

Facoltà di Ingegneria



Anno Accademico 2005/2006

Laurea Specialistica in Ingegneria Biomedica

**STUDIO NON INFERENZIALE DELLA CONNETTIVITÀ
CEREBRALE SPONTANEA**

Applicazioni alla sindrome di Alzheimer

Lucia Bargellini

RELATORI

Prof. Francesco Di Salle
Ing. Vincenzo Positano

INDICE

Introduzione	7
Capitolo 1	12
1.1 Storia della Risonanza Magnetica per Immagini	12
1.2 Momento di spin e momento magnetico	14
1.3 MRI dell'atomo di idrogeno	16
1.4 Interazione con un campo magnetico statico	18
1.5 Eccitazione a radiofrequenza	20
1.6 Rilassamento degli spin	22
1.7 Meccanismi di contrasto	25
1.8 Codifica spaziale	27
1.9 Il K-spazio	29
1.10 Risoluzione MRI	31
Bibliografia	32
Capitolo 2	34
2.1 Iperemia funzionale	35
2.2 Accoppiamento tra attività nervosa ed iperemia funzionale	36
2.3 Ruolo astrocitario nell'iperemia funzionale	38
2.4 Risposta emodinamica	41

2.5	Proprietà magnetiche dell'emoglobina	42
2.6	Contrasto BOLD	43
	Bibliografia	44

Capitolo 3 **49**

3.1	Default mode network	49
3.2	Esistenza della default mode network	50
3.3	Origine neuronale della default mode network	52
3.4	Studio della default mode network	54
3.5	Low frequency fluctuations	60
3.6	Aree appartenenti alla default mode network	62
3.7	Modulazione della default mode network	63
3.8	Funzione della default mode network	64
3.9	Resting state networks	65
3.10	Prospettive nell'analisi dello stato di riposo	69
	Bibliografia	70

Capitolo 4 **78**

4.1	Acquisizione dei dati	78
4.2	Preprocessing dei dati MRI	80
4.3	Analisi delle componenti indipendenti	84
4.4	ICA-fMRI	86
4.5	ICA dello stato di riposo	88
4.6	Mappe di attivazione	89

4.7	Significato delle componenti indipendenti	91
4.8	Self organizing group ICA	92
4.9	Template della default mode network	93
	Bibliografia	94
Capitolo 5		96
5.1	Marker preclinici della sindrome di Alzheimer	96
5.2	Legame tra sindrome di Alzheimer e default mode network	99
5.3	Ricerca di un nuovo test diagnostico	101
5.4	Stabilità del coefficiente di correlazione	102
5.5	Potere discriminativo del test diagnostico	107
	Bibliografia	110
Appendice		112
A	Componenti indipendenti associate alla default mode network	112
B	Mappa di Brodmann delle aree corticali	122
C	Classificazione dei tipi di memoria	123
D	Two-streams hypothesis	124
E	Elenco delle abbreviazioni	125
Conclusioni		128

*A Letterio,
l'altra metà del mio cuore*

RINGRAZIAMENTI

Vorrei ringraziare innanzi tutto il Prof. Francesco Di Salle per la sua generosità e gentilezza, e per avermi permesso di fare la tesi più bella che avrei potuto immaginare.

Un ringraziamento speciale all'Ing. Adriana Aragri, che mi ha insegnato tutto quello che so su Brain Voyager (grazie Adriana!) e all'Ing. Fabrizio Esposito, che ha seguito da Napoli la tesi: non so come avrei potuto fare senza di voi.

Ringrazio l'Ing. Vincenzo Positano, che è sempre stato disponibile e mi ha aiutato ogni volta che ne ho avuto bisogno.

Grazie ai miei genitori, che hanno avuto fiducia in me e mi hanno permesso di fare quella che sembrava una pazzia. Grazie ai miei nonni, che mi hanno tenuto al centro dei loro pensieri e non mi hanno mai fatto sentire sola.

Grazie alla famiglia Pania, la mia seconda famiglia: mi avete sempre trattato come una figlia e io ne sono onorata e felice. E grazie a Roberta, Simona, Stefania e Daniela per avermi fatto sentire una vera cugina!

Grazie a Letterio, che mi è stato accanto e ha condiviso con me questi sette anni di università.

Grazie alla mia migliore amica Arianna e al mio migliore amico Federico: vi voglio tanto tanto bene.

Grazie a Marco, per essere come è. Grazie a Fabio e Cristina, che mi hanno sopportato! Grazie a Lisa, Ilaria, Chiara A, MariaElena, Manuele, Benedetta, Antonella, compagni di avventura a medicina e ingegneria, e alla mia amica atletica Chiara M.

Grazie a tutti voi

INTRODUZIONE

La sindrome di Alzheimer (*Alzheimer's disease*, AD) è una patologia neurodegenerativa caratterizzata da deterioramento cognitivo e rappresenta la prima causa di demenza. I recenti progressi nel trattamento della malattia hanno determinato crescente interesse nei confronti di possibili marker preclinici, che permetterebbero di anticiparne e monitorarne la terapia. Una nuova frontiera nella ricerca di un marker preclinico della sindrome di Alzheimer è rappresentata dallo studio fMRI dello stato di riposo.

Infatti è stata recentemente ipotizzata l'esistenza di una rete funzionale di riposo (*default mode network*, DMN) impegnata nell'elaborazione dei ricordi autobiografici e nella pianificazione di eventi futuri, in equilibrio dinamico con le attività cognitive legate a necessità contingenti nella riallocazione delle risorse mentali. La *default mode network* è stata proposta come base neurale del flusso di coscienza e risulta alterata in patologie neurologiche e psichiatriche.

Nel presente lavoro di tesi è stata quindi indagata la possibilità di realizzare un test diagnostico basato sulla correlazione spaziale della rete di riposo con il *template* della *default mode network* ottenuto da un campione di soggetti sani.

Hanno partecipato allo studio 38 soggetti, suddivisi in quattro categorie: controlli giovani (età inferiore a 50 anni al momento dell'esame), controlli anziani, soggetti con lieve deficit cognitivo (Mild Cognitive Impairment, MCI) e pazienti con diagnosi di Alzheimer. I soggetti MCI sono stati inseriti nello studio perchè il deficit cognitivo lieve è considerato uno stadio intermedio nell'insorgere della sindrome di Alzheimer:

circa la metà dei soggetti MCI evolvono in AD nell'arco di cinque anni. Le acquisizioni MRI sono state svolte presso il reparto di Neuroradiologia dell'ospedale Santa Chiara di Pisa con uno scanner Siemens Symphony con campo magnetico statico di 1,5 T.

Attraverso l'utilizzo del software BrainVoyager QX, le immagini anatomiche e funzionali acquisite sono state elaborate in modo da estrarre un indice diagnostico utile nella diagnosi precoce dell'AD. In particolare, il preprocessing dei dati funzionali ha previsto le seguenti fasi:

- *Slice scan time correction.* Correzione del ritardo temporale tra una sezione e la successiva nell'acquisizione di ogni volume.
- *3D motion correction.* Correzione dei movimenti del paziente: sono stati stimati i parametri di traslazione e rotazione tra volumi successivi della serie funzionale; l'efficacia della correzione si riduce con l'entità e la rapidità del movimento. In base all'evoluzione dei parametri di roto-traslazione nel corso dell'esame lo sperimentatore può decidere l'esclusione del soggetto dallo studio.
- *Spatial smoothing.* Filtraggio spaziale passa basso, diretto ad aumentare il rapporto segnale-rumore (SNR, Signal-to-Noise Ratio). E' stato realizzato mediante convoluzione delle immagini con un filtro gaussiano tridimensionale caratterizzato da FWHM (Full Width at Half Maximum) pari a 4 mm.
- *Linear trend removal.* Filtraggio temporale: rimozione dai dati di trend lineari, presumibilmente attribuibili a derive del segnale non legate all'attivazione neuronale.

Le serie funzionale ed anatomica sono poi coregistrate, in modo da mappare le attivazioni fMRI su una immagine ad elevata risoluzione.

Per l'elaborazione delle serie funzionali dopo l'operazione di pre-processing, è stata utilizzata l'analisi delle componenti indipendenti (ICA). L'ICA è una tecnica di analisi statistica multivariata; appartiene alle metodiche di tipo esplorativo (*data driven*), basate su assunzioni generali riguardo alla formazione dei segnali, in contrapposizione alle analisi inferenziali (*hypothesis driven*), che rivelano soltanto i fenomeni precedentemente modellati. Nell'approccio utilizzato, ogni componente indipendente prodotta dalla ICA è una nuova immagine che descrive un particolare fenomeno alla base del segnale fMRI. Alle IC sono associati i relativi *time course* (TC), che definiscono la modulazione della componente nella generazione dei dati funzionali.

I due problemi fondamentali nell'utilizzo della tecnica ICA sono la ricerca del numero ottimo di componenti da utilizzare e la classificazione delle componenti ottenute. Il presente studio dello stato di riposo ha quindi compreso una fase preliminare di ricerca del numero ottimo di componenti indipendenti per l'individuazione della *default mode network*. La conoscenza a priori delle regioni appartenenti alla rete di riposo ha guidato la valutazione delle decomposizioni al variare del numero di IC: per acquisizioni funzionali di 60 volumi la migliore corrispondenza con la DMN è stata osservata per un numero di componenti indipendenti pari a 30.

Le componenti indipendenti sono state convertite in mappe di attivazione mediante sostituzione del valore di intensità con il relativo *z*-score. Per la visualizzazione della mappa di attivazione è stata scelta una soglia z_{th} ; due scale di colore rappresentano i valori positivi e negativi di *z* tali che $|z| \geq z_{th}$.

La presenza nel singolo soggetto di una particolare attivazione non è significativa dal punto di vista statistico: occorre pertanto verificare la consistenza delle componenti trovate. Lo studio di gruppo è stato realizzato mediante *self organizing group ICA* (sogICA), una metodica di clustering gerarchico che confronta le componenti indipendenti dei singoli soggetti e le raccoglie in base ad un criterio di similarità spaziale; ciascun cluster è composto da una componente indipendente di ogni soggetto.

Dalla sogICA delle serie funzionali di 7 controlli giovani è stato ottenuto il *template* spaziale della *default mode network*, individuando il cluster morfologicamente più simile alla rete di riposo e calcolandone la mappa media.

Per ogni componente della decomposizione ICA-fMRI è stato calcolato il coefficiente di correlazione spaziale con il *template* della *default mode network*. Come IC associata alla rete di riposo viene scelta la componente caratterizzata dalla massima correlazione; tale valore rappresenta anche il parametro discriminativo del test diagnostico.

Per impiegare il coefficiente di correlazione come marker AD è necessario dimostrarne la stabilità su più serie funzionali del singolo paziente, che nello studio in oggetto sono state acquisite in una medesima sessione MRI: tale valore deve infatti essere rappresentativo della condizione patologica del soggetto.

Per ogni serie funzionale sono state eseguite tre decomposizioni ICA. L'algoritmo ICA, infatti, non è deterministico e ripetuto sugli stessi dati trova componenti indipendenti leggermente diverse; occorre pertanto valutare se e in che misura tale variabilità aggiuntiva possa influenzare l'efficacia diagnostica del test.

Una volta verificata la stabilità del coefficiente di correlazione e la ridotta variabilità introdotta dall'algoritmo ICA è possibile procedere alla scelta di una soglia

discriminativa per il parametro diagnostico. Fissando tale soglia a 0.1, i controlli anziani sono distinti dai soggetti AD con una sensibilità del 77% e una specificità del 90%.

Nel Capitolo 1 sono esposti i meccanismi fisici alla base della metodica MRI.

Il Capitolo 2 descrive la risonanza magnetica funzionale: sono commentate le principali ipotesi riguardanti l'accoppiamento tra attività nervosa ed iperemia funzionale, ed è illustrato il meccanismo di contrasto BOLD.

Il Capitolo 3 introduce la *default mode network*: sono riferite le prove a favore dell'esistenza e dell'origine neurale della rete e ne è descritta la modulazione durante lo svolgimento di compiti cognitivi complessi; sulla base delle aree cerebrali coinvolte ne sono quindi indicate le funzioni putative.

Il Capitolo 4 tratta l'acquisizione e l'elaborazione dei dati. Viene descritto l'algoritmo ICA e la sua applicazione all'analisi di immagini fMRI.

Il Capitolo 5 descrive lo studio del nuovo marker AD. Sono riportati i risultati sulla popolazione di soggetti coinvolti nello studio sia per quanto riguarda la robustezza del marker proposto, sia per quanto riguarda i parametri di specificità e sensibilità.

Capitolo 1

MAGNETIC RESONANCE IMAGING

Le immagini di risonanza magnetica stanno assumendo crescente importanza tra le metodiche di imaging clinico. Offrono infatti una notevole risoluzione dei tessuti molli senza l'impiego di radiazioni ionizzanti e permettono l'acquisizione di sezioni e volumi con orientamento arbitrario.

In aggiunta alle immagini anatomiche, a partire dagli anni '90 l'impiego dell'effetto BOLD (Blood Oxygen Level Dependent) ha reso possibile l'acquisizione di immagini di natura funzionale.

1.1 Storia della Risonanza Magnetica per Immagini

La storia della Risonanza Magnetica per Immagini (MRI) inizia nel 1946 con la scoperta del principio di Risonanza Magnetica Nucleare (NMR) da parte di Felix Bloch [3] e Eduard Purcell [15].

La Risonanza Magnetica Nucleare fu impiegata per più di venti anni nel campo delle analisi molecolari chimiche e fisiche, finchè nel 1971 Raymond Damadian dimostrò che tessuti sani e tumorali possiedono tempi di rilassamento diversi [7], attirando

l'attenzione dei ricercatori sulle prospettive di utilizzo della NMR nell'ambito della diagnostica.

Negli stessi anni la radiografia tradizionale stava evolvendo in metodica tomografica: nel 1973 Hounsfield introdusse la Tomografia Assiale Computerizzata mediante raggi X (TAC) [1], provando la disponibilità delle strutture sanitarie a spendere cifre considerevoli per strumenti di imaging clinico.

Sempre nel 1973, a soli due anni dalla scoperta di Damadian, Paul Lauterbur produsse immagini MR di piccoli campioni in provetta [11], utilizzando per la ricostruzione dell'immagine una tecnica di retroproiezione simile a quella impiegata in TAC.

Nel 1975 Richard Ernst introdusse la codifica in fase e frequenza dei dati MRI, con ricostruzione delle immagini mediante trasformata di Fourier [10,13], completando così i presupposti teorici delle attuali tecniche di imaging in risonanza magnetica.

Innovazioni tecnologiche e nuove metodiche di acquisizione hanno consentito la produzione di immagini a risoluzione e velocità sempre maggiori.

Già nel 1977 fu sviluppata da Peter Mansfield la metodica di Echo Planar Imaging (EPI), che permette l'acquisizione di una sezione in un solo tempo di ripetizione (TR) [12]. La tecnica EPI rese possibile nel 1987 l'imaging in tempo reale del ciclo cardiaco [6].

L'ultima vera rivoluzione in ambito MRI risale al 1993, anno di nascita della risonanza magnetica funzionale (fMRI) [2,14]. La metodica fMRI permette di indagare l'attività di un organo senza l'impiego di traccianti radioattivi e rappresenta ad oggi la principale tecnica di imaging della funzione cerebrale.

1.2 Momento di spin e momento magnetico

Una trattazione esaustiva della Risonanza Magnetica Nucleare (NMR) implica la formalizzazione in termini di fisica quantistica. Una descrizione della NMR in termini classici è comunque possibile seguendo l'approccio di Bloch.

Lo spin è una proprietà fondamentale delle particelle subatomiche. Assume valori multipli di $\frac{1}{2}$ e può avere segno positivo o negativo. Elettroni, protoni e neutroni posseggono singolarmente uno spin $\pm \frac{1}{2}$.

Nell'ambito del modello a shell della struttura nucleare, i nucleoni riempiono gli orbitali nucleari secondo il principio di Pauli. L'accoppiamento spin up-spin down dà luogo ad una risultante nulla.

Dalla composizione degli spin dei singoli nucleoni risulta il momento angolare totale del nucleo, detto *momento di spin I*.

Il *numero di spin I* determina il numero di livelli energetici in cui può trovarsi il nucleo [8]:

$$2I + 1$$

Equazione 1.1

Nuclei con un numero pari di neutroni e di protoni hanno numero di spin I pari a 0.

Viceversa, nuclei con spin spaiati possiedono un momento di spin non nullo e sono interessati dal fenomeno della NMR.

Nuclei	Protoni Spaiati	Neutroni Spaiati	Spin Risultante	$\gamma/2\pi(\text{MHz/T})$
^1H	1	0	1/2	42.58
^2H	1	1	1	6.54
^{31}P	1	0	1/2	17.25
^{23}Na	1	2	3/2	11.27
^{14}N	1	1	1	3.08
^{13}C	0	1	1/2	10.71
^{19}F	1	0	1/2	40.08

Tabella 1.1 Nuclei di interesse in MRI.

In accordo con le equazioni di Maxwell, cariche elettriche in movimento generano un campo magnetico. Così il moto rotatorio dei protoni si traduce in un *momento magnetico* μ :

$$\underline{\mu} = \gamma \underline{P} \quad \text{Equazione 1.2}$$

dove \mathbf{P} è il vettore momento angolare associato allo spin di un nucleo e può avere solo valori quantizzati, multipli di $h/2\pi$ (con h costante di Planck che vale 6.626×10^{-34} J s) e funziona del numero quantico di spin; γ è il cosiddetto *rapporto giromagnetico*, il quale assume un valore caratteristico del tipo di nucleo ed indica la frequenza con cui il nucleo precede attorno ad un campo magnetico esterno.

In ambito MRI non interessa tanto il momento magnetico dei singoli nuclei, quanto invece la *magnetizzazione* risultante di un elemento di volume:

$$\underline{M} = \sum_i \underline{\mu}_i \quad \text{Equazione 1.3}$$

1.3 MRI dell'atomo di idrogeno

Quasi ogni elemento della tavola periodica possiede almeno un isotopo con momento di spin **I** diverso da zero, ma solo gli isotopi relativamente abbondanti nel corpo umano possono essere impiegati con successo in MRI.

E' definita abbondanza naturale di un isotopo la frazione di nuclei di un elemento aventi un determinato peso atomico (somma del numero di neutroni e di protoni) [17] .

Elemento	Simbolo	Abbondanza Naturale
Idrogeno	¹ H	99.985
	² H	0.015
Carbonio	¹³ C	1.11
	¹⁴ C	98.89
Azoto	¹⁴ N	99.63
	¹⁵ N	0.37
Sodio	²³ Na	100
Fosforo	³¹ P	100
Potassio	³⁹ K	93.1
Calcio	⁴³ Ca	0,145

Tabella 1.2 Abbondanza naturale degli isotopi di interesse MRI.

Per abbondanza biologica di una specie atomica si intende invece la frazione di un dato elemento nel corpo umano [9].

Elemento	Abbondanza Biologica
Idrogeno (H)	0.63
Sodio (Na)	0.00041
Fosforo (P)	0.0024
Carbonio (C)	0.094
Ossigeno (O)	0.26
Calcio (Ca)	0.0022
Azoto (N)	0.015

Tabella 1.3 Abbondanza biologica delle specie atomiche di interesse MRI.

E' evidente come l'idrogeno (H), essenzialmente sotto forma di ^1H , sia in assoluto l'elemento più rappresentato nel corpo umano. Per questa ragione l'imaging MR è basato sul segnale di NMR generato dai protoni di ^1H .

Il 63% degli atomi di idrogeno presenti nel corpo umano appartengono a molecole di acqua o lipidi [8]. In particolare, il segnale NMR è prodotto prevalentemente dai protoni dell'acqua [4].

1.4 Interazione con un campo magnetico statico

Il nucleo di ^1H ha numero di spin I pari a $\frac{1}{2}$, quindi secondo l'Equazione 1.1 può trovarsi in due possibili livelli energetici [8].

In assenza di campo magnetico esterno i momenti magnetici dei singoli nuclei sono distribuiti in modo casuale tra i due possibili livelli energetici, per cui la magnetizzazione netta dell'elemento di volume è nulla ($\mathbf{M} = 0$).

Il campo magnetico terrestre, di intensità pari a 0.25-0.35 gauss ($1\text{T} = 10^4$ gauss), è troppo debole per perturbare significativamente questo equilibrio.

In presenza di un forte *campo magnetico statico* \mathbf{B}_0 i singoli dipoli magnetici si allineano nella direzione di \mathbf{B}_0 con verso parallelo o antiparallelo. L'allineamento parallelo risulta favorito perchè è associato ad un'energia inferiore ($E^- > E^+$).

Il rapporto tra il numero N^- di atomi nel verso antiparallelo e il numero N^+ di atomi nel verso parallelo segue la statistica di Boltzmann [16]:

$$\frac{N^-}{N^+} = e^{-\frac{E}{kT}} \quad \text{Equazione 1.4}$$

dove T è la temperatura assoluta e k la costante di Boltzmann ($k = 0.3805 \times 10^{-23}$ J/°K).

Il dislivello energetico E tra gli stati antiparallelo e parallelo è definito dalla seguente relazione [5]:

$$E = \hbar\gamma B_0 \quad \text{Equazione 1.5}$$

dove \hbar è la costante di Plank h divisa per 2π .

Dall'Equazione 1.5 è evidente la necessità di disporre di un campo magnetico statico molto elevato (tipicamente 1.5 T nelle applicazioni cliniche) per sbilanciare in modo misurabile il rapporto N^-/N^+ . Il segnale utile proviene infatti dal piccolo numero di protoni in verso parallelo che non posseggono una controparte in verso antiparallelo: se le due popolazioni fossero costituite dallo stesso numero di nuclei, i relativi segnali si compenserebbero generando così un segnale risultante nullo.

L'allineamento preferenziale dei protoni nel verso parallelo determina nell'elemento di volume una magnetizzazione netta \mathbf{M}_0 , detta *magnetizzazione longitudinale all'equilibrio*. \mathbf{M}_0 ha stessa direzione e verso di \mathbf{B}_0 e modulo proporzionale a B_0 (intensità del campo magnetico statico) ed alla *densità protonica* ρ , cioè al numero di nuclei eccitati nel volume in esame [8].

A livello del singolo momento magnetico $\boldsymbol{\mu}$ il campo magnetico statico genera un momento meccanico $\boldsymbol{\mu} \times \mathbf{B}_0$, che fa precedere $\boldsymbol{\mu}$ attorno a \mathbf{B}_0 con velocità angolare $\boldsymbol{\omega}_0$ definita dalla legge di Larmor [4]:

$$\underline{\omega}_0 = -\gamma \underline{B}_0 \quad \text{Equazione 1.6}$$

dove il segno meno indica il verso di precessione.

1.5 Eccitazione a radiofrequenza

La magnetizzazione \mathbf{M}_0 indotta da \mathbf{B}_0 è troppo piccola per essere misurata quando è allineata al campo magnetico statico (il rapporto tra \mathbf{M}_0 e \mathbf{B}_0 vale circa 4×10^{-9}) [4]. Per la rivelazione è quindi necessario ruotare il vettore \mathbf{M}_0 rispetto alla direzione di \mathbf{B}_0 .

Definiamo un riferimento fisso (quello del laboratorio), con \mathbf{B}_0 parallelo alla direzione z , e un riferimento mobile, con il piano $x'y'$ ruotante attorno alla direzione z con velocità angolare ω_0 .

Un vettore ruotante attorno a z con pulsazione ω_0 nel sistema fisso apparirà fermo nel sistema di riferimento mobile.

Una bobina con asse parallelo alla direzione x e percorsa da una corrente costante produce un campo magnetico diretto lungo x .

La stessa bobina, percorsa da una corrente alternata di frequenza ν_0 , genera invece un campo magnetico \mathbf{B}_1 oscillante lungo x . Un campo magnetico analogo potrebbe essere prodotto da una bobina percorsa da corrente continua e ruotante attorno a z con velocità angolare $\omega_0 = 2\pi\nu_0$.

Il campo magnetico oscillante \mathbf{B}_1 ruota attorno a z nel sistema di riferimento fisso, mentre nel sistema di riferimento mobile rimane nella direzione x' .

L'energia di una radiazione elettromagnetica è definita dall'equazione di Planck:

$$E = h\nu_0$$

Equazione 1.7

In base alle Equazioni 1.5 e 1.6 questa energia corrisponde esattamente al gap energetico tra i livelli energetici relativi ad allineamento parallelo e antiparallelo dei momenti magnetici dei singoli nuclei.

Il campo magnetico \mathbf{B}_1 può pertanto scambiare energia con i protoni di ^1H , promuovendone il passaggio dal livello ad energia inferiore verso quello ad energia superiore. La condizione di scambio energetico tra i nuclei atomici e la radiazione incidente è detta *risonanza magnetica nucleare*.

Nel sistema di riferimento fisso la risonanza magnetica nucleare si traduce in un moto a spirale di \mathbf{M} su una superficie sferica.

Nel sistema di riferimento mobile il vettore \mathbf{M} ruota invece attorno a \mathbf{B}_1 con velocità angolare Ω , descrivendo un angolo α (*flip angle*) pari a [8]:

$$\alpha = \Omega \Delta t = \gamma B_1 \Delta t$$

Equazione

1.8

dove B_1 è l'intensità del campo magnetico ruotante e Δt è il tempo di applicazione di \mathbf{B}_1 .

La magnetizzazione \mathbf{M} acquista per effetto di \mathbf{B}_1 una componente trasversale, che può essere misurata come tensione alternata di frequenza ν_0 ai capi della bobina ricevente.

Poichè $\gamma/2\pi$ per l'atomo ^1H vale 42.58 Mhz/T, la frequenza di eccitazione ν_0 cade nell'ambito delle radiofrequenze (RF).

Questo rappresenta un ulteriore vantaggio per l'imaging MR dell'atomo di idrogeno, poichè tali frequenze non sono ionizzanti e incontrano attenuazione trascurabile nei tessuti [8].

1.6 Rilassamento degli spin

Al termine dell'eccitazione a radiofrequenza si assiste al rilassamento dei momenti magnetici dei singoli atomi, cioè al ripristino della condizione di equilibrio.

A livello macroscopico la magnetizzazione \mathbf{M} perde la componente trasversale e torna ad orientarsi lungo z.

Il rilassamento è causato dalla progressiva perdita di energia da parte degli spin dovuto alle interazioni con il mezzo circostante (*rilassamento spin-reticolo*) e con gli altri spin (*rilassamento spin-spin*).

Al rilassamento spin-reticolo è associato il recupero della componente longitudinale della magnetizzazione, come descritto dall'Equazione 1.9 [4]:

$$M_z(t) = M_0(1 - e^{-\frac{t}{T_1}}) + M_z(0)e^{-\frac{t}{T_1}} \quad \text{Equazione 1.9}$$

dove M_z è la componente longitudinale della magnetizzazione, M_0 è la magnetizzazione longitudinale all'equilibrio e T_1 è la costante temporale associata al rilassamento spin-reticolo.

