

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

CAMPUS DI CESENA

DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'ENERGIA ELETTRICA E

DELL'INFORMAZIONE "GUGLIELMO MARCONI"

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

La spettroscopia funzionale nel vicino infrarosso: principi fisici e applicazioni

Elaborato in

Strumentazione Biomedica

Relatore

Prof.ssa Elisa Magosso

Presentato da

Roberto Ramaglia Amadasi

Anno Accademico 2018/2019

PAROLE CHIAVE

Functional Near-Infrared Spectroscopy

Neuroimaging funzionale

Accoppiamento neurovascolare

Legge di Beer-Lambert modificata

Neonati pretermine

Ictus

INDICE

INTRODUZIONE	7
CAPITOLO 1 - LA SPETTROSCOPIA FUNZIONALE NEL VICINO INFRAROSSO (fNIRS)	9
1.1 Le basi della fNIRS	9
1.2 Componenti del segnale	12
1.3 I principi fisici della NIRS: la legge di Beer-Lambert modificata.....	15
1.4 Classificazione delle tecniche fNIRS	20
1.5 Strumentazione.....	23
1.5.1 Generalità.....	23
1.5.2 Sorgenti luminose	27
1.5.3 Fotorilevatori	29
CAPITOLO 2 - CONFRONTO TRA LA fNIRS E ALTRE TECNICHE DI IMAGING	31
2.1 Principali tecniche di imaging.....	31
2.1.1 La fMRI.....	32
2.1.2 La PET.....	34
2.1.3 La MEG	36
2.1.4 EEG.....	38
2.2 Vantaggi e svantaggi della fNIRS	41
CAPITOLO 3 - L'USO DELLA SPETTROSCOPIA FUNZIONALE NEL VICINO INFRAROSSO IN AMBITO NEONATALE	47
3.1 Lo sviluppo delle applicazioni fNIRS sui neonati.....	47
3.2 Strumentazione e metodi	48
3.2.1 Il copricapo	48
3.2.2 L'influenza dell'area corticale di interesse.....	50
3.2.3 Progettazione dello studio ed elaborazione del segnale NIRS	52
3.3 La fNIRS nello studio della funzione motoria e cognitiva nei neonati pretermine.....	56

3.3.1 I neonati pretermine	56
3.3.2 Le prestazioni motorie	57
3.3.3 La percezione del linguaggio	58
3.3.4 Il riconoscimento del volto	59
3.3.5 Conclusioni degli esperimenti	60

CAPITOLO 4 - L'USO DELLA fNIRS DURANTE IL CAMMINO IN PAZIENTI NEUROLOGICI

CAPITOLO 4 - L'USO DELLA fNIRS DURANTE IL CAMMINO IN PAZIENTI NEUROLOGICI	63
4.1 Lo sviluppo della fNIRS negli studi del cammino	63
4.2 Studio dell'attivazione corticale durante il cammino single-task e dual-task in pazienti post-ictus.	65
4.2.1 Introduzione allo studio	65
4.2.2 Esperimento 1: fNIRS durante il cammino reale.....	67
4.2.1.1 Procedura sperimentale.....	67
4.2.1.2 Acquisizione dei dati	68
4.2.1.3 Elaborazione dati	69
4.2.1.4 Risultati.....	69
4.2.2 Esperimento 2: fMRI e fNIRS durante il cammino simulato.....	71
4.2.2.1 Procedura sperimentale.....	71
4.2.2.2 Acquisizione ed elaborazione dei dati	72
4.2.2.3 Risultati della fMRI	72
4.2.2.4 Risultati della fNIRS.....	73
4.2.3 Discussione dello studio	74

CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE.....

BIBLIOGRAFIA.....

SITOGRAFIA PER IMMAGINI

INTRODUZIONE

Il lavoro di ricerca svolto ha l'obiettivo di illustrare la spettroscopia funzionale nel vicino infrarosso (functional Near-Infrared Spectroscopy). Si tratta di una innovativa tecnica di neuroimaging funzionale sulla quale si intende fornire una panoramica in merito ai principi di funzionamento e ai suoi recenti sviluppi, che stanno consentendo l'estensione delle applicazioni di neuroimaging funzionale a soggetti e condizioni difficilmente investigabili mediante le altre tecniche di neuroimaging.

Il neuroimaging funzionale, è l'insieme di strumenti tecnologici e procedure sperimentali che permettono di rilevare e mappare l'attività cerebrale.

Negli ultimi decenni le conoscenze sul cervello umano sono progredite in modo straordinario grazie all'utilizzo di metodologie come risonanza magnetica funzionale (fMRI), magnetoencefalografia (MEG), elettroencefalografia (EEG) e tomografia a emissione di positroni (PET). Tuttavia, le tradizionali tecniche di neuroimaging pongono forti limiti all'indagine di numerosi studi funzionali; in particolare, la bassa tolleranza al movimento corporeo costituisce la principale causa che impedisce indagini dell'attività cerebrale associata a compiti motori o interazioni sociali. Inoltre, le complesse procedure d'indagine e l'impiego esclusivo in ambiente ospedaliero, hanno incrementato l'esigenza di superare queste limitazioni attraverso lo sviluppo di nuove tecniche di neuroimaging.

La functional Near-Infrared Spectroscopy (fNIRS) è una tecnica innovativa che, mediante l'utilizzo della luce a specifiche lunghezze d'onda appartenenti alla regione del vicino infrarosso consente di misurare in maniera non invasiva l'attività emodinamica del tessuto cerebrale e gli aspetti funzionali ad essa associata, misurando le variazioni di concentrazione dell'ossiemoglobina e della de ossiemoglobina. I sistemi fNIRS permettono di condurre studi in contesti naturali e socialmente interattivi della vita quotidiana grazie alla compattezza della strumentazione, costi contenuti e alla trasportabilità. La registrazione fNIRS viene effettuata attraverso un dispositivo indossabile (copicapo) posizionato sullo scalpo del paziente che include coppie sorgente-rilevatore e che non impone vincoli fisici al partecipante, risultando, quindi, libero di eseguire movimenti o compiti motori. La sicurezza d'uso e soprattutto la tollerabilità ai movimenti, hanno reso questa tecnica di neuroimaging funzionale applicabile a tutti i pazienti e, inoltre può essere impiegata in una vasta gamma di applicazioni.

La fNIRS permette di effettuare studi/indagini specifici in ambiti difficilmente investigabili in modo adeguato mediante altre modalità di imaging cerebrale quali l'ambito del neurosviluppo e delle attività motorie. Attualmente è utilizzata come strumento di ricerca e monitoraggio

dell'emodinamica corticale, tuttavia ha mostrato di poter essere una potenziale tecnica di supporto alla neuroriabilitazione permettendo di controllare in modo continuo i progressi motori e cognitivi dei pazienti.

L'elaborato è stato strutturato in quattro capitoli:

Capitolo 1 – Nel primo capitolo si fornisce una descrizione della spettroscopia funzionale nel vicino infrarosso; vengono presentate le basi neurofisiologiche del segnale NIRS, seguite da una spiegazione dei principi fisici, delle metodologie e dei componenti che costituiscono la strumentazione fNIRS.

Capitolo 2 – Nel secondo capitolo sono state presentate le tradizionali tecniche di neuroimaging; effettuando un confronto con le caratteristiche della fNIRS al fine di evidenziarne limiti, e in particolare i vantaggi che ne hanno permesso un crescente impiego.

Capitolo 3 – Nel terzo capitolo vengono illustrate le procedure sperimentali degli studi fNIRS in ambito neonatale, con particolare attenzione agli aspetti metodologici e strumentali. Vengono, inoltre, presentati i risultati di studi effettuati su neonati pretermine che hanno l'obiettivo di comprenderne lo sviluppo cerebrale e valutarne le prestazioni motorie e cognitive che la nascita pretermine può compromettere.

Capitolo 4 – Il quarto capitolo, infine, verte sulla descrizione dell'uso della fNIRS durante il cammino in pazienti neurologici; in particolare vengono riportati i risultati di uno studio riguardante il cammino reale e simulato in pazienti post-ictus (confrontandolo con soggetti sani) in condizioni di Single Task e di Dual Task (esecuzione del cammino in contemporanea allo svolgimento di un altro compito).

Infine le Conclusioni commentano i principali risultati degli studi esaminati e delineano limiti attuali della tecnica e prospettive future.

CAPITOLO 1

LA SPETTROSCOPIA FUNZIONALE NEL VICINO INFRAROSSO (fNIRS)

1.1 Le basi della fNIRS

La luce è stata utilizzata per indagare grandezze fisiologiche nei tessuti umani già nell'Ottocento ma solo nel 1977 nel lavoro di Jöbsis "Noninvasive, infrared monitoring of cerebral and myocardial oxygen sufficiency and circulatory parameters" (Science 198, 1977) si dimostrò per la prima volta la possibilità di monitorare l'ossigenazione tissutale in modo continuo e non invasivo utilizzando la spettroscopia nel vicino infrarosso (Near-Infrared Spectroscopy, NIRS). A seguito di studi che svilupparono questa tecnologia e sulla base del principio dell'accoppiamento neuro-vascolare, nei primi anni Novanta è nata la spettroscopia funzionale nel vicino infrarosso (functional Near-Infrared Spectroscopy, fNIRS) una tecnica di neuroimaging che utilizza la luce a specifiche lunghezze d'onda appartenenti alla regione del vicino infrarosso per misurare in maniera non invasiva l'attività emodinamica del tessuto cerebrale [1,2].

La fNIRS consente la determinazione di concentrazioni particolari composti pigmentati, detti cromofori, sfruttando la trasparenza dei tessuti biologici nella regione spettrale del vicino infrarosso (NIR) di lunghezza d'onda di 700-900 nm anche conosciuta come 'finestra ottica' [3,4].

Il sistema fNIRS è costituito da due componenti principali che vengono posizionati sullo scalpo del soggetto: una sorgente di luce, come un diodo laser (LD) o un diodo a emissione di luce (LED) e un fotorilevatore. Il funzionamento consiste nell'emissione, da parte della sorgente, di luce nella regione NIR la quale si propaga attraverso il tessuto biologico; la porzione di radiazione che non viene assorbita è in parte registrata dal fotorilevatore che acquisisce il segnale [1,4]. La propagazione della luce all'interno del tessuto biologico dipende dai fenomeni di assorbimento e scattering. Quest'ultimo, alle lunghezze d'onda in uso nella fNIRS, risulta essere circa cento volte più probabile dell'assorbimento e conseguentemente permette l'attraversamento dei fotoni nel tessuto cerebrale.

Le misurazioni NIRS sono ottenute tramite una o più coppie sorgente-rilevatore posizionate secondo una specifica disposizione angolare sullo stesso lato della testa (Fig.1), le quali forniscono solo informazioni regionali relative al volume del tessuto cerebrale compreso tra i due dispositivi.

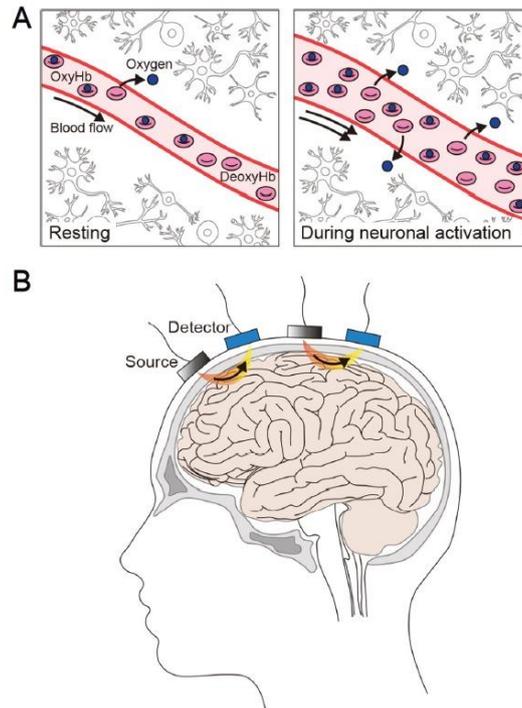


Figura 1. Imaging fNIRS delle regioni corticali nell'uomo.

(A) fNIRS utilizza la luce nel vicino infrarosso per misurare i cambiamenti relativi dell'emoglobina ossigenata (Oxy-Hb) e deossigenata (Deoxy-Hb) in una regione del cervello al basale ("Riposo") e durante l'attivazione neuronale. Oxy-Hb e deoxy-Hb sono i principali cromofori che assorbono la luce del vicino infrarosso e presentano spettri di assorbimento distinti.

(B) La superficie della testa viene irradiata mediante luce a specifiche lunghezze d'onda appartenenti alla regione del vicino infrarosso generata dalla sorgente luminosa ("Source"). I fotoni che ritornano sulla superficie della testa dopo aver percorso un profilo a forma di banana (in arancione e giallo) nei tessuti vengono catturati dal fotorilevatore ("Detector") posto sul cuoio capelluto [1].

La diffusione della luce mostra all'interno dei tessuti della testa (cuoio capelluto, cranio e spazio subaracnoideo riempito di liquido cerebrospinale) un percorso con profilo a forma di banana per ciascuna coppia sorgente-rilevatore (Fig.1B). L'andamento, due estremità strette e una curva verso l'interno al centro, è dovuto alla diversità dei tessuti. La distorsione che si determina non risulta essere tale da compromettere la capacità di indagine della corteccia cerebrale [4]. Il volume indagato in questo profilo è direttamente proporzionale alla distanza tra la sorgente luminosa e il fotorilevatore, maggiore è la distanza e maggiore sarà la profondità di penetrazione dei fotoni. Nelle misurazioni fNIRS è raccomandabile che lo spazio tra gli elettrodi sia superiore a 2,5-3cm. in quanto, la capacità di penetrazione della luce, è pari alla metà della distanza tra gli elettrodi. Valori inferiori causerebbero un contributo maggiore dei tessuti superficiali extracerebrali, la cui rilevazione, costituisce una componente di disturbo nell'indagine dei segnali cerebrali. Altri fattori che influiscono negli studi delle aree profonde sono: la lunghezza d'onda, le proprietà ottiche delle strutture cerebrali e l'intensità della luce. In generale, maggiore è l'intensità della luce e/o la distanza sorgente rilevatore e più elevata sarà la profondità di indagine. Tuttavia, vi sono vincoli a

questi parametri, in quanto l'intensità della radiazione emessa deve essere mantenuta molto più bassa del limite di sicurezza in modo da evitare danni alla pelle causati dal calore associato. Inoltre, la distanza tra sorgente e rilevatore, deve essere tale da poter trasmettere e ricevere il segnale in maniera efficiente. Pertanto, a causa di queste limitazioni, la profondità di imaging negli adulti è limitata alla superficie della corteccia cerebrale (circa 2cm) [1,2].

L'acquisizione del segnale tramite la spettroscopia nel vicino infrarosso si basa sullo studio dell'assorbimento della radiazione da parte di specifici cromofori correlati al trasporto di ossigeno. Il tessuto biologico presenta numerosi composti assorbenti (Fig.2A) come l'acqua, che presentando un coefficiente di assorbimento elevato a certe lunghezze d'onda, può essere responsabile dell'assorbimento della radiazione e di conseguenza invalidare le misurazioni. L'utilizzo della regione NIR consente di evitare questi fenomeni poiché all'interno di questa banda spettrale i principali assorbitori sono l'ossiemoglobina (O_2Hb) e la deossiemoglobina (HHb), (Fig.2B). La valutazione dell'attività cerebrale avviene determinando l'assorbimento della luce a due differenti lunghezze d'onda (λ), una più sensibile all'ossiemoglobina ($\lambda > 800$ nm) e l'altra alla deossiemoglobina ($\lambda < 800$ nm). Il segnale acquisito mostra la stima della concentrazione dei due cromofori che vengono utilizzate per ottenere una misura non invasiva dell'ossigenazione e dell'emodinamica tissutale [1,5].

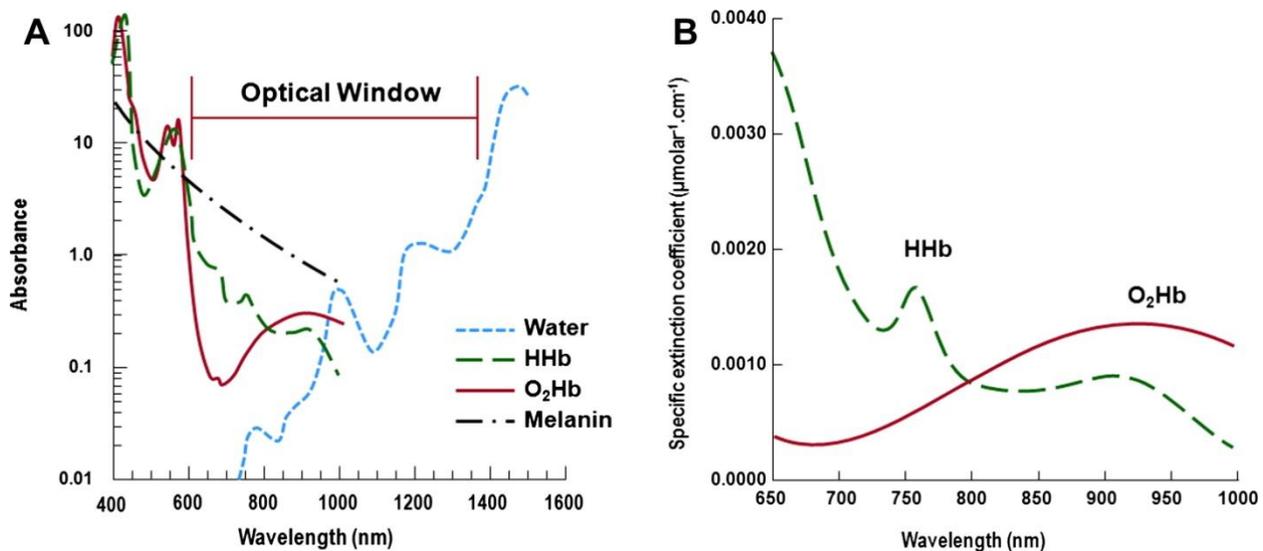


Figura 2.

- (A) Spettri di assorbimento della luce di diversi assorbitori nel tessuto.
 (B) Spettri di assorbimento di deossimioglobina (HHb) e ossiemoglobina (O_2Hb) [2].

1.2 Componenti del segnale

La fNIRS basa i suoi principi sulla spettroscopia ottica e sulla teoria dell'accoppiamento neuro-vascolare. Un incremento nell'attività neuronale determina un aumento nel metabolismo di ossigeno, necessario per soddisfare le maggiori esigenze energetiche. Questo processo, per l'aumentato metabolismo cellulare, porta ad una diminuzione della concentrazione di O₂Hb e ad un conseguente aumento di HHb. In questo modo, l'attivazione neuronale determina cambiamenti nell'emodinamica cerebrale in quanto il flusso sanguigno si indirizzerà verso le regioni cerebrali attive (accoppiamento neuro-vascolare) per rifornirle di ossigeno. I cambiamenti emodinamici porteranno in queste aree cerebrali un incremento della concentrazione di O₂Hb e a una diminuzione della concentrazione di HHb come conseguenza del fatto che l'apporto locale di ossigeno risulta maggiore della quantità che viene consumata (Fig.3b) [6]. La disposizione sorgente-rilevatore introduce inevitabilmente una contaminazione da componenti di origine extracerebrale sia per 'canali a separazione breve' che per 'canali a separazione lunga' con differenti contributi dipendenti dalla profondità di indagine (Fig.3a).

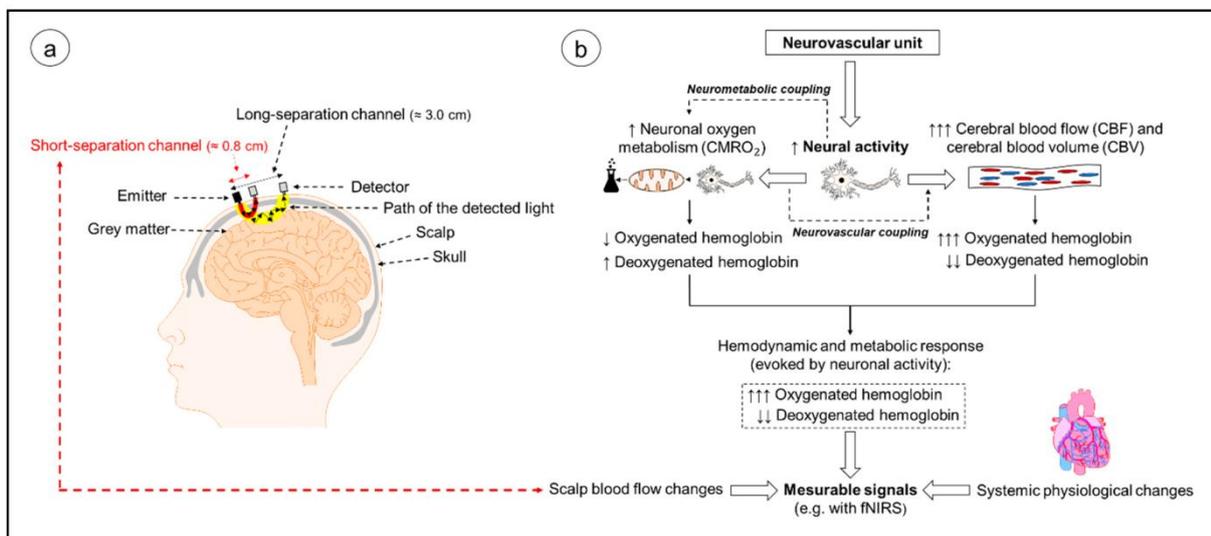


Figura 3.

- (a) Possibile monitoraggio NIRS con 'canali a separazione breve' e 'canali a separazione lunga'.
 (b) Illustrazione schematica dell'unità neuro-vascolare con cambiamenti emodinamici indotti dall'attività neurale [6].

Il segnale registrato da fNIRS risulta essere composto sia da componenti originate da attività cerebrali (segnale utile) che da fenomeni non associabili all'attività cerebrale funzionale (disturbi). Pertanto, durante la misurazione delle concentrazioni di cromofori, è necessario estrapolare la composizione del segnale in base alla combinazione di eventi evocati o spontanei, dovuti all'accoppiamento neuro-vascolare o processi fisiologici sistemici. Gli studi condotti con fNIRS hanno stabilito che il segnale acquisito durante la misurazione è classificata sulla base di tre aspetti; l'origine del segnale (intracerebrale o extracerebrale), la tipologia dello stimolo (evocato o non evocato) e la causa di attivazione (neuronale o sistemica). A seguito di queste considerazioni sono distinguibili sei componenti del segnale misurato (Tab.1).

	Evocato		Non-evocato	
	Neuronale	Sistemica	Neuronale	Sistemica
Cerebrale	SC1. Attività cerebrale funzionale (accoppiamento neuro-vascolare)	SC2. Attività sistemica di tipo 1 (variazioni della pressione sanguigna, PaCO ₂ , flusso/volume sanguigno cerebrale)	SC4. Attività cerebrale spontanea (accoppiamento neuro-vascolare)	SC5. Attività sistemica di tipo 3 (frequenza cardiaca, respirazione, onde di Mayer, oscillazioni a frequenze molto basse)
Extracerebrale		SC3. Attività sistemica di tipo 2 (variazione della pressione sanguigna, flusso/volume sanguigno cutaneo)		SC6. Attività sistemica di tipo 4 (frequenza cardiaca, respirazione, onde di Mayer, oscillazioni a frequenze molto basse)

Tabella 1: Classificazione dei sei componenti del segnale: SC1, SC2, SC3, SC4, SC5 e SC6 [7].

La componente del segnale registrato da fNIRS originato dall'accoppiamento neuro-vascolare per un evento evocato (SC1) è di rilevanza fondamentale poiché direttamente correlato all'attività funzionale, cioè è direttamente legata alla risposta emodinamica evocata dallo stimolo/task. Per evidenziare questo aspetto si preferisce definirla risposta emodinamica neuronale, distinguendola dalla risposta emodinamica sistemica (si veda anche oltre). SC1 presenta però cambiamenti di concentrazione piccole dei cromofori d'interesse, circa 0,5 μM per O₂Hb e 0,2 μM per HHb, rispetto alla variabilità complessiva dei segnali fNIRS (circa 1 μM sia per la concentrazione di O₂Hb che di HHb).

Durante la misurazione di fNIRS l'attivazione di una regione cerebrale può avvenire anche spontaneamente. Il componente che viene originato (SC4), viene spesso utilizzato con lo scopo di valutare indirettamente lo stato del cervello quando non è sottoposto ad alcuno stimolo.

L'attività sistemica cerebrale ed extracerebrale determina le componenti SC2, SC3, SC5 e SC6. La tecnologia di fNIRS è molto sensibile alla geometria del compartimento extracerebrale: strutture come cuoio capelluto, tessuto sottocutaneo, tessuto connettivo, cranio, liquido cerebrospinale (CSF) sono da considerarsi fonte di disturbo che altera le misurazioni del tessuto cerebrale. È stato dimostrato che, utilizzando un rilevatore e una singola sorgente ad una distanza di 3cm, l'intensità della radiazione è circa dieci-venti volte più sensibile al compartimento extracerebrale rispetto a quello cerebrale. In seguito a questo studio si è riscontrato che la quantità maggiore di energia veniva assorbita dalle altre strutture extracerebrali, cuoio capelluto (76%), cranio (20%), CSF (0,4%), mentre solo in piccola parte dalla materia grigia (3%) e dalla materia bianca (0,0005%). Da sottolineare come le considerazioni sopra scritte siano riscontrabili solo nel caso di una sorgente e un rilevatore posti a distanza di 3cm, infatti, le attuali tecniche di imaging consentono una notevole riduzione dei disturbi dei tessuti superficiali.

