

ALMA MATER STUDIORUM – UNIVERSITA' DI BOLOGNA

CAMPUS DI CESENA

DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'ENERGIA ELETTRICA E

DELL'INFORMAZIONE "GUGLIELMO MARCONI"

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

**Stimolazione transcranica a ultrasuoni focalizzati: una nuova tecnica
di neuromodulazione**

Elaborato in

Strumentazione Biomedica

Relatore

Prof.ssa Elisa Magosso

Presentato da

Giansalvo Nocchiero

Anno Accademico 2018/1019

PAROLE CHIAVE

Transcranial Focused Ultrasound Stimulation

Low Intensity Focused Ultrasound

Neuromodulazione

Corteccia sensoriale

Corteccia motoria

INDICE

INTRODUZIONE	7
CAPITOLO 1 - PRINCIPI FISICI DEGLI ULTRASUONI	11
1.1 Quantità ultrasoniche di base	11
1.1.1 Lo spettro acustico	11
1.1.2 Tipi di onde acustiche	12
1.1.3 Forme d'onda acustica	13
1.1.4 Velocità di propagazione acustica, impedenza e attenuazione	15
1.1.5 Grandezze caratteristiche dell'onda acustica in un mezzo	17
1.2 Quantità di primo e secondo ordine	18
1.2.1 Quantità di primo ordine	21
1.2.2 Quantità del secondo ordine	22
1.3 Dosimetria	24
1.4 Effetti biologici degli ultrasuoni.....	26
1.4.1 Effetti termici	26
1.4.2 Effetti meccanici.....	29
CAPITOLO 2 - ULTRASUONI FOCALIZZATI PER NEUROMODULAZIONE: ASPETTI GENERALI	35
2.1 Sviluppo e primi utilizzi degli ultrasuoni focalizzati	35
2.2 Parametri di sonicazione	36
2.2.1 Modalità di sonicazione degli FU	37
2.2.2 Meccanismi di neuromodulazione degli FUS a bassa intensità	38
2.2.3 Plasticità a lungo termine	40
2.3 Confronto con altre tecniche di neuromodulazione	40
2.4 Dispositivi	42
2.4.1 Generazione di un fascio ultrasonico	44
2.4.2 Focalizzazione degli ultrasuoni.....	45
2.4.3 Trasduttore a elemento singolo.....	46
2.4.4 Trasduttori phased array a multi-elemento.....	48
2.4.5 Misurazioni delle prestazioni dei phased array	52
CAPITOLO 3 – NEUROMODULAZIONE DELLA CORTECCIA VISIVA E DELLA CORTECCIA SOMATOSENSORIALE NELL'UOMO TRAMITE ULTRASUONI TRANSCRANICI FOCALIZZATI	53
3.1 Neuromodulazione tramite ultrasuoni focalizzati a bassa intensità: studi sugli animali e sull'uomo ..	53
3.2 Modulazione tramite ultrasuoni transcranici focalizzati della corteccia somatosensoriale primaria nell'uomo.....	55
3.2.1 Proprietà del fascio acustico della tFUS utilizzato	56
3.2.2 Direzionamento della tFUS sulla corteccia somatosensoriale primaria.....	58
3.2.3 La tFUS modula l'attività cerebrale evocata dalla stimolazione sensoriale	59
3.2.5 La tFUS modula le soglie di percezione.....	62
3.2.6 La modulazione dell'attività cerebrale conseguente a tFUS è spazialmente specifica	64
3.2.7 Sicurezza della tFUS	65
3.3 Stimolazione transcranica della corteccia visiva primaria nell'uomo tramite ultrasuoni focalizzati	66

3.3.1 Partecipanti e panoramica dello studio	66
3.3.2 Pianificazione della sonicazione e stimolazione FUS della corteccia visiva primaria (V1) guidata dall'imaging a risonanza magnetica (RM)	67
3.3.3 La stimolazione tramite FUS suscita la percezione del fosfene	69
3.3.4 La stimolazione FUS mostra risposte individuali e di gruppo	69
3.3.5 La stimolazione FUS genera risposte EEG	72
3.3.6 Simulazioni acustiche della tFUS.....	74
3.3.7 Esami neurologici pre e post sonicazione e valutazione radiologica di follow-up.....	75
3.4 Considerazioni riguardo ai risultati ottenuti e possibili studi futuri.....	75

CAPITOLO 4 – NEUROMODULAZIONE DELLA CORTECCIA MOTORIA (M1) NELL’UOMO TRAMITE ULTRASUONI TRANSCRANICI FOCALIZZATI.....

79

4.1 Neuromodulazione della corteccia motoria nell’uomo tramite l’applicazione simultanea di TMS e ultrasuoni transcranici focalizzati.....	80
4.1.1 I soggetti.....	80
4.1.2 Applicazione simultanea di ultrasuoni transcranici focalizzati e TMS.....	80
4.1.3 Forma d’onda e trasmissione di tFUS	83
4.1.4 Neuronavigazione stereotassica	83
4.1.5 Elettromiografia (EMG).....	84
4.1.6 Esperimento 1: curve di reclutamento dei MEP a impulso singolo	84
4.1.7 Esperimento 2: MEP a impulso accoppiato.....	86
4.1.8 Esperimento 3: tempo di reazione.....	87
4.2 Effetti sui tessuti generati da tFUS e TMS	88
4.3 Possibili meccanismi d’azione degli ultrasuoni transcranici focalizzati.....	89

CONCLUSIONI E DIREZIONI FUTURE.....

93

BIBLIOGRAFIA.....

97

INTRODUZIONE

In questo elaborato viene presentata una recente tecnica di neuromodulazione basata sull'utilizzo di ultrasuoni transcranici focalizzati (transcranial Focused Ultrasound Stimulation, tFUS), tutt'oggi in fase di ricerca e, in particolare, vengono trattati i principi fisici, i dispositivi impiegati, gli effetti che provocano sui tessuti biologici e i possibili meccanismi di azione, riportando anche alcune delle sperimentazioni condotte negli ultimi anni.

Con il termine neuromodulazione si intende la capacità di influenzare in maniera reversibile l'attività neuronale, attraverso l'eccitazione o l'inibizione reversibile di popolazioni di neuroni, il che le conferisce un enorme potenziale terapeutico. Infatti, le tecniche di stimolazione cerebrale sono strumenti importanti che permettono di esaminare i processi neurologici sia a livello cellulare che a livello sistemico. L'obiettivo principale di queste tecniche è quello di raggiungere l'utilità terapeutica e l'efficacia clinica nel trattamento di disturbi psicologici e neurologici ottenendo il giusto compromesso tra non invasività e risoluzione spaziale. Tra le tecniche di stimolazione cerebrale più comuni vi sono la stimolazione cerebrale profonda (Deep Brain Stimulation, DBS), la stimolazione transcranica a corrente continua (transcranial Direct Current Stimulation, tDCS) e la stimolazione magnetica transcranica (Transcranial Magnetic Stimulation, TMS). La DBS evoca l'attivazione neuronale tramite l'applicazione di elettrodi, i quali, per un corretto funzionamento, devono essere a diretto contatto con il tessuto neurale e ciò necessita quindi di procedure chirurgiche altamente invasive che espongono il paziente a gravi rischi come infiammazione, emorragia e anche morte cellulare. La tDCS (che utilizza correnti elettriche) e la TMS (che utilizza l'energia magnetica) rappresentano invece l'alternativa meno invasiva rispetto alla DBS, poiché non richiedono un intervento chirurgico. Tuttavia, queste presentano uno svantaggio comune: un ampio raggio d'azione, soprattutto nelle applicazioni alle aree cerebrali più profonde, con una conseguente perdita di risoluzione spaziale.

La tFUS rappresenta un nuovo approccio di neuromodulazione che offre molti vantaggi interessanti: (1) basso costo, (2) non invasività, (3) orientabile, (4) compatibile con altri sistemi di imaging, (5) capacità di modulare l'attività neuronale o produrre lesioni in modo mirato, (6) possibile utilizzo nelle terapie farmacologiche e genetiche per migliorare la somministrazione locale di farmaci. Di base, l'ultrasuono è un'onda meccanica con frequenze nell'ordine del MHz, quindi al di sopra dell'intervallo udibile. Come onde che si propagano, gli ultrasuoni riescono a fornire energia meccanica anche alle cellule cerebrali più profonde, producendo sia effetti termici che meccanici, a seconda dei parametri di sonicazione (ovvero dei parametri di trasmissione del fascio ultrasonico)

che vengono adottati. Ad esempio, gli ultrasuoni focalizzati ad alta intensità (High Intensity Focused Ultrasound, HIFU), possono essere impiegati per l'ablazione termica (ossia la distruzione per effetto termico) di una regione di tessuto, utile per il trattamento di tumori cerebrali e altri disturbi neurologici, come tremori, ma anche per la consegna di farmaci, poiché se utilizzati in combinazione con agenti di contrasto riescono ad aprire localmente la barriera emato-encefalica (BEE). Utilizzando le onde di pressione acustica anziché le correnti elettriche o le radiazioni magnetiche, è stato dimostrato che si possono stimolare funzionalmente i circuiti cerebrali del topo conferendo una risoluzione spaziale di ~ 3 mm. Recenti studi hanno incrementato l'interesse verso l'applicazione di ultrasuoni focalizzati a bassa intensità (Low Intensity Focused Ultrasound, LIFU), poiché i risultati ottenuti hanno mostrato che: 1) la stimolazione LIFU può suscitare effetti neuromodulatori nel sistema nervoso centrale utilizzando stimoli relativamente brevi; 2) il metodo è stato usato in modo sicuro nei primati, compresi gli umani, dimostrando che essi possono modulare l'attività sensoriale in maniera spazialmente selettiva, trascurando gli effetti termici indotti sul bersaglio, attraverso la loro applicazione sulle regioni corticali come la corteccia somatosensoriale e la corteccia visiva primaria.

Con la sua selettività spaziale superiore alle altre tecniche e la sua praticabilità nell'uomo, la tFUS sta ottenendo sempre più successo come nuova modalità di stimolazione cerebrale non invasiva e fornendo al tempo stesso nuove opportunità nella valutazione delle funzioni cerebrali in regioni specifiche, nonché nello sviluppo di varie modalità neuroterapeutiche.

L'elaborato è strutturato nel seguente modo:

Capitolo 1 – Il primo capitolo illustra i principi fisici delle onde ultrasoniche, descrivendo anche gli effetti che essi provocano sui tessuti biologici.

Capitolo 2 – Il secondo capitolo si concentra maggiormente sugli aspetti generali degli ultrasuoni focalizzati utilizzati per neuromodulazione e, in particolare, vengono illustrati i parametri che definiscono le modalità di trasmissione della tFUS, fornendo anche un confronto con le altre tecniche di neuromodulazione.

Capitolo 3 – Nel terzo capitolo vengono presentati due studi condotti di recente in cui si applica la tFUS per modulare l'attività di due aree corticali nell'uomo; uno studio riguarda l'applicazione della tFUS alla corteccia somatosensoriale e l'altro l'applicazione della tFUS alla corteccia visiva primaria.

Capitolo 4 – In quest'ultimo capitolo, viene esaminato un ulteriore studio sulla neuromodulazione tramite tFUS della corteccia motoria (M1) nell'uomo.

Infine, il capitolo sulle Conclusioni riassume i principali risultati ottenuti dagli studi sperimentali analizzati, illustrando gli attuali limiti della tFUS e le possibili ricerche future.

1.1 Quantità ultrasoniche di base

1.1.1 Lo spettro acustico

Il suono è il rapido movimento delle molecole. Queste vibrazioni trasportano energia da un trasmettitore, una fonte sonora come la nostra voce, a un ricevitore come il nostro orecchio. Il suono viaggia in onde che trasportano energia da una posizione all'altra. Si parla di compressione quando queste molecole si avvicinano tra loro, viceversa, si parla di rarefazione quando esse si allontanano. È proprio questo comportamento che permette di definire il suono come un'onda meccanica. L'idea del tono si riferisce alla nostra percezione della frequenza, ovvero il numero di volte al secondo in cui l'aria vibra producendo il suono che sentiamo. Questa descrizione della frequenza, tuttavia, è limitata alla gamma di frequenza, o spettro (20 Hz-20 KHz), all'interno della quale l'orecchio umano è sensibile. Esistono frequenze sonore al di sopra e al di sotto di quelle percettibili dall'orecchio umano (Fig. 1a). A frequenze inferiori di 20 Hz le onde vengono classificate come infrasuoni (Fig. 1a). La gamma di frequenza degli ultrasuoni inizia a una frequenza di circa 20 kHz (Fig. 1a). La maggior parte delle apparecchiature ad ultrasuoni mediche opera nella gamma di frequenza ultrasonica tra 1 e 15 MHz (Fig. 1b). Le applicazioni terapeutiche (terapia fisica, ultrasuoni focalizzati ad alta frequenza e ablazione) operano intorno a 1 MHz. Per la maggior parte delle applicazioni diagnostiche nell'ecografia addominale, ostetrica e ginecologica e nell'ecocardiografia, la gamma di frequenza è generalmente compresa tra 2,5 e 7,5 MHz. Per le parti superficiali del corpo, come la tiroide e l'occhio, e le applicazioni vascolari periferiche in cui l'ecografia non deve penetrare molto

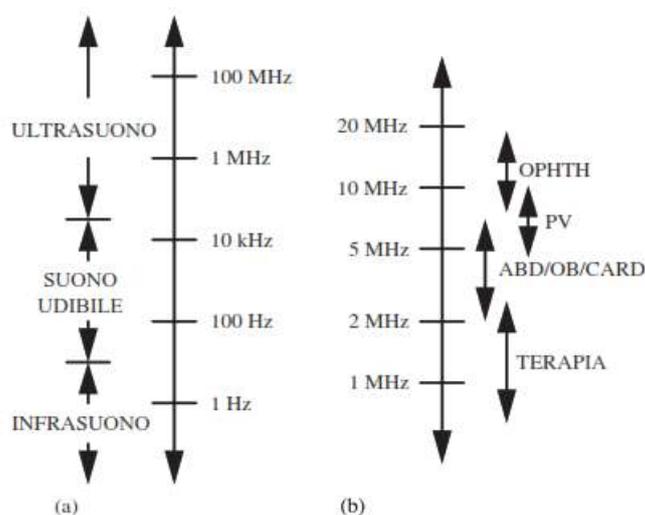


Figura 1. (a) Spettro acustico e (b) spettro dell'ultrasuono medico. Tratta da [1].

profondamente nel corpo, è possibile utilizzare frequenze ultrasoniche più elevate nell'intervallo di 7,5-15 MHz poiché l'attenuazione ultrasonica aumenta con l'aumentare frequenza [1].

1.1.2 Tipi di onde acustiche

La classificazione delle onde sonore si basa sul tipo di movimento indotto nel mezzo dall'onda sonora propagante. Ai fini della fisica ultrasonica, il livello più basso di organizzazione all'interno di un fluido (gas e liquido) è chiamato particella [1]. Le particelle sono rappresentate in Fig. 2 come punti, ognuno dei quali è costituito da milioni di molecole e tuttavia ciascuno ha dimensioni di una frazione di lunghezza d'onda ultrasonica.

Quando un'onda viene propagata all'interno del materiale, essa viene classificata in base alla direzione in cui l'energia ultrasonica sta viaggiando rispetto alla direzione in cui si muove la particella. Un'onda longitudinale si verifica quando le particelle si muovono avanti e indietro (cioè da sinistra a destra e viceversa, orizzontalmente in Fig. 2a) rispetto alla direzione dell'onda di energia che si muove

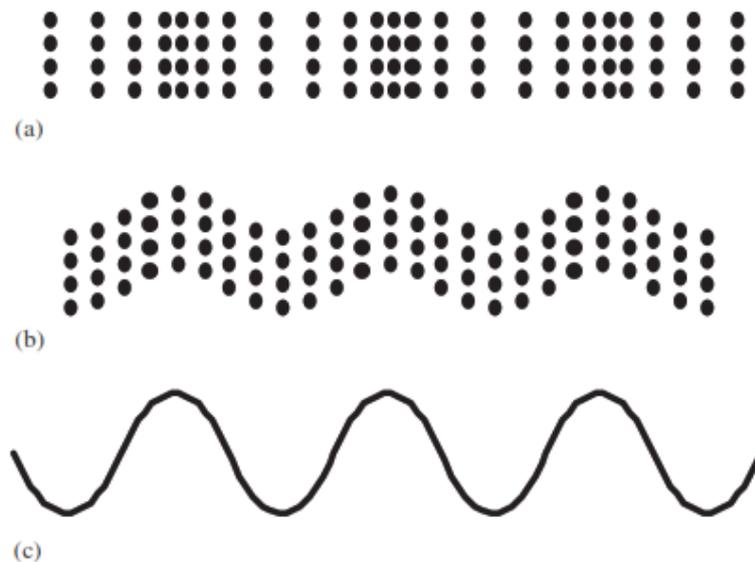


Figura 2. Rappresentazione delle onde: (a) longitudinali, (b) di taglio e (c) sinusoidali. Tratta da [1].

anch'essa orizzontalmente (cioè nelle onde longitudinali le molecole si muovono nella stessa direzione in cui si propaga l'energia). Le onde longitudinali propagate viaggiano attraverso tutti i tipi di materiali: gas, liquidi e solidi.

Nel caso delle onde di taglio, le particelle si muovono ad angolo retto rispetto alla direzione di propagazione dell'onda, come mostrato nella Figura 2b. In questa figura, le particelle si muovono verticalmente su e giù mentre l'energia dell'onda si muove orizzontalmente. Le onde di taglio esistono solo in materiali solidi. Perciò quest'ultime sono assenti nei tessuti molli poiché presentano proprietà acustiche simili ai liquidi mentre viaggiano in materiali biologici più duri come l'osso.

Le proprietà fisiche dei tessuti dipendono fortemente dall'acqua perché essa costituisce quasi i tre quarti dell'intera massa del corpo umano. La concentrazione di acqua varia da tessuto a tessuto, ad es. nell'umor vitreo ha valore intorno al 99%, nel fegato al 70%, nella pelle al 60%, nella cartilagine al 30% e adiposo fino al 10%.

1.1.3 Forme d'onda acustica

Il termine forma d'onda viene utilizzata per definire e quantificare l'onda ultrasonica che interagisce con i materiali biologici. Gli ultrasuoni viaggiano in onde che provengono da una fonte. Le creste alte e le depressioni basse rappresentano i valori di ampiezza specifici dell'onda e corrispondono rispettivamente ai valori di picco di compressione e di rarefazione. La distanza spaziale da una cresta alla successiva, o da una depressione alla successiva, viene chiamata lunghezza d'onda e indicata da λ in Fig. 3a. Il periodo T (Fig. 3b) rappresenta il tempo necessario affinché si compia un ciclo ed è inoltre il reciproco della frequenza ($f = 1/T$).

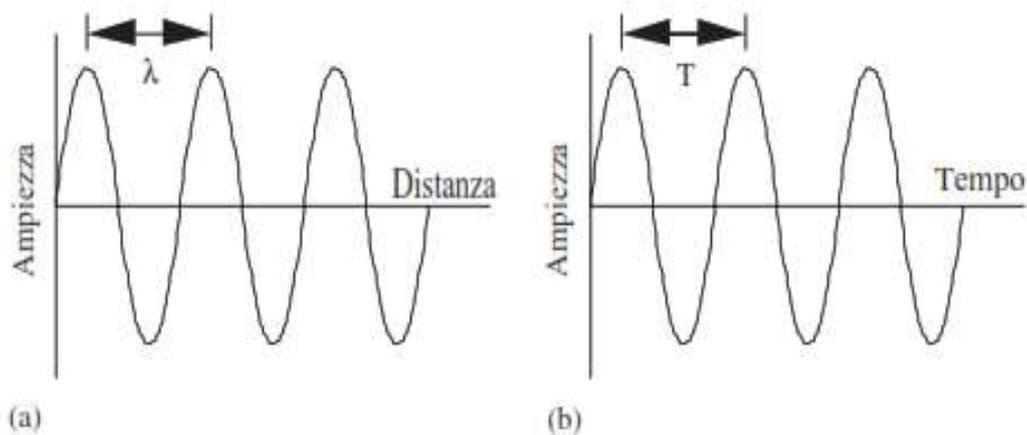


Figura 3. Rappresentazioni schematiche di una forma d'onda acustica: (a) ampiezza-distanza e (b) ampiezza-tempo. Tratta da [1].

Le informazioni sulla distanza possono essere convertite in valori di tempo e il tempo può essere convertito in informazioni di distanza. Gli strumenti ad ultrasuoni eseguono costantemente queste conversioni per visualizzare immagini ecografiche. Lo spazio (o distanza) di un ciclo è chiamato lunghezza d'onda e il tempo che occupa un ciclo è chiamato periodo, ovvero la lunghezza d'onda è "distanza / ciclo" e il periodo è "tempo / ciclo". La velocità di propagazione dell'onda è la costante che collega la lunghezza d'onda (λ) al periodo ($T = 1/f$): $c = \lambda f$. Per applicazioni mediche, la velocità di propagazione, nei tessuti è generalmente considerata costante pari a 1540 m / s.

Esistono due modalità di generazione di base degli ultrasuoni utilizzati nelle strumentazioni biomediche (Fig. 3). La modalità di generazione indica il modo in cui l'onda ultrasonica viene "modellata" quando viene trasmessa dal trasduttore ultrasonico, ovvero le caratteristiche temporali

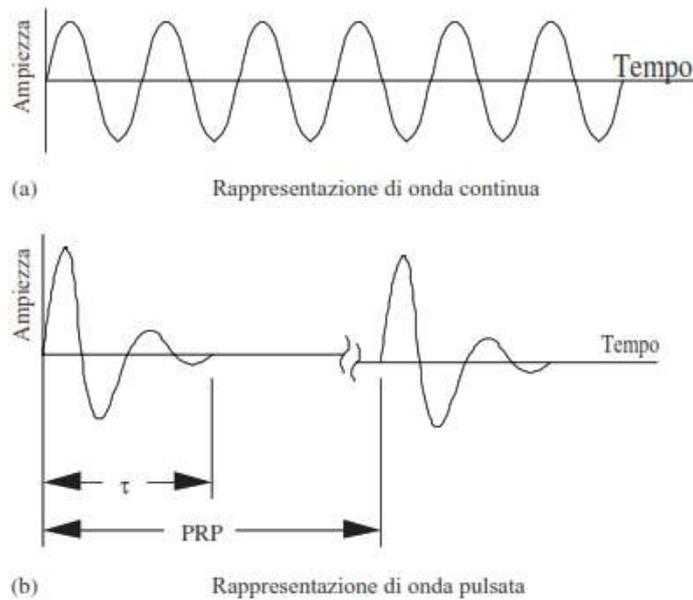


Figura 4. Rappresentazioni schematiche di forme d'onda (a) continua e (b) pulsata. Tratta da [1].

della forma d'onda. Una modalità di generazione è quella di eccitare continuamente il trasduttore ultrasonico con un'onda sinusoidale elettrica ad ampiezza costante. Questo produce un'onda ultrasonica continua alla stessa frequenza di quella elettrica e viene definita ultrasuono ad onda continua (modalità CW, Continuous Wave o ultrasuoni CW), come mostrato nella Figura 4a.

Un'altra modalità di generazione è quella di accendere il trasduttore per un breve periodo di tempo e spegnerlo per un tempo molto più lungo e quindi ripetere questo processo. Questa modalità di generazione è realizzata eccitando o inibendo il trasduttore ultrasonico con segnali elettrici molto brevi, aspettare un certo tempo e poi ripetere lo shock elettrico. Le onde ultrasoniche che vengono generate sono chiamate ultrasuoni ad onda pulsata (modalità PW, Pulsed Wave o ultrasuoni PW), come mostrato in Fig. 4b. Se il numero di cicli per impulso è N , allora la durata dell'impulso (τ) è

$$\tau = NT = \frac{N}{f} \quad (1)$$

Il rapporto tra la durata e il periodo di ripetizione dell'impulso (Pulse Repetition Period, PRP) è chiamato ciclo di lavoro (Duty Cycle, DC). DC è la quantità frazionaria di tempo in cui l'impulso è attivo, dato dall'equazione:

$$DC = \frac{\tau}{PRP} = tPRF \quad (2)$$

dove PRF è la frequenza di ripetizione dell'impulso. Ad esempio, se la durata dell'impulso è $1 \mu\text{s}$ e il periodo di ripetizione è 1 ms ($PRF = 1 \text{ kHz}$), il ciclo di lavoro è $0,001$ o $0,1\%$. Il valore massimo della forma d'onda ultrasonica si verifica quando le particelle vengono compresse (a pressione positiva). Pertanto, questo valore è chiamato picco di ampiezza della pressione di compressione. Il valore minimo della forma d'onda ultrasonica si verifica quando le particelle sono rarefatte (a pressione

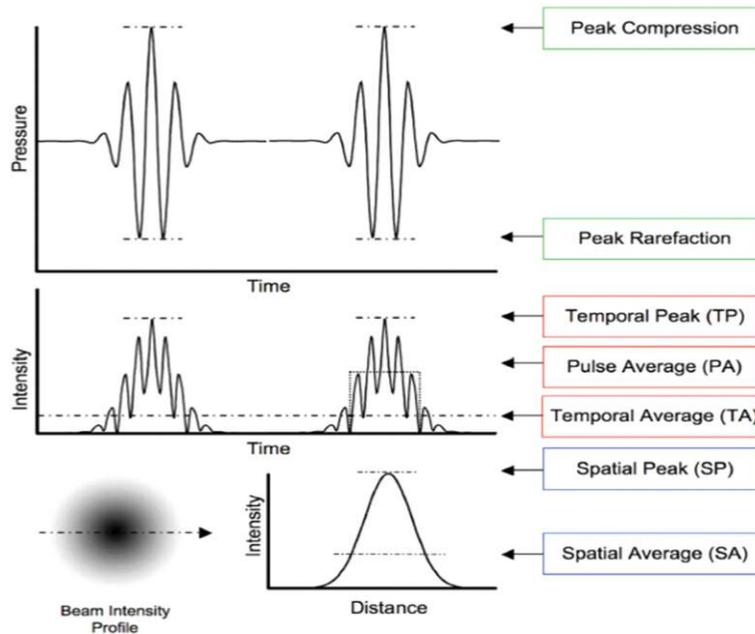


Figura 5. Spiegazione visiva dei valori medi utilizzati per descrivere le pressioni e intensità ultrasoniche. Tratta da [2]. Copyright AIUM 2009.

negativa). Pertanto, questo valore è chiamato picco di ampiezza della pressione di rarefazione (Fig. 5).

1.1.4 Velocità di propagazione acustica, impedenza e attenuazione

Una comprensione delle problematiche legate alla velocità di propagazione, impedenza e attenuazione nei materiali biologici sono direttamente applicabili alle descrizioni matematiche dei meccanismi biofisici. Le proprietà generalmente utilizzate per descrivere quantitativamente la propagazione degli ultrasuoni nei materiali sono la velocità, l'impedenza e l'attenuazione. Si presume che la propagazione degli ultrasuoni sia un processo adiabatico, cioè un processo in cui non si verifica lo scambio di calore. Pertanto, la velocità alla quale l'energia ultrasonica si propaga in un fluido è [1]

$$c = \sqrt{\frac{B_{AD}}{\rho}}, \quad (3)$$

dove B_{AD} rappresenta il modulo elastico per un fluido isotropico e ρ la densità. Pertanto, le onde propagate in un fluido sono longitudinali. Per un gas $B_{AD} = \gamma P_0$, dove γ è il rapporto tra i calori specifici e P_0 è la pressione atmosferica, quindi

$$c = \sqrt{\frac{\gamma P_0}{\rho}}. \quad (4)$$

Per un liquido il modulo elastico risulta $B_{AD} = \gamma B_T$, dove B_T è il modulo di massa (o modulo di Bulk) isoteramico, di conseguenza, la velocità diventa

$$c = \sqrt{\frac{\gamma B_T}{\rho}}. \quad (5)$$

In un solido isotropico, si propagano sia le onde longitudinali sia quelle di taglio per cui le loro rispettive velocità di propagazione sono

$$c_L = \sqrt{\frac{Y(1-\sigma)}{\rho(1+\sigma)(1-2\sigma)}} \quad (6a)$$

$$c_S = \sqrt{\frac{Y}{2\rho(1+\sigma)}} \quad (6b)$$

dove Y è il modulo di Young e σ è il coefficiente di Poisson. Poiché σ è minore di 0.5, c_L sarà maggiore di c_S .

L'impedenza acustica specifica dell'onda è definita come il rapporto tra la pressione acustica e la velocità delle particelle. Per onde piane, l'impedenza acustica specifica è

$$Z_S = \pm \rho c. \quad (7)$$

dove il segno + vale per l'onda che si propaga in avanti e il segno - per l'onda che si propaga all'indietro. Per le onde diverse da quelle piane, Z_S dipende sia dal mezzo che dal tipo di onda (piana, cilindrica, sferica ecc.). Il prodotto ρc si incontra frequentemente nell'acustica analitica ed è chiamato impedenza acustica caratteristica (Z) del mezzo o semplicemente impedenza acustica. Solo per l'onda piana queste due impedenze sono numericamente uguali. L'unità di misura dell'impedenza acustica è il Rayl ($1 \text{ Rayl} = 1 \text{ kg} / \text{m}^2 \cdot \text{s}$). La tabella 1 [1] riassume gli intervalli numerici di ρ , c e Z per i vari mezzi.

Il classico compromesso ingegneristico della strumentazione diagnostica ad ultrasuoni è quello tra risoluzione e profondità dell'immagine (o penetrazione). Entrambi sono direttamente influenzati dalla frequenza ultrasonica e dall'attenuazione. All'aumentare della frequenza, la risoluzione migliora e la penetrazione diminuisce. La risoluzione migliora perché la lunghezza d'onda ultrasonica nei tessuti diminuisce, essendo inversamente proporzionale alla frequenza. All'aumentare della frequenza, aumenta anche l'attenuazione ultrasonica. La penetrazione è direttamente influenzata dall'attenuazione dei tessuti perché approssimativamente legata linearmente alla frequenza. Ad es. a una frequenza ultrasonica di 1 MHz, il coefficiente di attenuazione nei tessuti molli è di circa 0,7 dB/cm mentre a 2 MHz esso è di 1,4 dB/cm. Pertanto, il coefficiente di attenuazione è (almeno approssimativamente) proporzionale alla frequenza.

Tabella 1

Densità tipica, impedenza acustica caratteristica e velocità di propagazione per mezzi isotropi

	ρ (kg/m ³)	c (m/s)	Z (rayl)
Gas	1	100–1000	100–1000
Liquido	1000	1000–2000	$1-2 \times 10^6$
Solido	1000–10,000	2000–10,000 (L) 1500–5000 (S)	$10-100 \times 10^6$ (L) $4-50 \times 10^6$ (S)

L denota un'onda longitudinale ed S denota un'onda di taglio.

1.1.5 Grandezze caratteristiche dell'onda acustica in un mezzo

Un concetto necessario per comprendere la risoluzione assiale (o intervallo) è la distanza che un ciclo (e quindi un impulso) copre in un mezzo. Quest'ultima è proprio la lunghezza d'onda, $\lambda = c/f$, dove c è la velocità di propagazione nel mezzo. Per una forma d'onda di impulso ripetuta (Fig. 4b), la distanza occupata da un impulso in un mezzo è chiamata lunghezza spaziale dell'impulso (SPL), ovvero il numero di lunghezze d'onda di cui è costituito l'impulso:

$$SPL = N\lambda = \frac{\tau}{T}\lambda = \tau f\lambda. \quad (8)$$

La risoluzione assiale è la capacità di discriminare strutture discrete lungo l'asse del fascio ultrasonico. Quantitativamente, è rappresentato come la distanza minima a cui devono trovarsi due strutture lungo l'asse del fascio per essere identificate come entità separate. La migliore risoluzione assiale è rappresentata dall'espressione

$$risoluzione\ assiale\ migliore = \frac{SPL}{2} = \frac{N\lambda}{2}. \quad (9)$$

Il progetto del trasduttore influisce sul numero minimo di cicli. Trasduttori fortemente smorzati (detti anche trasduttori a basso Q) producono pochissimi cicli di ultrasuoni quando eccitati dalla tensione del pulsatore. Quando la frequenza aumenta e altre quantità rimangono costanti, migliora la risoluzione assiale. Il termine "migliore risoluzione assiale" è stato utilizzato perché, in pratica, l'elettronica di ricezione ed elaborazione influisce sulla risoluzione assiale, così come la qualità del monitor video. L'elettronica e il monitor sono spesso raggruppati in "sistema Q ". Il sistema Q a basso valore fornisce una migliore risoluzione assiale rispetto a quelli di alto valore. Come "regola empirica", ci sono $Q/2$ cicli di pressione contenuti nell'impulso, cioè $N = Q/2$, che produce

$$risoluzione\ assiale\ migliore = \frac{N\lambda}{2} = \frac{Nc}{2f} = \frac{Qc}{4f} = \frac{c}{4\Delta f}, \quad (10)$$

dove il fattore di qualità Q è definito come il rapporto tra la frequenza fondamentale, f , e la larghezza di banda del sistema, Δf . Per una velocità di propagazione di 1540 m/s,

$$risoluzione\ assiale\ migliore\ (in\ mm) = \frac{0.77}{\Delta f}, \quad (11)$$

dove Δf è espresso in MHz. Tuttavia, le immagini ad ultrasuoni non sono omogenee (si presentano come un insieme di “chiazze”), per cui è opportuno utilizzare un’espressione più rappresentativa per la risoluzione assiale:

$$FWHM_A \text{ (in mm)} = \frac{1.37}{\Delta f}, \quad (12)$$

dove $FWHM_A$ è la lunghezza assiale ‘full width at half maximum’ dell’impulso in millimetri e Δf è in MHz. Questa espressione è anche solo una funzione della larghezza di banda del sistema, ma produce un valore numerico per la risoluzione assiale circa 1,8 volte maggiore della risoluzione assiale migliore. Pertanto, la risoluzione assiale migliora (il suo valore numerico diminuisce) all’aumentare della larghezza di banda.

La risoluzione laterale è la capacità di discriminare strutture discrete perpendicolari o laterali all’asse del fascio. Quantitativamente, è rappresentata come la distanza minima a cui devono trovarsi due strutture affiancate alla stessa distanza assiale per essere identificate come due entità separate. La migliore risoluzione laterale è uguale alla larghezza minima del raggio del fascio ultrasonico. Per un campo ultrasonico focalizzato, la larghezza del raggio (BW) al punto focale è

$$BW = 1.4\lambda \frac{ROC}{D} = 1.4\lambda^{\#}, \quad (13)$$

dove ROC è il raggio di curvatura (nella pratica ROC è la distanza tra la sorgente e il centro della regione focale, ossia la lunghezza focale) e D è il diametro di una sorgente circolare o una lunghezza lineare per una sorgente rettilinea. Nella terminologia di imaging, il termine " $f^{\#}$ " viene spesso utilizzato per quantificare la messa a fuoco (cioè il focusing), dove più basso è il suo valore, migliore è la messa a fuoco. In termini di lunghezza ‘full width at half-maximum’, la larghezza del raggio al punto focale è

$$FWHM_L = \frac{\lambda L}{D}, \quad (14)$$

dove $FWHM_L$ è la lunghezza laterale ‘full width at half-maximum’ e L è la lunghezza focale (sostanzialmente uguale a ROC).

1.2 Quantità di primo e secondo ordine

Le quantità di primo e secondo ordine vengono utilizzate per descrivere una classe generale di eventi. La quantità rappresenta ciò che viene misurato e il suo valore viene generalmente espresso dal prodotto di un numero e di un’unità (Tabella 2, tratta da [1]). Le quantità del primo ordine sono note come quantità di ampiezza mentre quelle del secondo come quantità basate sull’energia (Tabella 3, tratta da [1]). Le caratteristiche principali delle quantità del primo e del secondo ordine sono:

- entrambe le quantità del primo e del secondo ordine riguardano il trasporto di energia;
- tutte le quantità del primo ordine sono direttamente proporzionali l'una all'altra;
- tutte le quantità del secondo ordine sono direttamente proporzionali l'una all'altra;
- il prodotto tra due quantità del primo ordine è direttamente proporzionale a qualsiasi quantità del secondo ordine.