Il rilassamento spin-spin descrive invece la perdita di coerenza di fase degli spin giacenti sul piano ortogonale a \mathbf{B}_0 , descritta dall'Equazione 1.10 :

$$M_{xy}(t) = M_{xy}(0)e^{-\frac{t}{T_2}} \quad \text{Equazione 1.10}$$

dove M_{xy} è la magnetizzazione trasversale e T_2 la costante di tempo associata al rilassamento spin-spin. Le difficoltà tecnologiche nel garantire un campo magnetico statico omogeneo sia nello spazio che nel tempo risultano insormontabili e per questo si assiste ad un defasamento più veloce del previsto. Si introduce così la costante di

tempo T_2^* detta tempo di rilassamento spin-spin efficace: $\frac{1}{T_2^*} = \frac{1}{T_2} + \gamma \frac{\Delta B_0}{2}$, dove

$$T_2^* < T_2.$$

I due fenomeni di rilassamento avvengono contemporaneamente, come espresso dalle equazioni di Bloch [8]:

$$\frac{\partial M_{x,y}}{\partial t} = \gamma \cdot (M \times B)_{x,y} - \frac{M_{x,y}}{T_2^*} \quad \text{Equazione 1.11}$$

$$\frac{\partial M_z}{\partial t} = \gamma \cdot (M \times B)_z + \frac{M_0 - M_z}{T_1} \quad \text{Equazione 1.12}$$

dove $\mathbf{B} = \mathbf{B}_0 + \mathbf{B}_1$ è il campo magnetico totale e \mathbf{M}_0 è la magnetizzazione longitudinale all'equilibrio.

La costante temporale T_2 è sempre strettamente minore di T_1 , perchè l'allineamento di \mathbf{M} con la direzione z implica necessariamente la perdita della magnetizzazione

trasversale. *In vivo* il decadimento della magnetizzazione trasversale è reso più veloce dalla disomogeneità locale del campo magnetico \mathbf{B}_0 , la quale determina lo sfasamento dei protoni che precedono a frequenze diverse [16]. La costante temporale del rilassamento in campo magnetico non omogeneo T_2^* , è quindi minore del rispettivo T_2 .

Tessuto	T_1 (s)	T_2 (ms)	ρ (mM)
CSF	0.8 - 20	110 - 2000	70-230
Bianca	0.76 - 1.08	61-100	70-90
Grigia	1.09 - 2.15	61 - 109	85 - 125
Meningi	0.5 - 2.2	50 - 165	5 - 44
Muscolo	0.95 - 1.82	20 - 67	45 - 90
Grasso	0.2 - 0.75	53 - 94	50 - 100

Tabella 1.4 T_1 , T_2 e densità protonica dei tessuti visibili in un esame MR della testa.

Le costanti T_1 e T_2 dipendono dalla mobilità delle molecole, dal peso molecolare e dalla temperatura; in genere T_1 varia molto più di T_2 [8].

Entrambe le costanti di rilassamento sono minori nei tessuti rispetto ai liquidi perchè le macromolecole facilitano gli scambi energetici.

1.7 Meccanismi di contrasto

L'eccezionale capacità risolutiva dei tessuti molli garantita dalle metodiche MRI nasce dalla molteplicità dei possibili meccanismi di contrasto [8].

Le variabili intrinseche del sistema biologico che possono essere impiegate come meccanismi di contrasto sono T_1 , T_2 , T_2^* e densità protonica.

La scelta di un particolare tipo di contrasto è dettata dal quesito diagnostico e si riflette nei valori assegnati alle variabili sperimentali, ed in particolare a:

- TR tempo che intercorre tra una sequenza di eccitazione e la successiva;
- TE intervallo tra l'inizio dell'eccitazione RF e la massima intensità del segnale ricevuto.

La dipendenza di un'immagine dal T_1 è indotta eccitando preliminarmente il sistema con un impulso RF e poi attendendo un tempo TI (tempo di inversione) prima dell'inizio della seconda stimolazione RF, cui segue l'acquisizione dell'immagine.

Il tempo TI viene scelto in modo da cogliere la sezione in un momento in cui i tessuti di interesse hanno raggiunto fasi diverse del processo di rilassamento. In questo modo concorreranno alla formazione dell'immagine solo i protoni che nel tempo TI si sono già rilassati, riportandosi nella direzione iniziale lungo z.

Nell'acquisizione di immagini pesate in T_1 (T_1 weighted o T1W), si utilizzano $TR \approx T_1$ e $TE \ll T_2$, per evitare lo sfasamento dei protoni sul piano trasversale.

Nelle immagini T1W i tessuti con T_1 breve rispetto a TI producono un segnale maggiore risultando pertanto di colore chiaro. E' il caso del grasso sottocutaneo, che appare sotto forma di un anello bianco a contorno del cranio [4].

La formazione di immagini pesate in T_2 (T2W) si avvale del rifasamento imperfetto prodotto dall'impulso rifasante (stimolazione RF a 180°) [8]. Tale rifasamento è tanto più incompleto quanto maggiore è lo sfasamento iniziale dei protoni, per cui tessuti con T_2 basso saranno rifasati in modo peggiore e produrranno un segnale minore rispetto ai tessuti con T_2 elevato, che nell'immagine saranno quindi di colore chiaro; ne è un esempio il fluido cerebrospinale (CSF).

Le immagini T2W sono pertanto acquisite con $TE \geq T_2$, per enfatizzare differenze nello sfasamento tra i diversi tessuti, e $TR \gg T_1$ [4].

Per ottenere immagini pesate in densità protonica (PDW) il segnale viene reso indipendente dal T_1 e dal T_2 utilizzando $TR \gg T_1$ e $TE \ll T_2$ [8].

La dipendenza di un'immagine dal T_2^* è ottenuta tramite un diverso meccanismo di generazione del segnale eco: dopo l'impulso RF di eccitazione un gradiente sfa in modo ordinato gli spin, che sono successivamente rifasati da un gradiente opposto al primo.

Il rifasamento tramite gradiente, al contrario di quanto avviene con la focalizzazione RF, non compensa le disomogeneità locali di campo magnetico: il segnale acquisito dipende pertanto dal T_2^* .

Nell'ambito dell'imaging cerebrale, le immagini pesate in T_1 forniscono in genere il riferimento anatomico, le immagini T2W evidenziano le componenti liquide, mentre le immagini PDW aiutano nell'indagine di determinate patologie.

La risonanza magnetica funzionale con contrasto BOLD è basata sulle disomogeneità locali di campo magnetico indotte dalle proprietà magnetiche dell'emoglobina, impiega pertanto immagini pesate in T_2^* [4].

Ai meccanismi di contrasto endogeni si aggiungono quelli artificiali: mezzi di contrasto con proprietà magnetiche possono essere assunti dal paziente per via orale oppure endovenosa.

Il mezzo di contrasto è captato in modo preferenziale da un tessuto rispetto ai circostanti, come effetto di una maggiore affinità o vascolarizzazione, e determina una riduzione locale sia del T_1 che del T_2 .

Un tipico elemento chimico di contrasto è il gadolinio (Gd), uno ione metallico paramagnetico. Così come altri ioni paramagnetici, Gd è tossico: nella sintesi del mezzo di contrasto viene perciò associato ad altre molecole, che prevenendone il legame all'interno dell'organismo ne riducono la tossicità.

Il Gd-DTPA (Gadolinium-diethylenetriaminepentaacetic acid) è il mezzo di contrasto più usato nell'imaging del sistema nervoso centrale.

1.8 Codifica spaziale

La codifica spaziale delle immagini MRI è realizzata tramite gradienti lineari di campo magnetico lungo le tre direzioni spaziali: tali gradienti si sommano al campo magnetico statico \mathbf{B}_0 , determinando nei voxel frequenze di precessione leggermente diverse [4].

Il campo magnetico addizionale conseguente alla presenza dei gradienti è esprimibile come:

$$(xG_x + yG_y + zG_z)\hat{z} = (\underline{G} \cdot \underline{r})\hat{z} \quad \text{Equazione 1.13}$$

dove x , y e z rappresentano le coordinate del voxel nel piano cartesiano, \mathbf{r} è il vettore posizione, \mathbf{G} il vettore gradiente e \hat{z} il versore unitario nella direzione z ; i gradienti nelle tre direzioni dello spazio sono definiti dalle seguenti relazioni:

$$G_x = \frac{\partial B_z}{\partial x} \quad G_y = \frac{\partial B_z}{\partial y} \quad G_z = \frac{\partial B_z}{\partial z} \quad \text{Equazione 1.14}$$

Il gradiente G_z è detto di **selezione della fetta** ed è attivo durante la fase di eccitazione: l'impulso a RF ha una banda frequenziale stretta, ed eccita soltanto una sezione del volume in esame [16].

G_x è il gradiente di **codifica di frequenza**: rimane acceso durante l'acquisizione del segnale e fa precedere a frequenze diverse i voxel allineati lungo la direzione x .

G_y è detto infine gradiente di **codifica di fase**. E' attivo per un breve periodo prima della ricezione del segnale eco e determina lo sfasamento degli spin di una stessa colonna, che è poi mantenuto dopo lo spegnimento del gradiente.

I gradienti G_x e G_z vengono compensati, cioè preceduti o seguiti da un gradiente di segno opposto, al fine di evitare la perdita di coerenza di fase nella slice selezionata.

Ogni gradiente ha un proprio andamento temporale, come descritto in precedenza. Il campo risultante lungo z è quindi espresso dalla seguente relazione [4]:

$$B_z(\underline{r}, t) = B_0 + \underline{G}(t) \cdot \underline{r} \quad \text{Equazione 1.15}$$

I campi magnetici associati ai gradienti di codifica spaziale sono molto inferiori a \mathbf{B}_0 : tipicamente G è compreso tra 1 e 3 G/cm [4].

1.9 Il K-spazio

Il segnale di tensione $s(t)$ registrato ai capi della bobina ricevente può essere espresso come [4]:

$$s(t) = c \iint_A \rho(x, y, z_0) e^{j \left[\gamma \int_0^t G_x(t') x dt' + \gamma \int_0^t G_y(t') y dt' \right]} \cdot e^{-\frac{t}{T_2^*}} dx dy \quad \text{Equazione 1.16}$$

dove c è una costante di proporzionalità, A indica la slice selezionata dall'eccitazione RF e $\rho(x, y, z_0)$ rappresenta la distribuzione della densità protonica nella sezione A , γ è il rapporto giromagnetico, G_x e G_y sono i gradienti di codifica spaziale nelle direzioni x e y .

Gli integrali $\int_0^t G_x(t') x dt'$ e $\int_0^t G_y(t') y dt'$ tengono conto dell'effetto cumulativo indotto dall'applicazione di un gradiente sullo sfasamento dei protoni. Infatti, per l'Equazione 1.14 i prodotti $G_x x$ e $G_y y$ hanno le dimensioni di un campo magnetico, quindi (Equazione 1.16) il prodotto $\gamma B = \omega$ è una velocità angolare, il cui integrale temporale rappresenta uno sfasamento $\varphi = \int_0^t \omega(t') dt'$.

Trascurando il decadimento esponenziale del segnale RM legato alla costante temporale T_2^* , e ponendo

$$k_x(t) = \gamma \int_0^t G_x(t') dt' \quad \text{Equazione 1.17}$$

$$k_y(t) = \gamma \int_0^t G_y(t') dt' \quad \text{Equazione 1.18}$$

è possibile esprimere il segnale $s(t)$ in funzione delle due nuove variabili k_x e k_y :

$$S(k_x, k_y) = c \int_A \rho(x, y, z_0) e^{j(k_x x + k_y y)} dx dy \quad \text{Equazione 1.19}$$

Il parametro k è detto **numero d'onda** e rappresenta il periodo spaziale di una sinusoide:

$$k = \frac{2\pi}{\lambda} \quad [\text{m}^{-1}] \quad \text{Equazione 1.20}$$

dove λ è la lunghezza d'onda della sinusoide.

I valori $S(k_x, k_y)$ costituiscono una matrice detta **k-spazio**. Ad ogni punto del k-spazio corrisponde una sinusoide di:

- direzione ortogonale al vettore posizione del punto considerato;
- periodo spaziale definito dalle coordinate k_x e k_y ;
- ampiezza pari a $S(k_x, k_y)$.

Acquisire il segnale RM equivale a riempire la matrice del k-spazio secondo una traiettoria definita dall'andamento temporale dei gradienti di codifica spaziale.

Il segnale RM espresso dall'Equazione 1.19 è la trasformata di Fourier bidimensionale della densità protonica. Ne consegue che antitrasformando il k-spazio si ottiene un'immagine della distribuzione spaziale della densità protonica.

1.10 Risoluzione MRI

La generazione di immagini MR è la sola metodica di imaging con risoluzione spaziale indipendente dalla lunghezza d'onda della radiazione impiegata.

Nei sistemi ottici, ecografici e radiografici la diffrazione limita la risoluzione spaziale ad un valore dell'ordine della lunghezza d'onda [4]: il fascio emesso dalla sorgente diverge nel suo cammino verso il rivelatore, per cui non è possibile determinarne con esattezza l'origine.

Nell'imaging MR, invece, la localizzazione spaziale del segnale non è basata sulla focalizzazione della radiazione emessa, ma sulla codifica frequenziale del segnale proveniente dai diversi voxel.

Ciò permette una risoluzione submillimetrica dell'imaging MR, quando invece la lunghezza d'onda della radiazione RF è di alcuni metri.

La risoluzione MR dipende dal grado di copertura del k-spazio ed è inversamente proporzionale alla massima frequenza spaziale acquisita [4]. Nella pratica clinica, i

parametri di acquisizione vengono scelti in base al compromesso tra risoluzione e tempo di acquisizione dell'immagine.

Bibliografia

1. Ambrose J, Hounsfield G. Computerized transverse axial tomography. Br J Radiol. 1973 Feb;46(542):148-9.
2. Bandettini PA, Jesmanowicz A, Wong EC, Hyde JS. Processing Strategies for Time-Course Data Sets in Functional MRI of the Human Brain. Magn Reson Med. 1993; 30:161-173.
3. Bloch F. Nuclear induction. Phys Rev. 1946; 70: 460-474.
4. Bronzino J. The Biomedical Engineering Handbook. 1995. IEEE press.
5. Carrington A, McLachlan AD. Introduction To Magnetic Resonance. 1967. Chapman and Hall, London.
6. Chapman B, Turner R, Ordidge RJ, Doyle M, Cawley M, Coxon R, Glover P, Mansfield P. Real-Time Movie Imaging from a Single Cardiac Cycle by NMR. Magn Reson Med. 1987; 5:246-254.
7. Damadian R. Tumor detection by nuclear magnetic resonance. Science. 1971 Mar 19; 171(976):1151-3.
8. Fazio F, Valli G. Tecnologie e metodologie per le immagini funzionali. 1999. Patron editore.
9. Foster MA. Magnetic Resonance in Medicine and Biology. 1984. Pergamon Press, New York.

10. Kumar A, Welti D, Ernst RR. NMR Fourier zeugmatography. *J Magn Reson.* 1975; 18:69-83.
11. Lauterbur PC. Image formation by induced local interactions: examples employing nuclear magnetic resonance. *Nature.* 1973; 242:190-191.
12. Mansfield, P. Multi-planar image formation using NMR spin echoes. *J Phys C.* 10:L55-L58. 1977.
13. Nagayama K, Wuthrich K, Bachmann P, Ernst RR. Two-dimensional J-resolved ¹H n.m.r. spectroscopy for studies of biological macromolecules. *Biochem Biophys Res Commun.* 1977 Sep 9;78(1):99-105.
14. Ogawa S, Lee TM, Nayak AS, Glynn P. Oxygenation-sensitive contrast in magnetic resonance image of rodent brain at high magnetic fields. *Magn Reson Med.* 1990 Apr;14(1):68-78.
15. Purcell EM, Torrey HC, Pound RV. Resonance absorption by nuclear magnetic moments in a solid. *Phys Rev.* 1946; 69:37-38.
16. Santarelli MF, Landini L. *Immagini biomediche.* 2003. Servizio Editoriale Universitario di Pisa.
17. Weast RC. *Handbook of Chemistry and Physics.* 1972. Chemical Rubber Company, Cleveland.

Capitolo 2

RISONANZA MAGNETICA FUNZIONALE

L'attività cerebrale può essere studiata con tecniche di natura elettromagnetica oppure emodinamica-metabolica.

Le metodiche di tipo elettromagnetico registrano un potenziale remoto generato dall'attività di scarica neuronale, realizzando così una misura diretta dell'attività elettrica delle cellule nervose. Hanno risoluzione temporale molto elevata, limitata dalla sola elettronica di acquisizione del segnale, ma la risoluzione spaziale è povera: ogni elettrodo integra le variazioni di potenziale di un'area molto elevata a causa della distanza tra il sito di misura e quello di generazione del segnale elettrico.

Le metodiche di tipo emodinamico-metabolico hanno una risoluzione temporale inferiore, ma permettono una localizzazione più fine delle attivazioni corticali.

All'interno di questa seconda tipologia di indagine, la risonanza magnetica funzionale (fMRI) è generalmente preferita alla tomografia ad emissione di positroni (PET): consente infatti di acquisire nella medesima sessione di esame immagini sia anatomiche sia funzionali, fa uso di radiazioni non ionizzanti ed è caratterizzata da una maggiore risoluzione spaziale e temporale.

2.1 Iperemia funzionale

Il flusso sanguigno attraverso i vari distretti corporei è regolato dinamicamente in base all'attività dei singoli organi: un accresciuto apporto ematico interessa ad esempio i muscoli scheletrici nello svolgimento di attività fisica, come anche il tubo digerente durante la digestione.

Le prime ricerche sull'esistenza di un legame fisiologico tra attività nervosa e apporto di sangue nelle singole regioni cerebrali risalgono alla fine del diciannovesimo secolo [21,28,31].

E' stato successivamente dimostrato che l'attivazione di una specifica area cerebrale determina l'aumento locale sia del flusso (CBF, cerebral blood flow) che del volume ematico (CBV, cerebral blood volume) [10,19]; tale variazione fisiologica nell'apporto di sangue prende il nome di *iperemia funzionale*.

L'iperemia funzionale persiste durante il sonno e sotto anestesia, e la sua scomparsa è legata a gravi patologie quali l'emorragia subaracnoidea, l'ictus, l'ipotensione ed il trauma cranico [37].

Il primo valore percentuale più elevato di iperemia funzionale è relativo al consumo energetico nei roditori, seguito da quello nei primati. Se si considera il bilancio energetico della sinapsi (Fig. 2.1) ed in particolare la pompa Na^+/K^+ si comprende come la quasi totalità dell'energia spesa nella comunicazione nervosa vada a sostenere l'inversione dei flussi ionici di Na^+ e K^+ .

L'aumento del flusso ematico locale risponde ad un'accresciuta richiesta di glucosio e ossigeno: la comunicazione nervosa determina, infatti, un notevole incremento del fabbisogno energetico legato all'attività della pompa Na^+/K^+ [3].

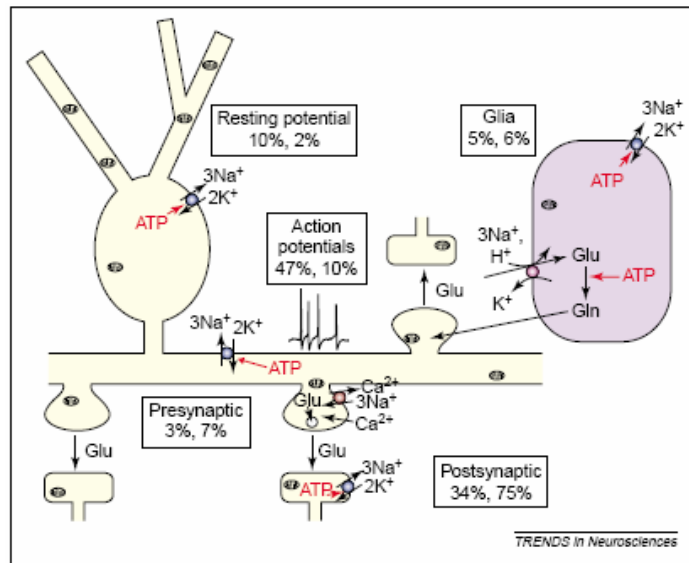


Fig. 2.1 Bilancio energetico della sinapsi [3]

La maggior parte di tale energia non viene spesa nel ripristino del potenziale di riposo assonale dopo la generazione del potenziale d'azione, ma nell'inversione dei flussi ionici dovuti alle correnti post-sinaptiche eccitatorie.

A tale proposito è interessante notare come nei roditori tale rapporto sia invertito, a causa del minor numero di sinapsi per neurone.

2.2 Accoppiamento tra attività nervosa ed iperemia funzionale

Nella ricerca del fattore scatenante l'iperemia funzionale, l'attenzione dei ricercatori si è inizialmente focalizzata sulla concentrazione locale di glucosio e di ossigeno [3].

L'aumento del flusso sanguigno verso un distretto cerebrale metabolicamente attivo ha infatti lo scopo di garantire un maggiore apporto di nutrienti.

A tal proposito, studi sperimentali hanno dimostrato che il flusso ematico cerebrale è correlato temporalmente con il consumo di ossigeno [13], ma non aumenta significativamente in condizione di ipossia [20].

Analogamente l'intensità dell'iperemia funzionale non è modulata dalla concentrazione di glucosio nel sangue [27].

Ulteriori studi dimostrano come la variazione del flusso ematico cerebrale non sia guidata neppure dalle specie chimiche CO_2 e H^+ , legate al metabolismo energetico [2].

Le ipotesi ad oggi più accreditate, non mutualmente esclusive, riconoscono come fattore chiave per l'iperemia funzionale:

- produzione locale di *adenosina o ione potassio (K^+)* in conseguenza dell'attività neuronale. Tali specie chimiche diffonderebbero fino ai vasi sanguigni adiacenti, determinando vasodilatazione [7].
- *innervazione diretta* dei vasi sanguigni da parte dei neuroni, con secrezione localizzata di sostanze vasoattive quali acetilcolina, monoamine o peptidi [15,29,36].
- attivazione dei *recettori ionotropi per glutammato* NMDA (N-methyl-D-aspartic acid) sul neurone post-sinaptico, con conseguente produzione di ossido nitrico (NO) ad opera dell'enzima NOS (nitric oxide synthase). NO diffonderebbe quindi fino ai vasi, inducendone la dilatazione [14].

2.3 Ruolo astrocitario nell'iperemia funzionale

Recenti studi hanno suggerito un ruolo astrocitario nella generazione della risposta emodinamica [24,30,33,41].

La ricerca è stata indirizzata in tale direzione da osservazioni di natura sia anatomica sia funzionale.

Gli astrociti posseggono infatti processi cellulari a stretto contatto sia con le arteriole cerebrali [26,32] che con le terminazioni neuronali [38]. Sono inoltre considerati assieme ai neuroni presinaptico e postsinaptico parte integrante della cosiddetta *sinapsi tripartita* [6,9,22,34]; gli astrociti traducono infatti la comunicazione nervosa in oscillazioni della concentrazione intracellulare di calcio ($[Ca^{++}]_i$), la frequenza delle quali è proporzionale al livello di attività sinaptica, e possono a loro volta influenzare l'attività dei neuroni circostanti mediante il rilascio di neurotrasmettitori [25].

Esperimenti condotti su fette sottili di tessuto nervoso hanno dimostrato che gli astrociti rispondono all'attività delle sinapsi glutammatergiche tramite oscillazioni della $[Ca^{++}]_i$, e che tali oscillazioni sono accoppiate a variazioni del flusso sanguigno.

Il glutammato (Glu) rilasciato nel vallo sinaptico durante la comunicazione nervosa si lega ai recettori metabotropi per glutammato (mGluR) dei processi astrocitari; ne consegue un incremento locale della $[Ca^{++}]_i$, proporzionale al livello di attività sinaptica [12].

Tale aumento della concentrazione di calcio si propaga nel resto della cellula, e l'andamento temporale della $[Ca^{++}]_i$ nel processo astrocitario a contatto con l'arteriola correla con la variazione del flusso ematico [41].

E' interessante notare l'assenza di vasodilatazione nei casi in cui l'aumento della concentrazione intracellulare di calcio è rimasta confinata al solo processo sinaptico della cellula astrocitaria.

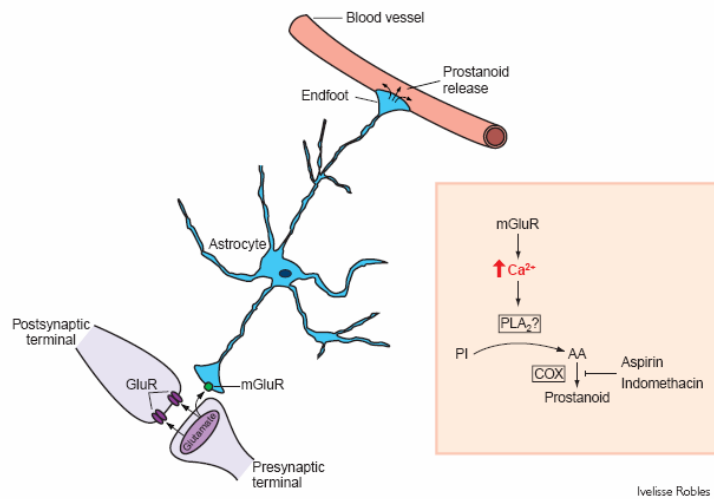


Fig. 2.2 Ruolo astrocitario nell'iperemia funzionale [24]

La catena enzimatica di accoppiamento tra attività nervosa e flusso sanguigno è stata indagata incubando il tessuto nervoso con inibitori di diverse vie metaboliche e verificandone poi l'effetto sull'entità della vasodilatazione conseguente alla stimolazione neuronale [41].

I risultati di tali studi suggeriscono che l'aumento della $[Ca^{++}]_i$ può attivare nei processi vascolari degli astrociti la fosfolipasi A₂ (PLA₂), la quale promuove la conversione del fosfatidilinositolo (PI) in acido arachidonico (AA), substrato della cicloossigenasi (COX) nella produzione di sostanze vasoattive quali prostaglandine e prostacicline.

Tra i prodotti della cicloossigenasi particolare attenzione è stata rivolta alla prostaglandina E₂ (PGE₂), che può essere rilasciata dagli astrociti in seguito a variazioni della

concentrazione intracellulare di calcio [4] e produce vasodilatazione nelle stesse arteriole che rispondono alla stimolazione neuronale [41].

I risultati ottenuti *in vitro* sono stati confermati *in vivo* dagli stessi autori: l'iniezione endovenosa di un antagonista mGluR nell'ambito di un protocollo standard di stimolazione somatosensoriale ha ridotto del 66% l'incremento di flusso ematico regionale, pur lasciando inalterata l'attività neuronale [41].

