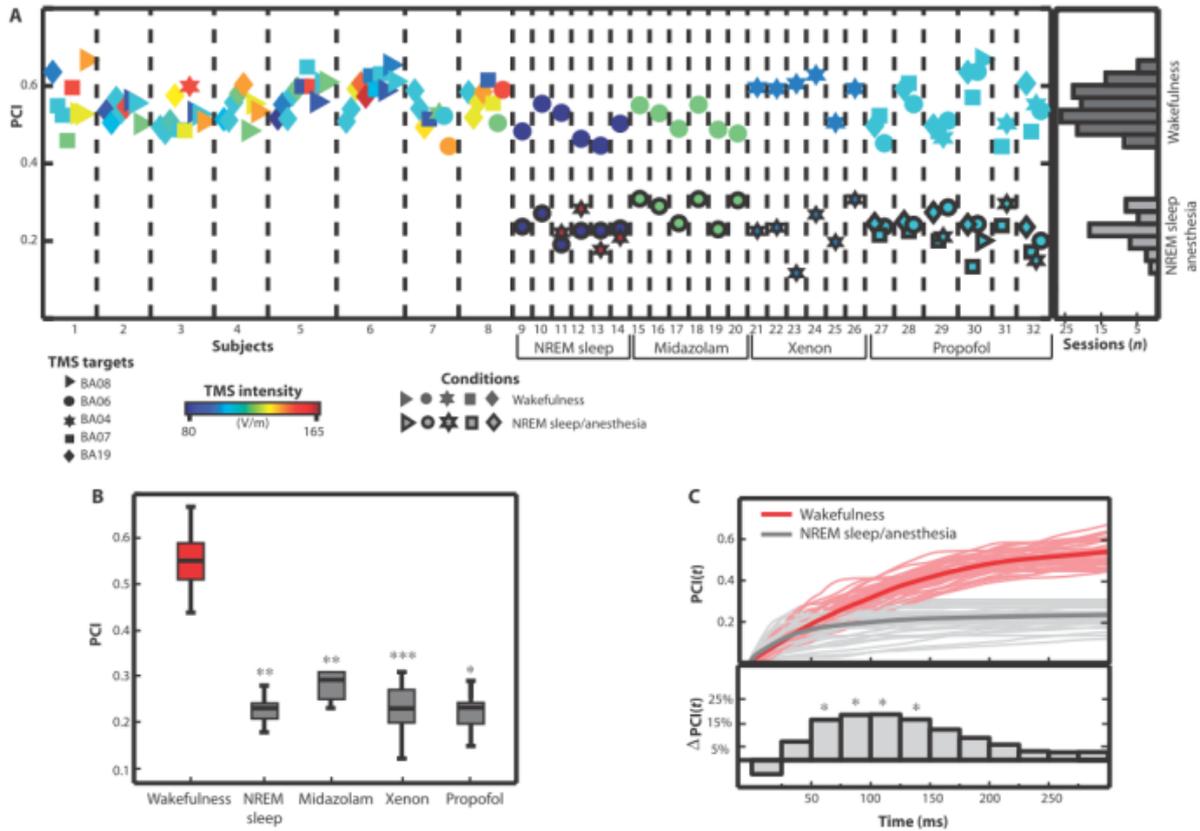


Figura 1.21 PCI discrimina tra le condizioni di coscienza e di non coscienza nei soggetti sani (tratta da Casali et al., 2013).

(A) Valori PCI raccolti da 152 sessioni in 32 soggetti sani stimolati con la TMS in diverse aree corticali (rappresentate da diverse forme geometriche), a diverse intensità (rappresentate dal colore) e in diverse condizioni (presenza/assenza del contorno nero). Gli istogrammi a destra mostrano la distribuzione di PCI tra i soggetti durante la veglia (barre grigio scuro) e durante la perdita di coscienza (barre grigio chiaro).

(B) I box plot con la significatività statistica (asterischi) rispetto al gruppo di veglia.

(C) Decorso temporale di PCI nel tempo.

### 1.6.3 PCI discrimina il livello di coscienza nei pazienti con lesioni cerebrali

Infine, il calcolo di PCI è stato effettuato per i soggetti portatori di gravi lesioni cerebrali (Casali et al., 2013). I valori PCI delle sessioni individuali di TMS/hd-EEG effettuate su 20 pazienti cerebrolesi sono stati direttamente confrontati con quelli ottenuti da 32 soggetti sani (fig. 1.22 A). In sei pazienti con una stabile diagnosi clinica di *stato vegetativo* (VS/UWS), svegli ma inconsapevoli, PCI varia tra 0.19 – 0.31 (media  $\pm$  SD,  $0.24 \pm 0.04$ ; N = 15), rientrando all'interno della distribuzione (0.12-0,31) osservata in soggetti sani durante il sonno NREM e anestesia. Al contrario, in due pazienti cerebrolesi che, al momento della registrazione, sono stati diagnosticati con *sindrome locked-in* (LIS) e che potevano comunicare in modo affidabile solo attraverso i movimenti oculari verticali, il PCI era maggiore di quello calcolato per i soggetti sani e svegli (range 0.51 - 0,62; media  $\pm$  SD,  $0.57 \pm 0.05$ ; N = 4).

PCI è stato calcolato anche in un gruppo di 12 pazienti che sono emersi dal coma e che hanno raggiunto un livello intermedio di coscienza, secondo la *coma recovery scale-revised* (CRS-R), di cui 6 hanno soddisfatto i criteri per uno *stato di coscienza minima* (MCS), mentre altri sei pazienti per uno *stato di emergenza dalla stato di minima coscienza* (EMCS). PCI nei pazienti MCS varia tra 0.32 – 0.49 (media  $\pm$  SD,  $0,39 \pm 0,05$ ; N = 15), mentre nei pazienti EMCS varia tra 0.37 – 0.52 (media  $\pm$  SD,  $0,43 \pm 0,05$ ; N = 14); in entrambi i casi, i valori PCI sono al di sopra dei valori massimi PCI osservati durante la perdita fisiologica e farmacologica di coscienza.

E' stata poi valutato il peso del sito di stimolazione e del livello di coscienza sui valori PCI (vedi Materiali e Metodi), scoprendo che tale indice è significativamente influenzato dal livello di coscienza del paziente ( $P=3 \times 10^{-8}$ ,  $F_{3,17.4}=42$ ) e che non ci sono stati effetti significativi del sito stimolazione scelto sui valori PCI ottenuti ( $P=0.9$ ,  $F_{3,37}=0,2$ ).

Dal riquadro B della figura 1.21 inoltre, si evince che i pazienti MCS hanno un valore PCI medio significativamente superiore a quello dei pazienti VS/UWS ( $P=2 \times 10^{-5}$ ) e significativamente inferiore a quella nei pazienti LIS ( $P = 0,0001$ ).

Allo stesso modo, PCI nei pazienti EMCS è significativamente maggiore rispetto ai pazienti VS/UWS ( $P = 8 \times 10^{-7}$ ) e inferiore a quello dei soggetti LIS ( $P= 0,002$ ).

In conclusione, alla luce dei risultati ottenuti con i soggetti considerati, possiamo affermare che PCI varia in modo graduale con il livello di coscienza.

PCI, inoltre, si comporta allo stesso modo se la perdita di coscienza è stata causata da un processo fisiologico (sonno) o dall'intervento farmacologico di agenti anestetici che presentano diversi meccanismi d'azione (midazolam, xeno e propofol); ciò suggerisce che tale indice è in grado di catturare un **correlato neurale del livello di coscienza** che è generale e affidabile.

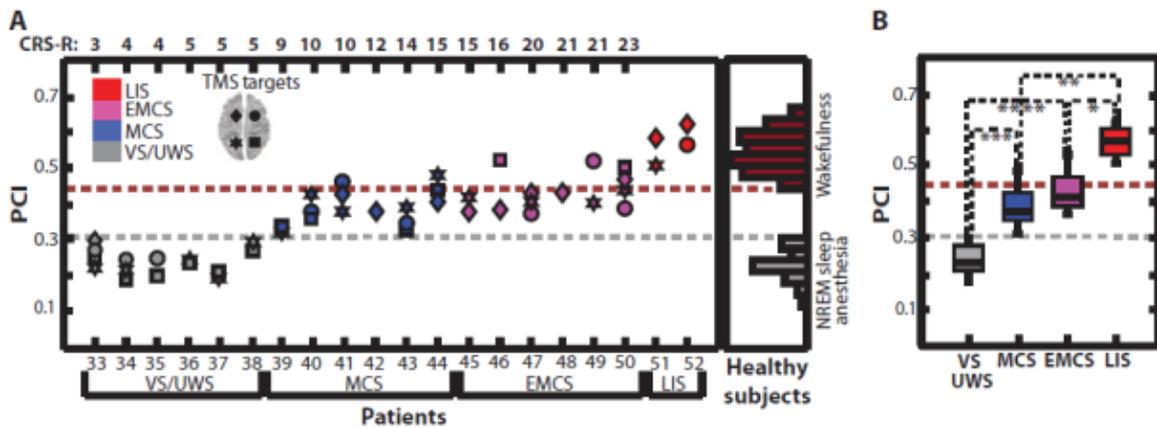


Figura 1.22 PCI discrimina il livello di coscienza in pazienti cerebrolesi.

(A) I valori PCI per 48 sessioni di TMS raccolti da 20 pazienti cerebrolesi (TMS mirata sia a sinistra che a destra di BA08 e BA07, come indicato in alto a sinistra). A destra: Distribuzione dei valori PCI degli individui sani.

(B) Box plots dai valori PCI in pazienti cerebrolesi con la significatività statistica tra coppie di condizioni (LMM: \* $P = 0.002$ , \*\* $P = 0,0001$ , \*\*\*  $P = 2 \times 10^{-5}$ , \*\*\*\*  $P = 8 \times 10^{-7}$ ). Le linee grigie e rosse tratteggiate in (A) e (B) rappresentano la complessità massima osservata durante la condizione di incoscienza ( $PCI = 0.31$ ) e la minima complessità osservata durante lo stato di veglia vigile ( $PCI = 0,44$ ) in soggetti sani, rispettivamente.

## 1.7 Obiettivi

PCI rappresenta un possibile esempio di indice calcolabile tramite specifiche operazioni di pre e di post processing del segnale elettroencefalografico rilevato in seguito ad una stimolazione magnetica transcranica. A prescindere dallo specifico processing del segnale e quindi dall'applicazione per la quale si decide di utilizzare la TMS, è fondamentale partire da un dato grezzo che sia già sufficientemente di buona qualità; in altre parole, al termine dell'esperimento, bisogna essere certi di aver acquisito una reale risposta corticale evocata da TMS.

Purtroppo, nonostante vengano tenute in considerazione le linee guida delineate al paragrafo 1.3 per soddisfare a questa necessaria condizione, la valutazione della qualità del dato durante l'esperimento di TMS/EEG è fortemente condizionata dagli strumenti che si hanno a disposizione.

In particolare, nel presente lavoro di tesi si è fatto uso dei due amplificatori EEG disponibili nel laboratorio ITCF dell'ospedale Sacco di Milano, Nexstim e BrainAmp, le cui caratteristiche principali sono già state descritte nel paragrafo 1.2.3.

Il primo, generalmente accoppiato al sistema di stimolazione cerebrale navigato della stessa azienda, possiede tutti i requisiti necessari per registrare e visualizzare correttamente le risposte elettroencefalografiche alla stimolazione magnetica transcranica e, pertanto, viene attualmente impiegato nella ricerca e nella clinica per eseguire esperimenti di TMS/EEG sia su soggetti sani che su pazienti. Avendo sostenuto un'ampia validazione, tale sistema è considerato come riferimento (gold-standard) in questo studio.

Esso presenta, però, il grande svantaggio di essere difficilmente trasportabile sia tra diversi centri di cura che all'interno della struttura stessa in cui viene impiegato, date le sue grandi dimensioni e peso, rendendo impossibile la cura al letto del paziente, sempre più fondamentale al giorno d'oggi; esso, inoltre, da qualche anno non viene messo più in produzione dalla Nexstim e questo sta spingendo i numerosi centri di cura e di ricerca che si occupano di TMS/EEG ad optare per la soluzione più compatta e flessibile proposta da BrainAmp.

Il loro amplificatore EEG presenta, infatti, il vantaggio di essere:

- totalmente portatile, grazie alle sue ridotte dimensioni,
- dotato di batteria e quindi immune dai molteplici disturbi di rete,
- accoppiato ad una cuffia EEG con elettrodi spostabili e/o rimuovibili,
- in grado di campionare i dati fino a 5000 Hz, quindi utilizzabile per registrare sia segnali EEG che elettromiografici.

L'amplificatore BrainAmp DC, infatti, è stato pensato per essere usato in diverse applicazioni e non specificatamente all'interno di un contesto di stimolazione magnetica transcranica; per questo motivo, è plausibile aspettarsi qualche limitazione nella sua applicazione ad esperimenti di TMS/EEG.

Per esempio, il software fornito da BrainAmp insieme all'amplificatore, presenta diverse limiti nella visualizzazione in tempo reale sia del dato EEG grezzo che dei potenziali evocati da stimolazione magnetica.

In particolare, si evidenziano le seguenti **limitazioni** del software:

1. L'artefatto da impulso elettromagnetico non può essere rimosso in tempo reale, mascherando un possibile artefatto muscolare che, se riscontrato, richiede il cambiamento dei parametri di stimolazione (la sede per esempio).
2. Lo scorrimento dei dati grezzi e l'aggiornamento della media tra i trial acquisiti non possono essere messi in pausa e i relativi segnali non possono essere ingranditi all'interno di una desiderata finestra di tempo e/o di ampiezza.
3. Il SNR non può essere calcolato in real-time.
4. I canali corrotti da rumore/artefatti non possono essere esclusi dal calcolo dell'*average reference* nel corso di una sessione di registrazione e, quindi, la visualizzazione topografica delle risposte corticali medie evocate non può essere adeguatamente apprezzata.

L'obiettivo del presente lavoro è stato quindi:

1. **Realizzare un'interfaccia grafica** (GUI) in Matlab per ottimizzare la visualizzazione in tempo reale dei dati di TMS/EEG, registrati con il sistema BrainAmp DC, e per valutare rapidamente la qualità della risposta cerebrale ad una stimolazione diretta.
2. **Confrontare** la risposta TMS-evocata acquisita con il Sistema BrainAmp con quella ottenuta con Nexstim, su soggetti sani, utilizzando il Divergence Index.
3. Mostrare che i potenziali evocati registrati con i due sistemi, in quanto significativamente simili, presentano **valori PCI** comparabili.

## 2 METODI E MODELLI COMPUTAZIONALI

In questo capitolo vengono introdotti i metodi e i modelli computazionali che sono stati utilizzati in fase di pre-elaborazione (cleaning, denoising) e analisi del segnale EEG, per valutare la diversità di due sessioni TMS/EEG e per misurare la complessità dei potenziali evocati. Pur mantenendo una trattazione ampia dei metodi utilizzati si fa preciso riferimento ai problemi posti dalla TMS-EEG.

### 2.1 Cleaning mediante ICA

L'analisi delle componenti indipendenti (Independent Component Analysis, ICA) è un metodo di elaborazione computazionale che serve per separare un segnale tempo-variante nelle sue sotto-componenti additive.

Utilizzando la definizione più generale possibile, l'ICA di un vettore casuale  $\mathbf{x} = (x_1, \dots, x_n)^T$  consiste nel trovare una trasformazione lineare  $\mathbf{s} = \mathbf{W} * \mathbf{x}$ , in modo che le componenti  $s_i$  siano il più indipendenti possibile, nel senso di massimizzare una funzione  $F(s_1, \dots, s_n)$  che misura l'indipendenza.

Questa definizione è la più generale nel senso che non viene fatta alcuna assunzione sui dati, che è in contrasto con la definizione espressa qui di seguito.

Il modello più utilizzato è sicuramente il *noise-free ICA model*, secondo il quale l'ICA del vettore casuale  $\mathbf{x}$  consiste nello stimare il seguente modello generativo dei dati:

$$\mathbf{x} = \mathbf{A}\mathbf{s} \tag{2.1}$$

dove le variabili (componenti)  $s_i$  del vettore  $\mathbf{s} = (s_1, \dots, s_n)^T$  sono ritenute **statisticamente indipendenti** e possiedono **una distribuzione nongaussiana**; la matrice  $\mathbf{A}$  di dimensione  $m \times n$  prende il nome di **mixing matrix**.

I diversi algoritmi esistenti per l'identificazione del modello ICA utilizzano misure quantitative di nongaussianità o di mutua informazione. Ad esempio, la routine di EEGLAB *runica*, utilizzata nel presente lavoro, implementa l'algoritmo *logistic infomax*.

Preliminare all'ICA è l'operazione di **Singular Value Decomposition**, applicata alla matrice dei dati per determinare il massimo numero di componenti indipendenti, *Cpca*.

*Cpca* rappresenta il numero di componenti indipendenti che l'algoritmo ICA dovrà determinare e corrisponde all'indice del valore singolare più grande fra tutti quelli maggiori di una certa soglia, generalmente fissata a 0.01 (punto d'intersezione tra la curva blu e la linea tratteggiata verticale in figura 2.1). Tale numero è dato: *numero di canali – bad channels – 1 (avg reference)*.

Dopo aver concatenato i trial (da matrice [ch,t,tr] a [ch,(t x tr)]) e rimosso la media temporale, viene quindi eseguita una riduzione della dimensionalità dei dati tramite **Principal Component Analysis (PCA)**; la matrice dei dati **X**, infatti, viene proiettata sulle prime *Cpca* componenti determinate. Infine, dopo un'operazione di *sphering*, la funzione *runica* calcola le *Cpca* componenti indipendenti dei dati precedentemente proiettati.

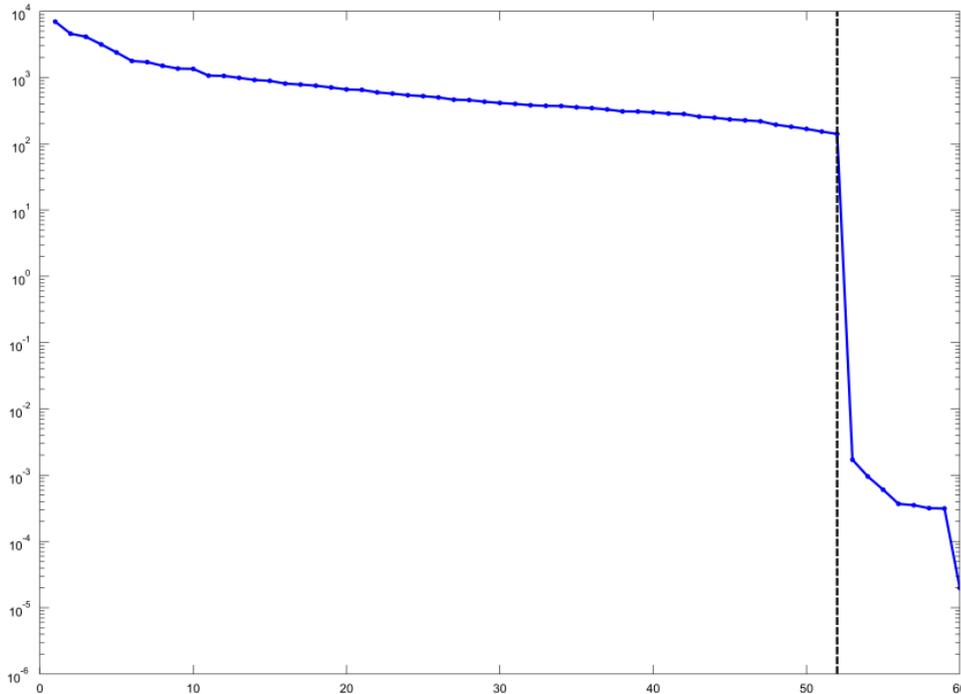


Figura 2.1 Valori singolari della matrice dei dati in scala semilogaritmica.

Ogni punto rappresenta il valore singolare associato ad un canale (60 in tutto). In questo caso i dati sono in average reference e la sessione contiene sette bad channels quindi si hanno 8 punti oltre la soglia, rappresentata dalla linea verticale nera tratteggiata. Il numero di componenti indipendenti è quindi 52 ( $Cpca=60-7-1=52$ ).

In uscita la funzione restituisce la matrice dei pesi **W** [comp,ch] e la matrice di sphering **Sph** di dimensione [ch,ch].

L'andamento temporale delle componenti indipendenti nei vari trial, **S**, è ottenibile tramite la seguente formula:

$$\mathbf{S} = \mathbf{W} * \mathbf{Sph} * \mathbf{X} \quad (2.2)$$

I pesi che tutte le componenti hanno nei vari canali sono contenute nella matrice **A**, data da:

$$\mathbf{A} = \mathit{pinv}(\mathbf{W} * \mathbf{Sph}) \quad (2.3)$$

dove *pinv* è la funzione che calcola la pseudoinversa. In altre parole, **A** rappresenta come si distribuisce l'attività delle componenti indipendenti nei canali EEG.

## 2.2 Confronto tra i potenziali TMS-evocati

Come discusso nell'introduzione e come presentato nei prossimi capitoli, la quantificazione delle differenze fra due distinti set di potenziali TMS-evocati è un problema ricorrente nell'analisi di sensitività, riproducibilità e validazione di uno strumento rispetto al gold-standard. Per valutare il grado di diversità tramite un singolo valore (Divergence Index - DI) corretto per il problema dei confronti multipli, è utilizzata una **procedura statistica non-parametrica basata su permutazione** (Casarotto et al., 2010).

### 2.2.1 Baseline test

In primo luogo, viene applicato il **Wilcoxon rank-sum test** per controllare che le baseline (250 ms pre-stimolo) dei singoli trial, che contribuiscono ai potenziali TMS-evocati delle due sessioni da confrontare, abbiano la stessa distribuzione statistica.

Si presume che i due insiemi di dati a confronto provengano da distribuzioni continue che sono identiche eccetto per un shift di posizione.

La funzione Matlab *ranksum* riceve in ingresso i due vettori contenenti le baseline delle due sessioni e restituisce il p-value, ovvero la probabilità di rifiutare l'ipotesi nulla (**la mediana delle due distribuzioni è uguale**) quando in realtà essa è vera. Piccoli valori del p-value mettono in dubbio la validità dell'ipotesi nulla.

In particolare, il ranksum test viene eseguito su ogni canale concatenando le baseline di tutti i trial per entrambe le sessioni, quindi su due vettori di dimensione  $[1, tr \times t \text{ baseline}]$ .

Se il p-value è maggiore dell' $\alpha$ -value stabilito per il test, il dato canale viene accettato.

Qualora il p-value sia minore dell' $\alpha$ -value in un dato canale, viene calcolato il massimo del valore assoluto del segnale nel pre-stimolo e il trial corrispondente in entrambe le sessioni.

Il trial che presenta il valore massimo più grande tra le due sessioni viene eliminato e la baseline correction ricalcolata nel caso in cui la percentuale di trial rimossi dal canale della sessione corrispondente sia stata inferiore al 5% , altrimenti il trial viene eliminato dal canale dell'altra sessione. Quindi i trial in cui le baseline differiscono maggiormente ( $P < 0.05$ ) vengono rimossi e il test viene ripetuto fino a quando le distribuzioni della baseline dei due gruppi di trial non sono statisticamente equivalenti o termina con il rifiuto del canale nel caso in cui da entrambe le sessioni sia già stato stato rimosso il 5% dei trial.

### 2.2.2 Permutazione

A questo punto, si potrebbe verificare l'ipotesi nulla che i due gruppi di potenziali TMS-evocati siano equivalenti. Se questo è il caso, "miscelando" insieme in una qualsiasi combinazione casuale i singoli trial registrati durante le due sessioni di TMS/EEG, i potenziali evocati dovrebbero risultare sempre statisticamente equivalenti. In caso contrario, l'ipotesi nulla deve essere rifiutata.

Così, per ogni confronto, 1000 potenziali TMS-evocati “misti” sono ottenuti **mescolando in maniera casuale e mediando 1000 volte** i singoli trial acquisiti separatamente nelle due diverse sessioni. Da ognuno dei 1000 potenziali viene rimossa la media temporale. L'insieme di 1000 valori in corrispondenza di uno specifico campione temporale di post stimolo rappresenta la **distribuzione di probabilità istantanea** empirica della tensione dei potenziali TMS-evocati, mostrata in figura 2.2 C. Viene detta distribuzione “nulla” in quanto assunta valida per l'ipotesi nulla di assenza di deviazioni sistematiche dei singoli potenziali.

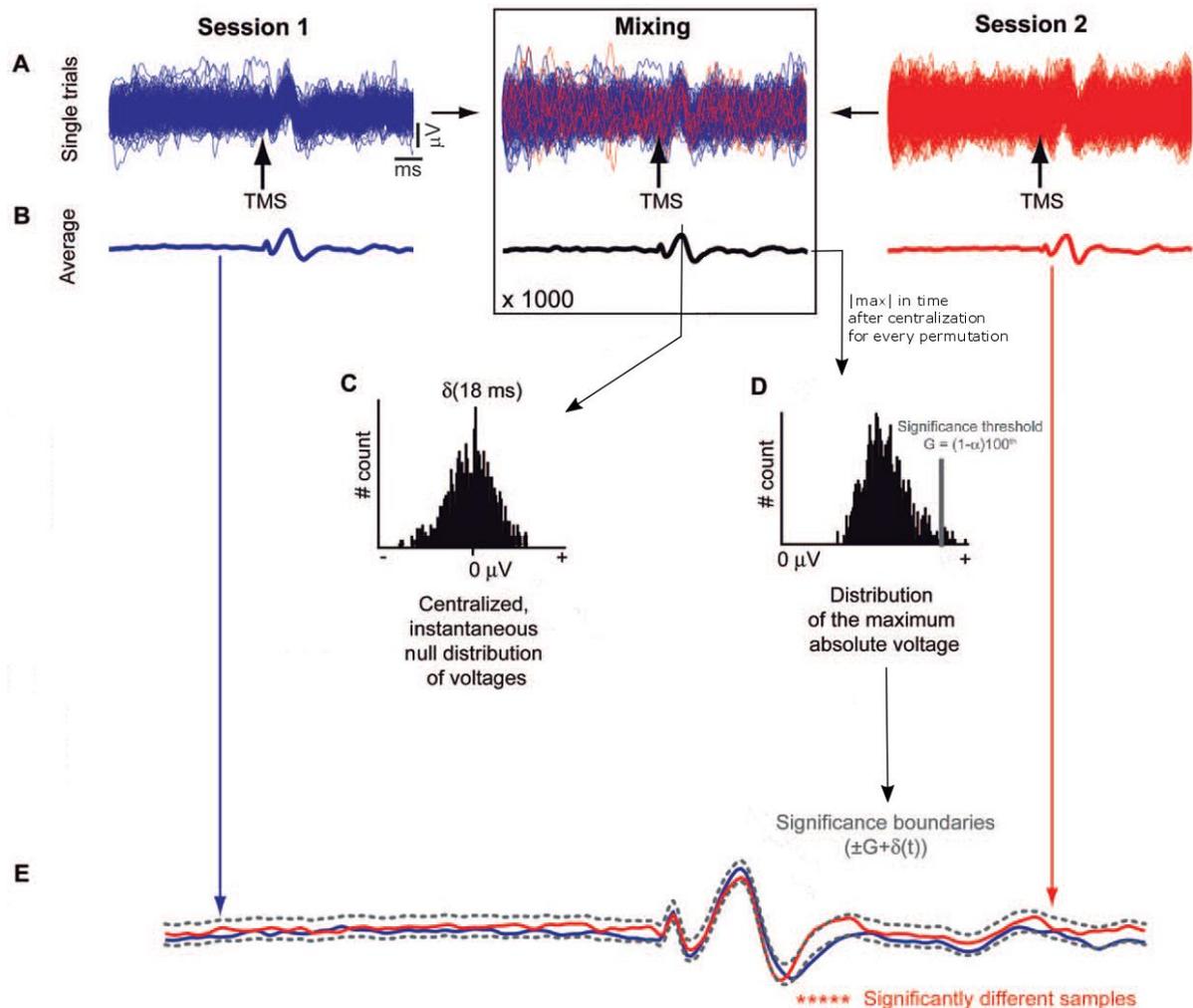


Figura 2.2 Procedura statistica non parametrica utilizzata per eseguire, a livello del singolo soggetto, confronti a coppie tra i potenziali evocati.

I singoli trial appartenenti alle due diverse condizioni (tracce blu e rosse) sono stati mischiati in maniera casuale (A) e mediati (B) 1000 volte. Le distribuzioni istantanee delle tensioni medie sono state calcolate e centralizzate intorno allo zero, memorizzando gli spostamenti  $\delta(t)$  (C). La distribuzione del valore massimo assoluto del potenziale evocato medio ottenuto per ogni permutazione è calcolato per definire una soglia di significatività  $G$  come  $(1 - \alpha) * 100^{\text{th}}$  percentile (D). I limiti di significatività (linee grigie tratteggiate) sono stati calcolati come  $(\pm G + \delta(t))$  ed utilizzati per definire i campioni temporali significativamente differenti (stelle rosse) tra le condizioni in un canale specifico (E).

### 2.2.3 Calcolo dei limiti di significatività

Allo scopo di evitare il problema dei confronti multipli nel tempo, è necessario calcolare un'unica distribuzione per tutto l'intervallo di tempo del trial come segue:

- tutte le distribuzioni istantanee sono **centralizzate** intorno allo zero, trasladole di una quantità pari a  $\delta(t)$  (figura 2.2 C);
- i **valori massimi assoluti** del potenziale medio ottenuto da ogni permutazione vengono calcolati e ordinati, a dare la distribuzione mostrata in figura 2.2 D
- il percentile  $(1 - \alpha) * 100$  della distribuzione dei valori massimi assoluti viene usato per stimare **una soglia di significatività G** per l'intera finestra temporale di interesse (figura 2.2 D);
- i **due confini di significatività** sono calcolati come  $(G + \delta(t))$  e  $(-G + \delta(t))$ . Il profilo temporale di questi due limiti è modulato da  $\delta(t)$ , poiché G è una soglia fissa.

L'ipotesi nulla di equivalenza tra le due risposte TMS-evocate ad ogni istante t è stata respinta con una probabilità di falsi positivi  $\alpha$ , corretta per confronti multipli, quando almeno uno dei due potenziali originali in quel campione temporale supera i limiti di significatività trovati (fig 2.2 E).

### 2.2.4 Calcolo del Divergence Index (DI)

Infine, per ogni confronto, il DI è stata definito come **la percentuale di campioni temporali significativamente diversi** nei primi 250 ms post-stimolo rispetto al numero totale di campioni spazio-temporali, considerando solamente i canali EEG che hanno superato il test sulla baseline.

Il totale dei campioni spazio-temporali è dato dal prodotto tra il numero di canali accettati e il numero di campioni presenti nella finestra temporale considerata.

## 2.3 Valutazione della complessità e Perturbational Complexity Index (PCI)

### 2.3.1 Source modeling

I potenziali postsinaptici generati tra i dendriti dei neuroni corticali piramidali sono ritenuti i principali contributori al segnale EEG (Nunez e Silberstein, 2000).

Le differenze di potenziale associate a questi potenziali postsinaptici generano correnti intracellulari post-sinaptiche (chiamato **primarie**, o generatori) e un loop di correnti extracellulari che fluiscono attraverso il volume conduttore (cosiddette correnti **secondarie**, di ritorno, o di volume). Entrambe le correnti primarie e secondarie contribuiscono ai potenziali elettrici rilevati sullo scalpo.