Tabella 2
Quantità e unità ultrasoniche tipiche

Quantità	Unità
Carica	Coulomb (C)
Corrente	Ampere ($A = C/s$)
Spostamento	Metro (m)
Energia	Joule ($J = Ws$)
Densità di energia	Joule per metro cubo ($J/m^3 = N/m^2$)
Forza	Newton (N)
Frequenza	Hertz (Hz)
Intensità	Watt per centimetro quadrato (W/cm^2)
Lunghezza	Metro (m)
Massa	Kilogrammo (kg)
Potenza	Watt (W)
Velocità	Metro per secondo (m/s)
Temperatura	Gradi Celsius ($^{\circ}C$)
Tempo	Secondo (s)
Pressione ultrasonica	Pascal ($Pa = N/m^2$)
Tensione	Volt (V)
Lunghezza d'onda	Metro (m)

Tabella 3
Lista delle quantità del primo e del secondo ordine utilizzati negli ultrasuoni

quantità del primo ordine	quantità del secondo ordine
Corrente	Energia
Accelerazione della particella	Densità di
energia Particle displacement	Intensity
Particle velocity	Power
Pressione ultrasonica	
Tensione	

La propagazione delle onde acustiche può essere descritta matematicamente facendo uso i) dell'*equazione di stato* che mette in relazione la variazione di densità con la variazione di pressione, ii) dell'*equazione di continuità* che mette in relazione il movimento delle particelle alla variazione di densità basandosi sulla conservazione della massa e iii) dell'*equazione del momento* (diventa l'equazione di Eulero per un mezzo senza perdite a riposo) che mette in relazione il cambiamento di pressione con il moto delle particelle attraverso la seconda legge della dinamica. Queste equazioni sono riportate di seguito:

Equazione di stato

$$p = c_0^2 \delta\rho \left\{ 1 + \frac{B}{2!A} \frac{\delta\rho}{\rho_0} + \frac{C}{3!A} \left(\frac{\delta\rho}{\rho_0} \right)^2 + \dots \right\}, \quad (15a)$$

$$p = c_0^2 \delta\rho \left\{ 1 + \frac{B}{2!A} s + \frac{C}{3!A} s^2 + \dots \right\}, \quad (15b)$$

Equazione di continuità

$$\frac{D\rho}{Dt} + \rho \nabla \cdot \vec{u} = 0, \quad (16a)$$

$$\frac{\partial\rho}{\partial t} + \nabla \cdot (\rho\vec{u}) = 0. \quad (16b)$$

Equazione del momento

$$\rho \frac{D\vec{u}}{Dt} + \nabla P = 0, \quad (17a)$$

$$\rho_0 \frac{\partial\vec{u}}{\partial t} + \nabla p = 0 \text{ (Equazione lineare di Eulero)}. \quad (17b)$$

La derivata totale è

$$\frac{Dq}{Dt} = \frac{\partial q}{\partial t} + (\vec{u} \cdot \nabla)q, \quad (18)$$

dove il primo termine al secondo membro è la variazione temporale di q (qualsiasi variabile acustica del primo ordine) che si avrebbe a particella in quiete ($\vec{u} = 0$) e il secondo rappresenta l'ulteriore variazione provocata dal movimento della particella. Inoltre, p è la pressione acustica (pressione istantanea $P = P_0 + p$), $\delta\rho$ è la variazione di densità (densità istantanea $\rho = \rho_0 + \delta\rho$), B/A è il coefficiente del primo parametro non lineare, s identifica la variazione frazionaria della densità ($\delta\rho/\rho_0$) e \vec{u} è la velocità delle particelle di un elemento fluido. Pressione P , velocità \vec{u} e densità ρ possono essere espresse come

$$P = P_0 + p_1 + p_2 + \dots, \quad (19a)$$

$$\vec{u} = \vec{u}_1 + \vec{u}_2 + \dots, \quad (19b)$$

$$\rho = \rho_0 + \rho_1 + \rho_2 + \dots, \quad (19c)$$

dove gli indici indicano l'ordine. Ad esempio, P_0 è il contributo di ordine zero alla pressione, p_1 è il contributo di primo ordine che varia in modo sinusoidale per un'onda armonica (CW) alla frequenza ω , e p_2 è il contributo di secondo ordine che ha sia una componente dipendente dal tempo a frequenza 2ω e una componente indipendente dal tempo. Poiché si assume che il fluido sia in quiete, il contributo di ordine zero di \vec{u} è zero.

1.2.1 Quantità di primo ordine

L'equazione di stato, l'equazione di continuità e l'equazione di Eulero per i contributi del primo ordine diventano, rispettivamente,

$$p_1 = B s_1 + \eta_B \frac{\partial s_1}{\partial t}, \quad (20)$$

$$\frac{\partial s_1}{\partial t} = -\nabla \cdot \vec{u}_1, \quad (21)$$

$$\rho_0 \frac{\partial \vec{u}_1}{\partial t} = -\nabla p_1. \quad (22)$$

In acqua e tessuti $\eta_B \frac{\partial s_1}{\partial t} \ll B s_1$. Quindi, l'equazione di stato diviene $p_1 = B s_1$. Eliminando l'ordine 1 dai pedici e notando che $\vec{u} = d\vec{\xi}/dt$, dove $\vec{\xi}$ è lo spostamento delle particelle, combinando queste equazioni per un'onda monodimensionale che si propaga in una certa direzione x si ottiene l'equazione dell'onda monodimensionale (senza perdite):

$$\frac{\partial^2 \xi}{\partial t^2} = c^2 \frac{\partial^2 \xi}{\partial x^2}. \quad (23)$$

Essa può essere descritta dallo spostamento delle particelle $\xi(x, t)$, oppure può essere descritta anche dalla velocità delle particelle $u(x, t)$, dall'accelerazione delle particelle $a(x, t)$ o dalla pressione acustica $p(x, t)$. In termini di spostamento delle particelle, l'equazione d'onda monodimensionale senza perdite che viaggia in direzione x positiva viene rappresentata come

$$\xi(x, t) = \xi_0 \cos(\omega t - kx), \quad (24)$$

dove ξ_0 è l'ampiezza di spostamento delle particelle, ω è la frequenza angolare, t è il tempo e k è il numero d'onda (chiamata anche costante di propagazione). Per le onde piane, la velocità, l'accelerazione e la pressione acustica (ultrasonica) sono determinate, rispettivamente, da

$$u(x, t) = \frac{\partial \xi(x, t)}{\partial t}, \quad (25)$$

$$a(x, t) = \frac{\partial u(x, t)}{\partial t}, \quad (26)$$

$$p(x, t) = -\rho c^2 \frac{\partial \xi(x, t)}{\partial x}, \quad (27)$$

dove l'Eq. (27) è determinata combinando l'equazione di stato e l'equazione di continuità per produrre $p = \rho_0 c^2 s$, dove $s = -\partial \xi / \partial x$ per un'onda piana. Essendo tutte le quantità di primo ordine per un'onda piana direttamente proporzionali l'una all'altra, si può scrivere

$$\xi_0 = \frac{U_0}{\omega} = \frac{A_0}{\omega^2} = \frac{p_0}{\omega \rho_0 c_0}, \quad (28)$$

dove U_0 , A_0 e p_0 sono rispettivamente le ampiezze di velocità, accelerazione e pressione acustica della particella.

Per l'equazione dell'onda monodimensionale considerando le perdite, il coefficiente di attenuazione del mezzo entra a far parte della soluzione per cui

$$\xi(x, t) = \xi_0 e^{-Ax} \cos(\omega t - kx), \quad (29)$$

dove A è il coefficiente di attenuazione.

1.2.2 Quantità del secondo ordine

Quando un'onda a ultrasuoni si propaga nei tessuti, viene indotta una deformazione meccanica, dove la deformazione si riferisce al relativo cambiamento nelle dimensioni o nella forma del corpo che è sottoposto a stress. Dal contributo del secondo ordine all'equazione del momento (Eq. (17)), il gradiente di P , ∇P , è

$$\vec{F} = \rho \frac{D\vec{u}}{Dt}, \quad (30)$$

dove \vec{F} è una variazione temporale e spaziale di forza per unità di volume (espressa in N/m^3), dove il volume è un elemento fluido.

Inoltre, la propagazione delle onde ultrasoniche trasporta e dissipa energia e le quantità del secondo ordine sono proporzionali ad essa. Quantitativamente, l'energia è rappresentata in termini di densità di energia (la quale è una grandezza scalare) e intensità (grandezza vettoriale). Per un'onda piana che si propaga in direzione x , le energie cinetica e potenziale istantanee sono, rispettivamente,

$$E_{KE}(x, t) = \frac{\rho u^2}{2}, \quad (31)$$

$$E_{PE}(x, t) = \frac{p^2}{2\rho c^2}, \quad (32)$$

dove u e p sono i rispettivi valori istantanei della velocità della particella e della pressione acustica. Al fine di valutare la densità di energia media temporale, si assume che la velocità delle particelle, la quale varia armonicamente, sia

$$u(x, t) = U_{op} \cos(\omega t - kx) + U_{on} \cos(\omega t + kx), \quad (33)$$

dove U_{op} e U_{on} sono le ampiezze di velocità delle particelle per le componenti con verso positivo e negativo, rispettivamente, e la pressione ultrasonica unidimensionale che varia armonicamente è

$$p(x, t) = p_{op} \cos(\omega t - kx) + p_{on} \cos(\omega t + kx), \quad (34)$$

dove $p_{op} = \rho c U_{op}$ e $p_{on} = -\rho c U_{on}$. Pertanto, la densità media di energia è

$$\langle E \rangle = \frac{1}{T} \int_0^T E(x, t) dt = \frac{\rho}{2} (U_{op}^2 + U_{on}^2). \quad (35)$$

L'intensità è una quantità ultrasonica estremamente utile che rappresenta una misura del flusso medio nel tempo di energia ultrasonora che attraversa e un'unità di superficie in direzione perpendicolare. Il concetto di intensità viene generalmente applicato relativamente a un'onda piana. Inoltre, è una quantità vettoriale ma, poiché lo sviluppo qui è limitato a un fluido e all'equazione d'onda unidimensionale, la notazione vettoriale non viene utilizzata, la direzione infatti è nota. L'intensità istantanea è definita come il prodotto interno tra la pressione ultrasonica e la velocità delle particelle ma poiché queste due quantità sono in fase, il prodotto è semplicemente pu . Il suo valore medio nel tempo è dato da

$$I = \frac{1}{T} \int_0^T p u dt = \frac{\rho c}{2} (U_{op}^2 - U_{on}^2). \quad (36)$$

Va notato che per un'onda stazionaria in cui $U_{op}^2 = U_{on}^2$, l'intensità media temporale (un vettore) è nulla, mentre la densità energetica media temporale (uno scalare) non lo è. Per un'onda progressiva piana che si propaga solo in direzione x positiva $U_{on}^2 = 0$, per cui le Eq. (35) e (36) diventano, considerando $U_{op}^2 = U_0^2$,

$$\langle E \rangle = \frac{\rho}{2} U_0^2 = \frac{1}{2\rho c^2} p_0^2 \quad (37)$$

e

$$I = \frac{\rho c}{2} U_0^2 = \frac{1}{2\rho c} p_0^2 = \frac{p_0 U_0}{2}, \quad (38)$$

dove $\langle E \rangle$ è la densità energetica temporale media (espressa in J/m³ o N/m²) I è l'intensità temporale media (in W/m² o più convenzionalmente nella biofisica degli ultrasuoni, W/cm²). Combinando questi risultati si può scrivere

$$\langle E \rangle = \frac{I}{c}, \quad (39)$$

la quale è un'espressione utile nella misurazione dell'intensità e della potenza ultrasonica con tecniche di forza di radiazione, ma valida solo per le onde piane.

La densità di energia media temporale è equivalente alla forza di radiazione (in N) per un assorbitore perfetto:

$$F_{rad} = \frac{IA}{c}, \quad (40)$$

dove A è la superficie dell'assorbitore. Il prodotto IA rappresenta la potenza acustica W , quindi

$$F_{rad} = \frac{W}{c}. \quad (41)$$

Per una perfetta superficie riflettente, la forza di radiazione è doppia rispetto a quella di una superficie assorbente. Se il mezzo è caratterizzato da perdite che si presume siano dovute solo all'effetto di assorbimento con coefficiente α , si ha che per un'onda unidimensionale che si propaga nella direzione x positiva, la velocità delle particelle (dalle Eq. (25) e (29)) e l'intensità media temporale possono essere descritte da

$$u(x, t) = U_0 e^{-\alpha x} \sin(\omega t - kx), \quad (42)$$

$$I = I_0 e^{-2\alpha x}, \quad (43)$$

dove I_0 è l'intensità per $x = 0$. Da queste due espressioni, e dal valore medio temporale di \vec{F} (Eq. (30)), la forza di radiazione media temporale nel mezzo è

$$F_{rad} = \frac{2\alpha I}{c}. \quad (44)$$

1.3 Dosimetria

La dosimetria è la determinazione di una dose, che caratterizza l'agente fisico in merito alla sua potenziale o effettiva interazione con il materiale biologico di interesse. L'obiettivo della dosimetria ad ultrasuoni è quello di mettere in relazione le dimensioni di quantità specifiche, come intensità, pressione acustica, spostamento delle particelle, ecc., con la probabilità che si verifichi un'alterazione biologica. A tale scopo, è necessario:

1. quantificare la quantità o le quantità di output della sorgente;
2. determinare l'effetto del materiale sull'energia di propagazione, vale a dire, riflessione, rifrazione, dispersione, assorbimento, ecc.;
3. mettere in relazione quantitativamente i primi due elementi nel sito di interesse.

Nelle applicazioni mediche delle radiazioni ionizzanti, viene fatta una distinzione chiara tra "esposizione" e "dose" [3]. L'esposizione, in questo contesto, è la quantità di ionizzazione prodotta nell'aria da raggi X o dai raggi γ . L'unità di esposizione è il Roentgen, R, (ovvero la quantità di radiazione ionizzante che produrrà un'unità elettrostatica di elettricità in un centimetro cubo di aria

secca a 0 °C e pressione atmosferica standard). Questa è una misura della quantità di radiazione che raggiunge il corpo, ma non descrive la frazione di quell'energia incidente che viene assorbita all'interno del tessuto. I fisici delle radiazioni definiscono un secondo parametro per questo, la "dose assorbita" (comunemente definita "dose"). Ciò caratterizza la quantità di energia depositata per chilogrammo. Le unità di dosaggio sono il *gray* (Gy) e il *rad*, dove $1 \text{ rad} = 100 \text{ Gy}$. La dose così definita non fa distinzione tra i diversi tipi di radiazioni. Un fattore ponderante (effetto biologico relativo, RBE) viene utilizzato nel tentativo di confrontare gli effetti biologici di diverse forme di radiazioni ionizzanti. Questo porta a un parametro chiamato "dose equivalente", le cui unità sono il *rem* o il *sievert*, Sv, ($1 \text{ rem} = 100 \text{ Sv}$), correlati dall'equazione:

$$\text{Dose equivalente (Sv)} = \text{dose(Gy)} \times \text{RBE}. \quad (45)$$

La disciplina degli ultrasuoni medici non ha mai tracciato queste distinzioni. I termini "esposizione" e "dose" sono usati in letteratura in modo intercambiabile, sebbene si possa fare un semplice esempio che evidenzia la necessità di adottare questa distinzione. Infatti, differenti conseguenze biologiche possono derivare da diverse modalità di erogazione di energia ad ultrasuoni. Ad esempio, due esposizioni che utilizzano la stessa energia acustica totale per un arco di tempo identico, in cui una viene erogata in modalità continua e l'altra con impulsi brevi a bassa frequenza di ripetizione, possono provocare effetti molto diversi nei tessuti. Il primo ha maggiori probabilità di indurre effetti termici, mentre il secondo può stimolare l'effetto meccanico. Nel fare il passaggio dall'esposizione alla dose in un campo ad ultrasuoni, è necessario conoscere i parametri acustici del percorso di propagazione. I parametri acustici di maggiore interesse in questo contesto sono i coefficienti di attenuazione e assorbimento, la velocità del suono e il parametro di non linearità B/A . Tuttavia questi parametri sono spesso non ben caratterizzati ed esistono notevoli lacune nella conoscenza dei valori di questi parametri nei tessuti sani e ammalati e nella dipendenza di questi parametri dalla letteratura.

Convenzionalmente, le esposizioni agli ultrasuoni sono caratterizzate in termini di campo acustico determinato in acqua in condizioni di campo libero. "Campo libero" per questi scopi descrive le circostanze in cui il fascio di ultrasuoni si propaga liberamente, senza subire l'influenza di confini o altri ostacoli. I parametri necessari per la descrizione dell'esposizione agli ultrasuoni sono la frequenza, il tempo di esposizione, le caratteristiche del trasduttore, la potenza totale, la pressione acustica e/o l'intensità acustica e il modo in cui l'energia viene erogata (singoli shot, o scansioni, etc.). Ulteriori fattori importanti che influenzano la misurazione sono la distanza del target dalla sorgente, l'assorbimento di energia nel percorso dell'acqua tra il trasduttore e il target. Tipicamente, la quantità più utilizzata per descrivere gli effetti biologici degli ultrasuoni e negli studi biofisici è l'intensità. Per misurare la pressione acustica sono stati utilizzati sia idrofoni ad ago che a membrana.

Gli idrofoni a membrana hanno il vantaggio di disturbare solo minimamente il campo, ma possono essere danneggiati da pressioni abbastanza elevate, tali da indurre cavitazione sulla loro superficie. Una volta stabilita la posizione del picco focale mediante un idrofono, è possibile misurare l'ampiezza della pressione acustica di picco. Da questo si può calcolare l'intensità del picco spaziale (picco focale).

1.4 Effetti biologici degli ultrasuoni

I primi rapporti sugli effetti biologici degli ultrasuoni apparvero già nel 1928 quando furono riportati cambiamenti nei tessuti viventi causati dall'esposizione ad onde sonore ad alta intensità e frequenza. Durante gli anni '40, fu proposto per la prima volta l'uso di ultrasuoni focalizzati per l'ablazione terapeutica o la chirurgia ad ultrasuoni e in seguito fu usato per trattare pazienti con morbo di Parkinson e altre condizioni neurologiche. Tuttavia, le applicazioni terapeutiche degli ultrasuoni sono state frenate dalla mancanza di immagini-guida durante il trattamento, che ha sollevato importanti problemi di sicurezza. Con lo sviluppo dell'imaging a ultrasuoni, i potenziali effetti pericolosi degli ultrasuoni sono stati studiati a fondo e sono stati chiariti i meccanismi di azione, le soglie e le proprietà di propagazione attraverso i tessuti. Il termine dosimetria ad ultrasuoni, che collega l'intensità degli ultrasuoni, la pressione acustica e altri parametri fisici con la probabilità di produrre alterazioni biologiche, è stato creato per guidare la progettazione di dispositivi di imaging ad ultrasuoni. Fortunatamente, gli studi di dosimetria ad ultrasuoni intesi a valutare la sicurezza dell'imaging diagnostico hanno migliorato la nostra comprensione degli effetti degli ultrasuoni su cellule e tessuti che ispirano lo sviluppo di applicazioni terapeutiche più avanzate. Si osservano due effetti biologici principali quando le onde acustiche si propagano attraverso i tessuti: termico e meccanico.

1.4.1 Effetti termici

Ogni volta che l'energia ultrasonica viene propagata in un materiale attenuante come il tessuto, l'ampiezza dell'onda diminuisce con la distanza. Questa attenuazione è dovuta all'assorbimento o alla dispersione. L'assorbimento è un meccanismo che rappresenta quella porzione di energia d'onda convertita in calore, e si può pensare alla dispersione come quella porzione che cambia direzione. Poiché il mezzo può assorbire energia per produrre calore, può verificarsi un aumento della temperatura fintanto che la velocità con cui il calore viene prodotto è maggiore della velocità con cui esso viene rimosso [1]. Nei tessuti, nel sito in cui l'intensità media temporale ultrasonica è I_{TA} , il tasso di generazione di calore per unità di volume è dato dall'espressione:

$$\dot{Q} = 2\alpha I_{TA} = \frac{\alpha p p^*}{\rho c}, \quad (46)$$

dove

$$I_{TA} = \frac{pp^*}{2\rho c}, \quad (47)$$

α è il coefficiente di assorbimento ultrasonico il quale aumenta all'aumentare della frequenza, p e p^* sono, rispettivamente, la pressione ultrasonica istantanea e il suo complesso coniugato, ρ la densità e c la velocità del suono. Il prodotto tra p e p^* è uguale all'ampiezza della pressione ultrasonica al quadrato, p_0^2 , a una posizione specifica nel mezzo in cui viene determinata \dot{Q} e può essere considerata come una quantità temporale media. L'intensità media temporale non è necessariamente nella posizione in cui è massimizzata, cioè nella posizione del picco spaziale. Se così fosse, allora I_{TA} (Eq. (47)) sarebbe l'intensità media temporale nel punto di picco spaziale I_{SPTA} , che massimizzerebbe \dot{Q} per quel sito di tessuto. Per una data I_{TA} , l'aumento massimo di temperatura ΔT_{max} , supponendo che non venga perso calore per conduzione, convezione o altri processi di scambio termico, è approssimativamente descritto da

$$\Delta T_{max} = \frac{\dot{Q}\Delta t}{C_v}, \quad (48)$$

dove Δt è la durata dell'esposizione e C_v è la capacità termica del mezzo per unità di volume. Questa formula è valida solo per brevi tempi di esposizione; per tempi di esposizione più lunghi, i processi di rimozione del calore diventano significativi. I valori forniti da AIUM Statement (American Institute for Ultrasound in Medicine) sono $I_{SPTA} = 0.1$ e 1 W/cm^2 a una frequenza ultrasonica di 5 MHz, per cui dall'Eq. (46) risulta $\dot{Q} = 0.05$ e $0.5 \text{ J/cm}^3\text{s}$ (con $\alpha \approx 0.25 \text{ cm}^{-1}$ a 5 MHz). Poiché le proprietà termiche del tessuto biologico possono essere approssimate dall'acqua ($C_v = 4.18 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-3} \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$), i valori massimi di variazione della temperatura sono

$$\frac{\Delta T_{max}}{\Delta t} = 0.012 \text{ e } 0.12 \text{ }^\circ\text{C/s}, \quad (49)$$

i quali indicano che per un'esposizione di 1 s, ΔT_{max} sarebbe di circa 0,012 e 0,12 °C. Se la durata dell'esposizione fosse più lunga di 1 s, la temperatura continuerebbe ad aumentare, ma a una velocità progressivamente più lenta, fino a quando la velocità di generazione del calore sarà circa la stessa di quella di rimozione del calore.

Per stimare l'aumento di temperatura provocato da un singolo impulso della strumentazione clinica e diagnostica ad emissione pulsata, l'intensità locale del singolo impulso dell'Eq. (46) è considerata come il valore di picco spaziale mediato sulla durata dell'impulso, ovvero, l'intensità media di impulso nel punto di picco spaziale I_{SPPA} . L' I_{SPTA} misura l'intensità media durante l'intera sonicazione, ed è quindi una buona misura del riscaldamento dei tessuti, che si ridimensiona in proporzione alla

durata della sonicazione. Al contrario, l' I_{SPPA} rappresenta l'intensità media su un singolo impulso, fornendo una stima dei bioeffetti termici a breve termine. Per la strumentazione tipica, il valore massimo di I_{SPPA} può raggiungere i 500 W/cm^2 . Pertanto, la variazione della temperatura nel tempo è

$$\frac{\Delta T_{max}}{\Delta t} = 60 \text{ }^\circ\text{C/s}, \quad (50)$$

ma, con una durata d'impulso, Δt , di circa $2 \mu\text{s}$, l'aumento di temperatura massimo sarà $\Delta T_{max} \approx 120 \mu^\circ\text{C}$. Tuttavia, nel caso di ultrasuoni focalizzati ad alta intensità (HIFU) per i quali la durata d'impulso può essere di 3 s, l'eq. (50) dimostra chiaramente che l'aumento di temperatura potrebbe superare i livelli sufficienti per l'ablazione dei tessuti.

Nel tessuto vivente, il trasferimento di calore si verifica in parte per perfusione (cioè flusso di sangue) e in parte per conduzione (chiamata anche diffusione). Un modello termico ampiamente utilizzato per i tessuti è l'equazione di trasferimento del bio-calore [1], formulazione che include un termine sorgente/dissipatore che rappresenta il trasferimento di calore tramite la perfusione del sangue, ovvero

$$\frac{\partial T}{\partial t} = \kappa \nabla^2 T - \frac{\Delta T}{\tau} + \frac{\dot{Q}}{c_v}, \quad (51)$$

dove $\partial T / \partial t$ è il tasso di aumento della temperatura in un punto, κ è la diffusività termica, ΔT è l'aumento di temperatura al di sopra di quella ambiente e τ è la costante del tempo di perfusione. Sebbene l'equazione di trasferimento del bio-calore presenti delle carenze [1], è facile da implementare analiticamente ed è forse il modello termico più diffuso dei tessuti viventi.

1.4.1.1 Concetto di dose termica

Le velocità delle reazioni chimiche e quindi dell'attività enzimatica dipendono dalla temperatura. L'effetto complessivo della temperatura sull'attività enzimatica è descritto dalla relazione nota come coefficiente di temperatura 10°C , o Regola del Q_{10} [1]. Molte reazioni enzimatiche hanno un Q_{10} vicino a 3, il che significa che per ogni incremento di 10°C della temperatura, l'attività enzimatica aumenta di un fattore 3. Una conseguenza immediata dell'aumento di temperatura è un aumento delle velocità di reazione biochimica. Tuttavia, quando la temperatura diventa sufficientemente alta (cioè circa $\geq 45^\circ\text{C}$), gli enzimi si denaturano. Successivamente, l'attività enzimatica diminuisce e alla fine cessa, il che può avere un impatto significativo sulla struttura e sulla funzionalità delle cellule.

Se si verificano danni durante l'esposizione di tessuti a temperatura elevata, l'entità del danno dipenderà dalla durata dell'esposizione e dall'aumento della temperatura raggiunto. Gli effetti dannosi in vitro sono generalmente osservati a temperature di $39\text{-}43^\circ\text{C}$, se mantenuti per un periodo di tempo

sufficiente; inoltre, a temperature più elevate (44 °C) può verificarsi la coagulazione delle proteine. Una formula empirica, basata su un gran numero di studi che coinvolgono la termotolleranza di cellule e tumori, mette in relazione il tempo t (in min) necessario per produrre un isoeffetto (ad esempio, una data quantità di morte cellulare), con il tempo (t_{43}) necessario se l'esposizione si fosse verificata ad una temperatura di riferimento di 43 °C, cioè

$$t_{43} = tR^{(43-T)}, \quad (52)$$

dove $R = 0.5$ per $T > 43$ °C e $R = 0.25$ per $T \leq 43$ °C. Usando l'Eq. (52), la relazione empirica derivata da Sapareto e Dewey [1], uno stesso valore di t_{43} può essere attribuito a qualsiasi combinazione di temperatura e durata dell'esposizione. Tra i 43 °C e 60 °C, la denaturazione delle proteine avviene in modo logaritmico rispetto al tempo di esposizione. Generalmente, il tessuto viene danneggiato a velocità esponenzialmente maggiori all'aumentare della temperatura in questo intervallo e poiché le proteine e le membrane cellulari subiscono la coagulazione a queste alte temperature, anche l'impedenza acustica del tessuto cambia in modo non lineare. Gli effetti termici diretti degli ultrasuoni ad alta intensità portano a cambiamenti nei tessuti che possono mediare effetti non termici estesi e improvvisi, che possono svolgere un ruolo sinergico in ulteriori sbalzi di temperatura. Le recenti linee guida FDA del 2017, impongono un I_{SPPA} massimo di 190 W/cm^2 , un I_{SPTA} massimo di 94 mW/cm^2 e un $MI < 1.9$ (indice meccanico, si veda paragrafo 1.4.2.1). In Europa, lo standard della Commissione elettrotecnica internazionale (IEC) 60601-2-5 per le apparecchiature ad ultrasuoni terapeutici a bassa intensità suggerisce un limite superiore di 3 W/cm^2 . L'indice termico (TI) fornisce informazioni sull'aumento della temperatura dei tessuti durante il trattamento. La definizione base di TI è

$$TI = \frac{W_0}{W_{DEG}}, \quad (53)$$

dove W_0 è la potenza della sorgente del sistema a ultrasuoni e W_{DEG} è la potenza di energia necessaria per aumentare la temperatura del tessuto di 1 °C in condizioni molto specifiche e conservative. Sono stati sviluppati tre diversi indici termici per valutare tre diversi modelli di tessuto, ovvero l'indice termico dei tessuti molli (TIS), l'indice termico osseo (TIB) e l'indice termico dell'osso cranico (TIC).

1.4.2 Effetti meccanici

Entrambe le quantità del primo e del secondo ordine sono state implicate in effetti biologici meccanici. Il meccanismo non termico che ha ricevuto maggiore attenzione è la cavitazione generata acusticamente, principalmente dalle microbolle, agenti di contrasto per gli ultrasuoni. Gli effetti sono stati anche attribuiti alla forza di radiazione.

1.4.2.1 Indice meccanico

L'indice meccanico, MI, è definito

$$MI = \frac{p_{r,3}}{\sqrt{f}}, \quad (54)$$

dove $p_{r,3}$ è la pressione di rarefazione di picco espressa in MPa ed f è la frequenza ultrasonica in MHz. Lo sviluppo dell'indice meccanico è basata sulla sperimentazione teorica e in vitro da parte di ricercatori che hanno scoperto una semplice relazione tra pressione acustica e cavitazione presupponendo una dimensione ottimale della bolla. La teoria ipotizzava una crescita isotermica, un collasso adiabatico, un fluido ospite incompressibile trascurava la diffusione del gas all'interno della bolla. Queste osservazioni furono la base per l'adozione dell'MI.

1.4.2.2 Cavitazione senza iniezione di microbolle

Quando un'onda a ultrasuoni si propaga nei tessuti, viene indotta una deformazione meccanica, la quale si riferisce al relativo cambiamento nelle dimensioni o nella forma del target. La tensione è significativa vicino a bolle di gas o vapore, da ciò deriva l'interesse per la cavitazione indotta dagli ultrasuoni. La cavitazione, in senso lato, si riferisce all'attività indotta dagli ultrasuoni che si verifica in un fluido contenente bolle o sacche a loro volta contenenti gas o vapore. Queste bolle provengono da materiali in posizioni definite "siti di nucleazione", la cui natura e fonte esatta non sono ben comprese in un mezzo complesso come il tessuto. Sotto la stimolazione ad ultrasuoni, la bolla oscilla e, a livelli di pressione ultrasonica sufficientemente elevati, può collassare.

Questo meccanismo è definito "collasso inerziale" perché il movimento della bolla è dominato dall'inerzia del fluido. La cavitazione può influire su un sistema biologico in virtù di un aumento della temperatura, di uno stress meccanico e/o della produzione di radicali liberi. Anche in questi casi esso è indicato come un meccanismo non termico.

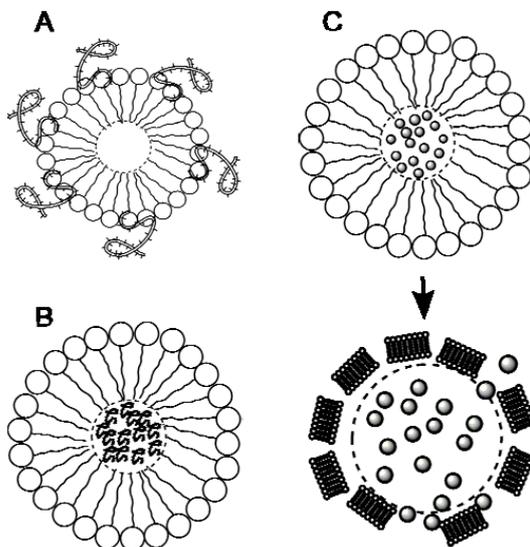


Figura 5. Microbolle come agenti di consegna. Le microbolle riempite con gas possono essere utilizzate come agenti di consegna incorporando ligandi sulle estremità idrofobiche (A), incapsulando i ligandi all'interno della microbolla che verrebbero erogati al collasso di quest'ultima (B) o incapsulando farmaci o nanoparticelle all'interno delle microbolle rilasciati al collasso (C). Queste microbolle possono agire da portatori di farmaci, terapia genica, piccoli RNA interferenti (siRNA) o altre nanoparticelle. Tratta da [4].

Il verificarsi della cavitazione e il suo comportamento dipendono da molti fattori, tra cui: la pressione ultrasonica; se il campo ultrasonico è focalizzato o non focalizzato, pulsato o continuo; fino a che punto ci sono onde stazionarie; la natura, lo stato del materiale e la sua geometria. Poiché, sperimentalmente, la cavitazione interessa solo una o poche cellule, sarebbe estremamente difficile rilevare un effetto biologico avverso, a meno che gli eventi di cavitazione non fossero diffusi in un grande volume di tessuto. Ciò è stato dimostrato nel caso del tessuto del sistema nervoso dei mammiferi, il quale è stato esposto a livelli ultrasonici di I_{SPTP} (intensità dell'impulso di picco spaziale nel tempo) superiori a $1000 W/cm^2$ per una durata dell'impulso di almeno 1 ms. Il violento collasso delle bolle produce quindi alte temperature e pressioni tali da causare emissione di luce e formazione di specie chimiche reattive.

1.4.2.3 Cavitazione con iniezione di microbolle

La principale applicazione medica degli agenti di contrasto a ultrasuoni (UCA) è quella di migliorare l'ecogenicità del sangue. Tali microbolle (Fig. 6) offrono la possibilità di cavitazione indotta da ultrasuoni e di potenziali bioeffetti. Tre modalità di esposizione ad ultrasuoni vengono utilizzate con applicazione di UCA: MI basso, MI normale e MI alto. Un MI basso è considerato intorno allo 0,1 e gli UCA subiscono oscillazioni lineari. L'MI normale viene considerato tra 0,2 e 0,7 e gli UCA subiscono oscillazioni non lineari. Un MI elevato viene considerato tra 0,8 e 1,9 (limite regolamentare della FDA) e gli UCA collassano.

La somministrazione diretta e specifica di farmaci contro i tumori solidi è spesso inefficiente e, di conseguenza, le cellule e i tessuti sani del paziente sono soggetti agli effetti tossici dei farmaci. Pertanto, è importante sviluppare strategie terapeutiche che somministrino farmaci alle cellule target all'interno del paziente in modo specifico, efficace e sicuro. Uno di questi metodi prevede l'uso degli ultrasuoni per migliorare la permeabilità cellulare. Con questo metodo è possibile, tramite la vascolarizzazione del tumore, fornire composti terapeutici collocati all'interno degli UCA direttamente alle cellule tumorali e provocarne il collasso attraverso l'utilizzo di onde ultrasoniche.