In particolare, a seconda del tipo di stimolo/task e del tipo di compartimento, le seguenti componenti sistemiche nel segnale fNIRS possono essere distinte

- I segnali SC2 ed SC3 sono originati rispettivamente da attività sistemica evocata, cerebrale ed extracerebrale. È noto che uno dei parametri più forti che modificano il flusso sanguigno cerebrale (CBF) e il volume di sangue cerebrale (CVB) è la pressione parziale dell'anidride carbonica (PaCO_2) nel compartimento arterioso. I cambiamenti di PaCO_2 si evidenziano nella variazione delle dimensioni dei vasi sanguigni, un aumento determina l'innalzamento in entrambi i compartimenti, con maggior rilevanza dell'aumento del CBF rispetto all'incremento trascurabile che avviene a livello del cuoio capelluto. Le variazioni di PaCO_2 sono imputabili alla durata dello stimolo e la tipo di compito assegnato al soggetto, che può influenzare il segnale in maniera più o meno evidente. Anche la variazione della pressione sanguigna risulta essere motivo di contaminazione del segnale, essa cambia principalmente quando vengono sottoposti all'individuo stimoli emotivi o compiti che prevedono il movimento. Un'altra origine della componente sistemica può essere determinata dal sistema nervoso autonomo che agisce sia sulla vascolarizzazione cerebrale che negli strati extracerebrali (rossore della pelle sul volto).
- Le componenti del segnale dovute ad attività sistemica non evocata dallo stimolo/task, cerebrale ed extracerebrale, sono rispettivamente SC5 e SC6. Le cause che portano alla variazione dell'emodinamica tissutale che non sono imputabili allo stimolo/task sono numerose, per la maggior parte però sono riconducibili ad oscillazioni emodinamiche

spontanee come il battito cardiaco (~ 1 Hz), la respirazione (~ 0,3 Hz), oscillazioni a bassa frequenza (onde di Mayer ~ 0,1 Hz) ed a frequenza ancora minori (< 0,1 Hz). Le oscillazioni emodinamiche spontanee sono state ampiamente dimostrate essere prodotte dalla componente sistemica, tuttavia, si sono trovate anche correlazioni con l'attività cerebrale. È stata scoperta anche una dipendenza tra le oscillazioni a bassa frequenza e l'attività del soggetto (compito o riposo), fase del sonno, postura, età. Pertanto, sebbene siano manifestazioni non evocate, è possibile modularle a seconda del tipo di studio condotto, di conseguenza, anche possono far parte e contribuire alle componenti SC2 ed SC3 del segnale acquisito [6].

1.3 I principi fisici della NIRS: la legge di Beer-Lambert modificata.

Gli aspetti matematici relativi alla precedente descrizione quantitativa possono essere così illustrati. La propagazione della luce all'interno dei tessuti biologici dipende dai fenomeni di scattering e assorbimento. Quest'ultimo in particolare è dipendente dai cromofori presenti, ognuno dei quali presenta uno spettro di assorbimento differente in cui il coefficiente di estinzione specifico è espresso in funzione della lunghezza d'onda. Tramite la legge di Beer-Lambert (1) è possibile identificare un rapporto direttamente proporzionale tra l'assorbanza (anche chiamata densità ottica) e la concentrazione dei cromofori a uno specifico valore di lunghezza d'onda.

$$A(\lambda) = -\ln \frac{I}{I_0} = \alpha(\lambda) \cdot c \cdot d \quad (1)$$

I simboli (1):

- A* assorbanza (anche detta densità ottica, OD);
- I* intensità della luce trasmessa;
- I₀* intensità della luce incidente;
- α* coefficiente di assorbimento del cromoforo ($\mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$);
- c* concentrazione del cromoforo (μM);
- d* cammino ottico (lunghezza percorsa dalla luce nel tessuto, cm), nel nostro caso la distanza sorgente-rilevatore.

Si noti che l'equazione (1) può essere riscritta sostituendo al logaritmo naturale il logaritmo in base 10 e ricordando la regola per la modifica della base dei logaritmi, ovvero $\log_{10} x = \frac{\ln x}{\ln 10}$ da cui $\ln x = \log_{10} x \cdot \ln 10$. Quindi la (1) può essere riscritta come segue

$$A(\lambda) = -\log_{10} \frac{I}{I_0} \cdot \ln 10 = \alpha(\lambda) \cdot c \cdot d \Rightarrow -\log_{10} \frac{I}{I_0} = \underbrace{\frac{\alpha(\lambda)}{\ln 10}}_{\varepsilon(\lambda)} \cdot c \cdot d$$

Indicando ancora con $A(\lambda)$ la quantità $-\log_{10} \frac{I}{I_0}$, possiamo scrivere

$$A(\lambda) = -\log_{10} \frac{I}{I_0} = \varepsilon(\lambda) \cdot c \cdot d \quad (1')$$

dove $\varepsilon(\lambda) = \frac{\alpha(\lambda)}{\ln 10}$ prende il nome di coefficiente di estinzione molare [7] espresso in $\mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ che differisce da $\alpha(\lambda)$ per un fattore di scala.

L'assorbanza complessiva della luce emessa per le misurazioni NIRS è determinata prendendo in considerazione che nel tessuto ad una specifica lunghezza d'onda vi sono più cromofori assorbenti come, per esempio, acqua, lipidi, melanina, mioglobina, citocromo ossidasi, ossiemoglobina (O_2Hb) e deossiemoglobina (HHb). Pertanto, è corretto considerare la somma lineare dei contributi di ciascuno di essi (2).

$$A(\lambda) = -\log_{10} \frac{I}{I_0} = [\varepsilon_1(\lambda) \cdot c_1 + \varepsilon_2(\lambda) \cdot c_2 + \dots + \varepsilon_n(\lambda) \cdot c_n] \cdot d = \sum_{i=1}^n \varepsilon_i(\lambda) \cdot c_i \cdot d \quad (2)$$

L'assorbanza della luce determinata dalla legge di Beer-Lambert non può però essere applicata ai sistemi fNIRS poiché non vengono tenuti in considerazione gli eventi di scattering presenti nei tessuti biologici [2]. Lo scattering è la deviazione del fascio di luce dalla traiettoria in linea retta in conseguenza della presenza di particelle nel campione. A seconda della dimensione e dell'indice di rifrazione delle particelle, nonché della lunghezza d'onda, la direzione di propagazione dei fotoni viene modificata; ciò fa sì che la lunghezza del percorso seguito dai fotoni aumenti. I fotoni emessi dalla sorgente luminosa si propagano nei differenti strati di tessuto seguendo traiettorie molto diverse tra loro nel tragitto tra l'emettitore e il rilevatore (Fig.4, schema a sinistra). Si noti che i due colori diversi (rosso e giallo) in figura si riferiscono al fatto che le misurazioni sono basate su due differenti lunghezze d'onda si utilizzano valori maggiori di 800nm per il rilevamento della concentrazione di O_2Hb (traiettorie rosse, Fig4) mentre valori inferiori a 800nm per la stima di HHb (traiettorie gialle, Fig4) in accordo con gli spettri di assorbimento dei due cromofori (Fig.2B).

Parte della radiazione emessa viene assorbita dai tessuti (fotoni 1 e 2) mentre gli altri fotoni sono soggetti al fenomeno di scattering che causa la deviazione delle traiettorie iniziali con conseguente aumento della distanza percorsa. A seguito di questo meccanismo i fotoni possono essere rilevati

(fotoni 3) oppure disperdersi all'interno del tessuto per scattering in avanti (fotoni 5) o indietro (fotoni 6) causando la perdita di informazioni [6].

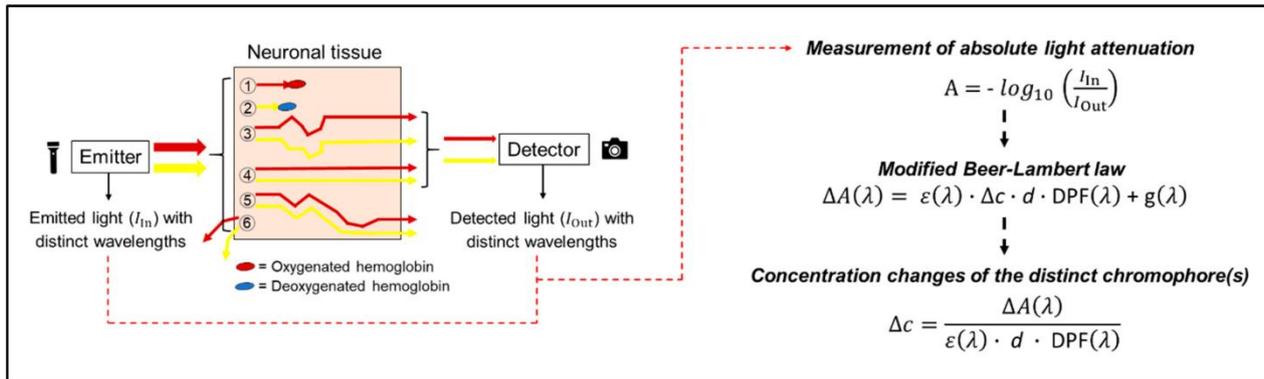


Figura 4. Illustrazione schematica della propagazione della luce attraverso il tessuto neuronale.

Sul lato sinistro dell'illustrazione, sono rappresentati i possibili percorsi dei fotoni per diverse lunghezze d'onda, il colore rosso rappresenta lunghezze d'onda di $\lambda > 800$ nm (principalmente assorbite da oxyHb), mentre il colore giallo rappresenta lunghezze d'onda di $\lambda < 800$ nm (principalmente assorbite da deoxyHb).

Nella parte destra dell'illustrazione sono mostrate le formule per calcolare le variazioni di concentrazione dei cromofori (basate su NIRS ad onda continua). I_{in} : intensità della luce emessa; I_{out} : intensità della luce registrata; $\varepsilon(\lambda)$: il coefficiente di estinzione del cromoforo ad una certa lunghezza d'onda (λ); Δc : variazioni della concentrazione di cromoforo; d : separazione (distanza) tra sorgente e rivelatore; $DPF(\lambda)$: fattore di lunghezza del percorso differenziale per una certa lunghezza d'onda (λ); $g(\lambda)$: scattering ad una certa lunghezza d'onda (λ) [6].

Approssimativamente l'attenuazione totale della luce è determinata dall'80% del fenomeno dello scattering ed il restante 20% dell'assorbimento; pertanto, lo scattering è un aspetto importante da considerare quando si eseguono misure quantitative con la NIRS. Inoltre, è importante sottolineare che a causa dello scattering i fotoni percorrono una distanza media che è assai maggiore della distanza geometrica (d), che è stata definita lunghezza del percorso differenziale (Differential Pathlength, DP). Il fattore di scala che lega d a DP viene chiamato fattore di lunghezza del percorso differenziale (DPF, Differential Pathlength Factor). Pertanto, il calcolo delle variazioni delle concentrazioni di ossiemoglobina e deossiemoglobina viene effettuato tramite l'utilizzo della legge di Beer-Lambert modificata (Fig.4, lato destro) [2,6].

La MBLL (modified Beer-Lambert Law,) è un'estensione della legge di Beer-Lambert che introduce un parametro (G) che tiene conto della perdita dell'intensità dei fotoni a causa dei fenomeni di scattering e tiene conto anche della variazione della lunghezza del percorso dei fotoni per effetto dello scattering. Pertanto, l'equazione (2), si modifica come segue.

$$A(\lambda) = -\log_{10} \left(\frac{I(\lambda)}{I_0(\lambda)} \right) = \sum_i \varepsilon_i(\lambda) \cdot c_i \cdot DPF(\lambda) \cdot d + G(\lambda) \quad (3)$$

Simboli (3)

- A* assorbanza;
I intensità della luce trasmessa;
I₀ intensità della luce incidente;
c concentrazione del cromoforo;
 ε coefficiente di estinzione molare;
DPF fattore di lunghezza del percorso differenziale;
d distanza sorgente-rilevatore;
G perdita intensità della luce dovuta a scattering (adimensionale).

L'indice *i* è usato per indicare tutti i cromofori investigati, tipicamente O₂Hb e HHb . Si noti inoltre che nella (3) si assume che *G* abbia lo stesso valore per tutti i cromofori nel mezzo. L'equazione (3) può essere riscritta mettendo in evidenza anche la variabile indipendente del tempo, cioè riferendosi alla misura in un determinato istante di tempo ovvero

$$A(t, \lambda) = -\log_{10} \left(\frac{I(t, \lambda)}{I_0(\lambda)} \right) = \sum_i \varepsilon_i(\lambda) \cdot c_i(t) \cdot DPF(\lambda) \cdot d + G(\lambda) \quad (3')$$

Si noti che il termine *G* è un parametro adimensionale sconosciuto dovuto alla conformazione geometrica e al coefficiente di scattering del tessuto in esame. Pertanto, tramite la MBLL, non può essere determinato un calcolo né dell'assorbanza né della concentrazione del cromoforo in termini assoluti. Per risolvere questo problema si suppone che la variazione di scattering sia molto inferiore alla variazione di assorbimento, così che *G* possa essere assunto tempo-invariante. Tramite questa ipotesi semplificativa, se si determina la variazione dell'assorbanza per un intervallo temporale da *t₀* a *t₁* ($\Delta A(\Delta t, \lambda) = A(t_1, \lambda) - A(t_0, \lambda)$), il termine *G* si annulla. Inoltre, assumendo costante l'intensità emessa *I₀*, e assumendo che la distanza *d* e il fattore *DPF* risultino costanti durante l'intervallo di misura che si ha:

$$\Delta A(\Delta t, \lambda) = A(t_1, \lambda) - A(t_0, \lambda) = -\log_{10} \left(\frac{I(t_1, \lambda)}{I_0(\lambda)} \right) + \log_{10} \left(\frac{I(t_0, \lambda)}{I_0(\lambda)} \right) = -\log_{10} \left(\frac{I(t_1, \lambda)}{I(t_0, \lambda)} \right) =$$

$$\sum_i \varepsilon_i(\lambda) \cdot c_i(t_1) \cdot DPF(\lambda) \cdot d + G(\lambda) - \sum_i \varepsilon_i(\lambda) \cdot c_i(t_0) \cdot DPF(\lambda) \cdot d + G(\lambda)$$

Da cui

$$\Delta A(\Delta t, \lambda) = -\log_{10} \left(\frac{I(t_1, \lambda)}{I(t_0, \lambda)} \right) = \sum_i \varepsilon_i(\lambda) \cdot \Delta c_i \cdot DPF(\lambda) \cdot d \quad (4)$$

dove il termine $\Delta c_i = c_i(t_1) - c_i(t_0)$ rappresenta la variazione temporale della concentrazione di cromoforo. La MBLL è valida solo per cambiamenti uniformi delle concentrazioni di ossiemoglobina e deossiemoglobina in tessuti omogenei. Pertanto, questa approssimazione non sarebbe valida per le misurazioni riguardanti la testa. Ciononostante l'eterogeneità dei tessuti è considerata costante e facente parte del termine G. Il fatto che i cambiamenti di concentrazione O_2Hb e HHb siano non omogenei, cioè avvengano solo nel tessuto cerebrale, e non in altri tessuti come pelle e ossa, portano ad un errore di quantificazione, cioè i cambiamenti di concentrazione di deossiemoglobina ed ossiemoglobina sono sottostimati dalla MBLL. In linea di principio questo errore potrebbe essere corretto con appropriate tecniche, tuttavia, la correzione non viene solitamente eseguita in quanto l'andamento dei risultati è corretto e una quantificazione esatta non è così rilevante nella ricerca sui meccanismi cerebrali; ovvero, in molti studi di imaging lo scopo principale è rilevare se una attivazione è presente o meno, dove si verifica e confrontare i segnali tra diverse locazioni e tra diversi paradigmi di stimolazione. La misura simultanea utilizzando due lunghezze d'onda specifiche consente di determinare la variazione di concentrazione di O_2Hb e HHb . In particolare l'eq.(4) viene valutata a due diverse lunghezze d'onda (considerando come cromofori l'ossiemoglobina e la deossiemoglobina) e si risolve il sistema costituito dalle due equazioni differenziali (Eq.5) [6].

$$\Delta A(\Delta t, \lambda_1) = \varepsilon_{HHb\lambda_1} \cdot DPF(\lambda_1) \cdot d \cdot \Delta[HHb] + \varepsilon_{O_2Hb\lambda_1} \cdot DPF(\lambda_1) \cdot d \cdot \Delta[O_2Hb]$$

$$\Delta A(\Delta t, \lambda_2) = \varepsilon_{HHb\lambda_2} \cdot DPF(\lambda_2) \cdot d \cdot \Delta[HHb] + \varepsilon_{O_2Hb\lambda_2} \cdot DPF(\lambda_2) \cdot d \cdot \Delta[O_2Hb]$$

$$\begin{bmatrix} \Delta[HHb] \\ \Delta[O_2Hb] \end{bmatrix} = (d)^{-1} \begin{bmatrix} \varepsilon_{HHb\lambda_1} & \varepsilon_{O_2Hb\lambda_1} \\ \varepsilon_{HHb\lambda_2} & \varepsilon_{O_2Hb\lambda_2} \end{bmatrix}^{-1} \begin{bmatrix} \Delta A(\Delta t, \lambda_1)/DPF(\lambda_1) \\ \Delta A(\Delta t, \lambda_2)/DPF(\lambda_2) \end{bmatrix} \quad (5)$$

Il valore del coefficiente di estinzione molare (ε) e il fattore di lunghezza del percorso differenziale (DPF) sono stati tabulati e resi disponibili per le misurazioni fNIRS. Il DPF è stato determinato e classificato in base all'età, al genere e al tessuto indagato. Un valore tipico del DPF, ottenuto da uno studio su un gruppo di cento individui di Duncan et al., 1995, ha stabilito che il valore medio per la testa in un adulto è di $6,53 \pm 0,99$. Analizzando il risultato si evidenzia una variabilità del 15% tra i soggetti che comporta un errore del 15% nella misurazione della variazione di concentrazione per il singolo individuo. Anche in questo caso sarebbe possibile agire per correggere l'errore tramite la fNIRS risolta nel tempo che permette la misura del DPF. Ma l'uso della strumentazione risolta nel tempo è complessa e costosa, e la quantificazione non è così

rilevante. Inoltre gli studi sono per lo più eseguiti su gruppi di individui e conseguentemente le stime dei parametri sono riportati in termini di medie di gruppo. [7]

1.4 Classificazione delle tecniche fNIRS

A seconda del metodo di misurazione utilizzato e al tipo di strumentazione è possibile classificare tre principali tecniche fNIRS: a onda continua (Continuous Wave, CW-fNIRS), risolta nel dominio della frequenza (Frequency Domain, FD-fNIRS) e risolta nel dominio del tempo (Time Domain, TD-fNIRS).

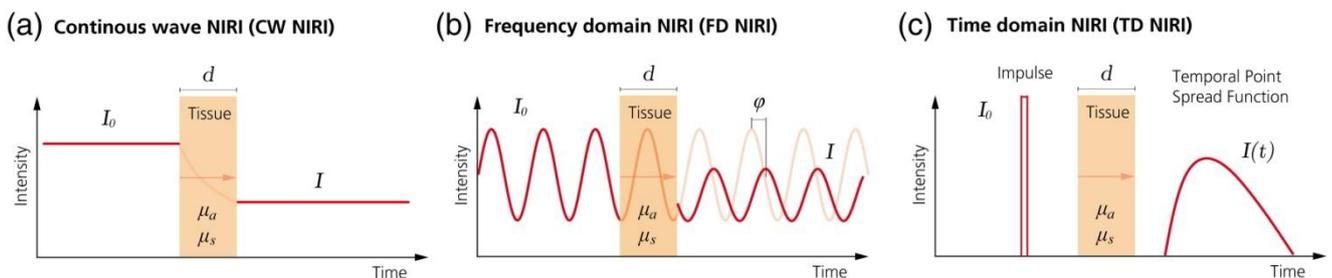


Figura 5. Illustrazione delle tre diverse tecniche NIRS (Near-Infrared Imaging; si intendono i sistemi NIRS con capacità di imaging). **(a)** La tecnologia a onda continua emette luce a intensità costante e misura solo i cambiamenti nell'intensità della luce che passa attraverso il tessuto. **(b)** La tecnologia del dominio della frequenza modula l'intensità della luce emessa e quindi misura l'intensità della luce rilevata e lo sfasamento, che corrisponde al tempo di volo. **(c)** La tecnologia del dominio del tempo emette un impulso estremamente breve di luce nel tessuto e misura i tempi di arrivo dei fotoni che emergono dal tessuto [7].

Simboli figura 5

- I_0 segnale luminoso incidente,
- I segnale luminoso trasmesso,
- d spessore del mezzo,
- μ_a coefficiente di assorbimento,
- μ_s coefficiente di scattering,
- ϕ ritardo di fase,
- $I(t)$ funzione di diffusione temporale del segnale luminoso trasmesso.

La CW fNIRS (Fig.5a) si basa sull'equazione modificata di Beer-Lambert e sfrutta l'emissione di un fascio luminoso di intensità costante nel tempo. La sorgente luminosa permette la modulazione

in ampiezza del segnale per valori di frequenza di alcuni kHz e le informazioni vengono derivate solamente dalla misurazione dei cambiamenti della luce riemergente dalla zona indagata [2,7,8]. I sistemi a onda continua al contrario delle altre tecniche fNIRS non sono in grado di determinare le proprietà ottiche dei tessuti in esame, come i coefficienti di scattering μ_s e di assorbimento μ_a , perciò non possono misurare le concentrazioni di deossiemoglobina e ossiemoglobina in maniera assoluta. CW-fNIRS consente però il calcolo delle variazioni relative delle concentrazioni dei cromofori dovuti all'attività cerebrale che, negli studi funzionali, hanno avuto una maggiore rilevanza della determinazione in termini assoluti.

La maggior parte dei sistemi attualmente disponibili utilizzano un massimo di quattro lunghezze d'onda e diodi laser a semiconduttore come sorgenti luminose. I rilevatori utilizzati sono: i tubi fotomoltiplicatori (alto guadagno e basso rumore) e fotodiodi al silicio (piccole dimensioni e alta efficienza). Affinché il valore del DPF possa risultare quasi costante in tutti i tessuti, viene consigliata una distanza tra gli elettrodi maggiore di 2,5 cm. Le altre due tecniche misurano oltre all'intensità della radiazione riflessa anche il tempo che la luce impiega nell'attraversare il tessuto, chiamato 'tempo di volo' [2,7].

La spettroscopia risolta nel dominio della frequenza (Fig.5b) permette di modulare in ampiezza una sorgente laser continua tramite sinusoidi per valori di frequenza dell'ordine delle radiofrequenze inferiori a 200MHz. Consente inoltre di determinare più misurazioni come il tempo di volo, che corrisponde allo sfasamento φ tra la luce che entra nel tessuto e la luce che esce dal tessuto, l'intensità della luce rilevata e il calcolo dei parametri dipendenti degli effetti di assorbimento e scattering delle regioni indagate. Pertanto, la tecnica risolta nel dominio della frequenza, permette di acquisire a partire dalle proprietà ottiche dei tessuti una misura assoluta delle concentrazioni dei cromofori. Il valore del DPF è calcolato attraverso l'impiego di diverse lunghezze d'onda e frequenze di modulazione (6) [2,7,8].

$$DPF = \varphi \cdot c_v / (2\pi \cdot f \cdot n_t \cdot d) \quad (6)$$

φ	sfasamento
c_v	velocità della luce nel vuoto
f	frequenza di modulazione
n_t	indice di rifrazione del tessuto (a cui si da empiricamente il valore 1,4)
d	distanza geometrica tra emettitore e rilevatore

Come la FD fNIRS anche la spettroscopia risolta nel dominio del tempo (Fig.5c) consente la misurazione del tempo di volo ma con un meccanismo differente. La sorgente (tipicamente un laser) genera impulsi luminosi estremamente brevi (decine di picosecondi) che penetrano nel tessuto e vengono registrati dall'apparato di rilevamento. Il rilevatore permette sia la misurazione dell'intensità del fotone che del ritardo temporale tra l'emissione e la ricezione degli impulsi grazie a una risoluzione temporale inferiore al nanosecondo. Il meccanismo del calcolo del ritardo prevede la divisione dell'impulso, parte di questo viene registrato direttamente con lo scopo di fungere da riferimento temporale, mentre l'altra parte penetra nel tessuto. I segnali sono misurati simultaneamente ed è nota la distanza tra emettitore e ricevitore. Pertanto, si determina la differenza tra il tempo necessario affinché il fotone entri nel tessuto e il tempo medio che la luce impiega ad attraversare il tessuto che viene usata per il calcolo del DPF (DP rappresenta il cammino ottico differenziale).

$$DPF = DP/d = c_v \cdot \langle t \rangle / (d \cdot n_t)$$

La TD fNIRS è la tecnica che in grado di acquisire la più maggior quantità di informazioni, offrendo la possibilità di determinare, tramite l'emissione di numerosi impulsi con frequenze differenti, le proprietà ottiche dei tessuti e una precisa valutazione dei coefficienti di scattering e assorbimento.