Localizzare le sorgenti elettromagnetiche primarie dell'attività EEG è un problema molto importante quando si desidera ricavare l'attività neurale generata esclusivamente dall'effetto causale di un gruppo di neuroni su un altro.

La soluzione di questo cosiddetto **problema inverso** comprende una procedura a due fasi che elimina l'effetto delle correnti secondarie che scorrono nei tessuti; la prima fase tiene conto delle proprietà geometriche e fisiche della testa al fine di costruire un modello di trasmissione della corrente all'interno del volume conduttore, chiamato **modello diretto**. La seconda fase, invece, stima la posizione delle correnti primarie nella corteccia cerebrale, associate al segnale EEG.

Nei seguenti paragrafi verrà descritto il metodo di Source modeling proposto da Casali et al. (2013) e attualmente utilizzato dal gruppo di ricerca del laboratorio ITCF dell'ospedale Sacco di Milano.

#### Il modello diretto

La modellazione della propagazione del campo elettromagnetico attraverso i diversi tessuti della testa dipende dalla rappresentazione parametrica delle sorgenti e del modello fisico-geometrico della testa. Dal momento che un insieme di correnti complesse può essere espresso come somma di sorgenti dipolari, la prima fase della procedura viene generalmente eseguita modellando le correnti primarie come **un insieme di dipoli equivalenti** che rappresentano l'attivazione totale dei neuroni piramidali in una data regione corticale. Poiché i segnali elettrofisiologici tipicamente hanno frequenze minori di 1kHz, le equazioni di Maxwell che regolano l'approssimazione dipolare possono essere ulteriormente semplificate al limite di quasi-staticità. Con questi presupposti, la densità di corrente libera che agisce come sorgente determina la tensione ai sensori sullo scalpo mediante il seguente modello algebrico lineare (Baillet et al., 2001; Mosher et al., 1999.):

$$\mathbf{v} = \mathbf{G} * \mathbf{j} + \boldsymbol{\varepsilon} \quad (2.4)$$

dove  $\mathbf{v} = \mathbf{v}(\mathbf{x}_e, t, k)$  è il vettore dei dati contenente i valori di potenziale sullo scalpo di un generico trial  $k \in \{1, 2, \dots, N_k\}$ , registrati al tempo  $t$  da  $N_e$  elettrodi situati in corrispondenza delle coordinate spaziali  $\mathbf{x}_e$ ;  $\mathbf{j} = \mathbf{j}(\mathbf{x}_j, t, k)$  è il corrispondente vettore delle sorgenti contenente l'attività elettrica istantanea di  $N_j$  sorgenti primarie dipolari situate nelle coordinate spaziali  $\mathbf{x}_j$  su una griglia fissa che ricopre l'intera corteccia cerebrale;  $\boldsymbol{\varepsilon} = \boldsymbol{\varepsilon}(\mathbf{x}_e, t, k)$  è un rumore di misura additivo istantaneo e  $\mathbf{G} = \mathbf{G}(\mathbf{x}_e, \mathbf{x}_j)$  è l'operatore diretto che definisce la propagazione del potenziale elettrico nei tessuti della testa e dipende esclusivamente dalle caratteristiche geometriche e fisiche della testa e dalle posizioni relative tra sensori e sorgenti.

Il modello di testa solitamente utilizzato nella maggior parte delle applicazioni cliniche e di ricerca utilizza tre sfere concentriche con diversa conducibilità omogenea; esse rappresentano le sfere che meglio fittano il cranio interno, il cranio esterno e lo scalpo, estratti da MRI del soggetto (Zang, 1995).

Un metodo molto utilizzato per il suo equilibrato trade-off tra risorse di calcolo, velocità di calcolo e l'accuratezza dei risultati è quello di **BERG** (Berg e Scherg, 1994; Zang, 1995).

Il metodo di BERG a 3 sfere è stato implementato tramite il pacchetto software Brainstorm, il quale costruisce un modello di sorgenti corticali tramite una griglia tridimensionale di 3004 dipoli fissi orientati normalmente alla superficie corticale del mesh canonico del Montreal Neurological Institute (MNI). Questo modello di testa viene poi adattato all'anatomia di ciascun soggetto utilizzando il pacchetto software Statistical Parametric Mapping (SPM5) come segue: maschere binarie del cranio e dello scalpo ottenute dalla risonanza magnetica del soggetto vengono deformate sulla base del corrispondente mesh MNI per approssimare la reale anatomia. Le soluzioni per l'operatore diretto  $\mathbf{G}$  vengono ottenute dopo la co-registrazione dei sensori EEG (digitalizzati tramite il sistema NBS al termine dell'esperimento) e della mesh del soggetto mediante rotazioni e traslazioni rigide dei landmark digitalizzati (nasion, trago sinistro e destro).

### Stima delle correnti primarie

Data una soluzione per l'operatore  $\mathbf{G}$ , le sorgenti primarie dei potenziali evocati possono essere ottenute dalla soluzione inversa dell'eq. (2.4). Tuttavia, questo problema inverso è fortemente indeterminato ( $N_j \gg N_e$ ) e matematicamente mal posto, dal momento che un numero idealmente infinito di configurazioni delle sorgenti può spiegare lo stessa distribuzione di potenziale sullo scalpo senza che siano imposti alcuni specifici vincoli anatomici e/o funzionali (a priori) sul rumore di misura e sulla configurazione delle sorgenti. Un vincolo semplice per il set di equazioni è quello di cercare, tra tutte le possibili soluzioni, quella che minimizza le deviazioni dal modello, ovvero,

$$\hat{\mathbf{j}} = \underset{\mathbf{j}}{\operatorname{argmin}} \left\{ \left\| \mathbf{C}_e^{-1/2} (\mathbf{v} - \mathbf{G} \cdot \mathbf{j}) \right\|^2 \right\} \quad (2.5)$$

dove si assume che il rumore di misura sia gaussiano con covarianza  $\mathbf{C}_e$ ,  $\boldsymbol{\varepsilon} \sim N(0, \mathbf{C}_e)$ .

Tuttavia, dal momento che questo approccio **Minimal Norm** può essere non realistico, il metodo classico utilizzato nella soluzione inversa generalizza tale approccio semplice utilizzando la regolarizzazione di Tikhonov (Tikhonov e Arsenin, 1977), la quale minimizza anche la norma pesata delle sorgenti di corrente:

$$\hat{\mathbf{j}} = \underset{\mathbf{j}}{\operatorname{argmin}} \left\{ \left\| \mathbf{C}_e^{-1/2} (\mathbf{v} - \mathbf{G} \cdot \mathbf{j}) \right\|^2 + \alpha \left\| \mathbf{H} \cdot \mathbf{j} \right\|^2 \right\} \quad (2.6)$$

dove  $\alpha$  è un parametro che esprime l'importanza relativa dei due termini che devono essere minimizzati e  $\mathbf{H}$  è un operatore di regolarizzazione che definisce alcuni vincoli anatomici e/o funzionali (a priori) sulla soluzione.

La soluzione al problema **Weighted Minimum Norm (WMN)** è data da:

$$\hat{\mathbf{j}} = \left[ \mathbf{G}^T \mathbf{C}_e^{-1} \mathbf{G} + \alpha (\mathbf{H}^T \mathbf{H}) \right]^{-1} \mathbf{G}^T \mathbf{C}_e^{-1} \cdot \mathbf{v} \quad (2.7)$$

Il principale svantaggio di WMN è la sua severità e la soluzione è altamente dipendente da  $\alpha$ .

In alternativa, la soluzione inversa può essere vista come un problema di inferenza: fare inferenza sulle cause (sorgenti di corrente  $\mathbf{j}$ ) a partire dagli effetti (potenziali sullo scalpo  $\mathbf{v}$ ). In presenza di rumore,  $\mathbf{v}$  può essere considerato il risultato di un processo stocastico in cui la probabilità di trovare una distribuzione di potenziale  $p(\mathbf{v})$  è determinata dalla probabilità di una data distribuzione di densità di corrente  $p(\mathbf{j})$  e dalla probabilità condizionale di  $\mathbf{v}$  dato  $\mathbf{j}$ ,  $p(\mathbf{v}|\mathbf{j})$ :

$$p(\mathbf{v}) = \sum_{\mathbf{j}} p(\mathbf{v} | \mathbf{j}) p(\mathbf{j}) \quad (2.8)$$

La soluzione inversa, che richiede di determinare la probabilità condizionale inversa  $p(\mathbf{v}|\mathbf{j})$ , è quindi equivalente al problema di inferenza che può essere affrontato con il **teorema di Bayes** dove

$$p(\mathbf{j} | \mathbf{v}) = \frac{p(\mathbf{v} | \mathbf{j}) p(\mathbf{j})}{p(\mathbf{v})}. \quad (2.9)$$

Quindi, la probabilità di  $\mathbf{j}$  dato  $\mathbf{v}$  è un prodotto normalizzato tra la funzione di verosimiglianza  $p(\mathbf{v}|\mathbf{j})$ , e la probabilità a priori sulle correnti,  $p(\mathbf{j})$ .

Quando si assume che le correnti sono distribuite come una gaussiana  $\mathbf{j} \sim N(0, \mathbf{C}_j)$ , il valore  $\mathbf{j}^*$  che massimizza la funzione di verosimiglianza con rumore Gaussiano  $\boldsymbol{\varepsilon} \sim N(0, \mathbf{C}_e)$  è data da (Mattout et al., 2006)

$$\mathbf{j}^* = \left[ \mathbf{G}^T \mathbf{C}_e^{-1} \mathbf{G} + \mathbf{C}_j^{-1} \right]^{-1} \mathbf{G}^T \mathbf{C}_e^{-1} \cdot \mathbf{v} \quad (2.10)$$

Confrontando le espressioni (2.7) e (2.10) vediamo che la soluzione che minimizza il WMN per un dato valore di  $\mathbf{C}_e$  e di  $\alpha$  è equivalente alla distribuzione delle sorgenti che massimizza la funzione di verosimiglianza assumendo, a priori, che le correnti siano gaussiane con covarianza  $\mathbf{C}_j = (\alpha \mathbf{H}^T \mathbf{H})^{-1}$ .

Pertanto, il problema (2.4) può essere riscritto secondo un modello Bayesiano parametrico ed empirico a due livelli:

$$\begin{cases} \mathbf{v} = \mathbf{G} \cdot \mathbf{j} + \boldsymbol{\varepsilon}_e \\ \mathbf{j} = \boldsymbol{\varepsilon}_j \end{cases} \text{ with } \begin{cases} \boldsymbol{\varepsilon}_e \propto N(\mathbf{0}, \mathbf{C}_e) \\ \boldsymbol{\varepsilon}_j \propto N(\mathbf{0}, \mathbf{C}_j) \end{cases} \quad (2.11)$$

dove  $\mathbf{C}_e$  e  $\mathbf{C}_j$  rappresentano le matrici di covarianza rispettivamente del primo e del secondo livello di tale approccio Bayesiano. E' stato assunto che  $\mathbf{C}_e$  sia indipendente tra gli elettrodi EEG, con varianza fissa calcolata nella finestra temporale di pre-stimolo. Il secondo livello dell'approccio bayesiano, invece, è stato modellizzato mediante due assunzioni a priori: il vincolo WMN ( $\mathbf{H} = \mathbf{I}$  dove  $\mathbf{I}$  è la matrice identità nello spazio delle sorgenti) e la distribuzione gaussiana della covarianza delle sorgenti lungo la geodetica con un parametro di smoothing pari a 8 mm (Mattout et al., 2006), al fine di far valere la relazione di correlazione tra sorgenti vicine. Dopo che  $\mathbf{C}_e$  e  $\mathbf{C}_j$  sono state stimate, la soluzione inversa  $\mathbf{j}$  è dato dall'eq. (2.10).

La stima della distribuzione delle sorgenti elettriche nel cervello è quindi stata ottenuta tramite l'approccio Bayesiano descritto, implementato nel software SPM5.

Il metodo a due fasi che comprende il modello diretto e la ricostruzione delle sorgenti è stato completamente validato nel corso degli anni, usando dataset simulati (Hauk, 2004), potenziali evocati periferici (Komssi et al., 2004b) e registrazioni intracraniche nei pazienti epilettici (Tanaka et al., 2010). In particolare, il vincolo WMN richiede minime informazioni a priori sulla natura della distribuzione delle sorgenti e determina una localizzazione delle correnti primarie neuronali che è a bassa risoluzione (pochi centimetri) ma molto affidabile; pertanto, esso rappresenta un'utile strumento di modellizzazione quando la robustezza è più importante della risoluzione spaziale.

## Analisi statistica delle attivazioni corticali

Dopo la ricostruzione delle sorgenti, le correnti secondarie vengono eliminate e si ottengono i singoli trial delle correnti dipolari primarie, sincronizzate con la stimolazione. Mediando queste correnti TMS-correlate, l'attività delle sorgenti corticali dovuta a fattori interni ed esterni non controllati è ridotta al minimo, rivelando le componenti spazio-temporali dei potenziali EEG evocati dalla stimolazione magnetica. Tali correnti medie riflettono **le proprietà deterministiche** dei circuiti neurali che vengono attivati.

L'ipotesi secondo cui esse sono prodotte, nella regione sotto la stimolatore, direttamente dalla stimolazione magnetica o, in aree corticali distanti, per effetto causale dell'attivazione di altri gruppi neuronali da parte dei neuroni corticali stimolati, dipende da un requisito molto importante: l'attività media in questione deve essere assente quando lo stimolo non è applicato.

Pertanto, al fine di valutare l'attività correlata alla stimolazione (e quindi alle interazioni causali tra gruppi neuronali), dopo il source modeling dobbiamo valutare dove ( $\mathbf{x}_j$ ) e quando ( $t$ ) la risposta corticale media

$$\mathbf{j}_{avg}(\mathbf{x}_j, t) = \frac{1}{N_k} \sum_{k=1}^{N_k} \mathbf{j}(\mathbf{x}_j, t, k) \quad (2.12)$$

è significativamente diversa dall'attività di pre-stimolo delle sorgenti. A causa del gran numero (3004) di sorgenti corticali, occorre controllare per il rischio di falsi positivi per valutare la loro significatività, applicando una procedura **statistica non parametrica bootstrap-based**, schematizzata in figura 2.12.

Prima di tutto, l'attività di ogni sorgente corticale è stata centralizzata e normalizzata sul valor medio e la deviazione standard della sua baseline (da -500 a -1 ms), in modo da attribuire lo stesso peso a tutte le sorgenti nell'analisi statistica ( $\mathbf{j}_{avg}^n$  e  $\mathbf{j}^n$ ).

Successivamente viene ottenuta **un'attività media surrogata della baseline** per ogni sorgente mescolando in modo casuale i campioni temporali di pre-stimolo; per ogni sorgente, infatti, viene preso un campione casuale all'interno della finestra temporale di pre-stimolo di ogni trial, ottenendo come risultato la matrice  $\mathbf{j}_{boot}(source, trial)$ . A questo punto, dopo un'operazione di media, viene calcolato il valore massimo assoluto dei surrogati tra tutte le sorgenti.

L'intera procedura è stata ripetuta 70000 volte per ottenere una distribuzione di 70000 bootstrap. Il controllo sui confronti multipli è stato quindi ottenuto calcolando **la funzione di distribuzione cumulativa F** del valore massimo assoluto nello spazio delle sorgenti:

$$\mathbf{M}_b = \max_{\mathbf{x}_j} \left| \mathbf{j}_{boot}(\mathbf{x}_j) \right| \text{ with } b = 1, \dots, N_b \quad (2.13)$$

Il percentile  $(1 - \alpha) * 100$  della distribuzione F viene usato per stimare **una soglia di significatività  $T(\alpha)$**  per tutte le sorgenti normalizzate e per tutti i campioni all'interno della finestra temporale di interesse.

L'**ipotesi nulla di assenza di risposta TMS-evocata nella media** al tempo  $t$  per la sorgente che si trova nelle coordinate  $\mathbf{x}_j$  viene rifiutata con probabilità di falsi positivi  $\alpha$  quando

$$\left| \mathbf{j}^n_{avg}(\mathbf{x}_j, t) \right| > T(\alpha) \quad (2.14)$$

Questo metodo permette di determinare la **distribuzione spazio-temporale binaria delle sorgenti statisticamente significative  $SS(\mathbf{x}_j, t)$** :  $SS(\mathbf{x}_j, t) = 0$  per tutte le sorgenti ( $\mathbf{x}_j$ ) e i campioni temporali ( $t$ ) in cui l'ipotesi nulla non può essere rifiutata,  $SS(\mathbf{x}_j, t) = 1$  altrimenti.

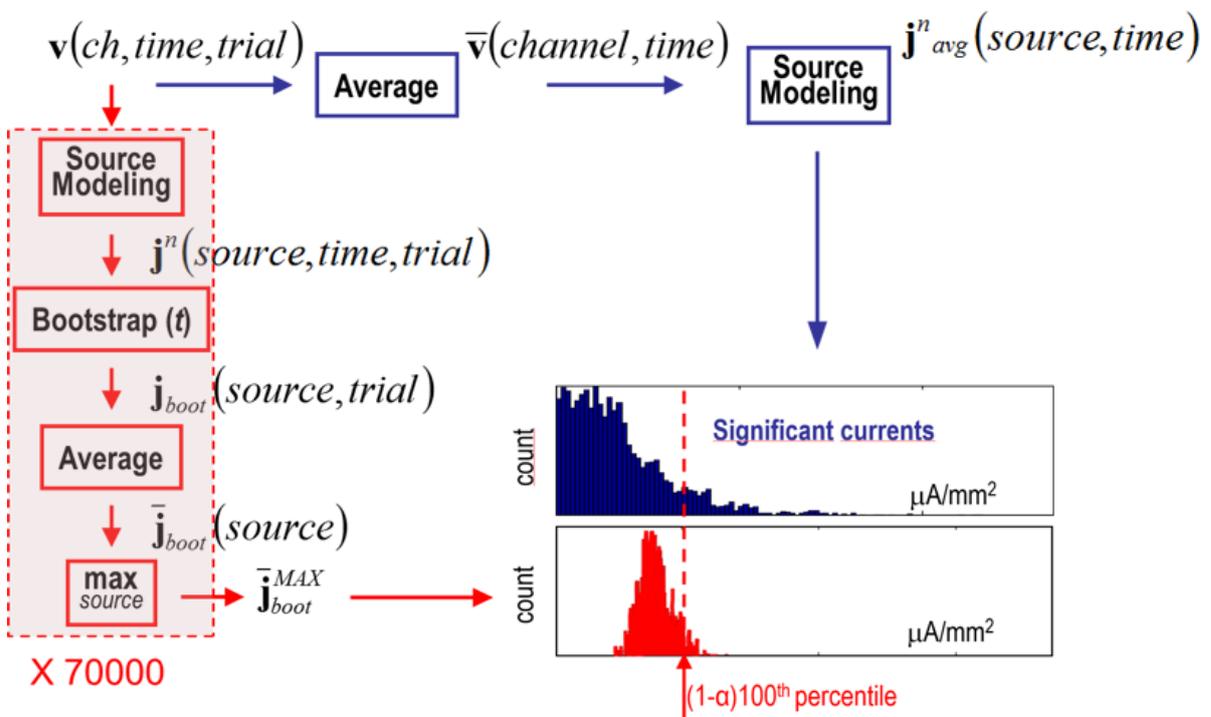


Figura 2.3 Analisi statistica non parametrica basata su procedura bootstrap utilizzata per determinare l'attività elettrica, correlata alla stimolazione magnetica, delle sorgenti corticali determinate con il source modeling. Il risultato di tale procedura è la distribuzione spazio-temporale binaria delle sorgenti statisticamente significative.

### 2.3.2 Complessità dei pattern di risposta

La complessità spazio-temporale del pattern di attivazione corticale può essere compresa osservando la matrice binaria delle sorgenti significative  $SS(x_j, t)$ , la quale indica dove e quando l'attività delle sorgenti è significativamente correlata alla stimolazione (si veda figura 2.4).

Come già chiarito nel paragrafo 1.6.1, la complessità delle matrici SS, piuttosto che l'ampiezza, la durata o l'estensione della risposta TMS-evocata, è ciò che distingue lo stato di veglia vigile, quando la coscienza è inequivocabilmente presente, dal sonno a onde lente, quando la coscienza svanisce.

In generale, esiste una relazione chiara e intuitiva tra la complessità di un pattern e il suo contenuto informativo. Questa idea ha spinto, nel 1960, Andrei Kolmogorov ed altri studiosi a definire la **complessità algoritmica** di una stringa come la lunghezza del programma più breve di un computer in grado di generare la stringa.

La complessità di Kolmogorov, tuttavia, è stata ritenuta fin da subito impossibile da calcolare in modo efficace e diverse misure approssimate sono state sviluppate per quantificare in modo affidabile la complessità algoritmica.

Una delle più popolari misure di complessità, appartenente alla classe di Kolmogorov, è stata introdotta da Lempel e Ziv (1976). Questa misura approssima **la quantità di informazioni non ridondante contenuta in una stringa** stimando la dimensione minima del "vocabolario" necessario per descrivere la stringa.

Stringhe con elevata complessità Lempel-Ziv richiedono un gran numero di diversi pattern ("parole") per essere riprodotte, mentre le stringhe con bassa complessità Lempel-Ziv possono essere in gran parte compresse con pochi pattern, utilizzati per eliminare la ridondanza senza perdita di informazioni.

La misura di Lempel-Ziv appare dunque il candidato naturale per quantificare la comprimibilità del contenuto informativo presente nei pattern di attività corticale evocati da TMS, correlati alla capacità del cervello di generare coscienza.

Nei seguenti paragrafi verrà descritto l'algoritmo di compressione proposto da Casali et al. (2013) e attualmente utilizzato dal gruppo di ricerca del laboratorio ITCF dell'ospedale Sacco di Milano per gli studi sullo stato cognitivo di pazienti traumatici.

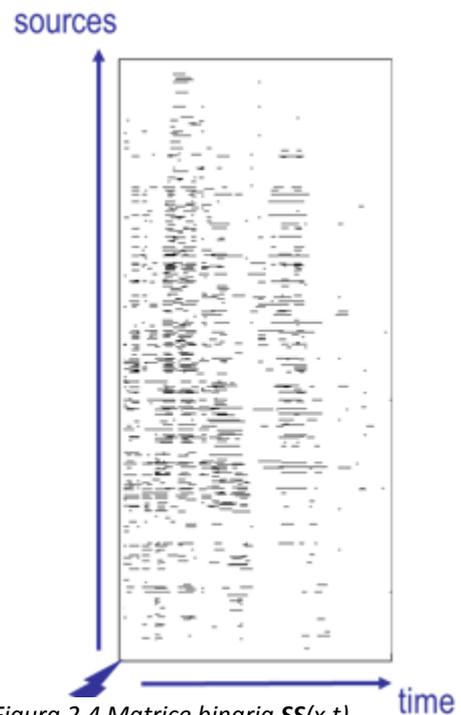


Figura 2.4 Matrice binaria  $SS(x,t)$ .

### 2.3.3 Algoritmo di Lempel-Ziv per matrici binarie

La misura di Lempel-Ziv, per una sequenza binaria di lunghezza arbitraria  $L$ , analizza la sequenza cercando al suo interno sottosequenze di caratteri consecutivi o "parole".

La complessità di Lempel-Ziv  $c_L$  rappresenta il numero di volte che una nuova sottosequenza viene rilevata e quindi quantifica la numerosità delle differenti "parole" che sono necessarie per descrivere il contenuto della stringa.

L'algoritmo utilizzato nel presente lavoro è una semplice generalizzazione al caso di matrici binarie, come le  $SS(x,t)$ , al posto delle stringe unidimensionali. Esso, infatti, procede lungo la dimensione verticale della matrice di ingresso (colonne) alla ricerca di pattern binari, e ripete questa ricerca lungo la dimensione orizzontale (righe), memorizzando i pattern riscontrati nelle colonne precedenti.

Lo schema dell'algoritmo implementato per il calcolo di  $c_L$  è mostrato in figura 2.5.

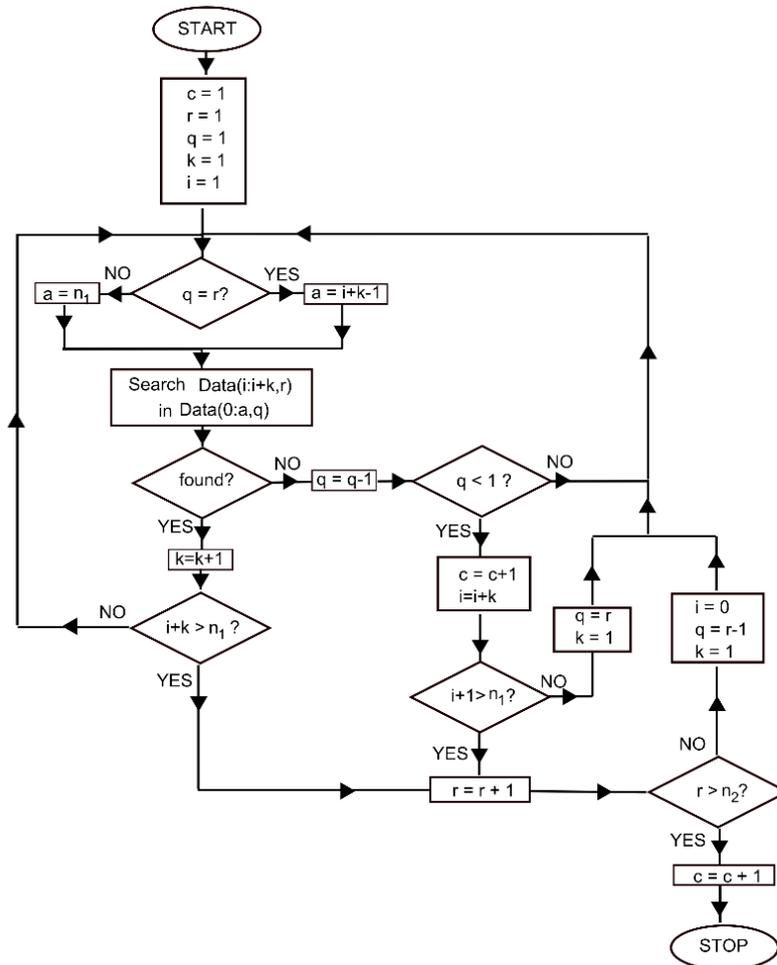


Figura 2.5 Schema dell'algoritmo utilizzato per calcolare la complessità secondo Lempel-Ziv di una matrice binaria.

L'ingresso dell'algoritmo è una matrice binaria  $n_1 \times n_2$  "Data", costituita da elementi  $s(i, j) = 0$  o  $1$  con righe  $i=1 \dots n_1$  e colonne  $j=1 \dots n_2$ .

Pattern di lunghezza  $k$  sono sequenze di  $k$  bit,  $Data(i:k, j) = s(i+1, j) s(i+2, j) \dots s(i+k, j)$ , con  $0 < j+k < n_1$ .

L'algoritmo dà in uscita la complessità Lempel-Ziv  $c_L$  della matrice  $SS$ .

Il comportamento asintotico di  $c_L$  per stringhe casuali generate da una sorgente con entropia  $H(L)$  è pari a  $LH(L)/\log_2(L)$  (Lempel e Ziv, 1976) dove

$$H(L) = -p_1 \cdot \log_2(p_1) - (1 - p_1) \cdot \log_2(1 - p_1) \quad (2.15)$$

e  $p_1$  è la frazione di '1' contenuti nella stringa binaria di lunghezza  $n$  (nel nostro caso, i campioni spazio-temporali significativi contenuti in **SS**). Pertanto, le deviazioni dalla massima complessità possono essere dovute al fatto che **H** è diversa da 1 e non alla formazione di un pattern nella stringa.

Per questo motivo, viene presa in considerazione la **complessità normalizzata di Lempel-Ziv**  $\bar{c}_L$  (Kaspar e Schuster, 1987)

$$\bar{c}_L = c_L \cdot \log_2(L) / (L \cdot H(L)) \quad (2.16)$$

la quale tende asintoticamente ad 1 per sequenze fortemente casuali.

### 2.3.4 Perturbational Complexity Index secondo Lempel-Ziv ( $PCI_{LZ}$ )

Sulla base di queste considerazioni, il Perturbational Complexity Index di Lempel-Ziv ( $PCI_{LZ}$ ) delle attivazioni spazio-temporali significative TMS-evocate è definito come la **complessità normalizzata di Lempel-Ziv**  $\bar{c}_L$  della matrice binaria **SS**.

Assumiamo che  $x$  e  $t$  siano gli indici discreti delle dimensioni spaziali e temporali rispettivamente,  $x = 1 \dots L_1$  e  $t = 1 \dots L_2$ ,  $L$  è il numero totale di campioni spazio-temporali di **SS**( $x,t$ ),  $L = L_1 \times L_2$ , e  $l(t)$  è il numero di campioni spazio-temporali di **SS**( $x,t$ ) fino al un tempo  $t$ ,  $l(t) = L_1 \times t$ .

Avendo **SS** come ingresso, per ogni istante di tempo  $t$  l'algoritmo calcola un numero,  $c_l(t)$ , che corrisponde alla complessità di Lempel-Ziv della sequenza bidimensionale di lunghezza  $l(t)$ .

$PCI$  è quindi equiparato alla complessità di Lempel-Ziv della sequenza completa bidimensionale di lunghezza  $L$ ,  $c_L = c_l(t = L_2)$ , normalizzata per  $LH(L)/\log_2(L)$ :

$$PCI_{LZ} = c_l(t = L_2) \times \frac{\log_2(L)}{LH(L)} \quad (2.17)$$

La normalizzazione della misura di Lempel-Ziv tramite l'entropia delle sorgenti **SS** determina una misura di complessità che è minimamente dipende dalla quantità totale di attività significativa e massimamente dipendente dal numero di differenti pattern necessari per descrivere i dati. Questa normalizzazione è giustificata dal fatto che il livello di coscienza non è correlato alla frazione di sorgenti statisticamente significative nel periodo di post-stimolo, la quale dipende invece da fattori esterni quali, ad esempio, l'intensità di stimolazione.

Il  $PCI_{LZ}$  rappresenta quindi una misura che aumenta con il numero di differenti pattern spaziali che occorrono ad un dato istante temporale e che non si verificano in campioni precedenti.

Stimando la complessità algoritmica dei pattern di attivazione spaziale, l'algoritmo illustrato in figura 2.5 è in grado di fornire **una misura dinamica di complessità**,  $PCI_{LZ}(t) = c_l(t) \times \log_2(L)/LH(L)$ , che aumenta monotonamente con l'emergere temporale dei pattern spaziali non ridondanti di attivazione corticale significativa.

In linea di principio, la complessità del pattern spaziali dipende dell'ordinamento arbitrario delle righe di **SS** (sorgenti) e la corretta complessità della  $SS(x, t)$  dovrebbe essere identificata con la minima complessità fra tutte le diverse permutazioni delle sorgenti.

Dal momento che cercare fra tutte le permutazioni possibili richiederebbe un calcolo computazionalmente impraticabile, si approssima l'ordinamento ottimale calcolando PCI da **SS** dopo aver ordinato le sorgenti sulla base del loro numero di campioni significativi.

Raggruppando, da un lato, le sorgenti più attive e, dall'altro lato, tutti quelle inattive, questa scelta approssima la minore complessità dell'ordimento spaziale della matrice **SS**.