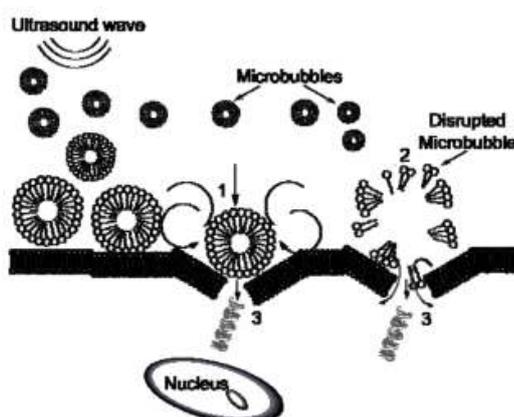


Figura 6. Le microbolle riempite di gas irradiate con ultrasuoni oscillano sotto l'influenza della variazione di pressione e vengono spinte dalla forza di radiazione verso la membrana cellulare. I pori transitori compaiono quando la membrana cellulare viene interrotta dall'espansione delle bolle (1) o dal collasso della bolla (2). Il collasso e l'espansione delle microbolle generano forze di taglio attorno alla membrana cellulare che causano microstreaming, spingendo gli agenti attraverso i pori temporaneamente formati. Tratta da [4].

Inoltre, quando esposta agli ultrasuoni, la membrana di una cellula può diventare transitoriamente permeabile. Questo effetto, chiamato sonoporazione (Fig. 7), aumenta quando gli UCA subiscono cavitazione vicino alle cellule [4].

Gli ultrasuoni sono stati utilizzati con successo in studi preclinici per introdurre agenti impermeabili di membrana in cellule o tessuti tra cui acido ribonucleico interferente piccolo (siRNA), peptidi, DNA plasmidico, nanoparticelle e anticorpi. Oltre all'effetto terapeutico causato dall'aumento del rilascio di farmaci nelle cellule, è stata suggerita la sonoporazione per migliorare la citotossicità delle molecole terapeutiche antitumorali e promuovere l'apoptosi indotta dagli ultrasuoni. Quest'ultima è un effetto molto osservato nei tessuti che hanno una scarsa rigenerazione come i neuroni. Un'ulteriore impiego di questa tecnica è quello di migliorare temporaneamente e localmente la permeabilità della barriera ematoencefalica (BEE), attraverso la combinazione di ultrasuoni ad alta intensità, doxorubicina e microbolle Optison®. Sfortunatamente, il beneficio terapeutico nel corso degli studi, fu ostacolato da alcuni effetti deleteri al tessuto cerebrale (come microemorraggie, ischemia, edema cerebrale) che si verificava in alcuni animali. Tuttavia, ciò è stato risolto con l'utilizzo di ultrasuoni focalizzati insieme all'iniezione di microbolle di gas intravascolari (Fig. 8), le quali hanno ridotto l'intensità delle onde incidenti nei tessuti adiacenti al target. Quando le microbolle passano attraverso il volume del tessuto esposto agli ultrasuoni, si espandono e si contraggono alla frequenza dell'onda acustica, mentre la forza di radiazione le spinge verso le pareti del vaso. Al di sopra di una data soglia di intensità, le bolle collassano creando getti fluidi che possono perforare la BEE consentendo il passaggio di molecole. La risonanza magnetica ha rivelato che la BEE sembra rimanere permeabile fino a 24 ore dopo l'esposizione agli ultrasuoni con assorbimento cerebrale ottimale entro 6 ore.

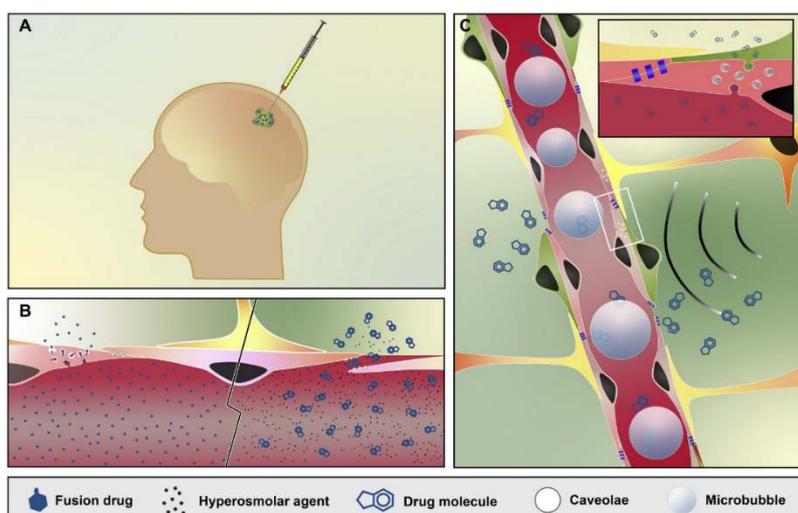


Figura 7. Illustrazione schematica del processo che comporta (A) l'iniezione diretta controllata del farmaco nel parenchima cerebrale. (B) Il pannello di sinistra mostra farmaci riprogettati fusi con insulina o che trasferiscono i recettori per passare attraverso la BEE, mentre, il pannello di destra (C) illustra l'apertura della barriera in caso di somministrazione di agente iperosmolare (ad es. Mannitolo). Ultrasuoni focalizzati e microbolle migliorano la penetrazione del farmaco. Tratta da [5].

Indagini svolte sulla sicurezza di questa tecnica hanno dimostrato che la permeabilità ad una frequenza di 690 kHz e valori di pressione di 0.4 MPa, significativamente inferiori ai 2.3 MPa alla quale si ha la necrosi tissutale. Inoltre indagini istologiche sui tessuti adiacenti dopo il trattamento hanno dimostrato livelli trascurabili di apoptosi o ischemia.

CAPITOLO 2 - ULTRASUONI FOCALIZZATI PER NEUROMODULAZIONE: ASPETTI GENERALI

2.1 Sviluppo e primi utilizzi degli ultrasuoni focalizzati

Come già affermato nel capitolo precedente, gli ultrasuoni sono onde meccaniche che si propagano a frequenze nell'ordine del MHz. Per generare oscillazioni meccaniche a queste frequenze, i trasduttori ad ultrasuoni sono composti da cristalli piezoelettrici. La piezoelettricità è la proprietà di cui godono alcuni materiali cristallini, per la quale una pressione meccanica applicata su di essi viene convertita in elettricità, precisamente in carica elettrica sulle superfici. La conversione delle onde meccaniche in onde elettriche, chiamata effetto piezoelettrico, fu scoperta dai fratelli Curie nel XIX secolo e lo studio dell'effetto inverso (conversione da onde elettriche a onde meccaniche) da parte di Gabriel Lippmann rese possibile la generazione del campo di ultrasuoni [6]. Infatti, l'applicazione precisa di una corrente elettrica ai cristalli piezoelettrici trasduce l'energia in precisi movimenti meccanici, generando onde sonore.

Le onde ultrasoniche possono anche interferire in modo costruttivo e distruttivo tra loro. Questa caratteristica ha portato allo sviluppo di usi diagnostici e terapeutici degli ultrasuoni basati proprio sul controllo di queste interferenze. Infatti gli array di trasduttori a ultrasuoni fisicamente separati tra loro possono utilizzare le interferenze costruttive e distruttive per concentrare l'energia in un singolo punto (punto focale o focus) [6]. Pertanto l'imaging o la terapia che utilizza questi fasci di ultrasuoni focalizzati viene chiamata FUS (Focused Ultrasound Stimulation).

L'eccellente profondità di penetrazione degli ultrasuoni all'interno dei tessuti molli a lunghezze d'onda su scala millimetrica fornisce un metodo ideale per la somministrazione non invasiva di energia localizzata per l'ablazione dei tessuti e altri interventi. La sperimentazione con applicazioni FUS neurologiche è iniziata nel 1958 da parte di Fry et al.; in quel caso il primo dispositivo clinico a ultrasuoni focalizzati, guidati da raggi X, venne utilizzato per coagulare termicamente i tessuti disfunzionali [7]. In questi primi studi sull'uomo, venne quindi dimostrato che la FUS può essere utilizzata per l'ablazione selettiva delle regioni bersaglio, risparmiando i tessuti circostanti.

I sistemi a FUS impiegati nei primi studi clinici consistevano in trasduttori a elemento singolo e quindi richiedevano un controllo meccanico per il targeting e per l'intera applicazione (si veda paragrafo 2.4.3). Inoltre, l'elevata attenuazione delle onde ultrasoniche causata dall'osso cranico richiedevano la craniotomia chirurgica per l'applicazione della FUS intracranica, il che la rendeva una procedura altamente invasiva. Nel 2002, l'applicazione della FUS divenne un'alternativa

efficiente alle attuali opzioni terapeutiche, grazie agli studi di Clement e Hynynen [8], i quali utilizzarono trasduttori a phased array multi-elemento (vedi paragrafo 2.4.2) per trasmettere più fasci di ultrasuoni focalizzati su bersagli in aree più profonde del cervello, producendo così un effetto terapeutico solo dove i raggi si intersecano (punto focale). I phased array consentono anche di tenere conto delle distorsioni del fronte d'onda indotte dalla propagazione acustica attraverso tessuti eterogenei, il che non è possibile con i trasduttori a elemento singolo; ciò è risultato fondamentale per consentire l'uso della terapia FUS nel cervello senza dover prima effettuare la craniotomia.

Nonostante le tecniche di neuromodulazione a ultrasuoni transcranici focalizzati (tFUS) e ad ultrasuoni transcranici non focalizzati (tUS) condividano gli stessi meccanismi d'azione di base, se applicati sullo stesso bersaglio possono portare a risultati abbastanza diversi. Questi risultati sono correlati alle differenze intrinseche tra le due tecniche. Il più importante, è il volume del cervello sottoposto al campo degli ultrasuoni. Alcune risultati sperimentali, in cui tFUS e tUS sono stati applicati sullo stesso target, come la corteccia motoria primaria, hanno dimostrato che tUS riesce ad attivare i MEP (Potenziali Motori Evocati, Motor Evoked Potential), mentre la tFUS li inibisce [9]. Inoltre, per la tUS la sonicazione effettuata durante la durata dello stimolo è generalmente continua, senza pause tra un impulso e l'altro, invece per la tFUS è pulsata, cioè caratterizzata da pause tra le sonicazioni [9].

2.2 Parametri di sonicazione

I cinque parametri che definiscono uno specifico protocollo di sonicazione sono: la frequenza fondamentale, la frequenza di ripetizione dell'impulso (pulse repetition frequency, PRF), duty cycle, durata della sonicazione e intensità (Fig. 9). La frequenza fondamentale è definita come il numero di cicli oscillatori per unità di tempo o l'inverso del periodo. La scelta della frequenza è un fattore determinante per il targeting spaziale delle regioni cerebrali [10].

Dal momento che è inversamente proporzionale alla lunghezza d'onda, una frequenza fondamentale più elevata provoca un focus più stretto di stimolazione. Esperimenti *ex vivo* con teschi umani hanno mostrato che una $f < 700 \text{ kHz}$ è ottimale per la trasmissione transcranica; pertanto, la maggior parte della ricerca sulla neuromodulazione di primati umani e non umani ha utilizzato frequenze comprese tra 200-650 kHz, consentendo il targeting di regioni cerebrali piccole fino a 2-4 mm. La PRF determina la velocità con cui vengono emessi gli impulsi acustici, mentre il duty cycle rappresenta l'intervallo di tempo dell'intera durata del trattamento in cui si ha l'impulso, il quale è costituito da cicli di ultrasuoni alla medesima frequenza fondamentale. La durata della sonicazione è definita come il tempo totale dall'esordio del primo impulso alla fine dell'ultimo. Le prove di studi preclinici

suggeriscono che durate più lunghe favoriscono l'inibizione dei neuroni corticali, mentre durate brevi ne provocano l'eccitazione [10].

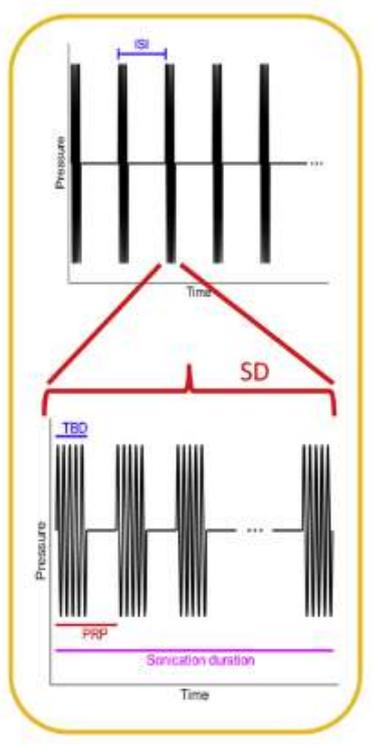


Figura 9. La figura mostra un protocollo di sonicazione pulsata. ISI (inter-stimulation interval) rappresenta l'intervallo di tempo che intercorre dal primo impulso di una sonicazione al primo impulso di quella successiva. Ciascuna sonicazione è definita dalla durata (SD) in cui TBD (Tone Burst Duration) indica l'intervallo di tempo tra l'inizio e la fine di ogni singolo impulso e il PRP (Pulse Repetition Period, ossia l'inverso della PRF) è il periodo di ripetizione dell'impulso. Il duty cycle può essere considerato come la somma di tutti i TBD per ogni sonicazione. Tratta da [10].

2.2.1 Modalità di sonicazione degli FU

Il vantaggio terapeutico dell'applicazione FUS continua ad alta intensità è legato ad un ingente aumento di temperatura localizzato, raggiungendo fino a 65 °C o più che provoca necrosi coagulativa irreversibile a livello dei tessuti (generalmente raggiunta a temperature poco più superiori a 55 °C) in pochi secondi, la quale sta alla base delle terapie ablative. Quando la FUS viene applicata in modo pulsato (anziché continuo) e ad alta intensità (HIFU), durante la pausa tra un impulso e l'altro può verificarsi un live raffreddamento del tessuto bersaglio e l'intensità mediata nel tempo può essere sostanzialmente ridotta. Questi fattori riducono gli aumenti di temperatura del target e delle zone prossimali a pochi gradi Celsius, nel caso di HIFU in modalità pulsato [8]. In tal caso, gli effetti meccanici predomineranno (piuttosto che quelli termici) sulla citoarchitettura locale, e possono essere utilizzati per migliorare la consegna di farmaci e geni attraverso l'enhancement della permeabilità

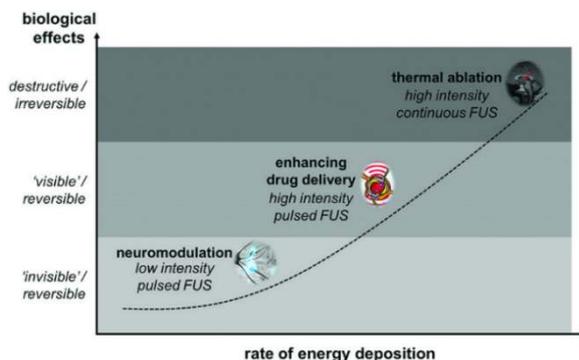


Figura 10. Effetti biologici unici si possono ottenere su una vasta gamma di valori di energia trasmessa manipolando l'intensità e il duty cycle del protocollo di sonicazione. Questi includono neuromodulazione, enhancement della barriera emato-encefalica (BEE) e ablazione termica. Tratta da [8].

della BEE (come già descritto nel paragrafo 1.4.2.3). Un'ulteriore riduzione della velocità di emissione di energia si ottiene con un'applicazione di FUS pulsata a bassa intensità, che può generare effetti neuromodulatori unici con aumenti di temperatura trascurabili (Fig. 10).

2.2.2 Meccanismi di neuromodulazione degli FUS a bassa intensità

Nonostante ricerche approfondite sui suoi effetti neuromodulatori per oltre cinquant'anni, i meccanismi d'azione alla base di LIFU rimangono scarsamente compresi [15]. Gli effetti non termici che si ipotizzano essere provocati da LIFU sono principalmente tre: a) variazioni della capacità di membrana (flexoelettricità e cambiamenti conformazionali), b) modulazione dei canali meccanosensibili (mechanosensitive channels) e c) sonoporazione (già accennata nel capitolo 1).

Con il termine sonoporazione si definisce l'apertura di pori o altri processi di trasporto, diversi dai canali ionici normalmente impiegati dalla membrana cellulare, tramite stimolazione acustica. La sonoporazione può verificarsi attraverso la creazione di pori fisici nel doppio strato lipidico, che fornirebbe un nuovo canale per il trasporto di ioni, guidato dai gradienti attraverso la membrana cellulare [13]. È stato dimostrato che la probabilità di formare un poro nella membrana è direttamente proporzionale alla compressibilità e al calore specifico della membrana stessa. Infatti, durante il transito degli ioni, il calore specifico raggiunge un picco locale, e quindi se la perturbazione degli ultrasuoni riesce a spingere la membrana attraverso una fase di transizione, la velocità di formazione dei pori aumenterà.

Il modello originario di Hodgkin e Huxley del 1952 sulla propagazione degli impulsi nervosi in un neurone prevedeva che la membrana avesse una capacità fissata [13]. Studi successivi hanno dimostrato che i cambiamenti nelle proprietà della membrana, come lo spessore, la curvatura e lo stato conformazionale del doppio strato fosfolipidico, portano a cambiamenti nella sua capacità, che possono provocare l'eccitazione degli impulsi nervosi. È stata già dimostrata l'abilità degli ultrasuoni di indurre all'interno delle membrane lipidiche correnti capacitive, le quali si basano su meccanismi flexoelettrici e sui cambiamenti di conformazione della membrana. Se le perturbazioni indotte sono sufficientemente compressive, le correnti risultanti saranno eccitatorie, mentre, se dilatative, le correnti saranno inibitorie [13]. Quindi, anche senza la creazione di pori fisici, la permeabilità della membrana può cambiare con il suo stato di conformazione, il quale influenza l'ambiente solvente nel nucleo idrofobo.

Recenti osservazioni, hanno confermato l'ipotesi che i LIFU agiscano, in parte, attraverso forze di radiazione acustica che incidono sui canali ionici locali. Mentre le onde ultrasoniche esercitano una pressione costante sui neuroni bersaglio, l'energia meccanica trasportata allunga e distorce la

membrana cellulare producendo alterazioni dirette sulla cinetica del gating (ossia l'apertura o la chiusura dei canali ionici), sulla conformazione dei canali e delle molecole associate alla membrana cellulare. Questi cambiamenti alla fine influenzano il flusso di ioni attraverso il doppio strato lipidico e quindi la probabilità di scarica neurale [15]. Nel 2008, un'indagine sugli effetti degli ultrasuoni a bassa intensità sull'elettrofisiologia neuronale condotta da Tyler et al. mostrò infatti che l'applicazione ultrasonica può innescare l'apertura dei canali voltaggio dipendenti del sodio (Na^+), dei canali liberi di calcio (Ca^{2+}), inoltre, fornisce un incremento sia dell'esocitosi mediata da recettori delle vescicole sinaptiche sia della trasmissione sinaptica nella sezione ippocampale asportata dal cervello di un topo [8]. Nel caso dello ione calcio Ca^{2+} , esso rappresenta una importante molecola messaggera, coinvolta anche nella funzione neuronale tramite la modulazione dell'attività sinaptica e attraverso le vie di segnalazione [13]. Inoltre, il flusso di Ca^{2+} è strettamente legato allo stato conformazionale della membrana, poiché la variazione di uno tra questi due comporta inevitabilmente alla variazione dell'altro. Oltre ai canali ionici, l'attività sinaptica è anche sensibile agli stimoli meccanici e infatti, le cellule gliali hanno mostrato, in studi condotti di recente, una risposta alla stimolazione ultrasonica [13]. Di seguito è riportata la Figura 11 che illustra gli effetti di sonicazione sulla membrana cellulare.

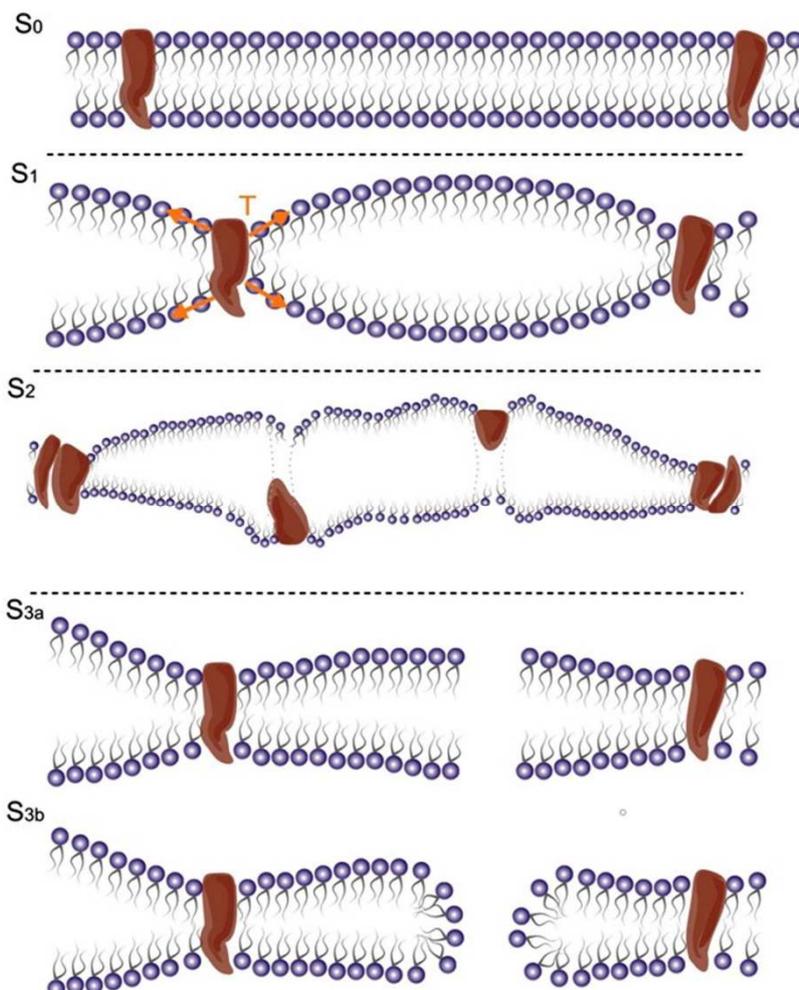


Figura 11. Gli ultrasuoni aumentano gradualmente la tensione di membrana. Dallo stato di riferimento (S_0), il primo allungamento attiva le proteine meccanosensibili (S_1); la tensione crescente potrebbe danneggiare le proteine di membrana (S_2) e quindi indurre la formazione di pori (S_{3a}) o causare la rottura della membrana (S_{3b}). Tratta da [6].

2.2.3 Plasticità a lungo termine

Una delle domande principali nel valutare l'utilità della tFUS nella neuroriabilitazione è stata quella di capire se gli effetti della sonicazione potessero effettivamente sopravvivere alla durata della sonicazione stessa. Infatti, per avere degli effetti terapeutici, si doveva esaminare la presenza di effetti a lungo termine sufficienti per indurre la plasticità neurale. In uno studio svolto nel 2011 da S.S. Yoo et al., la tFUS è stata applicata alle aree somatosensoriali di ratti anestetizzati per 10 minuti a bassa intensità e breve duty cycle (5%), misurando la progressione temporale dei potenziali somatosensoriali evocati (SEP). Rispetto alla condizione 'sham' di controllo, (nella quale si misura l'attività neurale in assenza di sonicazione), sono state osservate caratteristiche differenti dei SEP anche dopo 35 minuti dall'interruzione della somministrazione degli FUS [14].

2.3 Confronto con altre tecniche di neuromodulazione

La neuromodulazione, o la capacità di influenzare in modo reversibile l'attività neuronale, attraverso l'eccitazione o l'inibizione reversibile di popolazioni di neuroni, ha un enorme potenziale terapeutico [8]. Essa infatti produce un effetto diretto e localizzato nei circuiti neuronali comportando meno lesioni ai pazienti rispetto alle tecniche farmacologiche [11]. La stimolazione cerebrale può essere effettuata tramite un'applicazione elettrica, magnetica, ottica o meccanica. La tabella 4 (tratta da [11]) cataloga alcune delle tecniche di neuromodulazione utilizzate clinicamente o ancora in fase di ricerca.

Table 4. Alcune tecniche di stimolazione cerebrale utilizzate a livello clinico o in fase di ricerca.

Base Fisica	Tecnica	Abbreviazione	Stato
Elettrica	Stimolazione del nervo vago	VNS	Clinico
	Stimolazione cerebrale profonda	DBS	Clinico
	Stimolazione transcranica a corrente	tCS	Clinico
	Stimolazione elettrocorticale impiantata	IES	Ricerca
	Stimolazione corticale epidurale	ECS	Ricerca
	Stimolazione del nervo trigemino	TNS	Ricerca
	Terapia elettroconvulsiva	ECT	Clinico
	Stimolazione elettroterapeutica cranica	CES	Clinico
Magnetica	Stimolazione magnetica transcranica	TMS	Clinico
	TMS ripetitiva	rTMS	Clinico
Ottica	Optogenetica	-	Ricerca

Gli approcci optogenetici per la stimolazione cerebrale, hanno la capacità di controllare l'attività di un individuo/gruppo di cellule tramite la modifica genetica delle cellule nervose per renderle sensibili alla luce [14]. In termini di risoluzione spaziale, questi metodi di neurostimolazione geneticamente mediati attualmente sembrano essere superiori a tutti gli altri metodi di stimolazione cerebrale. Per questa tecnica, i limiti di risoluzione funzionale sono determinati dalla posizione e dalla densità dell'espressione proteica piuttosto che dai limiti dovuti alla diffrazione della radiazione elettromagnetica o della luce. Tuttavia, il limite principale dell'optogenetica risiede proprio nella complessità della codifica genetica che presenta spesso una serie di ostacoli e può quindi complicarne l'applicazione [12].

Sebbene in calo di popolarità per vari motivi, la terapia d'urto elettroconvulsiva (comunemente nota come 'elettroshock') è un classico metodo di stimolazione cerebrale, che non richiede un intervento chirurgico è stata ampiamente utilizzata in passato nel trattamento dei disturbi psichiatrici [12].

Le tecniche più comuni tra quelle cliniche sono la stimolazione cerebrale profonda (DBS), la stimolazione transcranica a corrente (tCS) e la stimolazione magnetica transcranica (TMS). L'obiettivo principale è quello di raggiungere l'utilità terapeutica e l'efficacia clinica dei disturbi neurologici e psicologici nonostante i limiti che esse presentano. I vantaggi e gli svantaggi delle suddette tecniche sono elencati insieme a quelli degli ultrasuoni a bassa intensità nella tabella 5 (la fMRI brain mapping indica la risonanza magnetica funzionale utilizzata per mappare le aree cerebrali, è utilizzata spesso per facilitare la localizzazione del target di sonicazione; tratta da [11]).

Tabella 5. Vantaggi e svantaggi delle tecniche di stimolazione comuni.

Parametro	DBS	tCS	TMS	LIFU
Invasività	Invasiva	Non invasiva	Non invasiva	Non invasiva
Risoluzione spaziale	~1 mm	Non rilevabile	~3-5 cm	1-5 mm
Profondità di stimolazione	Illimitata	Non rilevabile	~1-1.5 cm	10-15 cm o più
Durata degli effetti reversibili	~5 s	24 h	~5 s	~10-40 min
fMRI brain mapping	Difficile	Difficile	Molto difficile	Semplice

NEUR  SCIENCE

Evocare l'attività neuronale usando elettrodi convenzionali come avviene nella DBS, rappresenta di gran lunga l'approccio di stimolazione cerebrale più utilizzato data l'elevata risoluzione spaziale, il quale varia da diversi micrometri a pochi millimetri a seconda della dimensione e del posizionamento dell'elettrodo, dell'ampiezza, della durata e della frequenza dello stimolo. Lo svantaggio principale dell'utilizzo di elettrodi per la stimolazione del circuito cerebrale intatto è la necessità di un contatto

diretto con il tessuto neurale permesso da procedure chirurgiche altamente invasive, che innescano processi deleteri come infiammazione, sanguinamento, morte cellulare e gliosi [12]. Pertanto, sono spesso desiderabili procedure di stimolazione cerebrale meno invasive.

Al momento, i metodi di stimolazione cerebrale non invasiva più riconosciuti sono la stimolazione transcranica a corrente continua (tDC) e la stimolazione magnetica transcranica (TMS). Questi metodi di stimolazione cerebrale non invasiva possono essere utilizzati per attivare in modo non specifico le cellule in volumi di tessuto aventi diametro di 1 cm o più trasmettendo attraverso il cranio correnti elettriche (tCS) o energia magnetica (TMS) nel cervello. Sebbene le risoluzioni spaziali per TMS e tDCS siano notevolmente peggiori di quella della DBS, TMS e tDCS presentano un grande vantaggio: non richiedono un intervento chirurgico. Infatti, sia TMS che tDCS si sono dimostrati efficaci per stimolare i circuiti cerebrali intatti di topo e ratto, anche mediante modulazione non invasiva dell'attività corticale e subcorticale. Nonostante la loro non invasività, è spesso preferito implementare metodi di stimolazione cerebrale che offrano migliori risoluzioni spaziali e accuratezza di targeting [12].

Utilizzando le onde di pressione acustica anziché la luce, le correnti elettriche o le radiazioni magnetiche, è stato dimostrato che si possono stimolare funzionalmente i circuiti cerebrali del topo conferendo una risoluzione spaziale di ~ 3 mm [12]. La possibilità di 'bersagliare' la regione di interesse (ROI) nel cervello con alta risoluzione spaziale è una delle caratteristiche più rilevanti che offre la tecnica LIFU, e la focalizzazione dei LIFU attraverso i tessuti potrebbe essere effettuata sotto la guida dell'imaging cerebrale a risonanza magnetica in tempo reale (fMRI). Inoltre, la tecnica LIFU potrebbe essere applicata su più ROI nel cervello contemporaneamente o separatamente, sia che gli ultrasuoni producano effetti inibitori o eccitatori. Un'altra caratteristica importante è la non invasività (transcranica). In altre parole, le regioni target (ROI) possono essere controllati spostando di fase lo strumento (phased array, cioè modificando lo sfasamento con cui vengono eccitati i singoli elementi piezoelettrici nel trasduttore multielemento) senza alcun movimento meccanico o ulteriore operazione. Come tecnica sicura, essa può anche evolversi in versioni portatili come array di ultrasuoni impiantabili e indossabili [11].

2.4 Dispositivi

Una delle sfide principali per l'implementazione degli ultrasuoni come strumento di neuromodulazione nel sistema nervoso centrale (CNS) è la loro trasmissione attraverso il cranio. Infatti, l'osso del cranio è una struttura altamente eterogenea che presenta sia una densità sia una velocità di propagazione del suono maggiore rispetto al tessuto molle che lo circonda, generando tra

di essi un'elevata differenza di impedenza acustica. La sua struttura a più strati è formata da un guscio corticale duro e da uno strato di osso spugnoso interno pieno di sangue e grasso. La struttura trabecolare di questo strato interno provoca una forte dispersione dell'onda acustica a frequenze superiori a 1 MHz [13], rendendo il cranio simile a un filtro passa basso, limitando così la gamma di frequenza utilizzabile per la propagazione transcranica degli ultrasuoni.

Nei roditori, l'osso sottile del cranio consente agli ultrasuoni di penetrare facilmente nel cervello, ma le onde stazionarie possono formare delle riflessioni prodotte dalla parte opposta del cranio, generando campi complessi e punti di pressione lontani dalla posizione target. Nel passare da piccoli animali a grandi animali e umani, il cranio diventa più spesso e di conseguenza presenta una maggiore attenuazione e aberrazione dell'onda acustica. Lo sviluppo di array multi-elemento con centinaia o migliaia di singoli trasduttori ha consentito la correzione dell'onda ultrasonica per compensare le aberrazioni e concentrarsi efficacemente all'interno del cervello verso obiettivi profondi. Questi array sono stati implementati principalmente per applicazioni di ablazione termica, consentendo il trattamento dei tumori cerebrali, dolore neuropatico, disturbo ossessivo-compulsivo, tremore essenziale e morbo di Parkinson [13].

Tuttavia, gli array di trasduttori sono estremamente complessi e costosi, rendendoli così proibitivi per la maggior parte dei gruppi d'indagine nelle prime fasi della ricerca sulla neuromodulazione mediata dagli ultrasuoni. Inoltre per i target cerebrali situati sulla superficie corticale (utilizzati per analizzare gli effetti della stimolazione a ultrasuoni), gli array potrebbero non essere necessari per trattare queste aree [13]. Di conseguenza, possono essere utilizzate configurazioni più semplici per concentrarsi su obiettivi cerebrali periferici a costi molto ridotti, come ad esempio i trasduttori a elemento singolo. Tuttavia, è probabile che alcuni obiettivi rimangano difficili da accedere tramite questi dispositivi a causa della struttura dell'osso cranico descritta in precedenza. Per questo, lo sviluppo di una lente acustica potrebbe correggere le aberrazioni indotte e consentire la messa a fuoco acustica sull'obiettivo previsto [13]. La lente ha uno spessore regolabile per aggiustare la fase dell'onda incidente in base alla velocità del suono in quel materiale. Con ciò, un trasduttore a singolo elemento può essere trasformato in un array efficace, consentendo il trattamento di siti precedentemente intrattabili. Sebbene la lente sia quindi individuale e specifica, può essere costruita a un costo nettamente inferiore rispetto a quello di un array e una volta creata non dovrebbe essere più necessario alcun aggiustamento, neanche per trattamenti ripetuti, come può avvenire nel caso di applicazioni cliniche. In sintesi, mentre è probabile che siano necessarie matrici per individuare specifici bersagli cerebrali del sistema nervoso centrale situati in profondità, i trasduttori a singolo elemento possono

essere utilizzati con le lenti per colpire la superficie corticale, fornendo una soluzione per posizioni intermedie [13].

2.4.1 Generazione di un fascio ultrasonico

La Figura 12 mostra come le onde ultrasoniche possono essere generate da una piastra piezoelettrica che ha elettrodi metallici su entrambe le sue superfici anteriore e posteriore. Gli elettrodi sono collegati a una linea di trasmissione a radiofrequenza (RF) che applica una tensione variabile nel tempo tra gli elettrodi. A causa dell'effetto piezoelettrico inverso, il materiale piezoelettrico si espande e si contrae in proporzione alla tensione applicata e genera un disturbo meccanico, alla frequenza del segnale RF, nel mezzo a contatto con la superficie anteriore [7].

La frequenza di risonanza fondamentale di un trasduttore si ottiene quando la lunghezza d'onda λ nel materiale piezoelettrico è pari al doppio dello spessore della piastra. Per i trasduttori utilizzati in clinica, un mezzo a bassa impedenza (ad es. l'aria) viene comunemente utilizzato per garantire che si verifichi una riflessione totale dell'onda ultrasonica sulla superficie posteriore della piastra e che la maggior parte dell'energia generata sia diretta attraverso la parte anteriore del trasduttore, fornendo la massima potenza in uscita entro una larghezza di banda di frequenza molto stretta [7]. L'impedenza acustica di un materiale piezoelettrico è in genere elevata rispetto al tessuto biologico e al liquido di accoppiamento, tuttavia è possibile utilizzare strati di corrispondenza (Matching layers) per migliorare la trasmissione di energia dalla piastra al tessuto (Fig. 12). Lo spessore dello strato di corrispondenza che massimizza la trasmissione di energia è un quarto della lunghezza d'onda degli ultrasuoni che attraversano lo strato.

È anche possibile fabbricare dispositivi con un intervallo di frequenza operativa più ampio utilizzando materiali compositi. Questi materiali contengono, ad esempio, piccoli (paragonati alla lunghezza d'onda) pilastri di materiale piezoelettrico incorporati in un polimero più morbido, con conseguente riduzione dell'impedenza acustica. I trasduttori in materiale composito sono stati originariamente sviluppati per scopi diagnostici (nell'imaging a ultrasuoni), ma da allora hanno trovato impiego nelle terapie grazie al più esteso intervallo operativo di frequenze [7]. Tipicamente, la linea guida a RF contiene una sorgente che genera il segnale RF sinusoidale alla frequenza di risonanza del trasduttore. Questo segnale viene amplificato attraverso un amplificatore collegato a un accoppiatore bidirezionale e un misuratore di potenza per il monitoraggio della potenza dell'onda trasmessa e riflessa, poi si propaga attraverso una rete di 'tuning' (Matching Network) che abbina, alla frequenza di risonanza, l'impedenza del trasduttore all'impedenza di uscita dell'amplificatore. Per i phased array

a multi-elemento, ogni singolo elemento dell'array è guidato dalla propria linea guida indipendentemente dagli altri [7].