La scelta dell'utilizzo di uno di questi metodi fNIRS è valutato in relazione al tipo di studio che si vuole effettuare. I parametri che ne determinano la scelta sono, per esempio, la possibilità di discriminare l'influenza dei tessuti extracerebrali e cerebrali, la portabilità della strumentazione e i costi associati all'apparecchiatura (Tab.2). Tuttavia, gli strumenti a onda continua, risultano essere quelli che riscontrano il maggior numero di applicazioni in ambito clinico e nella ricerca. Essi presentano una risoluzione temporale maggiore e la misurazione dell'intensità della radiazione rappresenta un parametro meno rumoroso rispetto al tempo di volo, il quale, non permette la rilevazione di piccole attivazioni funzionali. Pertanto, la tecnica a onda continua risulta essere più adatta agli studi funzionali del cervello, inoltre, i costi contenuti, la possibilità di miniaturizzare la strumentazione e di realizzare sistemi indossabili e / o wireless hanno consentito di estendere i sistemi CW anche nelle normali attività quotidiane [2,7,8].

	Strumentazione basata sulle tecniche fNIRS		
Caratteristiche principali	Onda continua	Nel dominio della frequenza	Nel dominio del tempo
Frequenza di campionamento (Hz)	≤ 100	≤ 50	≤ 10
Risoluzione spaziale (cm)	≤ 1	≤ 1	≤ 1
Profondità di penetrazione (SDS di 4 cm)	Bassa	In profondità	In profondità
Discriminazione tessuto cerebrale ed extracerebrale	Non possibile	Possibile	Possibile
Possibilità di misurare strutture cerebrali profonde	Solo per neonati	Solo per neonati	Solo per neonati
Dimensione dello strumento	Grandi e piccoli	Grande	Grande
Stabilizzazione dello strumento	Non richiesta	Non richiesta	Necessaria
Trasportabilità	Alcuni facili altri fattibili	Possibile	Possibile
Costo dello strumento	Alcuni bassi altri alti	Molto alto	Molto alto
Parametri misurabili			
[O ₂ Hb], [HHb], [tHb]	Si, le variazioni	Si, valore assoluto	Si, valore assoluto
Coefficiente di dispersione e assorbimento e DPF	No	Si	Si
Saturazione del tessuto di O ₂ Hb (%)	No	Si	Si

Tabella 2. Tecniche fNIRS: caratteristiche principali e parametri misurabili. [4]

1.5 Strumentazione

1.5.1 Generalità

Nel 1992 venne scoperto che l'attivazione funzionale della corteccia cerebrale poteva essere indagata tramite spettroscopia nel vicino infrarosso; da allora la ricerca sulla mappatura cerebrale funzionale acquisì una notevole rilevanza che ha permesso un rapido progresso tecnologico della fNIRS. Dai primi sistemi utilizzati a canale singolo, con una bassa sensibilità e risoluzione temporale, si è giunti sino agli attuali sistemi multicanale ad alta risoluzione temporale e complessi sistemi di elaborazione dei dati (Fig.6). L'innovazione tecnologica è progredita nella progettazione di strumenti di imaging in due dimensioni (topografia) che hanno permesso di investigare intere aree della testa, ricostruendo l'immagine di una specifica area corticale e limitando la necessità di un posizionamento preciso dei sensori come avveniva nella strumentazione più datata. La

misurazione contemporanea di sorgenti e rilevatori disposti a distanze diverse ha consentito la nascita di tecniche tomografiche, basate sulla sovrapposizione delle misurazioni per poter ricostruire l'immagine tridimensionale [4].

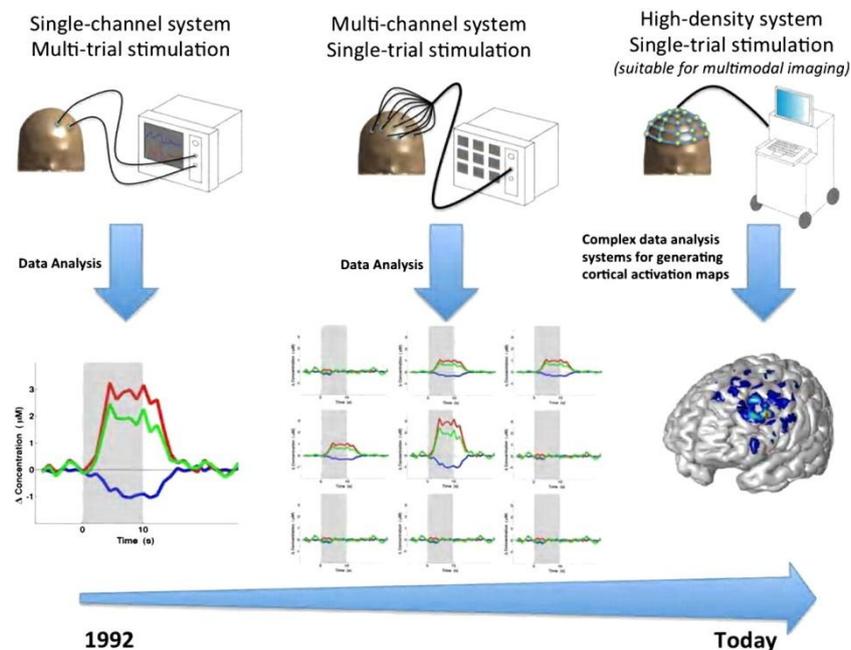


Figura 6. Sviluppo di fNIRS [4].

La maggior parte dei dispositivi disponibili sono basati sulla tecnologia ad onda continua poiché hanno caratteristiche che li rendono più idonei alle indagini funzionali. In ambito clinico la fNIRS risulta essere affidabile solo per l'analisi di un gruppo e non per i singoli individui. La causa principale è la difficoltà di determinare un unico metodo di indagine valido per tutti i pazienti; infatti, le diversità anatomiche tra le strutture cerebrali ed extracerebrali, uniche per ogni individuo, causano un differente contributo del segnale che viene acquisito. La ricerca sta sviluppando metodi per poter risolvere queste problematiche e permettere un maggior grado di affidabilità avanzando su due fronti. A livello strumentale si sta agendo nella selezione di lunghezze d'onda ottimali e nel miglioramento di emettitori e rilevatori, inoltre, per ottenere un rapporto segnale rumore elevato, diversi gruppi di ricerca stanno studiando come ottimizzare la disposizione geometrica dei sensori. A livello metodologico l'obiettivo è la diminuzione dell'influenza dei tessuti superficiali tramite algoritmi matematici al fine di garantire una maggiore affidabilità e riproducibilità nei singoli individui.

La strumentazione della fNIRS ad onda continua attualmente in commercio offre un'ampia gamma di dispositivi (Tab.3) utilizzabili in più applicazioni biomediche a seconda del tipo di studio da

effettuare. Tutti i dispositivi utilizzano un software per la determinazione dei cambiamenti dell'emodinamica tissutale e la maggior parte di essi si basano sulla MBLL per il calcolo delle variazioni relative delle concentrazioni di O₂Hb e HHb. Presentano inoltre caratteristiche comuni, come la possibilità di essere esposti alla luce ambientale senza il rischio di danneggiamento dei rilevatori, l'impiego di sensori riutilizzabili e l'emissione della radiazione luminosa con una potenza ottica massima di 5-20mW.

Ogni dispositivo è caratterizzato da un numero di canali, dove per 'canale' si intende il percorso tra un emettitore e un rilevatore per tutte le lunghezze d'onda usate. In genere il numero di canali è variabile anche per un singolo strumento poiché dipendenti dalla disposizione degli elettrodi che, in diversi dispositivi, possono essere distanziati manualmente dall'operatore. Considerando per esempio, un sistema con 16 emettitori e 32 rilevatori, il massimo numero teorico di canali, risulta essere 512; la discrepanza si evidenzia a livello pratico perché i rilevatori non hanno la capacità di acquisire il segnale luminoso quando la luce è prodotta da un emettitore distante. Pertanto, a causa dei vincoli spaziali, la disposizione degli elettrodi permette l'uso reale di 50-200 canali.

A caratterizzare uno strumento è principalmente il numero e il tipo di emettitori e rilevatori ma non solo; vi sono altri fattori che ne permettono una classificazione come il massimo valore della risoluzione temporale (Hz). In questo caso possono essere riportati due valori: il minimo rappresenta la massima frequenza di campionamento quando vengono attivate tutte le sorgenti mentre il massimo indica l'uso per un set limitato di canali. Ogni dispositivo dispone un metodo multiplexing (MUX) per la distinzione dei segnali da emettitori diversi e diverse lunghezze d'onda. Vengono impiegati tre metodi: time multiplexing (t), in cui l'attivazione dei diodi avviene per intervalli di tempo specifici. Frequency multiplexing (f): i diodi sono sempre attivi e diodi diversi sono modulati con frequenze differenti. Infine, il metodo code multiplexing (c), permette di attivare i diodi tramite sequenze di bit diverse per ciascuno di essi.

Un altro parametro che consente la classificazione dei dispositivi è la distanza sorgente-rilevatore (SDS, source detector separation) che può essere fissa o regolabile manualmente (a). Tuttavia, vi sono anche tipologie di strumentazione che impiegano sia distanze fisse che regolabili (+). Come per SDS, anche la scelta delle lunghezze d'onda può essere effettuata dal ricercatore (*) ma solamente per specifici intervalli all'interno della regione NIR.

Per quanto riguarda l'acquisizione del segnale, vi sono dispositivi in grado di determinare esclusivamente la concentrazione di O₂Hb e HHb, altri invece, offrono la possibilità di rilevare l'intensità della luce, indicata come densità ottica (OD) o come luce grezza (raw).

La strumentazione in commercio prevede anche sistemi indossabili; alcuni di essi, grazie alle dimensioni contenute, consentono al soggetto stesso di trasportare il dispositivo che, per consentire

studi che includono il movimento, viene alimentato con una batteria (y). In generale, per questi dispositivi la trasmissione dei dati avviene in modalità wireless dal sistema indossabile a un PC host. Tuttavia, non tutti gli strumenti permettono questa modalità di trasmissione, perciò la registrazione dei dati può avvenire anche nel dispositivo stesso (y*). Infine, tutti i dispositivi hanno l'obbligo del marchio CE, solo per scopi di ricerca esso non risulta necessario [7].

	Device	(Manufacturer), country	Time-res, Hz	#Emitter	#Detector	MUX	SDS (mm)	E-tech	Wavelengths (nm)	D-tech	Data	Wear	CE
D1	OXYMON MkIII	(Artinis), Netherlands	250	32	16	t	a	LD	760, 850*	APD	Raw	n	y
D2	PortaLite	(Artinis), Netherlands	50	3	1	t	20+25/ 30+35+40	LED	760, 850*	PD	Raw	y	y
D3	fNIR1 100	(fNIR Devices), USA	2	1/1/4	2/4/12	t	20/25/25	LED	730, 850		Hb	n	n
D4	fNIR1 100w	(fNIR Devices), USA	2	1	2/4	t	20/25	LED	730, 850		Hb	y	n
D5	ETG-4000	(Hitachi), Japan	10	18	8	f	20/30	LD	695, 830	ADP	Raw	n	y
D6	ETG-7100	(Hitachi), Japan	10	40	40	f	20/30	LD	695, 830	ADP	Raw	n	y
D7	WOT	(Hitachi), Japan	5	8	8	t + f	30	LD	705, 830	PD	Raw	y	n*
D8	Genie	(MIRRA), USA	5.02	4 to 16	8 to 32	c	a	LED	700, 830	PD	Raw	y	n
D9	NIRScout	(NIRx), USA	6.25 to 62.5	8 or 16	4 to 24	t + f	a	LED	760, 850	PD	Raw	n	y
D10	NIRScoutX	(NIRx), USA	6.25 to 62.5	48	32	t + f	a	LED	760, 850	PD	Raw	n	y
D11	NIRSport	(NIRx), USA	6.25 to 62.5	8	8	t + f	a	LED	760, 850	PD	Raw	y	y
D12	Brainsight NIRS	(Rogue Research), Canada	100	4 to 16	8 to 32	f	a	LD	685, 830, (808)*	ADP	Raw	n	n*
D13	FOIRE-3000	(Shimadzu), Japan	7.5 to 40	4 to 16	4 to 16	t	a	LD	780, 805, 830	PMT	OD	n	n
D14	OEG-SpO2	(Spectratech), Japan	1.52/12.2	6	6	c	30/25/15-40	LED	770, 840	PD	Raw	y*	n*
D15	CW6	(TechEn), USA	10 to 50	4 to 48	8 to 32	f	a	LD	690, 830*	APD	Raw	n	y
D16	UCL Optical Topography System	(University College London), UK	10 to 160	16	16	f	a	LD	780, 850	APD	Raw	n	n
D17	Imagent	(ISS), USA	16 to 60	16 or 32	4 or 8	f	a	LD	690, 830	PMT	Raw	n	y

Tabella 3. Dispositivi fNIRS in commercio. [7]

1.5.2 Sorgenti luminose

Le sorgenti luminose maggiormente utilizzate nei dispositivi fNIRS sono i diodi laser (LD, Laser Diode) e i diodi emettitori di luce (LED, Light Emitting Diode). Entrambi utilizzano il fenomeno dell'elettroluminiscenza e basano i propri principi sulla tecnologia dei semiconduttori che, in base al tipo e al drogaggio, varia la lunghezza d'onda emessa. I LED sono dispositivi facilmente regolabili che, quando attraversati da una corrente elettrica, emettono spontaneamente, ovvero il sistema (un atomo ad esempio) può rimanere in uno stato energeticamente eccitato per un tempo più o meno lungo, a seconda della differenza di energia in gioco. Quando il sistema si diseccita e fa ritorno allo stato energetico fondamentale, l'energia persa viene rilasciata sotto forma di radiazione elettromagnetica che si direziona in maniera casuale (luce incoerente) con larghezza di banda spettrale (BW) tra i 25 nm e i 50 nm. I LD sono dispositivi che generano un fascio laser sulla base dell'emissione stimolata, ovvero il ritorno del sistema allo stato energetico iniziale viene provocato da un fotone incidente. I fotoni in uscita però in questo caso hanno la stessa direzione dei fotoni che hanno provocato il diseccitamento. Pertanto, essendo i fotoni in fase tra loro (luce coerente), si ha un'amplificazione del fascio luminoso con conseguente restringimento della larghezza di banda. Sebbene i diodi laser abbiano un campo operativo più ristretto possiedono, oltre un'elevata potenza (decine di Watt), anche il vantaggio di avere una bassa divergenza e picchi spettrali stretti tale da consentirgli un facile accoppiamento in fibra, in quanto la velocità dell'onda è dipendente dalla lunghezza d'onda (dispersione cromatica). Pertanto, un intervallo spettrale ristretto garantisce una propagazione del segnale che, all'arrivo al rilevatore, ne consente una migliore decodifica.

In fNIRS, vengono solitamente impiegate delle sorgenti a banda larga con opportuni filtri passa banda e vengono utilizzate due o più lunghezze d'onda discrete da impiegare nella MBLL. La luce NIR emessa deve penetrare nel tessuto senza essere completamente assorbita in modo tale da poter essere rilevata. Per questo motivo, affinché si possa ottimizzare la quantità di luce registrata dal rilevatore e di conseguenza ottenere anche un rapporto segnale rumore elevato, la potenza ottica emessa dovrebbe assumere valori più alti possibili. Inoltre, valori maggiori di intensità permetterebbero di utilizzare una SDS maggiore e quindi fornire un'indagine cerebrale a strutture più profonde. Queste considerazioni risultano però valide fino a determinati limiti di sicurezza, infatti, valori elevati di potenza ottica comportano un riscaldamento dei tessuti che causa, oltre all'alterazione delle misurazioni, anche un pericolo per il paziente. La sicurezza viene garantita da una corretta progettazione dei dispositivi, non solo previene rischi per i pazienti, ma anche per prevenire alterazioni delle misurazioni a causa degli effetti della temperatura.

Per la strumentazione indossabile o miniaturizzabile le dimensioni e il consumo di energia assumono un ruolo fondamentale per la selezione della sorgente luminosa. I diodi laser garantiscono prestazioni elevate ma i costi e le dimensioni possono costituire un limite. Nei dispositivi che impiegano guide in fibra ottica per indirizzare la luce verso o dal cuoio capelluto, è ragionevole scegliere una fonte di luce che consenta un accoppiamento in fibra efficiente. La scelta nell'impiego della sorgente luminosa risulta essere dipendente dal tipo di applicazione e di studio che si vuole effettuare (Tab.5).

	BW	Dimensione	Colori	Divergenza	Accoppiam. in fibra	Costo	Sicurezza
LED	~ 35 nm	Piccolo	Molti	Ampia	Possibile	Basso	Alta
LD	< 1 nm	Ingombrante	Limitati	Stretta	Facile	Alto	Bassa

Tabella 4. Confronto tra diodi emettitori di luce (LED) e diodi laser (LD) [7].

Per le misurazioni di fNIRS le sorgenti luminose utilizzano due o più lunghezze d'onda dello spettro NIR per misurare la variazione delle concentrazioni dei cromofori di tramite MBLL. Sono stati sviluppati numerosi metodi basati su approcci teorici e sperimentali per la selezione delle lunghezze d'onda ottimali. L'interazione di più variabili come la tipologia e quantità dei cromofori analizzati, il numero di strati da investigare e il numero di lunghezze d'onda, hanno costituito un problema che non ha permesso di giungere a un modello univoco di analisi a causa delle diverse ipotesi formulate.

Numerosi studi hanno provato a determinare quali fossero i valori di lunghezza d'onda da applicare per avere la massima efficienza nell'analisi tissutale ma, ad oggi, sono stati definiti solamente intervalli. Tra gli studi più rilevanti, in Correia et al.,2010, è stato evidenziato come, per un dispositivo fNIRS che impiega due lunghezze d'onda nell'indagine di due cromofori, un'ottima scelta è quella con valori 704 ± 7 nm e 887 ± 12 nm. Utilizzando invece tre lunghezze d'onda nell'indagine di due cromofori in un mezzo a tre strati, i valori più idonei risultano essere 680 ± 5 , 725 ± 10 nm e 877 ± 12 nm, per quattro invece valori l'intervallo più consono è 685 ± 7 , 719 ± 9 , 731 ± 8 e 873 ± 9 nm. I modelli matematici usati però non includevano i contributi degli strati superficiali come pelle, cuoio capello o anche la pigmentazione scura dei capelli, che si sono dimostrati essere determinanti nell'assorbimento della luce. Altri studi riportano valori differenti, la discrepanza dimostra come il tipo di approccio di ottimizzazione matematica influenzi

molto i risultati perciò la selezione delle lunghezze d'onda ottimali è un tema ancora soggetto a studi [7].

1.5.3 Fotorilevatori

I fotorilevatori sono dispositivi in grado di misurare la radiazione luminosa fornendo in uscita un segnale elettrico, quelli utilizzati nella strumentazione di fNIRS sono i fotodiodi (PD), i fotodiodi a valanga (ADP) e i tubi fotomoltiplicatori (PMT). I fotodiodi basano il loro principio sull'effetto fotoelettrico interno, il quale prevede l'assorbimento degli elettroni nel diodo a giunzione così che possano essere disponibili per processi di conduzione.

Il PD non presenta un'amplificazione interna del segnale e può essere impiegato in due modalità. La prima, detta modalità fotoconduttiva, prevede che una tensione inversa venga applicata attraverso la giunzione; la corrente risultante da questo fenomeno rappresenta il segnale elettrico e viene misurata attraverso una piccola resistenza di carico. La seconda, detta modalità fotovoltaica, permette al fotorilevatore di operare sfruttando l'adeguata connessione a una resistenza di carico, che gli permette, evitando polarizzazioni, di agire come un generatore di corrente ad una specifica tensione. Al fine di ottenere una corrente trascurabile si usa una resistenza di carico elevata, questa però, causa delle variazioni di tensioni che rendono i circuiti operanti in questa modalità molto più lenti rispetto alla modalità fotoconduttiva.

Il fotodiodo a valanga sfrutta, come il PD, l'effetto fotoelettrico interno ed anche dal punto di vista circuitale si discosta poco dal fotodiodo. È costituito da quattro strati di semiconduttore drogati in maniera asimmetrica in cui il terzo è quello che permette l'effetto moltiplicativo alla base del dispositivo. Le cariche primarie prodotte creano un effetto valanga che determina la generazione di un numero elevato di cariche secondarie, il fenomeno si traduce in un'amplificazione interna di corrente. Infine, i tubi fotomoltiplicatori sono dei rilevatori estremamente sensibili alla luce il cui funzionamento si basa sull'effetto fotoelettrico esterno. L'apparecchio è costituito da un tubo di vetro al cui interno è praticato il vuoto e in cui è presente, oltre ad un anodo, anche altri elettrodi che costituiscono i dinodi. Il funzionamento si basa sulla collisione dei fotoni sulla superficie del fotocatodo che, provocando l'emissione di elettroni accelerati da un campo elettrico, acquisiscono energia cinetica. Gli elettroni vengono poi focalizzati verso uno stadio costituito da una serie di elettrodi posti a potenziale crescente, nel quale, si verifica l'effetto dell'emissione secondaria. Il meccanismo a cascata è originato dall'impatto dell'elettrone con gli elettrodi che provoca la fuoriuscita di diversi elettroni secondari dalla superficie dei dinodi. Questo fenomeno consente al

tubo fotomoltiplicatore di ottenere guadagni molto elevati di 10^6 - 10^7 . A seconda del tipo di analisi da effettuare, la scelta del dispositivo è legata a dimensioni, guadagno, intervallo misurabile (dynamic range) e tensioni operative (V_{op}) che si vogliono utilizzare (Tab.6)[7].

	Guadagno	Gamma dinamica	Dimensione	V_{op}	Velocità	Robustezza	Suscettibilità
PD	Nessuno	Alta	Piccolo	1 V	Media	Buona	No
ADP	Moderato	Moderata	Piccolo	100 V	Alta	Media	No
PMT	Ampio	Moderata	Ingombrante	1 kV	Alta	Media	Si

Tabella 5. Confronto tra fotodiodi (PD), fotodiodi a valanga (ADP) e tubi fotomoltiplicatori (PMT) [7].

CAPITOLO 2

CONFRONTO TRA LA fNIRS E ALTRE TECNICHE DI IMAGING

2.1 Principali tecniche di imaging

Esistono diverse tecniche di imaging che consentono lo studio del rapporto tra l'attività di specifiche regioni del cervello e le funzioni cerebrali ad esse associate. Le metodologie che come la fNIRS forniscono immagini in maniera indiretta sfruttando le variazioni locali di flusso ematico dovute all'attività neurale sono la risonanza magnetica funzionale (functional Magnetic Resonance Imaging, fMRI) e la tomografia a emissione di positroni (Positron Emission Tomography, PET). Al contrario, la magnetoencefalografia (MEG) e l'elettroencefalografia (EEG) misurano l'attività cerebrale direttamente utilizzando potenziali elettromagnetici associati a tale attività. In generale, tutti i metodi di neuroimaging hanno contribuito allo studio dei meccanismi cerebrali, sia in ambito di ricerca, permettendo di indagare il ruolo delle regioni cerebrali associate ad attività funzionali, che in ambito clinico come possibile strumento diagnostico.

Le tecnologie utilizzate per l'indagine cerebrale sono distinguibili in due classi. La prima comprendente i metodi che hanno lo scopo di fornire informazioni legate all'attività funzionale, mentre la seconda si occupa di mostrare la struttura del cervello a livello anatomico.

Le tecniche di imaging strutturale principalmente utilizzate sono la risonanza magnetica (Magnetic Resonance Imaging, MRI), la spettroscopia di risonanza magnetica (Magnetic Resonance Spectroscopy, MRS) e l'imaging del tensore di diffusione (Diffusion Tensor Imaging, DTI). La MRI viene utilizzata in generale per le misure delle dimensioni delle aree cerebrali ed eventualmente stabilire differenze volumetriche tra le strutture del cervello. La MRS ha le stesse caratteristiche della MRI ma possiede anche la capacità di valutare chimicamente il contenuto delle regioni indagate, per questo è spesso impiegata nella misura di metaboliti cerebrali correlati a danni neuronali. Infine, la DTI, è spesso utilizzata al posto della MRI perché permette di ottenere un maggior grado di precisione nell'indagine della mielinizzazione delle fibre della sostanza bianca del cervello. Viene sottolineato che, l'utilizzo di queste tecniche nelle indagini funzionali ha lo scopo di fornire un supporto per indagare la regione in cui si verifica l'attività funzionale.

Tuttavia, lo sviluppo e l'utilizzo simultaneo di vari metodi di imaging e la coregistrazione tra tecniche di analisi funzionali con metodi di visualizzazione anatomica, ha consentito di cambiare tipo di approccio. Si è passati da una ricerca che associava una specifica regione cerebrale ad una

particolare funzione, a una visione dinamica basata sul principio che l'aspetto funzionale è determinato dall'interazione di più regioni cerebrali [5,9].