### 3 SOFTWARE E SISTEMA DI ACQUISIZIONE

Nel presente capitolo verrà descritta la struttura e il funzionamento dell'interfaccia utente che ho realizzato per ottimizzare la visualizzazione in tempo reale dei dati di TMS/EEG, registrati con l'amplificatore BrainAmp DC. L'obiettivo è stato sviluppare uno strumento software che permetta di valutare la qualità della risposta cerebrale alla TMS durante l'esperimento.

#### 3.1 Schemi funzionali di progetto

Il software di visualizzazione è stata realizzato utilizzando il **Remote Data Access (RDA)**, ovvero uno specifico modulo del software di acquisizione EEG fornito dalla Brain Products, il *BrainVision Recorder*. Esso funge da **server** mentre il programma che riceve i dati assume il ruolo di **client**, come mostrato in figura 3.1.

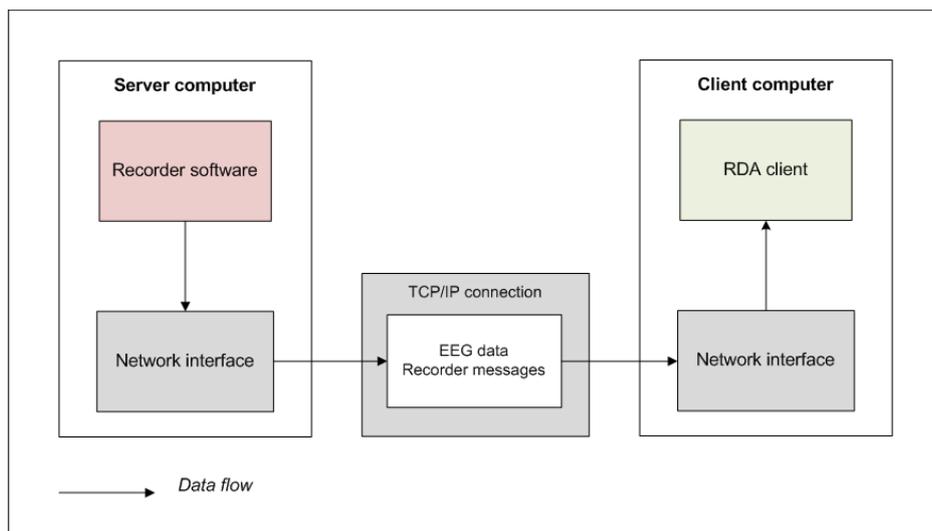


Figura 3.1 Schema d'interazione tra i due elementi del processo, server e client.

I due software lavorano su computer differenti che vengono fisicamente connessi tramite un cavo Ethernet, come mostrato in figura 3.2.



Figura 3.2 Schema del setup hardware utilizzato per la realizzazione della GUI in Matlab.

Per mezzo di uno specifico adattatore USB, i due amplificatori da 32 canali inviano i dati EEG al laptop di registrazione, sul quale è installato il software BrainVision Recorder (server). Quest'ultimo è poi connesso ad un secondo computer (client) tramite cavo Ethernet, permettendo così la trasmissione e quindi la visualizzazione dei dati sull'apposita interfaccia grafica realizzata ( Matlab GUI)

## 3.2 Strumenti SW e protocolli di comunicazione

### 3.2.1 Matlab Graphical User Interface (GUI)

Una **interfaccia grafica utente (GUI)** è un sistema di visualizzazione grafica in una o più finestre contenenti controlli, chiamati *componenti grafici*, che consentono a un utente, tramite semplici operazioni interattive, di svolgere calcoli, leggere e scrivere file di dati, visualizzare i dati per mezzo di tabelle o grafici e comunicare con altre interfacce utente.

I componenti dell'interfaccia possono essere menu, barre degli strumenti, pulsanti, box a lista e barre di scorrimento, solo per citarne alcuni.

La grande usabilità di questo strumento fa sì che l'utente non debba né creare uno script o digitare comandi nella riga di comando, né capire i dettagli di come vengono eseguite le diverse operazioni per poter svolgere le proprie attività.

In genere, le GUI attendono l'operazione "punta e clicca" dell'utente per manipolare un controllo e rispondere, a turno, ad ogni sua azione. In particolare, ogni controllo/componente è associato ad una o più funzioni di *callback*, così chiamate per il fatto che esse "richiamano" Matlab per chiedergli di eseguire le operazioni definite all'interno dalle funzioni stesse. Ad esempio, una particolare azione da parte dell'utente, come il click su un pulsante, genera un *evento*, al quale la GUI risponde eseguendo le operazioni definite nella funzione di callback del componente generante l'evento stesso.

In questo tipo di programmazione, spesso definito *event-driven*, l'esecuzione della callback è **asincrona**, cioè un evento esterno al software è in grado di attivare l'esecuzione della funzione di callback corrispondente anche quando un'altra callback è in corso d'esecuzione; molti eventi sono generati dall'interazione dell'utente con l'interfaccia, ma questa può rispondere anche ad altri tipi di eventi come, ad esempio, la creazione di un file o il collegamento di un dispositivo al computer.

Per quanto riguarda l'aspetto di progettazione, in Matlab è possibile realizzare una GUI in due modi:

1. Utilizzando l'ambiente di progettazione chiamato **Graphic User Interface Design Environment (GUIDE)**,
2. A livello di programmazione.

Il primo approccio inizia con una *figure* che il programmatore popola con i componenti disponibili all'interno di un editor di layout grafico, come mostrato in figura 3.3. Al momento del salvataggio del front-end, GUIDE crea automaticamente un file di codice Matlab contenente le funzioni di callback associate a tutti i componenti inseriti all'interno dell'interfaccia. È poi possibile avviare la propria applicazione sia dal file della figure (.fig) che da quello di codice(.m).

Nel secondo invece, è necessario crearsi un file di codice che definisce le proprietà e i comportamenti di tutti i componenti.

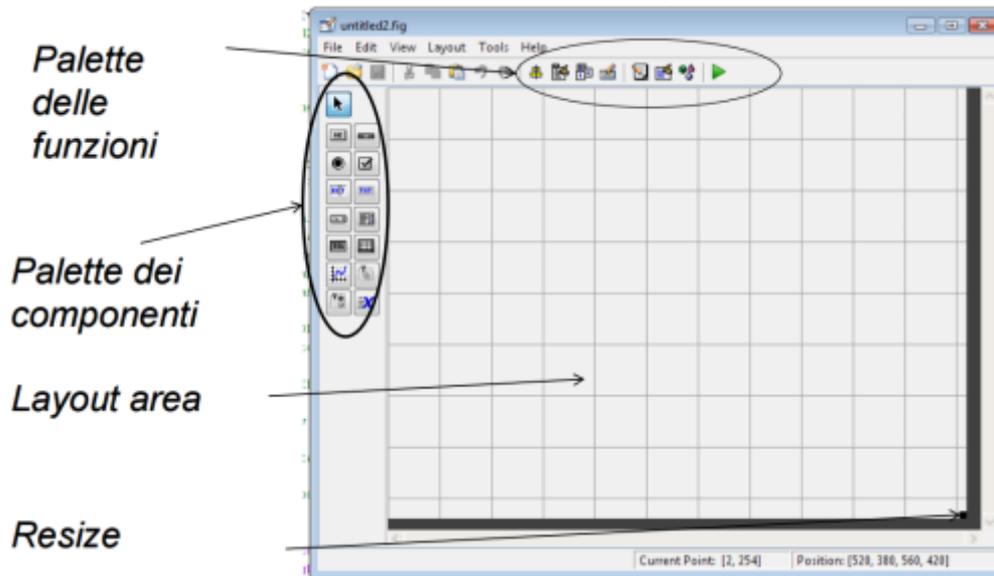


Figura 3.3 Ambiente di progettazione GUIDE in Matlab.

Quando l'utente esegue il file, si crea automaticamente una *figure*, popolata con tutti componenti definiti, in grado di gestire, analogamente al primo approccio, le varie interazioni degli utilizzatori. In genere, la *figure* non viene salvata tra le sessioni, perché il file di codice ne crea una nuova ogni volta che viene eseguito.

Ovviamente i file di codice Matlab dei due approcci appaiono diversi: i file UI programmati sono generalmente più lunghi, perché definiscono esplicitamente ogni proprietà della figura, dei suoi componenti e delle funzioni di callback, mentre quelli generati da GUIDE sono più brevi in quanto la maggior parte delle proprietà sono definite in fase di progettazione del front-end e salvate nel file .fig.

Infine, è bene ricordarsi che è possibile creare una interfaccia utente con GUIDE e decidere di modificarla in seguito a livello di codice, ma non è possibile creare un'interfaccia utente a livello di programmazione e modificarla poi utilizzando GUIDE.

L'approccio scelto dipende ovviamente dalle preferenze e dagli obiettivi che ci si pone. Nel nostro caso, l'aspetto grafico dell'interfaccia è progettato tramite GUIDE mentre le sue proprietà e funzionalità vengono impostate a livello di codice.

### 3.2.2 Trasferimento dei dati

I dati EEG possono essere trasferiti in tempo reale, tramite una **connessione TCP/IP**, dal programma di registrazione *BrainVision Recorder* ad altri programmi che si trovano sul computer locale o su un computer della rete.

Il TCP/IP (Transmission Control Protocol/Internet Protocol) è il linguaggio di comunicazione di base utilizzato da Internet ma può essere utilizzato anche come protocollo di comunicazione in una rete privata.

Fondamentalmente, si tratta di un programma basato sul **modello client/server** e costituito da diversi **layer** nei quali vengono impiegati due protocolli principali: **Transmission Control Protocol (TCP)** e **Internet Protocol (IP)**.

Il TCP è il livello superiore e gestisce l'assemblaggio di un messaggio o di un file in piccoli pacchetti che vengono trasmessi sulla rete e ricevuti da un altro livello TCP che ricomponi i pacchetti nel messaggio originale.

Il TCP è un protocollo *orientato alla connessione*, il che significa che la connessione è stabilita e mantenuta fino a quando i programmi applicativi a ciascuna estremità hanno terminato lo scambio di messaggi e inoltre, dal momento che è pensato per trasferire dati senza errori di trasmissione, gestisce il riconoscimento di tutti i pacchetti che arrivano e la ritrasmissione degli eventuali pacchetti persi o alterati.

Lo strato inferiore, **Internet Protocol**, gestisce la parte di indirizzo di ogni pacchetto in modo che arrivi alla giusta destinazione; ogni computer sulla rete, infatti, controlla questo indirizzo per determinare dove dovrà essere inoltrato il messaggio. Anche se alcuni pacchetti dello stesso messaggio vengono indirizzati lungo una via differente rispetto ad altri, essi saranno riassemblati una volta giunti a destinazione.

Un termine chiave nella programmazione via TCP/IP è il *socket adress*, cioè la combinazione di un *indirizzo IP* e un *numero di porta*.

Un indirizzo IP è un numero a 32 bit che identifica univocamente un host (computer o altro dispositivo, come una stampante o router) su una rete TCP/IP ed è normalmente espresso in formato decimale puntato, con quattro numeri separati da punti, ad esempio 192.168.123.132.

Una porta invece costituisce l'endpoint di un sistema operativo per molti tipi di comunicazione; non si tratta di un dispositivo hardware, ma di una entità logico-funzionale che identifica un servizio o un processo.

Essa è identificata, per ciascun indirizzo IP e protocollo di comunicazione, da un numero a 16 bit, comunemente noto come il numero di porta.

La combinazione di indirizzo IP, numero di porta e protocollo di comunicazione specifici possono rappresentare solo un unico processo/servizio alla volta; infatti, quando più programmi tentano di legarsi agli stessi numeri di porta sullo stesso indirizzo IP utilizzando lo stesso protocollo si verificano i cosiddetti *errori di porta*. Un esempio di servizio, assai noto e implicitamente utilizzato, è sicuramente il *protocollo HTTP* su un server Web, che ha 80 come numero di porta per impostazione predefinita.

Il server RDA del *BrainVision Recorder* ha due numeri di porta, 51234 e 51244, rispettivamente destinati ai dati a 16 bit e a quelli a 32 bit.

Elemento fondamentale per la trasmissione dei dati via TCP/IP è sicuramente un **buffer**. Senza di esso per Matlab, applicazione a singolo thread, sarebbe praticamente impossibile gestire allo stesso tempo la raccolta dei dati EEG, provenienti dal flusso continuo di trasmissione, e il loro trattamento. Pertanto, i dati vengono acquisiti in tempo reale dal sistema di acquisizione (hardware e software di acquisizione EEG) per poi essere raccolti continuamente in un apposito buffer di rete. Questo viene svuotato man mano che il client estrae i nuovi dati in forma di piccoli pacchetti per procedere alla loro successiva elaborazione, mentre i nuovi dati in uscita dall'amplificatore vengono bufferizzati in maniera totalmente indipendente.

Il buffer è compilato in un *file mex* di MATLAB, denominato in questo caso *pnet.m*; esso può essere utilizzato sia per accedere ad un buffer remoto collegato al software di acquisizione, che viene eseguito come un programma separato ed eventualmente su un computer differente rispetto a quello su cui Matlab è in esecuzione, o per generare un buffer locale, legato al processo di MATLAB come thread separato.

Infine, per realizzare la concreta trasmissione dei dati, occorre uno strato fisico che stia al di sotto del *transport layer* e dell'*IP layer*, precedentemente introdotti; si tratta del cosiddetto *hardware layer*, il quale gestisce la comunicazione tra i componenti di rete fisici servendosi di un opportuno protocollo. Il più noto, tra i protocolli del data link layer, è sicuramente Ethernet, utilizzato per la trasmissione dei dati dal server (BrainVision Recorder) al client (Matlab GUI) nel presente lavoro.

### 3.2.3 Client RDA

Remote Data Access (RDA) è il termine dato per *l'accesso remoto* al software di registrazione. Il client RDA, infatti, non è nient'altro che una routine Matlab fornita da Brain Products per trasferire in tempo reale i dati EEG dal BrainVision Recorder al computer client mediante il protocollo di comunicazione descritto al paragrafo precedente (implementato nel toolbox TCP/UDP/IP di Matlab).

Il primo compito del client RDA è quello di stabilire una connessione, tramite indirizzo IP e numero di porta, con il server RDA, dal quale riceve continuamente i nuovi dati EEG acquisiti dall'amplificatore BrainAmp DC.

Se la connessione viene correttamente stabilita, la routine Matlab mostra a video un messaggio di avvenuta connessione ed attende in un **ciclo** per i dati.

La prima operazione eseguita all'interno del ciclo è quella di verificare l'esistenza di dati nel *socket buffer* e, in caso affermativo, la funzione procede alla lettura dell'*header* del messaggio RDA.

L'*header* è composto da tre parti:

- *uid*, una costante di 128 bit indispensabile per l'identificazione univoca del pacchetto.
- *size*, descrive la lunghezza totale del messaggio.
- *type*, descrive il tipo di messaggio.

Esistono tre diversi tipi di messaggio: 1 significa che si tratta di un messaggio di start, 4 un messaggio contenente i dati, 3 un messaggio di stop.

A seconda del tipo di messaggio, il codice esegue operazioni differenti.

Nel caso di messaggio di start, il programma legge le informazioni di setup contenute nell'header, ovvero il numero di canali(EEG+EOG), l'intervallo di campionamento in  $\mu$ s, la risoluzione in  $\mu$ V per ogni canale (che non deve essere per forza la stessa) e il nome dei canali.

Un messaggio di tipo 4 invece, è utilizzato per trasferire dati a 32 bit ed è costituito dai seguenti elementi:

- *block*, numero del corrente pacchetto dal momento di inizio della trasmissione dei dati (quindi 1 se si tratta del primo e così via..). Tale numero viene utilizzato per verificare l'assenza di *overflow*, ovvero la perdita di pacchetti dovuta ad un lento svuotamento del socket buffer.
- *points*, numero di campioni contenuti in ogni pacchetto.
- *markerCount*, numero di marker presenti all'interno del presente pacchetto.
- *data*, nuovi dati EEG nel formato 32-bit IEEE floating point. Essi sono contenuti in un vettore la cui dimensione è data dal prodotto tra numero di canali e *points*.

Nel caso in cui sia presente anche un marker all'interno del pacchetto, il messaggio di tipo 4 conterrà anche il campo *markers* con i seguenti elementi:

- *size*, dimensione del marker in bytes.
- *position*, posizione relativa all'interno del pacchetto del campione rappresentante il marker.
- *points*, numero di punti coperti dal marker (normalmente 1).
- *channel*, numero del canale a cui il marker è assegnato.
- *Type e description*, stringhe contenenti il tipo(stimulus) e la descrizione(S1) del marker

Infine, il messaggio di stop contiene solamente l'header e rappresenta la condizione d'uscita dal ciclo di lettura dei dati.

Un esempio di pacchetto dati di tipo 4 e con marker è mostrato in tabella 2. Nell'ultima riga sono indicati i bytes delle variabili corrispondenti.

HEADER			DATA BLOCK				MARKERS					
uid (char)	size (uint32)	type (uint32)	block (uint32)	points (uint32)	markerCount (uint32)	data (single)	size (uint32)	position (uint32)	points (uint32)	channel (int32)	type (char)	description (char)
32	4	4	4	4	4	25600	4	4	4	4	16	8

Nel nostro caso, la trasmissione dei dati EEG dal BrainVision Recorder (server) alla routine Matlab (client) avviene tramite la sequenza di blocchi/pacchetti contenenti ognuno **20 ms di segnale**, che corrispondono ad un numero di campioni variabile a seconda della frequenza di campionamento utilizzata.

### 3.3 Struttura della GUI realizzata

L'interfaccia utente, realizzata per ottimizzare la visualizzazione in tempo reale dei dati di TMS/EEG, è costituita da una *figure* di Matlab contenente quattro elementi principali: un *pannello di controllo* e quattro *axes* (grafici bidimensionali).

Il pannello, mostrato nella figura 3.4 sulla sinistra, racchiude i seguenti componenti grafici:

- Tre *pulsanti*, INITIALIZE, START e STOP;
- Due *check*, RAW e AVG, per cambiare il display di visualizzazione dei dati;
- Due *listbox* contenenti i nomi di tutti i canali ('*all channels*') e di quelli ritenuti corrotti ('*bad channels*');
- Due pulsanti, ADD e REJ, per aggiungere o rimuovere canali dall'elenco contenuto nella *listbox* '*bad channels*';
- Uno *slider*, la barra di scorrimento alla destra delle *listbox*, per regolare l'ampiezza delle tracce;
- Due *check*, BANDPASS e BANDSTOP, per filtrare in tempo reale i dati visualizzati;
- Due caselle di *edit text*, per inserire le frequenze di taglio del filtro desiderate;
- Un *check*, ARTIF REJ, per abilitare la rimozione dell'artefatto elettromagnetico dovuto alla stimolazione;
- Due ulteriori caselle di *edit text*, per scegliere la lunghezza della finestra temporale nella quale rimuovere l'artefatto;
- Un *check*, HOLD SCREEN, per fermare l'aggiornamento degli *axes*.

Come già precedentemente detto, ad ognuno dei componenti grafici sopra elencati è associata una funzione di callback che ne implementa la desiderata funzionalità.

I quattro *axes* invece, sono sovrapposti l'uno all'altro e quindi non visibili nella figura 3.4; durante l'esecuzione del programma, è possibile far comparire in primo piano un *axes* nella posizione mostrata in figura, semplicemente selezionando il *check* corrispondente (grazie alla proprietà "visible" degli *axes*).

In particolare, i quattro *axes* utilizzati sono:

- *raw axes*, consente la visualizzazione del dato grezzo;
- *avg axes*, permette la visualizzazione topografica della media dei trial acquisiti per tutti i canali;
- *butterfly-plot axes*, mostra la sovrapposizione di tutti i canali EEG nella finestra temporale dei trial;
- *topography axes*, rappresenta la distribuzione del potenziale sullo scalpo per un determinato campione temporale.

Il trattamento e la visualizzazione del dato EEG relativi ai suddetti *axes* verrà affrontata più nel dettaglio nei successivi paragrafi.

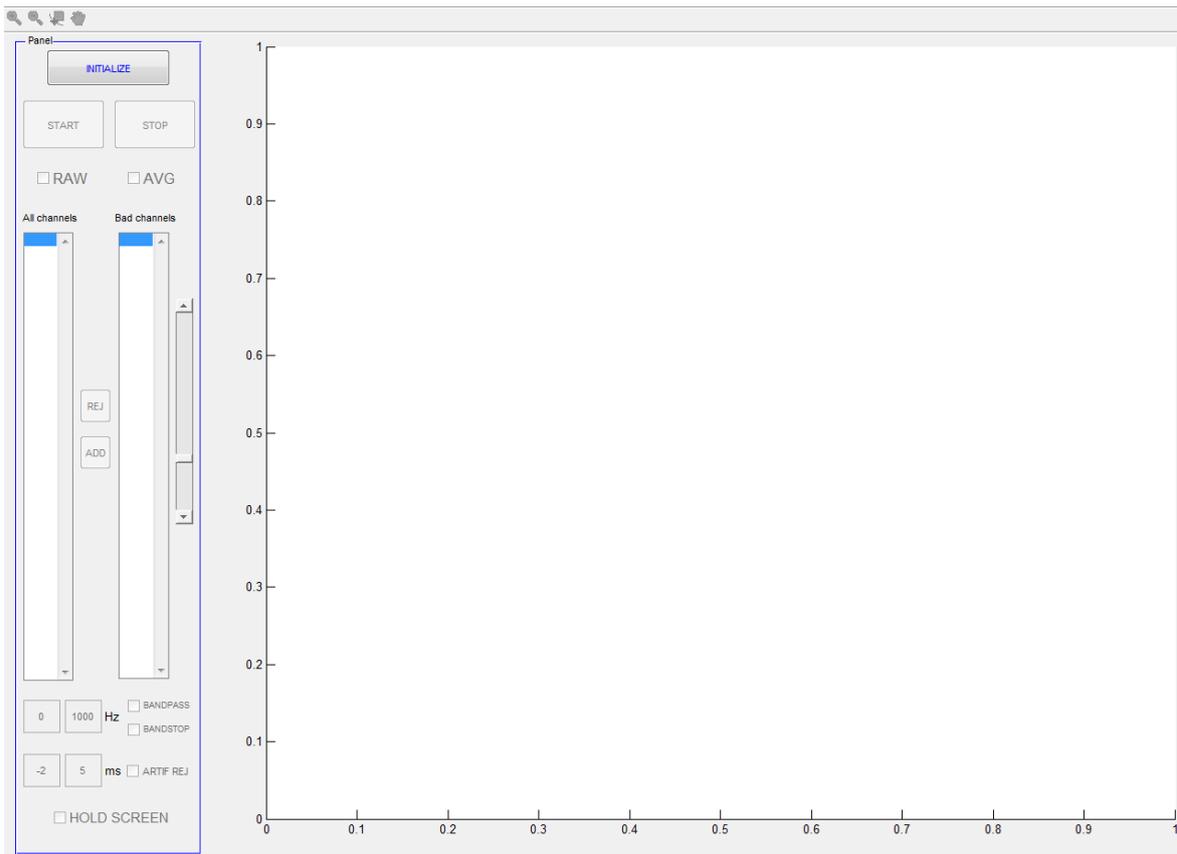


Figura 3.4 Interfaccia utente all'avvio del programma.

All'interno del riquadro blu sulla sinistra, troviamo il pannello di controllo.

Infine, quando l'utente seleziona la modalità di visualizzazione AVG, tra il pannello di controllo e l'*avg axes* compare un secondo pannello, denominato *parameters*, il quale contiene:

- tre *check*, Average Reference, Common Reference e Butterfly Plot;
- quattro componenti *text*, indicanti la finestra temporale dei trial, il numero di trial mediati, il SNR e l'istante temporale in cui è rappresentata la topografia (*topography axes*);
- un pulsante CLEAR AVG che viene abilitato quando viene acquisito almeno un trial.

Esso rimane visibile solamente nella modalità di visualizzazione AVG, sia quando viene mostrato l'*avg axes* che quando compaiono in primo piano il *butterfly-plot* e il *topography axes*, mentre scompare durante la modalità di visualizzazione RAW. Tale pannello è mostrato in figura 3.5.

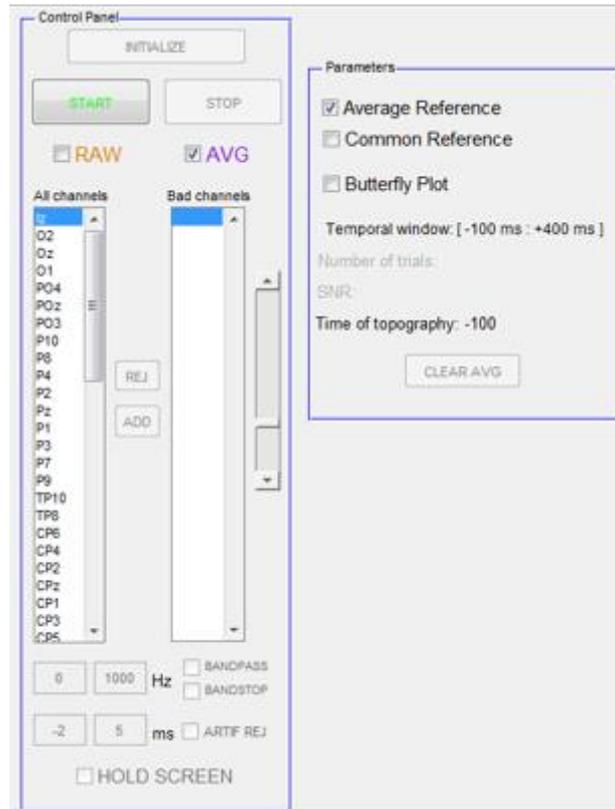


Figura 3.5 Pannello di controllo e pannello Parameters a seguito dell'operazione di inizializzazione dell'interfaccia.

## 3.4 Modalità di visualizzazione

### 3.4.1 Inizializzazione dell'interfaccia utente

Come si può osservare in figura 3.4, all'avvio del programma l'unico pulsante abilitato è quello di inizializzazione, chiamato **INITIALIZE**; la funzione di callback ad esso associato, consente al programma di connettersi al sever, il software di registrazione *BrainVision Recorder*, per ricevere tutte le informazioni riguardanti la registrazione in corso, quindi il **numero** e il **nome dei canali** connessi all'amplificatore, la **frequenza di campionamento** che determina il numero di campioni presenti all'interno di ogni singolo pacchetto, la **risoluzione** di ogni canale.

I nomi dei canali vengono elencati all'interno della *listbox* 'all channels' e affianco ai *tick* (trattini) dell'asse y, al posto dei valori numerici presenti in figura 3.4, mentre frequenza di campionamento e risoluzione dei canali vengono mostrati, insieme ad un messaggio di avvenuta connessione, nella *Command Window* di Matlab.

Il pulsante INITIALIZE permette inoltre l'**inizializzazione** dei primi tre *axes* elencati, *raw*, *avg* e *butterfly-plot*.

Nel caso del *raw axes*, il programma disegna le tracce EEG, una traccia EOG e il canale di trigger tramite linee piatte, opportunamente separate nello spazio, che simulano una condizione di assenza di segnale; si tratta fondamentalmente di una **matrice di spaziatura dei dati grezzi** con righe pari al numero di canali e colonne pari al numero di campioni temporali, spaziate tra loro dell'intervallo di campionamento, che sono mostrati nell'axes. Tale matrice verrà utilizzata in seguito per visualizzare correttamente i segnali EEG acquisiti.

Per quanto riguarda l'inizializzazione dell'*avg axes*, la funzione di callback associata al tasto INITIALIZE procede con la lettura del file 'M1\_XYZ3\_GABA.sfp' contenente le coordinate dei canali EEG espresse in coordinate polari, relative alla reale distribuzione degli elettrodi sulla cuffia EEG.

Dopo la trasformazione da coordinate polari a coordinate cartesiane e ulteriori trasformazioni, il programma ricava e memorizza le coordinate finali x e y di tutti i canali; da esse ricava rispettivamente, per ogni canale, un vettore tempo con passo pari all'intervallo di campionamento e un vettore di spaziatura con elementi tutti uguali alla coordinata y del canale corrispondente.

I vettori ricavati dalle coordinate x e y hanno lunghezza pari al trial.

I vettori di spaziatura formano poi le righe di una **matrice di spaziatura dei dati medi**, utilizzata in seguito per la corretta visualizzazione della media dei potenziali acquisiti.

La funzione prosegue disegnando nell'*avg axes* le linee che rappresentano tutti i canali, secondo la distribuzione topografica determinata dalle coordinate e quindi dai vettori precedentemente ricavati per tutti i canali, la linea di baseline e linee verticali che rappresentano i riferimenti temporali.

Infine, per l'inizializzazione del *butterfly-plot axes*, il programma disegna tutte le tracce EEG( per il momento piatte) sovrapposte ad una linea di baseline e una linea verticale che fungerà da riferimento temporale mobile durante l'acquisizione dei dati; esso memorizza, inoltre, i valori numerici presenti sui *tick* dell'asse y per poterli modificare correttamente quando viene utilizzato lo slider d'amplificazione presente nel pannello di controllo.

Ad ogni traccia dei tre axes descritti vengono associati **il nome del canale** che rappresenta e il **puntatore dell'oggetto grafico** che costituisce la traccia stessa; tali informazioni vengono memorizzate per essere utilizzate in seguito nelle funzioni di callback associate agli altri componenti grafici di controllo presenti nell'interfaccia.

Nella funzione di inizializzazione, inoltre, vengono settati **i limiti deli assi cartesiani** dei tre axes (xlim e ylim), sulla base delle finestre temporali di visualizzazione scelte (asse x) e per consentire una buona visualizzazione delle tracce (asse y).

Terminata l'operazione di inizializzazione, viene abilitato il pulsante di **START**, che avvia la trasmissione dei pacchetti dati e la loro visualizzazione in tempo reale, e il pulsante di **STOP**.

Nella funzione di callback del pulsante di START, il programma entra nel ciclo di lettura del dato descritto al paragrafo 3.2.3 e ne uscirà solamente quando l'utente premerà il pulsante di STOP o il server invierà un messaggio di stop di tipo 3.

### 3.4.2 Visualizzazione del dato grezzo (RAW display)

All'avvio del programma, l'axes visibile che compare in primo piano è il *raw axes*.

Nel *raw axes* è possibile osservare lo scorrimento dei dati grezzi di tutti i canali (EEG,EOG e TRIGGER) con una **frequenza di aggiornamento di 1 secondo**.

Elemento chiave è la **matrice dei dati grezzi** ricevuti dal software di registrazione, la quale viene opportunamente inizializzata come matrice di zeri di **dimensione [canali x campioni]** (trigger escluso).

Si tratta fondamentalmente di una matrice di accumulo dei pacchetti dati in arrivo dal server, le cui dimensioni sono però fissate. Il numero di campioni dipenderà ovviamente dalla finestra di visualizzazione del dato grezzo e dalla frequenza di campionamento; in particolare, per l'interfaccia è stata scelta una **finestra temporale di 5 secondi** che, ad una frequenza di campionamento di 5000 Hz, contiene 25000 campioni.

La funzione di callback del pulsante START implementa, all'interno del ciclo di lettura del dato, l'elaborazione e la visualizzazione dei dati EEG grezzi acquisiti dall'amplificatore.