Un secondo studio *in vivo* ha confermato l'ipotesi di un coinvolgimento della cicloossigenasi astrocitaria nella generazione dell'iperemia funzionale: è stata registrata una riduzione superiore al 50% del flusso ematico in seguito ad inibizione dell'enzima COX o alternativamente dei recettori metabotropi per glutammato, sebbene ciò non abbia determinato variazioni nell'attività sinaptica e nelle oscillazioni della $[Ca^{++}]_i$ astrocitaria [33].

La via enzimatica proposta è attivata dal glutammato, principale neurotrasmettitore eccitatorio del sistema nervoso centrale. Tale meccanismo potrebbe però essere esteso alle regioni in cui Glu non è il neurotrasmettitore prevalente, dato che nelle diverse aree cerebrali gli astrociti esprimono recettori per neurotrasmettitori differenti [12,39].

Gli studi precedentemente descritti propongono il coinvolgimento astrocitario come principale meccanismo di accoppiamento *in vivo* tra comunicazione nervosa e iperemia funzionale.

Particolare interesse per questo tipo di accoppiamento è legato alla selettività della vasodilatazione indotta.

L'origine astrocitaria dell'iperemia funzionale si accorda infine con le osservazioni che suggeriscono come il segnale fMRI rifletta l'informazione in ingresso ad un'area cerebrale e l'elaborazione locale, piuttosto che i segnali in uscita [16,17].

2.4 Risposta emodinamica

L'attività neuronale riduce in un primo momento la concentrazione locale di ossigeno, estratto dal sangue in misura maggiore a causa dell'elevato fabbisogno energetico.

L'iperemia funzionale che ne consegue determina invece un aumento della concentrazione di ossigeno, perchè l'apporto di O_2 sopravanza il prelievo da parte del tessuto nervoso [5]. Tale condizione si manifesta con un ritardo di circa due secondi rispetto all'attivazione neuronale, e si mantiene per circa dieci secondi dopo che questa è terminata [18].

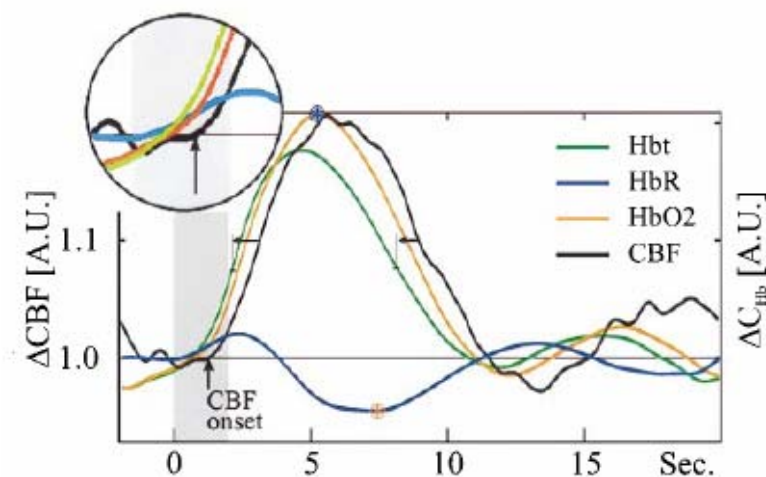


Fig. 2.3 Risposta emodinamica [18]

Risposta emodinamica conseguente ad un breve stimolo, indicato nel grafico dall'ombreggiatura grigia. Sono riportati in figura l'andamento temporale della concentrazione di emoglobina totale (Hbt), ossigenata (HbO₂) e ridotta (HbR), ed il flusso ematico cerebrale (CBF).

L'andamento temporale della risposta emodinamica rappresenta un limite intrinseco per la **risoluzione temporale** della metodica fMRI: non è possibile distinguere tra due attivazioni successive della stessa area cerebrale se la seconda interviene prima che sia concluso il recupero della condizione basale.

La **risoluzione spaziale** della risposta emodinamica è limitata invece dalla specificità dell'iperemia funzionale: la stimolazione di una singola colonna corticale produce una risposta vascolare che interessa inizialmente la sola colonna, ma che successivamente si comunica alle aree adiacenti [19].

Studi effettuati con metodiche di imaging ad alta risoluzione attribuiscono alla risposta emodinamica una capacità risolutiva prossima al millimetro [11,40].

2.5 Proprietà magnetiche dell'emoglobina

L'emoglobina è una proteina contenuta nei globuli rossi e deputata al trasporto dell'ossigeno. Tale funzione è realizzata dal gruppo prostetico *eme*, costituito dalla protoporfirina IX e dallo ione ferroso Fe⁺⁺ [1].

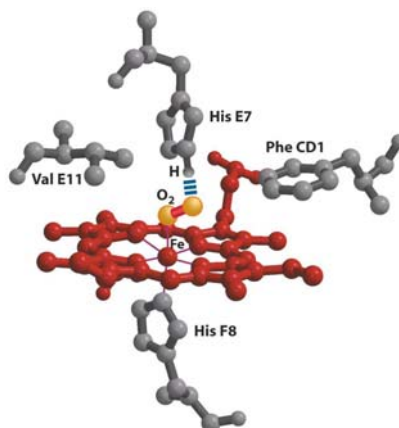


Fig. 2.4 Legame dell'ossigeno al gruppo prostetico *eme* dell'emoglobina.

Lo ione Fe^{++} è coordinato ai vertici di un ottaedro: quattro dei sei ligandi sono costituiti da atomi di azoto dell'anello porfirinico, un quinto sito di coordinazione è occupato da un residuo di istidina (His F8) della catena proteica, mentre il sesto ed ultimo legame di coordinazione è realizzato nella deossiemoglobina con una molecola di acqua e nella ossiemoglobina con una molecola di ossigeno.

La presenza nel sito funzionale di un secondo residuo di istidina (His E7) impedisce la formazione di un legame stabile tra ossigeno e ione ferroso e l'ossidazione irreversibile di quest'ultimo, che comprometterebbe le capacità di trasporto dell'emoglobina.

L'emoglobina deossigenata è una sostanza paramagnetica: quattro dei sei elettroni esterni dello ione Fe^{++} sono disaccoppiati e realizzano una configurazione ad alto spin, alla base delle proprietà magnetiche della macromolecola.

Nell'emoglobina ossigenata, invece, lo ione ferroso è in una configurazione a basso spin, perchè uno degli elettroni esterni è trasferito alla molecola di ossigeno. L'ossiemoglobina è quindi una sostanza diamagnetica.

2.6 Contrasto BOLD

L'emoglobina deossigenata, in quanto sostanza paramagnetica, produce delle disomogeneità locali di campo magnetico. Conseguentemente i nuclei di idrogeno circostanti precedono a frequenze leggermente diverse tra loro, determinando una riduzione del segnale MR [23].

Le proprietà magnetiche dell'emoglobina associano alla risposta emodinamica una variazione del segnale di risonanza magnetica dipendente dalla concentrazione di ossigeno del sangue, realizzando il contrasto BOLD (Blood Oxygen Level Dependent).

L'ampiezza del segnale BOLD a campi magnetici convenzionali è molto bassa (1-5% a 1,5 T) e dipende dal tipo di stimolazione impiegata nello studio funzionale [8].

Le variazioni di segnale crescono con l'intensità del campo magnetico statico: in esperimenti di stimolazione visiva sono state registrate variazioni del 15% a 4 T [35].

Bibliografia

18. Alberts B. Biologia molecolare della cellula. 2004. Zanichelli.
19. Astrup J, Heuser D, Lassen NA, Nilsson B, Norberg K, Siesjo BK. Evidence against H⁺ and K⁺ as main factors for the control of cerebral blood flow: a microelectrode study. Ciba Found Symp. 1978 Mar;(56):313-37.

20. Attwell D, Iadecola C. The neural basis of functional brain imaging signals. *Trends Neurosci.* 2002 Dec;25(12):621-5.
21. Bezzi P, Carmignoto G, Pasti L, Vesce S, Rossi D, Rizzini BL, Pozzan T, Volterra A. Prostaglandins stimulate calcium-dependent glutamate release in astrocytes. *Nature.* 1998 Jan 15;391(6664):281-5.
22. Bronzino J. *The Biomedical Engineering Handbook.* 1995. IEEE press.
23. Carmignoto G. Astrocyte-neurone crosstalk: variants of the same language? *Trends Pharmacol Sci.* 2000 Oct;21(10):373-5.
24. Faraci FM, Heistad DD. Regulation of the cerebral circulation: role of endothelium and potassium channels. *Physiol Rev.* 1998 Jan;78(1):53-97.
25. Fazio F, Valli G. *Tecnologie e metodologie per le immagini funzionali.* 1999. Patron editore.
26. Fellin T, Carmignoto G. Neurone-to-astrocyte signalling in the brain represents a distinct multifunctional unit. *J Physiol.* 2004 Aug 15;559(Pt 1):3-15.
27. Fox PT, Raichle ME. Focal physiological uncoupling of cerebral blood flow and oxidative metabolism during somatosensory stimulation in human subjects. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986 Feb;83(4):1140-4.
28. Grinvald A, Frostig RD, Siegel RM, Bartfeld E. High-resolution optical imaging of functional brain architecture in the awake monkey. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Dec 15;88(24):11559-63.
29. Haydon PG. GLIA: listening and talking to the synapse. *Nat Rev Neurosci.* 2001 Mar;2(3):185-93.
30. Hoge RD, Atkinson J, Gill B, Crelier GR, Marrett S, Pike GB. Linear coupling between cerebral blood flow and oxygen consumption in activated human cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Aug 3;96(16):9403-8.
31. Iadecola C. Regulation of the cerebral microcirculation during neural activity: is nitric oxide the missing link? *Trends Neurosci.* 1993 Jun;16(6):206-14.

32. Krimer LS, Muly EC 3rd, Williams GV, Goldman-Rakic PS. Dopaminergic regulation of cerebral cortical microcirculation. *Nat Neurosci*. 1998 Aug;1(4):286-9.
33. Logothetis NK, Pauls J, Augath M, Trinath T, Oeltermann A. Neurophysiological investigation of the basis of the fMRI signal. *Nature*. 2001 Jul 12;412(6843):150-7.
34. Logothetis NK, Pfeuffer J. On the nature of the BOLD fMRI contrast mechanism. *Magn Reson Imaging*. 2004 Dec;22(10):1517-31.
35. Malonek D, Dirnagl U, Lindauer U, Yamada K, Kanno I, Grinvald A. Vascular imprints of neuronal activity: relationships between the dynamics of cortical blood flow, oxygenation, and volume changes following sensory stimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Dec 23;94(26):14826-31.
36. Malonek D, Grinvald A. Interactions between electrical activity and cortical microcirculation revealed by imaging spectroscopy: implications for functional brain mapping. *Science*. 1996 Apr 26;272(5261):551-4.
37. Mintun MA, Lundstrom BN, Snyder AZ, Vlassenko AG, Shulman GL, Raichle ME. Blood flow and oxygen delivery to human brain during functional activity: theoretical modeling and experimental data. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jun 5;98(12):6859-64.
38. Mosso A. Ueber den Kreislauf des Blutes im Menschlichen Gehirn. 1881.
39. Newman EA. New roles for astrocytes: regulation of synaptic transmission. *Trends Neurosci*. 2003 Oct;26(10):536-42.
40. Ogawa S, Lee TM, Nayak AS, Glynn P. Oxygenation-sensitive contrast in magnetic resonance image of rodent brain at high magnetic fields. *Magn Reson Med*. 1990 Apr;14(1):68-78.
41. Parri R, Crunelli V. An astrocyte bridge from synapse to blood flow. *Nat Neurosci*. 2003 Jan;6(1):5-6.

42. Pasti L, Volterra A, Pozzan T, Carmignoto G. Intracellular calcium oscillations in astrocytes: a highly plastic, bidirectional form of communication between neurons and astrocytes in situ. *J Neurosci*. 1997 Oct 15;17(20):7817-30.
43. Peters A, Palay SL, Webster HF. The fine structure of the central nervous system: neurons and their supportive cells. Oxford Univ. Press. 1991.
44. Powers WJ, Hirsch IB, Cryer PE. Effect of stepped hypoglycemia on regional cerebral blood flow response to physiological brain activation. *Am J Physiol*. 1996 Feb;270(2 Pt 2):H554-9.
45. Raichle ME. Behind the scenes of functional brain imaging: a historical and physiological perspective. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Feb 3;95(3):765-72.
46. Reinhard JF Jr, Liebmann JE, Schlosberg AJ, Moskowitz MA. Serotonin neurons project to small blood vessels in the brain. *Science*. 1979 Oct 5;206(4414):85-7.
47. Rossi DJ. Another BOLD role for astrocytes: coupling blood flow to neural activity. *Nat Neurosci*. 2006 Feb;9(2):159-61.
48. Roy C, Sherrington C. On the regulation of the blood supply of the brain. 1890; *J. Physiol*. 11, 85–100.
49. Simard M, Arcuino G, Takano T, Liu QS, Nedergaard M. Signaling at the gliovascular interface. *J Neurosci*. 2003 Oct 8;23(27):9254-62.
50. Takano T, Tian GF, Peng W, Lou N, Libionka W, Han X, Nedergaard M. Astrocyte-mediated control of cerebral blood flow. *Nat Neurosci*. 2006 Feb;9(2):260-7.
51. Temburni MK, Jacob MH. New functions for glia in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Mar 27;98(7):3631-2.
52. Turner R, Jezzard P, Wen H, Kwong KK, Le Bihan D, Zeffiro T, Balaban RS. Functional mapping of the human visual cortex at 4 and 1.5 tesla using deoxygenation contrast EPI. *Magn Reson Med*. 1993 Feb;29(2):277-9.
53. Vaucher E, Hamel E. Cholinergic basal forebrain neurons project to cortical microvessels in the rat: electron microscopic study with anterogradely transported

- Phaseolus vulgaris leucoagglutinin and choline acetyltransferase immunocytochemistry. *J Neurosci.* 1995 Nov;15(11):7427-41.
54. Vavilala MS, Lee LA, Lam AM. Cerebral blood flow and vascular physiology. *Anesthesiol Clin North America.* 2002 Jun;20(2):247-64.
55. Ventura R, Harris KM. Three-dimensional relationships between hippocampal synapses and astrocytes. *J Neurosci.* 1999 Aug 15;19(16):6897-906.
56. Verkhratsky A, Orkand RK, Kettenmann H. Glial calcium: homeostasis and signaling function. *Physiol Rev.* 1998 Jan;78(1):99-141.
57. Villringer A, Planck J, Hock C, Schleinkofer L, Dirnagl U. Near infrared spectroscopy (NIRS): a new tool to study hemodynamic changes during activation of brain function in human adults. *Neurosci Lett.* 1993 May 14;154(1-2):101-4.
58. Zonta M, Angulo MC, Gobbo S, Rosengarten B, Hossmann KA, Pozzan T, Carmignoto G. Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. *Nat Neurosci.* 2003 Jan;6(1):43-50.

Capitolo 3

ANALISI DELLO STATO DI RIPOSO

Numerosi sono gli studi funzionali che dipingono l'attività del cervello durante lo svolgimento di compiti cognitivi, sensoriali e motori.

Relativamente recente è invece l'indagine dello stato di riposo: il soggetto in esame non svolge alcun compito particolare e rimane nello scanner MR come in una tecnologica, e molto rumorosa, sala d'aspetto.

3.1 Default mode network

Negli ultimi anni si è affermata tra i ricercatori l'ipotesi che a riposo il cervello sia impegnato in un'attività di fondo, definita in letteratura come *default mode of brain function* [17,27,52], *baseline state* [23], *conscious resting state* [5,47] o anche *stimulus-independent thought* [48].

Le aree cerebrali coinvolte in tale attività di fondo costituirebbero una rete funzionale, detta *default mode network* (DMN).

Per rete viene qui intesa l'attività spontanea simultanea di aree anatomicamente segregate, in accordo con il concetto di **connettività funzionale**: regioni che si attivano in maniera concorde appartengono ad una rete funzionale, cioè concorrono a realizzare una stessa funzione.

Distinta dalla connettività funzionale è la **connettività anatomica**, cioè l'effettiva presenza di un collegamento nervoso. E' infine definita **connettività effettiva** la presenza di un ritardo temporale, presumibilmente associato ad una relazione di causa-effetto, tra l'attivazione di due aree cerebrali.

In particolare, nel cervello a riposo è stata osservata elevata connettività funzionale tra regioni spazialmente distinte ma unite da tratti di sostanza bianca [34]; può tuttavia esistere una connessione funzionale anche in assenza di collegamento diretto tra due aree cerebrali [9,10,40,57,59].

La default mode network è costituita dalle aree cerebrali la cui attività aumenta durante lo svolgimento di compiti cognitivi semplici oppure a riposo rispetto all'esecuzione di task più complessi. Tale **deattivazione** è stata osservata per un'ampia gamma di compiti cognitivi [2,22,24,47,54].

Le regioni attribuite alla DMN da studi di risonanza magnetica funzionale corrispondono significativamente alle aree cerebrali metabolicamente più attive nello stato di riposo [52].

3.2 Esistenza della default mode network

Le prove più significative dell'esistenza della default mode network sono costituite da:

- **riproducibilità** della rete nel singolo soggetto [59];
- **consistenza** della rete tra soggetti diversi, anche al variare del compito cognitivo [3,4,23,47,59];

- **corrispondenza** delle aree corticali individuate dalle diverse metodiche di studio (PET, fMRI, functional connectivity MRI, perfusion fMRI) [13,17,23,61].

La *default mode network* è invece considerata da alcuni come prodotto dell'aliasing delle frequenze respiratorie e cardiache (l'elevato TR delle sequenze fMRI non consente il rispetto del teorema di Nyquist), o come immagine della rete di vasi sanguigni che irrorano il cervello (*blood vessel network*, BVN) [3,13].

Recenti studi hanno dimostrato che, ripetendo le acquisizioni con un TR basso (120 msec, rispetto ad un TR tipico di 3 sec), è possibile distinguere tra la rete di riposo e gli artefatti legati al ciclo cardiaco (~ 1 Hz) e respiratorio (~ 0,3 Hz) mediante analisi delle componenti indipendenti (*Independent Component Analysis* o ICA) [3,13].

L'ICA è una tecnica di analisi statistica non inferenziale che sarà illustrata nel Capitolo 5.

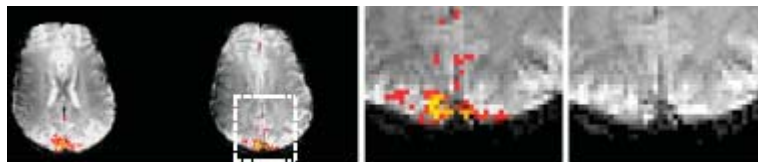


Fig.3.1 Artefatto da *blood vessel network* [3]

Per quanto riguarda il secondo tipo di obiezione, gli artefatti da *blood vessel network* sono legati alla presenza di grossi vasi sanguigni: raccogliendo il sangue refluo dalle aree di

iperemia funzionale, tali vasi determinano attivazioni fittizie, la cui localizzazione non coincide con il sito di attività neuronale.

L'ipotesi di identificazione della *default mode network* con la *blood vessel network* è rafforzata dall'analogia dello spettro di potenza di BVN e DMN: l'artefatto mostra ampiezza massima attorno a 0,2 Hz e la rete di riposo è caratterizzata dalla prevalenza delle basse frequenze (0,01-0,1 Hz).

Nella decomposizione ICA l'artefatto BVN viene però distinto dalla *default mode network* e rappresentato in una mappa di attivazione che evidenzia soltanto i tessuti adiacenti ai grossi vasi [3].

3.3 Origine neuronale della default mode network

Esistono importanti prove a favore dell'origine neuronale della *default mode network*:

- **localizzazione** della rete prevalentemente nella sostanza grigia [3,13,17];
- **corrispondenza** tra pattern di attivazione a riposo e regioni cerebrali correlate funzionalmente [3,11,14,38,39];
- **modulazione** dell'attività della rete ad opera del carico cognitivo [25,49];
- **lateralizzazione** stabile nei singoli soggetti ed analoga a quella osservata nello svolgimento di un compito motorio (*finger tapping*) [14];
- **correlazione** con la banda β_2 dell'EEG (17-23 Hz) [36];
- **alterazione** della rete in patologie neurologiche e psichiatriche [20,25,29,41].

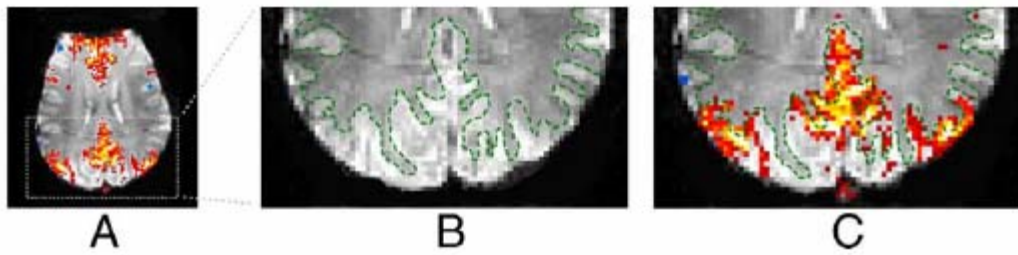


Fig. 3.2 Localizzazione corticale della *default mode network* [13]

La linea verde tratteggiata rappresenta il confine tra sostanza bianca e grigia, individuato tramite segmentazione manuale dell'immagine.

Sospetti sull'origine neuronale della *default mode network* nascono invece dalla lentezza delle fluttuazioni del segnale BOLD associate alla DMN [14], che potrebbero suggerire una causa vascolare non direttamente collegata all'attività neuronale, come ad esempio la fluttuazione del volume venoso cerebrale [33,50] o della concentrazione di anidride carbonica nel sangue.

A tale proposito, l'andamento nel tempo della concentrazione arteriosa di CO_2 è stato usato come regressore in uno studio GLM (*General Linear Model*) di dati fMRI: le regioni maggiormente correlate erano localizzate nei lobi occipitale, parietale e temporale, come anche nella corteccia del cingolo [62].

E' importante sottolineare che una eventuale origine vascolare della *default mode network* renderebbe tale rete di minor interesse per le neuroscienze, ma non ne ridurrebbe l'importanza dal punto di vista clinico.

3.4 Studio della default mode network

Lo studio della *default mode network* è coinciso in un primo tempo con l'indagine delle **aree cerebrali deattivate** durante l'esecuzione di un compito cognitivo complesso. Tale ricerca è stata condotta tramite indagini metaboliche ed emodinamiche.

Negli studi PET l'iniezione di un tracciante isotopico a breve emivita ha permesso l'individuazione delle regioni del cervello metabolicamente più attive nello stato di riposo [52,54,61].

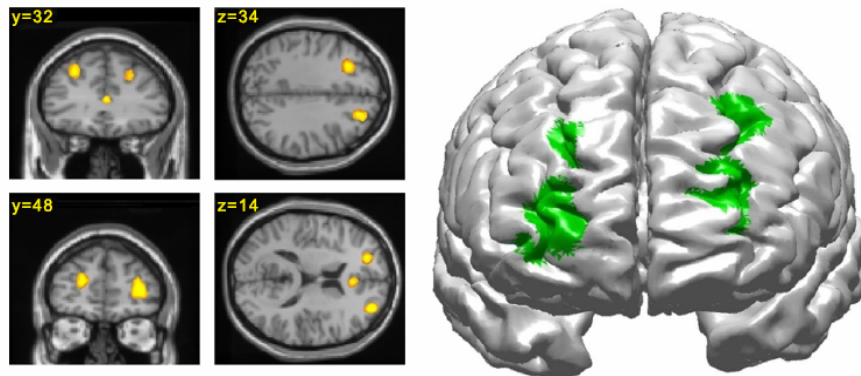


Fig. 3.3 Studio PET della default mode network [61]

Localizzazione delle aree in cui il flusso ematico regionale (rCBF) è maggiore nello stato di riposo.

Le coordinate sono relative allo standard anatomico del Montreal Neurological Institute.

Gli studi fMRI di deattivazione tipicamente prevedono un protocollo di stimolazione a blocchi, all'interno del quale compiti cognitivi complessi si alternano a compiti elementari o al riposo. I dati acquisiti possono quindi essere elaborati tramite il *General Linear Model* (GLM), che evidenzia le aree maggiormente attivate nella fase di controllo e in quella di stimolazione [5,26,49].

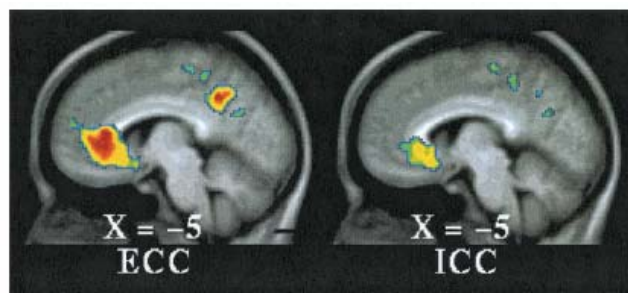


Fig. 3.4 Studio GLM-fMRI della *default mode network* [26]

In figura sono rappresentate le aree di deattivazione ottenute dal confronto tra fissazione visiva (condizione di controllo) e due tipi di giudizio sulle immagini presentate: gradevole-sgradevole (*internally cued condition*, ICC) e scena in luogo chiuso-scena all'aperto (*externally cued condition*, ECC). Le coordinate sono riferite allo spazio di Talairach.

Un secondo ambito di ricerca sulla *default mode network* è rappresentato dallo studio della **connettività funzionale a riposo**, valutata come correlazione tra i segnali provenienti dai singoli voxel (*functional connectivity MRI*) o mediante analisi non inferenziale dei dati fMRI (*Independent Component Analysis*).

La *functional connectivity MRI* (fcMRI) evidenzia le aree cerebrali ad elevata correlazione temporale con l'andamento temporale di un voxel seme o con il segnale medio di una regione di interesse (ROI, *Region of Interest*).

La scelta del seme definisce il tipo di analisi che condurrà alla ricostruzione della rete: correlazione positiva in caso di deattivazione del voxel durante il compito cognitivo, correlazione negativa se al contrario è attivo [23].

Il voxel seme può essere scelto in base a considerazioni anatomiche o a valutazioni sperimentali. Nel primo caso la presunta funzione del voxel è dedotta dalla regione cerebrale cui appartiene, mentre nel secondo l'analisi della connettività funzionale viene preceduta da una valutazione fMRI delle aree attivate o deattivate nello svolgimento di un particolare compito.

Analisi di fcMRI svolte su soggetti a riposo hanno mostrato correlazione positiva del cingolo posteriore (PCC, Posterior Cingulate Cortex) con la corteccia prefrontale mediale (MPFC, Medial Prefrontal Cortex), cingolata ventrale anteriore (vACC, ventral Anterior Cingulate Cortex), parietale inferiore (IPC, Inferior Parietal Cortex) e orbitofrontale (OFC, Orbitofrontal Cortex). Tale connessione funzionale si mantiene sia quando il soggetto tiene gli occhi chiusi che in caso di visione passiva, dimostrando la persistenza della rete durante lo svolgimento di compiti che non richiedono elevato impegno cognitivo [17,23].