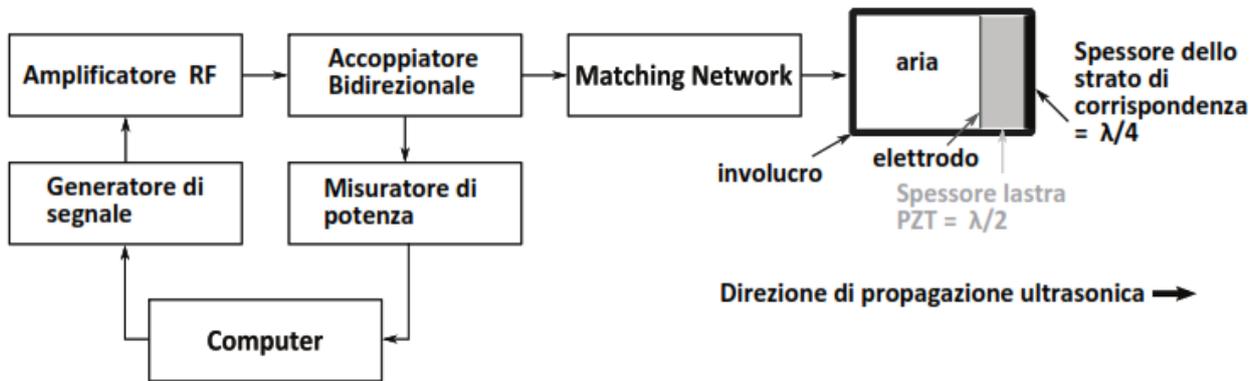


Figura 12. Diagramma di un singolo trasduttore e dalla propria linea guida RF. Tratta da [7].

2.4.2 Focalizzazione degli ultrasuoni

La focalizzazione degli ultrasuoni, utilizzata per prevenire le perdite del segnale dovute all'assorbimento acustico e allo scattering (ossia la dispersione delle onde causata dalla loro interazione con la materia), può essere realizzata utilizzando trasduttori con curvatura sferica, lenti acustiche, riflettori o phased array [7]. Utilizzando grandi (rispetto alla lunghezza d'onda) sorgenti, i fasci ultrasonici possono essere focalizzati in un punto con una dimensione focale nell'ordine della lunghezza d'onda. Le dimensioni e la posizione del fuoco possono essere controllate variando la geometria (ovvero apertura e curvatura) e la frequenza operativa del trasduttore (figura 13).

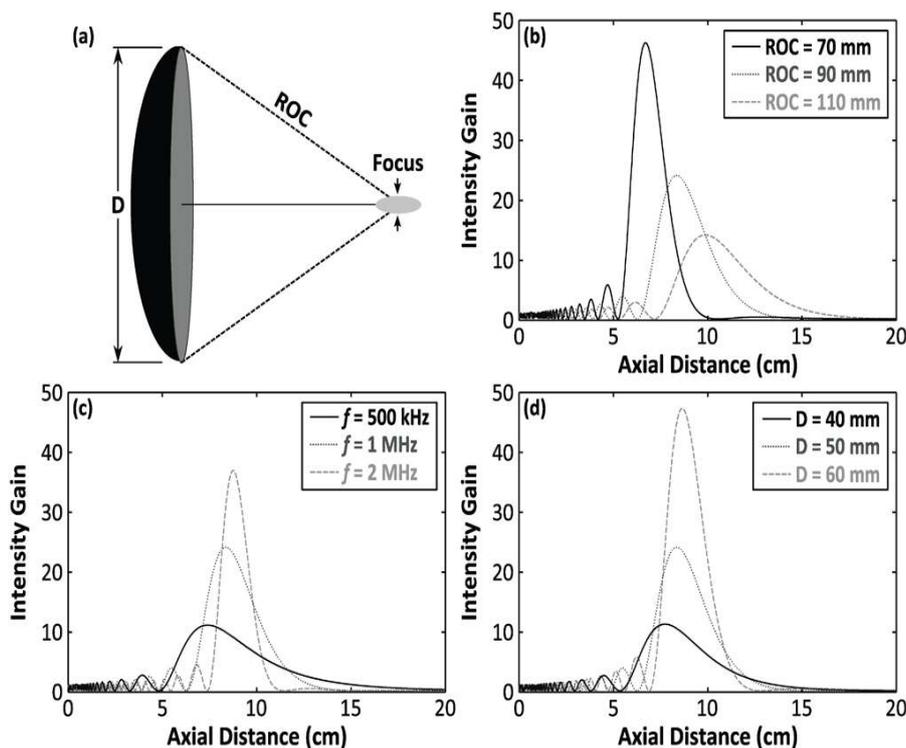


Figura 13. Grafici dell'intensità assiale per i vari trasduttori a elemento singolo focalizzati sfericamente. (a) Diagramma del trasduttore. (b) Gli effetti della variazione del raggio di curvatura (ROC ; $f = 1$ MHz, $D = 50$ mm), (c) della frequenza (f ; $ROC = 90$ mm, $D = 50$ mm) e (d) del diametro (D ; $f = 1$ MHz, $ROC = 90$ mm) sono stati simulati per condizioni di propagazione lineare degli ultrasuoni (velocità del suono = 1500 m/s, coefficiente di attenuazione = 5 Np / m / MHz). Il guadagno di intensità è definito come il rapporto tra l'intensità focale di picco e l'intensità sulla superficie del trasduttore. Tratta da [7].

Per i trasduttori con curvatura sferica, la messa a fuoco è di forma ellissoidale. Pertanto, se si utilizzano trasduttori di grande apertura, si possono ottenere diametri dei punti focali dell'ordine di 1-3 mm e lunghezze di circa 5-30 mm all'interno del corpo a frequenze clinicamente rilevanti. Grazie all'elevato grado di focalizzazione, l'assorbimento di energia nelle regioni vicine e lontane è trascurabile nella maggior parte dei casi (figura 13).

2.4.3 Trasduttore a elemento singolo

La configurazione del trasduttore FUS a phased array, che in genere assume la forma di un elmetto emisferico che circonda la testa, è efficace nel raggiungere le aree cerebrali profonde, in quanto l'angolo di attacco del fronte d'onda acustico proveniente da ciascun elemento del trasduttore è grande rispetto alla superficie del cranio (si veda paragrafo 2.4.4) [14]. Tuttavia, quando il focus è posto vicino alla superficie del cervello, gli angoli incidenti del fronte d'onda acustica rispetto alla superficie del cranio diventano più piccoli per una grande porzione dell'array di trasduttori e di conseguenza aumenta il livello di rifrazione / riflessione sulla superficie del cranio. Per ovviare a questo problema, come spiegato nel paragrafo precedente, è possibile manovrare un trasduttore FUS a elemento singolo attorno al cranio per trasmettere il fascio focalizzato di ultrasuoni nella posizione cerebrale desiderata mantenendo ampio l'angolo incidente rispetto alla superficie del cranio (illustrato in Fig. 14).

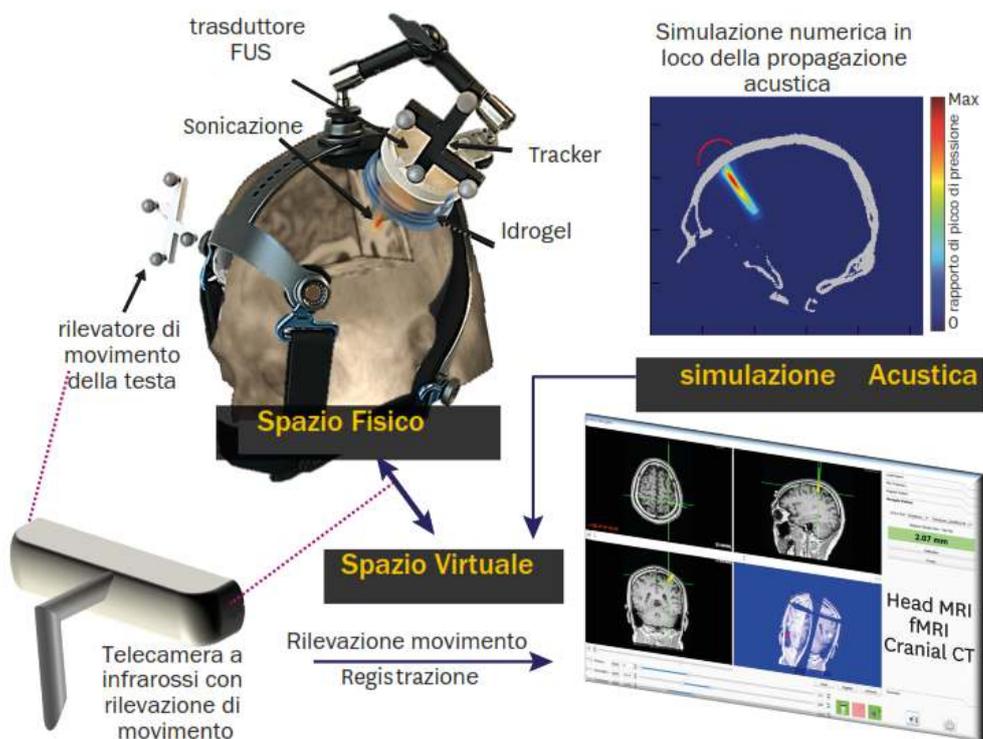


Figura 14. Schema della configurazione tFUS basata sull'utilizzo di un trasduttore a elemento singolo. Acquisizione di informazioni neuroanatomiche tramite MR volumetrica / fMRI / CT e co-registrazione dello spazio fisico corrispondente. Una telecamera di rilevamento del movimento verrà utilizzata per co-registrare lo spazio fisico e virtuale e per fornire all'operatore aggiornamenti sugli ultrasuoni transcranici focalizzati in tempo reale. Tratta da [14].

Invece di un dispositivo tFUS simile a un casco che viene riempito con acqua degassata per accoppiare la propagazione dell'onda sonora tra i trasduttori e il cuoio capelluto (come si usa nel caso di un dispositivo a phased array), viene utilizzato un idrogel di alcool polivinilico comprimibile come mezzo di accoppiamento acustico. La configurazione tFUS a elemento singolo non richiede preparazioni a livello chirurgico per i pazienti (il dispositivo a phased array in genere richiede una rasatura dei capelli e l'impianto del telaio stereotassico sul cranio per fissare la testa rispetto ai trasduttori), il che lo rende applicabile per l'uso pratico di routine in un ambulatorio [14].

L'immagine-guida è cruciale nell'applicare il piccolo focus acustico della sonicazione a specifiche ROI, che differiscono tra gli individui, sia anatomicamente che funzionalmente. Poiché il cranio può introdurre distorsioni significative nella propagazione acustica, una semplice derivazione geometrica della posizione focale acustica all'interno della cavità cranica è spesso inaccurata. Pertanto, l'immagine-guida richiede anche un ambiente di simulazione numerica integrato, in grado di stimare la propagazione / focalizzazione acustica all'interno della cavità cranica. La simulazione favorisce l'implementazione di uno schema di elaborazione veloce, come ad esempio un metodo a multi-risoluzione basato sulla formulazione alle differenze finite nel dominio del tempo per modellare la propagazione transcranica delle onde acustiche e restituire il feedback all'operatore come proposto da Yoo et al [14]. Questa funzionalità è importante in quanto non esiste un metodo non termico attualmente disponibile per visualizzare / seguire la posizione focale acustica in vivo. La guida assistita dalla simulazione aiuta ad aumentare l'accuratezza spaziale della sonicazione e può informare l'operatore dei potenziali rischi per la sicurezza, come la formazione di onde stazionarie.

Lo schema per la configurazione del trasduttore FUS a elemento singolo è mostrato in Fig. 14. Tipicamente, il sistema di registrazione / tracciamento ottico tridimensionale, è utilizzato per l'immagine-guida e per la navigazione [14]. Viene eseguita una risonanza magnetica strutturale e funzionale (fMRI) per ottenere informazioni sulla neuroanatomia dell'individuo e mappare l'area cerebrale rilevante. Marcatori visibili a risonanza magnetica / tomografia computerizzata (CT) vengono applicati sulla pelle (su imperfezioni della pelle, rughe e vene cutanee che offrono punti di riferimento affidabili che durano oltre 5 anni) e fungono da coordinate di riferimento per la registrazione spaziale tra i dati dell'immagine (che rappresenta lo "spazio virtuale") e la testa (che è lo "spazio fisico") (Fig. 14). Con i marker nello stesso posto della risonanza magnetica, le informazioni strutturali del cranio vengono ottenute utilizzando la TC ad alta risoluzione e successivamente co-registrate spazialmente con i dati della fMRI, per fornire informazioni utili alla pianificazione della sonicazione e per una guida in tempo reale [14]. Una TAC (Tomografia assiale computerizzata) fornisce anche informazioni sulla calcificazione che può interferire o assorbire

l'energia acustica e produrre rischi per la sicurezza del paziente. Inoltre, il processo di acquisizione dell'immagine-guida include la determinazione del punto di ingresso / target desiderato, l'orientamento angolare di sonicazione e la visualizzazione in tempo reale dell'errore spaziale tra la messa a fuoco acustica e il target (Fig. 14).

2.4.4 Trasduttori phased array a multi-elemento

Quando un trasduttore a ultrasuoni ha una dimensione uguale o inferiore alla metà della lunghezza d'onda ($\lambda/2$) nel mezzo di interesse, emette un'onda sferica che si propaga nell'intero semispazio di fronte ad essa [7]. Posizionando tanti piccoli elementi in riga e sincronizzando la trasmissione dell'onda di ciascun elemento in modo che le singole onde arrivino in fase nella posizione desiderata, è possibile ottenere una focalizzazione acustica. Con tali array lineari monodimensionali (1D), la posizione focale può essere scansionata all'interno del piano assiale del trasduttore regolando le fasi dei segnali guida RF, facilitando la focalizzazione del fascio elettronico (figura 15). Realizzando una matrice bidimensionale di trasduttori (2D), è possibile ottenere il pieno controllo tridimensionale (3D) del fascio ultrasonico, consentendo la generazione di più punti focali simultanei.

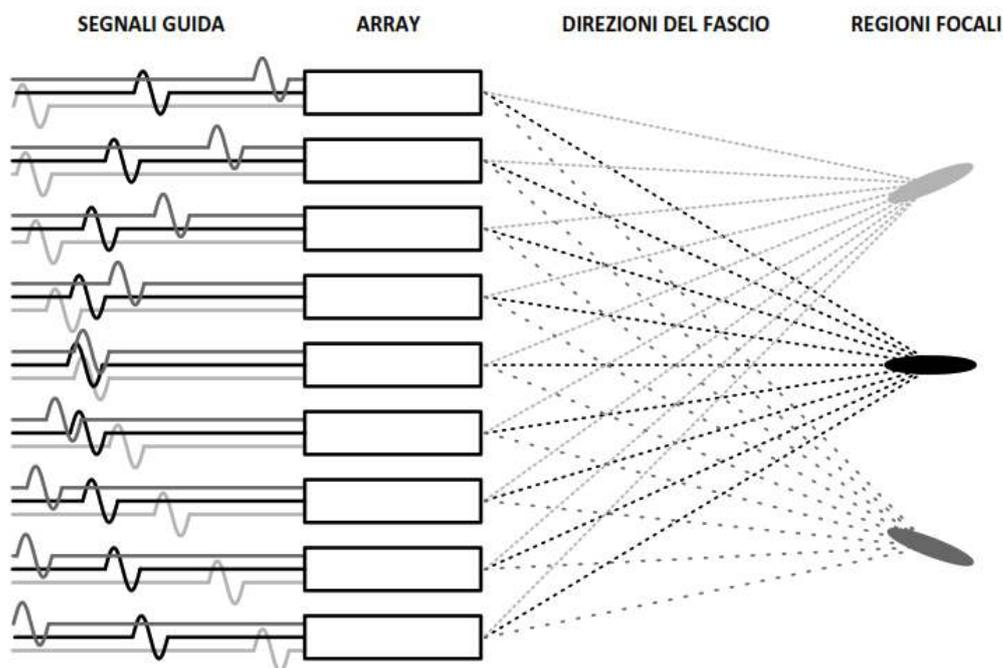


Figura 15. Diagramma che mostra il direzionamento del fascio ultrasonico con un array lineare 1D. Regolando il tempo in cui ciascun elemento dell'array emette il segnale guida (impulsi a ciclo singolo in questo esempio), il fascio può essere orientato in diverse direzioni nel campo. Tratta da [7].

Ci sono delle problematiche nell'implementare trasduttori ad array totalmente direzionabili (angolo di direzionabilità pari a 2π) per terapie ad alta potenza, pertanto essi non vengono utilizzati. Infatti, innanzitutto per avere un angolo di direzionamento del fascio completo (cioè di 2π), la distanza tra i centri di due elementi adiacenti del trasduttore deve essere minore o uguale alla metà della lunghezza

d'onda ($\lambda/2$). Nel caso in cui sia necessaria solo la focalizzazione lungo l'asse centrale dell'array è sufficiente una spaziatura di λ . Con elementi più grandi, e quindi distanze tra elementi maggiori, le onde provenienti da singoli elementi dell'array possono formare lobi di grating a causa di interferenze costruttive che si verificano in punti diversi da quello desiderato (figura 16). Pertanto, se si desidera un raggio di curvatura completo, la frequenza operativa pone un limite superiore alla dimensione dei singoli elementi dell'array e un limite inferiore al numero di elementi che lo costituiscono [7].

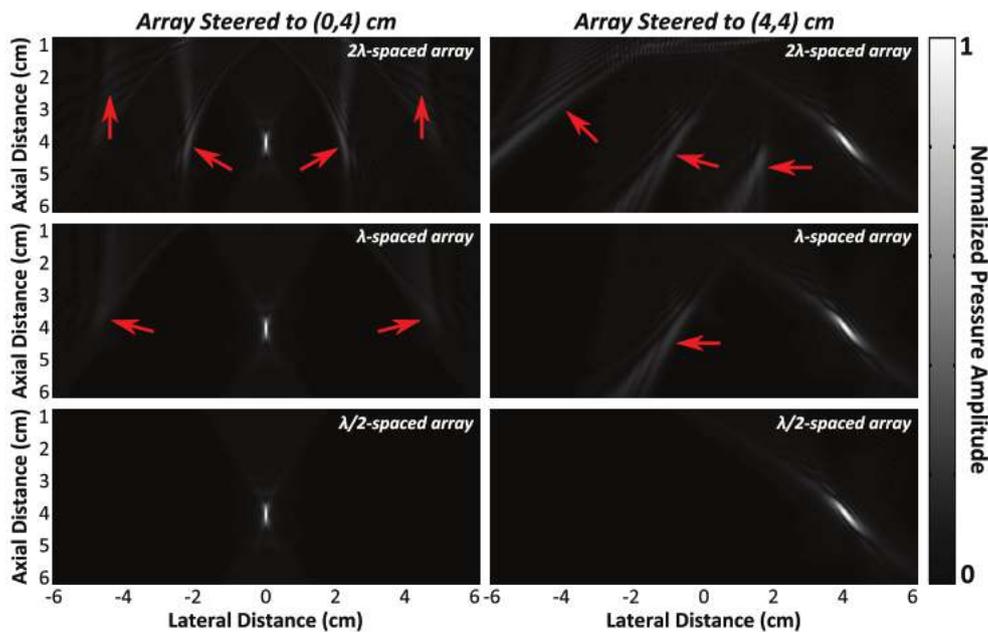


Figura 16. I campi di pressione assiale normalizzata sono tracciati per array 2D ($5\text{ cm} \times 5\text{ cm}$) 32×32 con spaziatura di 2λ (riga superiore), 64×64 con spaziatura di λ (fila centrale) e 128×128 con spaziatura di $\lambda/2$ (riga inferiore). I risultati della simulazione sono mostrati per il caso della messa a fuoco elettronica a $0,4\text{ cm}$ (colonna sinistra) e $4,4\text{ cm}$ (colonna destra), in condizioni di propagazione lineare degli ultrasuoni in acqua. I lobi di grating (freccie rosse) si formano nel caso di array spazati λ e 2λ , e diventano più frequenti quando il raggio viene allontanato dall'asse centrale dell'array. Tratta da [7].

Tuttavia, focalizzare l'energia acustica in profondità nel corpo richiede grandi guadagni geometrici tra la superficie del trasduttore e la messa a fuoco. Di conseguenza, le singole dimensioni del trasduttore necessarie per la terapia sono in genere molto più grandi di quelle utilizzate negli ultrasuoni diagnostici. Inoltre, per una data frequenza dei segnali RF, l'impedenza elettrica di un trasduttore aumenta man mano che le sue dimensioni vengono ridotte e quindi diventa difficile erogare la giusta potenza ai singoli elementi. Inoltre, l'efficienza di conversione della RF in energia acustica diminuisce con la riduzione delle dimensioni degli elementi. Tutti questi fattori favoriscono l'uso di elementi più grandi per gli array di terapia e, di conseguenza, non è possibile erogare elevate potenze da array completamente orientabili elettronicamente (ovvero a spaziature di $\lambda/2$). Inoltre, ogni elemento del trasduttore deve essere collegato al proprio circuito di guida individuale, generando un problema di interconnessione sostanziale per array contenenti un numero elevato di elementi.

Di seguito viene fornita una breve panoramica delle attuali soluzioni a questi problemi riguardanti i phased array [7].

2.4.4.1 Array sparsi

Un tipo di progettazione che è stato utilizzato efficacemente negli array di antenne per ridurre il numero di linee guida è quello di utilizzare piccoli elementi dell'array, disponendoli in maniera casuale solo su una porzione della superficie dell'array. La casualità delle posizioni degli elementi attenua la formazione di lobi reticolari, distribuendo in modo incoerente l'energia dispersa all'interno del campo [7].

In effetti, un'alternativa più concreta rispetto al design dell'array casuale consiste nell'utilizzare simulazioni del campo ad ultrasuoni per ottimizzare la distribuzione degli elementi e massimizzare le prestazioni dell'array. Le simulazioni al computer possono anche fornire informazioni utili relative alle frequenze di guida ottimali dell'array per applicazioni specifiche.

Il costo principale associato agli array sparsi è che la maggior parte dell'energia viene dispersa e depositata lontano dal focus. Con phased array casuali e ottimizzati dalla simulazione, questa energia viene distribuita in modo incoerente su un grande volume, riducendo al minimo la formazione di punti caldi localizzati nei tessuti [7]. La riduzione dell'intensità focale è proporzionale alla superficie del trasduttore che non emette ultrasuoni. Pertanto, è richiesta maggiore energia da un array sparso per ottenere la stessa intensità acustica rispetto a un array completamente riempito, tutto il resto rimane invariato.

2.4.4.2 Numero elevato di driver RF e interconnessioni

Sono stati esplorati due approcci principali per risolvere a livello economico la necessità di migliaia di driver RF e interconnessioni nei phased array ad ultrasuoni. Innanzitutto, è noto che la risoluzione in fase dei segnali guida non deve necessariamente essere molto precisa e che una buona focalizzazione può essere ottenuta con segnali a bassa risoluzione. Di conseguenza, è necessario utilizzare solo un sottoinsieme di driver RF ad alta potenza, combinato con interruttori per collegare ciascuno degli elementi dell'array alla linea RF con la fase più vicina a quella utile [7].

Una simulazione e uno studio sperimentale hanno dimostrato che si può ottenere un buon controllo elettronico con solo quattro linee guida. L'altro vantaggio di questo metodo è che gli elementi sono collegati in parallelo, aumentando efficacemente la superficie del trasduttore e riducendone l'impedenza elettrica. Tale approccio potrebbe essere implementato facilmente con gli array CMUT (vedere la sezione 2.4.4.4).

Un altro approccio per ridurre il gran numero di interconnessioni offrendo maggiore flessibilità, è quello di trarre vantaggio dalla moderna produzione di dispositivi elettronici e utilizzando la tecnologia ASIC (Application Integrated Circular Specific) per progettare circuiti personalizzati al fine di ridurre i costi e le dimensioni dei driver. Lo svantaggio di questo metodo è l'alto costo iniziale per raggiungere una progettazione ideale del chip. Tuttavia, i due progetti possono essere combinati per offrire soluzioni pratiche per array completamente orientabili elettronicamente [7].

2.4.4.3 Impedenza elettrica elevata

Una soluzione al problema dell'alta impedenza elettrica è stata trovata posizionando gli elettrodi metallici sui lati degli elementi del trasduttore anziché sulle loro superfici anteriore e posteriore (figura 17).

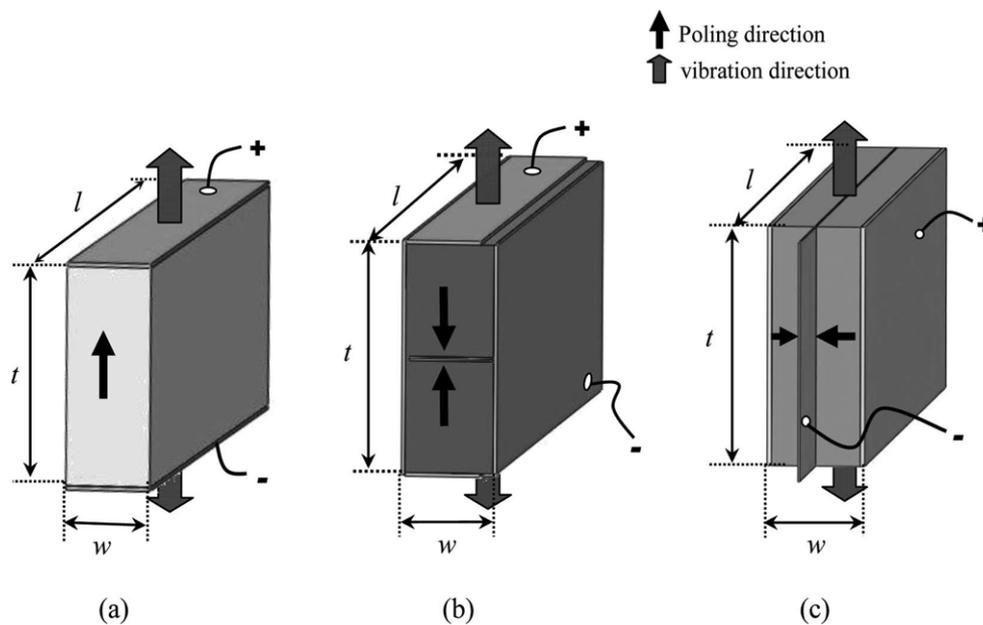


Figura 17. Diagramma degli elementi PZT guidati in modalità spessore e modalità accoppiamento laterale. (a) Un elemento PZT a strato singolo guidato in modalità spessore. (b) Un elemento PZT a due strati guidato in modalità spessore. (c) Un elemento PZT in modalità laterale a due strati. Le dimensioni complessive (t = spessore, l = lunghezza, w = larghezza) sono le stesse per tutti e tre gli elementi PZT. Poling direction si riferisce al campo elettrico generato all'interno del PZT. Tratta da [7].

Questo metodo aumenta la superficie dell'elettrodo e riduce lo spessore del materiale piezoelettrico tra gli elettrodi, i quali agiscono per ridurre l'impedenza elettrica dell'elemento. Tuttavia, invece di guidare l'elemento alla frequenza corrispondente allo spessore del materiale tra gli elettrodi (modalità spessore), la frequenza di guida viene invece selezionata in base alla lunghezza dell'elemento parallela alle superfici dell'elettrodo (modalità di accoppiamento laterale). Poiché la frequenza di risonanza di un elemento è determinata principalmente dallo spessore del materiale PZT nella direzione di propagazione, l'impedenza può essere regolata modificando lo spessore tra gli elettrodi mantenendo costante la frequenza. Ciò consente ai trasduttori di essere prodotti con un'impedenza elettrica ottimale [7].

2.4.4.4 Trasduttori ultrasonici capacitivi microlavorati (CMUTs)

Gli ultrasuoni possono anche essere generati utilizzando un metodo capacitivo in cui il trasduttore è formato da una piastra posteriore, una cavità e un sottile elettrodo a membrana metallica che può allungarsi, allontanandosi o avvicinandosi alla piastra posteriore in risposta a una tensione applicata [7]. I metodi di microlavorazione possono essere utilizzati per costruire questi trasduttori in modo da poter produrre array di grandi dimensioni a costi relativamente bassi e poiché il silicio viene utilizzato per la fabbricazione di questi dispositivi, l'elettronica di controllo può essere integrata direttamente nella parte posteriore dell'array. Questo approccio è stato utilizzato con successo nell'imaging diagnostico e più recentemente nei dispositivi basati su catetere per l'ablazione termica. La tecnologia CMUT è molto promettente per i dispositivi di terapia ad alta potenza poiché risolve la maggior parte delle sfide relative ai phased array, come il problema delle interconnessioni.

2.4.5 Misurazioni delle prestazioni dei phased array

Le prestazioni dei trasduttori a phased array possono essere valutate utilizzando metodi sperimentali standard comunemente usati per i trasduttori a elemento singolo. Le misurazioni della forza di radiazione possono essere utilizzate per quantificare la potenza acustica totale dell'array, mentre le misurazioni fatte dall'idrofono possono fornire ulteriori informazioni sul campo di pressione spaziotemporale generato dal dispositivo. È stato dimostrato che le misure di un idrofono effettuate su un campo planare pre-focale 2D possono essere utilizzate per valutare la distribuzione della velocità sulla superficie del trasduttore e il campo di pressione nella regione focale utilizzando metodi di proiezione specifici. Questo approccio infatti, può essere utilizzato per verificare se esistono variazioni significative di fase o ampiezza da elemento a elemento, che potrebbero successivamente essere compensate al fine di migliorare il campo acustico complessivo generato dall'array [7].

CAPITOLO 3 – NEUROMODULAZIONE DELLA CORTECCIA VISIVA E DELLA CORTECCIA SOMATOSENSORIALE NELL’UOMO TRAMITE ULTRASUONI TRANSCRANICI FOCALIZZATI

3.1 Neuromodulazione tramite ultrasuoni focalizzati a bassa intensità: studi sugli animali e sull’uomo

I progressi nella tecnologia FUS hanno consentito la somministrazione dell'energia acustica in aree altamente localizzate (nell'ordine di pochi millimetri) attraverso il cranio, comprese le strutture cerebrali profonde. Questa capacità è stata utilizzata per l'ablazione termica di specifiche regioni del cervello usando un'alta intensità acustica nel contesto della neurochirurgia funzionale. Contemporaneamente, studi in vitro e in vivo hanno dimostrato che le onde di pressione acustica, somministrate a bassa intensità che non causano un aumento di temperatura nei tessuti, possono modulare l'eccitabilità della regione del cervello colpita dagli ultrasuoni con un'eccellente selettività spaziale [17]. Come già accennato in precedenza, Fry e colleghi sono stati i pionieri degli studi sugli effetti degli ultrasuoni focalizzati sui potenziali evocati EEG negli anni '50. Hanno specificatamente dimostrato la soppressione EEG in un modello di gatto, fenomeno che è stato riscontrato successivamente su conigli e ratti da diversi team nel periodo tra il 2011 e il 2015. Nel 2011, altri studi hanno dimostrato che la sonicazione pulsata a bassa intensità focalizzata (LIFU) è in grado di inibire parte dell'attività epilettica in un modello di ratto con epilessia. La soppressione è stata quantificata dalla quantità di picchi EEG epilettici. Quest'ultimi infatti, erano per lo più diminuiti, dopo la sonicazione, nella banda di frequenza correlata all'intensità dell'epilessia [16]. Ulteriori prove su animali hanno dimostrato che la FUS può suscitare risposte elettrofisiologiche stimolando le corteccie visive e motorie delle pecore e può modulare funzionalmente le risposte comportamentali (ad esempio, i movimenti saccadici) stimolando il frontal-eye-field nei primati non umani (Fig. 18).

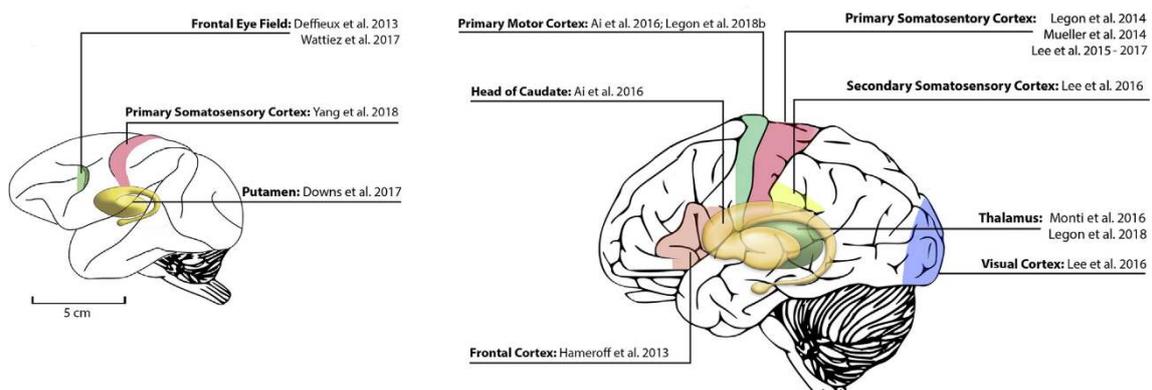


Figura 18. Regioni bersaglio della neuromodulazione a ultrasuoni focalizzati nei primati non umani e nell’uomo. Tratta da [15].

Nel 2013, Deffieux et al. [16] ha dimostrato che la stimolazione LIFU può modulare il comportamento visuomotorio nelle scimmie. Due macachi *rhesus* svegli furono addestrati per iniziare una saccade in direzione opposta a nuovi bersagli visivi. Prima dovevano fissare un obiettivo centrale. Quindi, uno stimolo rosso veniva introdotto nella regione periferica mentre una delle scimmie riceveva una stimolazione a FUS a 320 KHz. La latenza dell'antisaccade (AS) è stata misurata in entrambi i soggetti e si è scoperto che veniva temporaneamente ritardata sul lato ipsilaterale della stimolazione del frontal-eye-field. Non sono stati osservati effetti simili nella stimolazione a FUS sham (cioè simulata ma non realmente applicata) o durante l'esperimento di controllo (in questo caso, stimolazione della corteccia premotoria). La principale spiegazione di questi risultati è che la FUS abbia interrotto l'elaborazione delle informazioni attraverso il campo visivo frontale, dimostrando così che la FUS può modulare il comportamento. Nello stesso anno, Sanguinetti et al. (si veda [16]) ha applicato gli ultrasuoni focalizzati a bassa intensità / alta frequenza (8 MHz) per una durata totale di 15 s alla corteccia frontale posteriore nell'uomo riscontrando un miglioramento non specifico dell'umore e una riduzione della sensazione di dolore [16]. Successivamente, nel 2014, Legon, Tyler et al. hanno dimostrato che l'ampiezza dei potenziali evocati dall'area somatosensoriale primaria (SI), può essere significativamente attenuata utilizzando i LIFU. Questi risultati elettrofisiologici sono stati osservati in combinazione con effetti di enhancement sulla capacità di discriminazione sensoriale (come si vedrà più avanti).