Per ogni messaggio di tipo 4, viene incrementato un contatore, utilizzato per gestire la frequenza di aggiornamento del display RAW, ed utilizzato il seguente processo di trattamento del dato:

- Conversione del blocco dati **da formato vettorializzato a matrice** di dimensione [canali x campioni nel pacchetto];
- **Moltiplicazione** dei valori contenuti nella matrice ricavata al punto precedente **per il valore di risoluzione** dei canali;
- Rimozione delle prime 100 colonne dalla matrice dati e inserimento delle altrettante nuove in fondo, di modo che **lo scorrimento dei dati grezzi** avvenga da destra verso sinistra.

Queste operazioni vengono eseguite per ogni nuovo pacchetto dati, indipendentemente dal display di visualizzazione.

Nel modulo di visualizzazione relativo al *raw axes* invece, viene controllato che:

- I. non sia abilitata la funzione di HOLD SCREEN,
- II. sia attivo il check *RAW*,
- III. sia passato almeno un secondo dal precedente aggiornamento del display, ovvero che il contatore dei pacchetti sia arrivato a 51 (5000 nuovi campioni a 5000 Hz).

Qualora TUTTE queste condizioni siano soddisfatte, il display dei dati grezzi viene aggiornato mediante ulteriori operazioni, compiute sulla matrice dei dati per la sua corretta visualizzazione:

- sostituzione delle ultime due righe, contenenti i due canali EOG, con una sola data dalla differenza tra le due, per visualizzare **l'attività oculare in un unico canale**, ed **eliminazione dei canali ritenuti corrotti** da rumore e/o artefatti (bad channels); il risultato di questa operazione è una nuova **matrice dei dati temporanea** di dimensione [(canali - 1 - bad channels) x campioni] sulla quale verranno eseguite

le altre operazioni sotto elencate, lasciando invariata l'originale matrice di raccolta dei dati;

- **eliminazione della media temporale** da ogni canale della matrice (che ora avrà solo canali “buoni”, good channels);
- moltiplicazione per il valore di **amplificazione dello slider** presente nel pannello di controllo;
- operazione di **somma della matrice di spaziatura** dei dati grezzi per separare le tracce in visualizzazione;
- **trasformazione** della matrice dati temporanea in **cell array** di dimensione [(canali – 1 – bad channels) x 1] in cui ogni elemento è un vettore [1 x campioni];
- **modifica della proprietà ‘YData’** di tutti i componenti grafici visualizzati (canali EEG e i due canali EOG e trigger), utilizzando i loro puntatori ricavati in fase di inizializzazione.

Il comando *set* di Matlab consente, infatti, utilizzando i puntatori e i dati in formato cell array, di modificare contemporaneamente tutte le tracce visualizzate con un'unica riga di comando, accelerando notevolmente i tempi di calcolo; esso è stato quindi utilizzato in alternativa al comando *plot*, il quale crea invece nuovi componenti grafici ogni volta che viene utilizzato.

Fondamentale per la realizzazione dell'interfaccia è stato, infatti, adottare soluzioni che permettessero di **rispettare i vincoli temporali di elaborazione** del pacchetto, dettati dal processo di trasmissione e raccolta dei dati in tempo reale.

Una volta che il display dei dati grezzi è stato aggiornato, il programma riavzerà il contatore dei pacchetti e il ciclo di lettura ricomincia.

### 3.4.3 Visualizzazione topografica della media dei trial acquisiti (AVG display)

Quando l'utente seleziona il check AVG, l'*avg axes* compare in primo piano mentre tutti gli altri axes diventano invisibili.

L'*avg axes* mostra le risposte corticali medie, evocate dalla stimolazione, in **trial di 500 ms** (100 ms prima dello stimolo e 400 ms dopo) con una distribuzione topografica che riproduce schematicamente la posizione degli elettrodi sulla cuffia, come descritto nel paragrafo dedicato alla funzione di inizializzazione (EOG incluso).

L'utente può decidere di visualizzare i potenziali evocati sia in average reference che in common reference, utilizzando gli appositi check del pannello *parameters*.

Elemento chiave è la **matrice** contenente la **media dei trial**, la quale viene opportunamente inizializzata come matrice di zeri di **dimensione [canali x campioni]**; il numero di campioni dipenderà questa volta dalla finestra temporale dei trial e dalla frequenza di campionamento. Ad esempio, con una finestra di 500 ms e una frequenza di 5000 Hz la matrice conterrà 2501 campioni.

All'interno del ciclo di lettura del dato, la funzione di callback del pulsante START verifica se nel pacchetto dati di tipo 4 è contenuto un **marker**, ovvero se è stato generato uno stimolo magnetico nella finestra temporale del messaggio (20 ms indipendentemente dalla frequenza di campionamento).

In caso affermativo, una variabile di flag abilita l'incremento di un contatore fino al raggiungimento di 21 nuovi pacchetti, cioè più di 400 ms successivi allo stimolo, e il programma memorizza la posizione del marker all'interno del messaggio, quindi il campione in corrispondenza del quale c'è stato lo stimolo (un numero da 1 a 100 a 5000 Hz).

La posizione del marker è utilizzata per il canale di trigger, il quale presenterà un'impulso in corrispondenza dell'istante temporale di stimolazione nel display dei dati grezzi, e per la creazione dei trial.

Una volta ricevuti i 20 pacchetti dati successivi a quello contenente il marker, il programma

- incrementa il numero di trial mediati  $N$  e aggiorna il testo corrispondente del pannello *parameters* (abilita anche il pulsante CLEAR AVG nel caso in cui si tratti del primo trial);
- ricava la posizione del marker nella matrice dei dati,  $t'$ , a partire dalla posizione  $t$  che occupa all'interno del pacchetto ( $t' = 25000 - 21 \times 100 + t$  a 5000 Hz);
- aggiorna la matrice della media dei trial sommando la matrice dei dati, considerata da 100 ms prima dello stimolo  $t'$  a 400 ms dopo, alla media ricavata al trial precedente (500 campioni prima dello stimolo e 2000 dopo a 5000 Hz).

Nel modulo di visualizzazione invece, la funzione verifica che:

- I. non sia abilitata la funzione di HOLD SCREEN,
- II. sia attivo il check AVG,
- III. stia avvenendo una commutazione di visualizzazione da media in average reference a media in common reference o viceversa, oppure che sia passato almeno un secondo dal precedente aggiornamento del display,
- IV. il numero di trial acquisiti  $N$  sia maggiore di zero.

Qualora TUTTE queste condizioni siano soddisfatte, il display dei dati medi viene aggiornato mediante ulteriori operazioni, compiute sulla matrice della media dei trial per la sua corretta visualizzazione:

- sostituzione delle ultime due righe, contenenti i due canali EOG, con una sola data dalla differenza tra le due ed **eliminazione dei canali ritenuti corrotti** da rumore e/o artefatti, come per la matrice dei dati grezzi; il risultato di questa operazione è una nuova **matrice della media temporanea** di dimensione [(canali - 1 - bad channels) x campioni] sulla quale verranno eseguite le altre operazioni sotto elencate, lasciando invariata l'originale matrice;
- **eliminazione della media temporale** da ogni canale e divisione della matrice per il numero di trial mediati  $N$ ;

- se è attivo il check **Average Reference** del pannello *parameters*, viene eseguita la sottrazione della media di tutti i canali EEG (buoni, escluso il canale EOG) divisa per N (vettore [1 x campioni]) da ogni canale della matrice ottenuta al passo precedente, mentre se è attivo il check **Common Reference**, non viene effettuata alcuna operazione poichè a questo punto la matrice è già espressa in common reference;
- moltiplicazione per il valore di **amplificazione dello slider** presente nel pannello di controllo;
- operazione di **somma della matrice di spaziatura** dei dati medi per disporre le tracce secondo la distribuzione topografica precedentemente descritta.
- **trasformazione** della matrice della media temporanea in **cell array** di dimensione [(canali – 1 – bad channels) x 1] in cui ogni elemento è un vettore [1 x campioni];
- **modifica della proprietà 'YData'** di tutti i componenti grafici visualizzati (canali EEG e un canale EOG), utilizzando i loro puntatori ricavati in fase di inizializzazione.

Una volta che il display della media è stato aggiornato, il programma riavverte il contatore dei pacchetti successivi a quello contenente il marker e il ciclo di lettura ricomincia.

Infine, qualora l'utente decida, durante la registrazione, di ricominciare da capo a mediare i trial in arrivo, può decidere di azzerare la matrice della media dei trial mediante il pulsante CLEAR AVG del pannello *parameters*.

La scelta di aggiornare ogni secondo anche il display della media è stata dettata dalla necessità di mostrare in tempo reale l'effetto delle funzioni degli altri componenti grafici presenti nel pannello di controllo sui dati visualizzati.

### 3.4.4 Sovrapposizione dei canali EEG e distribuzione del potenziale sullo scalpo

Il *butterfly-plot* e il *topography axes* vengono visualizzati in primo piano quando l'utente seleziona il check Butterfly Plot del pannello *parameters* mostrato in figure 2.7.

Il *butterfly-plot axes* mostra la **sovrapposizione dei potenziali corticali medi** espressi in average reference in una finestra temporale di 500 ms ( [–100 ÷ 400 ] come nel *avg axes*), mentre nel *topography axes* il programma disegna una **mapa topografica del potenziale elettrico** rilevato sullo scalpo in una vista circolare 2D e calcolato mediante interpolazione su una griglia cartesiana fine.

Sotto il *butterfly-plot axes*, compare anche uno *slider* in posizione orizzontale che controlla il movimento della linea verticale che funge da **riferimento temporale** nella sovrapposizione dei potenziali evocati nell'axes sovrastante. Il passo di tale slider è pari all'intervallo di campionamento e l'istante temporale corrispondente alla posizione della linea verticale è mostrato in tempo reale nel pannello *parameters*.

Analogamente al caso dell'*avg axes*, la funzione di callback del pulsante START verifica che non sia abilitata la funzione di HOLD SCREEN, che sia attivo il check Butterfly Plot, che sia passato almeno un secondo dal precedente aggiornamento del display e, infine, che il numero di trial acquisiti N sia maggiore di zero.

Qualora TUTTE queste condizioni siano soddisfatte, il display del butterfly plot viene aggiornato mediante le stesse operazioni che vengono compiute nel caso della visualizzazione dell'*average reference* nell'*avg axes*, con l'eccezione che il canale EOG viene rimosso dalla matrice della media temporanea (quindi EOG non visualizzato) e ad essa non viene sommata nessuna matrice di spaziatura.

Il *topography axes* viene aggiornato insieme al butterfly plot (quindi nel caso in cui vengano soddisfatte le condizioni suddette) solamente se è stato acquisito un nuovo trial, non solo quando N aumenta ma anche quando il calcolo della media riparte da capo a seguito della pressione del pulsante CLEAR AVG. In caso contrario, la funzione aggiornerà solamente il butterfly plot ogni secondo.

Quando la topografia viene aggiornata, la funzione legge il valore della posizione dello slider suddetto per conoscere il campione temporale in corrispondenza del quale calcolare la mappa topografica del potenziale utilizzando la funzione *topoplot*; essa, infatti, riceve in ingresso la colonna della matrice dei dati temporanea corrispondente al campione temporale trovato e la struttura contenente le coordinate degli elettrodi EEG restituita dalla lettura del file *.sfp* (vedi paragrafo inizializzazione).

Una volta che il display del butterfly plot è stato aggiornato, il programma riavvolge il contatore dei pacchetti e il ciclo di lettura ricomincia.

Il funzionamento dei due axes descritti in questo paragrafo sarà illustrato nel paragrafo corrispondente dei risultati.

### 3.5 Funzionalità disponibili

Le funzioni che vengono eseguite dai principali componenti grafici presenti nell'interfaccia e che operano in tutte e tre le modalità di visualizzazione sono:

1. **AGGIORNAMENTO CONTINUO** del display corrente, sia quando sono mostrati tutti i canali sia quando è attiva la modalità di zoom to selection (zoom su un gruppo ristretto di canali per esempio).
2. **HOLD SCREEN**, per mettere in pausa l'aggiornamento del display visualizzato;
3. **ZOOM TO SELECTION**, per ingrandire i dati ad una scala di tempo/ampiezza desiderata;
4. **DATA CURSOR**, per ottenere rapidamente le informazioni di un campione specifico;
5. **BAD CHANNELS SELECTION**, per eliminare canali ritenuti corrotti da rumore e/o artefatti;
6. **SLIDER BAR**, per modificare l'ampiezza delle tracce EEG;
7. **SNR**, per calcolare in tempo reale il rapporto segnale-rumore dei potenziali evocati dalla TMS.
8. **ARTIFACT REJECTION**, per eliminare l'artefatto elettromagnetico indotto dalla TMS.
9. **FILTRAGGIO**, per applicare in tempo reale un filtro con banda desiderata sia ai dati grezzi che a quelli medi.

La funzione di zoom to selection è implementata tramite il **toolbar di Matlab** inserito nell'interfaccia utente in alto a sinistra, come mostrato nelle figure della GUI. Essa permette di disegnare un riquadro intorno all'area che si vuole ingrandire, semplicemente trascinando il cursore all'interno dell'axes.

Per ottenere rapidamente le informazioni di un campione specifico, è stato necessario modificare la funzione built-in del data cursor di Matlab.

La funzione implementata utilizza il puntatore dell'oggetto grafico (traccia EEG) su cui l'utente clicca per ricavare **la posizione** del punto selezionato (X e Y) all'interno dell'axes considerato, il valore attuale di amplificazione dello **slider** del pannello di controllo (s), il **nome del canale** e le **coordinate x** e **y** della sua origine (memorizzate in fase di inizializzazione).

Il valore di tempo  $t$  (espresso in ms) per il punto selezionato sarà uguale a:

$$t = X; \quad \text{nel caso } raw \text{ e } butterfly\text{-plot axes};$$

$$t = X - x; \quad \text{nel caso } avg \text{ axes};$$

Il valore di potenziale  $V$  (espresso in  $\mu\text{V}$ ) per il punto selezionato sarà invece uguale a:

$$V = \frac{(Y-y)}{s} \quad \text{nel caso } raw \text{ e } avg \text{ axes}$$

$$V = \frac{Y}{s} \quad \text{nel caso } butterfly\text{-plot axes}$$

I valori di tempo e di potenziale del campione selezionato vengono mostrati, insieme al nome del canale e al valore s, tramite la classica finestra del data cursor di Matlab.

La rimozione dei canali ritenuti corrotti avviene per mezzo delle *listbox* del pannello di controllo, in cui è possibile selezionare uno o più nomi contemporaneamente, e dei due pulsanti ADD e REJ, i quali permettono rispettivamente di aggiungere canali nella lista dei bad channels o di rimuoverli.

Se rimossi, i canali non vengono visualizzati in nessun axes dell'interfaccia e soprattutto **non rientrano nel calcolo dell'average reference**, ovvero la media di tutti i canali non risente del rumore e/o di artefatti presenti in questi canali.

Lo slider del pannello di controllo modifica il **range dell'asse y** degli axes in cui sono mostrate le tracce EEG, come già accennato al paragrafo 3.3.

Inoltre, quando l'utente muove lo slider, la relativa funzione di callback divide i valori numerici dei *tick* dell'asse y del *butterfly axes* opportunamente settati e memorizzati in fase di inizializzazione per l'attuale valore dello slider (che dipende dalla posizione della barra nella corsia di scorrimento).

Il *signal-to-noise ratio* viene calcolato una volta che il software di visualizzazione ha ricevuto un trial completo, mediante le seguenti operazioni:

- Calcolo di  $V_{pre}$  come la media tra canali del valore assoluto della *matrice della media dei trial*, considerando solo i good channels e i campioni da  $-100$  a  $-10$  ms (vettore [1 x campioni trial]);
- Calcolo di  $V_{post}$  come la media tra canali del valore assoluto della *matrice della media dei trial*, considerando solo i good channels e i campioni da  $+10$  a  $+400$  ms (vettore [1 x campioni trial]);
- Calcolo del SNR come rapporto fra la media nel tempo di  $V_{post}$  e la media nel tempo di  $V_{pre}$ .

Successivamente, la funzione andrà ad aggiornare il testo del pannello *parameters* che riporta in tempo reale il valore di SNR ad ogni nuovo trial acquisito.

Una delle funzioni più importanti dell'interfaccia è sicuramente la rimozione dell'artefatto elettromagnetico indotto dalla stimolazione.

Se l'utente seleziona il check ARTIF REJ e il programma possiede almeno un pacchetto dati successivo a quello in cui è contenuto il marker, la funzione di start

- ricava la posizione del marker nella matrice dei dati a partire dalla posizione che occupa all'interno del pacchetto, analogamente al caso dell'*avg axes* (cambia però il valore del contatore dei pacchetti),
- legge il valore degli istanti temporali di inizio e fine della rimozione dell'artefatto, inseriti dall'utente nell'apposita casella di testo (default  $-2 \div +5$  ms),
- a partire da 500 ms prima dello stimolo, estrae un segmento di segnale di lunghezza pari alla finestra temporale individuata dagli istanti inseriti (baseline),
- Sostituisce la porzione di segnale racchiusa dai due istanti temporali con la baseline ricavata al passo precedente,
- esegue un'operazione di smoothing per evitare discontinuità in corrispondenza dei punti di raccordo della baseline inserita con il resto del segnale (moving average).

Tale procedura viene ovviamente eseguita per tutti i canali EEG.

Infine, l'interfaccia utente realizzata consente di filtrare in tempo reale le tracce EEG visualizzate, se e solo se è attiva la funzione di rimozione dell'artefatto elettromagnetico.

In particolare, quando l'utente seleziona uno dei due check BANDPASS o BANDSTOP (scelta alternativa), la funzione di callback relativa legge il valore delle frequenze di taglio high-pass e low-pass inserite dall'utente nell'apposita casella di testo (default 0 ÷ 1000 ms), le normalizza per la frequenza di Nyquist e calcola i coefficienti di un **filtro di Butterworth del terzo ordine**.

Questi coefficienti sono poi utilizzati dalla funzione di callback del pulsante START per filtrare i dati EEG visualizzati, utilizzando la funzione Matlab *filtfilt* applicata alle matrici temporanee dei dati (sia raw che avg che contengono solo good channels).

Tutte le funzioni di callback associate ai componenti grafici presenti nell'interfaccia vengono eseguite **in parallelo** alla funzione di START contenente il ciclo principale di lettura continua del dato acquisito, vale a dire che, quando l'utente seleziona un componente, il programma interrompe temporaneamente l'esecuzione della funzione di START ed esegue la funzione di callback relativa al componente attivato. Una volta terminata, il programma ritorna ad eseguire la funzione di START da dove la aveva interrotta.

## 4 PROTOCOLLO SPERIMENTALE ED ELABORAZIONE DEL SEGNALE EEG

### 4.1 Setup sperimentale

Il setup sperimentale utilizzato per confrontare la risposta TMS-evocata acquisita con il Sistema BrainAmp con quella ottenuta con il Nexstim è mostrato in figura 4.1.

Esso è costituito da:

- Il Sistema di Stimolazione Cerebrale Navigato (NBS) della Nexstim;
- Due amplificatori BrainAmp DC da 32 canali ciascuno;
- Un laptop che utilizza il software BrainVision Recorder per registrare i dati EEG acquisiti con il BrainAmp DC;
- Un computer fisso per consentire l'utilizzo dell'interfaccia grafica Matlab realizzata;
- L'amplificatore eXimia della Nexstim da 60 canali con un software integrato di registrazione e di visualizzazione dei dati EEG.
- Una cuffia EEG da 60 canali;

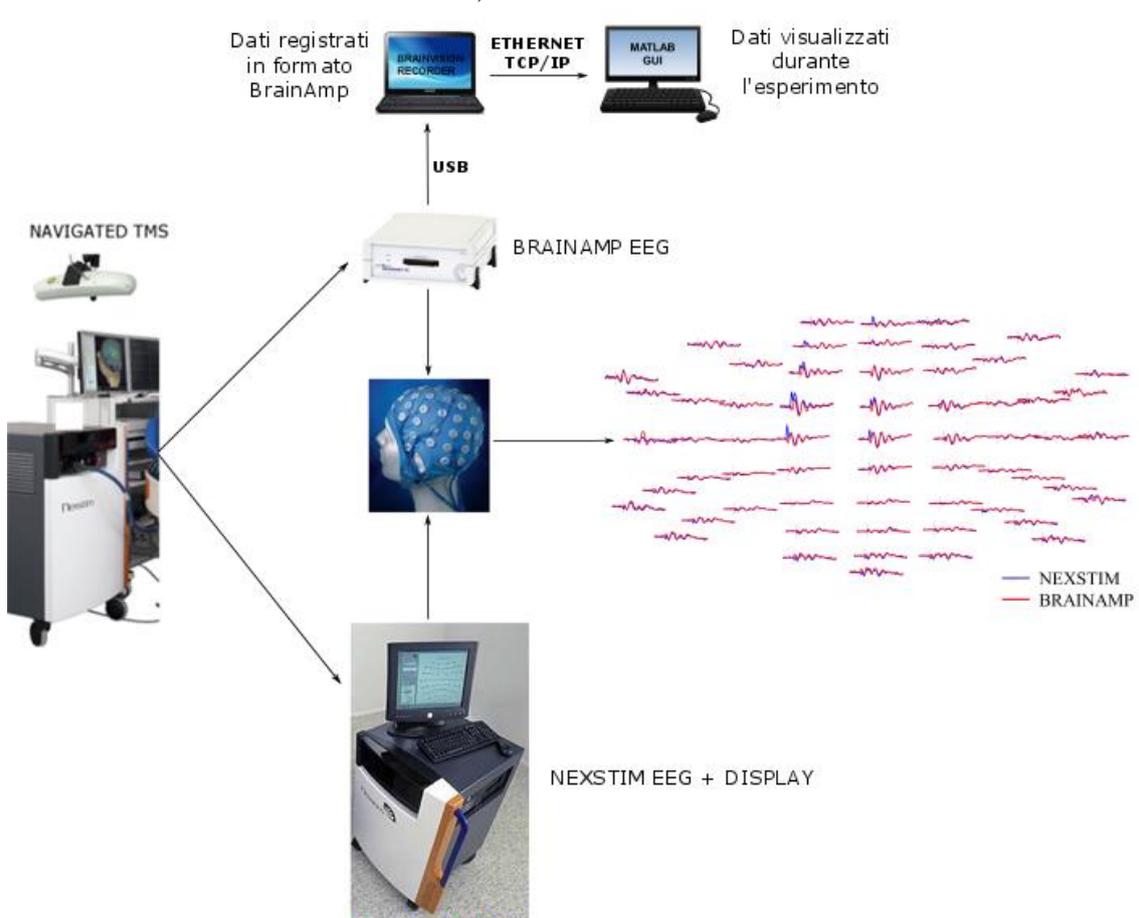


Figura 4.1 Setup sperimentale utilizzato per l'acquisizione dei potenziali TMS-evocati con i sistemi Nexstim e BrainAmp.

## 4.2 Procedura di registrazione dei potenziali TMS-evocati

Gli esperimenti di TMS/EEG sono stati eseguiti seguendo le linee guide descritte al paragrafo 1.3.

Il circuito di sample and hold dell'amplificatore eXimia ha assicurato registrazioni EEG prive di artefatto elettromagnetico indotto dalla stimolazione, mentre le registrazioni EEG effettuate con il BrainAmp DC sono state depurate dal suddetto artefatto durante l'analisi offline del dato.

Il segnale EEG è stato filtrato passa-banda tra 0.1 e 500 Hz e campionato a 1450 Hz con risoluzione a 16 bit nel caso Nexstim, tra 0 e 1000 Hz con frequenza di campionamento di 5000 Hz e risoluzione a 16 bit nel caso BrainAmp.

In entrambi i casi, l'impedenza degli elettrodi è stata mantenuta al di sotto di 5 K $\Omega$ .

La contaminazione dei potenziali evocati dalle risposte uditive, indotte dai click generati dalla scarica della bobina, è stata impedita tramite un suono di noise-masking che viene fatto sentire al soggetto tramite apposite cuffie auricolari durante tutto l'esperimento.

Abbiamo eseguito esperimenti di TMS/EEG su 3 soggetti sani, completamente vigili e con gli occhi aperti.

Per ogni soggetto, abbiamo scelto **due aree di stimolazione**, in ognuna della quale abbiamo effettuato **due sessioni**: una prima sessione di circa 250-300 trial utilizzando l'amplificatore eXimia e, a distanza di pochi minuti, una successiva sessione di ugual numero di trial con l'amplificatore BrainAmp DC.

La riproducibilità delle coordinate della stimolazione, all'interno e tra le due sessioni, è stata garantita dal sistema NBS che segnala in tempo reale qualsiasi deviazione dal target prestabilito superiore a 3 mm.

## 4.3 Preprocessing del segnale

Le reali risposte evocate dalla TMS si ottengono a seguito di **una procedura di preprocessing** effettuata sulle registrazioni EEG grezze.

Nel nostro caso, il preprocessing dei dati acquisiti con i due diversi sistemi commerciali non è esattamente lo stesso, ma differisce in alcuni passaggi iniziali.

In particolare, per i dati BrainAmp i primi step di pre-elaborazione prevedono la rimozione di:

- artefatto elettromagnetico generato dalla TMS;
- componente DC del segnale;
- due canali flottanti su 64 totali (60 EEG + 2EOG + 2 flottanti);

Il grosso artefatto di stimolazione viene rimosso con una procedura analoga a quella eseguita nell'interfaccia, quindi sostituzione del segnale da -2 a + 5ms con segmento di baseline della fase di pre-stimolo e smoothing nei punti di raccordo mediante media mobile ( si veda il paragrafo 2.1.5).

La rimozione della componente continua è implementata tramite un filtro del I ordine con frequenza di taglio a 0.01 Hz, mostrato in figura 4.2.

Nel caso dei dati Nexstim invece, l'unica operazione preliminare è la rimozione dell'artefatto da ricarica dei condensatori dello stimolatore tra 900 e 950 ms dopo lo stimolo, non presente nei dati BrainAmp.

I successivi step di preprocessing sono identici per i dati acquisiti con i due sistemi commerciali e, in ordine, prevedono:

- Rapida osservazione dei tracciati EEG grezzi con eventuale **eliminazione dei canali** palesemente corrotti da rumore e/o artefatti in tutta la registrazione, utilizzando il toolbox di Matlab EEGLAB.
- **Filtraggio** passa-banda tra 1 e 80 Hz e banda arrestata tra 49 e 51 Hz;
- **Splitting** dei tracciati EEG grezzi tra -600 e + 600 ms intorno allo stimolo per ottenere i singoli trial;
- **Sottocampionamento** a 625 Hz per i dati BrainAmp e a 725 Hz nel caso Nexstim. Nel caso in cui si decida di non filtrare passa-banda, i dati vengono filtrati passa-basso in modo opportuno prima di essere sottocampionati;
- Procedura di **eliminazione manuale dei singoli trial** tramite EEGLAB;
- Calcolo della **media** dei potenziali evocati in common reference (referenza d'acquisizione);
- Eventuale rimozione di ulteriori canali corrotti tramite la **visualizzazione delle risposte evocate medie** calcolate al passo precedente, con la modalità a butterfly-plot, che mette bene in evidenza se la risposta di un canale possiede un andamento totalmente differente da quello degli altri, e la distribuzione topografica che simula la posizione degli elettrodi sulla cuffia, per apprezzare separatamente i potenziali corticali in tutti i canali;
- Interpolazione sferica dei canali EEG eliminati, utilizzando i potenziali degli elettrodi vicini;
- **Baseline correction**, ovvero sottrazione della media temporale della baseline ( da -600 a + 10) dai trial di tutti canali;
- **Calcolo dell'average reference**: elimino da (tutti i trial di) ogni canale la media calcolata fra tutti i canali (vettore [tempo x trial])

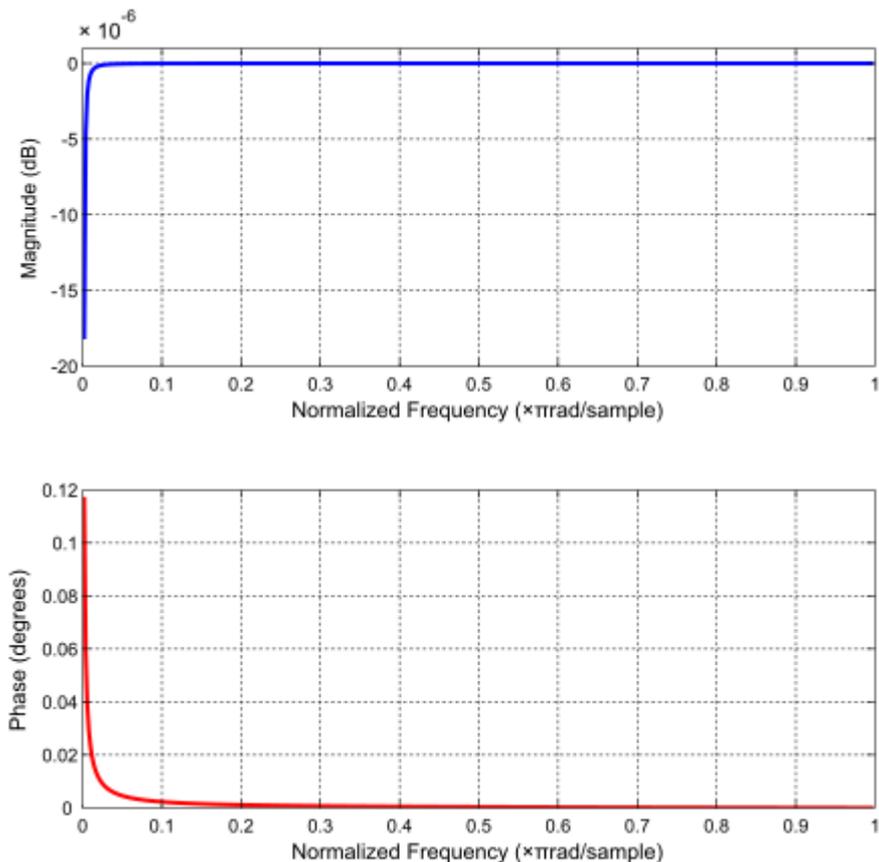


Figura 4.2 Modulo e fase della risposta in frequenza del filtro utilizzato per rimuovere la componente continua.

A questo punto, i dati EEG acquisiti con l'amplificatore eXimia vengono sottocampionati a 625 Hz (con filtraggio anti-aliasing) e i trial delle due sessioni vengono concatenati, ottenendo un'unica matrice dei dati in cui la prima metà dei trial appartengono alla sessione Nexstim e la seconda metà alla sessione BrainAmp.

L'ultima operazione di preprocessing è la decomposizione dei dati tramite **Independent Component Analysis (ICA)**, allo scopo di eliminare gli artefatti ancora presenti nei potenziali corticali registrati (v. par. 2.1).

### 4.3.1 Rimozione delle componenti artefatte tramite ICA

La scelta di unire le due sessioni è stata dettata dal fatto di voler calcolare l'ICA su un'unica matrice dei dati [canali,tempo,trial] per eliminare le stesse componenti in entrambe le sessioni.

L'andamento temporale **S** delle componenti indipendenti nei vari trial (v. Par. 2.1), espresso dall'Eq. 2.2 è visualizzabile in una specifica interfaccia di EEGLAB, mostrata in figura 4.3. Essa consente inoltre, di rimuovere i trial in cui le componenti mostrano artefatti sporadici. Nel caso in cui vengano eliminati trial, è necessario eseguire nuovamente il calcolo dell'ICA prima di procedere con la rimozione delle componenti artefattuali.