2.1.1 La fMRI

La risonanza magnetica funzionale (fMRI) è una tecnica di imaging che consente di ottenere informazioni circa gli aspetti funzionali cerebrali basandosi sul metabolismo cerebrale locale. I principi di funzionamento sono gli stessi della risonanza magnetica. I sistemi di imaging a risonanza magnetica (MRI) utilizzano un magnete superconduttivo da 5-10 tonnellate, accuratamente progettato per fornire un forte campo magnetico con elevata omogeneità nel tunnel dove verrà posizionato il paziente. Alcuni nuclei presenti nei campioni biologici presentano proprietà magnetiche che si comportano diversamente quando sono sottoposti a campi magnetici. In assenza di campo magnetico i nuclei ruotano ciascuno attorno al proprio asse, disposto con orientamento casuale nello spazio. Al contrario, quando sono sottoposti a un campo magnetico statico, gli spin degli atomi all'interno dei tessuti tendono ad allinearsi alle linee di forza del campo magnetico. Pertanto, durante l'esame, ogni punto all'interno del corpo del paziente, (rappresentato nell'immagine finale come un particolare 'pixel' o 'voxel'), avrà un certo numero di protoni allineati con il campo magnetico principale. L'effetto dell'allineamento degli spin è di produrre una magnetizzazione (somma di tutti i momenti magnetici elementari) che sarà soggetta al fenomeno della precessione attorno alla direzione del campo magnetico con una frequenza specifica (nota come frequenza di Larmor) e direttamente dipendente dalla grandezza del campo magnetico. Applicando un impulso a radiofrequenza con una frequenza esattamente corrispondente a quella di precessione, l'orientamento degli spin può essere modificato fino a quando i momenti magnetici non sono perpendicolari al campo magnetico principale. In questo orientamento, verrà indotta una tensione in un circuito elettrico circostante e dopo la cessazione dell'impulso, gli spin tenderanno a tornare lentamente al loro orientamento originale, ma non prima che questa tensione a radiofrequenza possa essere rilevata da una bobina ricevente. La sorgente di questo segnale può essere assegnata in una specifica posizione usando i gradienti di campo magnetico per farne variare l'intensità e quindi la corrispondente frequenza di risonanza, da punto a punto. Le altre caratteristiche del segnale dipendono dalle proprietà magnetiche del microambiente degli spin; la forza del segnale dipende dal numero di spin coinvolti, mentre la velocità con cui il segnale decade dipende da un numero di fattori, noti come tempi di rilassamento, che descrivono l'interazione degli spin con l'ambiente circostante. Metodi di acquisizione (sequenze di impulsi) sono stati sviluppati

per rendere il segnale MR maggiormente sensibile a una o più di queste proprietà, producendo immagini con forte contrasto tessutale [10,11].



Figura 7. Illustrazione dell'apparecchiatura di risonanza magnetica [s1].

Il metodo di imaging RM più spesso usato per produrre informazioni relative alle funzioni cerebrali piuttosto che l'anatomia è chiamato imaging a contrasto BOLD (Blood Oxygenation Level Dependent dipendente dal livello di ossigenazione del sangue). Questo metodo si basa su immagini RM rese sensibili ai cambiamenti dell'emoglobina che presenta proprietà magnetiche differenti a seconda dello stato di ossigenazione.

L'ossiemoglobina si comporta come una sostanza diamagnetica (cioè, quando soggetta a campo magnetico acquista una magnetizzazione indotta opposta al campo magnetizzante e in genere debole), al contrario, la deossiemoglobina si comporta come paramagnetica (acquista una magnetizzazione proporzionale a quella del campo magnetizzante e avente stesso verso) e, si sottolinea che i cambiamenti del segnale BOLD provengono dai cambiamenti di quest'ultima. Le proprietà magnetiche della deossiemoglobina consentono di generare campi magnetici locali che perturbano l'omogeneità del campo magnetico principale portando a una riduzione locale dell'omogeneità. Pertanto, all'interno di un particolare voxel (elemento di volume) la proporzione di deossiemoglobina rispetto all'ossiemoglobina determina come il segnale MR si comporterà in un'immagine BOLD: le aree con alta concentrazione di ossiemoglobina producono un segnale più elevato (immagine più luminosa) rispetto alle aree a bassa concentrazione. Ne consegue che la fMRI utilizza l'emoglobina come mezzo di contrasto endogeno per le proprie indagini [10].

Il segnale BOLD acquisito è dipendente dal meccanismo dell'accoppiamento neurovascolare, ovvero l'aumento dell'attività neuronale incrementa la richiesta di ossigeno che si traduce in un aumento di flusso ematico verso la regione attiva. In seguito ad uno stimolo/task di breve durata il

segnale BOLD si compone di tre fasi. Appena dopo lo stimolo, si può verificare una piccola risposta negativa del segnale dovuta all'aumento di deossiemoglobina (risposta rapida), successivamente si ha un aumento del segnale, dovuto all'incremento del flusso sanguigno ossigenato verso la regione attiva, che rappresenta la componente di maggior importanza. Infine, si verifica un undershoot post-stimolo, ovvero l'estrazione ulteriore di ossigeno dai vasi sanguigni che può richiedere fino a un minuto per tornare al livello basale [12].

Nella pratica, usando immagini BOLD, si può rilevare indirettamente l'aumento dell'attività neuronale nel momento in cui un soggetto svolge un determinato compito, rispetto ad un altro momento in cui tale compito non viene eseguito. I protocolli di indagine fMRI consistono nel far svolgere all'individuo all'interno dello scanner a una serie di compiti cognitivi mentre vengono raccolte immagini del cervello ad alta risoluzione spaziale. In genere, ogni 2-3 secondi vengono acquisite una serie di immagini dell'intero cervello; pertanto, durante l'esecuzione di una scansione fMRI completa, della durata di circa 2-10 min, per aumentare la sensibilità vengono accumulati centinaia di volumi del cervello [10].

2.1.2 La PET

La tomografia a emissione di positroni (PET) è una tecnica diagnostica di medicina nucleare che si basa sull'impiego di traccianti marcati radioattivamente per la produzione di immagini del corpo.

La tecnica prevede la somministrazione per via endovenosa di una sostanza normalmente presente nell'organismo (ad esempio glucosio) che viene marcata con una molecola radioattiva (isotopi), comunemente fluoro-18 (^{18}F) o carbonio-11 (^{11}C). L'isotopo funge da tracciante e si diffonde nel cervello concentrandosi nelle aree attive durante il compito cognitivo a seguito dell'aumento del flusso ematico. I radio-isotopi utilizzati hanno un'emivita breve, circa 20 minuti per il carbonio-11 e 110 minuti per il fluoro-18, che limita l'esposizione dei pazienti alla radioattività. Tuttavia, lo scopo è di rilevare e localizzare i traccianti tramite uno scanner e, come suggerisce il nome, si basa sull'emissione di positroni prodotti dal decadimento dei radio-isotopi (elementi instabili). Un positrone è l'equivalente di un elettrone, presenta la stessa massa ma con carica elettrica opposta, e viene rilasciato da un protone all'interno del nucleo; il positrone emesso, dopo aver percorso pochi millimetri, collide con un elettrone. La collisione produce una reazione di annichilazione reciproca positrone-elettrone che genera una coppia fotoni (raggi gamma) che viaggiano in direzioni opposte ciascuno con energia di 511 keV. I raggi gamma possono essere rilevati quando colpiscono rilevatori opposti quasi simultaneamente, provocando un vero evento di coincidenza. Si sottolinea

che i fotoni che non raggiungono il rivelatore in coppia, cioè entro un intervallo di tempo di pochi nanosecondi, non sono presi in considerazione. In seguito lo scintillatore converte il fotone in luce, che viene rilevata dai tubi fotomoltiplicatori collegati, mentre il percorso registrato dai due rivelatori colpiti in coincidenza è definito linea di risposta (LOR). La LOR è fondamentale per l'accuratezza della scansione PET poiché fornisce informazioni utili per ricostruire la posizione da cui sono stati emessi i fotoni.



Figura 8. Illustrazione del sistema PET [s2].

Successivamente, un algoritmo di ricostruzione delle immagini viene applicato ai dati grezzi così da ottenere la distribuzione spaziale risultante del radio tracciante, la quale riflette il processo funzionale.

La tomografia ad emissione di positroni per l'imaging cerebrale è stata usata per molti anni nella ricerca (per esempio, negli studi dei disturbi neurodegenerativi e disturbi del movimento) e negli ambienti clinici. Inoltre, i radio-traccianti disponibili negli studi PET, permettono di fornire importanti informazioni sulla patologia e la progressione della malattia per alcune condizioni neurodegenerative. L'elevata risoluzione spaziale della tecnica (4mm) permette di studiare diversi processi cerebrali usando differenti composti radioattivi con estrema precisione nella localizzazione. Tuttavia, PET non misura direttamente l'attività neuronale, ma il flusso ematico della zona attivata e, presenta numerose problematiche legate per esempio all'invasività del metodo, ai costi e alla bassa risoluzione temporale [13].

2.1.3 La MEG

La magnetoencefalografia (MEG) è una tecnica di neuroimaging che permette di mappare l'attività funzionale cerebrale in maniera non invasiva tramite la misurazione dei campi magnetici prodotti dall'attività magnetica dell'encefalo.

Il rilevamento dei campi magnetici cerebrali con i sensori MEG dipende dalla configurazione spaziale delle correnti neuronali e dalle conduttività elettriche dei diversi tessuti nella testa (materia grigia, fluido cerebrospinale, meningi, cranio, scalpo). Le principali fonti fisiologiche dei segnali MEG (ed EEG) sono le correnti post-sinaptiche nelle cellule piramidali corticali. Poiché i dendriti apicali delle cellule piramidali sono orientati perpendicolarmente alla superficie corticale, essi guidano le correnti neurali macroscopiche sino alla superficie corticale.

La MEG è più sensibile alle correnti corticali orientate tangenzialmente al cranio, perciò se la corrente è inclinata rispetto alla superficie del cranio, la sua componente tangenziale può produrre un forte segnale MEG. Nonostante la preferenza della MEG alle correnti superficiali, sia i dati registrati che i modelli utilizzati rilevano anche attività più profonde.



Figura 9. Illustrazione del sistema MEG posizionato all'interno di camera schermata [s3].

La MEG si basa sulla rilevazione di campi magnetici estremamente deboli (da 10^{-15} a 10^{-11} Tesla) in presenza di uno sfondo molto rumoroso generato da apparecchiature elettriche e magnetiche esterne (circa 10^{-7} T e oltre). Pertanto, l'apparecchiatura deve essere progettata correttamente in modo tale da combinare l'alta sensibilità necessaria per la rilevazione dei segnali alla capacità di respingere il rumore derivante da fonti esterne al cervello. Per questo motivo, i sistemi MEG si trovano all'interno di stanze schermate magneticamente (ed elettricamente) così che il rumore ambientale possa essere ridotto a un livello compatibile con le misurazioni del segnale cerebrale.

La strumentazione MEG all'avanguardia consiste di circa 300 sensori di campo magnetico (gradiometri) in un vaso criogenico. I componenti principali di un tale sistema (Fig.10a) sono il dispositivo superconduttore a interferenza quantistica (SQUID) con relativa elettronica, i trasformatori di flusso che accoppiano il campo neuromagnetico agli SQUID e il vaso criogenico (dewar) contenente elio liquido necessario a raffreddare il sistema per mantenerlo in uno stato superconduttivo.

Il campo magnetico misurato è accoppiato agli SQUID con l'aiuto di un trasformatore di flusso, composto da due bobine. La bobina di pickup (rilevamento) rileva il campo magnetico di interesse, mentre la bobina di ingresso accoppia il campo allo SQUID (Fig.10b). Il trasformatore di flusso più semplice è un *magnetometro* che risultando però sensibile a vari artefatti e al rumore esterno, ha una minore specificità ai segnali cerebrali.

Gli SQUID si basano sulle proprietà di un piccolo circuito superconduttore interrotto da due anelli deboli (giunzioni Josephson) e vengono utilizzati per rilevare campi magnetici dell'ordine di 10^{-15} T. Viene utilizzata un'ampia larghezza di banda di registrazione (≥ 10 kHz) insieme a uno spettro di rumore piatto superiore a circa 1 Hz. Di conseguenza, gli SQUID sono adatti per il rilevamento di campi magnetici del cervello che vanno da 0 a 1000 Hz e oltre e, con i suoi dispositivi elettronici, funge da convertitore di flusso-tensione magnetico a bassissimo rumore.

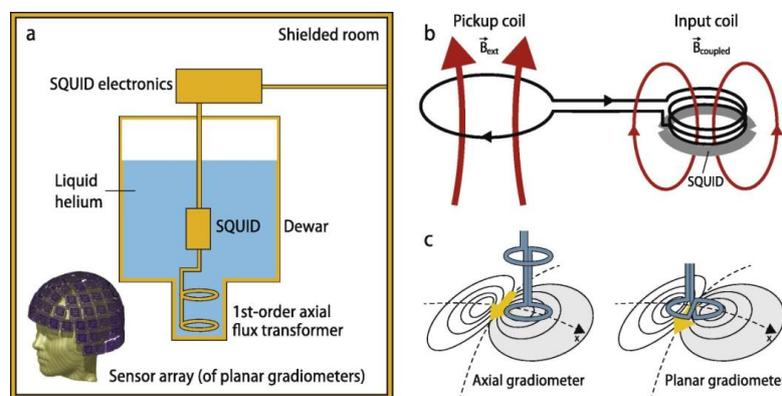


Figura 10. Schemi della strumentazione MEG. (a) Un gradiometro assiale a canale singolo e SQUID associato all'interno di un dewar riempito di elio liquido . In basso è rappresentato l'array di sensori di un casco MEG a 306 canali in cui ogni sensore contiene due gradiometri ortogonali planari e un magnetometro. (b) Trasformatore di flusso e SQUID. Il campo magnetico esterno genera nella bobina di raccolta una corrente che scorre nel circuito superconduttore dove una parte (bobina di ingresso) si accoppia per mezzo di un campo magnetico allo SQUID. L'elettronica controlla lo stato dello SQUID. (c) Gradiometri assiali e planari. Un gradiometro assiale rileva il segnale più grande a un paio di centimetri di distanza dal sito della sorgente locale (freccia), mentre il gradiometro planare rileva il segnale massimo appena sopra la sorgente. Si noti, tuttavia, che il segnale nel gradiometro planare dipende fortemente dal suo orientamento; se ruotato di 90 gradi, il segnale ottenuto in questo caso svanirebbe. Pertanto, i dispositivi che utilizzano gradiometri planari hanno due gradiometri planari ortogonali nello stesso sensore (vedere l'inserito in basso a sinistra in (a)) [14].

Il dewar, infine (Fig.10a), è tipicamente realizzato in fibra di vetro e deve essere progettato in modo tale che la distanza tra le bobine di rilevamento e la testa sia più piccola possibile affinché si possa meglio registrare il segnale. Inoltre, il sistema dev'essere mantenuto freddo il più lungo possibile, ne consegue che il volume debba essere abbastanza grande per rendere fattibile l'intervallo di ricarica per il funzionamento (ad esempio una capacità di 50–70 litri richiede una ricarica di elio ogni 5-9 giorni).

Sebbene la MEG possa fornire informazioni dirette ed in tempo reale della dinamica dell'attività neurale con una risoluzione temporale elevata (ms), i costi associati alla strumentazione e la limitata risoluzione spaziale costituiscono un limite per l'imaging cerebrale [14].

2.1.4 EEG

L'elettroencefalografia (EEG) è una tecnica non invasiva che registra l'attività elettrica dell'encefalo. La registrazione avviene tramite l'utilizzo di elettrodi metallici posizionati sul cuoio capelluto che, misurando le variazioni del potenziale elettrico, forniscono informazioni sull'attività neuronale della superficie della corteccia cerebrale. La disposizione degli elettrodi si basa generalmente sul sistema internazionale 10-20, in cui i valori dieci e venti espressi in percentuale sono riferiti alla distanza tra due punti di repère cranico: nasion (prominenza alla base dell'osso occipitale) e inion (attaccatura superiore del naso). Il posizionamento secondo questo sistema è determinato dalle misurazioni da quattro posizioni standard sulla testa: nasion, inion e punti preauricolari destra e sinistra (Fig.11), in cui la maggior parte degli elettrodi si trova a circa 5-7 cm dagli quelli adiacenti (in un adulto). Le differenze di potenziale tra gli elettrodi vengono amplificate e registrate su una carta o visualizzate su uno schermo dell'oscilloscopio (elettroencefalogramma). Da sottolineare che gli attuali sistemi digitali consentono la ricostruzione dell'elettroencefalogramma con qualsiasi derivazione o formato desiderato e consentono anche la manipolazione dei dati per analisi aggiuntive.

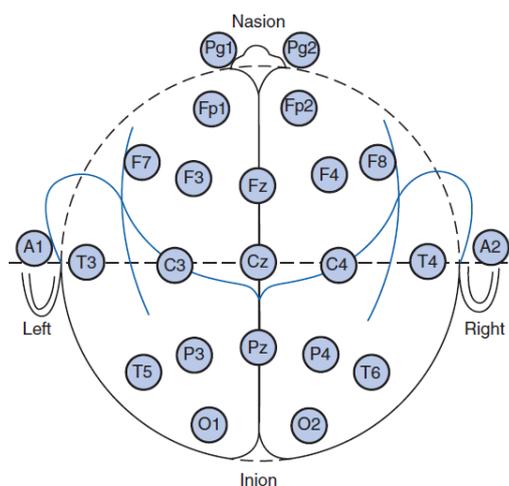


Figura 11 . Il sistema internazionale 10–20 di posizionamento degli elettrodi, relativo al posizionamento di 19 elettrodi sullo scalpo più due sui lobi. A, lobo orecchio; C, centrale; F, frontale; Fp, fronto-polare; P, parietale; Pg, rinofaringeo; T, temporale; O occipitale. I posizionamenti sul lato destro sono indicati da numeri pari, i posizionamenti sul lato sinistro da numeri dispari e i posizionamenti sulla linea mediana da z. Gli elettrodi Pg sono elettrodi speciali che non fanno parte degli elettrodi sullo scalpo [15].

Gli elettrodi sono collegati ad amplificatori secondo schemi prestabiliti, o montaggi, per consentire di registrare in sequenza l'attività elettrica di varie aree. Le modalità di registrazione possono essere diverse. Il montaggio può essere modificato anche dopo la registrazione digitale, in modo che la differenza di potenziale sia misurata tra coppie di elettrodi (derivazione bipolare) o tra singoli elettrodi e un punto di riferimento comune. In quest'ultima disposizione, il punto di riferimento può essere un sito relativamente inattivo sul cuoio capelluto, un punto collegato a tutti gli elettrodi in uso in modo che rifletta la media dei potenziali di questi elettrodi oppure può essere posizionato altrove.

I meccanismi responsabili della presenza di attività ritmica diffusa nel cervello non sono completamente noti, ma sono state prodotte evidenze secondo cui l'attività ritmica registrata dal cuoio capelluto ha un'origine corticale, derivante da potenziali post-sinaptici dei neuroni corticali piramidali. Pertanto, l'EEG costituisce l'espressione dei processi sinaptici dell'encefalo e, in base allo stato di attività cerebrale, i segnali registrati cambiano in ampiezza e frequenza. Quando la corteccia è attivata (ad esempio in un compito di problem solving) il segnale elettrico misurato, si presenta con alta frequenza e bassa ampiezza. Al contrario frequenze più basse e ampiezze maggiori sono associate a stati di riposo cerebrale. I ritmi cerebrali vengono identificati tramite una lettera greca e si distinguono in:

- Onde alpha: caratterizzate da una frequenza che va dagli 8 ai 13 Hertz. Sono riscontrate tipicamente nelle aree posteriori della testa durante lo stato di veglia ad occhi chiusi e negli istanti precedenti l'addormentamento. Recentemente si assume che abbiano un importante ruolo nell'inibire regioni cerebrali non attive durante specifici task o stati mentali.
- Onde beta: comprendono qualsiasi attività ritmica che presenta una frequenza maggiore di 13 Hz e l'ampiezza è solitamente inferiore a 30 μV . L'attività beta si registra in condizioni di corteccia attivata (ad es. durante stati di veglia che richiedono concentrazione e anche durante sonno REM).
- Onde theta: comprendono l'attività ritmica con una frequenza compresa tra 4 e 7 Hz e caratterizzano alcuni stadi del sonno.
- Onde delta: comprendono l'attività ritmica con frequenze inferiori a 4 Hz e si presentano durante le fasi profonde del sonno. Svolgono anche un ruolo fondamentale nei processi di memorizzazione.

L'EEG viene impiegata come metodo ausiliario per la diagnosi di patologie neurologiche e per scopi di ricerca. Tuttavia, sebbene non sia una tecnica invasiva e abbia una risoluzione temporale tra le migliori (ms), il suo limite maggiore è dato dalla bassa risoluzione spaziale (cm) che non permette di localizzare precisamente l'origine dell'attività elettrica. Inoltre, a causa della rilevazione esclusiva dell'area superficiale della corteccia, non è possibile indagare le strutture cerebrali profonde [15].

2.2 Vantaggi e svantaggi della fNIRS

L'utilità di una particolare tecnica di neuroimaging può essere valutata in base a diversi parametri, tra cui la risoluzione spaziale e temporale, la robustezza dei dati, le potenziali fonti di artefatti, i costi e l'accessibilità del metodo a una serie di partecipanti. Tuttavia, è da sottolineare come ogni dispositivo appartenente a una stessa metodologia si può differenziare dagli altri, per i parametri sopra riportati, anche significativamente. Di conseguenza è possibile descrivere un confronto tra le tecniche solo in maniera generale.

Per quanto riguarda la risoluzione spaziale, la fNIRS presenta una forte dipendenza dalla disposizione di sorgenti e rilevatori posti sul cuoio capelluto. Pertanto, è necessario considerare due aspetti; la risoluzione spaziale relativa al piano parallelo alla superficie della testa (distanza sorgente-rilevatore) e quella perpendicolare (profondità). fNIRS non garantisce lo studio delle strutture cerebrali profonde, infatti è possibile misurare le attività neurali solamente nella parte superficiale della corteccia cerebrale. Tra le tecniche descritte, solo EEG utilizza un setting sperimentale simile a fNIRS e come quest'ultima, permette una profondità d'indagine limitata alla superficiale della corteccia cerebrale. Inoltre, sebbene entrambe le tecniche consentano il movimento dei partecipanti durante gli studi, la fNIRS è in grado di offrire un'immagine funzionale con maggiore risoluzione spaziale rispetto a EEG.

La MEG sfrutta i piccoli cambiamenti nei campi magnetici indotti dalle correnti elettriche dall'attività neurale e, sebbene abbia una risoluzione spaziale leggermente migliore rispetto all'EEG essa risulta comunque inferiore alla risoluzione spaziale della fNIRS. Al contrario, per quanto riguarda la risoluzione temporale, sia EEG che MEG utilizzano frequenze di campionamento maggiori di 1000Hz che consentono di ottenere prestazioni molto più elevate della fNIRS [5,16,17,18].

PET e fMRI consentono entrambe di analizzare l'intera testa con elevata risoluzione spaziale. La prima, tramite il sistema di rilevamento basato sul decadimento radioattivo degli isotopi, offre una risoluzione spaziale di 4mm. La fMRI presenta un'eccellente risoluzione spaziale (voxel 0,3 mm) che permette di visualizzare in maniera precisa strutture cerebrali profonde. Si sottolinea che, sebbene fMRI e fNIRS misurino la stessa risposta emodinamica, i sistemi fNIRS utilizzano frequenze di campionamento temporali generalmente fino a 10 Hz, che garantiscono una risoluzione temporale migliore rispetto a fMRI e PET [5,16,17].

	fNIRS	fMRI	EEG/MEG	PET
Segnale	HHB, O ₂ HB	BOLD (HHB)	Elettromagnetico	Flusso sanguigno cerebrale e metabolismo del glucosio
Risoluzione spaziale	2-3 cm	Voxel da 0,3mm	5-9 cm	4 mm
Profondità di penetrazione	Corteccia cerebrale	Testa intera	Corteccia cerebrale / strutture profonde	Testa intera
Frequenza di campionamento	Fino a 10 Hz	1-3 Hz	> 1000 Hz	< 0,1 Hz
Gamma di possibili compiti	Molti	Limitati	Limitati	Limitati
Robustezza al movimento	Molto buona	Limitata	Limitata	Limitata
Gamme di possibili partecipanti	Tutti	Limitata	Tutti	Limitata
Suono prodotto	Silenziosa	Molto rumorosa	Silenziosa	Silenziosa
Portabilità	Si, per sistemi portatili	Nessuna	Si, per sistemi EEG portatili	Nessuna
Costo	Basso	Alto	Basso / Alto	Alto

Tabella 6. Confronto di fNIRS con altre tecniche di neuroimaging [16].

fNIRS è una tecnica che può essere estesa a tutti i pazienti, in particolare attributi come portabilità, sicurezza d'uso e soprattutto tollerabilità dei movimenti, hanno reso questa tecnica particolarmente adatta per lo studio delle funzioni cerebrali nei neonati e nei bambini [16]. Confrontando la possibilità di movimento durante l'esame, si evidenzia come in fNIRS siano concessi ampi margini di movimento rispetto alle altre metodologie (ad esempio, fMRI), in quanto il dispositivo (copricapo) è applicato solamente alla testa del soggetto che risulta libero di eseguire movimenti o compiti motori. L'altro fattore determinante che è necessario considerare, in particolare negli studi su bambini e neonati, è l'invasività del metodo. L'utilizzo di traccianti radioattivi, come in PET, comporta oltre un disagio per i pazienti anche notevoli rischi biologici, sia per l'uso di radiazioni ionizzanti che per i problemi legati ad allergia ai traccianti.