Pertanto, questi risultati hanno mostrato un simile effetto di EEG mediata da LIFU negli animali e nell'uomo, mirando a diverse aree subcorticali o corticali, interessando più bande di frequenza e portando a distinti risultati neurologici e comportamentali. Il numero di impulsi FUS trasmessi al secondo ha mostrato di essere correlato al risultato binario ottenuto. Per ottenere quindi un'inibizione era necessaria la sonicazione con una frequenza di ripetizione dell'impulso (Pulse Repetition Frequency, PRF) di 100 Hz, mentre l'aumento del PRF a 500 Hz porterebbe a un effetto quasi opposto, ossia a una 'facilitazione' prolungata ma reversibile della risposta EEG evocata. In effetti l'uso della tFUS (impostata sui parametri LIFU) guidata dall'imaging a MR per sonicare l'area somatosensoriale primaria a un PRF di 500 Hz produceva risposte somatiche ed elettrofisiologiche uguali a quelle generate dalla stimolazione del nervo mediano [16]. Più recentemente, durante la stimolazione FUS della corteccia somatosensoriale primaria è stata osservata l'induzione di sensazioni tattili e di potenziali EEG evocati, in assenza di stimolazioni sensoriali esterne.

Con la sua selettività spaziale superiore alle altre tecniche e la sua praticabilità nell'uomo, la FUS transcranica sta ottenendo sempre più successo come nuova modalità di stimolazione cerebrale non

invasiva e fornisce nuove opportunità nella valutazione delle funzioni cerebrali in regioni specifiche, nonché nello sviluppo di varie modalità neuroterapeutiche.

L'analisi funzionale dei circuiti neurali nel cervello durante la neuromodulazione mediata da FUS fornirebbe una base per far progredire le nostre conoscenze sulla stimolazione cerebrale acustica. Le modalità di neuroimaging funzionale, come la risonanza magnetica funzionale (fMRI) e la tomografia ad emissione di positroni (PET), sono state utilizzate per classificare le caratteristiche spaziali e temporali delle risposte neurali alla stimolazione cerebrale mediata da FUS in piccoli animali anestetizzati.

Nel seguito si analizzano due studi sull'uomo, uno condotto da Legon et al. sulla neuromodulazione della corteccia somatosensoriale (2014) [17] e uno condotto da Lee et al. (2016) relativo alla modulazione della corteccia visiva primaria [18].

3.2 Modulazione tramite ultrasuoni transcranici focalizzati della corteccia somatosensoriale primaria nell'uomo

Nello studio condotto da Legon et al. [17] è stata esaminata l'influenza della stimolazione transcranica a ultrasuoni focalizzati (transcranial Focused Ultrasound Stimulation, tFUS) mirati alla corteccia somatosensoriale primaria umana (S1) sull'attività cerebrale evocata da stimolazione tattile (Somatosensory Evoked Potential) e sulle capacità di discriminazione tattile. L'obiettivo era verificare se la tFUS fosse in grado di modulare funzionalmente l'attività cerebrale di S1. La risoluzione spaziale laterale e assiale del fascio della tFUS erano rispettivamente di 4.9 mm e 18 mm. In sintesi, le registrazioni elettroencefalografiche effettuate in tale studio hanno mostrato che la tFUS ha attenuato in modo significativo le ampiezze dei potenziali somatosensoriali evocati suscitati dalla stimolazione del nervo mediano. È stato anche evidenziato che la tFUS modulava significativamente il contenuto spettrale delle oscillazioni cerebrali evocate dai sensi. Inoltre, la tFUS produceva cambiamenti anche sull'attività basale delle onde alfa e beta, entro 20 ms dalla sonicazione. I cambiamenti prodotti dalla tFUS sull'attività cerebrale indotta scomparivano quando il fascio ultrasonico era focalizzato 1 cm più avanti o più indietro rispetto a S1. I risultati comportamentali hanno mostrato che la tFUS diretta a S1 migliorava le prestazioni nei compiti di discriminazione sensoriale.

Durante le varie sperimentazioni nel corso degli anni su questa nuova modalità di neuromodulazione, sono stati descritti effetti brevi e a lungo termine indotti dalla tFUS, a seconda di vari fattori, tra cui le caratteristiche della forma d'onda utilizzate, nonché le caratteristiche anatomiche e fisiologiche della regione cerebrale colpita. Ad esempio, è stato dimostrato in precedenza che basse frequenze di

ripetizione degli impulsi (10 – 70 Hz) e le lunghe durate degli impulsi (7 – 10 ms) suscitano sensazioni vibranti trasdotte dai recettori della pelle o dalle fibre meccanocettive, oppure che le sensazioni termiche possono essere suscitate trasmettendo sulla pelle onde ultrasoniche continue (duty cycle 100%) per almeno 1 s [17]. La forma d'onda utilizzata in questo studio (vedere sezione 3.2.1) è stata scelta per la sua capacità di produrre effetti sensoriali meccanici sulla pelle e sul cuoio capelluto. Tuttavia, chiarire le caratteristiche spaziali e temporali alla base della capacità degli ultrasuoni focalizzati di modulare l'attività cerebrale richiederà ulteriori esami.

3.2.1 Proprietà del fascio acustico della tFUS utilizzato

Il dispositivo utilizzato durante questo studio [17] era un trasduttore ad ultrasuoni focalizzati (FU) a singolo elemento avente una frequenza centrale di 0.5 MHz, un diametro di 30 mm e una lunghezza focale di 30 mm. Attraverso l'uso di un idrofono montato su un supporto motorizzato a tre assi (controllato da un software scritto in LabVIEW), i ricercatori hanno misurato i campi di pressione acustica generati dal trasduttore a FU all'interno dello spazio libero di un serbatoio acustico e dopo attraverso dei frammenti di cranio umano idratati. Le scansioni del campo acustico sono state eseguite a 400 μm e 200 μm . Per trovare il piano focale finale e la posizione del picco spaziale, le mappe dei campi acustici ottenute dalle scansioni precedenti sono state utilizzate come riferimenti per eseguire ulteriori scansioni con una risoluzione di 100 μm . le scansioni intorno all'asse z sono state fatte per prima in modo da trovare la distanza focale. Successivamente, è stata eseguita una scansione 12 x 12 mm alla distanza focale misurata per ottenere una mappa della potenza acustica sul piano focale x-y. Le scansioni sono state eseguite la prima volta senza il cranio tra il trasduttore e l'idrofono. In seguito, per testare gli effetti del campo acustico sul cranio dell'uomo, hanno inserito un frammento d'osso corticale spesso 6 mm (idratato per 48 h) tra il trasduttore e l'idrofono utilizzando le stesse procedure, tranne per la distanza dal trasduttore che è stata aumentata a 10 mm per evitare la collisione del frammento con l'idrofono. Le misurazioni hanno rivelato che quando la FUS viene trasmessa attraverso il cranio (tFUS), l'intensità media dell'impulso nel punto di picco spaziale (I_{SPPA}) diminuiva di circa quattro volte rispetto a quella generata nello spazio libero del serbatoio acustico (Fig.19a, b).

Inoltre la trasmissione della FUS attraverso il cranio ha causato una perdita del 10% nella risoluzione spaziale laterale e verticale del fascio ultrasonico, stimate dalla Full-Width at Half Maximum (FWHM; Fig. 19c). L'Half-Width of the Half-Maximum (HWHM) dell'intensità della FUS era di 20.4 mm per la trasmissione nello spazio libero e di 18.0 mm per la trasmissione transcranica. In queste condizioni, la trasmissione della FUS transcranica a 0.5 MHz ha comportato una riduzione della profondità del campo di pressione acustica e un aumento di circa il 12% della risoluzione assiale.

Questa messa a fuoco naturale può essere descritta come un effetto non lineare che fa ruotare il fascio conico della FUS che torna verso il punto di inserimento del cranio, creando un campo acustico a forma di ellissoide con una pressione più compatta (Fig. 19c). Pertanto, il cranio non risulta un ostacolo per la focalizzazione transcranica della FUS ma il suo effetto può essere paragonato a quello di una lente acustica che migliora la risoluzione spaziale in determinate condizioni [17].

Le forme d'onda (Fig. 20c) degli ultrasuoni transcranici ad ultrasuoni sono state generate utilizzando un generatore di funzioni a due canali a 2MHz. Il canale 1 è stato impostato per generare ultrasuoni ad una frequenza di ripetizione dell'impulso a 1 kHz e il canale 2 è stato impostato per guidare il trasduttore a una frequenza acustica di 0.5 MHz (Af). La durata dell'impulso (Pulse Duration, PD) è stata regolata a 0.36 ms impostando il numero di ciclo per impulso sul canale 2 a 180 e la durata di sonicazione (0.5 s) è stata regolata impostando il numero d'impulsi (np) sul canale 1 a 500. Quindi $A_f = 0.5 \text{ MHz}$, $PD = 360 \text{ }\mu\text{s}$, $np = 500$.

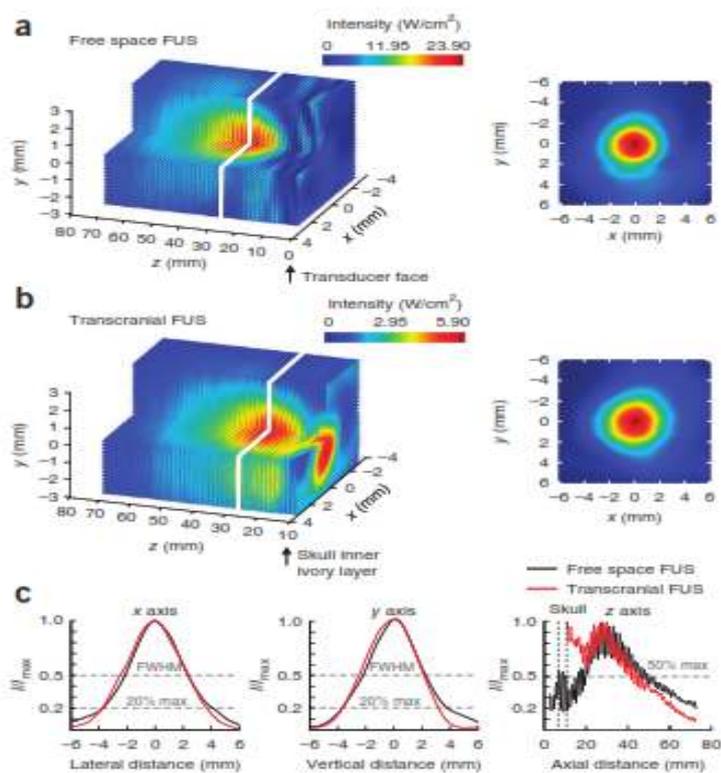


Figura 19. Gli ultrasuoni possono essere focalizzati attraverso il cranio umano. (a, b) Intensità acustica emessa da un trasduttore a FU a 0.5 MHz, misurata nello spazio libero (a) e dopo attraverso un frammento di cranio umano idratato (tFUS, b). Le linee bianche sulla mappa tridimensionale dell'intensità acustica (sinistra) indicano il piano focale dove è stata misurata l'intensità media d'impulso nel punto di picco spaziale (I_{SPPA}) del campo acustico. Le sezioni dei fasci ultrasonici corrispondenti a questi piani focali sono illustrate a destra. (c) I diagrammi in basso illustrano i profili di intensità acustica nel punto di picco laterale (x, a sinistra) e verticale (y, al centro) per il fascio ultrasonico trasmesso nello spazio libero (in nero) e attraverso il cranio umano (in rosso). È inoltre mostrato (a destra) il grafico del profilo d'intensità nel punto di picco assiale (z) del campo di FUS sia per lo spazio libero (nero) che transcranico (rosso). Tratta da [17].

Attraverso l'uso di questi parametri si è ottenuta una pressione di picco di rarefazione di 0.80 MPa, un indice meccanico di 1.13 e un'intensità media d'impulso nel punto di picco spaziale (I_{SPPA}) di 23.87 W / cm^2 . Era già stato dimostrato in precedenza che questa forma d'onda non produce effetti termici sulla pelle o sul cranio. Inoltre il trasduttore è stato rivestito con dell'idrogel di accoppiamento acustico e posizionato in corrispondenza alla posizione CP3 secondo il sistema internazionale 10-20 per EEG (come si vedrà di seguito) prima di essere fissato con una benda elastica.

3.2.2 Direzionamento della tFUS sulla corteccia somatosensoriale primaria

I ricercatori [17] hanno scelto la zona sinistra di S1 come bersaglio dei fasci ultrasonici trasmessi dal trasduttore posizionato perpendicolarmente allo scalpo, sul sito CP3 (Fig. 20a). Hanno visualizzato le posizioni del fascio ultrasonico attraverso l'uso di modelli di testa umana generati utilizzando il metodo degli elementi finiti (Finite Elements Method, FEM).

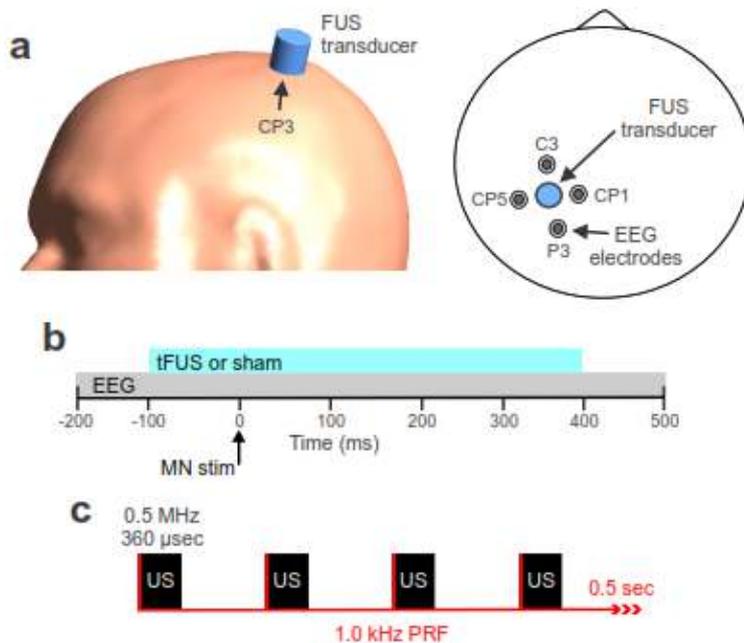


Figura 20. Schema dell'approccio sperimentale. (a) Il trasduttore a FUS è posizionato sul sito CP3 dell'elettrodo per EEG su un modello realistico a elementi finiti di una testa umana (a sinistra). Uno schema dall'alto verso il basso (a destra) illustra il posizionamento del trasduttore e degli elettrodi nei siti C3, CP1, CP5 e P3 per EEG standard. (b) Viene illustrata il protocollo temporale eseguito per la somministrazione di ultrasuoni focalizzati transcranici (tFUS) o condizione della tFUS sham (in cui si simula di applicare la tFUS, senza alcuna sonicazione effettiva) prima, durante e dopo la stimolazione del nervo mediano (MN stim). (c) Forma d'onda degli ultrasuoni pulsati (US) trasmessi dal trasduttore. La frequenza acustica della forma d'onda era di 0.5 MHz e la durata dell'impulso era di 360 μ s (nero). La frequenza di ripetizione dell'impulso (PRF, in rosso) era di 1 kHz e la durata totale di stimolazione di 500 ms. tratta dal materiale supplementare di [17].

In breve, la materia grigia, la sostanza bianca, il liquido cerebrospinale (Cerebro-Spinal Fluid, CSF), la pelle e il cranio sono stati delineati dalle immagini a risonanza magnetica e, sulla base delle immagini digitali dei tessuti, è stato creato un modello FEM tridimensionale della testa formato da circa 1.7 milioni di elementi tetraedrici, con una maggiore risoluzione della sostanza bianca e della materia grigia. Per stimare la distribuzione del campo acustico nel cervello durante la sonicazione transcranica, il campo della tFUS misurato (Fig. 21b) è stato proiettato nel cervello ipotizzando che la faccia del trasduttore fosse posizionata tangenzialmente al cuoio capelluto su CP3. Si presumeva che la materia grigia, la sostanza bianca e il CSF fossero abbastanza simili da rendere trascurabili gli effetti causati dalla differenza tra le impedenze acustiche alle interfacce dei tessuti [17].

Direzionando il fascio a S1 è stato sonicato, il fascio della tFUS mostrava un primo valore massimo dell'intensità nella parte superiore della corona del giro postcentrale (Fig. 21a) e un secondo valore massimo d'intensità nella parete posteriore del solco centrale, ad una profondità di circa 2 cm (Fig. 21b, c). Questa distribuzione bimodale dell'intensità acustica era dovuta al comportamento dell'onda acustica derivante dalla trasmissione transcranica. Inoltre, è stato osservato che il campo di intensità acustica si riduce del 50% del suo massimo nelle regioni cerebrali 2 mm in avanti o indietro dal centro del fascio ultrasonico (Fig. 21c).

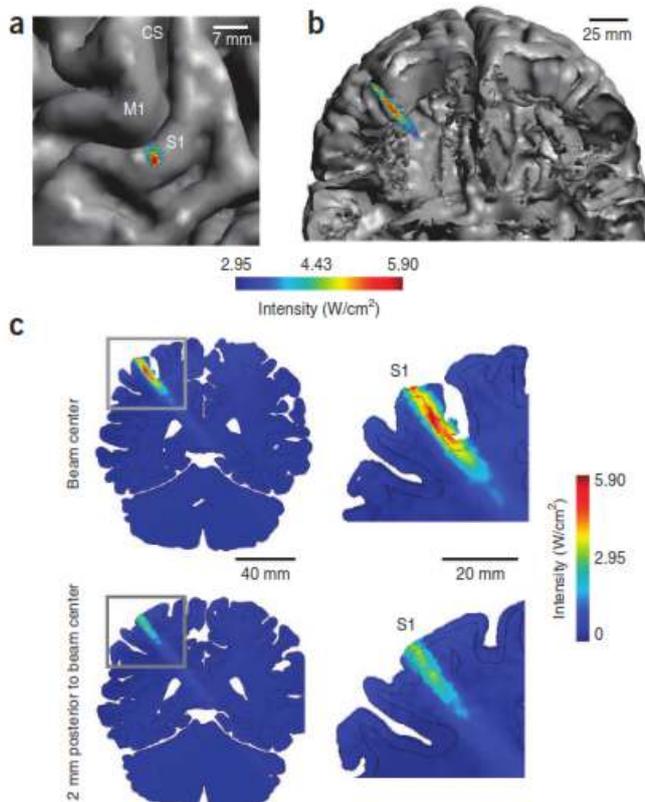


Figura 21. La tFUS può essere indirizzata a regioni spazialmente localizzate della corteccia umana. (a) Visuale dall'alto verso il basso e (b) sezione coronale che mostra il campo d'intensità acustica del fascio di tFUS proiettato dal sito CP3 per EEG in un modello FEM realistico del cervello ricavato da immagini a RM. La proiezione del campo acustico mostra il targeting della corteccia somatosensoriale primaria (S1) con riferimento alla corteccia motoria primaria (M1) e al solco centrale (CS). (c) Sezioni di risonanza magnetica coronale che mostrano le proiezioni dei campi acustici dal sito CP3, illustrando ulteriormente la specificità spaziale della tFUS a 0.5 MHz nella corona del giro postcentrale e nella parete posteriore del solco centrale. Le sezioni coronali sono mostrate lungo l'asse anteriore-posteriore corrispondente al centro del fascio (in alto) e 2 mm posteriormente (in basso) il centro del fascio che mostra il calo di intensità acustica in funzione alla larghezza del fascio della tFUS. Tratta da [17].

3.2.3 La tFUS modula l'attività cerebrale evocata dalla stimolazione sensoriale

Un totale di 10 volontari hanno partecipato allo studio; nessuno di loro ha riportato alcun danno neurologico e tutti hanno dichiarato di avere la mano destra come mano dominante. I partecipanti erano seduti su una sedia da scrivania con schienale alto e l'avambraccio destro completamente appoggiato. Durante il test, i soggetti dovevano sedersi mentre guardavano una croce di fissazione su uno schermo. Un totale di 120 forme d'onda ultrasoniche sono state trasmesse dal sito CP3 ad un intervallo di inter-stimolo (ISI) di 6 s. La condizione della tFUS reale prevedeva l'accoppiamento acustico della faccia attiva del trasduttore ad ultrasuoni al cuoio capelluto nel sito CP3 usando un gel per ultrasuoni. La condizione della tFUS sham prevedeva che il trasduttore ad ultrasuoni fosse accoppiato alla testa in corrispondenza di CP3, ma capovolto in modo tale che la faccia inattiva del trasduttore (simmetrica alla faccia attiva) entrasse in contatto con il cuoio capelluto cosicché l'energia

ultrasonica non fosse trasmessa attraverso lo scalpo. Questo approccio è stato utilizzato per tenere conto di un ronzio che veniva generato quando il trasduttore era attivo. Questo suono era identico per entrambe le condizioni (tFUS reale e sham) e nessun soggetto ha riportato differenze sensoriali o percettive tra le due condizioni. L'ordine del trattamento di tFUS reale o sham è stato randomizzato per ciascun soggetto. Il tempo totale di raccolta era di circa 1 ora.

I dati dell'elettroencefalografia (EEG) sono stati acquisiti utilizzando un amplificatore DC con quattro elettrodi a coppetta oro-argento da 10 mm posizionati sui siti C1, CP1, CP5 e P3 riferiti alla mastoide sinistra e collegati al processo stiloideo ulnare sinistro. Gli elettrodi a coppetta sono stati riempiti con una pasta conduttiva e tenuti in posizione con del nastro adesivo. Il cuoio capelluto è stato inizialmente preparato con un gel abrasivo delicato e alcool. Le impedenze di elettrodo sono state verificate ($< 5 \text{ k}\Omega$) prima della registrazione. I dati EEG sono stati filtrati on-line (DC – 200 Hz) e digitalizzati a 1 kHz prima di essere memorizzati su un computer per successive analisi off-line. I potenziali evocati somatosensoriali (Somatosensory Evoked Potentials, SEPs) sono stati suscitati in risposta alla stimolazione del nervo mediano destro usando un impulso ad onda quadra di 0.2 ms guidato da uno stimolatore SD-9 e trasmesso attraverso un elettrodo a barra (distanza dell'elettrodo di 2 cm) posizionato sul polso. L'intensità è stata regolata per provocare una leggera contrazione del pollice. Gli stimoli sono stati erogati ad un intervallo inter-stimolo di 6 s. In ciascuna condizione di trattamento, sono stati erogati in totale 120 stimoli MN. Gli stimoli del nervo mediano sono stati 'time-locked' in modo da verificarsi 100 ms dopo l'inizio delle forme d'onda della tFUS (Figura 20b). Gli sperimentatori che conducevano gli esperimenti non erano a conoscenza della condizione sperimentale, ma lo era il ricercatore che elaborava e analizzava i dati EEG acquisiti.

Attraverso questo esperimento è stato possibile esaminare l'influenza della tFUS sull'attività cerebrale evocata esaminando le ampiezze picco-picco dei potenziali evocati somatosensoriali (SEP) e il contenuto spettrale dell'attività EEG evocata dalla stimolazione del nervo mediano. I soggetti non hanno riportato alcuna sensazione termica o meccanica dovuta alla trasmissione della tFUS attraverso lo scalpo.

I componenti del SEP generato dalla stimolazione del nervo mediano durante le registrazioni EEG sono stati denominati in base alla loro polarità negativa (N) o positiva (P) e alla loro latenza (in ms) come ad es. N20, P27, N33, P50, N70, P100 e N140. È stato dimostrato che il componente N20 rappresenta l'input sensoriale che ha origine dal nucleo ventrale posteriore laterale (VPL) del talamo e che termina nell'area di Brodmann 3b della corteccia somatosensoriale (S1). Si ritiene che i potenziali successivi con una latenza di circa 200 ms riflettano l'elaborazione delle informazioni somatosensoriali dall'area 3b di Brodmann alle aree 1 e 2, continuando verso le aree di elaborazione

sensoriale superiore, come la corteccia parietale posteriore (che rappresenta le aree 5 e 7 di Brodmann) e la corteccia somatosensoriale secondaria, le quali svolgono diverse funzioni nella codifica di rappresentazione dello stimolo [17].

Rispetto alla condizione di tFUS sham, la sonicazione reale ha provocato una riduzione significativa dell'ampiezza picco-picco del complesso N20 - P27 e del complesso N33 - P27 del SEP a latenza breve registrato in corrispondenza di C3 (Fig. 22). La riduzione delle ampiezze di queste componenti è rimasta costante per tutta la durata del test. Inoltre la tFUS ha prodotto un'attenuazione significativa sulle ampiezze del complesso N70 - P50 registrato su CP5 e P3 (Fig. 22). Pertanto, è stato possibile dimostrare che la tFUS mirata su S1 modulava le ampiezze dei complessi del SEP sia a latenza breve che più ritardati [17].

La decomposizione spettrale dell'EEG ha fornito ulteriori informazioni sulle dinamiche oscillatorie che riflettono l'eccitabilità corticale e sull'elaborazione delle informazioni da parte del cervello. Rispetto alla condizione di tFUS sham, la sonicazione reale ha ridotto la potenza dell'attività di base nella banda delle onde alfa (7 - 12 Hz) e nella banda delle onde beta (13 - 30 Hz) registrata su C3 e P3 nei 100 ms dopo l'inizio della sonicazione e prima della stimolazione del nervo mediano (Fig. 22).

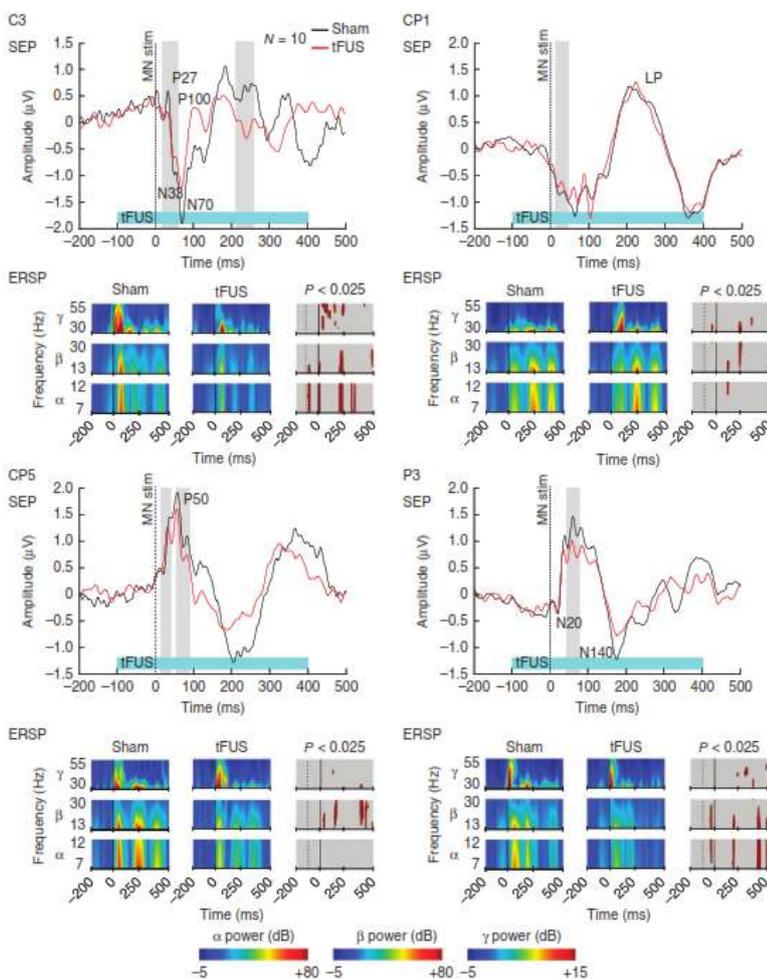


Figura 22. tFUS mirata alla corteccia somatosensoriale umana modula l'attività cerebrale evocata dai sensi. Pannelli superiori: SEP registrato sui siti degli elettrodi (C3, CP1, CP5 e P3) a seguito della stimolazione del nervo mediano destro per condizioni di tFUS sham (nero) e tFUS reale (rosso). N20, P27, N33, P50, N70, P100, N140 e i componenti ritardati dei SEP sono indicati in figura. Le barre verticali in grigio evidenziano regioni con differenze significative ($P < 0.025$) nelle ampiezze picco-picco dei complessi SEP tra condizione di tFUS sham e reale. I grafici tempo-frequenza sotto i corrispettivi diagrammi illustrano la potenza spettrale delle onde cerebrali evocate nelle bande di frequenza alfa (7 - 12 Hz), beta (13 - 30 Hz) e gamma (30 - 55 Hz) in relazione alla sonicazione e alla stimolazione del nervo mediano per ciascuna condizione (tFUS sham e reale). Sono mostrati anche i grafici delle differenze statistiche (per ulteriori approfondimenti circa le analisi statistiche vedere l'articolo originale [17]) per ciascuna banda di frequenza: le regioni in marrone-rosso scuro indicano una differenza significativa tra le due condizioni. La scala dei colori sottostante ai grafici indica la potenza di ciascuna banda di frequenza. Tratta da [17].

Inoltre, è stato scoperto che in corrispondenza a C3 la sonicazione ha prodotto un'attenuazione significativa nella potenza dell'attività delle onde gamma (30 – 55 Hz) verificatasi 70 ms dall'inizio della stimolazione del nervo mediano (Fig. 22). Inoltre la tFUS modula significativamente la potenza dell'attività in banda alfa, beta e gamma che si osserva più tardivamente dopo circa 200 ms dalla stimolazione del nervo mediano (Fig. 22).

3.2.5 La tFUS modula le soglie di percezione

In una sessione di studio successiva sono stati esaminati gli effetti comportamentali della tFUS applicata a S1 sulle soglie di percezione utilizzando i compiti di discriminazione di due punti e di frequenza.

Nel primo compito, i soggetti (12 volontari sani; 5 maschi, 7 femmine, età compresa tra 23 – 57 anni, in media 30.4 ± 10.4 anni) erano seduti su una sedia da scrivania con il braccio destro appoggiato su un tavolo e il polpastrello dell'indice appoggiato su un foro di 1.3 cm tramite il quale venivano somministrati gli stimoli. Sono state utilizzate ben nove distanze di separazione tra i pin (diametro di 200 μ m) tra cui 0, 0.7, 1, 1.3, 1.6, 1.9, 2.2, 2.5 e 2.8 mm. Ogni distanza tra i pin è stata applicata in modo casuale a una forza costante di 1 N sulla punta del dito per dieci volte durante il trattamento con tFUS reale o tFUS sham. Dopo ogni stimolo, i partecipanti dovevano riferire verbalmente se avvertivano uno o due pin. Prima del test, i partecipanti hanno preso familiarità con le sensazioni prodotte dai pin separati da 0 (un pin), 1.6 e 2.8 mm e venivano informati dopo ogni stimolo se esso era di uno o di due pin. I test effettivi sono iniziati solamente quando i partecipanti hanno raggiunto l'80% di risposte corrette. Ai soggetti non è stato permesso di vedere le proprie dita e neanche i pin, i quali erano nascosti sotto il tavolo.

È stato creato un dispositivo motorizzato su misura controllato da un software apposito per applicare i pin alla punta del dito. Ciò ha permesso di applicare con costanza la medesima forza (1 N) e per la stessa durata (250 ms) per tutti i test. Il software ha anche programmato l'inizio della sonicazione 100 ms prima dell'applicazione del pin sulla punta del dito. I partecipanti sono stati sottoposti al compito di discriminazione sensoriale durante le condizioni di tFUS sham o reale alternate nella stessa sessione di test. L'ordine di trattamento di tFUS reale o sham è stato randomizzato tra i soggetti. Il tempo totale di acquisizione è stato di circa un'ora [17].

L'impostazione del secondo compito era simile alla precedente. Il polpastrello dell'indice destro (della mano dominante) dei soggetti (12 volontari sani; 5 maschi, 7 femmine, età compresa tra 20 – 57 anni, media di 31.8 ± 11.8 anni) poggiava su un foro con diametro di 1.3 cm in cui venivano somministrati degli stimoli sotto forma di soffi d'aria. I soffi d'aria venivano generati da un

Picospritzer III ad una pressione costante di 14.5 p.s.i. trasmessa attraverso un'apertura con diametro di 1.88 mm che entrava in contatto con la superficie del dito. Questo si è tradotto in una forza di 0.3 N applicata sulla punta del dito. Venivano applicati due stimoli: il primo stimolo era sempre ad una frequenza costante di 100 Hz mentre il secondo era o alla stessa frequenza o superiore. I partecipanti dovevano rispondere verbalmente dopo l'interruzione del secondo stimolo 'più alto' se ritenevano che questo fosse più forte del primo o 'uguale' se ritenevano che fosse lo stesso. In tutto sono state utilizzate dieci frequenze da 100 Hz a 150 Hz con incrementi di 5 Hz. La durata dello stimolo era di 500 ms e l'intervallo tra gli stimoli era di 500 ms. Sono state somministrate in totale 120 coppie di stimoli ad un intervallo tra una prova e l'altra (Inter-Trial Interval, ITI) di 6 s. Tuttavia l'ITI non era sempre costante a causa dei diversi tempi di risposta dei partecipanti. Il tempo degli stimoli era controllato da un programma personalizzato scritto in LabVIEW (National Instruments, Austin, TX), così come anche il tempo di sonicazione, in modo tale che iniziasse a partire dal secondo stimolo. Come nel primo compito, i partecipanti hanno preso familiarità con gli stimoli da soffio d'aria a 100, 125 e 150 Hz fino a quando non si è raggiunto l'80% di risposte positive al test. I partecipanti non erano a conoscenza di quante differenze di frequenza venissero utilizzate e non è stato permesso loro di guardare le proprie dita. Inoltre sono state fornite delle cuffie che emettevano un rumore bianco in modo da bloccare qualsiasi segnale uditivo del dispositivo di soffiaggio dell'aria [17].

Sono state esaminate le soglie di discriminazione utilizzando l'indice di sensibilità cumulativa d' . La soglia di discriminazione è stata scelta a $d' = 1$ (pertanto valori superiori indicano discriminazione dei due punti o di frequenza), (Fig. 23). Attraverso diverse analisi dei risultati è stato dimostrato che l'attenzione dei partecipanti rivolta al compito non differiva tra i trattamenti di tFUS reale e sham e non hanno nemmeno influenzato o distorto la risposta che i soggetti davano. Inoltre essi hanno mostrato dei miglioramenti significativi nella loro capacità di distinguere i pin a distanze più ravvicinate durante il trattamento con tFUS reale rispetto alla condizione di tFUS sham. Anche nel secondo compito è risultato che i soggetti miglioravano nel discriminare piccole differenze di frequenza durante la sonicazione reale rispetto alla tFUS sham. Collettivamente, questi dati hanno evidenziato che il tFUS ha potenziato l'abilità di discriminazione sensoriale dei partecipanti, senza influenzarne o distorcerne la risposta data o l'attenzione (Fig. 23).

A prima vista questo miglioramento sull'abilità di discriminazione sensoriale prodotto dalla tFUS potrebbe sembrare paradossale considerando che gli esperimenti precedenti hanno evidenziato una riduzione dell'ampiezza dei complessi del SEP, ma esistono diverse ipotesi meccanicistiche che spiegherebbero queste osservazioni.

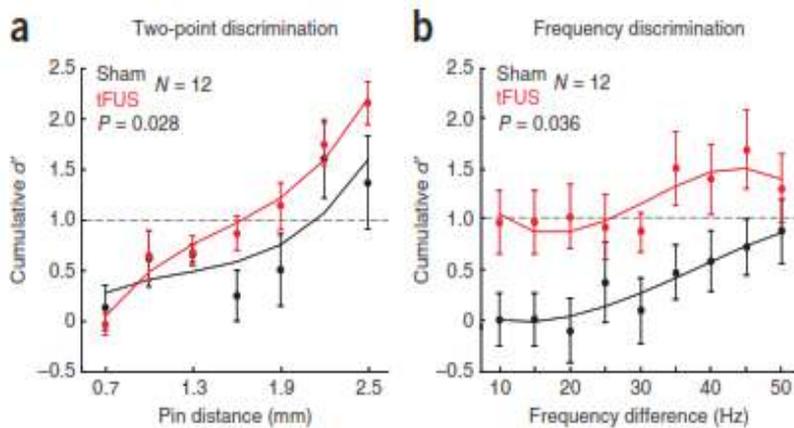


Figura 23. La tFUS mirata alla corteccia somatosensoriale migliora le abilità di discriminazione sensoriale dell'uomo. (a) Dati acquisiti con l'applicazione di tFUS reale (rosso) e sham (nero) durante il compito di discriminazione di due punti. I dati sull'indice di sensibilità cumulativa d' mostrano che la distanza tra i pin affinché si raggiungesse la soglia di discriminazione d' di 1 era più bassa per la condizione di tFUS reale rispetto a quella di sham. (b) Dati acquisiti con l'applicazione della tFUS reale e sham durante il compito di discriminazione di frequenza. Anche in questo caso la differenza di frequenza per raggiungere la soglia d' di 1 era più bassa per la condizione di tFUS reale rispetto a quella di sham. Tratta da [17].