Un'ulteriore **interfaccia utente**, appositamente realizzata in Matlab durante il presente lavoro di tesi, ha permesso la visualizzazione e la rimozione off-line delle componenti artefatte trovate (figura 4.4). Essa è costituita da una lista contenente gli indici di tutte le componenti (a sinistra) e una lista che viene riempita con gli indici delle componenti che si vogliono rimuovere (a destra). Il menù a tendina in alto permette all'utente di selezionare la desiderata componente; per ognuna è mostrato il butterfly plot dei potenziali evocati medi in average reference con le *good components* (a sinistra) e con le *good component* meno la componente selezionata nel menù a tendina (a destra), l'imagesc della matrice [tr,t] che rappresenta l'andamento temporale della componente nei diversi trial con sotto la sua media cross-trial, lo spettro in scala logaritmica di tale media riscaldato per il RMS del vettore contenente i "pesi" della componente nei vari canali, e, infine, la topografia di tale vettore. Il range della colormap associata alla topografia è definito da  $\pm$  il valore massimo del modulo del vettore dei pesi.

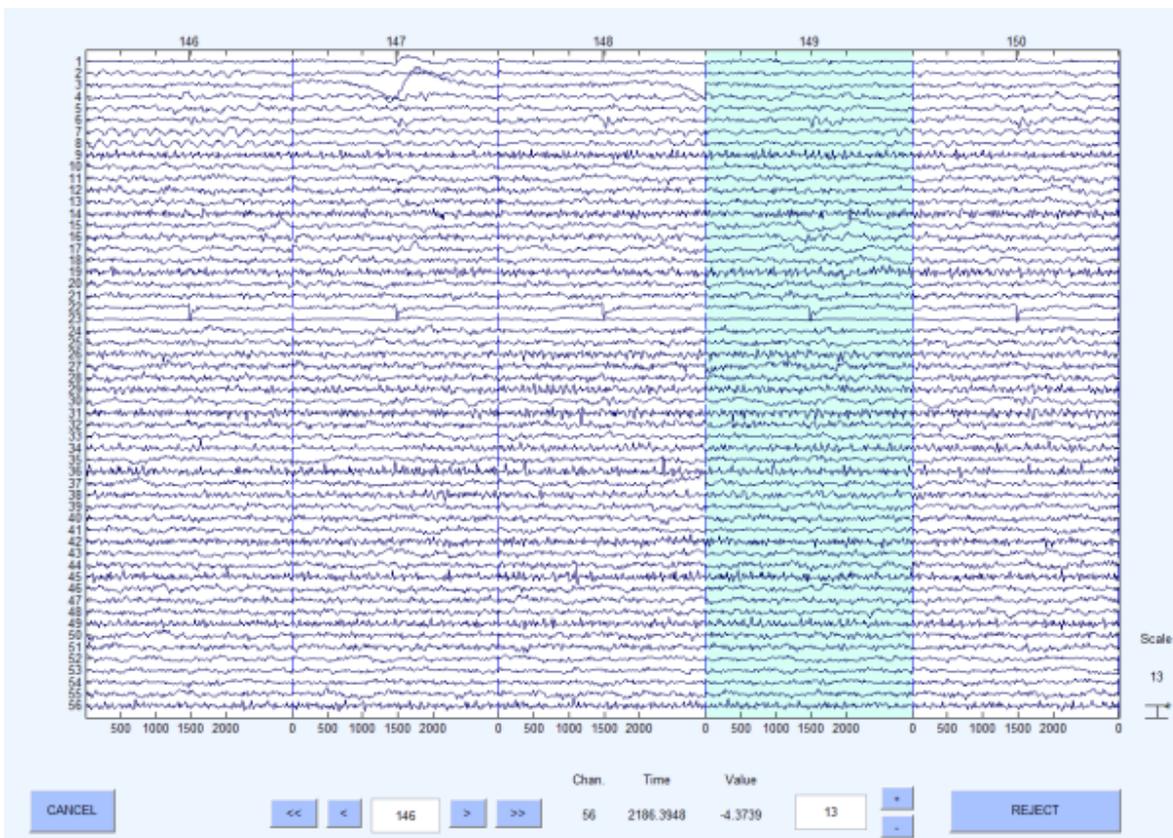


Figura 4.3 Andamento temporale delle componenti indipendenti.

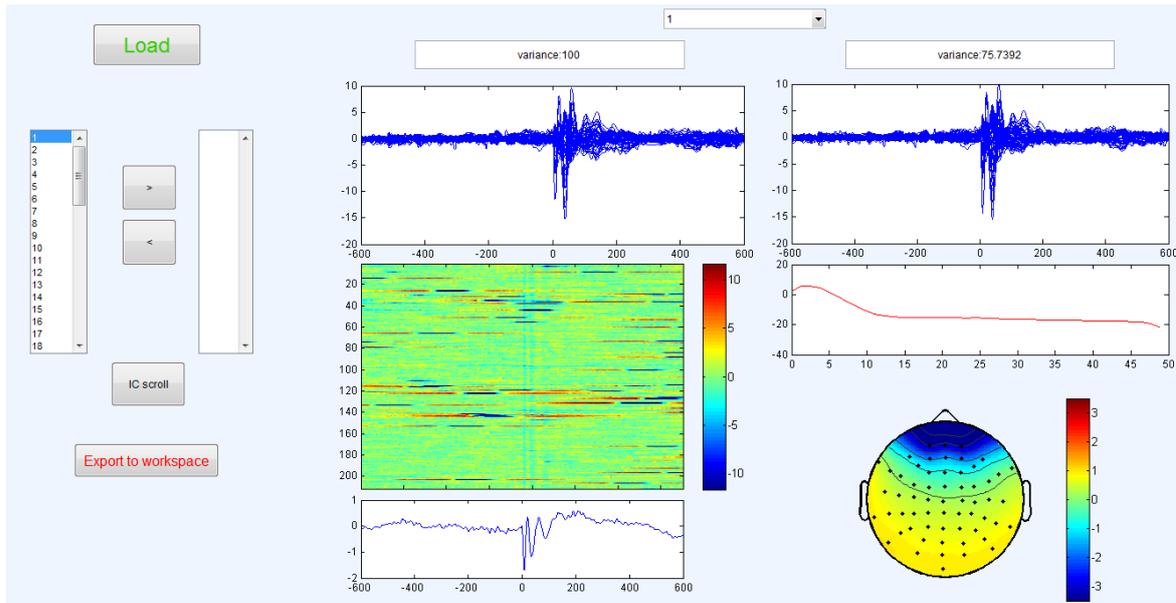


Figura 4.4 Interfaccia utente realizzata per la visualizzazione e la rimozione delle componenti indipendenti artefatte.

In questo caso viene mostrata una componente oculare dovuta al movimento di blink del soggetto durante l'esperimento. I potenziali sono espressi in  $\mu\text{V}$  e lo spettro in  $10 * \log_{10}(\mu\text{V}^2/\text{Hz})$ .

I pesi che tutte le componenti hanno nei vari canali sono contenute nella matrice  $\mathbf{A}$  (v. Eq. 2.3, Par. 2.1) e rappresenta come si distribuisce l'attività delle componenti indipendenti nei canali EEG.

Al di sopra dei butterfly plot viene riportato inoltre, il valore di varianza del segnale costituito dalle *good components* (a sinistra) e quello del segnale costituito dalle *good components* meno la componente selezionata nel menù a tendina (a destra).

Una volta individuate tutte le componenti artefattuali, la funzione di callback del pulsante EXPORT TO WORKSPACE calcola, servendosi delle matrici  $\mathbf{S}$  e  $\mathbf{A}$  e del vettore delle *good components*, la nuova matrice dei dati proiettati sulle *good components*.

La procedura di preprocessing termina con la divisione delle due sessioni Nexstim e BrainAmp.

#### 4.4 Confronto tra le sessioni Nexstim e BrainAmp

Per confrontare la risposte TMS-evocate acquisite con i due sistemi commerciali e per sintetizzare il loro grado di diversità in un singolo valore (Divergence Index - DI) corretto per il problema dei confronti multipli, è stata utilizzata la procedura statistica non-parametrica basata su permutazione descritta al paragrafo 2.2.

Il "baseline test" utilizza il Wilcoxon rank-sum test per controllare che le baseline (250 ms pre-stimolo) dei singoli trial delle due sessioni da confrontare abbiano la stessa distribuzione statistica ( $p < 0.05$ ). Per i dettagli si veda il paragrafo 2.2.1.

La permutazione dei trial (v. Par. 2.2.2) è usata per ricavare una distribuzione di valori sotto l'ipotesi nulla che i due gruppi di potenziali TMS-evocati siano equivalenti. Il numero di permutazioni utilizzato è pari a 1000 e l'ipotesi nulla di uguaglianza significativa dei potenziali evocati viene rigettata con un livello di confidenza  $p < 0.05$ , corretto per confronti multipli, come descritto al paragrafo 2.2.3.

Infine, il grado di diversità delle risposte TMS-evocate acquisite con i due sistemi commerciali viene quantificato mediante il Divergence Index (DI), definito come la percentuale di campioni temporali significativamente diversi nei primi 250 ms post-stimolo rispetto al numero totale di campioni spazio-temporali, considerando solamente i canali EEG che hanno superato il test sulla baseline. Il totale dei campioni spazio-temporali è dato dal prodotto tra il numero di canali accettati e il numero di campioni presenti nella finestra temporale considerata (60 canali EEG con 152 campioni temporali campionati a 625 Hz).

Per tenere in considerazione il fatto che i primi 5 ms di EEG evocato contengono la rimozione dell'artefatto da stimolazione in entrambi le sessioni (via hardware in NexStim, via software in BrainAmp), la percentuale di campioni significativamente diversi considera il periodo di post-stimolo da 9 ms inclusi fino a 250 ms.

In questo modo, il DI è stato sistematicamente calcolato a livello dei sensori per tutti i confronti tra sessione Nexstim e sessione BrainAmp, eseguite con il medesimo setting dei parametri di stimolazione. I valori di DI ottenuti per le sessioni di confronto sono riportati nel paragrafo 5.3 dei Risultati.

#### 4.5 Calcolo della complessità tramite $PCI_{LZ}$

Prima di tutto, i dati di tutte le sessioni vengono sottocampionati a 362 Hz (frequenza con cui PCI è stato validato in Casali et al., 2013). Le sorgenti elettriche corticali sono ottenute tramite source modeling: il software SPM5 adatta all'anatomia del soggetto (MRI) un modello di testa a 3 sfere (metodo di Berg) e un mesh canonico della corteccia cerebrale costituito da 3004 dipoli, e utilizza un approccio Bayesiano parametrico per stimare la distribuzione delle correnti nel cervello, come meglio descritto al paragrafo 2.3.1.

Una procedura statistica non parametrica bootstrap-based (vedi figura 2.3) con livello di significatività  $\alpha=0,01$  e numero di permutazioni  $N_b=70000$  è utilizzata per determinare la distribuzione spazio-temporale binaria delle sorgenti statisticamente significative  $SS(x_j, t)$ , la quale viene poi compressa secondo l'algoritmo di Lempel-Ziv considerando la finestra temporale  $8 \div 300$  ms dopo lo stimolo. Infine, l'indice  $PCI_{LZ}$  è ricavato normalizzando la misura di Lempel-Ziv appena ricavata tramite l'entropia delle sorgenti SS (v. Par. 2.3.4)

Abbiamo verificato che tutte le matrici SS per le quali è stato calcolato PCI avessero una percentuale di campioni spazio-temporali ( $p_1$ ) superiore al tasso di falsi positivi delle statistiche (1%), corrispondente ad un'entropia  $H > 0.08$ . In questo modo, abbiamo anche evitato instabilità numeriche (a causa di un denominatore vicino allo zero), che possono portare a valori  $PCI_{LZ}$  artificialmente alti quando la perturbazione non è efficace.

Inoltre, nel nostro caso, tutte le sessioni TMS in cui  $PCI_{LZ}$  è stato calcolato (v. Par. 5.4 per i valori ottenuti) hanno un  $SNR > 1.5$ .

## 5 RISULTATI

### 5.1 Display di visualizzazione e funzionalità della Matlab GUI

All'avvio del programma l'unico pulsante abilitato è INITIALIZE, il quale consente al programma di connettersi al sever, il software di registrazione *BrainVision Recorder*, per ricevere tutte le informazioni riguardanti la registrazione in corso, quindi il numero e il nome dei canali connessi all'amplificatore, la frequenza di campionamento e la risoluzione di ogni canale.

Il risultato dell'operazione di inizializzazione per il raw axes e per l'avg axes è mostrato nelle figure 5.1 e 5.2 rispettivamente.

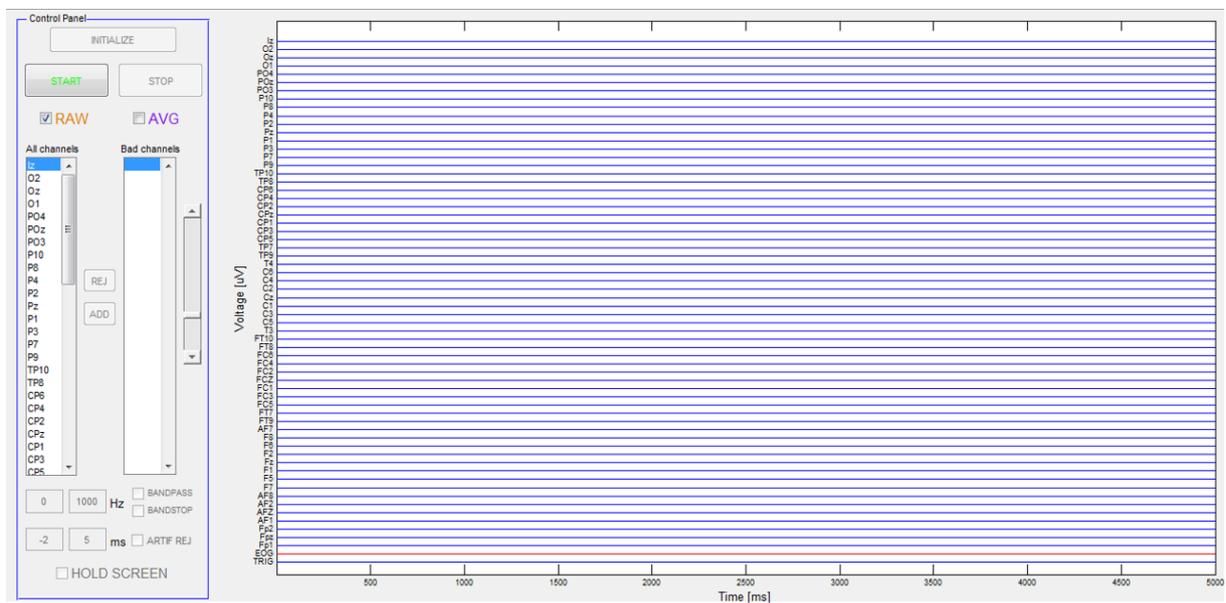


Figura 5.2 Inizializzazione del raw axes

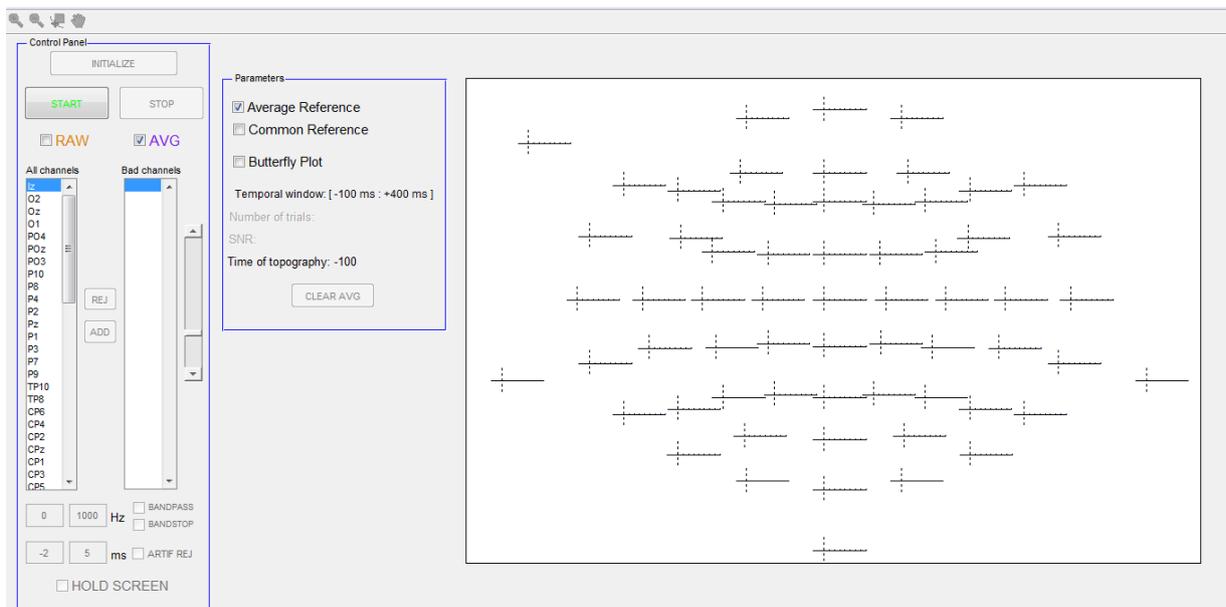


Figura 5.1 Inizializzazione del avg axes

I nomi dei 64 canali EEG dell'amplificatore BrainAmp DC sono elencati all'interno della *listbox* 'all channels' e sui riferimenti dell'asse y del *raw axes*, nel quale è disegnata la matrice di spaziatura dei dati grezzi. Passando invece al display dei dati medi AVG, è possibile osservare le linee che rappresentano tutti i canali secondo la distribuzione topografica relativa alla reale posizione degli elettrodi sulla cuffia EEG.

Terminata l'operazione di inizializzazione, viene abilitato il pulsante di START, che avvia la trasmissione dei pacchetti dati e la loro visualizzazione in tempo reale, e il pulsante di STOP.

A questo punto, il raw axes mostra lo scorrimento dei dati grezzi dei 64 canali EEG (dall'alto verso il basso, da canali occipitali a canali frontali), un canale EOG e un segnale di TRIGGER all'interno di una finestra temporale di 5 secondi con frequenza di aggiornamento di 1 secondo (figura 5.3)

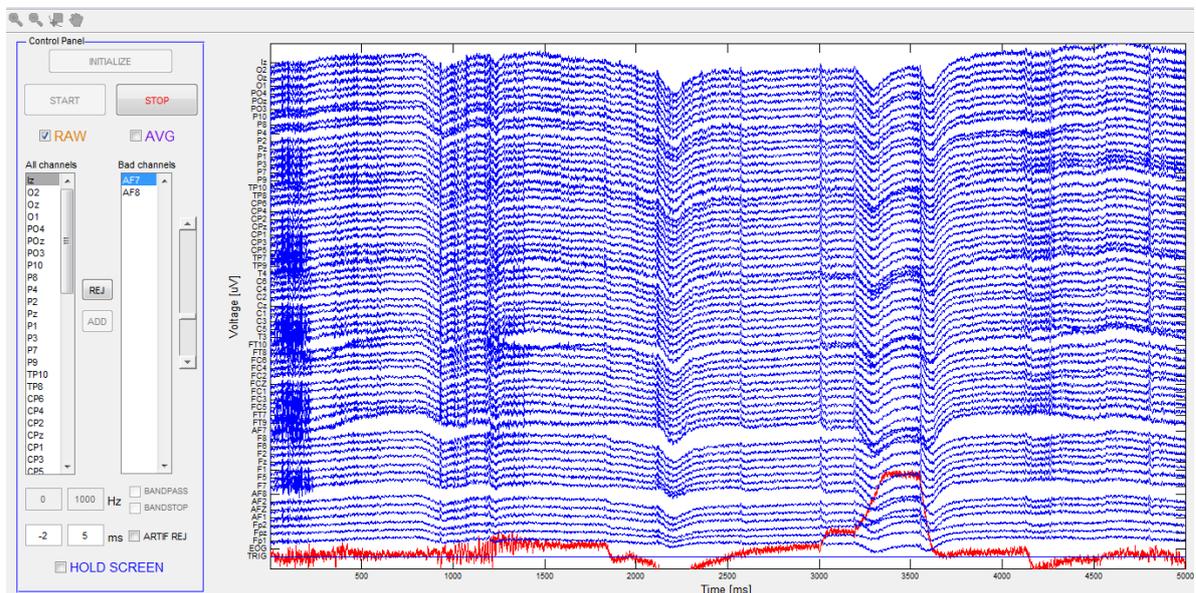


Figura 5.3 Scorrimento dei dati EEG grezzi acquisiti con l'amplificatore BrainAmp DC.

In corrispondenza dell'istante temporale di stimolazione, il canale di trigger mostra un'impulso che scorre insieme ai dati grezzi all'interno della finestra temporale del display. Quando l'utente seleziona il check AVG, l'*avg axes* compare in primo piano mentre tutti gli altri axes diventano invisibili.

L'*avg axes* mostra i potenziali corticali medi evocati dalla stimolazione, in trial di 500 ms (100 ms prima dello stimolo e 400 ms dopo) con la distribuzione topografica mostrata in figura 5.4. In questo caso quattro canali sono stati rimossi dalla visualizzazione perché corrotti da grossi artefatti.

L'utente può decidere di visualizzare i potenziali evocati sia in average reference che in common reference utilizzando gli appositi check del pannello *parameters*, nel quale viene mostrato il numero di trial su cui è calcolata la media e l'SNR corrispondente.

L'aggiornamento del display si verifica all'acquisizione di un nuovo trial, oppure quando avviene una commutazione di visualizzazione da average reference a common reference o viceversa, oppure quando è passato almeno un secondo dal precedente aggiornamento del display.

Il pulsante CLEAR AVG del pannello viene abilitato quando il numero di trial acquisiti è maggiore di zero e serve per azzerare la media dei potenziali evocati qualora l'utente decida, durante la registrazione, di ricominciare da capo a mediare i trial in arrivo.

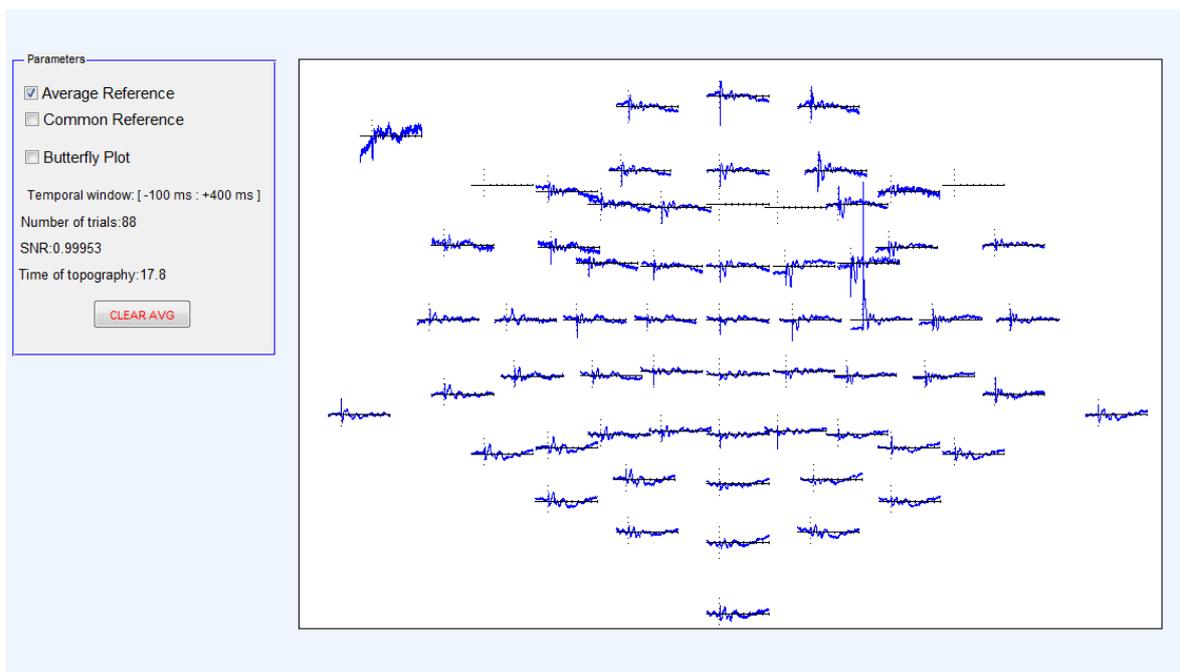


Figura 5.4 Visualizzazione topografica delle risposte corticali medie evocate dalla TMS in average reference, registrate con una cuffia EEG da 64 canali.

Il *butterfly-plot* e il *topography axes* vengono visualizzati in primo piano quando l'utente seleziona il check Butterfly Plot, come è possibile osservare in figura 5.5.

Il *butterfly-plot axes* mostra la sovrapposizione delle risposte corticali medie espressi in average reference in una finestra temporale di 500 ms (  $[-100 \div 400]$  come nel *avg axes*) con frequenza di aggiornamento di 1 secondo

Nel *topography axes*, invece, l'interfaccia disegna una mappa topografica del potenziale elettrico rilevato sullo scalpo in una vista circolare 2D e calcolato mediante interpolazione su griglia cartesiana fine.

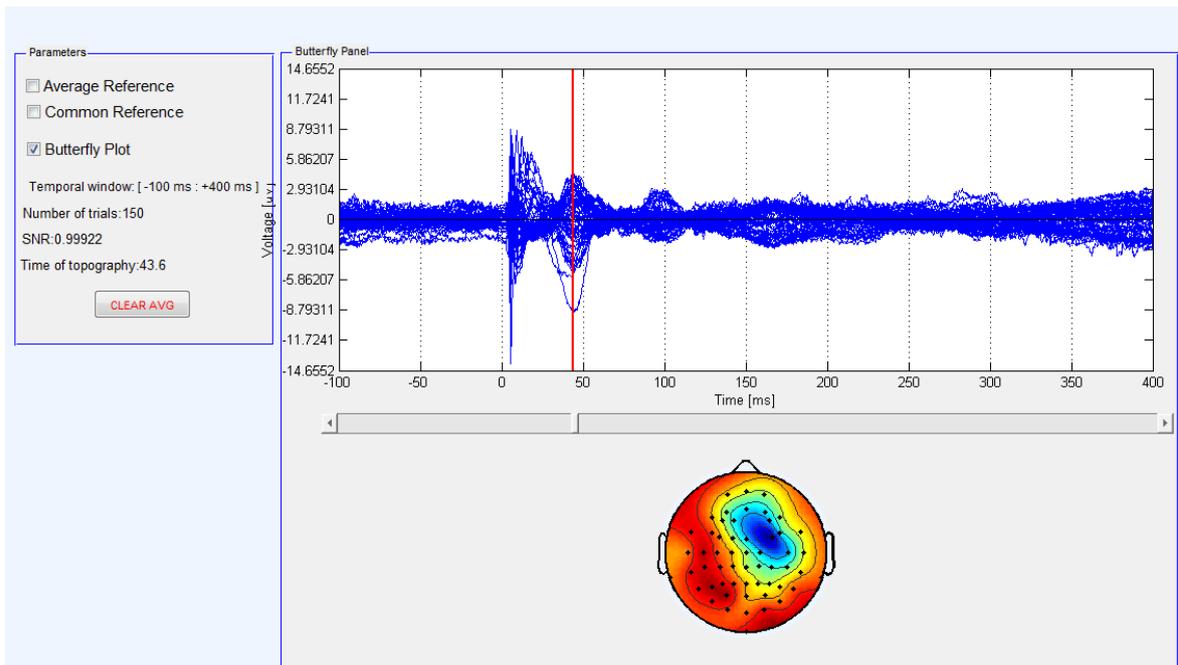


Figura 5.5 Butterfly plot delle risposte corticali medie e topografia del potenziale sullo scalpo a 43.7 ms dopo la stimolazione dell'area pre-motoria dell'emisfero destro.

Lo spike precoce nei primi ms di risposta, visibile in figura 5.5, rappresenta una possibile attivazione muscolare indotta dalla stimolazione. La topografia, invece, mostra la distribuzione del potenziale sullo scalpo in corrispondenza di un picco deterministico della risposta evocata da TMS.

Sotto il *butterfly-plot axes*, compare anche uno *slider* in posizione orizzontale che controlla il movimento della linea verticale rossa che funge da riferimento temporale nell'axes sovrastante. Il passo di tale slider è pari all'intervallo di campionamento e l'istante temporale corrispondente alla posizione della linea verticale è mostrato in tempo reale nel pannello *parameters*.

Il *butterfly-plot axes* viene aggiornato ogni secondo o, insieme al *topography axes*, all'acquisizione di un nuovo trial.

Grazie alla funzione di HOLD SCREEN dell'interfaccia, è ora possibile mettere in pausa l'aggiornamento del display attivato per ingrandire la visualizzazione dei dati EEG di uno o più canali ad una scala di tempo/ampiezza desiderata; ad esempio, la figura 5.6 fa vedere l'ingrandimento dei dati di tutti i canali intorno all'istante temporale dello stimolo quando l'artefatto elettromagnetico non è rimosso.

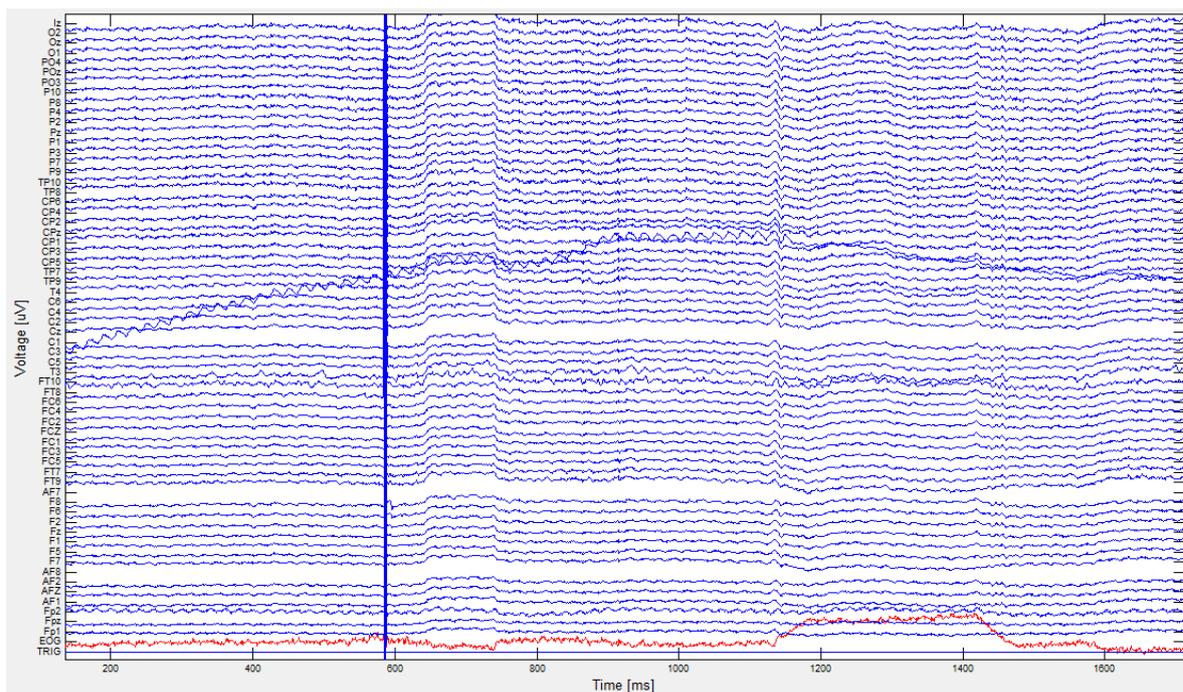


Figura 5.6 Risultato delle funzioni HOLD SCREEN e ZOOM TO SELECTION nel display dei dati grezzi.