Correlazione negativa della PCC è stata osservata invece con le aree premotoria (PMA) e motoria supplementare (SMA) e con la corteccia prefrontale dorso-laterale (DLPFC) [17].

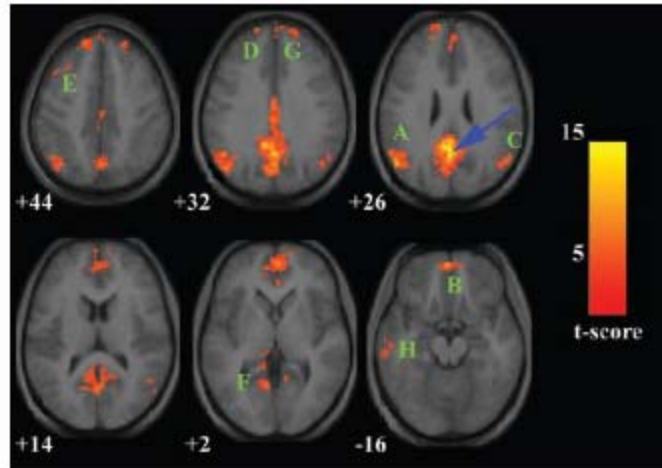


Fig. 3.5 Connettività funzionale della PCC [23]

La freccia indica la corteccia cingolata posteriore(PCC). Gli otto principali cluster sono indicati con le lettere A-H (il cluster A è caratterizzato dalla maggiore correlazione). Le coordinate sono riferite allo spazio di Talairach.

Riguardo alle connessioni funzionali della corteccia cingolata ventrale anteriore (vACC), è stata riscontrata correlazione positiva con PCC, MPFC, OFC ed ipotalamo [23].

Il principale limite della *functional connectivity MRI* risiede nella forte dipendenza dei risultati dalla scelta del seme iniziale, cui consegue la perdita delle informazioni riguardanti eventuali altri pattern di coattivazione [59].

Lo studio non inferenziale mediante **Analisi delle Componenti Indipendenti (ICA)** realizza invece una decomposizione delle acquisizioni fMRI in mappe di attivazione, ciascuna delle quali evidenzia la localizzazione di una distinta attività cerebrale. Regioni

che si attivano in modo coerente sono riunite in una stessa componente indipendente (IC), la cui evoluzione temporale è espressa dal rispettivo *time course* (TC).

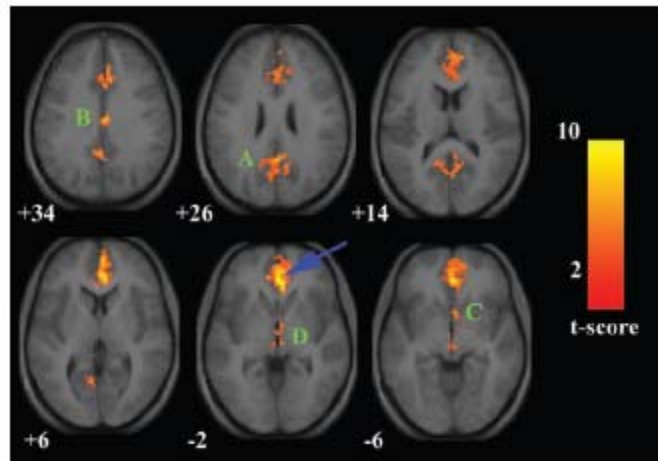


Fig. 3.6 Connettività funzionale della vACC [23]

La freccia indica la corteccia cingolata ventrale anteriore (vACC). I quattro cluster principali sono indicati con le lettere A-D (il cluster A è caratterizzato dalla maggiore correlazione). Le coordinate sono riferite allo spazio di Talairach

Lo studio ICA è una metodica di analisi esplorativa, che non si avvale di ipotesi a priori sul fenomeno sotto indagine, ed in virtù di tale caratteristica rappresenta ad oggi la metodica più utilizzata nello studio dello stato di riposo.

La *default mode network*, per sua natura indipendente da molti compiti sia cognitivi che sensorimotori, rende infatti particolarmente difficile la formulazione di modelli temporali di attivazione della rete. Tale disaccoppiamento dal paradigma di stimolazione riduce

significativamente la sensibilità delle metodiche inferenziali alla presenza della rete di riposo, rilevabile al contrario mediante analisi delle componenti indipendenti [24].

Lo studio ICA-fMRI dello stato di riposo permette di isolare la *default mode network* dalle componenti artefattuali e di rumore, ed evidenzia le stesse aree corticali messe in luce dalle altre metodiche di indagine [3,13,24,59].

Rispetto ad uno studio fcMRI, la decomposizione ICA ha l'ulteriore vantaggio di non richiedere la scelta di un voxel seme, di conseguenza fornisce un quadro completo della connettività cerebrale.

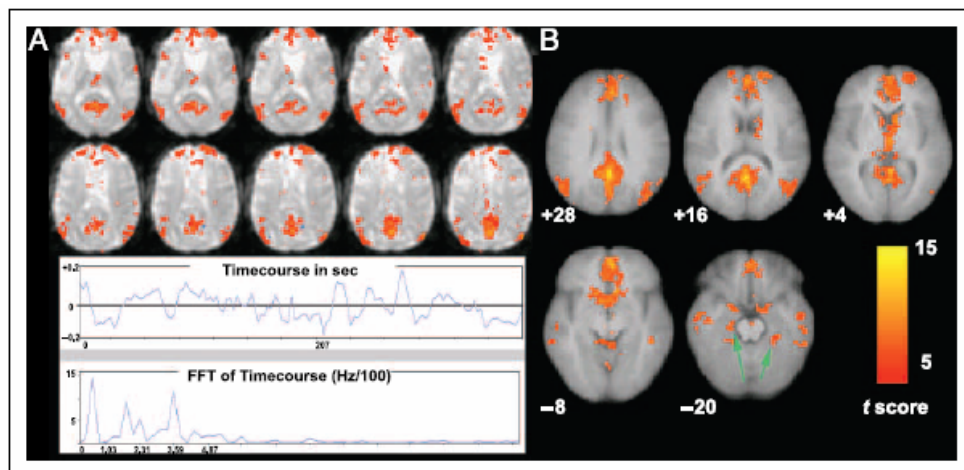


Fig. 3.7 Default mode network evidenziata da uno studio ICA-fMRI [24]

A. Componente indipendente associata alla *default mode network* in un singolo individuo, con relativo time course. B. Medesima componente estratta da uno studio di gruppo (13 soggetti). Le frecce verdi indicano i cluster localizzati nell'ippocampo e nel giro paraippocampale. Le coordinate sono relative allo standard anatomico del Montreal Neurological Institute.

3.5 Low frequency fluctuations

Le *low frequency fluctuations* sono fluttuazioni spontanee del segnale BOLD sincronizzate tra regioni cerebrali distanti e localizzate prevalentemente nella sostanza grigia [17]. Indicate anche come *physiological noise* [35], esibiscono una struttura spaziale complessa che ricorda le mappe di attivazione fMRI [3].

Sono state osservate a riposo in vari circuiti funzionali del cervello:

- *aree motrici primarie* dei due emisferi [6,14,63];
- *aree sensoriali* visive, uditive e somatosensitive [11,59];
- *aree del linguaggio* [28].

Molte delle aree che mostrano a riposo tali oscillazioni appartengono alla *default mode network*, che a sua volta presenta uno spettro di potenza caratterizzato dalle frequenze tipiche delle *low frequency fluctuations* ($< 0,1$ Hz) [3,6,13,14,17,59].

Tali fluttuazioni sono state osservate infatti nella corteccia prefrontale mediale (MPFC) e dorsolaterale (DLPFC), cingolata posteriore (PCC), cingolata ventrale anteriore (vACC) e nel precuneo [17].

Rimane da chiarire il collegamento tra basse frequenze e attività elettrica neuronale, molto più rapida (un potenziale d'azione neuronale dura circa 5 msec).

La connettività funzionale indagata tramite elettrodi intracellulari è spesso associata a frequenze del range γ (40-70 Hz), e mostra un elevato grado di coerenza sia su brevi che su lunghe distanze all'interno della corteccia cerebrale [19,38].

E' stato inoltre dimostrato che oscillazioni molto più lente, di frequenza inferiore a 0,1 Hz (scala temporale dei minuti), sono indicatori significativi di fluttuazioni coerenti a frequenze superiori (range γ) [38].

Le mappe di connettività funzionale ottenute con studi fMRI potrebbero quindi riprodurre un collegamento su larga scala esistente a livello neuronale [59].

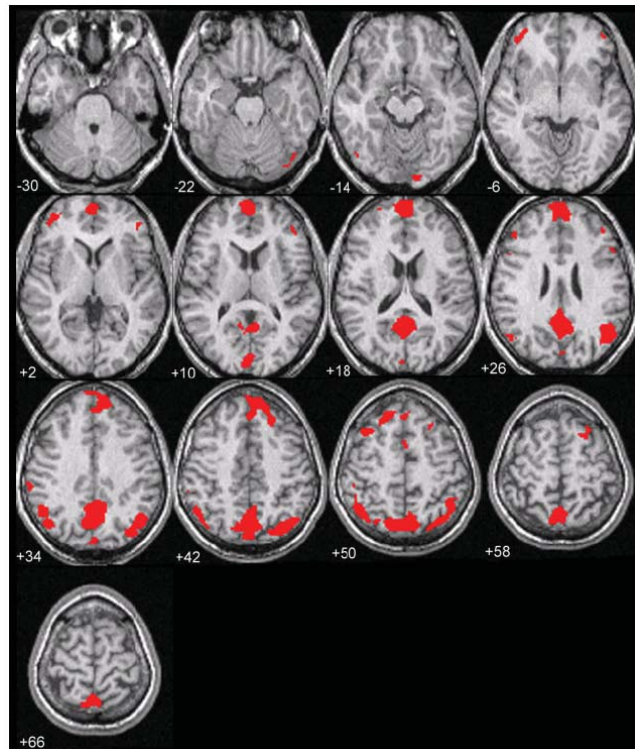


Fig. 3.8 Localizzazione delle *low frequency fluctuations* in uno studio di gruppo [17]

Le coordinate sono riferite allo spazio di Talairach.

3.6 Aree appartenenti alla default mode network

Appartengono alla *default mode network* aree dei lobi limbico, frontale, parietale e temporale, oltre all'ippocampo. Di tali regioni, in aggiunta alla denominazione ed alla corrispondente area di Brodmann (BA), è indicata in seguito la funzione putativa suggerita da precedenti studi funzionali (vedi Appendice C per la classificazione dei diversi tipi di memoria).

Lobo limbico:

- PCC Corteccia cingolata posteriore (BA 23,31) [3,13,23,59]
 - richiamo di memorie episodiche [8,21,42,44]
 - elaborazione di stati emozionali, integrazione fra emozione e memoria episodica [43]

- vACC Corteccia cingolata ventrale anteriore (BA 24) [3,17,23,61]
 - attività mentale riferita alla propria persona [26]

- PHG Giro paraippocampale (BA 25,27,35) [23,24]
 - memoria [53]

Lobo frontale:

- MPFC Corteccia prefrontale mediale (BA 10,12)
[17,23,24,26,61]
 - pensiero disgiunto da stimoli provenienti dall'ambiente circostante (*self-initiated thought*) [48]

L'attività della default mode network non si riduce durante la stimolazione sensoriale passiva [24,45]. Se però alla presentazione di stimoli visivi o uditivi è associato un compito da svolgere, la rete di riposo risulta attenuata in modo proporzionale alla difficoltà del compito. A tale proposito uno studio parametrico di riconoscimento di stimoli uditivi attesta che, al variare della discriminabilità dello stimolo, della frequenza di presentazione e del carico mnemonico, la deattivazione cresce con il carico cognitivo [49].

In accordo con quanto precedentemente esposto, al crescere della risposta corticale agli stimoli visivi e uditivi aumenta anche la correlazione della *default mode network* con le epoche di riposo del paradigma sperimentale [24].

La rete di riposo possiede infine un meccanismo di adattamento: in presenza di compiti ripetitivi l'attività della *default mode network* cresce con il ripetersi delle fasi sperimentali, suggerendo come la monotonia del compito possa ridurre l'attenzione prestata dal soggetto, che passa così all'attività mentale di natura introspettiva tipica dello stato di riposo [24].

3.8 Funzione della default mode network

Il ruolo della *default mode network* è stato recentemente indagato mediante esperimenti funzionali mirati. Le funzioni cognitive cui è stata associata la rete possono essere raccolte in due classi:

- memoria episodica [24,44]

Confrontando quattro tipi di compito (ricordi ed eventi personali, ricordi ed eventi non personali) con uno stato di controllo relativamente complesso (conteggio del numero di sillabe nelle parole ascoltate) è risultata attiva una rete sovrapponibile alla *default mode network* e comprendente corteccia cingolata posteriore (PCC), corteccia parietale inferiore (IPC), corteccia prefrontale mediale (MPFC), giro paraippocampico di sinistra (left PHG) e corteccia temporale inferiore di sinistra (left ITC) [44].

- processi mentali relativi al sè [27,31]

MPFC/vACC e precuneus/PCC sono risultati implicati nella riflessione e nella consapevolezza di sè [31], come anche nella formulazione di giudizi relativi alla propria persona e ad eventi con contenuto emotivo [27].

La *default mode network* è considerata come espressione delle interazioni esistenti tra reti funzionali. L'elevato grado di connettività riscontrato tra aree omologhe dei due emisferi sarebbe realizzato mediante connessioni transcallose [13,59].

3.9 Resting state networks

E' stata recentemente proposta l'esistenza di più reti di riposo (*Resting State Network*, RSN). Esistono al riguardo tre ipotesi principali:

- Coesistenza di due *resting state networks*: la prima, legata all'attenzione e ai processi cognitivi (*attention-cognition compartment*), fa capo alla corteccia cingolata posteriore (PCC) e realizza un'elaborazione di livello elevato,

presumibilmente conscia; la seconda è di natura vegetativa-somatica (*vegetative-somatic compartment*), fa riferimento alla corteccia cingolata ventrale anteriore (vACC) ed implica un'elaborazione forse inconscia [23,46]. Il cingolo posteriore è infatti collegato a regioni corticali superiori, mentre la corteccia cingolata anteriore è connessa a regioni paralimbiche e subcorticali, associate a processi emozionali e relativi al sistema nervoso autonomo (corteccia orbitofrontale, nucleus accumbens, ipotalamo) [12].

Dalla coordinazione dei due compartimenti avrebbe origine la regolazione degli stati autonomi e affettivi.

Avvalora questa ipotesi l'osservazione che le cortecce orbitofrontale e prefrontale mediale, implicate nell'integrazione di stimoli cognitivi ed emozionali [12,55,56], sono le sole regioni comuni ai pattern di connettività di PCC e vACC [23].

· Alternanza tra **attività mentale introspettiva** ed **allerta per possibili cambiamenti**, sia sotto forma di stati del corpo che di eventi di immediata rilevanza per l'individuo, con conseguente preparazione per l'esecuzione di compiti futuri [7,17].

L'introspezione è legata alle aree appartenenti alla *default mode network*: PCC, MPFC, vACC. La seconda rete di riposo è invece composta da corteccia premotoria (PM), area motoria supplementare (SMA), corteccia prefrontale dorsolaterale (DLPFC), area somatosensoriale secondaria (SII), corteccia parietale posteriore (PPC) ed insula. La corteccia cingolata posteriore mostra infatti correlazione positiva con MPFC e vACC, negativa con le aree cerebrali comprese nella seconda rete di riposo.

In accordo con questa ipotesi è stata osservata correlazione positiva a riposo tra banda β_2 (17-23 Hz) dell'EEG e *default mode network* (PCC e MPFC), mentre è presente una correlazione negativa tra banda α dell'EEG (8-12 Hz) e le aree fronto-parietali appartenenti alla seconda rete di riposo [36].

L'esistenza di una rete di riposo di natura sensori-motoria è suggerita anche dalla connettività funzionale a riposo riscontrata in un insieme di aree coinvolte nella funzione motoria [30].

- Presenza di almeno **cinque reti di riposo** riproducibili in soggetti diversi [3,13]:

RSN1 elaborazione visiva (corteccia striata ed extrastriata);

RSN2 *default mode network* (precuneo, polo anteriore, strutture della linea mediana tra cui talamo ed ipotalamo);

RSN3 controllo motorio e somatosensoriale (giro post-centrale, insula);

RSN4 "*where*" pathway vedi Appendice D

RSN5 "*what*" pathway vedi Appendice D

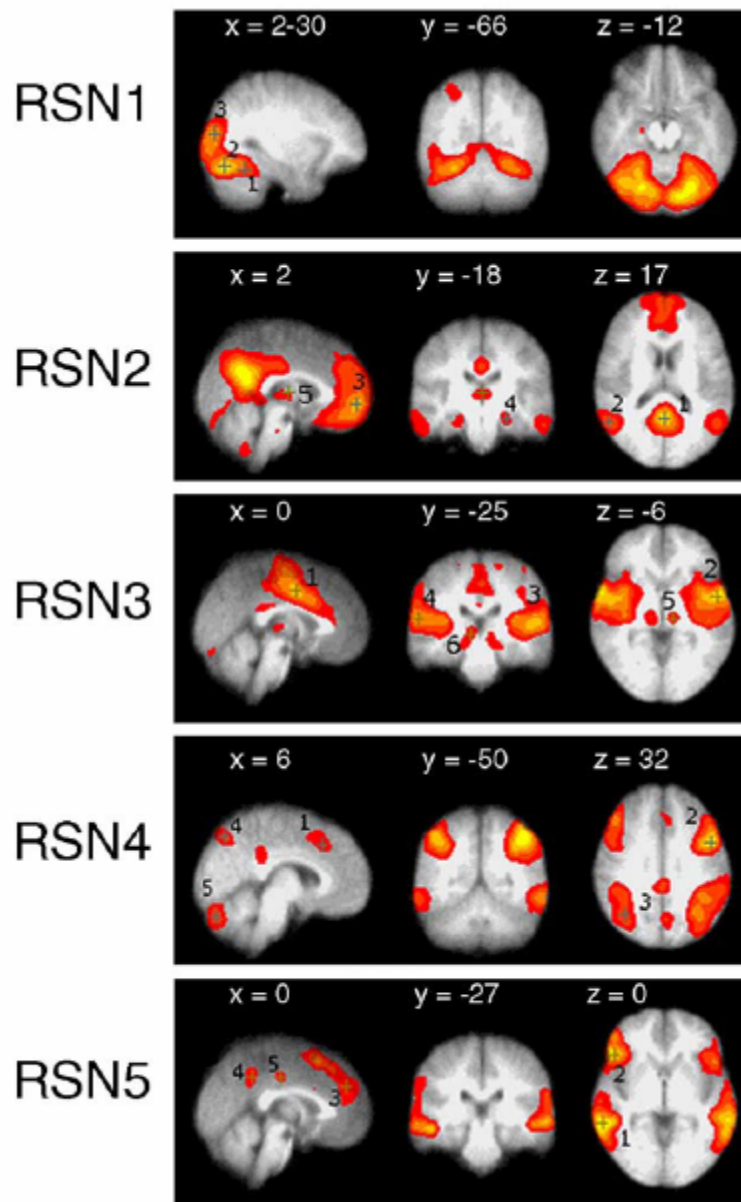


Fig. 3.9 Resting State Networks riproducibili in soggetti diversi [13]

Le coordinate sono relative allo standard anatomico del Montreal Neurological Institute.

3.10 Prospettive nell'analisi dello stato di riposo

Negli studi di risonanza magnetica funzionale la **condizione di controllo** è spesso rappresentata dallo stato di riposo. L'attività cerebrale associata a tale condizione è però ad oggi sostanzialmente sconosciuta.

Una scelta scorretta dello stato di controllo può nascondere il ruolo di aree che in tale condizione sono già attive. Ciò è stato riscontrato nello studio della corteccia cingolata posteriore, che non mostra un aumento di attività nel richiamo di memorie episodiche rispetto alla fissazione visiva; tale incremento può essere invece osservato scegliendo uno stato di controllo più complesso [8].

E' pertanto evidente come la conoscenza dei meccanismi mentali caratterizzanti lo stato di riposo sia fondamentale per l'interpretazione degli studi funzionali.

Il livello di correlazione tra l'attività della *default mode network* ed il paradigma di stimolazione può essere inoltre impiegato come indice dell'**attenzione** richiesta dal compito svolto, che distoglie il soggetto dal normale "corso mentale a riposo" [24].

Le maggiori potenzialità dell'analisi dello stato di riposo risiedono tuttavia nell'individuazione di alterazioni della connettività cerebrale associate a patologie neurologiche e psichiatriche [14,59]: ciò potrebbe infatti contribuire alla caratterizzazione fisiopatologica e alla diagnosi preclinica di tali malattie.

A tale proposito è importante considerare come lo studio fMRI dello stato di riposo prescinda dalla collaborazione attiva da parte del paziente, difficilmente raggiungibile in caso di patologie neurologicamente debilitanti.

Recenti studi mostrano una ridotta connettività funzionale in pazienti affetti da sclerosi multipla [41] e da schizofrenia [20,29].

Nel prossimo capitolo saranno esposte le ipotesi riguardanti la relazione tra *default mode network* e sindrome di **Alzheimer**.

Particolarmente interessante dal punto di vista neurofisiologico è infine il legame tra *default mode network* e **stato di coscienza**.

E' stato infatti osservato che l'attività della corteccia cingolata posteriore si riduce progressivamente con la perdita di coscienza durante la sedazione [16] e che le comunicazioni tra PCC e regioni prefrontali sono danneggiate nello stato vegetativo persistente [37].

“La default mode network, la cui attività scorre indisturbata fino ad un'interruzione ad opera di stimoli esterni, emerge ragionevolmente quale base neurale del flusso di coscienza”. Greicius et al. [24].

Bibliografia

1. Aharon I, Etcoff N, Ariely D, Chabris CF, O'Connor E, Breiter HC. Beautiful faces have variable reward value: fMRI and behavioral evidence. *Neuron*. 2001 Nov 8;32(3):537-51.
2. Baker SC, Rogers RD, Owen AM, Frith CD, Dolan RJ, Frackowiak RS, Robbins TW. Neural systems engaged by planning: a PET study of the Tower of London task. *Neuropsychologia*. 1996 Jun;34(6):515-26.

3. Beckmann CF, DeLuca M, Devlin JT, Smith SM. Investigations into resting-state connectivity using independent component analysis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2005 May 29;360(1457):1001-13.
4. Beckmann CF, Smith SM. Probabilistic independent component analysis for functional magnetic resonance imaging. *IEEE Trans Med Imaging.* 2004 Feb;23(2):137-52.
5. Binder JR, Frost JA, Hammeke TA, Bellgowan PS, Rao SM, Cox RW. Conceptual processing during the conscious resting state. A functional MRI study. *J Cogn Neurosci.* 1999 Jan;11(1):80-95.
6. Biswal BB, Yetkin FZ, Haughton VM, Hyde JS. Functional connectivity in the motor cortex of resting human brain using echo-planar MRI. *Magn Reson Med.* 1995; 34:537–541.
7. Bressler SL, Kelso JA. Cortical coordination dynamics and cognition. *Trends Cogn Sci.* 2001 Jan 1;5(1):26-36.
8. Cabeza R, Dolcos F, Graham R, Nyberg L. Similarities and differences in the neural correlates of episodic memory retrieval and working memory. *Neuroimage.* 2002 Jun;16(2):317-30.
9. Cordes D, Haughton V, Carew JD, Arfanakis K, Maravilla K. Hierarchical clustering to measure connectivity in fMRI resting-state data. *Magn Reson Imaging.* 2002 May;20(4):305-17.
10. Cordes D, Haughton VM, Arfanakis K, Carew JD, Turski PA, Moritz CH, Quigley MA, Meyerand ME. Frequencies contributing to functional connectivity in the cerebral cortex in "resting-state" data. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2001 Aug;22(7):1326-33.
11. Cordes D, Haughton VM, Arfanakis K, Wendt GJ, Turski PA, Moritz CH, Quigley MA, Meyerand ME. Mapping functionally related regions of brain with functional connectivity MR imaging. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2000 Oct;21(9):1636-44.

12. Damasio AR, Grabowski TJ, Bechara A, Damasio H, Ponto LL, Parvizi J, Hichwa RD. Subcortical and cortical brain activity during the feeling of self-generated emotions. *Nat Neurosci.* 2000 Oct;3(10):1049-56.
13. De Luca M, Beckmann CF, De Stefano N, Matthews PM, Smith SM. fMRI resting state networks define distinct modes of long-distance interactions in the human brain. *Neuroimage.* 2005 Oct 27.
14. De Luca M, Smith S, De Stefano N, Federico A, Matthews PM. Blood oxygenation level dependent contrast resting state networks are relevant to functional activity in the neocortical sensorimotor system. *Exp Brain Res.* 2005 Dec;167(4):587-94.
15. Desgranges B, Baron JC, Eustache F. The functional neuroanatomy of episodic memory: the role of the frontal lobes, the hippocampal formation, and other areas. *Neuroimage.* 1998 Aug;8(2):198-213.
16. Fiset P, Paus T, Daloze T, Plourde G, Meuret P, Bonhomme V, Hajj-Ali N, Backman SB, Evans AC. Brain mechanisms of propofol-induced loss of consciousness in humans: a positron emission tomographic study. *J Neurosci.* 1999 Jul 1;19(13):5506-13.
17. Fransson P. Spontaneous low-frequency BOLD signal fluctuations: an fMRI investigation of the resting-state default mode of brain function hypothesis. *Hum Brain Mapp.* 2005 Sep;26(1):15-29.
18. Friedman HR, Goldman-Rakic PS. Coactivation of prefrontal cortex and inferior parietal cortex in working memory tasks revealed by 2DG functional mapping in the rhesus monkey. *J Neurosci.* 1994 May;14(5 Pt 1):2775-88.
19. Fries P, Neuenschwander S, Engel AK, Goebel R, Singer W. Rapid feature selective neuronal synchronization through correlated latency shifting. *Nat Neurosci.* 2001 Feb;4(2):194-200.
20. Friston KJ. The disconnection hypothesis. *Schizophr Res.* 1998 Mar 10;30(2):115-25.