I sistemi fNIRS permettono di condurre studi più rilevanti in contesti naturali e socialmente interattivi della vita quotidiana grazie alla compattezza della strumentazione, costi contenuti, alla trasportabilità e un sistema di trasmissione wireless dei dati. Al contrario tecniche come fMRI, MEG e PET hanno costi molto elevati e il loro impiego è limitato all'ambiente ospedaliero, infatti hanno la necessità di essere utilizzate in camere specializzate a causa delle complesse procedure d'indagine. Inoltre, l'impiego di queste tecnologie nei pazienti che presentano disturbi mentali, o più semplicemente i bambini, è complesso; nei metodi di imaging convenzionali è necessario restare confinati in ambienti stretti, senza possibilità di movimento ed esposti a rumori forti. Tale

fattore è determinante negli individui emotivamente non preparati che non accettano le modalità d'indagine, perciò si ricorre spesso a sedare il paziente per permettere una corretta valutazione clinica. L'impiego di queste tecniche, relazionate ai sopra citati problemi d'uso, limitano conseguentemente la ripetibilità degli esami condotti [16,18].

I sistemi fNIRS presentano numerosi vantaggi nei casi in cui la sicurezza e il comfort dei partecipanti sono una priorità. La registrazione fNIRS è silenziosa, relativamente confortevole e non impone vincoli fisici al partecipante, il che significa che è un metodo applicabile a tutti i pazienti e consente l'esecuzione ripetuta di un esame [16].



Figura 12. Applicazione del sistema fNIRS durante studi cognitivi su bambini che prevedono il movimento [s4].

L'utilizzo della luce NIR a bassa energia permette la misurazione della risposta emodinamica in tempo reale e può essere utilizzata anche per un monitoraggio a lungo termine di parametri cerebrali. Poiché i componenti ottici non interferiscono con campi elettromagnetici, fNIRS è ideale per l'imaging multimodale (ad es. FNIRS – fMRI, fNIRS – EEG) per raccogliere informazioni più complete relative all'accoppiamento neurovascolare o integrare agli aspetti funzionali anche una visualizzazione anatomica, senza causare alcun danno su soggetti con dispositivi terapeutici impiantati (ad es. impianti cocleari o protesi metalliche) [1,16].

La rapida crescita di fNIRS come strumento per monitorare l'attività cerebrale funzionale negli ultimi decenni, è stata possibile per i numerosi vantaggi che fNIRS offre che le consente di essere usata in una vasta gamma di applicazioni. Una delle aree di indagine di maggior successo di fNIRS è stata il neurosviluppo, in cui ha permesso studi cognitivi sul cervello che le altre modalità di imaging non possono indagare adeguatamente. È stato possibile studiare molti nuovi casi come

l'elaborazione di oggetti, il riconoscimento di volti, lo sviluppo del linguaggio e specializzazione funzionale in ambito visivo, uditivo, e sistemi senso-motori.

Sono state condotte interessanti ricerche anche nello studio dello sviluppo atipico, con particolare attenzione alle disfunzioni esecutive e linguistiche e ai disturbi dello sviluppo neurologico come l'autismo e il disturbo da deficit di attenzione ed iperattività, che sono difficilmente indagabili con le altre tecniche. Pertanto, è stato dimostrato che fNIRS è uno strumento molto promettente per studiare i cambiamenti dell'attività cerebrale in soggetti con disturbi mentali. Ad esempio, sono state condotte ricerche sulla schizofrenia, in particolare esaminando le anomalie funzionali all'interno della corteccia prefrontale (PFC) durante i compiti di fluidità verbale. In generale, i risultati hanno mostrato che negli individui con schizofrenia sono state osservate delle differenze nelle modalità di risposta emodinamica, ridotta attività cerebrale e modelli di connettività funzionale atipica.

La possibilità di effettuare movimenti corporei e la portabilità dei sistemi hanno reso fNIRS adatta al monitoraggio dell'emodinamica corticale durante le attività motorie o durante le attività che coinvolgono la deambulazione. È stato possibile mappare i modelli di attività funzionale durante la vita quotidiana (per esempio, indagare l'aumento del rischio di caduta quando si utilizza lo smartphone mentre si cammina o indagare il carico di lavoro mentale durante la navigazione) ed esplorare gli effetti della neuroriabilitazione. Ad esempio, sono stati valutati anche i cambiamenti nell'attivazione corticale nei pazienti con ictus prima e dopo due mesi di riabilitazione. Questo studio ha dimostrato il potenziale di fNIRS nel rilevare i cambiamenti nell'attività regionale associati al recupero della locomozione, come riflesso di un aumento dell'attivazione della corteccia premotoria nell'emisfero interessato dopo la riabilitazione. Altri studi, hanno indagato come disfunzioni all'interno della corteccia prefrontale contribuiscono alle difficoltà nell'esecuzione di un secondo compito mentre si cammina, e ciò è stato valutato in diversi disturbi come il morbo di Parkinson o in anziani con lieve deficit cognitivo. In questo modo, la fNIRS ha mostrato un chiaro potenziale come strumento di supporto alla neuroriabilitazione per monitorare i progressi motori e cognitivi dei pazienti.

Uno dei principali fattori che guidano l'aumento della ricerca fNIRS è la possibilità di compiere studi efficienti anche quando un soggetto cammina, si impegna in una conversazione o addirittura balla poiché i dispositivi possono essere trasportati dal paziente stesso (per esempio indossando un copricapo sulla testa e trasportando la strumentazione tramite appositi zaini). Infatti, la fNIRS ha una buona tolleranza agli artefatti da movimento e il corretto posizionamento di un copricapo fNIRS consente di registrare segnali utili in qualsiasi condizione. Questo è permesso anche dai dispositivi indossabili di ultima generazione senza fibre ottiche, la cui progettazione sta

portando a renderli sempre più piccoli, più leggeri e quindi ancora più resistenti ai movimenti del corpo. Infatti, la strumentazione fNIRS che impiega fibre ottiche, limita parzialmente il movimento e ne aumenta notevolmente il peso, incrementando la probabilità di acquisire segnali con errori dovuti al movimento. Per questo motivo sono state sviluppate diverse tecniche per identificare ed efficacemente correggere errori di movimento. Ad esempio, in caso di spostamento degli optodi (sia le sorgenti luminose che i rivelatori) a causa dei rapidi movimenti della testa, gli artefatti da movimento possono apparire nei segnali fNIRS come picchi o spostamenti rapidi e stretti dai valori di base.

Vantaggi	Svantaggi
<ul style="list-style-type: none"> • Sicura • Miglior risoluzione spaziale rispetto a EEG • Miglior risoluzione temporale rispetto a fMRI • Tolleranza agli artefatti da movimento • Possibilità di monitorare HHb e O₂Hb • Portabilità • Basso costo • Silenziosa • Disponibilità di sistemi miniaturizzati e indossabili • Idonea per monitoraggio a lungo termine • Fattibilità per imaging multimodale • Compatibilità con altri dispositivi elettrici e magnetici • Maggior comfort per i pazienti rispetto fMRI • Tutti i pazienti sono ammessi (tutte le età, senza alcun criterio di esclusione) 	<ul style="list-style-type: none"> • Risoluzione temporale inferiore rispetto a EEG/MEG • Risoluzione spaziale inferiore rispetto a fMRI • Profondità di penetrazione (1,5-2 cm) • Impossibilità di raccogliere immagini strutturali e informazioni anatomiche • Interferenze sistemiche • SNR variabile • Mancanza di standardizzazione nell'analisi dati • Maggior sensibilità agli errori dovuti al movimento e minor comfort in caso di misurazioni con uso di fibre ottiche • Il posizionamento degli optodi può richiedere tempo a causa dei capelli

Tabella 7. Vantaggi e svantaggi di fNIRS [16].

Le caratteristiche di fNIRS hanno consentito di fornire segnali emodinamici con elevato campionamento temporale in una vasta gamma di contesti estendibili a tutta la popolazione. Ciononostante, è necessario sottolineare anche alcuni limiti di fNIRS come, per esempio, l'influenza delle variazioni sistemiche del flusso sanguigno sui segnali emodinamici. Questi fenomeni possono essere potenziali fonti di errori sia per i dati di fMRI che di fNIRS, soprattutto in caso di dati registrati in studi che prevedono il movimento. È necessario evidenziare, come discusso nel primo capitolo, che i segnali fNIRS misurati sono una combinazione di componenti derivanti dall'attività neuronale e componenti di origine sistemica che possono portare a falsi positivi e / o falsi negativi nell'inferenza statistica dell'attività funzionale.

Inoltre, sebbene esistano una vasta gamma di procedure di pre-elaborazione e analisi fNIRS disponibili, ad oggi non esiste né un accordo né linee guida consolidate sull'analisi dei dati fNIRS

come avviene in altre tecnologie (fMRI). Questa mancanza di standardizzazione e i numerosi parametri regolabili per gli algoritmi di pre-elaborazione e analisi possono condurre a studi di scarsa qualità o errata interpretazione e irriproducibilità dei risultati. Ad esempio, è stato dimostrato come diverse scelte e combinazioni di criteri di esclusione dei canali, metodi di correzione degli artefatti da movimento e approcci di elaborazione dati potrebbero portare a risultati diversi.

Un altro problema riscontrato dalla comunità fNIRS riguarda come l'indagine del segnale derivato da fNIRS possa essere meglio utilizzato per dedurre l'attività cerebrale funzionale. fNIRS fornisce variazioni di concentrazione di due segnali, l'ossiemoglobina e la deossiemoglobina, ognuna con i suoi vantaggi e svantaggi. Teoricamente, l'attivazione funzionale si riflette nell'aumento simultaneo di O₂Hb e nella diminuzione di HHb. Tuttavia, questo non è sempre il caso dei dati fNIRS reali e, ad esempio, solo un cromoforo potrebbe mostrare cambiamenti significativi in risposta a un determinato compito. Questo può accadere per diversi motivi, ad esempio le variazioni di O₂Hb sono di ampiezza maggiore e hanno un SNR più elevato, ma sono più confuse dalle interferenze fisiologiche, mentre l'HHb può mancare di potenza statistica, ma è più robusto ai cambiamenti sistemici. Pertanto, in alcuni studi, i risultati ottenuti e le conclusioni osservate sono spesso trattate sulla base di un solo cromoforo, senza alcun accordo su quale utilizzare, e raramente su entrambi. In sintesi, sono ancora necessari ulteriori lavori e ricerche per stabilire linee guida e procedure automatizzate per l'analisi dei dati fNIRS per garantire inferenze accurate e localizzazione dell'attività cerebrale funzionale attraverso fNIRS [16].

CAPITOLO 3

L'USO DELLA SPETTROSCOPIA FUNZIONALE NEL VICINO INFRAROSSO IN AMBITO NEONATALE

3.1 Lo sviluppo delle applicazioni fNIRS sui neonati.

Gli esseri umani sono caratterizzati dall'essere creature sociali. Entro il primo anno di vita, in genere i neonati apprendono un ampio repertorio di comportamenti sociali che permettono loro di sviluppare una vasta gamma di abilità in numerosi contesti di vita quotidiana.

Sono stati fatti numerosi progressi nella conoscenza dei circuiti neurali della cognizione e del comportamento sociale; tuttavia, gran parte di questo lavoro, spesso a causa delle metodologiche impiegate, si è concentrato su bambini più grandi e adulti, proponendo studi con esperimenti molto differenti dalle complesse situazioni sociali che si verificano nella vita quotidiana.

La spettroscopia funzionale nel vicino infrarosso ha permesso la misurazione delle risposte cerebrali dei neonati e la valutazione dell'attività cerebrale in contesti più naturali [19]. Il suo impiego è stato sperimentato in individui di tutte le età, ma il vantaggio di poter condurre gli studi non invasivi e con la libertà di movimento le hanno consentito di diventare una metodologia adatta agli studi infantili. Inoltre, la portabilità e i bassi costi sono attributi che le hanno permesso di essere disponibile su larga scala, anche in aree sottosviluppate del mondo [19,20]. Diversamente dalle altre tecnologie di neuroimaging che richiedono che i neonati siano fermi (in particolare, fMRI), l'indagine fNIRS consente un alto grado di tolleranza al movimento (è possibile condurre l'esame con il bambino seduto sulle ginocchia dei genitori) e, grazie alla silenziosità, permette studi che impiegano stimoli audio, video e / o in movimento. Inoltre, a differenza degli studi negli adulti, lo spessore ridotto del cranio permette una buona propagazione della luce nel cervello e la frequente mancanza di capelli permette di ottenere segnali con meno disturbi. Sebbene la fNIRS presenti alcuni limiti (già discussi nel capitolo 2) come l'incapacità di indagare strutture cerebrali profonde, ad oggi, questa tecnica ha contribuito ad aggiungere importanti conoscenze alla comprensione dello sviluppo cerebrale dei neonati utilizzando una gamma più flessibile e diversificata di stimoli che non potevano essere studiati con gli altri metodi di neuroimaging [19].

Nei primi studi fNIRS l'obiettivo principale era l'acquisizione delle risposte emodinamiche agli stimoli di base, per esempio attivando le aree corticali primarie come la corteccia uditiva con un tono acustico o la corteccia visiva tramite una luce lampeggiante stroboscopica. Più recentemente le

ricerche si sono concentrate sulla valutazione di stimoli più complessi che indagano aree cerebrali più ampie e sullo studio delle funzioni motorie e cognitive nei neonati con possibili deficit motori e cognitivi [5,20]. Per questo motivo, è stato possibile studiare numerose situazioni; nei neonati svegli per esempio, è stato possibile indagare l'elaborazione di oggetti, la comunicazione sociale, il movimento, l'osservazione dell'azione e il riconoscimento dei volti. In tutti questi studi, la fNIRS è stata utilizzata per localizzare le risposte emodinamiche in specifiche regioni della corteccia quali il solco temporale superiore (elaborazione del movimento), la corteccia orbitofrontale (riconoscimento del volto materno), aree sensorimotorie (osservazione dell'azione), corteccia prefrontale (permanenza dell'oggetto) e corteccia occipito-temporale (oggetti dinamici).

L'ambizione di condurre studi sempre più complessi ha alimentato il progresso tecnologico e metodologico della fNIRS, tanto che sono stati affrontati problemi come lo sviluppo di un copricapo che permettesse di ridurre gli effetti del movimento del neonato, ma anche la determinazione di un metodo che consentisse di comprendere e interpretare correttamente la risposta emodinamica. Inoltre, è emerso un ruolo chiave dell'accurata progettazione dello studio, considerando gli effetti della noia, dell'anticipazione e della sincronizzazione delle risposte sistemiche / bioritmiche e, della coregistrazione tra la risposta emodinamica misurata alla superficie della testa e l'anatomia corticale sottostante dei neonati [5].

3.2 Strumentazione e metodi

3.2.1 Il copricapo

Gli studi tramite la fNIRS sui neonati sono risultati essere molto più complessi rispetto a quelli negli adulti, infatti, la percentuale di neonati che è stata esclusa dagli studi NIRS a causa di dati insoddisfacenti è circa il 40%. Questo viene attribuito, in larga misura, alla difficoltà di progettazione di un sistema efficiente e confortevole mediante il quale posizionare il dispositivo sulla testa del neonato. Pertanto, per massimizzare l'efficacia della fNIRS come strumento per la ricerca infantile è stato fondamentale impiegare numerose risorse per lo studio del copricapo utilizzato durante le prove di indagine. I prerequisiti che deve avere il copricapo NIRS sono che deve essere comodo, leggero, facile da posizionare in un breve lasso di tempo e fornire misurazioni affidabili e continue da tutti i canali. Infatti, è bene sottolineare che, a differenza degli studi condotti sugli adulti, una volta che il copricapo viene posizionato sulla testa di un neonato, non è possibile

fermare la prova per valutare la qualità del segnale misurato e/o regolare la posizione del dispositivo e in seguito riprendere l'esperimento. Dopo il posizionamento del copricapo i neonati non devono essere indebitamente disturbati (poiché potrebbe portarli a non essere disposti ad eseguire lo studio) e durante la registrazione il copricapo deve essere sufficientemente discreto affinché non sia fonte di distrazione dall'attività svolta. Infine, il dispositivo deve aderire saldamente alla testa in modo che qualsiasi movimento del neonato non alteri la posizione di sorgenti e rivelatori che causerebbero artefatti nel segnale acquisito. L'array di canali all'interno del copricapo deve essere contenuto all'interno di una struttura semirigida che consenta un certo grado di flessibilità, affinché possa disporsi attorno alla testa del neonato mantenendo però una spaziatura fissa tra sorgenti e rivelatori. Inoltre, le fibre ottiche devono essere posizionate in modo tale che restino contemporaneamente lontane dal volto e fuori dalla portata delle mani del neonato (Fig.1).

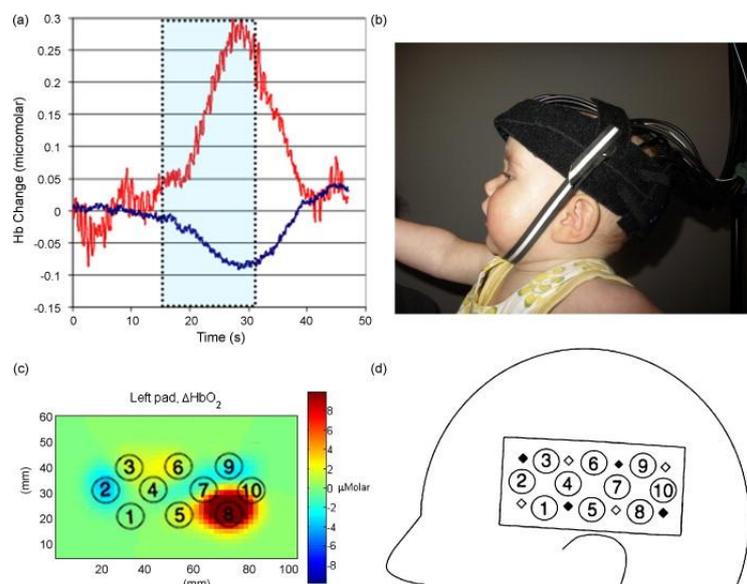


Figura 13. Una panoramica della tecnica NIRS applicata ai neonati; **(a)** una tipica risposta emodinamica che mostra un aumento di O_2Hb (rosso) e una diminuzione di HHb (blu) derivante dall'attivazione corticale; **(b)** un neonato che indossa sonde NIRS e copricapo; **(c)** una ricostruzione lineare delle variazioni di O_2Hb che mostra la localizzazione spaziale della risposta emodinamica a uno stimolo sperimentale; **(d)** la disposizione dell'array di sorgenti e rivelatori utilizzata per raccogliere i dati mostrati in (c) [5].

Lo sviluppo della fNIRS ha permesso ai dispositivi di aumentare la copertura sulla testa del neonato, permettendo di studiare l'attività cerebrale all'interno e tra ampie aree del cervello (come cortece frontali, temporali e occipitali). Mentre inizialmente gli studi con la fNIRS utilizzavano un numero limitato di canali (1-3 canali nei primissimi studi), questo numero è costantemente

aumentato ed è stato incorporato nella progettazione dei dispositivi. Infatti, una limitazione importante delle misure a uno o due canali è il livello di incertezza delle misurazioni effettuate sulla regione corticale d'interesse. Poiché l'anatomia cerebrale sottostante non è rappresentata con la NIRS, è essenziale tenere conto delle differenze individuali nella struttura cerebrale, misurando il segnale su un'area relativamente ampia della corteccia. Ad esempio un array con uno o due canali che produce cambiamenti emodinamici imprevisti, può essere attribuito a una risposta funzionale inattesa o al collocamento errato degli optodi rispetto alla regione di interesse. È quindi consigliabile utilizzare un sistema con più canali. Tuttavia, è da tenere in considerazione che l'aumento di canali comporta un'inevitabile aumento del peso e delle dimensioni del copricapo, che incrementa il rischio dell'esclusione di dati a causa di artefatti da movimento. Infatti si è osservato una più alta proporzione di dati ottici esclusi dovuti ad eccessivi artefatti da movimento negli studi che utilizzano sistemi fNIRS con un numero più elevato di canali. Questo non significa che gli studi eseguiti con un numero inferiore di canali abbiano sempre riportato una percentuale inferiore di dati esclusi, ma piuttosto che un aumento nel numero di canali è un fattore che può influire sulla qualità del segnale a meno che non sia attentamente considerato nella progettazione del copricapo [5].

3.2.2 L'influenza dell'area corticale di interesse

In base alla profondità dell'area corticale da indagare il design del copricapo può cambiare radicalmente, poiché proprio in base alla profondità d'indagine si determinerà la disposizione degli optodi. Teoricamente, se la distanza tra sorgente e rivelatore aumenta, la luce rilevata ha maggiori probabilità di fornire informazioni su una risposta emodinamica che si verifica nel tessuto più profondo. Tuttavia, questa ipotesi è limitata dall'intensità della luce sorgente e dalla diffusione ottica nel tessuto. Per raggiungere la corteccia, la separazione tra sorgente e rivelatore dovrebbe essere, come minimo, il doppio della distanza tra la superficie della pelle e la superficie della corteccia. Per garantire che le misure provengano dalla corteccia cerebrale, quando si studiano le risposte emodinamiche negli adulti, in genere, la separazione sorgente-rilevatore dei canali è tra 40 e 50 mm; nei neonati, la pelle, il cranio e lo strato di fluido cerebrospinale sono più sottili e traslucidi, perciò sono sufficienti separazioni dei canali tra 20 e 30 mm. A causa dei diversi fattori che influenzano la scelta della distanza sorgente-rilevatore, la determinazione di un valore di separazione ottimale è oggetto di discussione tra i ricercatori. Infatti, un aumento della separazione tra sorgente e rivelatore porterà anche a una diminuzione del numero di canali nell'area corticale d'interesse e a sua volta influenzerà il design del dispositivo. Va sottolineato che la distanza

sorgente-rilevatore può variare a seconda dell'intensità della luce emessa dalla sorgente, dell'età del neonato e dell'area cerebrale in esame.

Ad esempio, l'intensità della luce può influenzare notevolmente le misurazioni in quanto, maggiore è l'intensità, più luce raggiungerà i rivelatori e migliore sarà il rapporto segnale / rumore. Tuttavia, l'intensità delle sorgenti può variare tra i sistemi NIRS, per questo motivo, una separazione ideale per un sistema potrebbe non esserla per un altro. Inoltre, nel corso del primo anno di vita, le dimensioni del cervello e della testa del neonato aumentano rapidamente e la struttura anatomica varia tra gli individui. Ad esempio la corteccia di un neonato di 5 mesi può trovarsi a circa 4 mm dalla superficie cutanea nel lobo temporale ma a una profondità maggiore di 10 mm nei lobi frontali e occipitali. Pertanto, la separazione ottimale può variare tra le aree della corteccia e tra i neonati stessi. Per superare questa problematica, vengono impiegati dispositivi che impiegano diverse distanze di separazione sorgente-rilevatore. Questo tipo di approccio consente di ottenere simultaneamente misure da diverse profondità della corteccia, portando a una discriminazione dell'attività corticale nelle varie aree in base alla profondità.

Infine, altri aspetti da considerare durante la progettazione di un copricapo sono la curvatura del cranio e la presenza di capelli. Entrambi questi fattori possono comportare difficoltà nella corretta adesione del dispositivo alla cute. Tuttavia, sebbene le aree della testa più ricurve possono essere più difficili da trattare, il problema dei capelli resta quello con maggiori complicazioni.

I capelli riducono la presa del copricapo e delle sonde sulla testa e, riducendo l'attrito, aumentando gli effetti del movimento del neonato sul segnale registrato. Inoltre, la stratificazione, il diverso orientamento e colore dei capelli causano una differente attenuazione della luce che può portare a misurazioni inaffidabili o inutilizzabili (capelli molto scuri). Negli studi con adulti, viene speso molto tempo per spostare i capelli dall'area direttamente sotto gli optodi. Questo procedimento risulta di difficile impiego con i neonati, e anche gli optodi a molla (in grado di penetrare attraverso i capelli) sviluppati per gli studi negli adulti risultano scomodi per l'uso dei neonati. Pertanto per assicurarsi che il copricapo si adatti saldamente, vengono spesso utilizzate fasce sottogola e alcuni materiali come il silicone da incorporare nella progettazione del dispositivo in modo tale da prevenirne lo slittamento (Fig.14) [5].

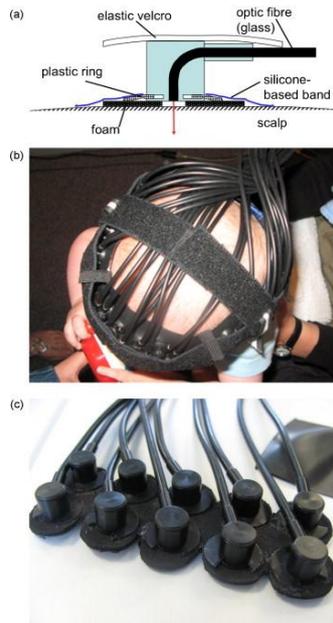


Figura 14

(a) Uno schema di optodi ad angolo retto che consente alle fibre di vetro di distendersi lungo la superficie cutanea. Sono rappresentati anche gli altri componenti, tra i quali, il cinturino elastico in tessuto e la fascia di silicone che riducono lo slittamento del copricapo.

(b) Un bambino indossa il copricapo, la fascia di tessuto è progettata per mantenere fissi gli array di canali nella posizione desiderata. La cinghia regolabile è utilizzata per mantenere il copricapo in posizione in base alle dimensioni della testa.

(c) Una foto degli optodi e delle fibre di vetro che si agganciano alla sonda [5].