Il volume focale del fascio ultrasonico ellissoidale era di 0.21 cm^3 . All'interno di questo volume, la pressione dell'onda acustica pulsata può spostare localmente l'equilibrio dell'attività neuronale a favore dell'inibizione agendo sui componenti meccanosensibili del cervello, tra cui membrane cellulari, canali ionici e sui cicli delle vescicole sinaptiche (come già accennato nei capitoli precedenti). Un'ipotesi coerente con la riduzione dell'attività gamma evocata a latenza breve (ritenuta responsabile della codifica iniziale di uno stimolo sensoriale) durante il trattamento con tFUS è che la pressione d'onda acustica pulsata potrebbe smorzare l'eccitazione prodotta dalla stimolazione successiva del nervo mediano o aumentare la distanza interneurone. In altre parole, l'inibizione locale prodotta dalla tFUS potrebbe servire da filtro, riducendo la diffusione spaziale dell'eccitazione corticale in risposta alla stimolazione del nervo mediano, provocando quindi un'eccitazione selettiva delle popolazioni neuronali, con conseguente miglioramento della rappresentazione corticale degli stimoli tattili. Acquisire una migliore comprensione di come gli ultrasuoni focalizzati in modalità pulsata influenzano l'equilibrio tra inibizione ed eccitazione nelle regioni cerebrali target, migliorerà sicuramente il modo di applicare la tFUS allo studio e alla mappatura dei circuiti del cervello umano.

3.2.6 La modulazione dell'attività cerebrale conseguente a tFUS è spazialmente specifica

Successivamente i ricercatori hanno esaminato la specificità focale della tFUS analizzando le ampiezze dei complessi del SEP e il contenuto spettrale dell'attività EEG suscitata dalla stimolazione del nervo mediano in 8 volontari sani, collegando il trasduttore ad ultrasuoni focalizzati 1 cm più avanti e 1 cm più indietro rispetto alla posizione CP3. L'applicazione in entrambi i punti è avvenuta nella stessa sessione (il setup sperimentale era identico a quello utilizzato per l'esperimento presentato nel paragrafo 3.2.3). Per il targeting, come nel primo esperimento i modelli FEM utilizzati hanno mostrato che lo spostamento del trasduttore a FUS 1 cm avanti al sito CP3 ha generato un fascio acustico nelle regioni cerebrali del solco centrale nel giro precentrale, mentre con lo spostamento di

1 cm indietro rispetto allo stesso sito, il fascio ultrasonico si focalizzava nelle regioni cerebrali posteriori alla corona del giro postcentrale (Fig. 24a) [17].

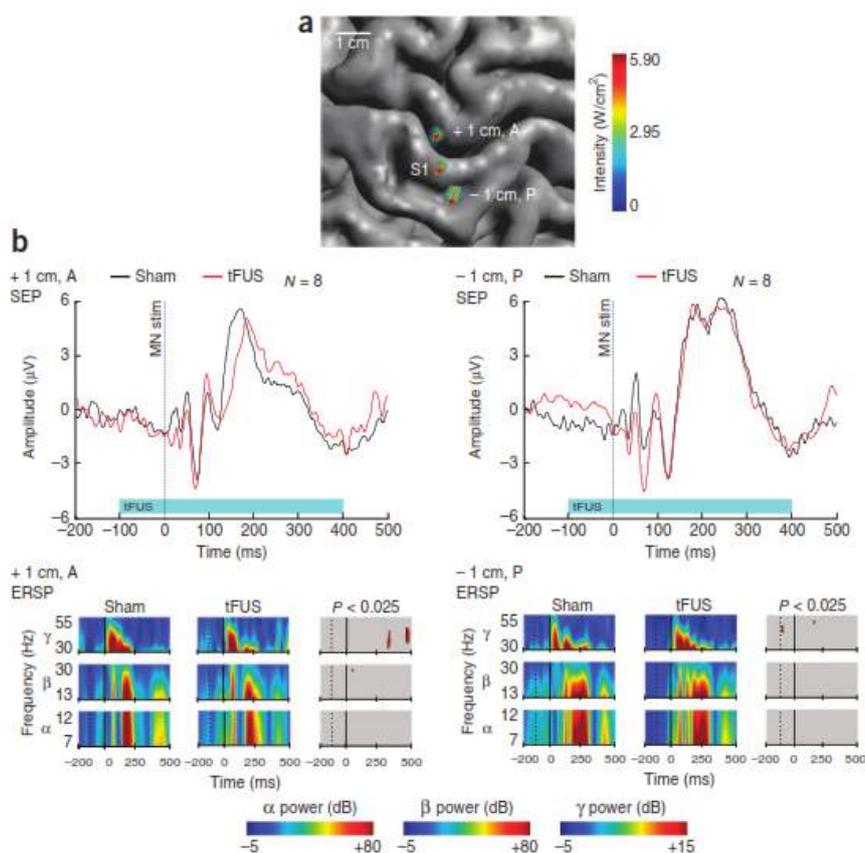


Figura 24. La tFUS produce effetti differenti in base alla regione del cervello colpita. (a) La visuale dall'alto verso il basso del cervello mostra la posizione spaziale dei fasci ultrasonici sulla corona post-centrale (S1) e sui siti 1 cm avanti (+1 cm, A) e 1 cm indietro (-1 cm, P), (b) In alto, i diagrammi sui SEP registrati dall'elettrodo su C3 che mostrano la risposta media alla stimolazione del nervo mediano destro per la condizione di sonicazione sham (nero) e per tFUS reale (rosso) 1 cm avanti (sinistra) e 1 cm indietro (destra) rispetto a S1. Non vi sono state differenze significative tra le due condizioni. I grafici inferiori tempo – frequenza illustrano la potenza delle onde cerebrali evocate nelle bande di frequenza alfa (7 – 12 Hz), beta (13 – 30 Hz) e gamma (30 – 55 Hz) in relazione all'applicazione della tFUS (linea verticale tratteggiata) e stimolazione MN (del nervo mediano, linea verticale continua) per entrambe le condizioni di sonicazione. Sono mostrati anche i grafici delle differenze statistiche (per ulteriori dettagli sulle analisi statistiche vedere l'articolo originale [17]). Le scale colorate in basso indicano la potenza di ciascuna banda di frequenza (in dB). Tratta da [17].

I risultati di questo esperimento hanno dimostrato che spostando il fascio ultrasonico rispetto al sito originario, gli effetti inibitori descritti in precedenza scomparivano. In particolare, non vi sono state differenze significative tra le ampiezze picco – picco dei complessi del SEP registrati durante le due condizioni di sonicazione reale e sham. L'analisi spettrale dell'attività EEG ha confermato questa osservazione. Stranamente, quando il fascio ultrasonico era mirato al giro precentrale (1 cm avanti al CP3), la tFUS influenzava selettivamente l'attività ritardata delle onde gamma che iniziava circa 300 ms dopo la stimolazione del nervo mediano (Fig. 24b). Questi risultati suggeriscono che la tFUS può influenzare in modo differenziato l'attività delle onde gamma, sia a breve latenza che quelle a maggiore latenza, in base all'area anatomica colpita dal fascio acustico.

3.2.7 Sicurezza della tFUS

L'applicazione di ultrasuoni focalizzati non ha causato danni ai tessuti durante gli studi che hanno utilizzato i loro effetti non termici per modulare l'attività neurale a intensità acustiche inferiori a quelle raccomandate per l'uso sicuro nell'imaging diagnostico. Tuttavia devono essere seguite delle procedure adeguate per garantire l'utilizzo sicuro della tFUS. Per evitare la generazione di onde stazionarie, è stato utilizzato un trasduttore FUS a banda larga, altamente focalizzato, che funziona in

modalità pulsata. È stato infatti mostrato in precedenza che utilizzando onde acustiche pulsate rispetto a quelle continue si ha un effetto termico sui tessuti molto lento, quindi trascurabile, e la probabilità di cavitazione transitoria risulta ridotta. Per quanto riguarda l'intensità I_{SPPA} utilizzata (23.87 W / cm^2), era inferiore al limite massimo raccomandato di 190 W / cm^2 per le applicazioni nell'imaging diagnostico. Anche la durata di applicazione è stata impostata a 500 ms per prevenire un riscaldamento apprezzabile dei tessuti. Gli ultrasuoni ad alta intensità come anche durate di esposizioni lunghe possono causare danni irreversibili ai tessuti, come qualsiasi fonte di energia, quindi si dovrebbe usare cautela quando si utilizzano per modulare l'attività cerebrale [17].

3.3 Stimolazione transcranica della corteccia visiva primaria nell'uomo tramite ultrasuoni focalizzati

Nello studio condotto da Lee, Wonhye, et al. nel 2016 [18], gli FUS sono stati applicati alla corteccia visiva primaria (V1) dell'uomo guidati dalla neuroanatomia funzionale dei pazienti. Contemporaneamente, la fMRI è stata acquisita per identificare le aree del cervello attivate dall'applicazione della tFUS; nello studio sono stati anche analizzati la presenza e il tipo di percezione visiva suscitata dalla stimolazione. Separatamente dalla valutazione fMRI, sono stati misurati i potenziali EEG corticali associati alla stimolazione FUS per fornire una valutazione elettrofisiologica dell'attività cerebrale. La simulazione numerica della propagazione delle onde acustiche attraverso il cranio è stata eseguita retrospettivamente per stimare l'intensità acustica in loco e l'accuratezza spaziale della sonicazione. I risultati ottenuti suggeriscono che la FUS può stimolare la V1 nell'uomo, determinando la percezione di fosfeni e attivando una rete di regioni coinvolte non solo in processi cognitivi visivi ma anche in quelli di ordine superiore.

3.3.1 Partecipanti e panoramica dello studio

Lo studio è stato condotto rispettando le linee guida etiche stabilite dagli Institution Review Boards (IRB) dell'Università Cattolica della Corea (pianificazione FUS tramite neuro-imaging funzionale e valutazione neuro-radiologica dei partecipanti allo studio) e dell'Università della Corea (stimolazione transcranica FUS e sua caratterizzazione EEG/fMRI). Complessivamente 19 volontari sani (5 femmine, età compresa tra 20 e 45 anni, età media 26 ± 5.4 anni) hanno partecipato allo studio. L'esperimento consisteva in due procedure separate: (1) imaging tramite RM e TC e (2) sonicazione via tFUS, conseguite in giorni diversi l'una dall'altra. Nella prima procedura, i partecipanti allo studio sono stati sottoposti a risonanza magnetica anatomica / funzionale per mappare le loro aree visive per la pianificazione della sonicazione. La TC cranica è stata acquisita per verificare la presenza di calcificazioni intracraniche e acquisire informazioni sulla geometria del cranio. Nella seconda procedura, il soggetto è stato sottoposto a una sessione FUS guidata dalla RM, per cui è stata utilizzata

l'acquisizione simultanea di BOLD-fMRI per rilevare le aree cerebrali attivate dalla stimolazione FUS. Come sessione sperimentale separata, sono stati anche misurati i potenziali evocati EEG associati alla FUS e alla stimolazione luminosa di alcuni partecipanti (N = 10, soggetto femmina = 1, età 20–45, età media 26.7 ± 7.1) al di fuori della risonanza magnetica.

3.3.2 Pianificazione della sonicazione e stimolazione FUS della corteccia visiva primaria (V1) guidata dall'imaging a risonanza magnetica (RM)

I dati di risonanza magnetica principale (che include la mappatura fMRI delle aree visive) e i dati di tomografia computerizzata (TC) ottenuti dai 19 partecipanti volontari (indicati 'h1' - 'h19') nella sessione precedente la sonicazione, sono stati usati per indentificare la posizione di V1 e pianificare il percorso di sonicazione (in modo da colpire V1) mantenendo l'angolo di entrata dei FUS il più perpendicolare possibile alla superficie dello scalpo (si veda Fig. 25a).

Successivamente, in una sessione sperimentale separata, è stata utilizzata una configurazione FUS compatibile con la MR (schemi sperimentali illustrati in Fig. 25a,) per fornire transcranialmente i LIFU in modalità pulsata alla V1 sotto la guida di uno Scanner clinico MR 3-Tesla. Le caratteristiche anatomiche del soggetto acquisite rispetto all'inione (cioè la protuberanza occipitale esterna) sono state utilizzate inizialmente per posizionare la testa rispetto al trasduttore e successivamente una RM pesata in T1 è stata eseguita in modo da visualizzare il profilo del trasduttore di FUS (rappresentato nelle figure 25d, 26 e 28a; visibile come contorno negativo circondato dall'idrogel). L'identificazione del trasduttore ha permesso di stimare le coordinate spaziali del fuoco di sonicazione e l'orientamento del raggio rispetto alla neuroanatomia del soggetto. Se la posizione del focus acustico e l'orientamento del percorso di sonicazione si discostavano troppo dal piano previsto, la testa veniva riposizionata con cura e l'imaging veniva ripetuta fino a quando il punto focale della sonicazione si trovava a circa 1 cm dal bersaglio. Per la stimolazione FUS è stata utilizzata una frequenza ultrasonica di 270 kHz per stimolare la V1, dato che valori simili di frequenza erano stati utilizzati in esperimenti precedenti per modulare l'attività cerebrale umana / ovina e per ottenere un'adeguata trasmissione del fascio attraverso il cranio. La lunghezza focale del trasduttore FUS era di 3 cm e la dimensione del focus acustico è stato misurato risultando avere un diametro di 3 mm e una lunghezza di 17 mm, come definito dal Full-Width-Half-Maximum FWHM (vedere sezione 1.1.5) della mappa d'intensità acustica (Fig. 25b, pannello superiore). In questo studio di Lee, Wonhye, et al. è stato utilizzato lo stesso protocollo pulsato usato in precedenza per stimolare la corteccia somatosensoriale primaria nell'uomo e negli animali: durata di sonicazione di 300 ms con un Tone Burst Duration TBD di 1 ms ripetuta a una Pulsed Repetition Frequency di 500 Hz (che fornisce un duty cycle del 50%, illustrato in Fig. 25b, pannello inferiore). L'intensità e la pressione acustica al fuoco degli FUS erano

rispettivamente $16,6 \text{ W} / \text{cm}^2$ (intensità media dell'impulso nel punto di picco spaziale, Spatial-Peak Pulse-Average Intensity, I_{sppa}) e 1.48 MPa. Dopo aver allineato la messa a fuoco acustica al V1 in riferimento ai dati funzionali specifici (ottenuti dalla fMRI) e alla neuroanatomia del cranio (acquisita con TC) (esempio mostrato in Fig. 25c), la FUS è stata applicata al V1 attraverso un idrogel di alcol polivinilico (PVA), che è stato compresso a $\sim 1 \text{ cm}$ di spessore attorno al contorno della pelle (dal suo spessore originale di 1.5 cm), ottenendo così uno stretto accoppiamento acustico e mantenendo l'orientamento della sonicazione il più perpendicolare possibile al cuoio capelluto (Fig. 25d).

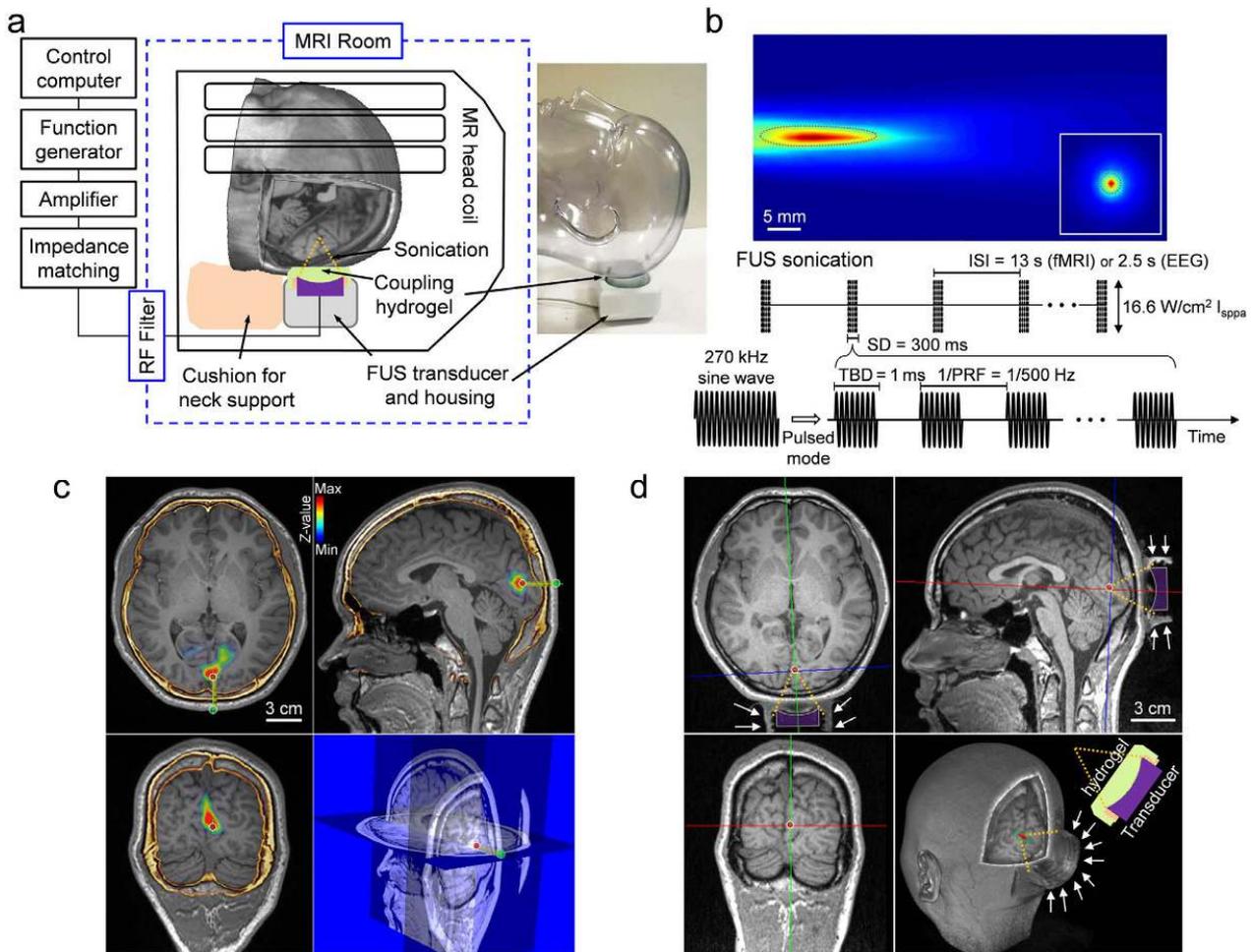


Figura 25. Schema della configurazione e dei parametri di sonicazione transcranica FUS guidata dalla MR. (a) Il dispositivo FUS posizionato all'interno della bobina a MR per la testa, con l'illustrazione del percorso di sonicazione (linee gialle tratteggiate). Un'immagine dell'implementazione corrispondente è anche mostrata con la testa di un manichino (senza la bobina a MR). (b) Pannello superiore destro: profilo di intensità acustica (longitudinale e trasversale, inserto) del focus ultrasonico generato dal trasduttore. Il profilo longitudinale è stato misurato con una distanza di 20 mm dal piano di uscita del trasduttore. Una messa a fuoco acustica a forma di 'sigaro' (3 mm di diametro e 17 mm di lunghezza) basata sulla FWHM dell'intensità acustica è rappresentata dalla linea rossa tratteggiata. Subito sotto vi sono i parametri acustici: ISI, intervallo di stimolazione = 13 s durante le sessioni di fMRI; 2,5 s durante le sessioni EEG; $I_{\text{sppa}} = 16,6 \text{ W} / \text{cm}^2$. (c) Esempi di immagini MR anatomiche sovrapposte alla risonanza magnetica funzionale e TC cranica (contrassegnata in giallo / arancione), usati per pianificare il percorso di sonicazione (linea verde) e il punto di ingresso (punto verde sulla superficie del cuoio capelluto) per raggiungere il target (punto rosso all'interno di un cerchio bianco). Il pannello in basso a destra mostra le informazioni corrispondenti sulle sezioni di imaging a MR. (d) Un'istantanea della risonanza magnetica eseguita durante la sessione di sonicazione guidata da MR, in cui è visibile il profilo dell'idrogel di accoppiamento acustico, compresso con uno spessore di $\sim 1 \text{ cm}$ (freccie bianche). La posizione geometrica del percorso di sonicazione rispetto al punto focale (punto rosso) è illustrata con linee gialle tratteggiate. Il contorno del trasduttore FUS è delimitato da un profilo viola. Tratta da [18].

3.3.3 La stimolazione tramite FUS suscita la percezione del fosfene

La fMRI correlata all'evento è stata condotta durante tre diversi tipi di condizioni sperimentali per acquisire l'attività neurale associata a ciascuna condizione: (1) stimolazione FUS, (2) stimolazione FUS 'sham', cioè placebo (cioè un'imitazione delle procedure FUS ma senza l'effettiva applicazione della sonicazione), e (3) stimolazione luminosa (stimolazione visiva ottenuta con fasci luminosi) senza FUS. Tutte le stimolazioni erano sincronizzate con lo scanner MR. La stimolazione (sonicazione FUS o stimolazione luminosa) sincronizzata con lo scanner MR, aveva una durata di 300 ms ed è stata somministrata 50 volte ogni 13 s. La luce ambientale è stata spenta. La sessione FUS è stata condotta dal soggetto con gli occhi chiusi, mentre la sessione di stimolazione fotonica è stata eseguita con gli occhi aperti.

Ai partecipanti, quali mantenevano gli occhi chiusi durante la stimolazione FUS (sia effettiva che 'sham'), è stato chiesto di fornire descrizioni di qualsiasi sensazione dopo le sessioni FUS reali / simulate. Su 19 partecipanti, 11 soggetti (N = 11, 'h1' – 'h11' classificati come 'reattivi') hanno riportato la percezione del fosfene (cioè un fenomeno visivo caratterizzato dalla percezione di punti luminosi, in assenza di luce) associata alla stimolazione FUS reale mentre nessuno ha riportato sensazioni durante la condizione 'sham'. La maggior parte delle percezioni visive sono state descritte come uno schiarimento diffuso, amorfo e non colorato dei campi visivi centrali che si ripeteva a intermittenza. Tra i soggetti sensibili, uno ('h5') ha descritto un motivo visivo di colore grigio (simile a una tenda) che sembrava contrarsi / espandersi, mentre un altro ('h10') ha riportato la comparsa di motivi a linee orizzontali statiche. Un individuo ('h9') ha percepito il fosfene colorato (verde) con un motivo di linee. Le sensazioni visive apparivano in modo diffuso sull'intero campo visivo senza la presenza di alcuna organizzazione retinotopica. Le percezioni del fosfene, come descritto in seguito dai soggetti, erano transitorie (duravano circa 1 secondo) e si verificavano in modo periodico simile agli intervalli di sonicazione.

Oltre a questi 11 soggetti sensibili, due ('h12' e 'h13') hanno riportato percezioni piuttosto transitorie che si sono verificate solo poche volte durante l'applicazione (classificati come "parzialmente reattivi"). Gli altri sei soggetti ('h14' – 'h19') non hanno riportato sensazioni (classificati come "non reattivi").

3.3.4 La stimolazione FUS mostra risposte individuali e di gruppo

Le mappature fMRI a livello individuale (Fig. 26) dei soggetti sensibili (N = 11) hanno rivelato che l'area attivata della V1 è spazialmente allineata / sovrapposta al bersaglio di sonicazione. Inoltre, un'attivazione distinta nell'area V1 non era visibile negli individui che non hanno riportato alcuna

percezione (ovvero, 'h12' – 'h19', N = 8, dati non mostrati). Durante la sessione sham di FUS, non è stata rilevata alcuna attivazione in nessuno dei partecipanti.

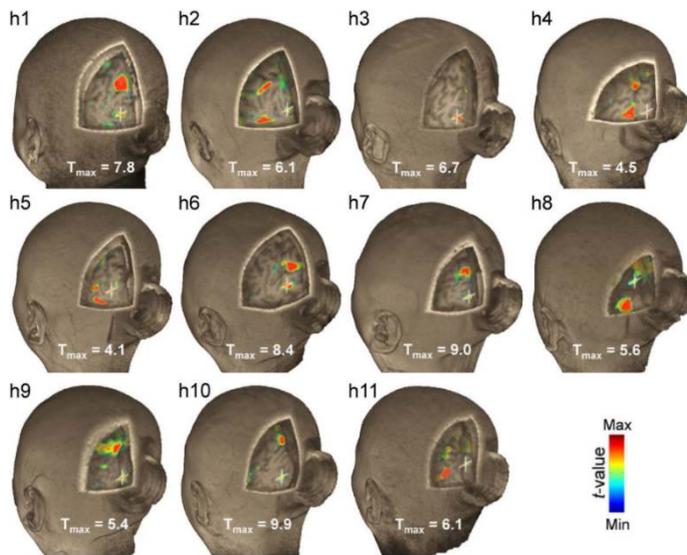


Figura 26. Risultati individuali della fMRI dell'area visiva sottoposta a sonicazione. Le illustrazioni colorate mostrano i valori di T ($p < 0.005$ non corretto) associati alla stimolazione FUS sovrapposta all'immagine MR tridimensionale dei soggetti reattivi (N=11). Il valore di T massimo viene mostrato per ogni individuo (T_{max}) mentre $T_{min} = 2,65$. Un mirino bianco mostra la posizione del bersaglio di sonicazione. La forma cilindrica cava dietro la testa è il contorno dell'idrogel di accoppiamento acustico. Tratta da [18].

L'analisi a livello di gruppo dei dati fMRI dei soggetti sensibili (N=11, con soglia di voxel $P = 10^{-4}$ e livello di cluster $P < 0.005$) ha rivelato che la FUS ha attivato non solo l'area di V1 sottoposta a sonicazione ma anche altre regioni del cervello (Fig. 27 e Tabella 6). Queste aree includono i nuclei talamici bilaterali (cioè i nuclei genicolati laterali, LGN) coinvolte nella via visiva primaria, insieme alle aree di associazione visiva, come il precuneo, il giro fusiforme, il giro temporale inferiore (ITG), alcune aree fronto-parietali (IFG, MFG, mSFG e IPL), corteccie cingolate (ACC e PCC) e lobo temporale (STG e MTG). Queste regioni sono coinvolte nei compiti di attenzione per la regolazione dei processi cognitivi e la loro attivazione ha permesso di ipotizzare che fossero coinvolti durante la percezione del fosfene sperimentata dai soggetti. Inoltre sono state osservate attivazioni bilaterali in ulteriori aree talamiche, il giro paraippocampale (PHG) e cervelletto (verme e lobo posteriore). La stimolazione FUS sham non ha provocato alcuna attivazione mentre la stimolazione luminosa ha provocato l'attivazione in LGN e V1, insieme all'attivazione nel giro fusiforme bilaterale (Fig. 27 e Tabella 7). Nel gruppo reattivo (N = 11), le aree che hanno mostrato una chiara attivazione mettendo a confronto la FUS reale e la sonicazione FUS sham sono le VL (ventrali laterali) talamiche, IPL, ITG e SFG/MFG.

L'analisi a livello di gruppo dei dati fMRI dei soggetti che non hanno riportato una percezione consistente di fosfene (N = 8, classificati sopra come "soggetti parzialmente reattivi / non reattivi") non ha mostrato alcuna attivazione nel cervello durante la stimolazione FUS reale o la condizione di FUS sham (nemmeno quando si utilizza una soglia statistica più rilassata a livello di voxel $P < 10^{-3}$ per tenere conto di un numero di soggetti più piccolo; correzione cluster-level $P < 0.005$). Tuttavia,

durante la stimolazione luminosa, l'analisi ha mostrato l'attivazione dei principali circuiti visivi, tra cui V1 e aree fusiformi bilaterali [18].

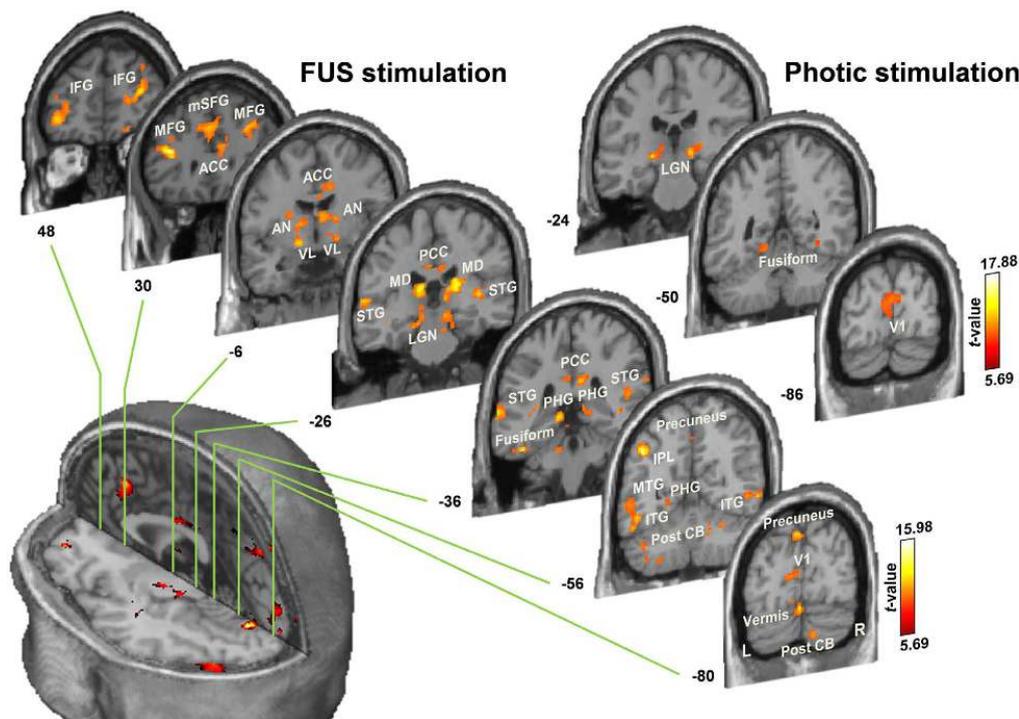


Figura 27. Mappa fMRI a livello collettivo dell'attivazione indotta da sonicazione e dalla stimolazione fotonica di soggetti sensibili al FUS (N = 11) sovrapposti alle immagini MR di coordinate fornite dal Montreal Neurological Institute (MNI). Le coordinate cerebrali nella direzione coronale sono mostrate accanto a ciascuna sezione. Per la visualizzazione è stata utilizzata una soglia di voxel di $P < 10^{-4}$, con una correzione a livello di cluster (vedere 3.3). IFG, giro frontale inferiore; MFG, giro frontale medio; mSFG, giro frontale superiore mediale; ACC, corteccia cingolata anteriore; PCC, corteccia cingolata posteriore; AN, nucleo anteriore del talamo; VL, nucleo laterale ventrale del talamo; MD, nucleo mediodorsale del talamo; LGN, nucleo genicolato laterale del talamo; PHG, giro paraippocampale; STG, giro temporale superiore; MTG, giro temporale medio; ITG, giro temporale inferiore; IPL, lobulo parietale inferiore; Post CB, lobo posteriore del cervelletto; V1, corteccia visiva primaria. Tratta da [18].

Tabella 6. Regioni cerebrali che mostrano attivazione indotta dalla sonicazione FUS. Sono mostrate le coordinate anatomiche x, y, z dei cluster significativi. Sono state identificate più regioni anatomiche all'interno di un singolo cluster. Sx, M e Dx indicano rispettivamente sinistra, mediale e destra. Tratta dal materiale supplementare di [18].

Regione	Dimensione cluster (voxel)	x	y	z	T
Giro frontale mediale, Dx	945	28	56	-14	13.23
Giro frontale inferiore, Dx		40	38	4	10.57
Giro frontale mediale, Sx	1076	-38	42	18	11.65
Giro frontale inferiore, Sx		-38	32	20	14.68
Giro frontale mediale superiore, M	366	0	32	34	9.10
Corteccia cingolata anteriore, M		4	36	24	8.29
Talamo, nucleo ventrale laterale/anteriore, Dx	1448	20	-6	-8	7.85
Talamo, nucleo ventrale laterale/anteriore, Sx		-14	-4	-6	9.58
Talamo, nucleo mediodorsale, Dx		10	-22	14	13.03
Talamo, nucleo mediodorsale, Sx		-12	-26	18	11.46
Talamo, nucleo genicolato laterale, Dx		10	-26	-10	7.82
Giro paraippocampale, Dx		16	-34	0	8.19
Talamo, nucleo genicolato laterale, Sx	279	-14	-26	-12	7.71
Giro paraippocampale, Sx		-12	-36	0	9.91

Corteccia cingolata posteriore, M	349	8	-34	26	9.40
		-8	-40	28	9.68
Giro temporale superiore, Dx	262	42	-24	4	10.56
Giro temporale superiore, Sx	188	-66	-38	14	10.31
	105	-44	-20	-6	8.47
Giro temporale inferiore (Fusiforme), Sx	455	-44	-36	-22	12.70
Giro temporale mediale, Sx		-50	-68	-12	9.07
Giro temporale inferiore (Fusiforme), Dx	135	44	-8	-30	9.33
Giro temporale inferiore, Dx	394	42	-38	-2	15.73
Lobo parietale inferiore, Sx	198	-44	-56	44	15.70
Precuneo (BA7), Dx/Sx	291	8	-74	52	7.53
		-2	-80	46	9.54
Corteccia visive primaria (BA17/18), Dx/Sx	382	-8	-86	8	7.65
		2	-94	8	7.93
Cervelletto, verme, M	425	0	-80	-16	10.88
Cervelletto, lobo posteriore superiore, Dx	257	-40	-66	-32	9.39
Cervelletto, lobo posteriore inferiore, Dx	155	-30	-62	-48	9.93
Cervelletto, lobo posteriore superiore, Dx	232	32	-64	-26	4.59
Cervelletto, lobo posteriore inferiore, Dx	125	20	-72	-44	10.39

Tabella 7. Regioni cerebrali che mostrano attivazione indotta da stimolazione luminosa.
Tratta dal materiale supplementare di [18].