Per valutare la presenza di **artefatti muscolari**, dovuti ad un'attivazione diretta o indiretta dei nervi presenti nello scalpo, o di componenti evocate, non direttamente indotte dalla stimolazione corticale, all'interno di una risposta evocata da singolo trial, l'utente può utilizzare la funzione di ARTIFACT REJECTION che consente di eliminare l'artefatto elettromagnetico indotto dalla TMS in tempo reale con il metodo descritto nel paragrafo 3.5; se nessun artefatto è presente nel trial considerato, si può procedere con la stimolazione del target prescelto e l'acquisizione di nuovi trial (figura 5.7).

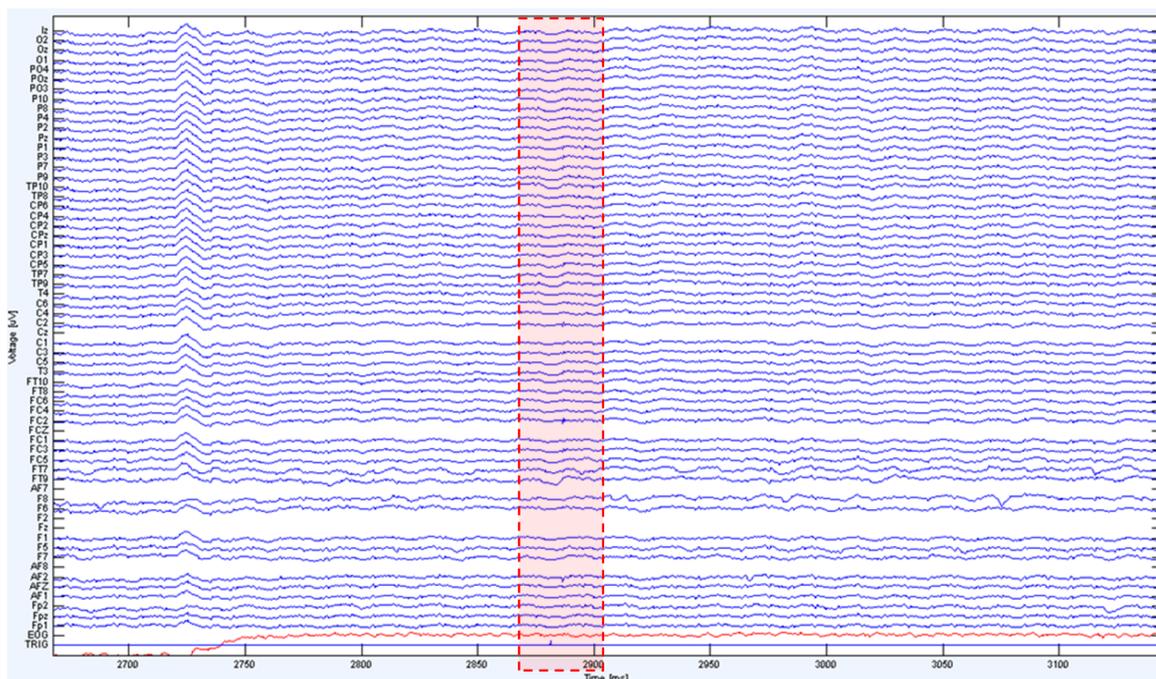


Figura 5.7 Ingrandimento attorno all'istante temporale di stimolazione per apprezzare la rimozione dell'artefatto elettromagnetico.

Dopo aver raccolto una decina di trial, generalmente si vuole misurare l'ampiezza della risposta evocata (si considera buona se maggiore di  $7/8 \mu\text{V}$  picco-picco); per ottenere rapidamente le informazioni di un campione specifico, è sufficiente servirsi del DATA CURSOR il quale restituisce i valori di tempo e di potenziale del campione selezionato insieme al nome del canale e al valore s dello slider (figura 5.8).

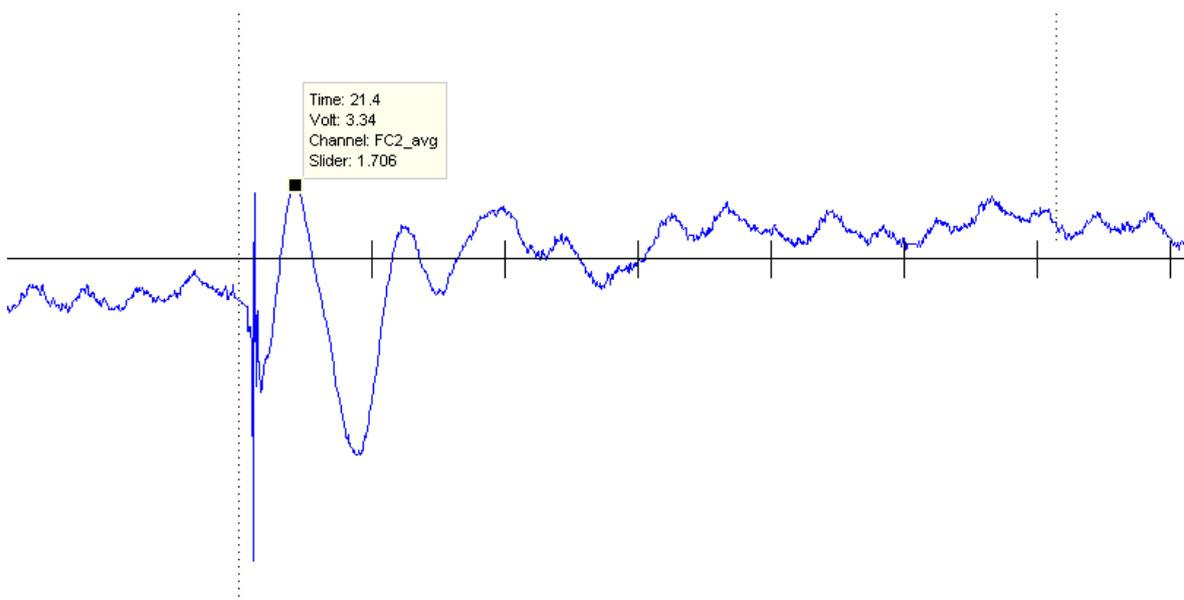
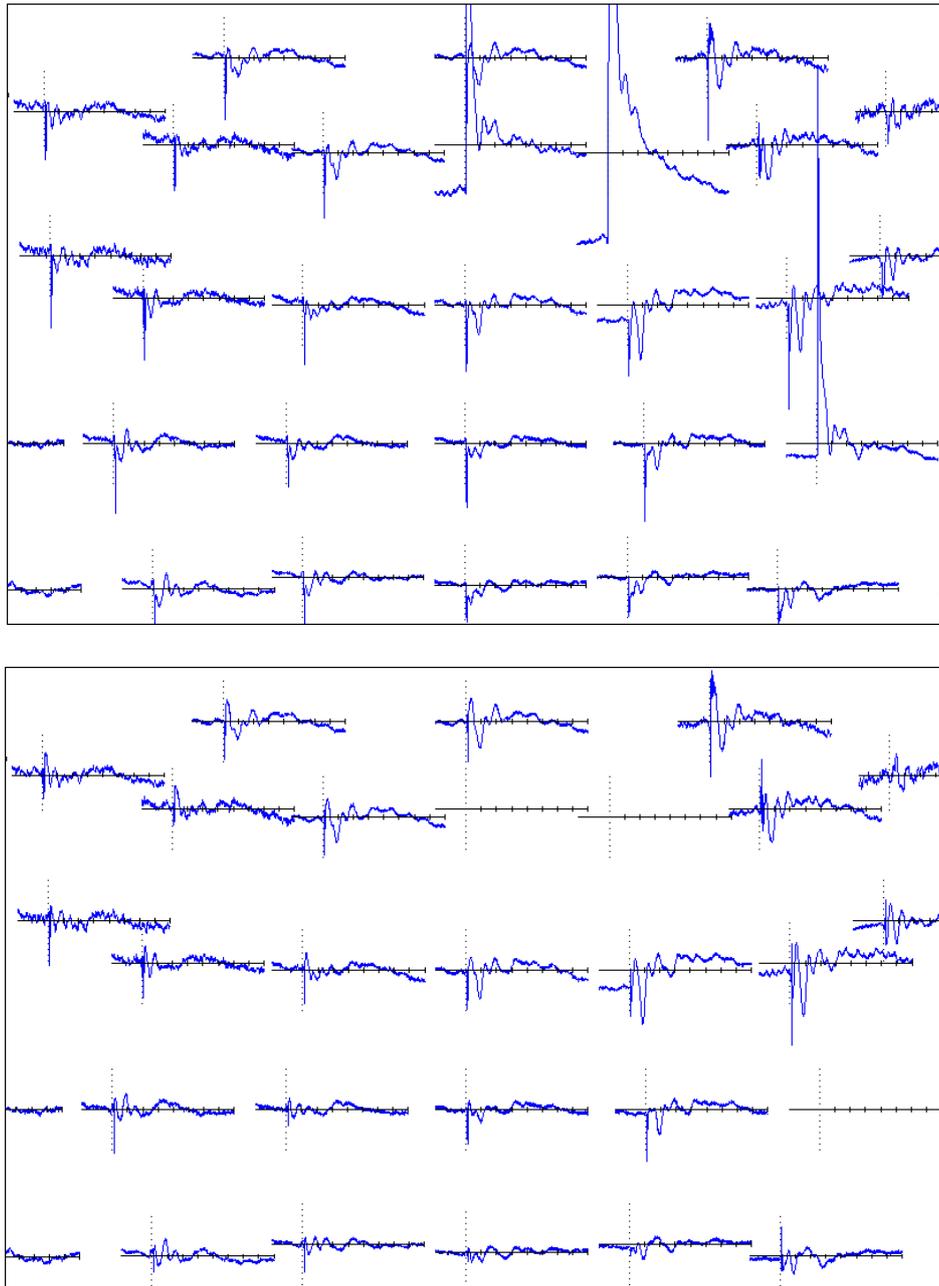


Figura 5.8 Ingrandimento del canale FC2 nel display AVG e risultato del cursore utilizzato per ricavare i valori di tempo e potenziale di un campione desiderato.

Il cursore può essere utilizzato in tutte e tre le modalità di visualizzazione.

Durante l'esperimento di TMS/EEG può capitare che le interfacce elettrodo-scalpo vicino allo stimolatore si polarizzino, generando gli artefatti mostrati in figura 5.9.

In questo caso, la funzione BAD CHANNELS SELECTION può essere impiegata per eliminare i tre canali corrotti da artefatto; se rimossi, i canali non vengono visualizzati in nessun axes dell'interfaccia e soprattutto non rientrano nel calcolo dell'average reference, ovvero la media di tutti i canali non risente del rumore e/o di artefatti presenti in questi canali.



*Figura 5.9 Effetto della rimozione dei canali corrotti da artefatto dalla media dei potenziali corticali evocati. La figura mostra un ingrandimento del display AVG quando i dati sono visualizzati in average reference.*

Quando la visualizzazione di tutte le risposte evocate nel display AVG non consente di apprezzarne le peculiarità, è utile utilizzare la funzione SLIDER BAR per modificare l'ampiezza delle tracce EEG nel corso dell'esperimento; lo slider del pannello di controllo, infatti, modifica il range dell'asse y delle tracce EEG visualizzate. Inoltre, quando l'utente muove lo slider d'amplificazione (non mostrato in figura 5.10), i valori numerici dei tick dell'asse y del *butterfly axes* vengono divisi per l'attuale valore dello slider (che dipende dalla posizione della barra nella corsia di scorrimento) mentre il valore di potenziale riportato nel cursore rimane invariato (figura 5.10).

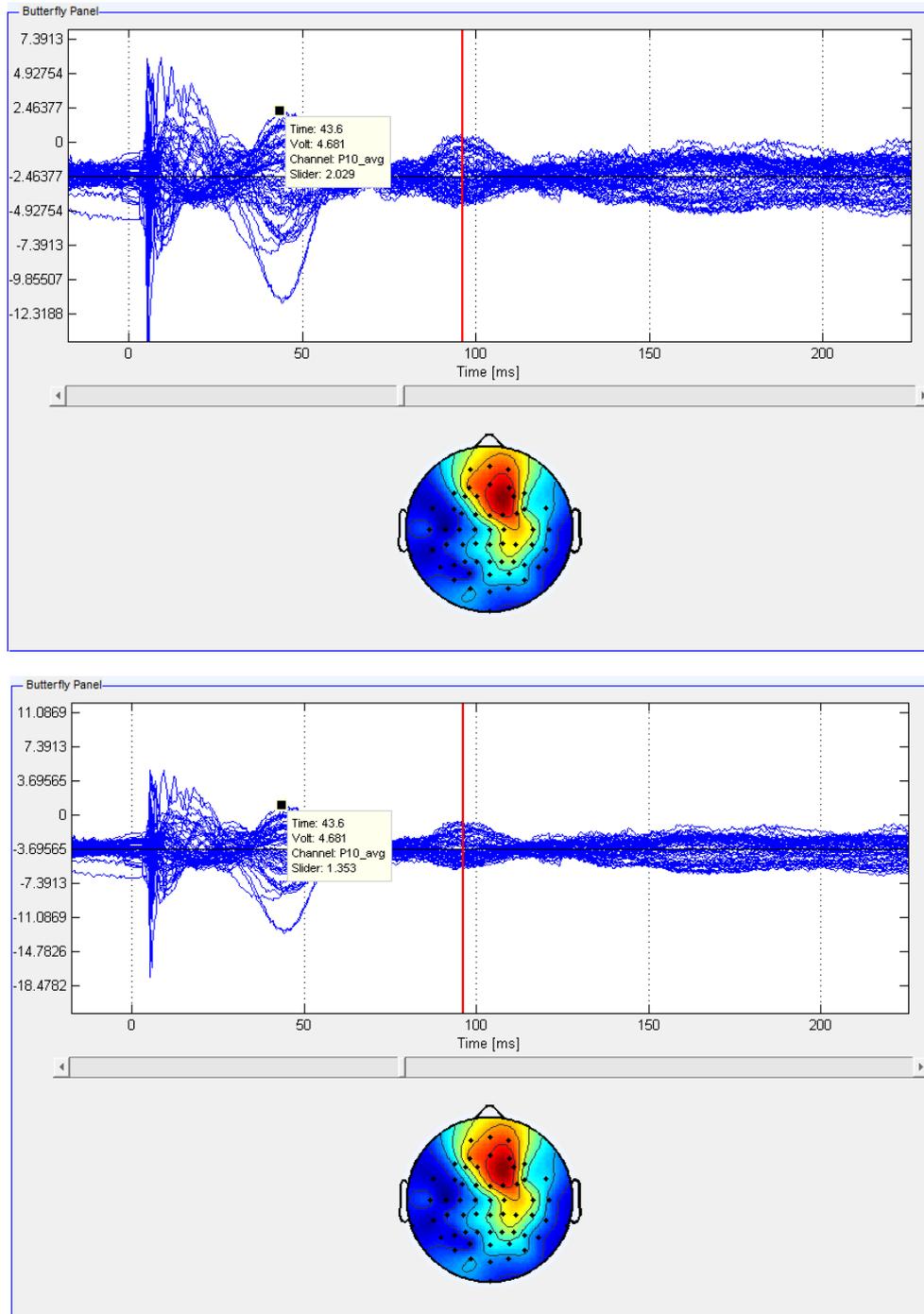


Figura 5.10 Risultato dello slider d'amplificazione sul butterfly axes. Il valore dello slider è pari a 1.3 nell'immagine sopra e 2 nell'immagine sotto.

Infine, se è attiva la funzione di rimozione dell'artefatto elettromagnetico, l'utente può decidere di filtrare in tempo reale le tracce EEG visualizzate, applicando un filtro di Butterworth del terzo ordine con banda desiderata sia ai dati grezzi che a quelli medi (fig. 5.11 e 5.12).

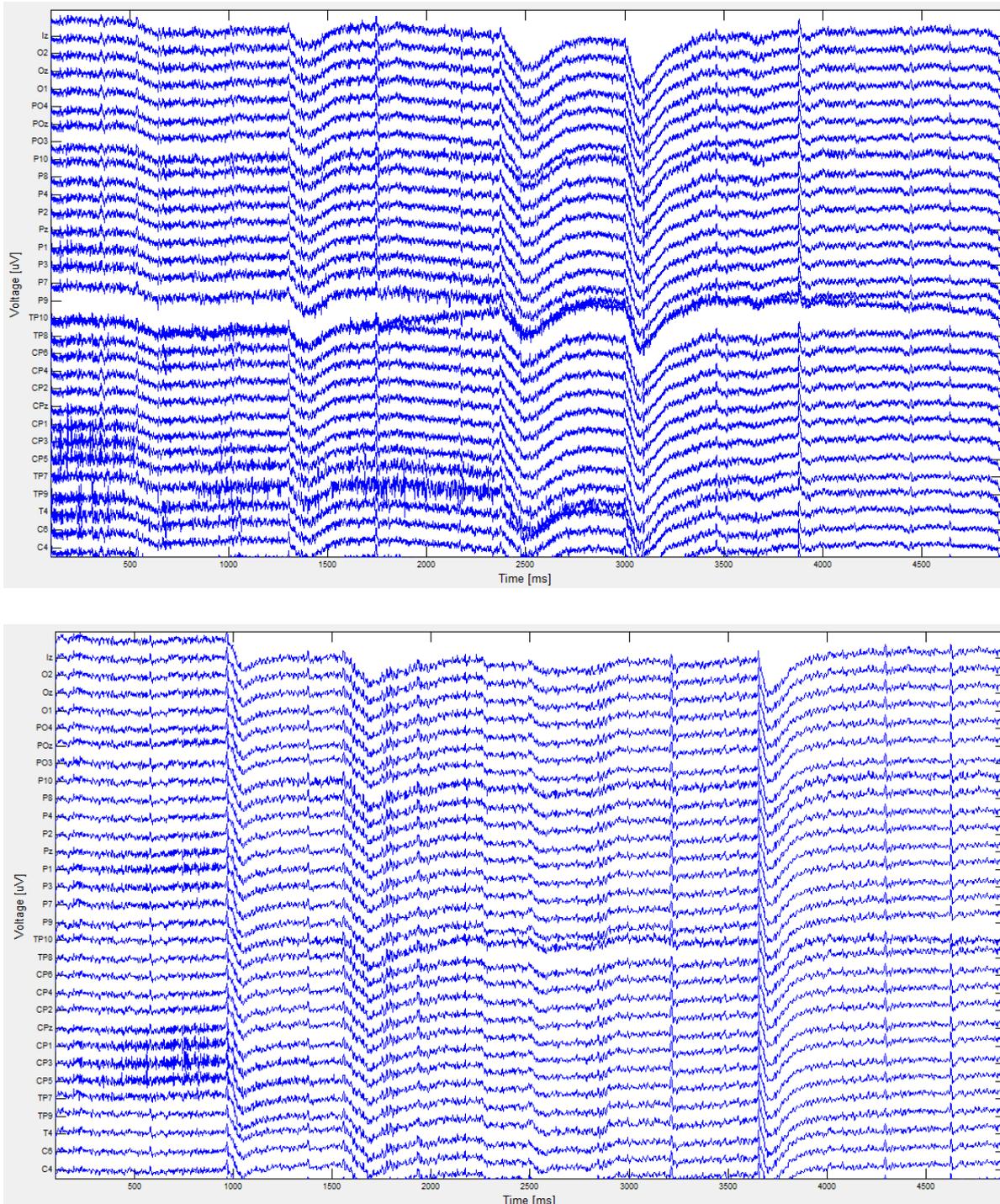


Figura 5.11 Ingrandimento di alcuni canali EEG, prima e dopo aver applicato un filtro di Butterworth con banda passante pari a [1 - 100] Hz sui dati grezzi.

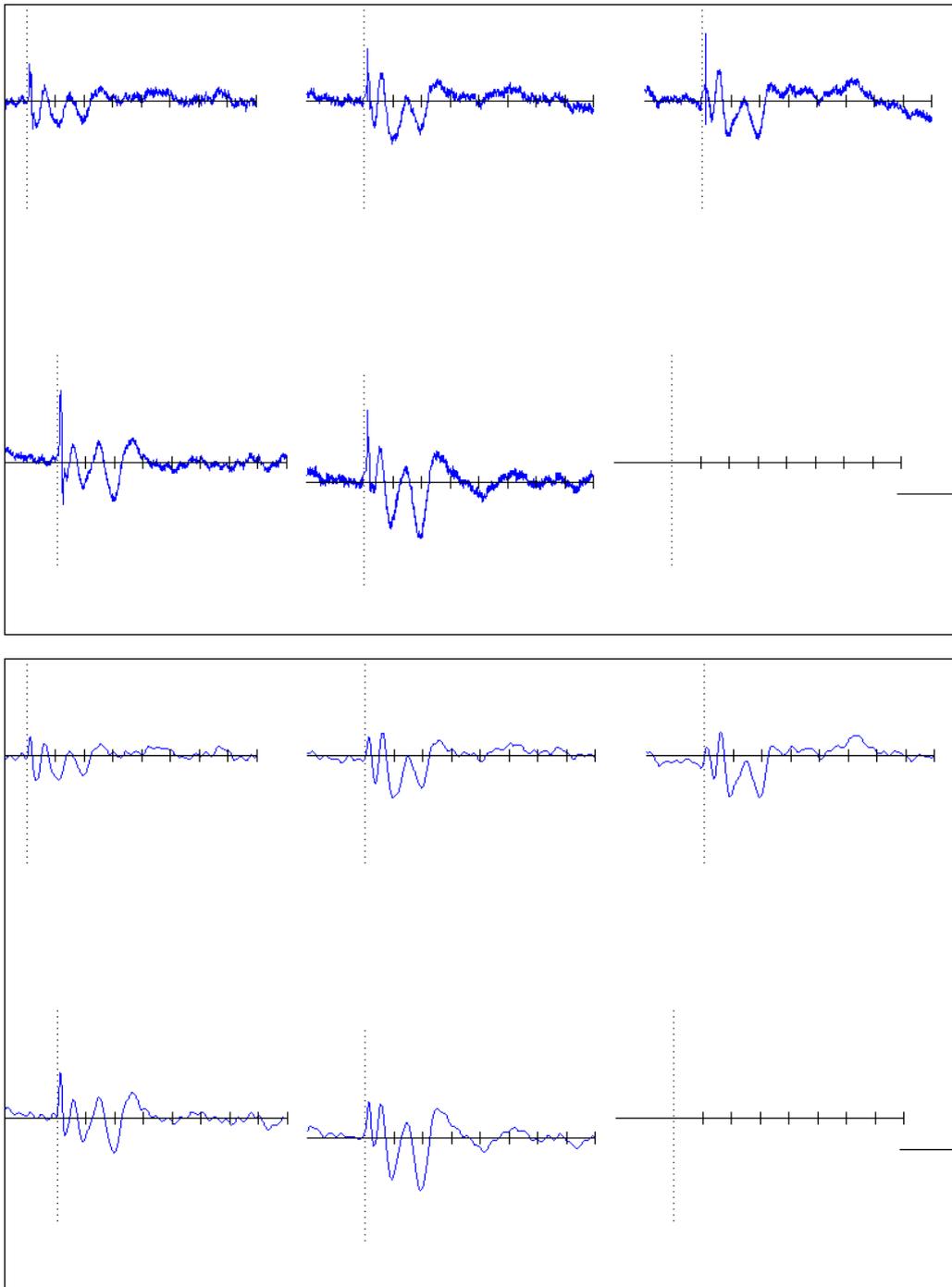


Figura 5.12 Effetto del filtraggio [1 – 100] Hz sui potenziali corticali medi.

## 5.2 Potenziali evocati registrati e risultati di preprocessing

I dati EEG, acquisiti su 3 soggetti sani con i due sistemi commerciali, hanno subito un'operazione di preprocessing.

Per i dati BrainAmp il primo step di pre-elaborazione prevede la rimozione dell'artefatto di stimolazione; in figura 5.13 è mostrato l'effetto di tale rimozione per un singolo canale EEG.

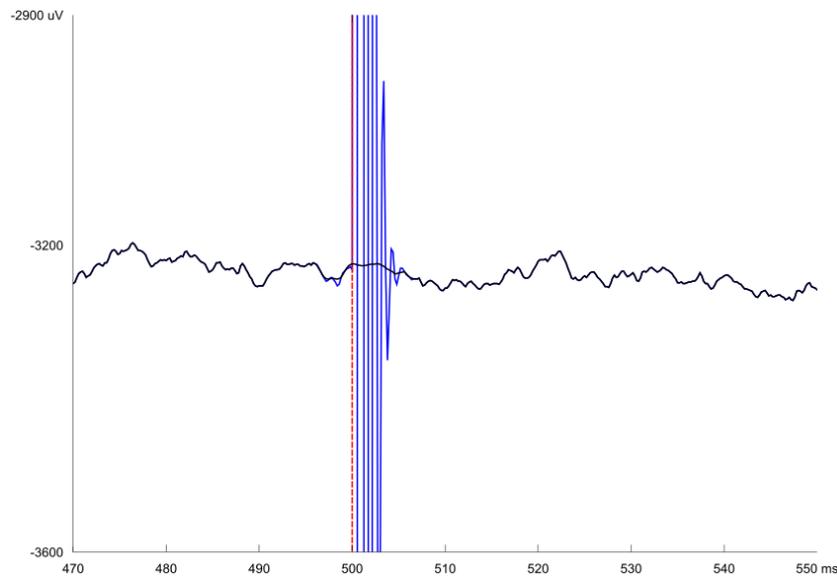


Figura 5.13 Rimozione dell'artefatto elettromagnetico di stimolazione per il canale 39, acquisito durante un esperimento di TMS/EEG con target in area premotoria.

A seguito delle operazioni di filtraggio, splitting, downsampling e rimozione dei *bad channels*, è possibile osservare, per entrambe le sessioni Nexstim e BrainAmp, i potenziali corticali TMS-evocati in common reference con la modalità a butterfly-plot, che mette bene in evidenza la risposta di tutti i canali (figura 5.14).

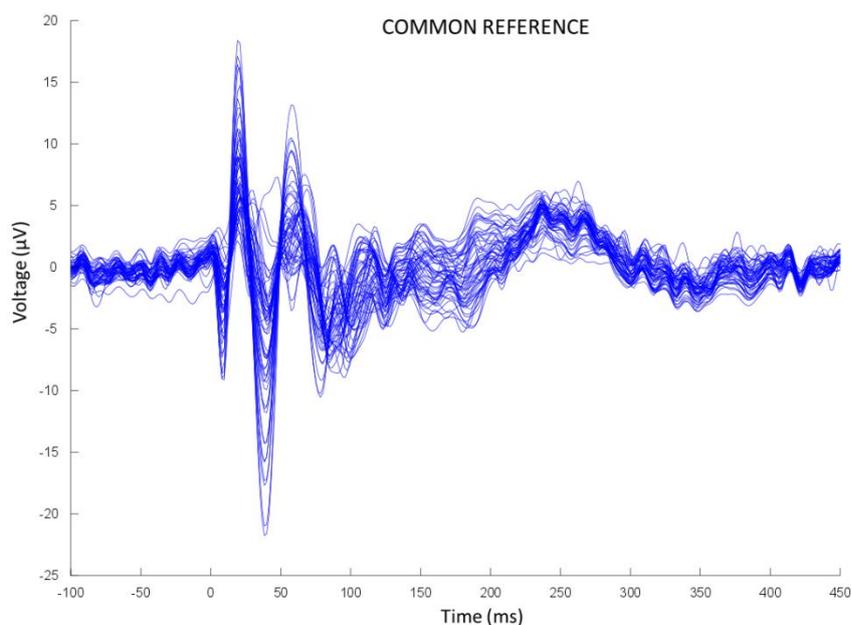


Figura 5.14 Butterfly plot dei potenziali evocati in common reference, ottenuti a seguito di una stimolazione in area pre-motoria utilizzando l'amplificatore BrainAmp DC (57 canali).

I canali eliminati vengono poi interpolati e i 60 potenziali corticali così ottenuti vengono espressi in average reference.

Fondamentale è poi la parte di rimozione delle componenti artefatte dai trial delle due sessioni concatenate tramite ICA. L'interfaccia utente, realizzata in Matlab durante il presente lavoro di tesi, permette la visualizzazione delle componenti di segnale utile (figura 5.15) e la rimozione delle componenti legate ad artefatti muscolari, movimenti saccadici e artefatti di polarizzazione (figure 5.16, 5.17 e 5.18 rispettivamente).

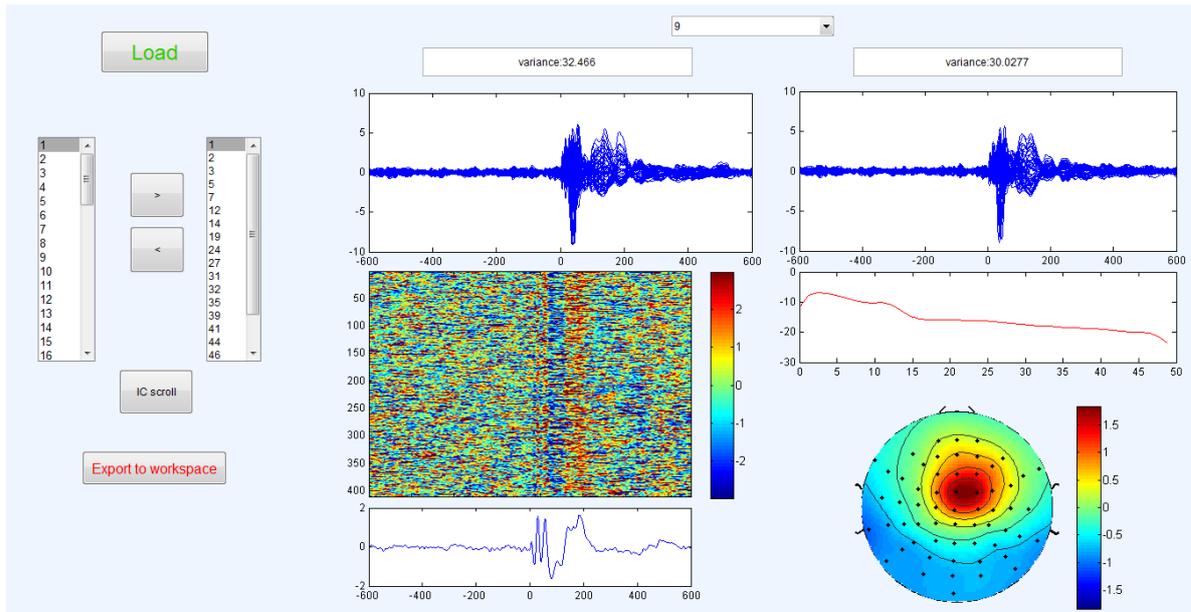


Figura 5.16 Nona componente legata a segnale utile nel caso di stimolazione in area premotoria destra. Si noti l'andamento come  $1/f$  nello spettro, tipico di una componente EEG.