3.2.3 Progettazione dello studio ed elaborazione del segnale NIRS

Innanzitutto, il progetto dello studio deve prendere in considerazione le caratteristiche temporali della risposta emodinamica (Fig.13a). Il metodo comune è presentare lo stimolo/task per un periodo di 3-30 s (o più lungo con gli stimoli uditivi durante il sonno) seguito da una condizione di controllo di durata tipicamente maggiore per consentire alla risposta emodinamica iniziata durante la condizione sperimentale di ritornare a un livello base. Questa condizione di controllo è solitamente o di stimolazione minima (ad es. silenzio durante gli studi del sonno) o progettata per provocare una stimolazione in misura minore rispetto alla condizione sperimentale (ad esempio, nel caso si stia investigando una regione cerebrale legata alla percezione sociale utilizzare un movimento meccanico che sia in contrasto con il movimento biologico). Di conseguenza, la risposta emodinamica allo stimolo/task sperimentale viene misurata in relazione alla condizione di controllo. Una considerazione importante quando si progetta uno studio con la fNIRS è l'effetto delle oscillazioni fisiologiche (ad es. dovute alla vasomotilità), che sono fonte di disturbo nel segnale misurato. Inoltre, è stato osservato che i neonati sono in grado di anticipare l'insorgenza di uno

stimolo, che potrebbe a sua volta influenzare l'inizio della risposta emodinamica. Un approccio per ridurre tali effetti fisiologici e anticipatori è quello di applicare gli stimoli sperimentali variando la durata delle prove di controllo in modo che non seguano uno schema prevedibile (cioè si introducono tempistiche imprevedibili nella somministrazione dello stimolo). Inoltre, al fine di ottenere una risposta emodinamica più attendibile, lo studio prevede la ripetizione della prova per un certo numero di volte, utilizzando stimoli presentati in maniera asincrona e con diverse durate del test di controllo per mantenere intervalli di presentazione imprevedibili. Infine, vi sono due considerazioni che influenzano il numero di prove necessarie per una data condizione sperimentale. In primo luogo, si deve stabilire il numero di ripetizioni della prova necessarie per avere una risposta adeguata. In condizioni sperimentali ideali un'unica prova sarebbe sufficiente a produrre un risposta significativa. Tuttavia, l'inadeguatezza del segnale a causa della presenza di artefatti da movimento e rumore segnale, in genere richiede la ripetizione di diverse prove. Gli studi NIRS non richiedono il numero di ripetizioni degli studi ERP in cui la percentuale di prove escluse per condizione sperimentale in studi infantili può variare da 30 a 50%. In secondo luogo, la ripetizione di più prove può portare a effetti di adattamento in cui le risposte neurali a stimoli ripetuti può diminuire nel tempo. Ad esempio in uno studio sui neonati, le prime cinque prove hanno rivelato un pattern di attivazione più ampio e diffuso rispetto alle analisi di tutte e dieci le prove. Se il rapporto segnale / rumore è adeguato, un numero inferiore di prove potrebbe fornire dati più affidabili. Pertanto potrebbe essere possibile progettare paradigmi in cui sono utilizzati relativamente pochi studi per testare più condizioni sperimentali all'interno di uno studio.

L'elaborazione del segnale acquisito (Fig.15), in seguito a una prova, prevede diverse fasi per estrarre i cambiamenti emodinamici dei dati ottici. Esse si compongono tipicamente di i) filtraggio dei dati (attraverso filtri passa-basso); ii) correzione di derive lineari (fluttuazioni molto lente che potrebbero essere di origine fisiologica); iii) conversione dell'assorbanza della luce in variazioni dell'ossigenazione dell'emoglobina (sfruttando la legge di Lambert-Beer); iv) rilevazione e rimozione di artefatti da movimento nel segnale; v) valutazione della conformità / attenzione del bambino allo stimolo (tipicamente osservata mediante una registrazione video della sessione). Tramite questo procedimento e in particolare grazie alle ultime due fasi, viene garantito che i dati acquisiti durante lo studio siano effettivamente le risposte emodinamiche dei neonati al compito assegnato e non dovute a effetti casuali spuri derivanti dal movimento o da altri stimoli che attivano la stessa regione cerebrale.

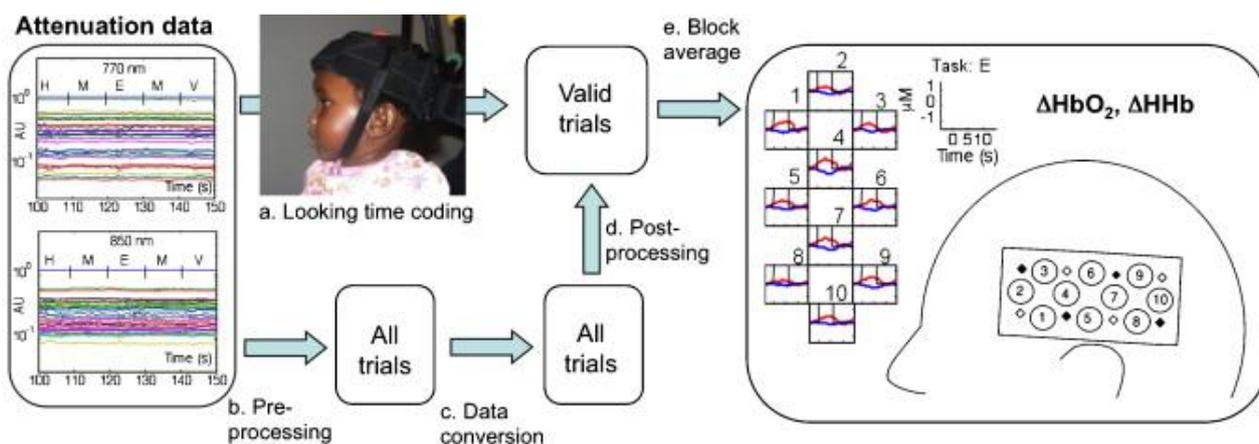


Figura 15. Diagramma di flusso del processo di analisi dei dati così come viene eseguito in laboratorio. **(a)** Il tempo di osservazione del neonato è definito da una registrazione video della sessione. **(b)** La pre-elaborazione dei dati comprende il filtraggio passa-basso, la valutazione della qualità dei dati canale per canale, estrazione dei blocchi di prova e la correzione della linea di base all'interno di ciascun blocco di prova. **(c)** La legge modificata di Beer-Lambert viene utilizzata per la conversione dei dati dall'assorbanza alla variazione di ossiemoglobina e deossiemoglobina (O_2Hb , HHb). **(d)** La post-elaborazione consiste nella rimozione automatica degli artefatti da movimento. **(e)** La media dei blocchi e l'analisi statistica vengono eseguite solo in quei canali che hanno dati di buona qualità [5].

L'elaborazione dei dati ottici di solito inizia con la valutazione della qualità dei dati di ciascun canale al fine di scartare immediatamente quelli interessati da problemi di connessione al cuoio capelluto o problemi strumentali. Tutte le fasi di elaborazione dati, salvo quella di conversione dell'assorbanza in variazioni di concentrazione dei cromofori, hanno lo scopo di eliminare i segnali di disturbo. Durante l'elaborazione del segnale sono presenti tre tipi di rumore da rimuovere: quello dovuto alla strumentazione, quello dovuto al movimento del neonato e le oscillazioni fisiologiche. Il rumore del segnale proveniente dalla strumentazione può essere determinato eseguendo studi NIRS su fantocci che simulano il tessuto e può essere solitamente rimosso usando filtri passa-basso. Gli artefatti da movimento sono solitamente caratterizzati da bruschi cambiamenti nei segnali che si verificano simultaneamente in più canali, piuttosto distinti dalla generica risposta emodinamica che normalmente risulta essere lenta e regolare.

In genere, come discusso in precedenza, un design efficiente del copricapo può ridurre la presenza di tali artefatti. Tuttavia, essendo improbabile risolvere completamente tale problema, un'opzione per trattare gli artefatti da movimento ad acquisizione terminata consiste nell'usare algoritmi di soglia per rimuovere sezioni di dati contenenti questi cambiamenti improvvisi. Risulta quindi necessario definire correttamente i valori di soglia affinché siano effettivamente preservati i risultati ottenuti dai reali cambiamenti dell'attività cerebrale. Infatti, non esiste alcun tipo di correlazione tra il tipo e la forza del movimento e l'interruzione dei dati. Tuttavia, è possibile utilizzare un sensore

di movimento per valutare le prestazioni del copricapo in termini di robustezza al movimento e anche per definire soglie per il rilevamento automatico di artefatti da movimento.

Le oscillazioni a bassa frequenza dovute ad es. alla vasomotilità (cioè oscillazioni nel tono vascolare causato da cambiamenti nello stato di contrazione della muscolatura liscia della parete dei vasi, non legati alla frequenza cardiaca o alla respirazione) si presentano invece molto simili in termini di ampiezza e frequenza alla risposta emodinamica. Per superare questa problematica, un'attenta progettazione dello studio e della frequenza di presentazione dello stimolo risulta necessaria al fine di minimizzare la possibilità di accoppiamento tra attività funzionale e oscillazioni cerebrovascolari spontanee. Un metodo utilizzato per consentire il disaccoppiamento tra cambiamenti vascolari sistemici e la risposta emodinamica cerebrale, consiste nell'acquisire i dati sistemici mediante un sistema di misurazione indipendente e campionare più volumi con la NIRS in modo che le misurazioni allo strato superficiale (con piccole separazioni sorgente-rilevatore) possano essere sottratte dalle misurazioni a livello della corteccia cerebrale (separazioni sorgente-rilevatore più grandi). Un altro passo importante nella sequenza di elaborazione dei dati è la rimozione della deriva della linea di base tra le prove all'interno della stessa sessione. Mediare gli andamenti nel tempo di più prove con linee di base diverse può ridurre la risposta emodinamica media. La correzione della linea di base può essere effettuata mediante filtraggio passa-alto o semplicemente rimuovendo una linea appropriata lungo l'intero studio o all'interno di ciascun blocco (un blocco è tipicamente definito come comprendente il periodo degli ultimi secondi della prova (trial) di controllo immediatamente precedente la prova sperimentale, la prova sperimentale, e la prova di controllo seguente).

Pertanto, l'attenta progettazione delle fasi di elaborazione dati e la registrazione simultanea da array di canali multipli ha migliorato il potenziale della fNIRS; non solo ha permesso la ricostruzione delle immagini funzionali ma ha consentito anche di incorporare correzioni ai possibili eventi indesiderati. Infine si sottolinea che la struttura e le problematiche dell'esperimento fNIRS qui descritte in relazione all'applicazione su neonati, sono valide anche per applicazioni su soggetti adulti [5].

3.3 La fNIRS nello studio della funzione motoria e cognitiva nei neonati pretermine

3.3.1 I neonati pretermine

La nascita pretermine è la principale causa di mortalità infantile in quasi tutti i paesi sviluppati del mondo. Sebbene i progressi nella medicina perinatale abbiano contribuito ad un aumento del tasso di sopravvivenza dei neonati, i disturbi delle funzioni cerebrali tra i neonati sopravvissuti sono ancora un grande problema da affrontare. La maggior parte delle gravidanze è di quaranta settimane, ma l'età gestazionale (GA) dei neonati pretermine è inferiore alle trentasette settimane.

Lo sviluppo incompleto di alcuni organi può far sì che i neonati pretermine non siano in grado di adattarsi adeguatamente all'ambiente extrauterino e siano quindi soggetti a ipossia cerebrale e infezioni. Questi fenomeni possono portare a paralisi cerebrali, con conseguenti rischi di disabilità e ripercussioni sulla salute fisica e sulle funzioni cognitive degli individui anche a lungo termine.

Le tecniche di imaging cerebrale possono fornire importanti informazioni sulla crescita del cervello e comprendere la connessione tra sviluppo cerebrale e comportamento umano.

Le tecniche tradizionali di imaging cerebrale come la risonanza magnetica funzionale (fMRI) o l'elettroencefalografia (EEG) non risultano particolarmente adatte agli studi infantili. In primo luogo, la fMRI ha una bassa tolleranza ai movimenti della testa e, poiché risulta quasi impossibile per un neonato rimanere fermo per un lungo periodo di tempo, l'esame deve essere eseguito mentre il neonato dorme. L'alternativa è sedare o anestetizzare il neonato prima di eseguire la scansione, il che può rendere i genitori restii a consentire uno studio fMRI sul figlio. In secondo luogo, un compito cognitivo è il metodo più efficace per studiare lo sviluppo cerebrale, ma per poter eseguire tali compiti è necessario che il neonato sia sveglio. In terzo luogo, lo studio dei neonati pretermine richiede un monitoraggio a lungo termine con uno strumento portatile e che possa essere utilizzato in diversi contesti. Infine, il costo delle apparecchiature è elevato. L'EEG presenta minori limitazioni ed è maggiormente accettata dai genitori rispetto alla fMRI. Tuttavia, a causa della bassa localizzazione spaziale, non risulta particolarmente adatta per studi sullo sviluppo cerebrale dei neonati pretermine. Un'accurata localizzazione delle aree attive nel cervello è fondamentale negli studi sulle funzioni motorie e cognitive.

Una tecnica di imaging cerebrale che è risultata essere idonea all'utilizzo nei neonati pretermine è la spettroscopia funzionale nel vicino infrarosso. La fNIRS è stata inizialmente utilizzata per studiare i neonati già tra la fine degli anni '70 e la prima metà degli anni '80, ed è ora ampiamente utilizzata nella ricerca e negli ambienti clinici per monitorare la saturazione cerebrale di ossigeno nei neonati

pretermine in varie condizioni, come in caso di apnea, in presenza di emorragia intraventricolare o valutare gli effetti terapeutici. Molti studi hanno confermato la fattibilità dell'uso di fNIRS per valutare l'autoregolazione cerebrale, la quale è associata al verificarsi di lesioni cerebrali. L'infanzia, infatti, è la fase di crescita più importante nella vita di un individuo, nella quale si sviluppano le capacità motorie, uditive e visive. Negli ultimi anni, alcune ricerche hanno utilizzato la fNIRS per confrontare l'ossigenazione cerebrale nei neonati pretermine e a termine con lo scopo di valutare le funzioni cerebrali nei neonati prematuri e indagarne le modalità di sviluppo cerebrale. È stato anche dimostrato che nei casi in cui siano presenti lesioni cerebrali, con compromissioni motorie o cognitive, l'impiego della fNIRS permette anche di identificare e diagnosticare precocemente questi deficit, in modo che i neonati colpiti possano beneficiare per tempo di un apposito intervento.

Gli studi con la fNIRS condotti con lo scopo di valutare la funzione cerebrale nei neonati pretermine si sono interessati a tre specifiche funzioni: le prestazioni motorie, la percezione del linguaggio e il riconoscimento del volto. Negli esperimenti si sono considerati sia stati di sonno che veglia, e in particolare sono state evidenziate le differenze delle risposte emodinamiche cerebrali tra neonati prematuri e a termine quando sottoposti agli stessi stimoli/task [20].

3.3.2 Le prestazioni motorie

Tra la ventesima e la trentasettesima settimana la crescita del feto avviene rapidamente e, lo sviluppo del sistema motorio si consolida nel corso della seconda metà della gravidanza. Pertanto, l'area deputata al controllo motorio è una tra le più colpite dalla nascita pretermine e le conseguenze possono protrarsi per il resto della vita.

È noto che le prestazioni motorie sono strettamente associate allo sviluppo della corteccia sensorimotoria ma, tramite la fNIRS è stato possibile avanzare l'ipotesi che le disabilità motorie siano associate all'ipossia cerebrale post-parto. Inoltre l'impiego della fNIRS è stato fondamentale per indagare il ruolo dell'area sensorimotoria nel comportamento motorio. Studi condotti su neonati sani e pretermine (età gestazionale: 24-35 settimane) durante il sonno sedato hanno mostrato delle differenze nei cambiamenti delle concentrazioni di ossiemoglobina (O_2Hb), deossiemoglobina (HHb) e emoglobina totale (tHb). Eseguendo movimenti passivi del ginocchio sui neonati è stato rilevato un aumento di O_2Hb e tHb nell'area sensorimotoria primaria di tutti i neonati, mentre la deossiemoglobina (HHb) diminuiva in sei su sette neonati in risposta al movimento controlaterale del ginocchio. Durante il movimento ipsilaterale del ginocchio invece, O_2Hb e tHb hanno mostrato cambiamenti più lievi.

Aggiungendo il movimento passivo del gomito, sia per i neonati pretermine che per quelli sani, studi successivi (età gestazionale: 24-41 settimane) hanno mostrato una differenza significativa nell'area e nel grado di risposta tra movimenti controlaterali e ipsilaterali. In particolare i risultati della fNIRS hanno evidenziato che il movimento controlaterale del ginocchio e del gomito produce un aumento di O₂Hb in un'area più ampia della corteccia sensomotoria, mentre il movimento ipsilaterale causa piccoli cambiamenti di O₂Hb in un'area più piccola.

Oltre al comportamento motorio passivo nello stato di sonno, la fNIRS è stata utilizzata dai ricercatori anche per identificare l'attività cerebrale nelle aree sensomotorie di neonati svegli. Confrontando le risposte emodinamiche, il risultato è stato che durante la stimolazione sensomotoria la risposta all'attività cerebrale nei neonati a termine era controlaterale, mentre la risposta nei neonati pretermine era prevalentemente bilaterale. Il gruppo pretermine ha anche mostrato una latenza più lunga per la risposta emodinamica. Tuttavia, i neonati pretermine hanno mostrato un'attività bilaterale più ampia a 6 mesi, e una risposta di attivazione esclusivamente controlaterale e più locale a 12 mesi pur continuando a mostrare un'area di attivazione più ampia rispetto al gruppo a termine della stessa età.

Gli studi condotti, sia nello stato di veglia che nel sonno sedato, hanno dimostrato non solo che le funzioni sensomotorie nei neonati pretermine possono essere visualizzate e valutate con la fNIRS, ma anche che il cervello dei neonati pretermine può essere meno specializzato rispetto ai neonati a termine [20].

3.3.3 La percezione del linguaggio

Il disturbo del linguaggio è una delle gravi conseguenze che si possono verificare nel neonato a seguito di una nascita pretermine. Sono stati condotti studi col fine di comprendere i meccanismi fisiologici alla base delle funzioni cerebrali deputate alla percezione del linguaggio. Utilizzando la fNIRS sono state registrate risposte corticali nelle aree temporali e frontali a stimoli uditivi di una voce umana in neonati pretermine di circa trenta settimane, ed è stato riscontrato che potevano discriminare due sillabe (ba / ga) e il genere della voce umana (maschio / femmina). Inoltre, quando i neonati pretermine sono stati esposti a stimoli uditivi delle loro madri e delle infermiere, la risposta nell'area frontale destra risultava differente. Questo potrebbero significare che hanno la capacità di discriminare la voce delle madri da quelle delle infermiere. Esaminando l'attività cerebrale e la connettività funzionale in risposta al linguaggio, l'attività cerebrale nei neonati

pretermine era più elevata nella regione temporale destra rispetto ai neonati a termine e anche la connettività interemisferica risultava maggiore.

Questo è stato particolarmente evidente nelle regioni note per essere coinvolte nell'elaborazione del parlato, come le regioni temporali e temporo-parietali, il che ha suggerito che i neonati pretermine seguano diverse modalità di sviluppo rispetto ai neonati a termine.

La ricerca della fNIRS su adulti e neonati ha indicato che il linguaggio in genere provoca un aumento di O₂Hb e una leggera diminuzione di HHb. Tuttavia uno studio [si veda la review 20] ha mostrato che i neonati pretermine (età gestazionale: 25-36 settimane) non sempre presentano lo stesso andamento di cambiamento di emoglobina come i bambini a termine nella risposta a contrasti fonetici o prosodici. Tuttavia, la percentuale di neonati pretermine con andamenti emodinamici atipici diminuiva e infine diventava uguale a quella dei bambini a termine quando veniva raggiunta l'età corretta di 38 settimane. Questi risultati indicano che la corteccia cerebrale dei neonati pretermine potrebbe inizialmente non essere completamente funzionante e che le funzioni cerebrali di più alto livello nei neonati si sviluppano gradualmente prima della data di parto prevista. Lo studio dell'emodinamica cerebrale in risposta alla percezione del linguaggio nei neonati pretermine è importante per la diagnosi precoce e per intervenire sui deficit di disturbo del linguaggio [20].

3.3.4 Il riconoscimento del volto

La capacità di distinguere e riconoscere i volti è una abilità necessaria per l'interazione sociale. Alla nascita, i neonati sono già in grado di distinguere tra motivi facciali e non facciali. I circuiti corticali iniziano a svilupparsi intorno ai due mesi, ma solo tra i sei e gli otto mesi i neonati sono in grado di identificare un volto. Studi con risonanza magnetica funzionale hanno evidenziato che le aree principali deputate al riconoscimento dei volti sono il lobo temporale destro, la corteccia prefrontale e il giro fusiforme. La lesione di queste aree non solo può essere associata a compromissione del riconoscimento del volto, ma potrebbe influire successivamente sulle interazioni sociali portando a stati di depressione o ansia. La spettroscopia funzionale nel vicino infrarosso ha permesso di misurare l'attività cerebrale durante compiti di elaborazione del volto monitorando le variazioni di concentrazione di O₂Hb, HHb e tHb.

È stato scoperto che, confrontando le risposte emodinamiche corticali a stimoli con volti noti e sconosciuti tra neonati pretermine e a termine, i primi mostravano una risposta emodinamica agli stimoli completamente opposta rispetto ai neonati a termine. In particolare i neonati pretermine mostravano una risposta emodinamica significativamente più piccola nell'area fronto-temporale

destra quando guardavano il volto della madre rispetto a un volto sconosciuto, esattamente l'opposto rispetto a quanto osservato nei bambini a termine. Questi risultati hanno suggerito che i neonati pretermine hanno processi di riconoscimento del volto diversi rispetto ai neonati a termine [20].

3.3.5 Conclusioni degli esperimenti

L'utilizzo della spettroscopia funzionale nel vicino infrarosso negli studi sui neonati pretermine ha permesso di analizzare la relazione tra l'attività cerebrale e lo sviluppo motorio e cognitivo. Le diverse risposte emodinamiche riscontrate nei neonati pretermine rispetto ai neonati a termine a parità di stimolo possono avere innumerevoli cause. Il fattore determinante riguarda proprio lo sviluppo cerebrale degli ultimi mesi, in questo periodo si ha il completamento della crescita del cervello che, la nascita prematura del neonato non consente. Le risposte emodinamiche agli stimoli risultano essere necessariamente influenzate dall'imaturità cerebrale e dalla minor esperienza intrauterina rispetto a un neonato a termine. Viene sottolineato come i neonati pretermine vengano curati e monitorati in unità di terapia intensiva, perciò a differenza dei neonati a termine ricevono una maggior quantità di stimoli uditivi e visivi. Di conseguenza, l'esperienza extrauterina potrebbe avere un forte impatto sulle funzionalità cerebrali e potrebbe influenzare notevolmente le risposte emodinamiche al linguaggio e, alla presentazione di volti durante le indagini con la fNIRS. Infine, l'angiogenesi e le reti neurali non completamente sviluppate dei neonati pretermine possono portare a cambiamenti anomali di O_2Hb e HHb , in quanto l'apporto di ossigeno successivo all'attività cerebrale (che ne causa una diminuzione), non viene erogato in maniera efficiente nell'area dove è avvenuta l'attività neuronale.

Per quanto riguarda le prestazioni motorie, differenze nella lateralizzazione delle risposte evocate nella corteccia sensomotoria dei neonati a termine e pretermine indicano che un notevole grado di lateralizzazione funzionale si sviluppa durante i primi mesi di vita postnatale. Negli studi sulla percezione del linguaggio i risultati mostrano come dopo le trentanove settimane i neonati pretermine iniziano a mostrare lateralità funzionale nella corteccia uditiva come nei neonati a termine e negli adulti (il fonema viene generalmente elaborato nell'area temporale sinistra, mentre la prosodia attiva l'area temporale destra).

Pertanto, gli studi con la fNIRS hanno suggerito che, sebbene le funzioni cerebrali dei neonati pretermine possano inizialmente non essere completamente funzionanti, in un momento successivo queste funzioni cerebrali potrebbero svilupparsi gradualmente sino ad avere le stesse caratteristiche

dei neonati a termine. Tuttavia i neonati pretermine sono a rischio di deficit cognitivi e disordini dello sviluppo; quindi la possibilità di studiare le funzioni cerebrali precocemente nei neonati pretermine è di fondamentale importanza. Tra le tecniche di neuroimaging, la spettroscopia funzionale nel vicino infrarosso ha permesso di comprendere e studiare il cervello dei neonati pretermine. Ad oggi, la fNIRS rappresenta anche un metodo utile per lo screening precoce e per identificare i periodi decisivi per l'intervento nello sviluppo atipico, riducendo così il rischio di disturbi motori e cognitivi e minimizzando l'impatto della nascita pretermine sui neonati. Attualmente, sono presenti ancora molti limiti e, a parte le funzioni cerebrali qui analizzate, i meccanismi alla base dello sviluppo di altre funzioni cerebrali non sono ancora stati esplorati. Ulteriori studi con la fNIRS sono necessari per comprendere più accuratamente i meccanismi delle funzioni cerebrali nei neonati pretermine [20].