21. Fujii T, Okuda J, Tsukiura T, Ohtake H, Miura R, Fukatsu R, Suzuki K, Kawashima R, Itoh M, Fukuda H, Yamadori A. The role of the basal forebrain in episodic memory retrieval: a positron emission tomography study. *Neuroimage*. 2002 Mar;15(3):501-8.
22. Ghatan PH, Hsieh JC, Wirsén-Meurling A, Wredling R, Eriksson L, Stone-Elander S, Levander S, Ingvar M. Brain activation induced by the perceptual maze test: a PET study of cognitive performance. *Neuroimage*. 1995 Jun;2(2):112-24.
23. Greicius MD, Krasnow B, Reiss AL, Menon V. Functional connectivity in the resting brain: a network analysis of the default mode hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Jan 7;100(1):253-8.
24. Greicius MD, Menon V. Default-mode activity during a passive sensory task: uncoupled from deactivation but impacting activation. *J Cogn Neurosci*. 2004 Nov;16(9):1484-92.
25. Greicius MD, Srivastava G, Reiss AL, Menon V. Default-mode network activity distinguishes Alzheimer's disease from healthy aging: evidence from functional MRI. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Mar 30;101(13):4637-42.
26. Gusnard DA, Akbudak E, Shulman GL, Raichle ME. Medial prefrontal cortex and self-referential mental activity: relation to a default mode of brain function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Mar 27;98(7):4259-64.
27. Gusnard DA, Raichle ME, Raichle ME. Searching for a baseline: functional imaging and the resting human brain. *Nat Rev Neurosci*. 2001 Oct;2(10):685-94.
28. Hampson M, Peterson BS, Skudlarski P, Gatenby JC, Gore JC. Detection of functional connectivity using temporal correlations in MR images. *Hum Brain Mapp*. 2002 Apr;15(4):247-62.
29. Hoffman RE, McGlashan TH. Parallel distributed processing and the emergence of schizophrenic symptoms. *Schizophr Bull*. 1993;19(1):119-40.
30. Jiang T, He Y, Zang Y, Weng X. Modulation of functional connectivity during the resting state and the motor task. *Hum Brain Mapp*. 2004 May;22(1):63-71.

31. Johnson SC, Baxter LC, Wilder LS, Pipe JG, Heiserman JE, Prigatano GP. Neural correlates of self-reflection. *Brain*. 2002 Aug;125(Pt 8):1808-14.
32. Jonides J, Schumacher EH, Smith EE, Koeppel RA, Awh E, Reuter-Lorenz PA, Marshuetz C, Willis CR. The role of parietal cortex in verbal working memory. *J Neurosci*. 1998 Jul 1;18(13):5026-34.
33. Kiviniemi V, Jauhiainen J, Tervonen O, Paakko E, Oikarinen J, Vainionpaa V, Rantala H, Biswal B. Slow vasomotor fluctuation in fMRI of anesthetized child brain. *Magn Reson Med*. 2000 Sep;44(3):373-8.
34. Koch MA, Norris DG, Hund-Georgiadis M. An investigation of functional and anatomical connectivity using magnetic resonance imaging. *Neuroimage*. 2002 May;16(1):241-50.
35. Krueger G, Glover GH. Physiological noise in oxygenationsensitive magnetic resonance imaging. *Magn Reson Med*. 2001; 46:631–637.
36. Laufs H, Krakow K, Sterzer P, Eger E, Beyerle A, Salek-Haddadi A, Kleinschmidt A. Electroencephalographic signatures of attentional and cognitive default modes in spontaneous brain activity fluctuations at rest. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Sep 16;100(19):11053-8.
37. Laureys S, Goldman S, Phillips C, Van Bogaert P, Aerts J, Luxen A, Franck G, Maquet P. Impaired effective cortical connectivity in vegetative state: preliminary investigation using PET. *Neuroimage*. 1999 Apr;9(4):377-82.
38. Leopold DA, Murayama Y, Logothetis NK. Very slow activity fluctuations in monkey visual cortex: implications for functional brain imaging. *Cereb Cortex*. 2003 Apr;13(4):422-33.
39. Lowe MJ, Dzemidzic M, Lurito JT, Mathews VP, Phillips MD. Correlations in low-frequency BOLD fluctuations reflect cortico-cortical connections. *Neuroimage*. 2000 Nov;12(5):582-7.

40. Lowe MJ, Mock BJ, Sorenson JA. Functional connectivity in single and multislice echoplanar imaging using resting-state fluctuations. *Neuroimage*. 1998 Feb;7(2):119-32.
41. Lowe MJ, Phillips MD, Lurito JT, Mattson D, Dzemidzic M, Mathews VP. Multiple sclerosis: low-frequency temporal blood oxygen level-dependent fluctuations indicate reduced functional connectivity initial results. *Radiology*. 2002 Jul;224(1):184-92.
42. Maddock RJ, Garrett AS, Buonocore MH. Remembering familiar people: the posterior cingulate cortex and autobiographical memory retrieval. *Neuroscience*. 2001;104(3):667-76.
43. Maddock RJ. The retrosplenial cortex and emotion: new insights from functional neuroimaging of the human brain. *Trends Neurosci*. 1999 Jul;22(7):310-6.
44. Maguire EA, Mummery CJ. Differential modulation of a common memory retrieval network revealed by positron emission tomography. *Hippocampus*. 1999;9(1):54-61.
45. Marx E, Deutschlander A, Stephan T, Dieterich M, Wiesmann M, Brandt T. Eyes open and eyes closed as rest conditions: impact on brain activation patterns. *Neuroimage*. 2004 Apr;21(4):1818-24.
46. Mayberg HS. Limbic-cortical dysregulation: a proposed model of depression. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*. 1997 Summer;9(3):471-81.
47. Mazoyer B, Zago L, Mellet E, Bricogne S, Etard O, Houde O, Crivello F, Joliot M, Petit L, Tzourio-Mazoyer N. Cortical networks for working memory and executive functions sustain the conscious resting state in man. *Brain Res Bull*. 2001 Feb;54(3):287-98.
48. McGuire PK, Paulesu E, Frackowiak RS, Frith CD. Brain activity during stimulus independent thought. *Neuroreport*. 1996 Sep 2;7(13):2095-9.
49. McKiernan KA, Kaufman JN, Kucera-Thompson J, Binder JR. A parametric manipulation of factors affecting task-induced deactivation in functional neuroimaging. *J Cogn Neurosci*. 2003 Apr 1;15(3):394-408.

50. Mitra PP, Ogawa S, Hu X, Ugurbil K. The nature of spatiotemporal changes in cerebral hemodynamics as manifested in functional magnetic resonance imaging. *Magn Reson Med.* 1997 Apr;37(4):511-8.
51. Petrides M. The role of the mid-dorsolateral prefrontal cortex in working memory. *Exp Brain Res.* 2000 Jul;133(1):44-54.
52. Raichle ME, MacLeod AM, Snyder AZ, Powers WJ, Gusnard DA, Shulman GL. A default mode of brain function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Jan 16;98(2):676-82.
53. Saykin AJ, Johnson SC, Flashman LA, McAllister TW, Sparling M, Darcey TM, Moritz CH, Guerin SJ, Weaver J, Mamourian A. Functional differentiation of medial temporal and frontal regions involved in processing novel and familiar words: an fMRI study. *Brain.* 1999 Oct;122 (Pt 10):1963-71.
54. Shulman GL, Fiez JA, Corbetta M, Buckner RL, Miezin FM, Raichle ME, Petersen SE. Common blood flow changes across visual tasks: II. Decreases in cerebral cortex. *J Cogn Neurosci.* 1997; 9:648–663.
55. Simpson JR Jr, Drevets WC, Snyder AZ, Gusnard DA, Raichle ME. Emotion-induced changes in human medial prefrontal cortex: II. During anticipatory anxiety. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Jan 16;98(2):688-93.
56. Simpson JR Jr, Snyder AZ, Gusnard DA, Raichle ME. Emotion-induced changes in human medial prefrontal cortex: I. During cognitive task performance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Jan 16;98(2):683-7.
57. Thirion B, Dodel S, Poline JB. Detection of signal synchronizations in resting-state fMRI datasets. *Neuroimage.* 2006 Jan 1;29(1):321-7.
58. Ungerleider LG, Haxby JV. 'What' and 'where' in the human brain. *Curr Opin Neurobiol.* 1994 Apr;4(2):157-65.
59. Van de Ven VG, Formisano E, Prvulovic D, Roeder CH, Linden DE. Functional connectivity as revealed by spatial independent component analysis of fMRI measurements during rest. *Hum Brain Mapp.* 2004 Jul;22(3):165-78.

60. Warburton E, Wise RJ, Price CJ, Weiller C, Hadar U, Ramsay S, Frackowiak RS. Noun and verb retrieval by normal subjects. Studies with PET. *Brain*. 1996 Feb;119 (Pt 1):159-79.
61. Wicker B, Ruby P, Royet JP, Fonlupt P. A relation between rest and the self in the brain? *Brain Res Brain Res Rev*. 2003 Oct;43(2):224-30.
62. Wise RG, Ide K, Poulin MJ, Tracey I. Resting fluctuations in arterial carbon dioxide induce significant low frequency variations in BOLD signal. *Neuroimage*. 2004 Apr;21(4):1652-64.
63. Xiong J, Parsons LM, Gao JH, Fox PT. Interregional connectivity to primary motor cortex revealed using MRI resting state images. *Hum Brain Mapp*. 1999;8(2-3):151-6.

Capitolo 4

ELABORAZIONE DEI DATI

Nel presente lavoro di tesi sono state realizzate e descritte tutte le fasi di uno studio di risonanza magnetica funzionale dello stato di riposo, dall'acquisizione delle immagini alla elaborazione dei dati mediante Analisi delle Componenti Indipendenti (ICA). Oggetto di ricerca è stata la presenza di alterazioni della connettività cerebrale spontanea in pazienti affetti dalla sindrome di Alzheimer.

4.1 Acquisizione dei dati

Le acquisizioni MRI sono state svolte presso il reparto di Neuroradiologia dell'ospedale Santa Chiara di Pisa con uno scanner Siemens Symphony al campo magnetico statico di 1,5 T.

Le immagini anatomiche sono state acquisite con sequenze 3D pesate in T1 (risoluzione 0.9765 x 0.9765 x 1 mm, TR 2160 msec, TE 3.93 msec). Il volume di interesse è stato allineato alla congiungente le commissure anteriore (AC) e posteriore (PC), così da semplificare la successiva normalizzazione delle immagini.

Le immagini fMRI sono state ottenute con una sequenza EPI (Echo Planar Imaging) di risoluzione 3.4375 x 3.4375 x 5 cm, TR 2100 msec, TE 60 msec. Ogni serie

funzionale si compone di 60 volumi; è stato chiesto ai soggetti di tenere gli occhi chiusi durante l'acquisizione e non pensare a niente in particolare.

Hanno partecipato allo studio 38 soggetti, suddivisi in quattro categorie: controlli giovani (età inferiore a 50 anni al momento dell'esame), controlli anziani, soggetti con lieve deficit cognitivo (Mild Cognitive Impairment, MCI) e pazienti con diagnosi di Alzheimer.

I soggetti MCI sono stati inseriti nello studio perchè il deficit cognitivo lieve è considerato uno stadio intermedio nell'insorgere della sindrome di Alzheimer: circa la metà dei soggetti MCI evolvono in AD nell'arco di cinque anni [7].

AD		MCI	
ID	Data di nascita	ID	Data di nascita
BAMA	06/08/1933	DELI	19/06/1936
FRPI	27/04/1943	ORLU	10/09/1930
GRBR	12/12/1931	ROLU	17/04/1939
MAMA	02/11/1933	SADE	25/01/1932
MAVA	27/11/1944	TAGR	30/12/1941
SCAR	29/01/1932		
STNO	06/12/1937		
TAAL	04/01/1929		
VIFI	14/01/1930		

Controlli anziani		Controlli giovani	
ID	Data di nascita	ID	Data di nascita
CISA	04/01/1951	BALU	31/08/1980
CORE	02/01/1940	BAVI	19/07/1968
CRIO	28/05/1930	BIEL	15/08/1982
CUST	11/11/1953	CADA	07/11/1974
FRAN	03/12/1936	CIPA	01/10/1963
GOAN	03/08/1944	DUIV	14/04/1982
GUGI	19/11/1942	FEBE	22/08/1986
MARO	06/12/1936	PIMA	14/01/1977
PALU	20/08/1939	RAST	16/09/1983
TRLI	16/07/1934	RIPI	10/03/1979
		SAVE	23/09/1972
		TAAN	19/05/1956
		TOAN	22/08/1962
		TRIL	11/06/1973

Tabella 4.1 Soggetti partecipanti allo studio.

4.2 Preprocessing dei dati MRI

I dati in formato DICOM (Digital Imaging and Communications in Medicine) prodotti dallo scanner MR sono stati elaborati con il software BrainVoyager QX, versione 1.7.

Le immagini componenti la serie anatomica sono state raccolte in un unico file (VMR) e ricampionate in modo da ricondurre l'immagine alle stessa dimensione nelle tre dimensioni dello spazio (risoluzione del file VMR: 1mm x 1mm x 1mm).

Il volume anatomico è stato quindi normalizzato, per consentire il confronto di dati provenienti da individui diversi. Il cervello del singolo soggetto è ricondotto ad un riferimento standard, detto spazio stereotassico: il volume viene inizialmente ruotato in modo da porre commissura anteriore e posteriore su uno stesso piano (trasformazione AC-PC), quindi viene realizzata la **trasformazione nello spazio di Talairach** in base alla posizione di sei punti di riferimento (commissura anteriore e posteriore, estremi superiore, inferiore, anteriore, posteriore, destro e sinistro del cervello).

Le serie funzionali sono riorganizzate in un file FMR: ad ogni voxel dell'immagine è associato il relativo *time course* (TC), cioè l'andamento temporale del segnale nella regione cerebrale specificata.

I primi due volumi di ogni serie funzionale sono stati scartati per evitare artefatti da saturazione magnetica.

Il preprocessing dei dati funzionali prevede le seguenti fasi di elaborazione:

- ***Slice scan time correction***. Correzione del ritardo temporale tra una sezione e la successiva nell'acquisizione di ogni volume.

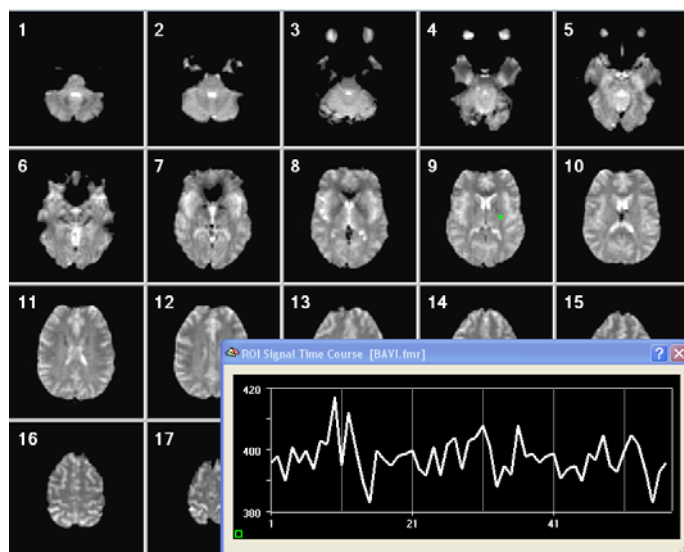


Figura 4.1 Serie funzionale

L'immagine rappresenta il primo volume di una serie funzionale (BAVI, controllo giovane). Il grafico in primo piano mostra l'andamento temporale del segnale fMRI nel voxel evidenziato in verde nella sezione numero 9.

- **3D motion correction.** Correzione dei movimenti del paziente: il programma stima i parametri di traslazione e rotazione tra volumi successivi della serie funzionale; l'efficacia della correzione si riduce con l'entità del movimento. In base all'evoluzione dei parametri di roto-traslazione nel corso dell'esame lo sperimentatore può decidere l'esclusione del soggetto dallo studio.
- **Spatial smoothing.** Filtraggio spaziale passa basso, diretto ad aumentare il rapporto segnale-rumore (SNR, Signal-to-Noise Ratio). E' realizzato mediante convoluzione delle immagini con un filtro gaussiano tridimensionale caratterizzato da FWHM (Full Width at Half Maximum) pari a 4 mm.

- **Linear trend removal.** Filtraggio temporale: rimozione dai dati di trend lineari, presumibilmente legati a derive del segnale non dovute dall'attivazione neuronale.

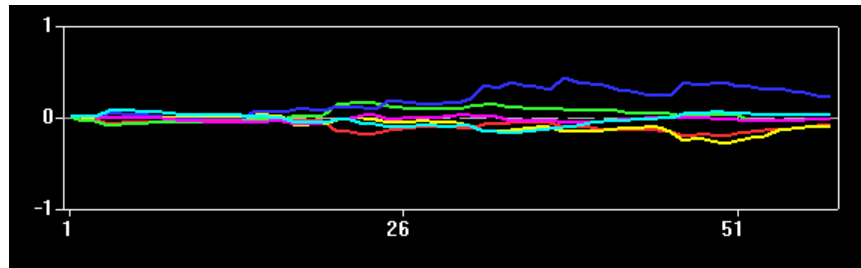


Figura 4.2 3D motion correction

Evoluzione temporale dei parametri di rototraslazione nel corso dell'acquisizione funzionale.

Le serie funzionale ed anatomica sono successivamente coregistrate, così da mappare le attivazioni fMRI su una immagine ad elevata risoluzione.

La **coregistrazione** automatica consta di due fasi:

- *Initial alignment.* Allineamento grossolano delle immagini anatomica e funzionale: identificazione delle sezioni assiale, sagittale e coronale.
- *Fine alignment.* Stima dei parametri di traslazione e rotazione che determinano il migliore allineamento tra i due set di dati.

Il risultato della coregistrazione automatica può essere visualizzato e corretto manualmente.

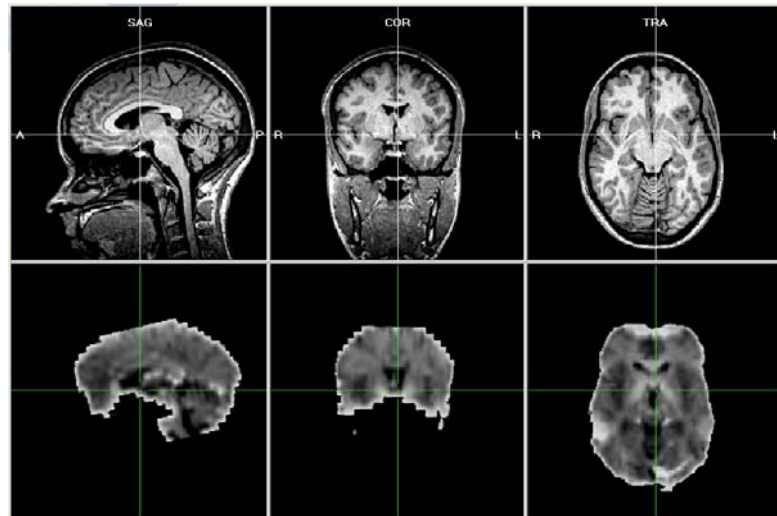


Figura 4.3 Coregistrazione delle serie funzionale ed anatomica (BALU, controllo giovane)

Le immagini fMRI preprocessate e le informazioni relative a coregistrazione e normalizzazione sono quindi riunite in un unico file (VTC), che sarà oggetto delle elaborazioni successive.

4.3 Analisi delle componenti indipendenti

L'ICA è una tecnica di analisi statistica multivariata; appartiene alle metodiche di tipo esplorativo (*data driven*), basate su assunzioni generali riguardo alla formazione dei segnali, in contrapposizione alle analisi inferenziali (*hypothesis driven*), che rivelano soltanto i fenomeni precedentemente modellati.

L'analisi delle componenti indipendenti risolve il problema della *Blind Source Separation* (BSS), trova cioè le sorgenti che hanno generato i dati originali; la natura multicanale delle acquisizioni è impiegata per individuare gli elementi informativi comuni ai diversi canali.

L'ICA presuppone un modello di **mixing lineare istantaneo**: i dati acquisiti dai sensori sono considerati come combinazione lineare dei segnali prodotti dalle sorgenti indipendenti.

Il processo di mixing può essere descritto algebricamente come segue [2]:

$$X = A \cdot S \quad \text{Equazione 4.1}$$

dove:

S = matrice dei segnali prodotti dalle m sorgenti indipendenti (m x t)

X = matrice dei segnali registrati dagli n sensori (n x t)

A = **matrice di mixing** (n x m)

Affinchè il sistema sia risolubile è necessario che il numero di sorgenti non superi quello dei sensori, cioè che:

$$n \geq m \quad \text{Equazione 4.2}$$

Risolvere il problema BSS equivale a trovare la **matrice di unmixing** W tale che:

$$Y = W \cdot x \approx S \quad \text{Equazione 4.3}$$

Gli algoritmi che implementano l'analisi delle componenti indipendenti sono basati sul **teorema del limite centrale**, secondo cui la somma di variabili indipendenti ha distribuzione gaussiana. Ne consegue che la combinazione lineare delle sorgenti è più gaussiana delle sorgenti stesse, quindi la matrice di unmixing può essere calcolata come insieme di coefficienti che minimizzano la gaussianità della seguente sommatoria:

$$y(j) = \sum_i^n w_i x_i \quad \text{Equazione 4.4}$$

dove $y(j)$ rappresenta la stima della j -esima sorgente, vale a dire la j -esima **componente indipendente (IC)**.

Nell'ambito delle tecniche di analisi non inferenziale, l'analisi delle componenti indipendenti rappresenta uno strumento statistico più potente dell'analisi delle componenti principali (PCA), dato che l'indipendenza rappresenta una condizione più stringente dell'incorrelazione: variabili aleatorie indipendenti sono anche incorrelate, ma non è vero il contrario.

Rispetto alla PCA, le componenti stimate dalla ICA non conservano però le informazioni relative ad ordinamento, segno e scala delle sorgenti originali.

4.4 ICA-fMRI

L'applicazione dell'analisi delle componenti indipendenti ai dati di risonanza magnetica funzionale sottintende l'ipotesi che le attivazioni siano statisticamente indipendenti da fenomeni di altra natura, sia biologica che strumentale, che

contribuiscono al segnale fMRI (battito cardiaco, respirazione, movimenti del soggetto, rumore termico dovuto ai componenti elettronici di trasmissione e ricezione del segnale RF).

E' possibile applicare l'ICA ad una serie temporale di immagini in due modi alternativi [1]:

- **sICA** Indipendenza spaziale: l'intensità del voxel in una componente non dà informazione sull'intensità dello stesso voxel nelle altre IC.
- **tICA** Indipendenza temporale: l'evoluzione temporale di una componente non dà informazione sul time course associato alle altre IC.

L'indipendenza spaziale è generalmente preferita a quella temporale. Nei dati fMRI possono infatti esistere più sorgenti correlate temporalmente, come ad esempio le IC associate ad attivazione funzionale e ad artefatti da movimento, entrambe legate alla presentazione dello stimolo. Un'analisi tICA non potrebbe distinguere tra tali componenti, al contrario di una sICA.

Parallelamente, le attivazioni fMRI riguardano una piccola frazione dei voxel in esame; l'indipendenza spaziale delle sorgenti rappresenta pertanto un vincolo meno stringente di quella temporale.

In accordo con quanto precedentemente esposto, per l'elaborazione dei dati acquisiti è stato scelto un criterio di indipendenza spaziale.

Ogni componente indipendente prodotta dalla sICA è una nuova immagine, che descrive un particolare fenomeno alla base del segnale fMRI. Alle IC sono associati i

relativi *time course* (TC), che definiscono la modulazione della componente nella generazione dei dati funzionali.

4.5 ICA dello stato di riposo

L'analisi ICA dei dati funzionali relativi allo stato di riposo è stata realizzata con il tool Independent Component Analysis di BrainVoyager QX.

Per effettuare la decomposizione è necessario definire il numero di componenti indipendenti che devono essere estratte dai dati, cioè il numero di sorgenti supposte all'origine del segnale fMRI.

Tale valore guida la selezione delle componenti principali nella fase preliminare di **sbiancamento o decorrelazione**: l'analisi ICA è infatti preceduta da una PCA, che riduce la dimensionalità dei dati e genera variabili aleatorie incorrelate, a media nulla e varianza unitaria, in modo da semplificare i calcoli successivi dell'algoritmo ICA [1].

La scelta del numero di componenti indipendenti influenza significativamente il risultato dell'analisi: riducendo troppo il numero di IC non è possibile separare i potenziali fenomeni di interesse (**sottorappresentazione delle sorgenti**), mentre con un numero eccessivo di IC le sorgenti dei dati possono risultare erroneamente dissociate (**sovrarappresentazione delle sorgenti**) [4].

Non esiste ad oggi un metodo condiviso per definire il numero di sorgenti alla base di un particolare set di dati; generalmente tale valore risulta compreso tra un quarto ed un quinto del numero di volumi dell'analisi funzionale [3,5].

Il presente studio dello stato di riposo ha compreso pertanto una fase preliminare di ricerca del numero ottimo di componenti indipendenti per l'individuazione della *default mode network*.

La conoscenza a priori delle regioni appartenenti alla rete di riposo ha guidato la valutazione delle decomposizioni al variare del numero di IC; per acquisizioni funzionali di 60 volumi la migliore corrispondenza con la DMN è stata osservata per un numero di componenti indipendenti pari a 30.

4.6 Mappe di attivazione

Le componenti indipendenti prodotte dall'ICA sono immagini tridimensionali del volume di interesse: ad ogni voxel è associato un valore di intensità che, pesato per il *time course* di componente, va a comporre il segnale del voxel corrispondente nella serie funzionale.

Le componenti indipendenti sono convertite in mappe di attivazione mediante sostituzione del valore di intensità con il relativo **z-score** [1]:

$$z = \frac{x - \mu}{\sigma} \quad \text{Equazione 4.5}$$

dove:

x = intensità del voxel in esame

μ = intensità media dei voxel dell'immagine

σ = deviazione standard dei valori di intensità

Per la visualizzazione della **mappa di attivazione** viene scelta una soglia z_{th} ; due scale di colore rappresentano i valori positivi e negativi di z tali che:

$$|z| \geq z_{th} \quad \text{Equazione 4.6}$$

Poichè l'ICA non conserva il segno delle sorgenti originali, z-score positivi non sono indice di attivazione. In particolare, una componente indipendente è equivalente alla stessa IC cambiata di segno, a patto di invertire anche il segno del relativo *time course*: non varia infatti il contributo della componente nella formazione delle immagini funzionali.

All'interno di una stessa IC, valori positivi e negativi di z-score individuano voxel modulati in controfase dal TC di componente.