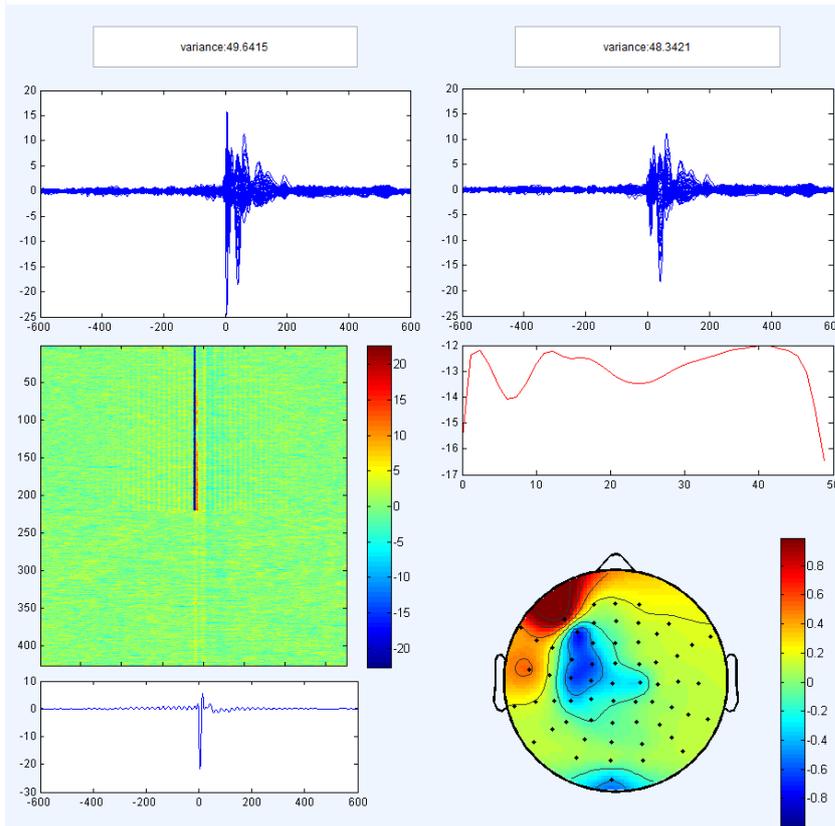


Figura 5.15 Componente di artefatto muscolare localizzato in zona temporale. Si evidenzia il contenuto del segnale alle alte frequenze (picco a 40 Hz).

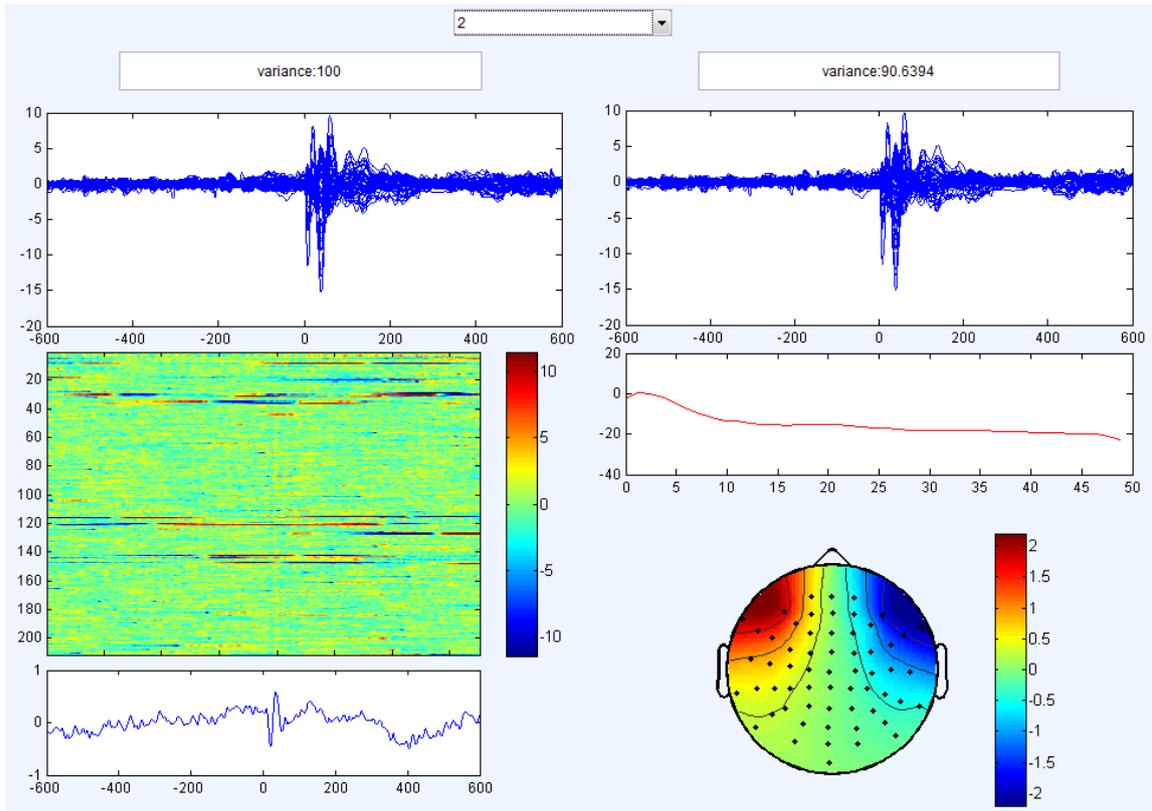


Figura 5.17 Componente legata ai movimenti saccadici del paziente durante l'esperimento di TMS/EEG.

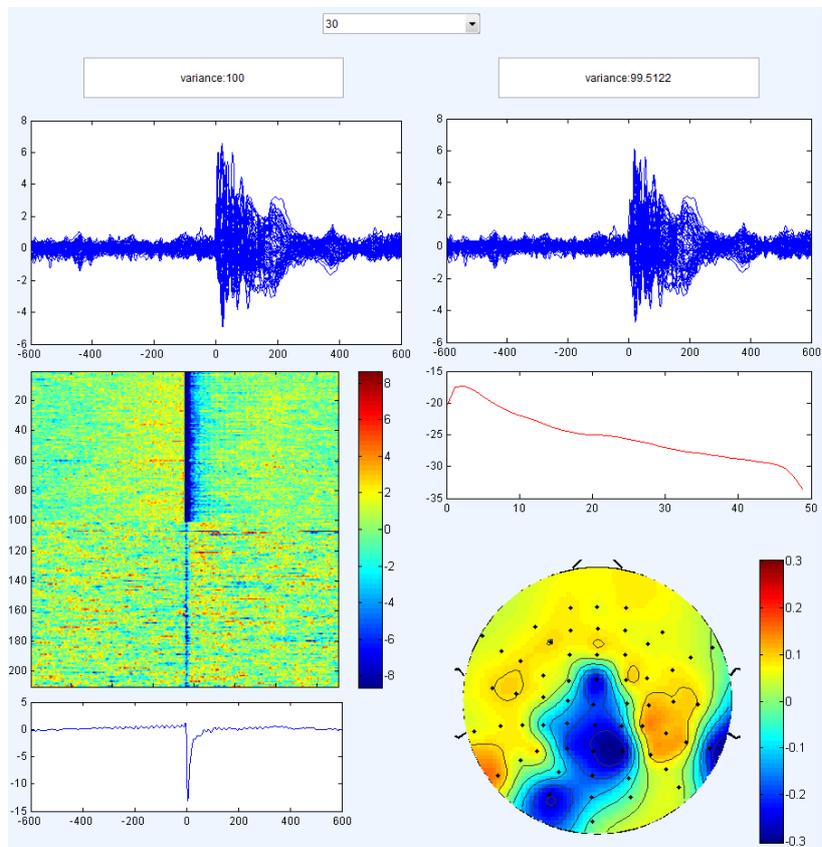


Figura 5.18 Componente che rappresenta l'artefatto di polarizzazione dovuto al gel degli elettrodi.

E' interessante notare come cambi la forma d'onda dell'artefatto di polarizzazione tra le due sessioni (imaged in figura 5.18); il decadimento esponenziale dell'artefatto presente nei primi 100 trial della sessione Nexstim, infatti, scompare nei successivi trial della sessione BrainAmp. Il filtro hardware interno all'amplificatore Nexstim (0 ÷ 350 Hz) determina un effetto di blurring sulla discontinuità di potenziale (delta di polarizzazione del gel causato dall'impulso TMS) maggiore di quello generato dal filtro dell'amplificatore Nexstim (0 ÷ 1000 Hz).

Una volta aver eliminato le componenti artefattuali e ridiviso le due sessioni, si ottengono i potenziali corticali TMS-evocati registrati con i due diversi amplificatori, eXimia e BrainAmp DC, pronti per essere confrontati. In figura 5.19 è mostrato il butterfly plot in average reference dei 60 canali EEG registrati con il sistema BrainAmp, al termine delle operazioni di pre-processing.

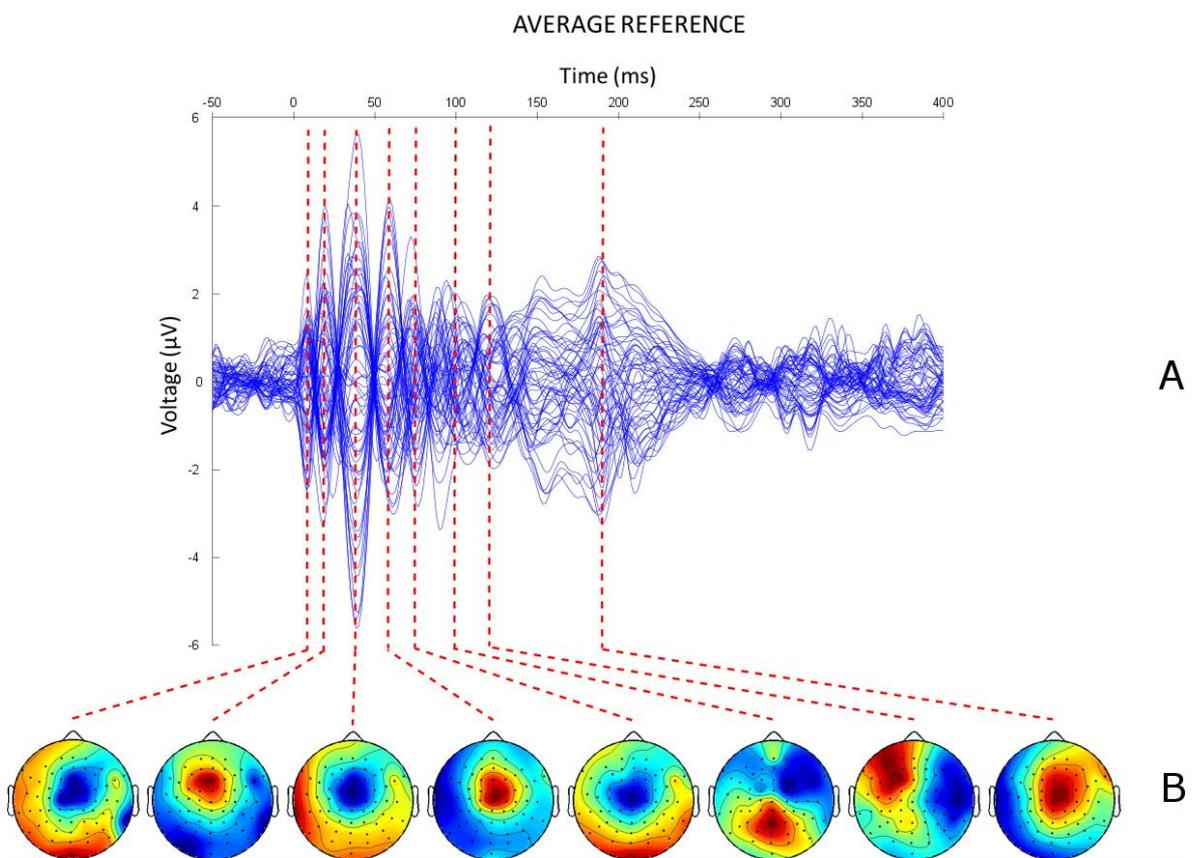


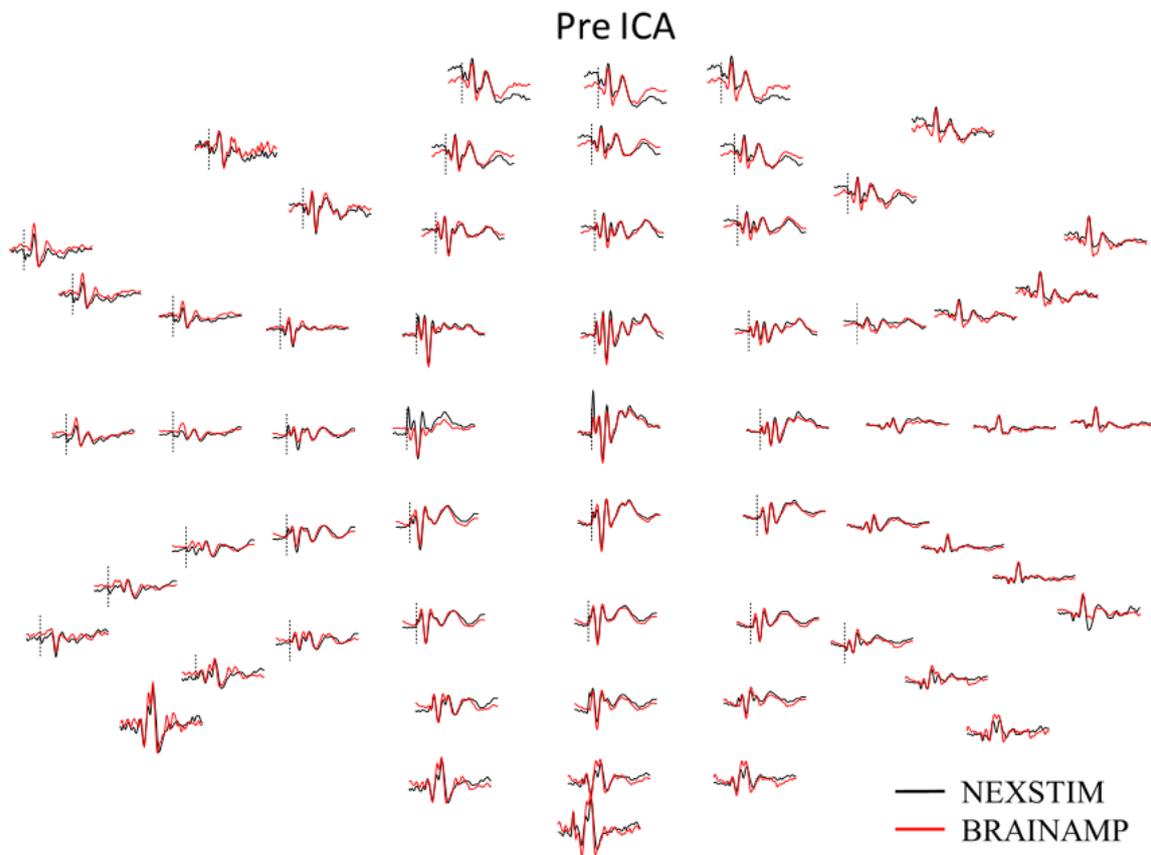
Figura 5.19 Butterfly plot e distribuzione istantanea sullo scalpo dei potenziali evocati.

(A) Butterfly plot dei potenziali evocati in average reference dopo procedura di pre-elaborazione (BrainAmp DC, 60 canali) nel caso di stimolazione in area premotoria. (B) La mappa codificata a colori mostra le distribuzioni istantanee di potenziale a specifiche latenze (autoscalate tra le tensioni istantanee massima e minima).

L'ICA si è rivelato uno strumento molto importante per la successiva fase di confronto dei potenziali acquisiti con i due sistemi commerciali. In generale, si può facilmente assumere che nelle due sessioni non siano presenti gli stessi identici artefatti e ciò contribuisce ad incrementare un indice del grado di diversità come il Divergence Index (DI).

Al tempo stesso però, alcune componenti artefattuali possono contenere anche segnale EEG utile, quindi, se eliminate, portano ad un aumento del DI.

Un buon compromesso è stato trovato concatenando i trial delle due sessioni, “forzando” l’ICA a trovare componenti (di segnale e non) comuni alle due sessioni; in questo modo, se una data componente artefatta è presente solo in una sessione, essa sarà eliminata anche dai trial dell’altra ma con una forma d’onda diversa e il ridotto contenuto di segnale utile descritto dalla componente stessa verrà eliminato da entrambi i dataset, riducendo al minimo la variabilità dell’analisi e l’aumento artefatto di DI. In figura 5.20 è possibile apprezzare visivamente il contributo dell’ICA nel confronto delle risposte evocate registrate con Nexstim e BrainAmp.



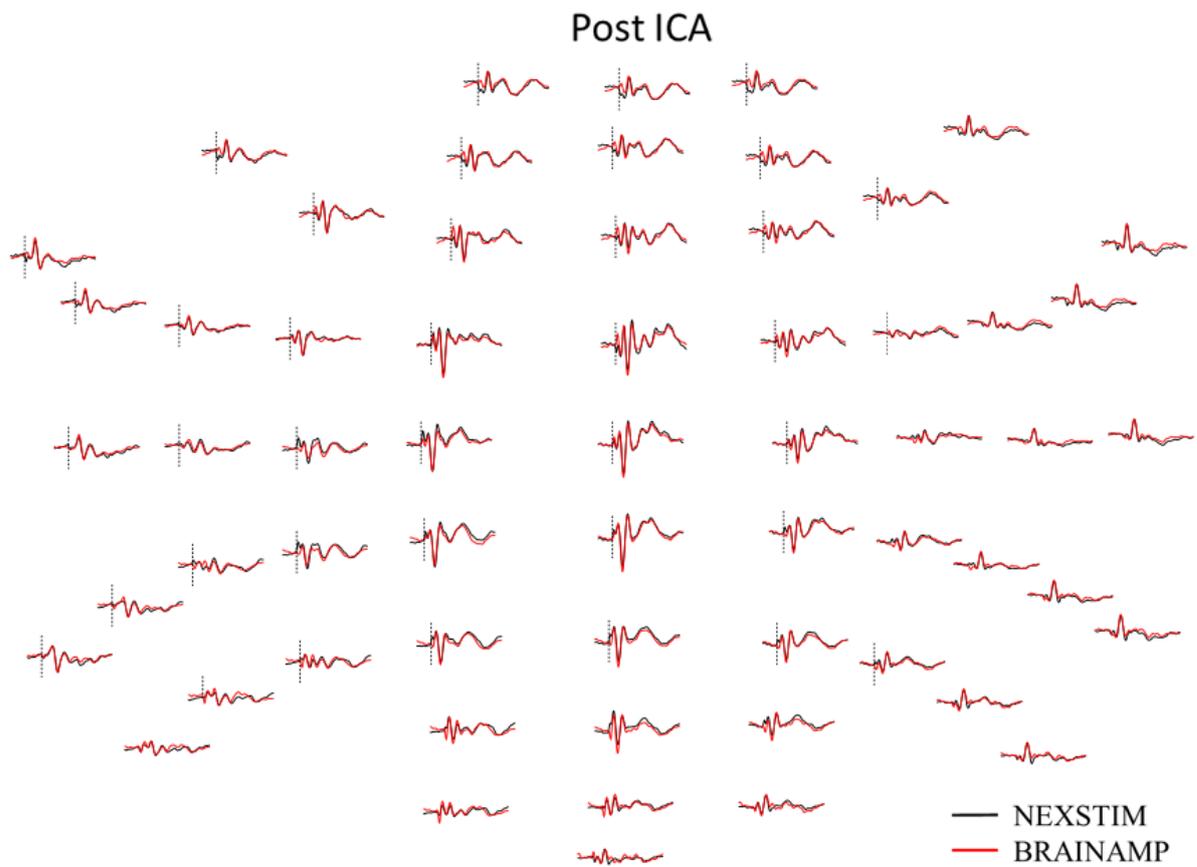


Figura 5.20 Visualizzazione dei 60 potenziali evocati registrati con i due sistemi commerciali prima e dopo ICA. I dati sono campionati a 625 Hz e visualizzati in average reference. Il target di stimolazione è in area parietale sinistra. Finestra temporale  $-50 \div 250$  ms.

### 5.3 Valori di Divergence Index (DI) tra sessioni Nexstim e BrainAmp

Il Divergence Index (DI) è stato calcolato per confrontare le risposte TMS-evocate acquisite con i due sistemi commerciali e per sintetizzare il loro grado di diversità in un singolo valore. La tabella 2 riporta i valori DI ottenuti per i 3 soggetti sani considerati nel presente lavoro, valutando i potenziali evocati nella finestra temporale che va da 9 a 250 ms dopo lo stimolo.

Soggetti	Area	Di intra-Nexstim (%)	Di intra-BrainAmp (%)	Di pre ICA (%)	Di post ICA (%)
Soggetto 1	Premotoria	0	0.40	1.02	<b>0.77</b>
	Parietale	0.11	0.81	3.09	<b>0.76</b>
Soggetto 2	Parietale	0	0.59	2	<b>0.80</b>
Soggetto 3	Premotoria	0.11	0.03	1.95	<b>1.38</b>
	Parietale	0.15	0	0.47	<b>0</b>

Tabella 2 Valori Divergence Index (DI) nella finestra temporale 9 ÷ 250 ms.

Quando la TMS è stata applicata con gli stessi parametri di stimolazione e differenti sistemi di acquisizione (amplificatore eXimia vs BrainAmp DC), la morfologia e la dinamica spazio-temporale dei potenziali TMS-evocati sono state largamente preservate (figura 5.20 e 5.21). I valori DI pre-ICA e post-ICA rappresentano il grado di diversità spazio-temporale tra le due sessioni Nexstim e BrainAmp, prima e dopo aver eseguito ICA.

La sessione prefrontale per il soggetto 2 non è stata considerata a causa dell'elevato numero di trial rifiutati durante il preprocessing del segnale registrato nella sessione Nexstim (bad quality signal).

Il DI pre-ICA medio è stato di  $1.71 \pm 0.90$  % (range 0.47 – 3.09%) mentre il valor medio di DI post-ICA è stato di  **$0.74 \pm 0.44$**  % (range 0 – 1.38%).

I valori DI intra-Nexstim e intra-BrainAmp sono stati ottenuti dividendo ogni sessione in due sotto-sessioni contenenti la prima metà e la seconda metà dei trial e calcolando il DI tra queste due. I loro valori medi sono stati rispettivamente pari a  $0.07 \pm 0.06$  (range 0 – 0.15 %) e  $0.37 \pm 0.32$  (range 0 – 0.81 %).

Per un dato canale, le due sessioni vengono considerate significativamente differenti in corrispondenza di un dato campione temporale quando almeno uno dei due potenziali originali supera i limiti di significatività trovati. La figura 5.21 mostra i due confini di significatività, calcolati come  $(G + \delta(t))$  e  $(-G + \delta(t))$ , trovati per un singolo canale prima e dopo ICA.

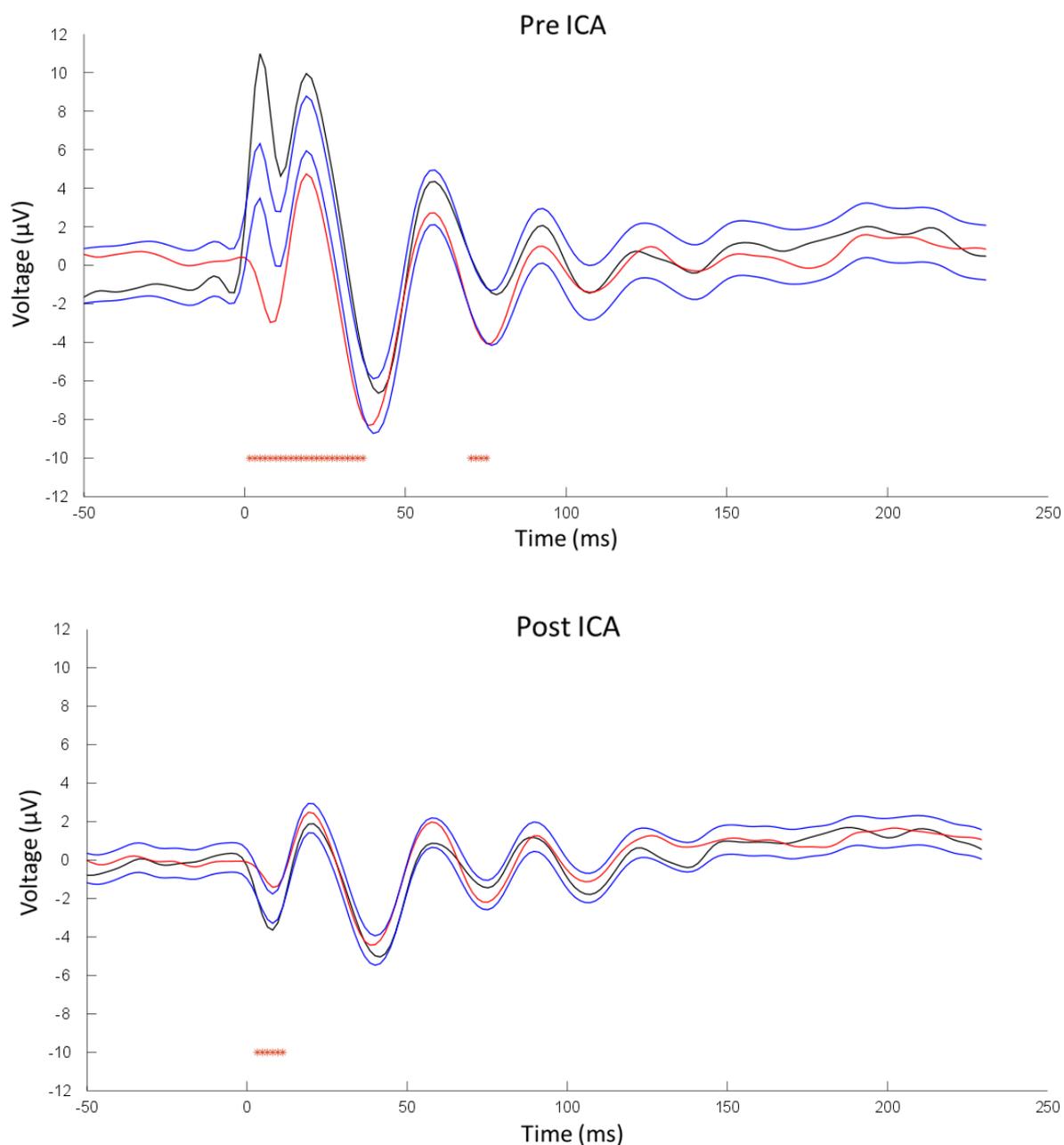
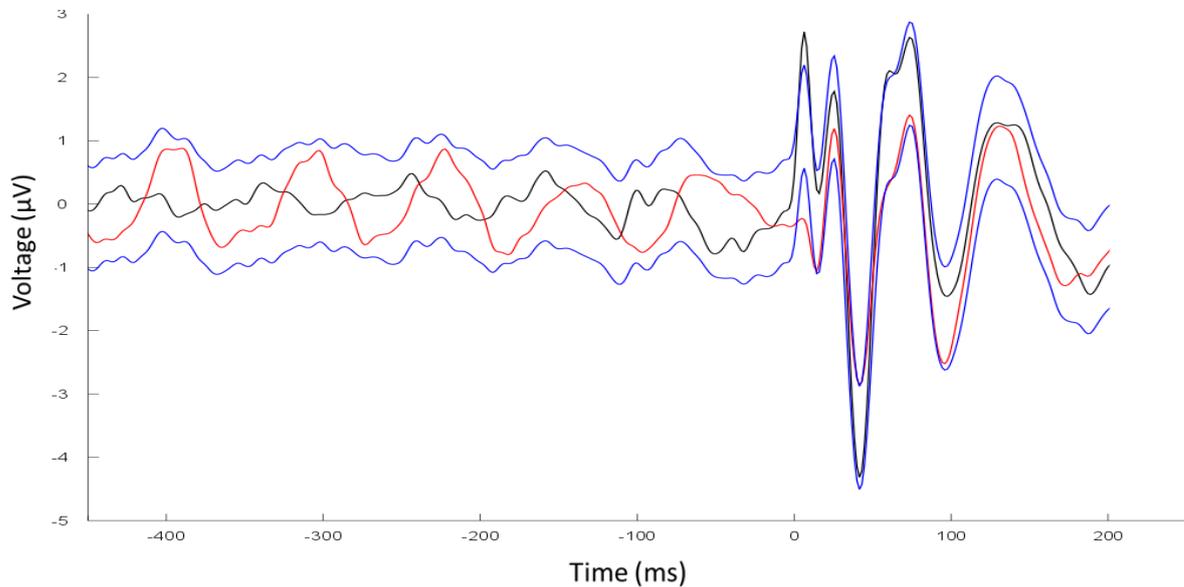


Figura 5.21 Limiti di significatività calcolati per il canale 18 e corrispondenti potenziali evocati medi per le due sessioni Nexstim (traccia nera) e BrainAmp (traccia rossa) nel caso di stimolazione premotoria, prima e dopo ICA.

Gli asterischi indicano i campioni significativamente differenti.

La rimozione delle componenti artefatte (si veda per esempio il primo picco a circa 5 ms della risposta evocata registrata con il sistema Nexstim) tramite ICA migliora il risultato di similarità tra le due sessioni in termini di minor numero di campioni significativamente differenti.

Come già chiarito al paragrafo 4.4, i valori DI sono stati ottenuti considerando solamente i canali EEG che hanno superato il test sulla baseline, ovvero quelli aventi stessa distribuzione statistica. Per esempio, un ritmo  $\alpha$  nella finestra temporale di pre-stimolo per un elevato numero di trial può portare al rifiuto del canale corrispondente (figura 5.22).



*Figura 5.22 Ritmo  $\alpha$  nella finestra temporale di pre-stimolo del canale 27 (traccia rossa, BrainAmp), rifiutato nel baseline test della procedura statistica utilizzata per confrontare le sessioni Nexstim e BrainAmp. In questo caso è mostrata la risposta alla stimolazione parietale del soggetto 2.*

## 5.4 Valori PCI su soggetti sani

Una volta aver validato l'amplificatore BrainAmp DC, è stato calcolato il Perturbational Complexity Index secondo Lempel-Ziv ( $PCI_{LZ}$ ) per le 12 sessioni di TMS effettuate sui 3 soggetti sani.

Prima di tutto, la soluzione del cosiddetto problema inverso (calcolata tra  $-400 \div 400$  ms) ha permesso di ottenere l'andamento temporale delle correnti primarie associate alle sorgenti dipolari del modello diretto a tre sfere di BERG. La figura 5.23 mostra la sovrapposizione delle 3004 correnti corticali stimate nel caso di TMS in area premotoria e la corrispondente distribuzione sulla corteccia (soggetto 1).