CAPITOLO 4

L'USO DELLA fNIRS DURANTE IL CAMMINO IN PAZIENTI NEUROLOGICI

4.1 Lo sviluppo della fNIRS negli studi del cammino

La deambulazione è una delle funzioni motorie più importanti nell'uomo che spesso viene compromessa a causa di deficit neurologici (ad esempio conseguenti l'ictus) o malattie neurodegenerative, come il morbo di Parkinson. In tutto il mondo quasi i due terzi delle persone con più di settant'anni soffrono di disturbi dell'andatura e, a causa del progressivo invecchiamento della popolazione, questa situazione è destinata ad aumentare nei prossimi anni. Sebbene le basi fisiologiche della deambulazione siano note, i meccanismi fisiopatologici nei pazienti neurologici sono stati descritti in maniera molto limitata. La causa risiede nella difficoltà di valutare in vivo i processi neuronali durante l'esecuzione di movimenti.

Negli ultimi venti anni, la risonanza magnetica funzionale (fMRI) è stata lo strumento maggiormente utilizzato per studiare i meccanismi alla base del controllo del movimento, nonché i disturbi del movimento. La fMRI consente di misurare il segnale dipendente dal livello di ossigenazione del sangue (BOLD, Blood Oxygenation Level-Dependent) che, basandosi sulle variazioni delle concentrazioni di deossiemoglobina (HHb), fornisce una misura indiretta dell'attività funzionale del cervello umano. I pattern di attivazione / disattivazione e connettività tra le regioni del cervello possono essere rilevati con una risoluzione spaziale molto elevata sia per le strutture corticali che per quelle sottocorticali. Questa tecnica, tuttavia, è caratterizzata da grandi limitazioni e vincoli relativi agli artefatti da movimento e solo piccoli movimenti sono consentiti all'interno dello scanner. Inoltre, comporta notevoli compromessi sia sulla progettazione sperimentale che sui criteri di inclusione / esclusione. Per superare tali limitazioni sono state provate molteplici soluzioni. Per esempio, molti studi di neuroimaging sono stati basati sull'immaginazione di condizioni motorie. Tuttavia, l'imaging può essere diverso da soggetto a soggetto, e la camminata immaginata e quella effettiva coinvolgono reti cerebrali diverse. Altri autori hanno suggerito l'uso della realtà virtuale eseguendo alcuni tentativi con la fMRI. Ulteriori procedimenti per studiare i meccanismi coinvolti nel controllo della deambulazione hanno utilizzato compiti surrogati eseguiti nello scanner come il movimento dei piedi (dorso-flessione della caviglia), o l'acquisizione dell'attività cerebrale durante la deambulazione utilizzando i radiotraccianti nella tomografia ad emissione di positroni (PET) che permettono l'identificazione

retrospettiva dei pattern di attivazione, sebbene vi siano alcune incertezze e bassa risoluzione spaziale e temporale. Pertanto, finora non esiste un modo efficace per valutare in modo non invasivo i correlati neurofisiologici dei processi di deambulazione nei disturbi del cammino. La spettroscopia funzionale nel vicino infrarosso (fNIRS) sta diventando un importante strumento di ricerca per valutare l'attività funzionale in individui con lesioni cerebrali (pazienti neurologici e psichiatrici) o per studiare particolari compiti.

Come abbiamo visto in questo elaborato la fNIRS è una tecnica di neuroimaging non invasiva che, analogamente alla fMRI, misura la risposta emodinamica per dedurre l'attività neurale sottostante. Tuttavia, la fNIRS ha una serie di notevoli vantaggi a differenza della fMRI: (I) non pone vincoli di immobilità, (II) è portatile, (III) consente la registrazione durante la camminata reale, (IV) consente registrazioni di lunga durata, (V) non produce alcun rumore, (VI) rende possibile lo studio dell'attività cerebrale durante il sonno, (VII) consente di ottenere un quadro più completo dell'accoppiamento neurovascolare in quanto misura i cambiamenti della concentrazione di O₂Hb e HHb con elevata risoluzione temporale.

In generale un'alta risoluzione temporale non è obbligatoria per lo studio della risposta emodinamica la cui dinamica richiede almeno 3-5 secondi, ma può essere utile per lo studio di attività emodinamica transitoria come rilevare le sottili variazioni temporali nella latenza della risposta emodinamica in diverse condizioni sperimentali.

Il principale svantaggio di fNIRS rispetto a fMRI è la sua risoluzione spaziale inferiore (pochi centimetri sotto il cranio) e la sua mancanza di sensibilità alle regioni subcorticali. Tuttavia, questo potrebbe essere considerato una limitazione minore, in quanto vi è un grande numero di prove che suggeriscono sia che durante la deambulazione si attivano meccanismi corticali, sia che l'organizzazione del sistema motorio è distribuita lungo ampie regioni cerebrali, e infine, che la funzione delle strutture subcorticali è riflessa nella corteccia cerebrale.

Nel complesso, la fNIRS ha dimostrato di consentire indagini affidabili delle funzioni di deambulazione in soggetti sani giovani e anziani, mentre nei disturbi dell'andatura questa tecnica funzionale di neuroimaging sta emergendo come un'area promettente di ricerca che contribuirebbe a caratterizzare meglio i meccanismi fisiopatologici in vivo alla base del controllo dinamico posturale [21].

Nel seguito del capitolo, viene esaminato uno studio [23] che ha utilizzato la fNIRS per investigare le attivazioni corticali durante il cammino in pazienti post-ictus (e per confronto in soggetti sani) in condizioni di Single Task e di Dual Task (cioè esecuzione del cammino mentre si effettua contemporaneamente un altro compito), nonché la fNIRS e la fMRI per investigare le attivazioni nel cammino simulato nelle stesse due condizioni.

4.2 Studio dell'attivazione corticale durante il cammino single-task e dual-task in pazienti post-ictus.

4.2.1 Introduzione allo studio

L'ictus si verifica quando un insufficiente apporto di sangue cerebrale provoca la morte cellulare. Vi sono due tipi principali di ictus: quello ischemico, causato dalla mancanza di flusso sanguigno cerebrale, e quello emorragico causato da emorragie. Nell'ictus ischemico l'afflusso di sangue cerebrale viene interrotto dal restringimento dei vasi causato da aterosclerosi o embolia. L'ictus emorragico è causato da ipertensione o rottura dell'aneurisma e, il flusso sanguigno si riduce a causa della perdita di sangue diretta o della compressione dei vasi. In entrambi i casi, si osserva un calo significativo dell'afflusso di sangue e la riduzione dell'ossigenazione cerebrale provoca lesioni alle unità neurovascolari dell'area colpita.

L'ictus è una delle principali cause di morte e disabilità in tutto il mondo. I sopravvissuti sono generalmente colpiti dal deterioramento o dalla perdita di alcune funzioni, ad esempio, delle funzioni sensomotorie che comporta debolezza motoria, compromissione del controllo motorio volontario, spasticità, incoordinazione, aprassia, perdita sensoriale, disfagia e disartria [22]. La maggior parte dei sopravvissuti all'ictus non recupera la capacità locomotoria necessaria per svolgere le attività quotidiane o la deambulazione. Alcune delle complesse situazioni che si verificano abitualmente nella vita possono essere studiate in laboratorio usando paradigmi Dual-Task, (DT), in cui mentre l'individuo esegue il cammino deve contemporaneamente eseguire un compito cognitivo. Infatti, camminare eseguendo un altro compito (ad esempio, parlare) può risultare impegnativo per molti pazienti neurologici.

Dati recenti provenienti da studi di imaging mostrano che la deambulazione stessa richiede risorse cerebrali utilizzate per il funzionamento cognitivo, come la corteccia prefrontale (PFC). Mentre gli effetti comportamentali del cammino DT sono ben descritti, le basi neurali dell'interferenza cognitiva-motoria durante il cammino DT nei pazienti neurologici non lo sono. Evidente da studi di lesioni cerebrali e studi di imaging indicano che il dual-task coinvolge la PFC. Pertanto, considerando le prove in adulti con età avanzata, i ricercatori dello studio in esame [23] hanno ipotizzato che durante il cammino nei pazienti post-ictus l'attività della PFC fosse legata alle prestazioni DT. Nello studio esaminato [23], per valutare l'attività cerebrale della corteccia prefrontale è stata utilizzata la spettroscopia funzionale nel vicino infrarosso. Studi precedenti negli anziani eseguiti con fNIRS hanno evidenziato il coinvolgimento della PFC sia durante il solo

cammino che nel cammino DT, e una diminuzione nel controllo del cammino associata all'avanzare dell'età. Tuttavia, sebbene la fNIRS offra il vantaggio di poter acquisire dati durante il cammino reale, presenta una risoluzione spaziale modesta e una penetrazione di profondità limitata. Pertanto, al fine di studiare l'attività della corteccia prefrontale e le relazioni tra l'attività di PFC e le misure relative al cammino durante i compiti Single-Task (ST, cioè solo cammino) e DT, è stato condotto uno studio con individui post-ictus e controlli sani che consisteva in due esperimenti. Nel primo esperimento è stata utilizzata la fNIRS per esaminare l'attività cerebrale della PFC durante il cammino reale in condizioni ST e DT. Nel secondo esperimento invece, è stata utilizzata una registrazione simultanea tra la fNIRS e la risonanza magnetica funzionale (fMRI) durante il cammino simulato in condizioni ST e DT, per esplorare la distribuzione dell'attività cerebrale. Il compito cognitivo aggiuntivo nel cammino DT consisteva nel conteggio ed è stato anche eseguito dai soggetti in assenza di cammino (reale o simulato) in entrambi gli esperimenti.

I criteri di inclusione per il gruppo di pazienti neurologici erano i) l'ictus si fosse verificato almeno sei mesi prima e fosse stabile dal punto di vista medico; ii) La capacità di camminare per almeno cinque minuti con o senza ausili; iii) i pazienti non dovevano presentare alcuna disabilità cognitiva, sensoriale o psicologica che potesse impedire il corretto svolgimento dello studio.

Nell'esperimento 2, i criteri di inclusione, comprendevano, oltre ai precedenti la capacità di eseguire un task di tapping bilaterale con i piedi e assenza di controindicazioni per esame di risonanza magnetica.

L'analisi statistica sui dati comportamentali (esperimento 1) è stata eseguita mediante un'analisi della varianza (ANOVA, Analysis of Variance) con fattori *gruppo* (2 livelli = controlli sani, pazienti post-ictus) e *task* (2 livelli = ST, DT qui ST si riferisce a seconda dei casi al solo conteggio o al solo cammino, a seconda che vengano valutate le performance di conteggio o di cammino). Per l'analisi statistica dei dati della fNIRS (sia nell'esperimento 1 che nell'esperimento 2), è stata calcolata la media dei canali attivi per ciascun compito e lato (PFC sinistra e destra). Quindi è stata condotta un'ANOVA con fattori *task* (3 livelli: conteggio, cammino ST reale o simulato, cammino DT reale o simulato), *emisfero* (2 livelli: PFC emisfero destro, PFC emisfero sinistro) e *gruppo* (2 livelli: soggetti di controllo, pazienti post-ictus) [23]. Per quanto riguarda il secondo esperimento, l'analisi delle immagini fMRI è avvenuta in due passi. Dapprima l'acquisizione dei dati NIRS è stata sincronizzata con le misurazioni fMRI utilizzando un trigger dallo scanner MRI. Quindi i segnali fMRI (immagini T2 pesate) sono state elaborate usando il software FMRIB Software Library [23].

4.2.2 Esperimento 1: fNIRS durante il cammino reale

4.2.1.1 Procedura sperimentale

Per prima cosa, ai partecipanti (diciannove pazienti cronici post-ictus e venti controlli sani) sono stato spiegati i compiti cognitivi che avrebbero dovuto affrontare. Ogni partecipante completava le prove di cammino, in condizioni ST o DT, su un tapis roulant alla velocità di cammino autonomamente scelta dal soggetto. Ogni compito consisteva in un periodo di 30 secondi ripetuto cinque volte e alternato a periodi di riposo o conteggio (da fermo) in un ordine casuale (Fig.16A). Per evitare l'anticipazione dell'inizio dei periodi di cammino, la durata dei periodi di riposo variava in maniera casuale da 25 a 45 secondi. Durante le prove DT, ai partecipanti è stato chiesto di contare all'indietro di sette numeri a partire da un numero compreso tra 291 e 299 e ai partecipanti non sono state date indicazioni relativamente a quali compiti dare la priorità durante lo studio [23].

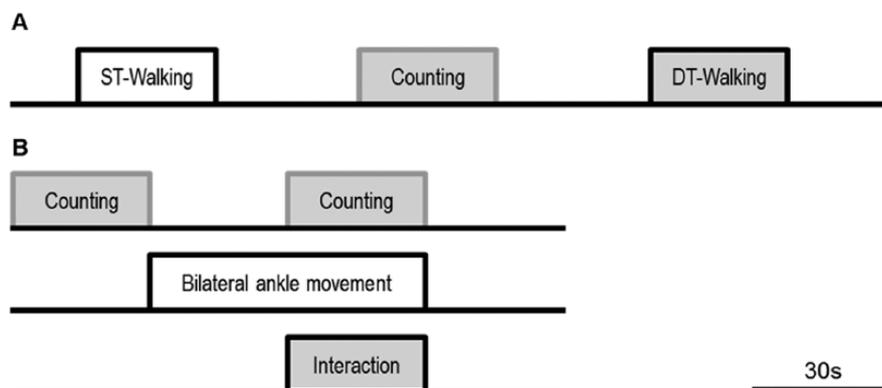


Figura 16. Procedura sperimentale: **(A)** Esperimento 1. I partecipanti eseguivano 5 prove per ciascuno dei seguenti compiti; camminare (ST-walking), contare mentre si è in piedi (Counting) e contare mentre si cammina (DT-walking). Ogni prova consisteva in un periodo di attività di 30 secondi e si alternava con periodi di riposo in un ordine pseudo-casuale. **(B)** Esperimento 2; un ciclo ABCD. Questo ciclo è stato ripetuto 6 volte per una durata totale di 12 minuti. La riga superiore indica il compito di conteggio dei partecipanti; la seconda riga indica il movimento dei piedi nel cammino simulato; la terza riga indica la combinazione dei due compiti. (ST, singolo compito; DT, doppio compito) [23].

4.2.1.2 Acquisizione dei dati

L'attività della corteccia prefrontale è stata misurata con il sistema NIRS multicanale ad onda continua (Oxyton Mk III) che utilizzava due lunghezze d'onda a 782 e 859 nm per stimare le variazioni relative di concentrazione rispettivamente dell'emoglobina ossigenata (O_2Hb) e deossigenata (HHb). Il copricapo utilizzato consisteva in due supporti di plastica identici composti da 4 optodi ciascuno (due sorgenti e due rivelatori) a formare 4 canali con distanza sorgente-rilevatore pari a 30 mm. Il dispositivo è stato posizionato sulla fronte di ciascun partecipante (Fig.17) coprendo l'area di collegamento tra Fp1, F3 e F7 e l'area di collegamento tra Fp2, F4 e F8 secondo il sistema internazionale 10-20, corrispondente rispettivamente alla PFC sinistra e destra. I segnali ottici provenienti dagli otto canali sono stati campionati a 10 Hz e memorizzati in base alla posizione e alla lunghezza d'onda. Successivamente i dati ottici sono stati usati per quantificare i cambiamenti relativi all'attività di O_2Hb e HHb in base alla legge modificata di Beer-Lambert. Per quanto riguarda i parametri spazio-temporale del cammino la valutazione è stata permessa tramite l'impiego di una unità di misura inerziale comprendente accelerometro triassiale, giroscopio e magnetometro, attaccata alla cute a livello della quarta vertebra lombare. Le prestazioni del conteggio all'indietro sono state valutate in base al rateo (numeri elencati per 30 secondi) e alla precisione (percentuale di risposte corrette). Infine, è stata misurata la pressione arteriosa sistemica all'inizio e dopo la fine di ogni prova [23].

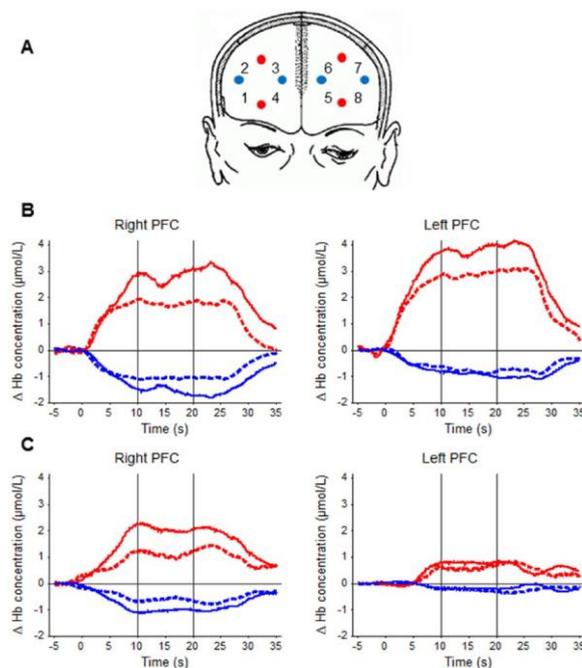


Figura 17. Misure mediante fNIRS: (A) Rappresentazione schematica della posizione della sonda NIRS. I punti rossi (trasmettitori) e blu (rivelatori) indicano le posizioni degli optodi, mentre i numeri indicano le posizioni dei canali posizionati a metà via tra coppie

trasmettitore-rilevatore vicine. La sonda fNIRS copriva l' area relativa alle posizioni Fp1, F3 e F7 e l'area relativa alle posizioni Fp2, F4 e F8, secondo il sistema elettroencefalografico internazionale 10-20 che è corrispondente alla corteccia prefrontale (PFC) nell'emisfero destro e sinistro. **(B e C)** Esempi rappresentativi dell'attività della PFC in un paziente con ictus (B) e in controllo sano (C) nel cammino ST (linea tratteggiata) e nel cammino DT (linea continua). Andamento temporale della media su tutti i blocchi mediata su tutte le posizioni misurate della sonda (PFC sinistra e destra). L'asse y mostra le variazioni di concentrazione relative dell'emoglobina in millimoli per litro. L'aumento di concentrazione di O₂Hb è indicato dalla linea rossa, mentre la diminuzione di HHb dalla linea blu. Le linee verticali indicano la finestra temporale di 10 secondi utilizzata per le ulteriori analisi statistiche [23].

4.2.1.3 Elaborazione dati

L'elaborazione dei dati della fNIRS è stata eseguita tramite un software (OxySoft) che ha consentito la preelaborazione standard e l'analisi statistica a livello individuale. La rimozione del rumore ad alta frequenza, come la pulsazione cardiaca, dai segnali acquisiti è stata effettuata tramite un filtraggio passa-basso con frequenza di taglio pari a 0,67 Hz. Per quanto riguarda l'analisi dell'attività cerebrale, sono stati selezionati i 10 secondi centrali del test (il tempo tra 6 e 16 secondi dopo l'insorgenza dello stimolo) e le variazioni di concentrazione media all'interno di questa finestra temporale sono state utilizzate per ulteriori analisi. Per l'identificazione dei canali che hanno mostrato attività cerebrale, le variazioni di concentrazione medie sono state confrontate con l'attivazione media di baseline mediante t-test per tutti i task, così da definire i canali attivi come statisticamente diversi rispetto alla baseline. I parametri spaziali del cammino sono stati successivamente stimati secondo il modello di andatura a pendolo inverso [23].

4.2.1.4 Risultati

Per quanto riguarda i dati comportamentali (Tab.8), l'analisi statistica ha rivelato un effetto (main effect) sia del fattore *compito* sia del fattore *gruppo* sulla velocità di conteggio (nel DT tutti i soggetti erano più lenti che nell' ST, si tenga conto che qui ST indica il conteggio da solo; inoltre i pazienti post-ictus erano in generale più lenti dei controlli). Per quanto riguarda l'accuratezza nel conteggio, risulta che non vi è differenza dovuta al task (single o dual), ma i pazienti con ictus erano meno accurati dei soggetti di controllo. Successivamente sono stati valutati gli effetti del task cognitivo sul cammino, evidenziando effetti significativi sulla lunghezza e cadenza del passo sia in base al compito che al gruppo (Tab.8).

	Stroke (N = 19)		Control (N = 20)				
	ST	DT	ST	DT	Task Sig.	Group Sig.	Interaction Sig.
Counting rate	17.6 ± 8.7	16.1 ± 8.2	24.5 ± 8.8	24.4 ± 8.7	.046	.009	.109
Counting accuracy	84.3 ± 13.8	81.4 ± 20.1	97.2 ± 2.4	94.8 ± 5.6	.158	.001	.894
Stride length (m)	0.71 ± 0.26	0.76 ± 0.25	1.08 ± 0.33	1.09 ± 0.30	.015	.001	.061
Cadence (steps/min)	67.4 ± 21.1	63.0 ± 23.3	100.7 ± 23.3	97.2 ± 25.3	.001	.000	.615

Tabella 8. Cambiamenti relativi al Dual-task nelle prestazioni di conteggio e nelle misure spazio-temporali del cammino. Abbreviazioni: ST, singolo compito; DT, doppio compito; Sig., significatività. I valori in grassetto indicano la significatività statistica [23].

Inoltre, i dati della fNIRS hanno mostrato un effetto significativo del task sui cambiamenti di concentrazione di O₂Hb che ha mostrato un maggiore aumento (riflettendo una maggiore attività della PFC) durante il cammino DT rispetto al cammino ST (e al compito di counting da solo) per entrambi i gruppi e ed emisferi indagati (Fig.18). Allo stesso modo, si è osservato un effetto significativo del task sui cambiamenti di concentrazione della HHb che diminuiva maggiormente (riflettendo una maggiore attività della PFC) durante il cammino DT rispetto al cammino ST (e al compito di counting da solo) per entrambi i gruppi e gli emisferi (Fig.18). Sia per i cambiamenti di O₂Hb che di HHb non ci sono stati effetti significativi del fattore di gruppo né del fattore emisfero né si sono riscontrate interazioni significative tra compito, gruppo ed emisfero. Infine, non vi sono stati cambiamenti significativi nella pressione arteriosa sistemica o nella frequenza cardiaca dovuti al cammino [23].

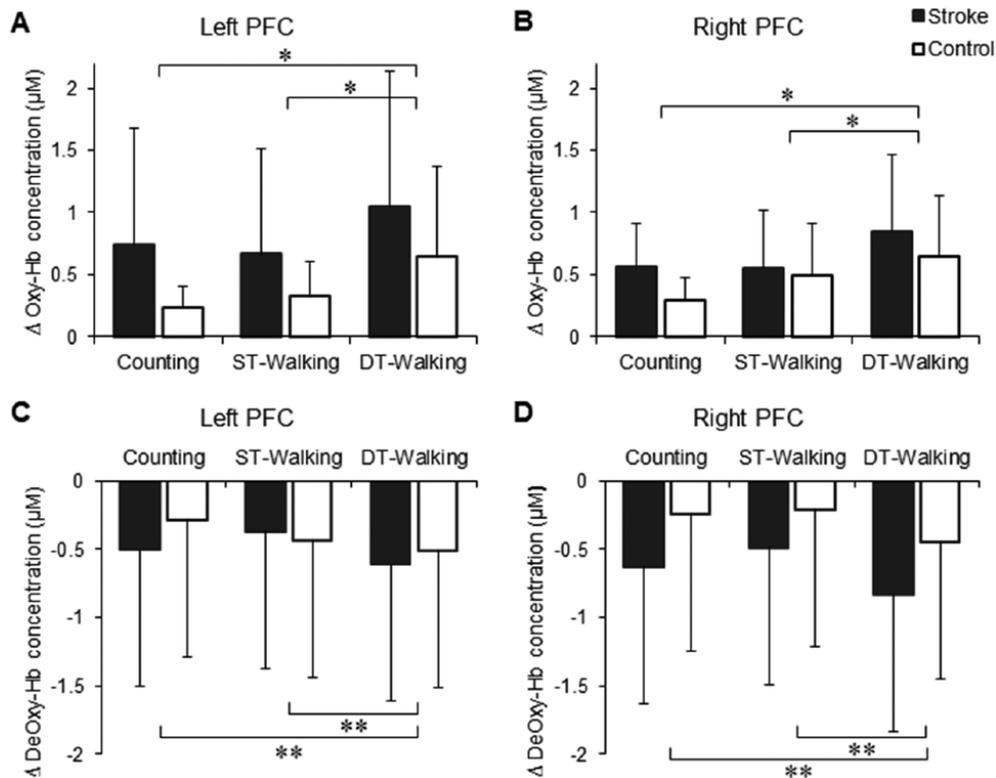


Figura 18. Dati di gruppo delle variazioni di concentrazioni relative di O₂Hb (A e B) HHb (C e D) nella corteccia prefrontale (PFC) relative ai compiti, durante l'attività singola (ST) e la duplice attività (DT). [23]

4.2.2 Esperimento 2: fMRI e fNIRS durante il cammino simulato

4.2.2.1 Procedura sperimentale

I partecipanti, nove pazienti cronici post-ictus e dieci controlli sani, sono stati ‘allenati’ sui compiti da eseguire prima di entrare nella sala di scansione. Durante la fase di training, ai soggetti sono stati fatti eseguire due compiti; il primo compito consisteva nel contare all'indietro di tre numeri da un valore casuale, mentre il secondo prevedeva di compiere una flessione-estensione dell'articolazione della caviglia che simulasse una camminata mediante un apposito apparato. Nello scanner, ogni partecipante ha eseguito quattro diverse condizioni; (A) solo conteggio; (B) solo movimento dei piedi; (C) doppio compito, conteggio e movimento dei piedi contemporaneamente; e (D) riposo (Fig.16B). L'esperimento consisteva in un test di 30 secondi ciascuno per ogni condizione del ciclo ABCD ripetuta sei volte, per una durata totale dell'esperimento pari a dodici minuti. L'esecuzione dell'attività è stata scandita da una luce lampeggiante proiettata su uno schermo posto a valle del tubo dello scanner e ogni test è stato preceduto da una schermata di istruzioni. Ai soggetti erano

state date istruzioni di eseguire il conteggio all'indietro, muovere i piedi od entrambi ogni volta che si accendeva il simbolo sullo schermo. Lo svolgimento del compito cognitivo è stato registrato durante la camminata simulata. La conformità dei partecipanti al compito è stata confermata da un potenziometro montato sull'apparato dei piedi. I segnali provenienti dal potenziometro, nonché una registrazione della presentazione dello stimolo e della pressione dei pulsanti sono stati raccolti e analizzati una volta concluso l'esperimento [23].