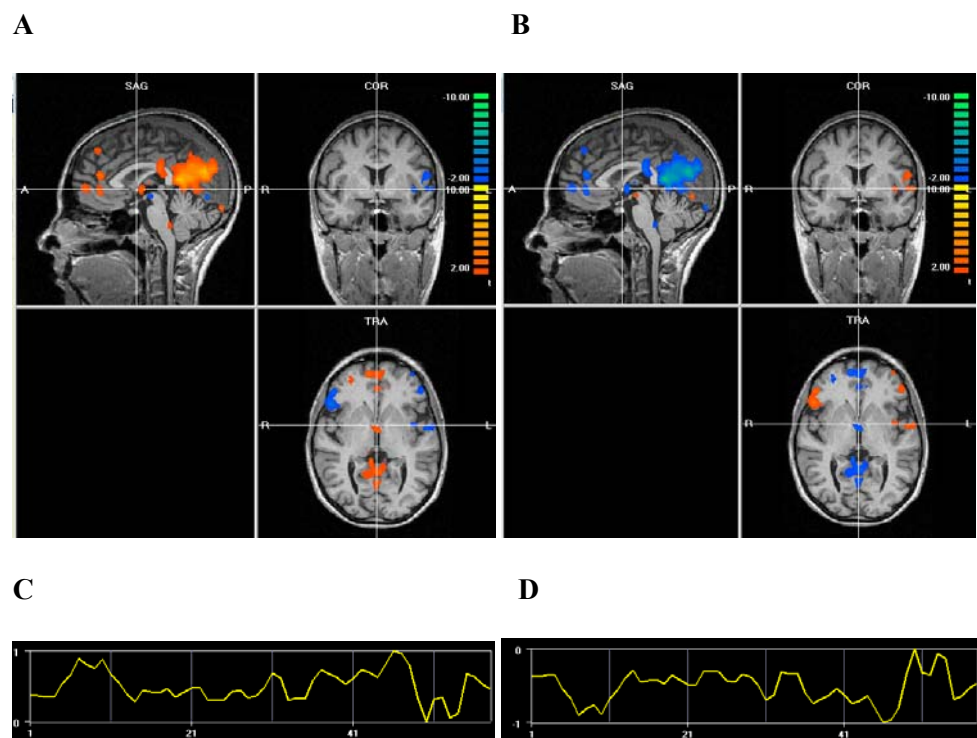


Fig. 4.4 Equivalenza delle IC in A e C, cui corrispondono TC di segno opposto (C e D, rispettivamente).

4.7 Significato delle componenti indipendenti

Le componenti prodotte dalla decomposizione ICA rappresentano fenomeni indipendenti i cui effetti si sovrappongono nella generazione dei dati fMRI.

In aggiunta ai circuiti neuronali attivi durante l'acquisizione delle immagini funzionali, possibili sorgenti aggiuntive sono costituite dal rumore strumentale e fisiologico (battito cardiaco, respirazione, presenza di grossi vasi sanguigni) e dai movimenti del soggetto [6].

Le componenti artefattuali possono essere distinte da quelle di segnale in base al contenuto frequenziale ed alla morfologia: le IC legate a rumore strumentale hanno una distribuzione relativamente uniforme all'interno del volume di interesse, mentre gli artefatti venosi sono localizzati in prossimità di vasi sanguigni di grandi dimensioni; gli artefatti da movimento mostrano infine una caratteristica forma ad anello.

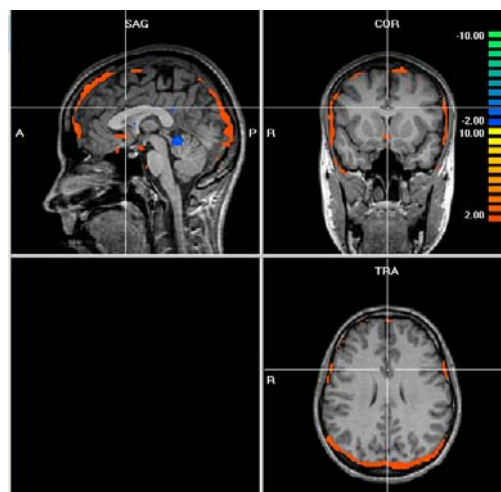


Fig. 4.5 Artefatto da movimento

4.8 Self organizing group ICA

La presenza nel singolo soggetto di una particolare attivazione non è significativa da un punto di vista statistico: occorre pertanto uno studio di gruppo per verificare la consistenza delle componenti trovate.

La *self organizing group ICA* (sogICA) è una metodica di clustering gerarchico che confronta le componenti indipendenti dei singoli soggetti e le raccoglie in gruppi di IC simili; la **matrice di similarità** (SM) tra le componenti è definita in base ai criteri sia spaziali che temporali [4]:

$$SM(i, j) = \lambda \cdot CCs(i, j) + (1 - \lambda)CCt(i, j) \quad \text{Equazione 4.7}$$

dove:

SM(i,j) = similarità tra i-esima e j-esima componente

λ = peso relativo della similarità spaziale ($\lambda = 0 \div 1$)

CCs(i,j) = coefficiente di correlazione spaziale tra le componenti i e j

CCt(i,j) = coefficiente di correlazione temporale tra le componenti i e j

Nel presente studio il coefficiente λ è stato posto uguale a 1, cioè la similarità tra le IC dei diversi soggetti è stata valutata unicamente in base ad un criterio spaziale.

Ciascun cluster è formato da una componente indipendente per ogni soggetto. Dalle IC di ogni cluster possono essere ricavate le mappe medie di componente.

4.9 Template della default mode network

Dalla sogICA delle serie funzionali di 7 controlli giovani (BALU, BIEL, CIPA, FEBE, RIPI, TOAN e TRIL) è stato ottenuto il *template* spaziale della *default mode network* individuando il cluster morfologicamente più simile alla rete di riposo e calcolandone la mappa media.

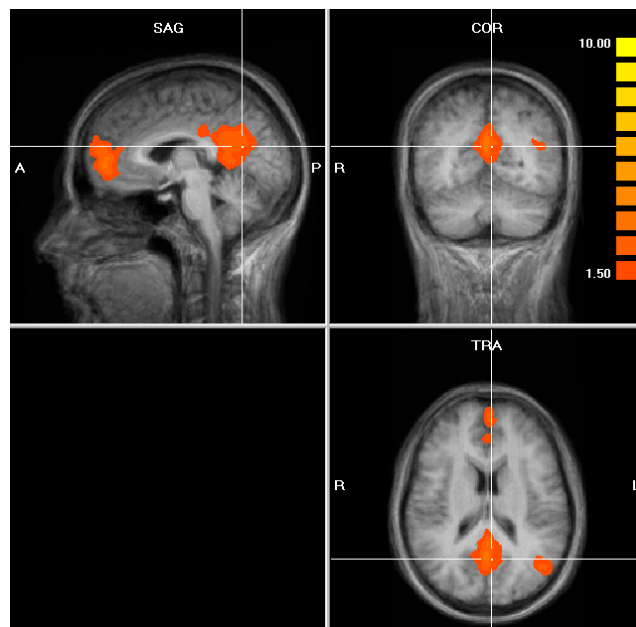


Fig.4.6 Template della default mode network

Il template è sovrapposto all'immagine anatomica media dei 7 controlli giovani da cui è stato tratto il modello spaziale della DMN.

E' di seguito riportata la correlazione spaziale del *template* con le componenti indipendenti da cui è stato ottenuto:

Controlli giovani (template)	Correlazione
BALU	0,187
BIEL	0,4
CIPA	0,307
FEBE	0,174
RIPI	0,23
TOAN	0,32
TRIL	0,406

Tabella 4.2 Correlazione spaziale tra il *template* della DMN e le IC da cui è stato ottenuto.

Bibliografia

1. Beckmann CF, DeLuca M, Devlin JT, Smith SM. Investigations into resting-state connectivity using independent component analysis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2005 May 29;360(1457):1001-13.
2. Brown GD, Yamada S, Sejnowski TJ. Independent component analysis at the neural cocktail party. *Trends Neurosci.* 2001 Jan;24(1):54-63.
3. Cordes D, Nandy RR. Estimation of the intrinsic dimensionality of fMRI data. *Neuroimage.* 2006 Jan 1;29(1):145-54.
4. Esposito F, Scarabino T, Hyvarinen A, Himberg J, Formisano E, Comani S, Tedeschi G, Goebel R, Seifritz E, Di Salle F. Independent component analysis of

- fMRI group studies by self-organizing clustering. *Neuroimage*. 2005 Mar;25(1):193-205.
5. Greicius MD, Menon V. Default-mode activity during a passive sensory task: uncoupled from deactivation but impacting activation. *J Cogn Neurosci*. 2004 Nov;16(9):1484-92.
 6. McKeown MJ, Jung TP, Makeig S, Brown G, Kindermann SS, Lee TW, Sejnowski TJ. Spatially independent activity patterns in functional MRI data during the stroop color-naming task. *Neuroimage*. 2006 Jan 1;29(1):321-7.
 7. Rombouts SA, Barkhof F, Goekoop R, Stam CJ, Scheltens P. Altered resting state networks in mild cognitive impairment and mild Alzheimer's disease: an fMRI study. *Hum Brain Mapp*. 2005 Dec;26(4):231-9.

Capitolo 5

RISULTATI DELLO STUDIO

La sindrome di Alzheimer (*Alzheimer's disease, AD*) è una patologia neurodegenerativa caratterizzata da deterioramento cognitivo progressivo. Rappresenta ad oggi la causa più comune di demenza e colpisce nel mondo 25 milioni di persone [3]: ne è affetta il 10% della popolazione oltre i 65 anni di età, ma la prevalenza sale al 50% tra gli individui che hanno superato gli 85 anni [9].

I recenti progressi nel trattamento della sindrome di Alzheimer hanno determinato un crescente interesse nei confronti di possibili marker preclinici della malattia, che permetterebbero di anticiparne e monitorarne la terapia.

5.1 Marker preclinici della sindrome di Alzheimer

I marker AD attualmente oggetto di studio sono rappresentati da:

- **Test neuropsicologici.** Memoria episodica, memoria semantica (vedi Appendice C per la classificazione dei tipi di memoria), attenzione e rapidità mentale risultano significativamente ridotte nei pazienti MCI che convertiranno in AD [3].

- **Marker biologici.** Variazioni della concentrazione plasmatica di residuo 42 della β -amiloide e del livello di proteine tau nel fluido cerebrospinale sono stati collegati ad una maggiore probabilità di evoluzione della malattia [6].
- **Marker genetici.** I geni PS1 e PS2 (Presenilina 1 e 2) e l'allele $\epsilon 4$ dell'apolipoproteina E (ApoE $\epsilon 4$) determinano una predisposizione genetica alla sindrome di Alzheimer [9].
- **Attività α dell'EEG.** La localizzazione delle sorgenti di attività α dell'EEG varia tra controlli sani e pazienti AD [8].
- **Neuroimaging strutturale.** L'atrofia corticale è significativamente maggiore nei pazienti MCI che convertono in AD; la perdita di materia grigia colpisce prevalentemente ippocampo, giro temporale medio ed inferiore, cingolo posteriore e precuneo [1,2].
- **Neuroimaging funzionale.** Studi di medicina nucleare hanno mostrato un ridotto metabolismo della corteccia cingolata posteriore nei pazienti MCI che convertono in AD [5,7], come anche nei soggetti con predisposizione genetica a sviluppare la sindrome di Alzheimer [9].

Prediction of AD conversion in people with MCI

Cognitive tests

Episodic memory

Delayed word-list recall (sensitivity 75–85%, specificity 80%)

Delayed story recall

Associative learning

Semantic memory

Category fluency (sensitivity 70–75%, specificity 65–70%)

Knowledge of famous faces

Mental speed (sensitivity 70–75%, specificity 65–70%)

Structural neuroimaging

MRI volumetry (ERC, HC; sensitivity 50%, specificity 90%, accuracy 81%)

Visual rating scale (MTL atrophy; sensitivity 70–78%, specificity 68–90%)

Brain atrophy rates (HC, ERC, ventricular volume)

Diffusion-weighted MRI (apparent diffusion coefficient)

Functional neuroimaging

SPECT (blood flow at cingulate, left frontal regions; sensitivity 80%, specificity 80%)

PET (glucose metabolism in temporoparietal region; accuracy 75%)

fMRI (recruitment of larger extent of right parahippocampal gyrus during encoding)

Other tests

EEG (alpha, beta, and theta activities; accuracy 85%)

CSF total-tau concentration (sensitivity 90%, specificity 100%)

CSF phosphorylated-tau concentration

Combined tests

Memory tests and imaging

Delayed recall and MTL atrophy (sensitivity 50%, specificity 90%)

Block design and PET

Neuroimaging (SPECT and MRI volumetry)

CSF-tau and SPECT (sensitivity 89%, specificity 90%)

Tabella 5.1 Marker preclinici della sindrome di Alzheimer [3].

5.2 Legame tra sindrome di Alzheimer e default mode network

Una nuova frontiera nella ricerca di un marker preclinico della sindrome di Alzheimer è rappresentata dallo studio fMRI dello stato di riposo.

Questo tipo di analisi mostra infatti numerosi vantaggi in prospettiva di una applicazione clinica: evidenzia un'alterazione effettivamente presente nel soggetto e non la semplice predisposizione alla malattia, ciò senza fare uso di radiazioni ionizzanti come avviene invece per PET e SPECT; non implica la segmentazione delle immagini, risultando pertanto meno laboriosa di un'analisi morfologica di atrofia corticale, e prescinde dalla collaborazione attiva del paziente.

La relazione esistente tra sindrome di Alzheimer e *default mode network* è stata indagata secondo tre direttive principali:

- **Sincronia funzionale.** Valutazione del coefficiente di cross-correlazione tra le fluttuazioni spontanee a bassa frequenza (*Spontaneous Low-frequency Fluctuations*, SLF) dei voxel appartenenti alla regione ippocampale [6].
- **Entità della deattivazione.** Durante lo svolgimento di compiti cognitivi complessi i soggetti MCI mostrano deattivazione minore rispetto ai controlli sani, ma maggiore rispetto ai pazienti AD. Ciò si verifica in particolar modo nella fase iniziale della deattivazione, riflettendo una diversa reattività e capacità di adattamento della rete di riposo [10].

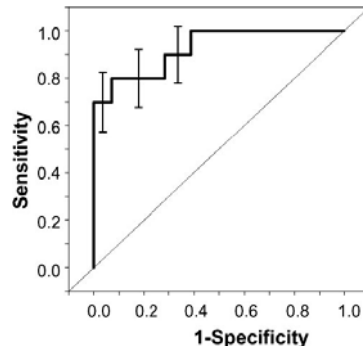


Figura 5.1 Receiver operating curve del marker di sincronia funzionale [6].

Lo studio è stato condotto su un campione di 24 soggetti: 9 controlli anziani, 5 MCI e 10 AD.

Corrispondenza con un template spaziale. I dati funzionali sono elaborati mediante analisi delle componenti indipendenti; segue la selezione della IC associata alla DMN ed il calcolo del livello di somiglianza (*goodness-of-fit score*) tra la componente scelta ed il *template* della rete di riposo [4].

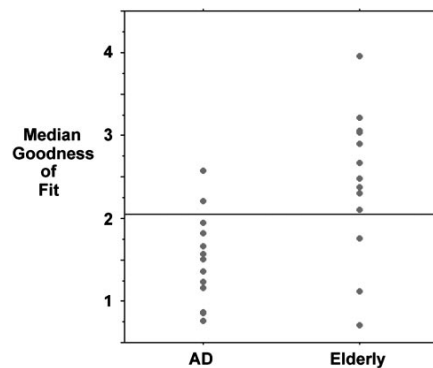


Figura 5.2 Scatterplot del marker AD basato sulla corrispondenza tra rete di riposo e template spaziale. Lo studio è stato condotto su un campione di 26 soggetti (13 controlli anziani e 13 soggetti affetti da AD). Scegliendo una soglia discriminativa pari a 2,1 è raggiunta una **sensività** dell'**85%** ed una **specificità** del **77%** [4].

5.3 Ricerca di un nuovo test diagnostico

Nell'articolo sopra indicato [4], Greicius e colleghi valutano la corrispondenza tra *template* e *default mode network* in base ad un criterio sia spaziale che temporale.

Il calcolo del *goodness-of-fit score* prevede la valutazione della correlazione tra segnale di ogni voxel e *time course* della IC associata alla rete di riposo; il valore trovato è espresso in termini di z-score. Dallo z-score medio dei voxel appartenenti al *template* viene quindi sottratto lo z-score medio dei voxel che non ne fanno parte; questa differenza viene assunta come *goodness-of-fit score* della componente indipendente.

Nel presente lavoro di tesi è stata indagata la possibilità di realizzare un test diagnostico in base alla sola conformità spaziale della rete di riposo con il *template* della *default mode network*.

Ciò viene compiuto calcolando per ogni componente della decomposizione ICA-fMRI il coefficiente di correlazione spaziale con il *template* della *default mode network*, ottenuto mediante sogICA delle serie funzionali di sette controlli giovani come precedentemente descritto nel Capitolo 4. Come IC associata alla rete di riposo viene scelta la componente caratterizzata dalla massima correlazione; tale correlazione rappresenta il parametro discriminativo del test diagnostico.

5.4 Stabilità del coefficiente di correlazione

Per poter impiegare il coefficiente di correlazione come marker AD è necessario dimostrarne la stabilità su più serie funzionali del singolo paziente, acquisite in una medesima sessione MRI: tale valore deve infatti essere rappresentativo della condizione patologica del soggetto.

Questa valutazione è stata ripetuta per le quattro classi di soggetti (controlli giovani, controlli anziani, MCI e AD), poichè il contesto fisio-patologico potrebbe determinare una differente risposta al test diagnostico.

Per ogni serie funzionale sono state eseguite tre decomposizioni ICA. L'algoritmo ICA non è deterministico, e ripetuto sugli stessi dati trova componenti indipendenti leggermente diverse; occorre pertanto valutare se e in che misura tale variabilità aggiuntiva possa influenzare l'efficacia diagnostica del test.

Sono di seguito riportati i risultati dello studio di stabilità.

Stabilità della RSN

			run1	run2	run3
Controlli giovani	CADA	part1	0,1022	0,0847	0,0723
		part2	0,2525	0,2725	0,2580
		part3	0,2166	0,2158	0,2205
		part4	0,1612	0,1602	0,1671

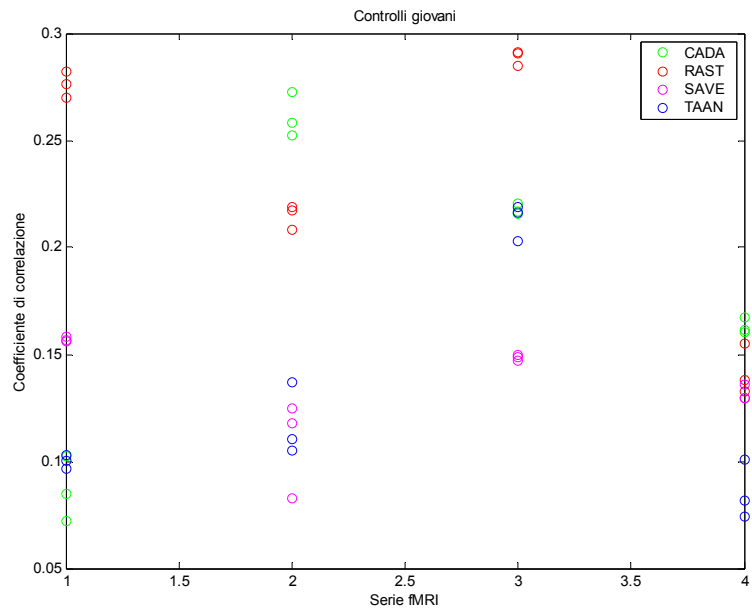
	RAST	part1	0,2701	0,2761	0,2823
		part2	0,2084	0,2171	0,2191
		part3	0,2908	0,2847	0,2913
		part4	0,1382	0,1325	0,1549
	SAVE	part1	0,1563	0,1565	0,1583
		part2	0,1246	0,1177	0,0825
		part3	0,1485	0,1469	0,1500
		part4	0,1358	0,1295	0,1296
	TAAN	part1	0,1027	0,1003	0,0963
		part2	0,1369	0,1051	0,1105
		part3	0,2031	0,2162	0,2188
		part4	0,0744	0,0818	0,1006
Controlli anziani	CUST	part1	0,1986	0,1875	0,1666
		part2	0,1067	0,0964	0,0836
		part3	0,1489	0,1433	0,1518
		part4	0,1291	0,1145	0,1225
MCI	DELI	part1	0,3001	0,2966	0,2796
		part2	0,2368	0,2439	0,2326
	ORLU	part1	0,1934	0,1955	0,1936
		part2	0,2463	0,2531	0,2445
		part3	0,1223	0,1106	0,113
		part4	0,0730	0,0679	0,0686
	SADE	part1	0,0984	0,1324	0,1364

		part2	0,2229	0,1735	0,2240
		part3	0,1616	0,1398	0,145
		part4	0,1049	0,1094	0,1134
	TAGR	part1	0,3306	0,3231	0,3312
		part2	0,3096	0,3190	0,3100
		part3	0,3535	0,3540	0,3585
		part4	0,2620	0,2672	0,2676
AD	FRPI	part1	0,1860	0,1945	0,2051
		part2	0,2135	0,2159	0,2105
		part3	0,1958	0,1355	0,2337
		part4	0,1690	0,1541	0,1571
	SCAR	part1	0,0884	0,1093	0,1009
		part2	0,0639	0,0738	0,0650
	TAAL	part1	0,1224	0,1081	0,1088
		part2	0,0950	0,1132	0,1309
	VIFI	part1	0,2186	0,2026	0,2023
		part2	0,0842	0,0832	0,0887
		part3	0,0906	0,0847	0,0759

Tabella 5.2 Valutazione della stabilità del coefficiente di correlazione.

Per ogni soggetto sono state ripetute tre decomposizioni ICA (run 1-3) per ogni serie funzionale (part 1-4).

A



B

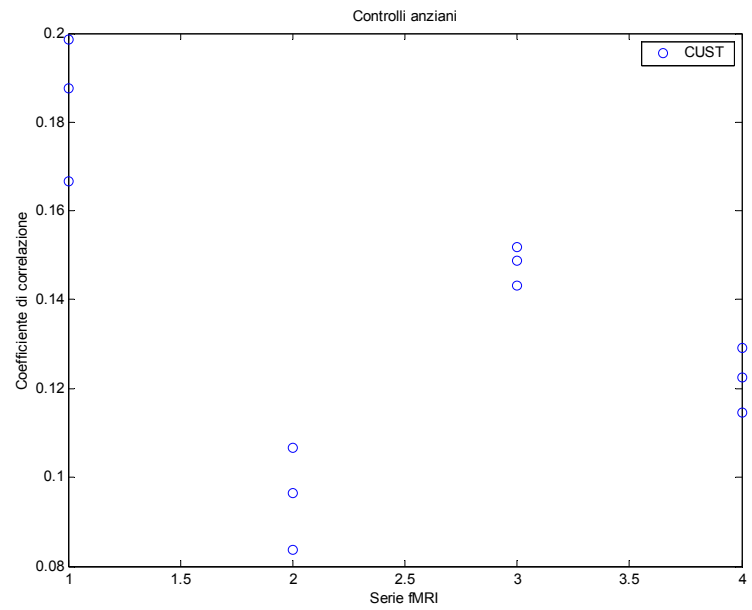
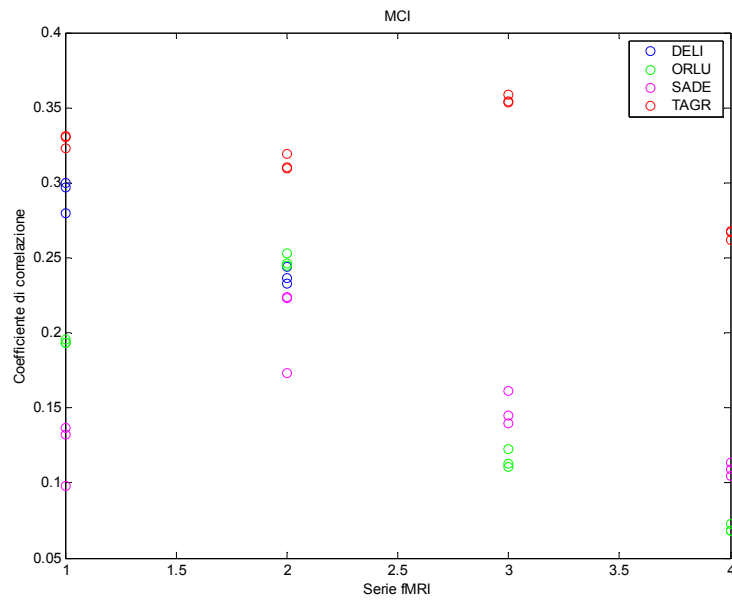


Figura 5.3 Valutazione della stabilità del coefficiente di correlazione.

Risultati ottenuti dalla decomposizione ICA di serie funzionali consecutive acquisite in una medesima sessione di esame. **A** Controlli giovani. **B** Controlli anziani.

C



D

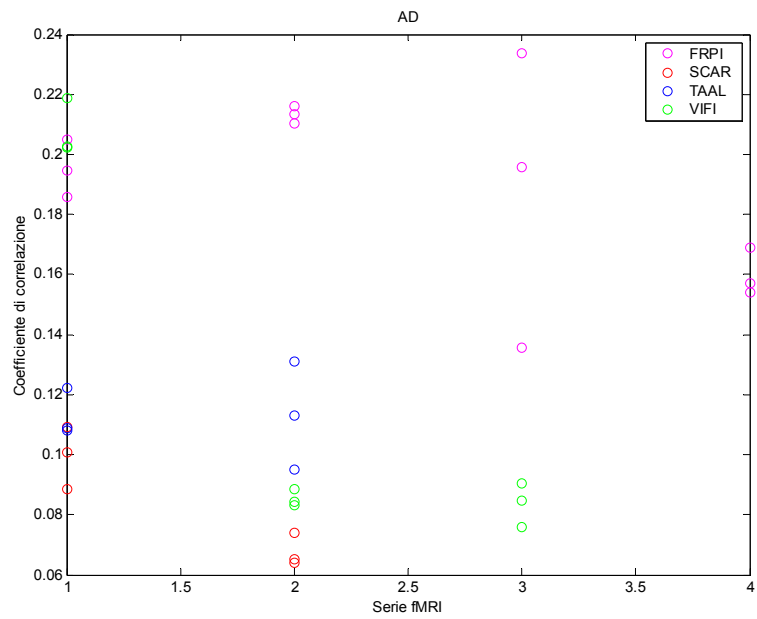


Figura 5.4 Valutazione della stabilità del coefficiente di correlazione.

Risultati ottenuti dalla decomposizione ICA di serie funzionali consecutive acquisite in una medesima sessione di esame. **C** Pazienti MCI. **D** Pazienti AD.

5.5 Potere discriminativo del test diagnostico

Una volta verificata la stabilità del coefficiente di correlazione e la ridotta variabilità introdotta dall'algoritmo ICA, è possibile procedere alla scelta di una soglia discriminativa per il parametro diagnostico.