Regione	Dimensione cluster (voxel)	x	y	z	T
Talamo, nucleo genicolato laterale, Dx	60	14	-24	-2	9.93
Talamo, nucleo genicolato laterale, Sx	91	-20	-16	0	17.88
Fusiforme, Dx	173	36	-62	-14	10.26
Fusiforme, Dx	67	-20	-38	-18	7.05
Corteccia visive primaria (BA17/18), Dx/Sx	366	12	-84	16	7.90
		-4	-88	16	7.68

3.3.5 La stimolazione FUS genera risposte EEG

Separatamente dagli studi fMRI, sono state misurate le risposte EEG specifiche di dieci soggetti (h1, h2, h3, h5, h6, h8, h9, h10, h11, h17) al di fuori della risonanza magnetica, attraverso le seguenti condizioni sperimentali: (1) stato di riposo, (2) stimolazione FUS, (3) stimolazione FUS sham e (4) stimolazione luminosa (illuminazione a LED bianco lunga 50 ms con un filtro diffusivo davanti agli occhi), durante le quali ai soggetti è stato richiesto di mantenere gli occhi chiusi. Il soggetto giaceva supino e la testa era posizionata sopra l'apparato di sonicazione, guidato dalle caratteristiche anatomiche del soggetto (ad es. l'inione). La stimolazione (in tutte e quattro le condizioni) è stata somministrata 50 volte ogni 2.5 s e le risposte EEG corrispondenti sono state misurate in modalità time-locked (ovvero, i dati non sono stati acquisiti in modo continuo, ma in epoche temporali attorno alla stimolazione, ovvero da -50 ms a +500 ms rispetto all'inizio della stimolazione) con un intervallo tra le acquisizioni di 2.5 s. Un'acquisizione EEG di riposo è stata acquisita nella stessa modalità senza

alcuna stimolazione esterna. I dati EEG sono stati acquisiti mediante elettrodi adesivi disposti o in corrispondenza alla posizione PO7 o PO8 (lato dell'emisfero randomizzato tra i soggetti, per estrarre i potenziali evocati visivi). Un elettrodo di riferimento è stato applicato alla mastoide ipsilaterale (a destra) e un elettrodo di ground è stato posizionato su Fpz (ossia il punto nella regione fronto-parietale sulla linea mediana). I dati sono stati filtrati online con un filtro notch a 60 Hz e un filtro passa-banda (0.3-200 Hz) prima della successiva analisi offline. Per la rimozione di artefatti, le serie temporali EEG con valori al di fuori dell'intervallo (da $-100 \mu\text{V}$ a $+100 \mu\text{V}$) sono state escluse manualmente da ulteriori analisi [18].

La media totale è stata calcolata facendo la media dei potenziali EEG evocati ($N = 10$, 50 prove per ogni condizione di stimolazione) elicitati durante ciascuna condizione sperimentale. Le analisi statistiche sono state eseguite sulle serie temporali delle risposte EEG usando Matlab, confrontando l'ampiezza EEG media in ciascun punto temporale (con passo di 1 ms) tra le condizioni di FUS e di stimolazione luminosa.

Tutti e dieci i soggetti che hanno partecipato alla registrazione EEG hanno riportato la percezione del fosfene (sono stati riportate descrizioni simili a quelle fornite nelle sessioni di fMRI, ovvero schiarimento diffuso del campo visivo). La media delle risposte EEG ($N=10$, Fig. 28) ha mostrato che la stimolazione luminosa ha generato potenziali evocati visivi (VEP) con componenti distintive denominate in base alle loro polarità (N, negativo; P, positivo) e latenze (in ms), cioè, N70, P100, N150 e P250. La condizione di sonicazione FUS, d'altra parte, ha suscitato un picco EEG negativo con circa 55 ms di latenza dopo l'inizio della sonicazione (cioè, N55) e un picco positivo che appare a 100 ms di latenza (cioè, P100) [18]. Si è osservato che le risposte EEG correlate alla stimolazione si sono verificate prima del completamento della sonicazione lunga 300 ms, il che indica che può essere utilizzata una durata di sonicazione più breve per produrre comunque una stimolazione. La condizione di FUS fantasma non mostrava picchi distintivi ed era indistinguibile dalla condizione di riposo (Fig. 28, inserto). In breve, questi dati mostrano che la somministrazione di FUS ha stimolato con successo la V1 e ha provocato potenziali EEG evocati corticali che presentano somiglianze con quelli della stimolazione luminosa.

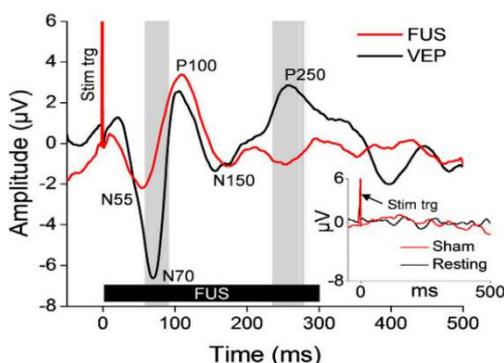


Figura 28. La media generale ($N=10$; 50 prove per la condizione di stimolazione) dei potenziali EEG evocati indotti dalla FUS transcranico nella corteccia visiva primaria (linea rossa) e VEP indotti dalla stimolazione luminosa (linea nera). La FUS è stata somministrata per un periodo di 300 ms mentre di 50 ms la durata della stimolazione fotonica. I picchi positivi (indicati con il prefisso P) e negativi (indicati con il prefisso N) dei potenziali evocati sono indicati sul diagramma. Le barre verticali grigie indicano i segmenti temporali che hanno mostrato differenze significative nelle ampiezze tra VEP e i potenziali evocati mediati da FUS ($P < 10^{-3}$). Il picco del segnale che innesca la stimolazione è etichettato come "Stim trig". L'inserto mostra i segnali EEG misurati nello stesso sito dell'elettrodo nello stato di riposo (cioè nessuna stimolazione, linea nera) e nella condizione FUS fantasma (linea rossa). Tratta da [18].

3.3.6 Simulazioni acustiche della tFUS

Per valutare l'accuratezza spaziale della sonicazione e stimare il livello di energia acustica somministrato a ciascun soggetto, i ricercatori hanno effettuato simulazioni retrospettive della propagazione dell'onda acustica attraverso l'anatomia individuale del cranio. Infatti, la visualizzazione diretta in vivo (ad es. usando particolari tecniche di MR) del profilo di pressione acustica è difficile con i livelli di intensità acustica usati nello studio. Pertanto la locazione e l'intensità acustica del fuoco FUS all'interno del tessuto cerebrale è stata stimata usando un software di stimolazione acustica (Wave 3000; Cyberlogic, New York, NY). L'intensità acustica e l'indice meccanico (MI) in corrispondenza al target desiderato ($AI_{@target}$, $MI_{@target}$) e i valori massimi all'interno dell'area circostante ($AI_{max@ROI}$, $MI_{max@ROI}$) sono stati tabulati nella Tabella 8. Sono mostrati anche la deviazione spaziale del focus acustico dal target desiderato, lo spessore del cranio misurato lungo il percorso di sonicazione e la reattività di ogni soggetto all'applicazione. Il profilo di intensità acustica simulato (Fig. 29, pseudo-colorato e sovrapposto alle immagini anatomiche della MR) di un soggetto reattivo ('h1') indica che la focalizzazione acustica è stata direzionata con successo nell'area bersaglio desiderata localizzata nella fessura calcarina. Anche il profilo longitudinale simulato dell'intensità acustica nella direzione del fascio (Fig. 29b) mostra che la maggior parte dell'energia acustica è stata somministrata nell'area target della V1. L' I_{sppa} stimata sul target previsto variava da 0.7 a $6.6 \text{ W} / \text{cm}^2$, circa il 18% della I_{sppa} di $16.6 \text{ W} / \text{cm}^2$, suggerendo che l'82% dell'intensità incidente, in media, è stata attenuata durante l'applicazione transcranica della FUS. La deviazione spaziale del fuoco acustico in situ dal bersaglio designato (centro della regione di interesse simulata; ROI) variava da 0 a 16.1 mm in tutti i soggetti [18].

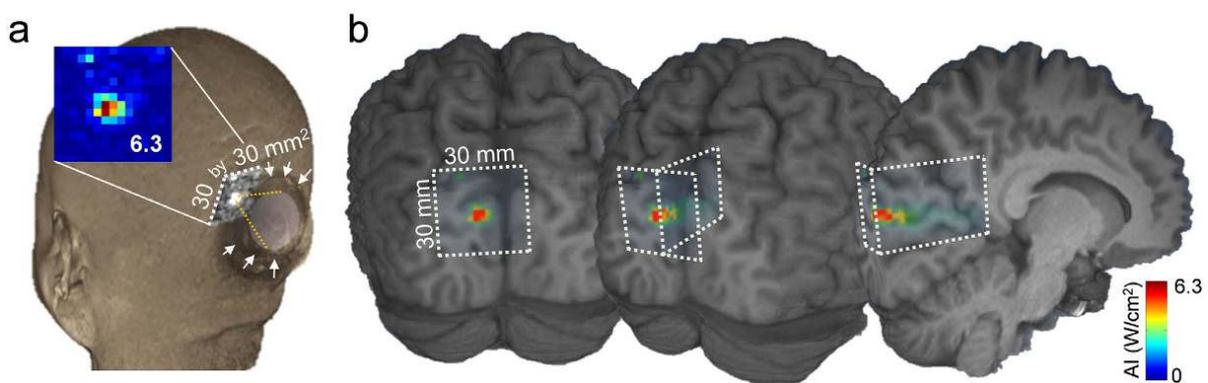


Figura 29. Esempio di profili simulati di intensità acustica sovrapposti alla regione sonicata delle aree visive (del soggetto "h1"). (a) Il profilo di intensità acustica ($30 \times 30 \text{ mm}^2$) del focus di sonicazione si sovrappone a un rendering 3D dei dati volumetrici della MRI della testa. La forma dell'idrogel di accoppiamento acustico è visibile (circondata da frecce bianche) mentre il focus di sonicazione si è formato nell'area visiva bersaglio (inserto, mappa colorata di intensità acustica colorata con valore massimo della I_{sppa} all'interno della regione di interesse simulata). (b) Il profilo di intensità acustica proiettato su sezioni cerebrali 3D dello stesso individuo (da sinistra a destra, sezione coronale, ruotate per mostrare la regione medio-sagittale del cervello). Le linee tratteggiate bianche indicano i confini delle ROI (Region of Interest) simulate. Tratta da [18].

Tabella 8. Risultati della simulazione acustica individuale della stimolazione tramite FUS della V1. Alla fine vengono forniti anche i valori medi (mean) e le deviazioni spaziali (s.d.). Tratta da [18].

ID	Genere	$AI_{I_{ppa}}^{target}$ (W/cm ²)	$AI_{I_{ppa}}^{max@ROI}$ (W/cm ²)	MI_{target}	$MI_{max@ROI}$	Deviazione dal focus (mm)	Spessore del cranio (mm)	Reattività del soggetto
h1	M	4.8	6.3	0.8	0.9	2.0	5.7	Sì
h2	F	1.2	3.7	0.4	0.7	4.0	6.8	Sì
h3	M	5.6	7.0	0.8	0.9	2.0	2.8	Sì
h4	F	2.7	4.5	0.6	0.7	2.0	5.6	Sì
h5	M	4.0	11.6	0.7	1.2	2.0	3.8	Sì
h6	M	2.3	3.2	0.5	0.6	4.0	7.8	Sì
h7	M	2.0	7.0	0.5	0.9	2.0	6.7	Sì
h8	M	1.5	1.7	0.4	0.4	2.0	6.7	Sì
h9	M	3.7	6.3	0.7	0.9	2.0	4.7	Sì
h10	M	1.3	3.2	0.4	0.6	4.0	6.7	Sì
h11	M	2.3	2.3	0.5	0.5	0.0	5.6	Sì
h12	M	5.3	5.3	0.8	0.8	0.0	2.1	Parziale
h13	M	6.6	9.1	0.9	1.1	2.0	2.3	Parziale
h14	F	3.2	5	0.6	0.8	2.0	6.6	No
h15	M	2.7	5.5	0.6	0.8	2.0	4.8	No
h16	M	3.7	3.7	0.7	0.7	0.0	6.7	No
h17	M	0.7	4.8	0.3	0.8	16.1	7.8	No
h18	F	1.2	1.7	0.4	0.4	8.2	6.9	No
h19	F	1.7	3.7	0.4	0.7	7.2	8.7	No
	Mean	3.0	5.0	0.6	0.8	3.3	5.7	
	s.d.	1.7	2.5	0.2	0.2	3.8	1.9	

3.3.7 Esami neurologici pre e post sonicazione e valutazione radiologica di follow-up.

Tutti i partecipanti sono stati sottoposti a un esame neurologico clinico un'ora prima e dopo dalla somministrazione di FUS. L'esame neurologico condotto da tre medici (i quali non erano a conoscenza della natura dello studio) non ha rivelato risultati anomali in nessuno dei soggetti. Un soggetto femminile ("h14") ha riportato un mal di testa transitorio solo durante la sessione fMRI della condizione FUS fantasma, scomparso subito dopo.

Le letture MRI anatomiche di follow-up, condotte in tre diversi momenti dopo la sonicazione non ha identificato anomalie radiologiche. Sulla base delle interviste di follow-up (avvenute 2 mesi dopo la sonicazione), non vi sono stati cambiamenti nello stato mentale o fisico, o disagi associati alla procedura [18].

3.4 Considerazioni riguardo ai risultati ottenuti e possibili studi futuri

La tFUS guidata dalle immagini di MR, insieme all'acquisizione simultanea di fMRI, hanno fornito prove importanti sul fatto che nell'uomo la FUS attiva l'area stimolata del cervello (in questo caso, V1) ed evoca contemporaneamente una percezione sensoriale sotto forma di fosfene. Il successo della

stimolazione di V1 è stato anche confermato dalla presenza dei potenziali corticali EEG evocati, che presentavano somiglianze con i classici VEP generati dalla stimolazione luminosa. I fenomeni stimolatori si sono rivelati transitori e reversibili, senza causare alcun disagio o effetto avverso tra coloro che hanno partecipato allo studio. La sensazione percepita è stata descritta principalmente come fosfene amorfo, non colorato, senza alcuna struttura, e si è manifestato in modo diffuso sull'intero campo visivo. Soltanto tre dei soggetti reattivi ('h5', 'h9' e 'h10') hanno descritto una risposta visiva schematica (ad esempio delle linee) o colorata. Questi tipi di sensazioni di fosfene hanno delle somiglianze con quelle riportate da studi precedenti condotti con stimolazione magnetica transcranica (TMS) di V1, nei quali è stata riportata la percezione di luci deboli con un colore bianco / grigio pallido o talvolta un 'colore insaturo', talvolta accompagnata dalla presenza di motivi visivi con una struttura definita. Sebbene la localizzazione retinotopica o topografica della risposta visiva non sia stata presa in considerazione nello studio descritto, un ulteriore esame della stimolazione localizzata in sottoregioni della V1 sarebbe vantaggioso per rivelare la propagazione spaziale della stimolazione FUS sulla superficie corticale e nelle regioni profonde.

I risultati suggeriscono che la FUS può stimolare la V1 dell'uomo, generando la percezione di fosfene e i potenziali visivi evocati associati. Tuttavia, i dati di fMRI hanno indicato che oltre ai circuiti visivi primari la FUS ha stimolato anche regioni del cervello distanti da V1. Una causa chiara per il coinvolgimento di queste ulteriori regioni del cervello non è stata identificata, tuttavia alcune ipotesi sono state avanzate. In particolare, l'attivazione delle aree fronto-parietali (comprendenti IFG, MFG, mSFG, precuneo/IPL) e le aree temporali (per es. STG e MTG), insieme con la corteccia cingolata (ACC e PCC) che fanno parte di reti legate a processi attentivi, possono indicare un potenziale coinvolgimento di meccanismi di attenzione durante la percezione dei fosfene elicitata dalla sonicazione. I dati attuali, pertanto, non supportano l'attivazione spazialmente selettiva dell'area sonora V1, principalmente a causa delle concomitanti attivazioni che sono state rilevate in tutto il cervello. A differenza degli studi di imaging funzionale su animali anestetizzati che hanno mostrato un'attivazione spazialmente selettiva nella regione target della sonicazione, i processi cognitivi degli esseri umani in stato di veglia impedirebbero un adeguato isolamento della regione cerebrale che è stata stimolata principalmente dalla FUS. La stimolazione di aree somatosensoriali / somatomotorie unilaterali con una disposizione somatotopica precisa (insieme alla mappatura della fMRI simultanea) o l'elicitazione di fenomeni visivi con una struttura retinotopica mediante sonicazione di una specifica sotto-regione del sistema visivo potranno essere utili in seguito per confermare la selettività spaziale del metodo [18].

È interessante, tuttavia, notare che alcuni individui ('h12' - 'h16', inclusi soggetti parzialmente reattivi, N = 5) non hanno riportato una percezione chiara e ripetuta del fosfene sebbene sia stata somministrata una sonicazione spazialmente accurata, con un livello di intensità acustica identico a quello utilizzato negli individui sensibili. Lee, Wonhye, et al. hanno ipotizzato che questa percezione apparentemente incoerente possa essere attribuita all'esistenza di differenze individuali nella soglia di intensità acustica che produce una sonicazione efficace; infatti, una considerazione simile era stata già sviluppata in studi precedenti che hanno coinvolto sia esseri umani che animali. Per spiegare la grande variabilità individuale nelle risposte osservate, sarebbe auspicabile una misura delle risposte del soggetto a diverse intensità / parametri di FUS. In alternativa, l'utilizzo di condizioni di controllo "attive" (ad esempio, sonicazione di posizioni diverse all'interno del V1) sarebbero preziose e costituiranno un argomento basilare per le indagini future.

Tra un sottoinsieme di soggetti che non hanno riportato sensazioni visive (ad esempio, "h17" - "h19", N = 3), la simulazione ha rivelato un errore spaziale piuttosto ampio nella sonicazione (compreso tra 7.2 e 16.1 mm dal target di V1, Tabella 8). I ricercatori hanno ipotizzato che le differenze locali nelle forme del cranio, che possono essere presenti nel percorso di sonicazione, potrebbero aver provocato un'alterazione nella propagazione delle onde acustiche attraverso il cranio. In questo contesto, la guida del percorso di sonicazione mediante simulazione acustica in loco con correzioni di aberrazione acustica migliorerebbe ulteriormente l'accuratezza spaziale della tFUS.

CAPITOLO 4 – NEUROMODULAZIONE DELLA CORTECCIA MOTORIA (M1) NELL’UOMO TRAMITE ULTRASUONI TRANSCRANICI FOCALIZZATI

Le sperimentazioni trattate nel capitolo precedente sulle regioni sensoriali (somatosensoriale e visiva), hanno messo in evidenza che la tFUS è in grado di inibire, in maniera spazialmente specifica la corteccia somatosensoriale primaria e di migliorare le prestazioni di discriminazione tattile, nonché di elicitare una risposta BOLD (rilevata dalla fMRI) nella corteccia visiva primaria, generando la percezione di fosfeni. Uno studio più recente ha dimostrato la capacità degli ultrasuoni focalizzati transcranici di modulare le aree sub-corticali del cervello umano [19]. Tale studio ha dimostrato che la stimolazione tFUS diretta al talamo è in grado di provocare un'attenuazione dei potenziali evocati somatosensoriali (SEP) generati nel nucleo ventroposteriore-laterale in regioni corticali collegate. Nello studio del 2018 presentato in questo capitolo, Legon et al. hanno esteso questi risultati alla corteccia motoria primaria (M1) dell'uomo [19]. Questo capitolo pertanto, riporta i metodi impiegati e i risultati ottenuti in quello studio [19].

Per valutare l'effetto degli ultrasuoni su M1 i ricercatori [19] hanno sviluppato un nuovo metodo che abbina la somministrazione simultanea e concentrica di ultrasuoni focalizzati con la stimolazione magnetica transcranica (TMS). Questo accoppiamento è vantaggioso in quanto prevede la valutazione degli ultrasuoni su metriche di TMS consolidate e ben comprese come i potenziali motori evocati (Motor Evoked Potential, MEP) (per un eventuale approfondimento sulla tecnica di TMS si veda l'articolo integrale [19]). Inoltre, consente un esame non invasivo dell'effetto degli ultrasuoni su popolazioni neuronali specifiche in quanto diverse metodologie TMS (ad es. impulso accoppiato) hanno dimostrato di influenzare selettivamente diversi microcircuiti motori.

In particolare, in questo studio [19] i ricercatori hanno testato quindi l'effetto della stimolazione tFUS diretta a M1 e sulle curve di reclutamento dei singoli impulsi MEP evocate da TMS a singolo impulso, sugli intervalli inter-stimolo (1–15 msec) di impulsi TMS accoppiati e sul tempo di reazione in risposta a uno stimolo semplice. In base alle sperimentazioni effettuate in precedenza, che hanno valutato l'effetto del tFUS sulla corteccia motoria di piccoli e grandi animali, dimostrando che gli ultrasuoni suscitano risposte motorie periferiche, la tFUS applicata alla corteccia motoria umana potrebbe avere effetti eccitatori e aumentare l'ampiezza dei potenziali motori evocati (MEP). Tuttavia, i ricercatori di questo studio [19] in base ai risultati da loro stessi ottenuti relativamente alla

stimolazione tFUS della corteccia somatosensoriale umana hanno ipotizzato a priori che l'effetto complessivo fosse l'inibizione corticale motoria.

A seconda dei parametri dello stimolo, la TMS a impulso accoppiato può essere utilizzata per testare l'eccitabilità di specifici circuiti inibitori o facilitatori nella corteccia motoria (M1). In particolare con uno stimolo condizionante (CS) sotto-soglia (per non evocare il MEP) seguito da uno stimolo test (S1) sopra-soglia (per evocare il MEP ed osservare l'effetto dello stimolo condizionante che lo ha preceduto) con un intervallo di inter-stimolo (ISI) di 1-6 ms, si ottiene l'inibizione del potenziale motorio evocato (MEP); questo fenomeno è conosciuto anche con il nome di 'inibizione corticale a intervallo breve' (Short Intra-Cortical Inhibition, SICI), se invece si utilizza un ISI tra gli 8 ms e i 30 ms tra lo stimolo CS e lo stimolo S1, il MEP generato da S1 viene facilitato, questo fenomeno è definito 'facilitazione intracorticale' (Intra-Cortical Facilitation, ICF). D'altra parte, attraverso l'utilizzo della TMS a impulso singolo per evocare il MEP, si testa l'eccitabilità corticospinale. Utilizzando quindi diversi metodi di TMS (come SICI e ICF), che sondano diversi microcircuiti motori oltre a valutare un semplice compito motorio, lo studio in esame ha cercato di ottenere una migliore comprensione dell'effetto della tFUS sulla corteccia motoria umana e nei circuiti neuronali sottoposti all'energia meccanica ultrasonica.

4.1 Neuromodulazione della corteccia motoria nell'uomo tramite l'applicazione simultanea di TMS e ultrasuoni transcranici focalizzati

4.1.1 I soggetti

Un totale di 50 volontari sani, privi di disturbi neurologici, 16 uomini e 34 donne di età compresa tra 19 e 38 anni (22 ± 3.59 anni), hanno partecipato agli esperimenti. Alla fine della sperimentazione, è stato chiesto ai partecipanti di compilare un questionario di follow-up per avere un rapporto sui sintomi che valutasse la loro esperienza e la tolleranza all'applicazione degli ultrasuoni: in generale non sono stati segnalati sintomi rilevanti. I sintomi lievi e moderati includevano dolore al collo, sonnolenza, contrazioni muscolari, prurito e mal di testa, ma nessuno di questi sintomi è persistito o è peggiorato.

4.1.2 Applicazione simultanea di ultrasuoni transcranici focalizzati e TMS

L'applicazione simultanea di ultrasuoni e TMS utilizza una bobina a forma di otto (si utilizza questo modello poiché genera un campo magnetico di intensità massima all'intersezione dei due avvolgimenti, con un'elevata focalizzazione) con due avvolgimenti complanari di uguale dimensione (bobina alfa con doppio avvolgimento da 70 mm, Magstim Inc., UK), alla quale è fissato un singolo trasduttore (1.25 cm di altezza rispetto alla bobina) a ultrasuoni focalizzati posto al centro

dell'intersezione tra i due avvolgimenti usando un supporto personalizzato stampato in 3D (Fig. 30A). L'attuale design della bobina per TMS accoppiata al trasduttore a tFUS aumenta la diffusione e indebolisce il campo elettrico indotto nella testa di circa il 30%, tuttavia l'area della corrente più elevata, concentrica al campo degli ultrasuoni, si trova direttamente sotto l'intersezione degli avvolgimenti della bobina, rendendo efficace la progettazione di tFUS con TMS per testare l'eccitabilità corticale motoria spazialmente specifica. Tuttavia, questa riduzione del campo elettrico indotto nella testa richiede un'uscita dello stimolatore TMS più elevata per raggiungere la soglia motoria e produrre un MEP periferico registrabile. Questo problema può essere minimizzato con l'utilizzo di trasduttori a ultrasuoni dal profilo più basso di 1.25 cm (utilizzato in questo studio) o posizionando il trasduttore in piano con gli avvolgimenti della bobina.

Sono stati condotti test iniziali per studiare la sicurezza e la praticabilità di tFUS e TMS simultanei e concentrici. I test iniziali sulla praticabilità si sono concentrati sulla potenziale interazione delle due fonti di energia e i possibili rischi associati, o sull'eventuale induzione di corrente nel trasduttore a ultrasuoni da parte del campo magnetico della TMS e, viceversa, sull'influenza del trasduttore a ultrasuoni sul campo magnetico e il conseguente campo elettrico indotto nella testa del soggetto.

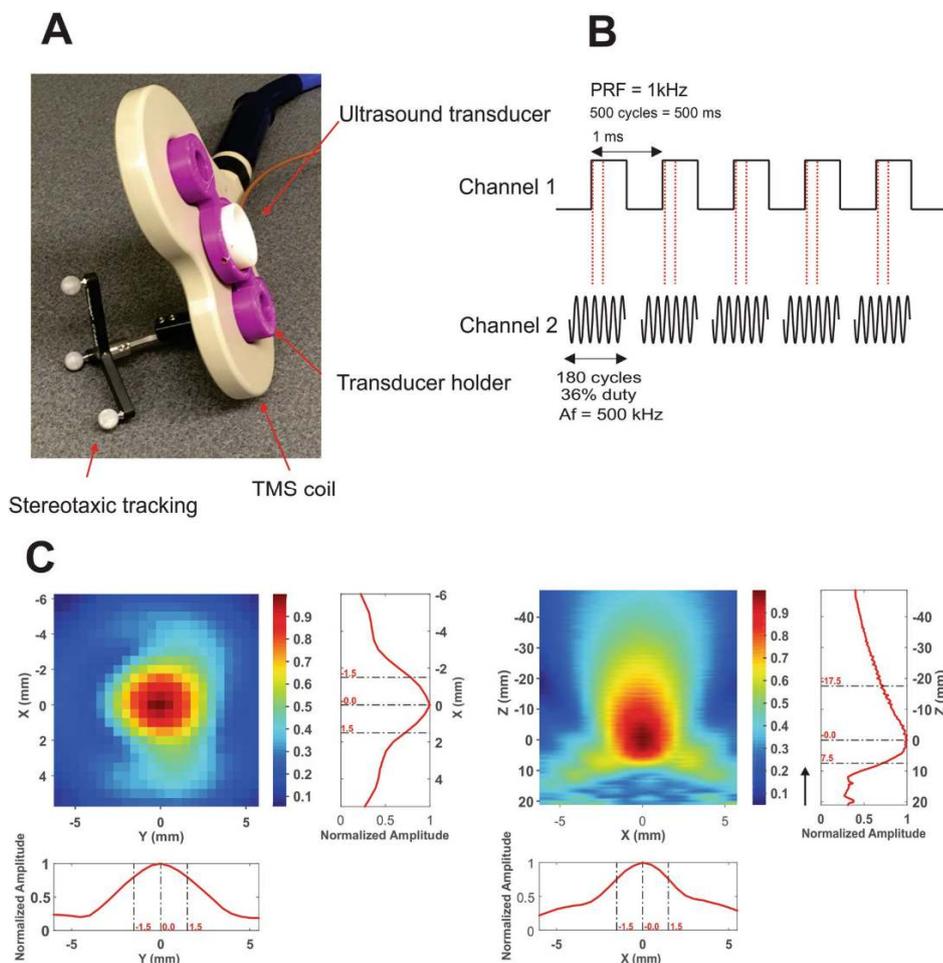


Figura 30. tFUS e TMS. (A) Fotografia del dispositivo ad ultrasuoni /TMS che mostra la bobina per TMS (beige), il trasduttore ad ultrasuoni (bianco) e il supporto (viola). Sono visibili anche i marker di tracking utilizzati per guidare l'ultrasuono / la TMS verso un target cerebrale specifico utilizzando la neuronavigazione stereotassica. (B) Modalità a ultrasuoni pulsati. PRF = frequenza di ripetizione dell'impulso; Af = frequenza acustica. (C) Diagrammi colorati e a linea del campo di pressione ad ultrasuoni in acqua. Le scale sono normalizzate alla massima pressione. La freccia nera indica la direzione della sonicazione. Tratta da [19].

Per misurare l'effetto della TMS sul campo ultrasonico risultante i ricercatori hanno costruito un serbatoio acustico ad hoc che separava le bobine della TMS dall'acqua (utilizzata come mezzo di accoppiamento acustico) ma lasciava 1 mm tra il trasduttore posto al centro e la faccia della bobina TMS. Il trasduttore ad ultrasuoni utilizzato è un trasduttore focalizzato a singolo elemento. Un idrofono è stato posizionato nel serbatoio per misurare il focus del trasduttore. La frequenza acustica utilizzata dal trasduttore era di 0.5 MHz con una lunghezza focale di 22 mm.

Il test consisteva in 100 singoli impulsi di TMS erogati ad un intervallo inter-stimolo (ISI) di 8 secondi. L'artefatto della TMS osservato dall'idrofono senza l'applicazione degli ultrasuoni è stato registrato per primo, seguito poi dalla registrazione del campo di pressione acustica generato dal trasduttore a FUS (250 cicli) senza TMS. Successivamente, la TMS è stata applicata negli stessi punti contemporaneamente agli ultrasuoni focalizzati per confrontare le pressioni generate dal trasduttore con e senza TMS.

In seguito, i ricercatori hanno testato l'effetto del trasduttore a FUS sul campo magnetico prodotto dalla bobina. È stato misurato quindi il vettore magnetico risultante dal centro della bobina utilizzando una sonda magnetica su misura composta da due avvolgimenti di fili di forma rettangolare (con superficie di 1 cm²) orientati perpendicolarmente l'uno all'altro e posizionati in piano con la faccia del trasduttore ad ultrasuoni, il quale viene posizionato 1.25 cm sopra la faccia della bobina. Un pezzo di carta che delinea una griglia di 3×3 cm è stato posizionato in piano con la faccia del trasduttore a FUS sopra la bobina come guida per i punti di misurazione del vettore magnetico.

Sono state trovate differenze trascurabili nell'ampiezza e nella morfologia della forma d'onda degli ultrasuoni con e senza un impulso di TMS. La Figura 24A mostra una traccia rappresentativa del campo ultrasonico con e senza TMS. Viceversa, neanche per 100 impulsi di TMS con e senza ultrasuoni sono state riscontrate differenze nel campo magnetico prodotto dalla bobina (Fig. 31B).

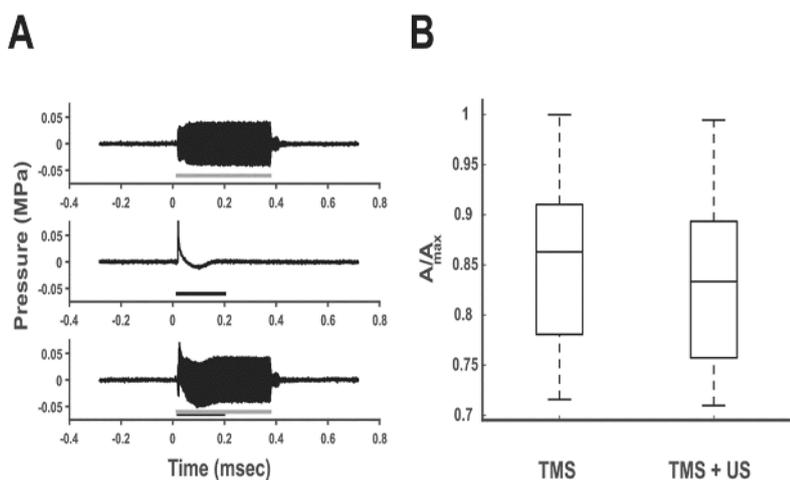


Figura 31. Interazione di tFUS e TMS. (A) Campo ultrasonico misurato in acqua libera. La linea grigia indica il periodo di sonicazione. (Pannello centrale) Artefatto da singolo impulso di uscita (100%) dello stimolatore per TMS. La linea nera indica la lunghezza dell'impulso di 'artefatto'. (Pannello inferiore) Sia gli ultrasuoni che la TMS sono trasmessi simultaneamente per determinare l'effetto della TMS sulla pressione del campo acustico. nessun effetto dell'impulso TMS è stato rilevato sul campo degli ultrasuoni. (B) Vettore magnetico medio (A) rispetto al massimo (A_{max}) misurato dal piano della faccia della bobina TMS in assenza di trasduttore ad ultrasuoni (TMS) e con il trasduttore ad ultrasuoni (TMS + US) posizionato sopra la bobina. L'aggiunta del trasduttore ad ultrasuoni non determina alcuna variazione nel vettore magnetico medio. Tratta da [19].

4.1.3 Forma d'onda e trasmissione di tFUS

Per tutti gli esperimenti è stato utilizzato un trasduttore a tFUS a singolo elemento con una frequenza centrale di 0.5 MHz, apertura di 30 mm e lunghezza focale di 22 mm. La mappa della pressione acustica di questo trasduttore in acqua libera è illustrata nella Figura 30C. L'intensità media dell'impulso nel punto di picco spaziale (I_{sppa}) calcolata in acqua libera era di 17.12 W / cm² con un'intensità media temporale nel punto di picco spaziale (I_{spta}) corrispondente di 6.16 W / cm². L'indice meccanico (IM) era 0.9.

Per generare la forma d'onda desiderata è stato utilizzato un generatore di funzioni a 2 canali a 2 MHz. Il canale 1 è stato impostato per fornire tFUS a una frequenza di ripetizione degli impulsi (PRF) di 1 kHz impostato per erogare 500 impulsi mentre il canale 2 è stato impostato per pilotare il trasduttore a 500 kHz, con il canale 1 che fungeva da trigger per il canale 2. Il canale 2 è stato impostato per erogare 180 cicli per impulso, e il canale 1 è stato impostato per erogare 500 impulsi per una durata totale di 500 msec. L'uscita del canale 2 è stata inviata all'ingresso di un amplificatore lineare da 100 W e, a sua volta, l'uscita dell'amplificatore veniva inviata al trasduttore tFUS (Fig. 30B). Sia per gli esperimenti TMS a singolo impulso che per gli esperimenti TMS a impulso accoppiato, la sonicazione è stata 'time-locked' per verificarsi solo 100 msec prima dell'impulso TMS. Per tutti gli esperimenti, la condizione di tFUS ha implicato l'accoppiamento acustico della faccia attiva del trasduttore ad ultrasuoni al cuoio capelluto nel sito target (vedere 4.1.4). Per ottenere l'accoppiamento acustico sulla testa, i capelli sono stati semplicemente spostati per esporre il cuoio capelluto, dopodiché è stato applicato dell'idrogel sulla superficie del trasduttore a contatto con la testa per tenere i capelli fuori dal sito di sonicazione e per garantire un corretto accoppiamento acustico.

La condizione di tFUS sham è stata ottenuta capovolgendo il trasduttore in modo che non venisse trasmesso alcun fascio ultrasonico alla testa, sebbene il contatto fosse mantenuto garantendo un corrispondente artefatto uditivo. Ciò è importante poiché in alcuni casi l'elemento piezoelettrico nel trasduttore produceva un ronzio leggermente udibile. Pertanto, ai partecipanti è stata fornita una protezione per le orecchie e non sono state segnalate differenze di sensazione tra condizione sham e sonicazione effettiva, in nessuno degli esperimenti.

4.1.4 Neuronavigazione stereotassica

L'identificazione di tutte le aree target in ogni esperimento è stata facilitata e confermata utilizzando un sistema di neuronavigazione stereotassica che è stato adattato per funzionare con la bobina della TMS e il singolo trasduttore a tFUS utilizzato nell'esperimento del tempo di reazione (vedi Fig. 30A).