4.2.2.2 Acquisizione ed elaborazione dei dati

I dati della spettroscopia nel vicino infrarosso sono stati acquisiti ed elaborati come descritto nel primo esperimento. Tramite la fMRI sono state acquisite un totale di 256 immagini (BOLD) durante l'esecuzione del compito (45 sezioni assiali per volume, TR = 3000 ms, TE = 30 ms, matrice = 64×64 , risoluzione nel piano = $3 \times 3 \text{ mm}^2$, angolo di inversione = 87°). È stata inoltre acquisita un'immagine anatomica T1-pesata (TR = 3000 ms, TE = 4,71 ms, TI [tempo di inversione] = 1100 ms, angolo di inversione 8° , campo visivo = 256×256 , matrice = 256×256). Infine è stato applicato un preprocessing standard e un'analisi statistica a livello individuale [23].

4.2.2.3 Risultati della fMRI

Sia per i pazienti con ictus che per i controlli sani, il movimento della caviglia ha prodotto distribuzioni di attività bilaterale previste, comprese le aree sensomotorie. Sono stati valutati i risultati dell'interazione positiva (ovvero l'aumento dell'attività cerebrale durante il compito DT superiore alla somma lineare delle attivazioni nelle due condizioni ST) di conteggio e di movimento dei piedi.

Nei controlli sani, l'interazione positiva si è verificata solo nel giro linguale bilaterale. Nei pazienti post-ictus, le aree che hanno mostrato un'interazione positiva rilevante includevano il giro frontale superiore bilaterale, il giro temporale inferiore bilaterale e il nucleo caudato sinistro. Le aree che hanno mostrato una maggiore interazione positiva nei pazienti con ictus, rispetto ai controlli sani, comprendevano il giro temporale inferiore bilaterale, il giro frontale superiore bilaterale, il giro cingolato bilaterale e il giro precentrale destro.

Correlazioni tra l'aumento del segnale fMRI relative al DT (rispetto all'ST) e il cambiamento di prestazioni comportamentali (rispetto all'ST) sono state trovate solo nei partecipanti con ictus, nel giro temporale inferiore bilaterale, nel giro cingolato sinistro e nel polo frontale sinistro; (un

maggior deterioramento nelle prestazioni comportamentali nel DT rispetto all'ST era associata ad una maggior attività fMRI nel DT rispetto all'ST) (Figura 4A) [23].

4.2.2.4 Risultati della fNIRS

I risultati ottenuti dai dati fNIRS nell'esperimento 2 sono riportati in Figura 19B. La concentrazione di O₂Hb ha mostrato variazioni significative a seconda del compito eseguito; in particolare, si sono osservate variazioni maggiori durante il DT rispetto al ST. Inoltre, le variazioni di ossiemoglobina erano più elevate nei pazienti post-ictus rispetto ai controlli sani. I confronti a coppie hanno evidenziato una differenza significativa tra le variazioni di ossiemoglobina nel DT rispetto ai compiti sia di conteggio che di movimento eseguiti singolarmente mentre il confronto del conteggio con la condizione di movimento non risultava significativo (Fig.19B). L'ANOVA separata condotta per ciascun gruppo ha mostrato un effetto significativo del compito nei pazienti con ictus, ma non nei controlli sani. Analogamente, l'analisi a posteriori ha rivelato una differenza significativa tra i due gruppi durante il compito DT sia nella PFC destra che sinistra. Pertanto, la PFC è stata attivata maggiormente in modo bilaterale nei pazienti con ictus rispetto ai controlli in condizioni di DT. Per i cambiamenti di HHb non vi sono stati effetti significativi di compito, gruppo, emisfero o interazioni tra quest'ultimi [23].

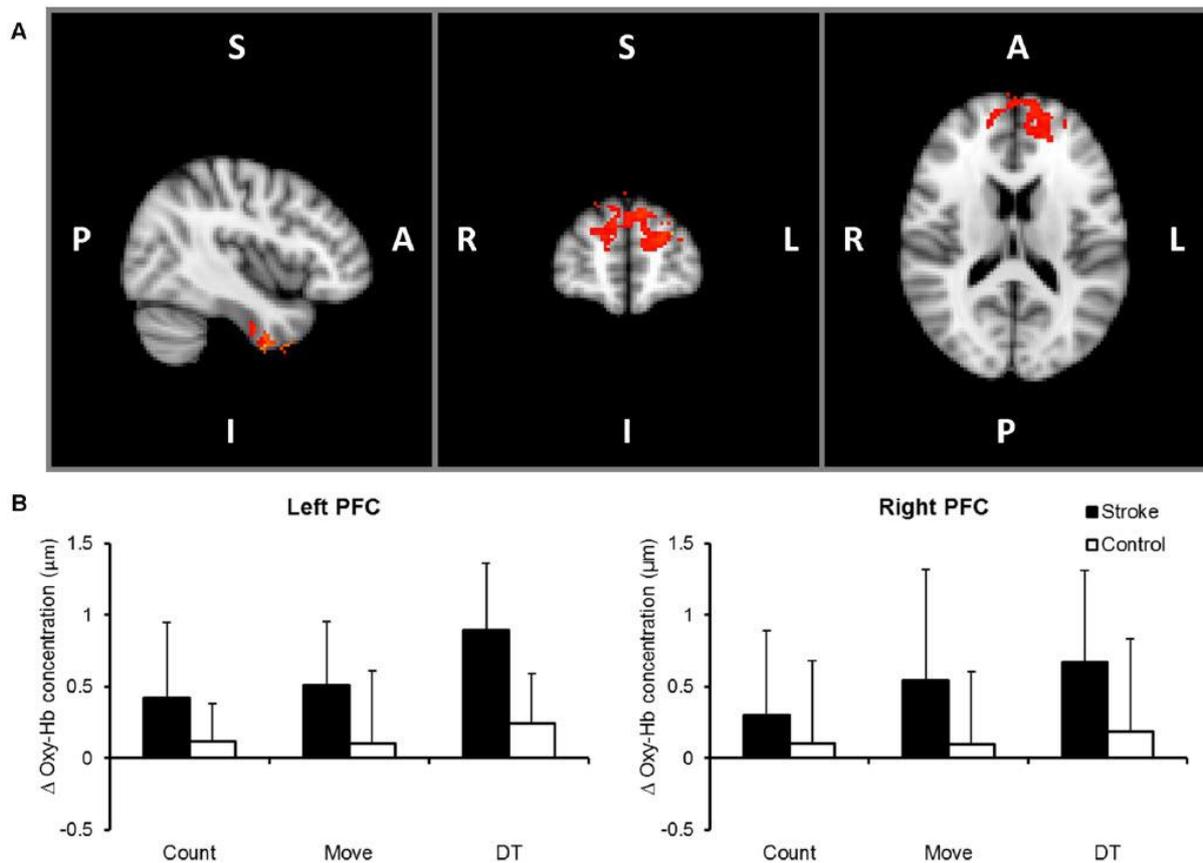


Figura 19. (A) Regioni con incremento di attività fMRI. (B) Valori mediati su ciascun gruppo delle variazioni di concentrazione di O_2Hb nella corteccia prefrontale (PFC) durante il conteggio, il movimento della caviglia e il DT misurati mediante spettroscopia funzionale nel vicino infrarosso (fNIRS) e risonanza magnetica funzionale (fMRI) contemporaneamente [23].

4.2.3 Discussione dello studio

I due esperimenti descritti avevano lo scopo di valutare il ruolo della PFC nel controllo del cammino dopo l'ictus. L'ipotesi dei ricercatori che hanno condotto lo studio era che le difficoltà nel cammino in condizioni DT potessero riflettere un aumento della domanda cognitiva come diretta conseguenza del cammino dopo l'ictus. A supporto di questa tesi, i risultati dello studio hanno evidenziato che i pazienti post-ictus mostravano una maggiore attività della PFC rispetto ai soggetti di controllo sia durante il cammino ST che durante il cammino DT, e che il cammino DT era associato con un incremento di attività della PFC in entrambi i gruppi esaminati. Inoltre è emerso che il conteggio durante il cammino influenzava i parametri del cammino, e viceversa, in entrambi i gruppi; anche nei soggetti sani, l'esecuzione del task di conteggio alterava il cammino. Questo ha suggerito che il compito di conteggio fosse impegnativo anche per il gruppo di controllo. Tuttavia, l'effetto di tale compito cognitivo sul cammino è risultato essere più evidente tra i partecipanti con ictus.

Complessivamente questi risultati suggeriscono che l'esecuzione del cammino richieda un incremento di attività della PFC nei pazienti post-ictus e che questa richiesta aumenti ulteriormente in presenza di un compito cognitivo concomitante.

Per la prima volta, grazie a questo studio, sono state fornite prove dei correlati neurali durante il cammino nella vita reale in condizioni DT ed evidenziano come un aumento delle esigenze cognitive, come mostrato dalla maggiore attività della PFC, possa limitare la camminata in condizioni di vita reale nelle persone colpite dall'ictus.

L'aumento dell'attività della PFC nel gruppo con ictus è stato ipotizzato essere correlato al ruolo che tale area ha nell'allocazione dell'attenzione durante l'azione o la pianificazione del movimento. Negli anziani, una maggiore attivazione della PFC è stata associata al declino delle funzioni cognitive e del cammino legate all'età, e al maggiore sforzo che i soggetti anziani devono compiere per ottenere migliori prestazioni.

Tuttavia, in altri studi riguardanti anziani sani, è stato dimostrato che l'attività della PFC aumenta durante la conversazione ma si riduce quando si esegue la prova di un compito DT impegnativo, forse riflettendo uno spostamento delle risorse di elaborazione dalla corteccia prefrontale ad altre regioni del cervello. In generale, i risultati dello studio descritto e di altre ricerche suggeriscono che i meccanismi di controllo adattivi del cervello sono influenzati dalle capacità e dalle condizioni dell'individuo, dalla domanda posta, e dalla natura dei compiti concomitanti.

È stato anche scoperto che solo nei pazienti con ictus, si sono mostrate correlazioni significative tra il cambiamento dell'attività della PFC e il cambiamento nel comportamento in condizioni DT. Pertanto, si ritiene che la riduzione del controllo cognitivo e/o motorio associato alle maggiori difficoltà del cammino DT abbia portato al reclutamento compensativo della PFC che comporta un controllo top-down per dirigere le risposte in base agli obiettivi del compito e ai vincoli ambientali. È bene sottolineare che l'osservazione di una maggiore dipendenza dal controllo top-down durante il cammino nei pazienti neurologici ha importanti implicazioni nella riabilitazione. Infatti, gli approcci tradizionali alla riabilitazione del cammino a seguito di danni cerebrali indicano che è necessario evitare i compiti DT mentre si cammina (cioè, modelli meno automatici) e focalizzano l'attenzione su come muoversi in sicurezza.

Al contrario, i risultati di questo studio mettono in discussione questi approcci e suggeriscono che può essere più vantaggioso e probabilmente più sicuro per i pazienti con ictus imparare a camminare in condizioni di DT (cioè, andatura più automatica e meno consapevole).

Questo studio presenta alcuni limiti metodologici, che è corretto menzionare. Ad esempio, questo studio ha utilizzato la fNIRS ad onda continua, (che non permette di valutare le concentrazioni

assolute dell'ossigenazione del sangue ma solo quelle relative, non riuscendo a determinare le proprietà ottiche dei tessuti). Un altro limite riguarda le modalità di esecuzione del secondo esperimento, in cui è bene considerare che il cammino reale dipende da molteplici meccanismi di controllo più complicati rispetto alla dorso-flessione della sola caviglia. Tuttavia, per concludere, lo studio indica che la fNIRS ad onda continua rimane una scelta pratica ed economica che fornisce un mezzo sicuro per esaminare l'attività cerebrale in una vasta gamma di individui e compiti. Inoltre, i risultati degli esperimenti offrono una base teorica per una migliore comprensione dei deficit comportamentali e per lo sviluppo di strategie che ottimizzano la mobilità sicura dopo l'ictus [23].

CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

Nell'elaborato è stata trattata la spettroscopia funzionale nel vicino infrarosso, un'innovativa tecnica di neuroimaging che permette di misurare le variazioni di concentrazione di ossiemoglobina (O₂Hb) e deossiemoglobina (HHb). L'acquisizione del segnale avviene posizionando sullo scalpo del soggetto una o più coppie sorgente-rilevatore e utilizzando lo studio dell'assorbimento della luce che, nella banda del vicino infrarosso, ha come principali assorbitori O₂Hb e HHb. In risposta ad uno stimolo l'attività cerebrale aumenta determinando un incremento di flusso sanguigno indirizzato verso la regione attiva, causando una maggior concentrazione di O₂Hb e una conseguente diminuzione di HHb. Questo fenomeno, rilevato dal segnale fNIRS, prende il nome di risposta emodinamica e fornisce informazioni sull'ossigenazione cerebrale e sul flusso ematico.

Sulla base della letteratura scientifica, è stata sottolineata l'importanza di poter condurre studi non invasivi e con libertà di movimento consentendo un ampio utilizzo di questa tecnica nella ricerca e negli ambienti clinici come strumento di monitoraggio della saturazione cerebrale di ossigeno nei neonati. In particolare, i risultati degli studi fNIRS riguardanti lo sviluppo motorio e cognitivo in neonati pretermine hanno suggerito che, sebbene le funzioni cerebrali dei neonati pretermine possano inizialmente non essere completamente funzionanti, in un momento successivo queste funzioni cerebrali potrebbero svilupparsi gradualmente sino ad avere le stesse caratteristiche dei neonati a termine. Pertanto, la fNIRS non permette solamente di studiare gli aspetti funzionali cerebrali nei neonati ma rappresenta anche un metodo utile per lo screening precoce e per identificare i periodi decisivi per l'intervento nello sviluppo atipico, riducendo così il rischio di disturbi motori e cognitivi e minimizzando l'impatto della nascita pretermine.

La fNIRS ha confermato la possibilità di condurre studi durante il cammino in pazienti neurologici. In particolare, nei due esperimenti riportati riguardanti la valutazione del ruolo della corteccia prefrontale nel controllo del cammino dopo l'ictus, l'applicazione della fNIRS ha consentito, in modo innovativo, di ottenere informazioni circa i correlati neurali durante il cammino nella vita reale in condizioni Dual-Task. I risultati dello studio hanno evidenziato che i pazienti post-ictus mostravano una maggiore attività della corteccia prefrontale rispetto ai soggetti sani sia durante il cammino Single-Task sia durante il cammino Dual-Task, suggerendo che il cammino Dual-Task possa richiedere un reclutamento compensativo della corteccia prefrontale. Pertanto, questo studio ha osservato una maggiore dipendenza dal controllo top-down durante il cammino in pazienti neurologici, proponendo un nuovo approccio riabilitativo basato sul recupero post-ictus in condizioni Dual-Task.

Nonostante i numerosi progressi della fNIRS nell'ambito del neuroimaging funzionale, molte questioni pongono ancora dei limiti negli studi fNIRS. In primo luogo non viene garantita l'analisi delle strutture cerebrali profonde; infatti la fNIRS consente di misurare le attività neurali solamente nella parte superficiale della corteccia cerebrale. Inoltre, non sempre si riesce ad ottenere una stima accurata della risposta emodinamica; i segnali fNIRS misurati costituiscono una combinazione di componenti derivanti dall'attività neuronale e componenti di origine sistemica che possono portare a falsi positivi e / o falsi negativi nell'inferenza statistica dell'attività funzionale. Infine, sebbene sia presente una vasta gamma di procedure di pre-elaborazione e analisi fNIRS disponibili, ad oggi non esiste né un accordo né linee guida consolidate sull'analisi dei dati fNIRS. Questa mancanza di standardizzazione e i numerosi parametri regolabili per gli algoritmi di pre-elaborazione e analisi possono condurre a studi di scarsa qualità o errata interpretazione e irriproducibilità dei risultati. Ad esempio, è stato dimostrato come diverse scelte e combinazioni di criteri di esclusione dei canali, metodi di correzione degli artefatti da movimento e approcci di elaborazione dati potrebbero condurre a risultati diversi.

Attualmente la fNIRS trova applicazioni nella ricerca e come strumento clinico di monitoraggio dell'ossigenazione cerebrale, del recupero e dell'apprendimento motorio, del controllo dell'equilibrio, e ulteriori applicazioni. Tuttavia, la coregistrazione con altre tecniche di neuroimaging quali PET, fMRI e EEG può condurre ad un monitoraggio più completo e accurato [22].

Gli ultimi progressi nella ricerca suggeriscono numerosi sviluppi per il prossimo futuro. La possibilità di condurre studi rilevanti in diversi contesti e individui attraverso nuovi compiti cognitivi e motori ha aumentato la ricerca nella progettazione e nello sviluppo di sistemi fNIRS.

I progressi metodologici e strumentali consentiranno nuovi tipi di approcci con dispositivi sempre più all'avanguardia orientando a nuove e potenzialmente rivoluzionarie indagini di neuroimaging; in particolare nell'ambito della cognizione del mondo reale, dell'interazione sociale e dello sviluppo neurologico [16]. Inoltre, lo sviluppo di nuovi algoritmi di analisi dei dati consentiranno una corretta separazione delle componenti del segnale NIRS in base alla loro origine, in modo tale da ottenere una risposta emodinamica più affidabile [5].

Le nuove prospettive prevedono l'impiego della fNIRS come strumento diagnostico, infatti è stata, ad esempio, dimostrata la possibilità di poter valutare i meccanismi neurali alla base dei disturbi neuropsichiatrici. Nonostante ad oggi gli studi siano limitati a valutazioni individuali per ciascun paziente, gli sviluppi sopra descritti consentiranno misurazioni riproducibili in singoli soggetti. Una volta raggiunto questo obiettivo, sarà possibile effettuare diversi tipi di diagnosi come il

rilevamento di malattie neurologiche, disfunzioni cognitive o motorie nei neonati pretermine e disturbi psichiatrici permettendo in futuro di diventare una tecnica diagnostica [7,24].

BIBLIOGRAFIA

- [1] Hak Yeong Kim, Kain Seo, Hong Jin Jeon, Unjoo Lee, Hyosang Lee, *Application of Functional Near-Infrared Spectroscopy to the Study of Brain Function in Humans and Animal Models*, *Molecules and Cells*, 40(8): 523-532, 2017.
- [2] Adelina Pellicer, María del Carmen Bravo, *Near-infrared spectroscopy: A methodology-focused review*, *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*, 16: 42-49, 2011.
- [3] Akikazu Sakudo, *Near-infrared spectroscopy for medical applications: Current status and future perspectives*, *Clinica Chimica Acta* 455: 181–188, 2016.
- [4] Marco Ferrari, Valentina Quaresima, *A brief review on the history of human functional near-infrared spectroscopy (fNIRS) development and fields of application*, *Neuroimage* 63(2): 921–935, 2012.
- [5] S. Lloyd-Fox, A. Blasi, C.E. Elwell, *Illuminating the developing brain: The past, present and future of functional near infrared spectroscopy*, *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 2009.
- [6] Fabian Herold, Patrick Wiegel, Feliz Scholkmann, Notger G. Müller, *Applications of Functional Near-Infrared Spectroscopy (fNIRS) Neuroimaging in Exercise-Cognition Science: A Systematic, Methodology-Focused Review*, *Journal of Clinical Medicine*, 2018.
- [7] Felix Scholkmann, Stefan Kleiser, Andreas Jaakko Metz, Raphael Zimmermann, Juan Mata Pavia, Ursula Wolf, Martin Wolf, *A review on continuous wave functional near-infrared spectroscopy and imaging instrumentation and methodology*, *NeuroImage* 85: 6–27, 2014.
- [8] Alessandro Torricelli, Davide Contini, Antonio Pifferi, Matteo Caffini, Rebecca Re, Lucia Zucchelli, Lorenzo Spinelli, *Time domain functional NIRS imaging for human brain mapping*, *NeuroImage* 85: 28–50, 2014.
- [9] B.J. Casey and Michelle de Haan, *Introduction: new methods in developmental science*, *Developmental Science* 5:3, pp 265–267, 2002.

- [10] Edson Amaro Jr., Gareth J. Barker, *Study design in fMRI: Basic principles*, Elsevier, Brain and Cognition 60, pp 220–232, 2006.
- [11] Vladimr Mlynàrik, *Introduction to nuclear magnetic resonance*, Elsevier, Analytical Biochemistry 529, 4-9, 2017.
- [12] David G. Norris, *Principles of Magnetic Resonance Assessment of Brain Function*, Journal of magnetic resonance imaging, 23:794–807, 2006.
- [13] Courtney Slough, Pharm.D., Shane C. Masters, M.D., Ph.D., Robin A. Hurley, M.D., and Katherine H. Taber, Ph.D, *Clinical Positron Emission Tomography (PET) Neuroimaging: Advantages and Limitations as a Diagnostic Tool*, J. Neuropsychiatry Clin Neurosci 28:2, Spring 2016.
- [14] Riitta Hari, Sylvain Baillet, Gareth Barnes, Richard Burgess, Nina Forss, Joachim Gross, Matti Hämäläinen, Ole Jensen, Ryusuke Kakigi, François Mauguïèrem, Nobukatzu Nakasato, Aina Puce, Gian-Luca Romani, Alfons Schnitzler, Samu Taulu, *IFCN-endorsed practical guidelines for clinical magnetoencephalography (MEG)*, Clinical Neurophysiology 129, 1720–1747, 2018.
- [15] Michael J. Aminoff, *Electroencephalography: General Principles and Clinical Applications*, Aminoff's Electrodiagnosis in Clinical Neurology, 37-84, 2012.
- [16] Pinti, P., Tachtsidis, I., Hamilton, A., Hirsch, J., Aichelburg, C., Gilbert, S., & Burgess, P. W. *The present and future use of functional near-infrared spectroscopy (fNIRS) for cognitive neuroscience*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2018.
- [17] Aslin, R. N., Shukla, M., & Emberson, L. L., *Hemodynamic correlates of cognition in human infants*, Annual review of psychology, 66, 349-379, 2015.
- [18] Wolf, M., Morren, G., Haensse, D., Karen, T., Wolf, U., Fauchere, J. C., & Bucher, H. U., *Near infrared spectroscopy to study the brain: an overview*, Opto-Electronics Review, 16(4), 413, 2008.

[19] McDonald, N. M., & Perdue, K. L. *The infant brain in the social world: Moving toward interactive social neuroscience with functional near-infrared spectroscopy*. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 87, 38-49. 2018.

[20] Wang, Q., Zhu, G. P., Yi, L., Cui, X. X., Wang, H., Wei, R. Y., & Hu, B. L. *A Review of Functional Near-Infrared Spectroscopy Studies of Motor and Cognitive Function in Preterm Infants*. *Neuroscience bulletin*, 1-9. 2019.

[21] Gramigna, V., Pellegrino, G., Cerasa, A., Cutini, S., Vasta, R., Olivadese, G., ... & Quattrone, A.. *Near-infrared spectroscopy in gait disorders: is it time to begin?*. *Neurorehabilitation and neural repair*, 31(5), 402-412. 2017.

[22] Yang, M., Wang, P., Yang, Z., Yuan, T., & Feng, W. *A systemic review of functional near-infrared spectroscopy for stroke: current application and future directions*. *Frontiers in neurology*, 10, 58. 2019.

[23] Al-Yahya, E., Johansen-Berg, H., Kischka, U., Zarei, M., Cockburn, J., & Dawes, H.. *Prefrontal cortex activation while walking under dual-task conditions in stroke: a multimodal imaging study*. *Neurorehabilitation and neural repair*, 30(6), 591-599. 2016.

[24] Ehlis, A. C., Schneider, S., Dresler, T., & Fallgatter, A. J. *Application of functional near-infrared spectroscopy in psychiatry*. *Neuroimage*, 85, 478-488. 2014.

SITOGRAFIA PER IMMAGINI

[s1] <http://udreview.com/new-fmri-facility-broadens-universitys-research-capacities/>

[s2] <https://www.marketexpert24.com/2019/10/03/positron-emission-tomography-pet-scanners-market-2019-global-forecast-to-2023-with-key-players-ge-siemens-healthcare-philips-healthcare-toshiba-hitachi-neusoft-topgrade-healthcare-united-im/>

[s3] <https://ccns.sbg.ac.at/2016/11/official-inauguration-of-the-meg-lab/>

[s4] <http://www.culhamlab.com/facilities-equipment>