Controlli giovani	Correlazione
CADA	0,2166
BAVI	0,1245
DUIV	0,1367
PIMA	0,1545
RAST	0,2701
SAVE	0,1485
TAAN	0,1369
 Controlli anziani	
CISA	0,1043
CORE	0,1511
CRIO	0,1267
CUST	0,1489
FRAN	0,1975
GOAN	0,2079
GUGI	0,1226
MARO	0,1180
PALU	0,0855
TRLI	0,1213

MCI

DELI	0,2368
ORLU	0,1934
ROLU	0,0919
SADE	0,1616
TAGR	0,3306

AD

FRPI	0,1958
BAMA	0,0738
GRBR	0,0850
MAMA	0,0972
MAVA	0,0833
SCAR	0,0884
STNO	0,0841
TAAL	0,1236
VIFI	0,0906

Tabella 5.3 Valore di correlazione rappresentativo di ciascun soggetto.

Non sono compresi tra i controlli giovani i soggetti da cui è stato tratto il *template*.

Ove disponibili più acquisizioni funzionali di uno stesso soggetto, è stata scelta come valore rappresentativo la mediana tra i coefficienti di correlazione spaziale delle prime tre serie fMRI. La mediana è stata preferita alla media perchè è meno sensibile alla presenza di *outliers*.

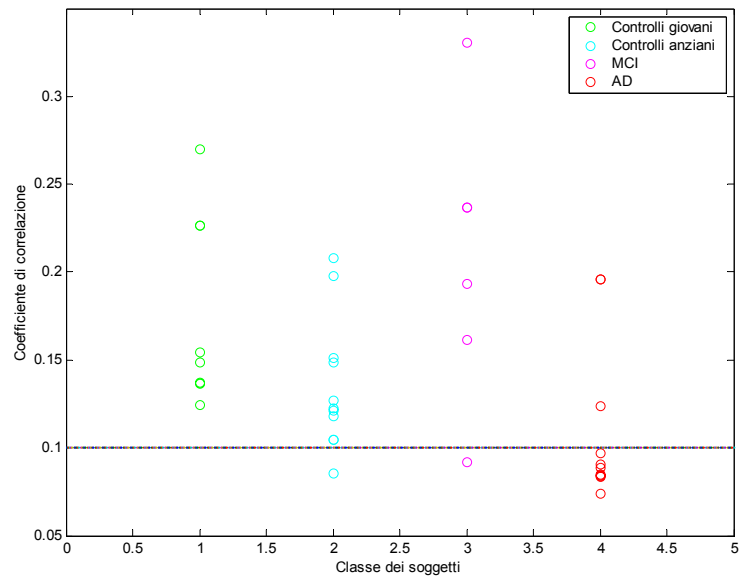


Figura 5.5 Efficacia del test diagnostico (soglia discriminativa = 0.1)

Non sono compresi tra i controlli giovani i soggetti da cui è stato ottenuto il *template*.

Fissando la soglia discriminativa a 0.1, i controlli anziani sono distinti dai soggetti AD con una **sensitività** del 77% e una **specificità** del 90%.

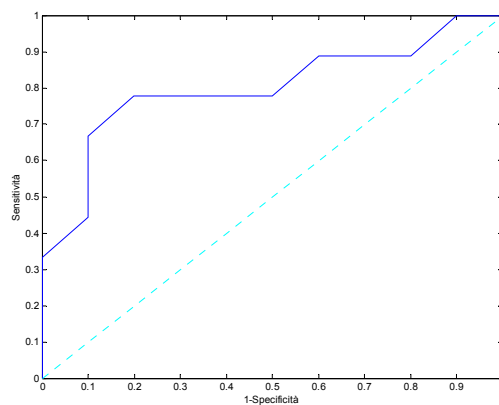


Figura 5.6 Curva ROC del test diagnostico

Tutti i controlli giovani sono caratterizzati da un coefficiente di correlazione spaziale superiore a 0,1. Ciò concorda con il fatto che appartengono a tale categoria i soggetti da cui è stato tratto il *template* della *default mode network*. Dei 5 soggetti MCI dello studio, uno soltanto possiede un coefficiente di correlazione inferiore a 0.1.

Bibliografia

1. Carmichael OT, Aizenstein HA, Davis SW, Becker JT, Thompson PM, Meltzer CC, Liu Y. Atlas-based hippocampus segmentation in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Neuroimage*. 2005 Oct 1;27(4):979-90.
2. Chetelat G, Landeau B, Eustache F, Mezenge F, Viader F, de la Sayette V, Desgranges B, Baron JC. Using voxel-based morphometry to map the structural changes associated with rapid conversion in MCI: a longitudinal MRI study. *Neuroimage*. 2005 Oct 1;27(4):934-46.
3. Chong MS, Sahadevan S. Preclinical Alzheimer's disease: diagnosis and prediction of progression. *Lancet Neurol*. 2005 Sep;4(9):576-9.
4. Greicius MD, Srivastava G, Reiss AL, Menon V. Default-mode network activity distinguishes Alzheimer's disease from healthy aging: evidence from functional MRI. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Mar 30;101(13):4637-42.
5. Johnson KA, Jones K, Holman BL, Becker JA, Spiers PA, Satlin A, Albert MS. Preclinical prediction of Alzheimer's disease using SPECT. *Neurology*. 1998 Jun;50(6):1563-71.

6. Li SJ, Li Z, Wu G, Zhang MJ, Franczak M, Antuono PG. Alzheimer Disease: evaluation of a functional MR imaging index as a marker. *Radiology*. 2002 Oct;225(1):253-9.
7. Minoshima S, Giordani B, Berent S, Frey KA, Foster NL, Kuhl DE. Metabolic reduction in the posterior cingulate cortex in very early Alzheimer's disease. *Ann Neurol*. 1997 Jul;42(1):85-94.
8. Osipova D, Ahveninen J, Jensen O, Ylikoski A, Pekkonen E. Altered generation of spontaneous oscillations in Alzheimer's disease. *Neuroimage*. 2005 Oct 1;27(4):835-41.
9. Reiman EM, Chen K, Alexander GE, Caselli RJ, Bandy D, Osborne D, Saunders AM, Hardy J. Functional brain abnormalities in young adults at genetic risk for late-onset Alzheimer's dementia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Jan 6;101(1):284-9.
10. Rombouts SA, Barkhof F, Goekoop R, Stam CJ, Scheltens P. Altered resting state networks in mild cognitive impairment and mild Alzheimer's disease: an fMRI study. *Hum Brain Mapp*. 2005 Dec;26(4):231-9.

Appendice A

COMPONENTI INDIPENDENTI ASSOCIATE ALLA DEFAULT MODE NETWORK

Tra le 30 componenti indipendenti prodotte dalla decomposizione ICA, è di seguito riportata per ogni soggetto dello studio la IC maggiormente correlata con il *template* della *default mode network*. Le immagini sono centrate sulle coordinate $x = 2, y = -18, z = 17$ dello spazio di Talairach.

➤ Controlli giovani (template)

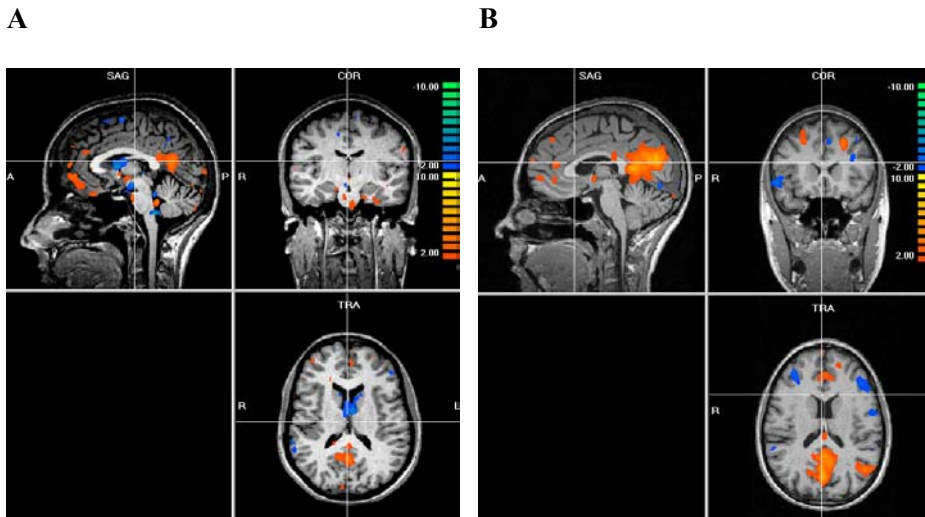
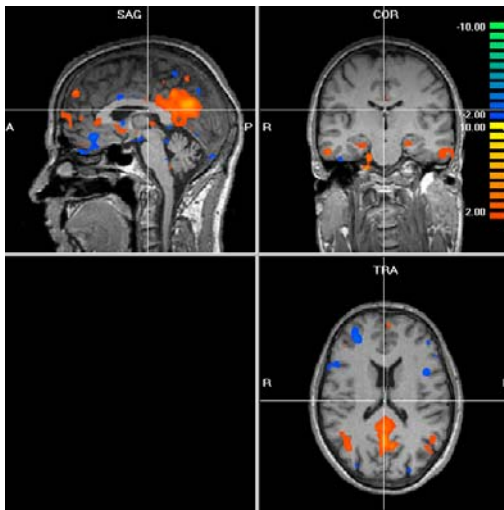


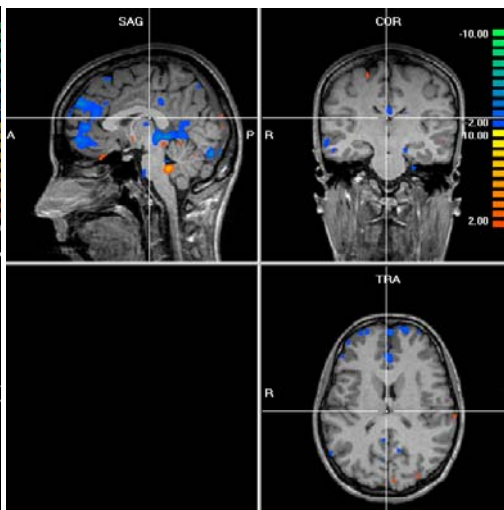
Fig. A.1 Controlli giovani appartenenti al template

A. BALU B. BIEL

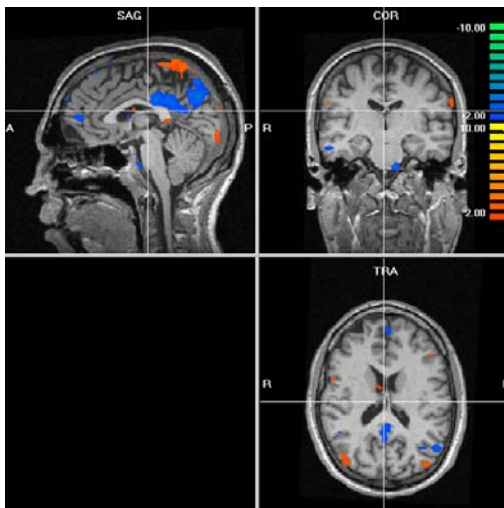
A



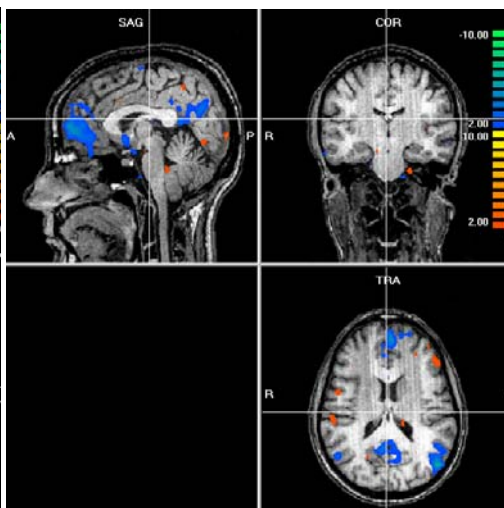
B



C



D



E

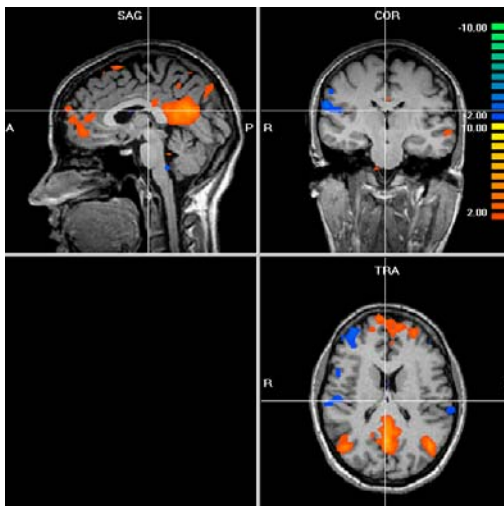


Fig. A.2 Controlli giovani (template)