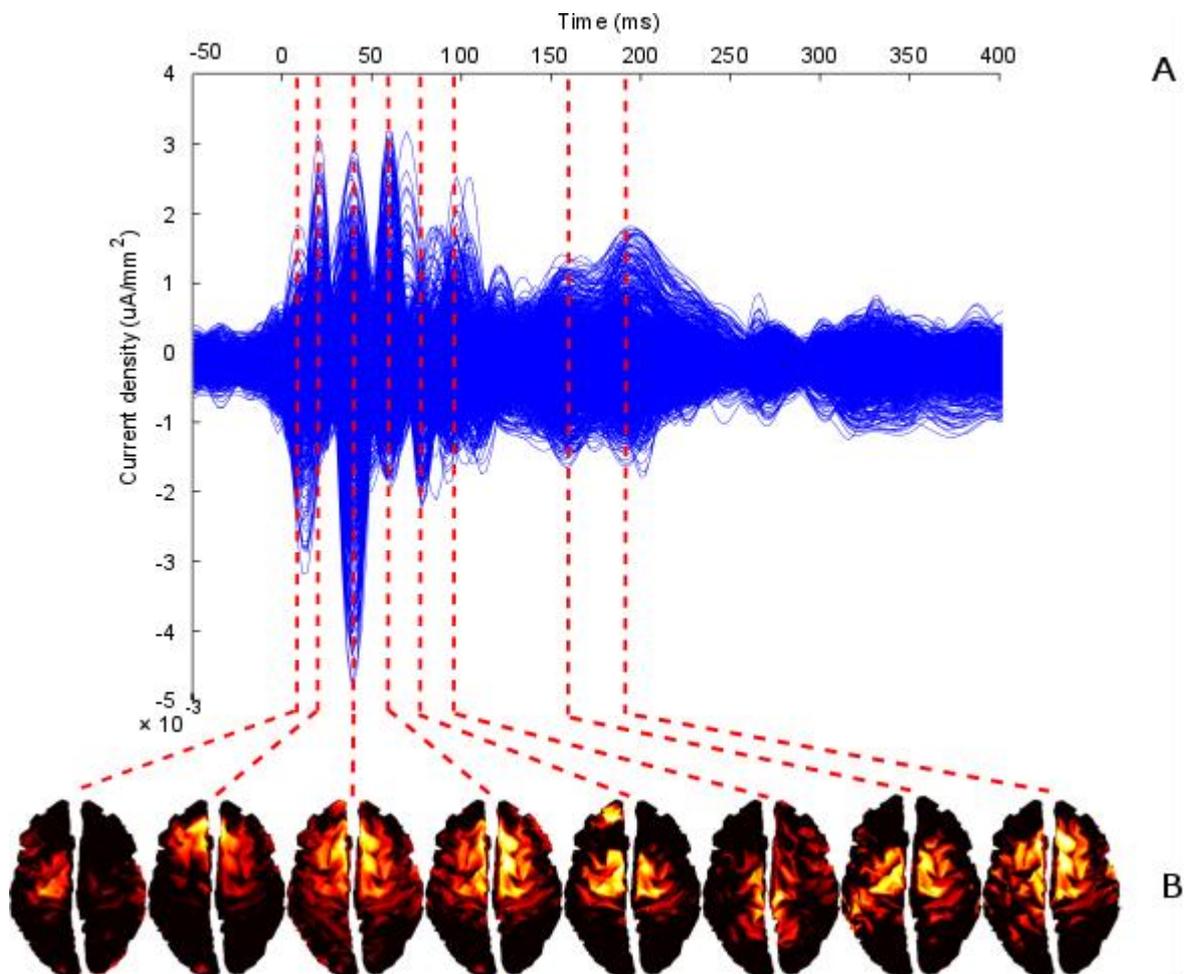


Figura 5.23 Butterfly plot e distribuzione istantanea sulla corteccia delle correnti primarie stimate.

(A) Butterfly plot delle correnti corticali ottenute risolvendo il problema inverso nel caso di stimolazione in area premotoria. (B) Distribuzioni istantanee delle correnti sulla corteccia a specifiche latenze (autoscalate tra le correnti istantanee massima e minima).

Applicando una procedura statistica non parametrica bootstrap-based sulle correnti corticali stimate, è stato poi possibile determinare la distribuzione spazio-temporale binaria delle sorgenti statisticamente significative  $SS(x_j, t)$ . In figura 5.24 viene mostrata la matrice  $SS$  con la percentuale di sorgenti significative per ogni istante temporale nel caso di TMS in area premotoria e in area parietale (soggetto 1).

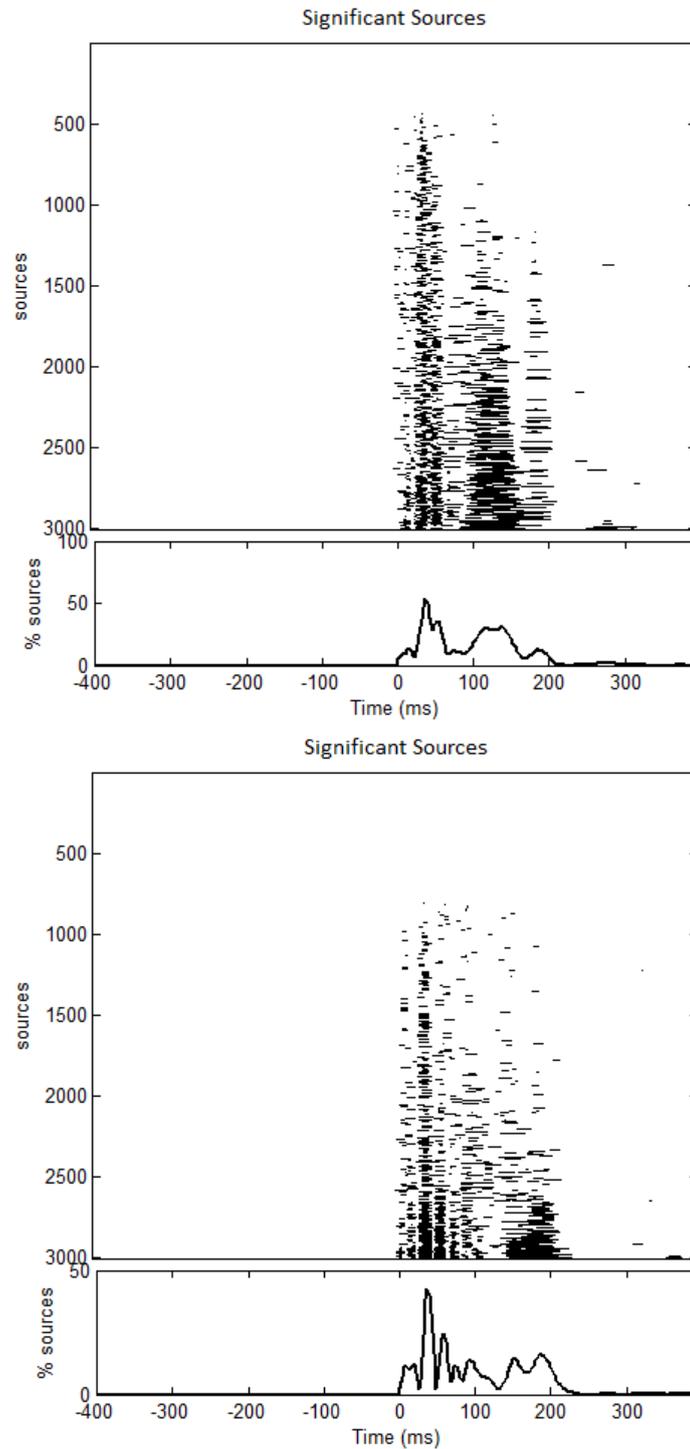


Figura 5.24 Matrice  $SS$  e percentuale di sorgenti significativamente attive nella finestra temporale  $-400 \div 400$  ms nel caso di stimolazione in area premotoria e in area parietale per il soggetto 1.

Le 3004 sorgenti corticali delle matrici SS (fig. 5.24) sono ordinate da quella meno significativamente attiva a quella più significativamente attiva nella finestra temporale di interesse. In questo caso, la TMS ha innescato una catena di risposte significative in un insieme distribuito di aree corticali, che diventano attive a diverse latenze, determinando un pattern spazio-temporale di attivazione corticale che è diffuso e differenziato e che si esaurisce nei primi 200-250 ms dopo lo stimolo.

Infine, la comprimibilità spazio-temporale delle matrici binarie SS è stata quantificata tramite  $PCI_{LZ}$ , un esempio di metrica in grado di stimare la quantità di informazione contenuta nei pattern di attivazione corticale a seguito di una perturbazione diretta.

I valori  $PCI_{LZ}$ , calcolati per i 3 soggetti sani considerando la matrice SS da 8 a 300 ms dopo lo stimolo, vengono riportati in tabella 3.

Soggetti	Area	$PCI_{LZ}$ Nexstim	$PCI_{LZ}$ BrainAmp
Soggetto1	Premotoria	0.53	0.52
	Parietale	0.54	0.56
Soggetto 2	Prefrontale	*	0.50
	Parietale	0.56	0.54
Soggetto 3	Premotoria	0.54	0.59
	Parietale	0.52	0.49

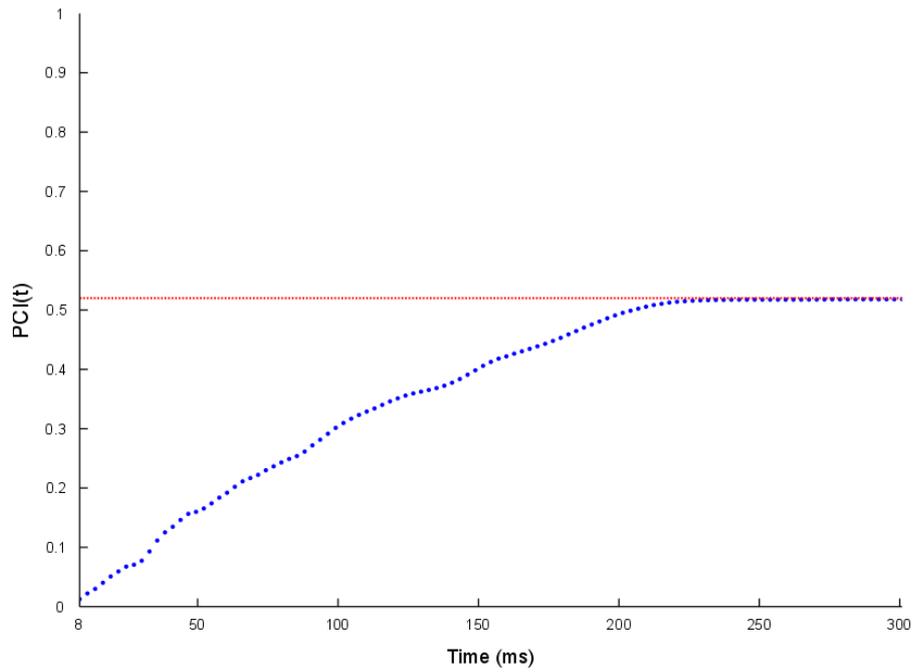
Tabella 3 Valori di Perturbational Complex Index (PCI) per le 6 sessioni effettuate sui 3 soggetti sani.

Finestra temporale di interesse +8 ÷ 300 ms. \* PCI non calcolato in quanto la sessione è stata scartata per l'elevato numero di trial rifiutati.

Il valore medio di  $PCI_{LZ}$  è pari a  $0.54 \pm 0.01$  nella sessione Nexstim e uguale a  $0.53 \pm 0.03$  nella sessione BrainAmp. La differenza media di  $PCI_{LZ}$  fra le due sessioni, invece, risulta pari a 0.03.

L'algoritmo di compressione di Lempel-Ziv fornisce inoltre l'evoluzione temporale di PCI,  $PCI_{LZ}(t)$ , calcolando la serie temporale cumulativa della complessità  $c_l$  della matrice SS.

Un esempio di  $PCI_{LZ}(t)$ , nel caso di TMS in area premotoria, è mostrato in figura 5.25.  $PCI_{LZ}(t)$  aumenta monotonicamente con l'emergere temporale dei pattern spaziali non ridondanti di attivazione corticale fino ad un valore asintotico raggiunto già a 250 ms circa, a conferma della finestra temporale utilizzata.



*Figura 5.25 Evoluzione temporale di PCI per il soggetto 1 nel caso di TMS in area premotoria (107 valori da 8 a 300 ms con una frequenza di campionamenti di 362 Hz). Il valore asintotico è 0.52.*

## 6 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

L'interfaccia utente realizzata per ottimizzare la visualizzazione in tempo reale dei dati di TMS/EEG, registrati con il sistema BrainAmp DC, ha permesso di rimuovere on-line l'artefatto elettromagnetico; ciò è particolarmente importante per verificare se la risposta evocata da singolo trial è contaminata da un'attivazione muscolare indesiderata o da componenti evocate non direttamente indotte dalla stimolazione corticale. Inoltre, la media dei trial acquisiti in average reference viene correttamente aggiornata e visualizzata scegliendo dinamicamente i canali, per valutare rapidamente l'efficacia della stimolazione e quindi l'esistenza di una effettiva risposta TMS-evocata. On-line, è ora possibile verificare se la risposta è massima alle brevi latenze (primi 50 ms) e in prossimità del sito di stimolazione, se presenta asimmetria tra i due emisferi cerebrali e, infine, se l'area corticale stimolata tende a conservare la propria frequenza naturale, indicando che le oscillazioni osservate riflettono meccanismi fisiologici locali (Rosanova et al., 2009).

Pertanto, la GUI sviluppata in Matlab permette di sfruttare la flessibilità e la portabilità del sistema BrainAmp per acquisire dati TMS/EEG di buona qualità, risultando quindi un utile strumento per tutti coloro che lo utilizzano nell'ambito della ricerca neuroscientifica.

Con l'ausilio dell'interfaccia, è stato poi possibile confrontare i due sistemi commerciali Nexstim (utilizzato come riferimento per il nostro lavoro) e BrainAmp, dimostrando che le risposte corticali acquisite sono molto simili. Il loro grado di diversità è stato quantificato tramite una procedura statistica non-parametrica basata su permutazione che termina con il calcolo del Divergence Index (DI), un indice che misura la percentuale di campioni significativamente diversi nei primi 250 ms post-stimolo rispetto al numero totale di campioni spazio-temporali. I valori DI ottenuti per le 5 sessioni del presente lavoro (punti rossi in figura 4.1) risultano **minori di 1.67%**, la soglia ottimale che massimizza sensibilità e specificità dei potenziali evocati nell'analisi ROC di Casarotto et al. (2010). Quindi, il grado di diversità dei potenziali evocati registrati con i due diversi amplificatori è minore della soglia oltre la quale occorre ritenere che si sia verificato un cambiamento nei parametri di stimolazione tra due sessioni di TMS/EEG. Nel nostro caso, si tratterebbe di cambiamenti incontrollati dovuti alla nuova strumentazione, il che sarebbe stato, se riscontrato, di grave impedimento al suo utilizzo. I dati ottenuti fanno presumere che la diversità tra due sessioni di TMS/EEG, realizzate con gli stessi parametri di stimolazione ma diversi amplificatori, è confrontabile alla variabilità biologica e sperimentale che contraddistingue due sessioni eseguite a distanza di tempo (stesso giorno o a distanza di una settimana) con i medesimi parametri e uguale amplificatore. In figura 6.1, infatti, è possibile osservare come i valori DI delle sessioni ottenute con diversi amplificatori (punti rossi) rientrino all'interno della distribuzione di valori DI delle sessioni realizzate utilizzando lo stesso amplificatore EEG (punti azzurri).

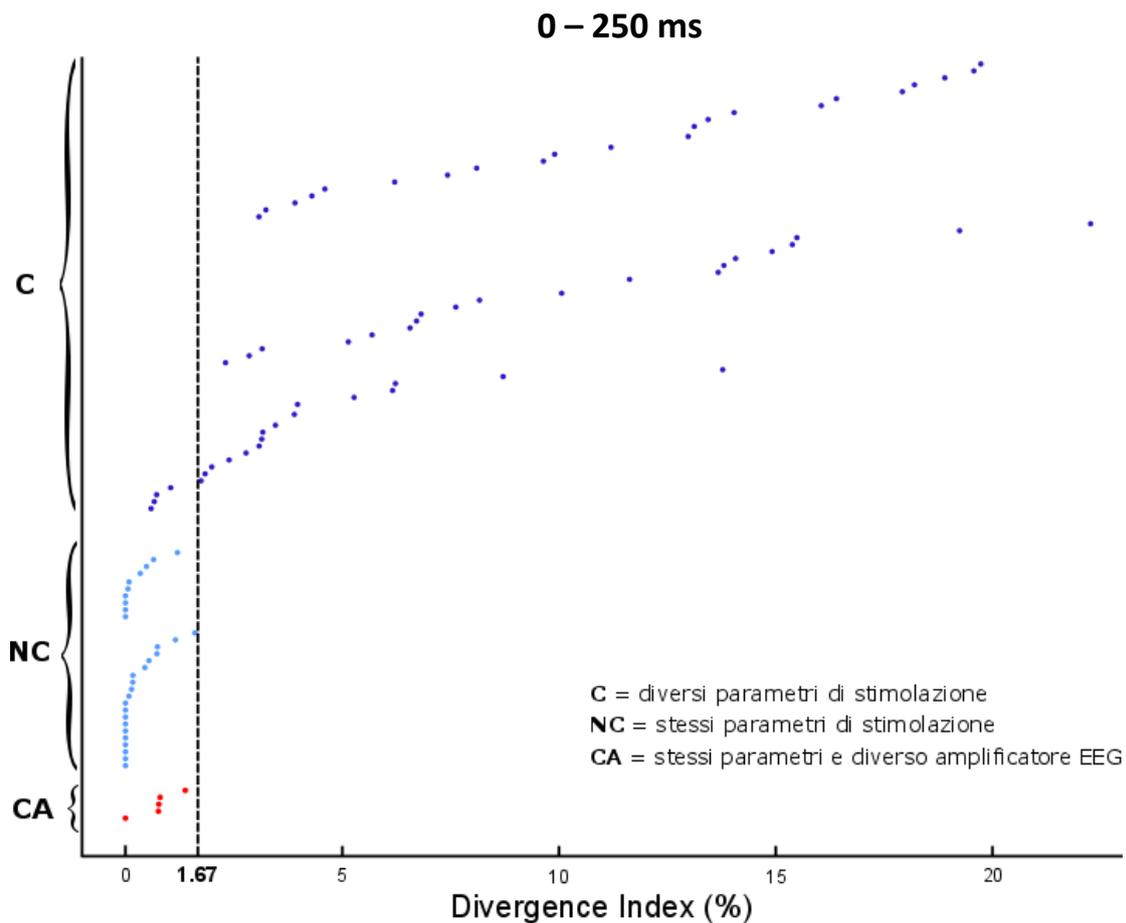


Figura 6.1 Valori DI calcolati per l'intero periodo di post-stimolo (250 ms).

I DI dei confronti C sono stati ottenuti utilizzando diversi parametri di stimolazione (sito, intensità e angolo di stimolazione), mentre i DI dei confronti NC mantenendo gli stessi parametri costanti nel tempo (sessioni in giornata e sessioni a distanza di una settimana). Infine, i 5 valori DI dei confronti CA sono stati ottenuti con gli stessi parametri ma utilizzando i due diversi amplificatori EEG, eXimia e BrainAmp DC. I valori DI dei confronti C e NC sono gli stessi della figura 1.14 del paragrafo 1.4.1 (Casarotto et al., 2010).

La riproducibilità del potenziale TMS-evocato tra esperimenti eseguiti con diversi amplificatori (eXimia e BrainAmp DC in questo caso) potrà essere ulteriormente confermata in futuro incrementando la numerosità delle sessioni.

Il risultato di riproducibilità della risposta corticale alla TMS è stato poi corroborato mediante il calcolo del Perturbational Complexity Index (PCI), un esempio di indice capace di quantificare il grado di integrazione e differenziazione espresso nei potenziali evocati da TMS.

I valori PCI sono risultati virtualmente identici nei due set-up utilizzati e rientrano all'interno della distribuzione di valori ottenuta da Casarotto et al. (in preparazione) per soggetti sani in stato di veglia (figura 6.2); questo conferma, pur su di un piccolo campione di soggetti sani, la robustezza della valutazione PCI rispetto a variazione dei parametri della TMS, premessa centrale per un indice volto a quantificare la complessità della risposta corticale.

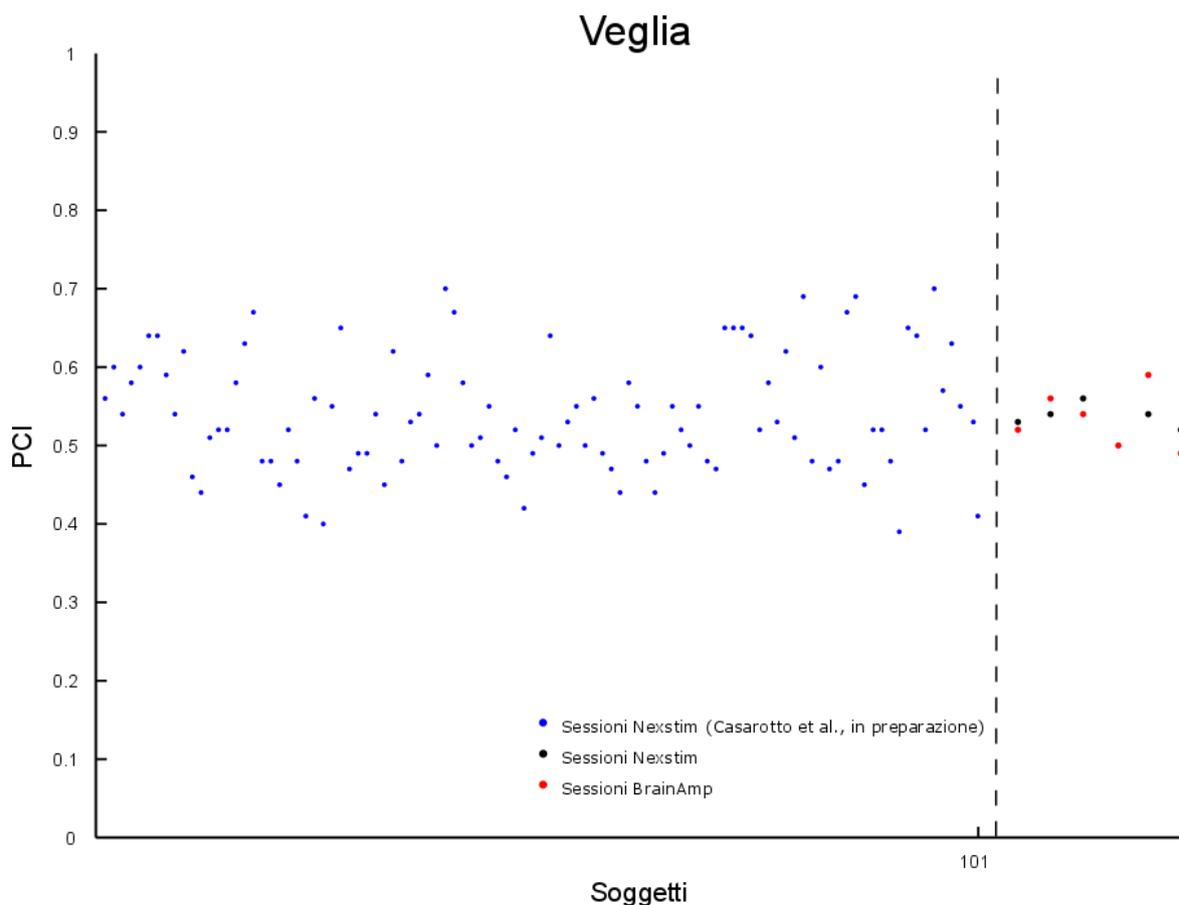


Figura 6.2 Valori PCI per soggetti sani in stato di veglia (+8 ÷ 300 ms.).

I punti blu rappresentano 101 sessioni (corrispondenti a 101 soggetti) di TMS/EEG acquisite mediante il sistema Nexstim. I punti neri (5) e rossi (6) rappresentano le 11 sessioni (corrispondenti a 3 soggetti) realizzate nel presente lavoro utilizzando rispettivamente il sistema Nexstim e il sistema BrainAmp.

Vista l'importanza clinica dell'indice PCI nei pazienti con disturbi di coscienza, risulta molto importante che sistemi diversi utilizzati per TMS/EEG diano il medesimo risultato, in termini di efficacia di stimolazione e forma d'onda del potenziale corticale registrato, per poter integrare studi clinici condotti in centri di ricerca che fanno uso di differenti sistemi commerciali e quindi trarre conclusioni più forti di quelle tratte sulla base di ogni singolo studio.

In conclusione, il presente lavoro ha permesso di compiere alcuni passi importanti verso lo sviluppo di uno strumento che, al letto dei pazienti, possa fornire un'immediata valutazione della complessità dei potenziali evocati dalla TMS e quindi del livello di coscienza. Sebbene il confronto tra i due sistemi commerciali sia stato eseguito su numero ridotto di sessioni, l'interfaccia utente di visualizzazione ha consentito di ripristinare per la nuova strumentazione tutte le procedure di controllo, validazione della specifica registrazione, reiezione degli artefatti, filtraggio e cleaning, fondamentali nel protocollo precedentemente consolidato e validato. In futuro, sarà di estrema importanza provare il software realizzato al letto del paziente, al fine di valutare la sua usabilità e robustezza ed, eventualmente, la possibilità di implementare ulteriori funzionalità che siano utili all'utente in fase di registrazione.



## 7 BIBLIOGRAFIA

- Baillet S., Mosher, J. C. and Leahy, R. M., “*Electromagnetic brain mapping.*” *IEEE Signal Process. Mag.* 18, 2001.
- Baldissera F., *Fisiologia e Biofisica Medica*. Poletto Editore, 2000.
- Berg P. and Scherg M., “*A fast method for forward computation of multiple-shell spherical head models.*” *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol* 90, 1994.
- Casali A.G., Casarotto S., Rosanova M., Mariotti M., Massimini M., “*General indices to characterize the electrical response of the cerebral cortex to TMS.*” *Neuroimage* 49(2), 2010.
- Casali A.G., Gosseries O., Rosanova M., Boly M., Sarasso S., Casali K.R., Casarotto S., Bruno M.-A., Laureys S., Tononi G., Massimini M., “*A Theoretically Based Index of Consciousness Independent of Sensory Processing and Behavior.*” *Sci. Transl. Med.* 5, 2013.
- Casarotto S., Romero Lauro L. J., Bellina V., Casali A.G., Rosanova M., Pigorini A., Defendi S., Mariotti M. and Massimini M., “*EEG Responses to TMS Are Sensitive to Changes in the Perturbation Parameters and Repeatable over Time.*” *Plos ONE*, 2010.
- Ferrarelli F., Massimini M., Sarasso S., Casali A., Riedner B.A., Angelini G., Tononi G., Pearce R.A., “*Breakdown in cortical effective connectivity during midazolam-induced loss of consciousness.*” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 2010.
- Friston K., “*Functional integration and inference in the brain.*” *Progress in neurobiology*, 2002.
- Hauk O., “*Keep it simple: a case for using classical minimum norm estimation in the analysis of EEG and MEG data.*” *Neuroimage* 21, 2004.
- Ilmoniemi R. J., Virtanen J., Ruohonen J., Karhu J., Aronen H. J., Näätänen R. and Katila T., “*Neuronal responses to magnetic stimulation reveal cortical reactivity and connectivity.*” *Neuroreport* 8, 1997.
- Kamitani Y., Bhalodia W.M., Kubota Y., Shimojo S., “*A model of magnetic stimulation of neocortical neurons.*” *Neurocomputing*, 2001.
- Kaspar F. and Schuster H. G., “*Easily calculable measure for the complexity of spatiotemporal patterns.*” *Phys. Rev. A*, 1987.
- Komssi S., Huttunen J., Aronen H. J., Ilmoniemi R. J., “*EEG minimum-norm estimation compared with MEG dipole fitting in the localization of somatosensory sources at SI.*” *Clin. Neurophysiol*, 2004b

- Lempel A. and Ziv J., "On complexity of finite sequences." *IEEE Trans. Inform. Theory*, 1976.
- Massimini M., Boly M., Casali A., Rosanova M., Tononi G., "A perturbational approach for evaluating the brain's capacity for consciousness." *Progress Brain Res* 107, 2009.
- Massimini M., Ferrarelli F., Esser S.K., Riedner B.A., Huber R., Murphy M., Peterson M.J., Tononi G., "Triggering sleep slow waves by transcranial magnetic stimulation." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 2007.
- Massimini M., Ferrarelli F., Huber R., Esser S.K., Singh H., Tononi G., "Breakdown of cortical effective connectivity during sleep." *Science* 309, 2005.
- Massimini M., Ferrarelli F., Murphy M.J., Huber R., Riedner B.A., Casarotto S., Tononi G., "Cortical reactivity and effective connectivity during REM sleep in humans. *Cogn.*" *Neurosci* 1, 2010.
- Massimini M., Ferrarelli F., Sarasso S., Tononi G., "Cortical mechanisms of loss of consciousness: insight from TMS/EEG studies." *Arch. Ital. Biol.* 150, 2012.
- Mattout J., Phillips C., Penny W. D., Rugg M. D. and Friston K. J., "MEG source localization under multiple constraints: an extended Bayesian framework." *NeuroImage*, 2006.
- Mosher J. C., Leahy R.M. and Lewis P.S., "EEG and MEG: forward solutions for inverse methods." *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, 1999.
- Nunez P.L. and Silberstein R.B., "On the relationship of synaptic activity to macroscopic measurements: does co-registration of EEG with fMRI make sense?" *Brain Topogr.* 13, 2000.
- Ilmoniemi R.J. and Kicic´ D., "Methodology for Combined TMS and EEG." *Brain Topogr.*, 2010
- Rogasch N. C. and Fitzgerald P.B., "Assessing Cortical Network Properties Using TMS–EEG." *Human Brain Mapping*, 2012.
- Rosanova M., Casali A.G., Bellina V., Resta F., Mariotti M., Massimini M., "Natural Frequencies of Human Corticothalamic Circuits." *Neurosci.* 29, 2009.
- Rosanova M., Gosseries O., Casarotto S., Boly M., Casali A.G., Bruno M.-A., Mariotti M., Boveroux P., Tononi G., Laureys S., Massimini M., "Recovery of cortical effective connectivity and recovery of consciousness in vegetative patients." *Brain J. Neurol.* 135, 2012.
- Sarasso S., Rosanova M., Casali A.G., Casarotto S., Fecchio M., Boly M., Gosseries O., Tononi G., Laureys S., Massimini M., "Quantifying cortical EEG responses to TMS in (un) consciousness. *Clin. EEG*" *Neurosci.* 45, 2014a.

- Sarasso S., Rosanova M., Casali A.G., Casarotto S., Fedchio M., Boly M., Gosseries O., Tononi G., Laureys S., Massimini M., “*Quantifying cortical EEG responses to TMS in (un)consciousness. Clin. EEG” Neurosci. 45, 2014b.*
- Tanaka N., Hämäläinen M.S., Ahlfors S. P., Liu H., Madsen J. R., Bourgeois B. F., Lee J. W., Dworetzky B. A., Belliveau J. W., Stufflebeam S. M., “*Propagation of epileptic spikes reconstructed from spatiotemporal magnetoencephalographic and electroencephalographic source analysis.*” *NeuroImage 50, 2010.*
- Tikhonov A.N. and Arsenin V.Y., “*Solutions of ill-posed problems.*” *Washington: Winston, 1977.*
- Tononi, G. “*An Information Integration Theory of Consciousness.*” *BMC Neurosci. 5, 2004.*
- Tononi G., Massimini M., “*Why does consciousness fade in early sleep?*” *Inter Science 1129, 2008.*
- Tononi G., Sporns O., *Measuring information integration. BMC Neurosci. 4, 31, 2003.*
- Wagner T., Valero-Cabre A., Pascual-Leone A., “*Noninvasive brain stimulation.*” *Anu Rev Biomed Eng, 2007.*
- Zang Z., “*A fast method to compute surface potentials generated by dipoles within multilayer anisotropic spheres.*” *Phys. Med. Biol. 40, 1995.*