I partecipanti sono stati dotati di sensori a infrarossi per tracciare il movimento della testa e sono stati utilizzati dei marcatori individuali su di essa per allinearla con un modello di cervello presente nel sistema di neuronavigazione. La bobina e il trasduttore ad ultrasuoni (nell'esperimento del tempo di reazione) sono stati inoltre dotati di marcatori a infrarossi che consentono di individuare la posizione specifica della bobina o del trasduttore rispetto alla testa del partecipante. Ciò ha contribuito a sonicare inizialmente la corteccia motoria primaria ma, soprattutto, ha assicurato il controllo costante sulla posizione della bobina e del trasduttore prova dopo prova per l'intera durata di tutti gli esperimenti. La tolleranza sulla posizione del target è stata impostata ≤ 1 mm rispetto alla posizione di neuromodulazione fissata inizialmente [19].

4.1.5 Elettromiografia (EMG)

Durante tutti gli esperimenti svolti sono stati acquisiti segnali EMG periferici di superficie utilizzando degli elettrodi adesivi, i quali sono stati fissati in posizione con del nastro adesivo per garantire un buon contatto con la cute e impedirne il movimento. Per gli esperimenti 1 e 2 (a impulso singolo e a impulso accoppiato) sono stati acquisiti i segnali EMG dal primo interosseo dorsale (First Dorsal Interosseus, FDI) della mano dominante del soggetto. Per l'esperimento sul tempo di reazione (Esperimento 3) è stata registrata dall'abditore breve del pollice (Abductor Pollicis Brevis, APB) della mano dominante, poiché era questo il muscolo che eseguiva il compito. I dati EMG sono stati registrati con continuità utilizzando un amplificatore DC con frequenza di campionamento di 1 kHz e successivamente memorizzati su un computer per ulteriori analisi offline.

In particolare i segnali EMG continui sono stati filtrati nella banda 5-200 Hz, e suddivise in epoche da -50 ms a + 100 ms dall'inizio della stimolazione TMS. Le ampiezze dei potenziali motori evocati (MEP) sono state identificate visivamente dai ricercatori e quantificati usando il metodo picco-picco. Un MEP era considerato presente se chiaramente visibile al di sopra del rumore di fondo (dello specifico trial) in una finestra di 50 ms dopo l'inizio della TMS. Agli eventi in cui i MEP non erano identificati era assegnata un'ampiezza di 0 e inclusi per successive analisi.

4.1.6 Esperimento 1: curve di reclutamento dei MEP a impulso singolo

Un totale di 12 soggetti (dei 50 partecipanti allo studio) hanno preso parte a questo esperimento, tutti con mano destra dominante.

Per generare curve di reclutamento, è stata determinata la soglia motoria a riposo (Resting Motor Threshold, RMT) individuale per il primo interosseo dorsale, utile per calibrare la potenza della bobina e utilizzare come stimolo iniziale l'uscita dello stimolatore con un valore del 20% inferiore a quello della soglia ottenuta (arrotondata al 5% più vicino). Ad esempio, se un partecipante avesse avuto un

RMT del 73% rispetto all'uscita dello stimolatore, il punto iniziale del test sarebbe stato un'uscita dallo stimolatore al 55% (73 - 20 arrotondato al 5% più vicino). Ogni dieci impulsi singoli, l'uscita dello stimolatore veniva incrementata del 5% fino al raggiungimento del 100% del suo valore massimo; in totale sono stati applicati dieci impulsi singoli per ciascuna potenza in uscita a un ISI (intervallo inter-stimolo) di 10 secondi tra un impulso TMS e l'altro. Prima della raccolta della curva di reclutamento, è stata acquisita una condizione di riferimento (cioè senza applicazione di ultrasuoni focalizzati) di 10 impulsi singoli a 10 secondi l'uno dall'altro. Il tempo di stimolazione è stato di circa 15-20 minuti per ciascuna condizione (tFUS simultanea e tFUS sham) e il tempo totale dell'esperimento, incluso il set-up, è stato di circa 2 ore.

Per analizzare le principali differenze nelle curve di reclutamento dei MEP tra le due condizioni di tFUS sham / TMS e tFUS reale / TMS è stata condotta un'analisi della varianza (ANOVA) a due vie per misure ripetute con i fattori MODULAZIONE (reale e sham) e INTENSITA' DI TMS (75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%). Test post-hoc sono stati condotti per investigare gli effetti significativi. L'analisi ha evidenziato un effetto ('main effect') del fattore di modulazione per cui il MEP, durante la stimolazione reale, risultava significativamente attenuato rispetto alla condizione di tFUS sham / TMS (Fig. 32A) e un effetto ('main effect') del fattore intensità della TMS per cui le ampiezze dei MEP non venivano incrementate all'aumentare dell'uscita dello stimolatore (Fig. 32B). L'interazione tra i due fattori non è risultata statisticamente significativa, suggerendo che l'inibizione da parte della tFUS non era dipendente dall'uscita dello stimolatore TMS.

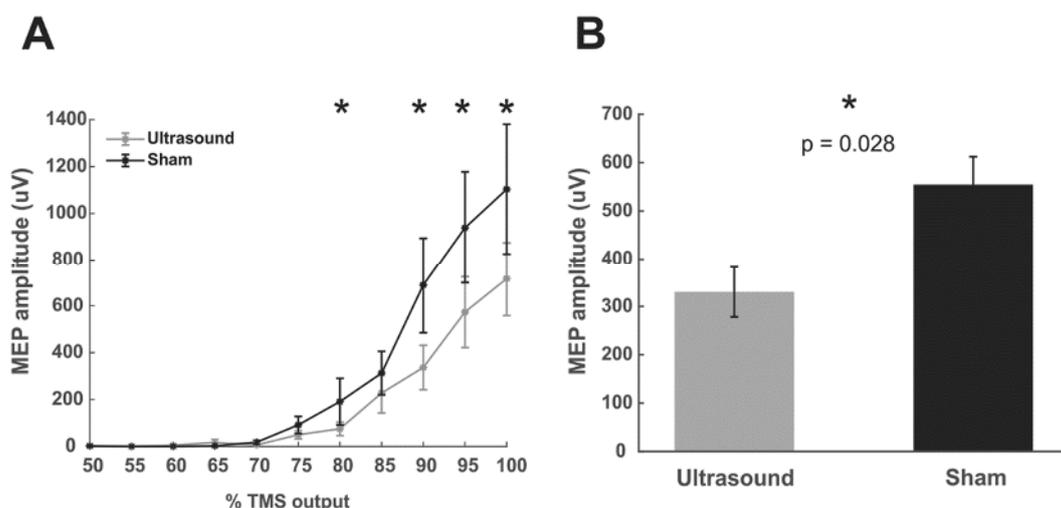


Figura 32. Effetti degli ultrasuoni focalizzati sulle curve di reclutamento generate da TMS a singolo impulso. (A) Curve di reclutamento per tFUS reale / TMS (grigio) e neuromodulazione sham (nero). Il simbolo * indica differenze significative tra tFUS sham e tFUS reale in corrispondenza a determinate intensità in uscita dalla TMS (B) L'ampiezza dei MEP della tFUS reale / TMS (grigio), rispetto a quella della neuromodulazione sham (nero) è significativamente attenuata a intensità dello stimolatore intorno a 75% - 100% (le altezze delle barre indicano l'ampiezza MEP media tra le stimolazioni 75%-100%). Tratta da [19].

4.1.7 Esperimento 2: MEP a impulso accoppiato

Un totale di 10 soggetti hanno partecipato a questo esperimento, tutti con mano destra dominante. Inizialmente è stata applicata una condizione di base con dieci impulsi singoli come nel primo esperimento. Dopo l'acquisizione della condizione di base, il dispositivo ad ultrasuoni ed a TMS è stato posizionato sopra la regione M1 corrispondente al primo interosseo dorsale. Lo stimolatore per l'impulso condizionante (CS) è stato impostato all'80% mentre per lo stimolo test (S1) è stato impostato al 120%. Dieci stimolazioni a tFUS / TMS venivano applicate ogni 10 secondi, con un intervallo tra stimolo condizionante e stimolo test (intervallo inter-stimolo, ISI) crescente, da 1 a 15 msec. Questa procedura è stata ripetuta sia per tFUS reale che tFUS sham. Anche in questo caso, la sonicazione è stata 'time-locked' in modo da verificarsi 100 ms prima dello stimolo condizionante. La durata della stimolazione era di circa 25-30 minuti per ciascuna condizione (FUS effettiva e tFUS sham) e il tempo totale dell'esperimento, incluso il setup, era di circa 2.5 ore. I dati sono stati dapprima normalizzati rispetto alla condizione di base individuale. Sono stati analizzati gli effetti indotti dagli ultrasuoni sull'inibizione intracorticale breve (Short IntraCortical Inibition, SICI) e sulla facilitazione intracorticale (ICF) per capire quali siano i meccanismi alla base della modulazione tramite tFUS. I dati registrati sono stati suddivisi in base al valore dell'ISI tra stimolo condizionante e stimolo test: i dati con ISI compreso tra 1 ms e 5 ms sono stati utilizzati per valutare gli effetti sul SICI, mentre quelli con ISI tra 10 ms e 15 ms sono stati utilizzati per l'ICF. Anche la sezione di dati con ISI intermedio (ISI da 6-9 ms) è stata analizzata sebbene questi ISI non abbiano dimostrato un'inibizione o una facilitazione in modo specifico. Come nel primo esperimento, è stata condotta un'analisi della varianza a due vie per misure ripetute, una per la SICI e una per l'ICF, con fattori MODULAZIONE (tFUS reale e sham) e TEMPO (durate degli ISI). Test post-hoc sono stati condotti per investigare gli effetti significativi. L'analisi ha evidenziato solo un effetto significativo del fattore modulazione nel caso delle epoche con ISI tra 10 e 15 (cioè nel caso di ICF). In particolare, si è osservato che per tutti i valori di ISI tra 10 e 15 la tFUS reale induceva un MEP attenuato rispetto alla tFUS sham (Fig. 33 A e B).

Visto che la sonicazione ha avuto effetto sulla TMS a impulso singolo è possibile che abbia un qualche effetto anche sullo stimolo condizionante e sulla sua abilità di attivare i neuroni inibitori che sopprimono gli input eccitatori generati dallo stimolo test. Tuttavia nella valutazione della SICI si è dimostrato che, anche in assenza di tFUS si ha una forte inibizione da parte dello stimolo condizionante. Nella valutazione di ICF, rispetto alle linee di base viene mostrata un'inibizione dell'effetto di facilitazione delle ampiezze del MEP quando si applicano gli ultrasuoni focalizzati. Poiché le due valutazioni mostrano risultati differenti, si ipotizza che l'effetto degli ultrasuoni non

influisca sui circuiti attivati dallo stimolo di condizionamento ma che si rifletta sui microcircuiti attivati dallo stimolo test, e questo effetto agisce esclusivamente sui meccanismi coinvolti nell'ICF. Sfortunatamente i microcircuiti coinvolti nel meccanismo di ICF non sono ancora ben compresi. Gli ultrasuoni sono serviti quindi non a bloccare totalmente l'eccitazione, bensì a ridurla, producendo uno stato di inibizione più generale che rende i circuiti responsabili dell'ICF meno recettivi.

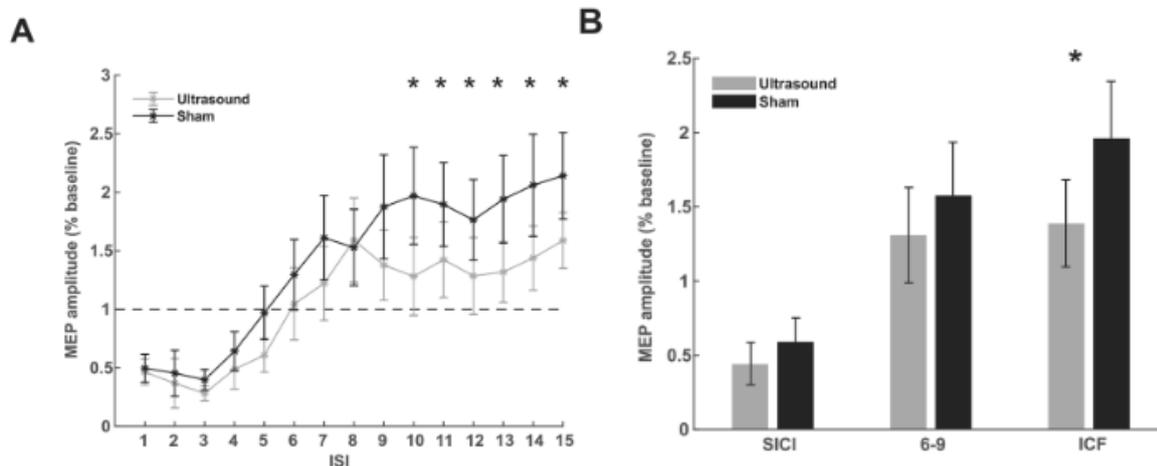


Figura 33. Effetti degli ultrasuoni sulla TMS a impulso accoppiato. A) Ampiezza media dei MEP evocata da TMS a impulso accoppiato per ISI da 1 a 15 ms, nel caso di tFUS reale/TMS (nero) e nel caso di tFUS sham/TMS (grigio). Le ampiezze sono presentate rispetto alla condizione di baseline (si veda il testo). B) ampiezze medie normalizzate dei MEP ottenute raggruppando i dati sulla base dei tre insiemi di ISI per evidenziare l'inibizione intracorticale a intervallo breve (SICI) e la facilitazione intracorticale. Il simbolo * indica $p < 0.05$ (le linee nere indicano il SEM, Standard Error of the Mean). Tratta da [19].

4.1.8 Esperimento 3: tempo di reazione

Un totale di 28 partecipanti sono stati inclusi in questo esperimento (tre di essi mancini).

In quest'ultimo esperimento è stato testato l'effetto del tFUS sul tempo di reazione usando un semplice compito di risposta allo stimolo. I partecipanti dovevano assistere allo stimolo visivo sullo schermo di un computer che consisteva in un grande blocco bianco a X o a forma di O presentato su uno sfondo nero al centro dello schermo. I partecipanti dovevano premere la barra spaziatrice sulla tastiera del computer con il pollice della mano dominante quando vedevano una X e non premere nulla quando veniva presentata una O. Un totale di 100 stimoli sono stati presentati ad intervalli di tempo casuali tra 3 s e 6 s. I partecipanti hanno risposto con il pollice durante la registrazione dell'attività EMG dall'adduttore breve del pollice (Abductor Pollicis Brevis, APB). Per questo esperimento non è stata utilizzata la bobina accoppiata al trasduttore a tFUS, ma solamente il trasduttore ad ultrasuoni con gli stessi parametri utilizzati negli esperimenti presentati sopra. Il trasduttore era posizionato sopra il target di M1 per l'APB controlaterale e tenuto in posizione con una fascia per la testa. Tre condizioni sono state testate: sono state applicate una neuromodulazione reale e una neuromodulazione sham al target di M1 per l'APB (condizioni M1 Ultrasound e M1 Sham) ed è stata anche realizzata una condizione di controllo 'attiva' (Active Sham) in cui la tFUS era applicata con gli stessi parametri e

la stessa tempistica in corrispondenza al vertice della testa (cioè in corrispondenza al sito dell'elettrodo Cz secondo lo standard internazionale 10-20).

Il tempo di reazione è stato definito come la differenza tra il tempo di inizio dello stimolo visivo e il tempo della pressione del tasto, registrato da script personalizzati scritti in Matlab. Le prove in cui non è stata registrata o premuta una pressione del tasto al di fuori di 1000 msec dall'insorgenza dello stimolo o è stato premuto un tasto sbagliato non sono state incluse nell'analisi successiva. Nell'analisi del tempo di reazione sono state incluse solo le prove in cui lo stimolo era una X. È stato calcolato il tempo di reazione (per i trial validi) in ciascuna delle tre condizioni (M1 Ultrasound, M1 Sham, Active Sham) per ciascun partecipante ed è stata applicata un'analisi statistica (ANOVA) a una via per misure ripetute, con test post-hoc. I risultati (Fig. 34) hanno mostrato che il tempo di reazione nella condizione si tFUS reale (M1 Ultrasound) era significativamente inferiore rispetto alla stimolazione M1 Sham (sham passivo) e alla stimolazione Active Sham.

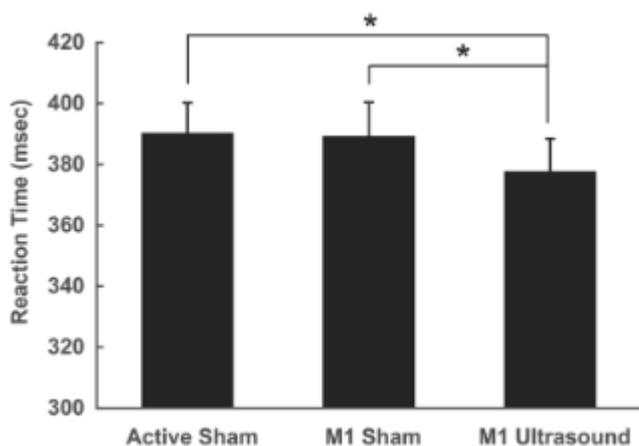


Figura 34. Effetto degli ultrasuoni sul comportamento motorio. (A) Tempo di reazione mediato sui partecipanti (in ms) al compito di risposta allo stimolo. Active sham indica la tFUS applicata al vertice della testa. M1 sham indica che il trasduttore era posizionato sopra M1 ma non venivano emessi ultrasuoni. M1 tFUS indica la stimolazione transcranica focalizzata diretta alla corteccia motoria primaria. Tratta da [19].

4.2 Effetti sui tessuti generati da tFUS e TMS

Nel presente studio è stato utilizzato quindi un nuovo modo di valutare l'effetto degli ultrasuoni sull'eccitabilità corticale motoria nell'uomo associandolo alla TMS, consentendo così la quantificazione dell'effetto degli ultrasuoni sulle misure del potenziale evocato confrontate ai MEP indotti dalla TMS. I ricercatori hanno dimostrato innanzitutto che l'applicazione concentrica e simultanea di TMS ed ultrasuoni è fattibile e sicura in quanto i campi energetici non interagiscono tra loro. In generale la tFUS diretta alla rappresentazione primaria della corteccia motoria del muscolo che esegue un semplice compito di risposta allo stimolo ha ridotto significativamente i tempi di reazione. Questo è il primo studio sull'uomo che ha valutato l'effetto degli ultrasuoni sulla corteccia motoria primaria e indica che i parametri acustici utilizzati generano ampiamente un effetto inibitorio che conferisce un vantaggio comportamentale.

Inoltre, vi è una qualche manifestazione di effetti elettrici generata dagli ultrasuoni in determinate condizioni biologiche. La potenziale vibrazione ultrasonica si manifesta con il fascio ultrasonico che attraversa una sospensione colloidale o ionica e induce una distorsione delle distribuzioni di carica a livello delle singole particelle. Questa distorsione deriva dalle particelle in sospensione aventi una densità superiore o inferiore rispetto a quella del fluido circostante, con conseguente differenza di ampiezza e fase del movimento delle particelle che differisce da quella del fluido circostante durante le fasi alternate del ciclo acustico.

Tuttavia, nel complesso gli effetti elettrici di tFUS da soli o in combinazione con TMS sono risultati trascurabili. Quindi è possibile concentrarsi sulle altre possibili interazioni tra TMS e tFUS stimando singolarmente gli effetti meccanici e termici prodotti dal loro accoppiamento e poi sommandoli.

Per quanto riguarda l'effetto termico, i rischi che provoca sono quelli a cui prestare maggiore attenzione, ma, tuttavia la causa di riscaldamento è dovuta in gran parte a tFUS e al loro dosaggio che in precedenza è stato calibrato in modo tale che il riscaldamento generato nel cervello fosse inferiore a $0.2\text{ }^{\circ}\text{C}$. D'altra parte, il riscaldamento dei tessuti cerebrali mediante TMS a singolo impulso è molto piccolo e si stima che sia inferiore a $0.1\text{ }^{\circ}\text{C}$, quindi trascurabile in entrambi i casi.

Per l'interazione meccanica tra TMS e tFUS, si può calcolare la forza meccanica di ciascuna modalità di stimolazione, supponendo che siano in fase, e successivamente sommarle per ottenere una forza massima del loro effetto combinato. A causa della differenza d'intensità tra le stime della forza della TMS e tFUS (rispettivamente $2.6 \times 10^{-10}\text{ N}$ e $1.3 \times 10^{-7}\text{ N}$) è evidente che la manifestazione di forze nel tessuto cerebrale è guidata da tFUS. Pertanto, le manifestazioni fisiche degli effetti, in particolare gli effetti termici e meccanici, sono guidate in gran parte da tFUS e non da TMS, e quindi non ci si può aspettare alcuna interazione. Di conseguenza, l'applicazione simultanea può essere effettivamente utilizzata per esaminare l'effetto degli ultrasuoni sull'eccitabilità della corteccia motoria nell'uomo senza avere alcun tipo di energia aggiuntiva indesiderata. Questa conclusione è sottolineata dal fatto che la tFUS è una forma di energia meccanica mentre la TMS una forma di energia elettrica.

4.3 Possibili meccanismi d'azione degli ultrasuoni transcranici focalizzati

È difficile valutare l'esatta popolazione neuronale che gli ultrasuoni colpiscono in modo non invasivo, ma l'uso dell'associazione ultrasuoni / TMS consente di fare alcune deduzioni circa le popolazioni neuronali colpite dagli ultrasuoni poiché è stato dimostrato tramite TMS che le modalità a singolo impulso e ad impulso accoppiato hanno attivato microcircuiti diversi nella corteccia motoria primaria. In particolare, nello studio investigato è stata utilizzato un impulso TMS che in precedenza si era

dimostrato colpire preferenzialmente le connessioni neuronali monosinaptiche più superficiali degli strati corticali che si proiettano sui neuroni corticospinali producendo le cosiddette onde I (sono il risultato dell'attivazione indiretta del tratto corticospinale, che avviene attraverso l'eccitazione di una serie di neuroni corticali; queste onde si presentano dopo l'onda D, la quale rappresenta l'attivazione diretta dei neuroni del tratto corticospinale) registrata dagli elettrodi spinali. Pertanto, gli ultrasuoni possono servire a inibire queste popolazioni con conseguente inibizione del MEP osservato.

Nonostante le ipotesi avanzate circa i meccanismi d'azione degli ultrasuoni, gli effetti meccanici probabilmente non sono così robusti come gli effetti elettrochimici diretti sulle membrane cellulari e / o sui recettori incorporati. Esistono specifici canali ionosensibili nel sistema nervoso che hanno dimostrato di essere sensibili alla perturbazione ultrasonica sebbene la loro densità nel cervello umano non sia ben nota. Un'interessante ipotesi avanzata per spiegare il meccanismo dell'inibizione ultrasonica è l'influenza del campo di pressione ultrasonica sulle cellule gliali. Gli astrociti si presentano come canali meccanosensibili e sono noti per gonfiarsi in alcuni stati patologici. Questo gonfiore induce la depolarizzazione che può essere dimostrata dall'apertura dei canali di cloro. Può essere che la pressione negativa prodotta dagli ultrasuoni induca il gonfiore degli astrociti e il rilascio di ione cloro (Cl⁻), il che può spiegare gli effetti inibitori generali simili a quelli provocati dalle cellule GABAergiche che attivano il recettore GABA (A), che a sua volta conduce selettivamente lo ione cloruro attraverso il suo poro. In effetti, un quadro teorico per la descrizione degli effetti degli ultrasuoni ipotizza che sia proprio la pressione negativa dell'onda ultrasonica a causare l'espansione della membrana lipidica, meccanismo fisico simile al gonfiore cellulare.

In precedenza (si veda il capitolo 3 e il lavoro [19]) è stata analizzata l'applicazione di ultrasuoni con parametri identici a quelli utilizzati nel presente studio per inibire l'attività della corteccia somatosensoriale primaria, la quale ha comportato anche un miglioramento della sensibilità tattile. Anche in questo caso, è stato riscontrato un vantaggio comportamentale in concomitanza con l'inibizione fisiologica. Infatti, l'aggiunta di una condizione di sham attiva e di una condizione di sham passiva, che non hanno mostrato alcun effetto nella prova sul tempo di reazione, ha permesso di dimostrare che questo effetto comportamentale non era dovuto a meccanismi attentivi o estranei alla tFUS. A prima vista potrebbe essere paradossale che l'inibizione fisiologica conferisca un vantaggio comportamentale, ma è un risultato comune per l'equilibrio tra eccitazione e inibizione (o perdita del tono inibitorio) alla base di alcuni comportamenti e condizioni neurologiche come la schizofrenia. Prove concrete dell'inibizione nella corteccia motoria umana necessaria al movimento frazionato delle dita hanno dimostrato una sua disfunzione in stati patologici come la distonia focale. Forse gli ultrasuoni forniscono un meccanismo per affinare gli input alla specifica rappresentazione

del dito che ne migliora le prestazioni. I movimenti di un solo dito non sono mai contrazioni complete e isolate di un singolo muscolo, ma richiedono il controllo simultaneo di tutta la mano e dell'avambraccio generando la contrazione di molti muscoli che agiscono sulle dita e sulle diverse articolazioni. Come tale, forse la tFUS serve a sopprimere gli input delle altre rappresentazioni muscolari sull'effettore, aumentando l'intensità del segnale di risposta a questo effettore e riducendo i tempi di trasmissione ed esecuzione. Questi meccanismi sono in gran parte mediati dalla trasmissione GABAergica, che dagli esperimenti a impulsi singoli e accoppiati sembra essere influenzata, almeno indirettamente, dalla tFUS. Inoltre, avendo il campo degli ultrasuoni un diametro di ~ 3-4 mm, simile alla dimensione delle singole rappresentazioni delle dita all'interno dell'omuncolo motorio, sarebbe quindi possibile testare l'eccitabilità delle singole rappresentazioni muscolari durante movimenti specifici per aiutare a capire meglio come gli ultrasuoni contribuiscono ai cambiamenti comportamentali motori.

CONCLUSIONI E DIREZIONI FUTURE

Il presente elaborato descrive lo stato dell'arte della stimolazione transcranica ad ultrasuoni focalizzati (transcranial Focused Ultrasound Stimulation, tFUS) concentrandosi principalmente sulla modalità a bassa intensità degli ultrasuoni focalizzati (LIFU). In particolare, sono state riportate alcune delle recenti sperimentazioni fatte sull'uomo in cui si è analizzata l'effettiva capacità della tFUS in modalità LIFU di modulare l'attività neurale, applicandola alla corteccia somatosensoriale primaria (S1), alla corteccia visiva primaria (V1) e alla corteccia motoria primaria (M1).

Complessivamente, gli esperimenti di neuromodulazione umana hanno dimostrato che la tFUS riesce ad alterare l'equilibrio tra eccitazione e inibizione nella generazione dei potenziali evocati sensoriali e motori (infatti la tFUS modifica tali potenziali evocati), a stimolare la V1 in modo simile a una stimolazione luminosa generando al percezione dei fosfeni, migliorare le prestazioni in compiti motori e di discriminazione tattile, a modulare la dinamica oscillatoria corticale (ovvero l'attività delle onde alfa, beta e gamma). Tuttavia, i meccanismi alla base degli effetti che gli ultrasuoni inducono sul comportamento (quali ad esempio il miglioramento di discriminazione tattile o minor tempo di reazione motori) sono ancora poco chiari, ma studi futuri sulla neuromodulazione a FUS con una serie più ampia di parametri e target potrebbero rivelare in modo più chiaro i meccanismi sottostanti quali l'interazione tra il talamo e S1 / S2 durante la codifica dello stimolo sensoriale, l'integrazione e il recupero delle informazioni sensoriali durante le attività di discriminazione, o l'interazione tra rappresentazioni nella corteccia motoria di muscoli individuali.

Da un punto di vista tecnico, il puntamento preciso delle strutture intracraniche rimane difficile con i trasduttori a ultrasuoni focalizzati a singolo elemento. Ad esempio, una limitazione presente nello studio di Legon et al. [19] sulla corteccia motoria umana è che il direzionamento su M1 (come anche nello studio su S1 condotto dallo stesso gruppo di ricerca) non è stato ottenuto attraverso un'immagine guida specifica per ogni paziente, ma piuttosto utilizzando lo stesso modello di cervello per tutti i partecipanti. Poiché la variabilità tra pazienti nello spessore del cranio e nella geometria corticale può essere significativa, le dimensioni e la posizione della porzione di M1 sottoposta al campo acustico non possono essere accertate con precisione.

Inoltre, la maggior parte degli esperimenti sull'uomo sono stati condotti con trasduttori focalizzati ad hoc in grado di sonicare ad una sola frequenza fondamentale. Dato che le frequenze di stimolazione ottimali sono ancora in fase di studio e possono variare notevolmente tra i vari studi, larghezze di banda delle membrane piezoelettriche maggiori possono essere vantaggiose poiché consentirebbero

una maggiore flessibilità durante la regolazione delle impostazioni di stimolazione. Lo sviluppo di trasduttori a quadri-frequenza e di sistemi phased array a multi elemento costituisce un promettente progresso tecnologico per poter superare i precedenti limiti. Le recenti innovazioni nella progettazione di trasduttori phased array di grandi dimensioni consentono già da adesso un direzionamento più preciso del fascio ultrasonico alle strutture intracraniche rispetto ai trasduttori a singolo elemento.

Poiché la misurazione diretta dell'intensità acustica nelle regioni cerebrali target non è attualmente possibile, la maggior parte degli studi sull'uomo ha utilizzato test ex vivo, modelli computazionali di cranio umano o l'uso di un idrofono per determinare le impostazioni di intensità ottimali sulla faccia attiva del trasduttore e per prevedere la forma e l'intensità del fuoco acustico durante la sonicazione. Anche in questo caso gli studi hanno evidenziato la necessità di ulteriori indagini che quantifichino la relazione tra la geometria cranica (molto variabile tra i soggetti) e l'intensità acustica applicata al target cerebrale.

Nonostante la sicurezza dimostrata e l'efficacia della stimolazione LIFU, dovranno essere affrontati diversi problemi al fine di consentire l'applicazione della tFUS come potenziale modalità terapeutica futura.

Come per la stimolazione cerebrale profonda (DBS), la tFUS in modalità LIFU dovrà probabilmente essere applicata in forma permanente per ottenere un effetto continuo sui sintomi. Pertanto, sarà necessario un design compatto e portatile sia del trasduttore a FUS che dell'amplificatore che alimenta il trasduttore. L'attuale ricerca è già focalizzata su prototipi di trasduttori più piccoli con l'obiettivo principale di migliorare i progetti di studio dei LIFU applicati sugli animali. Infatti, a causa degli attuali trasduttori a FUS, questi studi sono limitati alla stimolazione durante anestesia, limitando significativamente l'esplorazione della tecnologia nella terapia dei disturbi neurologici che richiedono una valutazione comportamentale.

In generale, la tFUS è interessante per la sua combinazione unica di non invasività, sicurezza, alta precisione e la vasta gamma di effetti neuromodulatori. Grazie all'enorme varietà di parametri utilizzabili e le regioni cerebrali corticali e sub-corticali ancora da esplorare saranno necessari ulteriori numerosi studi per poter definire con chiarezza gli effetti dose-risposta sull'attività neuronale specifica della regione target. Sebbene la comprensione meccanicistica degli effetti sia agli inizi, le applicazioni cliniche sembrano essere sempre più evidenti. Infatti, sono già in corso studi sull'uomo per il trattamento dell'epilessia, del morbo di Alzheimer, del morbo di Parkinson e dell'ictus. L'attuale panoramica della neuromodulazione a ultrasuoni focalizzati è molto promettente come

strumento per la mappatura funzionale del cervello e come nuovo metodo per il trattamento di disabilità conseguenti a patologie o disturbi neurologici.

BIBLIOGRAFIA

- [1] O'Brien Jr, W. D. (2007). Ultrasound–biophysics mechanisms. *Progress in biophysics and molecular biology*, 93(1-3), 212-255.
- [2] Naor, O., Krupa, S., & Shoham, S. (2016). Ultrasonic neuromodulation. *Journal of neural engineering*, 13(3), 031003.
- [3] ter Haar, G., & Coussios, C. (2007). High intensity focused ultrasound: physical principles and devices. *International journal of hyperthermia*, 23(2), 89-104.
- [4] Phenix, C. P., Togtema, M., Pichardo, S., Zehbe, I., & Curiel, L. (2014). High intensity focused ultrasound technology, its scope and applications in therapy and drug delivery. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 17(1), 136-153.
- [5] Meng, Y., Pople, C. B., Lea-Banks, H., Abrahao, A., Davidson, B., Suppiah, S., ... & Hamani, C. (2019). Safety and efficacy of focused ultrasound induced blood-brain barrier opening, an integrative review of animal and human studies. *Journal of Controlled Release*.
- [6] Darrow, D. P. (2019). Focused ultrasound for neuromodulation. *Neurotherapeutics*, 16(1), 88-99.
- [7] Hynynen, K., & Jones, R. M. (2018). Corrigendum: Image-guided ultrasound phased arrays are a disruptive technology for non-invasive therapy (2016 Phys. Med. Biol. 61 R206). *Physics in Medicine and Biology*, 63(1), 019501.
- [8] Khanna, N., Gandhi, D., Steven, A., Frenkel, V., & Melhem, E. R. (2017). Intracranial applications of MR imaging–guided focused ultrasound. *American Journal of Neuroradiology*, 38(3), 426-431.
- [9] di Biase, L., Falato, E., & Di Lazzaro, V. (2019). Transcranial Focused Ultrasound (tFUS) and Transcranial Unfocused Ultrasound (tUS) Neuromodulation: From Theoretical Principles to Stimulation Practices. *Frontiers in Neurology*, 10.
- [10] Pasquinelli, C., Hanson, L. G., Siebner, H. R., Lee, H. J., & Thielscher, A. (2019). Safety of transcranial focused ultrasound stimulation: A systematic review of the state of knowledge from both human and animal studies. *Brain stimulation*.
- [11] Rezayat, E., & Toostani, I. G. (2016). A review on brain stimulation using low intensity focused ultrasound. *Basic and clinical neuroscience*, 7(3), 187.
- [12] Tufail, Y., Yoshihiro, A., Pati, S., Li, M. M., & Tyler, W. J. (2011). Ultrasonic neuromodulation by brain stimulation with transcranial ultrasound. *nature protocols*, 6(9), 1453.
- [13] Blackmore, J., Shrivastava, S., Sallet, J., Butler, C. R., & Cleveland, R. O. (2019). Ultrasound neuromodulation: A review of results, mechanisms and safety. *Ultrasound in medicine & biology*.
- [14] Yoo, S. S. (2018). Technical Review and Perspectives of Transcranial Focused Ultrasound Brain Stimulation for Neurorehabilitation. *Brain & Neurorehabilitation*, 11(2).
- [15] Fomenko, A., Neudorfer, C., Dallapiazza, R. F., Kalia, S. K., & Lozano, A. M. (2018). Low-intensity ultrasound neuromodulation: an overview of mechanisms and emerging human applications. *Brain stimulation*, 11(6), 1209-1217.
- [16] Bowary, P., & Greenberg, B. D. (2018). Noninvasive focused ultrasound for neuromodulation: A review. *Psychiatric Clinics*, 41(3), 505-514.
- [17] Legon, W., Sato, T. F., Opitz, A., Mueller, J., Barbour, A., Williams, A., & Tyler, W. J. (2014). Transcranial focused ultrasound modulates the activity of primary somatosensory cortex in humans. *Nature neuroscience*, 17(2), 322.
- [18] Lee, W., Kim, H. C., Jung, Y., Chung, Y. A., Song, I. U., Lee, J. H., & Yoo, S. S. (2016). Transcranial focused ultrasound stimulation of human primary visual cortex. *Scientific reports*, 6, 34026.

[19] Legon, W., Bansal, P., Tyshynsky, R., Ai, L., & Mueller, J. K. (2018). Transcranial focused ultrasound neuromodulation of the human primary motor cortex. *Scientific reports*, 8.