A. CIPA B. FEBE C. RIPI

D. TOAN E. TRIL

➤ **Controlli giovani (non appartenenti al template)**

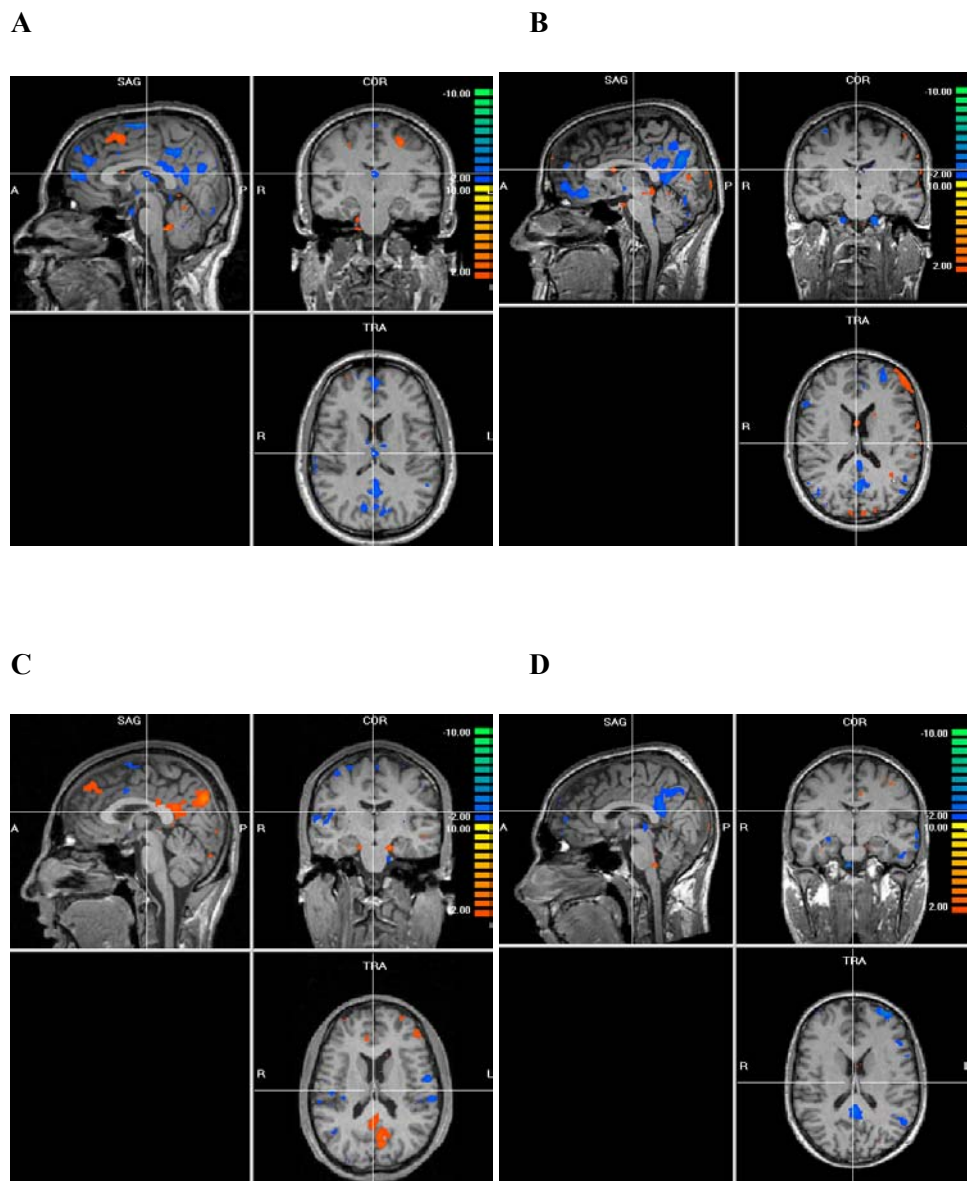


Fig. A.3 Controlli giovani non appartenenti al template spaziale

A. BAVI B. CADA C. DUIV D. PIMA

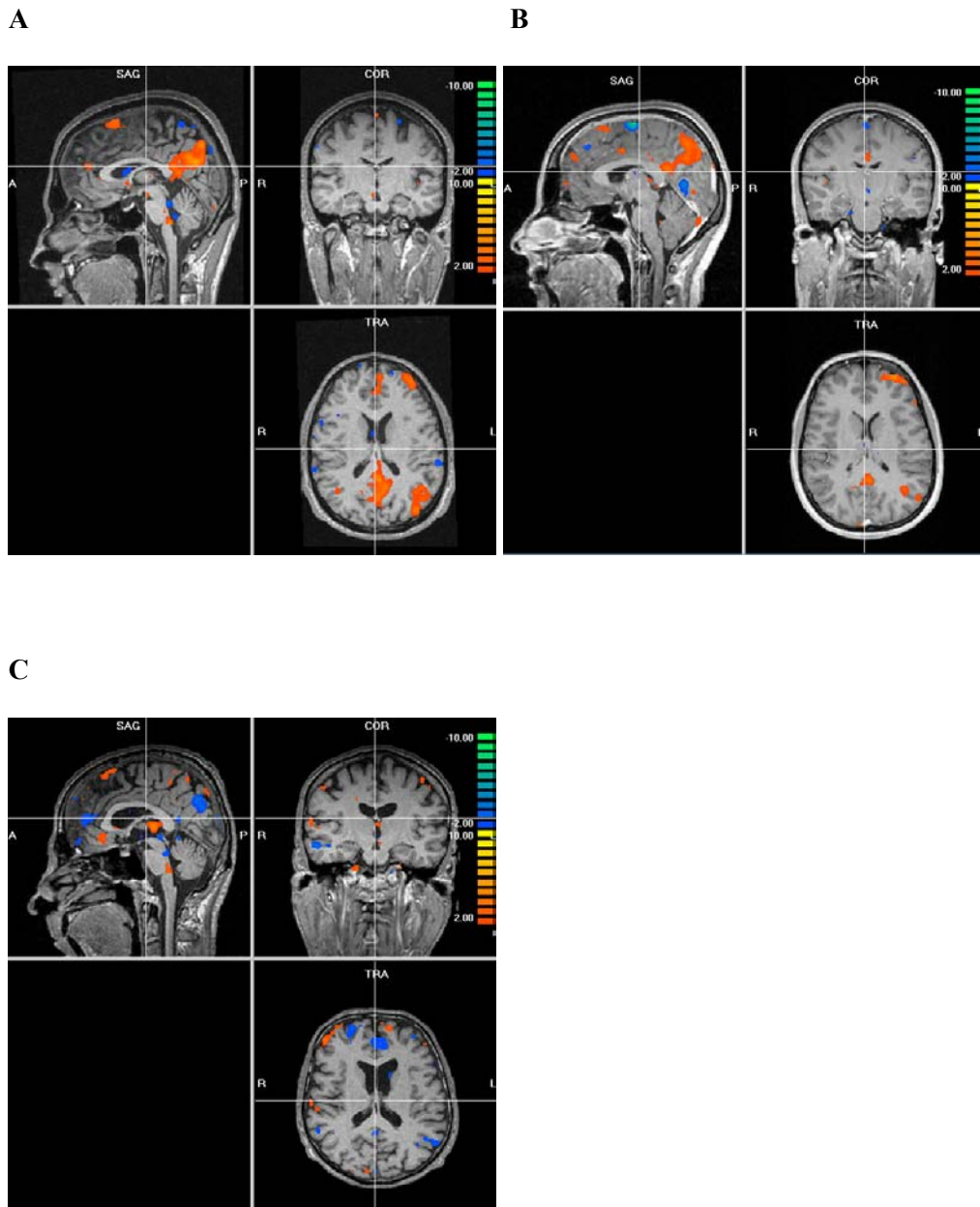


Fig. A.4 Controlli giovani non appartenenti al template spaziale

A. RAST **B.** SAVE **C.** TAAN

➤ **Controlli anziani**

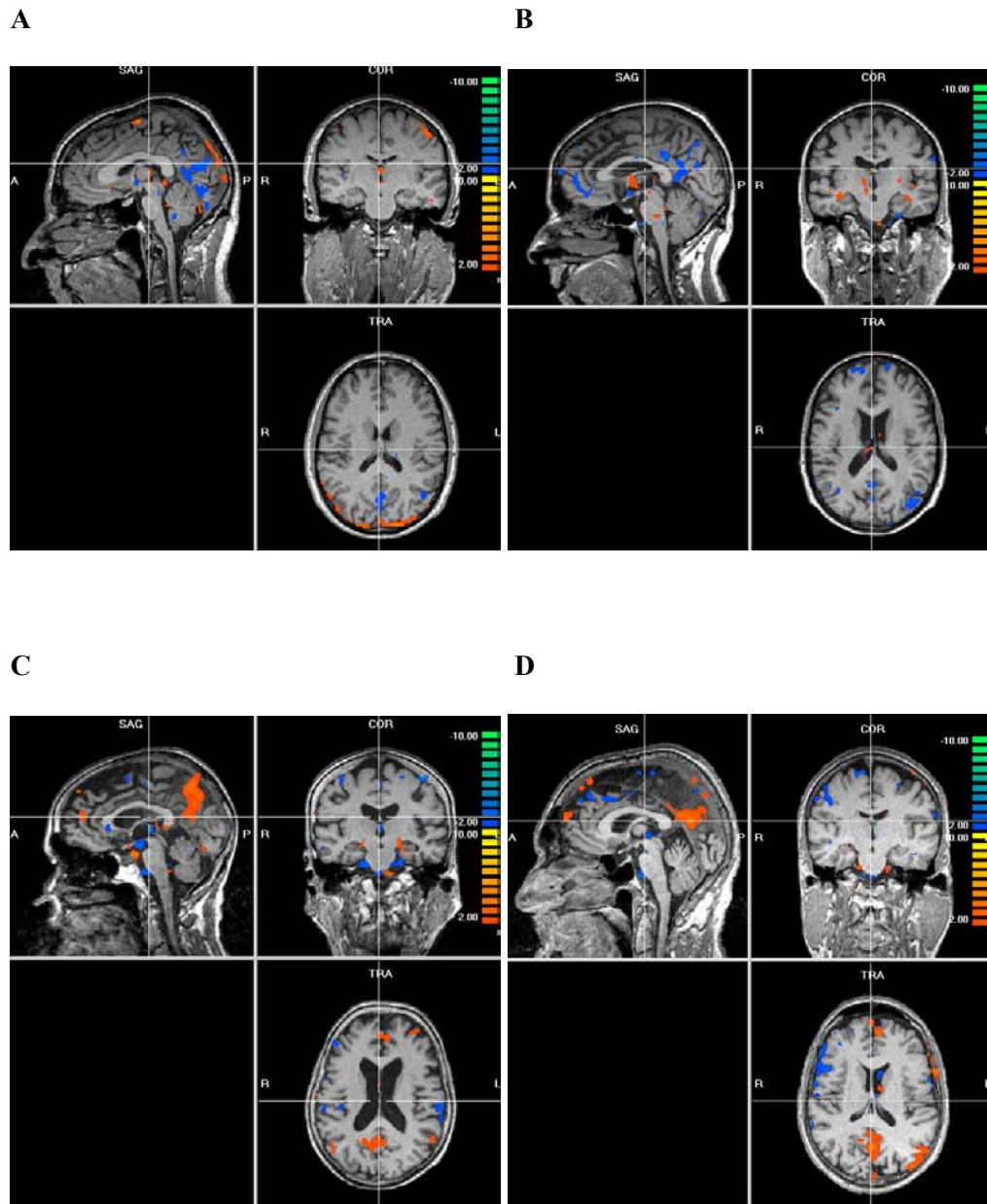


Fig. A.5 Controlli anziani **A.** CISA **B.** CORE **C.** CRIO **D.** CUST

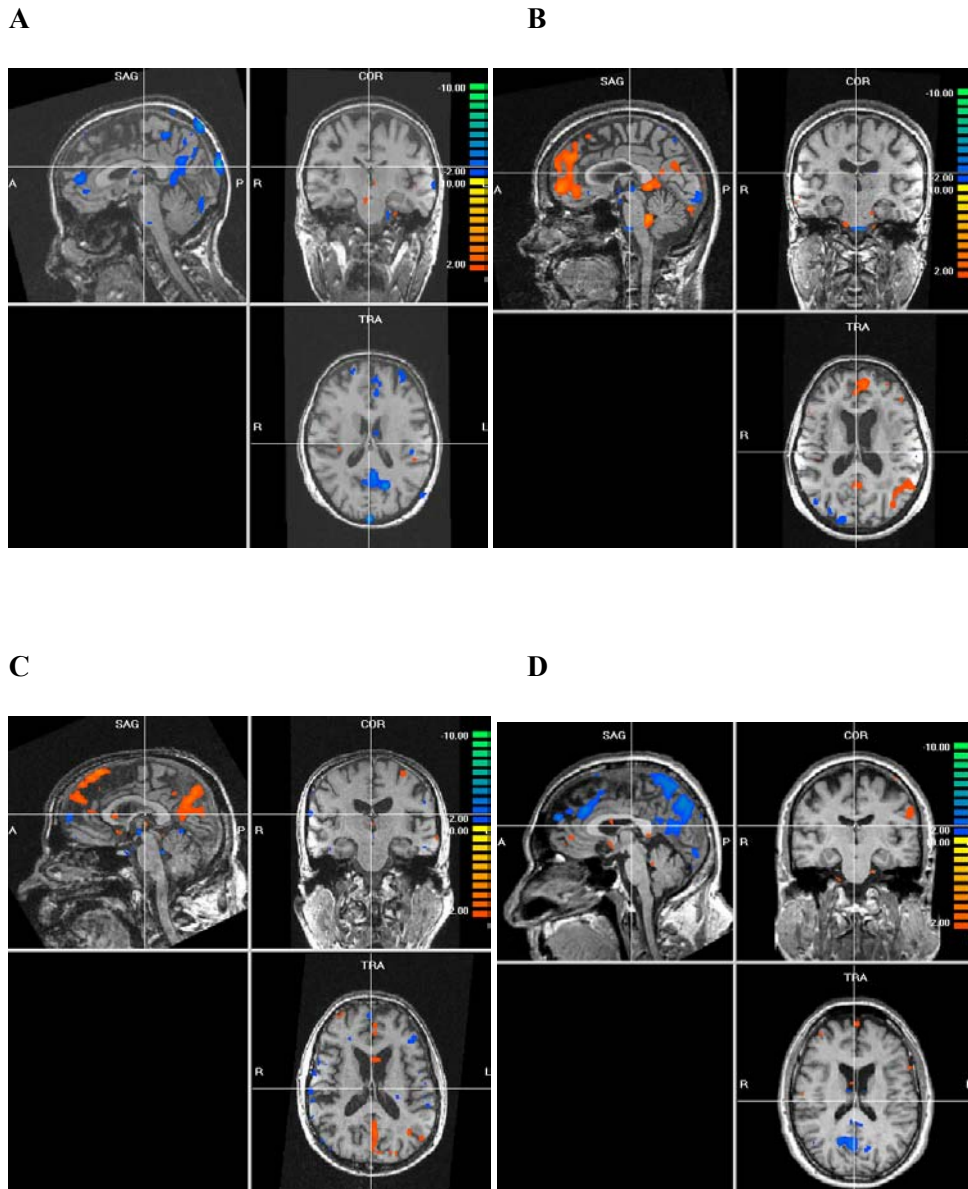


Fig. A.6 Controlli anziani

A. FRAN B. GOAN C. GUGI D. MARO

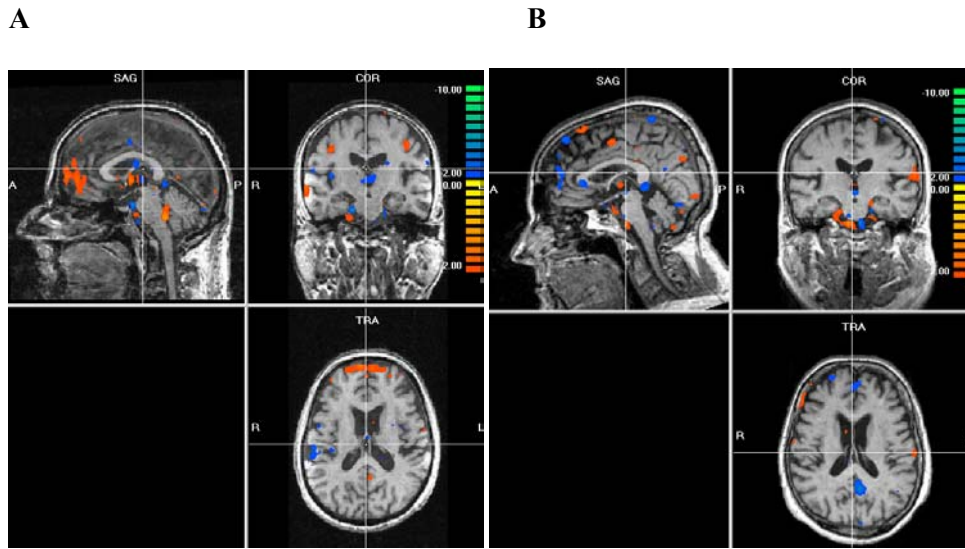


Fig. A.7 Controlli anziani A. PALU B. TRLI

➤ Pazienti MCI

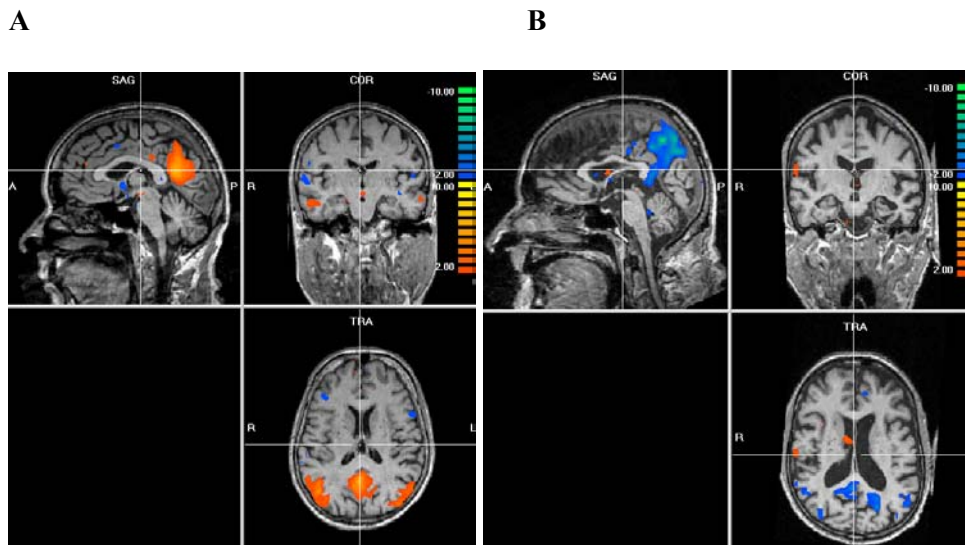
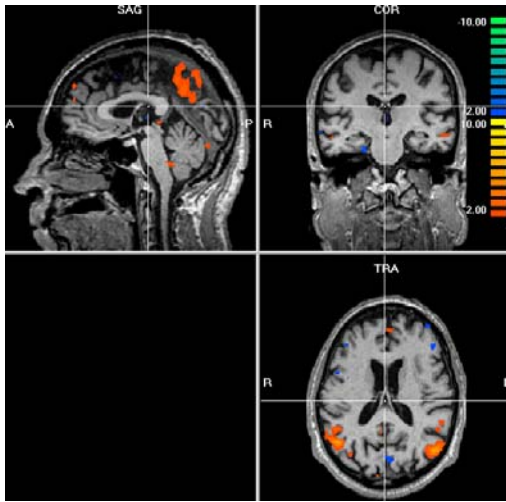
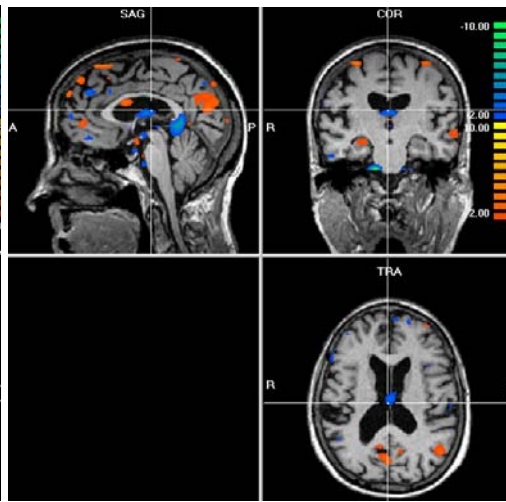


Fig. A.8 Pazienti MCI A. DELI B. ORLU

A



B



C

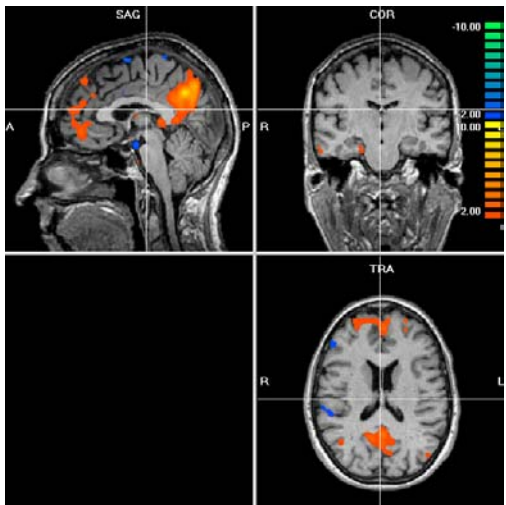


Fig. A.9 Pazienti MCI A. ROLU B. SADE C. TAGR

➤ Pazienti AD

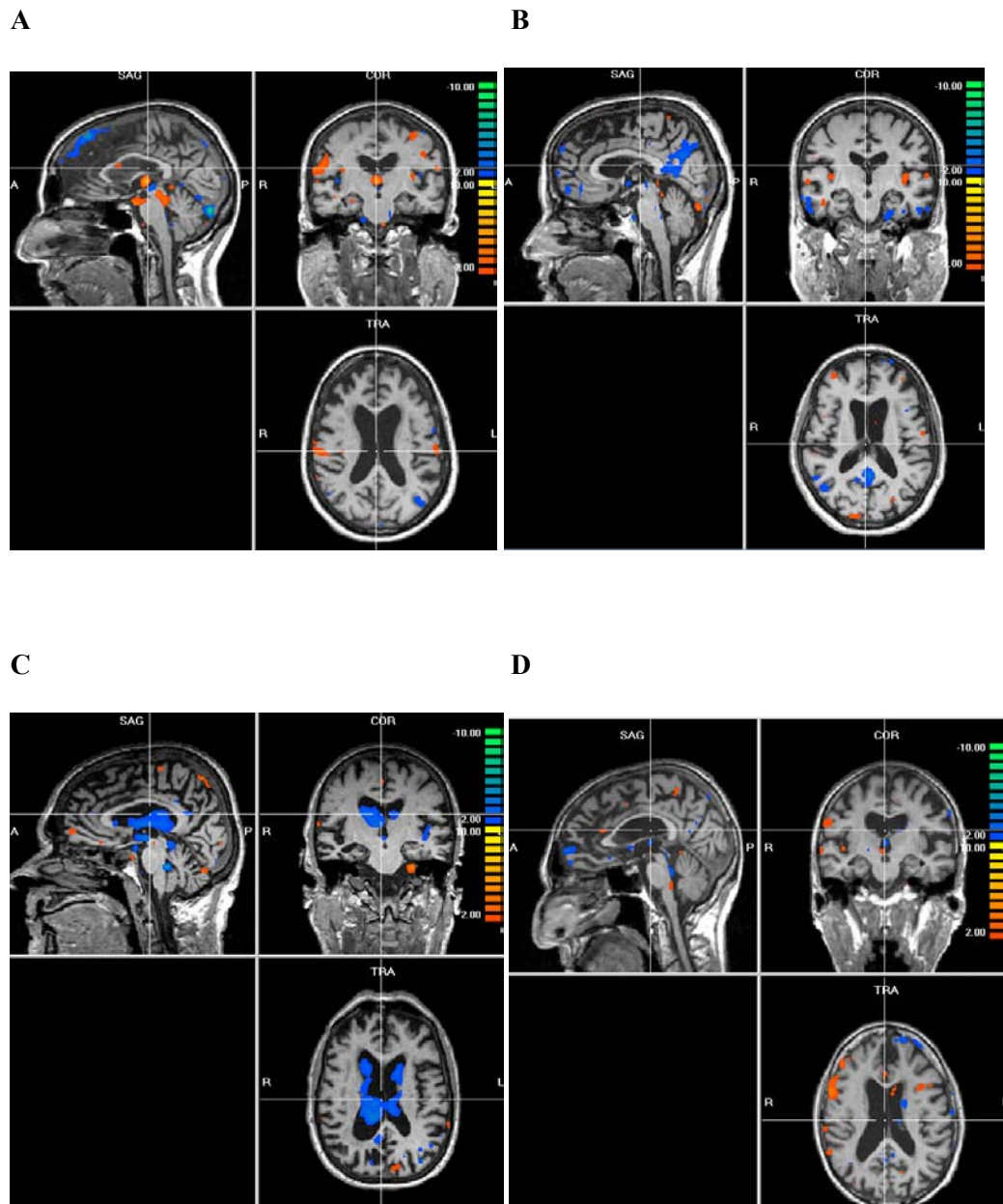
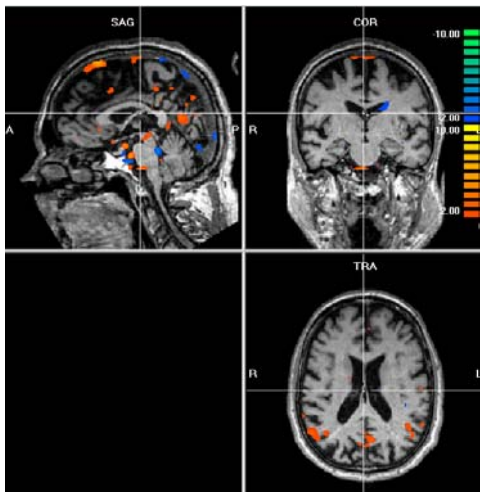
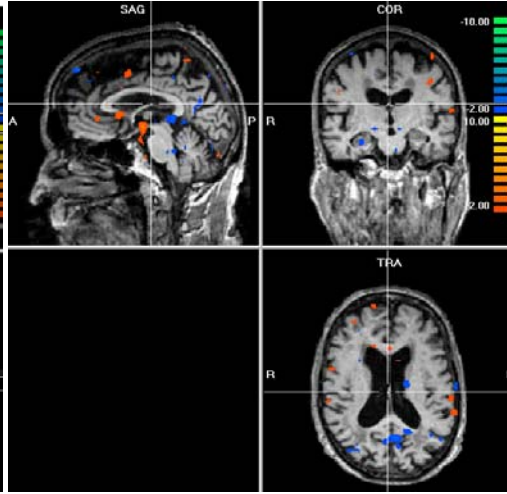


Fig. A.10 Pazienti AD A. BAMA B. FRPI C. GRBR D. MAMA

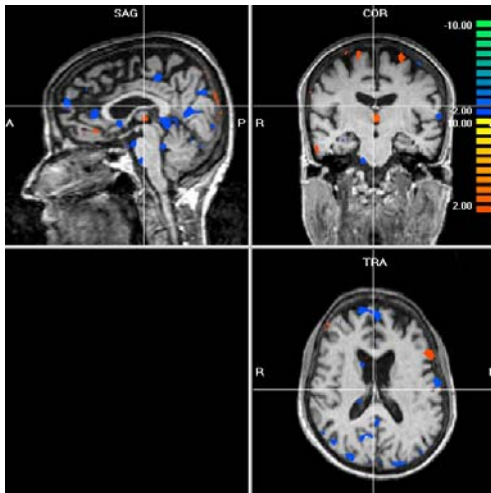
A



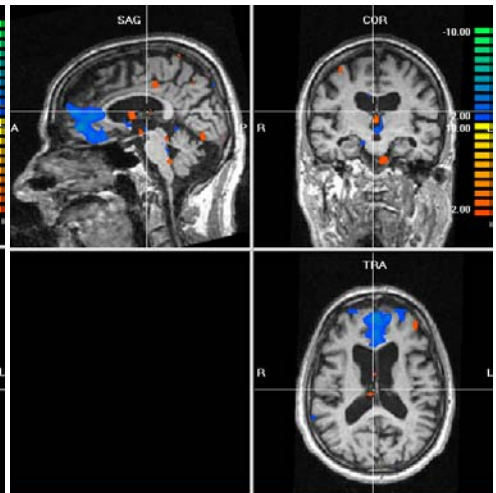
B



C



D



E

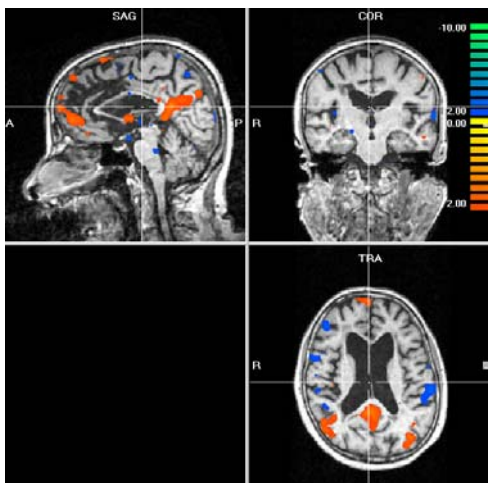


Fig. A.11 Pazienti AD

A. MAVA B. SCAR C. STNO

D. TAAL E. VIFI

Appendice B

MAPPA DI BRODMANN DELLE AREE CORTICALI

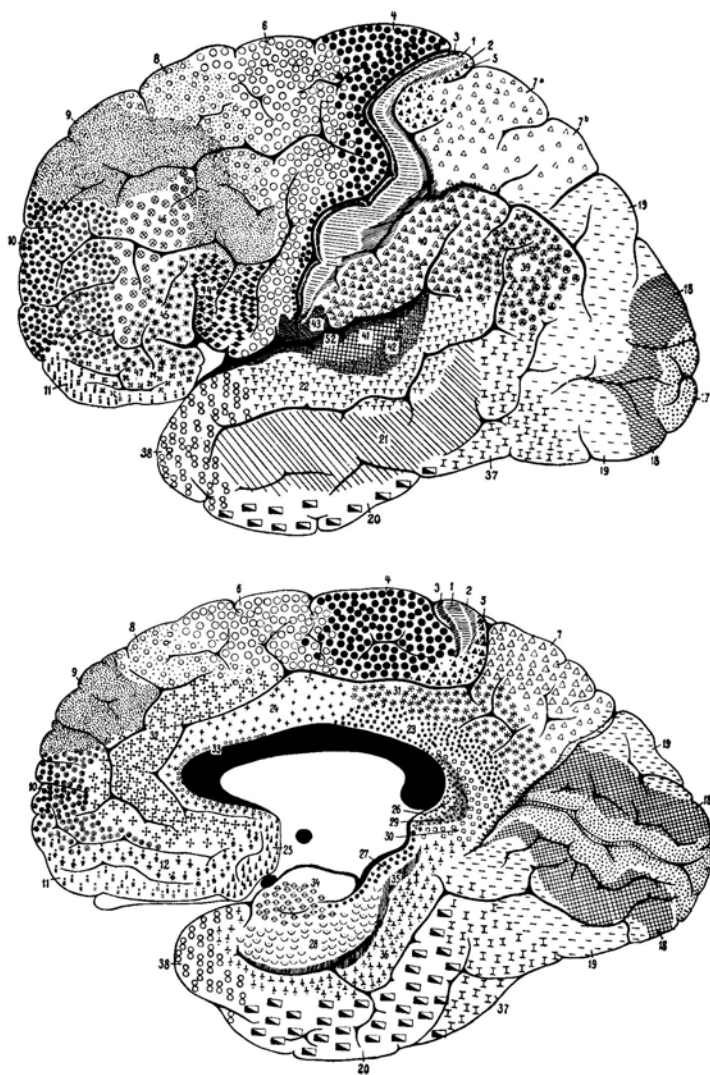


Figura B Mappa di Brodmann delle aree corticali

Publicata nel 1909 dal neurologo tedesco Korbinian Brodmann, è ad oggi la più adottata mappa citoarchitettonica delle aree corticali.

Appendice C

CLASSIFICAZIONE DEI TIPI DI MEMORIA

In base alla durata della ritenzione la memoria può essere distinta in:

- **sensoriale.** Raccoglie le informazioni grezze appena percepite e dura solo alcuni secondi.
- **a breve termine.** Conserva i ricordi delle ultime ore.
- **a lungo termine.**

In base al tipo di informazione è invece possibile distinguere tra:

- **memoria dichiarativa.** Trattiene informazioni comunicabili, il cui ricordo può essere richiamato consciamente. Può essere a sua volta suddivisa in **episodica** (informazioni relative ad un particolare contesto) e **semantica** (idee ed affermazioni indipendenti da uno specifico episodio). Un particolare tipo di memoria episodica è rappresentato dalla memoria **autobiografica**.
- **memoria procedurale.** Raccoglie le informazioni relative ai comportamenti automatici; riguarda soprattutto abilità motorie e fonetiche, apprese con l'esercizio ed utilizzate inconsciamente.

Nell'ambito della psicologia cognitiva è definita **working memory** la collezione di strutture e processi utili ad immagazzinare temporaneamente e gestire le informazioni.

Appendice D

TWO-STREAMS HYPOTHESIS

Secondo un'ipotesi ampiamente condivisa riguardo all'elaborazione visiva, l'informazione sensoriale in uscita dall'area visiva primaria (V1) segue due canali principali chiamati *ventral stream* (o “*what*” pathway) e *dorsal stream* (o “*where*” pathway) [58].

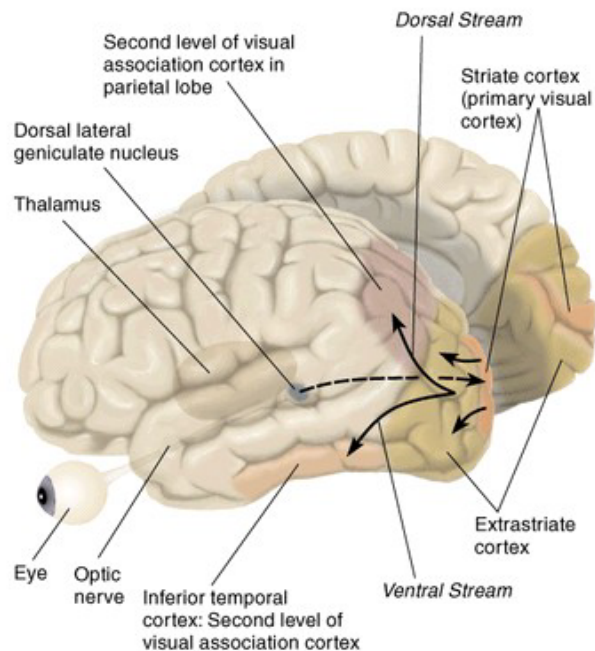


Figura D *Dorsal stream e ventral stream*

La via ventrale si dirige verso il lobo temporale; è coinvolta nell'identificazione degli oggetti e nella rappresentazione delle forme.

La via dorsale si porta invece verso il lobo parietale; è implicata nella localizzazione spaziale, nella guida delle azioni, nel rilevamento e nell'analisi dei movimenti.

Appendice E

ELENCO DELLE ABBREVIAZIONI

$[Ca^{++}]_i$	concentrazione intracellulare dello ione Ca^{++}
AA	Arachidonic Acid
AC	commissura anteriore
AD	Alzheimer's Disease
BA	Brodman Area
BOLD	Blood Oxygenation Level Dependent
BSS	Blind Source Separation
BVN	Blood Vessel Network
CBF	Cerebral Blood Flow
CO ₂	anidride carbonica
COX	cicloossigenasi
CSF	Cerebrospinal Fluid
DICOM	Digital Imaging and Communications in Medicine
DLPFC	Dorso-Lateral Prefrontal Cortex
DMN	Default Mode Network
DTPA	DiethyleneTriaminePentaAcetic Acid
EEG	elettroencefalogramma
EPI	Echo Planar Imaging
ERC	corteccia entorinale
fcMRI	functional connectivity MRI
fMRI	Functional Magnetic Resonance Imaging

FWHM	Full Width at Half Maximum
Gd	gadolinio
GLM	General Linear Model
Glu	glutammato
HC	ippocampo
IC	componente indipendente
ICA	Independent Component Analysis
IPC	Inferior Parietal Cortex
MCI	Mild Cognitive Impairment
mGluR	recettore metabotropo per glutammato
MPFC	Medial Prefrontal Cortex
MR	Magnetic Resonance
MRI	Magnetic Resonance Imaging
MTL	Medial Temporal Lobe
NMDA	N-methyl-D-aspartic acid
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NO	Nitric Oxide
NOS	Nitric Oxide Synthase
OFC	Orbitofrontal Cortex
PC	commissura posteriore
PCA	Analisi delle Componenti Principali
PCC	Posterior Cingulate Cortex
PDW	Proton Density Weighted
PET	Positron Emission Tomography
PGE ₂	prostaglandina E ₂
PI	fosfatidil inositolo
PLA ₂	fosfolipasi A ₂

PMA	Premotor area
PPC	Posterior Parietal Cortex
rCBF	regional Cerebral Blood Flow
RF	Radio Frequency
ROC	Receiver Operating Curve
ROI	Region of Interest
RSN	Resting State Network
SII	area somatosensoriale secondaria
SLF	Spontaneous Low-frequency Fluctuation
SMA	Supplementary Motor Area
SNR	Signal-to-Noise Ratio
sogICA	self organizing group ICA
SPECT	Single Photon Emission Computer Tomography
T1W	T ₁ Weighted
T2W	T ₂ Weighted
TAC	Tomografia Assiale Computerizzata
TC	Time Course
TE	Time of Echo
TI	Time of Inversion
TR	Time of Repetition
vACC	ventral Anterior Cingulate Cortex
VOI	Volume of Interest
V1	area visiva primaria

CONCLUSIONI

Nel presente lavoro di tesi sono state realizzate e descritte tutte le fasi di uno studio di risonanza magnetica funzionale dello stato di riposo, dall'acquisizione delle immagini alla elaborazione dei dati mediante analisi delle componenti indipendenti.

Oggetto di ricerca è stata la presenza di alterazioni della connettività cerebrale spontanea in pazienti affetti dalla sindrome di Alzheimer.

La connettività funzionale è stata valutata mediante correlazione spaziale delle componenti indipendenti con un template della *default mode network* ottenuto mediante *self organizing group ICA* delle serie funzionali di 7 controlli giovani.

Prima di procedere alla definizione della soglia discriminativa del test diagnostico, sono state valutate la stabilità del marker AD nei soggetti appartenenti ai quattro gruppi dello studio (controlli giovani, controlli anziani, pazienti MCI e pazienti AD) e la variabilità introdotta dall' algoritmo ICA nel coefficiente di correlazione.

Il marker AD permette il riconoscimento dei controlli anziani e dei soggetti affetti dalla sindrome di Alzheimer con una sensibilità del 77% e una specificità del 90% (sono classificati correttamente 7 dei 9 pazienti AD e 9 tra i 10 controlli anziani).

Il test diagnostico possiede sensibilità e specificità paragonabili ai marker descritti in letteratura. Presenta inoltre importanti vantaggi: l'acquisizione MRI è di breve durata (la serie funzionale è composta da soli 60 volumi) e prescinde dalla collaborazione attiva del paziente; l'elaborazione

dei dati non prevede infine la segmentazione delle immagini, procedura laboriosa e fortemente dipendente dall'operatore.

Rispetto alla distinzione dei pazienti AD dai controlli anziani, avrebbe una maggiore rilevanza clinica l'individuazione tra i pazienti affetti da Mild Cognitive Impairment di quei soggetti che stanno per essere colpiti dalla sindrome di Alzheimer (il tasso di conversione annuo è pari al 12%). Ciò permetterebbe infatti il trattamento precoce della malattia, con conseguente miglioramento del decorso clinico del paziente.

Lo studio svolto è di tipo trasversale, pertanto non consente questo tipo di valutazione, raggiungibile invece con uno studio longitudinale del campione in esame.

Monitorando il *follow-up* dei soggetti MCI che hanno partecipato allo studio sarebbe possibile seguire l'evoluzione della malattia in parallelo alla correlazione spaziale con il *template* della *default mode network*. Dalla corrispondenza tra decorso clinico e marker AD potrebbe essere dedotto il potere predittivo del parametro diagnostico.

Alterazioni della connettività cerebrale spontanea sono state riscontrate in altre patologie sia neurologiche che psichiatriche, tra cui sclerosi multipla e schizofrenia. Questa metodica di indagine potrebbe essere quindi applicata non solo alla sindrome di Alzheimer, ma più in generale a tutte le malattie cui risultino associate variazioni della connettività funzionale nello stato di riposo.